

知识介绍

多孔脂肪族聚酯组织工程支架的制备方法及其改进

王振林* 万 涛 闫玉华

(武汉理工大学 生物材料与工程研究中心, 武汉 430070)

摘要:生物可降解人工合成脂肪族聚酯类聚合物支架已广泛应用于组织工程中, 人们开发了多种方法制备多孔 PLLA, PGA 及其共聚物支架, 并通过对这些方法的改进或多种方法的结合提高孔隙率, 改善孔结构。本文介绍了这些制备方法及其改进措施的研究进展。

关键词:可生物降解; 聚脂肪酸; 组织工程; 多孔支架

引 言

组织工程中需要采用可生物降解的合成聚合物作支架。利用合成可降解的聚合物支架, 结合细胞的培养繁殖和生长因子促进组织形成, 再生软骨、骨骼、肌腱、肌肉甚至肝、胰等组织细胞及器官, 为细胞移植开辟道路(如图 1 所示)。一种支架材料应具备以下性能^[1~3](1)三维高孔隙率的联通孔网结构;(2)生物相容性及可控生物降解吸收性;(3)表面化学活性;(4)与植入位组织相匹配的机械性质。其中高孔隙率的联通孔网结构可保证支架内细胞和周围宿主组织间正常的物质运输, 并为毛细血管的长入提供空间。人工合成脂肪族聚酯类聚合物如聚乳酸(PLLA)、聚羟基乙酸(PGA)及其共聚物(PLGA)是能用于人类临床的少数合成聚合物中的几种, 并获得了美国食品药品监督管理局(FDA)的临床应用认可, 它们不仅具有生物相容性、生物可降解及易加工性, 而且其理化、机械及降解特性能满足一些特殊的应用^[4,5]。脂肪族聚酯中引入亲水组分或调节其表面电荷、表面能及表面粗糙度能提高支架表面的化学活性如亲水性和细胞亲和性^[6], 聚合物支架中引入羟基磷灰石^[7]、钙磷盐^[8]、生物活性玻璃^[9]、生物可降解硅酸盐^[10]及胶原^[11]可改善支架的生物活性(即生物相容性)、机械及降解特性。制备组织工程支架主要须解决成孔技术问题。

人们开发了多种方法用于制备多孔聚合物支架材料, 如浇铸/沥滤致孔法、乳液冷冻干燥法、气体发泡法、纤维粘结法、分相法、三维印刷法等。这些技术或多或少都存在一些缺点, 如普遍使用有毒有机溶剂、费工费时、聚合物基质中的残余相去除不完全、重复性差、孔的形状不规则、孔联通性差、结构单薄、形状不易控制等, 为改善多孔支架的结构增加孔的联通性, 除了单纯改进某种方法外, 有时还要将多种方法结合采用。本文综述了几种多孔聚合物支架的制备方法、原理及其改进方法。

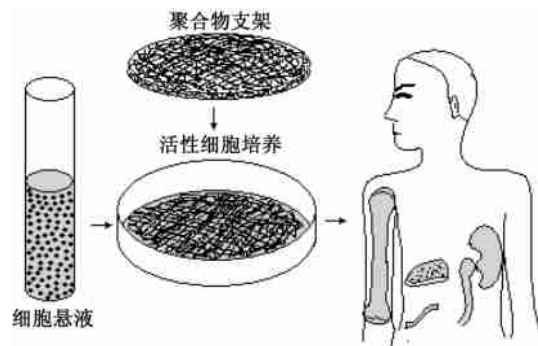


图 1 组织工程支架作用示意图

Figure 1 Illustration for function of tissue-engineering scaffolds

基金项目:武汉理工大学重点科学研究基金;

作者简介:王振林: (1968-), 男, 硕士, 工程师, 研究方向生物医用材料。Email: wyaow515@tom.com Tel: 027-87651853

2 多孔聚合物支架的制备方法及其改进

2.1 纤维联结法

这种方法将聚合物溶液浇铸在聚合物多孔织物上,利用溶剂相挥发和织物的支撑作用制备有一定机械性能的多孔膜。通常将 PLLA 溶解在二氯甲烷及乙酸乙酯混合溶剂中,再浇铸并用手术刀片铺展到聚乙交酯(PGA)网上,于室温在空气中挥发成孔,真空干燥除去残余溶剂,此法可在 PLLA 膜的表面和内层成孔^[12,13],但材料缺乏结构稳定性。可将这种单层膜通过热压模多层叠加制成三维多孔支架。

单一使用二氯甲烷作溶剂完全形成致密结构,而采用二元混合溶剂不仅在膜的表层而且在膜的内层都能成孔,因为当二氯甲烷挥发掉后混合溶剂中剩下的乙酸乙酯浓缩,使 PLLA 聚沉产生分相而在 PLLA 膜内成孔,乙酸乙酯可加快 PLLA 的聚沉,引起膜表面孔径变小^[12],因此可通过控制 PLLA 溶液的溶剂组成来控制膜的孔隙率。另外 PGA 的机械支撑作用对 PLLA 膜的表面孔的形成产生很大的影响,因为溶剂挥发时 PLLA 在表面聚沉会沿 PGA 网粘附,粘附的 PLLA 会给 PGA 网格内聚沉的邻近 PLLA 施加一个张力作用,阻止 PLLA 重排形成致密结构而在膜表面形成多孔 PLLA 网状结构。

纤维联结法还有另外一种^[14],即将 PGA 无纺布物浸入 PLLA 的氯仿溶液中,待溶剂挥发后分段加热至 PLLA 和 PGA 熔点之上,可使 PGA 纤维在其相交处粘结在一起,再加入溶剂溶解去除 PLLA,即得到纤维连结的 PGA 网状支架。在这种方法中,PLLA 熔点较低,先于 PGA 熔化,随即填满纤维间的空隙,而 PGA 与 PLLA 在熔融状态下不相容。这种方法利用了 PLLA 与 PGA 之间溶解性的差异和熔点不同的特点。

2.2 乳液冷冻干燥法

该方法包括三步:聚合物溶液和水均化成乳液,水作为分散相,聚合物溶液作为连续相(油包水型);乳液快速冷却锁定液态结构;通过冷冻干燥除去溶剂和水形成多孔结构。用剪应力均化乳液时,乳液稳定性受相对粘度增加值、乳化速率的影响,而乳液粘度增加值与分散相(水)的体积分数 ϕ 有关,乳化速率与聚合物浓度和平均分子量有关。因此可以通过改变分散相体积分数 ϕ 、溶液中聚合物重量百分比 $\%(\text{wt})$ 及其平均分子量 M_w 等工艺参数来控制乳液稳定性,从而在骤冷时使乳液能有足够时间冷冻并在分散相进一步乳化、絮凝、团聚之前锁定多孔结构。分散相体积分数 ϕ 决定了乳液的粘度增加值,直接影响最终材料的孔径并间接影响孔隙率;增加聚合物的 $\%(\text{wt})$ 和 M_w ,乳化速率降低,乳液的稳定性增加,聚合物絮凝速度降低,最终材料的孔径增大。采用乳液冷冻干燥制得的支架材料最大孔径在 $200\mu\text{m}$ 以上且平均孔径较小,但孔隙率和孔比表面积很高,在药物控释和组织再生中具有重要作用。Wang 等^[15]用 PLGA/二氯甲烷/水乳液系统通过此法制得支架材料的孔隙率大于 90%,平均孔径 $15\sim 35\mu\text{m}$ (其中最大孔径可达 $200\mu\text{m}$)。

2.3 气体发泡法

很多聚合物采用气体介质作成孔剂以产生高气孔率。由于挥发性液体,气体或超临界介质很容易从聚合物基质中逸出,因而常用作成孔剂。孔的形貌取决于成孔剂的类型和用量以及某些工艺参数如聚合交联度、聚合动力学性质、排气和干燥方法等。在某些情况下,用固体盐类物质作前驱体可分解出气体,碳酸氢氨常兼作有效的气体发泡剂和固体盐类成孔剂,加热时聚合物基质中产生 NH_3 和 CO_2 气体,发泡成孔形成内部联通的多孔结构,孔径 $300\sim 400\mu\text{m}$,这种材料特别适合高密度细胞种植^[7]。

目前开发了一种采用超临界 CO_2 作成孔剂制备高孔隙率聚合物基质材料的方法,避免了使用高温和有机溶剂^[16~18],适合于生长因子等蛋白质控释载体支架材料的制备。 CO_2 在超临界状态下兼作发泡剂和溶剂,可有效降低聚合物玻璃化转变温度^[7]。粉状聚合物在高压 CO_2 环境下平衡后,玻璃转变温度降低,其实质上是 CO_2 和聚合物相互作用增加了酯官能团在聚合物主链内迁移率的结果,聚合物链迁移率的增加导致聚合物自由体积增大,从而在聚合物相内产生较大的平衡气体量。压力骤降时, CO_2 的溶解度急剧降低,处于 CO_2 临界压力和临界温度下的饱和聚合物相在大气环境条件下变成过饱和,气体试图逸出

聚合物相时气泡成核,同时被超临界流体塑化的聚合物开始固化,聚合物玻璃转变温度升高,锁定气体成核过程产生的多孔结构而形成微孔材料。Sheridan^[16]等通过比较研究,采取气体发泡法制备 PLG 支架材料时,CO₂ 明显比 N₂ 和 He 气形成的孔隙率高,PLG 的共聚物比 PGA 或 PLLA 的均聚物更易成孔,可达到 95%~96% 的孔隙率,可以根据聚合物类型、分子量、降压速度等工艺参数来调节孔隙率。

2.4 分相法

分相是指控制聚合物溶液分为两相:一相为富聚合物相,一相为聚合物贫相即溶剂相,通常有多种方法分相^[19],其中热致分相普遍用来制备多孔材料。其原理是较高温度的聚合物均质溶液,通过热能转移转变为高聚合物相和无聚合物相,再通过抽提、蒸发、或冷冻干燥除去溶剂形成多孔结构,热致分相一般可分为液-液分相^[3]、液-固分相^[20],加入非溶剂可诱导液-液分相,如 PLLA/1,4-二氧六环/水(87/13,v/v)系统。聚合物的多孔形貌取决于热骤冷聚合物溶液的最终热力学状态,根据骤冷终点是位于聚合物溶液温度-浓度二元相图的亚稳区还是不稳定区,可获得两种不同的形貌。多孔材料的孔径分布、孔的几何形状和尺寸及其内部联通性取决于能否精确平衡各工艺参数如聚合物浓度、冷却速率、冷却程度、溶剂/非溶剂的组成、表面活性添加剂^[7]等,增大冷却速度或增大聚合物浓度,成孔的孔径变小,孔隙率降低。添加表面活性剂降低界面张力从而改变孔的形状和大小,另外聚合物溶液骤冷前稍高温下分相的粗化过程主要通过 ostwald 成长、聚结或流体力学机制增大孔径^[21,22]。

聚合物溶剂有时也用做成孔剂,如 1,4-二氧六环^[4,21],二甘醇二甲醚^[9]和萘^[23]除去结晶的溶剂相,其占据的空间就会成为支架的孔结构,制备多孔聚合物时大多采用冷冻干燥除去溶剂相,但比较费时耗能,采用非溶剂冷冻抽提可在低于聚合物凝固点温度下用聚合物非溶剂与溶剂相交换除去溶剂相。Ho 等^[24]采用 1,4-二氧六环溶解 PLLA 或 PLGA 等聚合物在-20℃分相,再用-20℃80%乙醇水溶液浸泡除去 1,4-二氧六环制备了多孔支架材料,报道比冷冻干燥高效节能且改善支架表皮结构。

浸渍聚沉分相是将聚合物溶液浇铸到惰性底物上或通过模具挤出成薄膜,然后快速浸入到非溶剂中,由于聚合物溶液中的溶剂被非溶剂交换而诱导聚合物溶液分相,发生凝胶转变使分相溶液沉积固化。浸渍聚沉分相涉及三元系统,Witte 等^[25]采用 PLLA-氯仿-甲醇系统通过浸渍聚沉分相制得多孔膜。

2.4 熔融成型法^[26,27]

该技术与粒子滤出类似,但不使用有机溶剂,故所制备的骨架可用于生物活性分子的控制释放;并且可以构造结构复杂的三维骨架。如将 PLGA 粉末与明胶粒子混合物放在四氟乙烯模具中,将模具加热到超过 PLGA 的玻璃化温度,加压使 PLGA 和明胶粒子结合在一起。冷却后将复合物放入水中,明胶粒子溶解后得到 PLGA 骨架。可通过改变明胶粒子的大小和明胶 PLGA 的比对孔结构加以控制。

2.5 三维印刷法

三维印刷法属于快速原型技术(Rapid prototyping technologies),能模仿活体组织微结构制备多孔支架,其实质是分层制备工艺^[28]。它采用离散/堆积成型原理,先由三维 CAD 软件设计出三维曲面或实体模型,然后根据工艺要求,将其按一定厚度进行分层,把三维模型变为二维平面/截面信息,即离散的过程^[29];该技术按计算机模拟的二维切片造型通过印刷喷头首先将联结剂(如氯仿溶剂)喷到粉末床上产生第一层,再将粉末床降低一定距离并将粉末(如 PLLA 与 NaCl 的混合粉末)均匀沉积铺展到粉末床上形成新鲜层,接着再开始制作第二层,不断重复直至制作出整个支架体,然后取出支架去掉未联结的粉末并进行后续处理(清洗、修饰等)就制备出多孔支架材料。整个过程可在室温下进行。如果使用能溶解聚合物但无毒的联结剂如水,可在不损害其活性的情况下在支架中载入细胞、生长因子等生物制剂,但脂肪酸聚合物仅能溶于氯仿、二氯甲烷等有毒溶剂中,迄今采用 3D 印刷技术并结合采用沥滤致孔法仅能制备聚合物基质中无生物制剂的支架材料,另外采用 3D 印刷法制备的材料机械性质和准确性还有待改善^[2]。

间接快速原形制备技术^[30]则是先用计算机设计支架形状和整体大孔形貌并通过三维印刷制备支架模,聚合物溶液浇铸入模形成整体孔,结合常规成孔法如沥滤致孔法、乳液冷冻干燥形成局部孔后再通过熔融或溶解脱模制成整体孔和局部孔内部贯通的三维多孔支架。

2.6 浇铸/沥滤致孔法

溶剂浇铸/沥滤致孔法是制备多孔聚合物支架的常用的简便方法。其基本过程为将聚合物溶于二氯

甲烷、三氯甲烷或丙酮等有机溶剂中,制成聚合物均质溶液后加入成孔剂如盐^[5,16,31,32]、糖^[33]、明胶^[34]、冰粒^[35]、石蜡^[36,37]等,混合均匀后浇铸入模,溶剂干燥后用能溶解成孔剂而不溶解聚合物的溶剂析出成孔颗粒即在聚合物中留下了孔结构。水溶性盐或碳水化合物成孔剂如糖、明胶等通常用蒸馏水沥滤致孔,石蜡可用正己烷等有机溶剂沥滤致孔。通过控制成孔剂的大小、形状和用量以及聚合物浓度来调控孔的结构、孔径和孔隙率。但该法由于造孔剂易于在容器底部沉淀,形成不均匀的孔结构,孔的联通性差,易产生闭孔。

为改善支架孔结构提高孔隙率和孔的联通性,沥滤致孔法通常与气体发泡^[38]、分相^[6]、冷冻干燥^[35,39]、浸渍聚沉和压模法等^[32]结合采用。Chen 等^[35]结合采用沥滤致孔和冷冻干燥技术制备多孔 PLA、PLGA 支架,用毛细管将冷水喷入液氮中制成冰粒作成孔剂,冰粒与聚合物/氯仿溶液于一 20℃ 混合后注模,再浸入液氮中冷冻干燥除去冰粒成孔。Chen 等^[37]结合采用沥滤致孔法与分相法制备纳米纤维状联通球形孔 PLLA 支架材料:首先将石蜡分散在 0.5% (g/mL) 聚乙烯醇(PVA)中通过加热乳化制备石蜡微球;再将石蜡微球盛入聚四氟乙烯模具中通过热联结形成一种互联模;将 PLLA 的二氧六环/吡啶(1:1)溶液,逐滴浇铸到石蜡微球热联模中并在 37℃ 进行快速真空热处理后于一 70℃ 冷冻发生热至分相;将分相后的聚合物/石蜡复合物先后浸入正己烷(-18℃)、环己烷(室温)中浸取出溶剂相和石蜡后而成孔。Hou 等^[32]结合采用沥滤致孔、聚合物聚沉、压模制备多孔支架,将加有 NaCl 晶体的聚合物氯仿溶液在快速搅拌的过量乙醇中聚沉获得聚合物/盐的复合体,将此复合体在 3.5MPa 压力下热压模后放入去离子水中沥滤出盐粒而成孔。

沥滤致孔法制备的支架材料的厚度、孔隙率常受到限制且比较费时,调制出半固化的聚合物溶液有利于制备多孔厚膜。Shastri 等^[36]采用石蜡颗粒作成孔剂与聚合物溶液混合调制成灰泥状的塑性预发泡混合物,模压成型后浸泡在正己烷中于聚合物玻璃转变温度下沥滤致孔制备出空隙率大于 85% 厚度不受限制的支架材料。Lee 等^[10]以碳酸氢氨/氯化钠颗粒为成孔剂和发泡剂加入一种镁铝页硅酸盐将聚合物调制成全固化,结合采用盐析/气体发泡法制备厚度大于 3mm 的 PLLA 支架材料,镁铝页硅酸盐粘土状物质可生物降解并增加支架机械强度。

3 结束语

组织工程的发展促使人们不断开发出满足各种特殊要求的生物可降解聚合物支架,可以说到目前理想的聚合物支架还未能制备,这需要对已有的制备方法不断改进。调整聚合物类型和组成引入生物活性组分制备复合材料支架,采用快速原型技术制备具有三维几何形状的仿生支架,以模板材料(分子、胶体晶,自组装介质等)介导成孔的模板合成技术,以及将聚合物单体和成孔剂置于修复组织处直接进行原位聚合已越来越受到人们的重视。

参考文献:

- [1] Murphy W L, Peters M C, Kohn D H. *Biomaterials*, 2000, 21, 2521~2527.
- [2] Huttmacher D W. *Biomaterials*, 2000, 21, 2529~2543.
- [3] Schugens C, Maquet V, Grandfils C, et al. *J Biomed Mater Res*, 1996, 30, 449~461.
- [4] Feng J H, Tae G P, Doo S L. *Polymer*, 2003, 44, 1911~1920.
- [5] Lu L C, Peter S J, Lyman M D, et al. *Biomaterials*, 2000, 21, 1595~1605.
- [6] Cai Q, Yang J, Bei J Z, et al. *Biomaterials*, 2002, 23, 4483~4492.
- [7] Hentze H P, Antonietti M. *Rev Mol Biotechnol*, 2002, 90, 27~53.
- [8] Weng J, Wang M, Chen J Y. *Biomaterials*, 2002, 23, 2623~2629.
- [9] Roether J A, Boccaccini A R, Hench L L et al. *Biomaterials*, 2002, 23, 3871~3878.
- [10] Lee J H, Park T G, Park H S, et al. *Biomaterials*, 2003, 24, 2773~2778.
- [11] Sato T, Chen G P, Ushida T, et al. *Mater Sci Eng*, 2004, 24, 365~372.
- [12] Park Y J, Nam K H, Ha S J, et al. *J Control Rel* 1997, 43, 151~160.
- [13] Park Y J, Ku Y, Chung C P, et al. *J Control Rel*, 1998, 51, 201~211.

[14] 赵瑾,袁晓燕,姚康德. 化工进展, 2002, 21(9): 644~648.

[15] Whang K, Thomas C H, Healy K E. Polymer, 1995, 36(4): 837~842.

[16] Sheridan M H, Shea L D, Peters M C et al. J Control Rel, 2000, 64: 91~102.

[17] Hile D D, Amirpour M L, Akgerman A. J Control Rel, 2000, 66: 177~185.

[18] Jang J H, Shea L D. J Control Release, 2003, 86: 157~168.

[19] Witte P, Dijkstra P J, Berg J W A. J Membrane Sci, 1996, 117: 1~31.

[20] Schugens C H, Maquet V, Grandfils C, et al. Polymer, 1996, 37(6): 1027~1038.

[21] Nam Y S, Park T G. Biomaterials, 1999, 20: 1783~1790.

[22] Atkinson P M, Lloyd D R. J Membrane Sci, 2000, 171: 1~18.

[23] Lo H, kadiyala S, Guggino S E. J Biomed Mater Res, 1996, 30: 475~484.

[24] Ho M H, Kuo P Y, Hsieh H J, et al. Biomaterials, 2004, 25: 129~138.

[25] Witte P, Esselbrugge H, Dijkstra P J et al. J Membrane Sci, 1996, 113: 223~236.

[26] 罗丙红, 卢泽俭. 国外医学生物医学工程分册, 2001, 24(4): 154~158.

[27] 刘斌, 郭超等. 武汉化工学院学报, 2003, 25(3): 66~71.

[28] Lam C X F, Mo X M, Teoh S H, et al. Mater Sci Eng, 2002, 20: 49~56.

[29] 吴林波, 丁建东. 功能高分子学报, 2003, 16(1): 91~96.

[30] Taboas J M, Maddox R D, Krebsbach P H, et al. Biomaterials, 2003, 24: 181~194.

[31] Kaufmann P M, Heimrath S, Kim B S, et al. Cell Transplant, 1997, 6(5): 463~468.

[32] Hou Q P, Grijpma D W, Feijen J. Biomaterials, 2003, 24: 1937~1947.

[33] Weng J, Wang M, Chen J Y. Biomaterials, 2002, 23: 2623~2629.

[34] Thomson R C, Yaszemski M J, Powers J M, et al. Biomaterials, 1998, 19: 1935~1943.

[35] Chen G P, Ushida T, Tateishi T. Biomaterials, 2001, 22: 2563~2567.

[36] Shastri V P, Martin I, Langer R. Mat Res Soc Symp Proc, 1999, 550: 149~153.

[37] Chen V J, Ma P X. Biomaterials, 2004, 25: 2065~2073.

[38] Murphy W L, Peters M C, Kohn D H et al. Biomaterials 2000, 21: 2521~2527.

[39] Chen G P, Ushida T, Tateishi T. Mater Sci Eng, 2001, 17: 63~69.

Methodologies with Modifications on Fabrication of Porous Aliphatic Polyesters Scaffolds for Tissue-engineering

WANG Zhen-lin^{*}, WAN Tao, YAN Yu-hua
(*Biomaterials & Engineering Research Center, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China*)

Abstract: Biodegradable aliphatic polyesters synthetic polymer scaffolds have been extensively applied in tissue-engineering. Various methods have been explored for fabrication of porous scaffolds using PLLA, PGA as well as its copolymers, their porosity increased and pore structure was improved through modifications and combination of present ways. The methodologies with their modifications development are included in this review.

Key words: Biodegradable; Aliphatic polyesters; Tissue-engineering; Porous scaffolds