

摘 要

组织工程支架是组织工程中重要的研究对象之一，其支架在体内的降解速率能否与生长组织部位修复速率相匹配是组织工程支架能否临床应用的关键因素之一。聚 β -羟基丁酸酯（PHB）是良好的组织工程支架材料之一，但降解速率较慢的特点影响了其在组织工程中的进一步应用。本文针对 PHB 降解速率慢的不足，从影响材料结晶度的因素考虑，将 PHB 与生物相容性好的聚乳酸（PLLA）及聚氧乙烯（PEO）共混改性，通过调整其比例以调控 PHB 的降解速率。另外，结合溶剂浇铸/粒子滤出法制备组织工程支架的优点，初步探讨研究了一种新的制备组织工程支架的方法，并考察了支架在动物体内的降解情况。

实验运用 DSC、POM、SEM 手段研究了 PHB/PLLA 及 PHB/PLLA/PEO 共混体系的相容性、冷结晶性及结晶度的变化情况及其在溶菌酶/PBS 缓冲溶液中的降解情况，结果表明，PHB 与 PLLA 有一定的相容性，PEO 的加入提高了 PHB 与 PLLA 的相容性；PHB 与 PLLA 共混，各组分的冷结晶温度不变，PHB 的冷结晶速率不受 PLLA 的影响，而 PLLA 冷结晶速率随 PHB 含量增大而加快，共混体系的结晶度随 PLLA 的含量的增多而变小；对含有 PEO 的 PHB/PLLA 共混体系，PHB 与 PLLA 的冷结晶温度都有减小；PLLA 含量小于 50% 时，共混体系的降解速率要慢于纯的 PHB，PLLA 含量为 50% 时，PHB < 体系的降解速率 < PLLA，含有 5% PEO 的 PHB/PLLA(1:1) 共混体系降解速率显著提高，在实验 90 天前要快于 PLLA，而后降解速率慢于 PLLA，当体系降解 120 天后，PHB 与 PLLA 的冷结晶温度几乎相同，说明 PEO 的加入加快了其体系的降解速度。

实验研究制备出由 PHB 多孔膜片与 PHB/PLLA/PEO 纤维复合而成的“夹芯”组织工程支架，并确定了制备 PHB 多孔膜片的最佳溶液浓度为 2-3%；另外，将制备的“夹芯”支架植入兔子体内，SEM 电镜观察，支架不但显示出了良好的组织相容性，而且降解显著；此外，该支架的结构也有利于细胞的生长。

关键词：聚 β -羟基丁酸酯，聚乳酸，组织工程支架，共混，降解

ABSTRACT

The three-dimensional scaffolds is one important part in the study of tissue engineering, whether the scaffolds rate of degradation in vivo can match with the growth rate of repair tissue is one of the key factors which scaffolds are applied in the clinical treatment.

poly(β -hydroxybutyrate)(PHB) is one of good biomaterials for tissue engineering, however, the slow rate of degradation of the characteristics of its impact on the further application in tissue engineering. In this paper, poly(L-lactide)(PLLA), poly(ethyleneoxide)(PEO), and PHB was blended, attempting to improve slow degradation. The material's degradability was improved by adjusting the rate of blending. In addition, a new method was developed to prepare highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering, and the scaffolds was implanted in the animal body to observe its degradability.

The cold crystallization behavior, miscibility, crystallinity and degradability in the lysozyme/PBS buffer solution, of PHB/PLLA blends and PHB/PLLA/PEO blends was studied by differential scanning calorimetry(DSC), Polarizing Optical Microscopy(POM), Scanning Electron Microscopy(SEM). The results showed that, PHB was partly compatible with PLLA, and the miscibility of PHB with PLLA could be improved when PEO joining in the PHB/PLLA blends; the cold crystallization temperature and rate of PHB were independent of contents of PLLA in blends, and the cold crystallization temperature of PLLA was also not affected by PHB, however, the crystallization rate became faster with increasing contents of PHB in blends; the crystallinity of blends depends on ratio of PHB and PLLA; In PHB/PLLA/PEO blends, the cold crystallization temperature of PHB and PLLA were reduced. When PHB/PLLA blends containing less than 50% weights PLLA, the rate of blends degradation was slower than pure PHB; When containing up to 50% weights PLLA, the rate of the blends degradation was faster than pure PHB, but slower than pure PLLA; For blends PHB/PLLA/PEO containing 5% PEO, its rate of degradation become faster in compared with PHB and PHB/PLLA blends, before 90 days, its rate was faster than that of pure PLLA, after 90 days, its rate was behind of pure PLLA, and remained PHB and PLLA became nearly miscible

e after PHB/PLLA/ PEO blends degradation 120 days.

In this research, the three-dimensional scaffold was fabricated by porous PHB membranes and PHB/PLLA/PEO fiber combing ,and optimal concentration of solution preparing porous PHB membranes was affirmed 2~3% g/ml. When this scaffold was implanted in rabbit's body, SEM showed that, the scaffold had good biocompatibility, and the degradation is distinctness; in addition,the construction of scaffold was good to cell growth.

Key words: poly(β -hydroxybutyrate)(PHB), poly(L-lactide)(PLLA), scaffold for tissue engineering, blends, degradation

西北工业大学 学位论文知识产权说明书

本人完全了解学校有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属于西北工业大学。学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版。本人允许论文被查阅和借阅。学校可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。同时本人保证，毕业后结合学位论文研究课题再撰写的文章一律注明作者单位为西北工业大学。

保密论文待解密后适用本声明。

学位论文作者签名：杜江华

2007年3月23日

指导教师签名：杨培华

2007年3月23日

西北工业大学 学位论文原创性声明

秉承学校严谨的学风和优良的科学道德，本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下进行研究工作所取得的成果。尽我所知，除文中已经注明引用的内容和致谢的地方外，本论文不包含任何其他个人或集体已经公开发表或撰写过的研究成果，不包含本人或其他已申请学位或其他用途使用过的成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式表明。

本人学位论文与资料若有不实，愿意承担一切相关的法律责任。

学位论文作者签名：杜江华

2007年3月23日

第一章 前言

1.1 课题研究的背景及意义

当人体组织或器官由于外伤或病变受到损伤以后,在临床上,人们通常采用:自体组织移植、异体组织移植和应用人工合成代用品的方法来对损伤的组织 and 器官给予修复治疗。然而,这些方法都存在着这样那样的不足,如自体组织移植必须以牺牲人体部分正常组织为代价来修复病理或缺损组织;异体组织移植会产生免疫排斥反应,而且一些组织的供体如肾脏、肝脏严重不足;人工合成代用品近年来虽然应用较为广泛,但仍然存在着异物反应、感染等风险。组织工程学近10多年的发展成为解决上述问题的一个契机。

组织工程学是应用生命科学与工程原理及方法构建一个生物装置来维护、增进人体细胞和组织的生长,以恢复受损组织或器官的功能,这有可能从根本上解决组织和器官缺损所致功能障碍或丧失的问题。它是利用了生物可降解材料做成三维支架,使生物体的细胞在其表面繁殖增长,形成或长出相应的组织或器官,材料在完成这一任务后就自动降解消失,从而解决了异体排斥问题。因而,组织工程学成为人们近20多年研究热点,其中组织工程支架材料及其支架的制备技术成为目前人们研究的主要对象之一。

PHB是微生物在不平衡生长条件下储存于细胞内的一种天然高分子聚合物,广泛存在于自然界许多原核生物中。它不仅具有优良的机械性能,而且具有好的生物可降解性、生物相容性、压电性、光学活性、无毒性、无刺激性等特殊性质。特别是其本身具有一些有利于细胞附着和分化的信息,是用来做仿生细胞外机制的理想材料。因而,PHB这些良好的特点,使其作为组织工程支架用材料在软骨、皮肤、心脏瓣膜、血管、神经等组织工程方面得到应用。但是PHB材料本身的一些不足,如结晶度高造成材料在宏观上表现出较大的脆性及其在体内降解速度较慢等。这些缺点限制了PHB在组织工程中的进一步应用。

在组织工程中,组织工程用多孔三维细胞支架起着非常重要的作用,它不仅影响细胞的生物学行为和培养的效率,而且决定着移植后能否与机体很好的适应、结合和修复,是限制组织工程能否应用于临床的一个关键因素。细胞支架不仅为特定细胞提供支撑作用,而且还起到模板作用,引导组织再生和控制组织结构。因此,在组织工程中,除了考虑材料的化学性质、表面性能外,还应考虑多孔三维细胞支架的结构,如孔隙形态、大小、连通性、孔隙率等,以利于细胞的黏附、渗透和营养物质的传送及代谢产物的交换,而支架的结构取决于三维支架制备方

法及其工艺。此外，支架在体内的降解速率也是一个必须要考虑的因素，它必须与组织部位的生长修复速度相一致，根据组织部位的不同，对其降解速率的要求有相当大的差异，例如皮肤组织为3-10日，内脏组织为15-30日，骨为1-2个月，关节为2-3个月，而作为组织或器官的再生，一般则至少需要半年以上。

因而，研究降解速率可调控的PHB（聚 β -羟基丁酸酯）多孔支架对PHB多孔支架用于临床有着非常重要的实际意义。

1.2 本文研究内容

本课题拟对以PHB为基料制备的多孔支架在组织工程中应用的基础上，针对当前制备多孔支架方法的不足及其PHB降解速度慢的特点进行研究，以期达到组织工程所要求的多孔支架。由于植入体内的材料主要接触组织和体液，所以水解（包括酸碱作用和自催化作用）和酶解是最主要的机制。对PHB多孔支架在体内的降解影响因素主要有材料本身的化学结构，其中聚合物的易水解性和单体的亲水性是主要因素；另外，支架表面的形态结构，如粗糙程度、孔洞的大小及其分布等都会影响支架的降解速率。同时，这些因素也影响着细胞在支架上的黏附、迁移及增长及其水分等物质的运输交换。综合以上因素的考虑，在研究PHB降解速率可调控的支架制备上主要从两个方面着手：一是通过改变材料的高度有序结构等参数来调控支架的降解速率，其主要方式是采用物理共混的方式，即用PHB与另一种生物相容、无毒的可降解聚合物共混，进而对支架降解速率给予调控；二是多孔支架的制备方法。具体来讲研究内容主要有以下几个方面：

(1) 以PHB为第一组分，PLLA为第二组分，通过PHB与PLLA物理共混，考查其共混体系的相容性及其在冷结晶条件下，各组分结晶性质的变化以及结晶度的变化；同时，将这些具有不同结晶度的共混体系制备成相同大小的膜片，置于PBS/溶菌酶溶液中考查其体外降解情况，以期初步了解不同共混体系的降解速率，为制备降解速率可调控的支架做准备。

(2) 在研究已有的溶剂浇铸/粒子滤出法制备多孔支架的基础上，采用膜片与纤维复合的方法，制备出多孔膜片与纤维复合的“夹芯”支架。该法制备的多孔支架可根据组织修复部位的不同，调节多孔膜片的厚度或复合纤维的量，从而调控其降解速度。

(3) 将制备的“夹芯”多孔支架植入兔子体内进行动物实验，考察其支架在动物体内的降解情况及其与组织的相容性。

第二章 文献综述

2.1 组织工程

2.1.1 引言

自体移植、异体移植、异种移植以及人工代用品是临床用于治疗组织器官缺损和功能障碍的主要方法^[1]，这些方法虽然各具优点、并且都显示了很好的治疗效果，但是同时也由于它们各自存在的免疫排斥、供体来源受限或需要二次手术将植入物取出等缺陷而在临床应用上受到了限制。因此，随着细胞生物学、分子生物学、材料科学及其相关的物理化学学科的发展，组织工程这一概念于1987年美国科学家在一次美国国家基金会(NSF)召开的会议上提出。组织工程内涵是“运用工程学与生命科学的原理与方法，从根本上了解正常与病理组织的结构了解正常与病理组织的结构-功能关系，从而研制恢复、维持或改进组织功能的生物学替代物”^[2]。组织工程研究的主要有4个方面：种子细胞、支架材料、器官构建、临床使用，四个方面缺一不可，决定着组织工程的成功与否。其中支架材料和种子细胞是组织工程目前研究的重要内容。

2.1.2 组织工程的基本原理和方法

组织工程的基本原理和方法是，将体外培养的组织细胞吸附扩增于一种生物相容性良好并可被人体逐步降解吸收的生物材料上，形成细胞-生物材料复合物。该生物材料为细胞提供一个生存的三维空间，有利于细胞获得足够的营养物质，进行营养物质交换，并且能排除废物，使细胞能在按照预制设计的三维形状支架上生长。然后将此细胞-生物材料复合体植入机体组织病损部位。种植的细胞在生物支架逐步降解吸收过程中，继续增殖并分泌基质，形成新的具有自身功能和形态相应的组织和器官。这种具有生命力的活体组织能对病损组织进行形态、结构和功能的重建并达到永久性替代^[3]。其原理示意图2-1^[4]

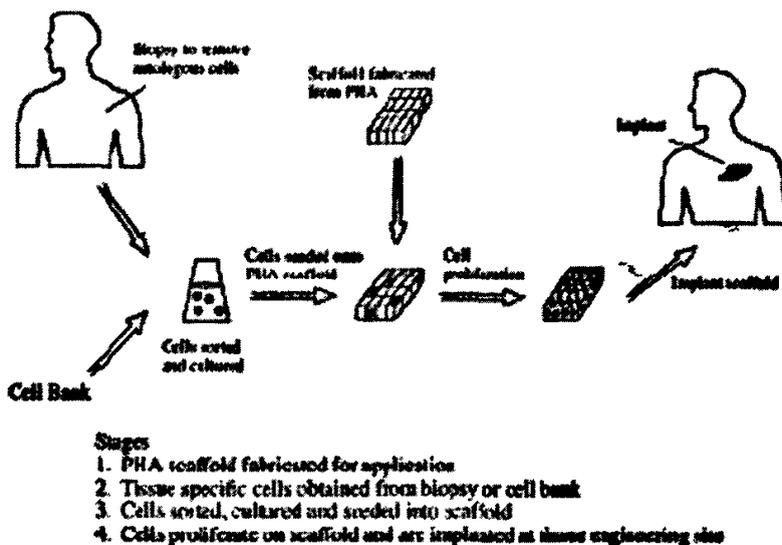


图 2-1 组织工程原理示意图

2.2 组织工程用材料

2.2.1 组织工程材料的基本要求^[5]

组织工程的核心是建立由细胞和生物材料构成的三维复合体，三维空间结构为细胞提供了获取营养、气体交换、排泄废物和生长代谢的场所，也是形成具有形态和功能的新组织、器官的物质基础。构成三维复合体的生物材料通常就称为组织工程支架材料，是组织工程化组织的最基本架构。组织工程支架材料最基本的特征是与活体细胞或生物系统直接结合，因此在材料性能的要求上也与一般生物材料有一定的差别。组织工程材料除应满足一般生物材料的各种理化性质外，还必须具有以下几点要求：

(1) 生物相容性

生物相容性是生物材料必备的条件。但对于组织工程支架材料而言要求更加严格，除了要求材料的组成无毒，化学结构稳定外，还要求材料降解产物无毒、无热源反应，无致癌性、不致畸，对细胞和周围组织无刺激性，不干扰机体的免疫机制，不引起免疫排异反应。由于支架材料降解是与组织的形成过程协调进行，材料与血液接触时必须具有良好的血液相容性，不引起溶血、凝血一反应，不破坏或改变体液、血液成分。

(2) 生物机械性能

组织工程支架材料最重要的作用就是为体外接种的细胞提供体内扩增和增殖的场所,并能阻碍周围组织的长入,作为细胞、生长因子和基因的生物载体,因此要求支架材料必须具备足够的力学性能,尤其是组织工程化软骨、骨、肌腱,韧带等的支架材料。但必须指出的是材料的物理机械性能不是越强越好,而是与机体组织要有良好的生物机械适应性,不但要求植入体与相邻组织的弹性模量匹配,而且还要求材料耐疲劳、耐磨损、耐老化等,能长期保持机体行使功能所需的机械性能。

(3) 生物可降解性

生物可降解性是组织工程支架材料不同于一般生物材料的特殊要求。对于良好的组织工程支架材料而言,不仅要求材料的降解产物无毒,而且要求生物材料的降解速率能根据需要进行适当的调整,以适用于不同组织的生长速率,这也是目前组织工程支架材料研究开发的难点之一。此外,还应注意的是支架材料植入机体后,随着降解过程的进行,支架材料的体积会逐渐变小,材料逐渐被新形成的组织所替代,为避免材料与新组织的界面处发生松动与破坏,支架材料与组织应有较强的亲合性,这就要求降解后的材料表面性能不应随降解的变化而变化。

(4) 材料可塑性

组织工程学的目的就是实现人体组织的工程化,由于人体组织的结构错综复杂就要求支架材料的结构也比较复杂,因此支架材料要有良好的可加工性或可塑性。一般支架材料的孔隙率要高于90%,且结构形状比较复杂,又要保持良好的机械强度,如果材料的可塑性不好,则很难达到组织工程化的要求。此外,为了提高材料的可塑性,在制作和加工成型过程中不可避免地会残留一些小分子,最终成为溶出物。

(5) 可行的灭菌、消毒方法

组织工程材料的灭菌与消毒是非重要的,材料的性能再好,若没有良好的灭菌消毒方法材料的使用也是不可能的。要求材料的结构和性能不能因灭菌消毒过程而受到影响,材料能经彻底灭菌而不变性。

2.2.2 组织工程支架用高分子材料的种类及特点

基于组织工程的特点,用于组织工程的材料除了发挥免疫隔离、组织支撑作用的用途外,决大多数情况下使用的是体内降解吸收高分子材料。这类材料主要有聚乳酸(PLLA)、聚乙醇酸(PGA)以及它们的共聚物(PLGA),聚酸酐、聚羟基丁酸酯(PHB)、聚原酸酯(POE)、聚磷腈、聚酯脲烷、聚己内酯(PCL)、聚三次甲基碳酸酯(PTMC)和聚丙烯一反丁烯二酸酯(PPF)等^[6]。其中以PLA,PGA及其

两者的共混物 PLGA 这类脂肪族聚酯的应用最广，这类材料在体内通过水解而降解，降解产物参与三羧酸循环，最终以 CO_2 和 H_2O 的形式排出体外，不会产生有害副产物，具有良好的生物相容性，已被美国食品与药品管理局(FDA)批准可用于临床。

天然高分子材料是人类最早使用的医学材料之一。常用的天然高分子生物材料主要包括多糖类和蛋白质材料两大类。在天然生物材料尤其是组织工程支架材料经常用到的有胶原、甲壳素及其衍生物、透明质酸、海藻酸钠、天然珊瑚、硫酸软骨素等。这类材料的优点在于它们本身就包含着许多生物信息，能够使细胞产生或维持各种功能。而且它们直接来自于动物体内，具有很好的生物相容性，与活体组织接触后一般也不会引起血液凝固、发生炎症或排异反应等现象，是较理想的生物医用材料。其缺点是在天然材料的大规模生产过程中会发生质量难以控制、性能变化与结构变化不成比例等，而且这些材料来源有限，价格较为昂贵，使其应用受到一定程度限制天然生物材料的优点，使其成为不可或缺的重要生物材料之一。表 2-1 列出了常用可降解吸收高分子的分类及特点。组织再生工程中常用的高分子材料是脂肪族聚酯、胶原和多糖类，表 2-2 中列出了常用于支架制造的可降解材料的特点及其制备的支架形态。

表 2-1. 可吸收高分子材料的分类^[7]

分 类	高 分 子	一 般 特 点
合成高分子	PHB、PGA、PLLA、PDLA	①好的材料容易得到力学性能良好
	PEG、PCL及它们的共聚物	②原料重现性好,调整材料性能余地大
天然高分子	胶原 纤维蛋白 海藻酸 透明质酸 甲壳素 羊膜	③组织和细胞的相容性较差 ①组织和细胞的相容性非常好
		②原料重现性差,调整材料性能余地小 ③很难得到力学性能良好的材料

表 2-2. 常用于支架制造的可降解材料^[7]

名称	代号	结晶性(A)	典型的 支架形态
		非结晶性(B)	
合成高分子	PGA	A	纤维状
	P(L-LA/GA)[10:90]	A	纤维状
	P(D,L-LA/GA)[50:50]	B	海绵状
	P(D,L-LA/GA)[85:15]	B	海绵状
	P(GA/CL)[75:25]	A	纤维状
	P-L-LA	A	纤维状
	P-D,L-LA	B	海绵状
	P(L-LA/CL)(75:25)	A	纤维状
	P(L-LA/CL)[50:50]	B	海绵状
	PCL	A	纤维状
天然高分子	PDS	B	纤维状
	胶原	A	凝胶、海绵状
	明胶	B	凝胶、海绵状
	纤维蛋白	A	凝胶状
	多糖类	A	凝胶、海绵状
无机材料	磷酸三钙,TCP	A	多孔体
	碳酸钙(珊瑚), CaCO ₃	A	多孔体

①共聚物的代号说明：以左旋乳酸和乙醇酸共聚物 P(L-LA/GA)[10:90]为例，P 表示聚合物，括弧 () 内的文字代表共聚单元的组成，括弧 [] 内的数字表示共聚物组成的百分比。共聚单元代号前的 L-和 DL-分别代表“左旋”和“右旋”

2.3 组织工程多孔支架的设计及制备技术

2.3.1 组织工程多孔支架的要求

在组织工程中，人工构成细胞-生物支架复合材料是最为关键的步骤之一。支架材料极其多孔支架在构建组织工程或器官主要作用包括^[8-9]：

- (1) 为细胞的勃附提供物理支撑，并且将细胞准确地投递到受损部位；
- (2) 为细胞的增殖、代谢提供空间；

- (3) 提供特定的宏观与微观结构, 引导细胞构建特定功能的组织或器官;
- (4) 传递化学或力学信号, 调控细胞的表型;

从组织工程学的角度来讲, 对理想的组织工程用支架有以下基本要求^[10]:

- (1) 有生物相容性和生物降解性能;
 - (2) 适当的亲水性能, 以促进细胞粘附;
 - (3) 能促进细胞的生长;
 - (4) 在细胞的分化和增殖过程中能保持细胞的功能;
 - (5) 具有适当的孔径、高的孔隙率及大的比表面积, 以便给细胞的种植、生长和细胞外基质(ECM)的产生提供足够的空间;
 - (6) 具有相互连通的孔结构, 保证细胞能够布满整个支架中, 这是形成组织的一个要素;
 - (7) 支架本身具有良好的力学性能, 能维持组织器官的原有形态;
- 以上都是支架设计要考虑的重要因素。

2.3.2 支架制备方法及其特征参数

随着组织工程发展近 20 年来, 组织工程支架的制备和加工方法也发展了很多种。每一方法均有其特点和优势, 但没有一个通用的, 还需要研究新的方法以满足不同的器官的特殊需要。常见的组织工程支架制备方法有: 纤维网固定、溶剂浇铸/粒子滤出法、冷冻干燥法、气体发泡法和热诱导相分离法、快速成型法、静电纺丝法等。

(1) 纤维网固定法

利用聚合物的溶解或熔融, 将 PLLA 二氯甲烷溶液灌注到乙交酯网状纤维上, 经处理后, 制成乙交酯增强的网状支架 (见图 2-2a)。这类支架可应用于与神经、皮肤、食道、膀胱以及软骨的再生^[11-14]。但这种方法无法调节和控制支架孔隙率。

(2) 溶剂浇铸/粒子滤出法

溶剂浇铸/粒子滤出法是最简便和研究最广法的技术之一。经典的制备过程是^[15-17]: 将筛选过的一定孔径的致孔剂颗粒均匀地分散在 PLLA 的氯仿溶液中, 然后浇铸在适当的模具中, 待大量氯仿挥发后, 真空干燥去除混合物中的残余溶剂, 即可获得干燥的 PLLA/致孔剂复合物。然后用去离子水滤出复合物中的造孔剂, 真空干燥后即得到多孔支架 (见图 2-2b)。采用此法可控制孔隙率和孔径, 这对制备支架是非常重要的。由于该法的优点, 成为组织工程用多孔细胞支架制备的技术, 可被广泛用于骨、软骨、神经、皮肤组织的构建。但该方法只能制备出厚度不超过 2mm 的多孔膜。另外, 孔隙间的相互连通程度不高, 并且连通通道大小和形态不规则、不可控制; 有机溶剂残余可能影响细胞的生长。为此, 众多国内外

学者对该法作了大的改进，其方法^[18]有新型致孔剂的应用、溶液浇铸/粒子沥滤一层叠

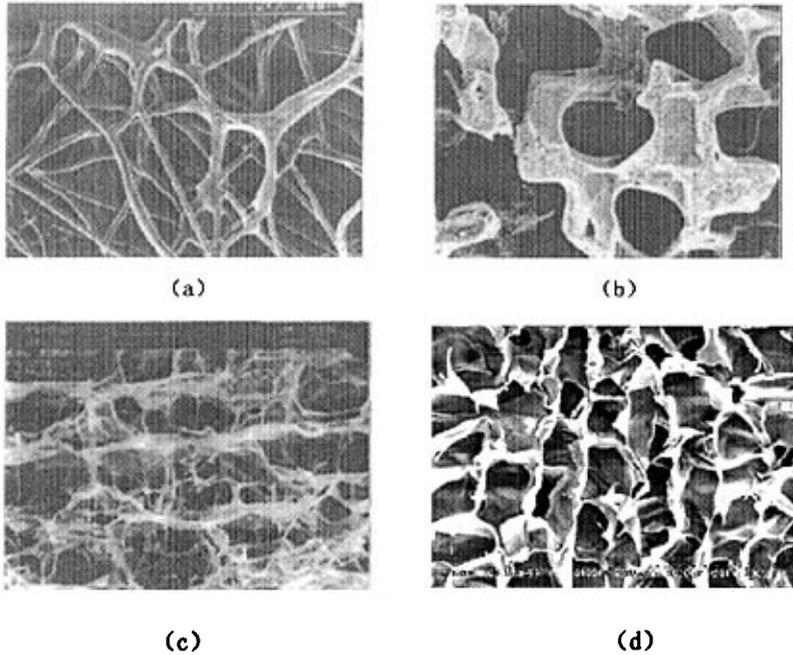


图2-2 各种制备方法制备的多孔支架微观形貌图：(a) 纤维固定；(b) 溶剂浇铸/粒子滤出；(c) 热诱导相分离法；(d) 冷冻干燥法

技术、熔融铸模—粒子沥滤技术、溶剂浇铸，粒子沥滤—挤出技术、溶剂混合—粒子沥滤技术等。

(3) 热诱导相分离法

热诱导相分离法制备多孔材料，早已广泛的应用在药物和食品工业中^[19]。该法是将聚合物溶液从高温状态（或低温）冷却（或升温）到低温（或高温），使聚合物溶液发生液-液分离或液固分离，形成聚合物-富相和聚合物-贫相，除去聚合物贫相，即得到高孔度的聚合物支架。Yoon Sung Nam等^[20]采用该方法制备了 PLLA, PGLA 多孔支架（见图2-2c）。研究表明，聚合物材料、溶剂/非溶剂的比例大小、冷却温度及其冷却速度等因素会影响到孔的大小和结构。控制冷却温度的大小，可以制备出孔径 $\geq 100\mu\text{m}$ 的开孔支架；对无定形聚合物，慢的冷却速度有助于制成孔径较大的开孔支架结构，然而，对半结晶性聚合物，快的冷却速度只能制备出孔径较小且孔为闭孔结构的支架。该法也存在使用有机溶剂的特点，但可以通过改变各种参数来控制孔径大小、孔隙率和孔的结构以满足临床使用的不同要求，故该法仍然受到青睐。

(4) 冷冻-冻干燥法^[21]

与热诱导相分离法相似，冷冻-冻干法也要经过冷冻凝固和冷冻干燥两个步骤，区别在于热诱导相分离法是由于降温而产生了聚合物与溶剂的相分离，而冷冻-冻干法却是在乳液配制下形成悬浮体系。有研究者用该法制备了孔径率 $\geq 90\%$ ，平均孔径 $15\sim 35\mu\text{m}$ ，最大孔径大于 $200\mu\text{m}$ ，并且孔间相连性好的聚乳酸共聚物多孔骨架。该法调控孔径、成孔率以及孔的比表面积的方法类似与热诱导相分离法（见图2-2d）。

(5) 其它

除了以上所述的制备方法，还有一些多孔支架的制备技术，如快速成型法，静电纺丝法、超临界流体技术等。表2-3是各种制备多孔支架的各种特征和参数^[22]。

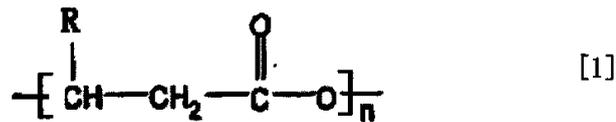
表2-3 是各种制备多孔支架的各种特征和参数

制备技术	加工材料	要求	孔径/ μm	孔隙率/%	结构
溶剂流涎盐 沥滤	流涎	溶解	30~300	90	球状孔径、盐 粒会残留
挤出沥滤	模具	热塑性	50~500	<80	球状孔径、盐 粒会残留
纤维粘合	编织	织物	20~100	<85	孔隙结构不 规整
乳液冷冻干 燥	流涎	溶解	20~200	>90	孔径尺寸较 小
热诱导相分 离	流涎	溶解	<100	<97	孔隙高度贯 穿，微孔结构
超临界流体 技术	流涎	非晶相	<50	10~30	非贯穿孔，微 孔结构
三维打印	固体自由成 型	溶解	45~150	<60	100%贯穿孔 (三角、五 角、蜂窝状)

2.4 生物可降解材料聚羟基丁酸酯

2.4.1 聚羟基链烷基酯(PHA)

聚羟基链烷基酯(PHA)是一系列广泛存在于许多微生物细胞中的天然高分子,种类繁多,性能各异^[23,24],其结构如图式,其中 R 为正烷基侧链,范围从甲基至壬基^[25]。



在这类聚合物中,根据单体结构或含量的不同,PHA 有较宽的性能谱,如可呈现从坚硬到柔软到弹性的一系列变化。其中,聚羟基丁酸酯(PHB)是 PHA 中发现最早,研究最透彻的一种^[26]。

PHA 不仅具有与化学合成高分子材料相似的性质,而且还有一般化学合成高分子材料没有的性质,如生物可降解性、生物相容性、压电性、光学活性等特殊性质。因此,PHA 的应用范围很广,可用作各种绿色包装材料与容器,生物可降解薄膜,污水处理用细菌床,电信器件外壳等。PHA 具有生物可降解性,能在人体内自然降解;它的最终降解产物 3-羟基脂肪酸是人体血液中的一种普通的代谢物,不会给人体带来任何毒副作用。另外,PHA 具有一定的力学性能,可用作骨移植的支架。随着近年来 PHA 生产技术的日益完善^[27]、生产成本的不断降低,人们越来越关注其在医药与组织工程中的应用。有大量实验数据表明 PHA 生物材料在组织工程领域和治疗用活体组织制品领域中将占有一席之地,鉴于其多样性的性质,PHA 材料在组织工程中可应用的领域有心血管系统、角膜、胰腺、胃肠系统、肾脏和泌尿系统、肌肉骨骼系统、神经系统、牙齿和口腔、以及皮肤等等。其中具有代表性的 PHA 生物材料是聚 β-羟基丁酸酯(PHB)3-羟基 3-羟基戊酸酯的共聚物(PHBV)目前已应用于药物控制释放、手术缝合线、伤口敷料、润滑粉剂、矫形手术和心包替代物等医药领域^[28-31]。

2.4.2 聚 β-羟基丁酸酯 (PHB)

聚羟基丁酸酯 (PHB) 是微生物在不平衡生长条件下储存于细胞内的一种高分子聚合物^[32],广泛存在于自然界许多原核生物中。[1]式中 R 为 CH₃ 时即表示 PHB。早在 1925 年,PHB 就首次被从微生物中分离出来。PHB 不仅具有化学合成

塑料相似的性质, 而且还有合成塑料没有的性质, 如生物可降解性、生物相容性、压电性、光学活性等特殊性质。英国 ICI 公司经过多年的努力, 率先于 1982 年采用真养产碱杆菌(*A. eutrophus*)小批量生产出了商品名为 Biopol 的生物可降解塑料。

PHB 的相对分子量因菌种及合成条件而异, 约 10^4 - 6×10^6 D, 相应的聚合度 n 约 700 至 12000。PHB 呈螺旋结构, 熔点约 170~180℃, 结构分析表明, 天然 PHB 颗粒是由 100 150, 伸展的聚合物构成纤维链状, 一般每个颗粒有一万条这样的链分子, 链分子平行排列。另外, PHB 颗粒易溶于氯仿等含卤素的有机溶剂, 不溶于乙醚和乙醇。

(1) PHB 性质

PHB 在活细胞中存在的形态尚有不十分明了以及不同认识之处, 但用溶剂把它从细胞中抽提出来, 再使之与溶剂分离之后, 得到的 PHB 是高结晶度(~80%)的, 研究表明, PHB 有非常好的立构规整性, 因而 PHB 是可结晶聚合物。聚羟基丁酸酯(PHB)作为由生物发酵获得并能完全被生物降解的一种热塑性脂肪族聚酯, 它通常采用挤出、注塑及纺丝手段成型。一般地, 由注塑而得的 PHB 样品的结晶度为 60%, 玻璃化转变温度在 5℃左右, 熔融温度 180℃左右^[33]。PHB 的物理性质与合成树脂聚丙烯 (PP) 类似, 在常温下, 两者有相仿的力学性能、熔融温度、较低的耐溶剂性能和较好的耐紫外光老化性能。尽管 PHB 与通用塑料 PP 相似, 但也存在明显的缺点。首先, 热稳定性差, 当它在熔点以上几度范围内受热时间稍长后, 其分子量会下降的很快; 其次, 由于 PHB 结晶度高, 球晶大, 在宏观上表现为脆性由于其可加工温度范围窄和抗冲击性能差等弱点, PHB 在应用上受到了限制。此外, PHB 的良好生物相容性和生物降解性, 使其能够广泛应用于医用领域, 特别是作为组织工程用材料, 但是其降解速率较慢, 影响了其进一步在组织工程中的应用。PHB 的这些缺点和不足均可通过与其它生物高分子共混改性得以改善。

2.4.3 聚 β -羟基丁酸酯的改性

PHB 是一种高结晶态、强疏水性材料, 在体内降解很慢, 完全吸收需要几年时间, 性能非常脆, 因此 PHB 要作为组织工程支架用材料很有必要对其改性。

(1) 生物改性

PHB 与聚羟基戊酸酯 (PHV) 的共聚物具有低结晶度、高柔软性并易于加工材料, 应用价值很高。通过控制单体 HB/HV 的比例, 共聚物的强度和韧性达到最佳的匹配, 能满足不同的应用的需要。HB 与 HV 的共聚物是用丙酸和戊酸为原料, 用 A-e 细菌发酵制成的, 得到 3-羟基丁酸酯 (3HB) 和 3-羟基戊酸酯 (3HV) 的

共聚物。共聚物的组成比可通过调节两种原料的比例来控制。在体外缓冲溶液中 PHB 均聚物的水解很慢，5 个月仅水解 20%-40%。HB-HV 共聚物的降解要快得多，含 3HV 比例的共聚物的水解速度越快；低分子产量比高分子量产物易水解。

(2) 物理改性

物理改性有称为共混改性是一种易行、较为经济的改性方式。物理共混是指通过选择合适的共混组分，调节两组分之间的配比，改善组分间的相容性以及采用不同的材料成型加工方法等手段，来获得满足各种要求的新型材料。在组织工程中，PHB 通常与生物可降解的生物高分子共混。表 2-3 列出了 PHB 与其它高聚物的共混体系。

表 2-3 PHB 物理共混体系^[34]

共混体系	共混组分	共混体系的相容性
PHB/CAB	醋酸丁酸纤维素	相容 (PHB 含量: 5~50wt%)
PHB/CAP	醋酸丙酸纤维素	相容 (PHB 含量: 5~50wt%)
PHB/P(HB-HV)	聚[β -羟基丁酸酯-co-聚(β -羟基戊酸酯)]	相容 (HV 含量: ≤ 12 wt%)
PHB/PEG	聚乙二醇	相容
PHB/PVA	聚乙烯醇	相容 (无规 PHV, PHB 含量: ≥ 85 wt%; 间同 PHV, PHB 含量: ≥ 55 wt%)
PHB/P(CL-co-LA)	聚(ϵ -己内酯)-co-聚乳酸	相容[LA 含量在 P(CL-co-LA)中: < 30 mol%]
PHB/svn-PHB	化学合成的聚(β -羟基丁酸酯)	相容
PHB/PLA	聚(d,l-乳酸)	不相容
PHB/PELA	聚(d,l-乳酸)-co-聚乙二醇	不相容
PHB/PCL	聚(ϵ -己内酯)	不相容
PHB/PECL	聚(ϵ -己内酯)-co-聚乙二醇	不相容
PHB/PPL	聚(β -羟基丙酸酯)	不相容
PHB/P(6HH)	聚(β -羟基己酸酯)	不相容
PHB/PHO	聚(β -羟基辛酸酯)	不相容
PHB/PBLG	聚(γ -苄基-L-谷氨酸)	不相容
PHB/HECA	聚乙基醋酸纤维素	不相容

PHB/EC	乙基纤维素	不相容
PHB/SA	淀粉醋酸酯	不相容

(3) 化学改性

主要采用化学的方法将 PHB 单体与另一种生物可降解的高分子单体进行共聚, 以改变材料的结晶性、亲水性、柔韧性及其在生物体内的降解速度等, 如嵌段共聚物 P(HB-b-CL)、P(HB-b-LA) 及 PHB-CO-PEG 共聚物。

1) 辐射聚合

PHB 辐射聚合一般采用 ^{60}Co 放射出的能量为 $(1.13\sim 1.28)\times 10^{11}\text{J/mol}$ ($1.17\sim 1.33\text{ MeV}$) 的 γ 射线引发聚合。同其它聚合方式相比, 不需要任何引发剂和催化剂就可获得纯度很高的产品。另外由于辐射线具有高能量, 辐射聚合可以在较低的温度下进行, 这对在高温下易分解的 PHB 来说尤为重要。

辐射接枝聚合有两种方法: (1) 共辐照接枝聚合, 即将 PHB 和接枝单体在保持直接接触的情况下进行辐照, 此方法中 PHB 自由基的利用率高, 但接枝单体均聚现象严重; (2) 预辐照接枝聚合, 先将 PHB 在除氧的情况下进行辐照, 产生自由基, 然后, 在辐射场外与脱除空气的单体在加热下进行接枝共聚反应, 本法很少产生接枝单体的均聚物, 有利于制备较纯的共聚物, 但 PHB 自由基的利用率低, 宜采用较低的接枝反应温度, 需辐照后立即进行接枝聚合反应。H. Mitomo^[35]首先研究了 PHB 以及它的共聚物 PHBV 的辐射接枝聚合, 运用上述两种方法成功地将甲基丙烯酸甲酯(MMA)、2-羟乙基丙烯酸甲酯(HEMA)接枝在 PHB 和 PHBV 分子链上。此外, 应用辐射聚合法人们还得到 PHB 与丙烯酸(AAc)、苯乙烯(St)、异戊二烯(Isoprene)^[36-37]等许多接枝共聚物。

2) PHB 大单体反应改性

PHB 大单体反应改性是指首先得到末端带有特定官能团的 PHB 低分子链段, 即 PHB 大单体, 然后采用大单体反应技术合成含 PHB 低分子链段的新分子结构, 如将 PHB 大单体接枝在其他分子链上或形成嵌段共聚物等。

PHB 大单体可通过醇解、水解、高温裂解等多种方式来实现。以对甲苯磺酸为催化剂, 用醇或二醇对 PHB 分子进行醇解, 可得到两端为羟基的 PHB 大单体^[38]。PHB 在酸性或碱性条件下也会像通常的酯一样发生水解, 可得到含羧基或对应羧酸盐类端基的 PHB 大单体^[39]。高温下 PHB 分子链的酯基部分易形成六元环结构, 断链时夺取亚甲基氢, 生成含双键或羧基末端基的 PHB 大单体^[40]。嵌段共聚物 P(HB-CL)和 P(HB-LA)就是利用末端带有羟基的 PHB 大单体与三乙基铝 AlEt_3 形成大单体引发剂 PHB-o-AlEt₂, 然后引发 ϵ -己内酯(PCL)或聚乳酸(PLA)聚合形成嵌段共聚物^[41]。利用末端带有羟基的 PHB 大单体与壳聚糖侧基上的氨基发生酰胺化作用, 可将 PHB 链段接枝到壳聚糖主链上^[42]。

3) 反应性共混

反应性共混是指共混的过程中由化学反应生成了共混组分的相容剂,进而达到改善共混体系相容性的目的。PHB 和聚 ϵ -己内酯(PCL)在共混过程中加入过氧化二异丙苯(DCPO)^[43],共混物的韧性明显提高,这是由于在共混过程中有 PHB-b-PCL 嵌段共聚物生成,改善了 PHB 与 PCL 的相容性。Immirzi 等研究了 PHB/聚己二酸丁二醇酯(PBA)反应性共混体系,该共混体系的韧性比纯 PHB 有明显提高,其原因是在共混过程中有 PHB-g-PBA 接枝共聚物生成,从而改善了非相容共混体系的相容性。

2.5 生物降解高分子材料在体内的降解机制及调控

组织工程支架用材料作为主体高分子材料,其降解速度必须与组织修复速度相一致,根据组织部位的不同,对其降解速度要求有不同的差异,如骨为 1-2 个月,关节为 2-3 个月,而作为组织器官的再生,一般则至少需要半年以上。因此,如何调控组织工程支架材料的降解速率使其与不同病损组织部位的修复生长速率相匹配显得非常重要。为此,首先要清楚材料的降解机制。由于材料的多样性和降解过程的复杂性,至今仍不完全清楚材料在体内的降解机制。本节主要介绍几种可能机制以及影响降解的因素和降解速度的调控途径。

2.5.1 降解机制

材料在体内的降解和吸收是生物环境作用的复杂过程,包括物理、化学和生化因素。物理因素主要是外应力,化学因素主要有水解、氧化及酸碱作用,生化因素主要是酶和生物。由于植入体内的材料主要是接触组织和体液,因此水解(包括酸碱作用和自催化作用)和酶解是最主要的降解机制^[3]。

(1) 水解机制

可降解高分子材料的降解主要是水解,水解的过程可以被酸、碱或酶所催化。高分子量固态的聚合物装置从植入体内到消失分为两个阶段。第一个阶段是,高聚物从不溶于水的固体变成溶于水溶性物质,这个过程称为溶蚀;宏观上是装置整体结构破坏,体积变小,逐渐变为碎片,最后完全溶解并在植入部位消失;微观上是大分子链发生化学水解,如分子量变小、分子链断开和侧链断裂等,变为水溶性的小分子而进入水溶液。第二阶段是吸收阶段,即进入体液的降解产物被细胞吞噬并被转化和代谢。其中,第一阶段时间的长短,是选择材料的重要依据。公认的降解机制是:可降解高分子材料的酯键无规水解而引起分子链断裂,其降

解速度符合酯类水解的一级动力学，并表现出自催化作用。

(2) 酶解机制

虽然聚合物材料前其的水解过程不一定需要酶参加，但水解生成的低分子量聚合物片段可能需要通过酶作用转化成小分子代谢产物。大多研究者认为酶解和酶促氧化反应是材料在体内降解吸收的重要因素，酶在一定过程上影响降解机制和速度。对易于水解的聚合物，在体内可能同时存在单纯的水解和酶催化水解两种作用，即酶促水解机制。酯酶促进聚酯分解，而水解酶可促进易水解聚合物的降解。但这些因素的作用机制有待完整的实验证据。

2.5.2 影响降解的因素和降解速率的调控

聚合物的降解是多种因素共同作用的结果，表中列出了近 20 种影响降解速度的因素。

上述诸因素中起决定作用的是材料本身的化学结构，其中聚合物主链的易水解和单体的亲水性是最主要的因素。因此，可以根据聚合物主链的结构预言降解趋势并进行分子设计，以制备不同降解速度的聚合物。

除主链结构外，降解速度极大程度上与材料对水的渗透性有关。在实际中，聚合物的形态，起始分子量、加工过程等都影响材料的降解速度。一般认为，凡是能影响材料水渗透性的物理形态和结构因素都能明显的影响降解性，其中形态是主要因素。聚合物的形态可分为结晶态和无定形态，其中结晶态聚合物比无定形态聚合物降解慢的多。此外，增加比表面积的大小和多孔状态结构都有利于水的渗透，因而可加快降解速度。

从上述影响因素分析，在设计降解速度可调控的聚合物支架，应考虑到多方面因素对材料降解的影响。

表 2-4 影响聚合物可能降解的因素^[3]

因素分类	具体因素
材料因素	化学结构：水解性、亲水性、离子强度 构型：光学异构体、立体规整度 形态：结晶型或无定型以及结晶度大小 分子量：分子量的大小、分子量的多分散性 形状：比表面积的大小 低分子物的存在：自催化作用
植入部位的环境因素	体液：PH 大小、金属离子 酶：种类和浓度 吸附物质的种类
物理因素	外应力的存在、消毒方式、保存历史

2.5.3 PHB 的降解机制

关于 PHB 的降解研究，人们研究较多。在常温条件下，PHB 有两种降解机制一种是在无菌条件下的通过水解进行，特别是在碱性条件下，降解速度很快，另外有研究表明在体内主要以水解为主，这种机制对于 PHB 在医用方面的应用非常重要。另一种机制是自然环境中的酶降解机制。许多细菌和真菌可以分泌解聚酶，有些甚至可以利用 PHB 作为唯一碳源生长、如粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*)、勒氏假单胞杆菌 (*Pseudomonas lemoignei*)、德氏假单胞菌 (*Pseudomonas delafieldii*) 和单纯青霉 (*Penicillium simplicissum*)。

(1) 酶降解^[44]

粪产碱杆菌中有两种 PHB 解聚酶，PHB 解聚酶和寡聚集体水解酶。解聚酶分子量约为 50000 既可降解 PHB，又可降解水溶性寡聚体，但对短链寡聚体活性相对较低，不能作用于二聚体，它以内式作用于羟基端第二个酯键，产生二聚体和少量的单体。寡聚集体水解酶仅作用于水溶性寡聚体，但活性比解聚酶要高 10 倍，链越长作用越快，但不能作用于聚体。勒氏假单胞杆菌也有两种聚体解聚酶 PHB 解聚酶和二聚体水解酶。不同的菌株情况略有差异，有些是诱导型酶，有些是组成型酶。影响 PHB 降解速度的因素较多，包括环境类型、微生物种群及活力、水分温度、制品厚度、表面组织形态、孔隙率及制品中的第二组合。在自然环境中、能降解 PHB 的微生物范围很广、包括细菌、放线菌和霉菌等。环境中的 pH、温度等不同，降解的主导微生物也不同。

通常情况下, PHB 厌氧降解比有氧降解快。真养产碱杆菌在厌氧条件下, 主要的代谢产物是乙酸和 3-羟基丁酸, 乙酰 CoA 转变成乙酸的同时生成 ATP。而在有氧情况下, 乙酰 CoA 完全分解成 CO_2 和 H_2O , 产生 12 个 ATP。与 PHB 相比, 有较长侧链的 PHA 在环境中降解速度较慢, 因为低分子量的有机化合物离子化速度比结构复杂的要快, 并且长侧链的重复单元增加了 PHA 的疏水性, 抑制或阻碍了微生物在聚集体表面的生长。

(2) 水降解

对使用于人体的可降解生物材料, 人们首先关心的是它的降解产物的毒性, 以及如何人为地控制降解速度。PHB 是可完全降解的聚合物, 它的体内代谢终产物是 3-羟基丁、乙酰乙酸、水和二氧化碳, 对人体没有毒性。PHB 也可以在水中不需要任何酶的作用以缓慢的速度水解^[45]。但 PHB 的水解速度要比在同样条件下的酶解速度低两到三个数量级。Y.Do^[46]等人研究的结果相同, 他们都发现不同的 PHB 样条在 $2\sim 55^\circ\text{C}$ 的缓冲液中都没有重量下降和表面腐蚀现象。聚合物的重均分子量也(Mw)不变。由于随机的链剪切作用, 数量分子量(Mn)有所下降, 但不影响聚合物的其它机械性能(如拉伸应力/杨氏模量等)。

(3) PHB 的酶降解过程

在对酶降解 PHB 的研究中发现, PHB 解聚酶都不能降解人工合成的无定型 P(R,S-HB), 而当 P(R,S-HB)与 PHB/V 共混后又可被酶降解; 同样纯 P(R,S-HB)无法被酶降解, 而当其与 PLA 形成二元嵌段共聚物后又变得可以被酶降解, 而 PHB 解聚酶是无法降解 PLA 的。这种现象被称为结晶引发生物降解。对 PHB 解聚酶的基因结构分析表明, 解聚酶主要由两个主区和一个连接区域组成。其中一个主区称为键合区。主要的作用是与 PHB 链发生键合而与材料相连。另一主区是酶催化区, 它包含有解聚 PHB 链的基因链段。对酶降解 PHB 的研究表明, 整个降解过程分为两步: 首先是通过酶的键合区与 PHB 发生键合作用而使酶吸附在材料表面; 第二步是通过酶催化区中对 PHB 有降解作用的基因段对 PHB 材料进行降解, 形成水溶性的产物。

从 PHB 的酶降解过程中可看到, 酶要对 PHB 的降解起作用, 首先必须与 PHB 链键合在一起。而对于无定型的 P(R,S-HB) 其玻璃化转变温度较低, 室温下处于高弹态, 由于分子链的活动性太强以至于酶无法与 PHB 链形成稳定的键合, 而无法对 PHB 降解起作用。对于细菌合成的 PHB 由于其一般都是结晶的聚合物, 降解酶能与结晶区形成较为稳定的键合, 因而能对 PHB 的降解起作用。一般认为降解酶首先进攻 PHB 材料表面的非晶区, 而对于 P(R,S-HB)/PLA 及 P(R,S-HB)/PCL 等形成的共混物来说, 酶可以与 PLA 及 PCL 中的晶区形成稳定的键合, 然后再对 P(R,S-HB)链进行降解, 这就是发生结晶引发降解的原因。

另外, 对 PHB 的降解机制, Doi^[47]曾提出一种假设, 认为 PHB 解聚酶由两

部分组成: 结合部(binding domain)和活性端(active side), 由于 PHB 结晶具有规整结构, 解聚酶易于在其表面吸附, 能和 PHB 分子粘合在一起, 随后解聚酶的活性部分发挥酶促作用, 首先降解 PHB 的非晶部分, 然后再降解 PHB 的结晶部分。陈珊等^[48]研究聚 β -羟基丁酸酯(PHB) 生物降解过程, 实验结果与此有很好的 consistency。实验表明, PHB 的结晶部分具有较高的有序性和较大的密度, PHB 解聚酶不能直接进入 PHB 的结晶中而引起降解, 而是首先进攻密度低、松散的非晶部分。当非晶部分降解后, PHB 结晶表面便会形成很多的自由端基, 这些自由端基具有较大的活动能力, 导致 PHB 的结晶表面形成非晶过度层, PHB 结晶逐渐被破坏, 随后 PHB 解聚酶继续对非晶部分降解, 直至使 PHB 完全降解。

(4) 影响 PHB 降解速度的其它因素及其调控降解速度的方法

从上面酶对 PHB 降解的影响因素外, 实际上, 影响 PHB 的降解速度和许多因素有关, 如物理状态(粒子的形状, 溶液或熔融浇铸膜, 单晶)、结晶度、晶粒大小、酶的类型和浓度、温度等, 如 M. Canetti 研究了 PHB 熔体在不同条件下结晶所得到样品的酶降解状况, 发现结晶度高的样品降解速度慢, 因此他认为形态结构对 PHB 的降解有非常大的影响^[49]。因此, 可通过降解条件的控制, 以此对 PHB 的降解速度的调控。

从 PHB 材料本身及材料的降解机制来言, PHB 作为组织工程用材料, 要改善其降解速度慢的特点, 一个方面就是要调整 PHB 的形态, 即改善 PHB 高结晶度的特点, 对此, 一般主要是通常采用生物改性或与另外生物降解高分子共混改性的手段来给予改善。生物改性 PHB 降解速度在 PHB 改性这一节中以叙述过, 在这里就不在多述了。下面就以一些典型的 PHB 物理共混体系给予介绍。

1) PHB/聚(ϵ -己内酯)共混体系^[50]

聚(ϵ -己内酯)(PCL)是一种典型的结晶型脂肪族聚酯, 易被脂肪酶等微生物分解。PCL 可熔融成坚韧的半透明物, 有着优良的热稳定性、水解稳定性和低温性能。

实验结果表明, PHB 与 PCL 是不相容的。二者的熔点随组成的变化不十分明显; 而 PHB 和 PCL 的结晶度随着共混组成而改变, 结晶度随着另一组分的加入降低很多, 说明二者的结晶有互相干扰的作用。SEM 结果表明, PCL 对于 PHB 的脆性有所改善, 当 PCL 含量较低时, 呈脆性断裂, 而当 PCL 含量高时, 呈韧性断裂。PHB/PCL 共混体系的拉伸强度和杨氏模量, 随着 PCL 含量的增加而降低, 并且在 50% 时达到最小值。这也说明了二者相容性较差。PHB/PCL 共混物的降解性受组成的影响较大。当 PCL 含量为 60~100% 时, 共混物的降解较慢; 当 PCL 含量为 0~40% 时, 共混物降解速度加快。

2) PHB/聚氧乙烯共混体系^[51,52]

聚氧乙烯(PEO)是具有柔顺性、高强度的热塑性树脂, 可以采用压延、挤出、注塑等方式进行加工 PEO 和其它树脂有着良好的相容性, 并且可生物降解。采用

PEO和PHB共混,既可以拓宽PHB的加工窗口,改善PHB的力学性能,且通过改变PHB/PEO共混体系的组成可控制材料的降解速度。

另外,PHB单体与其它单体共聚形成嵌段共聚物,来降低PHB链段的规整性,以降低PHB的高结晶度,如PHB单体与聚乙二醇(PEG)单体形成共聚物,不但降低了PHB的结晶度,而且改善了其亲水性,这些因素都有利于提高PHB在体内的降解速度。

2.6 聚 β -羟基丁酸脂支架在组织工程中的应用

聚 β -羟基丁酸酯作为一种天然的热塑性聚酯,具有良好的生物相容性和生物降解性,可在人体内自然降解,其最终降解产物为3-羟基丁酸,在人体血液中是一种普通的代谢物,不会给人体带来任何毒性作用。还具有无刺激性、无免疫原性、无热原反应、压电性、机体强度高、化学性能稳定等特点。PHB的这些性质使其成为生物学中的应用性研究中的一种新的组织工程支架材料。聚 β -羟基丁酸脂支架在组织工程中主要应用如下:

2.6.1 软骨组织工程

软骨组织工程是修复缺损骨组织的一种较新的手段。由于软骨的组织结构细胞成分相对简单(软骨组织内无血管、神经、淋巴分布,只含有一种细胞即软骨细胞)。因此,直接用组织工程的方法获得临床软骨替代物用于软骨缺损修复的研究较为成熟。目前用做软骨组织工程支架的主要生物材料有聚乳酸、聚羟基乙酸、胶原及纤维蛋白。但单纯的用其一种材料,很难达到临床软骨修复的使用要求。因此,对现有材料的化学改性或通过天然高分子与合成高分子的物理共混的方式,进而满足组织工程用支架的要求。目前聚羟基丁酸酯作为软骨修复材料,研究者们主要集中于聚羟基丁酸酯支架-软骨细胞复合及其聚羟基丁酸酯或聚羟基丁酸酯/共聚物与生物陶瓷共混的方法来构建受损软骨组织的研究。

第四军医大学杨维东等^[53]研究了聚羟基丁酸酯支架复合软骨细胞构建软骨组织的可行性和方法。他们将孔径为300~400 μm ,空隙率为85%,经过100 mg/L人纤维粘连蛋白的表面修饰,接种兔耳廓软骨细胞($4 \times 10^{10} \text{L}^{-1}$),以自体细胞移植方式将聚羟基丁酸酯/软骨细胞复合物植入新西兰兔皮下,在移植后第4,8周进行大体标本、苏木精-伊红染色和番红20染色观察新生软骨组织的形成情况。对照组为聚羟基丁酸酯支架植入。结果显示,第4,8周大体标本外观像软骨组织,第4周组织学观察显示有软骨组织形成,但细胞外基质较少,第8周软骨趋向成熟,

有较多的基质形成, 这表明聚羟基丁酸酯支架材料可以用于组织工程骨的构建。王常勇等^[54]研究了聚羟基丁酸酯泡沫材料作为软骨细胞支架材料以及体内培育组织工程化人工软骨的可行性。他们将新西兰幼兔关节软骨细胞种植到聚羟基丁酸酯泡沫材料上体外培养1周后, 将细胞支架材料复合体移植到兔背部皮下分别于术后第4, 8, 12周取材, 进行大体观察及组织学、免疫组织化学观察。结果发现软骨细胞—支架材料复合体组在兔背部皮下有新生软骨形成, 这表明聚羟基丁酸酯泡沫材料可以作为软骨组织工程的人工细胞外基质, 可以其为支架在动物体内培育组织工程化人工软骨。

Gamze等^[55]将聚羟基丁酸酯/V和含有磷酸钙的胶原多孔支架分别植入8只兔子的左右腿的膝骨沟中, 在4周和8周之后的结果表明种有软骨细胞的聚羟基丁酸酯/羟基戊酸酯多孔支架上有类似与正常关节软骨的软骨形成且异物反应很是微小。与有磷酸钙的胶原比较而言, 聚羟基丁酸酯/羟基戊酸有着较好的疗效反应。这充分表明聚羟基丁酸酯对交叉韧带的修复有着巨大的应用潜力。

2.6.2 骨组织工程

骨骼的损伤是一种很普通的病, 大约50%需要手术的方式给予治愈^[56], 聚羟基丁酸酯作为一种新的组织工程用支架材料, 特别是聚羟基丁酸酯的压电势, 与天然骨相比较而言, 是一个特有的性质^[57]。许多实验室已研究了外加1 μA 小电流对骨头加速生长的加速作用^[58]。因而聚羟基丁酸酯及其共聚物作为未来骨移植材料受到了广泛的关注。

第四军医大学伍锦华等^[59]探讨了聚羟基丁酸酯支架在修复骨缺损的可行性。他们将体外培养的兔骨髓细胞, 使其向成骨细胞分化后接种于本实验室制备的多孔聚羟基丁酸酯支架上, 植入兔下颌角骨缺损中, 以单纯缺损、单纯植入材料、植入新鲜骨髓加材料作为对照。4, 8, 12, 24周分别处死各组家兔2只, 行大体标本、X射线摄片、组织学及扫描电镜观察新骨形成情况。结果表明实验组24周大部分材料被骨性组织取代, 修复骨缺损效率较对照组高。这表明聚羟基丁酸酯组织工程支架可用来修复缺损的骨组织。

Boercc等^[60]研究了聚羟基丁酸酯与羟基磷灰石复合材料作为骨修复材料的特性。羟基磷灰石脆性较大且羟基磷灰石与人骨组织之间的亲合性较差, 而聚羟基丁酸酯可以在人体内水解和酶解, 而且聚羟基丁酸酯本身具有压电性, 可刺激新骨的成长。研究表明调节聚羟基丁酸酯/羟基磷灰石的组成可制得不同强度的材料, 这种材料既可作为外科移植骨的固定材料也可作为骨移植的替代材料。

Torun等^[61]将老鼠的造骨细胞种于多孔的P(HB-co-8%HV, 羟基丁酸与8%羟基戊酸共聚) 支架上, 实验结果表明造骨细胞在聚羟基丁酸酯/羟基戊酸支架上增殖。

在细胞培育的21 d后,通过共聚激光扫描显微分析,造骨细胞在支架上生长及开始矿化。在60 d过程中,增长的碱性磷酸酶和造骨细胞的分化表明源自干细胞的造骨细胞的显形。扫描电镜的组织形态分析和共聚激光显微分析表明造骨细胞可以在聚羟基丁酸酯/羟基戊酸支架当中生长及其细胞的矿化。因此,这充分表明聚羟基丁酸酯/羟基戊酸支架在骨组织工程以聚合物支架为未来的应用中,具有潜在的发展前景。

2.6.3 皮肤组织工程

组织工程最成功的领域是人工皮肤^[62],某些品种已经商品化,如胶原-硫酸软骨素人工皮肤。用于修复损伤皮肤的创面包敷材料必须具备一定的柔韧性、黏性、溶胀性和强度,而且能为创面提供营养,吸收伤口分泌物以防止伤口感染。

Chaputa^[63]通过盐浸/溶剂浇铸方法制成的聚羟基丁酸酯/羟基戊酸酯共聚物具有很好的高度相连的微细结构,孔隙率达0.85 成纤维细胞在其上增殖速率快,而且同时有大量蛋白质形成,这表明聚羟基丁酸酯/羟基戊酸酯多孔支架可用与皮肤组织的重建。Doyle等^[64]研究了应用人类真皮成纤维细胞在具有降解性的聚羟基丁酸酯织网上进行培养,并同时与聚乳酸及聚羟基乙酸酯织网进行比较,研究发现成纤维细胞可以在这些材料织网上培养增殖。与聚乳酸及聚羟基乙酸酯织网比较,细胞在聚羟基丁酸酯织网上的增殖速率较快,大约7 d就可形成单层,这表明聚羟基丁酸酯可以用于表皮或真皮的修复。

2.6.4 血管组织工程

理想的血管支架应该是生物可降解相容性的替代物,保持足够的机械强度和柔韧性,能够控制释放抗增生和抗血栓的药物;关于其降解时间有不同的观点,有学者认为6~12个月,有学者则认为12~24个月。聚羟基丁酸酯作为天然的高分子生物降解材料,具有良好的机械强度和适当的降解速度及其良好的血液相容性,它在体内的降解产物为3-羟基丁酸,在人体血液中是一种普通的代谢物。尽管聚羟基丁酸酯的柔韧性欠佳,但可以通过共聚或物理共混的方法给予改善,如Poly(HB-co-HV),聚羟基丁酸酯/羟基戊酸酯的力学性能及其降解性能可随着共聚单体HV的比例调整,而进一步得到调控;聚羟基丁酸酯中也以加入生物相容性较好的柠檬酸酯进行增塑来改善其韧性。因此,基于聚羟基丁酸酯的上述优势,聚羟基丁酸酯支架用于血管组织工程引起了研究者的关注。

艾卫兵等^[65]研究了改性聚羟基丁酸酯(聚羟基丁酸酯与聚氧乙烯物理共混)作为血管组织工程支架材料与血管平滑肌细胞的细胞相容性,结果表明采用体外

培养的兔血管平滑肌细胞接种在经胶原包埋处理后的管型聚羟基丁酸酯支架材料上,经相差显微镜和扫描电镜观察细胞的粘附和生长情况,发现血管平滑肌细胞在改性后的管型聚羟基丁酸酯支架材料上黏附生长良好,细胞生长融合成片状。苏木精-伊红染色观察显示细胞在聚羟基丁酸酯材料上生长良好。这表明改性后的聚羟基丁酸酯与兔血管平滑肌细胞有较好的生物相容性。

Lootz等^[66,67]采用自动浸渍技术以与激光加工的方法制备了球形的可扩张的聚羟基丁酸酯支架。Behrend^[68]采用三乙基柠檬酸酯增塑的聚羟基丁酸酯支架原型在扩张后瞬间平均弹性回弹越20%~24%,而扩张5d后达到27%~29%,然后将三乙基柠檬酸酯增塑的聚羟基丁酸酯支架作为可生物吸收血管内支架植入兔子的髂静脉后16~26周,支架几乎完全消失。这充分表明聚羟基丁酸酯支架可用于血管组织的修复。

2.6.5 聚羟基丁酸酯支架在组织工程其他方面的应用

聚羟基丁酸酯支架除了用于修复软骨、骨和皮肤及血管的组织损伤外,还可用于做周围神经、心脏瓣膜等组织的修复。人工神经导管引导神经再生是组织工程周围神经研究的焦点。聚羟基丁酸酯神经导管用于组织工程周围神经修复主要基于聚羟基丁酸酯其较长的吸收时间(至少6个月)和神经组织的生长由电荷刺激的这两点^[69]。

Young等^[70]应用组织工程技术对兔子体内的腓骨神经断裂达4cm的间隙进行搭桥修复,他们借自体神经移植修复的方法与聚羟基丁酸酯神经导管搭桥植入兔子体内修复的方法对比来考察其聚羟基丁酸酯神经导管作为修复神经组织的可行性。术后42d,对兔子体内的移植物进行观察,结果显示在自移神经体上与聚羟基丁酸酯神经管壁再生的神经轴突已经架起了断裂的神经间隙,而且再生的神经轴突长度随时间的增加而增长。另外,在聚羟基丁酸酯神经管壁上的具有免疫的再生神经纤维的区域大于自体神经移植的区域。这表明聚羟基丁酸酯神经导管支持周围神经在生可达数天,因此聚羟基丁酸酯神经导管适合用于神经断裂间隙长的神经损伤的修复。Mosahebi等^[71]研究了聚羟基丁酸酯神经导管联合藻酸、雪旺细胞的修复缺损神经可行性,结果表明聚羟基丁酸酯纤维可使得雪旺细胞呈微观上的几何排列,聚羟基丁酸酯神经导管联合有雪旺细胞的藻酸盐可提高周围神经的再生。

在心脏瓣膜组织工程的大量研究中,聚羟基丁酸酯支架用心脏瓣膜的修复也有一定的尝试。Vacanti等^[72]将种有羊体的骨动脉上采集的纤维母细胞和内皮细胞的聚羟基丁酸酯/聚羟基脂肪酸酯纤维支架制成的心脏瓣膜移植到羊体,结果表明这种心脏瓣膜组织工程替代物,可以承担正常的心功能。Sodian等^[73]也用聚羟基丁

酸酯制成了三叶壮的心脏瓣膜支架用与心脏瓣膜的修复进行了相关的研究。

第三章 PHB 的物理改性及其体外降解的研究

组织工程支架是组织工程研究内容之一，是重要的研究对象。在组织工程中，除了考虑三维细胞支架的结构，如孔隙形态、孔径大小、连通性等要素之外，支架在体内的降解速率也是一个很重要的指标，它必须与组织生长部位的生长修复速度相一致，根据组织部位的不同，对其降解速率也有较大的差异，如皮肤组织 3-10 天，膜组织 15-30 天，内脏 1-2 个月，坚硬组织 2-3 个月，大器官 6 个月以上。因此，对支架材料的降解速率的调控是非常必要的。

影响高分子降解因素很多，主要是分子链是否有可水解的键、高分子的结晶性、分子量、亲水/疏水性以及环境因素（如酸碱性、温度、酶）等。因此针对这些影响因素，可对高分子进行改性进而调控其降解速率。其中，用两种已知是生物相容、无毒的可降解高分子进行共混，可以根据实际需要简便的配制具有一定物理、力学和降解性能的共混物，是设计降解速率可控材料的一种有效手段^[74]。

本章拟对 PHB 与 PLLA（聚乳酸）、PEO（聚氧乙烯）不同比例共混，研究其冷结晶性的行为、相容性及结晶度，对 PHB 在模拟体液环境下的降解速率的影响，从而为制备降解速率可调控的 PHB 纤维或 PHB/PLLA/PEO 复合纤维提供一定的理论基础。

PLLA 是一种无毒、可完全生物降解的聚合物。它不仅具有较好的化学惰性、易加工性，而且还具有良好的生物相容性，是最有前途的可生物降解高分子材料之一^[75]，其降解速率较 PHB 快。PEO 是亲水性非降解高分子，作为生物高分子用，它有着良好的生物相容性、非常低的毒性^[76]。因而 PEO 有望提高 PHB/PLLA 共混物的生物相容性及其加快 PHB 与 PLLA 的降解速率。

3.1 实验部分

3.1.1 主要原材料和试剂

聚 β -羟基丁酸酯(PHB)为西北大学生命科学院合成, $M_n 4.0 \times 10^5$,纯度为 99%,菌种为园菌种为园褐固氮菌 G-3。

聚乳酸 (PLLA)	$M_w 1.3 \times 10^5$	分布指数: 1.4	本实验室合成
聚氧乙烯 (PEO)	$M_w 1.5 \times 10^6$		上海树脂研究所
三氯甲烷(CHCl ₃)	分析纯		西安化学试剂厂

PBS 缓冲液(0.01M pH7.2~7.6)	百灵克
溶菌酶	SIGMA 公司进口分装

3.1.2 主要仪器

分析天平	TG328B	上海天平总厂
示差扫描量热计 (DSC)	TAMDSC 2910 型	美国
扫描电子显微镜 (SEM)	S-570 型	日本 HITACHI
偏光显微镜 (POM)	E400 POL	日本 Nikon

3.1.3 试样制备及其降解液的配置

将 PHB 和 PLLA 按一定质量比例溶解在氯仿中, 形成 1w/v% 的溶液, 待充分溶解后, 室温下搅拌 30 分钟, 过滤并静置脱泡后, 在四氟乙烯上浇铸成膜, 室温下干燥 24h 后, 再置于 60℃ 真空干燥箱内抽提溶剂至恒重。共混物试样的质量比 (PHB/PLLA) 以依次为 1:0, 4:1, 3:2, 1:1, 2:3, 1:4, 0:1。另外, 在 PHB/PLLA 质量比=1:1 的共混物溶液中加入 5%, 10%, 20%, 30% 的 PEO, 依上述同样的步骤浇铸成膜, 干燥至恒重, 待用。

体外降解液为 SIGMA 公司提供的纯度为 99.8% 的溶菌酶溶于 PBS 缓冲溶液 (pH=7.4) 配置成 2mg/ml 的溶液。

3.1.4 实验方法

(1) DSC 分析

样品的整个 DSC 测试都在氮气的氛围保护下测试。取其样品 10-15mg, 置于热分析仪中进行不同过冷度的 DSC 测试。测试方法①: 试样于 190℃ 融 2min 后, 以 25-30℃/min 的降温速度降至 -40℃, 再以 20℃/min 二次升温速度升至 210℃, 观察其玻璃化转变及冷结晶性和熔融行为。测试方法②: 将样品升温至 210℃, 保持 2min 后, 置于液氮中淬冷, 再以 20℃/min 升温速度升至 210℃, 观察其玻璃化转变及其冷结晶和熔融行为。

(2) 偏光显微

取其少量样品, 缓慢加热熔融, 然后置于热台温度为 120℃ 的偏光显微镜下, 观察不同质量比的 PHB/PLLA 共混物的球晶体生长情况及共混物形态。

(3) 体外降解实验

在 20mm×180mm 的试管中加入 15ml 已配置好的降解液中, 在一组 (有 5 根试管组成) 试管中浸入按相同组成相同工艺制备好的膜片各一张, 膜片尺寸为

13×10×1mm³，用胶塞密封试管，置于(37 ± 1)°C水浴中进行水解试验。在水解的第 15, 30, 60, 90, 120d 分别取出试管 1 支，膜片以蒸馏水洗净晾干，置于真空干燥箱 40°C 至恒重，再进行测试。降解实验总共有 6 组，前 5 组试管中的膜片组成分别为：PHB/PLLA 质量比分别为 0:1, 1:0, 4:1, 3:2, 1:1, 第 6 组膜片组成为 5% 的 PEO 的 PHB/PLLA=1:1 的共混物。每组降解实验均按上述方法进行。

3.1.5 测试与表征

(1) 膜片降解后的残留量

根据下式计算，得到一定时间的残留百分量。

$$\text{Remaining mass (\%)} = 100 \times W_2 / W_1$$

式中，W₁ 是膜片降解前的质量，W₂ 是膜片降解后的质量。

(2) 膜片降解前后的表面形态观察

将膜片喷金后，用扫描电镜 (SEM) 观察膜片降解不同时间的表面形态。

3.2 结果与讨论

3.2.1 共混体系经空气骤冷的冷结晶性及其共混物组成对共混体系结晶度的影响

图 3-1 是 PHB/PLLA 共混物从熔体状态以 25–30°C/min 快速空气降温至 -40°C，再以 20°C/min 升温至 210°C 的 DSC 谱图。所得热力学数据列于表 3-1。共混物结晶度 X_C 由下式计算：

$$X_C^{\text{blend}} = (\Delta H_f / \Delta H_{\text{ref}}) \times 100\%$$

式中， $\Delta H_{\text{ref}} = \Delta H_{\text{ref, PHB}} W_{\text{PHB}} + \Delta H_{\text{ref, PLLA}} (1 - W_{\text{PHB}})$ ， ΔH_{ref} 是百分之百结晶的样品熔融焓，其中 $\Delta H_{\text{ref, PHB}} = 146 \text{ J/g}^{[77]}$ ， $\Delta H_{\text{ref, PLLA}} = 93.7 \text{ J/g}^{[78]}$ ，W 为共混组分的质量百分比， ΔH_f 为共混物熔融焓。

由图 3-1 见，在共混物的体系中，仅检测到 PLLA 的玻璃化转变温度和冷结晶温度。这是熔体在快速降温至 -40°C 的过程中，PHB 结晶较快，而 PLLA 结晶较慢，因而在升温过程中 PLLA 继续结晶，而 PHB 已是半结晶状态。E. Bliimm^[79] 等偏光研究表明 PHB 球晶在 T_C=90°C 时，球晶以最大生长速度 230 μm/min 生长；而 PLLA 在 T_C = 105°C，以大约 9 μm/min 最大速度生长。

由表 3-1 见，PLLA 的冷结晶温度随共混物组成变化而变化，从纯组分的 114.9°C 降至 PLLA 含量为 20% 时的 100.4°C。此类情况有三方面的原因，一是一种结晶组

分的存在使得第二相结晶组分的玻璃化转变温度降低, 导致第二相结晶组分在较低的温度下就能够完成有规律的变化^[80]; 二是一种结晶速度相对较快的结晶聚合物对第二相结晶聚合物起成核作用, 从而使得第二相结晶组分的冷结晶温度下降^[81]; 三是熔体在快速降温到低温的过程中, 虽然结晶速度慢的结晶聚合物未来的及完全结晶, 但可能形成了小的晶核或少量的不完整晶体, 从而使得聚合物从玻璃态升温结晶时, 冷结晶温度降低。在实验误差范围内, 测得 PLLA 的玻璃化转变温度基本在 60℃ 左右, 因此第一种原因基本排除。其它两面的原因, 待在 3.2 节中用液氮骤冷共混物冷结晶行为的讨论中给予分析。

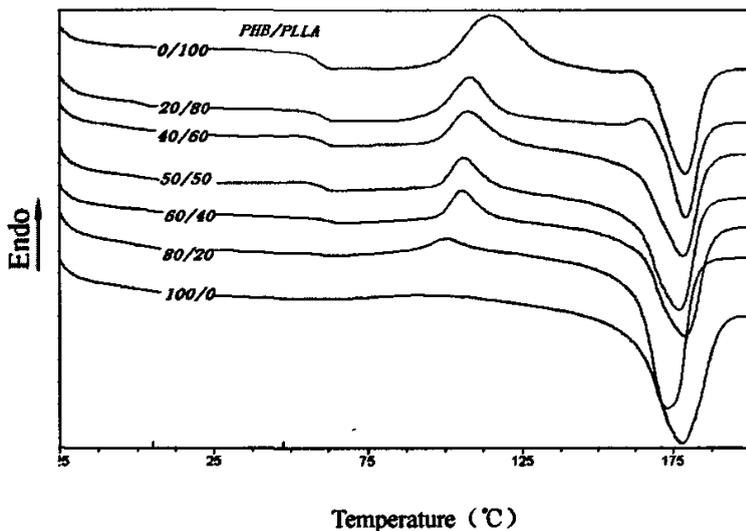


图 3-1 经空气骤冷的 PHB/PLLA 共混物 DSC 曲线

表 3-1 PHB/PLLA 共混物热力学数据

Blend PHB/PLLA	$T_g/^\circ\text{C}$		$T_m^{\text{blend}}/^\circ\text{C}$	$T_{cc}/^\circ\text{C}$		$\Delta H_{cc}/\text{J g}^{-1}$		X_c^{blend}
	PHB	PLLA		PHB	PLLA	PHB	PLLA	
100/0	n.d.	—	177.6	n.d.	—	n.d.	—	79%
80/20	n.d.	60.8	173.0	n.d.	100.4	n.d.	46.0	75%
60/40	n.d.	62.5	178.7	n.d.	105.4	n.d.	33.3	70.8%
50/50	n.d.	61.0	176.8	n.d.	106.1	n.d.	29.8	71%
40/60	n.d.	61.1	178.0	n.d.	107.3	n.d.	38.0	69.6%
20/80	n.d.	61.1	179.0	n.d.	107.9	n.d.	37.1	39.5%
0/100	—	59.8	178.9	—	114.9	—	49.6	60%

n.d.: 未检测到

从表 3-1 中还看出, PLLA 组分冷结晶焓随其在共混体系的含量减少而降低, 与纯组分 PLLA 相比较, 组分 PLLA 冷结晶焓有着显著的降低, 这表明 PLLA 在共混

物的结晶的完善程度受到了 PHB 的影响。共混物结晶度也随其组成 PHB 的含量减少而显著降低。

3.2.2 共混体系经液氮骤冷的冷结晶性及共混组成对共混体系结晶度的影响

图 3-2 是 PHB/PLLA 共混物熔体经液氮骤冷后, 从 -40°C 以 $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 210°C 的 DSC 图, 所得数据列于表 3-2。由图 3-2 见, PHB 的玻璃化转变温度 T_g 随着 PLLA 的加入, T_g 向 PLLA 的玻璃化转变温度靠近, PLLA 玻璃化转变温度 T_g 仅在 PHB/PLLA=20/80 检测到, 其它组分未检测到是由于 PHB 的冷结晶峰遮盖了 PLLA 的玻璃化转变 (结合表 3-1 和表 3-2, PLLA 的玻璃化转变温度和 PHB 的冷结晶峰在 DSC 曲线上很接近), 但可预测到 PLLA 的玻璃化转变温度 T_g 随 PHB 组分的增多向 PHB 的 T_g 方向上有一定程度上转变。 T_g 是评价高聚物共混的相容性的一个重要标志, 对于部分相容体系, 出现两个彼此靠近的 T_g , 两者越靠近相容性越好^[82]。因此, PHB 与 PLLA 共混有一定程度的相容性。

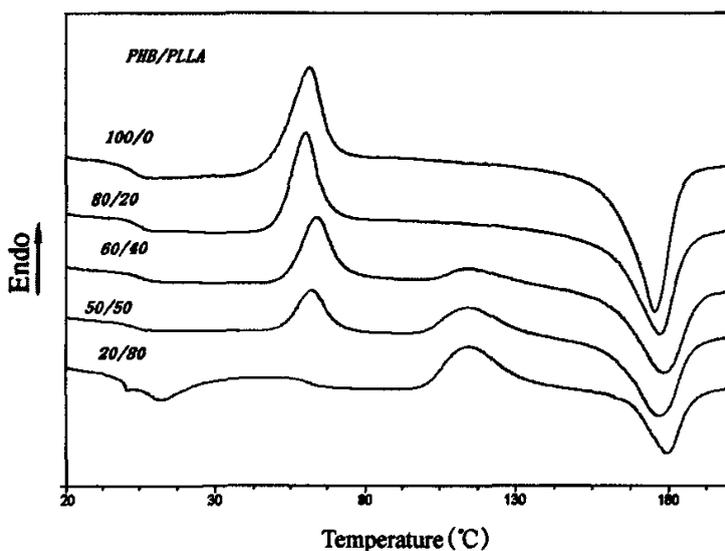


图 3-2. 经液氮骤冷的共混物 PHB/PLLA 的 DSC 曲线

由表 3-2 见, 在实验误差范围内, 共混物中 PHB 与 PLLA 各组分的冷结晶峰及结晶温度 T_{cc} 均不随组成而变化, 这表明 PHB 与 PLLA 的结晶都倾向在各自的晶核上生长结晶, 即均相成核。同时, 这也说明了在图 3-1 中, PLLA 冷结晶温度的降低是由于共混物熔体在快速降温形成的小晶核或不完善晶体造成的。由表 3-2

中, 还见 PHB 的冷结晶温度要大约比 PLLA 低 40℃, PHB 的结晶半高宽明显较 PLLA 窄, 这表明 PHB 结晶远快于 PLLA 的结晶, 且冷结晶速率较 PLLA 大。但 PHB 结晶峰半峰宽基本不随 PLLA 的加入而变化, 而 PLLA 的结晶峰半高宽随 PHB 的加入, 峰宽减小, 说明 PHB 的冷结晶速率在共混物中是恒定的, 而 PLLA 的冷结晶速率与纯组分相比较快^[78]。从上述分析知, 共混物中各组分都是均相成核, 因此共混物中

表 3-2 经液氮淬冷的共混物 PHB/PLLA 的热力学数据

Blends	T _g /°C		T _m ^{blend} / °C	T _{cc} /°C		ΔH _{cc} /Jg ⁻¹		X _c ^{blend} /%	Δw	
	PHB	PLLA		PHB	PLLA	PHB	PLLA		PHB	PLLA
100/0	3.3	—	175.3	61.1	—	63.4	—	77.6	12.2	n.d
80/20	5.1	n.d	177.1	60.0	n.d	63.8	n.d	65.1	10.1	n.d
60/40	5.9	n.d	178.5	63.7	114.2	67.8	20.5	56.1	11.2	15
50/50	7.4	n.d	177.0	62.1	114.7	49.6	52.0	55.0	10.7	19
20/80	13.8	60.3	179.7	n.d	114.8	n.d	58.7	41.3	n.d	20

n. d: 未检测到 Δw: 结晶峰半高宽

PLLA 的冷结晶速率随 PHB 的加入变快, 可能是由于 PLLA 的玻璃化温度 T_g 随 PHB 的加入降低, 使链段的活动性增加, 更易于链段进入晶格, 从而影响晶体生长速率, 使结晶速率提高。尽管, PHBT_g 有所增大, 但对 PHB 晶体的生长速率影响不大, 可能是由于 PHB 结晶速率较快。

在图 3-2 中, 当 PLLA 含量 ≤ 20% 时, PLLA 的冷结晶峰没有检测到, 而在图 3-1 中 PLLA 的冷结晶峰存在, 这说明共混体系在液氮骤冷的条件下, 当 PLLA 含量 ≤ 20% 时, 它可能以很小的微粒分散在 PHB 的基质当中。同样, PHB 在共混物中的含量 ≤ 20% 时, 冷结晶峰在图 3-2 中也没有表现出来, 而此位置检测到 PLLA 的玻璃化温度 T_g, 这可能是 PHB 形成的微晶粒分散在 PLLA 基质中, 使得晶粒难以继续生长。

共混物结晶度随 PLLA 含量增多而降低, 见表 3-2, 这与 3.1 节中的共混物结晶度有同样的结果。这很大程度上取决于共混物组成的变化。

3.2.3 PEO 对 PHB 与 PLLA 相容性的影响及其冷结晶性的影响

图 3-3 是 PEO 作为第三组分加入 PHB/PLLA=1:1 共混物中经液氮骤冷后, 以 20℃/min 升温至 210℃ 的 DSC 曲线, 所得数据列于表 3-3 中。图 3-4 为共混体系

PHB/PLLA/PEO 经空气快速降温后,以同样升温速度升至 210℃的 DSC 曲线。从图 3-4 中可见,PEO 的熔融温度 T_m 随共混体系 PHB/PLLA 组分增多而降低,当 PHB/PLLA 含量为 70%时,PEO 的熔融温度 T_m 为 61℃(纯 PEO 的 T_m 为 74℃);当 PHB/PLLA 含量为 80%时,PEO 的熔融温度 T_m 为 57℃;当 PHB/PLLA 含量继续增大时,由于 PLLA 玻璃化转变温度 (T_g 为 59℃) 的影响,PEO 熔融峰变的不明显。同样,共混组分 PHB/PLLA 体系 T_m 从 PEO 含量为 5%时的 182℃降到 PEO 含量为 30%的 177℃左右。对半结晶高聚物与其它高聚物共混,熔融温度降低可认为高聚物之间是在无定形区是相容的。因此,PHB/PLLA (1:1) 体系与 PEO 共混,两者的熔融温度都有所降低,表明 PHB/PLLA 体系与 PEO 共混在无定形区是相容的体系。

在表 3-3 见,PEO 的加入,组分 PHB 与 PLLA 的冷结晶温度 T_{CC} 显著降低。PHB 的冷结晶温度降低幅度随 PEO 在共混物中的含量增多,保持在 16℃左右,而 PLLA 冷结晶温度降低幅度随 PEO 在共混物中的含量增多而增大。这与 PHB、PLLA 与 PEO 的相容性程度有关^[78,83],PHB 的冷结晶温度降低主要是 PEO 充当了 PHB 的成核剂^[78]。对 PLLA 的冷结晶温度降低,作者认为有两个方面的因素共同作用,其一,PEO 充当了 PLLA 的成核剂;其二,PEO 的存在使得 PLLA 链段活动性增大。

共混物 PHB/PLLA 的熔融峰与未加 PEO 的熔融峰相比,峰形变的尖锐,峰宽变窄,峰高变高,熔融温度增大 2℃左右,共混物结晶度随 PEO 的含量增大而变大,这表明 PEO 的加入不但使得 PHB 与 PLLA 的共混比较均匀,组分之间的分散相尺寸变小^[78],而且使得各组分链段的活动性增大,从而共混组分结晶比较完善,结晶越完善,相应的熔融温度变的增大^[84]。

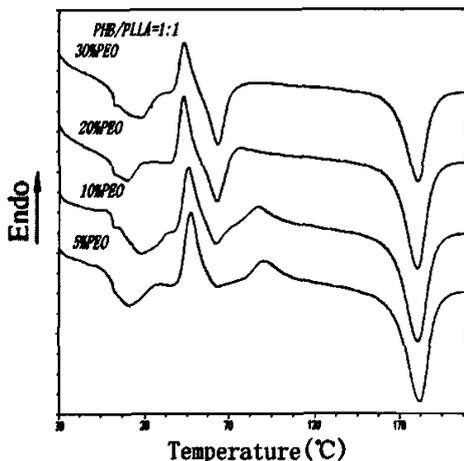


图 3.3 经液氮骤冷的 PHB/PLLA 共混物 DSC 曲线

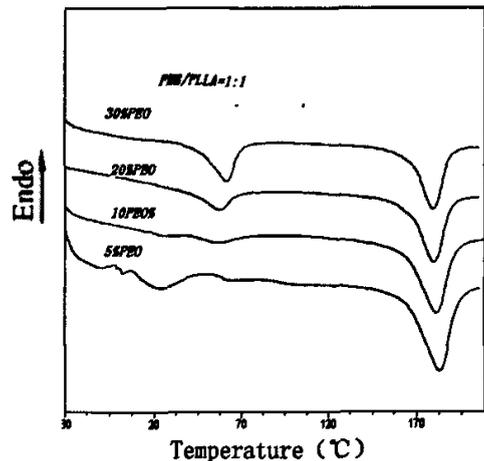


图 3.4 经空气骤冷 PHB/PLLA/PEO 共混物 DSC 曲线

表 3-3. 经液氮骤冷的 PHB/PLLA/PEO 共混物热力学数据

PEO content (in PHB/PLLA=1: 1)	$T_m^{blend}/^{\circ}\text{C}$	$T_{cc}/^{\circ}\text{C}$		$X_c^{blend}/\%$
		PHB	PLLA	
0%	177.3	62.1	114.7	55%
5%	181. 2	46.8	90.0	54%
10%	180. 9	45.4	83.3	65%
25%	180. 6	42.9	n.d	68%
30%	180. 7	43.6	n.d	69%

3.2.4 共混物的结晶形态

(1) 在室温(32 $^{\circ}\text{C}$)结晶条件下的结晶形态

图 3-5~3-7 是将熔融的 PHB、PLLA 及 PHB/PLLA=1:1 共混体系, 快速置于室温 (32 $^{\circ}\text{C}$) 2 小时后的结晶形态。从图 3-5 中可看到, PLLA 在正交偏光下, 视场是黑暗的, 这表明 PLLA 在从熔融态度快速降温到室温的状态时, 由于 PLLA 链段被冻结 (PLLA 玻璃化温度 $T_g 59^{\circ}\text{C}$), 无法继续结晶, 从而保持无定形状态; 而在图 3-6 中, 可见 PHB 的环带球晶, 这是由于 PHB 的链段活性较强, 易于结晶, 当 PHB 从熔体降温到室温状态, 分子链段仍可以活动 (PHB 玻璃化温度 $T_g 3.3^{\circ}\text{C}$), 从而结晶。因此, 在 PHB/PLLA 共混体系的偏光显微图中, 可以认为暗场部分是 PLLA, 亮场是 PHB; 另外, 从图中也可反映出 PHB 与 PLLA 共混体系的分布情况。

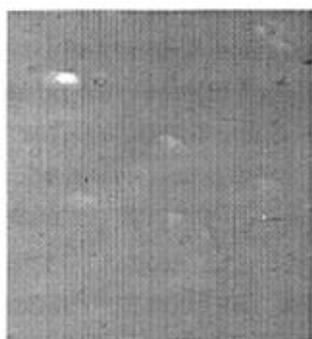


图 3-5 PLLA 偏光图

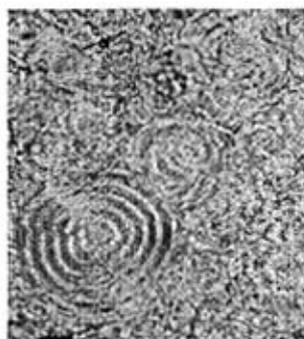


图 3-6 PHB 偏光图

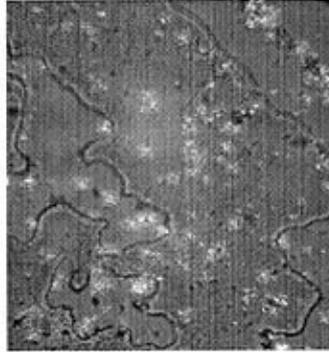


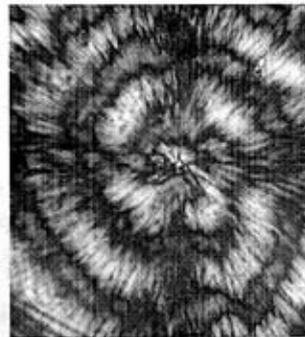
图 3-7 PHB/PLLA 偏光图

(2) 110℃结晶条件下的结晶形态

图 3-8 是 PHB/PLLA 共混体系在缓慢熔融后，迅速置于 110℃的热台上，恒温 2 小时后的偏光图片，放大倍数为 500。从图 3-8a 可看到，纯 PHB 黑十字消光和环带结构十分明显和规整，当 PHB/PLLA=1:1 时，尽管也看到黑十字消光和环带结构，但环带结构的规整性变差及环带间距有了变化（见图 3-8b），这可能是 PHB 晶体生长受到了 PLLA 的影响，在 3.2.2 节的表 3-2 中 PHB/PLLA(1:1)共混体系中,PHB 结晶焓与纯的 PHB 相比有了明显的降低就说明了这一点。另外，这也表明了 PHB 与 PLLA 的相容性情况，Kovama^[85]等研究了 PHB 与己内酯和乳酸的无规共聚物[P(CL-CO-LA)]共混体系的结晶形态，发现二组分的相容性对球晶形成有显著的影响。80℃等温结晶 PHB 与 P(CL-co-LA)不混溶，长不成环带球晶，且球晶的生长速率只受结晶温度影响，与组分含量无关；而 100℃等温结晶，PH 与 P(CL-co-LA)有一定的混溶性，可以长成环带球晶，且球晶生长速率随 P(CL-co-LA)含量的增加而降低，他们认为能长成环带球晶的原因是两组分的相容性得到了改善。



(a)



(b)

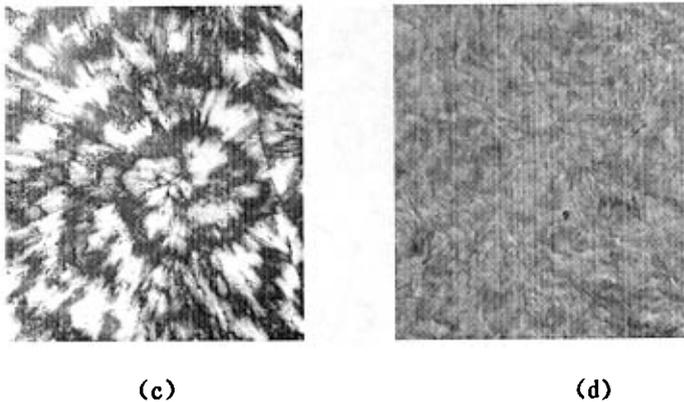


图 3-8 110℃ 结晶条件下结晶的偏光图 (a) PHB; (b) PHB/PLLA;
(c) PHB/PLLA/PEO; (d) PLLA

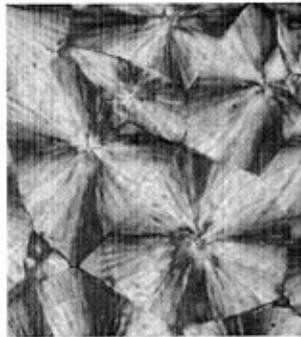


图 3-9 PLLA 从熔体以 2℃/min 冷却到 120℃ 偏光图

图 3-8c 为含有 5% 的 PEO 的 PHB/PLLA=1:1 共混体系的偏光图, 在图中十字消光十字变的不太明显, 但环带结构仍然可见, 与未加入 PEO 的 PHB/PLLA=1:1 共混体系比较, PHB 球晶体的织态结构变的不规整, 环带宽度减小, 环带周期增多, 这可能由于 PEO 的加入, 改善了 PHB 与 PLLA 的相容性, 这与许多研究者^[86-88]在研究物理共混体系中, 发现组分之间有相互作用或良好的相容性, 都有利于环带球晶的生长, 且环带宽度随第二组分的加入变窄有类似现象。在图 3-8c 中还看到, 在环带的暗带中存在着部分亮场, 在亮带中存在着部分暗场, 这可能是 PLLA 晶粒插在 PHB 的晶片之间, 影响了 PHB 晶体的扭转周期。纯 PLLA 在 110℃ 结晶, 球晶成核密度大, 但球晶较小 (见图 3-8d)。相反, 当 PLLA 从熔体以 2℃/min 冷却到 120℃, 球晶较大 (见图 3-9)。

3.2.5 共混体系的降解性能研究

(1) 比表面、厚度相同,质量比例不同的 PHB/PLLA 共混体系膜片的降解质量变化情况

具有相同比表面积、厚度,不同比例的 PHB/PLLA 共混体系质量保持率与降解时间的关系见图 3-10。从图可知,在降解 60 天内,不同比例的共混体系膜片质量均没有显著的变化;当降解 120 天后,PLLA 膜片质量保持率 84.9%,PHB/PLLA=1:1 膜片为 89.6%,PHB 膜片为 91.2%,而 PHB/PLLA=4:1 与 PHB/PLLA=3:2 共混体系膜片质量仍无显著变化,这表明在 PH=7.4 的 2mg/mlPBS/溶菌酶溶液中,PLLA 的降解速率>PHB/PLLA(1:1)>PHB。当 PHB 中加入等份的 PLLA 膜片较之纯 PHB 膜片降解速率提高,这可认为是 PHB/PLLA (1:1) 共混体系的结晶度的下降,从而利于水可以渗透到无定形区;而当 PLLA 加入的含量<50%时,PHB/PLLA 共混体系膜片降解速率较之 PHB 膜片降低,尽管共混体系的结晶度较纯 PHB 有所降低,但从表 3-2 知,共混体系中 PHB 组分的冷结晶焓要较 PHB 高,说明共混体系中的 PHB 组分结晶成分增多,相对的共混体系中的无定型区域减少,从而共混体系膜片较纯 PHB 膜片的降解速率减慢。

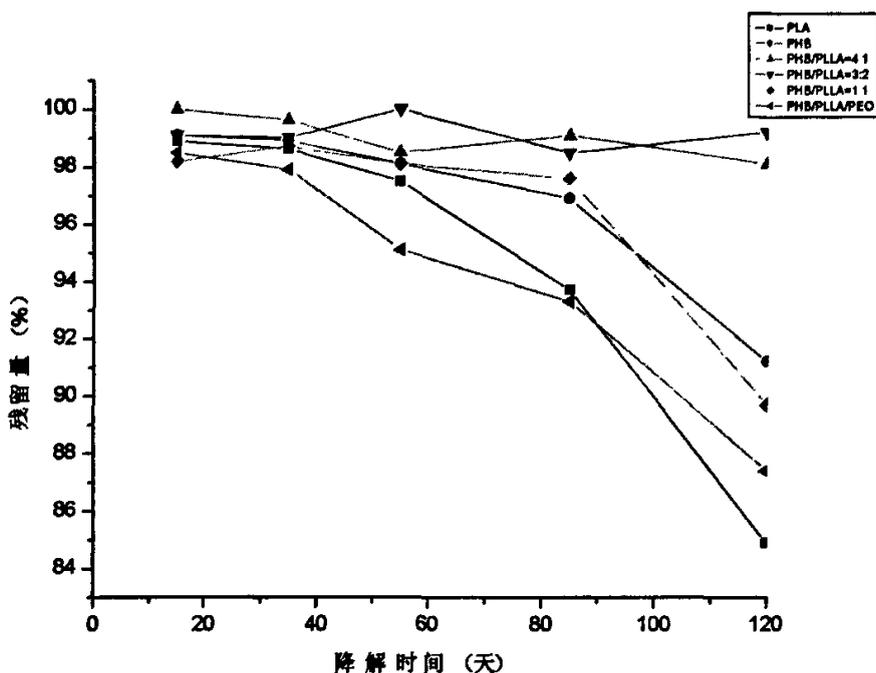


图 3-10 不同比例的 PHB/PLLA 共混体系质量保持率与降解时间的关系

另外, 含量为 5%PEO 的 PHB/PLLA (1:1) 共混体系膜片的降解速率较 PHB/PLLA (1:1) 共混体系, 其原因是由于 PEO 为亲水性物质改善了共混体系的亲水性。同时随着 PEO 的加入, 组分 PHB 与 PLLA 链段活动性与其未加 PEO 的共混体系的各组分比较, 更加易于活动(见表 3-1 与表 3-2 中各组分的冷结晶温度 T_{cc})。在降解时间为 90 天内, PHB/PLLA/PEO 共混体系的膜片降解速率高于 PLLA 膜片, 而降解时间为 120 天后, PHB/PLLA/PEO 共混体系的质量保持率高于 PLLA, 这可能是降解前期, 有一部分 PEO 的溶出, 随着降解的进行, 共混体系的结晶部分变的越加完善(这从下面小节的 PHB/PLLA/PEO 共混体系与 PLLA 共混体系降解 120 天后的 DSC 图谱中可表明), 从而使得水分更难于渗透到晶层中, 因而使得 PHB/PLLA/PEO 共混体系的重量保持率在降解 120 天后高于 PLLA。

(2) 膜片降解后的 DSC 分析

DSC 是研究高聚物玻璃化转变、熔融行为和结晶动态的常用手段。通过对不同组成的共混体系膜片在不同降解时间的 DSC 研究, 可有助于了解共混体系的降解行为。在实验中, 基于前面对不同组分的共混体系的降解质量变化的情况, 本小节主要研究 PHB、PLLA、PHB/PLLA (1:1) 及含有 5%的 PEO 的 PHB/PLLA (1:1) 降解后的结晶行为。实验方法与 3.1.4 节 DSC 分析中的测试方法 2 一样。

1) 不同共混体系的膜片降解 120 天后的 DSC 研究

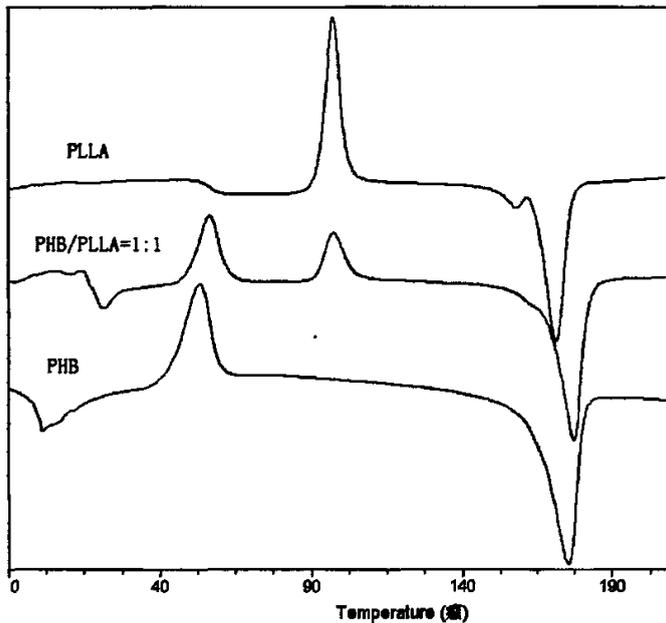


图 3-11 不同共混体系膜片降解 120 天的 DSC 曲线

表 3-4 与图 3-11 相对应的热力学数据

Blend	T _{cc} (°C)		ΔH _c (J/g)		T _m ^{blend} /°C	X _c ^{blend} /%
	PHB	PLLA	PHB	PLLA		
1/0	53.2		22.8		175.4	28.7
1/1	56.6	97.3	24.8	16.8	177.0	30.0
0/1		97.1		22.2	171.4	25.5

图 3-11 为 PHB、PLLA、PHB/PLLA (1:1) 膜片降解 120 天后的 DSC 图, 表 3-4 为从图中获得的热力学数据。从图表中可看出, PLLA、PHB 与 PHB/PLLA 在 PBS/溶菌酶溶液中降解 120 天后, 冷结晶温度 T_{cc}、冷结晶焓 ΔH_c 和结晶度与未降解 (未降解时的 T_{cc}, ΔH_c 见表 3-2) 之前比较, 都有了明显的降低。冷结晶温度 T_{cc} 表示大分子链段折叠砌入晶格时所需的最低温度, 与分子间相互作用力和结构规整度有关^[89]。PHB 与 PLLA 降解 120 天后, 部分大分子链段降解成为小分子链段, 小分子链段的增多, 进一步稀释了未降解的大分子链段, 使得这些大分子链段活动性变的增强, T_{cc} 下降。尽管大分子链段活动性增强有利于体系结晶, 但体系内的小分子链段的数量相对未降解体系增多。这相对于体系而言, 低分子量无定形成分比例部分增多, 高分子结晶区部分比例相对减少, 从而体系的冷结晶焓与结晶度都减小。对 PLLA 体系, 其熔融温度 T_m 与未降解之前相比都有了明显的降低, PLLA 降低 7°C 左右。T_m 有熔融焓 ΔH_m 和熔融熵 ΔS_m 决定, 即: $T_m = \Delta H_m / \Delta S_m$ 。ΔH_m 随分子间作用力的减小而下降, 而 ΔS_m 随分子链柔顺性增加而增大, 从而导致 T_m 下降。而 PHB 与 PHB/PLLA (1:1) 体系的熔融温度 T_m 并没有变化, 这可能是由于能够形成 PHB 的晶体的大分子链段与未降解时的大分子链段相比没有大的变化, 而对 PLLA 而言, 能够形成 PLLA 晶体的链段较未降解的大分子链段长度要短, 故熔融温度 T_m 下降。

2) PHB/PLLA (1:1) 降解不同时间 DSC 分析.

测得 PHB/PLLA (1:1) 共混体系降解不同时间的 DSC 曲线及其从图中得到热力学数据, 见图 3-12 与表 3-5。从图表中知, PHB/PLLA 共混体系 PLLA 和 PHB 组分冷结晶温度 T_{cc} 随降解时间增长而向低温方向移动, 结晶峰半高宽较未降解的共混体系相比有着明显的变窄, 这说明共混体系降解后, 各组分的分子链段柔性增强, 冷结晶速率加快, 这是由于共混体系降解后, 大分子链段降解为小分子链段后, 分子链段之间的相互作用力减弱, 使得分子链段更易活动, 从而结晶速率加快。体系的冷结晶焓和结晶度与未降解体系相比, 有了明显的降低。聚合物结晶与分子组成、分子间作用力及结构特征有关。共混体系在降解不同时间后, 体系的冷结晶焓及结晶度都有了很明显的降低, 这可能是由于体系的大分子链段降解

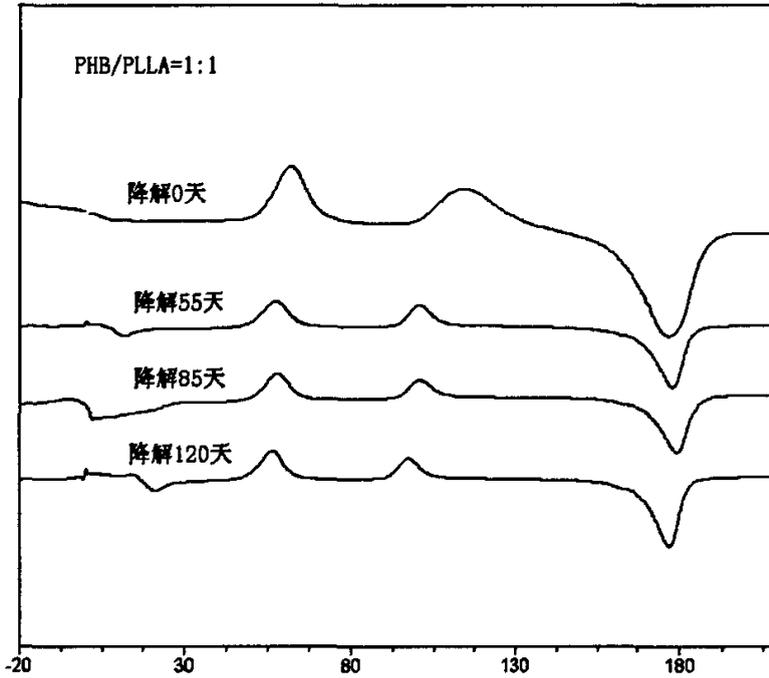


图 3-12 PHB/PLLA (1:1) 共混体系降解不同时间的 DSC 曲线

表 3-5 与图 3-12 对应的热力学数据

降解时间 (天)	$T_{cc}/^{\circ}\text{C}$		$\Delta H_{cc}/^{\circ}\text{C}$		$T_m^{\text{blend}}/^{\circ}\text{C}$	$X_c^{\text{blend}}/\%$
	PHB	PLLA	PHB	PLLA		
0	62.1	114.7	49.6	52.0	177	55.0%
55	57.3	100.7	24.8	17.4	178	29.0%
88	57.7	100.7	23.7	16.0	179	27.7%
120	56.6	97.3	24.8	16.8	177	30.6%

成不同链段长度的低聚物，尽管链段的柔顺性增加了，但有的低聚物分子链段不容易形成高度有序的晶格，因此体系相对与未降解的体系而言，能够规整排列形成有序的晶格的分子链段数量减少，使得体系的冷结晶焓与结晶度降低。另外，体系的熔融温度 T_m 与未降解体系比较，在实验误差范围内，基本没有变化。

3) PHB/PLLA/PEO 共混体系降解 DSC 分析

PEO 是亲水性非降解高分子，它具有非常好的生物相容性。由 3.2.3 节知，PEO 加入到 PHB/PLLA 共混体系，有效的提高了 PHB 与 PLLA 的相容性。PEO 是亲水性非降解高分子，它具有非常好的生物相容性。由 3.2.3 节讨论知，PEO 加入到

PHB/PLLA 共混体系,有效的提高了 PHB 与 PLLA 的相容性。图 3-13 与表 3-6 是含量为 5%PEO 的 PHB/PLLA (1:1) 共混体系降解 120 天与未降解的 DSC 曲线图

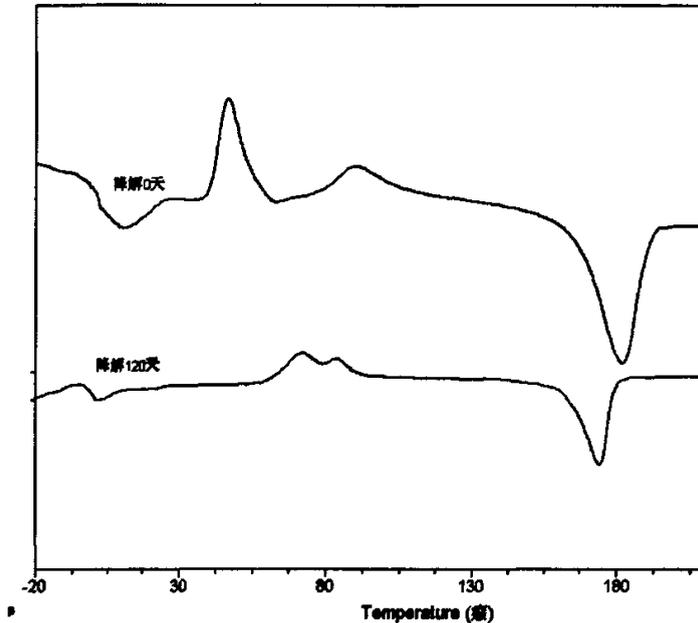


图 3-13 含量为 5%PEO 的 PHB/PLLA (1:1) 共混体系降解不同时间的 DSC 曲线

表 3-6 与图 3-13 对应的热力学数据

降解时间 (天)	T _{cc} /°C		T _m ^{blend} /°C	X _c ^{blend} /%
	PHB	PLLA		
0	46.8	90.0	181.2	54%
120	71.3	84.1	174.1	30%

及其从 DSC 中得到的热力学数据。从图和表中,可看到 PHB/PLLA/PEO 共混体系降解 120 天后, PHB 的冷结晶温度 T_{cc} 增大, PLLA 的冷结晶温度 T_{cc} 减小, 两者的冷结晶温度彼此靠拢, 这表明 PHB 与 PLLA 随着降解周期的增长, PHB 与 PLLA 几乎可以完全相容。这在两种相容性半结晶高聚物共混体系中, 冷结晶温度 T_{cc} 同玻璃化温度 T_g 的变化相类似, 即两种高聚物相容性越好, 两者的 T_{cc} 与 T_g 越彼此靠近^[90]。另外, 共混体系组分 PHB 的 T_c 与未加 PEO 的 PHB/PLLA(1:1)共混体系相比,有明显的提高, 这说明 PHB/PLLA/PEO 在 PBS/溶菌酶降解 120 天, PEO 增强了 PHB 与 PLLA 的相互作用, 而未加 PEO 中则存在界面层, 减小了 PLLA 对 PHB 结晶成核的影响。同时, 共混体系的 T_m 从未降解前的 181.2°C 降到 174.1°C, 结晶

度由 54%降到 30%这是由于共混组分相互作用力增强,各组分结晶变的困难,造成结晶不完善、结晶度不高;另一方面,是由于共混体系降解后,可结晶的高聚物链段数量相对减少。

3.2.6 膜片降解表面的形态分析

基于前面小节的基础上,选取 PHB、PLLA、PHB/PLLA (1:1)、含量为 5%的 PHB/PLLA (1:1) 共混体系降解 15 天和 120 天后,后将膜片干燥后进行 SEM 扫描分析,其见图 3-14~3-18。图 3-14 为 PHB 与 PLLA 膜片降解之前的 SEM 图。

对半结晶 PLLA 而言,在水溶性介质中的降解主要是水解机制。大量研究表明 PLLA 不直接接受酶的攻击,它在自然环境中降解,首先水解,使相对分子质量下降,然后较低的分子质量降解到一定程度,方可在酶的作用下参与新陈代谢。唯一能使 PLLA 不经过水解而直接发生作用的只有蛋白酶^[91]。另外,从前面 PLLA 的重量保持率与降解时间的关系图,可看出它基本符合酯类水解一级动力学的线形关系。因而,可认为 PLLA 在 PBS/溶菌酶中的降解仍然主要是水解机制。PLLA 水解一般有两个阶段^[92],第一阶段,水分子扩散到 PLLA 的无定型区域,酯键发生随机断裂,未降解的链段获得更多的空间和活性,分子链重排结晶度有所提高;第二阶段,当无定型区域降解几乎结束时,水解从结晶区边缘开始,向结晶中心扩展,降解速度比无定形区慢。

对 PHB 在酶存在的条件下的降解研究表明^[93],整个降解过程分为两步:首先是通过酶的键合区与 PHB 发生键合作用而使酶吸附在材料表面;第二步是通过酶催化区中对 PHB 有降解作用的基因段对 PHB 材料进行降解,形成水溶性的产物。从 PHB 的酶降解过程可看到,酶要对 PHB 的降解起作用,首先必须与 PHB 链键合在一起,对于细菌合成的 PHB,由于其一般都是结晶的聚合物,降解酶能与结晶区形成较为稳定的键合,因而能 PHB 的降解起作用。一般认为降解酶首先进攻 PHB 材料表面的非晶区。天津大学的^[94]王玲与本实验室研究^[95]的 PHB 在 PBS/溶菌酶的降解研究都表明,溶菌酶对 PHB 的降解有促进作用。前面 3.2.2 节的膜片重量保持率要比通常膜片仅在 PBS 缓冲溶液低^[46](120 天内,PHB 质量几乎不变),因此,可认为 PHB 在 PBS/溶菌酶的降解是酶促水解机制。

(1) PHB 与 PLLA 及 PHB/PLLA (1:1) 共混体系膜片表面降解形貌

从图 3-15 可得,PLLA 在 2mg/mlPBS/溶菌酶溶液降解 15 天后,膜的表面有少量的絮状沉淀和少量的颗粒物,膜片总体上还较平整。但在 120 天后,膜的表面大量堆积着的大小不一、外形不规则的块状物,整个表面变的非常粗糙。这可认为,PLLA 分子链中存在大量的酯键,首先是小分子的水移至聚合物材料表面表面,扩散进入酯键或亲水基团的周围,酯键通过水解随机断裂,使聚合物相对分

子质量下降,使得聚合物规整结构破坏,同时 PLLA 降解的一些低聚物附着在膜的表面,表现为膜的表面变的极其粗糙,并出现一些大小不一,形状不规则的孔洞。与 PLLA 相比,PHB 降解 15 天后,膜的表面凹凸不平(见图 3-16a),且有发白色的小微区,但没有颗粒物或絮状的沉淀物。同时,还看到有类似球晶的结构(见图 3-16c 方圈内),这与陈珊等[96]利用 DS9701 菌珠对 PHB 膜进行降解,对 PHB 膜采用 SEM 电镜看到的表面形态类似。当 PHB 膜降解 120 天后,膜片表面出现大量深浅不一的斜孔和孔洞(见图 3-16b),表现出与 PLLA 膜片降解 120 天后的表面形态极大不同,这表明 PHB 与 PLLA 在 PBS/溶菌酶的降解机理有所不同。

图 3-17 是 PHB/PLLA(1:1)共混体系降解后的 SEM 电镜图,从图 3-17a 中看到膜片降解 15 天后,表面兼有了纯组份 PHB 与 PLLA 膜片降解 15 天后的表面形态,但相比之下,表面凹凸地方密度增大,颗粒块状物增多,粗糙度加深,并有一些微孔。在共混体系降解 120 天后,膜表面表现出两相分离的现象,连续相中有大的不规则孔洞,孔洞边出现大量的发白色的、呈丘陵的近圆形物块(见图 3-17b)。对照纯组分 PHB 与 PLLA 降解 SEM 电镜图(图 3-15~3-16),可认为共混体系膜片的连续相为 PHB 组分,分散相为 PLLA 组分。这些大的不规则孔洞是由与共混体系随着降解时间的增长,PHB 的孔洞直径变大,当 PHB 降解的低聚物被 PBS/溶均酶溶液溶蚀后,包埋其中的 PLLA 组分就析了出来。图中的呈丘陵型的原形物块可认为 PLLA 在降解 120 天后,降解从结晶部分开始,而纯 PLLA 膜片在降解 120 天后,SEM 电镜图上仅出现大量发白、隆起的不规则块状堆积物。这可能是由于 PHB 与 PLLA 共混,体系中的 PLLA 组分的无定型部分相对与大小、厚度、表面积相同的纯 PLLA 膜片中的无定型部分要少,而且与降解液接触的比表面积大,使得共混体系中的 PLLA 无定型部分较快的降解完全后,结晶部分开始降解。

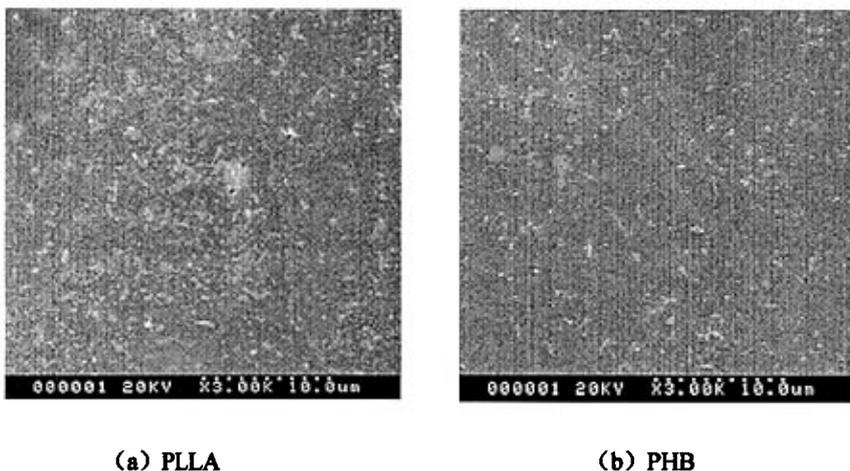
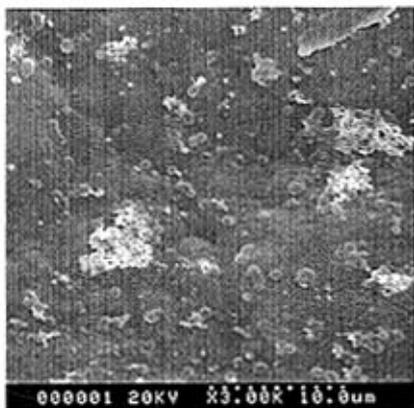
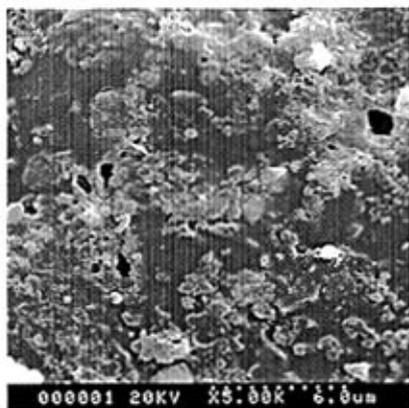


图 3-14 未降解的膜片 SEM 图

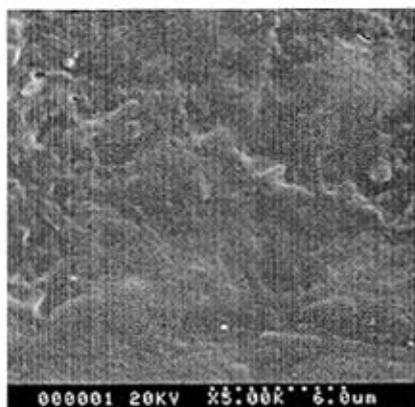


(a) 降解 15 天

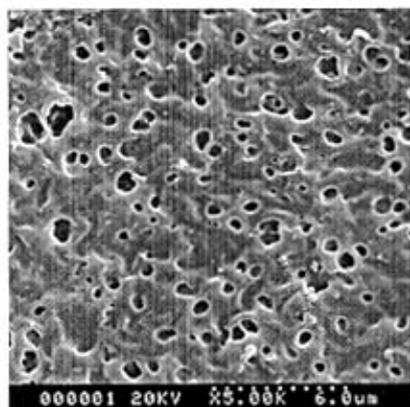


(b) 降解 120 天

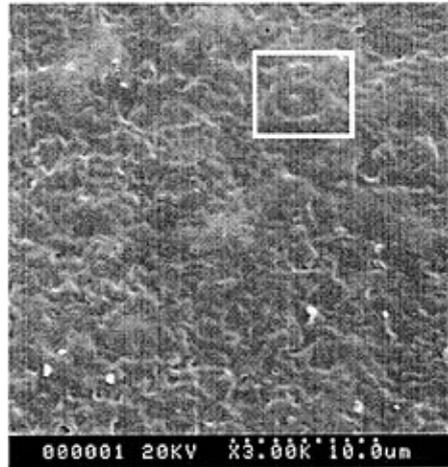
图 3-15 PLLA 膜片的降解 SEM 图



(a) 降解 15 天

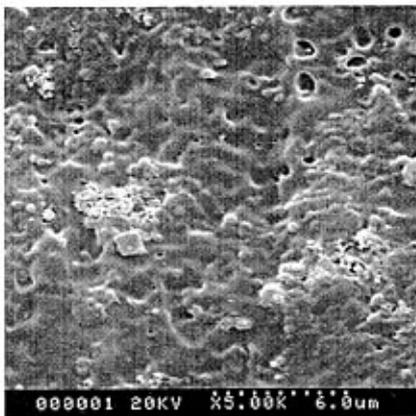


(b) 降解 120 天

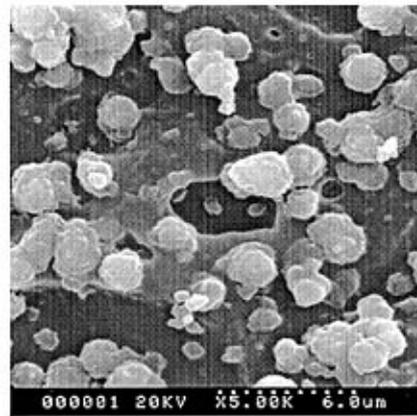


(c) 降解 15 天，放大倍数为 3000 倍

图 3-16 PHB 膜片的降解 SEM 图



(a) 降解 15 天



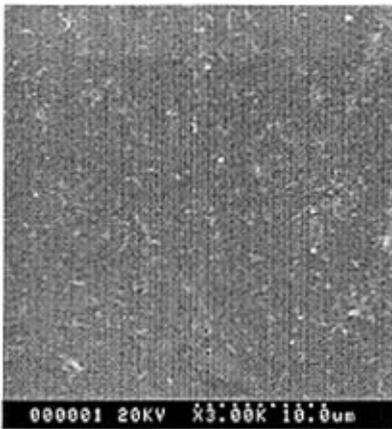
(b) 降解 120 天

图 3-17 PHB/PLLA 膜片的 SEM 图

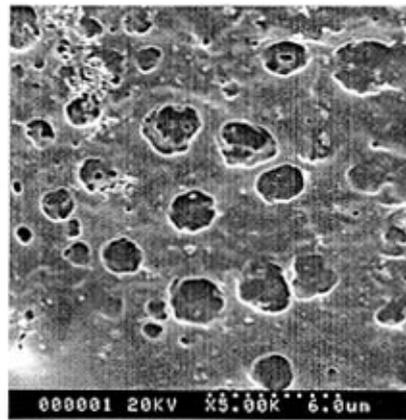
(2) 含量为 5%PEO 的 PHB/PLLA (1:1) 共混体系膜片表面降解形貌

从图 3-18 (a-c) 可见，含有 5%PEO 的 PHB/PLLA(1:1)共混体系膜片随着降解时间的增长，膜片表面的越来越粗糙，PLLA 组分不断从共混体系中析出附着于 PHB 膜片上，且逐渐变成细小的颗粒物。PHB/PLLA/PEO 共混体系在降解 15 天后，

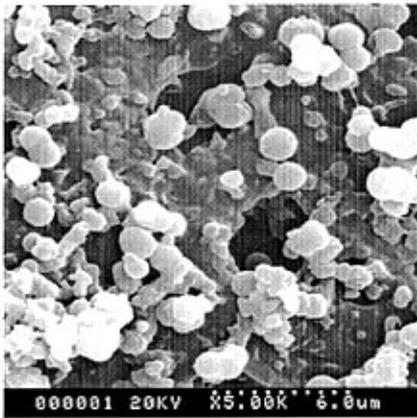
与未加 PEO 的 PHB/PLLA 相比,膜表面变的相对平整,大孔数量增多(见图 3-18a),这是由于 PEO 改善了 PHB 与 PLLA 的相容性,而且增加了 PHB/PLLA 共混体系的亲水性,使得共混体系中 PHB 与 PLLA 组分降解速率增快。同时,部分 PEO 溶解到降解液中留下的孔洞增加了体系组分与降解液的充分接触,从而孔径随降解时间的增长而增大。当 PHB/PLLA/PEO 共混体系膜片降解 120 天后,膜片在外观上有大量的细小裂纹,用手轻碰,膜片变成碎片失去力学强度;在 SEM 电镜图中(见图 3-18e),看到膜片表面有大量尺寸较小的线形颗粒物堆积一块,但并没有看到在未加 PEO 的共混体系 PHB/PLLA 中较清晰的 PLLA 结晶组分;同时,膜片的表面结构看似蜂窝结构。这说明在 PEO 的作用下,PHB 与 PLLA 相对分子量已经降解到很低,随之体系中 $-OH$ 、 $-COOH$ 基数量增多,使得 PHB 与 PLLA 分子之间作用力增强。在前面对 PHB/PLLA/PEO 在降解 120 天后的 DSC 分析中,PHB 与 PLLA 的冷结晶温度 T_c 相靠拢也表明了 PHB 与 PLLA 分子之间相互作用增强这一点,因此 PHB/PLLA/PEO 膜片在降解 120 天后,膜片表面上就呈现出大量的小颗粒物堆积一块。因此,可认为 PEO 加入到 PHB/PLLA/共混体系中,不但提高了共混体系 PHB/PLLA 的降解速度,同时也相对地提高了各组分的降解速度及其 PHB/PLLA 的相容性。



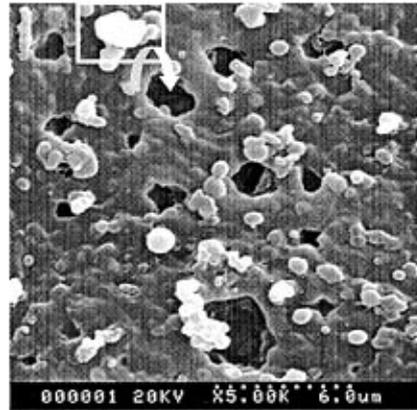
(a) 降解 0 天



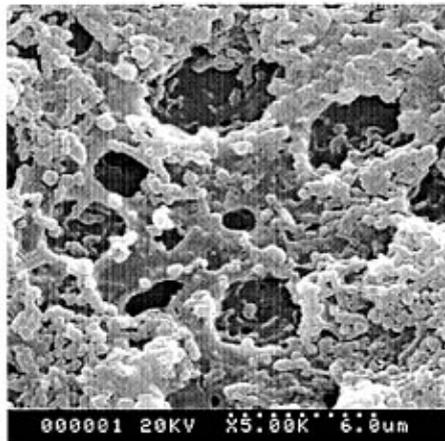
(b) 降解 15 天



(c) 降解 40 天



(d) 降解 60 天



(e) 降解 120 天

图 3-18 PHB/PLLA/PEO 膜片的 SEM 图

3.3 本章小结

将 PHB 与 PLLA 以不同质量比例共混，研究其在不同过冷程度下结晶行为、结晶度及两者相容性，结果表明，PHB 与 PLLA 的冷结晶温度 T_{CC} 与组分在其共混体系的含量没有关系；PHB 的冷结晶要快而且冷结晶速率要快于 PLLA，但 PHB 的冷结晶速率不随 PLLA 组分含量的增多而增大，而 PLLA 的冷结晶速率随 PHB

的含量增大加快；共混物的结晶度随着 PLLA 的含量增多而减小。PEO 加入到 PHB/PLLA 共混体系中，PHB 与 PLLA 组分的冷结晶温度都有了显著的降低，PHB 与 PLLA 的相容性得到改善；与未加 PEO 的共混体系比较，共混体系的结晶度随 PEO 的含量增多而增大，且共混体系的熔融温度与 PLLA 组分相近。

热台偏光显微镜观察共混体系在不同结晶条件下的结晶形态，得知 PLLA 组分对 PHB 球晶的环带结构与规整性有一定影响，PEO 的加入到共混体系中，PHB 的球晶的织态结构进一步变的不规整，环带宽度减小，环带周期增多，表明 PEO 改善了 PHB 与 PLLA 的相容性。

将不同组分含量的 PHB/PLLA 及其含有 5% 的 PEO 的 PHB/PLLA=1:1 共混体系，置于溶菌酶/PBS 缓冲溶液降解液中，研究其在体外模拟体内环境 (PH=7.4, 37℃) 下的降解情况。从共混体系膜片质量残留量看，在实验降解时间内，PLLA 降解速率>PHB/PLLA(1:1)>PHB；当 PLLA 含量<50%时，共混体系的降解速率要较纯 PHB 慢，当 PLLA 含量为 50%时，共混体系的降解速率要快于纯 PHB；含量为 5%PEO 的 PHB/PLLA (1:1) 共混体系降解速率较未加 PEO 的共混体系快，另外在降解时间 90 天内，共混体系的降解速率要高于 PLLA 膜片，而降解 120 天后，共混体系残留量要高于 PLLA。从共混体系降解不同周期的 DSC 图中，可知纯的组分与共混组分的结晶度均随降解周期的增长而减小，各组分的冷结晶焓与冷结晶温度都有了显著的降低，而含有 5% 的 PEO 的 PHB/PLLA (1:1) 共混体系，降解 120 天后，PHB 组分冷结晶温度升高，PLLA 组分冷结晶温度向 PHB 靠拢，共混体系的熔融温度也有所降低，这表明共混体系与未加入 PEO 共混体系比较，体系随降解周期增长，PLLA 与 PHB 的相容性几乎可以完全相容，同时说明了 PEO 的加入可以很好的提高 PHB/PLLA 的降解速率。共混体系膜片降解若干周期的 SEM 电镜图表明，PHB 在溶菌酶/PBS 缓冲溶液中是酶促水解机制，而 PLLA 在其中主要是水解机制；PHB/PLLA (1:1) 与含有 5%PEO 的 PHB/PLLA (1:1) 共混体系均较纯组分 PHB 降解要快，且 PHB/PLLA/PEO 更显著。

通过用 PLLA 和 PEO 对 PHB 的物理共混改性及体外降解实验发现，当共混的 PLLA 含量小于 50%时，共混体系的降解速率比纯的 PHB 慢，而当 PLLA 在共混体系中的含量为 50%时，PHB 的降解速率才可以得到提高，PEO 的加入不但有助于提高 PHB 与 PLLA 的相容性，而且提高其共混体系的降解速率。因此，可以通过 PHB 与 PLLA 的共混比例及其加入 PEO 组分，来调控材料的降解速率，从而满足组织工程对不同支架的降解性能的要求。

第四章 支架的制备及其在体内的降解研究

组织工程多孔支架的制备是组织工程的重要环节,有研究表明聚合物多孔支架在三个尺度范围可以控制组织的生长和发育。首先,大尺度范围($\text{mm}\sim\text{cm}$)决定工程组织的形状和大小;其次,支架的孔隙形态结构和大小(μm)调节细胞的迁移与生长;最后,用于制造支架材料的表面物理化学性质(nm)调节与其接触的细胞的黏附、铺展与基因的表达过程。

到目前已发展出多种制备方法,主要有溶剂浇铸/粒子滤出法^[97]、纤维网固定法^[98]、冷冻干燥法^[99]、气体发泡法^[100]、和热诱导相分离^[101]、快速成型法^[102]等。在这些方法中,纤维网固定法形成的支架孔隙尺寸大,且孔与孔之间是相通的,但结构稳定性差,应用时易变形,采用此法制备的支架多用于软组织的再生,不适合硬组织的再生;乳液冷冻干燥法、气体发泡法制备的支架的孔多是闭孔,孔的尺寸一般不大于 $100\mu\text{m}$,较适合用于制备微孔材料,很难满足组织工程支架使用要求;相比较而言,溶剂浇铸/粒子滤出法,采用氯化钠等可溶性粒子做造孔剂,可制得具有连通孔隙好的多孔支架,且空隙大小和结构,可以通过控制造孔剂的颗粒大小和加入量来调节,所用设备简单,因而得到广泛的应用,但也存在着一些问题,如此法制备的支架多是膜片,厚度不超过 2mm ,致孔剂有残留等。

针对以上所述方法的优缺点,本章将采用溶剂浇注/粒子滤出法制备出一定尺寸的膜片,然后将其与纺织出的纤维进行复合而制备出合宜的多孔三维支架,进而考察其制备该支架的工艺特点和支架结构及其与软骨细胞的相容性情况,为制备出降解速度可调控的支架做出初步探索。

4.1 实验部分

4.1.1 主要实验材料及设备

实验材料:聚 β -羟基丁酸酯(PHB)为西北大学生命科学院合成, $M_n 4.0\times 10^5$,纯度为99%,菌种为园菌种为园褐固氮菌 G-3;左旋聚乳酸(PLLA),由本实验室合成, $M_w 1.3\times 10^5$,分布指数:1.4;聚氧乙烯(PEO) $M_w 1.5\times 10^6$,上海树脂研究所;三氯甲烷(CHCl_3),分析纯,西安化学试剂厂;氯化钠,陕西省盐业总公司。

主要设备:纤维纺织设备(自制),扫描电子显微镜(SEM),S-570型,日本HITACH。旋转粘度计,NDJ-79型,上海昌吉地质仪器有限公司。

4.1.2 多孔支架的制备

(1) 多孔膜片的制备

该实验方法采用最经典的溶剂浇铸/粒子滤出法，其制备步骤如下：将 PHB 溶解于一定的三氯甲烷溶剂中，待充分溶解后，然后按一定比例加入经过研磨且过筛后的氯化钠颗粒，混合均匀并倒入模具中制备样片；将样片和模具一起放置空气中 48 小时，让三氯甲烷溶剂自然挥发，然后再将其样片与模具放置于真空干燥箱内干燥 24 小时，除去残留的溶剂；从模具中取出样品（PHB/氯化钠复合物）放入蒸馏水中浸泡 48 小时以溶去氯化钠，每隔 6 小时换一次水；溶去氯化钠的 PHB 膜片在室温下干燥 24 小时，然后置于真空干燥箱中干燥 24 小时，即得到 PHB 多孔膜片，最后将膜片封装于干净的塑料袋中，放入干燥皿中待用。PLLA 多孔膜片与 PHB/PLLA (1:1) 多孔膜片的制备方法类同。

(2) PHB/PLLA/PEO 复合纤维的制备

该复合纤维的制备采用干纺丝的工艺制备，其工艺流程图如下：

1) 纤维成型

纺丝溶液制备 → 喷丝口挤出 → 热空气烘道 → 绕卷成型

2) 纤维的拉伸与定型

初生纤维固定 → 拉伸 → 热定型 → 绕卷备用

纺丝液组分是含有 5%PEO 的 PHB/PLLA (质量比为 1:1) 的共混体系，其浓度及其纺丝工艺参数均按本实验室前期研究确定的最佳工艺参数进行^[95]，即纺丝液浓度 6%，用旋转粘度计测的转速为 750r/min 的纺丝液表观粘度为 740mPa·s，喷丝板温度 25℃左右，挤出速度为 0.05 ml/min，绕卷速度为 28.48m/min，拉伸温度 110℃，热定型温度 90℃及热定型时间 25min。制备好的纤维放置于干燥皿中待用。

(3) 膜片与纤维的复合

1) 首先，将绕卷的纤维裁其一定的纤维束，然后把纤维束按一定角度进行多层叠加至一定厚度，最后将叠加好的松散纤维片夹在两快干净的玻璃板的中间，置于 120℃烘箱中再次热定型。

2) 用胶头滴管将少量的三氯甲烷滴在平滑的硅纸上，使其充分充分铺展、润湿，将多孔膜片与纤维片轻放在硅纸上，用镊子轻轻按压，使其充分润湿，随后小心地将纤维片从硅纸上移开，翻转纤维片使其湿面向上，用镊子快速将膜片放在前者的上面，使两者的润湿面充分接触，然后将膜片/纤维复合膜片施压若干分钟。

3) 采用类似与 2) 的方法，将叠加好的另一片纤维片与膜片另一侧进行贴合，

然后将此制备好的“夹芯”多孔膜片夹在两快玻璃片中间放入真空干燥箱干燥 48 小时，彻底除去三氯甲烷溶剂。组成的“夹芯”多孔膜片即为所获得的多孔三维支架。

4.1.3 支架孔隙率和孔隙大小测定^[103]

孔隙率的测定采用比重瓶恒温 30℃条件下测定,具体操作如下:

选用一个比重瓶装满乙醇重 W_1 ，把重 W_S 的样品浸入乙醇中，脱气，务必使乙醇充盈于多孔支架的孔中，然后在加满乙醇，称重 W_2 ；把浸满了乙醇的样品取出后，剩余的乙醇的样品取出后，剩余的乙醇与比重瓶称重 W_3 ， ρ 为测定温度下的乙醇密度。

样品的支架本身体积： $V_S = (W_1 - W_2 + W_S) / \rho$

样品的支架孔体积： $V_P = (W_2 - W_3 - W_S) / \rho$

样品的支架孔隙率： $\epsilon = V_P / (V_P + V_S) = (W_2 - W_3 - W_S) / (W_1 - W_3)$

支架的孔隙大小和连通程度由显微镜或扫描电镜 (SEM) 确定。

4. 2 结果与讨论

4.2.1 溶剂浇铸/粒子滤出法

实验中筛选一定尺寸范围的氯化钠颗粒作致孔剂，将其加入到浓度不等的 PHB (或 PLLA、PHB/PLLA=1:1) 三氯甲烷溶液中，制备出一定厚度的多孔膜片，研究不同聚合物溶液浓度对制备出膜片的孔隙大小及其孔的分布、连通性的影响。

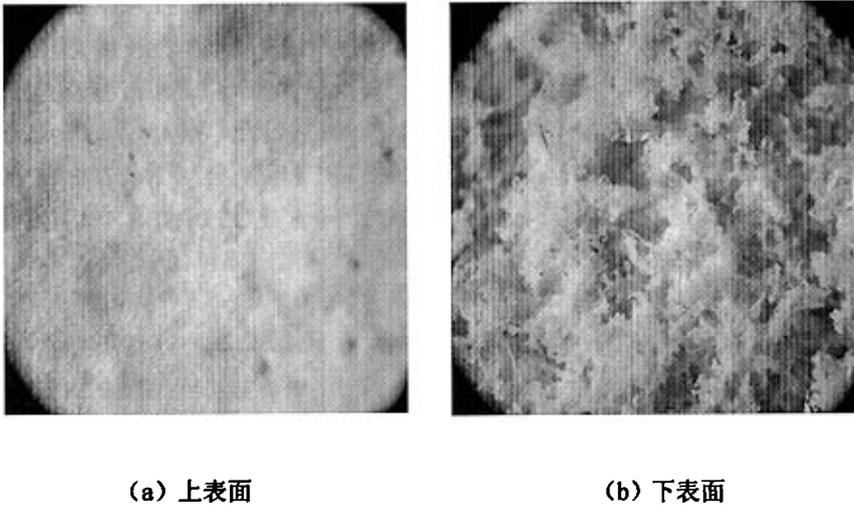
(1) 聚合物溶液浓度对膜片孔的分布大小、连通性的影响

实验中分别取聚合物溶液质量浓度 (g/ml) 为 7~8%、2~3%、≤2%，当聚合物溶液浓度 ≤2%，溶液浓度黏度小，利与溶液/氯化钠浇铸的进行，且氯化钠在溶液中易分散，制备出的膜片见图 4-1，从图中可看出，膜片上表面(与空气接触)孔径小，孔隙率也较小，较为致密；下表面(与浇铸膜接触面)孔径大，孔隙率大，较为疏松。

混匀的聚合物溶液/氯化钠混合物，浇铸于模子中后，氯化钠颗粒由于重力的作用，更多的沉降在膜的下表面，与模子表面相互接触，因而使得与空气接触的一面，溶液浓度要比与模子表面相接触的溶液浓度大。随着溶剂的挥发，混合物体系溶液浓度质量逐渐增大，在氯化钠颗粒表面形成膜状层，当氯化钠质量浓度增大到一定程度后，这层膜会产生一定的收缩，收缩可能造成部分膜的破裂，露出氯化钠颗粒，而还有部分未破裂的膜，使部分氯化钠颗粒仍然被溶液所包覆，

溶剂完全挥发后，该部分被聚合物包覆的氯化钠颗粒只能通过三氯甲烷挥发留下的微孔与外界空气接触。

由于聚合物溶液/氯化钠混合体系与空气相接触的一面，聚合物溶液浓度要比与模子相接触的一面要大，使得靠近空气一侧的聚合物更多包覆氯化钠颗粒，而靠近模子表面的聚合物膜更多的是随着溶剂的挥发而收缩破裂，露出氯化钠颗粒，故用蒸馏水滤去聚合物中氯化钠颗粒后，形成图 4-1 所示的多孔膜表面的形状。



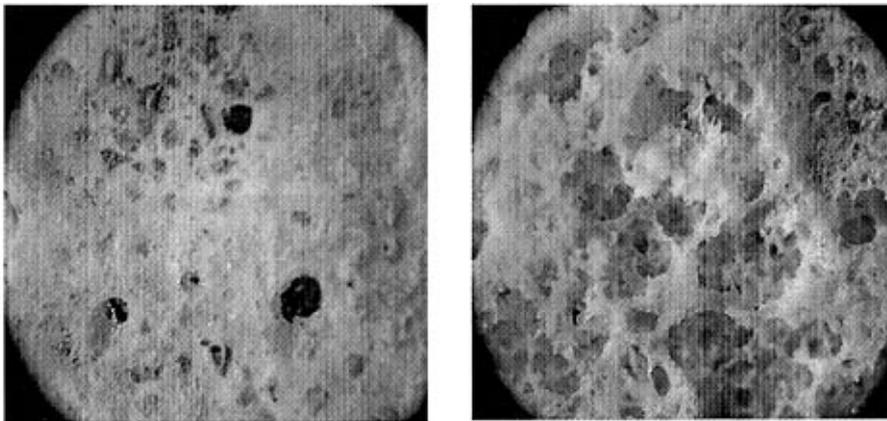
(a) 上表面 (b) 下表面
图 4-1 聚合物溶液浓度 $\leq 2\%$ 的多孔膜支架的表面型貌
(偏光显微镜下放大 $\times 40$ 倍)

图 4-2 为聚合物溶液浓度为 7~8% 制备的多孔膜片，与聚合物溶液浓度 $\leq 2\%$ 比较，在该浓度下，聚合物溶液/氯化钠混合体系黏度较大，浇铸相对较困难且混合体系浇铸时并不能完全浇铸于模子中，还要残留一部分于容器中，但形成的膜片的上表面孔径相对较大，孔隙率也较大；膜的下表面的孔径与孔隙率无多大变化。聚合物溶液浓度大，可使得沉降到靠近模子表面氯化钠颗粒相对减少，随着聚合物溶液上表面的溶剂挥发，靠近上表面的一部分氯化钠颗粒形成膜状层如同下表面的膜状层，收缩破裂，因此在用蒸馏水滤出氯化钠颗粒时，氯化钠可以同时从膜片两面同时析出，但从膜片下表面析出仍占主要部分。

图 4-3 为聚合物溶液浓度为 2~3% 制备的多孔膜片，从图中可看出，孔的分布比较均匀，且多为通孔(将多孔膜置于灯光下，光线通过膜片前后，光亮不变)。膜片的上下表面形态与图 4-1~4-2 膜片的下表面类似。

由此可见，溶剂浇铸/粒子滤出法制备多孔膜片，溶液浓度的大小是一个很关键

的因素,对制备 PHB 多孔膜片而言, PHB 聚合物溶液浓度应为 2-3%较为适宜。



(a) 上表面

(b) 下表面

图 4-2 聚合物溶液浓度为 7~8%的多孔膜支架表面形态
(偏光显微镜下放大×40 倍)

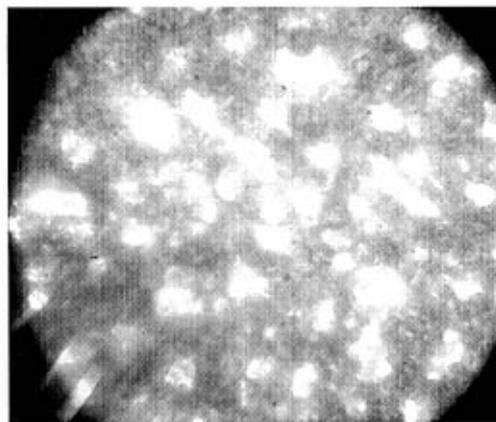
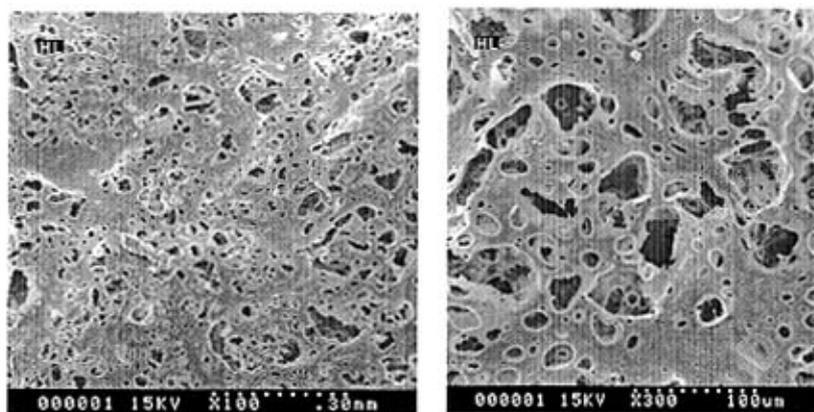


图 4-3 聚合物溶液浓度为 2~3%的多孔膜支架形貌图
(偏光显微镜下放大×40)

(2) 聚合物种类对多孔膜支架孔径及其孔隙率的影响

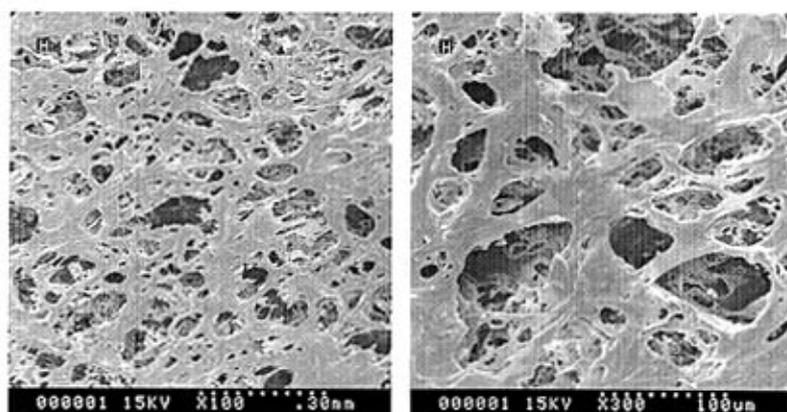
实验中分别用 PHB/PLLA=1:1 共混体系与 PHB 制备多孔膜片, 聚合物溶液浓度同为 2~3%, 氯化钠加入量为聚合物质量的 80%, 制备的多孔支架形貌见 SEM 图 4-4~4-5。从放大倍数 $\times 100$ 与 $\times 300$ 电镜图可见, PHB 多孔膜片盲孔较多, 孔分布均匀, 孔多为通孔, 连通性好, 测得孔隙率为 78.9%; 相比较而言, PHB/PLLA(1:1) 共混体系多孔膜连通性差, 细孔较多, 测得孔隙率为 67.3%, 这是由于 PHB/PLLA



(a) 放大倍数为 100

(b) 放大倍数为 300

图 4-4 PHB/PLLA (1: 1) 多孔膜支架 SEM 电镜图



(a) 放大倍数为 100

(b) 放大倍数为 300

图 4-5 PHB 多孔膜支架 SEM 电镜图

共混体系中 PLLA 分子量低, 比相同质量的 PHB 溶解于三氯甲烷形成的溶液黏度

要低，因此整个 PHB/PLLA 共混体系黏度相对 PHB 要低，这使得氯化钠颗粒更好的分散在溶液中，但这同时意味着颗粒之间彼此接触的机会减少，造成粒子被聚合物包覆的几率增多，而被包覆的颗粒只能通过三氯甲烷挥发留下的微孔，在蒸馏水中慢慢析出，因此在膜片中多看到小孔，且孔隙之间连通性差。另外，支架孔隙率低表明多孔膜片中残留着少量的氯化钠颗粒。

在图中，还见 PHB/PLLA (1: 1) 共混体系与 PHB 多孔膜片的孔的形态结构的差异，这可能与 PHB 与 PLLA 的分子量大小相关。

4.2.2 多孔膜片与纤维的复合

由上面讨论知，用溶剂浇铸/粒子滤出法可以较便利的制备多孔支架，所制备多孔支架的一些物理性质参数可以通过适当的工艺控制，如适当的聚合物溶液浓度，致孔剂的加入量，可以一定程度的控制多孔膜支架的孔的分布及其孔隙率，但当制备厚度较厚 ($\geq 2\text{mm}$) 的多孔膜支架，制备出的多孔膜的孔的连通性及孔的分布都较差，用做细胞支架有一定的限制。

为此，本实验结合溶剂浇铸/粒子滤出制备多孔支架的优点，尝试采用多孔膜片与纤维复合的新方法，设计制备出纤维/膜夹芯复合组织工程支架（简称“夹芯”支架）。其一，将浓度为 2-3% 的 PHB 溶液与一定量的氯化钠（PHB 质量的 4 倍）混合，按经典的溶剂浇铸/粒子滤出法制备出厚度为 0.5~0.6 mm 的多孔膜片（支架形貌见图 4-3）；其二，将制备出的纤维按本章所述实验方法与膜片复合。制备出的“夹芯”支架见图 4-6 与 4-7。

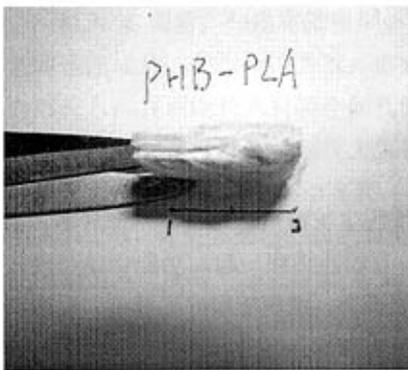


图 4-6 多孔支架大体外形图

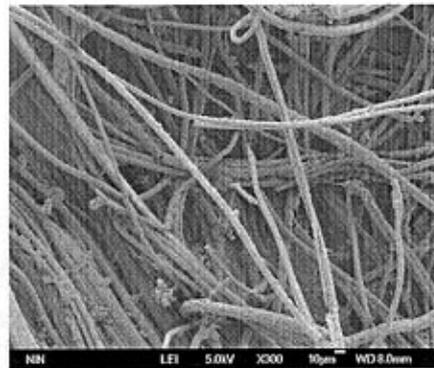


图 4-7 多孔支架表面 SEM 电镜图

制备出的膜片纤维复合“夹芯”多孔支架，多孔膜片使支架具有一定的力学性能，而纤维使得支架具有一定的弹性；同时，外表蓬松的纤维结构（孔径大）有利于

工程组织的形状和大小，而膜片的微米孔径可调节细胞的迁移和生长。另外，复合纤维（PLLA/PHB/PEO）与多孔 PHB 膜片具有不同的降解速度，因此可根据组织修复部位的不同需要，可设计出具有不同降解速度的“夹芯”支架。

4.3 “夹芯”支架在动物体内的初步实验研究

在对 PHB 材料及其共混体系 PHB/PLLA 与 PHB/PLLA/PEO 在体外的降解研究及其“夹芯”支架的制备基础上，将其支架植入在动物体内，对其降解情况与组织相容性进行初步的实验研究。

4.3.1 “夹芯”支架的预处理

将制备的“夹芯”支架裁成 $1.5\text{ cm} \times 1.0\text{ cm} \times 1.5\text{ mm}$ ，其中多孔膜片厚为 1 mm 。然后将多孔支架置于 75%乙醇中浸泡 24 h；以鼠尾胶原（I 型胶原）包埋，冷冻干燥机冻干处理， ^{60}Co 照射消毒。用前磷酸缓冲液浸洗 3 次；放入培养皿中用 Ham-F12 培养基 37°C 孵育 12 h。扫描电镜观察：支架材料用 Hanks 液冲洗 3 遍后，以 3% 预冷戊二醛固定，系列脱水，乙腈置换，真空干燥，表面喷金后行扫描电镜分析。

4.3.2 细胞-支架复合物的构建及动物体内的培养

将软骨细胞接种于多孔支架上（由合作单位第四军医大学实施），构成细胞-支架复合物，培养一周后，再将细胞-支架复合物植入新西兰白兔鼻背骨膜下进行体内培养和观察。

4.3.3 结果与讨论

（1）细胞在其支架的生长情况

实验中所用的兔子耳朵附近的软骨软骨细胞生长前呈梭形或多角形居多，当所用材料细胞相容性好时，细胞呈伸展状态，互相连接在一起，功能化趋势使较好的。如图 4-8 所示，在制备的“夹芯”支架表面上，细胞能很好的铺展、黏附和生长，无梭形聚集状态。另外在图 4-8 中还看到有细胞伪足伸入小孔，表明与材料附着牢固。



图 4-8 软骨细胞铺展完全状态

(2) 大体组织观察

植入 1 周后，该细胞—支架复合物在植入新西兰兔鼻背局部隆起，形成结节，质地稍硬，周围未发现有红肿及渗出等炎症反应。大体标本可见标本表面有透明薄膜形成，可辨认出支架表层的纺丝结构。植入 4 周后可见标本周围薄膜增厚，血管轻度增生，质地变韧，横断面可见组织与表面的纺丝结构已经完全融合，两者界限不清，支架材料的孔径增大，孔隙间有组织长入。外观及剖面类似于软骨组织。植入 8 周后，与 4 周时相比，标本质地更接近软骨组织，周围薄膜组织无继续增厚，与邻近组织界限清楚；血管未见明显增多；剖面可见组织量明显增多，组织间残余少量支架材料。

(3) SEM 电镜观察

植入 4 周后，扫描电镜观察：表面纤维多孔结构被细胞间质充填，细胞基质之间连接成片，类似水泥外观；部分纺丝结构断裂，软骨细胞由支架材料表层向内部长入；并逐渐长入材料中间孔隙中，周围伴随胶原纤维增生，内层支架材料孔径明显增大，纤维表面出现大量孔洞，支架材料出现局部的降解，与植入前光滑的表面形成了鲜明的对比(见图 4-11,4-13)，与植入 4 周的 PHB 膜片多孔支架(见图 4-9)比较，有更多的软骨细胞黏附于“夹芯”支架上生长，且细胞分布比较均匀；在细胞植入“夹芯”多孔支架 8 周后，扫描电镜观察：支架材料表层的纺丝多断裂崩解，被细胞间质连接形成片状；内部薄片材料孔径继续增大，孔隙侧壁多塌陷，软骨细胞散布在支架内部，细胞间质量增多，周围可见胶原纤维(见图 4-12)，与植入 8 周后的纯 PHB 膜片多孔支架(见图 4-10)对比，软骨细胞能够更多的增殖、黏附在“夹芯”支架内部，且支架降解程度明显加大。

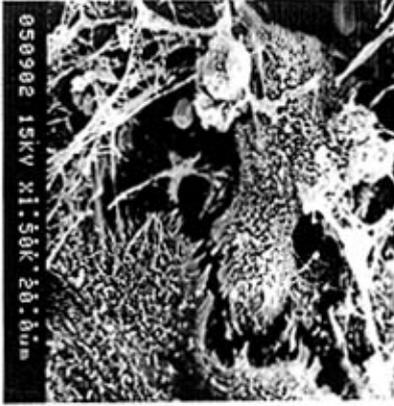


图 4-9 PHB 多孔支架植入 4 周后的 SEM 电镜图



图 4-10 PHB 多孔支架植入 8 周后的 SEM 电镜图

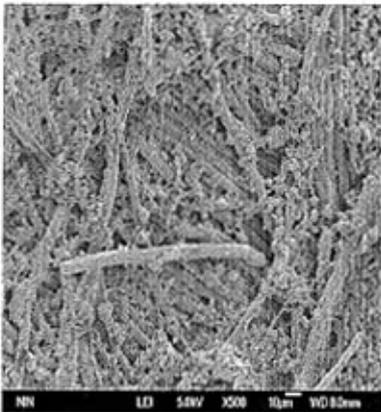


图 4-11 “夹芯”支架植入 4 周后的 SEM 电镜图

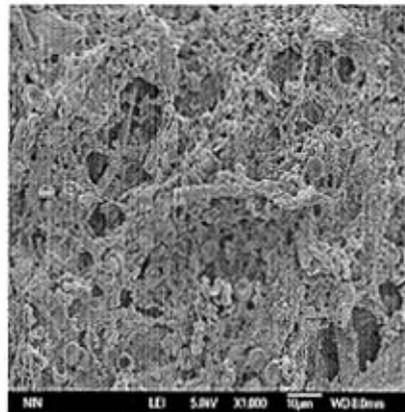


图 4-12 “夹芯”支架植入 8 周后的 SEM 电镜图

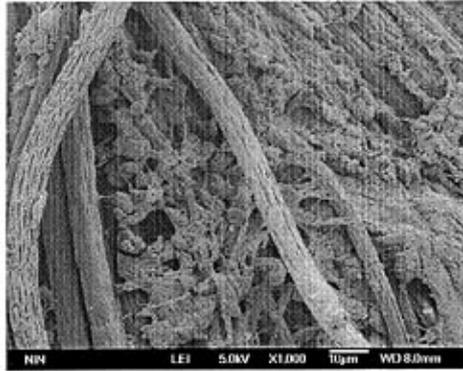


图 4-13 “夹芯”支架植入 4 周后纤维降解的 SEM 图

(4) 多孔支架植入家兔体内的后的结果观察

支架植入兔子精神饮食情况可，伤口呈一期愈合，局部未见红肿、溃破及渗出，皮肤表面的手术缝线在 10 天后自然脱落。4 周后，将材料从兔子背部取出，见材料周围有一层极薄的透明的包膜组织包裹，与材料疏松粘连，易于分离，材料本身无明显变形，质地较植入前稍软，周围未见明显肿胀变硬组织。表明 PHB、PLA 材料在机体内无明显毒性，不会引起机体的炎性反应。

由以上实验观察结果表明，与纯的 PHB 膜片多孔支架比较，纤维/膜复合的“夹芯”支架不仅显示出了较好的组织相容性，而且多孔支架的结构很有利于细胞的生长，同时支架表面的纤维结构，增加了细胞的附着空间，防止了表层种植细胞的流失。另外，支架在体内 8 周后，降解较明显，兔子体内仅有少量的材料残余，比在以往实验中的 PHB 多孔膜片降解要快，这一方面是由于纤维的降解要快于膜片，另一方面多孔膜片的厚度也是影响支架降解速度的一个因素，因而可根据修复组织部位的需要，通过调控 PHB 多孔膜片的厚度或 PHB 与 PLLA 共混比例及其复合纤维 PHB/PLLA/PEO 的复合量，从而使支架的降解速度可调控。

4.4 本章小结

1. 采用溶剂浇铸/粒子滤出法制备 PHB 多孔膜片, 聚合物溶液浓度为 2-3%, 能够制备出孔分布均匀, 且多为通孔的膜片。同时, 比较了 PHB/PLLA 共混体系与 PHB 在相同工艺条件下, 制备出的多孔膜片的差异, 进而探讨了聚合物种类对多孔膜的孔隙率及分布均匀性的影响。

2. 结合溶剂浇铸/粒子滤出的优点, 将 PHB 多孔膜片与 PHB/PLLA/PEO 纤维复合的方法制备了纤维/膜“夹芯”复合组织工程支架, 使其支架不但有一定的力学性能, 而且富有一定的弹性。支架的降解速度可以通过调整膜片的厚度与复合纤维的量, 来调节其支架的降解速率。

3. 将纤维/膜“夹芯”复合组织工程支架植入兔子体内进行降解实验, 结果表明, 支架在体内不但有好的组织相容性, 而且支架降解程度明显, 同时支架表面的纤维结构, 增加了细胞的附着空间, 防止了表层种植细胞的流失。

第五章 结 论

5.1 结论

本论文通过对 PHB/PLLA 及 PHB/PLLA/PEO 共混研究,探讨了其共混体系的冷结晶行为、相容性及结晶度的变化,进而考察了不同比例共混体系在溶菌酶/PBS 缓冲溶液模拟体液的条件下($\text{PH}=7.4, 37^\circ\text{C}$)的降解情况。同时,在改善基体材料 PHB 的降解速率的性能基础上,进一步研究了如何制备降解速率可调控组织工程多孔支架的制备工艺及其支架在体内的降解情况。

经过上述实验,本文研究得出如下结论:

1. PHB 与 PLLA 共混,各组分的冷结晶温度 T_{CC} 与组份的含量没有关系;但 PHB 冷结晶速率大于 PLLA,其速率不受 PLLA 组分含量的影响,对 PLLA 冷而言,其结晶速率是随着 PHB 含量的增大而加快。

2. 通过对 DSC 热力学数据分析,PHB 与 PLLA 共混后两者的玻璃化温度 T_g 在一定程度上彼此靠近,表明 PHB 与 PLLA 共混有一定的相容性;PEO 作为第三组份,加入 PHB/PLLA 共混体系后,各组份的冷结晶温度 T_{CC} 显著降低,有效的改善了 PHB 与 PLLA 的相容性。

3. 对 PHB/PLLA 共混体系,其结晶度随 PLLA 组分的增多而降低,当 PHB/PLLA=1:1 时,在共混体系中加入 PEO,其结晶度随 PEO 的含量增多而变大,体系熔融温度向纯组分 PLLA 熔融温度靠近。

4. 偏光显微镜分析表明,PHB 的球晶织态结构受其 PLLA 的影响,当加入 PEO 时,PHB 球晶织态结构进一步变的不规整,环带宽度减小,环带周期增多,表明 PEO 改善了 PHB 与 PLLA 的相容性。

5. PHB/PLLA、PHB/PLLA/PEO、PHB 及 PLLA 膜片体外降解实验表明,对于 PHB/PLLA 体系,PLLA 含量 $< 50\%$ 时,共混体系降解速率较纯的 PHB 慢,而当 PLLA 含量为 50% 时,降解速率介于纯组分 PLLA 与 PHB 中间;对于 PHB/PLLA/PEO 共混体系,在降解的 90 天前,其降解速率大于 PLLA,而后小于 PLLA。

6. 共混体系在溶菌酶/PBS 缓冲溶液降解若干周期后,DSC 分析表明各组分的冷结晶温度、冷结晶焓及其结晶度都有了显著降低。对含有 5% PEO 的 PHB/PLLA (1:1) 共混体系,降解到 120 天后,PHB 与 PLLA 的冷结晶温度几乎相同,说明 PEO 的加入加快了体系的降解速度。

7. PLLA 与 PHB 在溶菌酶/PBS 缓冲溶液中,表现出不同的降解机理, PLLA 在降解液中主要是水解机制,而 PHB 是酶促水解机制。含有 5%PEO 的 PHB/PLLA (1:1) 共混体系膜片在降解同周期降解程度要高于未有 PEO 的共混体系。

8. 溶剂浇铸/粒子滤出法制备 PHB 多孔膜片的最佳溶液浓度为 2-3%。

9. 采用 PHB 多孔膜片与 PHB/PLLA/PEO 纤维复合的方法制备的纤维/膜“夹芯”复合组织工程支架,使其支架不但有一定的力学性能,而且富有一定的弹性。通过调整膜片的厚度与复合纤维的量,可调整支架的降解速率。

10. “夹芯”支架植入动物体内,实验结果表明,支架不但有良好的组织相容性,而且有利于细胞的增殖、黏附和生长,并且支架表面的纤维结构,增加了细胞的附着空间,防止了表层种植细胞的流失。同时,从 SEM 电镜观察,支架降解速率能满足细胞生长速度的条件要求。

5.2 创新点

1. 从结晶度是影响材料降解的主要因素之一的角度,探讨研究了 PHB/PLLA 及 PHB/PLLA/PEO 共混体系在 PBS/溶菌酶降解前后的热力学行为、结晶度变化,对基体材料 PHB 的降解的影响,进而为制备降解速度可调控的组织工程支架打下一定理论基础。
2. 探讨研究了一种新的制备组织工程支架的方法:多孔膜片与纤维复合法。同时,制备出纤维/膜“夹芯”复合组织工程支架。

5.3 展 望

PHB 作为细胞内合成的一种高分子聚合物,其本身具有组织工程用支架材料的优良性质,特别是一些有利于细胞附着和分化细胞的信息,使其成为仿生细胞外基质的理想支架材料。尽管目前对 PHB 支架用于组织损伤修复或重建有了一定的研究,但还存在着一些问题,如支架本身的细胞亲和性不够、降解速率与新生组织不匹配、支架满足不同器官需要的物理特性的欠缺等。因此,进一步对 PHB 支架物理、化学、生物降解性能的改善及其对制备具有合适物理特性的组织工程用支架工艺的深入研究,使其满足不同病损组织部位的要求,这将是今后 PHB 支架应用于组织工程中的研究重点。通过本课题的研究表明,制备降解速率可调控的组织工程支架,若要实现精确的调控支架的降解速度,要从支架材料本身与支架结构两方面考虑。相信,解决了这些问题,PHB 将能够用于临床当中,为患者造福。

参考文献

- [1] 王身国,杨健,万玉青,等.组织工程用可降解生物材料的研究进展[J].化学通报, 2004,4:237~245.
- [2] Vacanti CA, Kim W, Upton J, et al. Tissue-engineered growth of bone and cartilage [J]. Transplant Proc, 1993, 25:1019.
- [3] 俞耀庭.生物医用材料[M]. 天津:天津大学出版社, 2000,12.
- [4] Saltzman W M. Weaving cartilage at zero: the reality of tissue engineering in space [J]. Proc Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94(25):1380~1383.
- [5] 周长忍. 生物材料学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2004,306~308.
- [6] 筱義人. 再生医工学[M]. 京都: (株)化学同人, 2001. 41~448.
- [7] 邹静恂, 白进发, 叶玲. 高分子材料在组织工程中的应用[J]. 首都医科大学学报, 2002,23(4): 364~366.
- [8] Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell[M].NewYork:Gar land, 1994, pp:71~995.
- [9] Kim B S, Mooney D J. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering [J]. Trends Biotechnol, 1998,16: 224-230.
- [10] Mikos A Cz, Thorsen A J, Czerwonka L A, et al. Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams[J]. Polymer, 1994, 35 (5), 1068~1077.
- [11] Saxena A. K, Marler. J, Benvenuto.M, et al, Tissue Eng[J]. 1999,5:525.
- [12] Brown. A. N, Kim. B. S, Alsberg .E, et al.Tissue Eng[J]. 2000,6,297.
- [13] Cao .Y, A. Rodriguez, M. Vacanti, et al. Biomater. Sci, Polym. Ed[J]. 1998, 9: 475.
- [14] Sittinger. M, Reitzel.D. Dauner.M., Biomed. Mater. Res[J]. 1996,33:57.
- [15] Mikos A G,Sarakino G,Leite S M,et al.Landnated three dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering[J].Biomaterials,1993,14:323-330.
- [16] Mikos A G,Thorsen A J,Czerwonh L A.et al.Preparation and characterization of poly(L-lactic acid)foams[J].Polymer,1994,35:1068~1077.
- [17] Mikes A G,Lyman,Freed L E,etal.Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(D,L- lactic -o-glycolicacid) foams for tissue culture[J].Biomaterials,1994,15:55~58.
- [18] 陈际达, 崔磊, 刘伟等,溶剂浇铸/颗粒沥滤技术制备组织工程支架材料研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2003 ,4:31-35.
- [19] Franks F.[J].Biotechnology(N-Y),1994,12(3):253.
- [20] Yoon Sung Nam, Tae Gwan Park. Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation [J]. J Biomed Mater Res,47,8~17, 1999.
- [21] 张军,严忻,沈健等,组织工程用高分子骨架研究的进展[J].功能材料,2002,33(4):373.
- [22] Dietmar W. Hutmacher. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage [J]. Biomaterials,2000,21:2535.
- [23] Zhang D.M.,Cui F.Z.,Luo Z.S,et al,Wettability improvement Coating Technology, 2000,(131):350~ 354.

- [24] Verhoogt H., Ramsay B.A., Favis B.D, Polymer review: polymer blends containing poly(3-hydroxyalkanoate)[J]. Polymer, 1994, 35(24): 5155~5168.
- [25] 苏涛, 周河治, 梁静娟. 微生物合成可降解塑料聚羟基链烷酸(PHA)[J]. 工业微生物, 1997, 27(3): 37.
- [26] Chibata, IL, Yamada, S., et al. US Patent 3,850,753, 1974.
- [27] 李爱萍, 李光吉. 聚羟基脂肪酸酯生物合成的研究进展[J]. 高分子通报, 2004, 10: 20~27.
- [28] 许开天, 赵树杰. PHB在生物医学的应用研究进展与应用[J]. 环境生物学报, 1995, 1(1): 85~91
- [29] Kassab A.Ch., Piskin, C. Embolization with Polyhydroxybutyrate(PHB) Micro-sphere res: In-vivo Studies[J]. Journal of Bioactive and Compatible, 1999, 14: 291~303.
- [30] Colin W.P., Saghir A, Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 1996, 18: 133~162.
- [31] 王正容, 陆彬, 杨红. 左炔诺孕酮-3-羟基丁酸酯缓释微球的研究 [J]. 药学学报 1999, 34(1): 54~57.
- [32] Slater S.C., Gallaher T., Dennis D, et al. Polyhydroxybutyrate Natural biocompatible and biodegradable polyesters produced by bacteria, [J]. Bacteriol, 1988, 170(10): 4431~4436.
- [33] Gaer Y., Marchessault R.H., Characterization of low weight molecular poly(β -hydroxybutyrate)s from alkaline and acid hydrolysis[J]. Polymer, 2000, 41(2): 1087~1098.
- [34] 郝建原, 邓先模. 生物塑料-聚(β -羟基丁酸酯)的物理改性和化学改性[J]. 高分子通报, 2001, (2): 1-12.
- [35] Mitomo H., Enjoji T., Watanabe Y, et al. Radiation-induced graft polymerization of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer [J]. Journal of Macromolecular Science - Pure and Applied Chemistry, 1995, A 32(3): 429~442.
- [36] Bahari K., Mitomo H., Enjoji T, et al. Degradability of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer grafted with styrene by radiation[J]. Polymer Degradation and Stability, 1998, 61: 245~252.
- [37] 胡平, 江涛. 一种聚羟基丁酸酯的增韧方法[P]. 中国专利: 1312305, 2001.
- [38] Hammond T, French C, Williams R, et al. Thermolysis and methanolysis of poly(β -hydroxybutyrate): random scission assessed by statistical analysis of molecular weight distributions[J]. Macromolecules, 1995, 28(13): 4408~4414.
- [39] Yu G, Marchessault R H. Characterization of low molecular weight poly(β -hydroxybutyrate) from alkaline and acid hydrolysis [J]. Polymer, 2000, (3): 1087~1098
- [40] Williams R J, Lehel R S. Thermal degradation of bacterial poly(hydroxybutyric acid): mechanisms from the dependence of pyrolysis yields on sample thickness [J]. Macromolecules, 1994, 27(14): 3782~3789.
- [41] Reeve M S, McCarthy S P, Gross R A. Preparation and characterization of B -poly(β -hydroxybutyrate)-poly(ϵ -caprolactone) and B -poly(β -hydroxybutyrate)-poly(lactide) degradable diblock copolymers[J]. Macromolecules, 1993, 26(5): 888~894.
- [42] Yu G, Morin F G, Nobes G A R, et al. Degree of acetylation of chitin and extent of grafting PHB on chitosan determined by solid state NMR [J]. Macromolecules, 1999, 32(2): 518~520.

- [43] Immirzi B, Malinconico M, Orsello G, et al. Blends of biodegradable polyesters by reactive blending: Preparation, characterization and properties[J]. Journal of Materials Science, 1999,34(7):1625~1639.
- [44] 蔡志江, 聚羟基丁酸酯的改性及其作为组织工程支架材料的研究, 硕士学位论文天津大学, 2002
- [45] Y Doi, Y Kanesawa, M. Kunioka and T. Saito, Biodegradation of microbial copoly esters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)[J], Macromolecules, 1990, 23: 26~31.
- [46] Y. Doi, Y Kanesawa, Y Kawaguchi and M. Kunioka, Hydrolytic degradation of microbial poly(hydroxyalkanoates)[J], Makromol. Chem Rapid Comm, 1989, 10: 227~230.
- [47] Abe H, Matsubara I, Doi Y. Physical properties and enzymatic degradability of polymer blends of bacterial poly [(R) 232 hydroxybutyrate] and poly [(R,S) 232hydroxybutyrate] stereoisomers[J]. Macromolecules, 1995, 28 (4): 844~853.
- [48] 陈珊, 刘东波, 夏红梅, 聚32羟基丁酸酯(PHB)生物降解过程的研究[J]. 生物化学与生物物理进展. 2002, 29(1): 110~113.
- [49] M. Caneti; M. Urso; P. Sadocco, Influence of the morphology and of the Supermolecular structure on the enzymatic degradation of bacterial Poly(3-hydroxybutyrate)[J]. Polymer 1999, 40: 2587~2594.
- [50] Bong O K, Seong I W, Compatibilizing capability of poly(β -hydroxybut- ϵ -caprolactone) in the blend of poly(β -hydroxybutyrate) and poly(ϵ -caprolactone), Polymer[J]. Bulletin, 1998, 41(12): 707-712.
- [51] Avella M, Maritscelh E, Grreco P, Cr, crytalization behaviour of poly(ethylene-oxide) from poly(3-hydroxybutyry)/poly(ethylene oxide) blends: phase stnrchring, Morphology and thermal behaviour[J]. Polymer, 1991, 32(9): 1647~1653.
- [52] Avella M., Mmtusoeh Z., RaimoM, The fracdonated cxystatiiziation phenomena in poly (3-hydroxybutyrate)/(poly(ethylene-oxide) blends[J]. Polymer, 1994, 5, (21): 4597~4605.
- [53] 杨维东, 胡平, 钱其春, 等. 应用羟基丁酸酯支架构建组织工程软骨[J]. 实用口腔医学杂志, 2002, 18(2): 157~9.
- [54] 王常勇, 袁晓辉, 刘爽, 等. 聚羟基丁酸酯载体人工软骨体内培育的实验研[J]. 中华外科杂志, 2000, 38(4): 270~2.
- [55] Köse GT, Korkusuzb F, özkul A, et al. Tissue engineered cartilage on collagen and PHB /V matrices[J]. Biomaterials 2005, 26: 5187~97.
- [56] Praemer A, Fumer S, Rice DP, et al. Musculoskeletal conditions in the United State US A: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1992.
- [57] Knowles JC. In vitro degradation of a PHB/PHV copolymer and a new technique for monitoring early surface changes. Biomaterials 1991, 12(2): 210~4
- [58] 蒋凌飞, 胡平. 生物可降解塑料PHB的压电性能及在骨移植中的应用[J]. 功能材料, 2000, 31(1): 33~5.
- [59] 伍锦华, 玉峰, 刘丽萍, 等. 聚羟基丁酸酯复合骨髓基质细胞构建组织工程骨修复兔下颌骨缺损[J]. 中国美容医学, 2005, 14(5): 532~4.

- [60]Boeree NR, Dove J, Cooper JJ, et al. Development of a degradable composite for orthopaedic use : mechanical evaluation of an hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite material[J]. *Biomaterials*, 1993, 14(10):793~6.
- [61]Köse GT, Korkusuz F, Korkusuz P, et al. Bone generation on PHBV matrices: an in vitro study [J].*Biomaterials* 2003, 24:4999~5007.
- [62]叶芬,尹玉姬,孙光洁,等.壳聚糖支架在组织工程中的应用[J].*功能材料*,2002,33 (5):460.
- [63]Chaput C, DesRosiers EA,Assad M,et al.Processing biodegradable natural polyesters for porous soft materials.NATO ASI Ser Ser E 1995;29(4):229.
- [64]Doyle V, Pearson R,Lee D,et al.Investigation of the growth of human dermal fibroblasts on poly-L-lactic acid in vitro[J].*Mater Sci* 1996,7:381~5.
- [65]艾卫兵,艾玉峰,熊猛,等.新型聚 β -羟基丁酯作为血管组织工程支架材料的实验研究[J].*中国美容医学*,2005,14(2):140~4.
- [66]Lootz D, Behrend D. Development of a method for the fabrication of restorable stents and FEM simulation of the deformation behaviour(in German)[J].*Biomed Tech* 1996;41(suppl1):586~7.
- [67]Lootz D, Behrend D, Kramer S,et al.Laser cutting:influence on morphological and physicochemical properties of polyhydroxybutyrate[J].*Biomaterials*, 2001,22:2447 ~52.
- [68]Behrend D. PHB as a bioresorbable material for intravascular stents [J].*Am J Cardiol* 1998,82:48.
- [69]斯泰因比歇尔主.生物高分子[M].陈学思,景遐斌,庄秀丽,译.北京:化学工业出版社,2005:272
- [70]Young RC,Wiberg M, Terenghi G. Poly-3-hydroxybutyrate(PHB):a resorbable conduit for long-gap repair in peripheral nerves[J]. *Br J Plast Surg* 2002,55(3):235~40.
- [71]Afshin M,Mikael W,Robin M,et al.New matrices for studying Schwann cell transplantation in peripheral nerve reconstruction. Second Smith and Nephew International Symposium in Tissue Engineering 2000: Advances in Tissue Engineering, Biomaterials and Cell Signaling, York, United Kingdom:Smith and Nephew, 2000:40.
- [72]Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE,et al. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model[J].*Ann Thorac Surg* 1995;60(6 Suppl):S513~6.
- [73]Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS,et al.Evaluation of biodegradable, three-dimensional matrices for tissue engineering of heart valves.ASAIO J 2000;46(1):107~10.
- [74]戈进杰. 生物降解高分子材料及其应用[M].北京: 化学工业出版社,2002,9:457.
- [75]杨革生,沈新元,杨庆. 聚乳酸及其共聚物纤维的制备及应用[J].*合成技术及应用*,1998,14(2):23~26.
- [76]A.J.Nijenhuis, E.Colstee, D.W.Grijpma, et al.High molecular weight poly(L-lactide) and poly(ethylene oxide) blends :thermal characterization and physical properties [J].*Polymer*,1999,26(37):5850.
- [77]Chin Han Chan, Claudia Kummerlöwe,et al. Crystallization and Melting Behavior of Poly(3-hydroxybutyrate)-Based blends[J].*Marcom.Chem, Phys*, 2004, 205: 664~ 675.
- [78]殷敬华,莫志深.现代高分子物理学,北京:科学出版社,2001.270~271.
- [79]E. Bliimm and A. J. Owen.Miscibility, crystallization and melting of poly(3hydroxybutyrate) /poly(L-lactide) blends *Polymer*[J].*polymer*,1995,36:4071 ~4081.

- [80] 彭树文, 聚3-羟基丁酸酯与聚丙烯碳酸酯共混体系研究, 中国科学院长春应用化学研究所博士学位论文, 2003.
- [81] Paul. D.R, Bucknall .C.B. *Polymer Blends*. 第一版. 北京: 科学出版社, 2004. 136.
- [82] 张俐娜, 薛奇, 莫志深, 等. 高分子物理近代研究方法, 第一版. 武汉: 武汉大学出版社, 2003: 226
- [83] 李荣群, 安玉贤, 庄宇钢, 等. 聚 β -羟基丁酸酯/超高分子量聚氧化乙烯共混体系相容性和结晶行为[J]. 高分子学报, 1999, (4): 498~500.
- [84] 何曼君, 高分子物理, 上海: 上海复旦大学出版社, 1990.
- [85] Koyama N, Doi Y. Miscibility, Thermal Properties, and Enzymatic Degradability of Binary Blends of Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] with Poly(ϵ -caprolactone-co -lactide) [J]. *Macromolecules*, 1996, 29: 5843.
- [86] 马德柱, 黄毅萍, 任小凡, 等. 聚己内酯与乙基纤维素共混体系的环带球晶及液晶形态的研究[J]. 应用化学, 1999, 16: 5.
- [87] Xiao Q, Yang S, Rogausch K D, et al. Ring-banded spherulites in poly(ϵ -caprolactone) blended with hydroxyethyl cellulose acetate as an indication for partial miscibility [J]. *J Appl Polym Sci*, 2001, 80: 1681.
- [88] Ma D Z, Zhang J B, Wang M.Z, et al. The Comparison of the Ringed Spherulite Morphology of PCL Blends with Poly(vinyl chloride), Poly(bisphenol A carbonate) and Poly(hydroxyether of bisphenol A) *Macromol Chem Phys*, 2001, 202: 961.
- [89] 张长安, 黄关葆, 尤维峰. 工程塑料用 PET 的结晶性能研究 [J]. 合成技术及应用, 2005, 12(20), 4: 122~126.
- [90] Q. Guo. [J]. *Macromol. Chem.* 1990, 191, 2639.
- [91] 钱以宏. 聚乳酸及其降解特性[J]. 纤维技术, 2004, 4: 40.
- [92] 刘磊, 吴若峰. 聚乳酸类的水解特性[J]. 合成材料老化与应用, 2005, 35(1): 45.
- [93] Scandola M., Focarret M.L, Gazzano M, et al. Crystallinity Induced Biodegradation of Novel [(R,S)- β -Butyrolactone]-b-pivalolactone Copolymer, *Macromolecules* [J]. 1997, 30: 7743 ~ 7751.
- [94] 王玲, 聚羟基丁酸酯组织工程支架材料的研究, 硕士论文, 天津大学, 2001.
- [95] 薛丹, 聚羟基丁酸酯纤维改性及酶解动力学研究, 硕士论文, 西北工业大学, 2004.
- [96] 陈珊, 刘东波, 夏红梅, 等. 聚3-羟基丁酸酯(PHB)生物降解过程的研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(1): 110~113.
- [97] Mikos A G, Thorsen A J, Czerwonka L. et al. Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams [J]. *Polymer*, 1994, 35(5): 1068~1077.
- [98] Mooney D J, Mazzoni C L, Breuer C, et al. Stabilized polyglycolic acid fiber-based tubes for tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 1996, 17(2): 115~124.
- [99] Whang K, Thomas C H, Healy K E, et al. Novel methods to fabricate bioabsorbable scaffolds [J]. *Polymer*, 1995, 36(4): 837~842.
- [100] Harris L D, Kim B S, Mooney D J. Open pore biodegradable materials formed with gas foaming [J]. *J Biomed Mater Res*, 1998, 42(3): 396~402.
- [101] Nam Y S, Park T G. Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation [J]. *J Biomed Mater Res*, 1997, 47(1): 8~17.

- [102]Tithi Dutta Roy, Joshua L.et,al.. Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques [J].J Biomed Mater Res,2003,66A: 283~291.
- [103]石桂欣,王身国,贝建中. 聚乳酸与聚乳酸-羟基乙酸多孔细胞支架的制备及孔隙的表征[J]. 功能高分子学报,2001,14(3): 7~11.

攻读硕士期间发表的论文

1. 杜江华, 杨青芳, 张楠楠, 聚 β -羟基丁酸酯(PHB)/聚乳酸共混体系和 PHB/聚氧乙烯(PEO)共混体系冷结晶性的研究, 高分子材料科学与工程, 已录用
2. 杜江华, 杨青芳, 张楠楠, 舒晓军等, 聚 β -羟基丁酸酯(PHB)支架在组织工程中的应用, 中国临床康复, 2006, 10(37)
3. 薛丹, 杨青芳, 杜江华, 生物塑料聚羟基丁酸酯的改性进展, 化工进展, 2006, 25(6)
4. 舒晓军, 杨青芳, 杜江华等. 生物材料聚乳酸改性及应用, 合成纤维与工业, 2006, 12
5. 王大伟, 杨青芳, 张楠楠, 杜江华等, 甲基丙烯酸正丁酯-含氢硅油的合成与表征, 中国胶粘剂2006, 10

致 谢

本文是在恩师杨青芳教授的悉心指导下完成的。杨老师博学多才，治学严谨，思路敏捷。经常与我讨论实验思路和方法，把握实验方向。同时，指出我的不足，提出宝贵建议，使我获益匪浅。在日常生活中，杨老师为人热忱，处事稳健，乐于助人，关心他人的崇高精神给予我莫大的精神启迪和教诲，令我终生受益，能成为杨老师的学生是我莫大的荣幸。

在此，谨向我尊敬的导师致以深深的谢意和感激！

同时，也要感谢姚老师在我论文及平常生活中给予的热情帮助。对张双存、范老师课题组给予测试方面的帮助表示感谢。同时，感谢第四军医大学硕士田晋洪在动物实验方面给予的大量帮助。

在本论文完成的过程中，薛丹师姐、张楠楠同学、舒晓军同学、王大伟同学、张爱军同学以及本课题组的其它师弟师妹，在平常的生活和学习中给予的帮忙，在此一并向他们表示感谢。

感谢 04618 硕士班的全体同学对我的帮助，难忘与你们共同度过这个让人怀念的时光。

最后，深深感谢我敬爱的父母和亲人对我的支持和鼓励！