doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.03.003

一种具有空腔结构的高分子超细纤维的制备及应用研究*

马骏锴¹ 倪国莉² 李西林² 何 洋² 周绍兵² 杨 光³△ (1西南交通大学生命科学与工程学院 四川 成都 610031;2 西南交通大学材料科学与工程学院 四川 成都 610031; 3 西南交通大学医学院 四川 成都 610031)

摘要 目的:制备一种具有空腔结构的高分子超细纤维并研究其相关性质,探索其应用。方法:结合静电纺丝技术和微流控技术, 制备出具有空腔结构的聚乳酸(PLA)超细纤维,并使用荧光显微镜、扫描电子显微镜、透射电子显微镜等手段进行结构表征;采用 甘油铜分光光度法、Alamar-Blue 法间接检测了纤维膜的甘油含量和细胞毒性,并考察了其吸水率相较于普通实心纤维膜的变化; 将 PEI- 质粒复合物载入纤维的空腔结构中,通过细胞转染实验验证了此纤维膜在运载质粒方面的应用。结果:纤维平均直径在 1 μm 左右,内部均匀分布着椭圆形空腔。该纤维膜中甘油占比 38.99%,吸水率为普通实心 PLA 纤维膜的近 2 倍。纤维膜与内皮细 胞 5 天的共培养中,没有明显的细胞毒性。细胞转染检测结果证明了纤维空腔部分能有效运载质粒复合物并保证其生物活性。 论:静电纺丝技术和微流控技术有效结合,成功制备出具有空腔结构的新型高分子超细纤维,展现出了区别于普通纤维的独特性 质和应用。

关键词:静电纺丝技术;徽流控技术;高分子;超细纤维 中图分类号:R318.08;R-33 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)03-413-06

The Preparation and Application of Polymer Superfine Fiber with Cavities*

MA Jun-kai′, NI Guo-lr̂, LI Xi-lin², HE Yang², ZHOU Shao-bing², YANG Guang³∆

(1 School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan, 610031, China;

2 School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan, 610031, China;

3 College of medicine, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan, 610031, China)

ABSTRACT Objective: To prepare a novel polymer superfine fiber with internal cavities and its properties and applications are researched. **Methods:** The novel polymer superfine fiber with cavities was prepared by combining electrospinning and microfluidic technology and then was characterized by fluorescence microscope, scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscopy (TEM); The glycerol content and cytotoxicity of this fiber membrane were investigated by cupric glycerinate spectrophotometry and Alamar-Blue assay. Besides, the difference about water absorption between the fiber and the conventional solid one was compared. The PEI-plasmid complexes were loaded into the cavities of the fiber and its application in transporting plasmids was studied by cell transfection experiments. **Results:** The fiber diameter was about 1 µm and the elliptical cavities were orderly distributed inside. The mass fraction of glycerol in the membrane was 38.99 % and water absorption of the membrane was nearly as twice as the conventional one without cavities. During the co-culture with endothelial cells for 5 days, the membrane had not shown significant cytotoxicity. Besides, the cavities inside fiber could effectively carry the PEI-plasmid complexes and maintain their biological activity, as verified by cell transfection experiments. **Conclusions:** Electrospinning and microfluidic technology were successfully combined to prepare a polymer superfine fiber with cavities and this fiber membrane exhibited unique properties and might be promising in many applications.

Key words: Electrospinning; Microfluidic technology; Polymer; Superfine fiber

Chinese Library Classification(CLC): R318.08; R-33 Document code: A Article ID: 1673-6273(2018)03-413-06

前言

在科学技术日新月异的 21 世纪,随着信息、能源、生物、环 境等技术的迅速发展,各领域对相关材料都提出了更高的需 求。面向微纳尺度材料的研究,已成为当今各领域的热点。微纳 材料由于本身较小的尺寸,使其具有了区别于常规尺寸材料的 特殊物理化学性质^[12]。

静电纺丝技术是一种利用电场力制备连续的高分子超细 纤维的方法,纤维直径从微米到纳米不等。最早是由美国人 Formhals 于 1934 年发明设计的,并成功申请了专利。目前,静

作者简介:马骏锴(1991-),男,硕士研究生,研究方向:生物材料,E-mail: 281596584@qq.com

^{*}基金项目:国家自然科学基金项目(51173150);国家重大科学研究计划(973计划)子课题(2012CB933602); 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20120184110029)

[△] 通讯作者:杨光(1989-),男,讲师,研究方向:生物材料,E-mail: gyang@swjtu.edu.cn

⁽收稿日期:2017-05-30 接受日期:2017-06-25)

电纺丝技术已在过滤材料³¹、灵敏传感器⁴⁴、环境工程、生物医学 ⁵¹等领域得到了广泛的应用。而微流控技术是一门多领域交叉 的新兴学科⁴⁰,其通过对微小流体的操控,可以得到各种微尺度 的结构,在检测技术¹⁷和组织工程⁸⁰等领域展现出了良好的应用 前景。

本论文有效地结合了静电纺丝技术和微流控技术,制备出 具有空腔结构的新型高分子超细纤维,研究了纤维膜的结构性 质和在基因载体方面的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂 聚乳酸(Polylactic acid, PLA, 实验室自主合成, 分子量约 15 万), 甘油 (Adamas -66258B), 聚乙烯亚胺 (Polyethyleneimine, PEI, 分子量 25000, Sigma-Aldrich), 碘化丙 啶(Propidium iodide, PI)、钙黄绿素(Calcein-AM)和罗丹明 B 购于 biosharp 公司,碳酸二甲酯(DMC)、硫酸铜、氢氧化钠(成都科龙化工试剂厂), 圆形、方形玻璃毛细管(北京中成石英玻

璃制品有限责任公司),带有绿色荧光蛋白(GFP)的质粒(四川 省人民医院友情提供)等。

1.1.2 实验仪器 微流泵 (LSP01-2A, China),高压电源 (DW-P403-4ACDE, China),电子天平(北京赛多利斯仪器系统 有限公司),荧光倒置相差显微镜(IX51, Olympus, Japan),场发 射扫描电子显微镜(JSM-7001F, JEOL, Japan),透射电子显微 镜(2100F, JEOL Ltd., Japan),紫外分光光度计(UV-2550, Shimadu, Japan),纳米激光粒度仪(Nano-ZS90, Malvern, U.K.),酶 标仪(Thermo, USA),流式细胞仪(BD, USA)等。

1.2 方法

1.2.1 纤维的制备 如图 1,用微流控芯片¹⁹制得油包水型乳 液,之后直接进行电纺。具体参数如下:水相为甘油水溶液,质量分数 83.4%,推速 0.5 mL/h。油相为 PLA 的 DMC 溶液,质量 体积比 30%,推速 1.5 mL/h。纺丝电压 20 kV,纤维接收距离 15 cm 左右,纺丝温度控制在 20-25 ℃。为了便于观察,在水相 中加入了有红色荧光的罗丹明 B。





Fig.1 Schematic illustration of preparation of fibers

1.2.2 纤维膜中甘油含量测定 氢氧化铜 Cu(OH)₂ 与甘油会 反应生成甘油铜,其在 630 nm 处有最大吸收,可以利用紫外分 光光度计测量浓度。

标准曲线建立:依次配置不同浓度甘油水溶液(8 mg/mL、 10 mg/mL、12 mg/mL、14 mg/mL、16 mg/mL、18 mg/mL、20 mg/ mL、22 mg/mL、24 mg/mL), 配置氢氧化钠水溶液 NaOH(0.05 g/mL),硫酸铜水溶液 CuSO₄(0.1 g/mL)。在 0.5 mL 的甘油水溶 液中依次加入 3 mL NaOH 和 1 mL CuSO₄。超声 5 min 后, 10000 r/min(RPM)离心 5 min,取上清液用紫外分光光度计分 别测其 630 nm 处吸光度,然后建立标准曲线。

纤维膜中甘油含量测定:剪取纤维膜,并称重。用5mL DMC溶解后,再用5mL水萃取出其中甘油。然后按照上述方 法制得甘油铜,测其吸光度值,代入标准曲线后可得甘油浓度, 进而可计算出甘油在纤维膜中占比。

1.2.3 纤维膜吸水率测定 取干燥纤维膜称重得 m₁,将其放 入蒸馏水中至完全浸润,之后取出,用滤纸吸除纤维膜表面水

后称重得 m₂。则其吸水率 q =(m₂- m₁)/mL × 100 %^[10]。 1.2.4 纤维膜生物相容性测定 (1)剪取适量纤维样品,放入 封口带中于紫外灯下灭菌(正反面各 2 h)。(2)将内皮细胞 (EC)以 2× 10⁴ 个/孔的密度接种于 48 孔板中,加入 500 μL DME/F12(1:1)培养基,过夜培养待细胞贴壁。之后将灭好菌的 纤维膜用压环固定于孔板中部与细胞共培养^[11]。(3)在细胞培 养的第 1、3、5 天时,移除培养基,加入 200 μL Alamar blue 溶液 (media 199:FBS:Alamar blue 原液 =8:1:1),与细胞孵育 4 h。之 后将孵育液转移至 96 孔板中,用酶标仪检测。(4)在 1、3、5 天 时,同时对细胞进行活死染色,并用荧光显微镜观察形貌。染色 方法为:移除培养基,同时加入 100 μL 稀释后的 PI 与 Calcein-AM 染液,避光条件下孵育 20 分钟,移除染液,用 PBS 冲 洗 3 次后即可进行观察。

1.2.5 PEI- 质粒复合物制备 将 500 μL 浓度为 132 μg/mL 的 PEI 水溶液缓慢滴入等体积的 100 μg/mL 的质粒溶液中^[12]。涡 旋 2 分钟,因静电吸附作用,PEI 会将质粒压缩成纳米颗粒。之 后用纳米激光粒度仪(DLS)测量颗粒粒径。

1.2.6 装载 PEI-质粒复合物纤维膜的制备 将制备好的 PEI-质粒复合物水溶液与甘油以 1:2 的体积比混合,涡旋 5 分钟,静置 2 h 消除溶液中气泡。之后直接作为水相,其它实验条 件参照 1.2.1。

1.2.7 **细胞转染实验** 把运载 PEI- 质粒复合物的纤维膜置于 蒸馏水中超声,破坏纤维空腔壁,得含有 PEI- 质粒复合物的释 放液。将人肝癌细胞(HepG2)以 5×10⁴ 个/孔的密度接种于 24 孔板中,培养 16小时后用无血清培养基清洗细胞,之后加入纤 维释放液(5μg 质粒含量)和无血清培养基,培养 4小时后换成 含 10%血清的培养基继续培养 24小时,完成转染。用荧光显 微镜和流式细胞仪进行观察与检测。1.2.5 中制得的 PEI- 质粒 复合物作为纤维释放液的对照组。

1.3 统计学分析

采用 Microsoft excel 和 Origin8.5 统计分析软件处理本实

验所得数据。如未特别注明,则所有的实验均至少设置3个平 行样。处理结果以平均数±标准差表示,P<0.05表示数据间存 在统计学差异。

2 结果

2.1 具有空腔结构的高分子超细纤维表征

图 2 为具有空腔结构的 PLA 纤维的荧光图(a)、扫描电镜 图(b)和透射电镜图(c)。从 a 中可以看到,一个个大小均匀的 红色小球呈线性排列,其本质就是存在于纤维空腔中的罗丹明 B 所发出的荧光。扫描电镜结果显示,纤维直径在 1 µm 左右, 且纤维基体上可隐约观察到明暗相间的区域(暗色部分即为空 腔),证明其内部并不是实心结构。而透射电镜结果更可以明显 看到纤维内部的椭圆形空腔。以上结果均证明,成功制备出了 具有空腔结构的超细高分子纤维。



图 2 空腔结构纤维的(a)荧光图像、(b)扫描电镜图像和(c)透射电镜图像 Fig.2 Fluorescence microscope (a), SEM(b) and TEM(c) images of PLA fibers with cavities

2.2 纤维膜性质探究

2.2.1 甘油含量 图 3 为甘油铜的紫外吸收光谱(a)和标准曲线(b)。甘油铜最大吸收在 630 nm 处,标准曲线方程为 y=0.

0296x-0.0954(R²=0.9992),具有良好的线性关系。依 1.2.2 中方 法最终测得的纤维膜中甘油质量分数为(38.99± 1.24)%。





2.2.2 吸水率 比较了空腔结构 PLA 纤维膜吸水率相较于普 通实心 PLA 纤维膜的变化,结果如图 4。具有空腔结构的纤维 膜吸水率是普通纤维膜的近两倍。这是因为纤维中含有空腔,

且空腔中含有的甘油又是一种强吸水性的物质,利于水分渗透 进入并存储于纤维膜间隙和空腔中。



with cavities); *P<0.05

2.2.3 **细胞毒性** 图 5 中的结果表明,具有空腔结构的纤维在 与内皮细胞共培养 5 天后,仍保持 80 % 以上的细胞活性,1、3、 5天的活死细胞染色结果中也没有看到明显的死细胞(红色荧光),且活细胞(绿色荧光)状态良好,数量逐渐增多。证明了此 纤维材料具有良好的生物相容性。

2.3 纤维膜运载质粒研究

2.3.1 PEI- 质粒复合物粒径考察 为了增强细胞对质粒的吞噬,提高转染效率,使用 PEI 对质粒进行压缩,制得纳米颗粒,粒径分布如图 6。平均粒径为 187.9 nm, PDI 为 0.106,粒径均匀,符合转染要求。

2.3.2 细胞转染实验检测 图 7 为实验组 -- 纤维膜包载的质 粒复合物 (Fiber 表示)和对照组 -- 未被包载的质粒复合物 (PEI-DNA 表示)的细胞转染荧光图像。两者共培养过的细胞 都分别呈现出了绿色荧光,证明了质粒的成功表达。图 8 为流 式细胞仪转染效率的检测结果,空白组为不添加任何组分的细胞。转染效率上,Fiber 组为 (25.5± 3.6)%,PEI-DNA 组为 (28.6± 4.8)%,两者不存在显著差异。以上结果均证明该纤维 的空腔可以包载质粒复合物,并且能很好的保持其生物活性。



图 5 不同时间点纤维膜细胞毒性及对应荧光图像

Fig.5 Cytotoxicity of the fiber membrane at different time points and corresponding fluorescence images



3 讨论

Yu Yue^[13]等使用微流控芯片制得了类似竹状结构的空腔

纤维,但纤维尺寸相对较大,在 30 µm 左右。Sun Yong-ming^[14] 等通过静电纺丝技术制得碳纳米纤维,经过进一步的热处理得 到了有较好电化学性质的空腔纤维。本论文基于已有的研究成 果,创新性地将静电纺丝技术和微流控技术有效结合起来,成 功制备出一种具有空腔结构的超细高分子纤维,并探究了其在 生物材料领域的应用前景。纤维直径在1µm 左右,制备方法 简单,重复性好,且不需要繁琐的后处理。通过荧光显微镜、扫 描电子显微镜、透射电子显微镜等方法进行了纤维的结构表 征。之所以能够产生此种结构的纤维,很大程度上是因为纺丝 液由微流控芯片制备成了包含连续均匀微球的乳液。此乳液在 泰勒锥¹⁵¹处被电场力拉伸,含 PLA 的油相随着溶剂挥发变成 纤维,水相则变成更小的微滴存在于纤维中形成空腔。

Marco Angarano^[10]等制备的明胶实心纤维膜吸水率在 300 %左右。因空腔和甘油的存在,使此种纤维膜吸水率超过了 600%,远大于普通实心纤维膜。由于所用原材料均无毒无害, 纤维膜具有良好的生物相容性。此外,细胞转染实验证明了此 种纤维可以有效地包载质粒,并能保证其活性不受破坏。









可降解高分子纤维膜在组织修复[16,17]和癌症治疗[18-20]等方 面都已经展现出了良好的应用前景。本研究制备的具有空腔结 构的高分子纤维,结构新颖,生物相容性好,并且纤维中含有油 (纤维基体)、水(纤维空腔)两相,可用于同时包载各种亲疏水性 物质, 解决了以往研究成果中单根纤维只能装载单一类型药物 的问题^[21],为药物运输等领域提供了一种新型的生物载体材料。

静电纺丝技术和微流控技术结合制备纤维膜也已受到过 一些研究者的关注,并发表了相关论文[2223]。本研究对实验装置 和制备参数进行改进与优化,寻求到了一种简单易行、可重复 性高的制备空腔结构高分子纤维的方法,正是本文创新点所 在。值得注意的是,通过对微流控中水相、油相材料的改变和静 电纺丝参数的调整,可能会为发展其它新型结构纤维提供一种 新思路,需要我们继续发掘和研究。

参考文献(References)

- [1] Zhang Qi-feng, Evan Uchaker, Stephanie L .Candelaria, et al. Nanomaterials for energy conversion and storage[J]. Chemical Society Reviews, 2013, 42(7): 3127-3171
- [2] De Volder MFL, Tawfick SH, Baughman RH, et al. Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications[J]. Science, 2013, 339(6119): 535-539
- [3] Ge Jian-long, Zhang Ji-chao, Wang Fei, et al. Superhydrophilic and underwater superoleophobic nanofibrous membrane with hierarchical structured skin for effective oil-in-water emulsion separation[J]. Journal of Materials Chemistry A, 2017, 5(2): 497-502
- [4] Li Zhen-yu, Zhang Hong-nan, Zheng Wei, et al. Highly sensitive and stable humidity nanosensors based on LiCl doped TiO2 electrospun

nanofibers [J]. Journal of the American Chemical Society, 2008, 130 (15): 5036-5037

- [5] Wang Ling, Wu Yao-bin, Guo Bao-lin et al. Nanofiber Yarn/Hydrogel Core-Shell Scaffolds Mimicking Native Skeletal Muscle Tissue for Guiding 3D Myoblast Alignment, Elongation and Differentiation[J]. Acs Nano, 2015, 9(9): 9167-9179
- [6] Sackmann EK, Fulton AL, Beebe DJ, et al. The present and future role of microfluidics in biomedical research [J]. Nature, 2014, 507(7491): 181-189
- [7] Lichtenberg J, de Rooij NF, Verpoorte, E. A microchip electrophoresis system with integrated in-plane electrodes for contactless conductivity detection[J]. Electrophoresis, 2002, 23(21): 3769-3780
- [8] Jun Yesl, Kang Edward, Chae Sukyoung, et al. Microfluidic spinning of micro- and nano-scale fibers for tissue engineering [J]. Lab on a Chip, 2014, 14(13): 2145-2160
- [9] Utada AS, Lorenceau E, Link DR, et al.Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device [J]. Science, 2005, 308 (5721): 537-541
- [10] Marco Angarano, Schulz Simon, Fabritius Martin, et al. Layered Gradient Nonwovens of In Situ Crosslinked Electrospun Collagenous Nanofibers Used as Modular Scaffold Systems for Soft Tissue Regeneration[J]. Advanced Functional Materials, 2013, 23(26): 3277-3285
- [11] Yang Guang, Wang Jie, Li Long, et al. Electrospun micelles/drugloaded nanofibers for time-programmed multi-agent release [J]. Macromolecular bioscience, 2014, 14(7): 965-976
- [12] Godbey WT, Wu KK. Mikos AG. Poly (ethylenimine) and its role in gene delivery [J]. Journal of Controlled Release, 1999, 60 (2-3): 149-160
- [13] Yu Yue, Wen Hui, Ma Jing-yun, et al. Flexible Fabrication of Biomimetic Bamboo- Like Hybrid Microfibers[J]. Advanced Materials, 2014, 26(16): 2494-2499

(上接第 422 页)

- [18] 李少伟, 沈文通, 潘晖榕, 等. 从原核生物中纯化人乳头瘤病毒晚 期蛋白 L1 的方法[P]. 中国专利, CN200610140613.0, 2006-09-29 Li Shao-wei, Shen Wen-tong, Pan Hui-rong, et al. Purification of human papillomavirus late protein L1 from prokaryotes [P]. Chinese Patent, CN200610140613.0, 2006-09-29
- [19] Kim H, Kim S, Lim S, et al. One-step chromatographic purification of human papillomavirus type 16 L1 protein from Saccharomyces cerevisiae[J]. Protein Expression and Purification, 2010, 70(8): 68-74
- [20] Kwag HL, Kim HJ, Chang DY, et al. The production and immunogenicity of human papillomavirus type 58 virus-like particles produced in Saccharomyces cerevisiae [J]. Journal of Microbiology, 2012, 50(5): 813-820
- [21] Thönes, Nadja Herreiner, Anna Schädlich, et al. A direct comparison of human papillomavirus type 16 L1 particles reveals a lower im-

- [14] Sun Yong-ming, Sills Ryan B, Hu, Xian-luo, et al. A Bamboo-Inspired Nanostructure Design for Flexible, Foldable, and Twistable Energy Storage Devices[J]. Nano Letters, 2015, 15(6): 3899-3906
- [15] Yarin AL, Koombhongse S, Reneker DH. Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers [J]. Journal of Applied Physics, 2001, 90(9): 836-846
- [16] Cheng Li-ying, Sun Xiao-ming, Zhao Xin, et al. Surface biofunctional drug-loaded electrospun fibrous scaffolds for comprehensive repairing hypertrophic scars[J]. Biomaterials, 2016, 83: 169-181
- [17] Li Xiao-ran, Li Meng-yuan, Sun Jie, et al. Radially Aligned Electrospun Fibers with Continuous Gradient of SDF1 alpha for the Guidance of Neural Stem Cells[J]. Small, 2016, 12(36): 5009-5018
- [18] Ghavami NA, Sasikala ARK, Unnithan AR, et al. Mussel-Inspired Electrospun Smart Magnetic Nanofibers for Hyperthermic Chemotherapy[J]. Advanced Functional Materials, 2015, 25(19): 2867-2875
- [19] Zhao Xin, Yuan Zi-ming, Yildirimer Lara et al. Tumor-Triggered Controlled Drug Release from Electrospun Fibers Using Inorganic Caps for Inhibiting Cancer Relapse[J]. Small, 2015, 11(34): 4284-4291
- [20] Zhang Zhi-yun, Liu Shi, Qi Yan-xin, et al. Time-programmed DCA and oxaliplatin release by multilayered nanofiber mats in prevention of local cancer recurrence following surgery[J]. Journal of Controlled Release, 2016, 235: 125-133
- [21] Kaplan JA, Liu Rong, Freedman JD, et al. Prevention of lung cancer recurrence using cisplatin-loaded superhydrophobic nanofiber meshes[J]. Biomaterials, 2016, (76): 273-281
- [22] Srivastava Yasmin, Marquez Manuel, Thorsen Todd. Microfluidic electrospinning of biphasic nanofibers with Janus morphology [J]. Biomicrofluidics, 2009, 3(1): 012801-012806
- [23] Zhang Xu, Gao Xing-hua, Jiang Lei, et al. Flexible Generation of Gradient Electrospinning Nanofibers Using a Microfluidic Assisted Approach[J]. Langmuir, 2012, 28(26): 10026-10032

munogenicity of capsomeres than viruslike particles with respect to the induced antibody response [J]. Journal of Virology, 2008, 82(11): 5472-5485

- [22] Zhao, Q Modis, Y High, et al. Disassembly and reassembly of human papillomavirus virus-like particles produces more virion-like antibody reactivity[J]. Virology journal, 2012, 9(11): 52
- [23] Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, et al. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas [J]. Immunology, 1995, 92 (12): 11553-11557
- [24] Roteli-Martins C, Naud P, De Borba P, et al. Sustained immunogenicity and efficacy of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: up to 8.4 years of follow-up[J]. Human vaccines & immunotherapeutics, 2012, 10(8): 2147-2162