

# 聚羟基烷酸酯薄膜的亲水性改性

卢 玲\* 王迎军 郑裕东 吴 刚

(华南理工大学材料学院生物材料研究所, 特种功能材料及其制备新技术教育部重点实验室 广州 510641)

**摘 要** 分别采用氧等离子体方法和碱性条件下水解的方法对新型生物高分子 3-羟基丁酸和 3-羟基戊酸共聚物(PHBV)薄膜进行改性处理,以改善其亲水性和细胞亲和性。采用 XPS 考察了改性前后薄膜表面的组成、元素化学状态,用 SEM 观察了表面形貌变化,并考察了犬骨髓基质细胞在其上的生长情况。结果表明,经等离子体和水解改性后 PHBV 薄膜表面的氧含量分别增加了 5.3% 和 2.5%,水接触角分别减小了 36° 和 16.7°,表明材料表面的亲水性增强。在氧等离子体处理后分别有 1.5% 和 3.5% 的 C—O 和 C—C 发生断裂,生成亲水的羧基,而在碱性溶液中则发生酯键的水解。改性后的 PHBV 薄膜更有利于细胞的生长,尤以采用氧等离子体处理的效果更为明显。研究结果为进一步的表面改性修饰以及制备细胞亲和性好的 PHBV 三维支架打下良好基础。

**关键词** PHBV, 氧等离子体, 水解, 亲水性

中图分类号: O631.3; TQ323.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2006)01-0022-04

组织工程支架材料要求材料与细胞或组织间有良好的界面相互作用<sup>[1~3]</sup>,以增进细胞活性或促进新组织再生。影响细胞与材料间相互作用的因素很多,材料表面的亲疏水性是一个重要因素,通常亲水性材料表面更有利于细胞粘附<sup>[4~7]</sup>,如将聚羟基乙酸进行水解,可改善血管平滑肌细胞的附着<sup>[8]</sup>。微生物合成的聚羟基烷酸酯(PHA)是一类新型热塑性生物高分子,具有良好的生物降解性和生物相容性。其中研究最多的是聚 3-羟基丁酸酯(PHB),其结晶度高,既硬且脆,实用价值不高<sup>[9]</sup>;而 3-羟基丁酸与 3-羟基戊酸的共聚物(PHBV)则结晶度较低、具有柔韧性,易于加工,可用作药物控释、外科缝合线、人工骨、组织工程支架材料等<sup>[10]</sup>。但 PHBV 的疏水性较强,作为组织工程支架,细胞在其上的粘附力不够。采用等离子体处理在材料表面形成新的亲水性基团,是一种有效的表面改性方法<sup>[11]</sup>,如经氧等离子体处理后的聚乳酸可促进鼠成纤维细胞在膜表面的粘附<sup>[12]</sup>。本文采用氧等离子体处理 PHBV 薄膜表面,引入亲水性基团,考察犬骨髓基质细胞在其上的生长增殖,并与碱性条件下的水解方法进行比较。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

PHBV(英国 ICI 公司),Grade:D 400p;三氯甲烷,分析纯;NaOH,分析纯;医用氧 $\geq 99.5\%$ ;细胞培养试剂:改良 Eagle 培养基 DMEM(美国 Gibco 公司);胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);胎牛血清。

射频辉光放电等离子体处理仪(自制),13.56 MHz;ESCALAB Mk II 型 X 射线光电子能谱仪(英国 VG 公司);激发源为 MgK $\alpha$ ;XL 30 FEG 型扫描电镜(荷兰 Philips 公司);样品经喷金后观察;OCA15 接触角测定仪(德国 Dataphysics 公司),以二次蒸馏水为测定相;采用 ZEISS Axiovert 25 倒置显微镜(德国)观察经固定、染色后的细胞形态。

### 1.2 PHBV 薄膜的制备

称取经充分干燥的 0.125 g PHBV 粉料,加入 12.5 mL 三氯甲烷,充分溶解,溶剂挥发后成膜,室温下真空干燥 2 d(压力 1.33 KPa)。将 PHBV 薄膜先后在丙酮、乙醇中振荡清洗 20 min,晾干后,室温下真

2005-02-27 收稿,2005-05-15 修回

国家自然科学基金资助项目(50272021,59932050)、“八六三”项目(2003AA205053),中国博士后科学基金资助项目(2003033035),广东省十五重大科技专项资助项目(A0302020202,2003A1070102),广东省自然科学基金博士科研启动基金资助项目(04300428),华南理工大学自然科学基金项目(E5324298)

通讯联系人:王迎军,女,1954 年生,博士,教授;E-mail:wluling3@yahoo.com.cn;研究方向:生物医用材料

空干燥 1 d (压力 1.33 kPa) 备用。

1.3 PHBV 薄膜的氧等离子体处理

将 PHBV 薄膜置于等离子体处理仪的反应室中央,抽真空,并用氧气置换 3 次,用进气控制系统调节氧气进气流量,使反应室内压力达 40 Pa,稳定后,接通冷却水,调节射频电源至 100 W,放电处理 2 min。处理完毕后,取出样品。

1.4 PHBV 薄膜的水解

将 3 cm × 3 cm 的 PHBV 薄膜放入 50 mL 1 mol/L 的 NaOH 溶液中,置于 60 °C 水浴中加热 1 h。反应完成后,将薄膜取出,用去离子水反复冲洗至中性,晾干后室温下真空干燥 2 d 备用。

1.5 细胞形态学观察

将 PHBV 薄膜剪成 1.5 cm × 1 cm 的小片,紫外线(UV)消毒,无菌磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 3 次,置于 12 孔培养皿底部。将第 3 ~ 4 代犬骨髓基质干细胞制成细胞悬液,接种于 PHBV 薄膜上,置于 37 °C、 $\alpha$ (CO<sub>2</sub>)为 5% 的培养箱中培养。培养 1 周后固定,苏木素与伊红对比染色(HE 染色)。

2 结果与讨论

图 1 为 PHBV 处理前后的 XPS 谱图。图中可见,PHBV 表面主要为 C、O 元素,结合能 285 eV 附近为 C 元素的 1s 峰,533 eV 附近为 O 元素的 1s 峰。经改性处理后的 PHBV 薄膜表面 O 峰显著增高。

由定量分析结果(见表 1)可以看出,经等离子体和水解处理后 PHBV 薄膜表面的 O 含量显著增多,而 C 含量则降低,O/C 比相应增加,表明均有氧元素被引入到材料表面。在氧等离子体处理过程中,含氧活性粒子通过对材料表面的轰击并发生旧键断裂和新键生成而引入,同时还引入少量氮,这是

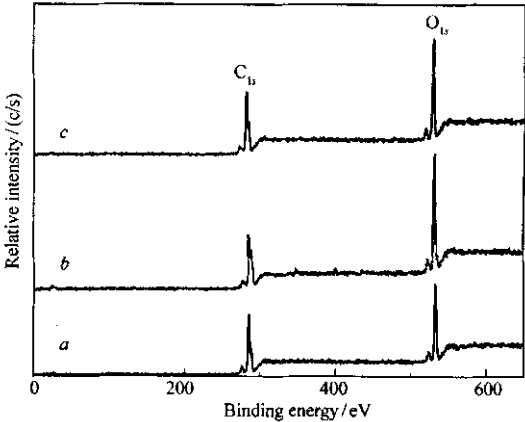


图 1 PHBV 薄膜表面处理前后的 XPS 谱图

Fig. 1 XPS of surface of PHBV films before

and after modification

a. PHBV before modification ;

b. PHBV after O<sub>2</sub> plasma treatment ( 100 W /40 Pa 2min ) ;

c. PHBV after hydrolysis( 1 mol/L NaOH 60 °C 1 h )

表 1 水解前后 PHBV 表面的元素含量分析

Table 1 Element contents of surfaces of PHBV films before and after modification

	Element content/%			
	C	O	N	O/C
Untreated PHBV	69.4	30.6	—	0.440
PHBV after O <sub>2</sub> plasma treatment	61.2	35.9	2.9	0.587
PHBV after hydrolysis	66.9	33.1	—	0.494

活性位点与空气中的氮发生作用的结果。等离子体

处理后氧含量的增加较水解方法更加显著,O/C 比值也更大。在水解过程中 PHBV 中的酯键在 OH<sup>-</sup> 的进攻下发生水解,引入水中的氧,水解后的氧含量由 30.6% 增加至 33.1%。

从 C<sub>1s</sub> 的曲线拟合谱(图 2)可看到,C<sub>1s</sub> 峰经拟合得到 3 个组分,其中 284.6 eV 处的峰归属于 C—C,286 eV 附近的峰由 C—O 产生,而 288.6 eV 附近的峰则对应于 COO 键(酯键 COOR 和羧基 COOH)。比较图 2a 和图 2b、2c 可见,C 元素的化学状态发生了一定程度的变化,结合表 2 所示的各峰位置及所占相对比例大小,可以看到经等离子体和水解处理后位于 284.6 eV 处的 C—C 峰的峰面积均有所减小,而 286.0 eV 附近的 C—O 峰则有不同表现,经氧等离子体处理后减小为 24.6%,而经水解后则由 26.1% 增大至 27.2%,归属于 COO 键的峰则均增大,但经氧等离子体处理后该峰的增大更为显著。

等离子体中存在电子、离子、自由基等活性粒子,它们对 PHBV 薄膜表面的轰击会导致旧键的断裂和新键的生成,如 C—C、C—O 键发生了一定程度的断裂,而生成较多的 COO 键。因此,经氧等离子体处理后归属于 C—C、C—O 的峰分别降低 3.5% 和 1.5%,而 COO 峰则增加(表 2)。在水解过程中,由于 OH<sup>-</sup> 的进攻,PHBV 表面的酯键发生断裂,288.6 eV 附近 COO 峰的变化实际上包含了酯键的减少和

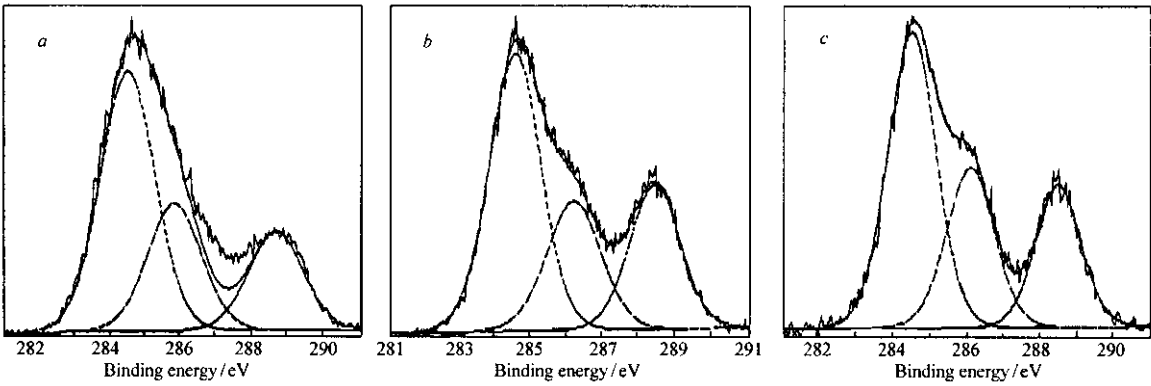


图 2 改性处理前后 PHBV 表面的 C<sub>1s</sub> 谱

Fig. 2 C<sub>1s</sub> spectra of surfaces of unmodified and modified PHBV films

*a, b, c* see Fig. 1

羧基的增加,由于水解生成的亲水端基羧基和羟基(不同于原本蜷缩在 高分子链中间的酯键)易于伸出到 PHBV 表面,从而导致表面羧基和羟基(C—OH)峰增加,而 C—C 所占的比例则有所下降。

表 2 处理前后 C<sub>1s</sub> 谱中对应的各峰强度相对大小

Table 2 Relatively intensity of each peak in C<sub>1s</sub> spectra before and after modification

Peak value/eV	Possible element state	Untreated PHBV	PHBV after O <sub>2</sub> plasma treatment	PHBV after hydrolysis
284.6	C—C/%	53.5	50.0	50.2
286.0	C—O/%	26.1	24.6	27.2
288.6	COO( COOR or COOH )/%	20.4	25.4	22.6

改性前后 PHBV 薄膜表面的 SEM 照片示于图 3,处理前的材料表面(图 3a)存在许多 PHBV 的晶粒突出于薄膜表面,还可看到不少圆孔,是在制膜过程中溶剂挥发后留下的孔穴。经氧等离子体处理后(图 3b)表面形貌没有显著改变,而经 1 mol/L NaOH 在 60 ℃ 水解 1 h 后(图 3c)晶粒已不明显,同时出现不少侵蚀后留下的呈不规则形状的孔洞,此时 PHBV 薄膜已由水解前的半透明变成白色不透明。

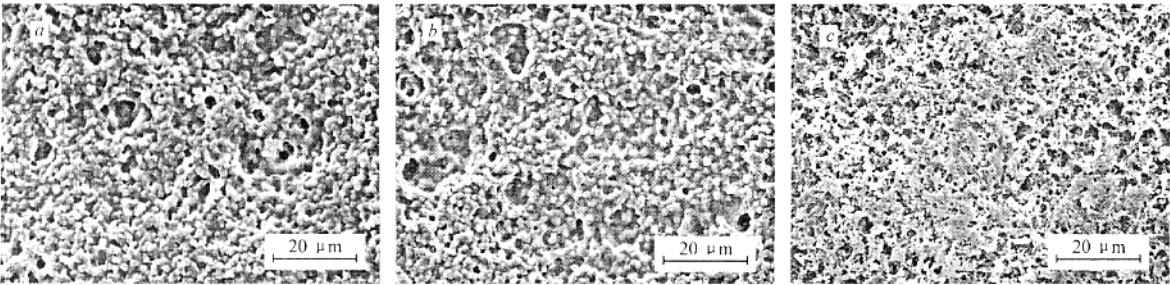


图 3 PHBV 薄膜处理前后的 SEM 照片

Fig. 3 SEM photographs of PHBV films before and after modification

*a.* untreated PHBV ; *b.* after O<sub>2</sub> plasma treatment ( 100 W 40 Pa 2 min ) ; *c.* after hydrolysis ( 1 mol/L NaOH 60 ℃ 1 h )

经氧等离子体处理后,PHBV 表面的水接触角从 75.2°减小到 39.2°,且等离子体作用非常迅速,处理 10 s 后,水接触角就已降低到 52.4°。碱性条件下的水解程度并不能完全反映水解后在 PHBV 表面生成的亲水基团羧基和羟基数量的大小。这是因为在同一条聚合物分子链上可发生多处酯键水解,只有生成的链段的分子量大到一定程度后,才能继续与其它分子链相互缠结而留在材料中,分子量较小的分子链片段则将游离到水溶液中,这样即使水解程度足够大,也难以在 PHBV 表面引入与水解程度相当的羧基和羟基。在 NaOH 溶液中,水解 1 h 的 PHBV 表面水接触角仅从水解前的 75.2°降低到 58.5°。

图 4a ~ 图 4c 所示分别为犬骨髓基质细胞在未经处理的、氧等离子体处理以及水解后的 PHBV 膜上的贴壁形态,可见在经氧等离子体处理后(图 4b)和水解后(图 4c)的膜上细胞增殖要好于未经处理的 PHBV 薄膜,表明亲水性改善后的 PHBV 膜更有利于细胞生长,尤以氧等离子体处理的效果更为显著。

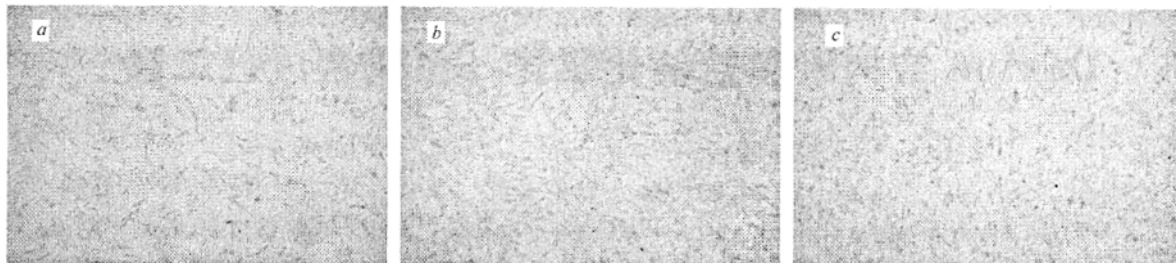


图 4 改性前后 PHBV 薄膜上培养的犬骨髓基质细胞形态

Fig. 4 Cell morphologies of BMSCs cultured on PHBV films before and after modification

a. untreated PHBV film ; b. PHBV after O<sub>2</sub> plasma treatment( 100 W ,40 Pa 2 min ) ; c. PHBV after hydrolysis( 1 mol/L NaOH ,60 °C ,1 h )

参 考 文 献

1 YAO Kang-De( 姚康德 ),YIN Yu-Ji( 尹玉姬 ). Biomaterials Related to Tissue Engineering( 组织工程相关生物材料 ) [ M ] ,1st Edn( 第 1 版 ). Beijing( 北京 ) :Chemical Industry Press( 化学工业出版社 ) 2003 254

2 Thull R. *Materialwiss Werks*[ J ] 2001 **32** 949

3 Peppas N A ,Langer R. *Science*[ J ] ,1994 **263** :1 715

4 Rainer J P ,Bellamkonda R ,Jacob J ,et al. *J Biomed Mater Res*[ J ] ,1993 **27**( 7 ) 917

5 Altankov G ,Groth T. *J Mater Sci Mater Med*[ J ] ,1994 **5** 732

6 Lee J H ,Jung H W ,Kang I K ,et al. *Biomaterials*[ J ] ,1994 **15**( 9 ) 705

7 Curtis A ,Forrester J ,McInnes C ,et al. *J Cell Biology*[ J ] ,1983 **97** :1 500

8 Jinming G ,Laura N ,Robert L. *J Biomed Mater Res*[ J ] ,1998 **42** 417

9 YU Yao-Ting( 俞耀庭 ) ,ZHANG Xing-Dong( 张兴栋 ). Bio-medical Materials( 生物医用材料 ) [ M ] ,1st Edn( 第 1 版 ). Tianjin( 天津 ) :Tianjing University Press( 天津大学出版社 ) 2000 56

10 Gassner F ,Owen A J. *Polym Int*[ J ] ,1996 **39** 215

11 Seal B L ,Otero T C ,Panitch A. *Mater Sci Eng Res*[ J ] 2001 **34** 147

12 YANG Jiar( 杨健 ) ,BEI Jian-Zhong( 贝建中 ) ,WANG Shen-Guo( 王身国 ). *Chin J Repar Reconstr Surgery*( 中国修复重建外科杂志 ) [ J ] 2001 **15**( 5 ) 269

Hydrophilicity Improvement of Polyhydroxyalkanoate Films

LU Ling\* , WANG Ying-Jun , ZHENG Yu-Dong , WU Gang

( Biomaterials Research Institute ,South China University of Technology ,Key Laboratory of Specially Functional Materials and Advanced Manufacturing Technology ,Ministry of Education ,Guangzhou 510641 )

**Abstract** New biopolymer poly( 3-hydroxybutylate-co-hydroxyvalerate ) ( PHBV ) films were treated with oxygen plasma and hydrolyzed under alkaline condition to render them hydrophilicity and cell affinity. The surface composition and elemental chemical state of PHBV films after modification were characterized *via* XPS , while surface morphologies were observed with SEM ,and the growth of bone marrow stromal cells( BMSCs ) on the films were also investigated. It was shown that oxygen contents of PHBV films were increased by 5.3% and 2.5% , water contact angles were reduced by 36° and 16.7° respectively after oxygen plasma treatment and hydrolysis , the results suggested the improvement of surface hydrophilicity. After oxygen plasma treatment , 1.5% C—O bonds and 3.5% C—C bonds cleft and carboxyl bonds were generated , while under alkaline condition the ester bonds in PHBV hydrolyzed to form more hydroxyl and carboxyl bonds. Modified PHBV films were favourable for cell growth , especially the films after oxygen plasma treatment. The results have laid the foundation for further surface modification and preparation of three-dimensional PHBV scaffold with good cell affinity.

**Keywords** PHBV ,O<sub>2</sub> plasma treatment ,hydrolysis ,hydrophilicity