

## p(nBA-DEAEMA)的合成及其作为人工气管内 表面修饰材料的初步研究\*

朱剑<sup>1</sup>,蒋雪梅<sup>1†</sup>,钟军<sup>1</sup>,段翼远<sup>1</sup>,邓林红<sup>1,2</sup>

(1.重庆大学 生物工程学院,重庆 400030; 2.常州大学 生物医学工程与健康科学研究院,江苏 常州 213164)

**摘要:**为制备 p(nBA-DEAEMA)乳液及表面具有纤毛样结构的共聚物膜材料,采用半连续乳液聚合合法合成 p(nBA/DEAEMA)乳液,再用 Velcro 成型工艺将纯化干燥的产物制备成纤毛样膜.采用傅里叶红外光谱(Fourier Transform Infrared Spectrometer, FT-IR)、核磁共振光谱(Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, <sup>1</sup>H NMR)、凝胶色谱(Gel Permeation Chromatography, GPC)、粒径分析、扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)、静态接触角测定、示差扫描量热分析(Differential Scanning Calorimetry, DSC)及力学分析对材料进行详细表征.最后用浸提液实验对材料的生物安全性进行了初步评价.结果显示:FT-IR 和 <sup>1</sup>H NMR 表明目标产物结构正确.共聚物乳液的多分散系数(polydispersity, PDI)为 0.385,平均粒径(Z-average)为 46.48 nm. DSC 结果显示共聚物的玻璃化温度(glass transition temperature,  $T_g$ )和粘流温度(viscous flow temperature,  $T_f$ )分别为 33.2 °C 和 47.7 °C.纤毛样膜对水的接触角为 102.3°,表面自由能 13.81 J·m<sup>2</sup>. SEM 结果显示共聚物粒子大小为 40~50 nm,纤毛样层高度为 5~10 μm.细胞实验结果显示材料对大鼠气道上皮细胞(bronchial epithelial cells, BECs)具有可接受的生物安全性.

**关键词:**p(nBA-DEAEMA);乳液;纳米粒子;膜材料;生物安全性

**中图分类号:**TB 332

**文献标志码:**A

## Preparation of p(nBA/DEAEMA) Copolymer Brushes and Its Feasibility Study as Surface Modification for Inner Face of Artificial Trachea

ZHU Jian<sup>1</sup>, JIANG Xuemei<sup>1†</sup>, ZHONG Jun<sup>1</sup>, DUAN Yiyuan<sup>1</sup>, DENG Linhong<sup>1,2</sup>

(1. Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400030, China;

2. Institute of Biomedical Engineering and Health Sciences, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

**Abstract:** p(nBA/DEAEMA) nanoparticles of emulsion and polymeric cilia-like membranes were prepared. Two monomers of n-butyl acrylate (nBA) and 2-(diethylaminoethyl methacrylate) (DEAEMA) were polymerized by semi continuous emulsion polymerization method, and the cilia-like membranes were prepared by attaching a Velcro-like surface to partially coalesced films. Subsequently, the prepared

\* 收稿日期:2016-12-19

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31400805, 11532003, 31670950), National Natural Science Foundation of China(31400805, 11532003, 31670950);江苏省自然科学基金资助项目(BK20151186), Natural Science Foundation of Jiangsu Province(BK20151186);中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(106112017CDJQJ238815), Fundamental Research Funds for the Central Universities(106112017CDJQJ238815)

**作者简介:**朱剑(1987—),女,四川万源人,重庆大学博士研究生

**†通信联系人,**E-mail: jianxuemei@cqu.edu.cn

materials were characterized by FT-IR,<sup>1</sup>HNMR, GPC, SEM, DSC combined with particle size analysis, static contact angle measurements and mechanical analysis. Finally, BECs from SD rats were used to characterize the biosecurity of the material. Correct structure of copolymer was also confirmed by FT-IR and <sup>1</sup>HNMR. The particle size analysis of the copolymer emulsion was PDI 0.385 and Z-average was 46.48 nm, while  $T_g$  and  $T_f$  for copolymer was 33.2°C and 47.7°C, respectively. The contact angle of polymeric films was 102.3° with water, and the surface free energy was 13.81 J · m<sup>2</sup>. Meanwhile, SEM photos showed the size of particles was 40 to 50 nm, and the height of cilia-like layer was about 5 to 10 μm. The biosecurity of this material was eventually verified by cell experiments. The copolymer cilia-like membranes can be used as a surface modification material for artificial trachea.

**Key words:** p(nBA-DEAEMA); copolymer emulsion; nanoparticles; cilia-like membrane; biosecurity

纤毛是存在于很多生物体器官如气管等表面的一种毛发状结构,可分为原纤毛和运动纤毛,它们承担着大量的生理功能,如保护器官感知周围其他物种、应对周边环境的物理化学变化等.气管内的纤毛更是在清除气道灰尘、细菌等废物上起着重要的作用<sup>[1]</sup>.目前针对气管缺损的重建气管依然不具有功能活性的很大原因是由于其内表面上没有类似纤毛状的结构<sup>[2-3]</sup>.为了解决这一问题,研究者在气管上皮组织重建的研究中越来越关注纤毛层的存在及其功能化.个别研究报道在直接培养的组织细胞表面可以形成自然生长的纤毛,但这类型纤毛尚不具备输运物质如气道废物的能力<sup>[4]</sup>.另一方面,过去几十年里刺激响应型聚合物材料与生物系统的相似性及其在仿生物系统中的应用已被越来越多地证实<sup>[5]</sup>.得益于微观生物力学的发展,自然界中运动型纤毛诸多优异的性质陆续被展示在人们面前,特别是其对于微流体的控制处理能力,使得研究工作者们开发出了很多类型的仿生纤毛<sup>[6-10]</sup>.鉴于上述研究,若能将高分子材料和人工纤毛的研究结合起来,对某种聚合物材料进行合理的分子设计和成型工艺研究,开发出一种与自然生物纤毛系统高度相似并具有优良理化及力学性质的聚合物材料,这种复合型材料或许有助于解决重建气管移植物功能性的问题.

为此,本文选取丙烯酸正丁酯(nBA)和甲基丙烯酸二乙胺基乙酯(DEAEMA)两种单体采用半连续乳液聚合的方法共聚合成了纳米粒子乳液,并通过适当的成型加工工艺将其制备成表面具有纤毛刷样结构的膜材料.为检验所得的膜材料是否真正制备成功,其性能是否满足作为生物材料的基本要求,我们分别采用 FT-IR、<sup>1</sup>HNMR、GPC、粒径分析、SEM、静态接触角测定、热分析及力学分析手段

对材料的物理化学性质进行了详细表征,最后还对材料的生物安全性进行了初步评价,这些检测和表征结果为材料的后续应用提供了科学的基础参数.

## 1 实验材料和方法

### 1.1 主要实验试剂

nBA、DEAEMA、十六烷基三甲基氯化铵(25%)(CTAC)、标准 NaOH 和 HCl 均为分析纯试剂,购于 Aldrich 公司.偶氮二异丁腈(>98%+) (AIBN,分析纯)和氘代二甲基亚砷(试剂纯)分别购于 Adamas 公司和 Sigma 公司.其他细胞实验所用试剂均购于 Sigma 公司.

SD 大鼠气道上皮细胞的分离、纯化与鉴定参照本研究室前期相关研究<sup>[11]</sup>.

### 1.2 主要实验仪器

蠕动泵(Masterflex,美国 Masterflex), FT-IR (MAGNA IR 560,美国 Nicolet), <sup>1</sup>HNMR(Ultra Shield400,瑞士布鲁克光谱仪器公司), DSC 分析仪(DSC200PC,德国耐池),凝胶渗透色谱仪(7890A/5975C,Agilent), SEM(JSM-5900LV,日本电子株式会社),纳米激光粒度仪(Nano-ZS,英国 Malvern),视频接触角测量仪(OCAHZOO,德国 Dataphysics),冷冻干燥机(SC21CL,北京博医康实验仪器有限公司),电子拉力机(AI-7000S,高铁科技股份有限公司),流式细胞仪(BD(Verse),美国),光学磁微粒扭转细胞测量系统(EDL Eberhard,美国).

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 共聚物的合成<sup>[12]</sup>

制备单体预乳化液:室温条件下,向一干净三颈瓶中预先加入 25 mL 蒸馏水,通入氮气(0.2

MPa),称取一定量的 CTAC,DEAEMA 和 nBA,按照该顺序先后将上述 3 种物质分别缓慢滴加到三颈瓶里,边搅拌边滴加,控制搅拌时间以保证预乳化完全.

共聚反应:室温条件下向单体预乳化液中加入一定量的 AIBN,继续搅拌 1 h.73 °C 条件下,向另一干净四颈瓶中加入 27 mL 蒸馏水,通入氮气(0.2 MPa),安装固定好冷凝管和搅拌装置.将制备好的预乳化液转移到烧杯中,用蠕动泵将其缓慢泵入四颈瓶中,控制泵入速率.滴加结束后继续搅拌反应 3 h,调节 pH 值,冷却出料.

### 1.3.2 纤毛样膜材料的制备

纤毛样聚合物膜材料的制备参照尼龙维克牢的成型工艺执行<sup>[13]</sup>,将共聚所得的胶体悬液直接流平到干燥的聚四氟乙烯基底上,室温条件下控制环境相对湿度为 45%,按照 80  $\mu\text{m} \times 10 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$  的规格成型,成型过程中控制温度、蒸汽压及光线照射.样品制备好后,待测.

### 1.3.3 共聚物纳米粒子及膜材料的理化性质表征

分别用 FT-IR,<sup>1</sup>HNMR, GPC, SEM, DSC, 激光粒径分析仪、接触角分析仪及材料拉伸试验仪等对共聚物纳米粒子和膜材料进行了合适的分析表征.

### 1.3.4 共聚物材料对 BECs 生物学行为的影响研究

由于预实验结果显示该共聚物具有降解惰性且细胞不能直接粘附在纤毛样膜材料表面,所以采用浸提液试验对材料的体外细胞毒性进行考察,浸提液(polymer material's culture extract, PMCE)的制备参照 GB/T16886.5-2003/ISO 10993-5:1999 执行.而后考察了 BECs 经不同时间梯度的 PMCE 作用后的细胞活性、群体迁移能力、粘附能力、内源性凋亡及细胞刚度的变化表征.

## 2 结果和分析

### 2.1 FT-IR 分析

图 1 是单体及合成的均聚物和共聚物的红外光谱图.图谱中的特征峰归属分析如下:1 350~1 500  $\text{cm}^{-1}$  区域内均为  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  中 C-H 的变形伸缩振动峰;1 567.61  $\text{cm}^{-1}$  处为 C-N 的伸缩振动峰;1 694.00  $\text{cm}^{-1}$  和 1 671.88  $\text{cm}^{-1}$  处均为 C=C 的伸缩振动峰;1 732.43  $\text{cm}^{-1}$  和 1 729.00  $\text{cm}^{-1}$  处为酯基的伸缩振动峰;2 850.84  $\text{cm}^{-1}$  处为  $\text{CH}_2$  的对称伸缩振动峰;2 875.13  $\text{cm}^{-1}$  处为  $\text{CH}_3$  的对称伸缩振动峰;2 919.20  $\text{cm}^{-1}$  为  $\text{CH}_2$  的不对称伸缩振动峰;

2 960.02  $\text{cm}^{-1}$  处为  $\text{CH}_3$  的不对称伸缩振动峰.共聚物的红外图谱中,2 850~3 000  $\text{cm}^{-1}$  和 1 350~1 500  $\text{cm}^{-1}$  区域的峰值来自 C-H 的伸缩振动和甲基- $\text{CH}_3$ 、次甲基- $\text{CH}_2$  的变形振动重叠而成的多重吸收峰,1 732  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰代表了羧基酯的特征吸收峰.正如所预期,1 568  $\text{cm}^{-1}$  处的特征吸收峰及 1 670~1 690  $\text{cm}^{-1}$  处 C=C 伸缩振动吸收峰的消失则证实了共聚的发生.由此认为聚合物材料的制备合成是成功的.

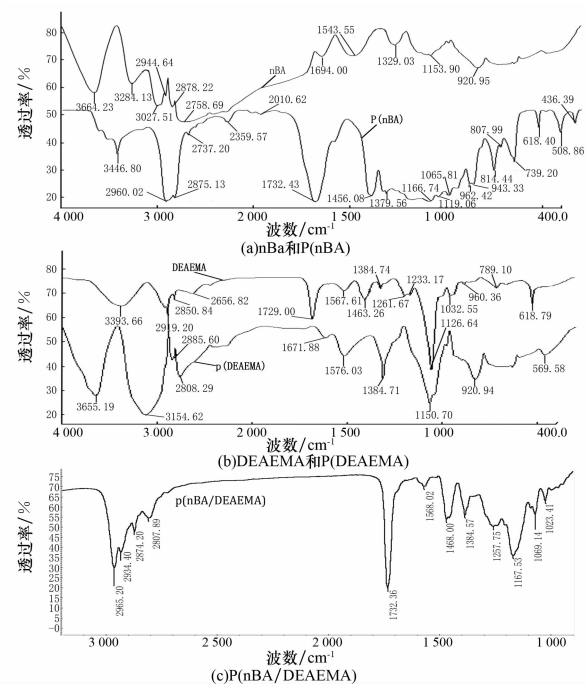


图 1 单体、均聚物及共聚物的红外光谱图  
Fig.1 Infrared spectrum of monomer, homopolymer and copolymer

### 2.2 <sup>1</sup>HNMR 分析

图 2 为本文中制备的共聚物的<sup>1</sup>HNMR 图谱.此图谱中的特征峰归属分析如下:室温条件下,带有肩峰的 0.85 ppm 处的特征峰属于- $\text{CH}_2-\text{CH}_3$  官能团,3.9~4.1 ppm 处的特征峰属于- $\text{O}-\text{CH}_2$  官能团,这两处特征峰是共聚物中来自 nBA 的单元产生的.1.0 ppm 处的来自于- $\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$  的特征峰、1.2 ppm 处的来自于- $\text{C}-\text{CH}_3$  官能团的特征峰、3.0 ppm 处的来自于- $\text{CH}_2-\text{N}$  的特征峰以及 3.9~4.1 ppm 处来自于- $\text{O}-\text{CH}_2$  的特征峰则都是由共聚物中来自 DEAEMA 的单元产生的.2.5 ppm 处的特征峰是溶解 DMSO 的峰,3.4 ppm 处的特征馒头峰是溶剂 DMSO 中的水产生的峰.这些数据不但更加证实了共聚反应的发生,而且结合两种单体的竞聚率我们可以计算出,得到的共聚物

是共聚率约为 74% 的 DEAEMA 无规共聚 p(nBA/DEAEMA)。同时,由于实验最优条件下单体投料比 nBA/DEAEMA = 0.020/0.016,说明共聚过程中, nBA 和 DEAEMA 两种单体发生的是进料比约为 2:3 的共聚反应。

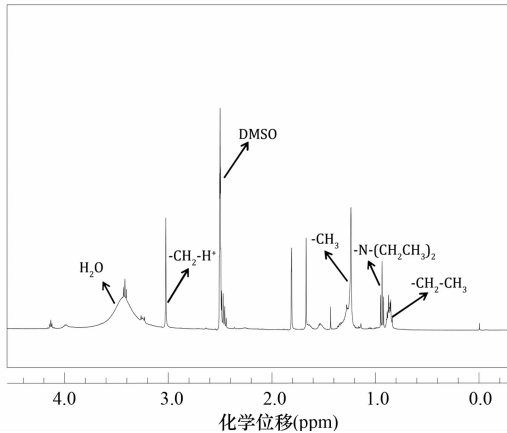


图 2 共聚物的核磁共振氢谱图

Fig.2  $^1\text{H}$ NMR spectra of the copolymer

### 2.3 共聚物分子量的测定

共聚物的分子量分布会直接影响其强度、粘度等性能,因此我们对制备得到的共聚物进行了分子量分布的测定。图 3 显示出文中制备共聚物的重均相对分子质量  $M_w$  为 1 803 289 Daltons,软件计算的各项参数值见表 1。其相对分子质量分布为 1.809 559,这种较宽的相对分子质量分布使得我们在合成的共聚物分子量很大的前提下,后期制备共聚物刷纤毛样膜的成型工艺中能够同时兼顾到其力学性能和加工性能,这也说明得到共聚物在相对分子质量分布上是令人满意的。

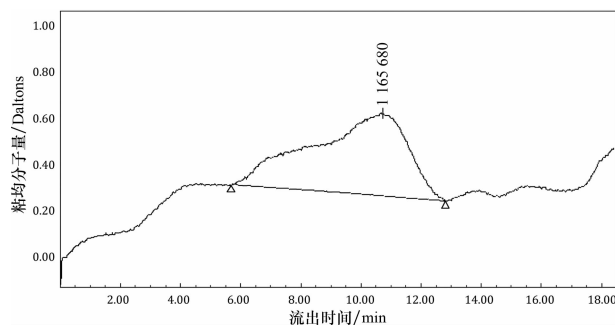


图 3 共聚物相对分子质量的 GPC 图谱

Fig. 3 GPC spectrum of the copolymer's molecular weight

表 1 共聚物相对分子质量的测定参数

Tab.1 The parameters of the copolymer's molecular weight					
$M_n$ (Daltons)	$M_w$ (Daltons)	$M_p$ (Daltons)	$M_z$ (Daltons)	Polydispersity	$M_z/M_w$
996 365	1 803 289	1 165 680	2 803 848	1.809 559	1.554 852

### 2.4 共聚物悬浮液的粒径分析

聚合物悬浮液的粒径及其分布作为其重要性指标之一,对聚合物最终的使用特别是成膜性能影响重大。研究表明<sup>[14]</sup>,粒子直径越小、粒径分布越宽,生成的聚合物膜致密度越高。本文中得到的共聚物悬浮液外观如图 4(a)所示,呈现半透明状态,根据以水为载体的聚合物悬浮液粒径大小与液体颜色之间的定性关系<sup>[15]</sup>,我们推测本文中聚合物悬浮液的粒子粒径大小在 100 nm 以下。

由于所选单体 DEAEMA 的特殊性,其分子侧链末端还带有叔氨基,因此理论上能够表现出对环境 pH 值变化的敏感,而其与  $\text{H}^+$  结合的程度也会影响乳液粒子的粒径大小,所以我们对共聚物乳液粒子粒径对 pH 值变化的反应性质做了初步研究(图 4(b))。结果显示共聚物乳液粒子的粒径对环境 pH 值的改变呈现出随 pH 值升高粒径先增大后减小的现象,在 pH=3 时粒径最大,pH=12 时粒径最小,两者相差了 26.4%,而 pH=6~10 之间的乳液粒子粒径则相差不大。这可能是因为合成的共聚物因为空间构型的影响,能结合的  $\text{H}^+$  的数量存在一定范围,在过酸( $\text{H}^+$  过多)或过碱( $\text{H}^+$  过少)环境中都不能充分地与  $\text{H}^+$  结合,因此在 pH=3 时结合最多的  $\text{H}^+$ ,整个分子的侧链因为受到最强的静电排斥作用而呈现出最佳的伸展状态,达到粒子粒径的最大。

图 4(c)为采用激光粒度仪在 pH=7 的条件下定量测定两种均聚物及共聚物的粒径分布情况的结果,纵坐标为测定结果中的光强度值。从图中可以看到,不管是均聚物乳液还是共聚物乳液,粒径分布的均一性都较好,p(nBA),p(DEAEMA)及 p(nBA/DEAEMA)三者的 PDI 分别为 0.451,0.207 和 0.385,其 Z-Average 分别为 44.24 nm,1 797 nm 和 46.48 nm。可见,共聚物乳液粒子的粒径与 p(nBA)均聚物乳液粒子的粒径较为相近,但 p(DEAEMA)均聚物乳液粒子的粒径则比前两者大出接近 36 倍,排除相同合成工艺因素的影响,这可能是由于 DEAEMA 这种单体的相对分子质量比 nBA 的相对分子质量大得多,相同质量的单体合成的均聚物的相对分子质量就更大,而粒径大小  $R_h$  与相对分子质量之间的关系为: $R_h = kM^a$ ,即相对分子质量越大,粒径就越大,因此造成均聚物 p(DEAEMA)的粒径比其他两种聚合物的粒径大得多。

就聚合物本身来看,粒子粒径小而比表面积增大,在成膜后不仅能使膜更致密而且还能增大粘液

与其接触的面积,在受到力学刺激时就能消耗更多的能量,产生更多有效的力学行为.

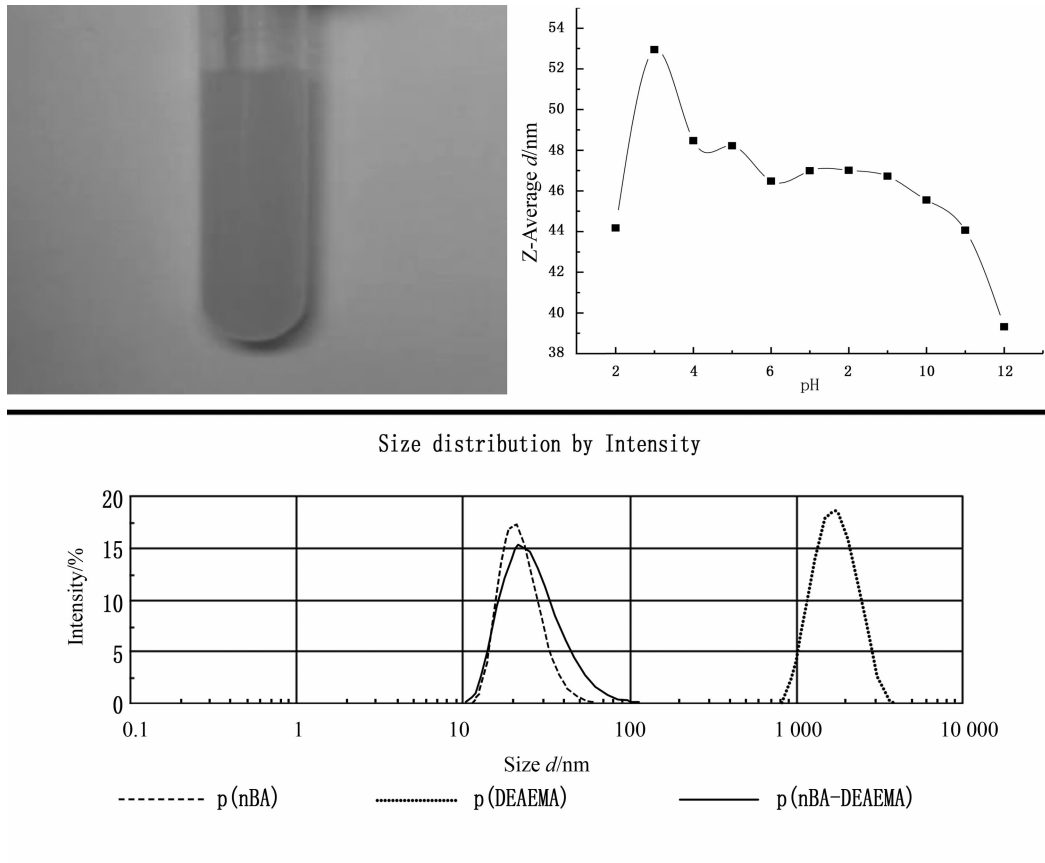
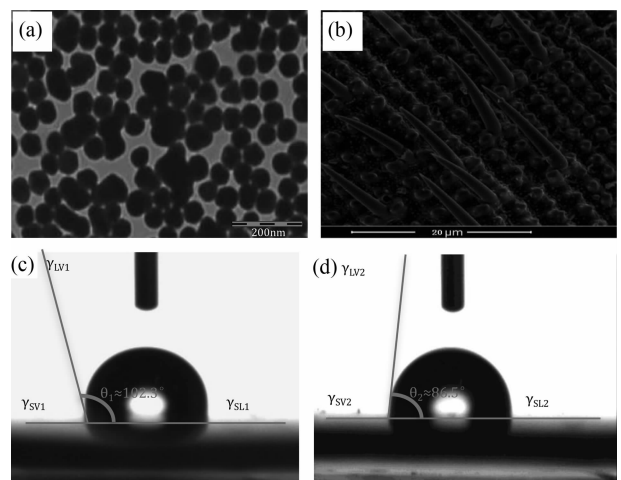


图4 共聚物悬浮液的粒径分析结果  
Fig.4 Particle size analysis results of the copolymer

### 2.5 SEM 和膜材料的接触角分析

图 5(a)和 5(b)是共聚物乳液粒子及膜材料表面的扫描电镜图.从图中可以看出,共聚物乳液粒子的直径在 40~50 nm 左右,这与前面粒径测试的结果一致.膜材料表面上形成的纤毛样结构高度约为 5~10  $\mu\text{m}$ ,这与 3~7  $\mu\text{m}$  的人体气道纤毛相比,尺寸大小相似.因此,将该膜材料作为人工气管内表面修饰材料代替实现气道纤毛的模拟存在拓扑学上的可能.图 5(c)和 5(d)表示了水和乙二醇两种测试液在纤毛样膜材料表面的接触角测定结果.通过计算可以得到,材料的表面自由能为 13.81  $\text{J} \cdot \text{m}^2$ .这种较为疏水的特性能形成一定的水屏障效应,有利于蛋白质吸附,且在生理环境中大部分蛋白都带有负电荷,而本文中制备的材料表面带有一定数量的正电荷,因此还会发生静电吸引作用而建立起离子键,这种吸附作用能帮助材料获得更好的生物相容性.



(a) 共聚物乳液纳米粒子电镜图; (b) 纤毛样膜材料表面电镜图;  
(c) 纤毛样膜材料的接触角测定结果(测试液:水);  
(d) 纤毛样膜材料的接触角测定结果(测试液:乙二醇)

图5 共聚物乳液纳米粒子和纤毛样膜材料表面的电镜图及膜材料的接触角测试图

Fig.5 SEM images of copolymer nanoparticles and cilia-like film (a and b) and the diagram of polymer film's contact angle with different detection liquids (c: water; d: glycol)

## 2.6 DSC 分析

本文合成的共聚物最终有望作为一种生物材料应用于生物体内,因此为了排除其可能在室温(25 °C)和体温(37 °C)两种温度环境下发生明显的性质改变,对其进行热分析是很有必要的.图 6 是合成的共聚物的 DSC 曲线,可以看出,共聚物的热分解温度为 47.7 °C,远高于生理温度,因此可以预见若将该材料在生理温度(37 °C)下使用,材料是能够保持其热稳定性的.

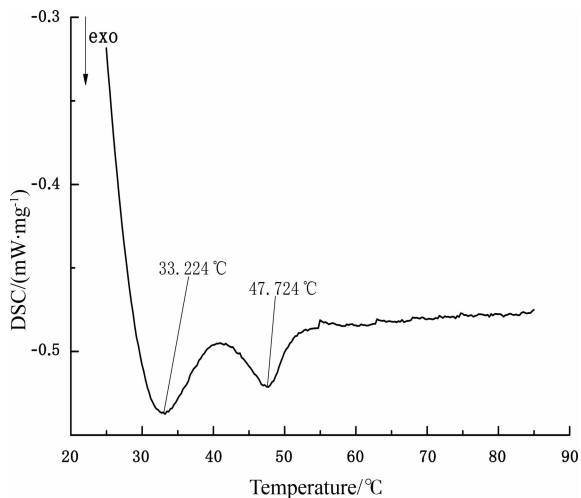


图 6 共聚物的 DSC 谱图

Fig. 6 The DSC spectra of copolymer

## 2.7 纤毛样共聚物膜材料的力学性能分析

作为人工气管内壁的涂覆修饰材料,与气管替代物一起被放置在受体体内,经常会受到交变压力、弯曲、扭曲等各种外力的作用,若材料力学性能不佳,会在植入后发生一些不可逆转的损坏,给患者造成很大痛苦甚至威胁生命.因此,本文也对膜材料的力学性能进行了初步表征.表 2 是所得的力学性能参数.从表 2 可以看出,制备所得的膜材料抗张强度达到 1.41MPa,断裂伸长率为 134.73%.

表 2 纤毛样共聚物膜的力学性能

Tab.2 The mechanical properties of the cilia-like copolymer film

Tensile strength	Elongation at break
1.41±0.16 MPa	134.73±3.15%

## 2.8 BECs 经 PMCE 作用后的生物学行为表征

各项检测结果如图 7 所示.从图中可以看出,MTT 测试和 LDH 测试的结果一致,得到的聚合物材料的毒性为 1 级,作为生物医用材料应用,其毒性在可接受范围内.受试细胞受不同时间梯度 PMCE 作用后,对其群体迁移和侧向迁移能力有一定程度

的抑制,但随着浸提时间的增加,细胞受浸提液作用后的迁移能力又会出现一定程度的回升,这说明 PMCE 对细胞迁移能力的抑制是有时间范畴的.测试细胞在不同时间梯度 PMCE 作用下,实验组细胞与空白对照组细胞的粘附能力表现出显著性差异,这表明文中制得的 PMCE 对实验细胞的粘附存在着不可忽略的影响,且最终细胞的粘附率稳定维持在 74%左右的水平,与对照组细胞相比,粘附能力下降了 18.1%.这表明细胞的该项能力与其群体迁移能力变化的情况类似,细胞对长时间梯度的 PMCE 能表现出一定的适应性,即后期细胞粘附能力基本不再发生显著性的变化,具有一定的时间范畴.经 48 h 脱血清饥饿处理以诱导实验细胞内源性凋亡以后,空白对照组与所有实验组之间晚期凋亡的细胞比例存在显著性差异,且所有实验组细胞的凋亡率均低于对照组细胞,实验组之间凋亡率的变化趋势呈现随 PMCE 时间增加而先降低后又缓慢回升的现象,受 15 dPMCE 作用的细胞组凋亡率最低,达到 2%左右,而后受 30 dPMCE 作用的细胞组凋亡率又回升到 7.5%左右,这表明本文中合成的聚合物材料的降解产物会显著抑制 SD 大鼠气道上皮细胞的凋亡.测试细胞在不同时间梯度 PMCE 作用下其刚度都呈现降低的趋势,受 30 dPMCE 作用的实验组细胞刚度比对照组细胞降低了 31.4%.就实验组细胞而言,受 20 dPMCE 作用的实验细胞组刚度达到最高,达到 0.8 Pa/nm,与对照组有显著性差异,这表明本文中合成的共聚物降解产物对 SD 大鼠气道上皮细胞的细胞刚度有显著性影响,经其 PMCE 作用后的细胞刚度明显减小.

生物材料与细胞的相互作用中,细胞粘附是基础,这种粘附性质的差异会影响细胞的增殖、迁移、铺展生长等其他细胞行为.细胞在聚合物材料表面的粘附过程大致为<sup>[16]</sup>:首先聚合物通过吸水膨胀作用或表面润湿作用与细胞粘膜紧密接触,接着聚合物链渗入细胞间连接的缝隙,最后他们之间形成一些弱的化学键而产生粘附.结合预实验的研究结果,虽然本文合成的聚合物材料相对分子质量大、膜材料表面张力增大等性质都有利于细胞在其上的粘附,但细胞最终不能直接在纤毛样聚合物膜材料表面粘附,我们对材料细胞毒性的评级结果排除了引起这种不粘附现象的材料毒性的关系,而猜测是材料疏水的纤毛样拓扑结构表面直接阻断了细胞向材料靠近的可能.在实际应用中,这种对细胞靠近粘附阻断的能力使得其作为人工气管内表面修饰材

料时能够阻止邻近组织向重建气管内壁爬行,防止

气道再狭窄的发生.

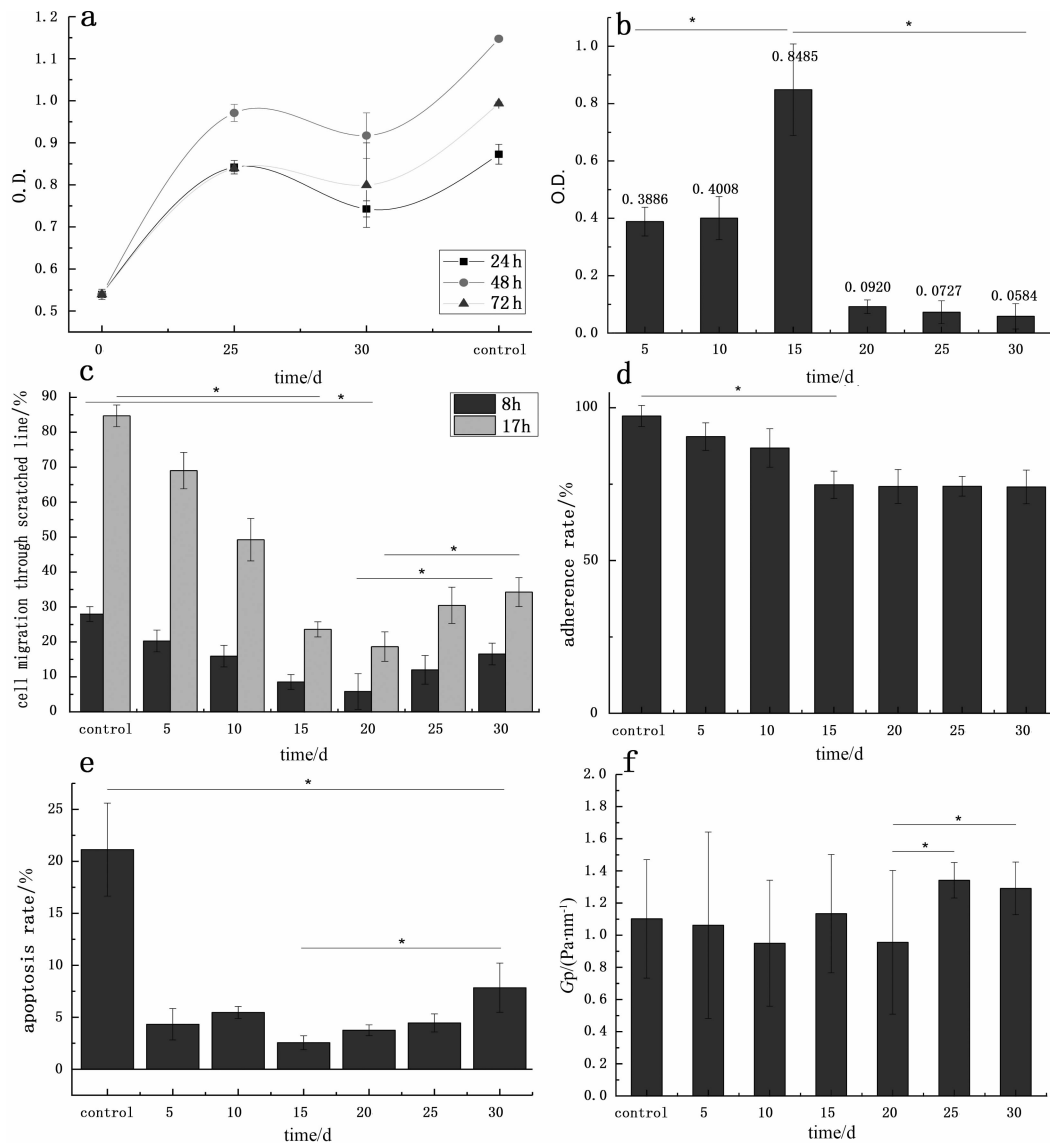


图7 BECs经不同梯度PMCE作用后细胞毒性

(a)MTT增殖检测;(b)LDH毒性检测、迁移能力;(c)粘附能力;(d)细胞凋亡;(e)及细胞刚度;(f)变化

Fig.7 The proliferation (a), cytotoxicity (b), migration ability (c), adhesion ability (d),

apoptosis(e) and stiffness (f) of BECs in different PMCE

对于细胞受材料浸提液中降解产物影响后相关细胞行为变化的研究结果,我们认为其相似的粘附行为和迁移行为的变化结果,是由于疏水性的丙烯酸酯类聚合物主要是以紧密粘附的方式吸附周围的物质<sup>[17]</sup>,而其降解下来的小分子产物可能在细胞膜内外进出,当细胞刚与这些小分子接触时,由于胞外电荷环境等的骤然变化刺激等使得细胞在粘附和迁移行为方面都必须做出应答,这种应答行为中一个重要的方面就是通过结构性的粘附来维持细胞的增殖迁移功能<sup>[18]</sup>,且这种应答的过程是需要一定时间的,因此我们推测,在这段时间过程中,受刺激的细胞粘附和迁移两方面的行为与正常环

境中的细胞相比就会表现出一定的下降,待到应答行为完成,其粘附和迁移行为便不再发生变化甚至不同程度的回升,因此我们得到实验细胞的这两种行为对于材料降解产物的刺激具有一定的时间范畴.而PMCE对BECs的凋亡表现出的显著抑制作用,这对气道具有组织保护作用,从而维护呼吸系统的内环境稳态<sup>[19]</sup>.

已有研究中,越来越多的证据表明,气道疾病发生形成复杂应力场时,上皮细胞组织承受了最大的压力<sup>[20]</sup>,很多研究也都证实了气道上皮细胞在气道炎症发生时能对外界应力产生应答<sup>[21]</sup>.本文中使用方法对SD大鼠气道上皮细胞刚度的测定其实反

映的是细胞内骨架蛋白 F-actin 的表达,而实验组细胞刚度发生了显著性的减小,我们推测材料降解产生的小分子物质在进出细胞膜的过程中影响了细胞骨架正常状态下的预应力状态<sup>[22]</sup>,造成了初期细胞刚度的显著下降,但随后细胞产生的应答机制又使细胞自我调整了骨架重构的状态,最终达到平衡,出现刚度稳定的状态。

### 3 结 论

本文针对人工气管内表面纤毛上皮缺失的问题,以研究背景成熟深入且生物相容性较好的 nBA 和 DEAEMA 作为研究对象制备出了一种表面具有纤毛样结构的纤毛样共聚物膜材料,对材料从化学组成、分子结构、理化性质 3 个方面进行了研究,提示了该材料在人工气管内表面修饰材料领域应用的可行性。得到的主要结论如下:

1)合成的共聚物是一种超高分子量聚合物,其粒径分布特征也为膜材料制备提供了理论基础,而共聚物膜材料的疏水性、与人体气道纤毛长度相近的纤毛样层高度及优良的力学性能都证明了材料在人工气管内表面修饰材料领域的应用可能,特别是 FT-IR 和<sup>1</sup>H NMR 的详细分析结果更是从分子组成结构层面共同证实了聚合的发生及目标产物的结构正确性。

2)共聚物的热稳定性和细胞安全性都表明了共聚物作为生物材料应用的可行性,这种生物相容性的考察拓宽了丙烯酸酯类聚合物在传统的眼科、牙科及药物缓释材料中的应用,为人工气管功能化奠定了基础。

因此,无论从理化性质、拓扑结构和生物安全性的衡量上看,该膜材料很有可能作为一种人工气管内表面的修饰材料以代替实现气道纤毛的模拟存在甚至物质输运功能。

### 参 考 文 献

- [1] VOGEL Gretchen. News focus: Betting on cilia[J]. *Science*, 2005, 310(5746): 216—218.
- [2] SATOH S, EISTRODT J, HINRICHS WL, *et al.* Tissue engineered prefabricated vascularized flaps [J]. *Head & Neck*, 2007, 29(5): 458—464.
- [3] SATOH S, EISTRODT J, HINRICHS WL, *et al.* Prevention of infection in a porous tracheal prosthesis by omental wrapping[J]. *Asaio Transactions*, 1990, 36(3): 438—440.
- [4] KOMURA Makoto, KOMURA Hiroko, KANAMORI Yutaka, *et al.* An animal model study for tissue-engineered trachea fabricated from a biodegradable scaffold using chondrocytes to augment repair of tracheal stenosis[J]. *Journal of Pediatric Surgery*, 2008, 43(12): 2141—2146.
- [5] URBAN Marek W. Stratification, stimuli-responsiveness, self-healing, and signaling in polymer networks[J]. *Progress in Polymer Science*, 2009, 34(8): 679—687.
- [6] TOONDER Jaap Den, BOS Femke, BROER Dick, *et al.* Artificial cilia for active micro-fluidic mixing [J]. *Lab on a Chip*, 2008, 8(4): 501—632.
- [7] KHADERI Syed, HUSSONG Jeanette, WESTERWEEIL Jerry, *et al.* Fluid propulsion using magnetically-actuated artificial cilia-experiments and simulations [J]. *The Royal Society of Chemistry*, 2013, 3(31): 12735—12742.
- [8] OOSTEN Casper L, BASTIAANSEN Cees W, BROER Dirk J. Printed artificial cilia from liquid-crystal network actuators modularly driven by light [J]. *Nature Materials*, 2009, 8(8): 677—682.
- [9] ZARZAR Lauren D, KIM Philseok, AIZENBERG Joanna. Bio-inspired design of submerged hydrogel-actuated polymer microstructures operating in response to pH [J]. *Advanced Materials*, 2011, 23(12): 1442—1446.
- [10] VOLDER Michael De, PARK S, TAWFICK Sameh, *et al.* Stain-engineered manufacturing of freeform carbon nanotube microstructures [J]. *Nature Communications*, 2014(5): 4512.
- [11] 樊磊磊. 压力对共培养上皮细胞下的气道平滑肌细胞影响的研究[D]. 重庆:重庆大学生物工程学院, 2010: 14—20.  
FAN Leilei. A study on the effects of pressure force on airway smooth muscle cells via co-cultured epithelial cells [D]. Chongqing: College of Bioengineering, Chongqing University, 2010: 14—20. (In Chinese)
- [12] OVANDO-MEDINA Victor M, PERALTA Rene D, MENDIZABAL Eduardo. Semicontinuous microemulsion copolymerization of vinyl acetate and butyl acrylate: high solid content and effect of monomer addition rate [J]. *Colloid and Polymer Science*, 2009, 287(5): 561—568.
- [13] HIPPMANN Sophie, HEIN Christoph, HOFFMANN Hartmut. Correlation between the adhesive tensile strength and the engagement grade of crosswise oriented nonwovens of metal hook and loop fasteners [J]. *Production Engineering*, 2008, 2(4): 395—400.
- [14] VISSCHERS Marcel, LAVEN Jozua, GERMAN Anton L. Current understanding of the deformation of latex particles during film formation [J]. *Progress in Organic Coatings*, 1997, 30(1/2): 39—49.
- [15] TADROS Tharwat, IZQUIERDO P, ESQUENA J, *et al.* Formation and stability of nano-emulsions [J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2004, 108/109(10): 303—318.
- [16] YANG Dayun, LU Xiaoying, HONG Ying, *et al.* The molecular mechanism of mediation of adsorbed serum proteins to endothelial cells adhesion and growth on biomaterials [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(23): 5747—5758.
- [17] JOHNSTON Robert L, SPALTON David J, HUSSAIN Ali, *et al.* In vitro protein adsorption to 2 intraocular lens materials [J]. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 1999, 25(8): 1109—1115.
- [18] XIANG Yang, TAN Yurong, ZHANG Jiansong, *et al.* Wound repair and proliferation of bronchial epithelial cells regulated by CTNNA1 [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2007, 103(3): 920—930.
- [19] FARAH Claude S, KING Gregory G, BROWN Nathan J, *et al.* The role of small airways in the clinical expression of asthma in adults [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2012, 129(2): 381—387.
- [20] SADOSHIMA Junicha, IZUMO Seigo. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress [J]. *Annual Review of Physiology*, 1997, 59(1): 551—571.
- [21] VLAHAKIS Nicholas E, HUBMAYR Rolf D. Invited review: plasma membrane stress failure in alveolar epithelial cells [J]. *Journal of Applied Physiology*, 2000, 89(6): 2490—2496.
- [22] INGBER Donald E. Cell structure and hierarchical systems biologically [J]. *Journal of Cell Science*, 2003, 116(7): 1157—1173.