

贯通多孔聚酯基PolyHIPE支架在肝细胞培养中的应用

周苗苗<sup>1</sup>, 张咪<sup>2</sup>, 周燕<sup>2</sup>, 肖艳<sup>1</sup>

(华东理工大学1. 材料科学与工程学院, 2. 生物反应器工程国家重点实验室, 上海200237)

**摘要:** 以生物相容性好且可降解的端基双键化的聚 $\epsilon$ -己内酯(PCL)或聚4-甲基- $\epsilon$ -己内酯(PMCL)为基体, 通过乳化剂Hymermer T96制备高内相乳液(HIPE)。该乳液在紫外光引发下, 通过后加入的季戊四醇四-3-巯基丙酸酯(PETMP)与碳碳双键化的PCL(PCL-AC)或者PMCL(PMCL-AC)发生巯基-烯点击反应, 经连续相的交联得到聚酯基三维多孔支架。采用扫描电子显微镜、差示扫描量热仪、万能材料试验机对支架的微观形貌、热力学以及力学性能进行了表征。通过体外细胞毒性实验以及肝细胞培养实验对支架的生物学性能进行了评估。力学性能测试结果表明: 在乳液制备中, 去离子水温度对支架的力学性能影响更为显著。体外细胞毒性以及肝细胞培养结果表明: 支架无细胞毒性, 且支架的刚性越小越有利于肝细胞的增殖和功能表达。

**关键词:** 聚 $\epsilon$ -己内酯; 聚(4-甲基- $\epsilon$ -己内酯); 聚高内相乳液; 贯通多孔; 肝细胞培养

中图分类号: O633.14

文献标志码: A

Polyester-Based PolyHIPE Scaffolds with Interconnected Porous Structure for Hepatocyte Culture

ZHOU Miao-miao<sup>1</sup>, ZHANG Mi<sup>2</sup>, ZHOU Yan<sup>2</sup>, XIAO Yan<sup>1</sup>

(1. School of Materials Science and Engineering; 2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** Herein, high interconnected porous characteristics of poly(high internal phase emulsion) (PolyHIPE) and good biocompatibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) were combined to create 3D porous polyester-based scaffolds. First, ring opening polymerization (ROP) of  $\epsilon$ -caprolactone (CL) and 4-methyl- $\epsilon$ -caprolactone (MeCL) using 1,4-benzenedimethanol as initiator and Sn(Oct)<sub>2</sub> as catalyst was carried out, followed by acrylation of both hydroxyl ends. Then, Hypermer T96 was used to emulsify the dichloromethane/water mixing system to obtain high internal phase emulsion (HIPE, internal volume >74%), where pentaerythritol tetra(3-mercaptopropionate) (PETMP) was added afterwards. Finally, under UV light irradiating, thiol-ene click cross-linking took place in continuous phase to form high interconnected porous polyester-based PolyHIPE scaffolds. The structure of PCL or

收稿日期: 2018-04-02

基金项目: 上海市"科技创新行动计划"国际合作项目(14520720600); 上海市科委基础研究重点项目(16JC1400203)

作者简介: 周苗苗(1993-), 女, 江西九江人, 硕士, 主要研究方向为生物医用高分子。E-mail: 1550214138@qq.com

通信联系人: 肖艳, E-mail: yxiao@ecust.edu.cn.

poly(4-methyl- $\epsilon$ -caprolactone) (PMCL) and acrylation of the polymers were thoroughly characterized by nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$ -NMR) and gel permeation chromatography (GPC). Cross-linking conditions for PolyHIPE were also studied with aid of scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimeter (DSC) and universal material tester to reveal the microstructure, thermodynamics and mechanical properties of the porous PolyHIPE scaffolds, respectively. Moreover, biological properties of the scaffolds were evaluated by cytotoxicity assessment and hepatocyte culture experiment in vitro. Results of  $^1\text{H}$ -NMR and GPC demonstrated that polymerization and complete acrylation of PCL and PMCL were successfully achieved. In addition, the stability of the emulsion could be adjusted by molecular weight of PCL or PMCL, water content and temperature of internal phase. Furthermore, the water temperature of HIPE had a more dominant influence on thermodynamics and mechanical properties of PolyHIPEs than the water content did. Higher water temperature of HIPE led to higher glass-transition temperature ( $T_g$ ) of the scaffold, as well as lower stiffness. It was shown that Soxhlet-extracted PolyHIPE scaffolds were almost non-toxic in vitro. For hepatocyte culture, the lower stiffness of PMCL<sub>10-80-75</sub> and PCL<sub>10-80-75</sub> scaffolds was beneficial for cell proliferation and function express.

**Key words:** poly( $\epsilon$ -caprolactone); poly(4-methyl- $\epsilon$ -caprolactone); PolyHIPE; interconnected porous; hepatocyte culture.

肝脏是人体内的重要器官, 具有高度再生的功能, 但随着肝衰竭人群的增多, 自体移植已不能满足需求, 更多目光转至如何利用组织工程技术制备出具有肝脏功能的人工肝<sup>[1-2]</sup>。组织工程支架作为组织工程的重要部分, 为人工肝制备提供了思路, 为了模拟天然细胞外基质(ECM)以及便于氧气和营养物质的传送, 组织工程支架一般为三维多孔结构<sup>[3-4]</sup>。由于肝细胞的行为直接受支架的微观结构(如孔的形状、尺寸、孔隙率和相互连接性)以及力学性质所影响, 因此很多研究均集中在通过控制支架的多孔结构以及力学性能, 从而探索肝细胞在不同支架上面的细胞行为<sup>[5-6]</sup>。其中, 高内相乳液(HIPE)模板法是一种制备多孔材料的新型方法, 主要通过一系列不同的单体和聚合机理来制备贯通多孔材料<sup>[7-9]</sup>。与其他孔材料制备方法相比, 聚高内相乳液(PolyHIPE)的优势在于其高度灵活的特性<sup>[10]</sup>。Busby等<sup>[11-13]</sup>证明PolyHIPE制备过程中所使用的材料及其副产物均无细胞毒性, 且PolyHIPE支架有利于生物细胞生长, 包括人成纤维细胞、肝细胞。Johnson等<sup>[14-16]</sup>成功地将巯基-烯化学引入聚酯型PolyHIPE材料制备, 使其交联效率显著提高, 并且该方法制备的支架也被证明有利于纤维细胞、角质细胞和成骨细胞的生长。

聚 $\epsilon$ -己内酯(PCL)因良好的生物相容性和生物可降解性被广泛应用于组织工程<sup>[17]</sup>。Cameron等<sup>[18]</sup>最早利用乳液模板法制备PCL基的多孔支架, 研究表明该多孔支架可以很好地支撑成纤维细胞的黏附和增殖。Silverstein等<sup>[19]</sup>将PCL与聚丙烯酸进行等量共混, 利用相同的方法制备的PCL基共混多孔支架可以很好地促进小鼠骨骼肌干细胞黏附、渗透以及增殖。乳液模板法制备的PCL基多孔支架具有高孔隙率以

及高度贯通的多孔结构,十分有利于肝细胞的培养<sup>[5-6]</sup>,因此通过预先设计的贯通多孔结构、可降解且生物相容性好的PCL基支架有望被应用于肝细胞培养中。

本文利用改性后的无定型聚4-甲基- $\epsilon$ -己内酯(PMCL)以及PCL经高内相乳液模板法,将PMCL和PCL通过端基碳碳双键化得到PMCL-AC以及PCL-AC<sup>[20]</sup>,将PMCL-AC或PCL-AC与季戊四醇四-3-巯基丙酸酯(PETMP)在紫外光的引发下发生巯基-烯点击反应,交联制备成一系列的多孔支架,并对支架在肝组织工程方面的应用进行了生物学评估。其中,肝细胞培养实验证明了聚合物基多孔支架可以很好地支持肝细胞的黏附、增殖和功能表达。因此,聚酯基多孔支架在肝组织工程领域具有广阔的应用前景。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

4-甲基环己酮、 $\epsilon$ -己内酯(CL):分析纯,杭州邦成化工有限公司,使用前经氢化钙干燥后减压蒸馏处理;间氯过氧化苯甲酸(m-CPBA):w=70%~80%,Acros;异辛酸亚锡(Sn(Oct)<sub>2</sub>):分析纯,上海阿拉丁生化科技有限公司;乙醇:优级纯,上海凌峰试剂有限公司;二氯甲烷(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,使用前经无水硫酸镁干燥)、石油醚、丙酮、光引发剂 I2959、PETMP、硫代硫酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、氢化钙、碳酸钾、Hypermer T96、氢氧化钠、磷酸氢二钾、脱氧胆酸:分析纯,国药试剂有限公司;聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)、10 wt%多聚甲醛、CCK-8 试剂盒、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、荧光标记的罗丹明(FITC-Rhodamine):分析纯, Sigma-Aldrich; PBS 溶液: pH 7.4, HyClone。

### 1.2 样品制备

1.2.1 聚合物 PCL 和 PMCL 的合成 单体的制备过程可参照实验室前期工作<sup>[20]</sup>,采用 Baeyer-Villiger 反应,以 4-甲基环己酮为原料, m-CPBA 为氧化剂,在冰水浴下,一锅法得到 4-甲基- $\epsilon$ -己内酯(MeCL)。通过控制单体 CL 或 MeCL 与引发剂对苯二甲醇(BDM)的物质的量之比为 10,经单体的开环聚合得到聚合物 PCL 和 PMCL,分别标记为 PCL<sub>10</sub> 或 PMCL<sub>10</sub>。具体实验过程如下:首先,在惰性气体的保护下将反应茄瓶连接到双排管上,并加入预先计量好的单体和引发剂,放入 60 °C 的油浴锅中抽真空 6 h 以上除去体系中的微量水分;然后,往体系内加入催化剂异辛酸亚锡(Sn(Oct)<sub>2</sub>,单体质量的 0.05%),并且在惰性气体保护下封口;紧接着将茄形瓶放入 120 °C 的油浴锅中,反应 24 h 后加入足量的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶解聚合物,并在石油醚中沉降,静置一段时间待聚合物沉入底部或者贴附在烧杯壁上时,倒去上层石油醚;最后将剩余聚合物放置于真空干燥箱内,抽真空 24 h 后可分别得到聚合物 PCL<sub>10</sub> 或 PMCL<sub>10</sub>。当单体(CL 或 MeCL)与 BDM 的物质的量之比为 n (n=10、20、40、80)时,所得聚合物的聚合度为 n,产品记为 PCL<sub>n</sub> 或者 PMCL<sub>n</sub>。

1.2.2 聚合物 PCL 和 PMCL 的端基双键化 首先,将 250 mL 单口圆底烧瓶和 100 mL 恒压滴液漏斗同时连接到双排管,并烤管 3 次除去体系中的水分;接着,在氩气惰性气体的保护下,迅速将一定量的 PMCL 或 PCL、碳酸钾(K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)以及 50 mL 已干燥的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 加入到 250 mL 单口圆底烧瓶的底部,同时将定量的丙

烯酰氯(AC)和 35 mL 已干燥的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  缓慢滴加到恒压滴液漏斗中, 单体、AC 与  $\text{K}_2\text{CO}_3$  的物质的量之比为 1:16:20, 反应在冰水浴中进行; 反应 3 d 后, 在超速离心下除去  $\text{K}_2\text{CO}_3$  沉淀, 将滤液于  $40\text{ }^\circ\text{C}$  下经旋转蒸发除去溶剂  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  至剩余小部分, 并用石油醚沉降剩下的含聚合物的溶液; 最后, 倒去上层溶剂石油醚, 将剩下部分置于真空干燥箱中, 干燥 24 h 便可获得双键化后的 PMCL-AC 和 PCL-AC。

**1.2.3 PolyHIPE 多孔支架的制备** 首先, 以 Hypermer T96 为乳化剂 (1 mL 水加入量为 0.013 g), 将称量好的端基碳碳双键化后的聚合物 PMCL-AC 或 PCL-AC 加入到 100 mL 的烧杯中; 接着, 加入光引发剂 I2959 (加入量和碳碳双键物质的量之比为 0.3)、PETMP (加入量和碳碳双键物质的量之比为 0.5)、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 g 碳碳双键化后的聚合物中加 4 mL), 经充分混合均匀后, 倒入三口玻璃反应釜中, 在搅拌速度为 300 r/min 下, 往体系内滴加不同温度和体积的去离子水 (去离子水温度 15、45、75  $^\circ\text{C}$ , 去离子水加入体积占整个体系体积的 75%、80%、85%、90%), 滴加完毕后继续搅拌 10 min 得到均匀的乳液; 然后将乳液转移到聚四氟乙烯模具中 (50 mm  $\times$  50 mm  $\times$  5 mm), 并用盖玻片盖住, 尽量减少  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  的挥发, 并且在紫外灯 (500 W, 365 nm) 的照射下进行巯基-烯点击反应交联, 交联时间每面 25 min, 结束后脱除模具取得样品; 最后, 将样品先后以丙酮、无水乙醇为溶剂, 经索氏提取进行抽提操作各 24 h, 真空干燥可得到 PolyHIPE 多孔支架, 其制备过程如图 1 所示。

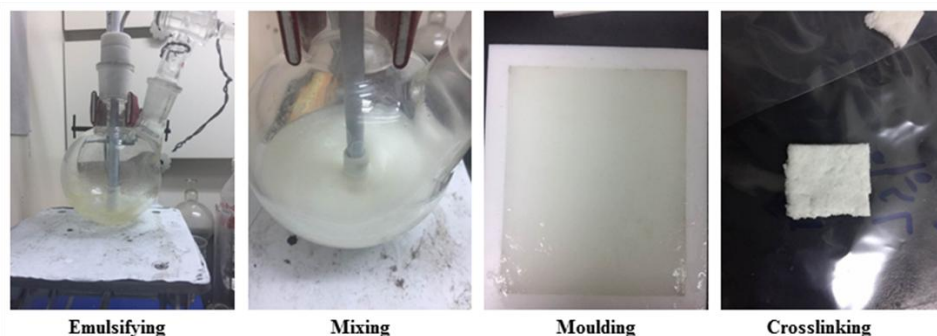


图 1 PolyHIPE 的制备流程图

Fig. 1 Scheme of PolyHIPE fabrication

**1.2.4 细胞培养后 SEM 样品的准备** 待肝细胞培养至第 7 d 后从培养箱中取出, 先用  $\omega=10\%$  的多聚甲醛将细胞固定, 时间为 10 min, 之后用 PBS 浸洗 3 次。接着用 Triton X-100 将细胞透化, 时间 20 min, 继续用 PBS 浸洗 3 次, 再用乙醇溶液进行分级脱水, 乙醇溶液的体积分数依次为 25%、50%、75%、90%、95% 和 100%。最后待乙醇完全挥发后, 将其固定在铝样品桩上, 并用金-钼涂覆用于 SEM 的表征。

### 1.3 测试与表征

**1.3.1 PolyHIPE 支架凝胶含量( $G_c$ )、孔隙率、吸水能力( $E_A$ )的测试** 将约为 50 mg 的 PolyHIPE 称重( $m_0$ ), 并放置在  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中 72 h 后, 于真空干燥箱中干燥至恒重( $m_1$ )为止, 根据公式(1)可计算支架的  $G_c$ 。将支架裁成 5 mm  $\times$  5 mm  $\times$  5 mm 的正方形方块, 每组均设置 3 组平行试样, 用电子密度仪测量非多孔支架的样品密度

( $\rho_0$ ), 天平测得多孔支架的质量( $m$ ), 游标卡尺测得支架的体积( $V$ ), 多孔支架的密度( $\rho$ )可以由多孔支架的质量  $m/V$  得到。最终根据公式(2)可计算支架的孔隙率, 其中纯 PCL 的密度为  $1.14 \text{ g/cm}^3$ , 纯 PMCL 的密度为  $1.12 \text{ g/cm}^3$ 。用天平称干燥 PolyHIPE 支架试样为  $w_{\text{dry}}$ , 将预先称量好的支架分别浸泡于 30 mL 去离子水中, 于恒温震荡箱中  $37^\circ\text{C}$  下 72 h 后, 将其取出后并称其质量为  $w_{\text{wet}}$ , 每组设置 3 组平行样, 由公式(3)可计算支架的  $E_A$ 。

$$G_c = m_1/m_0 \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Porosity} = (1 - \rho/\rho_0) \times 100\% \quad (2)$$

$$E_A = (w_{\text{wet}} - w_{\text{dry}})/w_{\text{wet}} \times 100\% \quad (3)$$

1.3.2 体外细胞毒性实验 将人类慢性粒细胞白血病细胞(k562 细胞)与 PolyHIPE 分别共培养 24 h 和 48 h 后, 通过 CCK-8 测定细胞活性, 以纯细胞培养板 TCPS 为阳性对照, 使用 ELISA 平板读数仪在波长 490 nm 处测量所得着色溶液的吸光度( $A_{\text{sample}}$ ), 对照组 TCPS 在 490 nm 的吸光度( $A_{\text{control}}$ ), 相对细胞活力( $C_v/\%$ )为  $A_{\text{sample}}$  与  $A_{\text{control}}$  之比。

1.3.3 肝细胞的接种和培养实验 具体肝细胞培养过程如下: 首先, 以人诱导肝细胞(hiHeps)为目标细胞<sup>[21]</sup>, 将厚度为 100  $\mu\text{m}$  的支架切片置于 24 孔 TCPS 中, 室温下置于体积分数为 75% 的乙醇中浸泡 24 h 进行灭菌; 接着将切片浸入肝细胞培养基中 24 h 以检查灭菌是否完成, 最后经 PBS 洗涤 3 次后, 将肝细胞悬浮液以每孔  $8 \times 10^4$  个细胞的密度接种在切片上, 并保持在  $37^\circ\text{C}$  且体积分数为 5% 的  $\text{CO}_2$  潮湿气氛中培养。作为阳性对照, 将细胞以相同的密度铺在没有支架的 TCPS 上, 其他过程都相同。细胞培养 7 d 后, 样品用  $\omega=2.5\%$  的戊二醛溶液在  $4^\circ\text{C}$  的卡可酸盐缓冲液( $0.1 \text{ mol/L}$ ,  $\text{pH} = 7.4$ )中固定 1 h, 对每种测试材料进行 3 个独立的黏附实验。细胞接种率( $S_e$ )计算过程如下: 按上述细胞接种的方式接种肝细胞, 并在  $37^\circ\text{C}$  下培养 1 h, 之后用 CCK-8 测试接种在支架以及 TCPS 上细胞的吸光度, 两者的吸光度的比为  $S_e$ 。

1.3.4 免疫荧光染色实验 使用胶原包被的 6 cm 培养皿, 待肝细胞长至体积百分浓度 90% 以上汇合度时, 弃去培养基。首先用 PBS 洗 1 次, 后加入 1 mL 多聚甲醛溶液( $\omega=4\%$ ), 室温孵育 15 min 进行固定; 然后用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 加入通透液(含 0.25 wt% Triton X-100 和 3 wt% 牛血清白蛋白的 PBS 溶液), 室温孵育 15 min, 进行细胞膜和核膜的通透; 接着用 PBS 洗 3 次, 每次 15 min, 加入 DAPI 和 FITC-Rhodamine, 室温孵育 30 min 进行细胞染色; 最后用共聚焦荧光显微镜进行观察并拍照记录。

1.3.5 ALB 分泌量和 Urea 合成量测定实验 将来自培养基的样品收集在预先冷却的试管中并储存于  $-20^\circ\text{C}$ 。使用免疫酶学 ELISA 方法测量肝细胞 ALB 分泌量, 具体过程为: 首先, 用 100  $\mu\text{L}$  稀释(1:100)包被的山羊抗人血白蛋白抗体包被 96 孔板, 并在室温放置 1 h; 然后, 在 PBS 中洗涤 5 次后, 将 200  $\mu\text{L}$  封闭溶液( $0.14 \text{ mol/L}$  NaCl 和体积分数为 1% 的 BSA 溶于  $50 \text{ mmol/L}$  Tris 缓冲液中)加入到孔板中, 并将溶液放置 30 min; 接着, 在 PBS 中洗涤 3 次后, 将 100  $\mu\text{L}$  细胞培养上清液和 100  $\mu\text{L}$  过氧化物酶加入到孔中; 最后,

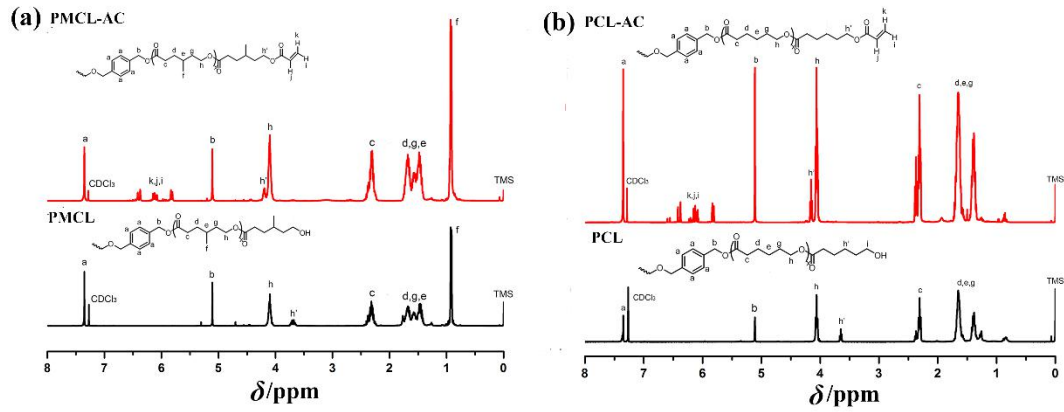
将样品在 PBS 中洗涤 3 次, 加入含有四甲基联苯胺的底物缓冲液并放置 15 min, 并用 100  $\mu\text{L}$  的 0.18 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应。将 96 孔板在 450 nm 下读取吸光度值, 根据标准曲线计算上清中 ALB 分泌量。使用尿素氮(BUN)试剂盒测定肝细胞 Urea 合成量。具体过程为: 在一试管中加入 0.02 mL 的双蒸水作为空白管, 另一试管中加入 0.02 mL 的 10 mmol/L BUN 标准应用液作为标准管, 若干试管加入 0.25 mL 待测样品作为测定管。在每个试管中加入 0.25 mL 的缓冲酶液并混匀, 于 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min 后各加入 1 mL 酚显色剂和 1 mL 碱性次氯酸钠。充分混匀后于波长 640 nm 下测定各管吸光度值, 即为 Urea 合成量。

**1.3.6 样品表征** 采用德国 Bruker 公司 AVANCE III 400 MHz 核磁共振波谱仪测定聚合物的核磁共振氢谱(溶剂为  $\text{CDCl}_3$ ); 采用美国 Waters 1515 凝胶渗透色谱仪(GPC)测定聚合物分子量和分子量分布, 其中 THF 为淋洗溶剂, 单分散 PS 作为标准样; 采用美国 Thermo 公司 TA-2910 差式扫描量热仪, 测定各个支架的热学性能; 采用日本 FE-SEM S-3400 低分辨扫描电子显微镜来表征多孔支架的表面形貌; 采用上海中晨 JC2000A 型静态接触角测量仪来测量支架的接触角(WTA); 采用上海衡翼 HY-0230 型万能机械测试仪测试支架的拉伸性能; 采用中国 TW 300A 型密度仪测量支架的密度; 使用美国 BioTek Synergy 2 型酶标仪, 在特定波长 490 nm 处得到对应的细胞相容性吸光度数值, 其中显著性检验 p 值通过 GraphPad Prism 软件计算得到, 当  $p^* < 0.05$  时, 表明结果具有显著统计学差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 聚合物的结构表征

用核磁共振氢谱来表征聚合物(PMCL 和 PCL), 及其端基碳碳双键化(PMCL-AC 和 PCL-AC)后的结构和端基化反应程度, 其结果如图 2 所示。由图 2 可知, 聚合物在 3.72 处的峰位移移至双键化聚合物 4.25 低场处, 且 PMCL 和 PCL 的 3.72 处位移均无残留峰, 说明 PMCL 或 PCL 的端羟基已经消失, 双键化完全。双键化聚合物中 6.45~5.80 处 k、j、i 峰为末端双键上氢的出峰位置, 进一步表明 PMCL 以及 PCL 端基双键成功接上。此外, 通过双键氢出峰的积分面积可推算出双键化程度为 100%。以引发剂羟甲基氢的质子峰(b 峰)和己内酯的特征峰(h 峰)的积分面积比可以推算出预聚物 PMCL 和 PCL 的分子量。不同分子量的聚合物均可以通过核磁对应的特征峰积分面积得到实际分子量, 最终聚合物设计的分子量( $M_n^a$ )以及实际分子量( $M_n^b$ )如表 1 所示。

图2 (a) PMCL-AC、PMCL 和 (b) PCL-AC、PCL 的  $^1\text{H}$ -NMR 谱图Fig. 2  $^1\text{H}$ -NMR spectra of (a) PMCL-AC and PMCL, (b) PCL-AC and PCL

## 2.2 聚合物PMCL和PCL的凝胶渗透色谱表征

图3是不同分子量PMCL和PCL的GPC谱图，由GPC测得聚合物的分子量( $M_n$ )以及分布(PDI)如表1所示。从图3中可以看出，不同分子量PMCL和PCL的GPC谱图均是单一峰且服从正态分布，这说明聚合物PMCL和PCL均为均聚物，且数均分子量在一定程度上是可控的；聚合物PDI在1.30~1.50，说明分子量分布较窄。最终GPC获得的分子量与核磁计算的结果是一致的，说明实验成功合成了不同分子量的PMCL和PCL。

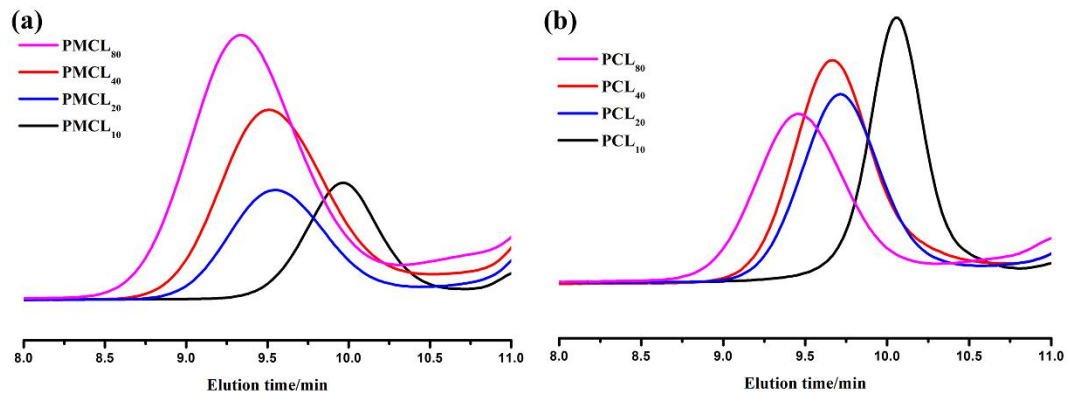


图3 (a) PMCL 和(b) PCL 的凝胶渗透色谱

Fig.3 GPC traces of (a) PMCL and (b) PCL

表 1 PMCL 和 PCL 的合成

Table 1 Synthesis of PMCL and PCL

Polymer	$M_n^a$	$M_n^b$	$M_n^c$	PDI
PMCL <sub>10</sub>	$1.28 \times 10^3$	$1.29 \times 10^3$	$1.46 \times 10^3$	1.34
PMCL <sub>20</sub>	$2.56 \times 10^3$	$2.54 \times 10^3$	$3.12 \times 10^3$	1.41
PMCL <sub>40</sub>	$5.12 \times 10^3$	$5.14 \times 10^3$	$5.89 \times 10^3$	1.30

PMCL <sub>80</sub>	10.24×10 <sup>3</sup>	10.20×10 <sup>3</sup>	12.75×10 <sup>3</sup>	1.44
PCL <sub>10</sub>	1.14×10 <sup>3</sup>	1.13×10 <sup>3</sup>	1.39×10 <sup>3</sup>	1.36
PCL <sub>20</sub>	2.28×10 <sup>3</sup>	2.23×10 <sup>3</sup>	2.68×10 <sup>3</sup>	1.32
PCL <sub>40</sub>	4.56×10 <sup>3</sup>	4.57×10 <sup>3</sup>	5.21×10 <sup>3</sup>	1.45
PCL <sub>80</sub>	9.12×10 <sup>3</sup>	9.15×10 <sup>3</sup>	11.93×10 <sup>3</sup>	1.37

### 2.3 PolyHIPE多孔支架的制备和表征

在控制巯基-烯摩尔比为1:1的条件下,探究了不同聚合度的聚合物,高内相乳液制备中去离子水体积用量和温度对最终PolyHIPE支架制备的影响。实验中观察到,不论是对于PMCL基体系还是PCL基体系,当去离子水用量达到90%时,体系均不能交联,去离子水用量越高,支架的孔隙率就越高,因此本文可以得出最佳去离子水用量为85%;不论是对于PMCL基体系还是PCL基体系,均可在设定温度下交联,且去离子水温度越高体系交联速率越快;对于PMCL基体系而言,在整个设计的数均分子量范围内体系均可交联;但是对于PCL基体系而言,当数均分子量超过4 560时,由于PCL的高结晶性从而导致支架的高脆性,常温下发生断裂,因此预聚物的数均分子量不应过高。

根据前面交联实验的结果,本文选取了6组支架进行后续的表征,具体结果如表2所示。其中,PMCL<sub>10-80-15</sub>表示的是PMCL的聚合度为10,去离子水用量为80%,去离子水的温度为15℃,其他的同理可知。从表2可知,随着高内相乳液中去离子水的温度以及用量的增加,不论是以PMCL或者PCL为基体,支架的孔径均显著增加,但是去离子水温度对孔径的影响比用量更为显著。孔隙率的变化规律和孔径相似,同样是随着去离子水的温度以及用量的增加而逐渐增加,且温度对孔隙率的影响更加显著。对比不同聚合物基体的支架,以PMCL为基体的支架,孔径以及孔隙率会略小于以PCL为基体的支架,这是因为PCL结晶性更高,对孔的保持能力更好,孔不易坍塌,因此孔径和孔隙率会更高。从DSC获得的玻璃化转变温度( $T_g$ )以及 $G_c$ 的结果来看,交联度越高,支架的 $G_c$ 越高, $T_g$ 会越大。对于PMCL<sub>10-80-75</sub>和PCL<sub>10-80-75</sub>这两组而言,随着温度的升高,交联的效率越高,从而 $T_g$ 与 $G_c$ 越高,该结果与预期估计相符。对比不同聚合基体的两类支架,以PMCL为基体的支架因为常温下为液态,链端更易移动,从而交联效率会更好,最后支架的 $G_c$ 高于以PCL为基体支架的 $G_c$ , $T_g$ 会更小。从支架的接触角以及吸水性的表征来看,以PMCL为基体支架的亲水性大于以PCL为基体支架的亲水性。

表 2 PolyHIPE 支架的孔径、孔隙率、 $T_g$ 、 $G_c$ 、WTA、 $E_A$ 的结果

Table 2 Pore size, porosity,  $T_g$ ,  $G_c$ , WTA and  $E_A$  of PolyHIPE scaffolds

PolyHIPE	Pore size/ $\mu\text{m}$	Porosity/%	$T_g$ / $^{\circ}\text{C}$	$G_c$ /%	WTA / $^{\circ}$	$E_A$ /%
PMCL <sub>10-80-15</sub>	65±12.5	64.3±2.4	-40.5	79.2±2.1	66.7±2.1	147.8±12.1



PMCL <sub>10</sub> -80-75	203±34.1	82.6±3.8	-38.9	93.0±2.2	47.4±2.1	177.0±14.3
PMCL <sub>10</sub> -90-15	95±18.4	73.5±2.1	-41.2	79.4±1.9	54.6±2.1	103.6±10.4
PCL <sub>10</sub> -80-15	98±13.8	69.0±3.9	-42.7	78.9±7.3	90.3±2.1	118.0±16.8
PCL <sub>10</sub> -80-75	450±47.9	89.0±1.4	-40.5	88.9±2.8	76.9±2.1	118.2±15.2
PCL <sub>10</sub> -90-75	149±20.5	84.4±2.2	-41.8	84.9±6.8	84.6±2.1	117.9±12.4

室温下PolyHIPE支架的力学性能见表3。由表3可知,随着去离子水温度的增加,无论以何种聚合物基体为支架,拉伸强度( $\sigma$ )、杨氏模量(E)、断裂伸长率( $\epsilon$ )均显著减小,这是因为随着去离子水温度增加,支架的孔径和孔隙率会显著增加,从而大大减弱了支架的力学性能。在相同去离子水温度以及用量情况下,以PMCL和PCL为基体支架间的力学性能差距随着去离子水温度升高而降低。

表3 室温下 PolyHIPE 支架的力学性能

Fig 3 Mechanical properties of PolyHIPE scaffolds at room temperature

PolyHIPE	E/kPa	$\sigma$ /kPa	$\epsilon$ /%
PMCL <sub>10</sub> -80-15	58.2±4.4	72.21±5.4	144.7±10.4
PMCL <sub>10</sub> -80-75	23.7±2.3	19.44±1.1	85.6 ±8.8
PMCL <sub>10</sub> -90-15	54.8±5.2	51.10±3.9	94.75±7.9
PCL <sub>10</sub> -80-15	33.1±3.8	44.65±2.6	136.2±13.5
PCL <sub>10</sub> -80-75	20.1±2.7	15.86 ±1.3	78.9 ±7.9
PCL <sub>10</sub> -90-15	31.4±2.9	28.43±2.7	90.5 ±8.4

## 2.4 PolyHIPE多孔支架在肝细胞培养中的应用

为了探究制备的PolyHIPE支架在组织工程中的应用,根据前面的各种表征,本文选取了3组PolyHIPE支架(PMCL<sub>10</sub>-80-15、PMCL<sub>10</sub>-80-75和 PCL<sub>10</sub>-80-75)进行生物学评估实验,包括体外细胞毒性,体外肝细胞接种,增殖以及荧光染色,肝功能表达,肝细胞培养前后支架SEM的表征。具体的实验结果如图4、图5、图6所示。

从24 h和48 h后的体外细胞毒性(图4(a))中可以看出,作为阳性对照,不含生物材料的TCPS上的细胞活力被认为是100%。在培养24 h和48 h后,k562细胞在所有支架上面的细胞活力均高于85%,这说明PolyHIPE是没有细胞毒性的,可被用于组织工程中。

从1 h后的接种率(图4(b))中观察到,肝细胞在不同PolyHIPE支架上面的 $S_e$ 相近且均在85%以上,但15℃下的 $S_e$ 略高于75℃下的 $S_e$ 。可能的原因是制备的PolyHIPE是多孔结构,但是不同去离子水温度形成的孔径大小相差很大,温度越高,孔径越大。细胞能否在材料上面很好的黏附,和材料表面的多孔结

构以及润湿性是息息相关的<sup>[23]</sup>, 而 3 种支架中 PMCL<sub>10-80-75</sub> 和 PCL<sub>10-80-75</sub> 表面的粗糙度、孔径和孔隙率相似, 因此两者的  $S_e$  相近。而 PMCL<sub>10-80-15</sub> 的孔径最小 (50  $\mu\text{m}$  左右), 其孔径大小与正常肝细胞大小相近, 更容易固定支架表面的细胞, 从而使得肝细胞的  $S_e$  比其他 2 组高。

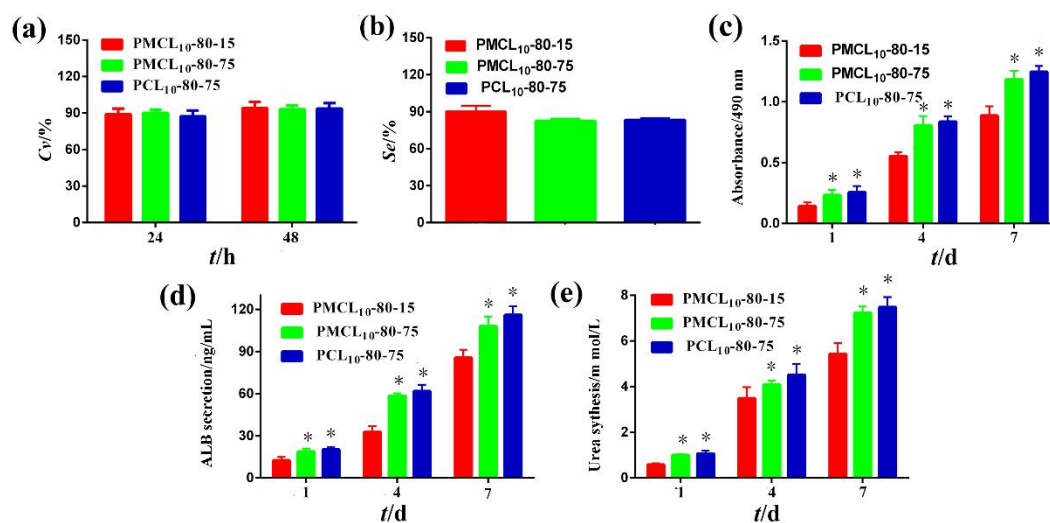


图 4 支架的细胞毒性以及肝细胞培养: (a) 24 h 和 48 h 后的体外细胞毒性; (b) 1 h 后的接种效率  $S_e$ ; (c) 不同天数的增殖; (d) 不同天数 ALB 分泌量; (e) 不同天数 Urea 合成量, 随后用 Bonferroni t 检验( $p^* < 0.05$ ): (\*) 与 PMCL<sub>10-80-15</sub> 支架相比

Fig.4 Cytotoxicity of scaffolds and hepatocyte culture: (a) cytotoxicity in vitro after 24 h and 48 h; b)  $S_e$  at 1 h; (c) proliferation at different days; (d) ALB secretion at different days; (e) Urea synthesis at different days. Data statistically significant according to Bonferroni t-test ( $p^* < 0.05$ ): (\*) vs. PMCL<sub>10-80-15</sub> scaffold

图 4(c)为不同天数肝细胞的增殖图。肝细胞数目在所有的支架上面均随着培养时间的增加而增加, 但是 PMCL<sub>10-80-15</sub> 上面扩增的速率小于 PMCL<sub>10-80-75</sub> 和 PCL<sub>10-80-75</sub>, 且后两种支架肝细胞增殖的速率接近, 说明去离子水温度对肝细胞增殖影响显著。这是因为随着去离子水温度的增加, 支架的弹性模量大幅度降低, 从文献<sup>[6]</sup>可知支架的刚性越低, 越有利于肝细胞的增殖。对于不同聚合物基体支架而言, 虽然 PCL 的结晶性比 PMCL 强, 但是本文研究的聚合物均是低聚物, 最终结晶性对支架的刚度影响不大, 所以得到的 PMCL 和 PCL 基体支架的弹性模量相近, 且随去离子水温度的变化而显著减小。

图 4(d)+(e)分别表示肝细胞 ALB 分泌量和 Urea 合成量随时间变化的图。肝细胞在 PMCL<sub>10-80-15</sub> 上的 ALB 分泌量在 1~7 d 内增加缓慢, 而在 PMCL<sub>10-80-75</sub> 和 PCL<sub>10-80-75</sub> 上增加更快, 且肝细胞在 PolyHIPE 支架上的 Urea 合成量与 ALB 分泌量基本一致, 这和文献所报道的相符<sup>[24]</sup>。因此, PolyHIPE 可以很好地保持肝细胞功能。

图 5 表示肝细胞在 PolyHIPE 支架上面培养第 7 d 后的荧光染色图。由图 5 中可知, 培养至第 7 d 时, 肝细胞在不同 PolyHIPE 上面的形态无差距, 只是数量上发生改变。PMCL<sub>10-80-15</sub> 上的细胞个数均小于 PMCL<sub>10-80-75</sub> 和 PCL<sub>10-80-75</sub>, 这和细胞增殖的数据相吻合, 再一次说明去离子水温度对支架的刚度影响

很大, 进而影响肝细胞的增殖。图 6 是肝细胞在支架上面培养 7 d 前后的 SEM 图。肝细胞在支架上培养 7 d 后, 其在 3 种支架上都呈现出球状细胞聚集体<sup>[5]</sup>, 但是 PMCL<sub>10-80-75</sub> 和 PCL<sub>10-80-75</sub> 相对于 PMCL<sub>10-80-15</sub> 支架来说, 细胞聚集体更多也更加密集, 这与前面细胞增殖和荧光结果是一致的。正常肝细胞一般都倾向于抱团生长, 从 SEM 结果可知, 3 种支架上的肝细胞均成团生长, 且具有正常肝细胞的形貌, 说明 PolyHIPE 支架在肝细胞培养方面有较好的应用前景。

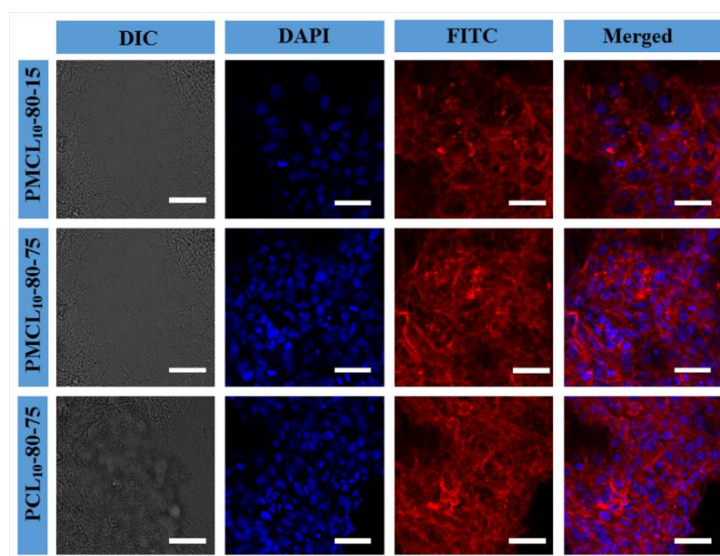


图 5 肝细胞支架上面第 7 d 的荧光染色图, 标尺: 40  $\mu\text{m}$

Fig.5 Fluorescent images of hepatocytes on scaffolds at 7 d, scale bar: 40  $\mu\text{m}$

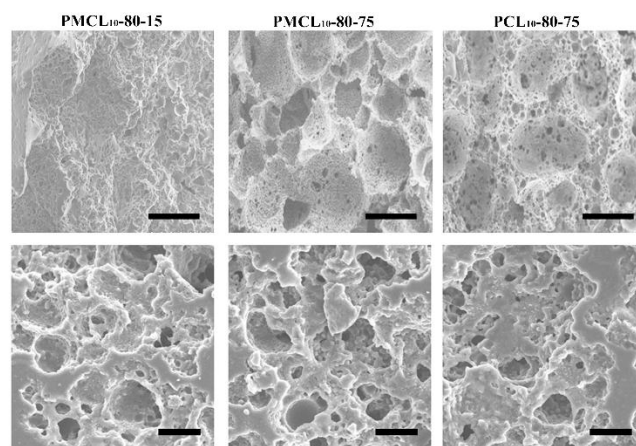


图 6 支架肝细胞培养 7 d 前 (上) 后 (下) 的 SEM 图, 标尺: 上 500  $\mu\text{m}$ /下 40  $\mu\text{m}$

Fig.6 SEM images of scaffolds before (up) and after (down) hepatocyte culture at 7 d, scale bar: up 500  $\mu\text{m}$ /down 40  $\mu\text{m}$

### 3 结 论

(1) 通过高内相乳液模板法, 成功制备了以 PCL 和 PMCL 为基体的三维多孔 PolyHIPE 支架, 改支架具有良好的生物相容性, 高内相乳液制备过程中去离子水温度对支架的孔径、孔隙率、亲水性、力学性能的

影响显著。

(2) 具有较低杨氏模量的 PMCL 和 PCL 基体支架可以很好地支持肝细胞的黏附、增殖以及功能的表达, 在肝组织工程领域具有一定的应用前景。

参考文献:

- [1] PEREZ R A, JUNG C R, KIM H W. Biomaterials and culture technologies for regenerative therapy of liver tissue[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2017, 6(2): 1600791.
- [2] OHASHI K, YOKOYAMA T, YAMATO M, et al. Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets[J]. *Nature Medicine*, 2007, 13(7): 880-885.
- [3] BOKHARI M, CARNACHAN R J, CAMERON N R, et al. Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge[J]. *Journal of Anatomy*, 2007, 211(4): 567-576.
- [4] LOH Q L, CHOONG C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size[J]. *Tissue Engineering Part B Reviews*, 2013, 19(6): 485-502.
- [5] HAYWARD A S, EISSA A M, MALTMAN D J, et al. Galactose-functionalized PolyHIPE scaffolds for use in routine three dimensional culture of mammalian hepatocytes[J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14(12): 4271-4277.
- [6] CHEN A A, KHETANI S R, LEE S, et al. Modulation of hepatocyte phenotype in vitro via chemomechanical tuning of polyelectrolyte multilayers[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(6): 1113-1120.
- [7] KIMMINS S D, CAMERON N R. Functional porous polymers by emulsion templating: Recent advances[J]. *Advanced Functional Materials*, 2011, 21(2): 211-225.
- [8] SILVERSTEIN M S. Emulsion-templated porous polymers: A retrospective perspective[J]. *Polymer*, 2014, 55(1): 304-320.
- [9] PULKO I, KRAJNC P. High internal phase emulsion templating-a path to hierarchically porous functional polymers[J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2012, 33(20): 1731-1746.
- [10] LANGFORD C R, JOHNSON D W, CAMERON N R. Preparation of hybrid thiol-acrylate emulsion-templated porous polymers by interfacial copolymerization of high internal phase emulsions[J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2015, 36(9): 834-839.
- [11] BUSBY W, CAMERON N R, JAHODA C A B. Tissue engineering matrixes by emulsion templating[J]. *Polymer International*, 2002, 51(10): 871-881.
- [12] BARBETTA A, MASSIMI M, CONTI D L, et al. Enzymatic cross-linking versus radical polymerization in the

- preparation of gelatin PolyHIPEs and their performance as scaffolds in the culture of hepatocytes[J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7(11): 3059-3068.
- [13] BARBETTA A, MASSIMI M, DI R B, et al. Emulsion templated scaffolds that include gelatin and glycosaminoglycans[J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9(10): 2844-2856.
- [14] JOHNSON D W, LANGFORD C R, DIDSBURY M P, et al. Fully biodegradable and biocompatible emulsion templated polymer scaffolds by thiol-acrylate polymerization of polycaprolactone macromonomers[J]. *Polymer Chemistry*, 2015, 6(41): 7256-7263.
- [15] CALDWELL S, JOHNSON D W, DIDSBURY M P, et al. Degradable emulsion-templated scaffolds for tissue engineering from thiol-ene photopolymerisation[J]. *Soft Matter*, 2012, 8(40): 10344-10351.
- [16] SUSEC M, LISKA R, RUSDMULLER G, et al. Microcellular open porous monoliths for cell growth by thiol-ene polymerization of low-toxicity monomers in high internal phase emulsions[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2015, 15(2): 253-261.
- [17] DASH T K, KONKIMALLA V B. Polycaprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review[J]. *Journal of Controlled Release*, 2012, 158(1): 15-33.
- [18] BUSBY W, CAMERON N R, JAHODA C A. Emulsion-derived foams (PolyHIPEs) containing poly(epsilon-caprolactone) as matrixes for tissue engineering[J]. *Biomacromolecules*, 2001, 2(1): 154-164.
- [19] SUGA T, XUYEN N T, MATSUMOTO K, et al. Enhanced proliferation of HeLa cells on PLLA-PCL and PLGA-PCL multiblock copolymers[J]. *Polymer Journal*, 2017, 49(7): 1-7.
- [20] XIAO Y, LANG H, ZHOU M, et al. A highly stretchable bioelastomer prepared by UV curing of liquid-like poly(4-methyl-epsilon-caprolactone) precursors[J]. *Journal of Materials Chemistry B: Materials for Biology and Medicine*, 2017, 5(3): 595-603.
- [21] HUANG Y, ZHANG D, GAO M, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(3): 370-384.
- [22] 郎思皖, 肖艳, 李进杰, et al. 基于星型聚 4-甲基-epsilon-己内酯的光交联网络合成与性能表[J]. *功能高分子学报*, 2016, 29(3): 267-273.
- [23] LEI N, CHEN D, SUO P, et al. Physicochemical characterization and biocompatibility in vitro of biphasic calcium phosphate/polyvinyl alcohol scaffolds prepared by freeze-drying method for bone tissue engineering applications[J]. *Colloids & Surfaces B Biointerfaces*, 2012, 100(12): 169-176.
- [24] BAHARVAND H, HASHEMI S M, KAZEMI A S, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro[J]. *International Journal of Developmental Biology*, 2006, 50(7): 645-652.