

大气压等离子体射流对 PLLA 纤维膜表面改性方法的研究*

田振华¹,程军杰²,周熟能¹,郭 飞¹,文 莉¹,王 海³,褚家如¹,邹 纲²

(1. 中国科学技术大学 精密机械与精密仪器系,安徽 合肥 230027;2. 中国科学技术大学 高分子科学与工程系,安徽 合肥 230026;3. 安徽工程大学 机械与汽车工程学院,安徽 芜湖 241000)

摘 要:左旋聚乳酸(PLLA)以其优异的生物可降解性能和良好的力学性能在组织工程中得到了广泛的应用。其中,PLLA 纤维膜多孔结构模拟了天然细胞外基质,因而引起了广泛关注。然而,PLLA 纤维膜的疏水性能使其细胞亲和力较差,进而限制了它与生物环境的相互作用。大气压等离子体射流(AP-PJ)是一种有效的表面改性工具,具有结构简单、成本低和操作灵活等优点。研究使用静电纺丝法成功制备了平均纤维直径为 1 184 nm 的 PLLA 纤维膜,并通过 He/O₂ APPJ 对 PLLA 纤维膜进行表面改性,大幅提高了材料表面的亲水性和细胞亲和力。在改性前后的 PLLA 纤维膜上培养小鼠成肌细胞 C2C12,结果表明,改性后的 PLLA 纤维膜更有利于细胞的增殖和生长。研究结果在组织工程和生物医学工程中具有重要的应用前景。

关键词:PLLA 纤维膜;大气压等离子体射流;表面改性;亲水性;细胞亲和力;生物医学工程

中图分类号:TB 39 **文献标志码:**A

Research on Surface Modification of PLLA Fibrous Membranes with Atmospheric Pressure Plasma JetTIAN Zhenhua¹, CHENG Junjie², ZHOU Shuneng¹, GUO Fei¹, WEN Li¹, WANG Hai³, CHU Jiaru¹, ZOU Gang²

(1. Department of Precision Machinery and Instrumentation, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China; 2. Department of Polymer Science and Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China; 3. School of Mechanical and Automotive Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China)

Abstract: Poly (L-Lactic) Acid (PLLA) was widely used for tissue engineering due to its excellent biodegradability and good mechanical properties. Among them, the porous structure of the PLLA fibrous membrane simulated the natural extracellular matrix, thus it attracted much attention. However, the hydrophobic nature of the PLLA fibrous membrane resulted in poor cell affinity, which in turn limited its interaction with the biological environment. The atmospheric pressure plasma jet (APPJ) was an effective surface modification tool with the advantages of simple structure, low cost and flexible operation. The PLLA fibrous membrane with an average fiber diameter of 1184 nm was successfully prepared by electrospinning, and the surface modification of PLLA fibrous membrane by He/O₂ APPJ greatly improved the hydrophilicity and cell affinity of the material surface. Mouse myoblast C2C12 was cultured on the PLLA fibrous membrane before and after modification, the results showed that the modified PLLA fibrous membrane was more conducive to cell proliferation and growth. The research results had important application prospects in tissue engineering and biomedical engineering.

Key words: PLLA fibrous membrane, atmospheric pressure plasma jet, surface modification, hydrophilicity, cell affinity, biomedical engineering

组织工程是研究开发用于修复人体组织或受损器官的一门新兴学科。理想的组织工程支架应具有适当的力学性能、良好的生物相容性以及生物可降解性,以便为细胞粘附和增殖提供物理支撑和空间,促进细胞构建特定的功能组织或器官,并可在体内被降解吸收^[1]。左旋聚乳酸(PLLA)是一种有着良好力学性能的医用级生物可降解性材料,已在血管组织工程、骨组织工程等生物医学领域得到了广泛的应用^[2]。和传统薄膜结构的 PLLA 相比,三维多孔结构的 PLLA 纤维膜,由于可以模拟细胞外基质的结构和功能,非常有利于营养物质的传递,因此近

年来得到越来越广泛的重视和关注。

然而,PLLA 纤维膜由于较低的表面能和化学惰性,致使其表现出疏水性和较差的细胞亲和力^[3-4],因此,通过改善 PLLA 膜的表面特性来增强其与生物环境的相互作用就显得尤为重要。常见的表面改性方法有湿化学处理、紫外线照射、臭氧处理和低温等离子体处理^[5]。与其他方法相比,低温等离子体处理是一种环境友好型方法,改性层很薄,不会影响材料的固有性质,且改性不受材料尺寸和形貌的影响^[6]。然而,常用的低气压等离子体处理需要复杂昂贵的真空系统,并且处理对象的尺寸受到

真空室尺寸的限制^[7]。近些年来,新发展起来的大气压低温等离子体射流(APPJ),因其中含有高浓度的活性粒子,可在常压和开放环境中工作,并且结构简单、成本低、操作灵活,因而在材料表面改性和生物医学等领域得到越来越多的关注^[8]。目前,利用APPJ对多孔纤维结构的 PLLA 进行表面改性的研究还少有报道,因此有必要深入研究并发展一种低成本、简单快捷的 PLLA 纤维膜表面改性方法,以提高其亲水性和生物相容性。

本文通过静电纺丝技术制备了 PLLA 纤维膜,然后利用 APPJ 对 PLLA 纤维膜进行表面改性。试验结果表明,APPJ 中含有高浓度的活性官能团,经其处理后的 PLLA 纤维膜亲水性大大提高。小鼠成肌细胞的培养试验表明,在经过 APPJ 改性过的 PLLA 纤维膜表面,细胞的增殖性能和生长形貌要明显优于未处理的纤维膜,纤维膜的生物相容性和细胞亲和力大大提高。本文的研究成果在组织工程和生物医学工程中具有重要的应用前景。

1 试验方法

1.1 PLLA 纤维膜的制备

静电纺丝装置示意图如图 1 所示。为了制备 PLLA 纤维膜,称取 0.5 g 左旋聚乳酸粒(PLLA)置于玻璃瓶中,然后加入 4 mL 二氯甲烷(DCM)和 1 mL 二甲基甲酰胺(DMF)制备成浓度为 10% 的左旋聚乳酸溶液,将混合好的溶液磁力搅拌 4 h 使其完全溶解。采用静电纺丝方法将 PLLA 溶液从注射器喷出,并在旋转滚筒上收集得到纤维膜,操作参数为:纺丝距离 2 cm,施加正电压 5 kV,负电压 -2 kV,滚筒的转速是 3 000 r/min,纺丝时间 3 h。最后,将制备好的纤维膜放入干燥箱中,干燥至恒重,备用。

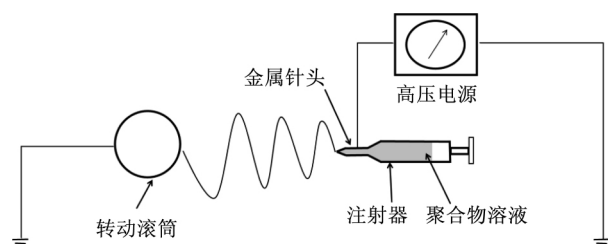


图 1 静电纺丝装置示意图

1.2 大气压等离子体射流表面改性

APPJ 装置示意图如图 2 所示。APPJ 装置由

玻璃管、聚四氟乙烯(PTFE)绝缘管、针状高压电极和环状接地电极组成。玻璃管长度为 90 mm,内外径分别是 3 和 5 mm。高压电极是直径为 2 mm、长度为 80 mm 的铜棒,固定在玻璃管内。接地电极安装在距离玻璃管边缘 30 mm 处。该针环电极结构放电强烈,可产生大量等离子体活性粒子。

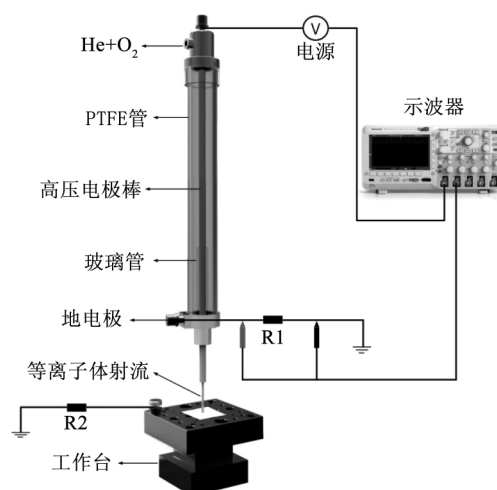


图 2 大气压等离子体射流装置示意图

1.3 C2C12 细胞培养

将小鼠成肌细胞 C2C12 培养在含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素和 89% 的 DMEM 溶液(总称培养液)中,并将其放在 CO₂ 浓度为 5%、温度为 37 °C 的培养箱中生长^[9]。

1.4 C2C12 细胞生长形貌的研究

将 C2C12 细胞以密度为 5×10^6 /mL 接种在 PLLA 纤维膜上,在培养 1 天后,使用磷酸盐缓冲液溶液(PBS)洗涤 2 次,并通过 4% 多聚甲醛溶液固定细胞。接下来,使用 20%、30%、50%、70%、90% 和 100% 梯度乙醇脱水 2 次,每次 15 min,最后采用 CO₂ 临界干燥法干燥后,在扫描电子显微镜(SEM)下观察细胞形态^[10]。

1.5 数据统计

所有试验数据以平均值±方差的形式呈现。

2 结果分析

2.1 PLLA 纤维膜的形貌表征

静电纺丝是通过施加静电力来控制纤维生产的纤维形成过程。在扫描电子显微镜下,纤维膜表面呈现出连续且无珠的纤维结构(见图 3)。通过调节纺丝时间为 3 h,将纤维膜的厚度控制在 (100 ± 12) μm。图 4 显示了 PLLA 纤维膜的纤维直径分布情

况,通过 Origin(Origin Lab,USA)分析 PLLA 支架纤维的平均直径为 $(1\,184\pm182)$ nm。

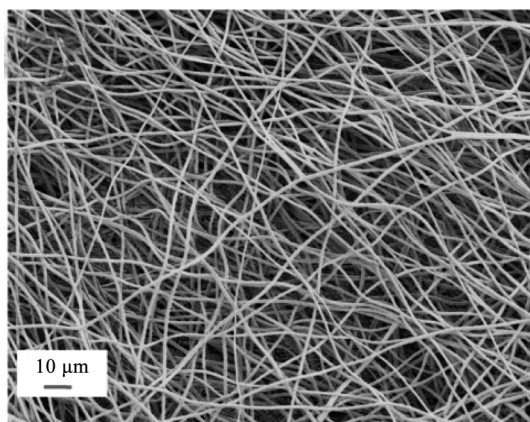


图 3 PLLA 纤维膜表面形貌的 SEM 图片(500×)

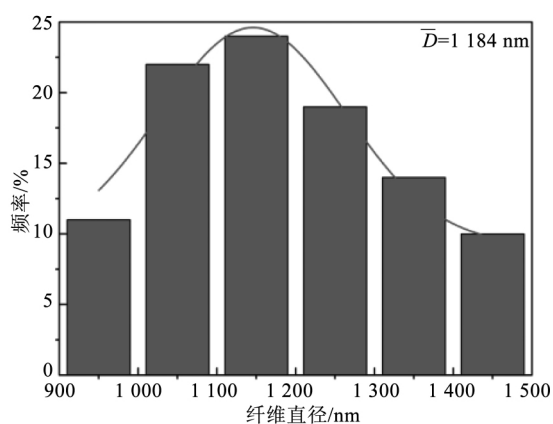


图 4 纤维直径分布情况

2.2 大气压等离子体射流的发射光谱特性

图 5 显示了在 200~900 nm 波长范围内, O_2/He 混合比为 0.6% 的情况下测得的 APPJ 发射光谱。图 5 中,工作电压为 ± 7.0 kV,工作距离为 1 cm,氦气流速为 1 000 sccm,氧气流速为 6 sccm。研究发现,在大气压 He/O_2 混合气体放电中,发射光谱包括氦原子和氧原子的谱线、 N_2^+ 第一负带谱线、 N_2 第二正带谱线^[11],以及羟基($-OH$)和 NO 粒子的谱线。杂质氮谱线的产生是等离子体射流与环境空气发生相互作用的结果。除此之外,由于环境空气和工作气体中都混合了少量的氧气和水蒸气,等离子体中的高能电子会通过非弹性碰撞激发、电离水蒸气和氧气等中性分子,进而产生羟基($-OH$)和 NO 等活性粒子,这些活性粒子是对材料进行表面改性的主要成分。

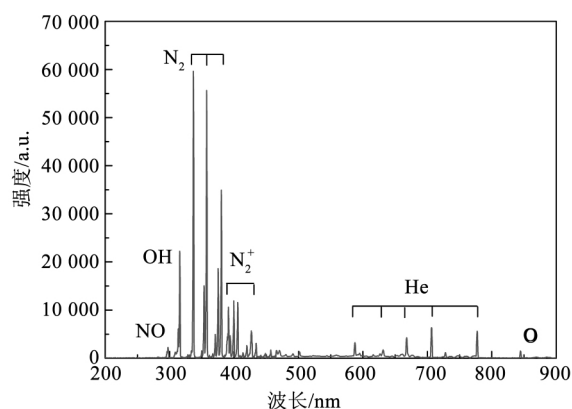


图 5 大气压 He/O_2 等离子体射流发射光谱图

2.3 PLLA 纤维膜的亲水性能表征

PLLA 纤维膜表面的亲水性能可以用水接触角(WCA)来表征。图 6 所示为 PLLA 纤维膜表面的 WCA 随等离子体处理时间的变化情况,其中,工作电压为 ± 7.0 kV,工作距离为 1 cm,氦气流速为 1 000 sccm,氧气流速为 6 sccm。从图 6 中可看出,未处理的 PLLA 纤维膜的 WCA 是 120° ,表现为超疏水性;在经过 APPJ 处理后,材料表面的 WCA 显著下降,表明材料的亲水性能得到很大改善。当施加电压为 ± 7.0 kV, O_2/He 混合比是 0.6% 时,观察到材料表面的 WCA 在经过 4 min 等离子体处理后急剧下降(从 120° 到 29°)。由于 He/O_2 APPJ 环境富含活性氧粒子,经过 APPJ 处理后,在 PLLA 纤维膜表面引入了含氧极性基团,如羟基($-OH$)和羧基($-COOH$)^[12],从而使得 PLLA 材料表面的亲水性能得到大幅度提升。从图 6 中观察得到,当处理时间从 4 min 增加至 16 min 时,材料表面的水接触角可缓慢下降至 18° 。综合考虑时间成本和获得的效益,将后续研究的处理时间优化至 4 min。

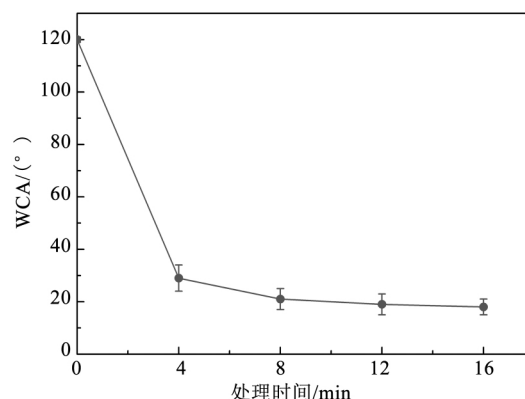
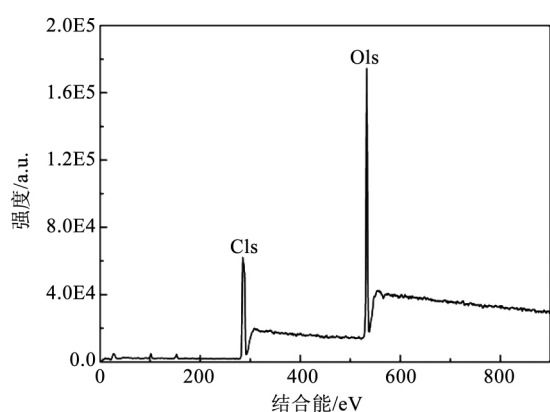


图 6 PLLA 纤维膜表面水接触角随处理时间的变化情况

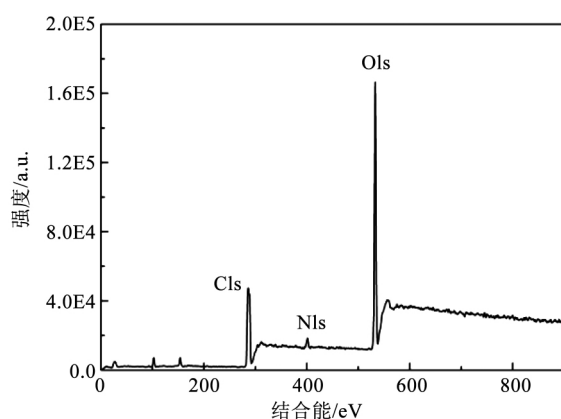
2.4 XPS 分析

PLLA 纤维膜表面化学元素的组成可通过 X

射线光电电子能谱(XPS)来分析评估。图7显示了未处理和经过等离子体处理的 PLLA 纤维膜的 XPS 扫描全谱。等离子体处理参数:工作电压 ± 7.0 kV,工作距离 1.0 cm,He 流速 1 000 sccm, O_2/He 混合比 0.6%,处理时间 4 min。从图7中可以看出,2种XPS全谱都具有2个分离的峰,其对应于 Cl_{1s} (285 eV)和 O_{1s} (532 eV),在等离子体处理后的 PLLA 纤维膜上还可以看到一个 N_{1s} 峰(400 eV),表明等离子体射流与周围空气相互作用产生了活性氮粒子。此外,经过等离子体处理后,PLLA 纤维膜上 Cl_{1s} 归一化强度下降,相应地 O_{1s} 归一化强度上升,即在等离子体改性后, O_{1s} 粒子所占比例上升。这是因为等离子体射流中的电子、离子和光子等物质与 PLLA 纤维膜表面相互作用后,使得纤维膜表面的 C 键断裂^[13],并引入含氧官能团所导致的。这些亲水性的官能团能促使 PLLA 表面的 WCA 下降,这与图6的结果是一致的。



a) 未处理的 PLLA 纤维膜



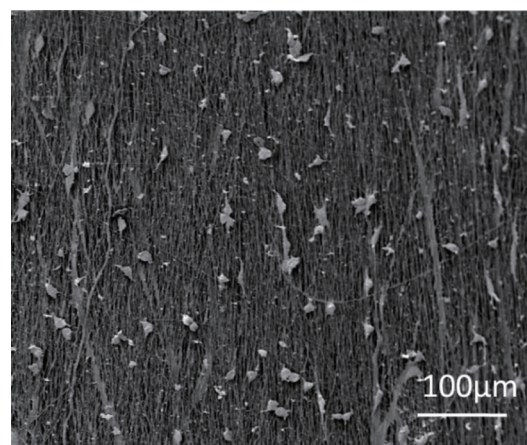
b) 经过等离子体处理的 PLLA 纤维膜

图7 PLLA 纤维膜的 XPS 扫描全谱

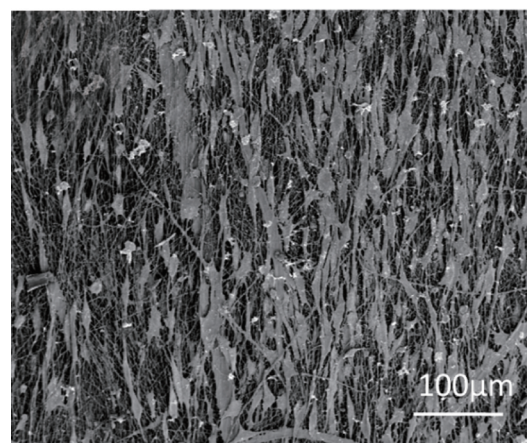
2.5 C2C12 细胞生长形貌研究

图8显示了 C2C12 细胞在未处理和 APPJ 处理后的 PLLA 纤维膜上培养 1 天时的 SEM 图片。

等离子体处理参数:工作电压 ± 7.0 kV,工作距离 1.0 cm,He 流速 1 000 sccm, O_2/He 混合比 0.6%,处理时间 4 min。从图8中可以看出,和未处理的纤维膜相比,在 APPJ 改性过的纤维膜上,细胞拉长,呈现出 C2C12 细胞的特征纤维形态;并且,细胞在 APPJ 改性后的纤维膜上生长密度大大提高,而且形态上也更加铺展,说明 APPJ 表面改性大大提高了 PLLA 纤维膜的生物相容性和细胞亲和力,极大地促进了细胞的粘附、增殖和生长。



a) 未处理的 PLLA 纤维膜上



b) APPJ处理后的 PLLA 纤维膜上

图8 C2C12 细胞在未处理和 APPJ 处理后的 PLLA 纤维膜上培养 1 天时的 SEM 图

3 结语

本文首先通过静电纺丝法制备了 PLLA 纤维膜,然后提出使用针环电极结构的大气压 He/O_2 等离子体射流装置对 PLLA 纤维膜进行表面改性。研究结果表明, He/O_2 大气压等离子体射流处理可以在 PLLA 纤维膜表面有效地引入羟基($-OH$)和羧基($-COOH$)官能团,大幅改善材料表面的亲水

性能;小鼠成肌细胞 C2C12 在改性后的 PLLA 纤维膜上能更好地粘附、增殖和生长,表明 APPJ 表面改性性能大大提高 PLLA 纤维膜的生物相容性和细胞亲和力。本文的研究成果在组织工程、生物医学工程等领域具有重要的应用前景。

参考文献

- [1] 郭永伟. 多孔丝素蛋白材料及其在生物医学领域研究新进展[J]. 科技信息, 2013(4): 1-2.
- [2] Deng X, Sui G, Zhao M L, et al. Poly (L-lactic acid)/hydroxyapatite hybrid nanofibrous scaffolds prepared by electrospinning[J]. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2012, 18(1): 117-130.
- [3] 曹鼎. 高分子量聚乳酸基三维纳米纤维结构的构建及应用研究[D]. 北京:北京化工大学, 2011.
- [4] Yang Y W, Wu J Y, Liu C T, et al. Fast incorporation of primary amine group into polylactide surface for improving C2C12 cell proliferation using nitrogen-based atmospheric-pressure plasma jets[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2014, 102(1): 160-169.
- [5] Tim D, Rino M, Nathalie D G, et al. Nonthermal plasma technology as a versatile strategy for polymeric biomaterials surface modification: A review[J]. Biomacromolecules, 2009, 10(9): 2351-2376.
- [6] Park J K, Ju W T, Paek K H, et al. Pre-treatments of polymers by atmospheric pressure ejected plasma for adhesion improvement[J]. Surface and Coatings Technology, 2003, 174/175: 547-552.
- [7] Schutze A, Jeong J Y, Babayan S E, et al. The atmospheric-pressure plasma jet: a review and comparison to other plasma sources[J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 1998, 26(6): 1685-1694.

- [8] Lu X P, Jiang Z H, Xiong Q, et al. A single electrode room-temperature plasma jet device for biomedical applications[J]. Applied Physics Letters, 2008, 92(15): 666.
 - [9] Ribeiro S, Gomes A C, Etxebarria I, et al. Electroactive biomaterial surface engineering effects on muscle cells differentiation[J]. Materials Science and Engineering C, 2018, 92(1): 868-874.
 - [10] Kim C H, Khil M S, Kim H Y, et al. An improved hydrophilicity via electrospinning for enhanced cell attachment and proliferation[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2006, 78B(2): 283-290.
 - [11] Oh J S, Olabanji O T, Hale C, et al. Imaging gas and plasma interactions in the surface-chemical modification of polymers using micro-plasma jets[J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2011, 44(15): 155206.
 - [12] Surucu S, Masur K, Sasmazel H T, et al. Atmospheric plasma surface modifications of electrospun PCL/chitosan/PCL hybrid scaffolds by nozzle type plasma jets for usage of cell cultivation[J]. Applied Surface Science, 2016, 385:400-409.
 - [13] Weltmann K D, Brandenburg R, Woedtke T V, et al. Antimicrobial treatment of heat sensitive products by miniaturized atmospheric pressure plasma jets (APPJs)[J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2008, 41: 194008.
- * 国家自然科学基金项目(51375469)

作者简介:田振华(1994-),女,硕士研究生,主要从事大气压等离子体射流表面改性方法等方面的研究。

通信作者:文莉

收稿日期:2019-03-22

责任编辑 郑练