

聚乙烯醇-细菌纤维素复合可吸收生物屏障膜的制备及理化性能研究

赵正宜¹,肖剑虹¹,刘重远¹,邹多宏^{1,2}

摘要 目的 通过测试聚乙烯醇(PVA)-细菌纤维素(BC)复合可吸收生物屏障膜的拉伸强度,并检测其对鼠胚胎成纤维细胞增殖的影响,研究其作为新型骨组织工程生物屏障膜的可行性。方法 通过自沉积的方法制备不同比例PVA-BC共混膜及纯PVA膜。采用拉伸实验测试不同比例组别样品抗拉强度,取抗拉强度最大复合膜组浸泡于去离子水中测量其湿态抗拉强度。取抗拉强度最大复合膜组及纯PVA膜组,用扫描电镜观察其结构。对PVA、BC和PVA-BC复合膜进行X射线衍射和傅里叶变换红外光谱分析。分别将两组薄膜与NIH/3T3共培养后用CCK-8法检测各组细胞存活率,观察其生物相容性。结果 制备出均质PVA-BC复合膜,X射线衍射和傅里叶变换红外光谱分析显示复合膜中存在PVA和细菌纤维素,复合膜抗拉强度最初随BC比例增加而增加,当PVA和BC质量分数比为10:7时抗拉强度最大,达(155.5±14.7)MPa,该组湿态下强度达(13.8±1.2)MPa。细胞培养第1、4、7天后PVA-BC复合膜、纯PVA膜及空白组之间无明显差异($P>0.05$)。结论 PVA-BC共混膜干湿态下均具备一定的机械性能及良好的生物相容性,具有一定的临床应用前景。

关键词 聚乙烯醇;细菌纤维素;共混液;仿生结构材料

中图分类号 R 782

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)10-1513-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.001

引导性骨再生(guided bone regeneration, GBR)技术已经成为牙槽骨缺损修复与再生的常规及有效的治疗方案。目前临床常应用的屏障膜为可吸收生物膜,存在机械强度弱,容易穿孔并破裂等缺点^[1]。聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)是一种由聚醋酸乙烯酯水解而成的,无色、无毒、无腐蚀性、可降解的

水溶性有机高分子聚合物。PVA所表现出来的性能在生产、生活中具有相当广泛的应用,例如造纸、纺织品、粘合剂、涂料、薄膜以及药物输送等^[2-4]。细菌纤维素(bacterial cellulose, BC)是一种天然纤维素,由醋酸杆菌、固氮菌、根瘤菌及假单胞菌等细菌产生^[5]。BC不同于植物纤维素,其具有独特的结构特性,如高化学纯度、高杨氏模量、高吸水能力以及超细的网状纤维状结构,在医用敷料、组织工程及纳米合成功能材料等领域具有广泛的应用前景^[6-7]。该研究主要采用溶液共混的方法将PVA与BC共混,制备PVA-BC可吸收生物屏障膜,并对其物理性能和生物相容性进行研究,探索其作为新型骨组织工程生物屏障膜的可行性,为将来临床应用提供一种选择。

1 材料与方法

1.1 实验材料 PVA 1750±50(上海国药集团化学试剂有限公司),BC(生化级,阿拉丁生化科技股份有限公司,上海),鼠胚胎成纤维细胞(NIH/3T3细胞,中国科学院细胞库)。

1.2 试剂和仪器 DMEM、胰酶消化液(美国HyClone公司);胎牛血清(美国Gibco公司);CCK-8试剂盒(日本株式会社同仁化学研究所);力学万能实验机(5565A,美国英斯特朗公司);CO₂ 孵箱(美国Thermo公司);扫描电镜(Supra40,德国蔡司公司);X射线衍射仪(X'Pert3 Powder,荷兰帕纳科公司);傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet 8700,美国热电尼高力仪器公司);酶标仪(美国Bio-tek公司)。

1.3 薄膜制备 首先配制1 g/L PVA溶液,称取PVA固体加入去离子水中,放入磁子,在90℃下搅拌3 h获得透明PVA溶液。将BC以不同含量加入到PVA溶液中,分别制备PVA:BC质量分数比为10:3、10:5、10:7、10:9的溶液,搅拌2 h形成均匀的PVA/BC二元共混液,置于真空箱内多次去除气泡,然后将混合液倒入培养皿中,置于恒温加热台等待24 h干燥成膜,见图1。

2022-05-23 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31870969)

作者单位:¹安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究重点实验室,合肥 230032

²上海交通大学医学院附属第九人民医院·口腔医学院口腔外科,上海市口腔医学重点实验室,上海 200001

作者简介:赵正宜,女,硕士研究生;

邹多宏,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: zdhyy@ahmu.edu.cn

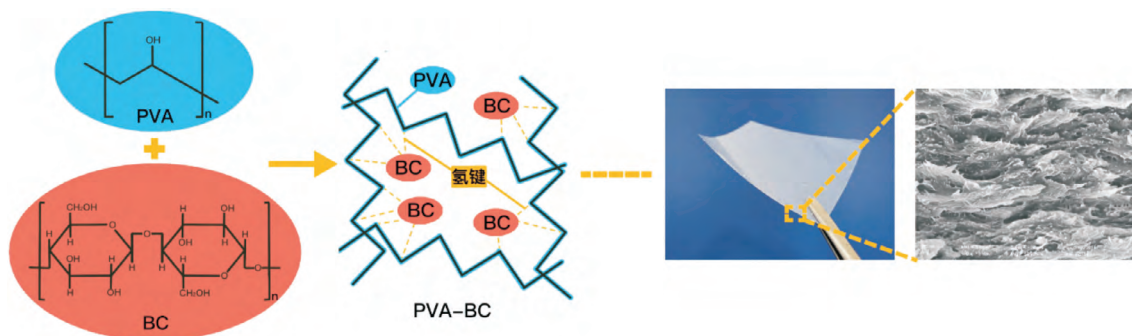


图1 PVA-BC复合膜的合成方案及形貌

1.4 力学测试 薄膜拉伸实验使用万能力学试验机(Instron 5565,美国)进行测试,使用500 N重力传感器,速度为0.01 mm/s。条形样品(50 mm × 3 mm)在室温条件下进行拉伸。每组样品重复测试6次。取抗拉强度最大的复合膜组,重新制备待测样品后浸泡于去离子水中1 h,同样的方法测量湿态样品抗拉强度,最后绘制出相应的应力-应变曲线和断裂应力值图。

1.5 样品表征 选取抗拉强度最大的复合膜组和纯PVA膜组样品,力学测试后收集断裂截面,经过制样、喷金等步骤,用扫描电镜观察两组截面的微观结构。采用X射线衍射分析仪扫描检测PVA、BC和PVA-BC薄膜,扫描速度为0.2°/min,在5°~55°(2θ)范围内进行分析。分别将PVA、BC和PVA-BC薄膜样品在傅里叶变换红外光谱仪上进行各成分分析,采集波长范围为500~4 000 cm⁻¹。

1.6 细胞相容性实验 采用CCK-8法测定薄膜对细胞增殖能力和活力的影响。取抗拉强度最大的复合膜组和纯PVA膜组,两组分别作为实验组和阴性实验组,按照国际标准组织(ISO/EN 10993-12)^[8]规定提取浸提液。将灭菌后的上述两组样品分别浸泡于含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基中,样品与培养基的比例为1 g/10 ml,24 h后获得浸提液。使用96孔板,NIH/3T3细胞播种,细胞密度为每孔1 × 10⁴个,空白对照组细胞仅用培养基培养,阴性实验组和实验组细胞贴壁后分别更换为每孔100 μl的纯PVA膜和抗拉强度最大的复合膜浸提液,每组每个时间点5个复孔,在37 °C、5% CO₂培养箱中培养。在第1、4、7天,配置含10% CCK-8的DMEM,每孔加100 μl,37 °C、5% CO₂培养2 h。用酶标仪在450 nm处读取吸光度(optical density, OD)值。

1.7 统计学处理 使用SPSS Statistics软件进行统计分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差

分析对各组的结果进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组膜抗拉强度的比较 图2为各组薄膜样品应力-应变曲线及断裂应力值。在一定范围内,随着BC含量的增加,PVA-BC复合膜的抗拉强度也增加,当PVA与BC的质量分数比为10:7时,复合膜的抗拉强度达到最大(155.5 ± 14.7) MPa,显著高于纯PVA薄膜(56.0 ± 6.7) MPa。随后继续增加BC的含量,抗拉强度开始下降,各组差异有统计学意义($F = 67.239, P < 0.001$);两两比较显示,纯PVA膜组与10:3、10:5、10:7、10:9 PVA-BC组组间差异均有统计学意义($P < 0.05$),10:7 PVA-BC组与10:3、10:5、10:9 PVA-BC组组间差异均有统计学意义($P < 0.05$),即当PVA与BC质量分数比为10:7时,复合膜的抗拉强度最大。考虑到GBR膜实际使用为体内湿态环境,取干态抗拉强度最大的10:7 PVA-BC膜组进行湿态下的力学测试。图2C、2D显示湿态下的复合膜强度达到(13.8 ± 1.2) MPa。

2.2 试件表征 纯PVA薄膜和PVA-BC复合膜的横断面电镜下观察结果显示,PVA薄膜的断面光滑致密,几乎无孔(图3A、3B),共混膜PVA-BC的横断面形貌略粗糙于纯PVA膜,厚度约为30 μm,BC的加入降低了材料的延展性,形成强韧的薄膜。结果表明,PVA薄膜加入BC后韧性和拉伸强度均有提高,未观察到团聚和宏观上的分离情况,表明薄膜中PVA和BC分散良好(图3C、3D)。XRD结果显示混合薄膜显示出多个衍射峰,分别为PVA的特征峰19°和BC的3个特征峰14°、16°和22°。图3F显示复合膜在3 410 cm⁻¹处有1个宽阔的吸收峰,在2 939 cm⁻¹、1 424 cm⁻¹、1 142 cm⁻¹、1 093 cm⁻¹和851 cm⁻¹均存在吸收峰,表明复合膜与PVA结晶度相关。复合膜在3 400 cm⁻¹、2 920 cm⁻¹、1 643

cm^{-1} 及 $1\ 064\ \text{cm}^{-1}$ 附近有明显吸收峰,表明所得产物具有纤维素的特征峰(图 3E)。

2.3 细胞相容性实验结果 CCK-8 法检测结果显示,在共培养的第 1、4、7 天的相同时间点进行检测,

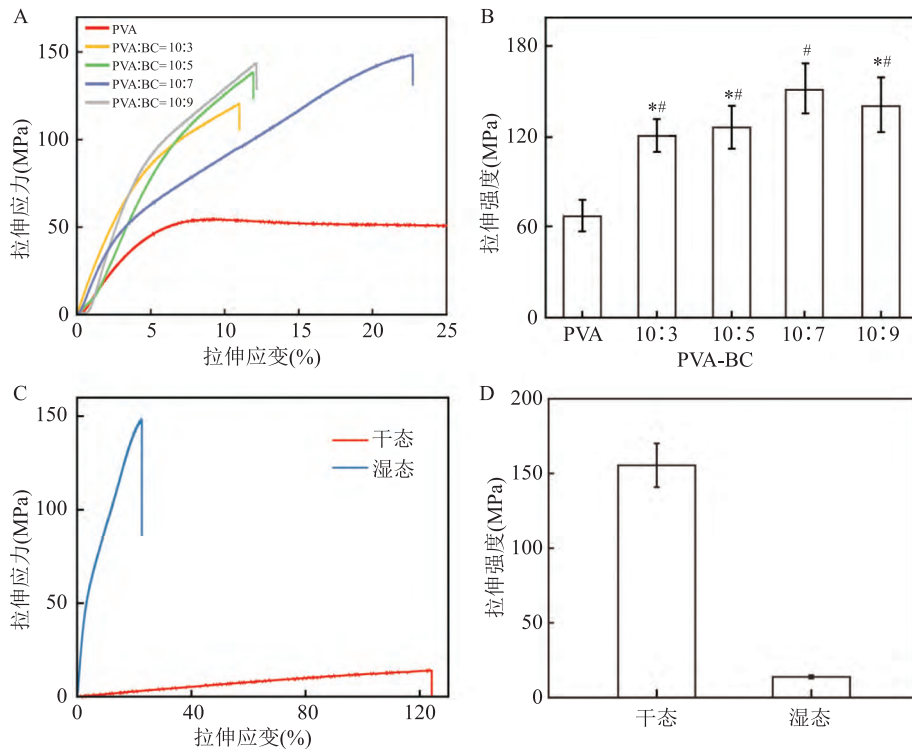


图 2 PVA-BC 复合膜的抗拉强度测试

A: 各组样品的典型拉伸应力-应变曲线; B: 各组样品的断裂应力值; 与 PVA 组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与 10:7 组比较: $^{*}P < 0.05$; C: PVA-BC 复合膜的典型拉伸应力-应变曲线干湿态对比; D: PVA-BC 复合膜的断裂应力值干湿态对比

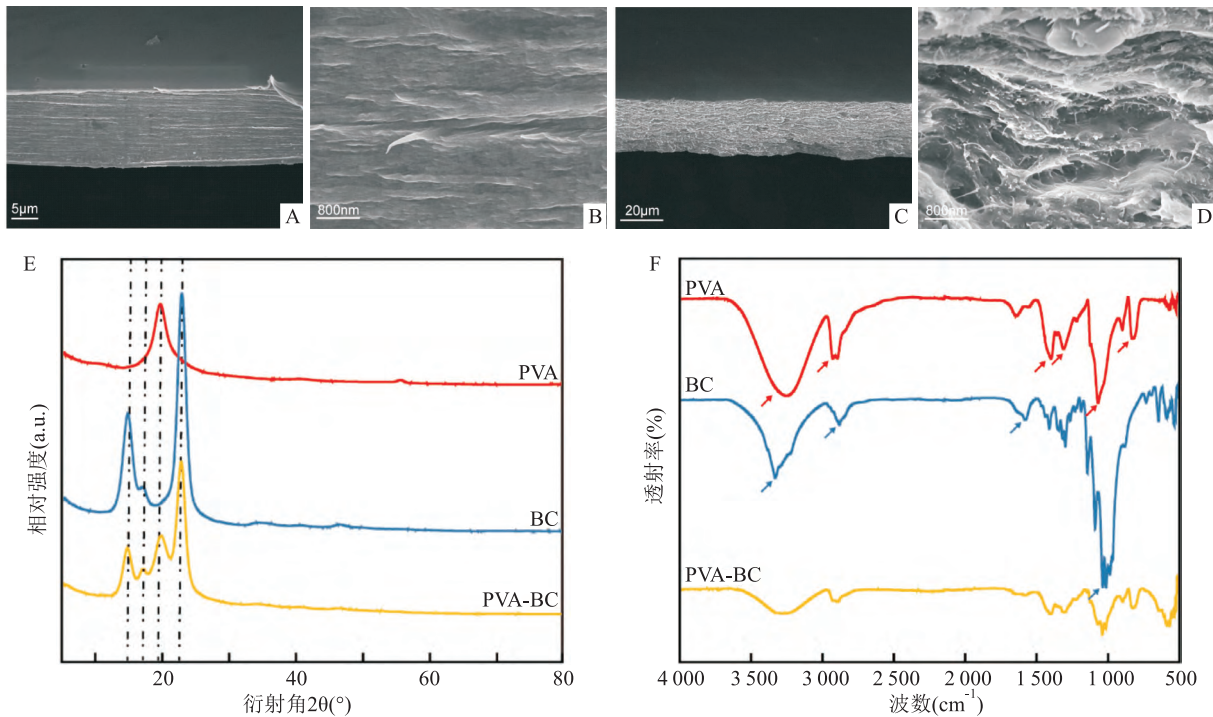


图 3 PVA-BC 复合膜的微观结构和成分分析

A, B: 纯 PVA 薄膜截面; C, D: PVA-BC 复合膜截面; E: PVA-BC 复合膜的 X 射线衍射结果; F: PVA-BC 复合膜的傅里叶变换红外光谱结果

NIH/3T3 细胞在空白对照组、阴性实验组和实验组都保持了较高的增殖水平,相同时间点各组 OD 值差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。说明 PVA-BC 薄膜具有良好的生物相容性。

表 1 各组材料与 NIH/3T3 细胞共培养不同时间后的 OD 值比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	第 4 天	第 7 天
实验	1.50 ± 0.058 1	2.65 ± 0.057 6	3.28 ± 0.014 4
阴性实验	1.45 ± 0.097 8	2.66 ± 0.088 2	3.30 ± 0.025 3
空白对照	1.51 ± 0.132 7	2.61 ± 0.066 2	3.27 ± 0.037 9
<i>P</i> 值	0.566	0.463	0.197
<i>F</i> 值	0.598	0.89	1.863

3 讨论

GBR 技术中的屏障膜将快速增长的软组织与缓慢生长的骨组织分离开,以达到屏障的作用,最终达到牙槽骨组织的修复与再生的效果。目前使用的 GBR 膜可分为可吸收膜和不可吸收膜,不可吸收膜虽然具有更加稳定的机械性能以提供稳定的骨修复环境,但却需要二次手术取出,另外也存在术后暴露的问题,从而增加了患者的二次创伤及骨增量失败的风险^[9];可吸收膜由天然或合成材料制成,植骨术后一定时间(2 周至几个月不等)完成吸收,无需二次手术取出,在一定时间内有效阻止了软组织进入骨修复区域,从而促进了新骨形成。但可吸收生物屏障膜存在机械强度不足的问题,这样不利于牙槽骨修复的效果,特别针对大面积骨缺损的修复重建(高度/宽度 > 5 mm)。

因此,本研究将 PVA 溶液和 BC 溶液以不同比例混合搅拌制备 PVA-BC 薄膜,旨在制备出新型可代谢高机械性能 GBR 膜。PVA 本身具有高亲水性和优异的力学性能,无毒且溶于水,具有良好的可降解性,是一种生物相容性良好的水凝胶,具有生物医学应用所需的特性^[10]。BC 在生物材料领域有着广泛的应用,其具有生物相容性好、亲水性强、机械强度高、比表面积大等优点,已有多项研究^[11-12]表明,向聚合物网络中引入 BC 可大大提高复合物的机械性能,可充当纳米复合材料的增强添加剂^[13]。因此,本研究旨在制备一种基于 PVA 的复合材料,由 PVA 作为连续相,添加 BC 作为增强纳米材料,BC 可通过广泛形成氢键与 PVA 聚合物基体发生强烈的相互作用,使 PVA 和 BC 纳米纤维表面形成牢固的界面,形成非常坚固的纳米复合材料^[14]。完成制

备后进行拉伸测试,当 PVA 与 BC 质量分数比为 10 : 7 时,复合膜抗拉强度达到最大 (155.5 ± 14.7) MPa,此外,PVA 和 BC 的高保水性使薄膜具有足够的柔韧性和湿润性,取该最强组,测试湿态下抗拉强度为 (13.8 ± 1.2) MPa,显著高于市售 Bio-Gide 胶原膜 1.16 MPa^[10]。因此,该复合膜在湿态情况下也具备一定强度。生物相容性实验表明 PVA-BC 膜具有良好的生物相容性。

综上所述,本研究通过溶液共混法制备出 PVA-BC 复合膜,并探索出最佳机械性能比例,对其结构、成分、形态进行表征,并进行生物相容性检测。结果表明,这种复合膜具有较高的机械性能,且生物相容性良好,具备成为 GBR 膜候选材料的潜力。下一步将通过体内大动物实验进一步明确其在牙槽骨缺损修复与再生中的作用。

参考文献

- [1] Elgali I, Omar O, Dahlin C. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited [J]. *Eur J Oral Sci*, 2017, 125(5):315-37.
- [2] Aslam M, Kalyar M A, Raza Z A. Polyvinyl alcohol: A review of research status and use of polyvinyl alcohol based nanocomposites [J]. *Polym Eng Sci*, 2018, 58(12):2119-32.
- [3] Kim J W, Chang J H. Syntheses of colorless and transparent polyimide membranes for microfiltration [J]. *Polymers (Basel)*, 2020, 12(7):1610.
- [4] Hosseini M S, Nabid M R. Synthesis of chemically cross-linked hydrogel films based on basil seed (*Ocimum basilicum L.*) mucilage for wound dressing drug delivery applications [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 163:336-47.
- [5] 周 璞,程东东,邹多宏. 抗菌高强复合膜的制备及其表征 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(11):1692-6.
- [6] Retegi A, Gabilondo N, Peña C. Bacterial cellulose films with controlled microstructure - mechanical property relationships [J]. *Cellulose*, 2009, 17(3):661-9.
- [7] Klemm D, Cranston E D, Fischer D. Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today's state [J]. *Mater Today*, 2018, 21(7):720-48.
- [8] Biological evaluation of medical devices-part 12: Sample preparation and reference materials: ISO 10993-12: 2021 [S/OL]. [2021-01]. <http://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10993:-12:ed-5:v1:en>.
- [9] Napavichayanun S, Yamdech R, Aramwit P. The safety and efficacy of bacterial nanocellulose wound dressing incorporating sericin and polyhexamethylene biguanide: *in vitro*, *in vivo* and clinical studies [J]. *Arch Dermatol Res*, 2016, 308(2):123-32.
- [10] Jia Y T, Gong J, Gu X H. Fabrication and characterization of poly(vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method [J]. *Carbohydr Polym*, 2007, 67(3):403-9.

- [11] Klemm D, Kramer F, Moritz S. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, 50(24):5438–66.
- [12] Österberg M, Cranston E D. Special issue on nanocellulose-editorial[J]. *Nord Pulp Pap Res J*, 2014, 29(1):4–5.
- [13] Eichhorn S J, Baillie C A, Zafeiropoulos N. Review: Current international research into cellulosic fibres and composites[J]. *J Mater Sci*, 2001, 36(9):2107–31.
- [14] Zhang K R, Gao H L, Pan X F. Multifunctional bilayer nanocomposite guided bone regeneration membrane[J]. *Matter*, 2019, 1(3):770–81.

Preparation and characterization of poly(vinyl alcohol)/bacterial cellulose guided bone regeneration composite film

Zhao Zhengyi¹, Xiao Jianhong¹, Liu Chongyuan¹, Zou Duohong^{1,2}

¹*Stomatological College of Anhui Medical University, The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Key Lab of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032;* ²*Dept of Oral Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai 200001*

Abstract *Objective* By testing the tensile strength of the poly(vinyl alcohol) (PVA)/bacterial cellulose(BC) composite membrane and its effect on the proliferation of mouse embryonic fibroblasts, its potential as new bone tissue engineering membrane were studied. *Methods* PVA-BC films of different proportions and pure PVA films were prepared by self-evaporation method. The tensile strength of each group was tested. The group with the highest tensile strength was immersed in deionized water for 0.5 h to measure its wet tensile strength. The microstructure of pure PVA film and the film with the highest tensile strength was observed by scanning electron microscopy (SEM). X-ray diffraction and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy were used to analyze pure PVA, pure BC, and the film with the highest tensile strength respectively. Cell counting kit-8 (CCK-8) was applied to detect the survival rate in the blank control group, the pure PVA film group, and the composite film group with the highest tensile strength. *Results* PVA-BC composite films were successfully prepared, X-ray diffraction and FTIR analysis revealed the co-presence of PVA and bacterial cellulose in the composite film. The initial tensile strength of the composite membrane increased with the BC ratio. When the concentration ratio of PVA to BC was 10 : 7, the tensile strength reached (155.5 ± 14.7) MPa, and wet samples reached (13.8 ± 1.2) MPa. The CCK-8 test of NIH/3T3 showed that there was no significant difference among the PVA-BC composite film group, pure PVA group and blank control group after 1, 4 and 7 days of cell culture ($P > 0.05$). *Conclusion* PVA-BC film fabricated by blending method obtain certain mechanical properties and biocompatibility in both wet and dry states, which may be an appropriate candidate as a GBR membranes for clinical application.

Key words poly(vinyl alcohol); bacterial cellulose; solution blending; biomimetic structural materials