

响应面法优化制备牦牛皮胶/PMVE-MA 复合支架材料及表征

张玉霞^{1,2},杨红霞¹,戎林^{1,2},魏立新¹,杜玉枝^{1*}

¹中国科学院西北高原生物研究所 青海省藏药药理学与安全性评价研究重点实验室,西宁 810000;

²中国科学院大学,北京 100049

摘要:为获得牦牛皮胶/PMVE-MA 复合支架材料的最佳制备条件,得到性能良好的支架材料,研究中以不同因素条件对制备的支架材料在溶血率方面的影响差异为考察指标,完成单因素筛选;在单因素实验的基础上,以浓度配比(牦牛皮胶:PMVE-MA)、搅拌温度和搅拌时间为自变量,复合支架材料溶血率为响应值,建立多元二次回归方程,通过响应面优化分析得到最佳制备条件,在该条件下制备复合支架材料,并对其进行溶血率测定,微观结构、溶胀度、降解率等物理性能方面的表征。响应面实验筛选得到的最佳制备条件:浓度配比(牦牛皮胶:PMVE-MA)6:1、搅拌温度 41 °C、搅拌时间 3.85 h,在上述条件下制备的复合支架材料,溶血率测定结果的实际值接近于理论值,说明模型可靠,支架材料的血液相容性较好;物理性能方面的表征结果显示:牦牛皮胶/PMVE-MA 复合支架材料溶胀度相对较低,力学性能良好,表明其具有较好的维持材料自身结构的性能。

关键词:响应面法;制备条件;支架材料;性能表征

中图分类号:R318.08

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022) Suppl-0068-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.S.011

Preparation of yak skin gelatin/PMVE-MA composite scaffold material by response surface methodology and its characterization

ZHANG Yu-xia^{1,2}, YANG Hong-xia¹, RONG Lin^{1,2}, WEI Li-xin¹, DU Yu-zhi^{1*}

¹Qinghai Key Laboratory of Tibetan Medicine Pharmacology and Safety Evaluation, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

²University of Chinese Academic of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: In order to determine the best preparation conditions for the yak skin gelatin/PMVE-MA composite scaffold material with a good performance, the effect of different preparation conditions on the hemolysis ratio of scaffold material was investigated to perform the single factor experiment. On the basis of single factor experiment, the multiple quadratic regression equation was established with concentration ratio (yak skin gelatin: PMVE-MA), stirring temperature and stirring time as three independent variables and hemolysis ratio as the response value. Then the best preparation condition was obtained by response surface optimization analysis. Finally, the combined scaffold material was prepared under the best condition, and the hemolysis ratio and physical properties such as the microstructure, swelling ratio, and degradation ratio were characterized. The optimal preparation condition selected by the response surface experiment was: concentration ratio (yak skin gelatin: PMVE-MA) 6:1, stirring temperature 41 °C, stirring time 3.85 h. The actual hemolysis ratio of scaffold material prepared under the above condition was close to the theoretical value, indicating that the model was reliable and the blood compatibility of stent material was also great. In addition, the characterization results of physical properties showed that the swelling ratio of combined scaffold material was relatively low, and the mechanical property was relatively great, which indicated that the prepared material had a good performance in maintaining its own structure.

Key words: response surface methodology; preparation conditions; scaffold material; properties characterization

收稿日期:2021-07-16 接受日期:2021-08-04

基金项目:青海省基础研究项目(2019-ZJ-7026)

* 通信作者 Tel:86-971-6132480; E-mail: yzdu@nwipb.cas.cn

近年来,复合支架材料成为医学组织工程领域的研究热点,与传统金属和高分子材料相比,天然生物材料具有可降解、降解产物无毒性、良好的生物相容性等特点,是制备可降解性组织工程支架材料的主要原料。动物明胶作为一种天然生物材料,已广泛应用于组织工程领域^[1-3],牦牛皮胶是以牦牛皮为原料提取出的一种含有丰富营养成分的明胶,由于牦牛生长条件不同于其他动物,因此提取自青藏高原牦牛的牦牛皮胶不仅含有更丰富的营养物质,其热稳定性也远高于其他动物明胶^[4,5]。牦牛皮是肉类加工的废物,只有其中的少数被用来制造成皮革制品,大多数牦牛皮通常都被丢弃,其中的高含量蛋白质没有得到有效利用,造成了严重的资源浪费和环境污染^[6],因此将其应用于组织工程领域,不仅能够减少对环境的污染,其中的营养成分也能被充分利用。

甲基乙烯基醚/马来酸酐共聚物(PMVE-MA)是一类经FDA批准的酸苷聚合物,其优势是生物降解性和低毒性,已在伤口愈合方面的研究中得到应用,还被用于包裹胶囊药物以增强生物粘附性^[7]。牦牛皮胶/PMVE-MA复合支架材料是由牦牛皮胶与PMVE-MA制成的复合材料,以期为血管组织工程领域的相关研究及牦牛皮胶的充分利用提供研究基础。

响应曲面优化设计法(response surface methodology)简称响应面法,是一种将实验设计和模型建立相结合以寻找最佳条件的实验优化方法。该法通过对实验过程的回归拟合,建立相应的曲面模型,充分考虑受测因素之间的相互作用对响应值的影响,其中的Box-Behnken design(BBD)能够在保证实验数量最小化的同时,实现对实验条件的优化^[8],目前该方法已经广泛应用于化学、生物学、食品学及工程学等各个领域^[9]。

1 材料

1.1 材料与试剂

牦牛皮胶(实验室自制);PMVE-MA(北京伊诺凯科技有限公司);冰乙酸(分析纯,上海广诺化学科技有限公司);生理盐水(山东华鲁制药有限公司);PBS(北京索莱宝科技有限公司);六亚甲基二异氰酸酯(HMDI,北京伊诺凯科技有限公司);异丙醇(分析纯,上海广诺化学科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

电子天平(AL105,梅特勒-托利多仪器(上海)

有限公司);加热型磁力搅拌器(加热型1EA,北京赛欧华创科技有限公司);冷冻干燥机(FD-1A-80+,北京博医康实验仪器有限公司);超低温冰箱(DW-HL398S,美菱);自动纯水机(UPH-I-40L,四川优普超纯科技有限公司);多功能酶标仪(PerinElmer Enspire公司);台式高速冷冻离心机(3-18KS,德国Sigma公司);数显恒温水浴锅(HH-8,邦西仪器科技(上海)有限公司);微机控制电子万能试验机(C45.105);扫描电子显微镜(SEM)(SU8010,日立)。

2 方法

2.1 牦牛皮胶/PMVE-MA复合支架材料的制备

用0.5 mol/L乙酸溶液分别溶解配制牦牛皮胶溶液和PMVE-MA溶液,两种溶液以1:1比例混合,在一定时间和温度下进行磁力搅拌,将搅拌后的混合溶液倒入合适的模具,在-80℃条件下冷冻24 h后进行冷冻干燥,对照品材料为0.5 mol/L乙酸溶液配制的纯牦牛皮胶溶液,其余制备步骤与样品材料相同。冷冻干燥后的材料样品在10% HMDI(以异丙醇配制)溶液中浸泡一定时间后用异丙醇清洗两遍,待异丙醇自然挥干,再用纯水清洗三遍。

2.2 溶血率测定

根据文献^[10]进行溶血实验,完成复合支架材料溶血率的测定。取健康SD大鼠的全血于抗凝采血管,4℃,3 000 r/min条件下离心15 min,取下层红细胞用生理盐水洗涤干净,将洗涤干净的红细胞用生理盐水稀释为2%红细胞溶液(1 mL红细胞+49 mL生理盐水)待用。将支架材料置于24孔板,每孔加入1 mL生理盐水在37℃水浴条件下平衡30 min,弃去生理盐水,加入已稀释的2%红细胞溶液与支架材料共同在37℃水浴中孵育1 h,将孵育后的红细胞溶液转移至2 mL离心管,在4℃,1 500 r/min条件下离心15 min,取上清液于96孔板(0.1 mL/孔),在545 nm处读取OD值,计算溶血率(HR)。其中阳性对照和阴性对照分别为纯水和生理盐水与2%红细胞溶液共孵育,溶血率计算公式如下:

$$HR = [(A_{ts} - A_{ns}) / (A_{ps} - A_{ns})] \times 100\% \quad (1)$$

式中,ts为测试样品;ns为阴性对照;ps为阳性对照。

2.3 溶胀度

通过对支架材料溶胀度的测量评价其吸水能力^[11],将干燥的支架材料称重记录(W_d),在室温条

件下浸泡于 pH 7.4 的 PBS 溶液中,在浸泡 24 h 后取出浸泡后的支架材料,用滤纸吸去材料表面残留的 PBS,并称量记录 (W_w),计算支架材料溶胀度 (SR),计算公式如下:

$$SR = [(W_w - W_d) / W_d] \times 100\% \quad (2)$$

2.4 降解率

在 37 °C 条件下测定复合支架材料的体外降解率。将制备好的支架材料称重 (W_0) 后浸泡于 pH 7.4 的 PBS 溶液中,在固定时间点 (1、3、5、7、10 天) 取出样品,冷冻干燥后称重记录 (W_t),浸泡过程中每 2 天更换一次 PBS 溶液。通过计算支架材料降解前后的质量损失率 (W_L) 对其降解程度进行表征。质量损失率计算公式如下:

$$W_L = [(W_0 - W_t) / W_0] \times 100\% \quad (3)$$

2.5 力学性能

根据文献^[12],利用 GB/T 1448-2005 中的方法,采用万能电子试验机进行测定复合支架材料的压缩强度,将复合支架材料裁成约 10 mm × 10 mm 的正方形块状,固定于装置,以 10 mm/min 速率进行测定。

利用 GB/T 1449-2005 中的方法,采用万能电子试验机测定复合支架材料的弯曲强度,将复合支架材料裁成 18 mm × 5 mm × 4 mm 的长方体状,固定于装置,以 5 mm/min 速率进行测定。

2.6 单因素实验

2.6.1 成分配比 (牦牛皮胶:PMVE-MA) 对支架材料溶血率的影响

在搅拌时间 2 h,搅拌温度 20 °C,预冻温度为 -80 °C,10% HMDI 浸泡时间 2 h 的条件下,测定牦牛

皮胶与 PMVE-MA 配比为 1:1、1:2、2:1、4:1 时复合支架材料的溶血率,确定两种成分的最佳配比。

2.6.2 搅拌温度对支架材料溶血率的影响

在牦牛皮胶与 PMVE-MA 配比 4:1,搅拌时间 2 h,预冻温度 -80 °C,10% HMDI 溶液浸泡时间 2 h 的条件下,分别测定磁力搅拌温度 20、37、45、55 °C 时复合支架材料的溶血率,确定最佳的磁力搅拌温度。

2.6.3 搅拌时间对支架材料溶血率的影响

在牦牛皮胶与 PMVE-MA 配比 4:1,搅拌温度 20 °C,预冻温度 -80 °C,10% HMDI 溶液浸泡时间 2 h 的条件下,分别测定磁力搅拌时间 0.5、1、2、3、4 h 时复合支架材料的溶血率,确定最佳的磁力搅拌时间。

2.6.4 预冻温度对支架材料溶血率的影响

在牦牛皮胶与 PMVE-MA 配比 4:1,搅拌时间 2 h,搅拌温度 20 °C,10% HMDI 溶液浸泡时间 2 h 的条件下,分别测定预冻温度 -20、-80、-196 °C 时复合支架材料的溶血率,确定最佳的预冻温度。

2.6.5 HMDI 浸泡时间对支架材料溶血率的影响

在牦牛皮胶与 PMVE-MA 配比 4:1,搅拌温度 20 °C,搅拌时间 2 h,预冻温度 -80 °C 的条件下,分别测定 10% HMDI 溶液浸泡时间 1、2、3 h 时复合支架材料的溶血率,确定最佳的浸泡时间。

2.8 响应面实验设计

在单因素实验的基础上,以配比 (牦牛皮胶:PMVE-MA)、搅拌温度、搅拌时间为自变量,以支架材料的溶血率为响应值,采用 Box-Behnken 设计优化牦牛皮胶/PMVE-MA 复合支架材料制备条件实验 (见表 1)。

表 1 响应面设计因子水平表

Table 1 Factors and levels in the response surface analysis

水平 Level	因素 Factor		
	A 配比 (牦牛皮胶:PMVE-MA) Ratio of Yak skin gelatin to PMVE-MA	B 搅拌温度 Stirring temperature(°C)	C 搅拌时间 Stirring time(h)
-1	2:1	37	2
0	4:1	45	3
1	8:1	55	4

2.8 数据统计与分析

利用 GraphPad Prism 7 和 Design-Expert 8.6 对实验数据进行分析处理,实验结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析判断结果显著性, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 单因素实验

3.1.1 浓度配比 (牦牛皮胶:PMVE-MA) 对支架材料溶血率的影响

将 8% W/V 的牦牛皮胶和 8%、16%、4%、2%

W/V 的 PMVE-MA 聚合物以体积比为 1:1 的比例混合,制成复合支架材料,测定不同浓度配比复合支架材料对溶血率的影响。图 1 表明,没有 PMVE-MA 聚合物成分的对照品材料溶血率最低,且低于 5%,可视为该材料不引起溶血反应。添加 PMVE-MA 聚合物后,除成分配比为 4:1 的材料外,其他配比的材料溶血率均有显著升高,其中二者浓度配比为 1:1 时,材料溶血率达到最高,且远高于 5%,成分配比为 1:2 和 2:1 时,材料的溶血率明显低于浓度配比为 1:1 的材料,但仍高于 5%,即视为会引起溶血反应。聚合物 PMVE-MA 的添加导致支架材料的两种主要成分间发生反应,进而对复合支架材料的溶血率产生影响,溶血率测定结果表明,较高浓度的 PMVE-MA 将对材料溶血率产生一定影响,而低浓度 PMVE-MA 的添加对支架材料溶血率无明显影响。因此,选取牦牛皮胶与 PMVE-MA 的最佳配比为 4:1。

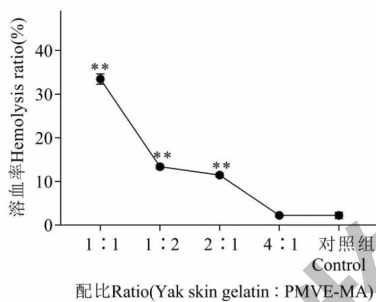


图 1 成分配比 (牦牛皮胶:PMVE-MA) 对支架材料溶血率的影响

Fig. 1 Effect of distribution ratio (Yak skin gelatin: PMVE-MA) on hemolysis rate of scaffold materials

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.1.2 搅拌温度对支架材料溶血率的影响

复合支架材料制备过程中,磁力搅拌温度对牦牛皮胶和 PMVE-MA 反应程度有一定影响,故选取磁力搅拌温度 20 °C (室温), 37、45、55 °C, 分别制备对应温度条件下的对照品和样品材料,测定不同搅拌温度对复合支架材料溶血率的影响。实验表明,搅拌温度为 20 °C (室温) 时,牦牛皮胶与 PMVE-MA 无法充分反应。由图 2 可知,支架材料制备过程中,搅拌温度对样品材料和对照品材料的影响几乎呈相反趋势,随搅拌温度升高,样品材料溶血率呈降低趋势,对照品材料溶血率呈升高趋势,但各搅拌温度下制备的支架材料溶血率均低于 5%,即各搅拌温度

下制备的材料均不引起溶血反应。不考虑反应不充分的搅拌温度 20 °C 条件,搅拌温度 45 °C 时,对照品材料和样品材料的溶血率均相对较低,与 45 °C 条件下的对照品材料相比,55 °C 条件下的对照品材料溶血率显著升高,其余各温度条件下的样品和对照品材料溶血率与 45 °C 条件下的材料溶血率均无显著性差异,但均高于搅拌温度 45 °C 条件下制备材料的溶血率。因此,选取最佳搅拌温度为 45 °C。

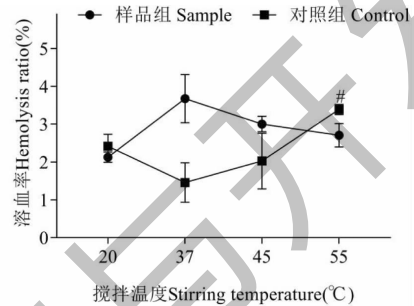


图 2 搅拌温度对支架材料溶血率的影响

Fig. 2 Effect of stirring temperature on hemolysis rate of scaffold materials

注:与 45 °C 条件下的对照品材料相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 45 °C 条件下的样品材料相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with control material at 45 °C, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with sample material at 45 °C, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.1.3 搅拌时间对支架材料溶血率的影响

复合支架材料制备过程中,磁力搅拌时间与牦牛皮胶和 PMVE-MA 反应程度也有一定相关性,因此,选取磁力搅拌时间 0.5、1、2、3、4 h, 分别制备对应搅拌时间下的对照品和样品材料,测定不同搅拌时间对复合支架材料溶血率的影响。实验证明搅拌时间太短可能导致牦牛皮胶与 PMVE-MA 反应不充分,材料溶血率相对较低。实验结果如图 3 所示,所有材料的溶血率均低于 5%,但搅拌时间为 3 h 时,对照品和样品材料溶血率均最低,与 3 h 的材料相比,1 h 对照品、样品材料及 4 h 样品材料的溶血率均与其有极显著差异,2 h 样品材料与其有显著性差异。因此,选取最佳搅拌时间为 3 h。

3.1.4 预冻温度对支架材料溶血率的影响

图 4 显示,各预冻温度下,复合支架材料的溶血率变化不明显,溶血率均低于 5%,其中在预冻温度 -196 °C 条件下的对照品和样品材料的溶血率相对最低。根据实验情况,预冻温度 -20 °C 时,将材料从模具转移至相应容器进行冻干的过程中,冷冻的

材料样品表面容易发生融化现象,而在预冻温度-196 ℃条件下,样品材料溶血率略有升高。因此,选

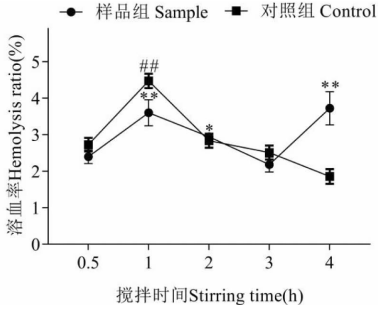


图3 搅拌时间对支架材料溶血率的影响

Fig. 3 Effect of stirring time on hemolysis rate of scaffold materials

注:与3 h条件下的对照品材料相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与3 h条件下的样品材料相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with control material at 3 h, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with sample material at 3 h, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

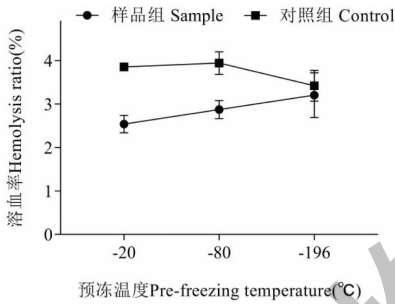


图4 预冻温度对支架材料溶血率的影响

Fig. 4 Effect of pre-freezing temperature on hemolysis rate of scaffold materials

取最佳预冻温度为-80 ℃。

3.1.5 HMDI 浸泡时间对支架材料溶血率的影响

HMDI 通常被用作交联剂或偶联剂,以完成复合材料的界面改性等^[13,14],本实验为考察 HMDI 溶液与复合支架材料交联时间对材料溶血率的影响,分别测定在 10% HMDI 溶液浸泡复合支架材料的时间为 1、2、3 h 时样品材料和对照品材料的溶血率。由图 5 可知,随着 10% HMDI 溶液浸泡时间的延长,复合支架材料的溶血率变化不大,样品材料的溶血率均在 1% 左右,对照品材料溶血率在 2.5% 左右,表明浸泡时间对复合支架材料的溶血率无明显影响。因此,选取 HMDI 溶液最佳浸泡时间为 2 h。

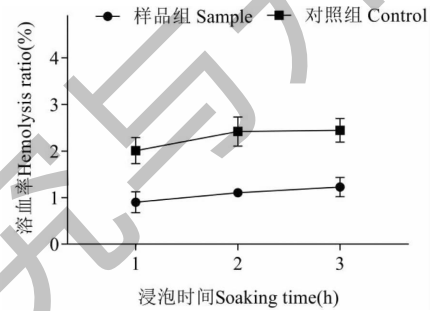


图5 浸泡时间对支架材料溶血率的影响

Fig. 5 Effect of soaking time on hemolysis rate of scaffold materials

3.2 响应面优化分析

3.2.1 响应面实验结果

采用 Design-expert 8.0.6 软件进行数据处理,表 2 是 Box-Behnken 实验设计与结果。

表2 Box-Behnken 实验设计与结果

Table 2 Box-Behnken design and results

实验号 No.	A: 配比 Ratio of Yak skin gelatin to PMVE-MA	B: 搅拌温度 Stirring temperature(°C)	C: 搅拌时间 Stirring time(h)	Y: 溶血率 Hemolysis ratio(%)
1	2:1	45	2	9.02 ± 0.35
2	2:1	55	3	8.52 ± 1.38
3	8:1	45	2	0.10 ± 0.00
4	4:1	45	3	0.70 ± 0.52
5	8:1	55	3	1.00 ± 0.60
6	4:1	37	4	0.60 ± 0.35
7	4:1	37	2	1.20 ± 0.17
8	4:1	55	4	0.90 ± 0.63
9	4:1	45	3	1.10 ± 0.46
10	4:1	55	2	1.60 ± 0.80
11	4:1	45	3	1.10 ± 0.35

续表 2 (Continued Tab. 2)

实验号 No.	A:配比 Ratio of Yak skin gelatin to PMVE-MA	B:搅拌温度 Stirring temperature(°C)	C:搅拌时间 Stirring time (h)	Y:溶血率 Hemolysis ratio(%)
12	8:1	45	4	0.40 ± 0.30
13	4:1	45	3	0.60 ± 0.17
14	2:1	37	3	9.12 ± 0.30
15	2:1	45	4	7.82 ± 0.17
16	4:1	45	3	0.60 ± 0.46
17	8:1	37	3	0.30 ± 0.17

3.2.2 回归模型的建立及方差分析

以配比(牦牛皮胶:PMVE-MA)(A)、搅拌温度(B)、搅拌时间(C)为响应变量,溶血率(Y)为响应值建立模型。采用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 中的数据进行多元回归分析,优化后得到溶血率对配比、搅拌温度、搅拌时间三因素的模型方程:

$$Y = +1.91 + 4.06A + 0.045B - 0.33C - 0.33AB - 0.34AC - 0.037BC + 2.50A^2 + 0.32B^2 - 0.079C^2 \quad (4)$$

表 3 的方差分析结果显示,该模型的 $F = 401.77$, $P < 0.0001$,模型显著性高,表明该模型可信度好^[15]。回归模型方差分析结果表明,配比和搅拌时间对材料溶血率有极显著影响,且根据 F 值可

判断,在实验选取的各因素水平范围内,三个因素对材料溶血率影响的显著性顺序依次是:配比(A) > 搅拌时间(C) > 搅拌温度(B),搅拌温度(B)对材料溶血率的影响无显著性,各因素间交互作用对溶血率的影响顺序为:AC > AB > BC,配比(A)与搅拌温度(B)之间和配比(A)与搅拌时间(C)之间的交互作用呈显著性。该模型失拟项 $P = 0.7064 > 0.05$,不具有显著性,即由误差引起的失拟不显著,且 $R^2 = 0.9981$, $R^2_{Adj} = 0.9956$,均接近于 1,表明模型可靠^[16,17],可用于复合支架材料制备条件和溶血率的分析及预测。

表 3 回归模型的方差分析
Table 3 Analysis of variance (ANOVA)

变异来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	P	显著性 Significance
模型 Model	190.34	9	21.15	401.77	<0.0001	Significant
A	131.42	1	131.42	2496.51	<0.0001	
B	0.015	1	0.015	0.29	0.6043	
C	0.84	1	0.84	16.04	0.0052	
AB	0.46	1	0.46	8.80	0.0209	
AC	0.49	1	0.49	9.31	0.0185	
BC	5.419E-003	1	5.419E-003	0.10	0.7577	
A ²	19.67	1	19.67	373.64	<0.0001	
B ²	0.42	1	0.42	7.99	0.0255	
C ²	0.026	1	0.026	0.50	0.5040	
残差 Residual	0.37	7	0.053			
失拟 Lack of fit	0.099	3	0.033	0.49	0.7064	Not significant
误差 Pure error	0.27	4	0.067			
总变异 Cor total	190.71	16				

$$R^2 = 0.9981; R^2_{Adj} = 0.9956$$

3.2.3 两因素间交互作用的响应面分析

对浓度配比、搅拌温度和搅拌时间三因素的交互作用进行分析,各因素对材料溶血率的响应面等高线图和三维图如图 6~8 所示。响应面能够直接反映各实验因素对材料溶血率的影响程度,响应面坡度越陡,表明该实验因素对材料溶血率的影响越大。等高线图是响应面在底面的投影,能够反映两因素间交互作用的强弱,等高线图呈椭圆形时,表明两因素间交互作用显著。图 6~8 结果显示,配比的

响应面坡度最陡,搅拌时间次之,搅拌温度最缓,表明搅拌温度对材料溶血率的影响不明显。浓度配比和搅拌时间的交互作用对材料溶血率的影响最为显著,浓度配比和搅拌温度的交互作用次之,搅拌温度和搅拌时间的交互作用对材料溶血率影响不明显,其原因可能是材料溶血率的变化主要由 PMVE-MA 的浓度变化引起,PMVE-MA 浓度越高,材料溶血率越大,该结果与 Chhabra^[18] 的实验结果一致。

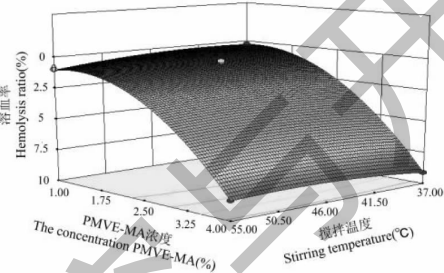
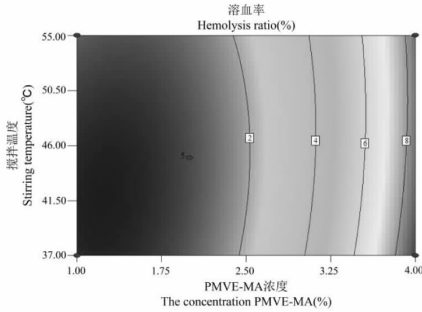


图 6 配比和搅拌温度交互作用的等高线和响应面

Fig. 6 Contour and response surface for interactions of ratio and stirring temperature

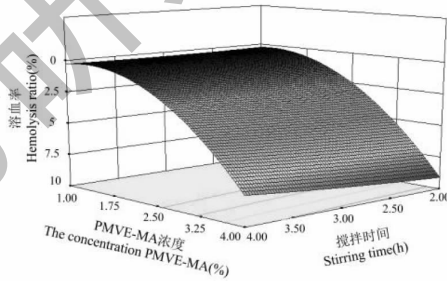
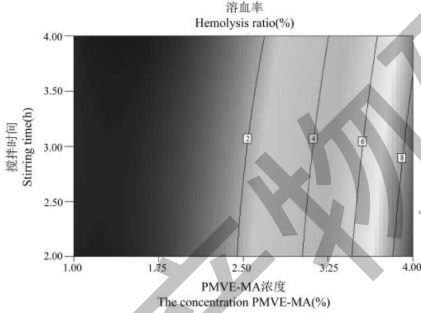


图 7 配比和搅拌时间交互作用的等高线和响应面

Fig. 7 Contour and response surface for interactions of ratio and stirring time

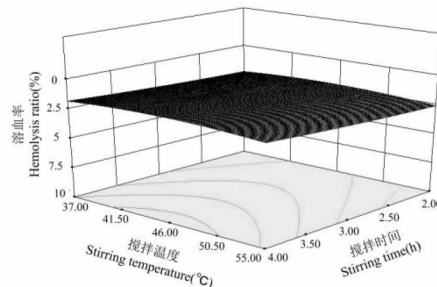
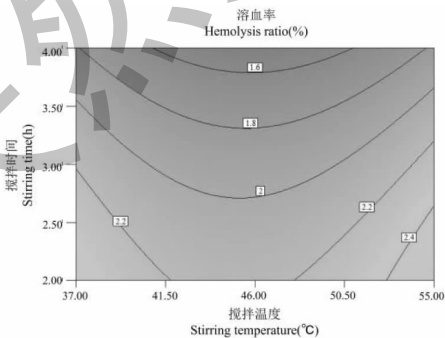


图 8 搅拌温度和搅拌时间交互作用的等高线和响应面

Fig. 8 Contour and response surface for interactions of stirring temperature and stirring time

3.2.4 最佳制备条件预测及验证

通过 Design Expert 软件分析,制备牦牛皮胶/

PMVE-MA 复合支架材料的最优工艺条件为:配比 6.25:1(牦牛皮胶 8% W/V, PMVE-MA 1.28% W/

V), 搅拌温度 40.84 °C, 搅拌时间 3.88 h, 在该条件下, 制备的复合材料溶血率理论值为 0.092%。根据实际情况, 将复合支架材料的制备条件修正为: 配比 6:1 (牦牛皮胶 8% W/V, PMVE-MA 1.33% W/V), 搅拌温度 41 °C, 搅拌时间 3.85 h。

在最佳制备条件下进行三组平行验证实验, 测得材料溶血率平均值为 0.145%, 与模型值接近, 说明该模型真实可靠, 可用于预测牦牛皮胶/PMVE-MA 复合支架材料的制备条件。

3.3 材料的表征

通过微观结构的观察和溶胀度、降解率、力学性

能的测定, 对上述最佳制备条件下制备得到的复合支架材料进行表征。

3.3.1 微观结构

样品形貌如图 9 所示。图 9 中 A 和 B 是同等放大倍数 (500 ×) 下的纯牦牛皮胶材料和牦牛皮胶/PMVE-MA 复合支架材料的断面 SEM。由图 9A 可观察到, 纯牦牛皮胶材料的断面空隙较少, 空隙尺寸分布比较均匀, 材料比较致密; 而图 9B 复合材料的断面呈现松散片层结构, 含有较多不规则空隙, 这种互通的空隙结构可能有利于细胞生长和增殖^[20]。

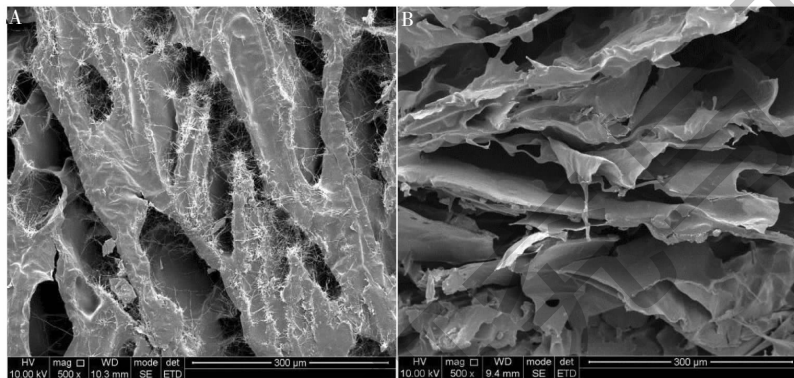


图 9 支架材料的微观结构图 (500 ×)

Fig. 9 SEM micrograph of scaffold materials (500 ×)

注: A: 纯牦牛皮胶材料; B: 牦牛皮胶/PMVE-MA 复合支架材料。Note: A: Pure yak skin gelatin material; B: Yak skin gelatin/PMVE-MA composite scaffold materials.

3.3.2 溶胀度

溶胀度是支架材料的一个重要特性, 良好的溶胀性能有利于细胞在支架材料上的粘附和增殖。图 10A 是复合支架材料在 PBS 溶液中浸泡 1、3、5、10、12、24 h 后的溶胀度变化情况, 由图可知, 材料溶胀度在开始浸泡的 1 h 内迅速升高, 后续时间点均略有升高, 在浸泡 12 h 以后, 溶胀度趋于平稳, 无明显

升高趋势。支架材料的溶胀性能与聚合物亲水性和材料微观结构有关, 由于 PMVE-MA 本身具有良好的保水性^[20], 支架材料表现出较好的溶胀性能。结合 SEM 观察结果, 与纯牦牛皮胶材料相比, 复合支架材料有较多空隙结构, 可进一步促进材料发生溶胀; 与 Chhabra 等^[18]制备的明胶/PMVE-MA 复合支架材料溶胀度相比, 本研究支架材料的溶胀度明显

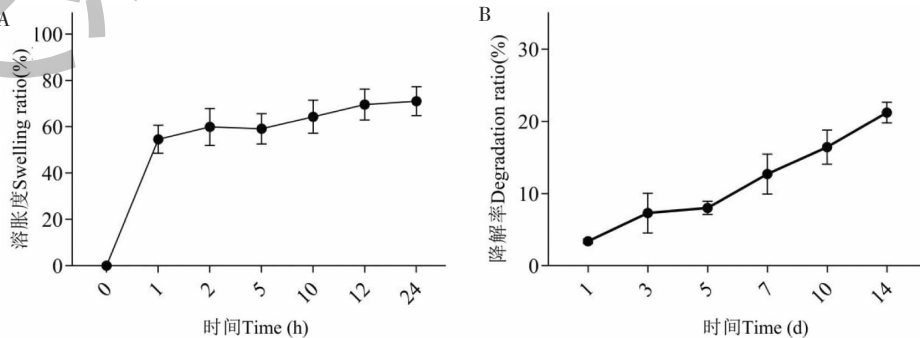


图 10 复合支架材料在不同时间的溶胀度 (A) 和降解率 (B) 变化

Fig. 10 Changes of swelling ratio (A) and degradation ratio (B) of composite scaffolds at different times

更低。有研究报道^[21],过高的溶胀比表示有过量水分进入支架材料内部,可能导致支架材料产生由内向外的压力,使其微观结构遭到破坏,导致力学性能降低,且有可能对细胞在支架材料上的粘附行为产生影响。因此,本研究制备的复合支架材料溶胀度介于纯牦牛皮胶材料和明胶/PMVE-MA 复合支架材料溶胀度之间,有利于维持其自身内部结构,推测对细胞粘附无明显影响。

3.3.3 降解性能

图 10B 是复合支架材料在室温条件下,在 PBS 溶液中浸泡 1、3、5、7、10、14 天后的质量损失率,显示了在不同时间点复合支架材料的降解程度,由图可知,材料降解率随时间推移呈逐渐增大的趋势,第 10 天降解率达到 16.44%,即 10 天后仍然 73.56% 的支架材料,基本满足支架材料植入体内的时间要求。

3.3.4 力学性能

支架材料应力-应变曲线如图 11 所示,样品材料和对照品材料的压缩强度结果分别为 269.711 ± 43.265 、 101.102 ± 180.045 kPa,对照品材料的压缩强度明显高于样品材料,可能原因是对照品材料本身空隙较少,结构较致密,表明由于聚合物 PMVE-MA 的添加,复合支架材料的微观结构发生改变,导致其力学性能有所降低,但样品材料的压缩强度接近于 Zhu 等^[22]制备的血管支架材料,仍能满足体内血管支架材料的要求。

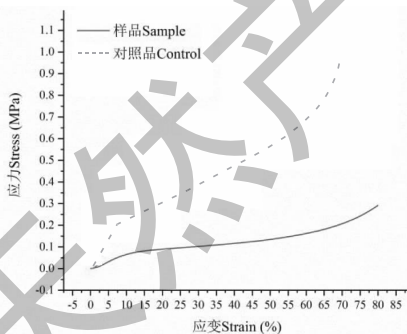


图 11 支架材料应力-应变曲线图

Fig. 11 Stress and strain curve of scaffold material

4 结论

本实验考察了在选取的制备条件范围内,浓度配比、搅拌温度和搅拌时间三个因素对材料溶血率的影响,利用响应面法对牦牛皮胶/PMVE-MA 复合支架材料的制备条件进行优化,实验结果表明:三因素对响应值影响顺序为:浓度配比(A) > 搅拌时间

(C) > 搅拌温度(B),其中浓度配比和搅拌时间的交互作用对溶血率影响最为显著;最终确定的最佳制备条件为:浓度配比(牦牛皮胶:PMVE-MA)6:1、搅拌温度 41 °C、搅拌时间 3.85 h。在此条件下制备的得到的复合支架材料溶血率极低,平均值为 0.145%,该值与模型预测值接近,说明该模型真实可靠。

对最佳制备条件下得到的牦牛皮胶/PMVE-MA 复合支架材料进行相关研究,溶血率测定结果显示,其溶血率较低,表明该条件下制备的支架材料有良好的血液相容性;牦牛皮胶/PMVE-MA 复合支架材料相比于纯牦牛皮胶材料,力学性能较低,但复合材料具有更良好的微观结构,更适合细胞生长,且其力学性能也能够满足血管支架材料体内实验的要求。牦牛作为青藏高原的特色资源,牦牛皮胶/PMVE-MA 复合支架材料不仅在组织工程领域的潜力可期,同时也为牦牛皮附加值的提升和进一步开发利用提供新的科研思路。

参考文献

- 1 Wang HY, Liang YP, Li YY, et al. Preparation and biochemical properties of collagen sponges from fish[J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong(华中科技大学学报:医学版), 2012, 41: 709-715.
- 2 Radhika Rajasree SR, Gobalakrishnan M, Aranganathan L, et al. Fabrication and characterization of chitosan based collagen/gelatin composite scaffolds from big eye snapper *Priacanthus hamrur* skin for antimicrobial and anti oxidant applications[J]. Mater Sci Eng C, 2020, 107: 110270.
- 3 Kim H, Yang GH, Kim GH. Three-dimensional gelatin/PVA scaffold with nanofibrillated collagen surface for applications in hard-tissue regeneration[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 135: 21-28.
- 4 Zhang CQ, Xing YX, Hu FZ. Analysis and evaluation of amino acids and mineral composition in skin glue of yak[J]. Mod Sci Instrum(现代科学仪器), 2006(3): 50-51.
- 5 Xu MQ, Wei LX, Xiao YC, et al. Physicochemical and functional properties of gelatin extracted from Yak skin[J]. Int J Biol Macromol, 2017, 95: 1246-1253.
- 6 Tian L, Liu JH, Ma L, et al. Isolation and purification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides from yak (*Bos grunniens*) skin[J]. J Food Process Preserv, 2017, 41(5): 1-11.
- 7 Dong XP, Li L, Xu J, et al. Rheological behavior of PMVE-MA aqueous solution with metallic cations[J]. Front Chem Sci Eng, 2011, 5(1): 126-130.

- 8 Guezane CE, Moudden HE, Harhar H, et al. Optimization of roasting conditions on the bioactive compounds and their antioxidant power from *Opuntia ficus-indica* seeds using response surface methodology (RSM) [J]. *Biointerface Res Appl Chem*, 2020, 11:10510-10532.
- 9 Wang YF, Wang CG. Theory and application of the response surface method[J]. *J Minzu Univ China; Nat Sci (中央民族大学学报:自然科学版)*, 2005(3):236-240.
- 10 Javanmard SH, Anari J, Kharazi AZ, et al. *In vitro* hemocompatibility and cytocompatibility of a three-layered vascular scaffold fabricated by sequential electrospinning of PCL, collagen, and PLLA nanofibers[J]. *J Biomater Appl*, 2016, 31:438-449.
- 11 Liu XQ, Wang J, Dong FS, et al. Cytocompatibility and biologic characteristics of synthetic scaffold materials of rabbit acellular vascular matrix combining with human-like collagen I[J]. *J Biomater Appl*, 2017, 32:463-471.
- 12 Wang XT, Gu B, Huang LJ, et al. Optimization of PLA/cassava residues wood plastic composites by response surface methodology[J]. *Eng Plast Appl (工程塑料应用)*, 2017, 45(2):51-55.
- 13 Han Q, Yang GS, Yu MM, et al. Preparation and interfacial modification of corn stalk cellulose reinforced polylactic acid composites[J]. *J Cellul Sci Technol (纤维素科学与技术)*, 2019, 27(1):17-22.
- 14 Li N, Zhang Q, Zhang QQ, et al. Synthesis and biocompatibility of amphiphilic graphene oxid[J]. *Chem J Chin Univ (高等学校化学学报)*, 2013, 34(1):50-54.
- 15 Zhang ZM, Zheng HL. Optimization for decolorization of azo dye acid green 20 by ultrasound and H₂O₂ using response surface methodology [J]. *J Hazard Mater*, 2009, 172:1388-1393.
- 16 Biira S, Crouse PL, Bissett H, et al. Optimisation of the synthesis of ZrC coatings in a radio frequency induction-heating chemical vapour deposition system using response surface methodology[J]. *Thin Solid Films*, 2017, 624:61-69.
- 17 Kumar S, Joshi J, Kumar V, et al. Effect of immobilized enzymes naringinase and tannase produced from aspergillus Sp. Isolate Mk156394 isolated from rotten pomelo on quality characteristics of citrus limetta juice and process optimization by using response surface methodology[J]. *Biointerface Res Appl Chem*, 2020, 11:9646-9657.
- 18 Chhabra H, Gupta P, Verma PJ, et al. Gelatin-PMVE/MA composite scaffold promotes expansion of embryonic stem cells[J]. *Mater Sci Eng C*, 2014, 37:184-194.
- 19 Liang JH, Lv ZY, Xie YF, et al. Preparation and properties of functional polyester porous scaffold[J]. *Synthetic Technol Appl (合成技术及应用)*, 2018, 33(2):14-17.
- 20 Zhao LJ, Hu WM. Synthesis and characterization of copolymer of methyl vinyl ether and maleic anhydrid[J]. *J Zhejiang Univ; Eng Sci (浙江大学学报:工学版)*, 2005, 39:1082-1085.
- 21 Wang BW, Ma R, Wu F, et al. Preparation and characterization of graphene oxide-sodium alginate-chitosan composite scaffold[J]. *Chem J Chin Univ (高等学校化学学报)*, 2020, 41:2099-2106.
- 22 Zhu CH, Fan DD, Wang YY. Human-like collagen/hyaluronic acid 3D scaffolds for vascular tissue engineering[J]. *Mater Sci Eng C*, 2014, 34:393-401.