

• 实验研究 Experimental research •

碳纳米管-聚氨酯复合膜的力学特性及生物相容性初步研究

董 生, 袁 正, 吴胜伟, 李文新

【摘要】 目的 探讨碳纳米管-聚氨酯复合膜的力学特性和生物相容性。方法 将经超声处理的碳纳米管与聚氨酯混合制成复合膜,用万能材料试验机检测不同质量比的复合膜的力学特性,在支架弯曲 90°时电镜观察膜的表面,将不同含量的复合膜溶液与人肝癌细胞 7721 细胞培养进行细胞毒性试验,用浸涂法制备碳纳米管-聚氨酯覆膜金属支架,并置入兔食管进行活体评价。结果 碳纳米管含量为 0、0.1%、0.3%和 0.5%时,对应的复合膜拉伸强度(MPa)和复合膜断裂延长率(%)分别为:4.62/900、6.05/730、8.26/704、5.7/450。支架弯曲 90°,用电镜扫描表面光滑,未见裂痕。当碳纳米管含量为 0.5%和 1.0%时,对细胞生长有明显抑制作用。在兔食管放置 30 d 后碳纳米管-聚氨酯复合膜未见裂纹、老化降解等现象。结论 添加适量的碳纳米管的聚氨酯膜能改善复合膜的力学特性,同时有较好的生物相容性。

【关键词】 碳纳米管; 聚氨酯; 力学特征; 生物相容性; 支架

中图分类号:R197.39 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2011)-02-0127-04

The mechanics and biocompatibility characteristics of carbon nanotubes-polyurethane composite membranes: a preliminary study DONG Sheng, YUAN Zheng, WU Sheng-wei, LI Wen-xin. Department of Radiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
Corresponding author: DONG Sheng, E-mail: dongsheng2828@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To discuss the mechanics and biocompatibility characteristics of carbon nanotubes-polyurethane composite membranes. **Methods** The mechanics property of carbon nanotubes-polyurethane composite membranes with different carbon nanotubes contents were tested by universal material testing machine. The surface of the membranes was observed by electron microscope when the stent was bent 90 degree. And its cytotoxicity was tested by cultivating study with 7721 cell. The metallic stent that was covered with carbon nanotubes-polyurethane composite membrane by using dip-coating method was inserted in rabbit esophagus in order to evaluate its biocompatibility in vivo. **Results** Composite membranes tensile strength (MPa) and elongation at break (%) were 4.62/900, 6.05/730, 8.26/704 and 5.7/450 when the carbon nanotubes contents were 0%, 0.1%, 0.3% and 0.5%, respectively. If the stent was bent at 90 degree, its surface was still smooth without any fractures when it was scanned by electron microscope. Composite membranes had critical cytotoxicity when its carbon nanotubes content was up to 0.5% and 1.0%. No fissure nor degradation of composite membranes occurred at 30 days after composite membrane covered metallic stent was inserted in rabbit esophagus. **Conclusion** When moderate carbon nanotubes are added into polyurethane composite membrane, the mechanics and biocompatibility characteristics of the polyurethane composite membrane can be much improved. (J Intervent Radiol, 2011, 20: 127-130)

【Key words】 carbon nanotube; polyurethane; mechanics characteristics; biocompatibility; nona material; stent

基金项目:国家自然科学基金(30270418);上海市科委重点纳米专项基金(0452nm037)

作者单位:200003 上海 第二军医大学长征医院放射科(董生);南京军区南京总医院放射科(袁正);中国科学院上海医用物理研究所(吴胜伟、李文新)

通信作者:董 生 E-mail: dongsheng2828@hotmail.com

覆膜支架植入是微创介入技术治疗体内管腔狭窄和外漏的一个常用且有效的方法。聚氨酯(polyurethane, PU)材料具有优异的韧性、易于加工,因而被广泛的用作支架的覆膜材料^[1-3]。但在长期使用过程中发现聚氨酯在体内会出现老化降解

和钙化现象^[4],材料出现裂纹,甚至全部破坏,因此有必要采用合理有效的方法来改善材料的力学特性和生物相容性^[5]。但常用的化学改性方法会对聚氨酯的力学性质有负面影响^[6]。

碳纳米管(carbon nanotubes, CNTs)具有优异的力学性能,适量掺加 CNTs 的高分子材料能改善材料的强度。用 CNTs 对聚氨酯材料进行改性,可能对聚氨酯的抗氧化降解性能及强度的提高都有促进作用^[7]。另外,一些金属化合物能在 CNTs 管内填充,使得通过 CNTs 载带放射性物质制备放射性支架成为可能。因而本研究将 CNTs 掺加到聚氨酯中制备成复合材料,评价其生物相容性,并初步探讨了此材料在覆膜支架中的应用,为 CNTs 在生物医药领域中的应用进行了初步有益的探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 CNTs 的处理 将 CNTs(多壁纳米管,直径为 10 ~ 30 nm,长度为数十到数百微米。购自深圳纳米港有限公司)置于 1-氨基-1,2-二甲基-1,1,2-磷酸(AEDP)^[8]水溶液里用超声波粉碎仪(AP-203 型,上海杰理科技有限公司)超声处理。透析后干燥备用。

1.1.2 CNTs-聚氨酯复合膜材料的制备 称取一定量的上述处理过的 CNTs,加入适量的四氢呋喃溶液(AR,中国医药集团上海化学试剂公司),放在超声波清洗器(SK5200H 型,上海科导超声仪器有限公司)上超声 3 min,然后称取适量的聚氨酯(江苏法尔胜有限公司提供)加入到上述溶液中,静置 1 d 后搅拌均匀,用此溶液在玻璃片上涂膜即得 CNTs-聚氨酯复合膜材料。

1.2 方法

1.2.1 CNTs-聚氨酯复合膜的力学性质 配制 CNTs 含量为 0、0.1%、0.3% 和 0.5% 的 CNTs-聚氨酯复合材料,然后用万能材料试验机(深圳新三思材料检测有限公司)检测材料的力学性质。探讨碳纳米的加入量对聚氨酯膜材料力学性质的影响,并对不同含量的复合材料的表面进行电镜观察。

1.2.2 细胞毒性试验^[9] 选用的细胞系为人肝癌细胞(简称 7721 细胞),使用 RPMI1640 培养基。

配制 CNTs 含量为 0、0.1%、0.5% 和 1% 的 CNTs-聚氨酯的四氢呋喃溶液,将其分别涂在处理过的盖玻片上,然后将其放在六孔细胞培养板里,每孔 1 个,另外放 1 片处理过的盖玻片作对照。每孔加入 75%乙醇溶液 5 ml 浸泡过夜。等乙醇挥发后

于紫外光下消毒。然后每孔加入对数生长期的 7721 细胞悬液,密度为 1×10^5 个/ml,加入的细胞悬液将盖玻片完全浸没并稍许过量。将培养板放在 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养,分别在 24 和 48 h 取出,倒置显微镜下观察每个孔中盖玻片上细胞的生长情况并分级表征。0 级,材料表面无细胞生长;1 级,材料表面较少细胞生长;2 级,材料表面较多细胞生长;3 级,材料表面最多细胞生长。

1.2.3 CNTs-聚氨酯复合膜覆膜金属支架制备及活体评价

1.2.3.1 制备:用浸涂法制备覆膜金属支架(镍钛合金,常州智业医疗仪器研究所),简述如下:将金属支架(规格 6 mm × 30 mm 4 枚)套在电动搅拌器的转杆上,然后将其浸到搅拌均匀的 CNTs-聚氨酯-四氢呋喃溶液(溶液中 CNTs 与聚氨酯的质量比分别为 0.3%),使支架完全浸没在溶液中,稍浸片刻,将套有支架的转杆取出,固定在电动搅拌器上,开动搅拌器,用玻璃棒沿支架长度方向轻贴在支架上将多余的膜溶液刮去。最后放在电炉上烤干。

1.2.3.2 活体评价:新西兰大白兔 4 只,体重 2.5 ~ 3.0 kg,雌雄不拘(第二军医大学实验动物中心提供),用 3%戊巴比妥按 30 mg/kg 静脉注射,仰卧位四肢固定于专用板上,自制口托,将舌拉出,在 DSA 监视下,5 F 导管经口腔插入食管至胃腔,用置换导丝将导管换出,用 10 F 的输送器放置自制带膜支架到食管上中段,复查造影,行三维 DSA。专人饲料喂养,术后当天进流质,第 2 天恢复正常喂养。术后半小时,7、14 和 30 d 行透视或摄片观察支架位置,手术结束后和处死动物前分别行 CT 扫描观察食管支架情况;取标本行病理检查。

2 结果

2.1 CNTs-聚氨酯复合膜材料的制备

经超声切割修饰处理后的 CNTs 在四氢呋喃溶液中能很好地分散,并且其长度也有了很大的改变,大部分长度在 600 纳米左右。再将其与聚氨酯混合后,CNTs 在膜材料中分散均匀,无明显的聚集成团现象,膜表面光滑。

2.2 CNTs-聚氨酯复合膜材料的力学性质

表 1 为用万能材料试验机测得的不同含量的 CNTs-聚氨酯膜复合膜的力学性质。分别弯曲 90°,用扫描电镜放大 1 K 时,表面光整,未见裂痕(图 1)。

2.3 细胞毒性试验

表 2 给出了聚氨酯材料及掺加不同量 CNTs 的

CNTs-聚氨酯复合材料对 7721 细胞的毒性试验结果。

表 1 CNTs-聚氨酯膜复合膜的力学性能

碳纳米管含量(%)	复合膜拉伸强度(MPa)	复合膜断裂伸长率(%)
0	4.62	900
0.1	6.05	730
0.3	8.26	704
0.5	5.7	450

表 2 CNTs-聚氨酯膜复合膜细胞毒性试验结果

	对照	PU	PU-0.1% CNTs	PU-0.5% CNTs	PU-1% CNTs
24 h	3	2	2	1	0
48 h	3	2	2	0	0

结果显示,聚氨酯材料对细胞的生长还是有一定的影响,聚氨酯表面上细胞的数目较对照的载玻片上细胞的数目有些减少,但这还不至于影响材料的使用。而 CNTs 的加入则对复合材料的细胞毒性有较大的影响:在只加入 0.1% CNTs 时,复合材料的毒性没有变化,与单纯聚氨酯材料几乎一样,但当 CNTs 的掺加量加大到 0.5% 时,材料表现出明显的细胞毒性,24 h 时,材料表面细胞数目显著减少,48 h 后表面细胞全部死亡。当进一步提高 CNTs 掺加量时,细胞死亡的速度更快,表明材料毒性更强。

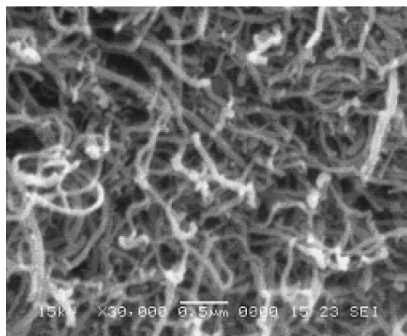
2.4 复合膜金属支架的活体食管评价

实验中 4 只兔均存活,其中 1 只精神稍差,活

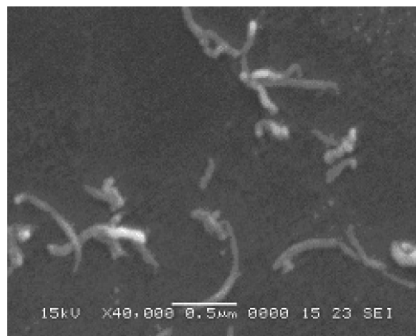
动减少、进食量较支架植入前减少,至实验结束时出现体重减轻。实验中三维 DSA 重建见各组支架张开,位置理想,腔道通畅(见图 2);食管造影见对比剂通过顺畅,支架段食管蠕动消失,支架与食管结合紧密,未见在食管与支架间隙中出现对比剂。CT 平扫和三维重建表现:支架支撑均匀,与食管相贴紧密,模拟内窥镜腔内通畅(图 3)。实验结束后,取出支架观察发现:支架复合膜外观无破损,膜未见明显腐蚀,颜色与原先相比微微变黄。支架放置 7~14 d 食管壁局部未见明显的病理改变,黏膜完好,黏膜下肌层如常(图 4)。

3 讨论

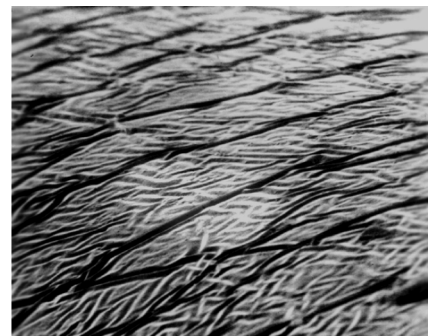
1991 年,日本科学家 Iijima 等^[10-11]发现了 CNTs。之后的短短数十年中,CNTs 以其奇特结构和众多优异的性能,深深吸引了全世界材料、化学、物理、生物等领域的科学工作者。CNTs 有着独特的结构特征,故而表现出奇异的力学、电学和磁学等性质,使其具有许多潜在的应用价值。CNTs 具有优异的力学性能,适量的 CNTs 掺加到高分子材料中能提高材料的强度。另外,CNTs 具有抗氧化性。用 CNTs 对聚氨酯材料进行改性,可能对聚氨酯的抗氧化降解性能及强度的提高都有促进作用。



a 超声前的 CNTs 的扫描电镜图

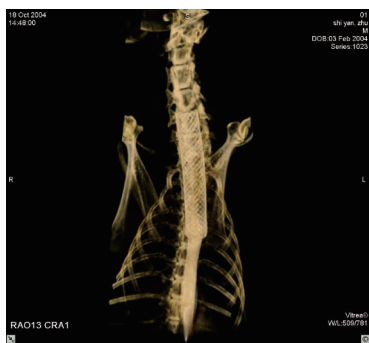


b 超声后的 CNTs 的扫描电镜图



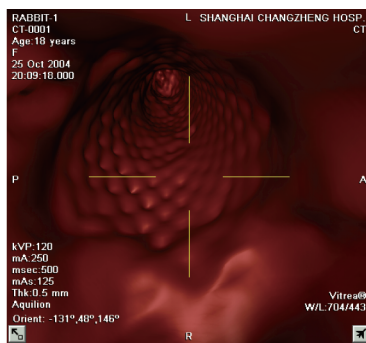
c 电镜扫描照片,支架弯曲 90 度时,膜仍较光滑,未见裂痕

图 1 CNTs 物理性能



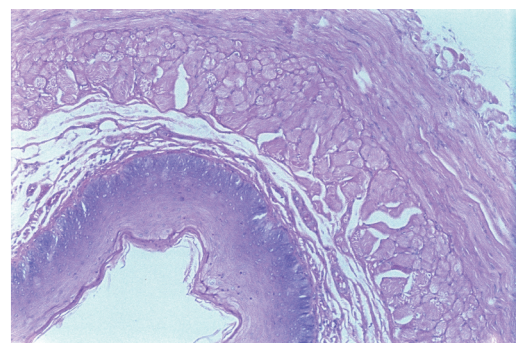
显示食管腔道通畅

图 2 旋转 DSA 三维重建



显示支架腔内光整

图 3 CT 虚拟内镜



食管 HE 染色,黏膜、黏膜下、肌层均未见异常

图 4 支架放置 7 d 后组织学图

本研究发现,在一定范围内,随着聚氨酯中 CNTs 掺加量的提高,复合材料的拉伸强度先升高,当掺加量加大到一定值后,复合材料的拉伸强度会下降。当 CNTs 的掺加量为 0.3% 时,复合膜的拉伸强度比单纯的聚氨酯膜提高了 94%。CNTs 具有优异的力学性质,其轴向弹性模量从理论估计和实验测定均接近甚至超过石墨烯片,在 1Tpa 到 1.8Tpa 之间。当在聚氨酯中掺加适量的 CNTs 后,由于 CNTs 经过超声处理后,其长度缩短为数百纳米左右,并且在聚氨酯中的分散性能良好,高强度的 CNTs 在聚氨酯中的均匀分布能有效地提高复合材料的拉伸强度。但当 CNTs 的掺加量提高到一定量时,一方面 CNTs 的团聚效应使得其在聚氨酯的分布不再均匀;另一方面, CNTs 与聚氨酯的有效结合界面面积降低,使得 CNTs 在聚氨酯中弥散增强效应也相应降低,从而导致复合膜拉伸强度降低。由于 CNTs 轴向拉伸强度很大而延展性也即塑性很差,当将 CNTs 加入到聚氨酯中后,与聚氨酯牢固结合的 CNTs 就阻碍了聚氨酯拉伸时的塑性变性率,也就表现为 CNTs 的加入降低了复合膜的断裂延长率,并且随着 CNTs 加入量的增大有较大的降低。由此可见,适量 CNTs 的加入,能改善聚氨酯膜材料的力学特征。

对于 CNTs-PU 复合材料的细胞毒性,研究发现,聚氨酯材料对细胞的生长还是有一定的影响,聚氨酯表面上细胞的数目较对照的载玻片上细胞的数目有些减少,但这还不至于影响材料的使用。而 CNTs 的加入则对复合材料的细胞毒性有较大的影响:在只加入 0.1% CNTs 时,复合材料的毒性没有明显变化,和单纯聚氨酯材料几乎一样,但当 CNTs 的掺加量加大到 0.5% 时,材料表现出对细胞明显的毒性,24 h 时,材料表面细胞数量显著减少,48 h 后表面细胞全部死亡。当进一步提高 CNTs 掺量时,细胞死亡的速度更快,表明材料毒性更强。

修饰后的 CNTs 管壁上有氨基存在^[12],而氨基可能引起蛋白质构象与构型的改变,从而引起功能变化,导致细胞死亡,所以,当有大量的 CNTs 掺加到聚氨酯中后,会引起细胞毒性增加。具体的机制还有待进一步的研究。当掺加少量的 CNTs 时,由于和细胞相接触的氨基相对来说很少,对细胞的毒性也几乎不会增加。因此,如何在不改变 CNTs 表面性

质的情况下使其分散均匀是 CNTs 在生物材料中应用的一个方向。

总之,添加适量的 CNTs 能改善聚氨酯膜材料的力学特性,并不会出现明显的细胞毒性,可以作为金属支架的覆膜材料。

[参考文献]

- [1] Ruygrok PN. The Coherex Flat Stent: an advance in patent foramen ovale closure[J]. Expert Rev Med Devices, 2010, 7: 193 - 199.
- [2] Radeleff B, Grenacher L, Christoph P. Comparison of a microporous thermoplastic polyurethane-covered stent with a self-expanding bare nitinol stent in a porcine iliac artery model[J]. J Vasc Interv Radiol, 2009, 20: 927 - 935.
- [3] Schuman E, Babu J. Sirolimus-loaded polyurethane graft for hemodialysis access in sheep[J]. Vascular, 2008, 16: 269 - 274.
- [4] Anderson JM, Hiltner A, Wiggins MJ, et al. Recent advances in biomedical polyurethane biostability and biodegradation [J]. Polymer International, 1998, 46: 163.
- [5] Xu Y, Mahmood M, Fejleh A, et al. Carbon-covered magnetic nanomaterials and their application for the thermolysis of cancer cells[J]. Int J Nanomedicine, 2010, 7: 167 - 176.
- [6] Szelest-Lewandowska A, Masiulanis B, Szymonowicz M, et al. Modified polycarbonate urethane: synthesis, properties and biological investigation *in vitro* [J]. J Biomed Mater Res A, 2007, 82: 509 - 520.
- [7] Misra SK, Ansari TI, Valappil SP, et al. Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications[J]. Biomaterials, 2010, 31: 2806 - 2815.
- [8] Chai BJ, Covina W, Fred D, et al. Method of preparing phosphonates from nitriles[J]. United States Patent US4239695. 1980212216.
- [9] Feng L, Andrade JD. Protein adsorption on low temperature isotropic carbon[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 1995, 7: 439 - 452.
- [10] Singh AK, Sadrzadeh A, Yakobson BI. Metallacarboranes: toward promising hydrogen storage metal organic frameworks[J]. J Am Chem Soc, 2010, 132: 14126 - 14129.
- [11] Yasutake M, Shirakawabe Y, Okawa T, et al. Performance of the carbon nano-tube assembled tip for surface shape characterization[J]. Ultramicroscopy, 2002, 91: 57 - 62.
- [12] 郭金学, 李宇国, 吴胜伟, 等. CNTs 化学修饰的 γ 剂量研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2005, 23: 112.

(收稿日期:2010-08-27)