

基于PVA/BNC复合材料的人工耳廓制备与性能

黄丽娜 陈琳 洪枫

Preparation and properties of artificial auricles based on PVA/BNC composites

HUANG Lina, CHEN Lin, HONG Feng

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20240023.004>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

聚乙二醇改性纳米纤维素/聚乙烯醇复合水凝胶的制备及性能

Preparation and properties of polyethylene glycol-modified cellulose nanofibers/polyvinyl alcohol composite hydrogel
复合材料学报. 2017, 34(4): 708–713 <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20160819.001>

静电纺纤维素纳米晶体/壳聚糖-聚乙烯醇复合纳米纤维的制备与表征

Preparation and characterization of electrospun cellulose nanocrystals/chitosan-polyvinyl alcohol composite nanofibers
复合材料学报. 2018, 35(4): 964–972 <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20170609.004>

功能化六方BN纳米片/聚乙烯醇复合材料的制备及力学性能

Preparation and mechanical properties of functionalized BN nanoflakes/polyvinyl alcohol composites
复合材料学报. 2018, 35(5): 1073–1079 <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20170713.004>

载Ag改性桑枝韧皮纤维素/聚乙烯醇复合膜的制备及表征

Preparation and characterization of Ag-carried tetracycline-mulberry bast carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol composite films
复合材料学报. 2019, 36(11): 2502–2508 <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20190412.003>

加工芳纶纳米纤维/聚乙烯醇水凝胶制备高强度复合薄膜

Processing aramid nanofiber/poly(vinyl alcohol) hydrogel into high-strength composite films
复合材料学报. 2021, 38(12): 3986–3995 <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20210205.001>

磺胺嘧啶银/聚乙烯醇水凝胶复合材料的制备及性能表征

Preparation and properties of sulfadiazine Ag/polyvinyl alcohol hydrogel composites
复合材料学报. 2017, 34(12): 2668–2673 <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20170310.002>



扫码关注微信公众号, 获得更多资讯信息

基于 PVA/BNC 复合材料的人工耳廓制备与性能



分享本文

黄丽娜^{1,2}, 陈琳^{1,2}, 洪枫^{*1,2}

(1. 东华大学 细菌纳米纤维制造及复合技术科研基地, 中国纺织工程学会, 上海 201620; 2. 东华大学 生物与医学工程学院, 微生物工程与医学材料研究组, 上海 201620)

摘要: 耳廓再造的关键是实现植入材料与天然组织间的生物力学适配, 然而迄今尚未找到一种理想的耳廓替代物。本文将细菌纳米纤维素 (Bacterial nanocellulose, BNC) 匀浆加至不同浓度的聚乙烯醇 (Polyvinyl alcohol, PVA) 水溶液中, 通过冻融法使两者物理交联形成兼具高弹柔韧性和高力学强度的 PVA/BNC 复合材料, 并对其理化性能和细胞相容性进行表征。结果表明: 该材料具有高吸水性、低溶胀比, 较高的韧性、弹性和缝合强度等特点, 最大压缩模量可达到 (6.98 ± 0.49) MPa, 与天然耳廓组织的生物力学相适配。最大缝合强度可达 (7.06 ± 0.33) N, 完全满足临床缝合需求。BNC 的加入促进了细胞在材料表面的粘附、生长和增殖, 使 PVA/BNC 复合材料具有更高的细胞密度和活力, 是一种很有潜力的人工耳廓材料。

关键词: 细菌纳米纤维素; 聚乙烯醇; 人工耳廓; 冻融法; 力学性能

中图分类号: R318.08; TB332 文献标志码: A 文章编号: 1000-3851(2024)11-6138-10

Preparation and properties of artificial auricles based on PVA/BNC composites

HUANG Lina^{1,2}, CHEN Lin^{1,2}, HONG Feng^{*1,2}

(1. Bacterial Nanofiber Manufacturing and Composite Technology Research Base, China Textile Engineering Society, Donghua University, Shanghai 201620, China; 2. Research Group of Microbiological Engineering and Medical Materials, College of Biological Science and Medical Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract: The key to auricle reconstruction is to achieve a biomechanical fit between the implanted material and the natural tissue. So far, an ideal auricle substitute has not been found. In this study, bacterial nanocellulose (BNC) homogenate was added into polyvinyl alcohol (PVA) aqueous solutions of different concentrations, and the freeze-thaw method was used to form PVA/BNC composite materials with both high elastic flexibility and high mechanical strength via physically cross-linking. The physical and chemical properties and cytocompatibility of the composites were characterized. The results show that the material has the characteristics of high water absorption, low swelling ratio, as well as high toughness, elasticity and suture strength. The maximum compressive modulus reaches (6.98 ± 0.49) MPa, which matches the biomechanics of natural auricle tissue. The maximum suture strength reaches (7.06 ± 0.33) N, which fully meets the needs of clinical suture. Addition of BNC promotes the adhesion, growth and proliferation of cells on the surface of the material, giving the PVA/BNC composite material higher cell density and vitality. All the results show that the PVA/BNC composite is a promising biomaterial for artificial auricles.

Keywords: bacterial nanocellulose; polyvinyl alcohol; artificial auricle; freeze-thaw method; mechanical properties

收稿日期: 2023-12-19; 修回日期: 2023-12-30; 录用日期: 2024-01-23; 网络首发时间: 2024-01-24 19:34:56

网络首发地址: <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20240023.004>

基金项目: 国家先进功能纤维创新中心重点项目 (HX105210640)

Key Project of National Advanced Functional Fiber Innovation Center (HX105210640)

通信作者: 洪枫, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为细菌纤维素的低成本制备及其高值应用 E-mail: fhong@dhu.edu.cn

引用格式: 黄丽娜, 陈琳, 洪枫. 基于 PVA/BNC 复合材料的人工耳廓制备与性能 [J]. 复合材料学报, 2024, 41(11): 6138-6147.

HUANG Lina, CHEN Lin, HONG Feng. Preparation and properties of artificial auricles based on PVA/BNC composites[J]. Acta Materiae Compositae Sinica, 2024, 41(11): 6138-6147(in Chinese).

耳廓缺损主要是由先天性小耳畸形、创伤和癌症等造成。其中，先天性小耳畸形患者居多，其严重程度从轻度结构异常到完全缺失不等，全球发病率约每万名新生儿 0.83~17.4 例，中国的发病率约为每万人 5.18 例^[1]。由于耳廓软骨属于缺乏血管的弹性软骨，且解剖结构极其精细复杂，自身难以修复和重建，成为整复外科医生面临的巨大挑战之一^[2]。目前临床的治疗方法主要存在以下问题：雕刻自体肋软骨进行移植，手术的周期长、雕刻难、创伤大、供区并发症多等^[3]。组织工程再造耳支架缺乏足够的力学强度^[4]。生物材料耳廓再造能够避免以上问题，且具有来源广和可塑性强等特点^[5]，困难之处在于如何实现材料与天然组织间的生物力学适配。例如，目前商用耳廓生物材料假体——多孔高密度聚乙烯 (Medpor)，具有良好的生物相容性，但质地较硬，缺乏天然耳廓的柔韧性和弹性，与植入部位的组织力学失配，易发生支架挤压外露且成本较高^[6]。因此，迄今尚未找到一种理想的生物材料替代物，能够与人耳廓组织的力学性能相适配，以长期维持材料在植入部位的结构和力学稳定性。

细菌纳米纤维素 (Bacterial nanocellulose, BNC) 是一种由木醋杆菌在气液界面产生的纳米纤维素，具有类细胞外基质的三维纳米纤维网络结构及良好的生物相容性、柔软性和优异的力学性能。已有研究表明 BNC 在力学上适合作为耳软骨置换植入材料，显示出较高的软骨细胞生长水平^[7-11]，但是刚性纤维缺乏弹性，限制了其在耳软骨材料方面的应用。聚乙烯醇 (Polyvinyl alcohol, PVA) 是一种内部呈多孔网络结构的水凝胶，具有良好的生物相容性和优异的弹性，与弹性软骨的理化特性相似。PVA/BNC 复合材料在血管^[12]、角膜^[13]、关节软骨^[14]、心脏瓣膜^[15] 等领域都有广泛的应用研究。Hu 等^[12] 研究表明，在 BNC 中加入 PVA 可以增强复合水凝胶的弹性等力学性能，显示出良好生物相容性。Zhao 等^[14] 通过浸渍和退火方法制备了强度和耐磨性均大于关节软骨的 PVA/BNC 水凝胶。然而，PVA/BNC 复合材料在人工耳廓领域的应用潜力尚缺乏研究。

本文将 BNC 膜破碎匀浆后加到不同浓度的 PVA 水溶液中，通过反复冻融使两者物理交联形成兼具较高弹性、柔韧性和力学强度的 PVA/BNC 复合材料，通过 SEM、FTIR、XRD、密度和力学性能测试及体外细胞实验等对 PVA/BNC 复合材料

进行表征，以评估其作为人工耳廓的潜力。

1 实验材料与方法

1.1 原材料

木醋杆菌 (DHU-ATCC-1)，本课题组保藏菌种；小鼠皮肤成纤维细胞 (L929) 获自中科院上海细胞库；多聚甲醛，购自武汉赛维尔生物科技有限公司；青霉素-链霉素溶液、0.25% 胰蛋白酶、细胞计数试剂盒 (CCK-8) 购自上海碧云天生物技术有限公司；钙黄绿素 (AM) 购自上海翌圣生物技术有限公司；胎牛血清 (FBS) 和高糖培养基 (DMEM) 购自 Adamas 公司；聚乙烯醇 (1 750±50)、葡萄糖、酵母粉、胰蛋白胨、氢氧化钠、柠檬酸、无水乙醇等化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 BNC 膜的制备及后处理

采用浅盘静态培养法制备 BNC 膜^[16]。实验所用种子培养基与发酵培养基的成分及配比如下：葡萄糖 40 g/L，胰蛋白胨 5 g/L，酵母粉 3 g/L，用柠檬酸调节 pH 为 5.1，于 115℃ 高温高压蒸汽灭菌锅 (YXQ-LS-SII，上海博迅医疗生物仪器股份有限公司) 中灭菌 30 min，然后移至超净工作台中冷却备用。无菌环境下，挑取 DHU-ATCC-1 单菌落于 100 mL 种子培养基中，置于 30℃ 振荡培养箱 (ZQZY088 C，上海知楚仪器有限公司) 中 160 r/min 振荡培养 10 h，随后按 2.5% (体积分数，*v/v*) 接种量吸取种子液于 1 L 发酵液中，扩大培养 5 h。将不锈钢浅盘灭菌并烘干后，置于超净工作台中。待冷却后，向浅盘中倒入全部发酵液，于 30℃ 隔水式恒温培养箱 (GHP-9270，上海齐欣科学仪器有限公司) 中静态培养 5 天。

发酵结束后，将 BNC 膜浸泡在 1%NaOH 溶液 (质量体积分数，*w/v*) 中 (80℃ 恒温水浴)，除去多余培养基、细菌细胞等杂质，4 h 后用去离子水浸泡，反复洗涤至 BNC 膜呈半透明状，并用超纯水冲洗至中性，灭菌 8 次以去除内毒素^[17]。通过实验室数显高速分散均质机 (FJ200-SH，上海沪析实业有限公司) 使 BNC 膜破碎成匀浆态 (10 000 r/min，15 min，3 次)，放入 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 PVA/BNC 复合材料的制备

称取一定质量的 PVA 颗粒，在 90℃ 磁力搅拌水浴锅中溶解 2 h，分别配制成 8%、12%、16%、20% (*w/v*) 的 PVA 水溶液。10 000 r/min 离心 10 min 以除去 BNC 匀浆中多余的水分，将离心后的

BNC 沉淀 (含水率约 $(97.34\pm0.57)\%$) 按照 $30\%(w/v)$ 比例加入 PVA 溶液中, 充分搅拌混合后倒入模具中, 置于 -20°C 冰箱中冷冻 36 h, 随后室温解冻 12 h^[18], 反复冻融 1~3 次, 获得 PVA/BNC 复合材料。以未加入 BNC 匀浆的纯 PVA 水凝胶为对照。所得样品按照 PVA 浓度和成分分别命名为 8%PVA、12%PVA、16%PVA、20%PVA、8%PVA/BNC、12%PVA/BNC、16%PVA/BNC、20%PVA/BNC, 见表 1。

表 1 材料的配方
Table 1 Formulations of materials

Sample	PVA (w/v)	BNC (w/v)
8%PVA	8%	0%
12%PVA	12%	0%
16%PVA	16%	0%
20%PVA	20%	0%
8%PVA/BNC	8%	30%
12%PVA/BNC	12%	30%
16%PVA/BNC	16%	30%
20%PVA/BNC	20%	30%

Notes: PVA—Polyvinyl alcohol; BNC—Bacterial nanocellulose; w/v —Mass volume fraction.

1.2.3 材料的物理结构

拍摄不同浓度 PVA、PVA/BNC 材料的宏观照片, 观察样品间差异。将所有样品冷冻干燥并喷金后, 使用扫描电镜 (S4800, HITACHI) 对其微观形貌进行表征。

将冻干后的样品称重并测量体积, 计算出材料的堆积密度 (Apparent density, 记为 A_d), 使用全自动真密度测试仪 (AccuPyc II 1340, Micromeritics) 测试材料的骨架密度 (Skeletal density, 记为 S_d), 并根据文献 [19] 方法计算材料的孔隙率, 如下式所示。同时, 使用全自动氮气吸附比表面积及孔隙度分析仪 (ASAP 2460, Micromeritics) 测试材料的比表面积。

$$\text{孔隙率} = \left(1 - \frac{A_d}{S_d}\right) \times 100\% \tag{1}$$

1.2.4 采用 FTIR 分析材料的化学结构

样品冷冻干燥后, 使用傅里叶红外光谱仪 (Nicolet 6700, Thermo Fisher) 在 $400\sim4\,000\text{ cm}^{-1}$ 的波长范围内进行扫描, 表征样品表面的化学组成与官能团情况。

1.2.5 材料的含水率、吸水率与饱和溶胀率

将样品裁成直径为 15 mm、厚度为 5 mm 的圆柱状, 称量初始湿重, 记为 W_0 , 然后样品冻干称重, 记为 W 。室温下将样品浸泡在超纯水中,

间隔一定时间 (5、15、30、60、120、240、480 min) 后, 去除样品表面水分并称湿重, 记为 W_t , 最大吸水率计为饱和溶胀率。每组样品设 6 个平行, 结果取平均值±标准差。由以下公式计算样品的含水率和吸水率:

$$\text{含水率} = \frac{W_0 - W}{W_0} \times 100\% \tag{2}$$

$$\text{吸水率} = \frac{W_t - W}{W} \times 100\% \tag{3}$$

1.2.6 采用 XRD 分析材料的结晶性能

样品冷冻干燥后, 采用 X 射线衍射仪 (D8 ADVANCE, Bruker) 测试样品的结晶度。

1.2.7 材料的力学性能测试

(1) 材料的压缩性能

采用万能材料测试机 (HY-0580, 上海恒翼精密仪器有限公司) 测试样品的压缩和拉伸力学性能, 均使用 1 000 N 的传感器。将样品裁剪成相同尺寸的圆柱状 (直径为 12 mm, 厚度为 5 mm), 以 5 mm/min 的速度压缩样品至 70% 应变后自动返回初始位置。循环压缩的加载和卸载速度为 5 mm/min, 应变为 30%, 循环 20 次测试样品的能量耗散能力。

(2) 材料的拉伸性能

将样品裁剪成相同尺寸条状 (长 30 mm, 宽 10 mm), 标距为 15 mm, 以 50 mm/min 的速度拉伸样品至完全断裂后自动返回。循环拉伸, 即以 50 mm/min 的速度拉伸样品达到 40% 应变, 再以相同速度返回到无应变状态, 循环 20 次测试样品的韧性。韧性和能量耗散等相关参数计算方法参照文献 [20]。

1.2.8 材料的缝合强度

缝合强度测试方法与拉伸试验类似, 首先制备样品 (长 30 mm, 宽 10 mm, 厚 $(2.33\pm0.21)\text{ mm}$), 将样品的一端固定在万能测试机的下端夹具中, 另一端用 6-0 的外科缝合线穿引, 穿引点距离样品上端约 2 mm。测试参数: 标距为 35 mm, 拉伸速度为 15 mm/min, 样品断裂时的最大力即为缝合强度。

1.2.9 材料的细胞相容性

人工耳廓主要移植于颞筋膜瓣下, 筋膜是由多种纤维构成的结缔组织, 富含成纤维细胞等^[21]。为探索植入物对周围组织内成纤维细胞生长的影响, 采用 Luo 等^[22]方法评估材料的细胞相容性。

材料经过灭菌和漂洗等预处理后，加入细胞培养基无菌浸提 24 h。将浓度为 $2\times10^4/\text{mL}$ 的 L929 细胞悬液依次加入 24 孔板中，置于细胞培养箱。待细胞贴壁后，弃去剩余培养基，更换成浸提液继续培养。在培养的第 1、2、3 天，通过 CCK-8 试剂盒分别检测材料浸提液的细胞毒性。随后，用荧光显微镜 (BX53, Olympus) 观察钙黄绿素染色结果并拍照，全程避光。

采用相同方法预处理材料后，用培养基孵育过夜。将浓度为 $3\times10^4/\text{mL}$ 的 L929 细胞直接种在材料表面，第 1、3、5 天分别取出材料，加入多聚甲醛固定。超纯水漂洗材料后用 25%、50%、75%、95%、100% 的乙醇逐步脱水，叔丁醇置换 3 次，每次间隔均为 15 min。最后， -80°C 过夜，真空冷冻干燥后通过电镜观察细胞在材料表面的形态。

1.2.10 数据分析

采用 Excel 2019 对所有数据的平均值及标准差进行分析，通过 Origin 2021 对数据进行统计显著性检验及绘图。 $P>0.05(\#)$ ，表示组间无显著性差异； $0.01<P<0.05(*)$ ，表示具有显著性差异； $P<0.01(**)$ ，表示组间差异性极显著。除标记显著性差异比较对象外，其他显著性差异标注均为 PVA/BNC 与同浓度 PVA 水凝胶比较。

2 结果与讨论

2.1 材料的物理结构

冻融法指在低温下使 PVA 分子通过范德华力和氢键作用物理交联形成凝胶。不同 PVA 浓度 (8%、12%、16%、20%) 的 PVA、PVA/BNC 材料的宏观及微观形貌如图 1 所示。图 1(a) 为 PVA 和 PVA/BNC 样品的外观图，PVA 凝胶在 8% 浓度下呈微透明状，随浓度提高及加入 BNC 后呈现完全白色形态，这是由于单位体积的游离水减少和 PVA 分子的交联密度提高。图 1(b) 为硅胶模具制得的 PVA/BNC 样品。

图 1(c) 显示所有材料在电镜下均呈多孔蜂窝网络状结构。加入 BNC 后，PVA/BNC 复合材料

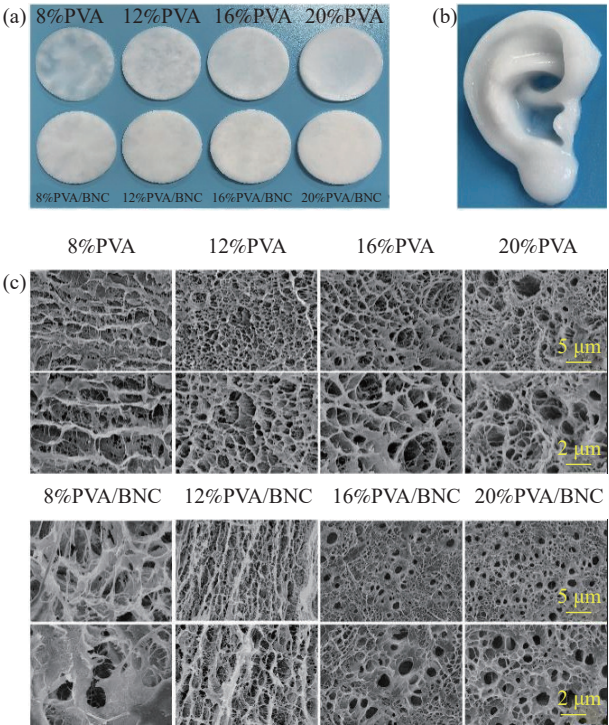


图 1 聚乙烯醇 (PVA)、PVA/细菌纳米纤维素 (BNC) 材料的宏观、微观形貌：(a) 不同浓度 PVA、PVA/BNC 材料的宏观形貌；(b) 耳朵状样品图；(c) 材料的微观形貌

Fig. 1 Macroscopic and microscopic morphologies of polyvinyl alcohol (PVA) and PVA/bacterial nanocellulose (BNC) materials: (a) Macroscopic morphology of PVA and PVA/BNC materials with different concentrations; (b) Diagram of an auricular sample; (c) Microscopic topography of materials

的网络结构更加致密，小孔增多，部分大孔的孔径增大。PVA 材料的网络结构随浓度提高变得更加致密，这是由于 PVA 黏度增大，空气越难进入溶液中，导致孔隙率降低。同时，致密的网络结构导致水分子更难渗透到聚合物网络中，PVA 凝胶中游离水的含量便逐渐降低，阻止了更多冰晶的形成，导致孔径减小。该结果与王森^[23]关于 PVA 交联密度不断增加及链之间的距离变短，使网络结构变得更加致密的报道一致。

由表 2 的孔隙率 (Porosity) 及比表面积 (Specific surface area) 测试结果可知，PVA/BNC 材料的孔隙率显著大于 PVA，比表面积略大于 PVA

表 2 孔隙率与比表面积测试结果

Table 2 Porosity and specific surface area test results

Sample	Skeletal density/(g·cm ⁻³)	Apparent density/(g·cm ⁻³)	Porosity/%	Specific surface area/(m ² ·g ⁻¹)
BNC	1.056 ± 0.017	0.009	99.17	58.98
16%PVA	1.219 ± 0.006	0.909	25.47	24.96
16%PVA/BNC	1.207 ± 0.005	0.455	62.27	26.48

凝胶。这是由于 BNC 与 PVA 搅拌时引入了部分空气，但 PVA 溶液黏度增加，使空气较难排出，因此小孔增多，比表面积增大。此外，由于 BNC 具有较高含水率(加入 PVA 时含水率约 $(97.34 \pm 0.57)\%$ ，使 PVA/BNC 中更多的游离水在冻融过程中，促进了冰晶的形成，解冻后冰晶的原有位置变成孔洞，从而使孔隙率提高。

2.2 材料的化学结构

图 2(a) 为 BNC 及不同浓度 PVA、PVA/BNC 材料的红外光谱图。BNC 光谱中，在 $3\,347\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\,161\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,057\text{ cm}^{-1}$ 处观察到吸收峰，分别代表 O—H 伸缩振动、纤维素糖苷链和 C—O 的拉伸振动^[22]。通过观察 PVA 的吸收光谱，可以发现 $3\,447\text{ cm}^{-1}$ 和 $2\,937\text{ cm}^{-1}$ 处存在 O—H 和 C—H 的伸缩振动峰，而 $1\,562\text{ cm}^{-1}$ 处呈现—CH₂ 的弯曲振动峰。在 PVA/BNC 光谱中同时出现 BNC 和 PVA 的特征峰，表明 BNC 与 PVA 成功复合。

2.3 材料的含水率、吸水率与饱和溶胀率

材料的含水率测试结果如图 2(b) 所示，所有材料的含水率均在 82% 以上。其中，低 PVA 浓度

的材料具有更高的含水率，并且各 PVA 浓度的 PVA/BNC 材料的含水率均高于相同浓度的 PVA 水凝胶。由图 2(c) 和图 2(d) 中材料的吸水率和饱和溶胀率可知，PVA 水凝胶在加入 BNC 后，其吸水率和饱和溶胀率都显著提高，所有材料在吸水 360 min 后都达到平衡。其中，8%PVA/BNC 的饱和溶胀率在 360 min 时可达到 463%，明显大于其他样品。归因于 BNC 具有较高含水率(97.34%)和吸水率^[16]。随 PVA 浓度提高，聚合物的网络结构更加致密，间隙空间和孔径都减小，水分子更难渗透到三维网络中，导致材料的含水率、吸水率和饱和溶胀率都有所下降。良好的吸水和溶胀性能可以促进营养物质和细胞渗透进入材料，改善细胞在材料上的粘附和生长。

2.4 材料的结晶性能

图 2(e) 为不同浓度 PVA 和 PVA/BNC 样品的 X 射线衍射图谱。由图可知，PVA 的特征吸收峰在 $19.76^\circ \pm 0.468^\circ$ 处，而 PVA/BNC 图谱除此之外，增加了 $22.48^\circ \pm 0.014^\circ$ 处 BNC 的特征峰，说明 PVA 与 BNC 成功复合。

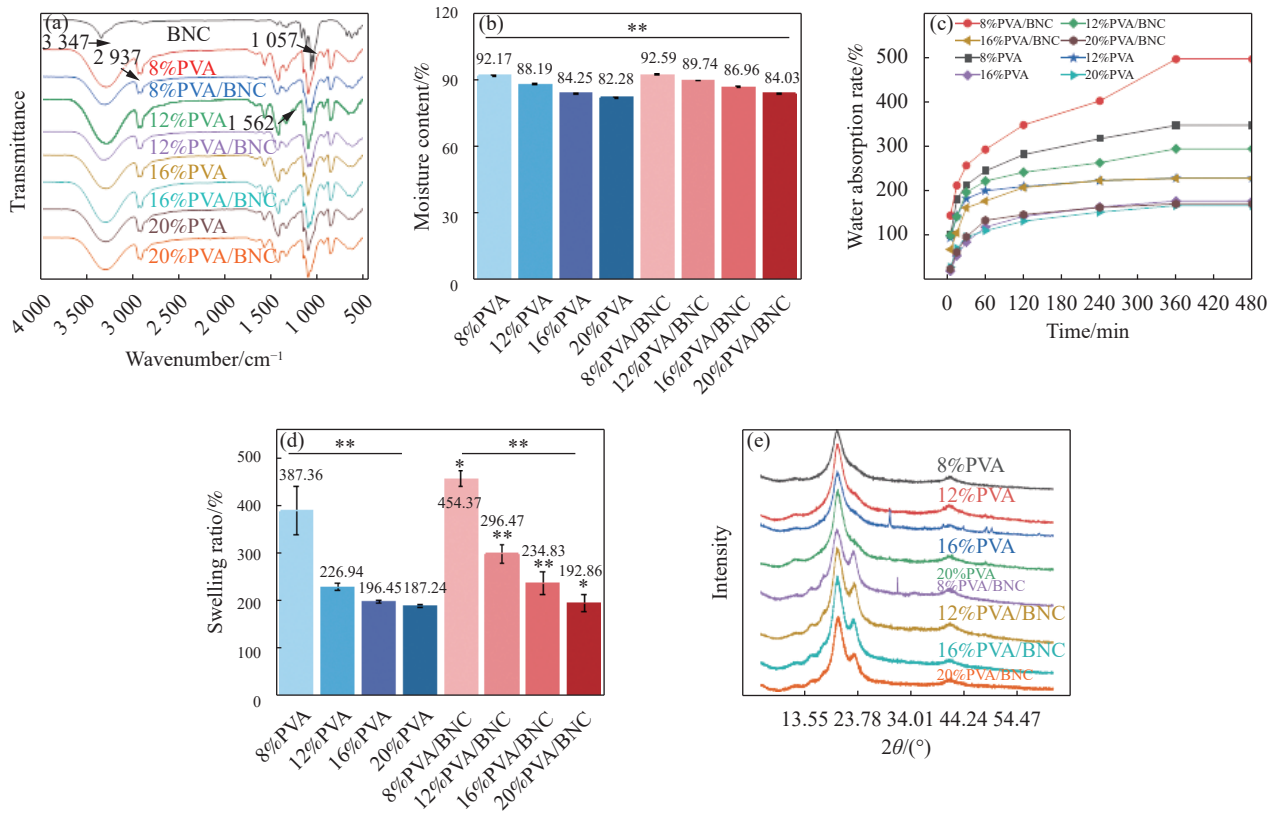


图 2 材料的基本理化性质: (a) 不同浓度 PVA、PVA/BNC 材料的红外图谱; (b) 含水率; (c) 吸水率; (d) 饱和溶胀率; (e) XRD 图谱

Fig. 2 Basic physical and chemical properties of materials: (a) Fourier transform infrared spectra of PVA and PVA/BNC materials with different concentrations; (b) Moisture content; (c) Water absorption rate; (d) Saturated swelling rate; (e) XRD patterns

结晶度测试结果如表 3 所示。所有样品的结晶度都在 34%~46% 范围内，PVA/BNC 复合材料的结晶度较 PVA 有所提高，说明 BNC 的加入使 PVA 的三维网络结构遭到破坏并重构，同时参与彼此的结晶过程，从而增加 PVA/BNC 的结晶度。

表 3 材料的结晶度
Table 3 Crystallinity of materials

Sample	Crystallinity/%
BNC	44.73 ± 5.07
8%PVA	34.08 ± 4.36
12%PVA	34.66 ± 9.87
16%PVA	35.80 ± 8.60
20%PVA	36.15 ± 6.28
8%PVA/BNC	37.38 ± 7.52
12%PVA/BNC	38.39 ± 7.88
16%PVA/BNC	45.68 ± 3.94
20%PVA/BNC	40.07 ± 1.47

2.5 材料的力学性能

2.5.1 材料的压缩性能

力学性能是耳廓替代物最关键的特征，为避免材料与组织间相互运动引起挤压外露，其生物力学应与天然耳廓组织相匹配，以长期维持体内

结构和力学的稳定性。

高浓度 PVA 水凝胶和 PVA/BNC 复合材料明显表现出更优异的压缩强度和模量，如图 3(a)、图 3(b) 所示。随 PVA 浓度从 8% 增加至 20%，其压缩强度和模量从 (0.026±0.0047) MPa 和 (0.12±0.04) MPa 分别增加至 (0.35±0.061) MPa 和 (1.51±0.33) MPa，这归因于氢键数目和结晶度的增加^[24]。BNC 的加入提高了材料的固体含量，使 PVA/BNC 复合材料的压缩模量和强度得到显著性提高。商用假体 Medpor 的压缩模量为 (267±40) MPa，远大于天然耳软骨的平均弹性模量 (1.66 ± 0.63 MPa)^[25]，与天然组织严重失配。PVA/BNC 复合材料的压缩模量可随 PVA 浓度变化，从 (2.30±0.29) MPa 增加至 (6.98±0.49) MPa，与天然耳廓的力学相匹配。此外，其力学强度可随循环冻融次数进行调节^[26]。

耗散能力对植入假体具有重要意义。因 16%PVA/BNC 与 20%PVA/BNC 的力学不具有显著差异，故选取 16%PVA 和 16%PVA/BNC 进行测试。图 3(d) 和图 3(e) 分别为循环压缩应力-应变曲线和能量耗散及损耗系数结果。第 1 次压缩循环后，

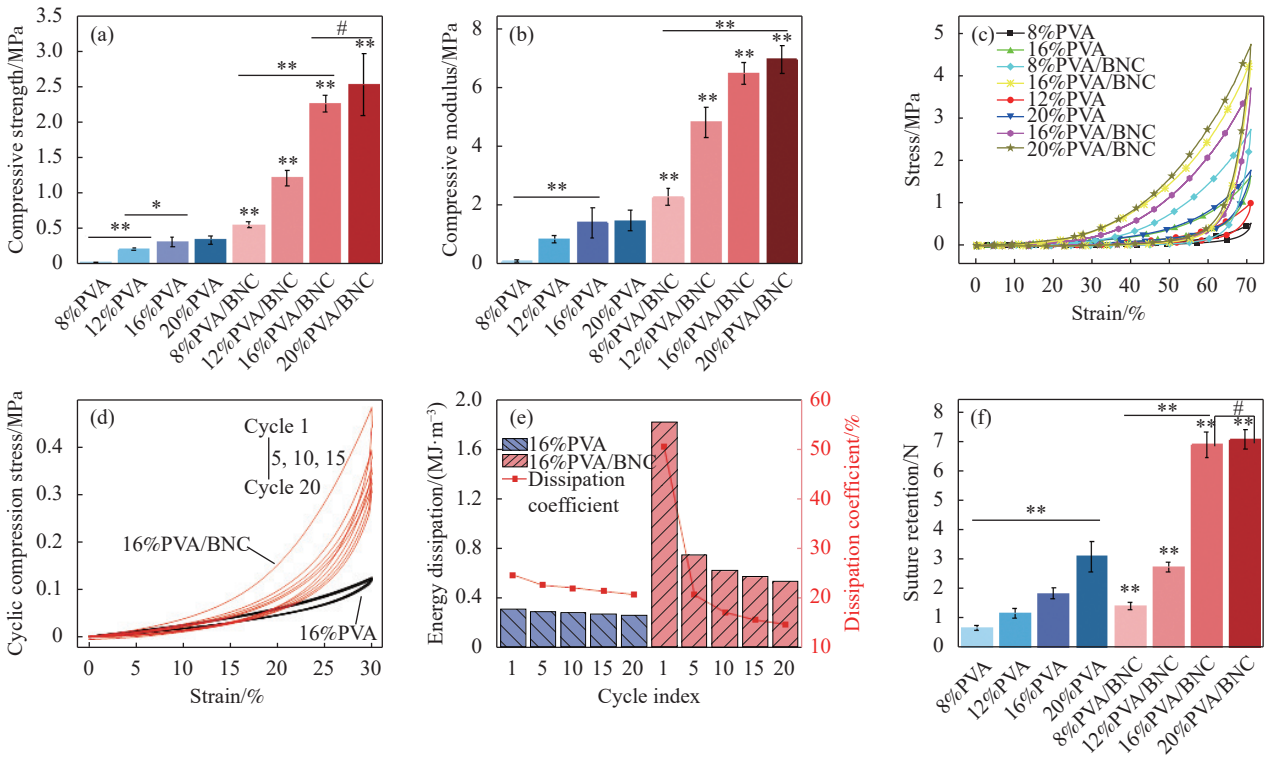


图 3 PVA 和 PVA/BNC 材料的压缩力学性能与缝合强度：(a) 不同浓度 PVA、PVA/BNC 材料的压缩强度；(b) 压缩模量；(c) 压缩应力-应变曲线；(d) 16%PVA 和 16%PVA/BNC 循环压缩应力-应变曲线；(e) 循环压缩能量耗散与能量损耗系数；(f) 缝合强度
Fig. 3 Compressive mechanical properties and suture strength of PVA and PVA/BNC materials: (a) Compressive strength of PVA and PVA/BNC materials with different concentrations; (b) Compressive modulus; (c) Compressive stress-strain curves; (d) 16%PVA and 16%PVA/BNC cyclic compressive stress-strain curves; (e) Cyclic compression energy dissipation and energy dissipation coefficient; (f) Suture retention

PVA 水凝胶的能量耗散和能量损耗系数分别为 0.31 MJ/m³ 和 24.90%。循环压缩 20 次后仍维持在 0.26 MJ/m³ 和 20.88% 左右, 并且全过程的加载-卸载均表现出稳定且较小的滞后曲线, 说明 PVA 材料具有优异的弹性。16%PVA/BNC 材料在第 1 次压缩循环后, 出现较大的滞回曲线, 表明第 1 次压缩引起的网络断裂为不能恢复的氢键等非共价键, 因此能量耗散和损耗系数较大 (1.82 MJ/m³, 50.53%)。循环压缩 5 次至 20 次过程中, 其能量损耗从 1.82 MJ/m³ 逐渐减小至 0.54 MJ/m³, 损耗系数从 50.53% 降低至 14.92%。循环压缩 10 次后变化越来越小并趋于稳定。这是由于 BNC 的加入提高了材料的固体含量, 使 PVA/BNC 复合材料的内部结构具有更优异的应力分散能力^[20]。

2.5.2 材料的拉伸性能

图 4(a) 和图 4(b) 分别为 PVA、PVA/BNC 材料的拉伸强度和模量, 该结果与 PVA 含量对压缩性能的影响一致。各浓度 PVA/BNC 复合材料的拉伸强度和模量均显著高于 PVA 水凝胶, PVA/BNC 材料的最大拉伸模量 (1.11±0.17) MPa, 与天然耳软骨 (2.02±0.25) MPa 及 Medpor(6.16±0.20) MPa 没有

明显差异。相较于 Medpor 的断裂伸长率 (4.40%±11%), PVA/BNC 复合材料 (49.83%±4.02%) 与天然耳软骨更相近 (40.62%±28%)^[27]。

图 4(e) 和图 4(f) 所示, 在 20 次的循环拉伸过程中, 16%PVA 的应力-应变曲线几乎重叠, 其韧性从 2 MJ/m³ 缓慢降低至 1.73 MJ/m³, 最大能量耗散系数为 13.57%, 表明 PVA 材料具有优异的回弹性。16%PVA/BNC 在第 1 次和第 5 次拉伸循环中, 韧性分别为 5.05 MJ/m³ 和 3.70 MJ/m³。从第 5 次到 20 次循环, 韧性缓慢降低至 3.04 MJ/m³, 能量耗散系数从 26.75% 逐渐增加并趋于 39.80%, 表明 PVA/BNC 复合材料具有较高韧性, 能够在变形过程中有效耗散能量。

2.6 PVA/BNC 复合材料的缝合强度

作为耳部植入物, 手术过程中使用 6-0 尼龙缝合线进行缝合。如图 3(f) 所示, PVA 样品组除 20%PVA ((3.12±0.52) N) 外, 其余样品的缝合强度均小于 2 N。加入 BNC 后, 复合材料的缝合强度显著提高, 除 8%PVA/BNC((1.46±0.12) N) 外, 其余样品均大于 2 N, 分别为 (2.78±0.16) N、(6.90±0.42) N 和 (7.06±0.33) N, 完全满足临床移植手术

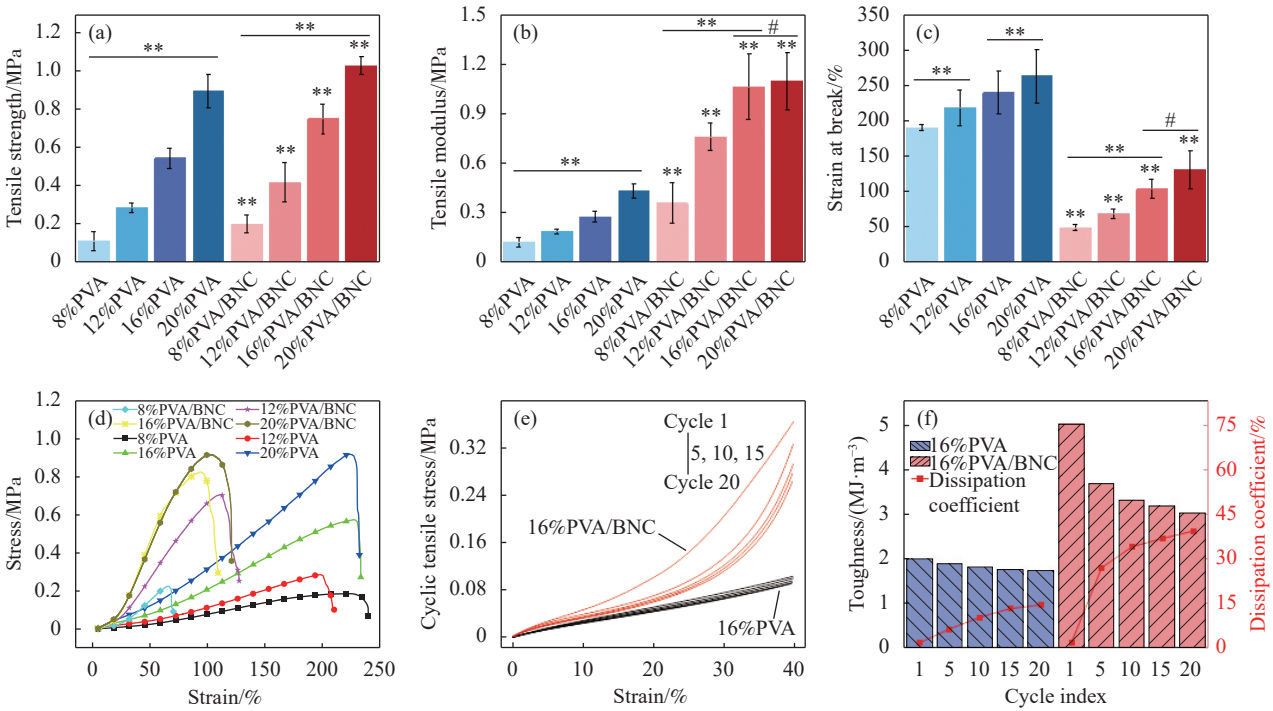


图 4 PVA、PVA/BNC 材料的拉伸力学性能: (a) 各 PVA、PVA/BNC 材料的拉伸强度; (b) 拉伸模量; (c) 断裂伸长率; (d) 拉伸应力-应变曲线; (e) 16%PVA 和 16%PVA/BNC 循环拉伸应力-应变曲线; (f) 循环拉伸韧性与能量损耗系数

Fig. 4 Tensile mechanical properties of PVA and PVA/BNC materials: (a) Tensile strength of PVA and PVA/BNC materials; (b) Tensile modulus; (c) Elongation at break; (d) Tensile stress-strain curves; (e) 16%PVA and 16%PVA/BNC cyclic tensile stress-strain curves; (f) Cyclic tensile toughness and energy dissipation coefficient

的需求。

2.7 PVA/BNC 复合材料的细胞相容性

本文采用浸提液法检测细胞毒性，直接接触法观察细胞形态，PVA 作为 PVA/BNC 样品对照。由图 5(a) 和图 5(b) 的细胞毒性检测结果可知，所有材料都可支持细胞生长。培养第 1 天，各样品的吸光值均在 0.55 左右，无显著性差异。第 2、3 天结果显示，随 PVA 浓度提高，细胞增殖缓慢且活力下降，低浓度 PVA 和 PVA/BNC 具有更高的细胞密度和活力。钙黄绿素染色结果如图 5(c) 所示，根据第 2、3 天的染色结果可知，8%PVA/BNC 明显比其他样品的细胞密集，与 PVA 水凝胶相比，PVA/BNC 复合材料更有利于细胞粘附和生长。

细胞在材料表面的微观形态如图 5(d) 所示。直接接触法培养细胞的第 1 天，细胞均粘附在材料表面，且生长良好。其中，8%PVA/BNC 表面存在细胞团聚现象；第 3 天时，细胞逐渐延伸出伪足；第 5 天，细胞已在材料表面铺展开，8%PVA/BNC 和 12%PVA/BNC 材料表面的细胞形态更铺展。以上结果的原因可能是，BNC 增加了材料的孔隙率、比表面积(表 1) 和吸水性(图 2)，从而显著促进了细胞在材料表面的粘附、生长和增殖，与文献 [7-11, 28] 报道的 PVA 和 BNC 具有良好细胞相容性的实验结果一致，该结果为 PVA/BNC 复合材料移植耳部时的组织相容性研究奠定了基础。

3 结论

采用冻融法成功制备了聚乙烯醇/细菌纳米纤维素 (PVA/BNC) 复合材料。实验结果表明：

(1) BNC 的引入赋予了该材料高吸水性和适宜溶胀度等与软骨类似的基础理化性质；

(2) PVA/BNC 复合材料具有较高的韧性、弹性和缝合强度等特点。压缩模量高达 (6.98±0.49) MPa，与目前商用的耳廓植入物 Medpor (267±40 MPa) 相比，具有与天然耳廓组织更接近的压缩模量 (1.66±0.63) MPa。此外，最大缝合强度可达 (7.06±0.33) N，完全满足临床缝合的需求；

(3) 细胞实验显示，8% 和 12% 的 PVA/BNC 材料具有更高的细胞密度和活力。BNC 增加了材料的孔隙率、比表面积和吸水性。其中，材料的孔隙率从 25.47% 增加至 62.27%，饱和吸水率在 360 min 时可达 463%。因此，显著促进了细胞在材料表面的粘附、生长和增殖。

以上实验结果为组织相容性研究奠定了基础。

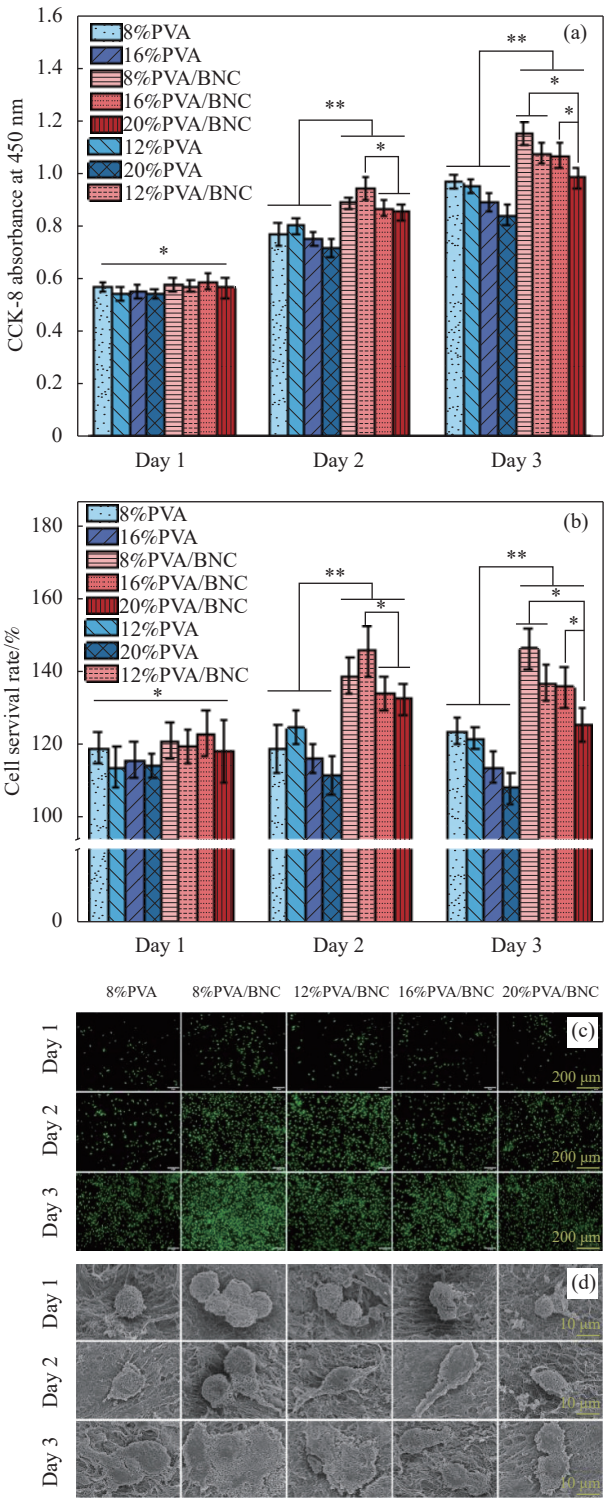


图5 小鼠成纤维细胞的相容性: (a) CCK-8 实验结果; (b) 浸提液培养的细胞存活率; (c) 浸提液培养 L929 细胞 1、2、3 天后细胞荧光图; (d) 电镜显示细胞在材料上生长 1、3、5 天后形态图

Fig. 5 Cytocompatibility of mouse fibroblasts: (a) CCK-8 experimental results; (b) Cell viability of extract culture; (c) Cell fluorescence pattern of L929 cells after culture in extract for 1, 2 and 3 days; (d) Electron microscopy showing morphology of cells after 1, 3, and 5 days of growth on the material

后期,拟开展PVA/BNC复合材料的动物实验,以进一步评估其作为人工耳廓的潜力。

参考文献:

- [1] JIANG C, ZHAO C, CHEN B, et al. Auricular reconstruction using Medpor combined with different hearing rehabilitation approaches for microtia[J]. *Acta Otolaryngol*, 2021, 141(6): 572-578.
- [2] SHIEH S J, TERADA S, VACANTI J P. Tissue engineering auricular reconstruction: In vitro and in vivo studies[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(9): 1545-1557.
- [3] PARK J Y, CHOI Y J, SHIM J H, et al. Development of a 3D cell printed structure as an alternative to autologs cartilage for auricular reconstruction[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2017, 105(5): 1016-1028.
- [4] 王艺蒙. 力学仿生耳软骨组织工程支架的3D打印及应用基础研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2022.
WANG Yimeng. Basic research on 3D printing and application of mechanical bionic ear cartilage tissue engineering scaffold[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2022(in Chinese).
- [5] FENG P, ZHAO R, TANG W, et al. Structural and functional adaptive artificial bone: Materials, fabrications, and properties[J]. *Advanced Functional Materials*, 2023, 33(23): 2214726.
- [6] 张如鸿, 曹谊林. 全耳再造的过去、现在和将来[J]. *组织工程与重建外科*, 2005(2): 109-114.
ZHANG Ruhong, CAO Yilin. The past, present and future of whole ear reconstruction[J]. *Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery*, 2005(2): 109-114(in Chinese).
- [7] HAN Y, LI C, CAI Q, et al. Studies on bacterial cellulose/poly(vinyl alcohol) hydrogel composites as tissue-engineered corneal stroma[J]. *Biomedical Materials*, 2020, 15: 035022.
- [8] SVENSSON A, NICKLASSON E, HARRAH T, et al. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(4): 419-431.
- [9] 唐敬玉, 包露涵, 李雪, 等. 细菌纳米纤维素与聚乙烯醇复合水凝胶管的生物相容性表征[J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(34): 5474-5480.
TANG Jingyu, BAO Luhan, LI Xue, et al. Biocompatibility characterization of bacterial nanocellulose and polyvinyl alcohol composite hydrogel tubes[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2017, 21(34): 5474-5480(in Chinese).
- [10] HU G Q, CHEN L, ZHAO S, et al. Mercerization of tubular bacterial nanocellulose for control of the size and performance of small-caliber vascular grafts[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 428: 131104.
- [11] NIMESKERN L, MARTINEZ A H, SUNDBERG J, et al. Mechanical evaluation of bacterial nanocellulose as an implant material for ear cartilage replacement[J]. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2013, 22: 12-21.
- [12] HU G Q, LI G L, CHEN L, et al. Production of novel elastic bacterial nanocellulose/polyvinyl alcohol conduits via mercerization and phase separation for small-caliber vascular grafts application[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 239: 124221.
- [13] WANG J, GAO C, ZHANG Y, et al. Preparation and in vitro characterization of BC/PVA hydrogel composite for its potential use as artificial cornea biomaterial[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2010, 30(1): 214-218.
- [14] ZHAO J, TONG H, KIRILLOVA A, et al. A synthetic hydrogel composite with a strength and wear resistance greater than cartilage[J]. *Advanced Functional Materials*, 2022, 32: 2205662.
- [15] MILLON L E, WAN W K. The polyvinyl alcohol-bacterial cellulose system as a new nanocomposite for biomedical applications[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2006, 79B(2): 245-253.
- [16] CHEN G, CHEN L, WANG W, et al. Manufacture of a novel anisotropic bacterial nanocellulose hydrogel membrane by using a rotary drum bioreactor[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 211: 281-288.
- [17] YANG G, WANG C, HONG F, et al. Preparation and characterization of BC/PAM-AgNPs nanocomposites for antibacterial applications[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 115: 636-642.
- [18] WAN W K, CAMPBELL G, ZHANG Z F, et al. Optimizing the tensile properties of polyvinyl alcohol hydrogel for the construction of a bioprosthetic heart valve stent[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, 63(6): 854-861.
- [19] GROULT S, BUDTOVA T. Thermal conductivity/structure correlations in thermal super-insulating pectin aerogels[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 196: 73-81.
- [20] CHEN Q, ZHANG X, CHEN K, et al. Bilayer hydrogels with low friction and high load-bearing capacity by mimicking the oriented hierarchical structure of cartilage[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, 14(46): 52347-52358.

[21] 郭佩佩, 蒋海越. 颞浅筋膜瓣在整形修复外科领域的临床应用进展 [J]. *中华整形外科杂志*, 2019, 35(12): 1271-1274.
GUO Peipei, JIANG Haiyue. Clinical application of temporal superficial fascia flap in plastic surgery[J]. *Chinese Journal of Plastic Surgery*, 2019, 35(12): 1271-1274(in Chinese).

[22] LUO Y H, LI G L, CHEN L, et al. Preparation and evaluation of bacterial nanocellulose/hyaluronic acid composite artificial cornea for application of corneal transplantation[J]. *Biomacromolecules*, 2023, 24(1): 201-212.

[23] 王森. 高强度大孔聚乙烯醇水凝胶的制备和机理分析 [D]. 大连: 大连理工大学, 2020.
WANG Sen. Preparation and mechanism analysis of high-strength macroporous polyvinyl alcohol hydrogel[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2020(in Chinese).

[24] PAN Y S, XIONG D, CHEN X L. Mechanical properties of nanohydroxyapatite reinforced poly(vinyl alcohol) gel composites as biomaterial[J]. *Journal of Materials Science*, 2007, 42(13): 5129-5134.

[25] GRIFFIN M F, PREMAKUMAR Y, SEIFALIAN A M, et al. Biomechanical characterisation of the human auricular cartilages: Implications for tissue engineering[J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2016, 44(12): 3460-3467.

[26] KOSHUT W J, RUMMEL C, SMOOT D, et al. Flaw sensitivity and tensile fatigue of poly(vinyl alcohol) hydrogels[J]. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2021, 306: 200679.

[27] NAYYER L, BIECHALL M, SEIFALIAN A M, et al. Design and development of nanocomposite scaffolds for auricular reconstruction[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2014, 10(1): 235-246.

[28] TANG S, CHI K, XU H, et al. A covalently cross-linked hyaluronic acid/bacterial cellulose composite hydrogel for potential biological applications[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 252: 117123.