



丝素-壳聚糖/聚氧化乙烯双层纳米纤维膜 制备及其生物活性

王莉^a, 刘涛^b, 丁新波^a, 李雅^a, 仇巧华^a, 王吉楠^a, 王寅^a

(浙江理工大学, a.纺织科学与工程学院(国际丝绸学院); b.科技与艺术学院, 杭州 310018)

摘要: 以丝素蛋白(Silk fibroin, SF)、壳聚糖(Chitosan, CS)和聚氧化乙烯(Polyvinyl oxide, PEO)为原材料, 利用静电纺丝技术制备 SF-CS/PEO 双层纳米纤维膜; 采用扫描电子显微镜、红外光谱等对 SF-CS/PEO 双层纳米纤维膜的微观形貌结构进行表征, 并分析了 SF-CS/PEO 双层纳米纤维膜的溶胀度、水接触角和机械性能, 并通过浸泡模拟体液考察了其体外生物活性。结果表明: SF-CS/PEO 双层纳米纤维膜呈现三维网络结构, 在磷酸盐缓冲液中的溶胀度可达 556%; SF 层的水接触角为 77.89°, CS/PEO 层为 47.45°; 双层纳米纤维膜的断裂强度为 4.35 MPa, 断裂伸长率为 25.52%、杨氏模量 74.27 MPa; 浸泡模拟体液后双层纳米纤维膜表面沉积了簇状羟基磷灰石, 体现出较好的生物活性。因此, 该丝素-壳聚糖/聚氧化乙烯双层纳米纤维膜有望应用于骨组织再生修复。

关键词: 丝素蛋白; 壳聚糖; 双层纳米纤维膜; 静电纺丝; 生物活性

中图分类号: TB332

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2022) 07-0474-08

Preparation of silk fibroin-chitosan/polyvinyl oxide bilayer nanofiber membrane and its bioactivity

WANG Li^a, LIU Tao^b, DING Xinbo^a, LI Ya^a, QIU Qiaohua^a, WANG Jinan^a, WANG Yin^a

(a. College of Textile Science and Engineering (International Institute of Silk);

b. Keyi College, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Using silk fibroin (SF), chitosan (CS) and polyvinyl oxide (PEO) as raw materials, the SF-CS/PEO bilayer nanofiber membrane was prepared by electrospinning technology. The micro-morphology and micro-structure of SF-CS/PEO bilayer nanofiber membrane were characterized by SEM and FTIR. The swelling degree, water contact angle and mechanical properties of the SF-CS/PEO bilayer nanofiber membrane were analyzed. Its in vitro bioactivity was explored by soaking them into simulated body fluids (SBF). The results showed that the SF-CS/PEO bilayer nanofiber membrane exhibited a three-dimensional network structure, and its swelling degree reached 556% in phosphate buffer solution. The water contact angle of SF layer was 77.89°, and the CS/PEO layer was 47.45°. The tensile strength and elongation at break of the bilayer nanofiber membrane was 4.35 MPa and 25.52%, respectively. After soaking in SBF, the hydroxyapatite clusters were deposited on the surface of bilayer nanofiber membrane, indicating good bioactivity. Thus, the prepared SF-CS/PEO bilayer nanofiber membrane is expected to be applied in bone tissue regeneration and repair.

Key words: silk fibroin protein; chitosan; bilayer nanofiber membrane; electrospinning; bioactivity

收稿日期: 2022-01-11 网络出版日期: 2022-03-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31900964)

作者简介: 王莉(1996—), 女, 浙江温州人, 硕士研究生, 主要从事现代纺织技术及新产品开发的研究。

通信作者: 刘涛, E-mail: maggie_liu310@163.com

0 引言

外伤、感染和肿瘤等多种因素会导致临床骨缺损,其治疗一直是骨科临床工作的一项难题。随着再生医学与组织工程学的发展,骨组织工程开始被广泛研究,并成为解决组织和器官缺损的有效手段之一^[1]。支架材料是组织工程研究的重要内容之一,既为细胞提供了载体,又为新生骨组织生长营造了局部微环境。目前,由静电纺丝技术制备的纳米纤维膜较好地仿生了骨的细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)结构^[2],同时又具有表面积大、易功能化、力学性能可控等特征,使其在骨修复支架材料中被广泛应用^[3-5]。

丝素蛋白(Silk fibroin, SF)是一种天然生物聚合物,因其优异的力学性能、良好的生物相容性和可控的生物降解性,在生物医学领域得到广泛研究^[6-10];但其黏附性和亲水性差,限制了其进一步的应用。壳聚糖(Chitosan, CS)含有大量羟基、氨基等极性基团,将壳聚糖与丝素蛋白进行共混或多层静电纺丝可以改善丝素蛋白材料的亲水性能^[11-13]。

聚氧化乙烯(Polyvinyl oxide, PEO)可提高壳聚糖的可纺性^[14-20],因此,本文采用静电纺丝法制备 SF-CS/PEO 双层纳米纤维膜;以 SF 纳米纤维为基底层,构建 CS/PEO 纳米纤维层;并采用 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳化二亚胺盐(1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC)和 N-羟基丁二酰亚胺(N-Hydroxysuccinimide, NHS)对双层纳米纤维膜进行交联改性,得到 SF-CS/PEO 双层纳米纤维膜。然后,采用 SEM、FTIR 和水接触角等表征方法,分析双层纳米纤维膜的表面微观结构及理化性能,并通过体外浸泡模拟体液的方法评估其体外生物活性。

1 实验部分

1.1 试剂

蚕茧购于湖州中维茧丝经营有限公司;壳聚糖(CS,脱乙酰度 95%以上,国药化工集团有限公司);聚氧化乙烯(PEO,平均分子量 2×10^6 ,杭州市米克化工有限公司);冰醋酸和分析纯氯化钙(杭州高晶精细化工有限公司);甲酸(FA,分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);无水乙醇(EtOH,分析纯,杭州双林化工试剂有限公司);透析袋(截留分子量 8000~14000,上海麦克林生化科技有限公司);去离子水实验室自制。

1.2 纺丝液的配制

将 20 g 脱胶处理后蚕丝加入摩尔比为 1:2:8 的

CaCl₂、CH₃CH₂OH、H₂O 三元溶液中充分溶解,用去离子水透析 2 d,高速离心去除溶液中的细小杂质后得到丝素蛋白溶液,并采用冷冻干燥机(FD-1A-50 型,上海比朗仪器制造有限公司)冷冻干燥后保存备用。取 1 g SF 溶于 9 g 甲酸溶液,室温条件下磁力搅拌 12 h,直至完全溶解,得到质量分数为 10% 的 SF 溶液。分别称取 CS、PEO(质量比为 7:3)溶于 70% 的醋酸水溶液,室温下搅拌 12 h,得到 4% 的 CS/PEO 纺丝液。

1.3 SF-CS/PEO 双层纳米纤维膜的制备

本文采用静电纺丝技术制备双层纳米纤维膜,纺丝装置主要由高压直流电、微量注射泵和接收装置组成。将 5 mL SF 纺丝液注入 10 mL 玻璃注射器,针头型号为 G18,纺丝速度为 0.5 mL/h,纺丝距离为 20 cm,直流电压为 20 kV,连续纺丝得到 SF 纳米纤维膜;在已经纺制的 SF 膜上进行第二层 CS/PEO 纺丝,纺丝参数设置为流速 0.5 mL/h,纺丝距离为 20 cm,直流电压为 25 kV;纺丝完成后,通过 EDC-NHS 对制备的 SF-CS/PEO 纳米纤维膜进行交联改性,反应 2 h 后用去离子水反复冲洗纤维膜,25 °C 干燥后得到 SF-CS/PEO 双层纳米纤维交联膜。

1.4 测试与表征

1.4.1 形貌及结构分析

利用扫描电子显微镜(Ultra55 型,德国 Carl Zeiss 公司)对双层纳米纤维膜的表面形貌进行观察分析。

采用傅里叶红外光谱仪(Nicolet5700 型,美国 Thermo Electron 公司)对双层纳米纤维膜的化学结构进行分析。

1.4.2 溶胀性能测试

将纳米纤维膜浸入 37 °C, pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液中,待样品达到溶胀平衡后取出,用吸水纸迅速擦干纳米纤维膜表面液体,称重记为 W_1 ,置于 80 °C 真空烘箱完全干燥后称重,记为 W_2 。样品的溶胀率(S_w)通过式(1)计算得到:

$$S_w/\% = \frac{W_1 - W_2}{W_2} \times 100 \quad (1)$$

1.4.3 水接触角测试

采用 JY-82B 型接触角测量仪对两层膜分别进行水接触角的测试,将样品平整地黏贴在载玻片表面,滴加 2 μ L 去离子水在样品表面,记录样品的接触角变化。

1.4.4 力学性能测试

采用万能材料试验机对样品进行力学性能测试,夹头间距为 20 mm,试样宽 5 mm,长 25 mm。

测试环境温度为 20℃±2℃,相对湿度 55%±3%。

1.4.5 体外生物活性研究

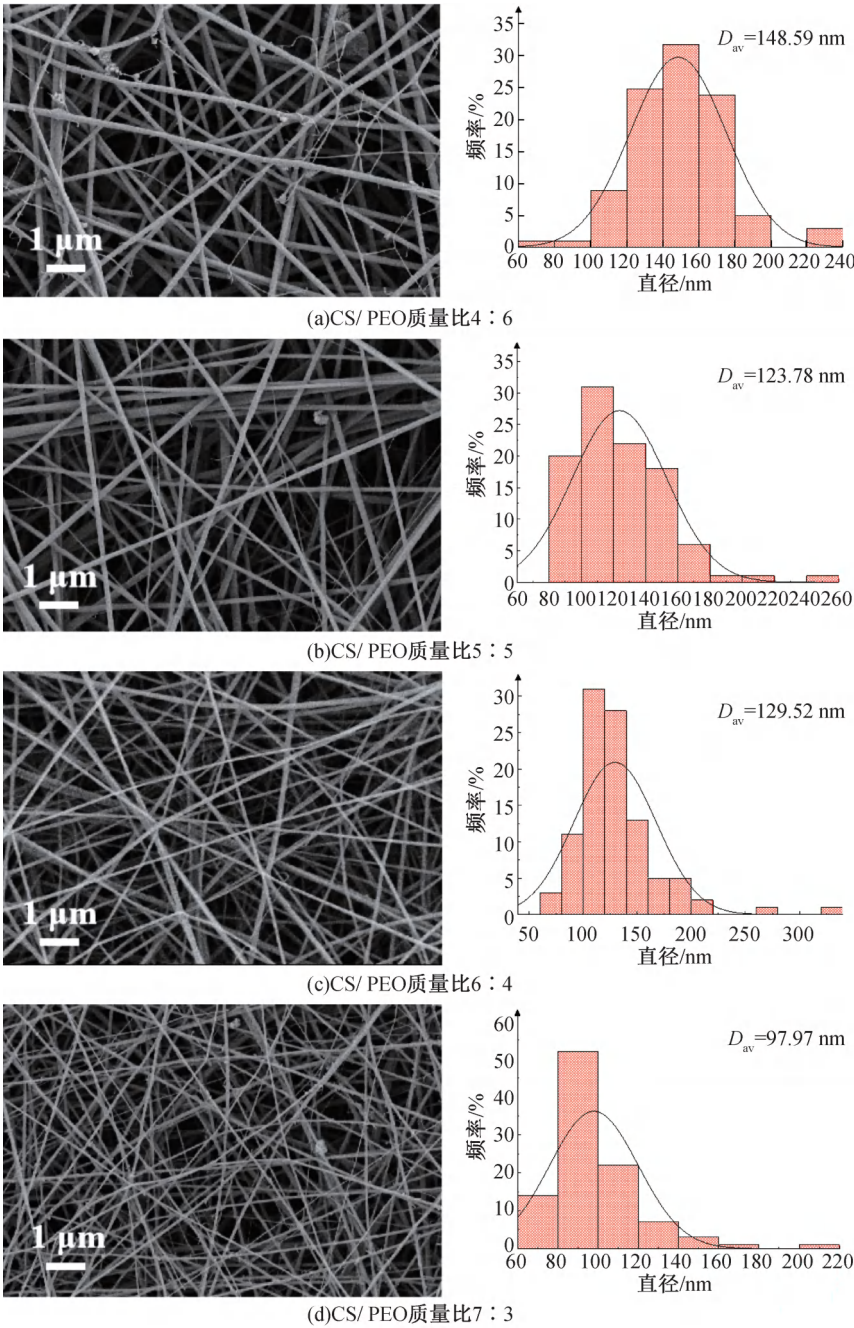
通过 SBF 浸泡对样品的生物活性进行测定,具体方法如下:将双层纳米纤维膜浸泡在按照参考文献[21]制备的 SBF 溶液中,在 37℃下培养,每天更换新鲜 SBF 溶液;将矿化后的纳米纤维膜进行冷冻干燥处理,采用扫描电子显微镜观察纳米纤维膜的外观形貌。

2 结果与讨论

2.1 纳米纤维膜形态及结构表征

2.1.1 纳米纤维膜的扫描电镜观察

图 1 为不同配比 CS/PEO 纳米纤维膜的 SEM



和直径分布图。由图 1 可见,随着 CS 含量的增加,纤维的平均直径(D_{av})从 148.59 nm 下降到了 71.49 nm,其原因可能是由于 CS 带正电荷,提高了溶液的电导率,增加了射流表面的电荷密度,使射流的轴向鞭动不稳定处于主导地位,从而降低了纤维的直径;CS/PEO 纳米纤维膜纺丝过程中表明,质量比为 4:6 时,静电纺丝过程不稳定,导致喷射细流分裂成多股细流,产生细小纤维,质量比为 5:5、6:4 和 8:2 时,纤维直径粗细不均,直径分布宽,质量比为 9:1 的 CS/PEO 纤维膜可纺性差;质量比为 7:3 时,直径最均匀。综上所述,选择 7:3 质量比的纺丝液,用于后续双层纳米纤维膜的制备。

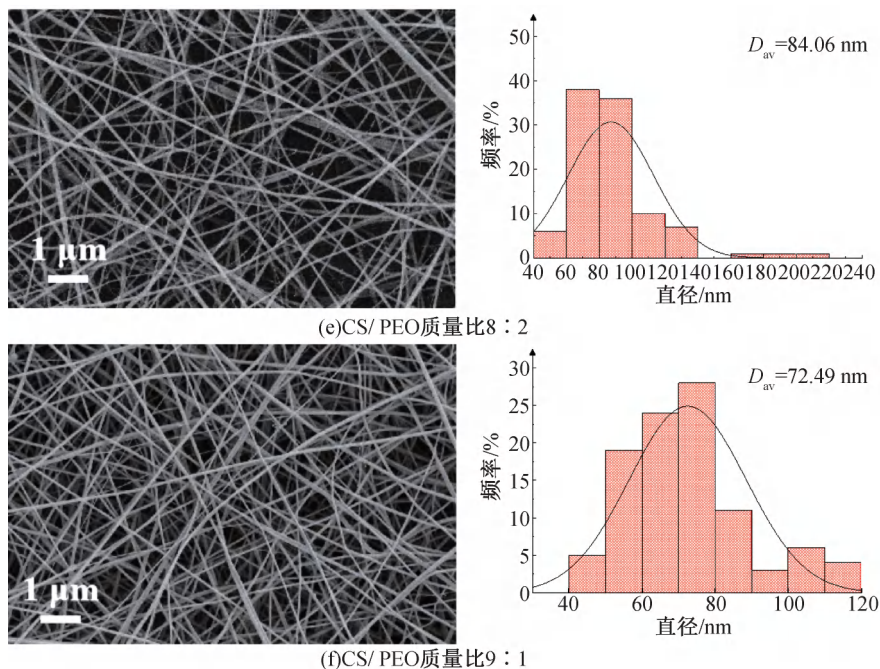
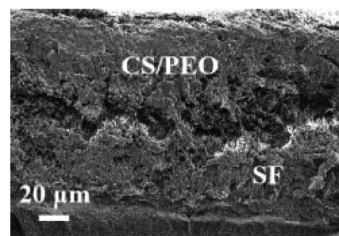


图 1 不同配比 CS/PEO 纳米纤维膜 SEM 和直径分布

图 2 为 SF-CS/PEO 双层纳米纤维膜的表面以及截面图。从图 2(a)—(b)可以观察到, CS/PEO 纳米纤维膜和 SF 纳米纤维膜粗细较均匀, 纤维表面光洁, 无串珠结构。由图 2(c)和 2(d)可知, 交联前的双层纳米纤维膜呈分离状, 经 EDC-NHS 交联处理后, 两层膜紧密地合并在一起。交联过后的 SF 与 CS 通过酰胺键相连, 从而使纳米纤维膜在使用的过程中不会被轻易剥离、破坏。

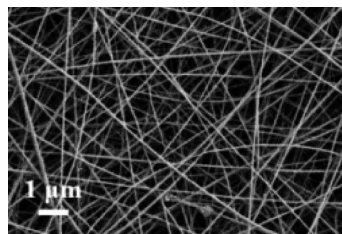


(d) SF-CS/PEO 交联后

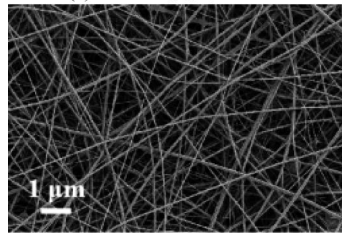
图 2 纳米纤维膜扫描电镜图像

2.1.2 纳米纤维膜的 FTIR 分析

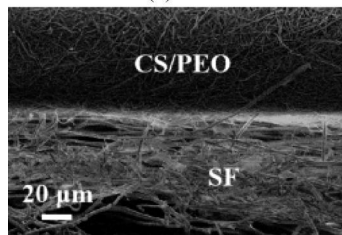
图 3(a)为 CS、PEO、CS/PEO 纳米纤维膜的红外光谱图谱。图 3(a)显示: 在 CS 红外光谱中, 3424 cm^{-1} 附近的吸收峰归属于 O—H 和 N—H 形成氢键伸缩振动, 1598 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 N—H 的变形振动, 1261 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 O—H 的弯曲振动。PEO 红外光谱中, 2886 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 C—H 的振动吸收, 1099 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 C—O 的伸缩振动; 在 CS/PEO 纳米纤维膜的光谱图上, 3356 cm^{-1} 处出现一个宽峰, 是加入 PEO 后, O—H、N—H 吸收峰在 CS 分子内氢键的作用下重叠增宽造成的。 $2840 \sim 2960\text{ cm}^{-1}$ 的 C—H 伸缩振动吸收峰强度增强, 是由于 CS 中的氨基在 PEO 中醚键的影响下, 由原来的分子内氢键转变为与 PEO 中的醚键形成分子间氢键; 1100 cm^{-1} 处吸收峰由孤立的峰而转变为不可分的肩峰, 进一步说明共混纤维中, CS 与 PEO 分子间存在强烈的相互作用, 由此可认为共混纤维具有良好的相容性。图 3(b)为未交联各单层



(a) CS/PEO 质量比 7:3



(b) SF



(c) SF-CS/PEO 交联前

以及交联前后的双层纳米纤维膜红外光谱图谱。图3(b)表明:SF的红外图谱中的 $3200\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰归属于O—H伸缩振动,由于分子间的氢键而形成了强宽峰; 1647 cm^{-1} 和 1535 cm^{-1} 处分别为酰胺Ⅰ和酰胺Ⅱ中的C—N伸缩振动和N—H弯曲振动, 1239 cm^{-1} 处为酰胺Ⅲ带中N—H官能团弯曲振动;由EDC-NHS交联机制可知,分子间酰胺化,交联后的纳米纤维膜红外图谱中,主要表现为酰胺Ⅰ带、酰胺Ⅱ带、酰胺Ⅲ带吸收峰强度比值的减小,即 1647 、 1535 cm^{-1} 和 1239 cm^{-1} 处的吸收峰面积比值减小,且交联后 1072 cm^{-1} 附近的C—O—C酯键的吸收峰强度有所增加,表明交联材料生成了CO—NH酰胺键或C—O—C酯键。

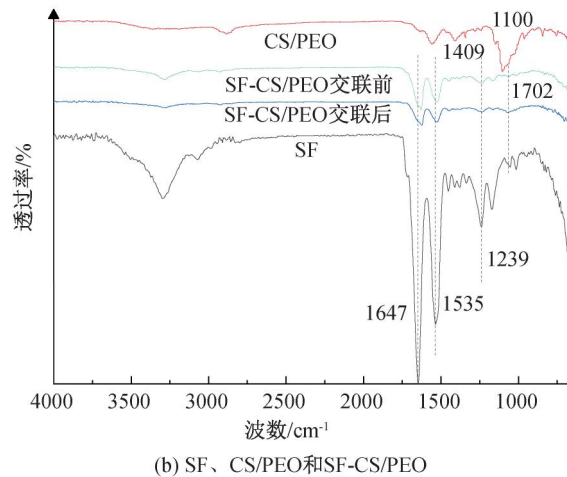
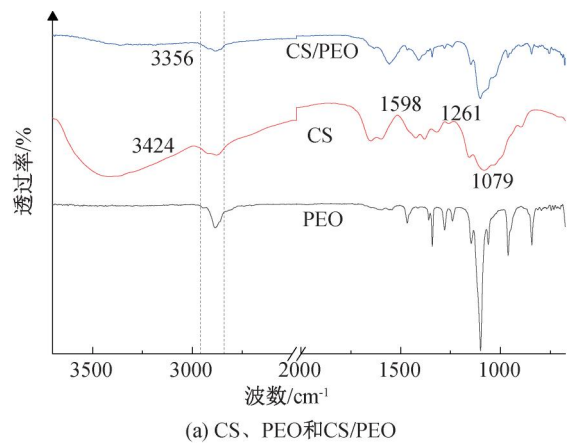


图3 不同样品 FTIR 图

2.2 纳米纤维膜溶胀度

作为组织引导再生材料,纳米纤维膜的溶胀度应该得到控制,太高会影响纳米纤维的物理结构和力学强度,太低则不适合营养物质传递^[22]。图4为不同纳米纤维膜的溶胀度,图4表明:SF纳米纤维膜溶胀度为380%,CS/PEO纳米纤维膜的溶胀度为1177%,其数值是SF纤维膜的3倍,由于CS、

PEO具有大量亲水基团氨基与羟基,提高了材料的溶胀度;交联前的SF-CS/PEO纳米纤维膜溶胀度为875%,交联后溶胀度降低为556%,是由于交联前分子间主要通过范德华力和氢键作用力,而EDC-NHS交联后,分子间形成化学键,作用力的增强导致结构更加紧密,减少结合水的数量,从而导致纤维膜的吸水溶胀性能降低。以上结果表明,可通过交联来实现对纳米纤维膜溶胀度的调控。

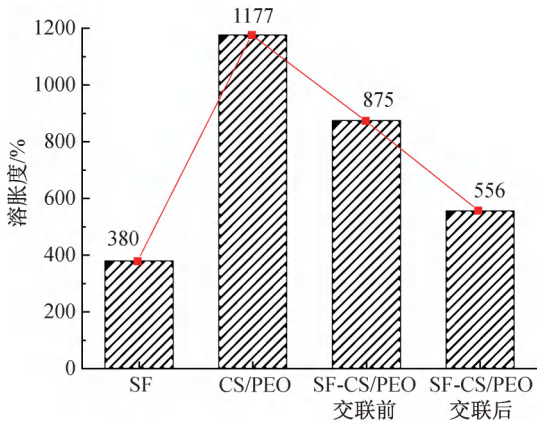


图4 不同样品的溶胀度

2.3 纳米纤维膜水接触角

图5为纳米纤维膜的水接触角。由图5可知,SF纳米纤维膜的水接触角为 77.89° ,CS/PEO纳米纤维膜的水接触角为 47.45° ,由于CS和PEO的分子主链上含有大量的亲水基团,使CS/PEO纤维膜具有良好的亲水性,有助于细胞的黏附和增殖;交联前CS/PEO纳米纤维层水接触角为 48.89° ,交联后的水接触角为 51.52° ,略大于交联前,是由于化学键的形成导致结合水的数量减少。

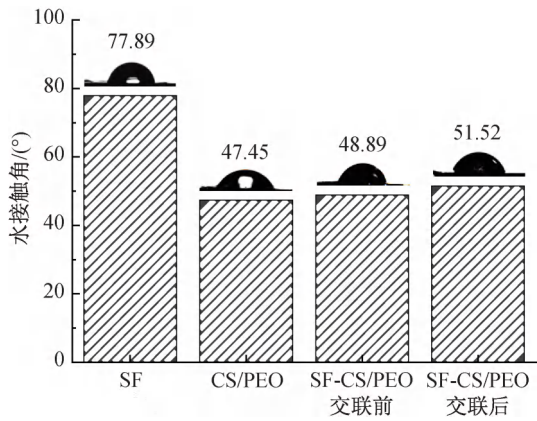


图5 纳米纤维膜的水接触角

2.4 纳米纤维膜力学性能研究

图6为不同纳米纤维膜应力—应变曲线,表1为不同样品的杨氏模量、断裂强力和断裂伸长率。图6与表1显示:SF纳米纤维膜的断裂强度为

6.14 MPa,断裂伸长率为 33.50%,CS/PEO 纳米纤维膜的断裂强度为 2.80 MPa,断裂伸长率为 13.95%;SF-CS/PEO 双层纳米纤维膜交联前的断裂强度为 3.82 MPa,断裂伸长率为 19.00%,杨氏模量为 69.67 MPa;交联后纤维材料的断裂强度、断裂伸长率及杨氏模量均有所提高,分别为 4.35 MPa、25.52%、74.27 MPa,是由于经碳二亚胺交联处理后,双层纳米纤维膜分子内部及分子之间的结合更加紧密,分子间的作用力增强,从而使纳米纤维膜的强力增加。

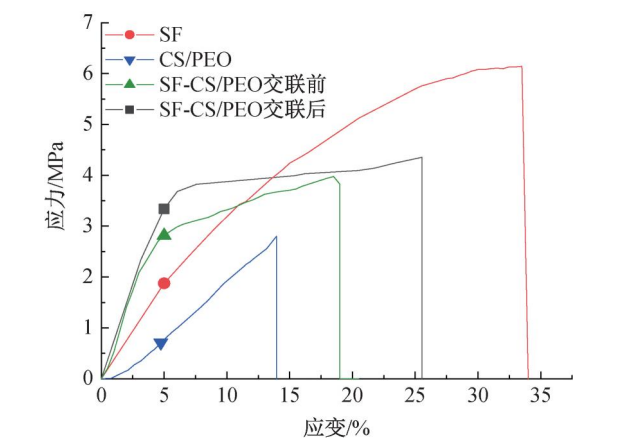


图 6 纳米纤维膜应力-应变曲线

表 1 不同样品的杨氏模量、断裂强力和断裂伸长率

样品	杨氏模量/MPa	断裂强度/MPa	断裂伸长率/%
SF	32.52	6.14	33.50
CS/PEO	11.09	2.80	13.95
SF-CS/PEO 交联前	69.67	3.82	19.00
SF-CS/PEO 交联后	74.27	4.35	25.52

2.5 纳米纤维膜体外活性研究

图 7 为双层纳米纤维膜矿化不同时间的晶体形貌图。图 7(a)——(c)为浸泡 SBF 7 d 后的形貌图,原本光滑的纤维表面出现细小结晶沉积物,放大图片显示,晶体形态不规则,不均匀地分散在纳米纤维表面。为了进一步研究矿化物,对其进行元素分析,结果如图 7(g)所示,纳米纤维膜表面有钙、磷元素存在,说明纳米纤维膜形成的矿化晶体为羟基磷灰石;随着矿化时间的延长,图 7(d)——(f)为浸泡 SBF 14 d 后形貌图,样品表面羟基磷灰石进一步堆积,体积逐渐增大,数目增多,与 7(g)相比,图 7(h)中 P 元素和 Ca 元素含量明显增加,表明随浸泡时间的增加,表面羟基磷灰石的含量逐渐增加。以上结果表明,SF-CS/PEO 双层纳米纤维膜具有沉积羟基磷灰石的能力,具有较好的体外生物活性。

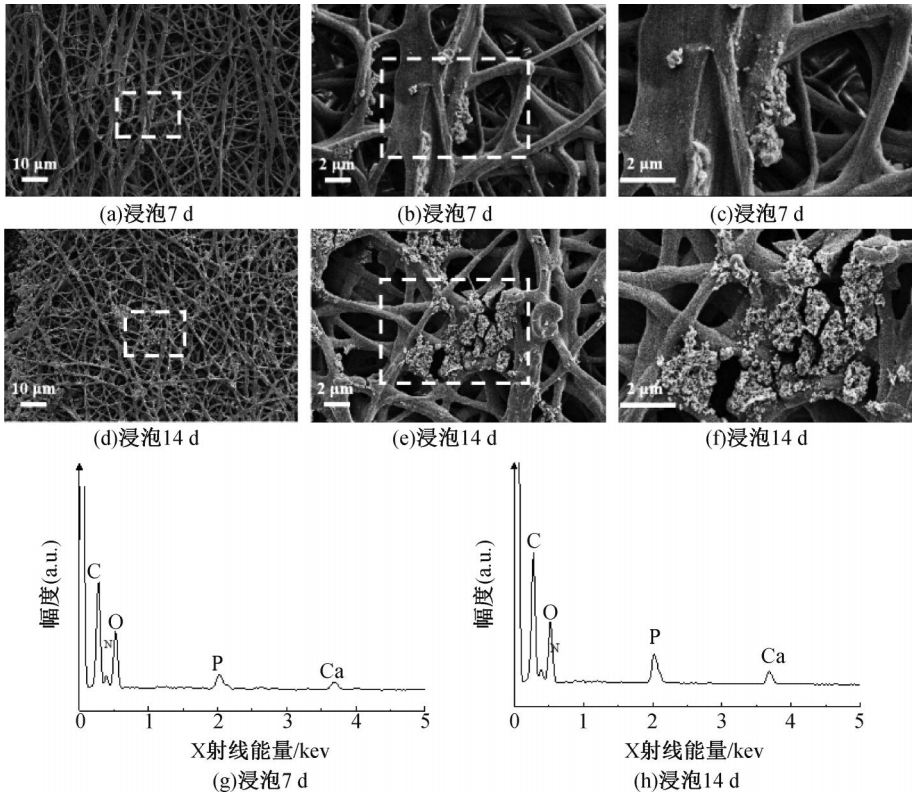


图 7 浸泡模拟体液后的 SF-CS/PEO 双层纳米纤维膜 FESEM 及 EDS 表征

3 结 论

本文采用静电纺丝技术制备了 SF-CS/PEO 双层纳米纤维膜,并通过扫描电镜、红外、水接触角等方法对其进行表征分析,主要结论如下:

a)SF-CS/PEO 双层纳米纤维膜通过多层静电纺丝法成功制备,SF 纳米纤维和 CS/PEO 纳米纤维粗细均匀,表面光滑无串珠,纤维直径较细;交联后的双层纳米纤维膜结构更加紧密,保证在应用过程中结构的稳定性。

b)SF-CS/PEO 双层纳米纤维膜具有合适的溶胀性能,其溶胀度为 556%;SF 层的水接触角为 77.89°,CS/PEO 层的水接触角为 47.45°,双层结构有利于细胞的黏附。

c)SF-CS/PEO 双层纳米纤维膜具有较好的强力,交联后其断裂强力为 4.35 MPa,断裂伸长率为 25.52%。

d)SF-CS/PEO 双层纳米纤维膜在浸泡模拟体液后,羟基磷灰石的生成能力较好,表明样品具有良好的体外生物活性。

SF-CS/PEO 双层支架结构既保证支架的机械性能,同时又能提供有利于组织修复的湿态环境,负载药物后有望用于骨组织再生修复。

参考文献:

- [1] Zhang S, Xing M, Li B. Biomimetic layer-by-layer self-assembly of nanofilms, nanocoatings, and 3D scaffolds for tissue engineering [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(6): 1641-1660.
- [2] Kishan A P, Cosgriff-Hernandez E M. Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2017, 105(10): 2892-2905.
- [3] 黄予畅,姜猛进. 静电纺丝技术在生物医用材料领域的应用[J]. *合成纤维工业*, 2019, 42(1): 64-70.
- [4] 张家盛,吴刚,邱江. 组织工程中细胞与生物材料相互作用研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(8): 2668-2677.
- [5] Hernández-Rangel A, Martín-Martínez E S. Collagen based electrospun materials for skin wounds treatment [J]. *Journal of biomedical materials research*, 2021, 109(9): 1751-1764.
- [6] 刘鑫,齐磊,左明星,等. 天然生物材料在组织工程和再生医学中的应用[J]. *医疗卫生装备*, 2019, 40(3): 98-103.

- [7] Jin S, Yang R, Chu C, et al. Topological structure of electrospun membrane regulates immune response, angiogenesis and bone regeneration [J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 129(5): 148-158.
- [8] Zhang X, Zhu D, Cheng Y, et al. Preparation and biocompatibility characterization of regenerated silk fibroin films [J]. *Journal of Macromolecular Science*, 2021, 60(8): 603-615.
- [9] Yang W, Xu H, Lan Y, et al. Preparation and characterisation of a novel silk fibroin/hyaluronic acid/sodium alginate scaffold for skin repair [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 130(2): 58-67.
- [10] Zhao Y H, Niu C M, Shi J Q, et al. Novel conductive polypyrrole/silk fibroin scaffold for neural tissue repair [J]. *Neural Regeneration Research*, 2018, 13(8): 1455-1464.
- [11] Li D W, He J, He F L, et al. Silk fibroin/chitosan thin film promotes osteogenic and adipogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Journal of Biomaterials Applications*, 2018, 32(9): 1-11.
- [12] Msp A, Gek A, Ldap B, et al. Silk fibroin/chitosan/alginate multilayer membranes as a system for controlled drug release in wound healing [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 152(2): 803-811.
- [13] Goh C H, Heng P, Lai W C. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88(1): 1-12.
- [14] Lemraski E G, Jahangirian H, Dashti M, et al. Antimicrobial double-layer wound dressing based on chitosan/polyvinyl alcohol/copper: in vitro and in vivo assessment [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2021, 16(1): 223-235.
- [15] Sadeghi A, Moztaarzadeh F, Mohandesi J A. Investigating the effect of chitosan on hydrophilicity and bioactivity of conductive electrospun composite scaffold for neural tissue engineering [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121(1): 625-632.
- [16] 陈鹏,王耐艳,郑莹莹. 壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶纤维制备及其生物性能探究 [J]. *浙江理工大学学报(自然科学版)*, 2019, 41(1): 56-64.
- [17] Mouro C, Gomes A P, Gouveia I C. Double-layer PLLA/PEO chitosan nanofibrous mats containing *Hypericum perforatum* L. as an effective approach for wound treatment [J]. *Polymers for Advanced Technologies*, 2021, 32(4): 1493-1506.

[18] 窦涌, 欧俊, 郑伟华, 等. 聚乙烯醇/壳聚糖复合电纺纤维膜的制备及表征[J]. 广东化工, 2017, 44(10): 13-15.

[19] Muzzarelli R, Mehtedi M, Mattioli-Belmonte M. Emerging biomedical applications of nano-chitins and nano-chitosans obtained via advanced eco-friendly technologies from marine resources[J]. Marine Drugs, 2014, 12(11): 5468-5502.

[20] Yuan T T, Jenkins P M, DiGeorge Foushee A M, et al. Electrospun chitosan/polyethylene oxide nanofibrous scaffolds with potential antibacterial wound dressing applications[J]. Journal of Nanomaterials, 2016, 2016(10): 1-10.

[21] Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? [J]. Biomaterials, 2006, 27(15):2907-2915.

[22] 曾飞. 壳聚糖/丝素蛋白-海藻酸双功能复合膜的设计及其生物学性能评价[D]. 深圳：南方医科大学, 2018: 1-47.

(责任编辑:廖乾生)