

PEO/SA 生物活性玻璃支架的制备和生物活性研究

张立^a, 刘涛^b, 张丽香^a, 訾园兴^a, 丁新波^a

(浙江理工大学, a. 材料与纺织学院; b. 科技与艺术学院, 杭州 310018)

摘要: 将生物活性玻璃(Bioactive glass, BG)加入聚氧化乙烯(PEO)/海藻酸钠(SA)混合水溶液中,利用静电纺丝构建生物活性玻璃纤维支架,并将纤维膜浸泡在六亚甲基二异氰酸酯(HMDI)的甲苯溶液和氯化钙(CaCl_2)水溶液中交联处理,进一步将交联后的纤维膜在模拟体液(Simulated body fluid, SBF)中浸泡1、3、5 d和7 d;通过扫描电子显微镜(SEM)、能谱仪(EDS)和X射线衍射仪(XRD)对其形貌结构、元素组成和晶体结构进行表征分析。研究表明:在交联剂中加入2%二月桂酸二丁基锡(DBTDL)作为催化剂使得纤维膜在模拟体液浸泡7 d后仍能保持纤维结构,并伴随羟基磷灰石的生成,因此PEO/SA纳米纤维膜通过上述方法交联处理后具有较好的耐水性能,并具有良好的生物活性。

关键词: 聚氧化乙烯;海藻酸钠;静电纺丝;交联;生物活性玻璃

中图分类号: TQ127.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2018)05-0299-05

0 引言

静电纺丝技术在近几十年来已经被广泛研究,是一种简单有效的制备纳米纤维的方法,它生产的纳米纤维直径可达5~500 nm^[1]。静电纺丝主要是通过高聚物和一些具有特殊功能的组分配制成纺丝液,将纺丝液倒入注射器中并固定在注射泵上,设定恒定的流速,放置一个接收装置,通过在注射器针头和接收装置之间加上一个高电压,使纺丝液在针头和接收装置之间高速运动,加速纺丝液中溶剂的挥发,在接收装置上形成纳米纤维膜^[2-3]。纳米纤维膜是由大量超细的纤维随机沉积在接收板上,具有高比表面积,这种特性使其能较好地模仿细胞外基质结构并作为理想的组织工程支架^[4-5]。

自生物活性玻璃发现以来,因其具有促进骨修复以及体内硬、软组织结合的能力^[6],引起广大研究者的兴趣,并被大量应用于组织修复领域。海藻酸钠(SA)有着很多特性,包括无毒性、可降解性和细胞相容性,使其被广泛应用于组织工程和骨修复领域^[7]。谢红等^[8]利用聚乙烯醇和海藻酸钠制备出能

缓慢释放药物的伤口敷料。聚氧化乙烯(PEO)是被最广泛应用于静电纺丝的高聚物之一,具有无毒、可降解和生物相容的特点^[9],无论是纯PEO纺丝还是与其他高聚物进行混纺,都已有大量的研究报道^[10]。李晓龙等^[11]利用牛跟腱胶原蛋白和PEO制备出胶原蛋白纳米纤维膜。本文利用PEO易纺性和SA的特性,采用PEO/SA二元组分并掺入生物活性玻璃静电纺丝,并对纤维膜进行交联处理以用于生物活性测试,旨在构建一种合适的生物支架用来装载生物活性玻璃并应用于组织工程领域。

1 实验

1.1 试剂和仪器

正硅酸乙酯(TEOS)、磷酸三乙酯(TEP)、四水硝酸钙(CaNT)、 EO_{20} - PO_{70} - EO_{20} (P123)、无水乙醇、盐酸(HCl)、聚氧化乙烯(PEO)、海藻酸钠(SA)、氯化钠(NaCl)、碳酸氢钠(NaHCO_3)、氯化钾(KCl)、磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、六水氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、氯化钙(CaCl_2)、硫酸钠(Na_2SO_4)、三羟甲基氨基甲烷(Tris),均购于国药集团化学试剂有限公司;去离子

收稿日期: 2017-11-07 网络出版日期: 2018-01-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(LY16E020012);浙江省自然科学基金项目(Y201534618)

作者简介: 张立(1994-),男,湖北孝感人,硕士研究生,主要从事现代纺织技术、新产品方面的研究与开发。

通信作者: 丁新波, E-mail: dxblt@zstu.edu.cn

水,实验室自制。

DW-P303-1ACFO型高压直流电源(东文高压电源有限公司),S82-1型磁力搅拌器(上海志威电器有限公司),DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器(杭州惠创仪器设备有限公司),CP114型电子天平(奥豪斯仪器有限公司),KDS100型微量注射泵(KD Scientific, Inc.)。

1.2 样品制备和实验方法

1.2.1 生物活性玻璃的制备

将 4.00 g P123 和 1.00 g 0.5 mol/L 盐酸加入 60.00 g 乙醇中,搅拌 1 h,其后每次间隔 2 h 依次加入 7.40 g TEOS, 0.68 g TEP, 和 0.98 g 四水硝酸钙,接着加入炭粉 1.47 g,在 40 °C 恒温磁力搅拌器下搅拌 3 d,取出所形成的溶胶液倒入玻璃皿中干燥 7 d;将干燥后的物质研磨,在马弗炉中煅烧 5 h(煅烧温度为 650 °C,升温速率为 2 °C/min),获得生物活性玻璃(BG),保存备用。

1.2.2 静电纺丝纤维的制备

将 0.300 g PEO、0.100 g SA 和 0.015 g 已制备得到的生物活性玻璃一起溶解在 10 mL 去离子水中搅拌 8 h 形成混合均匀的纺丝溶液,并将纺丝液倒入注射器,排除残余气泡。设定注射泵流速为 0.5 mL/h,纺丝电压 12 kV,针头到接收板距离为 12 cm,温度(35±2) °C,湿度低于 30%,在接收板处铺一张锡箔纸用来接收沉积的纤维,进行静电纺丝 12 h,将收集的纤维膜取下并置于干燥皿中放置备用。

1.2.3 纤维膜的交联

通过将纤维膜浸泡在 2% HMDI 的甲苯溶液中 24 h,溶液中含有 2% DBTDL 作为催化剂,接着将其浸泡在 5% CaCl₂ 水溶液中进一步处理 24 h,将处理过后的纤维膜用去离子水清洗 3 次,置于干燥皿中保存。

1.2.4 模拟体液浸泡

模拟体液(SBF)通常用来评估纤维的体外生物活性,其配置方法如下:取 1000 mL 烧杯,加入 800 mL 左右的蒸馏水,并放置一颗磁力搅拌子在烧杯中,将烧杯放于磁力搅拌器上,每隔 15 min 依次称取 4.700 g NaCl、0.350 g NaHCO₃、0.224 g KCl、0.228 g K₂HPO₄、0.305 g MgCl₂·6H₂O、0.278 g CaCl₂、0.071 g Na₂SO₄ 和 6.057 g Tris 加入烧杯。最后用 1 mol/L 的稀盐酸调节溶液的 pH 值到 7.35。

模拟体液浸泡的方法参考文献[12-13],具体方法如下:将交联过后的纤维膜和 SBF 溶液按照 0.03 g/20 mL 的比例放置于 37 °C 环境下,分别浸泡 1、3、5 d 和 7 d,将浸泡的纤维膜清洗后保存在干燥皿中。

1.3 表征和性能测试

1.3.1 场发射扫描电子显微镜和电子能谱仪

通过 ULTRA 55 型场发射扫描电子显微镜(德国 Carl Zeiss 公司)观察制备所得纤维的表面形貌,样品经过镀金 30 s,然后在电镜下采用 1~3 kV 电压观察。纤维膜的元素分析通过 INGA-Energy 200 电子能谱仪(英国 Oxford 公司)完成。

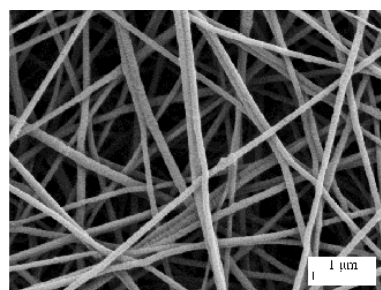
1.3.2 X 射线衍射(XRD)

纤维膜的晶体结构和组成通过 X 射线衍射仪进行检测,X 射线衍射仪所采用的放射源为 Cu 靶 K α 射线,扫描步长取 0.02°,在扫描区间为 2 θ =10°~80°进行广角物相分析。

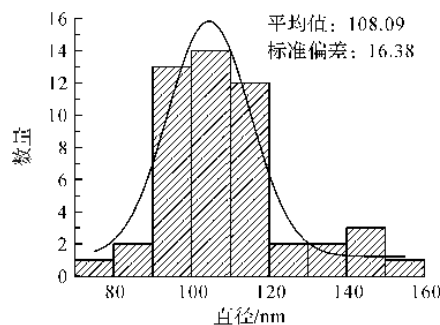
2 结果与讨论

2.1 PEO/SA/BG 静电纺丝纤维膜的形貌观察

图 1 为 PEO/SA/BG 静电纺丝纤维膜的 SEM 图像和纤维直径分布图。从图 1(a)中可以看到纤维分布较为均匀且表面光滑。在 SEM 图中随机选取 50 根纤维进行统计分析,得到图 1(b)所示的纤维直径分布图,纤维平均直径为 108.09 nm,标准偏差为 16.38 nm,直径分布较为集中。在纤维表面并未明显地观察到微球状物质,对纤维表面做 EDS 测试,选取纤维表面区域,如图 2(a)所示,得到图 2(b)所示的 PEO/SA/BG 静电纺丝纤维膜 EDS 谱图,可见在纤维中存在 Si 元素。以上结果表明通过静电纺丝技术,生物活性玻璃被成功地掺入纤维膜中。



(a) 扫描电镜图



(b) 纤维直径分布图

图 1 PEO/SA/BG 静电纺丝纤维膜的扫描电镜和纤维直径分布图

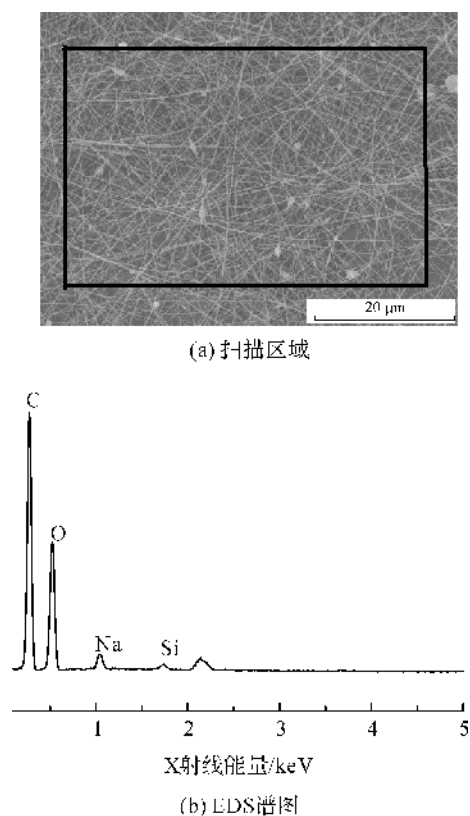
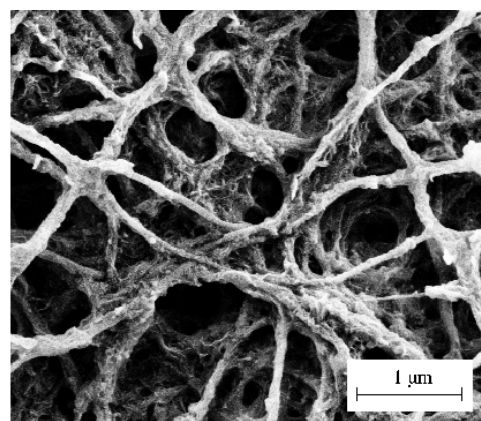


图2 PEO/SA/BG静电纺丝纤维膜的EDS扫描区域及EDS谱图

2.2 PEO/SA/BG静电纺丝纤维的交联分析

由于PEO和SA都是水溶性材料,为达到在组织工程中的使用要求必须对其水溶性进行有效调控,而交联是常用的方法^[14]。图3(a)所示是经过交联处理后的纤维膜的SEM图,由图可见交联后的静电纺丝纤维仍然保持纤维状,但表面变粗糙。通过随机选取50根纤维对其直径统计,得到图3(b)所示的纤维直径分布图,其平均直径为98.30 nm,标准偏差为21.42 nm。对比交联之前的数据,发现直径有所减小,这是在交联过程中纤维的部分溶解造成的。将经过交联的纤维膜浸泡在去离子水中3 d,纤维膜仍能保持不溶解,可见经过交联后的纤维膜具有抗水性能。



(a) 扫描电镜图

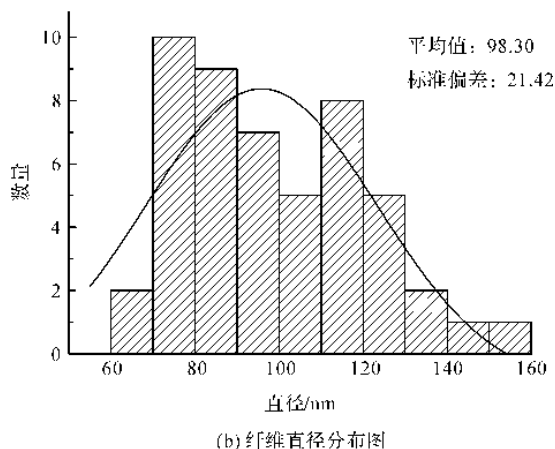


图3 经交联改性后的静电纺丝纤维扫描电镜图和纤维直径分布图

图4是在交联过程中加入不同催化剂含量并在SBF溶液中浸泡7 d的SEM图。由图4(a)~(c)可见,加入1%催化剂和3%催化剂交联处理过的纤维膜其纤维结构被损毁,而加入2%催化剂交联处理的纤维能够保持较完整的纤维结构。其原因可能是当交联剂含量较少时,交联作用和基体水溶同时进行,且基体水溶速度高于交联速度,导致纤维结构损毁严重;而当交联剂过多时,将导致纳米纤维膜硬而脆。因此,采用2%催化剂作为静电纺丝纤维交联处理的条件。

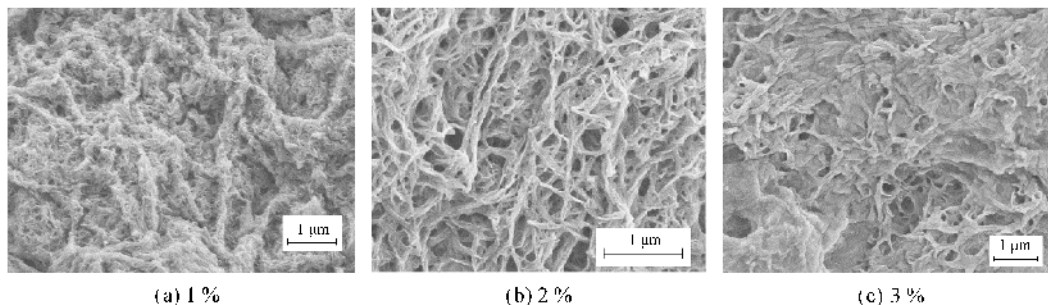


图4 不同含量催化剂交联后的静电纺丝纤维的SEM图

2.3 体外生物活性分析

为进一步研究该生物活性玻璃纤维支架,对2%催化剂交联组进行体外活性分析,将试样在SBF中浸泡1、3 d和5 d,其结果如图5所示。在图5(c)看到类似于花瓣状的晶状物质生成,可见在SBF中,PEO/SA/BG具有沉积羟基磷灰石的能力。为确认PEO/SA/BG复合纤维膜支架的体外活性,进一步进行XRD研究。图6所示为经过交联处理并在SBF溶液中浸泡的XRD图谱,相比未浸泡纤维膜的XRD图谱,经过浸泡的纤维膜在 2θ 值为 29.6° , 32° 和 45.7° 附近出现羟基磷灰石的特征峰,且峰宽较窄,说明所形成的羟基磷灰石具有较好的结晶结构,进一步观察浸泡5 d和浸泡7 d的图谱,发现浸泡7 d的特征峰更为明显,说明浸泡7 d的纤维膜伴随更多的羟基磷灰石生成。以上实验结果表明PEO/SA/BG复合纤维膜具有较好的生物活性。

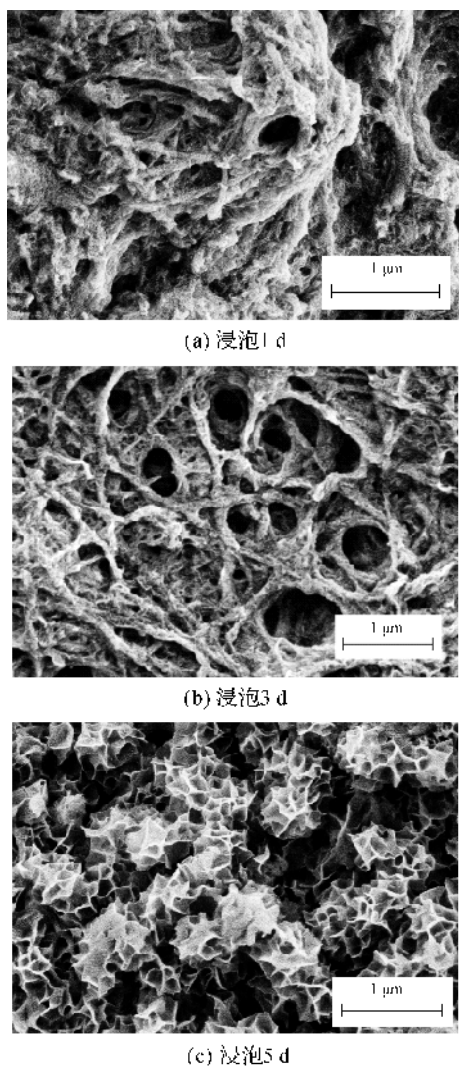


图5 静电纺丝纤维膜在SBF中浸泡的SEM图

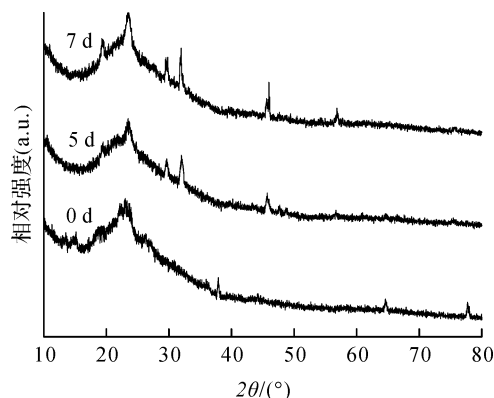


图6 PEO/SA/BG静电纺丝纤维膜的XRD图谱

3 结论

以PEO/SA为原料构建搭载生物活性玻璃的纤维支架,通过无机材料生物活性玻璃、高聚物PEO和SA复合制备静电纺丝纤维膜,并通过交联使其具备一定的抗水性能使PEO/SA/BG复合纤维膜在实际环境中应用,最后分析复合纤维膜在模拟体液中的生物活性,主要结论如下:

a) 生物活性玻璃可以通过和PEO、SA混合,通过静电纺丝的方法掺入静电纺丝纳米纤维中,所制得复合纤维膜直径为 (108 ± 16) nm。

b) 可以通过将静电纺丝纤维膜分别浸泡在含有2%催化剂(DBTDL)的HMDI的甲苯溶液24 h和5% CaCl_2 水溶液24 h来对其交联改性,且在催化剂含量为2%时达到最佳的交联效果,得到纤维直径为 (98 ± 21) nm的纤维膜。

c) 所制备的载有生物活性玻璃的静电纺丝膜在模拟体液中能保持完整的纤维结构,在SBF溶液中促进羟基磷灰石的沉积,具备较好的体外生物活性。

参考文献:

- [1] Chen J P, Chang G Y, Chen J K. Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2008, 313: 183-188.
- [2] Kaassis A Y A, Young N, Sano N, et al. Pulsatile drug release from electrospun poly(ethylene oxide)-sodium alginate blend nanofibres [J]. Journal of Materials Chemistry B, 2014, 2(10): 1400-1407.
- [3] Son W K, Youk J H, Lee T S, et al. The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers[J]. Polymer, 2004, 45(9): 2959-2966.

- [4] Lu J W, Zhu Y L, Guo Z X, et al. Electrospinning of sodium alginate with poly (ethylene oxide) [J]. Polymer, 2006, 47(23): 8026-8031.
- [5] Zhao X, Chen S, Lin Z, et al. Reactive electrospinning of composite nanofibers of carboxymethyl chitosan cross-linked by alginate dialdehyde with the aid of polyethylene oxide [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 148: 98-106.
- [6] Liu X, Rahaman M N, Day D E. Conversion of melt-derived microfibrillar borate (13-93B3) and silicate (45S5) bioactive glass in a simulated body fluid [J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2013, 24(3): 583-595.
- [7] 康祺, 于炜婷, 吴叶, 等. 非共价键交联海藻酸钠水凝胶的制备与性能[J]. 化学通报, 2015, 78(3): 236-236.
- [8] 谢红, 卢华, 黄华, 等. 载药聚乙烯醇/海藻酸钠静电纺丝纤维的改性及其药物体外释放研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(23): 2485-2489.
- [9] 樊亚男, 蔡志江, 赵孔银. 静电纺丝制备海藻酸钠基复合纳米纤维的研究进展[J]. 高分子通报, 2013, 11(13): 70-75.
- [10] Son W K, Youk J H, Lee T S, et al. The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly (ethylene oxide) fibers [J]. Polymer, 2004, 45(9): 2959-2966.
- [11] 李晓龙, 陈婷, 张兴群. I型胶原蛋白纳米纤维膜的制备及结构表征[J]. 食品与药品, 2016, 18(2): 83-86.
- [12] Liu T, Ding X, Lai D, et al. Enhancing in vitro bioactivity and in vivo osteogenesis of organic-inorganic nanofibrous biocomposites with novel bioceramics [J]. Journal of Materials Chemistry B, 2014, 2(37): 6293-6305.
- [13] Liu X, Ranaman M N, Day D E. Conversion of melt-derived microfibrillar borate (13-93B3) and silicate (45S5) bioactive glass in a simulated body fluid [J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2013, 24(3): 583-595.
- [14] Park S A, Park K E, Kim W D. Preparation of sodium alginate/poly (ethylene oxide) blend nanofibers with lecithin [J]. Macromolecular Research, 2010, 18(9): 891-896.

Preparation and bioactivity of bioactive glass scaffold based on PEO/SA

ZHANG Li^a, LIU Tao^b, ZHANG Lixiang^a, ZI Yuanxing^a, DING Xinbo^a

(a. College of Materials and Textiles; b. Keyi College, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The bioactive glass (BG) was added into poly (ethylene oxide) (PEO)/sodium alginate (SA) mixed aqueous solution to construct the bioactive glass fiber scaffold by electrospinning. Then the fiber membrane was soaked in hexamethylene diisocyanate (HMDI) toluene solution and CaCl_2 aqueous solution for cross-linking treatment. The cross-linked fiber membrane was soaked in the simulated body fluid (SBF) for 1, 3, 5 and 7 days. The morphology, elemental composition and crystal structure were characterized by scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive spectroscopy (EDS) and X-ray diffraction (XRD) respectively. The results showed that when 2% dibutyltin dilaurate (DBTDL) was added into cross-linking agent as the catalyst, the fiber membrane maintained fiber structure and generated hydroxyapatite after being soaked in simulated body fluid for 7 days. It indicates that PEO/SA nanofibrous membrane after cross-linking treatment by the above method has good water resistance and biological activity.

Key words: poly ethylene oxide; sodium alginate; electrospinning; crosslink; bioactive glass

(责任编辑: 廖乾生)