



壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶纤维制备及其生物性能探究

陈 鹏^a, 王耐艳^b, 郑莹莹^a

(浙江理工大学, a.理学院; b.材料与纺织学院, 杭州 310018)

摘 要: 为提高壳聚糖的可纺性和生物相容性进行了材料设计。通过在壳聚糖(CS)乙酸溶液中引入高度可纺性的聚氧化乙烯(PEO)来提高壳聚糖的可纺性,并以高度可纺性的明胶(GEL)作为核模板,通过同轴静电纺丝技术进一步提高壳聚糖的可纺性,并制备出核壳结构的壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶(CS-PEO@GEL)纤维。纺丝实验结果显示,CS和GEL浓度对纤维成型有显著影响,最佳条件为:CS浓度为3%(W/V),CS和PEO质量比为4:1,GEL浓度为41%(W/V);扫描电镜(SEM)和透射电镜(TEM)显示CS-PEO@GEL纳米纤维表面均匀光滑,具有核壳结构,内径约为100 nm,外径约为150 nm;亲水性测试结果表明,亲水性较好的PEO和GEL能够明显提高CS的亲水性;骨肉瘤细胞MG-63培养过程中,CS-PEO@GEL纤维呈现出良好的生物相容性。所制备的CS-PEO@GEL纤维材料在骨组织工程上具有潜在的研究价值。

关键词: 壳聚糖;明胶;同轴电纺;细胞培养

中图分类号: Q28

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2019) 01-0056-09

Preparation and biological properties of Chitosan-PEO@Gelatin nanofibers

CHEN peng^a, WANG Naiyan^b, ZHENG Yingying^a

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

Abstract: To improve spinnability and biocompatibility of chitosan (CS), material design was conducted. Spinnability of chitosan improved through introducing PEO with high spinnability in CS acetic acid solution. Besides, gelatin (GEL) with high spinnability was used as the template to further improve spinnability of chitosan through coaxial electrospinning technology. And chitosan-polyethylene oxide-gelatin(CS-PEO@GEL) nanofibers with core-shell structure were prepared. The experimental results showed that, the concentration of CS and GEL had significant influence on fiber forming. The optimal conditions are as follows: CS concentration 3%(W/V), CS/PEO mass ratio 4/1 and GEL concentration 41%(W/V). SEM and TEM showed that CS-PEO@GEL nanofibers with the inner diameter of about 100 nm and external diameter of about 150 nm were uniform and smooth on the surface, and had core-shell structure. The hydrophilicity test result indicated that, hydrophilicity of the CS was improved by adding PEO and GEL. When MG-63 cells were cultured, CS-PEO@GEL nanofibers presented good biocompatibility. The prepared CS-PEO@GEL nanofibers have potential research value for bone tissue engineering.

Key words: chitosan; gelatin; coaxial electrospinning; cell culture

0 引 言

骨骼损伤不易修复的是医学界的一大难题,组织工程学提出一种新的思路,即利用支架材料与细胞结合,在体内外构建组织或者器官对骨损伤修复进行外部干预,从而提高骨损伤修复的效率^[1]。目前,以天然多糖为原料,通过静电纺丝技术制备出的三维多孔结构纤维膜被认为是理想的生物支架材料^[2]。甲壳素(Chitin)是一种天然多糖,产量丰富,经脱乙酰基处理后获得线性多糖为壳聚糖。壳聚糖(Chitosan,CS)是由氨基葡萄糖和乙酰基葡萄糖两种基本单元通过 β -1,4糖苷键构成的,其结构与人体内的粘多糖相似,有着良好的生物相容性^[3-5];其分子链上具有大量的氨基,氨基基团在质子化后使壳聚糖带正电,赋予壳聚糖优异的性能,如抗菌性和凝血性等^[6];壳聚糖在生物体内能通过酶催化作用进行生物降解,降解产物为氨基葡萄糖和乙酰基葡萄糖、 CO_2 和 H_2O ,对人体无毒无害,因此在生物组织工程上得到广泛应用,如眼科材料、人工皮肤材料、神经材料以及目前备受关注的骨科材料^[7-8]。

静电纺丝被认为是一种简单而有效的制备壳聚糖支架材料的方法。但壳聚糖分子链上大量的氨基基团具有很强的相互作用,因此壳聚糖很难被溶剂溶解,即使溶解一小部分,得到的也是低浓度高粘度的纺丝液,这使纺丝过程变得很困难,并且由于壳聚糖溶液低浓度高粘度的特点而导致产量很低^[9]。在早期的研究中,为了解决壳聚糖溶解问题,一般采用具有毒性、腐蚀性的溶剂,如三氟乙酸或者二氯甲烷。Kousaku等^[10]将壳聚糖三氟乙酸溶液和壳聚糖三氟乙酸-二氯甲烷溶液作为纺丝液,采用静电纺丝技术能够形成均匀的壳聚糖纤维。由于三氟乙酸和二氯甲烷都具有一定的毒性,以三氟乙酸和二氯甲烷作为溶剂来制备壳聚糖生物材料是不可取的。Geng等^[11]认为利用稀乙酸来溶解壳聚糖能有效的解决溶剂毒性。

通过将壳聚糖和其他具有生物活性且高度可纺的聚合物形成均匀的混合液进行静电纺丝成为了更有效的方法,不仅解决壳聚糖难纺的问题,并且提高壳聚糖纤维的生物活性,常见的用于改性壳聚糖溶液纺丝效率的聚合物有聚氧化乙烯^[12-14](Polyethylene oxide, PEO)、明胶^[15](Gelatin, GEL)、胶原蛋白^[16](Collagen, COL)、丝素蛋白^[17-18](Silk fibroin, SF)、聚己内酯^[19](Polycaprolactone, PCL)、海藻酸盐^[20]

(Sodium alginate, SA)、聚乳酸^[21](Polylactic acid, PLA)等。目前I型胶原蛋白来进行纤维改性应用的比较广泛,但是I型胶原蛋白成本过高且在体内具有抗原性,限制其应用^[22]。明胶作为胶原蛋白的变形产物,具有很多的优点,如价格低、无抗原性、生物相容性以及生物可吸收降解性等,能较好地解决胶原蛋白抗原性的问题,并且纯的明胶纤维也可作为骨损伤修复支架材料^[23]。明胶与壳聚糖结合时能形成一种类似于精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列(Arg-Gly-Asp, RGD序列)^[24],该序列大多存在于骨细胞外基质中^[25],壳聚糖和明胶两者复合,能很好地模拟出骨组织的细胞外基质,可以促进成骨细胞的粘附、增殖和分化^[26-27]。明胶与壳聚糖共混能提高壳聚糖溶液的可纺性,但由于是共混体系,溶液浓度容易变大从而导致纺丝过程变得困难^[28]。作为壳层的壳聚糖分子链上丰富的氨基基团具备整合金属的性能,更容易接触细胞,促进细胞的粘附和增殖以及生物矿化,并与核层的明胶形成了精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列结构,模拟骨组织的细胞外基质来提高壳聚糖支架材料的生物性能^[29]。

本文以壳聚糖、聚氧化乙烯和明胶为原料,采用同轴静电纺丝技术,制备核壳结构纳米纤维构成的三维多孔生物支架材料,并探究材料成型的条件并研究其生物性能。

1 实验部分

1.1 实验材料

壳聚糖(脱乙酰度95%以上,阿拉丁试剂),明胶(Type I,分析纯,阿拉丁试剂),聚氧化乙烯(Polyethylene oxide, PEO,平均分子量为300000,阿拉丁试剂),戊二醛(GA,25%,分析纯,阿拉丁试剂),无水乙醇(阿拉丁试剂),乙酸(分析纯,阿拉丁试剂),磷酸盐缓冲液(PBS,HyClone),二甲基亚砜(DMSO,分析纯,阿拉丁试剂)。实验中所用水为蒸馏水。

1.2 纺丝液的制备

1.2.1 壳聚糖溶液制备

称取不同质量的壳聚糖粉末溶于20%的乙酸水溶液中,搅拌至完全溶解,配置成不同浓度的壳聚糖乙酸溶液;将聚氧化乙烯粉末加入壳聚糖乙酸溶液中,聚氧化乙烯质量为壳聚糖的四分之一,搅拌至溶解,静置12 h消泡。

1.2.2 明胶溶液制备

称取不同质量的明胶颗粒溶于20%的乙酸水

溶液中,室温下搅拌使明胶溶胀后,置于 60 ℃ 水浴中搅拌 6 h 溶解,静置 12 h 消泡。

1.3 静电纺丝过程

同轴针头选择 18 G(0.90 mm)和 23 G(0.33 mm)两种型号;将壳聚糖-聚氧化乙烯溶液和明胶溶液分别装入 20.00 mL 注射器内并连接到同轴针头上,其中壳聚糖-聚氧化乙烯溶液连接外针头(即作为壳溶液),而明胶溶液连接内针头(即作为核溶液)。滚筒收集器用一层 0.50 mm 厚的铝箔纸包裹,并与针头顶端相距 16 cm。纺丝过程中,为了能够得到稳定连续的纤维,需调节电压和内外纺丝液的推进速度,其中电压为 20.00 kV,内外层纺丝液推进速度分别为 0.40 mL/h 和 0.30 mL/h,滚筒收集器转速为 1000 r/min,并保持外界温度为 25 ℃,相对湿度为 35%~45%。纺丝结束后,收集滚筒外铝箔纸上的薄膜并置于 80 ℃ 烘箱中干燥,待用。为了后续对比试验,壳聚糖-聚氧化乙烯溶液和明胶溶液分别进行单溶液静电纺丝,制备条件及过程与同轴静电纺丝一致。

1.4 化学交联实验

壳聚糖和明胶是高亲水性材料,通过同轴静电纺丝形成的纤维遇水很容易被破坏。为了避免这种情况,需要进行化学交联处理,本文所采用的交联剂为戊二醛溶液^[30]。用无水乙醇将戊二醛溶液稀释到不同的浓度;将干燥的壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶纤维(CS-PEO@GEL)薄膜裁剪成 1 cm×1 cm 大小以方便后续实验,并放在戊二醛溶液中浸泡 24 h;用去离子水洗涤多次,每次 5 min,以除去 CS-PEO@GEL 薄膜表面上没有反应掉的戊二醛。将交联好的薄膜进行冷冻干燥 24 h。壳聚糖-聚氧化乙烯薄膜和明胶薄膜进行同样的戊二醛溶液化学交联处理。

1.5 材料表征

采用日本 HATACHI 公司的 S-4800 场发射扫描电子显微镜(加速电压 10 kV,测试时样品需喷金 20 s)和日本 JEOL 公司的 JEM-2011 透射电子显微镜(加速电压 200 kV)对材料的表面形貌以及核壳结构进行表征。采用美国热电公司的傅里叶红外光谱分析仪(FTIR-ATR, Nicolet 5700)对材料的表面基团和分子结构进行分析,样品与溴化钾(KBr)混合压片,光谱范围 4000~550 cm⁻¹,分辨率 0.09 cm⁻¹。采用美国 PerkinElmer 公司的热重分析仪(TGA, PYRIS 1)对样品质量与温度变化关系进行测试以判断材料的热稳定性以及对应组份含量,测试时,取 5~10 mg 样品在氮气气氛下进行,以 10 ℃/min 的升

温速率从室温加热到 800 ℃。材料的亲水性采用德国克鲁斯公司的接触角测量仪(DSA100)进行测试。

1.6 细胞毒性测试

将材料灭菌后浸泡在培养基 72 h,将培养基收集起来作为浸提液。骨肉瘤细胞(MG-63)细胞经消化离心重悬后,以 5×10⁴个/mL 的细胞密度接种在 96 孔板中。每个孔板加入 100 μL 的细胞悬液后,放入饱和湿度、37 ℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱内培养 12 h,使细胞贴壁。然后每孔换上 100 μL 的浸提液在培养箱中继续培养 24 h 和 48 h。细胞活性的检测可以通过 MTT(四甲基偶氮唑盐, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)法获得。具体操作为:细胞在浸提液中培养 24 h 和 48 h 后,每孔避光加入 10 μL 的 MTT 溶液,在培养箱中孵育 4 h 后,移除上清液,加入 200 μL 的二甲基亚砜,晃动 10 min。选择 570 nm 波长,在酶标仪上测定各孔吸光度,记录结果。实验组、空白组和控制组都需做 5 个平行实验,吸光度取平均值以减少误差。

1.7 细胞增殖测试

细胞增殖实验是指材料显示低毒性后,将细胞接种在材料上后共同培养 1、3、5 d 和 7 d 后观察细胞的生长情况,能直观的表达出材料的生物活性以及可能存在的应用。材料灭菌后置于 48 孔板中, MG-63 细胞经消化离心重悬后,以 2×10⁴/mL 的细胞密度接种在材料上,每孔接种 200 μL 的细胞悬液。之后在培养箱中培养 1、3、5 d 和 7 d,隔天换次培养基。对于细胞活性的定量分析可以通过 CCK-8 法(2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐)测试。具体步骤如下:细胞接种在材料上培养了 1、3、5 d 和 7 d 后,每孔避光加入 20 μL 的 CCK-8 溶液,在培养箱中孵育 1 h 后,选择 450 nm 波长,在酶标仪上测定各孔吸光度,记录结果。实验组、空白组和控制组都需做 5 个平行实验,取平均值,避免误差。

在扫描电子显微镜(SEM)下观察细胞形态进行定性分析。细胞接种在材料上培养 1、3、5 d 和 7 d 后, PBS 溶液冲洗 48 孔板中的生物材料 5 次,每次 5 min;500 μL 的 4%多聚甲醛加入孔板中,室温下固定样品 15 min;用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%和 100%的乙醇水溶液进行梯度脱水后冷冻干燥过夜;将样品喷金处理,在扫描电子显微镜下观察。

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖溶液浓度对壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶纳米纤维形貌的影响

图 1 为 CS 溶液浓度大小对纤维成型的影响。CS 浓度为 1%, 溶液具有较低的粘度, 在表面张力和电压的作用下, 达不到溶液喷射出流体的临界值, 因此在此浓度下, 只能形成不稳定的串珠或者液滴, 结果如图 1(a) 所示。而随着浓度的增加, 聚合物溶液粘度增加。大于临界值时, 分子链与分子链之间纠缠数量增加, 溶液松弛需要的时间增加, 在针头能形成稳定的液滴。通过电场力的作用下, 能保持一定的形态, 并且形成纤维状, 因此串珠现象随着浓度

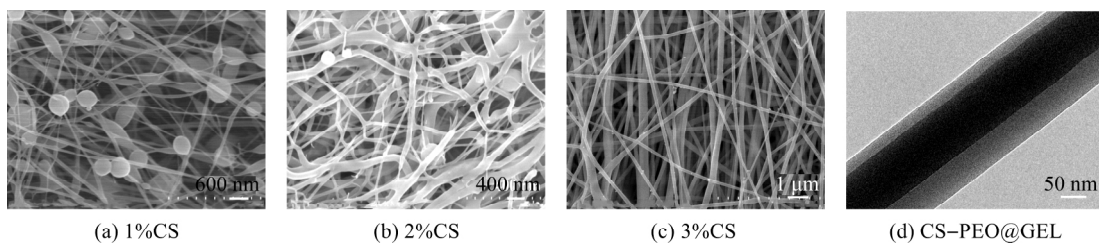


图 1 CS 浓度不同时 CS-PEO@GEL 纳米纤维的 SEM 图以及 CS-PEO@GEL 纳米纤维的核壳结构 TEM 图

2.2 明胶溶液浓度对壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶纳米纤维形貌的影响

图 2 为 GEL 溶液浓度大小对纤维成型的影响。图 2 表明, GEL 溶液浓度对 CS-PEO@GEL 纳米纤维有着显著影响, 串珠现象随着浓度的变化也在相应的改变。当 GEL 浓度较低的时候(36%), 溶液粘度很低, 达不到溶液喷射出流体的临界值, 因此在此浓度下, 只能形成不稳定的串珠或者液滴, 而且串珠很多

的增加而减少。CS 浓度到 2%, 结果如图 1(b) 所示, 串珠现象变少; CS 浓度为 3%, 串珠现象消失, 形成均匀光滑的纤维(图 1(c))。纤维的直径大约在 100~200 nm 之间, 并且纤维与纤维之间形成三维多孔结构。三维多孔结构不仅有利于小分子营养物质的传输和氧气进入、代谢产物的排出, 也为细胞的粘附、增殖、分化提供了良好的环境^[31-32]。图 1(d) 为单根 CS-PEO@GEL 纤维的透射电镜图(TEM), 结果表明纤维的内部结构; 由于明胶和壳聚糖对电子束穿透能力不同, 在 TEM 结果中呈现出明显的核壳结构, 纤维内径约为 100 nm, 外径约为 150 nm, 与扫描电镜(图 1(c))显示的结果相符合。

(图 2(a))。随着 GEL 浓度的增加(37%~39%), 即纺丝液粘度的增加, 串珠开始变少(图 2(b—d))。GEL 浓度在 40%(图 2(e))的时候串珠现象与之前低浓度的结果相比, 明显减少。GEL 浓度为 41%(图 2(f))的时候, 串珠现象消失。GEL 溶液在电场力的作用下, 能保持一定的形态, 形成均匀光滑的纤维, 纤维的直径大约在 100~200 nm 之间, 并且纤维与纤维之间形成三维多孔结构, 符合生物支架材料的要求。

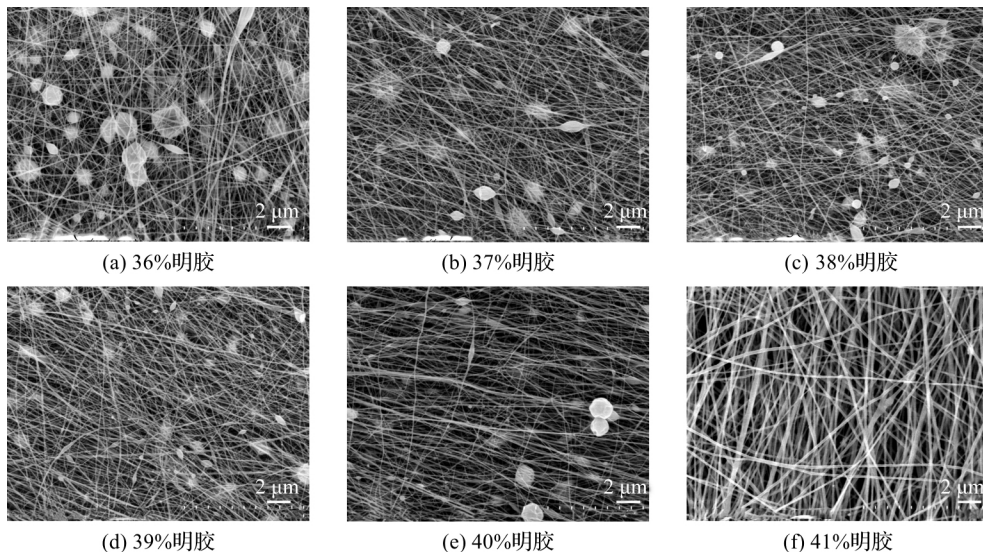


图 2 明胶浓度不同时 CS-PEO@GEL 纳米纤维的 SEM 图

2.3 不同浓度的戊二醛交联对壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶纳米纤维形貌的影响

图3为CS-PEO@GEL薄膜交联前后的SEM图。CS-PEO@GEL薄膜呈白色薄膜状(图3(a)),有着很弱的水稳定性。当在薄膜上滴上去离子水,薄膜很快溶解消失,露出底部的铝箔纸(图3(b))。本文采用戊二醛(GA)为交联剂进行化学交联,GA交联的原理是CS分子链中的氨基基团和GA分子链中的醛基形成一种更加稳定的席夫碱,从而提高CS-PEO@GEL薄膜的水稳定性^[30-33]。图3(c)结果表明,将交联后的薄膜置于去离子水中,薄膜仍然保持原状,呈现出很好的水稳定性。图3(e)为经过浓度为3%的GA交联后放在水中薄膜的SEM图,

结果显示纤维保存的比较完整,和未交联前的形貌(图2(c))基本保持一致。图3(d-f)为GA浓度分别为2%、3%、4%时壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶纳米纤维形貌特征图,结果表明看出在GA浓度较低的时候(2%),交联程度不够,在水中受到水分子作用时纤维变得弯曲,且有部分相连接在一起(图3(d));而GA浓度过高的时候(4%),交联程度过高,纤维变得粗厚,多孔结构也被破坏(图3(f));最合适的GA交联浓度为3%(图3(e))。图4分别显示CS-PEO纤维(图4(a)),GEL纤维(图4(b))以及分别通过3%(V/V)GA交联后纤维的扫描电镜图,结果表明交联后的CS-PEO纤维(图4(c))和GEL纤维(图4(d))保存原先的微观形貌。

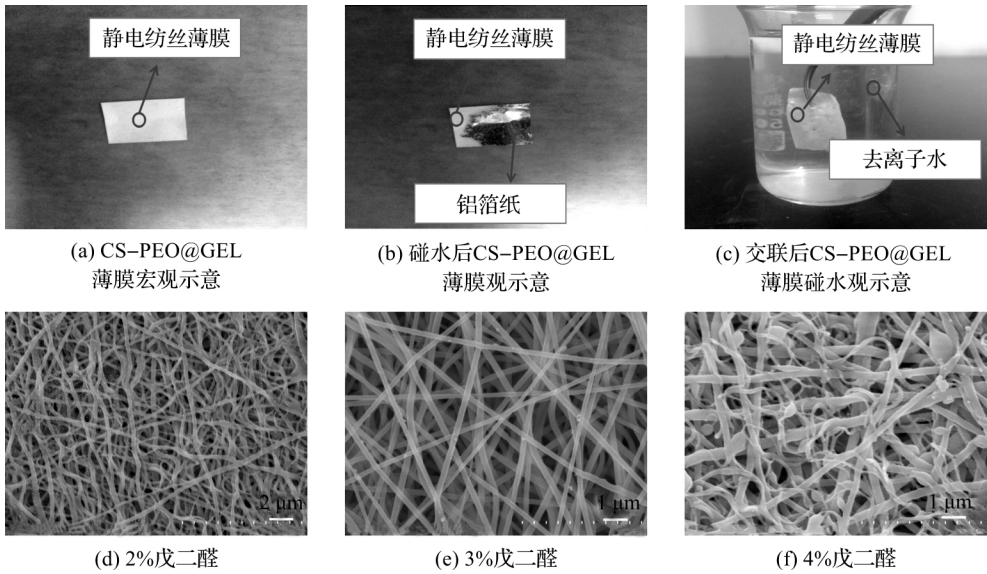


图3 CS-PEO@GEL薄膜交联实验

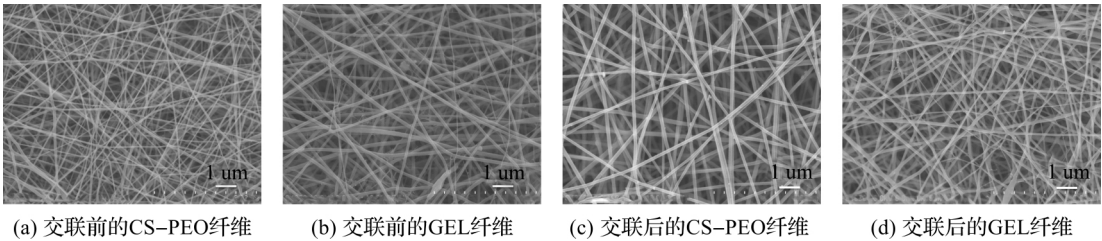


图4 CS-PEO纤维和GEL纤维交联前后的SEM图

2.4 热重和光谱分析

为了探究复合材料的组分构成,本文对纤维复合材料进行傅里叶红外光谱分析和热重分析。图5分别显示CS-PEO、GEL、未交联的CS-PEO@GEL和交联后的CS-PEO@GEL纳米纤维的傅里叶红外光谱图。在CS-PEO和GEL复合材料中,3100—3500 cm⁻¹处的吸收峰属于O—H的伸缩振动;2800 cm⁻¹处的吸收峰为N—H的伸缩振动;1638 cm⁻¹处的吸收峰为酰胺Ⅰ带(C=O)伸缩振动峰,

1537 cm⁻¹处的吸收峰为酰胺Ⅱ带(N—H)伸缩振动峰,1240 cm⁻¹处为酰胺Ⅲ带(C—N)的吸收峰。以上这些都是CS和GEL的特征峰。CS-PEO的吸收图谱中,1030 cm⁻¹的吸收峰是CS分子中C—O—C对称和不对称伸缩导致的^[34]。CS-PEO@GEL纤维交联前的吸收峰位置基本与CS-PEO和GEL一致,说明该复合材料中含有CS、PEO和GEL。对比交联前和交联后的吸收光谱,发现交联后的纳米纤维在1380—1400 cm⁻¹的光谱范围内出

现一个新的吸收峰,是 GA 交联产生新的醛亚胺($-C=NH-$)吸收造成的^[35],证明 CS-PEO@GEL 纳米纤维与 GA 的成功交联。

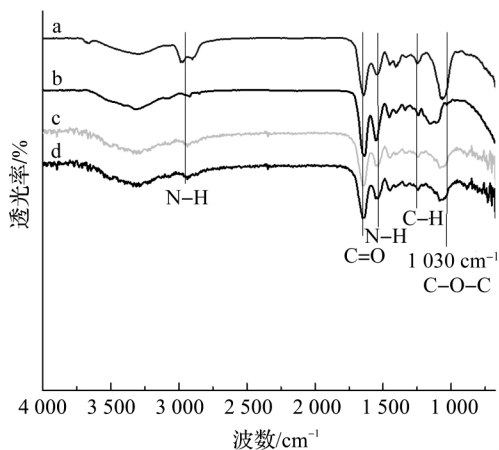


图 5 傅里叶红外光谱图

采用热重分析对 CS-PEO@GEL 纤维中的 PEO、CS 和 GEL 的含量进行分析,结果如图 6 所示,图 6 中的 a—d 分别显示 GEL、CS-PEO@GEL 纤维、CS 和 PEO 的热重曲线。从图 6 中曲线 a 表明,GEL 的分解分两步,除了在 295 °C 热失重外,在 500 °C 时曲线有个大幅度的降低,到 610 °C 以上,在氮气气氛下,明胶剩有 6% 的碳化物;图 6 中曲线 c 表明,CS 的分解也分两步,温度分别为 250 °C 和 320 °C。图 6 中曲线 d 可见 PEO 分解温度为 181 °C。CS-PEO@GEL 纤维的热重曲线和 GEL 以及 PEO 的热重曲线相比,在各个有机物达到各自的分解温度时,复合材料的失重情况也相应的有所变化,在三个温度区间有明显的失重现象,分别对应 PEO、CS、GEL 达到各自分解温度造成的。0~100 °C

之间 9.4% 的失重是由于材料失水;100~250 °C 区间失重 3.8%,是由于 PEO 的分解;250~295 °C 区间失重 10.1%,主要为 CS 的分解;295~610 °C 失重 71.6%,主要是 GEL 和 CS 的分解;610 °C 以上仍然剩有 5.1%,为明胶的碳化物。

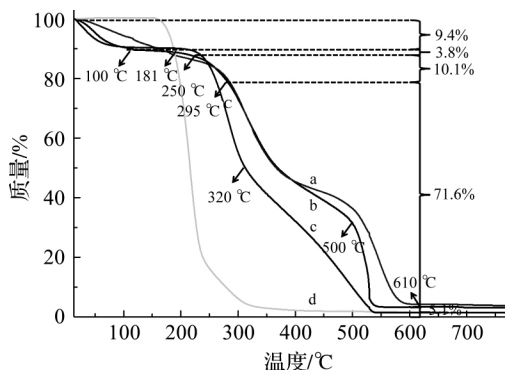


图 6 纤维复合材料的热重曲线

2.5 亲水性性能

CS 分子链上含有丰富的氨基基团,形成大量的分子内氢键,影响着纤维材料的亲水性,限制了后续细胞在材料上的粘附作用^[36]。添加 PEO 和 GEL 明显改善纤维材料的亲水性能,结果如图 7(a) 所示,纯 CS 的水接触角约为 81.4°,加入 PEO 这种具有较强的亲水性材料后,接触角变小约为 73.0°(图 7(b)),因此 PEO 通过干扰 CS 分子链中的氢键作用,既增加 CS 的溶解性,又使亲水性增加。纯 GEL 是高亲水性的材料,接触角为 37.8°(如图 7(c) 所示)。复合后材料的亲水性明显改善,接触角明显减少,约为 46.9°,结果如图 7(d) 所示。

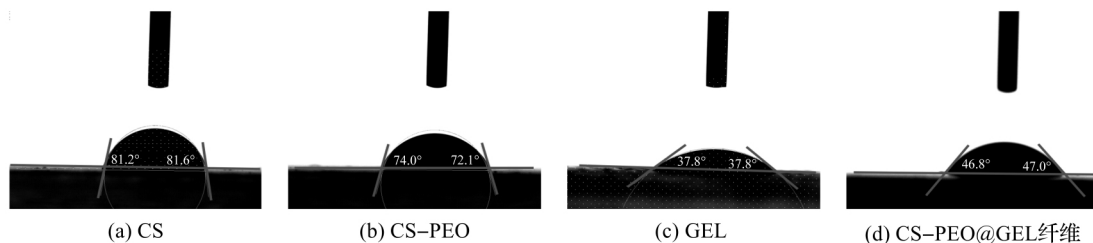


图 7 复合纤维材料的接触角测量

2.6 纤维材料的毒性测试分析

图 8 为 MG-63 细胞接种在 CS-PEO 纤维、GEL 纤维和 CS-PEO@GEL 纤维上,并培养了 24 h 和 48 h 后的毒性测试结果。采用的方法是 MTT 比色法,其中 570 nm 处的吸光度代表 MG-63 的细胞活性。和对照组相比,细胞活性基本在 80% 左右。细胞培养 24 h 后,CS-PEO 纤维、GEL 纤维和 CS-PEO@GEL 纤维上的细胞活性分别为 77.37%、79.20% 和

81.98%;培养 48 h 后,细胞活性分别为 79.97%、82.26%、83.70%。以上结果均高于体内毒性测试标准 70% (ISO 10993-5:2009),因此 CS-PEO 纤维、GEL 纤维和 CS-PEO@GEL 纤维是低毒的,具有良好的生物相容性。CS-PEO@GEL 纤维的细胞活性要比单纯的 CS-PEO 纤维和 GEL 纤维上的细胞活性分别高约 3.73% 和 1.44%,其原因可能是 CS 和 GEL 结合形成精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列

(RGD)结构,进一步提高生物活性,有利于细胞的生长。

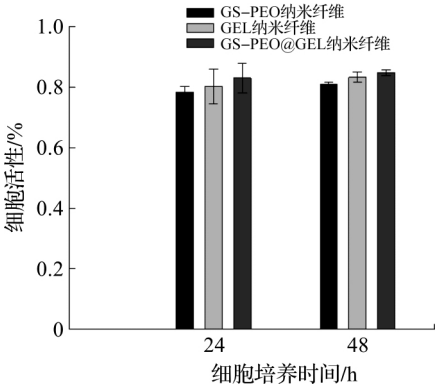


图8 纳米纤维对 MG-63 细胞毒性影响的分析

图9为MG-63细胞接种到CS-PEO纤维,GEL纤维和CS-PEO@GEL纳米纤维生物支架材料上并共同培养1,3,5 d和7 d后的增殖结果。结果表明:7 d内细胞活性在CS-PEO纤维,GEL纤维和CS-PEO@GEL纳米纤维上呈现出一个上升的趋势,说明细胞成功地贴附在材料上,并且继续增殖,三种材料均具有良好的生物相容性,能为细胞的生长提供良好的环境。CS-PEO@GEL纳米纤维上的细胞活性整体上要比CS-PEO纤维和GEL纤维要高。

图10为MG-63细胞分布在纤维材料上的形态特征。结果表明:MG-63细胞在CS-PEO纤维,GEL纤维和CS-PEO@GEL纳米纤维上培养7 d,细胞数量随时间的推移而增多;细胞在CS-PEO@GEL纳米纤维上生长速率要比单纯的CS-PEO纤维和GEL纤维上的高。

维和GEL纤维上的高。第1 d和3 d,细胞数量比较少,比较分散,但是在第3 d,CS-PEO@GEL纳米纤维上的大部分的细胞开始相互连接;第5 d,细胞在CS-PEO纤维和GEL纤维上比较聚集,连接在一起,而CS-PEO@GEL纳米纤维上的细胞相互连接并且数量增多;到第7 d,CS-PEO纤维和GEL纤维上的细胞相互连接数量增多,与CS-PEO@GEL纳米纤维上的细胞在第5 d的结果相似。而此时CS-PEO@GEL纳米纤维已经被细胞完全覆盖。图9和图10的结果表明,核壳结构的CS-PEO@GEL纳米纤维中,壳聚糖和明胶形成一种RGD结构,并且壳聚糖作为壳层,分子链上丰富的氨基基团有着良好的生物相容性,可以促进细胞的粘附和增殖。

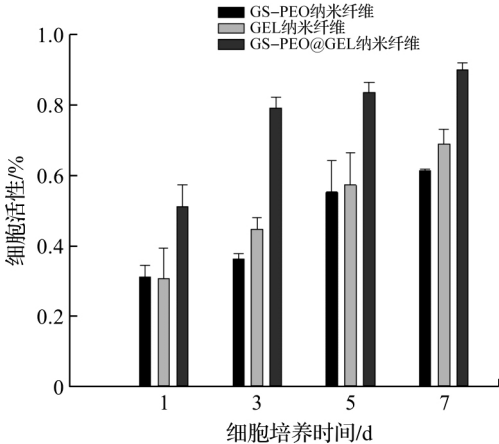


图9 纳米纤维对 MG-63 细胞增殖影响的分析

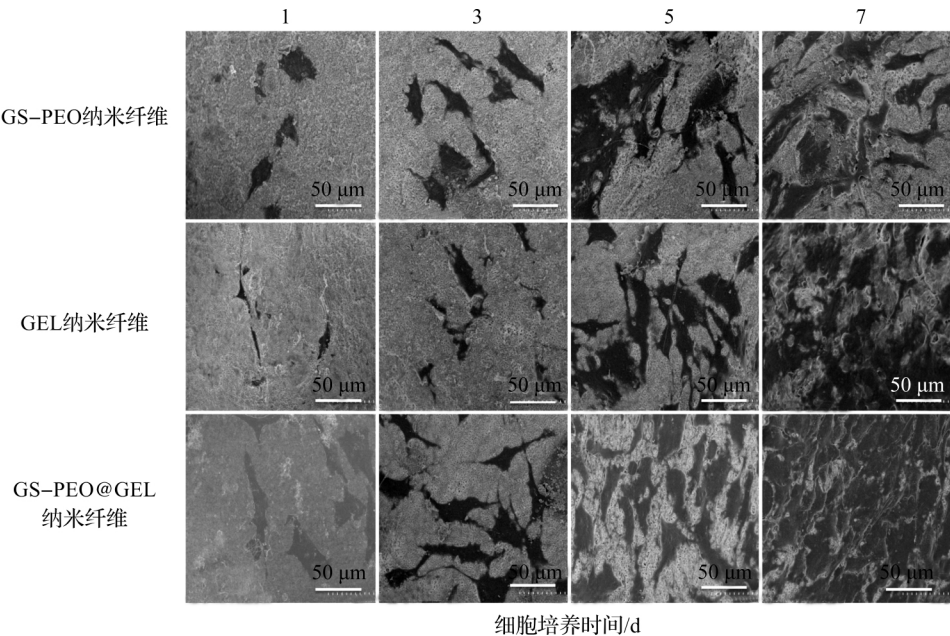


图10 纳米纤维对 MG-63 细胞增殖作用的 SEM 图

3 结 论

本文以 CS-PEO 乙酸溶液为壳层, GEL 乙酸溶液为核层, 通过同轴静电纺丝技术制备的 CS-PEO@GEL 核壳纳米纤维生物支架材料具有三维多孔结构以及良好的生物活性, 主要结果如下:

a) 通过调节壳聚糖和明胶的浓度发现壳聚糖和明胶的浓度影响纤维的成型, 其中壳聚糖浓度为 3%, 明胶浓度为 41% 时, CS-PEO@GEL 纤维光滑均匀。

b) 亲水性较好的 PEO 和 GEL 明显提高了 CS 的亲水性。

c) 利用戊二醛溶液不仅能有效地提高 CS-PEO@GEL 薄膜的水稳定性, 通过调节戊二醛的浓度发现, 戊二醛浓度在 3% (V/V) 时能保存 CS-PEO@GEL 纳米纤维原先的微观形貌。

d) 细胞毒性试验和细胞增殖实验可见, 相对于纯 CS-PEO 纤维和纯 GEL 纤维, 核壳结构的 CS-PEO@GEL 复合纤维, 形成精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列 (RGD) 结构, 呈现出更好的生物相容性。

本文通过同轴电纺技术制备出的 CS-PEO@GEL 生物支架材料能为细胞的生长提供良好的微环境, 在骨损伤修复的支架材料中有着潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] Mourino V, Boccaccini A R. Bone tissue engineering therapeutics: Controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds[J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2010, 7(43): 209-227.
- [2] Polocorrales L, Latorreesteves M, Ramirezvick J E. Scaffold design for bone regeneration[J]. *Journal of Nanoscience & Nanotechnology*, 2014, 14(1): 15-56.
- [3] LogithKumar R, KeshavNarayan A, Dhivya S, et al. A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 151(1): 172-188.
- [4] Desai K, Kit K, Li J, et al. Morphological and surface properties of electrospun chitosan nanofibers[J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9(3): 1000-1006.
- [5] Liu X D, Tokura S, Haruki M, et al. Surface modification of nonporous glass beads with chitosan and their adsorption property for transition metal ions[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2002, 49(2): 103-108.
- [6] Bispo V M, Mansur A A P, Barbosa-Stancioli E F, et al. Biocompatibility of nanostructured chitosan/poly (vinyl alcohol) blends chemically crosslinked with genipin for biomedical applications[J]. *Journal of*

Biomedical Nanotechnology, 2010, 6(2): 166-175.

- [7] Duan B, Dong C, Yuan X, et al. Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly (ethylene oxide)[J]. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 2004, 15(6): 797-811.
- [8] Alves N M, Mano J F. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2008, 43(5): 401-414.
- [9] Zhang Y, Su B, Ramakrishna S, et al. Chitosan nanofibers from an easily electrospinnable Uhmwpeo-doped chitosan solution system [J]. *Biomacromolecules*, 2007, 9(1): 136-141.
- [10] Kousaku O, Dongil C, Hakyong K, et al. Electrospinning of chitosan[J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2004, 25(18): 1600-1605.
- [11] Geng X, Kwon O h, Jang J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(27): 5427-5432.
- [12] Bhattarai N, Edmondson D, Veisheh O, et al. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(31): 6176-6184.
- [13] Aliabadi M, Irani M, Ismaeili J, et al. Electrospun nanofiber membrane of PEO/chitosan for the adsorption of nickel, cadmium, lead and copper ions from aqueous solution[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2013, 220(11): 237-243.
- [14] Zarghami A, Irani M, Golpour M, et al. Fabrication of PEO/chitosan/PCL/olive oil nanofibrous scaffolds for wound dressing applications[J]. *Fibers and Polymers*, 2015, 16(6): 1201-1212.
- [15] Huang Z M, Zhang Y Z, Lim C T, et al. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers[J]. *Polymer*, 2004, 45(15): 5361-5368.
- [16] Shalumon K T, Lai G J, Chen C H, et al. Modulation of bone-specific tissue regeneration by incorporating bone morphogenetic protein and controlling the shell thickness of silk fibroin/chitosan/nanohydroxyapatite core-shell nanofibrous membranes[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(38): 21170-21181.
- [17] Chen J P, Chen S H, Lai G J. Preparation and characterization of biomimetic silk fibroin-chitosan composite nanofibers by electrospinning for osteoblasts culture [J]. *Nanoscale Research Letters*, 2012, 7(1): 170.
- [18] Pal P, Dadhich P, Srivas P K, et al. Bilayered nanofibrous 3D hierarchy as skin rudiment by emulsion electrospinning for burn wound management[J].

- Biomaterials Science, 2017, 5(10): 1786-1799.
- [19] Teboho C M, Adriaan S L. Development of multifunctional nano/ultrafiltration membrane based on a chitosan thin film on alginate electrospun nanofibres[J]. Journal of Cleaner Production, 2017, 156(10): 470-479.
- [20] Ignatova M, Manolova N, Markova N, et al. Electrospun non-woven nanofibrous hybrid mats based on chitosan and PLA for wound-dressing applications[J]. Macromolecular Bioscience, 2009, 9(1): 102-111.
- [21] Huang Z M, Zhang Y Z, Ramakrishna S, et al. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers [J]. Polymer, 2004, 45 (15): 5361-5368.
- [22] Dhandayuthapani B, Krishnan U M, Sethuraman S. Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2010, 94(1): 264-272.
- [23] Huang Z M, Zhang Y Z, Ramakrishna S, et al. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers [J]. Polymer, 2004, 45 (15): 5361-5368.
- [24] Huang Y, Onyeri S, Siewe M, et al. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering[J]. Biomaterials, 2005, 26(36): 7616-7627.
- [25] Chien C Y, Tsai W B. Poly (dopamine)-assisted immobilization of Arg-Gly-Asp peptides, hydroxyapatite, and bone morphogenic protein-2 on titanium to improve the osteogenesis of bone marrow stem cells[J]. Acs Applied Materials Interfaces, 2013, 5(15): 6975-6983.
- [26] Nandagiri V K, Gentile P, Chiono V, et al. Incorporation of PLGA nanoparticles into porous chitosan-gelatin scaffolds: Influence on the physical properties and cell behavior[J]. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2011, 4(7): 1318-1327.
- [27] Li J, Chen Y, Yin Y, et al. Modulation of nanohydroxyapatite size via formation on chitosan-gelatin network film in situ[J]. Biomaterials, 2007, 28 (5): 781-790.
- [28] 梁红培, 王英波, 栗智, 等. 电纺制备明胶/壳聚糖/羟基磷灰石/氧化石墨烯抗菌复合纳米纤维的研究[J]. 无机材料科学学报, 2015, 30(5): 516-522.
- [29] Gupta N, Kushwah A K, Chattopadhyay M C. Adsorptive removal of Pb^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} by hydroxyapatite/chitosan composite from aqueous solution [J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2012, 43(1): 125-131.
- [30] Yan L, Jie Z, Cong X, et al. Crosslinked chitosan nanofiber mats fabricated by one-step electrospinning and ion-imprinting methods for metal ions adsorption [J]. Science China Chemistry, 2016, 59(1): 95-105.
- [31] Murphy C M, Haugh M G, O'Brien F J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagenglycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering[J]. Biomaterials, 2010, 31(3): 461-466.
- [32] Sun L J, Guo D G, Zhao W A, et al. Influences of reaction parameters and Ce contents on structure and properties of nano-scale Ce-HA powders[J]. Journal of Materials Science Technology, 2014, 30(8): 776-781.
- [33] Tual C, Espuche E, Escoubes M, et al. Transport properties of chitosan membranes: Influence of crosslinking[J]. Journal of Polymer Science Part B Polymer Physics, 2000, 38(11): 1521-1529.
- [34] Paluszkiwicz C, Stodolak E, Hasik M, et al. FT-IR study of montmorillonite-chitosan nanocomposite materials[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011, 79(4): 784-788.
- [35] Schiffman J D, Schauer C L. One-step electrospinning of cross-linked chitosan fibers[J]. Biomacromolecules, 2007, 8(9): 2665-2667.
- [36] Zhang Y, Su B, Ramakrishna S, et al. Chitosan nanofibers from an easily electrospinnable UHMWPEO-doped chitosan solution system[J]. Biomacromolecules, 2007, 9(1): 136-141.
- [37] Hao L L, Wang H L, Cai R Z, et al. Mesoporous hydroxylapatite/activated carbon bead-on-string nanofibers and their sorption towards $Co(II)$ [J]. RSC Advances, 2016, 6(74): 69947-69955.

(责任编辑: 廖乾生)