



# 锶磷灰石@壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶复合支架制备及其生物性能探究

刘乐云<sup>a</sup>, 冯诗璇<sup>a</sup>, 王耐艳<sup>b</sup>, 郑莹莹<sup>a</sup>

(浙江理工大学, a.理学院; b.材料与纺织学院, 杭州 310018)

**摘要:** 为了模拟自然骨的成分以及进一步提高材料的生物活性,制备羟基磷灰石@壳聚糖@明胶和锶磷灰石@壳聚糖@明胶复合支架,并对两种材料的生物性能进行表征。通过同轴电纺制备核壳结构的壳聚糖@明胶纤维;并采用化学沉积方法,在壳聚糖@明胶纤维表面沉积羟基磷灰石或锶磷灰石颗粒。结果显示:沉积锶磷灰石后,支架仍然能保持利于细胞生长的网状结构;细胞毒性实验和增殖实验结果表明, MG-63 细胞在支架材料上的存活率均超过 70%;与羟基磷灰石@壳聚糖@明胶复合支架相比,锶磷灰石@壳聚糖@明胶复合支架的细胞存活率更高,表明该材料确实促进细胞的生长和活性。因此锶磷灰石@壳聚糖@明胶复合支架有良好的骨组织工程应用前景。

**关键词:** 壳聚糖;明胶;同轴电纺;锶磷灰石;骨组织工程;细胞培养

中图分类号: Q28

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2019) 11-0776-10

## Preparation and biological properties of Strontium hydroxyapatite @Chitosan-PEO@Gelatin composite scaffold

LIU Leyun<sup>a</sup>, FENG Shixuan<sup>a</sup>, WANG Naiyan<sup>b</sup>, ZHENG Yingying<sup>a</sup>

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

**Abstract:** In order to simulate the composition of natural bone and further improve the biological activity of the materials, hydroxyapatite@chitosan@gelatin composite scaffolds and strontium apatite@chitosan@gelatin composite scaffolds were prepared and the biological properties of the two materials were then characterized. Chitosan@gelatin fibers with core-shell structure were prepared through coaxial electrospinning. Meanwhile, hydroxyapatite or Strontium apatite particles were deposited on the surface of chitosan@gelatin fibers by chemical deposit method. The results showed that after the deposition of strontium apatite on the surface of chitosan@gelatin fibers, the scaffolds could still maintain the network structure in favor of cell growth. Cytotoxicity test and proliferation test indicated that the survival rate of MG-63 cells on the scaffold exceeded 70%. Compared with HAP@CS@GEL composite scaffolds, SrHAP@CS@GEL composite scaffolds had higher cell survival rate, indicating that the materials can promote cell growth and activity. Therefore, the SrHAP@CS@GEL composite scaffolds have good promising application in bone tissue engineering.

**Key words:** chitosan; gelatin; coaxial electrospinning; Strontium apatite; bone tissue engineering; cell culture

收稿日期: 2019-01-17 网络出版日期: 2019-04-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(51603187)

作者简介: 刘乐云(1994-), 女, 江西上饶人, 硕士研究生, 主要从事生物复合材料的制备及生物性能方面的研究。

通信作者: 郑莹莹, E-mail: zhengyy1718@zstu.edu.cn

## 0 引言

近年来,使用人工材料作为植入物,被认为是治疗骨损伤最有效的方法之一<sup>[1]</sup>。该方法能有效、特异性地向靶位点递送治疗细胞,避免传统细胞疗法的缺点,如较短细胞保留时间、较差细胞存活率等<sup>[2-3]</sup>。壳聚糖(Chitosan, CS)为甲壳素的衍生物,具有生物降解性<sup>[4-6]</sup>、生物相容性<sup>[7-9]</sup>、抗菌性<sup>[10-11]</sup>、促进伤口愈合性能<sup>[12-13]</sup>和生物粘附性<sup>[14-16]</sup>等优异性能。壳聚糖具有聚阳电解质性质,可纺性较差而无法进行高效同轴静电纺丝<sup>[17-19]</sup>,但将壳聚糖溶解在三氟乙酸或者乙酸中,或加入其他纺丝性能良好的合成聚合物,如聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)<sup>[20]</sup>、聚环氧乙烷(PEO)<sup>[21-22]</sup>、明胶<sup>[23]</sup>等,可提高壳聚糖的可纺性。由静电纺丝方法所形成的壳聚糖三维网络结构能够为细胞的生长提供场所,是一种很好的适用于组织工程学的细胞载体材料<sup>[21-23]</sup>。陈鹏<sup>[24]</sup>利用同轴技术制备CS-PEO@GEL纳米纤维,该材料将富含氨基基团的CS作为壳层,可有效发挥其促进矿化以及细胞粘附的功能。

羟基磷灰石与天然骨组成相似,具有较好的生物相容性和骨传导性,被广泛应用于骨损伤治疗<sup>[25-27]</sup>。羟基磷灰石与聚合物基质制备的复合材料受到广泛研究,该材料中的羟基磷灰石不仅改善聚合物基质的生化性质,而且有利于骨传导性、细胞增殖和分化<sup>[28]</sup>。壳聚糖和羟基磷灰石与天然骨的有机相和无机相成分相似,因此两者结合而获得复合材料具有较好的应用研究价值<sup>[29]</sup>。在复合纳米材料中引入 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 和 $\text{Sr}^{2+}$ 等金属离子以高材料的生物活性,可加速血管生成,模拟间充质干细胞(Mesenchymal stem cell, MSCs)的成骨分化<sup>[30-31]</sup>。在生物活性金属离子中,锶(Sr)离子能够增加新骨形成并抑制骨吸收,促进MSCs的成骨并阻断破骨细胞的增殖,在骨修复材料中受到广泛研究<sup>[32-33]</sup>。雷奈酸锶(SrR)是一种含有Sr的药物,通过口服直接进入身体,但在骨缺损部位的释放缺乏控制<sup>[34]</sup>。因此使用化学沉积法,模仿在纳米纤维表面沉积羟基磷灰石的方法来沉积锶磷灰石,可以避免Sr的不受控释放。选择 $\text{Sr}^{2+}$ 离子替代 $\text{Ca}^{2+}$ 在纳米纤维表面化学沉积锶磷灰石,具有广泛应用价值前景。然而,目前将锶和壳聚糖结合起来模拟人骨成分鲜有报道。

明胶和壳聚糖上的氨基和羧基发生类似于氨基酸缩合的反应,可形成一种类似于精氨酸-甘氨酸-

天冬氨酸序列,该序列是细胞外基质的一种特殊结构,细胞外基质的重要活性结构,提高材料的生物相容性<sup>[35]</sup>。同轴的结构能防止壳聚糖和明胶溶液共混导致溶液浓度过大而难以纺丝,通过化学沉积法在材料表面沉积锶磷灰石颗粒进一步提高生物活性,并与沉积羟基磷灰石做对比,与Ca相比,锶磷灰石中的Sr可以进一步促进骨细胞增殖分化<sup>[36]</sup>。

本文主要采用同轴静电纺丝技术制备壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶纳米纤维,通过化学沉积的方法制备锶磷灰石@壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶复合纳米材料,并分析测试锶磷灰石@壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶的生物学活性。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

壳聚糖(CS,脱乙酰度95%以上,阿拉丁试剂)、明胶(GEL, Type I, 分析纯,阿拉丁试剂)、聚氧化乙烯(PEO,平均分子量为 $3 \times 10^5$ ,阿拉丁试剂)、戊二醛(GA, 50%,分析纯,阿拉丁试剂)、无水乙醇(分析纯,阿拉丁试剂)、冰醋酸(Ac,分析纯,杭州高晶精细化工有限公司)、无水氯化钙( $\text{CaCl}_2$ ,分析纯,杭州高晶精细化工有限公司)、无水磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司)、硝酸锶( $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ ,分析纯,上海试一化学试剂有限公司)、磷酸盐缓冲液(PBS, HyClone)、人成骨肉瘤细胞(MG-63,中科院上海细胞库)、 $\alpha$ -MEM培养基(南京碧云天生物技术研究所在所)和10%的小牛血清(南京碧云天生物技术研究所在所)。

### 1.2 壳聚糖-聚氧化乙烯/明胶核壳纤维的制备

#### 1.2.1 纺丝液制备

称取0.60 g的壳聚糖粉末,将其加入到20 mL体积比为20%的冰醋酸溶液中,搅拌至完全溶解。取0.15 g聚氧化乙烯粉末加入上述的壳聚糖乙酸溶液中,搅拌至溶解,配置成同轴静电纺丝的壳层纺丝液。取6.15 g的明胶粉末,将其加入到20 mL浓度为20%的冰醋酸水溶液中,60℃水浴搅拌至完全溶解,配置成同轴静电纺丝的核层纺丝液。

#### 1.2.2 同轴静电纺丝过程

选择18G(0.90 mm)和23G(0.33 mm)两种型号的同轴针头,静置消泡后的纺丝液通过20 mL的注射器与同轴针头连接并进行泵送(内外层纺丝液推动速度分别为0.5 mL/h和0.3 mL/h);用一层0.50 mm厚的铝箔纸将滚筒收集器完全包裹起来并接地(接收器与针头顶端之间的距离是

15.00 cm)。纺丝过程中,针头加载 22 kV 的电压,滚筒收集器以 800 r/min 速度收集样品,室温下电纺,并将相对湿度保持在 40%。待溶液纺完后,收集铝箔纸上的纤维并将其放置于干燥箱中蒸发掉残留的乙酸溶剂,干燥温度为 80 °C。将干燥后的纤维材料裁剪成 1 cm×1 cm 的大小,置于 4% 的戊二醛乙醇溶液中交联 12 h。交联后的材料干燥备用。

### 1.3 化学沉积羟基磷灰石@壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶纳米纤维

化学沉积羟基磷灰石@壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶纳米纤维的方法参考文献[37],具体如下:分别配制 200 mL 浓度为 0.5 mol/mL 的氯化钙溶液和 0.3 mol/mL 的磷酸氢二钠溶液,搅拌均匀后备用;将交联后的壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶薄膜,放入氯化钙溶液中浸泡 10 min 后取出;放入 200 mL 的去离子水中漂洗 5 min,洗去表面多余的  $\text{Ca}^{2+}$  离子;再将薄膜放入磷酸氢二钠溶液中浸泡 10 min 后取出,放入 200 mL 的去离子水中漂洗 5 min,洗去表面多余的离子,即沉积完成。氨水调节氯化钙水溶液和磷酸氢二钠水溶液的 pH 值为 10。用无水乙醇洗去羟基磷灰石@壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶薄膜表面多余的去离子水,并将羟基磷灰石@壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶(HAP@CS-PEO@GEL)纳米纤维放入冷冻干燥机中干燥 6 h。

### 1.4 化学沉积锶磷灰石@壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶纳米纤维

配制 200 mL 0.5 mol/mL 的硝酸锶溶液和 0.3 mol/mL 的磷酸氢二钠溶液,将交联后的壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶薄膜依次放入硝酸锶溶液和磷酸氢二钠中,沉积方法与 1.3 中的方法相同。先将薄膜浸泡在硝酸锶水溶液中,再浸泡在磷酸氢二钠溶液中,最后将锶磷灰石@壳聚糖-聚氧化乙烯@明胶(SrHAP@CS-PEO@GEL)纳米纤维放入冷冻干燥机中干燥 6 h。

### 1.5 材料表征

复合纳米纤维材料的微观结构采用扫描电子显微镜(SEM,日立公司,S-4800,加速电压为 10 kV)和透射电子显微镜(TEM,日本电子公司,JEM-2011,加速电压为 200 kV)进行表征;通过能量色散光谱法(EDS,英国 Oxford Instruments 公司,INCA)对材料表面区域进行成分分析;采用 X 射线衍射仪(XRD,D8 Discover,德国 Bruker 公司)研究材料的衍射图谱分析,扫描范围  $2\theta=10^\circ\sim 80^\circ$ ,步长

$0.02^\circ$ 。复合材料的表面基团及分子结构通过傅立叶红外光谱仪(FTIR,美国热电公司,Nicolet 5700)获得,其中用溴化钾进行混合压片,光谱范围  $4000\sim 600\text{ cm}^{-1}$ ,分辨率  $0.09\text{ cm}^{-1}$ 。采用热重分析仪(TGA,美国 PerkinElmer 公司,PYRIS 1)对复合纳米材料的成分及热稳定性进行分析,升温速率  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ,升温范围为  $20\sim 700\text{ }^\circ\text{C}$ 。

### 1.6 生物性能分析

#### 1.6.1 细胞毒性测试

为了验证复合纳米纤维材料的细胞相容性,使用该材料浸提液对细胞进行培养,进行细胞毒性实验。具体实验方法如下:电纺样品经 70% 乙醇水溶液灭菌后,用无菌 PBS 洗涤,干燥;在无菌条件下将样品转移到孔板中,加入 MEM 培养基浸泡并收集浸提液;将浓度为  $5\times 10^4$  个/mL 的 MG-63 细胞悬液接种在 96 孔板中(每孔 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液),放入 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱内,在 37 °C 下培养 12 h;待细胞贴壁后,吸出孔板中的培养液,再加入 100  $\mu\text{L}$  的浸提液在培养箱中继续培养 24 h 和 48 h。对照组是将细胞在正常培养基中培养 24 h 和 48 h,空白组是纯培养基。每个样品有 5 个平行实验值。细胞活性可以通过 CCK-8 试剂盒进行检测,加入 CCK-8 试剂 1 h 后用酶标仪测定 490 nm 波长下细胞孔板上各孔吸光度,记录结果。为了更直观地观测细胞在浸提液中的生长情况,使用钙黄绿素和碘化吡啶荧光染料对细胞进行活死细胞荧光染色,使用激光共聚焦显微镜(日本奥林巴斯公司,FV1000-IX81)观察细胞染色情况。

#### 1.6.2 细胞增殖测试

当细胞毒性测试显示材料低毒性时,为了进一步验证材料对细胞的增殖促进功能,将 MG-63 细胞接种在样品上共同培养 1、3、5 d 和 7 d 后观察细胞的存活状态及生长情况。材料使用医用乙醇浸泡 12 h 灭菌后,风干,将材料浸泡在培养基中 15 min 使其润湿备用;用消毒后的镊子将润湿后的材料放入 48 孔板中,骨肉瘤细胞(MG-63)以  $1\times 10^5$  个/mL 的细胞密度接种在 48 孔板中(每个孔板 250  $\mu\text{L}$  细胞悬液),将细胞放入 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱内在 37 °C 下培养 1、3、5 d 和 7 d;第 2、4 d 和 6 d 换液一次以保证细胞生长需要的营养,同时做对照组和空白组实验,对照组是将细胞在正常培养基中培养 1、3、5 d 和 7 d,而空白组是纯培养基。每个样品 5 个平行实验组。细胞活性可以在细胞培养 1、3、5 d 和 7 d 后通过 CCK-8 试剂盒进行检测。细胞在支架材料上

的形貌和生长状态可以通过扫描电镜进行观察。在复合纳米纤维支架材料上培养 1、3、5 d 和 7 d 后的细胞用 2.5% 的戊二醛固定 20 min, 梯度脱水处理后放入冷冻干燥机中干燥 6 h, 取出, 用扫描电子显微镜进行观察。

## 2 结果与讨论

### 2.1 热重和红外光谱分析

图 1 中 a—e 分别是 PEO、GEL、CS、HAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维和 SrHAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维的傅里叶红外光谱图。在 HAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维和 SrHAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维的光谱图上, 在  $3300\sim 3500\text{ cm}^{-1}$  处出现一个宽峰, 该吸收峰属于 O—H 的伸缩振动峰, 是壳聚糖与明胶形成分子内氢键形成的; 在  $1638\text{ cm}^{-1}$  处出现的吸收峰为酰胺 I 带 (C=O) 伸缩振动峰, 为 CS 特征峰。在  $1537\text{ cm}^{-1}$  处出现的吸收峰为酰胺 II 带 (N—H) 伸缩振动峰, 为 GEL 特征峰。在  $1300\sim 1400\text{ cm}^{-1}$  的光谱范围处出现一个新的吸收峰, 是 CS-PEO@GEL 纳米纤维与 GA 成功交联产生的醛亚胺 (—C=NH—) 吸收造成的<sup>[37]</sup>。在  $1038\text{ cm}^{-1}$  处的新峰, 是 P—O 伸缩振动引起的, 说明复合材料中有 P—O 键, 因此 HAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维和 SrHAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维中分别存在着 HAP 颗粒和 SrHAP 颗粒。

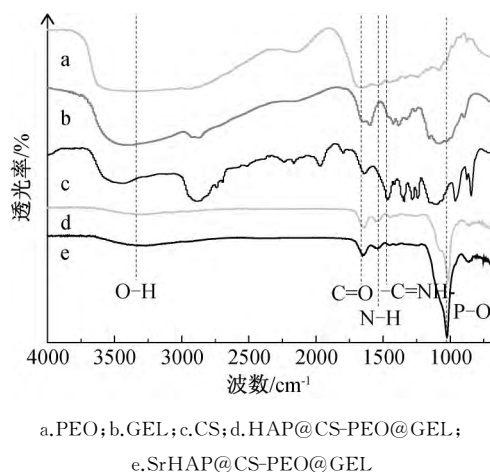
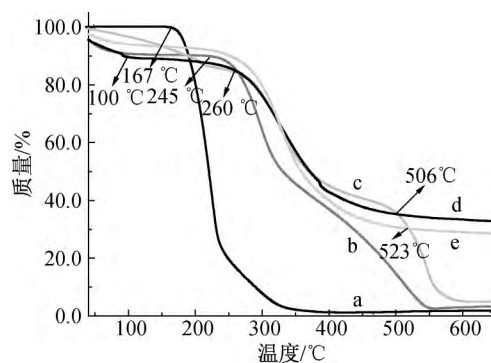


图 1 复合纳米纤维的傅里叶红外光谱图

采用热重分析对 HAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维和 SrHAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维的组成及热性能进行表征, 结果如图 2 所示。图 2 中的 a—e 分别为 PEO、CS、GEL、HAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维和 SrHAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维的热重曲线。由图 2 可知, PEO、CS 和 GEL 在 167、

245 °C 和 260 °C 分别达到热分解温度, 开始分解, 到 600 °C 基本分解完毕。图 2 中 d 表明, 40~120 °C 时, 失重 11.6%, 其原因可能是失去自由水以及结晶水导致的; 120~506 °C 时, 失重 53.3%, 由于在此温度区间, PEO、CS、GEL 先后失重; 而 506~700 °C 时, 曲线平稳, 残留 35.1% 的质量为 HAP 颗粒; HAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维中含有 11.6% 的水, 53.3% 的有机物和 35.1% 的 HAP。图 2 中 e 中表明, 40~120 °C 时, 复合纳米纤维材料失去自由水和结晶水, 导致 9.8% 的失重; 120~523 °C 区间, 由于 PEO、CS、GEL 先后分解导致失重 60.1%; 523~700 °C 区间, 曲线平稳, 残留的 SrHAP 颗粒质量为 30.1%。与 HAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维相比, SrHAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维中含有较多的有机物和较少的无机盐。



a. PEO; b. CS; c. GEL; d. HAP@CS-PEO@GEL; e. SrHAP@CS-PEO@GEL

图 2 复合纳米纤维的热重曲线

### 2.2 X 射线衍射分析

图 3 中 a 是 HAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维的 X 射线衍射图谱, 图 3 中 b 是 SrHAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维 X 射线衍射图谱。与 HAP 的标准 pdf 卡片 (PDF # 09-0432) 对比, 图 3 图谱 a 中 (200)、(111)、(002)、(211)、(112)、(300)、(212)、(310)、(400)、(203)、(222)、(402)、(004)、(501)、(304)、(522) 晶面与 HAP 标准峰一一对应, 为六方晶系。与 SrHAP 的标准 pdf 卡片 (PDF # 33-1348) 对比, 图 3 中 b 的 (200)、(102)、(211)、(202)、(311)、(400)、(222)、(312)、(004)、(313)、(330)、(311)、(510)、(520)、(432)、(334) 晶面与 SrHAP 标准峰一一对应, 为六方晶系。X 射线衍射分析结果显示, HAP 和 SrHAP 两种晶体分别成功沉积在 CS-PEO@GEL 纳米纤维表面, 并且两种晶体均与天然骨的无机成分相似。

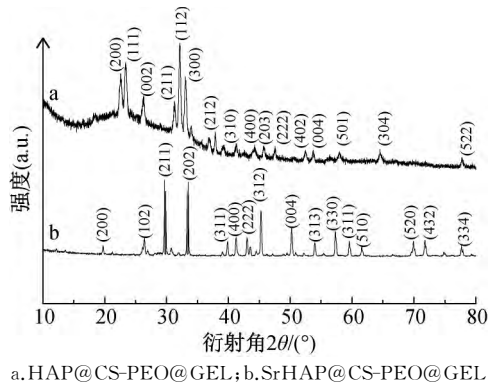
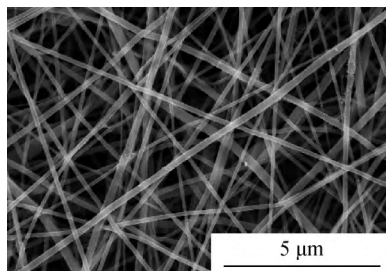
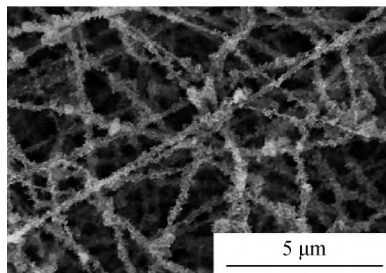


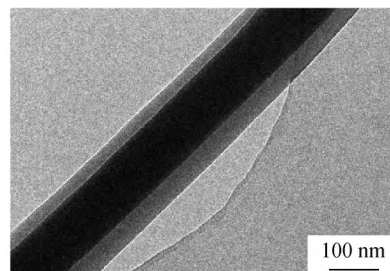
图3 纤维复合材料的X射线衍射图谱



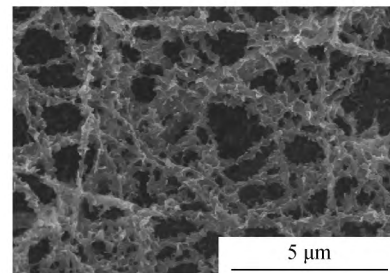
(a) CS-PEO@GEL纳米纤维



(c) HAP@CS-PEO@GEL纳米纤维



(b) CS-PEO@GEL纳米纤维核壳结构

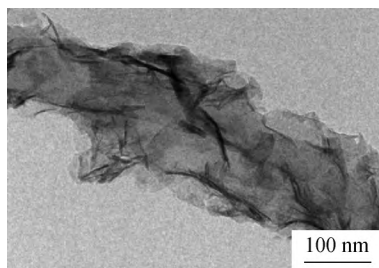


(d) SrHAP@CS-PEO@GEL纳米纤维

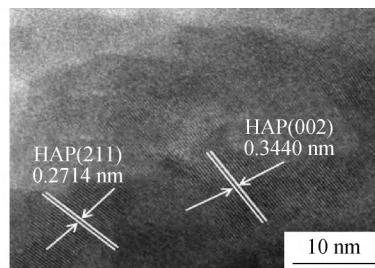
图4 复合纤维材料的形貌

为了进一步探究纳米纤维材料的结构以及成分,采用透射电镜对纳米纤维材料进行表征,结果如图5所示。图5表明:透射电镜图显示 HAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维表面覆盖着大块的片层结构;高倍透射电镜图展示 0.2814 nm 和 0.3440 nm 的

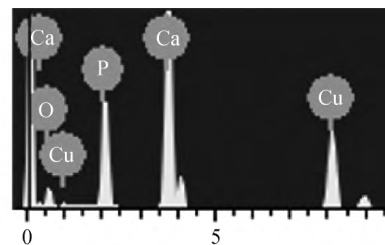
两个晶面间距,分别对应于 HAP(211)和(002)晶面的晶面条纹;能谱图表明材料表面的片层结构由 Ca、P、O 元素组成,进一步证实 HAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维材料表面是 HAP。



(a) HAP@CS-PEO@GEL的TEM图



(b) HAP@CS-PEO@GEL的HRTEM图



(c) HAP@CS-PEO@GEL的EDS图

图5 HAP@CS-PEO@GEL 复合材料的透射电镜和能谱图

图6为 SrHAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维的透射电镜图、高倍透射电镜图和能谱图。透射电镜图可观察到在纤维表面覆盖小块的片层结构;高倍透射电镜图显示 0.4229 nm 的两个晶面间距,

分别对应于 SrHAP(220)晶面的晶面条纹;能谱图表明 SrHAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维表面的片层结构由 Sr、P 和 O 元素组成,进一步说明纳米纤维材料表面有 SrHAP 颗粒存在。

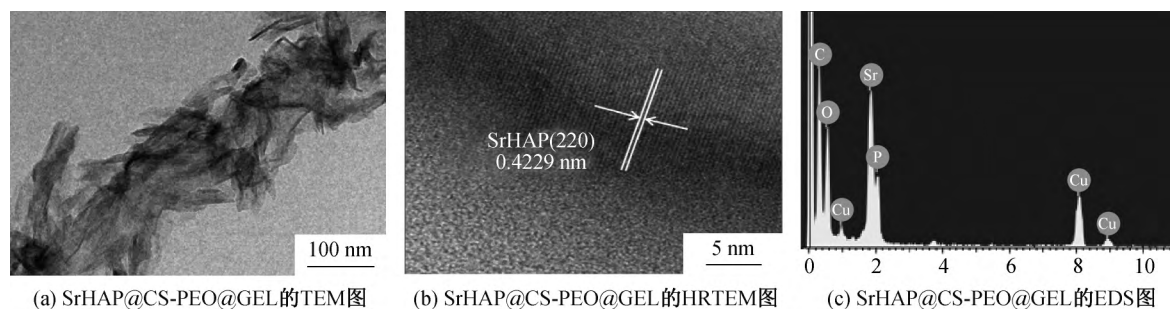


图6 SrHAP@CS-PEO@GEL复合材料的透射电镜和能谱图

## 2.4 复合纳米材料的毒性测试

为了验证材料的细胞相容性,对复合纳米纤维材料进行毒性测试,结果如图7所示。图7为MG-63细胞在CS-PEO@GEL、HAP@CS-PEO@GEL和SrHAP@CS-PEO@GEL复合纳米材料的浸提液中培养24 h和48 h后的细胞存活率。图7表明,细胞在CS-PEO@GEL纳米纤维、HAP@CS-PEO@GEL纳米纤维和SrHAP@CS-PEO@GEL纳米纤维的浸提液中培养24 h后的细胞活性分别为68.44%、73.24%和75.90%;培养48 h后,细胞活性提高到88.66%、92.76%和98.59%,高于体内毒性测试标准(ISO 10993—5:2009),因此3种复合纳米材料的生物毒性较低,不影响细胞的生长,具有良好的生物相容性。HAP@CS-PEO@GEL纤维和SrHAP@CS-PEO@GEL纤维的细胞活性高于CS-PEO@GEL纤维的细胞活性,说明HAP和SrHAP可进一步提高生物活性。SrHAP@CS-PEO@GEL纤维的细胞活性高于HAP@CS-PEO@GEL纤维的细胞活性。与培养24 h相比,细胞在SrHAP@CS-PEO@GEL纳米纤维上培养48 h后,活性提高22.69%。而培养在HAP@CS-PEO@GEL纳米纤维上的活性48 h提高19.52%。两者相差3.17%。

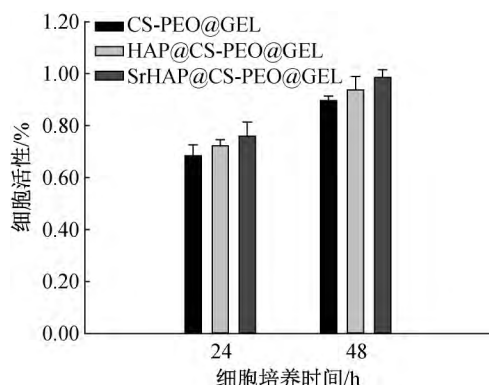


图7 纳米纤维复合材料对MG-63细胞的毒性影响

为了更直观地观测细胞在浸提液中的生长情况,使用钙黄绿素和碘化吡啶荧光染料对培养在材料浸提液中的细胞进行活死细胞荧光染色,结

果如图8所示(同一时间中左右分别是活细胞和死细胞的存活情况)。图8显示,同一时间的右图中几乎看不到死细胞的存在,进一步说明复合纳米材料的低毒性。SrHAP@CS-PEO@GEL纳米纤维对应的活细胞数量较多,进一步证实SrHAP能提高CS-PEO@GEL纤维的生物活性,促进细胞的生长。

## 2.5 复合纳米材料对细胞增殖影响

复合纳米材料上细胞增殖结果如图9所示,图9为MG-63细胞在CS-PEO@GEL、HAP@CS-PEO@GEL和SrHAP@CS-PEO@GEL复合纳米材料上培养1、3、5 d和7 d后的细胞存活率。图9表明,细胞在CS-PEO@GEL纳米纤维、HAP@CS-PEO@GEL纳米纤维和SrHAP@CS-PEO@GEL纳米纤维的浸提液中培养1 d后的细胞活性分别为60.32%、60.00%和58.42%;培养3 d后,细胞活性提高到71.96%、78.09%和84.10%;培养5 d后,细胞活性提高到81.34%、89.48%和103.31%;培养7 d后,细胞活性提高到89.62%、103.69%和116.57%;高于体内毒性测试标准(ISO 10993—5:2009)。细胞在复合材料上培养1~7 d内,细胞活性在CS-PEO@GEL纳米纤维、HAP@CS-PEO@GEL纳米纤维和SrHAP@CS-PEO@GEL纳米纤维上分别呈现出一个上升的趋势,说明细胞能在材料上生长增殖。HAP@CS-PEO@GEL纤维和SrHAP@CS-PEO@GEL纤维的细胞活性高于CS-PEO@GEL纤维的细胞活性,说明HAP和SrHAP可以进一步提高材料的生物活性。SrHAP@CS-PEO@GEL纤维的细胞活性高于HAP@CS-PEO@GEL纤维的细胞活性,在SrHAP@CS-PEO@GEL纳米纤维上的细胞活性(58.42%)一开始略低于其他两种材料上的细胞活性(60.32%和60.00%),但细胞的增殖速度却比其他两种材料上的细胞要快,其原因可能是开始材料上的SrHAP颗粒对细胞粘附有些影响;细胞成功粘附在材料表



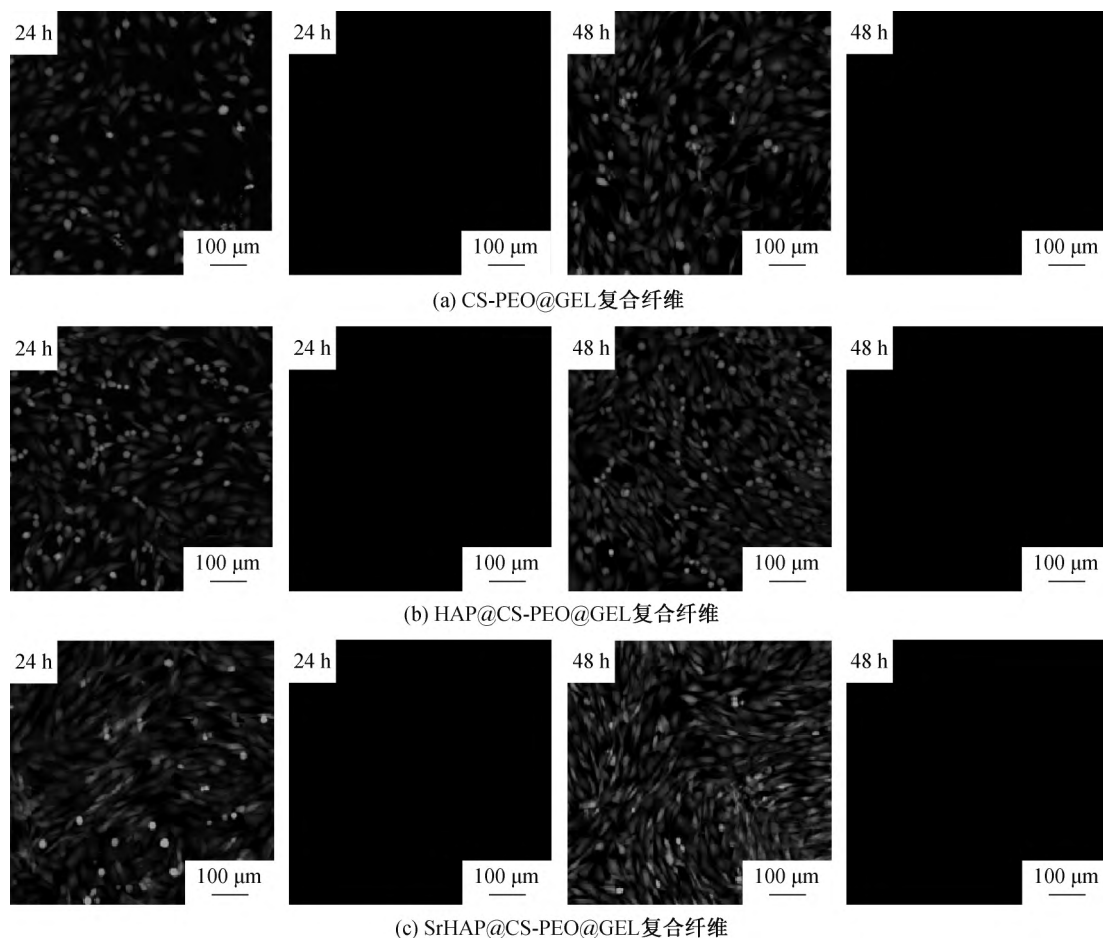


图8 人骨肉瘤细胞 MG-63 在复合材料上培养后细胞染色结果

面后, SrHAP 能更好地促进细胞的增殖。MG-63 细胞在 SrHAP@CS-PEO@GEL 纤维表面培养 5 d 时, 细胞活性已经达到 103.31%, 高于在其他材料上培养 7 d 的细胞活性, 因此 SrHAP@CS-PEO@GEL 纤维对细胞的增殖促进作用最好。

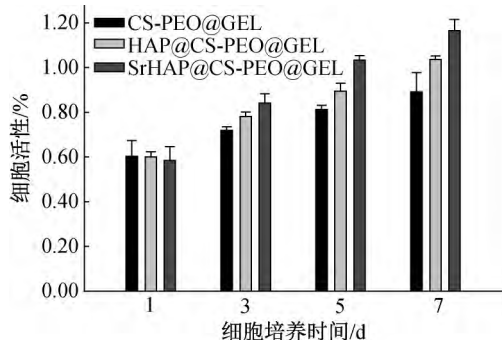


图9 纳米纤维复合材料上 MG-63 细胞增殖情况

图 10 是细胞在纳米复合纤维表面生长情况的扫描电镜图, 由图 10 可知, 随着时间的推移, 细胞数量呈现不断增加的趋势, 说明三种材料都具有不错的生物相容性, 可以促进细胞的生长, 细胞在 SrHAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维上生长速率最快。1 d, CS-PEO@GEL 纳米纤维上的细胞呈现近

椭圆状, 而另外两种材料上的细胞出现触角, 说明细胞已经成功粘附在材料表面并且开始分化。3 d 和 5 d, 细胞继续在材料表面增殖分化, 而且可以明显看出在 HAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维和 SrHAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维表面的细胞更多, 在 SrHAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维表面的细胞都呈现高度分化的状态, 证明 SrHAP 可以促进 MG-63 细胞增殖分化。7 d, 细胞覆盖材料表面 80% 以上面积, SrHAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维表面的细胞是三种材料中最多的, 完全覆盖材料表面。以上结果显示, SrHAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维能较好地促进细胞生长增殖。

### 3 结 论

本文通过同轴静电纺丝和化学沉积法制备 SrHAP@CS-PEO@GEL 纳米纤维的生物支架材料, 并通过红外、热重、扫描电镜和透射电镜等方法对其进行表征分析, 主要结论如下:

a) 壳层溶液为含有 3.00% (W/V) 的壳聚糖和 0.75% (W/V) 的聚氧化乙烯的乙酸溶液, 芯层溶液为

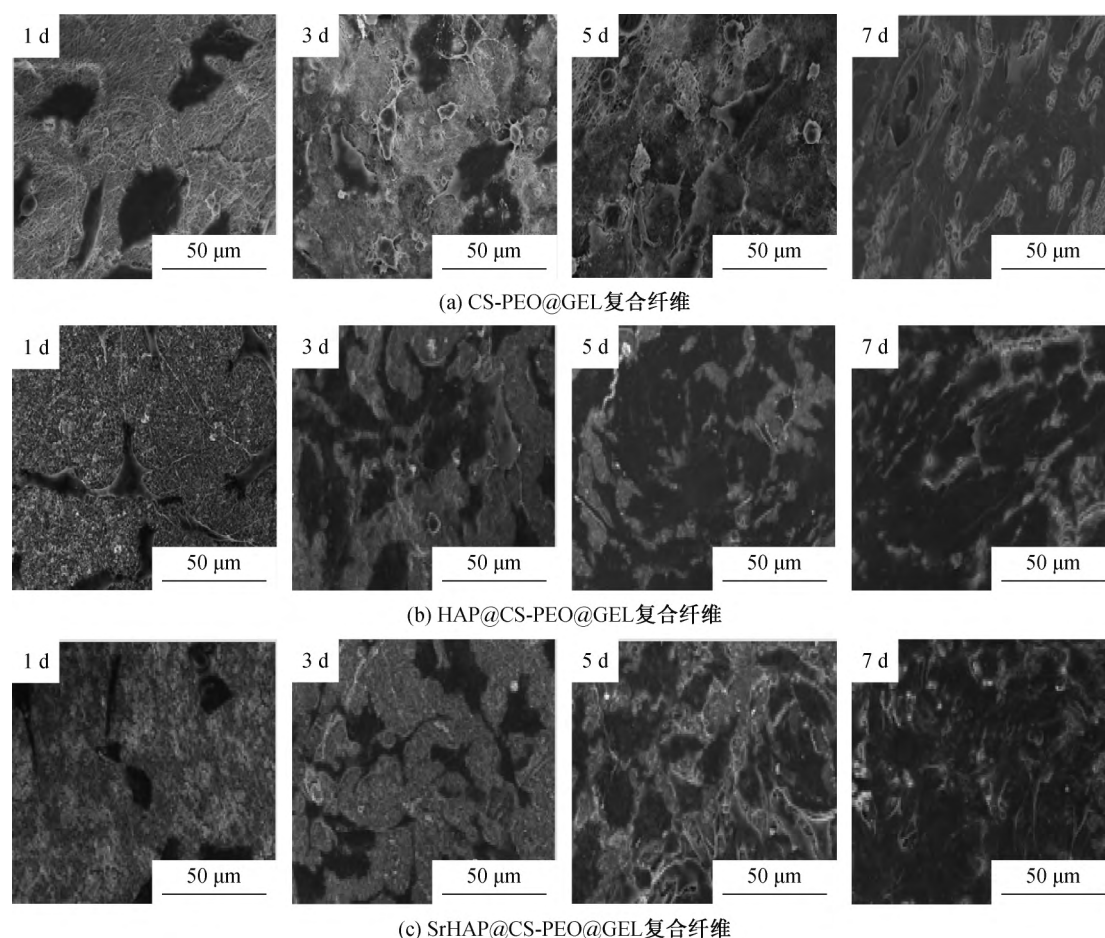


图 10 MG-63 细胞在纤维复合材料上增殖的扫描电镜图

30.75%(W/V)的明胶乙酸溶液,通过同轴电纺设备可制备出均匀的具有核壳结构的 CS-PEO@GEL 纳米纤维,纤维与纤维之间形成三维多孔结构。

b)通过化学沉积方法分别制备出 HAP@CS-PEO@GEL 复合纳米纤维以及 SrHAP@CS-PEO@GEL 复合纳米纤维,化学沉积未破坏三维多孔结构。

c)Sr 掺杂的 SrHAP@CS-PEO@GEL 复合纤维在细胞毒性和增殖实验中呈现出更好的生物相容性。

#### 参考文献:

- [1] Levengood S K L, Zhang M. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2014, 2(21): 31-61.
- [2] Anjum F, Lienemann P S, Metzger S, et al. Enzyme responsive GAG-based natural-synthetic hybrid hydrogel for tunable growth factor delivery and stem cell differentiation[J]. Biomaterials, 2016, 87(5): 104-117.
- [3] Kumar A, Mandal S, Barui S, et al. Low temperature additive manufacturing of three dimensional scaffolds for bone-tissue engineering applications: Processing

related challenges and property assessment [J]. Materials Science & Engineering R, 2016, 103(5): 1-39.

- [4] Kim S, Kang Y, Mercado-Pagán Á E, et al. In vitro evaluation of photo-crosslinkable chitosan-lactide hydrogels for bone tissue engineering[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials, 2015, 102(7): 1393-1406.
- [5] Li L, Li B, Zhao M, et al. Single-step mineralization of woodpile chitosan scaffolds with improved cell compatibility [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials, 2011, 98(2): 230-237.
- [6] Deshmukh T R, Kuthe A M, Chaware S M, et al. A novel rapid prototyping and finite element method-based development of the patient-specific temporomandibular joint implant [J]. Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, 2012, 15(4): 363-370.
- [7] Lai G J, Shalumon K T, Chen S H, et al. Composite chitosan/silk fibroin nanofibers for modulation of osteogenic differentiation and proliferation of human



- mesenchymal stem cells[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 111: 288-297.
- [8] Sarkar S D, Farrugia B L, Dargaville T R, et al. Chitosan — collagen scaffolds with nano/microfibrous architecture for skin tissue engineering[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2013, 101(12): 3482-3492.
- [9] Chesnutt B M, Viano A M, Yuan Y, et al. Design and characterization of a novel chitosan/nanocrystalline calcium phosphate composite scaffold for bone regeneration [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2009, 88(2): 491-502.
- [10] Wise J K, Alford A, Goldstein S, et al. Comparison of uncultured marrow mononuclear cells and culture — expanded mesenchymal stem cells in 3D collagen-chitosan microbeads for orthopaedic tissue engineering [J]. Tissue Engineering Part A, 2014, 20(1/2): 210-224.
- [11] Shalumon K T, Anulekha K H, Girish C M, et al. Single step electrospinning of chitosan/poly (caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80 (2): 413-419.
- [12] Cao L, Werkmeister J A, Wang J, et al. Bone regeneration using photocrosslinked hydrogel incorporating rhBMP — 2 loaded 2-N, 6-O-sulfated chitosan nanoparticles[J]. Biomaterials, 2014, 35(9): 2730-2742.
- [13] Sarkar S D, Farrugia B L, Dargaville T R, et al. Chitosan — collagen scaffolds with nano/microfibrous architecture for skin tissue engineering[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2013, 101 (12): 3482-3492.
- [14] 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 Mechanical Behavior Biomedical Materials, 2011, 4 (7): 1318-1327.
- [15] Niranjana R, Koushik C, Saravanan S, et al. A novel injectable temperature — sensitive zinc doped chitosan/  $\beta$ -glycerophosphate hydrogel for bone tissue engineering [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 54(1): 24-29.
- [16] Lei Y, Xu Z L, Ke Q F, et al. Strontium hydroxyapatite/chitosan nanohybrid scaffolds with enhanced osteoinductivity for bone tissue engineering [J]. Materials Science and Engineering C, 2017, 72 (3): 134-142.
- [17] Zhang Y, Su B, Ramakrishna S, et al. Chitosan nanofibers from an easily electrospinnable doped chitosan solution system [J]. Biomacromolecules, 2007, 9(1): 136-141.
- [18] Schiffman J D, Schauer C L. Cross — Linking Chitosan Nanofibers[J]. Biomacromolecules, 2007, 8(2): 594-601.
- [19] Geng X, Kwon O H, Jang J, et al. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution [J]. Biomaterials, 2005, 26(27): 5427-5432.
- [20] Duan B, Wu L L, Li X R, et al. Degradation of electrospun PLGA — chitosan/PVA membranes and their cytocompatibility in vitro [J]. Journal of Biomaterials Science, 2007, 18: 95-115.
- [21] Bhattarai N, Edmondson D, Veis O, et al. Electrospun chitosan — based nanofibers and their cellular compatibility[J]. Biomaterials, 2005, 26(31): 6176-6184.
- [22] 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: 237-243.
- [23] 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.
- [24] 陈鹏. 基于壳聚糖多糖类仿生材料的制备和生物性能的研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2018: 26-34.
- [25] Di M A, Sittering M, Risbud M V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering [J]. Biomaterials, 2005, 26(30): 5983-5990.
- [26] Wei G, Ma P X. Structure and properties of nano — hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering [J]. Biomaterials, 2004, 25 (19): 4749-4757.
- [27] Huang D, Zuo Y, Zou Q, et al. Reinforced nanohydroxyapatite/polyamide66 scaffolds by chitosan coating for bone tissue engineering [J]. Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials, 2012, 100(1): 51-57.
- [28] Feng Q, Yu B, Li S, et al. Biomimetic properties of an injectable chitosan/nano-hydroxyapatite/collagen composite[J]. Materials Science & Engineering C, 2011, 31(3): 683-687.
- [29] Venkatesan J, Kim S K. Chitosan composites for bone tissue engineering — an overview[J]. Marine Drugs,

- 2010, 8(8): 22-52.
- [30] Peter M, Ganesh N, Selvamurugan N, et al. Preparation and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 687-694.
- [31] Ji X, Wang T, Guo L, et al. Effect of nanoscale-ZnO on the mechanical property and biocompatibility of electrospun poly(L-lactide) acid/nanoscale-ZnO mats[J]. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2013, 9(3): 417-423.
- [32] 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.
- [33] Lei Y, Xu Z, Ke Q, et al. Strontium hydroxyapatite/chitosan nanohybrid scaffolds with enhanced osteoinductivity for bone tissue engineering[J]. Materials Science & Engineering C, 2017, 72(3): 134-142.
- [34] Marie P J, Felsenberg D, Brandi M L. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis[J]. Osteoporosis International, 2011, 22(6): 1659-1667.
- [35] Abboskhujaveva L S, Ismailov S I, Alikhanova N M. Efficacy of strontium ranelate in combination with a d-hormone analog for the treatment of postmenopausal osteoporosis[J]. Drugs in Research and Development, 2014, 14(4): 315-324.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] Chen P, Liu L Y, Pan J Q, et al. Biomimetic composite scaffold of hydroxyapatite/gelatin-chitosan core-shell nanofibers for bone tissue engineering[J]. Materials Science & Engineering C, 2019, 97(2): 325-335.
- [39] 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, 2019, 41(1): 56-64.

(责任编辑:廖乾生)