

聚乳酸/壳聚糖纳米纤维结构形成的影响条件及其生物矿化活性

刘淑琼*, 吴芳芳, 吴方棣, 吕志玉

(武夷学院生态与资源工程学院 福建省生态产业绿色技术重点实验室, 武夷山 354300)

摘要:以二氧六环/冰醋酸为溶剂体系,采用相分离法制备了聚乳酸(PLA)/壳聚糖(CS)复合纳米纤维结构的组织工程支架,探讨了不同CS含量、不同凝胶温度及不同分子量对PLA/CS复合支架纳米纤维结构的影响以及支架的生物活性。结果表明,凝胶温度对PLA/CS复合材料的纳米纤维结构影响较大,且随着温度的降低,结构的微观尺寸也逐渐增大,从纳米级上升到普通的尺寸结构;CS含量对PLA/CS复合支架的基体结构影响不大;实验范围内PLA分子量对PLA/CS复合支架的纳米纤维结构有重要影响;分子量大的样品,较易得到PLA/CS复合纳米纤维结构的材料,而分子量小的样品则不能得到纳米纤维结构。另外,生物矿化实验表明CS的添加有利于PLA/CS复合材料生物活性的提高。

关键词:聚乳酸;壳聚糖;纳米纤维;生物活性

引言

近年来,纳米纤维支架成为组织工程的研究热点,主要归因于纳米纤维支架的仿生结构及纳米效应。研究表明,仿生细胞外基质(ECM)的纳米纤维结构(50nm~500nm)更有利于细胞的生长、繁殖、迁移及功能表达^[1~5],因此,制备具有仿细胞外基质的纳米纤维结构的支架具有重要意义。合成聚酯是一类广泛应用于组织工程的成熟生物材料,该类材料具有优异的降解性能、机械性能、生物相容性和可设计性,例如聚乳酸(PLA)^[1,2,6,7]、聚己内酯(PCL)^[8,9]、聚氨酯(PU)^[10]、聚羟基乙酸共聚物(PLGA)^[11,12]等,但聚酯材料也存在疏水性和生物活性较差等缺点^[2],这些缺点也成为聚酯材料在组织工程中进一步应用的障碍。因此,具有较好生物活性的天然高分子材料就经常作为该类复合材料的改性组分被添加到材料中,用以增加聚酯材料的生物活性,诱导细胞识别,促进细胞在支架上的增殖^[2,13]。例如,采用静电纺丝制备的壳聚糖(CS)材料就被证明具有良好的生物活性,从而在组织工程领域被广泛研究^[14~16],但是由于其机械性能差及较快的降解速度同样限制了它的应用^[2]。已有较多文献报道将PLA和CS进行复合制备PLA/CS复合纳米纤维支架^[2,17~19],制得的复合支架具有良好的细胞引导性,但这些支架都是采用静电纺丝方法制备的,鲜有采用相分离方法制备。静电纺丝是目前制备具有纳米纤维结构支架的重要方法^[20,21],通过该方法容易得到纳米纤维尺寸的支架,但不易得到具有大孔的三维结构的纳米纤维支架——类似于天然细胞外基质的结构^[1],而相分离方法则可以克服这一缺点,且所用设备简单,操作容易,该方法主要是通过实验参数控制形成复杂的三维空间结构。Liu等^[22]采用相分离法制备了具有三维联通大孔结构的胶原纳米纤维支架,该支架具有高孔隙率和高比表面。Yao等^[1]采用热致相分离法制备了具有三维大孔结构的PLA/PCL复合纳米纤维支架,并在支架上进行了体外及体内的细胞实验,实验显示,具有仿生纳米纤维结构的PLA/PCL复合支架具有比平滑结构的PCL支架更好的体外细胞分化和体内成骨能力。因此,本文意在采用相分离法制备具有细胞外基质结构的聚乳酸/壳聚糖纳米纤维复合支架,且利用壳聚糖改善聚乳酸的生物活性,构建具有较好生物活性的PLA/CS复合纳米纤维支架。

10.14028/j.cnki.1003-3726.2020.03.005

收稿:2019-01-11;修回:2019-12-01;

基金项目:福建省生态产业绿色技术重点实验室开放课题(WYKF2018-12),福建省大学生创新创业训练项目(201810397037,201910397034);

作者简介:刘淑琼(1985-),女,汉族,讲师,主要研究方向为生物医用高分子材料;

* 通讯联系人,E-mail:liushuqiong123456@163.com.

1 实验部分

1.1 原料与试剂

聚乳酸(PLA, $M_n = 10$ 万, 日本大赛璐; $M_n = 25$ 万, Nature work); 1,4-二氧六环(AR.), 冰醋酸(AR), 无水乙醇(AR), 壳聚糖(CS, 脱乙酰度为 80~95%, 粘度为 50~800mPa/s, BR), 磷酸二氢钠(AR), 尿素(AR), 均来自国药集团化学试剂有限公司; 无水氯化钙(AR), 广东汕头市西陇化工厂; 去离子水自制。

1.2 不同条件的 PLA/CS 纳米纤维组织工程支架的制备

称取一定量的 CS(CS 占总溶液的质量比分别为 0.25%、0.5%、1% 和 2%) 溶于一定浓度(50%) 的冰醋酸, 然后将该混合体系置于磁力搅拌器上充分搅拌, 直至 CS 全部溶解, 然后加入一定量的 1,4-二氧六环, 使冰醋酸和二氧六环的质量比为 1:9, 搅拌约 30min, 使两溶剂混合均匀。然后向该溶液中加入一定量的 PLA, 使得 PLA 占整个溶液的质量比为 10%, 大约 3h 后 PLA 全部溶解, 未出现相分离现象, 则成功配置了 PLA/CS 的聚合物均相溶液, 随后将该溶液倒到模具中, 置于设定温度(分别为 -5℃、-10℃、-20℃ 和液氮中) 进行凝胶冷冻 3h, 然后置于真空冷冻干燥机干燥 3d, 最后将样品保存于干燥器中待用。

为对比不同 PLA 分子量对于 PLA/CS 纳米纤维复合材料结构的影响, 换用了不同分子量的 PLA 进行制备 PLA/CS 纳米纤维复合材料, 制备步骤同上。

1.3 PLA/CS 复合生物支架的生物矿化

生物矿化是衡量材料诱导羟基磷灰石形成的一种简单方法, 本文采用简单的矿化实验来评判诱导羟基磷灰石形成的能力。实验过程参考文献^[23]: 取 0.3g 尿素、5mL 去离子水和 15mL 无水乙醇分别加到烧杯中, 并搅拌均匀, 然后再加入 5mL 0.1mol/L NaH_2PO_4 , 继续搅拌; 将两个相同的 PLA/CS 样品浸入该溶液体系, 低速搅拌 10min, 使溶液充分渗透到样品中; 然后再加入 8.35mL 0.1mol/L 的 CaCl_2 溶液, 继续低速搅拌 5min; 最后将该烧杯密封放入 80℃ 烘箱中, 反应 24h 取出其中一个样品, 剩余样品再反应 24h 后取出。矿化后的样品用 85% 乙醇清洗, 超声, 冷冻干燥后保存待用。其它样品的矿化同上。共对下面 2 个支架的样品做矿化实验:

(1) CS 的质量分数为 1%, 在 -10℃ 条件下凝胶 3h 的 PLA/CS 复合纳米纤维支架材料;

(2) 纯 PLA 在液氮条件下冷冻 3h 的支架材料。

1.4 PLA/CS 载体复合材料的表征及性能测试

采用冷场发射扫描电镜(FE-SEM, JSM-7500F) 观察不同条件下的 PLA/CS 纳米纤维复合材料的结构及其矿化后的沉积物的结构形貌; 采用 Nicolet 330 傅立叶变换红外光谱仪, 分析矿化后样品沉积物的结构特征; 用 X 射线衍射仪分析(Philips X'pert MPD) PLA/CS 纳米纤维复合材料矿化后的成分。

2 结果与讨论

2.1 不同凝胶温度对 PLA/CS 复合纳米纤维支架结构的影响

图 1 是不同凝胶温度的条件下制备的 PLA/CS 复合支架的 SEM 图, 其中 CS 含量为 0.5%, 从图中可以看出, 随着凝胶温度的变化, 支架的结构也发生较大的变化。-5~-20℃ 的凝胶温度使得支架材料的基本结构呈现较无规则的形态结构, 但也有一定的规则变化: -5℃ 时其基体结构由一些不规则微球构成, 而微球的结构是由很多分叉的网状结构组成, 类似球晶的生长, 其对应高倍率的图片(见图 1(b)) 即呈现出团簇结构, 且可以明显看出其分叉的纤维直径在 500nm 以内, 但出现明显的纤维粘连现象。从图 1(c) 可看出, 凝胶温度为 -10℃ 的 PLA/CS 的基体结构由两个部分组成, 即多孔结构和部分散掉的微球构成, 即微球的相连处为多孔结构, 从其高倍率的图片也可以看出, 该条件下 PLA/CS 复合材料的更精

细的结构是由部分较密实的骨架和部分纳米纤维团簇结构构成,而且可以看出其密实部分的骨架是由纳米纤维团簇发展而成的;当凝胶温度降到 -20°C 时,基体结构则由多孔结构构成,且其孔壁结构仍然是由一些多孔组成,孔洞尺寸大概在 $1\mu\text{m}$ 以内(见图 1ef);当凝胶温度降到液氮温度时,则得到较为规则的梯形结构,且其孔壁的精细结构仍然由多孔结构构成,其孔洞尺寸明显大于凝胶温度为 -20°C 的样品。综上所述可知,凝胶温度对 PLA/CS 复合材料的结构影响较大,且随着温度的降低,结构的微观尺寸也逐渐增大,从纳米级上升到普通的尺寸结构。本实验采用的是热致相分离法来制备生物复合材料的,所以当把 PLA 和 CS 的混合溶液置于设定温度时,相当于是对该溶液进行冷却,使基体材料进行热致相分离而结晶析出。由此可以看出,凝胶温度对于 PLA 的相分离行为将造成影响,并最终影响其形态结构。

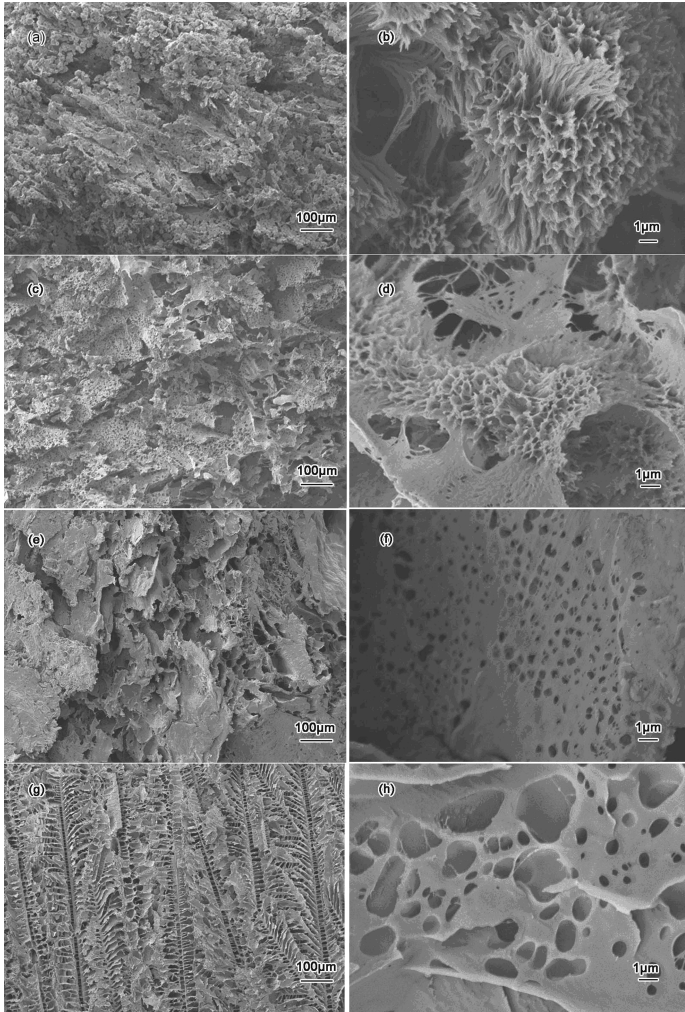


图 1 不同凝胶温度的 PLA/CS 复合生物支架的 SEM 图
(ab) -5°C ;(cd) -10°C ;(ef) -20°C ;(gh)液氮

Figure 1 SEM of PLA/CS composite scaffolds prepared at different aging temperatures
(ab) -5°C ;(cd) -10°C ;(ef) -20°C ;(gh) liquid nitrogen

2.2 不同 CS 含量对 PLA/CS 复合纳米纤维支架结构的影响

图 2 是不同壳聚糖含量的 PLA/CS 复合材料的 SEM 图,讨论该条件时,PLA 的浓度为 10%,凝胶温度为 -10°C 。从图 2 及图 1(cd)(0.5%CS)可以明显看出,随 CS 含量的增加,PLA/CS 复合支架的基体结构变化不大,三种不同壳聚糖含量的复合支架的结构均为多孔结构,但随 CS 含量的增加,其孔洞越来越密实,而高倍率下的形态结构都是由纳米团簇状结构构成,且随 CS 含量的增加,在纤维团簇结构上

的颗粒物也增加,这应该这是由于 PLA 和 CS 的相容性不好导致其相分离,两者分别成相,且随 CS 含量增加,相分离程度增加。

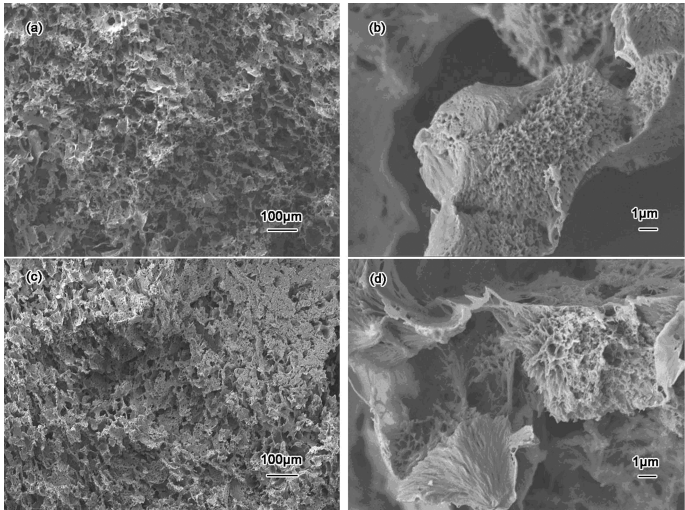


图 2 不同 CS 含量的 PLA/CS 复合生物支架的 SEM 图
(ab)0.25%;(cd)1%

Figure 2 SEM of PLA/CS composite scaffolds prepared from different CS content
(ab)0.25%;(cd)1%

2.3 不同 PLA 分子量对 PLA/CS 复合纳米纤维支架结构的影响

图 3 为采用不同分子量 PLA 制备的 PLA/CS 复合生物支架的 SEM 图,两者 CS 含量均为 0.25%,凝胶温度为-20℃。从图中可以看出,两者的基体结构均为多孔结构,但是由分子量小的 PLA 制得的支架孔洞尺寸明显大于由分子量大的 PLA 制得的支架孔洞尺寸,而高倍率下的精细结构呈现出明显不同的结构:分子量大的样品,得到了纳米纤维结构的 PLA/CS 复合材料,且纤维分布较均匀;而分子量小的样品完全不能得到纳米纤维结构。有文献^[24,25]表明:只有结晶性聚合物才可采用相分离法得到纳米纤维结构的支架,因为其相分离的微晶可以作为交联剂,使聚合物形成凝胶,凝胶是形成纳米纤维的关键。但也有研究表明,一些非晶性聚合物亦能形成凝胶,比如 R208 非结晶的聚乳酸/二氧化六环/水三元混合体系^[26],或者是非结晶的聚苯乙烯在环己醇溶液体系的冷却过程中也能形成凝胶^[27],即凝胶的形成不一定要以相分离形成的微晶作为交联剂,但文中未对凝胶成因进行分析。本实验中分子量大的 PLA 有利于纳米纤维结构形成的原因可能是因为分子量较大,导致分子链容易形成链缠结,该链缠结可作为凝胶结构形成的交联剂^[28],促使 PLA/CS 复合支架最终形成了纳米纤维结构。

2.4 PLA/CS 复合纳米纤维支架材料的生物矿化

2.4.1 SEM 分析 从图 4 可看出,纯 PLA 纳米纤维支架和含 1%CS 的 PLA/CS 复合纳米纤维生物支架在矿化 48h 后,在支架材料的表面均形成一定的矿物覆盖层,表明两组支架材料均有诱导矿物形成的能力。课题组原来的工作就报道过,纳米纤维结构的 PLA 支架比非纳米纤维结构的 PLA 支架具有更好的诱导矿物层形成的能力^[29]。对比来看,含有 CS 的 PLA/CS 复合支架表面的矿物层更为致密,沉积的量更多,这可能是添加 CS 的结果。CS 是一种天然高分子材料,具有良好的生物相容性和生物活性,且有一定的亲水性能,将其与 PLA 进行复合,可以在一定程度上改善 PLA 的亲水性能,促进其在矿化溶液中的浸入程度,从而有利于矿物在其表面的沉积。

2.4.2 XRD 分析 图 5 为纯 PLA 和 PLA/CS 复合支架的 XRD 图,从图中可以看出,两个样品的主衍射峰 16.8°和 19°分别归属于 PLA 的特征衍射峰,对应于(200)/(110) 和(203)晶面^[2],添加 1%CS 的样品在 15°左右出现了壳聚糖的无定型峰包^[23],且在 31°~32°和 25°出现了 HA 的特征衍射峰,但强度较弱

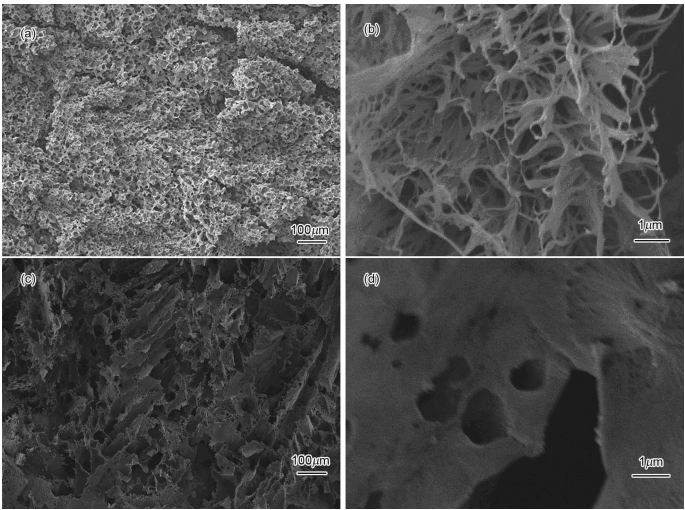


图 3 不同 PLA 分子量的 PLA/CS 支架 SEM 图
(ab) $M_n=250000$;(cd) $M_n=100000$

Figure 3 SEM of PLA/CS composite scaffolds prepared from different molecular weight of PLA
(ab) $M_n=250000$;(cd) $M_n=100000$

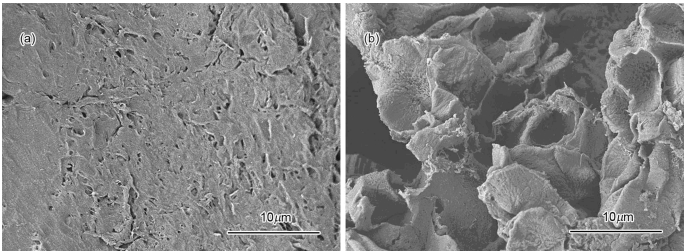


图 4 不同 CS 含量的 PLA/CS 复合支架矿化 48h 的 SEM 图
(a)pure PLA;(b)1%CS

Figure 4 SEM of PLA/CS composite scaffolds with different content of CS mineralization 48h
(a)pure PLA;(b)1%CS

且没有很明显的分离,说明所沉积物质为弱结晶结构^[29],从而也证明该纳米纤维结构的复合材料具备一定的生物活性,可以诱导羟基磷灰石的形成;而纯的 PLA 样品则没有特别明显的 HA 特征衍射峰,这可能是由于矿化沉积的量较少。

2.4.3 红外分析 图 6 为不同 CS 含量的 PLA/CS 复合纳米纤维支架矿化 48h 的 FTIR 图,由图可知复合生物支架在图中出现较为明显的 PO_4^{3-} 的特征吸收峰,分别在 585cm^{-1} 、 954cm^{-1} 、 1041cm^{-1} ,且在 872cm^{-1} 和 1457cm^{-1} 处出现了 CO_3^{2-} 的特征吸收带^[29]。结合 XRD 的分析,可以推断生成覆盖在样品表面的矿物质为碳羟基磷灰石,表明复合材料具有良好的生物活性。

3 结论

以二氧化六环/冰醋酸为溶剂体系,采用相分离法制备了 PLA/CS 复合纳米纤维结构的组织工程支架,并探讨了不同凝胶温度、不同 CS 含量及不同分子量的 PLA 对 PLA/CS 复合支架纳米纤维结构形成的影响及该复合支架的生物活性。结果表明:

(1)凝胶温度对 PLA/CS 复合材料的纳米纤维结构影响较大,且随着温度的降低,支架基体结构的微观尺寸也逐渐增大,从纳米级上升到普通的尺寸结构;

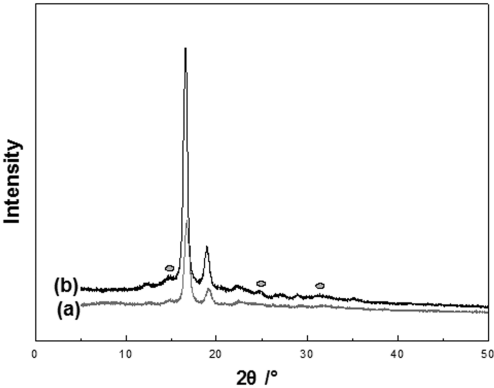


图 5 不同 CS 含量的 PLA/CS 复合支架矿化 48h 的 XRD 图
(a)纯 PLA;(b)1%CS

Figure 5 XRD of PLA/CS composite scaffolds with different content of CS mineralization 48h
(a)pure PLA;(b)1%CS

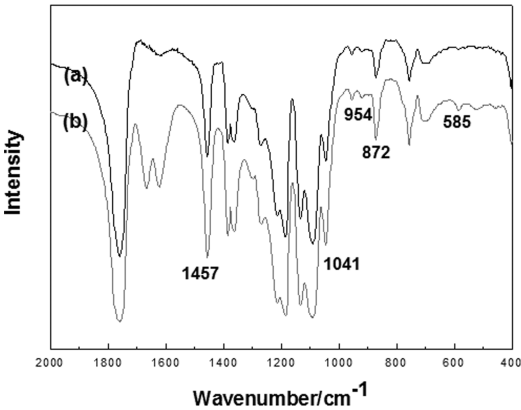


图 6 不同 CS 含量的 PLA/CS 复合支架矿化 48h 的 FT-IR 图
(a)纯 PLA;(b)1%CS

Figure 6 FT-IR of PLA/CS composite scaffolds with different content of CS mineralization 48h
(a)pure PLA;(b)1%CS

(2)CS 含量对 PLA/CS 复合支架的基体结构影响不大,实验范围的添加量均能形成纳米纤维的结构;

(3)实验范围内分子量对 PLA/CS 复合支架的纳米纤维结构有重要影响:分子量大的样品,较易得到纳米纤维结构的材料,而分子量小的样品则难或不能得到纳米纤维结构;

(4)生物矿化实验表明,CS 的添加有利于 PLA/CS 复合纳米纤维支架生物活性的提高。

参考文献:

[1] Yao Q Q, Cosme J G, Xu T, Miszuk J M, Picciani P H, Fong H, Sun H L. Biomater. 2017, 115(1): 115~127.
[2] Xu T, Yang H Y, Yang D Z, Yu Z Z. Appl Mater Interfaces, 2017, 9(6): 21094~21104.
[3] Xu T, Yao Q Q, Miszuk J M, Sanyour H J, Hong Z K, Sun H L, Fong H. Colloid Surface B, 2018, 171: 31~39.
[4] Zhang J Y, Ma S Q, Liu Z H, Geng H J, Lu X, Zhang X, Li H J, Gao C Y, Zhang X, Gao P. Int J Nanomed, 2017, 12: 8855~8866.
[5] Li X Y, Yang Q, Ouyang J, Yang H M, Chang S. Appl Clay Sci, 2016, 126: 306~312.
[6] Valente T M A, Silva D M, Gones P S, Fernandes M H, Saneos J D M. Interfaces, 2016, 8(5): 3241~3249.

[7] Yang Z J, Sun C, Wang L, Chen H X, He J, Chen Y. J Colloid Interf Sci, 507(2017): 344~352.

[8] Xu T, Miszuk J M, Zhao Y, Sun H L, Fong H. Adv Healthc Mater, 2015, 4(9): 2238~2246.

[9] Shoba E, Lakra R, Kiran M S, Korrapati P S. Biomed Mater, 2017, 12(3): 035005.

[10] Li W, Tan X N, Luo T, Shi Y, Yang Y J, Liu L F. Integrated Ferroelectrics, 2017, 179(1): 104~119.

[11] Lin S E, Cui L, Chen G H, Huang J P, Yang Y H, Zou K J, Lai Y X, Wang X L, Zou L Y, Wu T, Cheng J C Y, Li G, Wei B, Lee W Y W L. Biomater, 2019, 196: 109~121.

[12] Zhou P Y, Cheng X S, Xia Y, Wang P F, Zou K D, Xu S G, Du J Z. Appl Mater Interfaces, 2014, 6(23): 20895~20903.

[13] Zhou T, Wang N P, Xue Y, Ding T T, Liu X, Mo X M, Sun J. Appl Mater Interfaces, 2015, 7(5): 3253~3262.

[14] Jin I L, Min J K, Lee W K. Appl Sur Sci, 2014, 320(9): 614~619.

[15] 杨慎宇, 唐三元, 谭文成, 曾戎, 杨辉, 黄馨霏, 夏吉生, 屠美. 材料研究学报, 2015, 29(11): 801~806.

[16] Han J, Zhang J F, Yin R X, Ma G P, Yang D L, Nie J. Carbohydr Polym, 2011, 83: 270~276.

[17] Wang T, Ji X Y, Jin L, Feng Z Q, Wu J H, Zheng J, Wang H Y, Xu Z W, Guo L L, He N Y. ACS Appl Mater Interfaces, 2013, 5(9): 3757~3763.

[18] Dong W Y, Zeng Q H, Yin X Q, Liu H F, Lv J, Zhu L. Polym Compos, 2018, 39: E416-E425.

[19] Hoveizi E, Ebrahimi-Barough S. J Cell Physiol, 2019, 234(11): 19565~19573.

[20] Sun B, Long Y Z, Zhang H D, Li M M, Duval J L, Jiang X Y, Yin H L. Prog Polym Sci, 2014, 39(5): 862~890.

[21] Wang X, Ding B, Li B. Mater Today, 2013, 16(6): 229~241.

[22] Liu X H, Ma P X. Biomater, 2009, 30(25): 4094~4103.

[23] 李立华, 丁珊, 周长忍. 功能材料. 2010, 11: 1955~1958.

[24] Zhang R Y, Ma P X. J Biomed Mater Res, 2000, 52(2): 430~438.

[25] Brown E E, Laborie M P. Biomacromolecules, 2007, 8(10): 3074~3081.

[26] 励杭泉, 张晨. 聚合物物理学, 北京: 化学工业出版社, 2007: 144.

[27] Lloyd D R, Kinzer K E, Teseng H S. J Membr Sci, 1990, 52(3): 239~261.

[28] Ji G L, Zhu B K, Cui Z Y, Zhang C F, Xu Y Y. Polymer, 2007, 48(21): 6415~6425.

[29] Liu S Q, He Z H, Xu G J, Xiao X F. Mater Sci Eng C, 2014, 44 (10): 201~208.

The Effects Condition on the Nanofibrous Structures of Poly(lactic acid)/Chitosan Scaffolds and Bio-mineralization Activity

LIU Shu-qiong^{*}, WU Fang-fang, WU Fang-di, LÜ Zhi-yu

(Fujian Provincial Key laboratory of Eco-Industrial Green Technology, College of Ecological and Resources Engineering, Wuyi University, Wuyishan 354300, China)

Abstract: Poly(lactic acid) (PLA)/chitosan (CS) composite nanofibrous scaffolds were fabricated from a quaternary PLA/CS/dioxane/glacial acetic acid system by phase separation method. The effects of gelation temperature, CS content and the molecular weight of PLA on the morphology of composite scaffolds were investigated. The results revealed that gelation temperature and the molecular weight of PLA significantly influenced the formation of nanofibrous structure, but the CS content had very litter effect on the nanofibrous structure. The microstructure of the PLA/CS composite scaffolds changed greatly with the reduction of gelation temperature, from nano-structure to micro-structure. Besides, high molecular weight of PLA make for nanofibrous structure easier than the low molecular weight of PLA in this work. The mineralization results showed that PLA/CS composite nanofibrous scaffolds could induce hydroxyapatite formation faster than pure PLA nanofibrous scaffolds.

Key words: Poly(lactic acid); Chitosan; Nanofibrous; Bioactivity