壳聚糖/海藻酸钙/自组装多肽微凝胶纤维的制备及应用

胡　萍[1]，张双英[1]，李　洁[1]，雷琪琪[1]，张文柠[1]，敖宁建[1,2*]

（1. 暨南大学生命科学技术学院，广州 510632；2. 广东省教育厅生物材料重点实验室，广州 510632）

摘要：将自组装多肽/海藻酸钠与氯化钙反应，利用水动力学拉伸收集，得到平行排列的活性微凝胶纤维；利用聚电解质反应制备壳聚糖/海藻酸钙/自组装多肽微凝胶纤维，并通过溶胀率分析、扫描电子显微镜观察、细胞毒性检测、支架与神经干细胞的相互作用评价该复合微凝胶纤维对神经再生的作用。结果表明，壳聚糖/海藻酸钙/自组装多肽微凝胶纤维高度规整，平行，生物相容性良好，能够支持神经干细胞的生长和分化并能引导神经轴突的定向生长。

关键词：微凝胶纤维；自组装多肽；海藻酸钠；壳聚糖；神经修复

引言

目前在临床上已经批准的用于神经再生材料大多都是管状结构。管状神经再生材料能够提供简单的机械支持，但是其操作复杂，而且只适用于短距离的缺陷（3～5cm），而复合水凝胶支架通过简单地植入神经间隙就可以达到目的[1]。海藻酸凝胶因其良好的生物相容性和生物可降解性，已广泛用于构建神经组织工程支架[2~7]。然而，海藻酸钠的亲水性较强，很多细胞在海藻酸钙凝胶表面很难黏附和生长[8~10]。因此，当海藻酸盐作为生物材料使用时，更多的是与其它材料结合以避免这些缺陷。研究发现，功能性自组装多肽（functional self-assembling peptide，F-SAP）不仅可以介导细胞黏附，还可以促进神经再生[11]。Liu 等[12]报道了一种自组装 K-2(QL)(6)K-2(QL6)支架，QL6 支架可以显著改善神经轴突的功能，如提高传导速度和增强高频传导，这些改善都能够促进脊髓损伤后神经功能的恢复。Motoyuki 等[13]通过神经干细胞和自组装多肽 K2(QL)6K2(QL6)的协同作用来改善脊髓损伤后的微环境。在前期的研究基础上，本课题组通过仿生物学设计了 F-SAP（RADA16-IKVAV），并由 American Peptide Company 制备，纯度≥95%。通过实验证明了该自组装多肽凝胶为神经再生提供了更加稳定的环境，并且能够诱导神经轴突的伸长。壳聚糖（Chitosan，CS）是一种天然聚合物，来自甲壳素的去乙酰化作用[14]，由于其可调节的化学和生物学特性而被广泛用于伤口愈合、生物传感器和神经再生等多种生物医学领域[15~17]。本文利用海藻酸钠和氯化钙的螯合作用，以同轴注射和水动力学拉伸收集的方式制备了海藻酸钙（Calcium alginate，Alg-Ca）微凝胶纤维，并在其基础上进行改性，将 F-SAP 负载在 Alg-Ca 微凝胶纤维的表面来增强 Alg-Ca 微凝胶纤维的生物学特性；再利用 Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维与 CS 溶液的静电吸附作用，形成一层聚电解质膜将 Alg-Ca 与 F-SAP 包裹在内，利用二氧化碳临界点干燥技术制得 CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维。通过扫描电镜观察 CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维的微观组成结构，探讨该复合微凝胶纤维对神经干细胞分化的影响，评价其对神经再生的作用。

10.14028/j.cnki.1003-3726.2020.08.005

收稿：2020-04-20；**修回**：2020-06-23；

基金项目：国家自然科学基金资助项目（20976068）；

作者简介：胡萍（1996-），女，硕士，暨南大学生命科学技术学院生物医学工程专业；

* **通讯联系人**：敖宁建，研究员，博（硕）生导师，研究方向为新型医用高分子材料与医疗器械产品的研发。E-mail：taonj@jnu.edu.cn，Tel：13660596766.

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

海藻酸钠，AR，天津市大茂化学试剂厂；氯化钙，AR，天津市大茂化学试剂厂；壳聚糖（分子量：20万；酰化度：≥85.0%），AR，美国 Sigma 公司；D-多聚赖氨酸（PDL），AR，美国 Sigma 公司；兔源-GFAP，AR，美国 Sigma 公司；抗鼠源-Tubulin-β，AR，美国 Bio Legend 公司；Alexa Fluor 546 二抗，AR，美国 Invitrogen 公司；Alexa Fluor 488-Phalloidi，AR，美国 Sigma-Aldrich 公司；CCK-8 试剂盒，AR，日本同任有限公司；含 DAPI 的荧光保护剂，AR，美国 Electron Microscopy Science 公司。

EMCPD300 二氧化碳临界点干燥仪，德国 Carl Zeiss，Goettingen 公司；ULTRA55 扫描电子显微镜，德国 Carl Zeiss，Goettingen 公司；LSM700 激光共聚焦显微镜，德国 Carl Zeiss，Goettingen 公司；Multiskan MK3 酶标仪，美国 Thermo Scientific 公司。

1.2 Alg-Ca 微凝胶纤维的制备

配制 0.8mg/mL 的海藻酸钠溶液和 1.5mg/mL 的氯化钙溶液，利用同轴制备的方式制备 Alg-Ca 微凝胶纤维，如图 1 所示。在注射过程中，海藻酸钠的注射速度小于氯化钙的注射速度，产生一个速度差。速度差可以将两者交联产生的凝胶带入快速旋转的收集浴中，进而被拉伸成微凝胶纤维。再将微凝胶纤维用 50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%的乙醇浓度梯度置换 10min，然后用 EMCPD300 二氧化碳临界点干燥仪干燥至恒重，即进行二氧化碳临界点干燥，制得 Alg-Ca 微凝胶纤维。其中，收集浴采用双蒸水，水浴速度由转子速度控制。

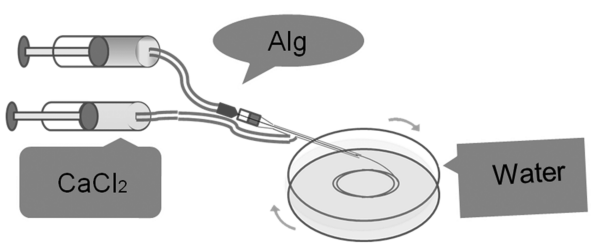

图 1 Alg-Ca 微凝胶纤维的制备装置图

Figure 1 Device for preparing Alg-Ca hydrogel microfibers

1.3 CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维的制备

配制 10mg/mL 的 F-SAP 溶液，调节其 pH 值为 7，然后和海藻酸钠溶液按 1∶4 的体积比混合均匀，利用同轴制备的方式制备 Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维，如图 1 所示。再将制备好的 Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维与 20mg/mL 的 CS 溶液（pH=5.5）以 1∶1 的体积比混合，通过聚电解质复合反应反应一段时间后，进行二氧化碳临界点干燥，即得 CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维。同法制备 CS/Alg-Ca 微凝胶纤维作为对照。

1.4 CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维溶胀率的测定

测定 CS 溶液作用时间对 CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维溶胀率的影响。将 CS 溶液与 Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维分别反应 5min、10min、15min、20min、25min、30min、60min，再将制得的 CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维进行二氧化碳临界点干燥。然后各取适当大小，称重，质量记为 M_d。再将其浸泡在 37℃的 PBS 缓冲溶液中，5 h 后取出溶胀的复合微凝胶纤维，用滤纸吸去表面多余的水分后，称重，质量记为 M_s。按式(1)计算溶胀率：

$$溶胀率 = (M_s - M_d)/M_d * 100\% \quad (1)$$

1.5 CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维的微观形态

将二氧化碳临界点干燥的 Alg-Ca 微凝胶纤维、Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维和 CS/Alg-Ca/F-SAP 微

10.14028/j.cnki.1003-3726.2020.08.005

凝胶纤维通过 ULTRA55 扫描电镜观察微观形态。将 CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维放入液氮中脆断，然后再进行二氧化碳临界点干燥，制样，通过扫描电镜观察横截面。

1.6　细胞免疫染色

将一定细胞密度的 C57 胎鼠鼠脑源神经干细胞接种在材料内部培养 7d。用抗鼠源-Tubulin-β 标记神经元，兔源-GFAP 标记星型胶质细胞；将 Alexa Fluor 546(驴抗鼠)和 Alexa Fluor 488(驴抗兔)溶解在 PBS 中，2h 常温避光反应；用 DAPI(1∶1000)染色细胞核，10min 避光反应。最后置于共聚焦显微镜中观察染色情况，对照组为包被了 PDL 的玻片。

1.7　CCK-8 测定

用 CCK-8 试剂盒检测微凝胶纤维对神经干细胞的细胞毒性。简而言之，封装在微凝胶纤维中的神经干细胞与 200μL 含有 20μL CCK-8 的新鲜培养基在 37℃下孵育 4h，然后将样品粉碎成碎片离心，使用酶标仪在 450nm 波长下测吸光度。

2　结果与讨论

2.1　CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维的溶胀分析

图 2 是 CS 溶液不同作用时间对 CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维溶胀率的影响。从图 2 可以看出，CS 溶液作用 5min、10min、15min 时，CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维的溶胀率变化幅度很小。当 CS 溶液作用 20min 时，CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维的溶胀率明显地下降。再随着 CS 溶液反应时间的增长，CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维的溶胀率基本保持不变，达到平衡。由此表明，CS 溶液与 Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维反应 20min 时，制得的 CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维具有比较稳定的溶胀性能。良好的溶胀率是评价支架材料的一个重要的指标。

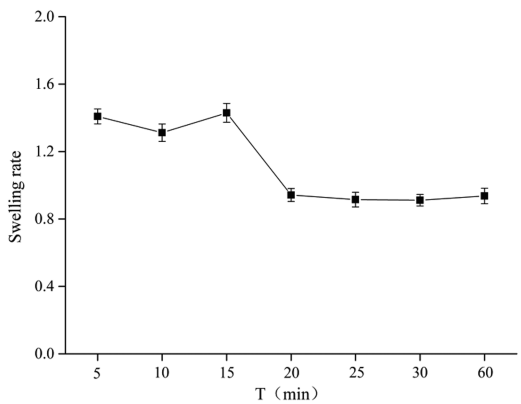

图 2　CS 溶液不同作用时间的微凝胶纤维的溶胀率

Figure 2　Swelling ratio of hydrogel microfibers with different action time of CS solution

2.2　CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维的微观形态

图 3 是 Alg-Ca 微凝胶纤维、Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维、CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维的扫描电镜(SEM)图。从图 3(A)可以看出，Alg-Ca 微凝胶纤维表面光滑且具有明显的沟壑。相反，从图 3(B)可以看到，Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维表面有短小的纤维均匀的附着，沟壑表面粗糙，但沟壑规整且方向一致，说明 F-SAP 的加入改变了 Alg-Ca 微凝胶纤维的特性。当聚电解质反应发生时，可以产生相似排列度的微凝胶纤维，如图 3(C)所示。CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维沟壑明显，高度规整且平行，但是表面既不光滑也无短纤维均匀的附着，而且形成的微凝胶纤维直径更小。这可能是因为，Alg-Ca 与 CS 发生聚电解质复合反应，从而改变了 Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维表面的特性。图 4 是 CS/Alg-Ca 微凝胶纤维、CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维横截面的 SEM 图。从图 4(A)可以看出，CS/Alg-Ca 微凝胶纤维内部

10.14028/j.cnki.1003-3726.2020.08.005

具有分层的结构，而从图 4(B)可以看到，由于 F-SAP 的加入，CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维内部无明显的分层结构，内部均一，结构更为紧密。

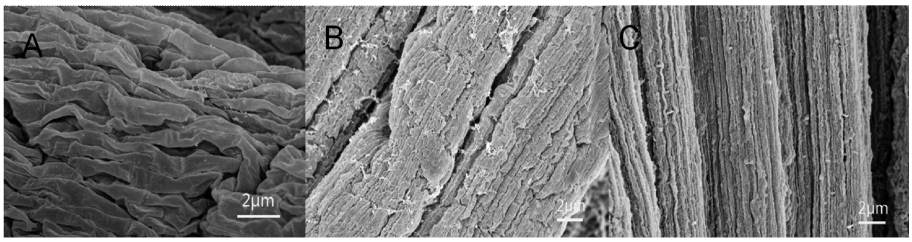

图 3 微凝胶纤维的 SEM 图

(A)Alg-Ca;(B)Alg-Ca/F-SAP;(C)CS/Alg-Ca/F-SAP

Figure 3 SEM images of hydrogel microfibers

(A) Alg-Ca; (B) Alg-Ca/F-SAP; (C) CS/Alg-Ca/F-SAP

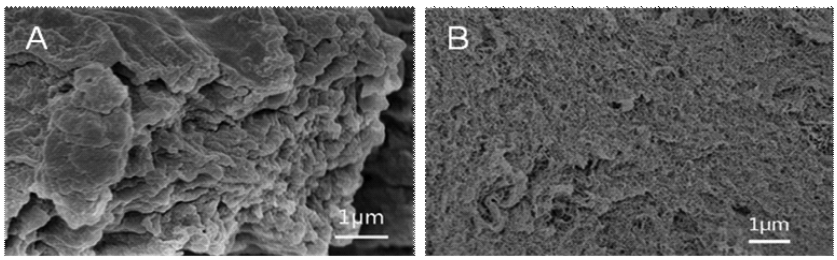

图 4 微凝胶纤维横截面的 SEM 图

(A)CS/Alg-Ca;(B)CS/Alg-Ca/F-SAP

Figure 4 SEM image of cross section of hydrogel microfibers

(A) CS/Alg-Ca; (B) CS/Alg-Ca/F-SAP

2.3 CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维对神经干细胞分化的影响

图 5 是神经干细胞在不同支架材料上培养 7d 后的细胞荧光染色图。在拉伸过程中，整个交联步骤都是在水溶液的环境中进行的，因此神经干细胞可以很好地封装在复合微凝胶纤维内部。神经干细胞具有多向分化的潜能，可以分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞[18]，具有可塑性强、高迁移率和低免疫原性等特点。Cajal 的神经趋化理论指出，神经在修复进程中，再生的轴突在远端组织释放的化学物质的引导下定向发展延长[19]。从图 5(B)可以看到，在 CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维中培养 7d 后，神经干细胞分化形成的神经元大部分都是沿着微凝胶纤维平行排列的方向生长的。例如，箭头 1 和 2 所指的神经元轴突生长方向与微凝胶纤维平行排列的方向一致，并且 1 和 2 首尾相接成一条直线，与微凝胶纤维长轴的方向平行。另外，箭头 3、4、5 所指的神经元的所有轴突生长方向都与微凝胶纤维长轴方向平行。然而，并不是所有的神经元轴突生长方向都与微凝胶纤维长轴方向平行，如箭头 6 所指的神经元，该神经元轴突初始的生长方向为箭头 6 所指的方向，但是随后其轴突生长方向有一个体位的调整，逐渐向箭头 7 的方向生长，从而使得该神经元轴突生长的方向与微凝胶纤维长轴的方向趋于平行。同理，箭头 8 所指的神经元也是由箭头 8 的方向逐渐向箭头 9 的方向做了体位调整。从图 5(A)中可以看到，在 CS/Alg-Ca 微凝胶纤维中培养 7d 后，神经干细胞分化形成的神经元较少，而且只有较小部分的神经元轴突生长方向与微凝胶纤维长轴方向平行，且神经元轴突的长度小于图 5(B)中的神经元。而图 5(C)中显示，对照组 PDL 中的神经元轴突都是发散的。由此可以推测，平行排列的活性微凝胶纤维不能使所有神经元轴突朝着微凝胶纤维长轴的方向生长，但是在神经元生长过程中会引导轴突做出体位调整，使轴突的生长方向趋向于平行支架长轴的方向，并且含有自组装多肽的支架材料也能够促进神经元轴突的伸长。

10.14028/j.cnki.1003-3726.2020.08.005

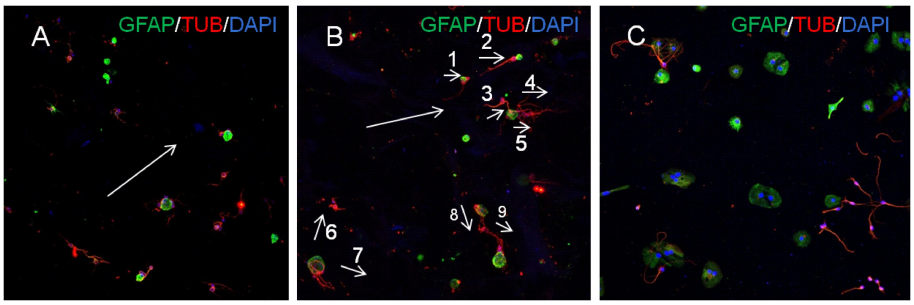

图 5　神经干细胞在不同材料上培养 7d 的荧光染色图(箭头的方向是与支架平行的方向)

(A)CS/Alg-Ca;(B)CS/Alg-Ca/F-SAP;(C)PDL

Figure 5　Fluorescence staining of neural stem cells after 7 days of culture on different materials

(The direction of the arrow is parallel to the stent)

(A) CS/Alg-Ca; (B) CS/Alg-Ca/F-SAP; (C) PDL

2.4　CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维安全性评价

图 6 是神经干细胞在不同支架材料上培养 3、5、7 天的细胞活性。从图中可以看到,接种在 CS/Alg-Ca 微凝胶纤维和 CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维内部的神经干细胞的细胞活力均大于 90%。其中,CS/Alg-Ca 微凝胶纤维中的细胞活性分别为(91.54±4.0)%、(90.33±2.3)%、(90.01±3.7)%。CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维中的细胞活性分别为(93.56±5.5)%、(90.8±5.4)%、(90.1±5.2)%,说明 CS/Alg-Ca 微凝胶纤维和 CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维具有良好的细胞相容性。良好的细胞相容性也是评价支架材料的一个重要的指标。

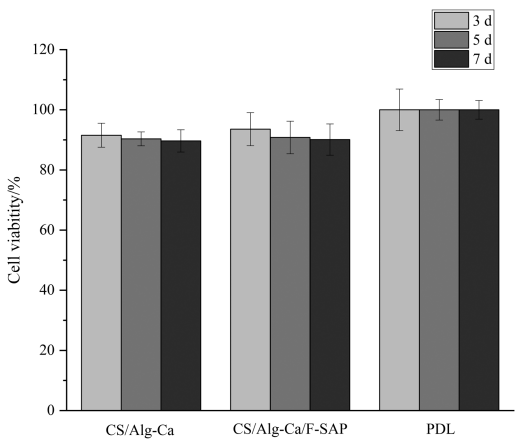

图 6　神经干细胞在不同材料中培养一段时间的细胞活性

Figure 6　Cell activity of neural stem cells cultured in different materials for a period of time

3　结论

本文利用水动力的方式同轴制备 CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维,设备简单,容易操作。以纯水为收集浴,无毒且廉价易得,为以后混合细胞制备含有细胞在内的纤维支架打下基础。所得的 CS/Alg-Ca/F-SAP 微凝胶纤维彼此间高度平行,能够促进神经干细胞的分化,引导神经元沿着微凝胶纤维长轴的方向定向生长,并且证明了含有自组装多肽的支架材料也能够促进神经元轴突的伸长,同时还具有良好的细胞相容性,未来有望在神经修复与再生领域得到应用。

10.14028/j.cnki.1003-3726.2020.08.005

参考文献：

[1] Kang E, Jeong G S, Choi Y Y, Lee, K H, Khademhosseini A, Lee S H. Nat Mater, 2011, 10(11): 877～883.

[2] Matyash M, Despang F, Ikonomidou C, Gelinsky, M. Tissue Eng Part C-Methods, 2014, 20(5): 401～411.

[3] Matyash M, Despang F, Mandal R, Fiore D, Gelinsky M, Ikonomidou C. Tissue Eng Part A, 2012, 18(1/2): 55～66.

[4] Hashimoto T, Suzuki Y, Suzuki K, Nakashima T, Tanihara M, Ide C. J Mater Sci-Mater Med, 2005, 16(6): 503～509.

[5] Prang P, Muller R, Eljaouhari A, Heckmann K, Kunz W, Weber T, Faber C, Vroemen M, Boddahn U, Weidner N. Biomaterials, 2006, 27(19): 3560～3569.

[6] Suzuki K, Suzuki Y, Tanihara M, Ohnishi K, Hashimoto T, Endo K, Nishimura Y. J Biomed Mater Res, 2000, 49(4): 528～533.

[7] Suzuki Y, Ishikawa N, Tanihara M, Saito S. Plastic and Reconstructive Surgery-Global Open, 2016, 4(1): DOI 10.1097/GOX.0000000000000581.

[8] 宋益哲，任英，娄茹云，王秀丽，于炜婷，马小军. 功能材料，2016，47(11)：11136～11140.

[9] Jun Y, Kang A R, Lee J S, Jeong G S, Ju J, Lee D Y, Lee S H. Biomaterials, 2013, 34(15): 3784～3794.

[10] Lee B R, Hwang J W, Choi Y Y, Wong S F, Hwang Y H, Lee D Y, Lee S H. Biomaterials, 2012, 33(3): 837～845.

[11] Lu J J, Sun X, Yin H Y, Shen X Z, Yang S H, Wang Y, Jiang W L. Nano Res, 2018, 11(9): 4599～4613.

[12] Liu Y, Ye H, Satkunendrarajah K, Yao G S, Bayon Y, Fehlings M G. Acta Biomater, 2013, 9(9): 8075～8088.

[13] Iwasaki M, Wilcox J T, Nishimura Y, Zweckberger K, Suzuki H, Wang J, Liu Y, Karadimas S K. Biomaterials, 2014, 35(9): 2617～2629.

[14] Seyedmajidi M, Rabiee S, Haghanifar S, Seyedmajidi S, Jorsaraei, S G A, Alaghehmand H, Jamaatlu N, Bijani A. Int J Biomater, 2015, 32(2): 37～39.

[15] Tuzlakoglu K, Alves C M, Mano J F, Reis R L. Macromol Biosci, 2004, 4(8): 811～819.

[16] Prabaharan M, Mano J F. Drug Deliv, 2005, 12(1): 41～57.

[17] Santos T C, Marques A P, Silva S S, Oliveira J M, Mano J F, Castro A G, Reis R L. J Biotechnol, 2007, 132(2): 218～226.

[18] Li H Y, Zhang Y M, Liu S M, Li F P, Wang B L, Wang J J, Cao L F, Xia T L, Yao Q Y, Chen H J. Stem Cells, 2019, 37(4): 504～515.

[19] 张贤平，王锐英. 世界最新医学信息文摘，2019，19(86)：54～55.

Preparation and Application of Chitosan/Calcium Alginate/Self-Assembling Peptide Hydrogel Microfibers

HU Ping[1], ZHANG Shuang-ying[1], LI Ji[1], LEI Qi-qi[1], ZHANG Wen-ning[1], AO Ning-jian[1,2*]

(1. *College of Life Science And Technology, Jinan University, Guangzhou* 510632, *China*;
2. *Key Laboratory of Biomaterials, Education Department of Guangdong Province, Guangzhou* 510632, *China*)

Abstract: A functional self-assembling peptide/sodium alginate reacted with calcium chloride to obtain a parallel active hydrogel microfibers by the hydrodynamic stretching, then the chitosan/calcium alginate/self-assembling peptide hydrogel microfibers are obtained through polyelectrolyte composite reaction. The application of the nanocomposite scaffolds in nerve regeneration is studied by SEM, cytotoxicity, the interaction between the matrixt and the neural stem cells. The results show that the nanocomposite scaffolds are highly regular and parallel and have good biocompatibility. Besides, the nanocomposite scaffolds can support the growth and differentiation of neural stem cells and can guide the directional growth of axons.

Key words: Hydrogel microfibers; Self-assembling peptide; Sodium alginate; Chitosan; Nerve repair

10.14028/j.cnki.1003-3726.2020.08.005