

文章编号:2095-0411(2018)01-0087-06

氧化石墨烯修饰壳聚糖基支架的构建及其 作为骨修复材料的研究

刘 杨,张中勋,伍铭慧,秦 勇,邓林红

(常州大学 生物医学工程与健康科学研究院,江苏 常州 213164)

摘要:为提高壳聚糖基支架材料的力学性能,尝试通过引入氧化石墨烯分子对壳聚糖基支架材料进行了化学修饰(GO/CS),并对改性前后的壳聚糖基支架材料的微观结构、理化性能和生物学性能进行了评价。FTIR 分析表明氧化石墨烯与壳聚糖分子发生了有效的接枝。SEM 照片显示 GO/CS 材料内部具有均一的三维多孔结构,孔洞尺寸分布在数十微米且相互连通。改性之后的材料具有较好的保湿性能和高孔隙率。相对于纯壳聚糖支架,材料的力学性能显著提升。此外,细胞实验结果还表明氧化石墨烯改性之后的材料具有良好的生物相容性。本研究获得的氧化石墨烯改性壳聚糖支架有可能为骨组织工程材料提供一种新选择。

关键词:壳聚糖;氧化石墨烯;骨修复;生物材料

中图分类号:R 318.08

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2018.01.014

Preparation of Chitosan Scaffold Modified by Graphene Oxide and Its Potential Applications as Bone Repair Material

LIU Yang, ZHANG Zhongxun, WU Minghui, QIN Yong, DENG Linhong

(Institute of Biomedical Engineering and Health Sciences, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: In order to improve the mechanical properties of the chitosan-based scaffold, the graphene oxide was introduced into the chitosan scaffold through chemical modification by making use of 1-Ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) as the cross-linker in this study. Micro-structure, physicochemical properties and biocompatibility of the graphene oxide modified chitosan scaffolds (GO/CS) were characterized. The results of fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) test show that the graphene oxide was crosslinked with chitosan molecular successfully. SEM photos indicate that the GO/CS scaffold has a uniform three-dimensional porous structure. Compared with the pure chitosan scaffold, mechanical performance of the GO/CS scaffold

收稿日期:2017-09-10。

基金项目:江苏省科技厅自然科学基金面上项目(BK20171196);江苏省教育厅自然科学基金面上项目(15KJB310001)。

作者简介:刘杨(1985—),男,湖北仙桃人,博士,讲师。E-mail: liuyang@cczu.edu.cn

significantly increased. In addition, the cell experimental results indicate that the MC3T3 osteoblasts can grow and proliferate well in the GO/CS scaffold. This grapheme oxide modified chitosan scaffold, which can be prepared in large quantities and at low cost, should have potential application in bone tissue engineering.

Key words: chitosan; graphene oxide; bone repair; biomaterials

骨组织是人的重要器官,由于外伤、肿瘤和感染等原因造成的骨缺损是目前临床上的常见问题^[1-3]。虽然通过自体或异体骨移植对受损部位进行修复是一种有效的治疗手段,但是有限的来源和免疫排斥反应极大地限制了天然骨组织的移植治疗^[4-5]。随着材料科学和生命科学的发展,组织工程支架的诞生为人工制备骨修复材料提供了新思路和新选择^[6]。一般来说,骨组织工程支架材料需要具备优良的降解性能、三维连通的多孔结构、适当的力学性能以及良好的生物相容性等多种性能^[7-9]。常见的骨修复材料主要包括金属支架、磷酸盐材料和有机高分子等^[10-12]。其中,壳聚糖作为一种天然可降解高分子材料,具备了优良的理化性能和生物相容性,同时还具有一定的抗菌性能,这些优良的性能使之成为构建骨组织工程支架的首选材料^[13-16]。然而,由于单一的壳聚糖基支架材料力学性能较差,在受力时容易发生结构破坏。氧化石墨烯作为石墨烯的氧化物,除了具有较高的比表面积外,还含有大量的含氧官能团,其中羧基的存在为其提供了化学接枝的反应位点^[17-18]。为提高壳聚糖基支架的力学性能,本研究尝试在壳聚糖基支架材料中引入氧化石墨烯成分,希望通过物理共混和化学交联相结合的方式构建出一种有利于骨组织再生的壳聚糖基支架材料(GO/CS)。此外,还对改性前后的壳聚糖基支架的微观结构、理化性能和生物学性能进行了评价。

1 实验部分

1.1 材料和仪器

壳聚糖原料(脱乙酰度 $\geq 95\%$)、柠檬酸(AR)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)和碳酸氢钠由 Aladdin 公司提供,醋酸(AR)由上海申博化工有限公司提供。氧化石墨烯由南京先丰纳米材料科技有限公司提供。碳二亚胺(EDC)由吉尔生化(上海)有限公司提供。MC3T3 成骨细胞由西北工业大学提供, MEM 培养基由 GIBCO 公司提供,胎牛血清由美国 Thermo scientific 公司提供,乙二胺四乙酸由 Sunshine 公司提供,胰蛋白酶由烟台赛尔生物技术有限公司提供,二甲基亚砷由上海凌峰化学试剂有限公司提供。

1.2 材料的制备

将纯化后的壳聚糖溶于浓度为 0.1 mol/L 的醋酸溶液中,磁力搅拌制备质量分数为 2%~3% 的 CS 溶液,随后向壳聚糖溶液中加入一定量 6 mg/mL 的 GO 水溶液,常温下搅拌 2 h 得到均匀的 GO/CS 共混体系。分别配制 15 mg/mL 的 EDC 和 NHS 溶液,往 GO/CS 体系中加入质量比为 1:1 的 EDC 和 NHS,控制 EDC 和 NHS 与氧化石墨烯和壳聚糖两者的质量比为 1:6。将交联得到的氧化石墨烯-壳聚糖凝胶在 4℃ 冰箱中放置 6 h,然后转入 -20℃ 下 6 h,最后将其转移至 -80℃ 冰箱过夜。随后将固化的 GO/CS 转移到冷冻干燥机中冷冻干燥 48 h,得到冻干的 GO/CS 支架材料。图 1 是氧化石墨烯分子与壳聚糖分子发生化学交联反应的机理图,其中 EDC 起到交联剂的作用,而 NHS 则起到催化剂的作用。

1.3 材料性能表征

真空下将 CS 和 GO/CS 支架材料分别裁剪成长 \times 宽 \times 高为 6 mm \times 6 mm \times 4 mm 的样品后进行喷

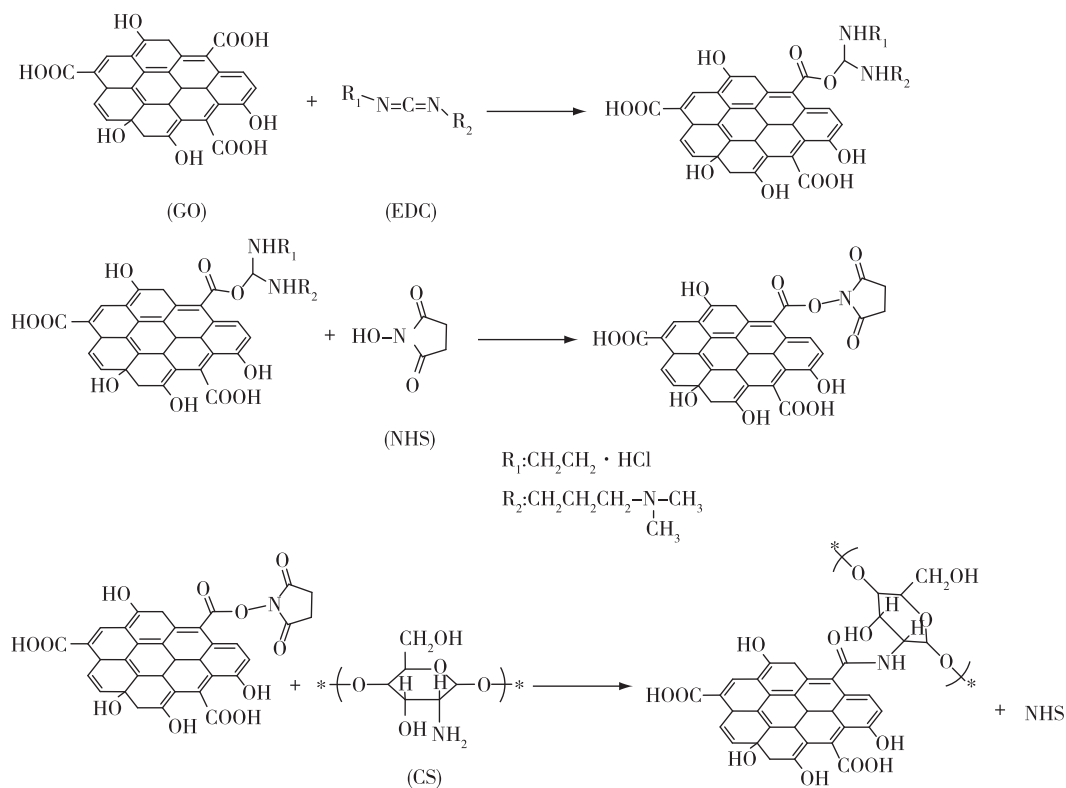


图 1 壳聚糖与氧化石墨烯的化学反应机理

金,采用扫描电镜(SUPRA 55,德国 Zeiss 公司)观察材料的微观结构。取一定量的材料置于研钵中研磨成粉末,将干燥后的粉末样品与溴化钾按 1:100 的比例混匀研细并压片,然后采用傅里叶红外光谱仪(Nicolet Avatar 370,美国尼高力公司)进行红外测试,扫描范围 $400 \sim 4\,000\text{cm}^{-1}$ 。支架材料的吸水率测试在 PBS($\text{pH}=7.4$)溶液中进行,分别测定材料在干态时的质量 m_0 和饱和吸水之后的质量 m_w ,吸水率 $= (m_w - m_0) / m_w (n=10)$ 。为了评价支架材料的力学性能,本研究采用生物力学性能试验机(Bose ELF3200,美国 Bose 公司)对 CS 和 GO/CS 支架材料的抗压性能进行了评价($n=6$)。

此外,为评价改性之后材料的生物相容性,本研究采用 MC3T3 成骨细胞对改性前后材料的生物相容性进行了评价。MC3T3 成骨细胞由西北工业大学提供,细胞培养使用的培养液为含有生长因子,重组人胰岛素,人转铁蛋白,谷氨酰胺,青/链霉素双抗,非必须氨基酸,胎牛血清的完全培养基。将 MC3T3 细胞悬液以 $5\,000$ 个/ cm^2 加入到培养板中,加入浸泡材料 24h 之后的浸提液培养基,在 37°C , 5% CO_2 饱和湿度条件下进行培养,每天更换一次培养基。通过 MTT 法评估 MC3T3 成骨细胞的活性与增殖情况。在细胞培养至第 1,2,3,4,5,6,7d 时各取出一块培养板,在每个样品孔中加入 $20\mu\text{L}$ 质量浓度为 5mg/mL 的 MTT 溶液后,放回 37°C , 5% CO_2 培养箱中继续孵育 4h,然后终止培养。用滴管小心吸出样品孔内的上清液后,在每孔中加入 $100\mu\text{L}$ DMSO,震荡 10min,使结晶物充分溶解。用微孔板式连续波长酶标仪测定溶解液在波长为 490nm 时的吸光值。

2 结果与讨论

2.1 支架材料的 FTIR 分析

图 2 所示为 CS 和 GO/CS 两种材料的红外光谱图。从图中可以看出位于 3417cm^{-1} 的吸收峰变宽可能是由于 O—H 和 N—H 键的伸缩振动; 893cm^{-1} 附近为 CH_3 和 CH_2 中 C—H 的伸缩振动峰; 在 1643cm^{-1} , 1558cm^{-1} , 1412cm^{-1} 附近出现的 3 个峰均为壳聚糖的特征峰, 分别归因于酰胺 I ($\text{C}=\text{O}$), $-\text{NH}_2$ 中 N—H 弯曲振动, 以及酰胺 II ($\text{C}-\text{N}$) 和酰胺 III ($\text{C}-\text{N}$ 伸缩振动峰, N—H 弯曲振动) 的重叠峰; 1149cm^{-1} 和 895cm^{-1} 附近为糖苷键 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) 的特征峰, 表明复合材料中含有 CS 成分。此外, GO/CS 材料中 1727cm^{-1} 处的吸收峰为氧化石墨烯中 $-\text{COOH}$ 的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动, 这表明氧化石墨烯成份被成功的引入到了壳聚糖支架内部。

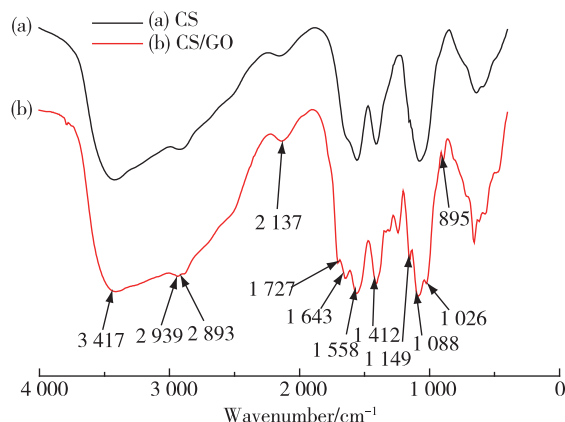


图 2 CS 和 GO/CS 的红外光谱图

2.2 支架材料的 SEM 分析

图 3 是 CS 和 GO/CS 两种支架材料的扫描电镜图。从图中可以清楚观察到, CS 和 GO/CS 支架材料内部都具有比较均匀的三维多孔结构, 孔洞大小均一且孔洞之间相互连通, 这些孔洞结构可以为细胞生长提供营养物质和代谢产物的传输通道。而对比两者的结构可以发现, CS 支架中的孔洞主要呈现圆形且尺寸较小(图 3(a)和 3(b)), 而引入氧化石墨烯之后的 GO/CS 支架内部的孔洞则为更规则的矩形且尺寸较大(图 3(c)和 3(d)), 后者的尺寸更利于细胞由外界向材料内部发生迁移。此外, GO/CS 支架中的孔洞内壁呈现出具有微皱褶的片层结构, 这为细胞粘附和细胞外基质的沉积提供了理想的位点, 也可能有利于细胞生长和增殖。

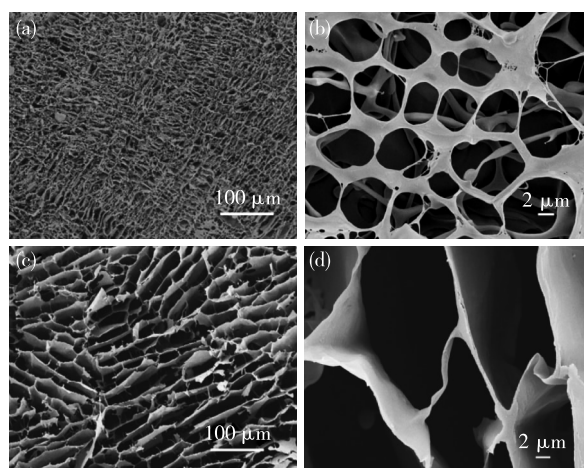


图 3 CS 与 GO/CS 支架材料的扫描电镜图

2.3 支架材料的吸水率

保湿性能对于生物材料在体内的应用至关重要, 图 4 为 CS 和 GO/CS 两种样品在 PBS 中的饱和吸水率。随着时间的推移, 两种材料的吸水率均有增加, 4h 后两种材料的饱和吸水率趋于稳定。其中, GO/CS 支架的吸水率稍高于 CS 的吸水率, 这可能是由于前者内部的多孔结构为水份储存提

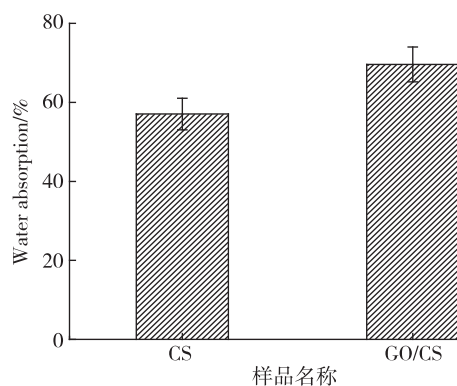


图 4 CS 和 GO/CS 支架材料的饱和吸水率 ($n=10$)

供了较大的空间,同时氧化石墨烯成分表面的大量亲水性官能团也为水分吸收提供了动力。

2.4 支架材料的力学性能

图5为CS和GO/CS两种壳聚糖基支架材料的力学性能测试结果。图5(a)为两种材料在受压时的应力-应变曲线,可以发现随着压缩行程的增加,材料受到的应力也逐渐增加。图5(b)显示的是CS和GO/CS支架材料的抗压强度,两种材料在被压缩至50%时的抗压强度分别为0.197MPa

和0.389MPa。结果表明GO/CS支架的抗压强度显著高于CS支架,这可能是由于引入氧化石墨烯与壳聚糖分子发生化学交联后,分子质量的增加和分子间作用力的加强有效提升了支架材料的力学强度。此外,相对于CS支架,GO/CS支架内部的三维结构更加稳定,孔洞内壁的片层结构也为支架结构的稳定性提供了保障。

2.5 支架材料的细胞毒性测试

本研究通过在支架材料上接种MC3T3成骨细胞来评估材料的生物相容性。图6为MC3T3细胞分别在两种支架材料的浸提液中培养1,2,3,5,7d后,进行MTT试验所得的吸光度值。吸光度值随着培养时间的延长逐渐升高,表明细胞能够良好地生长,改性前后的两种材料均能较好地支持细胞粘附和生长。MTT检验结果表明,GO/CS支架对MC3T3细胞没有毒性反应,具有良好的生物相容性。

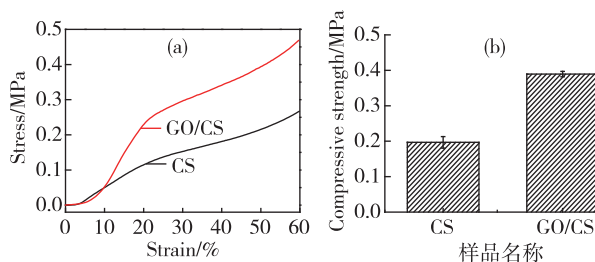


图5 CS和GO/CS支架材料的力学性能($n=6$)

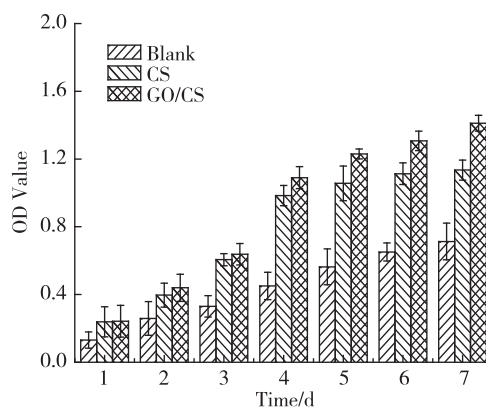


图6 MC3T3细胞在CS和GO/CS支架浸提液培养一周内的OD值($n=5$)

3 结论

本研究通过引入氧化石墨烯分子,分别以EDC和NHS为交联剂和催化剂,对壳聚糖基支架材料进行化学接枝改性,成功地构建了一种具有三维连通多孔结构的GO/CS复合支架材料。氧化石墨烯的引入有效地改善了壳聚糖支架材料的力学性能。此外,细胞实验结果表明该GO/CS材料具有良好的生物相容性,该材料有可能为骨组织工程支架材料提供一种新选择。

参考文献:

- [1]BALLARRE J, MANJUBALA I, SCHREINER W H, et al. Improving the osteointegration and bone-implant interface by incorporation of bioactive particles in sol-gel coatings of stainless steel implants[J]. Acta Biomater, 2010, 6: 1601-1609.
- [2]KANG S, PARK J B, LEE T J, et al. Covalent conjugation of mechanically stiff graphene oxide flakes to three-dimensional collagen scaffolds for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Carbon, 2015, 83: 162-172.
- [3]BIGGS M J, DALBY M J. Focal adhesions in osteoneogenesis[J]. Proc Inst Mech Eng H, 2011, 224:1441-1453.
- [4]DEPAN D, GIRASE B, SHAH J S, et al. Structure-process property relationship of the polar graphene oxide-media-

- ted cellular response and stimulated growth of osteoblasts on hybrid chitosan network structure nanocomposite scaffolds[J]. *Acta Biomater*, 2011, 7:3432-3445.
- [5] TAMPIERI A, CELOTTI G, LANDI E, et al. Biologically inspired synthesis of bone-like composite: selfassembled collagen fibers/hydroxyapatite nanocrystals[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2003, 67:618-625.
- [6] YU P, BAO R Y, SHI X J, et al. Self-assembled high-strength hydroxyapatite/grapheneoxide/chitosan composite hydrogel for bone tissue engineering[J]. *Carbphyd Polym*, 2017, 155:507-515.
- [7] LANGER R, VACANTI J P. Tissue engineering[J]. *Science*, 1993, 260:920-926.
- [8] PEPPAS N A, LARGER R. New challenges in biomaterials[J]. *Science*, 1994; 263: 1715-1720.
- [9] CRANE G M, LSHAUG S L, MIKOS A G. Bone tissue engineering[J]. *Nature Med*, 1995, 1:1322-1326.
- [10] CHEN S H, ZHENG L Z, XIE X H, et al. Comparative study of poly (lactic-co-glycolic acid)/tricalcium phosphate scaffolds incorporated or coated with osteogenic growth factors for enhancement of bone regeneration[J]. *J Orthopa Transl*, 2014, 2: 91-104.
- [11] BELLUCCI D, SOLA A, GENTILE P, et al. Biomimetic coating on bioactive glass-derived scaffolds mimicking bone tissue[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2012, 100A: 3259-3266.
- [12] HUTMACHER D W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage[J]. *Biomaterials*, 2000, 21: 2529-2543.
- [13] GARCIA M A, PEREZ L. Effect of molecular weight reduction by gamma irradiation on chitosan film properties[J]. *Mat Sci Eng C*, 2015, 55: 174-180.
- [14] LIU Y, SHEN X, ZHOU H, et al. Chemical modification of chitosan film via surface grafting of citric acid molecular to promote the biomineralization[J]. *Appl Surf Sci*, 2016, 370:270-278.
- [15] MA X Y, FENG Y F, MA Z S, et al. The promotion of osteointegration under diabetic conditions using chitosan/hydroxyapatite composite coating on porous titanium surfaces[J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 7259-7270.
- [16] LIU Y, JI P H, LYU H L, et al. Gentamicin modified chitosan film with improved antibacterial property and cell biocompatibility[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 98:550-556.
- [17] YANG X Y, WANG Y S, HUANG X, et al. Multi-functionalized graphene oxide based anticancer drug-carrier with dual-targeting function and pH sensitivity[J]. *J Mater Chem*, 2011, 21: 3448-3454.
- [18] YANG X M, TU Y F, LI L, et al. Well-dispersed chitosan/graphene oxide nanocomposites[J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2010, 2:1707-1713.

(责任编辑:殷丽莉)