

壳聚糖-磷酸化壳聚糖聚电解质复合物水凝胶的组装与仿生矿化***

沈 军, 李全利, 唐旭炎, 周 建

Assemble and biomimetic mineralization of chitosan-phosphorylated chitosan polyelectrolyte complex hydrogel

Shen Jun, Li Quan-li, Tang Xu-yan, Zhou Jian

College of Stomatology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Oral Disease Research of Anhui Province, Hefei 230032, Anhui Province, China

Shen Jun★, Master, Lecturer, Attending physician, College of Stomatology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Oral Disease Research of Anhui Province, Hefei 230032, Anhui Province, China shjxfk@gmail.com

Correspondence to: Li Quan-li, Doctor, Associate professor, College of Stomatology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Oral Disease Research of Anhui Province, Hefei 230032, Anhui Province, China ql-li@126.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 307724400*, 30973352*; Key Project of Science and Technology Research and Development of Anhui Province, No. 08010302196*

Received: 2010-06-23
Accepted: 2010-09-08

Abstract

BACKGROUND: Based on the theory of biomineralized organic matrix template controls inorganic crystal growth, human hard tissue repair materials constructed using molecular bionic technology is one of the research hotspots of biological materials. But there is no report regarding polyelectrolyte complex organic matrix plate constructed for biomimetic synthesis of bone tissue repair materials.

OBJECTIVE: Polyelectrolyte complex hydrogel formed by reacting polycation chitosan and polyanion derivate phosphorylated chitosan is used as the pre-tissue biomineralized organic matrix template to biomimetic synthesis of the biomaterials.

METHODS: Firstly natural polycation polysaccharide chitosan was modified through phosphorylation, to synthesize polyanion derivate phosphorylated chitosan; then polyelectrolyte complex hydrogel was formed from equal volumes of phosphorylated chitosan solution and polycation chitosan solution. The obtained polyelectrolyte complex hydrogel was soaked in supersaturated CAVP solution to induce hydroxyapatite crystals deposit and grow under the regulation of hydrogel matrix. It was characterized with fourier transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction and scanning electron microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: The porous polyelectrolyte complex hydrogel formed by the interaction between polycation chitosan and polyanion phosphorylated chitosan can induce hydroxyapatite crystals nucleated and grew on the fiber surfaces of the hydrogel, thus biomimetic synthesizing a new composite biomaterial for bone repairing.

Shen J, Li QL, Tang XY, Zhou J. Assemble and biomimetic mineralization of chitosan-phosphorylated chitosan polyelectrolyte complex hydrogel. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(47):8814-8817. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 依据生物矿化有机基质模版调控无机晶体生长理论, 采用分子仿生技术构建人体硬组织修复材料是目前生物材料研究的热点之一。但是目前还未见构建聚电解质复合物有机基质模版进行骨组织修复材料仿生合成的报道。

目的: 以聚阳离子壳聚糖与其聚阴离子衍生物磷酸化壳聚糖形成的聚电解质复合物水凝胶作为生物矿化有机基质模版的预组织形式, 进行生物材料仿生合成。

方法: 首先对天然聚阳离子多糖壳聚糖进行磷酸化改性, 合成聚阴离子的磷酸化壳聚糖; 然后通过聚阳离子壳聚糖溶液与聚阴离子磷酸化壳聚糖溶液复合, 形成聚电解质复合物水凝胶; 最后将获得的聚电解质复合物水凝胶浸入钙磷过饱和液中, 诱导磷灰石晶体在水凝胶基质的调控下沉积生长。通过傅里叶红外光谱、X射线衍射、扫描电镜进行表征观察。

结果与结论: 阳离子壳聚糖与聚阴离子磷酸化壳聚糖相互作用, 形成多孔的聚电解质复合物水凝胶, 此水凝胶可以诱导磷灰石晶体的生长。从而仿生合成了一种新型的有机无机复合生物材料。

关键词: 壳聚糖; 磷酸化壳聚糖; 聚电解质复合物; 水凝胶; 仿生矿化
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.47.018

沈军, 李全利, 唐旭炎, 周建. 壳聚糖-磷酸化壳聚糖聚电解质复合物水凝胶的组装与仿生矿化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(47):8814-8818. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

依据生物矿化的“有机基质模版调控无机晶体成核生长”理论, 进行生物材料的分子仿生构建是目前人体硬组织修复材料研究的热点之一。研究的关键是有机模版的分子结构的设计^[1-11]。目前在模版的设计中还有许多缺点, 如生物相容性不佳、潜在的疾病传染、价格昂贵等, 有待于进一步改善。作者对天然多糖——壳聚糖进行磷酸化改性, 证实磷酸化壳聚糖可以做一种有机分子模版, 调控磷灰石晶体的成核、生长和形态^[12]。

聚电解质复合物(polyelectrolyte complex, PEC)是由相反电荷的大分子通过静电力相互作用, 而形成的一类高分子复合物^[13-14]。生命体内的很多复杂现象, 如基因信息的传递、酶的选择, 细胞外基质的许多成分, 如聚多糖、双链DNA、细胞骨架蛋白等都与PEC有关。因而聚电解质复合物广泛地应用于生物医用材料的研究, 如生物膜、药物控释体系、药物和酶载体、基因治疗及人造疫苗等领域。关于聚阳离子的壳聚糖与其他聚阴离子形成的PEC有广泛的研究, 显示了良好的应用前景和细胞相容性^[15-21]。目前还未有采用PEC作为矿化模版, 调控无机晶体生长的报道。

本文拟以PEC水凝胶作为生物矿化的有机基质模板的预组织形式, 通过聚阳离子的壳聚糖与其衍生物磷酸化壳聚糖聚阴离子复合, 构建壳聚糖-磷酸化壳聚糖PEC水凝胶, 然后在钙磷过饱和液中仿生矿化, 形成有机-无机有序键合水凝胶体系, 仿生构建具有硬组织细胞外基质特性的骨组织修复材料。

1 材料和方法

设计: 对比观察实验。

时间及地点: 于2008-09/2009-12在安徽医科大学口腔医学院/安徽省口腔疾病研究省级实验室完成。

材料:

主要试剂及仪器: 壳聚糖(脱乙酰度96.54%, 黏度55 mPa·s, 灰份0.86%, 水分5.34%), 浙江玉环海洋生物有限公司。其他化学试剂均为分析纯。可见紫外分光光度计(uv-260, uv-vis, spectrophotometer), Shimadzu。X射线衍射仪(X' Pert Pro MPD), Philips, Holland。傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet 510P FTIR), USA。扫描电镜(S-2460N), Hitachi, Tokyo, Japan。

方法:

磷酸化壳聚糖的合成与检测: 磷酸化壳聚糖的合成参照Nishi等^[22]介绍的方法进行。磷酸化壳聚糖取代度的确定参照淀粉磷酸酯磷含量的方法(ISO3946-1982标准)。

矿化液——快速矿化液: 配制方法参照文献^[23]的方法,

壳聚糖-磷酸化壳聚糖的聚电解质复合物水凝胶的制备: 1 g的壳聚糖溶于100 mL体积分数1%的醋酸溶液配制成1%的壳聚糖溶液。1.73 g磷酸化壳聚糖溶于100 mL去离子水, 配制成1.73%的磷酸化壳聚糖溶液。在室温下, 将2 mL的磷酸化壳聚糖溶液缓慢加入试管中的2 mL的壳聚糖溶液中, 静止陈化24 h, 过滤除去上清液, 用去离子水反复洗涤。凝胶状沉淀物保存于去离子水中备用。胶状沉淀物常规梯度乙醇脱水, 进一步用醋酸异戊酯置换、临界点干燥、喷金进行SEM观察。

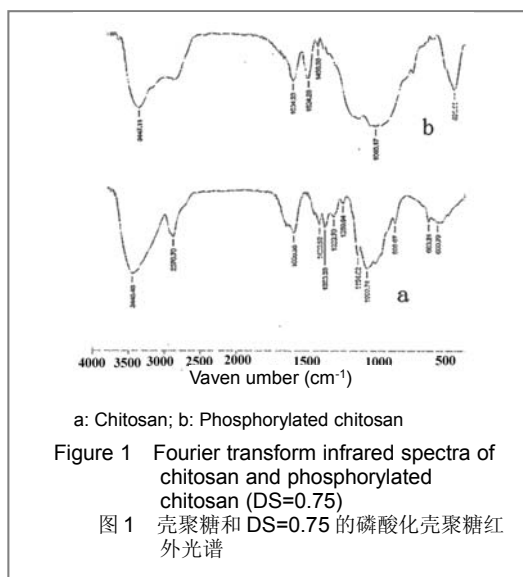
PEC的仿生矿化: PEC水凝胶在饱和的Ca(OH)₂溶液中浸泡4 d, 然后用去离子水反复洗涤。然后将PEC水凝胶转移至含有30 mL快速矿化液的密封聚乙烯塑料瓶中, 并置入37 °C的水箱中孵育1周。快速矿化液每天更换1次。

最后取出PEC水凝胶用大量的去离子水洗涤。样品按上述方法处理进行扫描电镜观察; 常温真空干燥, 进行X射线衍射检测。

主要观察指标: 傅里叶红外光谱确定基团的性质, 扫描电镜观察形成的PEC-磷灰石复合物的形态, X射线衍射观察磷灰石晶体的特征峰, 对磷灰石晶体进行定性表征。

2 结果

2.1 磷酸化的壳聚糖的合成与性质 壳聚糖、磷酸化壳聚糖的傅里叶红外光谱分析见图1。壳聚糖的傅里叶红外光谱(图1a)的峰值归属已有详细研究^[24-29], 磷酸化壳聚糖的傅里叶红外光谱(图1b)与壳聚糖(图1a)相比较: 一级醇羟基的C-O的伸缩振动峰(1 000~1 100 cm⁻¹)减弱, 而在1 048 cm⁻¹出现了磷酸根的伸缩振动峰ν₁ PO₄, 以及在941 cm⁻¹和491 cm⁻¹出现ν₃ PO₄、ν₄ PO₄新峰; -NH₂的峰(1 560 cm⁻¹)消失, 而酰胺I(1 634 cm⁻¹)酰胺II(1 524 cm⁻¹)的峰加强。壳聚糖和磷酸化壳聚糖的X射线衍射光谱显示: 壳聚糖在2θ=10°, 20°左右强的吸收峰, 表明壳聚糖具有晶体结构。磷酸化壳聚糖改性后峰均明显减弱甚至消失, 表明晶体结构基本被破坏(图谱为提供)。测定磷酸化壳聚糖[P]=质量分数10.69%(DS=0.75)。



2.2 PEC的合成和性质 把磷酸化壳聚糖加入壳聚糖溶液中, 在PEC合成过程中, 可以观察到所形成的PEC由不稳定状态, 逐渐转变为稳定状态, 最终形成有一定韧性和强度的相对致密的胶冻状的水凝胶。开始形成的水凝胶由

安徽医科大学
口腔医学院, 安徽省
口腔疾病研究省
级实验室, 安徽省
合肥市
230032

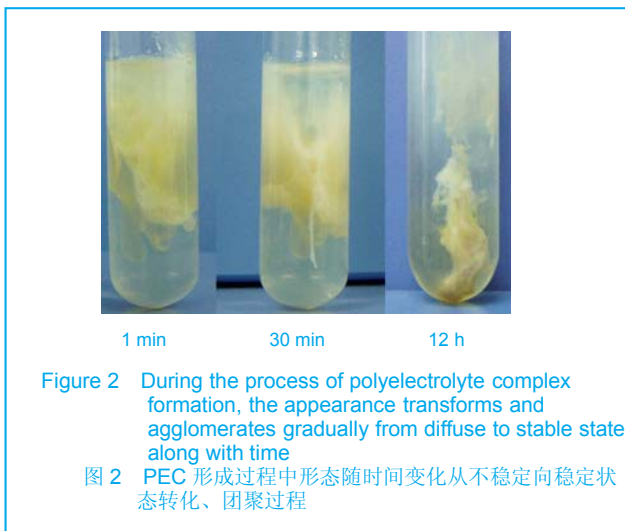
沈军★, 男, 1973
年生, 安徽省蚌埠
市人, 汉族, 1996
年安徽医科大学
口腔医学院毕业,
硕士, 讲师, 主治
医师, 主要从事生
物矿化与口腔正
畸学研究。
shjxfk@
gmail.com

通讯作者: 李全
利, 博士, 副教授,
安徽医科大学口
腔医学院, 安徽省
口腔疾病研究省
级实验室, 安徽省
合肥市
230032
qli@126.com

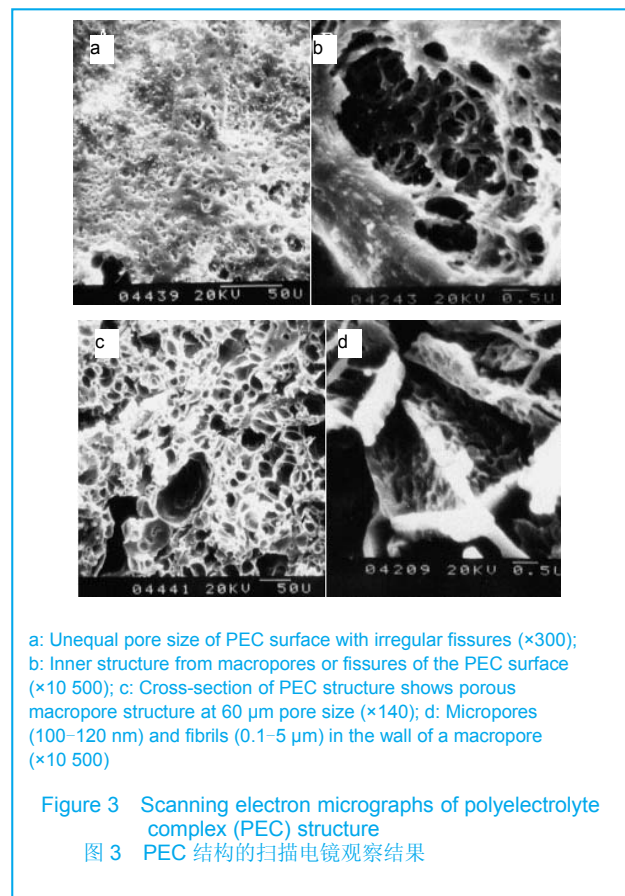
中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2010)47-08814-04

收稿日期: 2010-06-23
修回日期: 2010-09-08
(20100531001/G·Y)

很多的丝网状、半透明的结构组成, 随着时间的推移, 它们逐渐团聚, 变得相对较不透明, 体积缩小, 而最终稳定, 见图2。

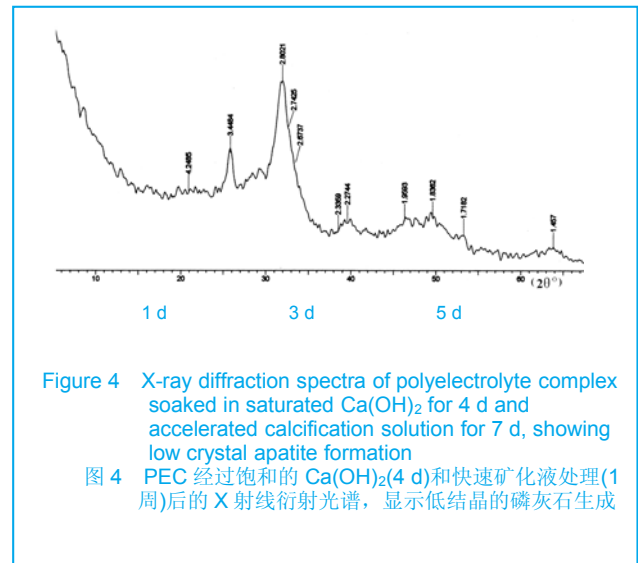


扫描电镜观察PEC水凝胶是一种三维的多孔的、相互贯穿的、海绵状的、多等级空隙结构。大孔的孔径5~100 μm (平均60 μm); 构成大孔的壁又有无数的微孔组成, 微孔的孔径100~120 nm, 组成微孔的纤维直径0.1~5 μm, 见图3。



2.3 PEC的仿生矿化 PEC经过饱和的Ca(OH)₂和快速矿化液处理后的X射线衍射显示结果见图4。2θ角在

25.8°, 31.9°, 32.6°, 33.5°的峰特征与羟基磷灰石晶体相符, 但是峰较宽, 可见晶体发育是不完善的。



扫描电镜结果见图5。有很多物质沉淀于PEC纤维上, 在某些区域是单层颗粒, 有些区域则为多层颗粒, 甚至所有的纤维都被覆盖。这些颗粒又聚集成多孔状结构, 晶体形状呈球状、棒状、针状或板状, 呈现多样性。



3 讨论

本实验采用壳聚糖和磷酸化壳聚糖两溶液直接混合的方法, 获得PEC水凝胶。实验设计的氨基与磷酸根的摩尔比为1:1。但在静电荷上, 负电荷存在净剩余, 这样设计主要是为了利于矿化的进行。PEC之间的作用力主要是聚阴离子和聚阳离子之间的静电力, 及氢键、疏水力。本实验PEC的形成主要源于壳聚糖的氨基(正电荷)和磷酸化壳聚糖的H₂PO₄⁻。

PEC的形成过程是一个时间渐进过程, 有很高的不稳定因素, 因而结构也比较复杂和多样化。研究表明,

混合两种带相反电荷的聚电解质时, 会通过离子键的相互作用, 瞬时形成无规则的复合物(一级结构), 这是一种非平衡状态, 随着时间的推移会发生构象的变形^[30]。将逐渐向更稳定的构型(二级复合物)转变。进而向特异的高级结构, 即复合物键间的聚集(三级结构)转变。第一步是通过静电相互而实现的快速反应, 瞬时完成, 第二步是则需小时数量级的时间, 其中包括离子键的断裂和新键的形成, 及复合物结构的调整, 第三步是通过疏水相互作用而实现。本实验中最初形成的PEC具有较大的体积, 不稳定, 随着时间的推移, 最后团聚成较小的体积, 相对较致密, 有一定韧性和强度, 半透明状。这是其多等级结构的基础。

在前期实验的基础上, 本实验作者依据细胞外基质为一种三维纳米复合水凝胶的特点, 通过壳聚糖与磷酸化壳聚糖复合, 构建了一种PEC纳米复合水凝胶, 来模拟骨组织细胞外基质特点, 进行矿化有机质三维结构的预组织。结果显示PEC水凝胶在快速矿化液中可以诱导磷灰石的形成。其过程是一个异相成核, PEC中的磷酸化壳聚糖的磷酸根首先吸附Ca²⁺作为成核的位点, 其后羟基磷灰石生长、聚集。由于PEC水凝胶具有较大的表面积, 因而羟基磷灰石成核的能域降低, 更有利于成核。

结论: 壳聚糖和磷酸化壳聚糖自组装形成多等级孔隙的聚电解质复合物水凝胶, 通过仿生矿化处理, 形成了一种新型的类似骨组织细胞外基质特性的新一代骨组织修复材料。本实验为新型骨组织修复材料的研制提供了一种新的方法。

4 参考文献

- Wang K, Han WS. Beijing: Publishing House of Higher Education. 1997.
王夔, 韩万书. 中国无机化学十年进展[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- Tamerler C, Sarikaya M. Molecular biomimetics: utilizing nature's molecular ways in practical engineering. *Acta Biomater.* 2007;3(3): 289-299.
- Stupp SI, Braun PV. Molecular manipulation of microstructures: biomaterials, ceramics, and semiconductors. *Science.* 1997;277(5330): 1242-1248.
- Zhang S. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat Biotechnol.* 2003;21(10): 1171-1178.
- Weiner S, Addadi L, Wagner HD. Materials design in biology. *Mater Sci Eng.* 2000;C11: 1-8.
- Sarikaya M, Tamerler C, Jen AK, et al. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nat Mater.* 2003;2(9): 577-585.
- Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science.* 2001; 295(5547): 1684-1688.
- Kikuchi M, Itoh S, Ichinose S, et al. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. *Biomater.* 2001;22(13): 1705-1711.
- Doi Y, Horiguchi T, Moriwaki Y, et al. Formation of apatite-collagen complexes. *J Biomed Mater Res.* 1996;31(1):43-49.
- O'Donnell JNR, Skrtic D, Antonucci JM. Amorphous calcium phosphate composites with improved mechanical properties. *J Bioact Compat Polym.* 2006;21: 169-184.
- Chen G, Ushida T, Tateishi T. Poly(DL-lactic-co-glycolic acid) sponge hybridized with collagen microsponges and deposited apatite particulates. *J Biomed Mater Res.* 2001; 57(1): 8-14.
- Chen ZQ, Li OL, Zen Q, et al. Biomimetic mineralization and bioactivity of phosphorylated chitosan. *Key Eng Mater.* 2005;288-289: 429-432.
- Zeng X, Chen GW. Ggaofenzi Tongbao. 1997;10(1): 29-36.
曾晔, 陈观文. 聚电解质复合物[J]. 高分子通报, 1997, 10(1): 29-36.
- Shu XZ, Zhu KJ. Gongneng Gaofenzi Xuebao. 1999;12(4): 491-496.
舒晓正, 朱康杰. 聚电解质复合物在药物控释中的应用[J]. 功能高分子学报, 1999, 12(4): 491-496.
- Bergera J, Reista M, Mayera JM, et al. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;57(1):35-52.
- Chomet E, Dumitriu S. Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion Complexes. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;31(3):223-246.
- Denuziere A, Ferrier D, Damour O, et al. Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties. *Biomaterials.* 1998;19:1275-1285.
- Muzzarelli RAA, Biagini G, de Benedittis A, et al. Chitosan-oxchitin coatings for prosthetic materials. *Carbohydrate Polymers.* 2001;45 : 35-41.
- Hamano T, Teramoto A, Iizuka E, et al. Effects of polyelectrolyte complex (PEC) on human periodontal ligament fibroblast (HPLF) function. I. Three-dimensional structure of HPLF cultured on PEC. *J Biomed Mater Res.* 1998;41: 257-269.
- Hamano T, Teramoto A, Iizuka E, et al. Effects of polyelectrolyte complex (PEC) on human periodontal ligament fibroblast (HPLF) function. II. Enhancement of HPLF differentiation and aggregation on PEC by L-ascorbic acid and dexamethasone. *J Biomed Mater Res.* 1998; 41:270-277.
- Hamano T, Chibo D, Nakatsuka K, et al. Evaluation of polyelectrolyte complex (PEC) composed of chitin derivatives and chitosan, which promotes the rat cavariial osteoblast differentiation. *Polym Adv Technol.* 2002;13: 46-52.
- Nishi N, Fbina A, Nishimura S, et al. Highly phosphorylated derivatives of chitin, partiallyly deacetylated chitin and chitosan as new functional polymers: preparation and characterization. *J Biol Macromol.* 1986; 8: 311-317.
- Song YJ, Li MS, Wen SL. Cailiao Daobao. 2002;16(5): 33-35.
宋云京, 李木森, 温树林. 仿生法制备生物陶瓷涂层的最新研究进展[J]. 材料导报, 2002, 16(5): 33-35.
- Jiang TD. Beijing: China Environmental Science Press. 1995.
蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1995.
- Pearam FG, Marchessault RH, Liang CY. Infrared spectra of crystalline polysaccharides. *V Chitin J Polym Sci.* 1960;43: 101-116.
- Mima S, Miya M, Iwamoto R, et al. Highly desecetylated chitosan and its properties. *J Appl Polym Sci.* 1983; 28:1909-1917.
- Dong YM, Wang M, Wu YS, et al. Xianweisu Kexue yu Jishu. 2001; 9(2): 42-56.
董炎明, 王勉, 吴玉松, 等. 壳聚糖衍生物的红外光谱分析[J]. 纤维素科学与技术, 2001, 9(2): 42-56.
- Yang JH, Du YM, Qin CQ. Fenzi Kexue Xuebao. 2003;19(3):282-287.
杨建红, 杜予民, 覃彩芹. 红外光谱与核磁共振波谱在甲壳素结构研究中的应用[J]. 分析科学学报, 2003, 19(3): 282-287.
- Brugnerotto J, Lizard J, Goycoolea FM, et al. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer.* 2001;42: 3569-3580.
- Wang B, Deng ZH, Wan GX. Gaofenzi Cailiao Kexue yu Gongcheng. 1990;4(2): 28-33.
王兵, 邓正华, 万国祥. 聚三甲丙烯酸和主链型聚吡啶复合物的研究[J]. 高分子材料科学与工程, 1990, 4(2): 28-33.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 国家自然科学基金: 自组装仿生构建可降解缓释活性复合骨组织修复材料的研究(307724400), 釉质仿生牙体修复材料的模型构建(30973352)。安徽省科技攻关重点项目: 生物活性缓释剂诱导牙周组织再生材料和构建骨缺损材料的临床前研究(08010302196)。

作者贡献: 设计、实施、评估均为本文作者, 均经过正规培训。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

本文创新性: ①壳聚糖和磷酸化壳聚糖自组装形成多等级孔隙的聚电解质复合物水凝胶, 通过仿生矿化处理, 形成了一种新型的类似骨组织细胞外基质特性的新一代骨组织修复材料。②作者检索了 Pubmed 数据库 1996/2007 的相关文献, 认为本实验为新型骨组织修复材料的研制提供了一种新的方法。