

冻干法制备的海藻酸钙-壳聚糖组织工程复合材料支架*★

李沁华, 王迪

Preparation of calcium alginate-chitosan tissue engineering scaffolds by a freeze-drying method

Li Qin-hua, Wang Di

文章亮点:

将壳聚糖和海藻酸钠按不同的配比复合, 制备海藻酸钙-壳聚糖复合支架材料, 测定复合支架的含水率、膨胀率, 探讨其作为组织工程支架材料的可行性并找出综合性理想配比与加工方法, 以及不同成型方法下制备的支架材料性能差异。

Abstract

BACKGROUND: High water content is related to the composition of composite scaffolds. Sodium alginate is a polymer material with high water absorption, and chitosan has hydrophilicity. Therefore, the combination of these two materials has high water content as sodium alginate.

OBJECTIVE: To construct calcium alginate-chitosan composite scaffolds for tissue engineering by mainly using chitosan and sodium alginate.

METHODS: Chitosan and sodium alginate were compounded in various proportions and formed in different ways by orthogonal experiment and single factor experiment methods. The water content and swelling ratio of the composite scaffolds were measured. The histological morphology of the cross-sections of scaffolds was observed by scanning electron microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: The water content of the scaffolds was 77.20% for the film-forming method, 75.27% for the freeze-drying method, and 97.13% for particle forming method. These findings suggest that the scaffolds prepared in various ways have different cellular structures. Different forming methods have different influences on scaffold properties. Calcium alginate-chitosan scaffolds have high water content and swelling ratio as well as abundant cellular structures, which can be used as tissue engineering scaffolds.

Li QH, Wang D. Preparation of chitosan-calcium alginate-chitosan sodium alginate tissue engineering scaffolds by a freeze-drying method. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(29): 5441-5444.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 高含水率与复合支架材料的组成有关, 海藻酸钠是吸水性很高的高分子材料, 而壳聚糖也具有亲水性。两者的复合保持了海藻酸钠高含水率的特性。

目的: 以壳聚糖、海藻酸钠为主要成分, 构建组织工程复合支架材料。

方法: 采用正交试验法和单因子试验法, 将壳聚糖和海藻酸钠按不同的配比复合, 以不同的方法成型, 测定复合支架的含水率、膨胀率; 扫描电镜观察样品横截面的组织形态。

结果与结论: 不同配比的壳聚糖与海藻酸钠复合, 膜成型法得到的材料含水率 77.20%, 冷冻干燥法得到的支架材料含水率最高 75.27%, 而微球颗粒的含水率高达 97.13%。说明不同配比的复合支架材料具有不同的内部孔洞结构, 不同成型法对材料性能影响不同。海藻酸钙-壳聚糖复合支架材料具有较高的含水率, 内部孔洞结构丰富, 可作为组织工程支架材料。

关键词: 海藻酸钠; 壳聚糖; 组织工程; 复合支架; 膜成型法; 生物材料

李沁华, 王迪. 冻干法制备的海藻酸钙-壳聚糖组织工程复合材料支架[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(29): 5441-5444. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

Department of Biomedical Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Li Qin-hua★, Master, Associate researcher, Department of Biomedical Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China libmejnu@163.com

Supported by: Construction Program of "211Project" of Guangdong Province, No. 50621030*

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.29.025

Received: 2011-12-17 Accepted: 2012-02-06

暨南大学生物医学工程系, 广东省广州市 510632

李沁华★, 女, 1963年生, 广东省广州市人, 汉族, 1987年暨南大学毕业, 硕士, 副研究员, 主要从事组织工程生物材料支架与再生医学的研究。libmejnu@163.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344 (2012)29-05441-04

收稿日期: 2011-12-17
修回日期: 2012-02-06
(20110217008/D·T)

0 引言

支架材料为特定的细胞提供结构支撑作用, 引导组织的再生以及控制组织结构。因此, 寻找一种具有良好生物相容性和可降解吸收的三维支架作为细胞生长的支架式组织工程研究很重要的工作^[1-2]。壳聚糖是自然界存在的惟一的碱性多糖, 具有无毒性、无刺激性、无免疫抗原性、无热原反应、不溶血等特性, 其可生物降解性和良好的生物相容性、成膜性, 使其成为一种理想的安全可靠的天然生物活性支架材料, 在组织工程的应用中, 壳聚糖已被应用于皮肤组织工程骨、软骨、神经、肌腱、血管、肝脏、心脏瓣膜、角膜等各种组织工程中^[3-4]。

海藻酸吸水性很强但不溶于水, 海藻酸钠作为海藻酸盐具有良好的水溶性, 但遇到二价金属离子如CaCl₂钠离子被钙离子置换生成海藻酸钙, 不再溶于水, 海藻酸钠的交联是应用了这一性质。近年来在生物工程, 化学工程有重要用途而引起人们重新研究的兴趣。它常在水溶液及凝胶状态使用^[5-6]。

本实验以壳聚糖、海藻酸钠为主要组分, 制备海藻酸钙-壳聚糖复合支架材料, 探讨其作为组织工程支架材料的可行性并找出综合性能理想配比与加工方法, 不同成型方法下制备的支架材料性能差异等。

1 材料和方法

设计: 多组对照选择实验。

单位: 于2010-03/2011-06在暨南大学生物医学工程系完成。

材料: 海藻酸钠为ACROS ORGANICS产品, 壳聚糖由实验室自制, 其他常规化学试剂均为国产分析纯, 扫描电镜(JSM-T30)为Jeol公司产品。

方法:

混合溶液的制备: 采取单因子试验设计, 根据正交结果, 研究组分与温度两因素对材料性能影响。

将壳聚糖溶于一定浓度的NaOH溶液中配成浓度为0.5%的壳聚糖溶液; 海藻酸钠溶于一定浓度的醋酸溶液中配成浓度为0.5%的海藻酸钠溶液。按一定比例将溶液在高速搅拌下混合, 搅拌均匀后去泡。

不同成型方法制备支架材料: ①成膜法: 将中反应液倒入直径9 cm的培养皿中, 置于38 °C的烘箱中, 烘干成膜, 取出后置于一定浓度的CaCl₂溶液中, 浸泡24 h使材料交联, 在烘干成膜, 取出备用。②冷冻干燥法:

将反应液倒入注射器针盒中, 在-50 °C、10 Pa下冷冻干燥24 h。取出后置于一定浓度的CaCl₂溶液中, 浸泡24 h使材料交联, 反应后用蒸馏水冲洗后再次冷冻干燥24 h后取出备用。③微球颗粒法: 用针筒将反应液逐滴滴入一定浓度的CaCl₂溶液中, 待交联30 min后取出, 在蒸馏水中浸泡30 min后取出。

复合支架含水率的测定: 从样品膜上剪取1 cm×1 cm的样品, 干态时测定其体积V₁, 在蒸馏水中浸泡24 h后测定器体积V₂。吸干湿态膜表面水分, 称质量为m₂, 再置于烘箱中烘干至恒质量, 称质量为m₁。

$$\text{材料含水率} = (m_2 - m_1) / m_2 \times 100\%$$

重复3个平行样的测定, 取平均值计算结果。其中微球颗粒只测定含水率。

扫描电镜观察: 从干膜材料上剪取一小块样品, 将其横截面固定于样品铜台上喷金, 在扫描电镜下观察样品横截面的组织形态。

主要观察指标: 复合支架的含水率。扫描电镜下观察样品横截面的组织形态。

统计学分析: 由第一、二、三作者采用SPSS 10.0软件进行统计处理。

2 结果

2.1 成膜法制备壳聚糖-海藻酸钙复合支架材料及性能研究

壳聚糖用量、反应温度对材料含水率的影响: 见表1。

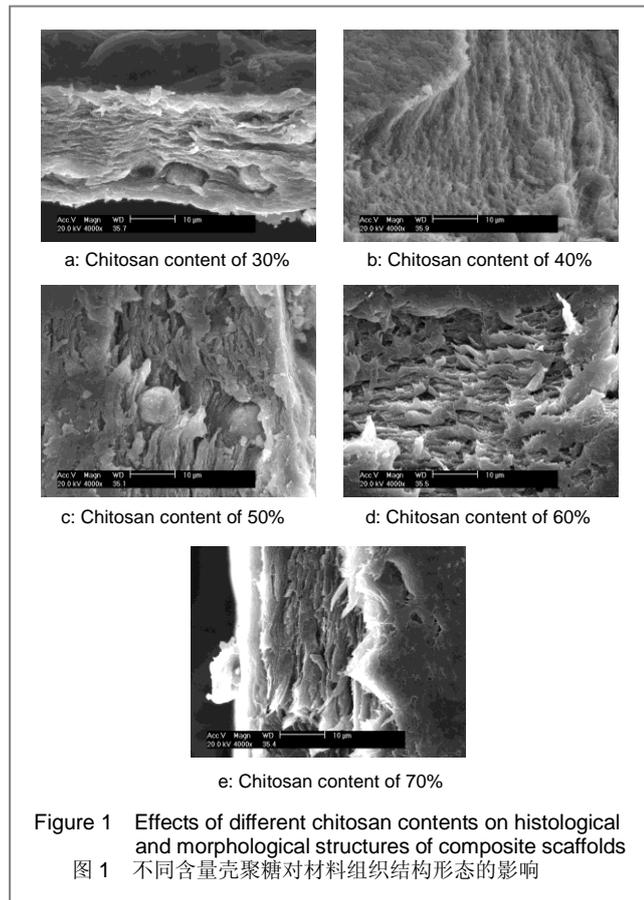
表1 壳聚糖用量、温度变化对复合支架材料含水率的影响
Table 1 Effects of chitosan amount and temperature changes on the water content of composite scaffolds

Mass fraction of chitosan (%)	Water content (%)	Reaction temperature (°C)	Water content (%)
30	64.03	40	41.06
40	77.20	50	46.65
50	62.90	60	48.26
60	49.43	70	41.97
70	54.01	80	26.40

壳聚糖的质量分数为40%时复合支架材料的含水率达到最大值77.20%。再增加壳聚糖的用量, 聚电解质膜的含水率会下降, 在用量为60%时分别降到最低, 49.43%; 而壳聚糖用量减少也会是含水率急剧下降, 在壳聚糖质量分数为30%时, 含水率为64.03%。而反应温度在60 °C时膜材料的含水率达到最大值48.26%。

温度的降低材料的含水率会有明显降低, 在40 °C为41.06%, 而温度继续升高会使含水率大幅下降, 到80 °C时降到最低26.40%。

扫描电镜观察复合支架的组织结构形态: 随着壳聚糖含量的增加, 膜材料中孔隙由纤维状变成半纤维状, 有孔洞产生, 最小的孔径达到10 μm左右, 作为细胞培养支架孔径偏小, 可考虑激光打孔后应用。见图1。



2.2 冻干法制备壳聚糖-海藻酸钙复合支架材料及性能
壳聚糖用量、反应温度对材料含水率的影响: 见表3。

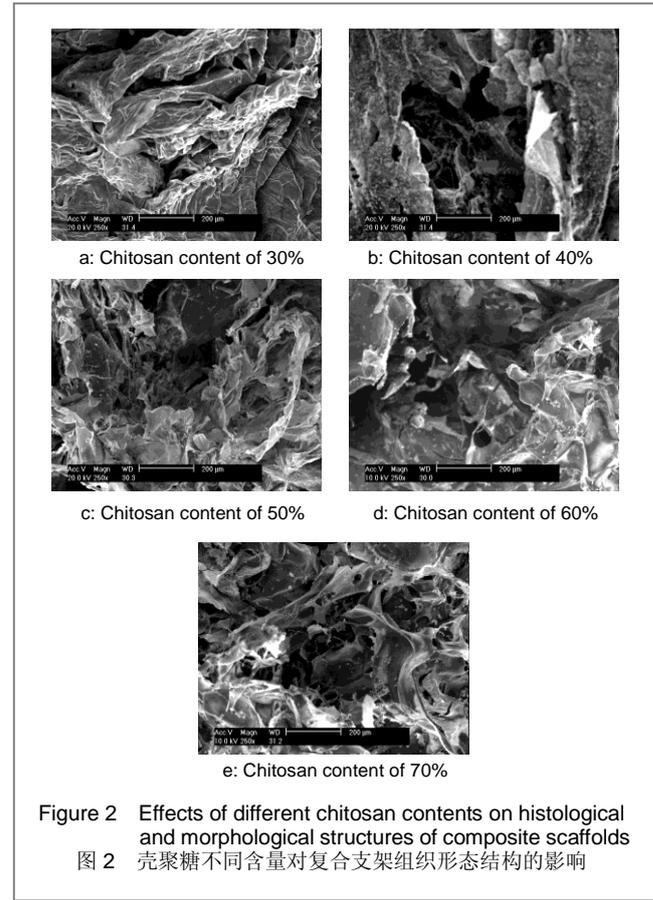
表3 壳聚糖含量、反应温度对海绵材料含水率影响
Table 3 Effects of chitosan content and temperature changes on the water content of sponge scaffolds

Chitosan content (%)	Water content (%)	Reaction temperature (°C)	Water content (%)
30	50.68	40	41.13
40	48.13	50	68.14
50	46.21	60	82.86
60	41.17	70	59.44
70	75.27	80	31.00

海绵支架材料在壳聚糖含量小于60%时含水率保持在一个相对变化不大的水平上(41.17%~50.68%), 当壳聚糖含量继续增加时, 海绵支架材料的含水率急剧增加, 在壳聚糖含量为70%时含水率为最大, 达到

75.27%。反应温度在60 °C时海绵材料的含水率达到最大值82.86%, 温度的升高和降低都会造成含水率的下降, 40 °C和70 °C时分别只有41.13%和31.00%。

扫描电镜观察复合支架的组织结构形态: 聚糖含量的不同使海绵复合支架组织形态结构发生变化。随着壳聚糖含量的增加, 海绵中孔隙变多, 孔径变小, 最小的孔径达到20 μm左右, 见图2。



2.3 壳聚糖-海藻酸钙复合材料微球制备及性能研究

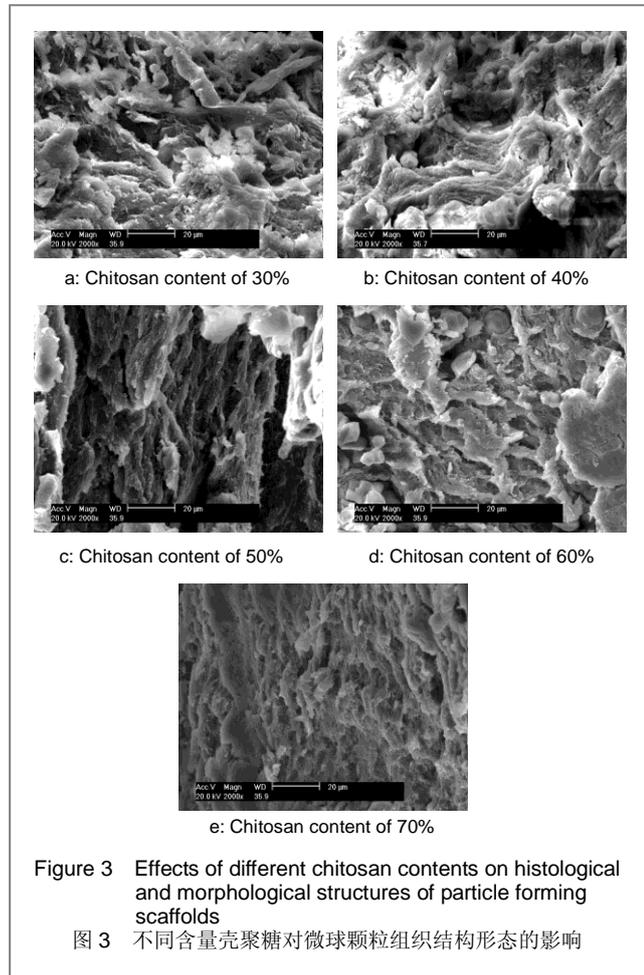
壳聚糖用量、反应温度对复合材料微球颗粒含水率的影响: 壳聚糖的含量对于材料含水率的影响是很小的, 材料的含水率保持在90%~96%。而温度的变化, 对材料的含水率影响也不大, 在70 °C前保持在94%~96%, 在80 °C时为88.20%。见表4。

表4 壳聚糖含量、反应温度对微球颗粒含水率影响
Table 4 Effects of chitosan content and temperature changes on the water content of particle forming scaffolds

Chitosan content (%)	Water content (%)	Reaction temperature (°C)	Water content (%)
30	94.02	40	97.13
40	95.77	50	96.48
50	90.11	60	96.06
60	96.03	70	93.97
70	-	80	88.20

Microparticles can not be formed when chitosan accounts for 70%.

扫描电镜观察微球颗粒的结构形态: 壳聚糖含量的不同使微球颗粒组织形态结构发生变化。扫描电镜放大 2 000 倍。随着壳聚糖含量的增加, 颗粒中孔洞孔径变小, 孔径 10~20 μm , 见图 3。



3 讨论

在本实验中, 3种成型方法得到的支架材料均具有很高的含水率, 膜成型法得到的材料含水率 77.20%, 冷冻干燥法得到的支架材料含水率最高 75.27%, 而微球颗粒的含水率高达 97.13%。

高含水率与复合支架材料的组成有关, 海藻酸钠是吸水性很高的高分子材料, 而壳聚糖也具有亲水性。两者的复合保持了海藻酸钠高含水率的特性。改变两组分用量和反应温度, 容易引起材料内部氢键之间相互作用的增强或减弱, 由于壳聚糖与海藻酸钠之间的静电引力作用, 改变用量容易引起材料结构的致密性, 从而导致复合支架含水率发生改变。所以, 为了能得到满足不同需要的材料, 可以通过改变以上因素, 得到具有不同含水率的材料, 用于不同的组织替换或修复^[7-8]。

研究表明, 成膜法得到的支架材料强度较高, 但柔韧性很好, 可以考虑用于软组织修复, 如皮肤等; 冷冻干燥法得到的复合支架呈海绵状, 具有很高的含水率, 同时硬度较高, 不易断裂, 可以考虑用于软骨组织修复方面。成微球颗粒法得到的材料为一小球, 有缓释特性, 可以应用于组织器官修复方面。但其生物降解性、细胞亲和性和生物活性还有待进一步研究^[9-10]。

4 参考文献

- [1] Qiu JH, Peng DL. Xin Yixue. 2009;40(2):121-124. 邱建辉, 彭东亮. 组织工程支架[J]. 新医学, 2009, 40(2): 121-124.
- [2] Cao YL. Zhongguo Meirong Yixue. 2005;14(2):134-135. 曹宜林. 组织工程学的研究进展[J]. 中国美容医学, 2005, 14(2): 134-135.
- [3] Joseph JG. Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. Concise general review of recent studies. Polymers for Advanced Technologies. 2006;17(6): 395-418.
- [4] Jiang TD. Beijing: Chemical Industry Press. 2007:1-2. 蒋挺大. 壳聚糖[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 1-2.
- [5] No HK, Park NY, Lee SH, et al. Antibacterial activities of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights on spoilage bacteria isolated from tofu. Journal of Food Science. 2002;67(4):1511-1514.
- [6] Cheng D, Han XY, Feng N, et al. Xiandai Yufang Yixue. 2006; 33(2):162-164. 程东, 韩晓英, 冯宁, 等. 壳聚糖的毒性研究[J]. 现代预防医学, 2006, 33(2): 162-164.
- [7] Gu QS. Shanghai: Second Military Medical University Press. 2006:6-21. 顾其胜. 海藻酸与临床医学[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2006: 6-21.
- [8] Ji MH. Beijing: Science Press. 1997:10-34. 纪明侯. 海藻化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 10-34.
- [9] Xue WM, Yu WT, Ma XJ, et al. Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao. 2004;25(7):1342-1346. 薛伟明, 于炜婷, 马小军, 等. 载细胞海藻酸钠-壳聚糖微胶囊的化学破囊方法研究[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(7): 1342-1346.
- [10] Lu YY. Shanghai Jiaotong Daxue. 2007. 陆轶业. 壳聚糖衍生物 Chitosan-g-(PCL- β -MPEG) 和壳聚糖/海藻酸钠复合物 (CS/SA) 的研究[D]. 上海交通大学, 2007.

来自本文课题的更多信息—

基金声明: 广东省 211 建设项目 (50621030)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 第一、二作者进行实验实施, 第一作者进行实验评估、资料收集、成文并审校, 第一作者文章负责。

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。