

胶原/生物活性玻璃/壳聚糖增强型复合支架

孟永春¹, 陈晓峰^{1,2}, 南开辉¹, 李玉莉², 罗小刚¹, 邓春林² (¹温州市生物材料工程技术研究中心, 温州医学院附属眼视光医院, 浙江省温州市 325027; ²国家人体组织功能重建工程技术研究中心, 华南理工大学材料科学与工程学院, 广东省广州市 510640)

文章亮点:

实验创新性地以壳聚糖作为分散剂, 将生物活性玻璃粉体预先在壳聚糖溶液中均匀分散, 然后与胶原溶液混合, 通过冷冻干燥法制备多孔复合支架, 有效改善了生物活性玻璃粉体在胶原胶体溶液中的分散效果, 提高了支架的力学性能和抗降解能力。

关键词:

生物材料; 骨生物材料; 壳聚糖; 分散; 生物活性玻璃; 胶原; 支架; 国家自然科学基金

主题词:

生物相容性材料; 壳聚糖; 胶原; 玻璃

基金资助:

浙江省自然科学基金(Y407241); 国家自然科学基金(51072055); 国家自然科学基金重点项目(50830101); 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2011CB606204)资助

摘要

背景: 生物活性玻璃/胶原复合材料具有优良的成骨活性和的生物学性能, 然而其在人体环境中易降解而导致支架溃散、力学性能下降。

目的: 构建具有良好力学性能、抗降解性能和骨修复特性的胶原/生物活性玻璃/壳聚糖增强型复合支架。

方法: 以壳聚糖作为分散剂, 将生物活性玻璃粉体预先在壳聚糖溶液中均匀分散, 然后与胶原溶液混合, 结合冷冻干燥法制备多孔胶原/生物活性玻璃/壳聚糖增强型复合骨修复支架。采用傅里叶变换红外光谱仪、场发射扫描电子显微镜、X射线衍射仪、动态生物力学试验机对复合支架的结构和性能进行表征。

结果与结论: 由于壳聚糖和生物活性玻璃粉体在微酸性环境下的电荷吸引, 使在壳聚糖中预分散的生物活性玻璃颗粒在复合支架中分散更均匀; 壳聚糖的引入大量增加了机体中的羟基和氨基, 使分子间的相互作用增强, 显著提高了材料的抗压模量和强度; 壳聚糖和胶原在分子尺度的混合, 使胶原分子被壳聚糖包裹, 降低了胶原酶对胶原分子的酶切能力, 显著提高了复合支架的抗胶原酶解性; 壳聚糖分子使生物活性玻璃颗粒更均匀的包裹在大分子基相中, 减少了生物活性玻璃颗粒的团聚和暴露, 导致复合支架在模拟体液中的矿化活性略微降低。

孟永春, 陈晓峰, 南开辉, 李玉莉, 罗小刚, 邓春林. 胶原/生物活性玻璃/壳聚糖增强型复合支架[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(21):3367-3373.

Collagen/bioactive glass/chitosan composite scaffolds

Meng Yong-chun¹, Chen Xiao-feng^{1,2}, Nan Kai-hui¹, Li Yu-li², Luo Xiao-gang¹, Deng Chun-lin² (¹Wenzhou Engineering Research Center for Biomaterials, the Eye Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China; ²National Engineering Research Center for Tissue Restoration and Reconstruction, School of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Collagen/bioactive glass composite materials possess excellent osteogenic potential and biocompatibility, but its application in bone tissue engineering is limited by mechanical property and degradation.

OBJECTIVE: To construct collagen/bioactive glass/chitosan composite scaffolds with good mechanical property, anti-degradation ability and bone repair property.

METHODS: Bioactive glass/collagen composite scaffolds with chitosan as dispersant were prepared by lyophilization. Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscope, X-ray diffraction, and dynamic biomechanical testing were used to characterize the structure and properties of the composite scaffolds.

RESULTS AND CONCLUSION: Results show that charge-attractions in pre-prepared bioactive glass/chitosan solution increased the homogeneity of bioactive glass dispersed in collagen gel and the compressive modulus and strength increased significantly due to the homogeneity and intermolecular interactions between chitosan and collagen. The enzymatic degradation rate and mineralization activity in the simulated body fluid were also lower because of a high degree of embedment of bioactive glass in collagen/chitosan matrix, and entanglement of collagen in chitosan at molecular level, which decreased the exposure of bioactive glass to the simulated body fluid, and collagen to enzyme solution.

孟永春, 温州市生物材料工程技术研究中心, 温州医学院附属眼视光医院, 浙江省温州市 325027

通讯作者: 邓春林, 国家人体组织功能重建工程技术研究中心, 华南理工大学材料科学与工程学院, 广东省广州市 510640

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.21.016
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)21-03367-07

稿件接受: 2013-11-20

Meng Yong-chun, Wenzhou Engineering Research Center for Biomaterials, the Eye Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China

Corresponding author: Deng Chun-lin, National Engineering Research Center for Tissue Restoration and Reconstruction, School of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China

Accepted: 2013-11-20

Subject headings: biocompatible materials; chitosan; collagen; glass

Funding: the Natural Science Foundation of Zhejiang Province, No. Y407241; the National Natural Science Foundation of China, No. 51072055, 50830101; the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2011CB606204

Meng YC, Chen XF, Nan KH, Li YL, Luo XG, Deng CL. Collagen/bioactive glass/chitosan composite scaffolds. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(21):3367-3373.

0 引言 Introduction

生物活性玻璃具有良好的生物相容性、组织相容性、细胞相容性、骨传导性甚至骨诱导性, 当生物活性玻璃微粒填充缺损的骨时, 生物活性玻璃及其三维多孔支架能激活基因、介导骨组织重建^[1], 在修复部位能够促进新骨组织的再生修复, 因而在生物材料研究和临床医学领域的应用得到了迅速发展^[2]。由于生物活性玻璃良好的骨组织结合性及优良的成骨性能, 基于生物活性玻璃的骨修复材料及骨组织工程支架研究已成为热点, 如生物活性玻璃/聚羟基烷酸酯^[3]、生物活性玻璃/聚己内酯^[4-5]、生物活性玻璃/聚乳酸-羟基乙酸共聚物^[6-7]、生物活性玻璃/胶原^[8-10]、生物活性玻璃/壳聚糖等^[11-12]。

胶原具有独特的四级结构, 使它不仅可以构成细胞外基质的骨架结构, 而且能与细胞相互作用并影响细胞的形态、骨架组装及增殖与分化。I型胶原蛋白在体内以胶原纤维的形式存在, 其机械性能主要由它的化学组成、交联和螺旋结构所决定的, 胶原的天然结构是维持胶原力学性能的关键^[13]。生物活性玻璃/胶原复合材料因为具有生物活性玻璃优良的成骨活性和胶原优良的生物学性能而获得良好的骨组织修复效果, 然而该复合支架也存在一些不足, 其在人体环境中易降解而导致支架的溃散、力学性能大幅下降^[14-15]; 同时在制备过程中, 生物活性玻璃等无机粉体在胶状胶原溶液中分散困难、易团聚, 致使支架力学性能不稳定, 重复性差, 生物活性玻璃颗粒的团聚使支架局部碱性较强, 可能会影响局部微环境的细胞学行为^[16]。针对上述缺点, 有效改善生物活性玻璃粉体在胶原胶体溶液中的分散效果、提高力学性能和抗降解能力是目前亟待解决的问题。壳聚糖是甲壳素部分或全部脱乙酰基得到的氨基多糖, 具有优越的生物相容性, 生物可降解性, 并且降解产物无毒不产生免疫反应, 无致癌性。壳聚糖作为一种聚阳离子电解质, 壳聚糖在液态介质中可与带负电荷的聚合物、大分子甚至一些聚阴离子如透明质酸^[17]、明胶等相互作用^[18], 形成稳定的聚电解质复合物, 促进细胞有丝分裂, 诱导合成生长因子并延长其半衰期。

实验中采用壳聚糖作为分散剂, 将生物活性玻璃粉体(本实验室制备^[19]: 质量分数58%SiO₂, 质量分数33%CaO, 质量分数9%P₂O₅)预先在壳聚糖溶液中均匀分散, 然后与胶原溶液混合, 通过冷冻干燥法制备多孔支架, 并对生物活性玻璃的分散性、支架的抗压模量和强度、抗胶原酶解性, 以及其在模拟体液中的矿化活性等性能进行研究。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 单一样本观察实验。

材料:

实验原料: 12 g/L I型胶原(上海其胜生物技术有限公司); 生物活性玻璃, 平均粒度5 μm, 本实验室自制; 壳聚糖, 脱乙酰度≥92%(Sanland-chem International Inc.); 209 U/mg I型胶原酶(广州齐云生物技术有限公司); 碳化二酰亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、乙磺酸(西格玛-安德里奇, 上海); 模拟体液, 实验室自制。

实验仪器: 傅里叶变换红外光谱仪(Nexus, 美国Nicolet); X射线衍射仪(D/max-III A, 日本理学公司); 场发射扫描电子显微镜(Nova Nano 430, 荷兰FEI); 动态生物力学试验机(ELF3200, 美国Bose)。

实验方法:

复合多孔支架的制备: 首先将壳聚糖粉体、生物活性玻璃粉体分别溶解于0.2 mol/L的乙酸溶液中得到4%的壳聚糖溶液及生物活性玻璃-乙酸溶液, 然后将一定量的生物活性玻璃颗粒分散于其中得生物活性玻璃-壳聚糖溶液, 使生物活性玻璃: 壳聚糖质量比为8:1。将生物活性玻璃-乙酸溶液, 生物活性玻璃-壳聚糖溶液分别缓慢加入到胶原溶液中, 并加入适量乙磺酸以保持溶液pH值在4.8左右, 搅拌均匀4 h后, 经抽滤得絮状物质, 用碳化二酰亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺交联后, 倒入直径6 mm、高8 mm的圆柱形模具中成型, 通过冷冻干燥, 得到生物活性玻璃质量含量为70%的胶原/生物活性玻璃、胶原/壳聚糖/生物活性玻璃两种多孔支架。用场发射扫描电子显微镜对多孔支架的截面和孔壁等进行形貌观察。

仪器及表征方法: 采用傅里叶变换红外光谱仪对复合多孔支架材料的分子间相互作用进行分析。将冷冻干燥后的支架用溴化钾混合压片后作红外光透射分析。

采用X射线衍射仪测定复合支架矿化产物的形成。

参考Yunoki等^[15]的方法, 采用动态生物力学试验机测试其抗压强度和模量。压头以1.2 mm/min纵向压缩圆柱体, 使其向下位移高度为总高度的50%后停止压缩, 并记录实验数据。

参照Nam等^[20]的测试方法。配制0.1 mol/L的Tris-HCl缓冲液(pH=7.4), 其中包含5×10⁻³ mol/L的CaCl₂, 5×10⁻⁴ mol/L的NaN₃。将10 mg样品放入2 mL Tris-HCl缓冲液中, 在37 °C下振动1 h, 然后将2 mL含有胶原酶的Tris-HCl缓冲液加入到上述混合溶液中, 使胶原酶的浓度恒定在

100 U/mL。将样品在37 °C恒温摇床中振荡0, 1, 2, 4, 8, 24 h, 然后将剩余样品冻干后得残余质量。

模拟体液中含有NaCl、NaHCO₃、KCl、K₂HPO₄·3H₂O、MgCl₂·6H₂O、无水CaCl₂、Na₂SO₄、三羟甲基甲烷、去离子水等, 将样品在37 °C下浸泡于盛有模拟体液的塑料瓶中, 材料质量和模拟体液体积比为3 mg/2 mL, 分别浸泡1, 3, 5, 10 d, 取出后分别用丙酮和去离子水反复清洗3次后, 再冷冻干燥得到待测样品, 进行X射线衍射分析及扫描电镜观察。

主要观察指标: 多孔胶原/生物活性玻璃/壳聚糖增强型复合骨修复支架的傅里叶变换红外光谱、场发射扫描电子显微镜、X射线衍射仪及动态生物力学试验机检测结果。

2 结果与讨论 Results and discussion

2.1 孔支架的形貌分析 **图1**为胶原/生物活性玻璃、胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架的横截面形貌扫描电镜图片, 以及生物活性玻璃颗粒的分散形貌图。

从图中对比可以发现, 相对胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架, 胶原/生物活性玻璃支架的孔形貌较有序, 也更完整, 孔径更均匀, 但胶原/生物活性玻璃支架中有大量的生物活性玻璃颗粒散落在基体的表面, 团聚现象更为严重, 导致这种现象可能的原因主要有: 在酸性条件下, 壳聚糖分子表面带大量的正电荷, 而生物活性玻璃颗粒表面带负电荷, 壳聚糖作为分散剂不仅可以通过物理作用将生物活性玻璃颗粒隔离开, 同时可通过电荷吸引将生物活性玻璃颗粒吸附在壳聚糖胶体上, 阻碍生物活性玻璃颗粒的沉降, 因而胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架中生物活性玻璃颗粒分散较均匀; 壳聚糖和胶原分子间分子尺度的混合, 使生物活性玻璃颗粒更易均匀的分散于胶原分子形成的胶原纤维中。这与Zhang等^[16]研究的壳聚糖能促进羟基磷灰石颗粒在胶原溶液中的分散结果相一致。

2.2 复合支架材料分子间的相互作用分析 **图2**为支架中不同组分的红外图谱。

由胶原红外图谱中, 胶原蛋白的酰胺A谱带(3 325-3 330 cm⁻¹)主要是由N-H的伸缩振动引起的, 酰胺A谱带对胶原蛋白三螺旋结构很敏感; 酰胺I谱带(1 650 cm⁻¹)通常不受肽链侧基影响, 振动频率取决于肽链构型, 由蛋白多肽骨架的C=O伸缩振动引起的, 为蛋白质的二级结构变化的敏感区域, 且其吸收最强, 常被用于蛋白质的二级结构分析, 同时对三螺旋结构的变化也非常敏感^[21]; 酰胺II谱带(1 554 cm⁻¹)主要反映胶原蛋白的C-N(具有双键性质)伸缩振动和面内N-H弯曲振动, 同时也是α-螺旋、β-折叠、转角和无规卷曲叠加的吸收带。与酰胺I谱带相同, 酰胺II谱带也不易受肽链侧基影响, 但对胶原蛋白的三螺旋结构不敏感^[22]; 酰胺III谱(1 240 cm⁻¹)带主要由同相N-H弯曲振动和C-N伸缩振动共同引起的, 此外还含些许C-O面内弯曲振动和C-C伸缩振动。此谱带的振动组成比较复杂, 侧链

结构对其有不同程度的影响, 但此谱带仍可用于蛋白质二级结构预测^[23]。酰胺I带只含C=O伸展振动, 而在II, III带中, 每一种酰胺带都包含两种振动方式, 而且都含氨基N-H键的面内弯曲振动。与I带峰的强度相比, II、III带峰的强度显著降低, 表明N-H键面内弯曲振动受阻的程度远大于C=O键的伸展振动。从壳聚糖曲线知, 其特征谱带在3 433, 2 917, 2 877, 1 599, 1 422 cm⁻¹分别代表着-OH, -CH₂, -CH, N-H弯曲振动, 伯碳原子醇羟基-OH振动峰。在1 646处为C=O很弱的伸缩振动峰, 表明壳聚糖的脱乙酰化程度很高(≥92%)^[24]。从生物活性玻璃曲线可知, 其特征峰1 071, 799, 470 cm⁻¹分别代表着Si-O-Si非对称伸缩振动峰、Si-O-Si的对称伸缩振动峰、Si-O-Si的弯曲振动峰^[25-26]。

从胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架曲线知, 胶原的酰胺I, II, III带均减弱, 且酰胺III带(1 240 cm⁻¹)明显消失, 而在795 cm⁻¹处出现强的新峰。生物活性玻璃与胶原复合后在795 cm⁻¹出现新的吸收峰, 其为Si-C的伸缩振动峰, 由生物活性玻璃表面的Si-OH基团与胶原中的-C=N-基团发生了化学键合反应^[27], 同时生物活性玻璃中的钙离子与胶原中游离的羧基螯合, 导致胶原上酰胺谱带振动的减弱^[28-29]。据Sionkowska等^[30]研究显示在生物活性玻璃复合材料中, 壳聚糖含量的增加会导致胶原的III带的逐渐减弱, 至胶原组分低于30%时, 酰胺III带被完全包裹, 峰信号被弱化, 特征峰消失, 均说明高分子相之间发生了明显的分子尺度的相互作用, 分子间的相互作用示意图见**图3**。

2.3 支架的力学性能分析 干态下复合支架的抗压强度采用SPSS 17.0作统计学分析($n=5$)。纯胶原支架、胶原/生物活性玻璃支架、胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架的抗压强度分别为0.08, 1.56, 2.34 MPa, 后两者力学性能均有显著性提高。壳聚糖引入材料中后, 一方面使生物活性玻璃颗粒更容易进入胶原纤维的空隙之中, 促进了生物活性玻璃颗粒在基体中的分散, 减少了因为生物活性玻璃颗粒分散不均匀导致的力学性能差的缺点; 另一方面, 壳聚糖引入后, 因为其带大量的自由-OH、-NH₂基团, 有利于分子之间氢键生成, 提高了分子间的相互作用力。

2.4 支架的抗酶解性能分析 见**图4**。

纯胶原支架在4 h内几乎降解完全。胶原/生物活性玻璃支架在酶解液中浸泡1 h后溶液中有样品的碎片出现, 随着时间的延长, 碎片开始增多, 降解逐渐加深, 至24 h后, 样品降解严重, 只剩余小部分, 其原始几何形状基本消失。而胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架直到4 h才开始降解, 到第8-24小时降解基本完全, 失去了支架的几何形状; 在第4, 8小时后, 溶液中有极少碎片, 基本没有明显降解, 到24 h后碎片逐渐明显, 但其降解程度明显相对胶原/生物活性玻璃支架更慢, 其几何外观保持相对更完整, 表现出了良好的抵抗酶解的能力。

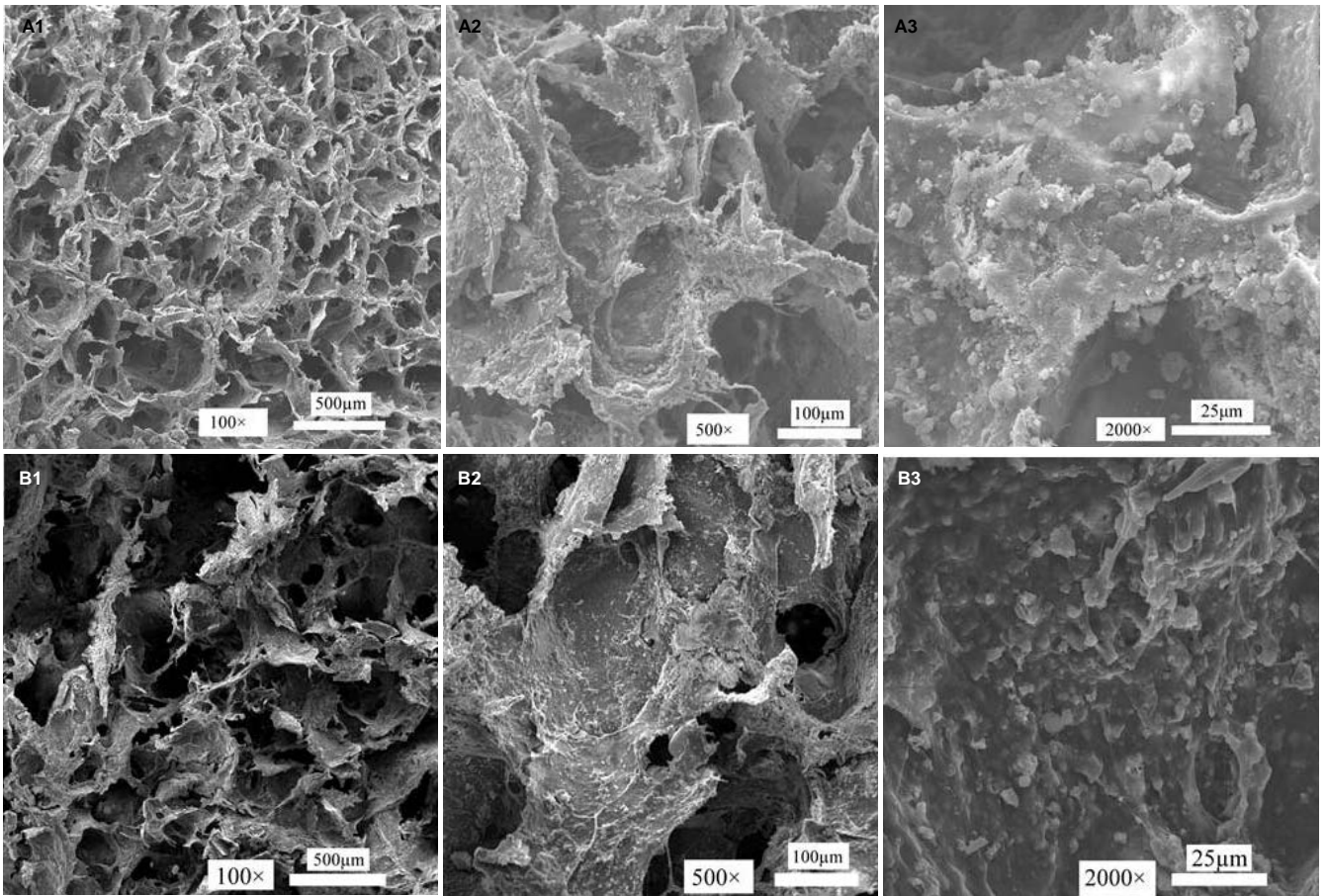


图 1 胶原/生物活性玻璃和胶原/生物活性玻璃/壳聚糖多孔支架的扫描电镜图片

Figure 1 Scanning electron microscope images of collagen/bioactive glass and collagen/bioactive glass/chitosan porous scaffolds

图注: 图中 A 为胶原/生物活性玻璃支架; B 为胶原/生物活性玻璃/壳聚糖多孔支架。相对胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架, 胶原/生物活性玻璃支架的孔形貌较有序, 也更完整, 孔径更均匀, 但胶原/生物活性玻璃支架中有大量的生物活性玻璃颗粒散落在基体的表面, 团聚现象更为严重。

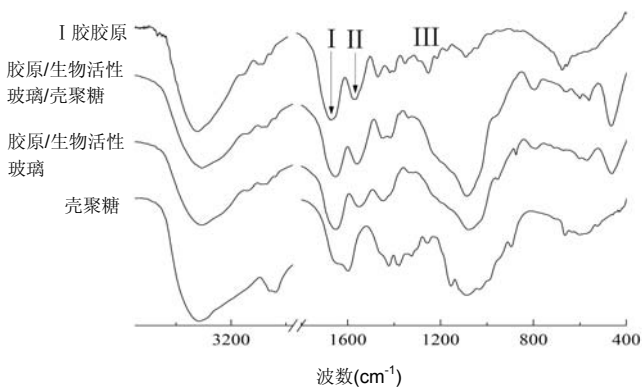


图 2 不同支架的红外光谱图

Figure 2 Fourier transform infrared spectroscopy pattern of different components in porous scaffolds

图注: ①胶原红外图谱中, 酰胺 I 带只含 C=O 伸展振动, 而在 II, III 带中, 每一种酰胺带都包含两种振动方式, 而且都含氨基 N-H 键的面内弯曲振动。与 I 带峰强度相比, II、III 带峰强度显著降低。②壳聚糖曲线知, 其特征谱带在 3 433, 2 917, 2 877, 1 599, 1 422 cm^{-1} 分别代表着 -OH, -CH₂, -CH, N-H 弯曲振动, 伯碳原子醇羟基 -OH 振动峰。在 1 646 处为 C=O 很弱的伸缩振动峰。③从生物活性玻璃曲线可知, 其特征峰 1 071, 799, 470 cm^{-1} 分别代表着 Si-O-Si 非对称伸缩振动峰、Si-O-Si 的对称伸缩振动峰、Si-O-Si 的弯曲振动峰。④从胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架曲线知, 胶原的酰胺 I, II, III 带均减弱, 且酰胺 III 带 (1 240 cm^{-1}) 明显消失, 而在 795 cm^{-1} 处出现强的新峰。

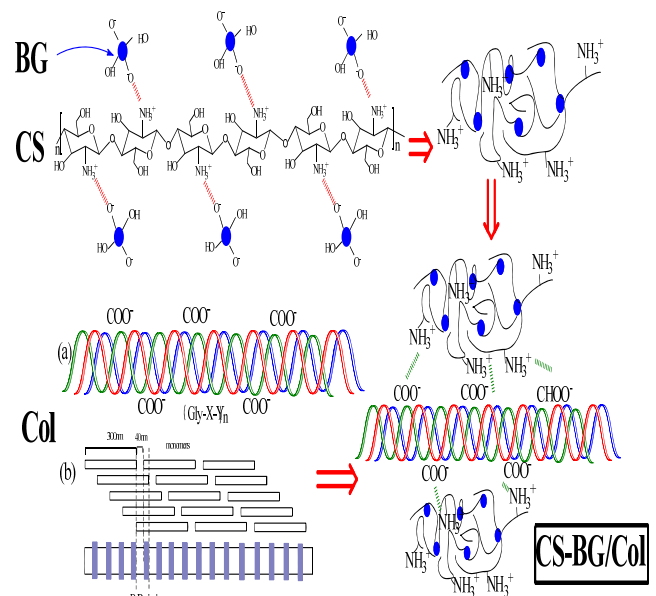


图 3 胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架中各组成之间的相互作用机制图

Figure 3 Schematic diagram of the interactions among components of composite scaffolds

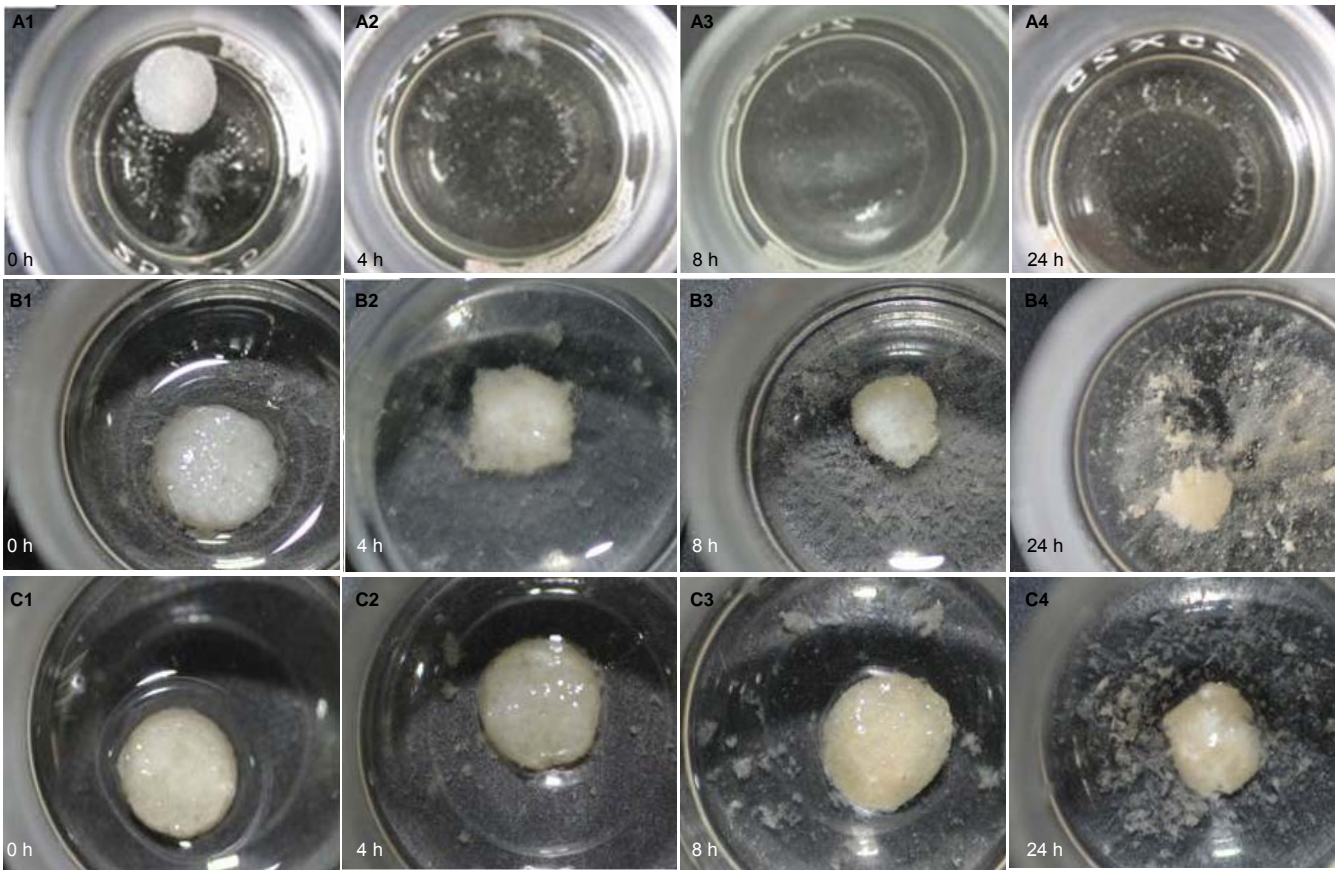


图 4 大体观察不同材料在含有胶原酶 Tris-HCl 缓冲液中的降解

Figure 4 Degradation of different materials in the buffer containing Tris-HCl

图注: 图中 A 为胶原支架, B 为胶原/生物活性玻璃支架, C 为胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架。纯胶原支架在 4 h 内几乎降解完全。胶原/生物活性玻璃支架在酶解液中浸泡 1 h 后溶液中有样品碎片出现, 随着时间的延长, 碎片开始增多, 降解逐渐加深, 至 24 h 后样品降解严重, 只剩余小部分, 其原始几何形状基本消失。胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架直到 4 h 才开始降解, 到第 8-24 小时降解基本完全, 失去了支架的几何形状; 在第 4, 8 小时后溶液中有极少碎片, 基本没有明显降解, 到 24 h 后碎片逐渐明显, 但其降解程度明显相对胶原/生物活性玻璃支架更慢, 几何外观保持相对更完整, 表现出了良好的抵抗酶解能力。

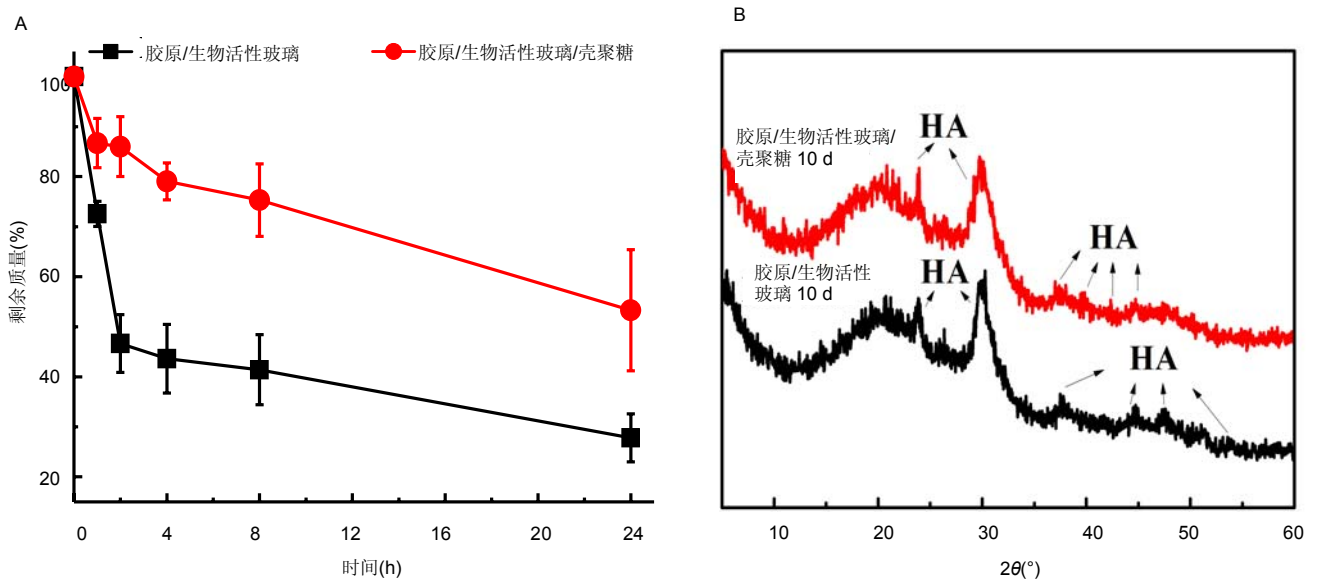


图 5 不同材料在含有胶原酶 Tris-HCl 缓冲液中降解的质量变化, 以及在模拟体液中矿化 10 d 的 X 射线衍射图谱

Figure 5 Degradation curves of composite scaffolds in the buffer containing Tris-HCl as well as X-ray diffraction spectra of composite scaffolds after being soaked in the simulated body fluid for 10 days

图注: 图中 A 为在含有胶原酶的 Tris-HCl 缓冲液中, 两种材料均在 4 h 降解最快, 4 h 后降解相对缓慢; 胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架降解较胶原/生物活性玻璃支架慢; 图中 B 为在模拟体液中矿化 10 d, 两支架有明显的羟基磷灰石特征峰, 而壳聚糖的引入减弱了胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架的特征羟基磷灰石峰, 在一定程度上降低了复合支架的矿化活性。

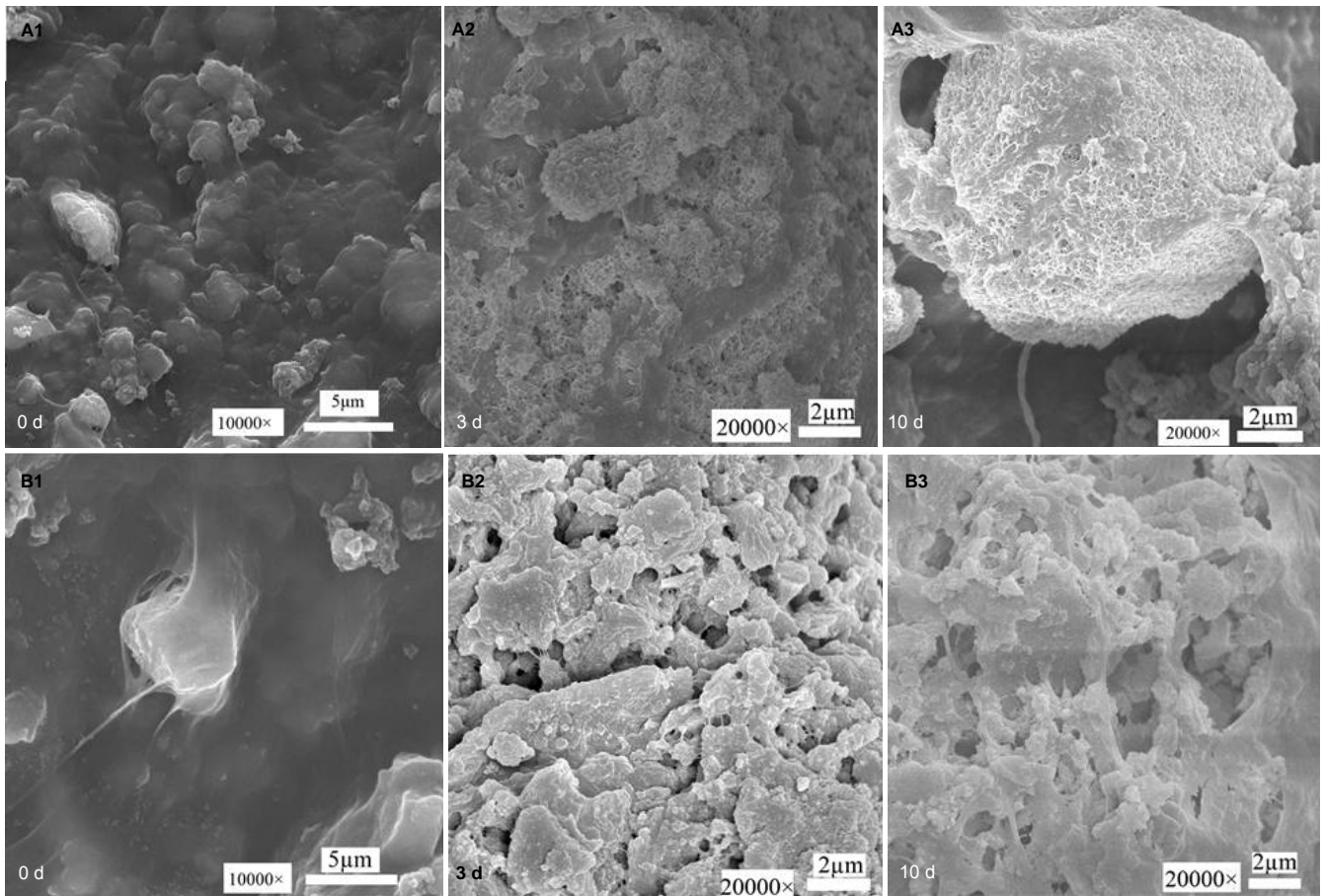


图6 扫描电镜观察不同支架浸泡在模拟体液中 10 d 的体外矿化

Figure 6 *In vitro* mineralization of different scaffolds after being soaked in the simulated body fluid for 10 days (scanning electron microscope)

图注: 图中 A 为胶原/生物活性玻璃支架, B 为胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架, 3 d 时两组支架的生物活性玻璃颗粒表面长出了大量磷灰石物质, 至第 10 天生物活性玻璃颗粒表面已被完全覆盖, 鳞片状物质堆积更为紧密和规则, 表现出良好的矿化活性; 但胶原生物活性玻璃支架表面矿化物质为叶片状, 胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架表面矿化物质为块状。

图5A为两种支架的酶降解质量曲线。从曲线知, 样品在酶溶液中浸泡4 h后降解最快, 胶原/生物活性玻璃支架剩余质量约为48%, 胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架约为88%, 4 h后样品降解相对缓慢, 与溶液中酶的消耗量有关; 到第24小时后, 胶原/生物活性玻璃支架剩余质量约为28%, 而胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架剩余约为55%, 胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架表现出了良好的抵抗酶解性能。这是因为壳聚糖和胶原发生了分子尺度的混合, 提高了胶原分子的结构稳定性, 与Taravel等^[31]研究的关于壳聚糖提高胶原抗胶原酶降解的结果相一致。

2.5 复合材料的体外矿化活性分析 图6为两种支架矿化不同时间的形貌分析, 到第3天, 支架表面的生物活性玻璃颗粒表面长出了大量磷灰石物质; 至第10天, 生物活性玻璃颗粒表面已被完全覆盖, 鳞片状物质堆积更为紧密和规则, 表现出良好的矿化活性, 这与孟永春^[32]的研究结果一致。然而, 胶原/生物活性玻璃支架表面矿化物质为叶片状, 而胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架表面矿化物质为块状, 这可能是壳聚糖作为有机基质与生物活性玻璃, 胶原等之间的静电作用和分子间的相互作用, 而参与调控生物矿化的结果。

图5B为两种支架矿化10 d后的X射线衍射分析曲线。由

图知, 矿化到第10天, 两样品有明显的羟基磷灰石特征峰^[33]: 25.9°, 31.8°, 39.6°, 42.1°, 46.8°。而壳聚糖的引入, 减弱了胶原/生物活性玻璃/壳聚糖支架矿化后的特征羟基磷灰石峰, 在一定程度上降低了复合支架的矿化活性, 然而这与Zhang等^[16]研究壳聚糖促进羟基磷灰石在胶原中分散, 以及提高复合支架细胞学活性的结果不一致。

3 结论 Conclusion

采用壳聚糖作为生物活性玻璃的分散剂, 结合冷冻干燥法制备了多孔胶原/生物活性玻璃/壳聚糖复合支架。结果表明, 壳聚糖的引入有效提高了生物活性玻璃在胶原胶体中的分散, 增加了共混体系的均匀性; 壳聚糖引入的大量氨基和羟基增加了分子间的氢键, 同时促进了分子间相互作用力, 显著提高了材料的抗压强度和模量; 壳聚糖分子对胶原分子的大量包裹, 导致胶原结构的稳定, 显著提高了其抵抗胶原酶的降解能力; 由于生物活性玻璃颗粒分散均匀, 其暴露的概率降低, 使复合支架在模拟体液中的矿化活性略为降低。

作者贡献: 实验设计、实施及评估为全体作者。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 未涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 生物活性玻璃-是由 SiO_2 , Na_2O , CaO 和 P_2O_5 等基本成分组成的硅酸盐玻璃。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Kushitani S, Yasukawa E, Iwaki H, et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clin Orthop Relat Res.* 1997;(334):316-325.
- [2] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 2000;21:2529-2543.
- [3] Li HY, Du RL, Chang J. Fabrication, characterization, and in vitro degradation of composite scaffolds based on PHBV and bioactive glass. *J Biomater Appl.* 2005;20:137-155.
- [4] Shalumon KT, Sowmya S, Sathish D, et al. Effect of Incorporation of Nanoscale Bioactive Glass and Hydroxyapatite in PCL/Chitosan Nanofibers for Bone and Periodontal Tissue Engineering. *J Biomed Nanotechnol.* 2013; 9:430-440.
- [5] Tamjid E, Bagheri R, Vossoughi M, et al. Effect of particle size on the in vitro bioactivity, hydrophilicity and mechanical properties of bioactive glass-reinforced polycaprolactone composites. *Mat Sci Eng C-Mater.* 2011;31:1526-1533.
- [6] Alm JJ, Frantzen JPA, Moritz N, et al. In vivo testing of a biodegradable woven fabric made of bioactive glass fibers and PLGA(80)-A pilot study in the rabbit. *J Biomed Mater Res B.* 2010;93B:573-580.
- [7] Orava E, Korventausta J, Rosenberg M, et al. In vitro degradation of porous poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA)/bioactive glass composite foams with a polar structure. *Polym Degrad Stabil.* 2007;92:14-23.
- [8] Yang CR, Wang YJ, Chen XF. Mineralization regulation and biological influence of bioactive glass-collagen-phosphatidylserine composite scaffolds. *Sci China Life Sci.* 2012;55:236-240.
- [9] Han X, Chen XF, Meng YC, et al. Biocompatibility of the Composite Scaffold of Sol-Gel Bioactive Glass/Collagen. *J Inorg Mater.* 2011;26:869-873.
- [10] Leu A, Leach JK. Proangiogenic potential of a collagen/bioactive glass substrate. *Pharm Res.* 2008;25:1222-1229.
- [11] Luz GM, Mano JF. Chitosan/bioactive glass nanoparticles composites for biomedical applications. *Biomed Mater.* 2012; 7:054104.
- [12] Couto DS, Hong ZK, Mano JF. Development of bioactive and biodegradable chitosan-based injectable systems containing bioactive glass nanoparticles. *Acta Biomater.* 2009;5:115-123.
- [13] Bhowmik R, Katti KS, Katti DR. Mechanics of molecular collagen is influenced by hydroxyapatite in natural bone. *J Mater Sci.* 2007;42:8795-8803.
- [14] Verschuere DS, Gassner R, Mitchell R, et al. The effects of guided tissue regeneration (GTR) on modified Le Fort I osteotomy healing in rabbits. *Int J Oral Max Surg.* 2005;34: 650-655.
- [15] Yunoki S, Ikoma T, Tanaka J. Development of collagen condensation method to improve mechanical strength of tissue engineering scaffolds. *Mater Charact.* 2010;61:907-911.
- [16] Zhang LH, Tang PF, Zhang W, et al. Effect of Chitosan as a Dispersant on Collagen-Hydroxyapatite Composite Matrices. *Tissue Eng Part C-Me.* 2010;16:71-79.
- [17] Richert L, Lavalle P, Payan E, et al. Layer by layer buildup of polysaccharide films: physical chemistry and cellular adhesion aspects. *Langmuir.* 2003;20:448-458.
- [18] Yin YJ, Yao KD, Cheng GX, et al. Properties of polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin. *Polym Int.* 1999;48: 429-432.
- [19] Chen XF, Meng YC, Li YL, et al. Investigation on bio-mineralization of melt and sol-gel derived bioactive glasses. *Appl Surf Sci.* 2008;255:562-564.
- [20] Nam K, Kimura T, Kishida A. Preparation and characterization of cross-linked collagen-phospholipid polymer hybrid gels. *Biomaterials.* 2007;28:1-8.
- [21] Payne KJ, Veis A. Fourier transform ir spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies. *Biopolymers.* 1988; 27: 1749-1760.
- [22] Doyle BB, Bendit EG, Blout ER. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. *Biopolymers.* 1975; 14:937-957.
- [23] Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2007;1767:1073-101.
- [24] Shanmugasundaram N, Ravichandran P, Reddy PN, et al. Collagen-chitosan polymeric scaffolds for the in vitro culture of human epidermoid carcinoma cells. *Biomaterials.* 2001;22:1943-1951.
- [25] Costa HS, Rocha MF, Andrade GI, et al. Sol-gel derived composite from bioactive glass-polyvinyl alcohol. *J Mater Sci.* 2008;43:494-502.
- [26] Mansur HS, Oréface RL, Mansur AAP. Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. *Polymer.* 2004;45:7193-7202.
- [27] Kida T, Nagasaka Y, Sakurai T, et al. Growth and Characterization of SiC Films by Hot-Wire Chemical Vapor Deposition at Low Substrate Temperature Using SiF₄/CH₄/H₂ Mixture. *Jpn J Appl Phys.* 2008;47:566-568.
- [28] Rhee SH, Tanaka J. Hydroxyapatite coating on a collagen membrane by a biomimetic method. *J Am Ceram Soc.* 1998; 81:3029-3031.
- [29] Rhee SH, Lee JD, Tanaka J. Nucleation of hydroxyapatite crystal through chemical interaction with collagen. *J Am Ceram Soc.* 2000;83:2890-2892.
- [30] Sionkowska A, Wisniewski M, Skopinska J, et al. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials.* 2004;25:795-801.
- [31] Taravel MN, Domard A. Collagen and its interactions with chitosan : III. Some biological and mechanical properties. *Biomaterials.* 1996;17:451-455.
- [32] 孟永春. 胶原与生物活性玻璃作用机理及其复合骨修复材料的研究[D]. 广州:华南理工大学博士学位论文, 2010.
- [33] Wang K, Li WW, Gao C. Poly(epsilon-caprolactone)-functionalized carbon nanofibers by surface-initiated ring-opening polymerization. *J Appl Polym Sci.* 2007;105: 629-640.