

文章编号: 1671-0444(2018)06-0881-08

海藻酸盐-壳聚糖/羟基磷灰石 复合纤维敷料的制备及性能

张小林¹, 黄 晨², 靳向煜²

(1. 江南大学 纺织服装学院, 江苏 无锡 214122; 2. 东华大学 纺织学院, 上海 201620)

摘要: 自制微流纺丝设备, 芯层流以海藻酸高分子为主原料, 并分别添加壳聚糖和纳米羟基磷灰石, 皮层流则为氯化钙的乙醇溶液, 采用微流纺制备新型海藻酸盐基复合纤维敷料。由降解性能和力学性能表征结果可知, 芯层流中加入壳聚糖或羟基磷灰石可减小材料降解速率, 增强力学性能, 通过人体皮肤细胞增殖及迁移试验进一步证明所制复合纤维敷料无细胞毒性。海藻酸盐-壳聚糖复合纤维敷料和海藻酸盐-羟基磷灰石复合纤维敷料性能均优于纯海藻酸盐纤维, 可用于创面治疗。

关键词: 海藻酸盐; 壳聚糖; 羟基磷灰石; 纤维敷料

中图分类号: TQ 342.87

文献标志码: A

Fabrication and Performance of Alginate-Chitosan/Hydroxyapatite Composite Fibrous Dressings

ZHANG Xiaolin¹, HUANG Chen², JIN Xiangyu²

(1. College of Textile and Clothing, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. College of Textiles, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract: Alginate-chitosan/hydroxyapatite composite fibrous dressings were fabricated by blending chitosan/nano-hydroxyapatite with alginate via a self-developed microfluidic spinning. The characterization of degradation behavior and mechanical properties demonstrate that the incorporation of chitosan/hydroxyapatite in alginate based fibrous dressings can delay the degradation rate and improve the mechanical behavior. The prompt proliferation of fibroblast and keratinocytes cells indicates that there is no significant cytotoxicity of alginates containing chitosan and hydroxyapatite. Alginate-chitosan composite fibrous dressing and alginate-hydroxyapatite composite fibrous dressing performance are superior to pure alginate fiber, which can be used for wound healing.

Key words: alginate; chitosan; hydroxyapatite; fibrous dressings

海藻酸是从天然海藻中提取的一种线形多糖生
物高分子材料, 由 β -D-甘露糖醛酸(M 单元)和 α -L-

古罗糖醛酸(G 单元)两种组份组成, 以 M-M、G-G、
M-G 等多种形式排列, 是通过 1~4 糖苷键连接而

收稿日期: 2017-07-03

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(CUSF-DH-D-2017009)

作者简介: 张小林(1989—), 女, 江西上饶人, 博士研究生, 研究方向为海藻酸盐纤维医用敷料, E-mail: xiaolinzhang1989@163.com

靳向煜(联系人), 男, 教授, E-mail: jinxy@dhua.edu.cn

成的嵌段聚合物^[1]。海藻酸因具有高生物相容性、无毒性等优良性能,被广泛用于伤口敷料、药物释放及组织工程等领域。海藻酸大分子结构中 G 单元与 Ca^{2+} 交联形成特殊的“egg-box”结构^[2],且相联的 Ca^{2+} 可与 Na^+ 和 K^+ 发生离子交换,形成水溶性的海藻酸盐。海藻酸钙纤维敷料用于创面治疗时,通过离子交换,从不溶性海藻酸钙转变成水溶性海藻酸钠,吸收大量液体呈凝胶状态,为伤口愈合提供相对安全润湿的环境^[3]。尤其治疗洞穿性创面时,成凝胶性能可减少死腔,缓解病人疼痛症状,效果明显^[4]。

国内外已展开对海藻酸盐纤维^[5-7]的研究。文献[8]对海藻酸钙纤维基本性能,如表观形貌,物理参数及热、力学性能等进行了初步研究及表征。文献[1]研究制备高强度海藻酸盐纤维,并得出湿法纺丝的最佳工艺参数,同时表征纤维基本性能。文献[9-10]研究海藻酸盐纤维降解机理及影响降解性能因素,并对材料降解性能、力学性能、药物释放及抗菌性能作详细阐述。文献[11-13]以海藻酸为原料纺制微胶囊,将其作为药物载体,并植入动物体内做进一步病理学分析。文献[14]将不同相对分子质量的海藻酸钠高分子原料混合,控制相对分子质量大小来调节海藻酸盐凝胶的力学性能。目前主要以静电纺、湿法纺丝和冻干法制备海藻酸盐纤维支架等。

本文以海藻酸为主要原料并添加其他物质,通过微流纺纺制新型海藻酸盐复合纤维敷料,并对其降解性能、力学性能及生物毒性作评价,为后期用于伤口创面治疗提供参考。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

海藻酸钠(180947-100G, Sigma);壳聚糖(Hyclone-SH30256, 国药);羟基磷灰石(C10068615, 麦克林);氯化钙(AR500ML, 凌峰试剂);乙醇(AR500ML, 鸿盛);去离子水;胰蛋白酶(0.25%, 加拿大);细胞培养液;磷酸缓冲液 PBS(Hyclone-SH30256, 国药);噻唑蓝(MTT, 美国);二甲基亚砜(DMSO, 美国);人的成纤维皮肤细胞和角质化细胞。

1.2 试验仪器

扫描电子显微镜(S-4800 型, 日本);高强高模纤维强伸度仪(XQ-1C 型, 上海新纤仪器公司);18 kW 转靶 X 射线衍射仪(D/max-2550VB-PC 型, 日本);红外光谱仪(Nicolet 6700 型, 美国);酶标仪

(Synergy H1 型, 美国);倒置显微镜(LEICA DMi1 型, 美国)。

1.3 海藻酸盐基纤维敷料制备方法

将海藻酸钠粉末溶于去离子水中,制备体积分数为 3% 的海藻酸钠溶液 3 份,并标为 A、B、C。往 A 溶液中加入 0.1 mg 壳聚糖粉末, B 溶液中加入 0.1 mg 羟基磷灰石粉末。已配制的海藻酸钠溶液 A、B、C 分别为芯层溶液,皮层溶液均为 5% 氯化钙乙醇溶液,通过自制微流纺设备^[9]纺制 3 种类型海藻酸盐基纤维敷料,如表 1 所示。

表 1 3 种纤维芯-鞘流成分

Table 1 Core-sheath ingredient of three kinds of fiber

纤维类型	SA	SA-HAP	SA-CS
芯流	海藻酸盐	海藻酸盐-羟基磷灰石	海藻酸盐-壳聚糖
鞘流	CaCl_2 -乙醇	CaCl_2 -乙醇	CaCl_2 -乙醇

注:SA 为海藻酸盐纤维;SA-HAP 为海藻酸盐-羟基磷灰石复合纤维;SA-CS 为海藻酸盐-壳聚糖复合纤维

1.4 海藻酸盐基纤维敷料性能测试

1.4.1 表面形态表征

先使用手感目测法对纤维敷料的外观形态进行感官评价,然后采用扫描电子显微镜对纤维表面形态做进一步观察。

1.4.2 溶胀性能

室温下将 3 种纤维敷料分别浸渍在磷酸盐缓冲液中,在固定时间间隔取出样品,用滤纸充分吸除纤维表面多余水分并称量,用溶胀率(式(1))来表示纤维溶胀性能。

$$\text{溶胀率} = [(m_s - m_i)/m_i] \times 100\% \quad (1)$$

式中: m_s 为纤维敷料溶胀后质量; m_i 为纤维敷料未溶胀前质量。

1.4.3 降解性能

室温下将 3 种纤维敷料分别浸渍在磷酸盐缓冲液中,在固定时间间隔取出样品,充分脱水干燥并称量,用质量损失率(式(2))来表示纤维降解性能。

$$\text{质量损失率} = [(m_0 - m_1)/m_0] \times 100\% \quad (2)$$

式中: m_0 为纤维敷料未浸渍前质量; m_1 为纤维敷料降解后质量。

1.4.4 红外光谱及 X-射线衍射分析

采用红外光谱仪对纤维的光能团进行测试分析,采用 X-射线衍射仪测定海藻酸盐纤维的结晶度。

1.4.5 力学性能测试

在标准环境(温度为 $(20\pm 3)^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 $(65\pm 5)\%$)下,使用高强高模纤维强伸度仪对纤维的力学性能进行测试,拉伸隔距为10 mm,预加张力为0.5 cN,拉伸速度为20 mm/min。

1.4.6 生物毒性评价

(1) 细胞增殖试验。3种纤维敷料各取50 mg分别浸渍在50 mL细胞培养液中,放置在恒温箱中孵化5 d,过滤所制质量浓度为1 mg/mL的纤维浸提液。分别将人体皮肤成纤维细胞和角质化细胞按照5 000个/孔的浓度加入到96孔板中,在 37°C 和 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养12 h。每孔加入100 μL 试样液,空白组加入等体积培养基。在固定时间间隔内,每孔加入10 μL MTT培养3.5 h。用移液枪吸去孔内液体,每孔加入100 μL DMSO,于490 nm测定吸光度^[15-16]。细胞相对增殖率(RGR)=样品吸光度/空白组吸光度 $\times 100\%$ 。

(2) 细胞划痕试验。人体皮肤成纤维细胞和角质化细胞按照 1×10^6 个/孔的浓度接种到3 cm培养板,在 37°C 和 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养。待细胞长到90%后,用20 μL 吸液管分别在培养板中划痕,用移液枪吸去培养基,加入3 mL 试样液,空白对照组加入等体积培养基。在固定时间间隔内取出培养板,用倒置显微镜观察细胞迁移情况。

2 结果与分析

2.1 海藻酸盐基纤维敷料的表面形貌特征

采用扫描电子显微镜对3种纤维敷料表面形态观察分析,结果如图1所示。由图1可知,海藻酸盐纤维敷料和海藻酸-壳聚糖复合纤维敷料的表面均比较光滑,海藻酸盐-羟基磷灰石复合纤维表面呈现小圆颗粒。由此表明嵌入的纳米羟基磷灰石颗粒均匀地覆盖在纤维表面,这将对纤维的降解性能和力学性能产生一定影响。

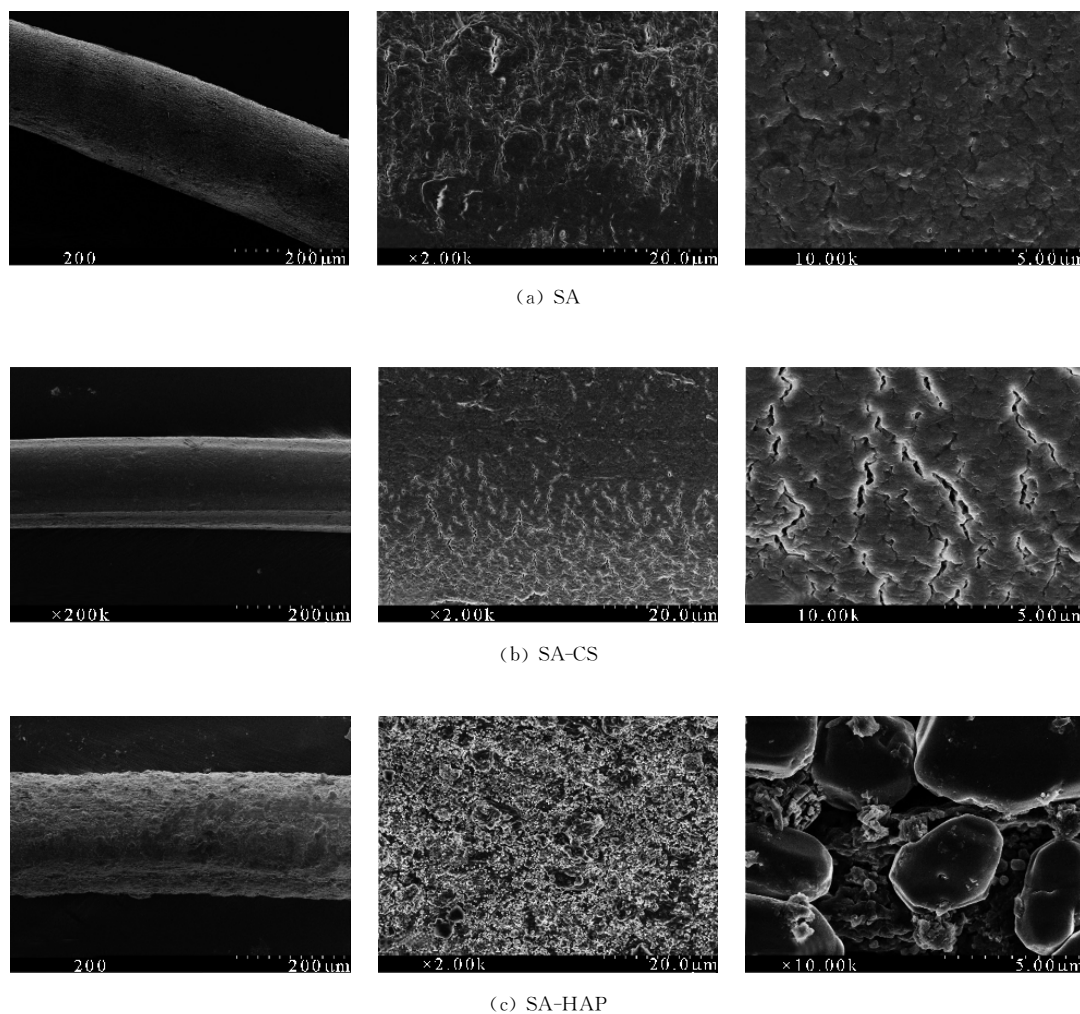
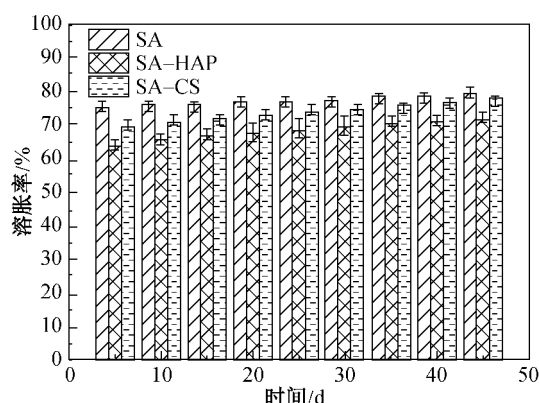


图1 海藻酸盐基纤维敷料的表面形态

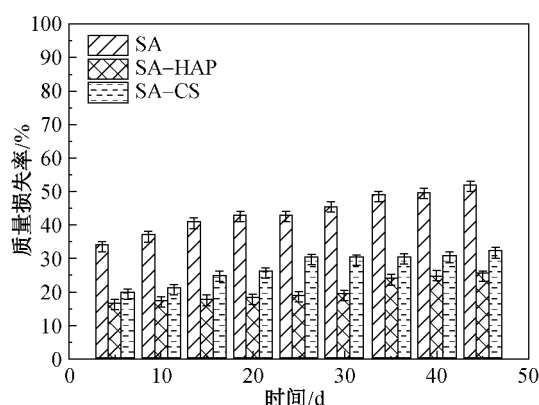
Fig 1 Morphological characterization of alginate-based fibrous dressings

2.2 海藻酸盐基纤维敷料的溶胀性能和降解性能

3种海藻酸盐基纤维敷料的溶胀性能和降解性能如图2所示。



(a) 溶胀性能



(b) 降解性能

图2 3种海藻酸盐基纤维敷料的溶胀性能和降解性能

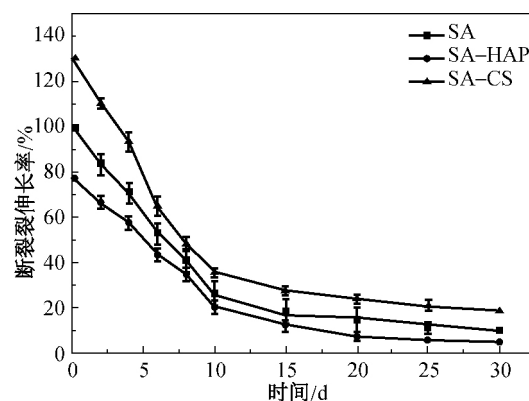
Fig.2 Swelling behavior and degradation of three types of alginate-based fibrous dressings

由图2(a)可知,海藻酸盐纤维呈现优异的溶胀性能,归因于纤维中含有大量的—OH和—COOH。纤维浸渍在磷酸盐缓冲液中,海藻酸盐纤维中 β -D-甘露糖醛酸(M)大分子基团先吸收大量水分,当达到饱和状态时,纤维发生部分降解;此时 α -L-古罗糖醛酸(G)大分子基团“egg-box”结构中—COOH交联的 Ca^{2+} 和溶液中 Na^+/K^+ 发生离子交换,吸收更多的水分,最终导致“egg-box”结构破裂,大量的水分子进入到大分子链中,导致纤维降解^[9]。由图2可知,海藻酸盐-壳聚糖复合纤维及海藻酸盐-羟基磷灰石复合纤维的溶胀和降解性能均差于海藻酸盐纤维。羟基磷灰石嵌入并均匀覆盖在纤维表面,降低水分子浸入纤维内部的趋势,减弱纤维溶胀性能,进而减缓纤维降解过程。壳聚糖是一种线性阳离子聚合物,壳聚糖大分子链中的—NH₂和海藻酸钙中的—COOH存在静电作用,可以减少海藻酸中

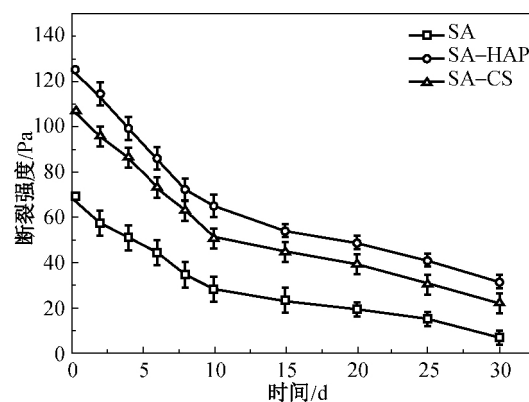
—COOH与 Ca^{2+} 的交联,降低了离子交换程度,导致海藻酸盐-壳聚糖复合纤维呈现较低的溶胀及降解性能^[9]。

2.3 海藻酸盐基纤维敷料的力学性能

3种海藻酸盐基纤维敷料的力学性能随降解时间的变化如图3所示。



(a) 断裂伸长率



(b) 断裂强度

图3 3种海藻酸盐基纤维敷料的力学性能随降解时间变化

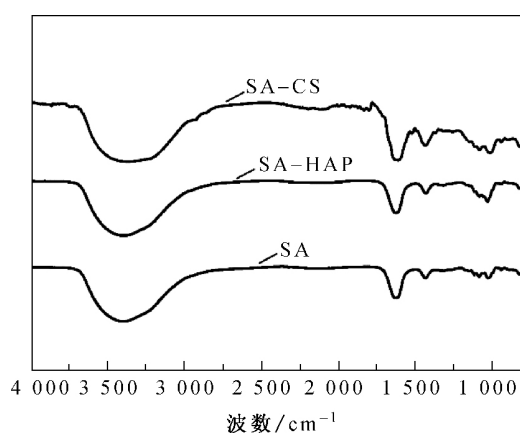
Fig.3 Mechanical performance of three types of alginate-based fibrous dressings changes with degradation time

由图3可知,3种纤维敷料的断裂强度和断裂伸长率均随着降解时间增加而减小。降解速度越快,纤维敷料断裂强度损耗越大,3种纤维敷料断裂强度对应于其降解速度。羟基磷灰石覆盖在纤维敷料表面,使纤维敷料刚度增强,导致海藻酸盐-羟基磷灰石复合纤维敷料呈现最小断裂伸长率;壳聚糖大分子链中—NH₂与海藻酸盐大分子链中的—COOH相交联,减少了—COOH与 Ca^{2+} 交联,增加了纤维敷料柔度,导致海藻酸盐-壳聚糖复合纤维敷料比海藻酸盐纤维敷料呈现更大的断裂伸长率。

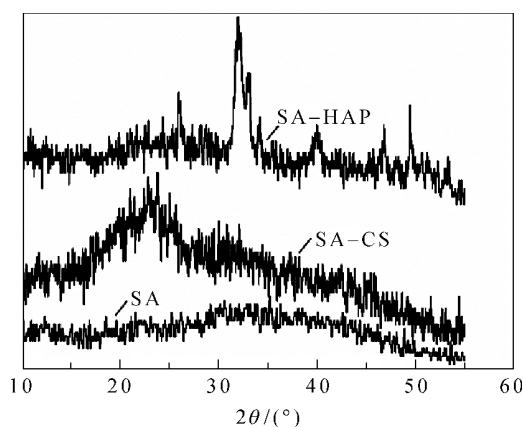
2.4 海藻酸盐基纤维敷料的红外光谱及X-射线衍射分析

3种海藻酸盐基纤维敷料的红外光谱和X-射线

衍射光谱如图4所示。



(a) 红外光谱



(b) X-射线衍射光谱

图4 3种海藻酸盐基纤维敷料的红外光谱和X-射线衍射光谱

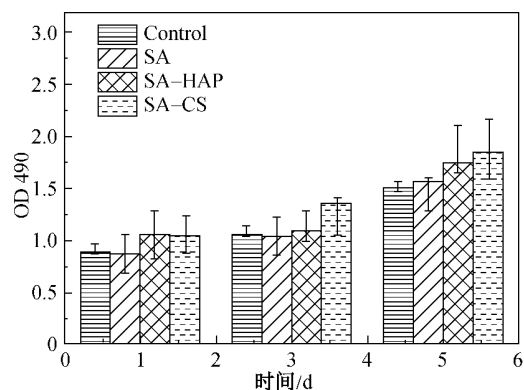
Fig 4 FTIR spectra and XRD patterns of three types of alginate-based fibrous dressings

由图4(a)可知,3种纤维敷料红外吸收带类似,复合纤维没有新官能团产生。 3400 cm^{-1} 处为O—H伸缩振动峰, 1625 和 1430 cm^{-1} 处分别对应于C=O不对称和对称伸缩振动峰。由图4(b)可知,纯海藻酸盐纤维的结晶度比另外两种复合纤维结晶度低,海藻酸盐-羟基磷灰石复合纤维的X衍射峰对应于羟基磷灰石所属标准卡片JCPDS # 09-0432。芯层流中的壳聚糖与海藻酸盐交联,使得复合纤维大分子有序度增加,结晶度随之增加。

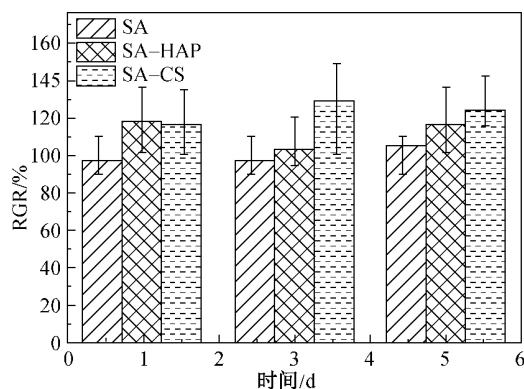
2.5 细胞增殖试验

医用海藻酸盐基纤维敷料的生物毒性评价极其重要,本试验采用人体皮肤成纤维细胞和角质化细胞,通过细胞增殖试验和迁移试验对纤维敷料的细胞毒性进行评价。3种纤维敷料浸提液处理的人体成纤维细胞和角质化细胞增殖试验结果分别如图5和6所示,其中Control为空白对照组。由图5和6

可知,试验组中的OD 490值均大于对照组。由此可知,经3种纤维敷料浸提液处理过的人体皮肤细胞存活率和对照组相当,或略大于对照组。另外,海藻酸盐纤维敷料、海藻酸盐-壳聚糖复合纤维敷料及海藻酸盐-羟基磷灰石复合纤维敷料对应的人体成纤维细胞和角质化细胞的相对增长率均大于75%,根据细胞毒性评级标准^[15-16](如表2所示)可证明材料无生物毒性。



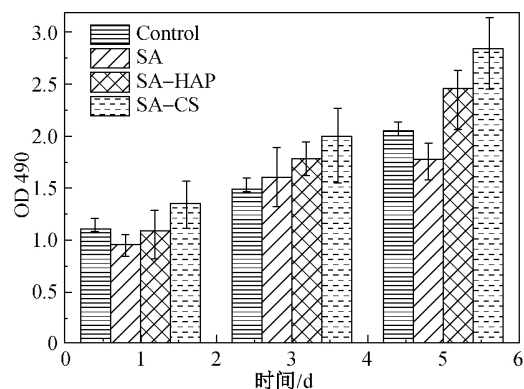
(a) 细胞增殖



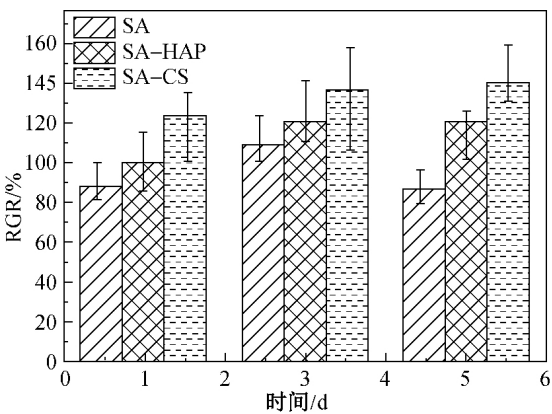
(b) 细胞相对增长率

图5 3种纤维敷料浸提液处理的人体皮肤成纤维细胞增殖试验结果

Fig 5 Results of fibroblasts proliferation treated by three types of fibrous dressings extracted medium



(a) 细胞增殖



(b) 细胞相对增长率

图 6 3 种纤维敷料浸提液处理的人体皮肤角质化细胞增殖试验结果
Fig 6 Results of keratinocytes proliferation treated by three types of fibrous dressings extracted medium

表 2 细胞毒性评级标准

Table 2 Cytotoxicity grading criteria

RGR/%	级别
≥100	0
75~99	1

(续 表)

RGR/%	级别
50~74	2
25~49	3
1~24	4
0	5

2.6 细胞迁移试验

体外模拟人工划痕试验用于表征材料对细胞迁移性能影响,以进一步评价材料对细胞的毒性。3 种纤维敷料对人体皮肤成纤维细胞和角质化细胞迁移性能影响如图 7 和图 8 所示,其中 Control 为空白对照组。由图 7 可知,经 3 种纤维敷料浸提液处理过的划痕,24 h 后已长满 90%,与空白对照组中的细胞迁移速率基本相同。由图 8 可知,经试验组和对照组浸提液处理的划痕,72 h 后长满 90%。人工模拟细胞划痕试验表明,海藻酸盐-壳聚糖复合纤维敷料及海藻酸盐-羟基磷灰石复合纤维敷料对人体皮肤细胞没有明显细胞毒性,相比空白对照组而言,试验组浸提液处理过的细胞迁移速率基本相同。

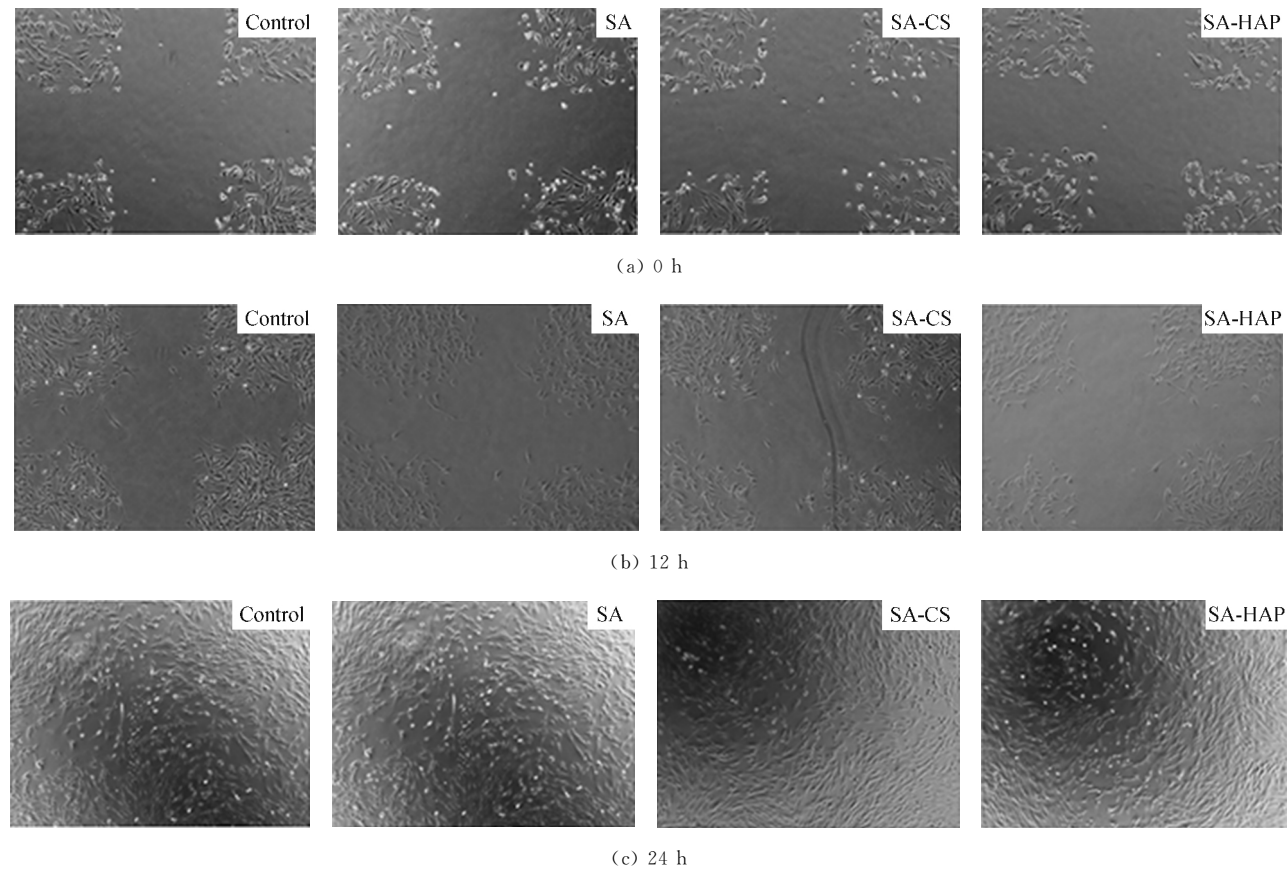


图 7 3 种纤维敷料浸提液处理过的人体皮肤成纤维细胞划痕试验结果
Fig 7 Results of fibroblast migration in the scratched fibroblast free area after treated by three types of fibrous dressings extracted medium

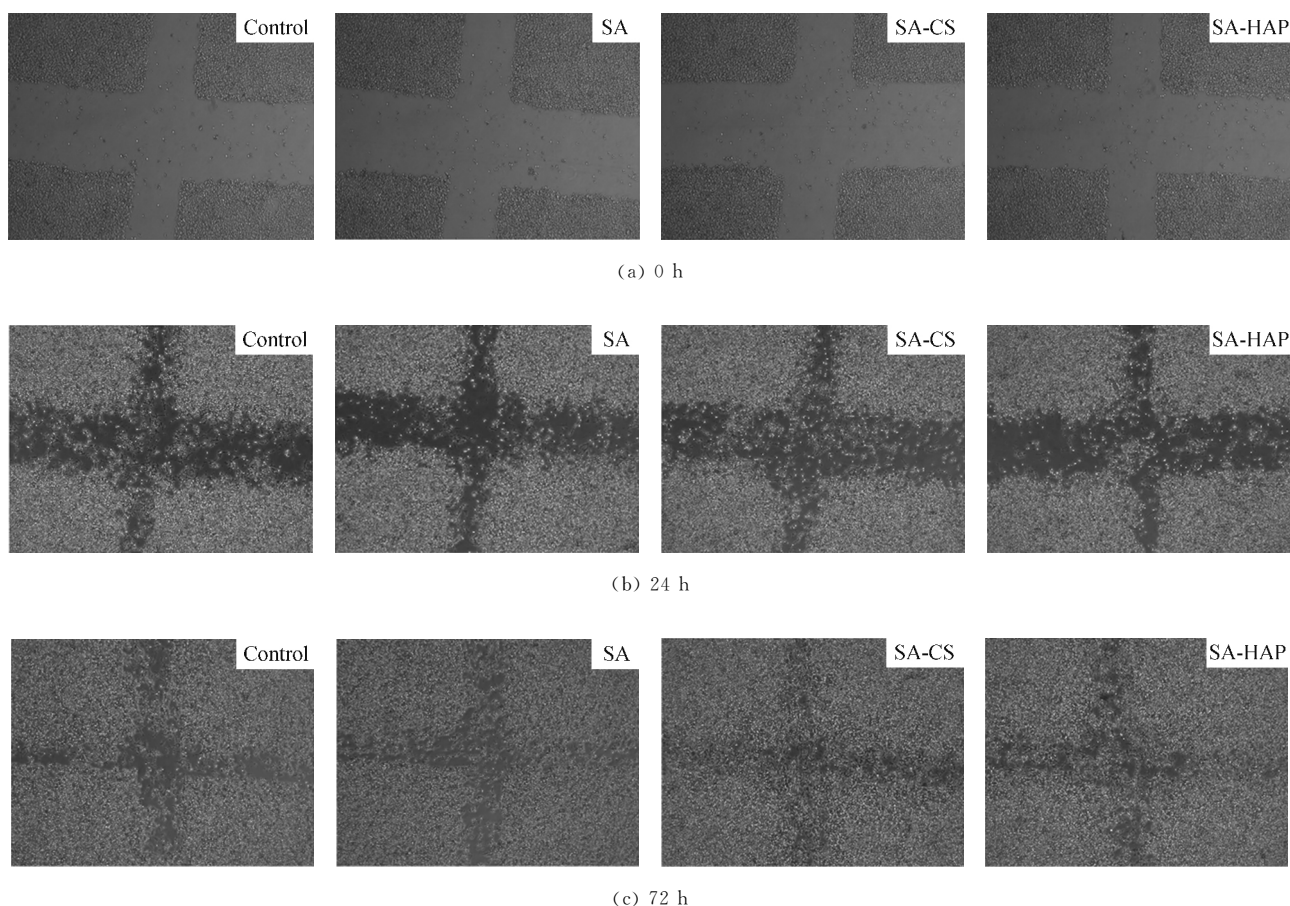


图8 3种纤维敷料浸提液处理过的人体皮肤角质化细胞划痕试验结果

Fig. 8 Results of keratinocyte migration in the scratched keratinocyte free area after treated by three types of fibrous dressings extracted medium

3 结 语

本文采用自制微流纺丝设备制备3种海藻酸盐纤维敷料,并通过溶胀率、质量损失率和力学性能等测试,结果表明,海藻酸盐-壳聚糖复合纤维敷料和海藻酸盐-羟基磷灰石复合纤维敷料比纯海藻酸盐纤维敷料具有更慢降解速率及更强力学性能。由此表明,芯层流中壳聚糖或羟基磷灰石颗粒的加入可延缓纤维敷料降解周期,增强纤维敷料力学性能。另外,人体皮肤成纤维细胞和角质化细胞增殖试验及迁移试验结果表明,3种复合纤维敷料均无细胞毒性,可为后期治疗伤口创面提供理论参考依据。

参 考 文 献

- [1] 张传杰,朱平,王怀芳. 高强度海藻酸盐纤维的制备及其结构与性能研究[J]. 天津工业大学学报, 2008, 27(5): 23-27.
- [2] 秦益民. 海藻酸盐纤维的开发和应用[J]. 成都纺织高等专科学校学报, 2016, 33(1): 19-23.
- [3] 秦益民,朱长俊,冯德明,等. 海藻酸钙医用敷料与普通棉纱布的性能比较[J]. 纺织学报, 2007, 28(3): 45-48.
- [4] 李佳媚,宗杰,李娜,等. 海藻酸盐敷料止血作用及生物相容性研

究[C]//全国海洋与陆地多糖多肽及天然创新药物研发学术会议论文集. 中国黑龙江漠河, 2015: 133-136.

- [5] SIMÓ G, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ E, VILA-CRESPO J, et al. Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 170: 1-14.
- [6] AGÜERO L, ZALDIVARSILVA D, PEÑA L, et al. Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 168: 32-43.
- [7] MAO A S, SHIN J W, UTECH S, et al. Deterministic encapsulation of single cells in thin tunable microgels for niche modelling and therapeutic delivery [J]. Nature Materials, 2016, 16: 236-243.
- [8] 高颖俊,靳向煜. 海藻酸钙纤维基本性能的研究与表征[J]. 东华大学学报(自然科学版), 2014, 40(6): 734-738.
- [9] ZHANG X, HUANG C, JIN X. Influence of K^+ and Na^+ ions on the degradation of wet-spun alginate fibers for tissue engineering[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2017, 134(2): 44396.
- [10] ZHANG X, HUANG C, ZHAO Y, et al. Ampicillin-incorporated alginate-chitosan fibers from microfluidic spinning and for vitro release. [J]. Journal of Biomaterials Science Polymer Edition, 2017, 28(13): 1408-1425.

- [11] AHN S Y, MUN C H, LEE S H. Microfluidic spinning of fibrous alginate carrier having highly enhanced drug loading capability and delayed release profile[J]. RSC Advances, 2015, 5(20):15172-15181.
- [12] LEE K H, SHIN S J, PARK Y, et al. Synthesis of cell-laden alginate hollow fibers using microfluidic chips and microvascularized tissue-engineering applications[J]. Small, 2009, 5(11):1264-8.
- [13] SHI X, OSTROVIDOV S, ZHAO Y, et al. Microfluidic spinning of cell - responsive grooved microfibers [J]. Advanced Functional Materials, 2015, 25(15):2250-2259.
- [14] BOONTHEEKUL T, KONG H J, MOONEY D J. Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution[J]. Biomaterials, 2005, 26(15): 2455-2465.
- [15] SUN K H, LIU Z, LIU C, et al. Evaluation of in vitro and in vivo biocompatibility of a myo-inositol hexakisphosphate gelled polyaniline hydrogel in a rat model [J]. Scientific Reports, 2016, 6:23931.
- [16] CHEN S, GE L, MUELLER A, et al. Twisting electrospun nanofiber fine strips into functional sutures for sustained co-delivery of gentamicin and silver [J]. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2017, 13 (4): 1435-1445.

(责任编辑:徐惠华)

(上接第 880 页)

- [7] YOU Z W, BI X P, WANG Y D. Fine control of polyester properties via epoxide rop using monomers carrying diverse functional groups [J]. Macromolecular Bioscience, 2012, 12 (6): 822-829.
- [8] YOU Z, WANG Y. A versatile synthetic platform for a wide range of functionalized biomaterials[J]. Advanced Functional Materials, 2012, 22(13): 2812-2820.
- [9] YOU Z, BI X, FAN X, et al. A functional polymer designed for bone tissue engineering[J]. Acta Biomaterialia, 2012, 8(2): 502-510.
- [10] 谢阳芬,王少飞,孙利杰,等. 富马酸-双环氧丁烷-对苯二甲西酸共聚酯的制备及表征[J]. 中国科技论文, 2017, 12(12): 1386-1389.
- [11] 张宝元,赵梨,张娟,等. 聚对苯二甲酸乙二醇酯表面接枝改性及其血液相容性的研究进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(25): 4658-4660.
- [12] 徐莹,李景军,何国庆. 赤藓糖醇研究进展及在食品中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2005 (3): 92-95.
- [13] 李学坤,张昆,高振,等. 富马酸的合成及应用[J]. 现代化工, 2005, 25(S1): 81-83.
- [14] POMERANTSEVA I, KREBS N, HART A, et al. Degradation behavior of poly(glycerol sebacate)[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2009, 91 (4): 1038-1047.
- [15] CHEN L, WANG Y Z. Aryl polyphosphonates: Useful halogen-free flame retardants for polymers [J]. Materials, 2010, 3(10): 4746-4760.
- [16] MA Z, MAO Z, GAO C. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2007, 60(2): 137-157.
- [17] GUELCHER S A, SRINIVASAN A, DUMAS J E, et al. Synthesis, mechanical properties, biocompatibility, and biodegradation of polyurethane networks from lysine polyisocyanates[J]. Biomaterials, 2008, 29(12): 1762-1775.
- [18] MULLER R J, KLEEGERG I, DECKWER W D. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents [J]. Journal of Biotechnology, 2001, 86(2): 87-95.

(责任编辑:郭小敏)