

网络出版时间:2022-7-28 15:03 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220727.1754.001.html

◇基础医学研究◇

壳聚糖-细菌纤维素复合膜的制备及其生物相容性的研究

肖剑虹¹,赵正宜¹,邹多宏^{1,2}

摘要 目的 通过制备壳聚糖(CS)-细菌纤维素(BC)复合膜,并测试该复合膜在干态和湿态下的拉伸强度及其生物相容性,探究CS-BC复合膜作为引导骨再生膜的可行性。方法 将CS和BC按不同的质量比混合,超声破碎使两者分散均匀,通过自蒸发分别制备出纯CS膜和CS:BC分别为10:1、10:3、10:5、10:7和10:9的复合膜,将制备的各组膜通过氢氧化钠乙醇溶液浸泡除酸处理后备用。采用力学万能实验机来测试各组膜分别在干态和湿态下的拉伸强度($n=6$)。通过扫描电镜和透射电镜观察拉伸强度最大复合膜的微观结构,而其成分构成则通过傅立叶变换红外光谱仪和X-射线衍射进行表征。将大鼠骨髓干细胞分别与空白对照组(不加膜)、纯CS膜组和拉伸强度最大的复合膜组($n=5$)共培养1、4、7 d后通过CCK-8法检测各组细胞存活率。结果 在CS基质中加入BC后,扫描电镜观察复合膜的横截面呈现出有序的层状结构,傅立叶变换红外光谱分析及X-射线衍射分析显示复合膜中存在BC。CS-BC复合膜的拉伸强度随BC比例增加呈现出先增加后降低的趋势,在CS和BC的质量分数比为10:7时该复合膜在干、湿态的拉伸强度均达到最大,分别为(204.7 ± 63.0)、(44.4 ± 6.4) MPa。与大鼠骨髓干细胞共培养1、4、7 d后,纯CS膜组、CS-BC复合膜组($n=5$)大鼠骨髓干细胞的数量与空白组对比差异均无统计学意义。结论 CS:BC为10:7时,复合膜在干态和湿态的拉伸强度最大,且具有良好的细胞相容性。关键词 壳聚糖;细菌纤维素;复合膜;拉伸强度;生物相容性材料

中图分类号 R 782

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)08-1177-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.001

引导骨再生(guided bone regeneration, GBR)技术是临床上治疗牙槽骨缺损常用且有效的方法之一。其中,GBR屏障膜在阻止成纤维细胞和上皮细

胞等非成骨细胞长入骨缺损区和维持骨修复所需要的空间等方面起到重要作用。目前临床上应用的可吸收性屏障膜机械强度不足,在骨缺损修复的过程中容易发生穿孔和破裂,不利于屏障功能的实现和骨修复空间的维持,从而导致骨修复效果不佳^[1]。因此,研发出一种具有足够力学性能的屏障膜,尤其是在体内湿态环境下还能维持足够的力学强度,以维持骨再生所需要的空间是目前发展GBR技术的当务之急。该研究在壳聚糖(chitosan, CS)基质中引入细菌纤维素(bacterial cellulose, BC),并通过自蒸发方法制备出CS-BC复合膜,通过测试该复合膜在干态和湿态下的拉伸强度及其对大鼠骨髓干细胞增殖的影响,探究其作为GBR膜的可行性。

1 材料与方法

1.1 合成材料 中低黏度CS(100~200 Mpa·s,脱乙酰度 $\geq 95\%$,阿拉丁生化科技股份有限公司,上海)。细菌纤维素(生化级,阿拉丁生化科技股份有限公司,上海)

1.2 主要试剂与仪器 胎牛血清(美国Gibco公司);达尔伯克改良伊格尔培养基(美国Gibco公司);胰酶消化液(美国Hyclone公司);CCK-8试剂盒(日本株式会社同仁化学研究所);冰乙酸和氢氧化钠(北京国药集团化学试剂有限公司);二氧化碳孵育箱(美国Thermo公司);高温高压灭菌锅(HVE-50,日本Hirayama公司);酶标仪(美国Bio-tek公司);超声破碎机(JYD1800L,上海比朗仪器有限公司);力学万能测试机(5565A,美国英斯特朗公司);扫描电子显微镜(Supra 40,德国蔡司公司);透射电子显微镜(HT7700,日本日立公司);傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet 8700,美国热电尼高力仪器公司);X射线衍射仪(X'Pert3 Powder,荷兰帕纳科公司)。

1.3 原料合成 称取1 g CS粉末溶于98 ml去离子水中,边搅拌边往溶液中逐滴加入1 ml冰乙酸,搅拌至粉末完全溶解,配制出质量浓度为1%的CS溶液,离心除气泡备用。

2022-04-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31870969)

作者单位:¹ 安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究重点实验室,合肥 230032

² 上海交通大学医学院附属第九人民医院·口腔医学院口腔外科,上海市口腔医学重点实验室,上海 200001

作者简介:肖剑虹,女,硕士研究生;

邹多宏,男,教授,责任作者,E-mail: zhdhyy@ahmu.edu.cn

1.4 复合膜的制备 首先制备 CS : BC 质量分数为 10 : 1 的复合膜,取 100 g 1% CS 溶液和 20 g 0.5% BC 溶液,冰水浴中超声破碎至两者混合均匀,在真空干燥箱中除尽气泡后倒入培养皿中,放置于 40 ℃ 加热台上待水分完全蒸发后成膜。将自蒸发所制备的膜浸泡于 0.3 mol/L 的氢氧化钠乙醇溶液中 24 h,待酸除尽后用去离子水冲洗干净后一半干燥,另一半在去离子水中浸泡保持湿润状态备用。同理分别制备 CS : BC 质量分数为 10 : 3、10 : 5、10 : 7 和 10 : 9 的复合膜以及纯 CS 膜(图 1)。

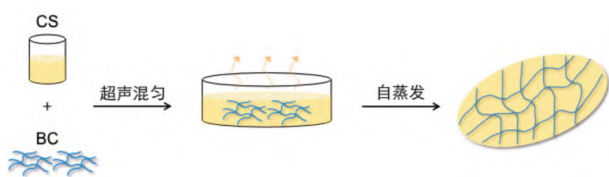


图 1 复合膜的制备过程示意图

1.5 力学性能测试 将所制备的各组薄膜在室温下裁剪为长 50 mm、宽 3 mm 的样品(每组薄膜样品数量为 6)。用螺旋测微器测量每个样品的厚度后,通过力学测试机在拉伸速度为 0.01 mm/s 的情况下拉伸样品至样品断裂,并记录其拉伸强度。每组膜干燥和湿润的样品均重复测试 6 次。绘制出各组膜分别在干态和湿态下的拉伸强度值表和应力应变曲线图,取拉伸强度最大的复合膜组及纯 CS 膜组进行后续实验。

1.6 样品表征 取纯 CS 组和拉伸强度最大的复合膜组,用扫描电子显微镜观察其横截面的微观结构。将成品 BC 溶液稀释后滴于透射铜网的表面,待其完全干燥后经透射电镜观察 BC 的形貌。将 BC 溶液经自蒸发沉积后成膜,取纯 BC 膜、纯 CS 膜和拉伸强度最大的复合膜,采用傅立叶变换红外光谱仪和 X-射线衍射仪分析其各组成成分。

1.7 大鼠骨髓干细胞 (rat bone marrow stem cells, RBMSCs) 的分离及培养 取 3~4 周龄体质量为 (50 ± 5) g 的雄性 SD 大鼠(安徽医科大学实验动物中心)的两边股骨,用眼科剪将股骨两端剪去成两端相通,用 1 ml 的注射器吸取含 20% 胎牛血清的 DMEM 反复冲洗骨髓腔、离心、弃上清液后将沉淀的组织细胞重悬于大皿中培养,大皿中总体积为 10 ml,标记为 P0。5 d 后首次换液,之后每 3 d 换 1 次液,待 P0 细胞融合至 70%~80% 后用胰蛋白酶消化传代。本实验所用的大鼠骨髓干细胞均为 P3~P5 代。

1.8 细胞相容性实验 取纯 CS 组及干湿态力学性能最强组复合膜,用打孔器将薄膜制备为直径为 6 mm 的圆,每组至少 15 个样,经过高温高压灭菌后备用。取 P3~P5 代 RBMSCs,分为空白对照组、纯 CS 膜组和复合膜组共 3 组,每组 5 个复孔,共 3 个时间段以 5×10^3 /孔的细胞密度接种于 3 个 96 孔板中。在 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h,待孔板中的细胞贴壁后,将灭菌好的薄膜材料分别加入 3 个 96 孔板中,空白对照组中不加任何薄膜。继续将 96 孔板置于培养箱中分别培养 1、4、7 d。将 CCK-8 试剂与纯 DMEM 以 1 : 10 的比例混合后,每孔加 110 μl,培养箱中继续培养 2 h 后,用酶标仪读取每孔在波长为 450 nm 处的吸光度(optical density, OD)值。

1.9 统计学处理 使用 SPSS Statistics (version 18.0, IBM Corporation) 进行统计学分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,采用单因素方差分析(ANOVA)对各组所得的结果进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纯 CS 膜及各组复合膜在干态和湿态下拉伸强度的比较 各组薄膜在干态和湿态下的拉伸强度值和应力应变曲线图如图 2。随着 BC 含量增加,CS-BC 复合膜在干湿态下的拉伸强度随之增加,在 CS : BC 为 10 : 7 时,拉伸强度达到最大,干、湿态的拉伸强度分别为 (204.7 ± 63.0) 、 (44.4 ± 6.4) MPa,远远大于临床上最常用的 Bio-Gide 膜在干、湿状态下的力学性能约为 3.7、1.16 MPa,之后随着 BC 含量增加,拉伸强度开始下降。

2.2 样品表征 纯 CS 膜和 CS : BC 质量分数为 10 : 7 的复合膜横截面的扫描图如图 3 所示。纯 CS 膜为均一的有机质结构,复合膜中可见 BC 的纤维撕扯样结构。透射电镜示 BC 的纳米纤维样结构(图 4)。傅立叶变换红外光谱图和 X-射线衍射图中示复合膜中存在 CS 和 BC(图 5)。

2.3 细胞相容性实验 选取纯 CS 膜和 CS : BC 质量分数为 10 : 7 时的复合膜进行细胞相容性实验。图 6 结果显示,纯 CS 组和复合膜组与 RBMSCs 共培养 1 d ($F = 3.590, P = 0.060$)、4 d ($F = 0.293, P = 0.751$) 和 7 d ($F = 1.737, P = 0.217$) 后,在同一个时间段内,各组 OD 值差异无统计学意义。基于此结果,本实验所制备的复合膜具有优良的细胞相容性。

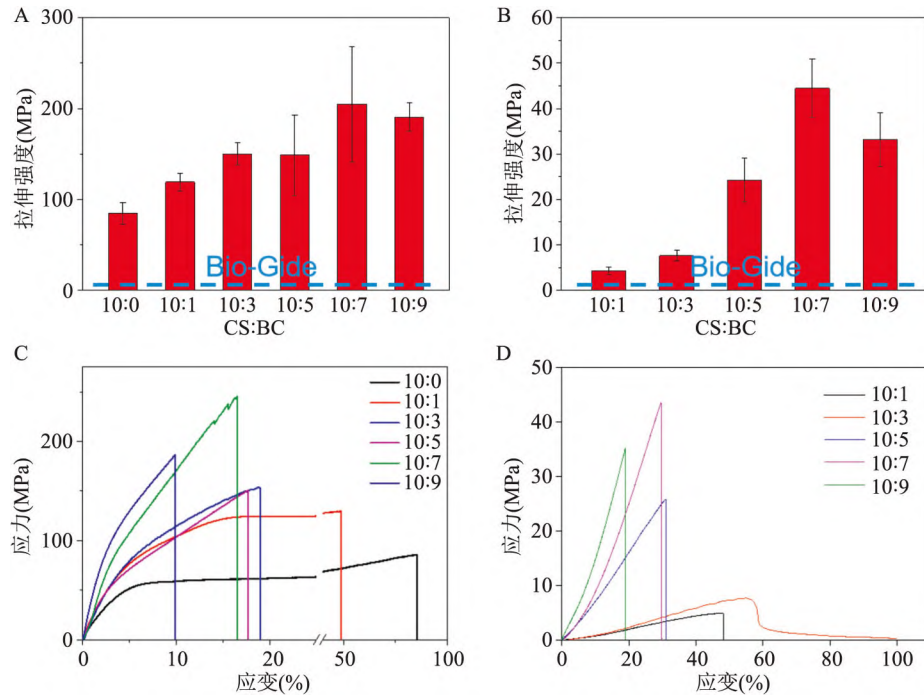


图2 纯CS膜、各组复合膜及Bio-Gide膜在干态和湿态下拉伸强度的比较

A、C: 纯CS膜及各组复合膜在干态下的拉伸强度值和应力应变曲线图; B、D: 纯CS膜及各组复合膜在湿态下的拉伸强度值和应力应变曲线图

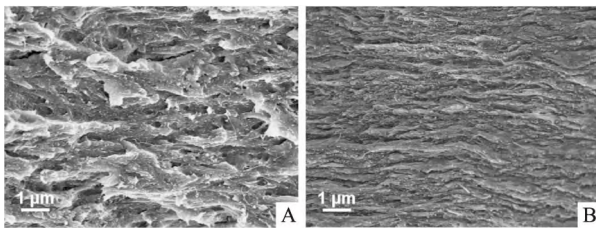


图3 横截面扫描电镜微观结构图

A: 纯CS膜组横截面 ×20 000; B: CS:BC 为10:7复合膜组横截面 ×10 000

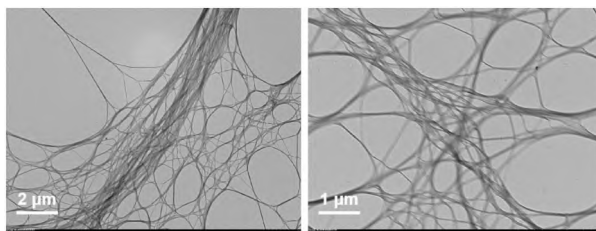


图4 BC在不同倍数下的透射电镜图

A: ×2 500; B: ×5 000

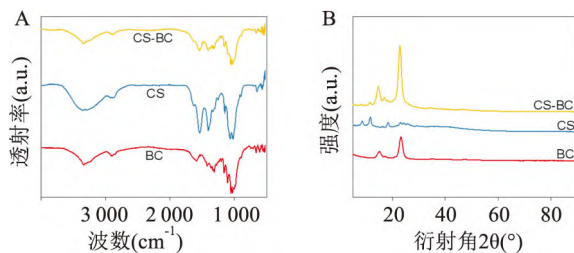


图5 CS-BC复合膜的傅立叶变换红外光谱图

(A)和X-射线衍射图(B)

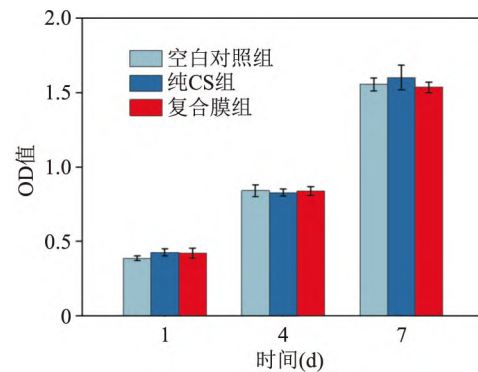


图6 各组膜材料与RBMSCs共培养1、4和7 d后细胞计数的比较

3 讨论

临床上,GBR技术被广泛应用于因炎症、创伤、肿瘤摘除或者先天性疾病而引起的牙槽骨缺损的治疗^[2]。该技术将一层屏障膜置于骨缺损和软组织之间来阻挡周围迁移过快的成纤维细胞和上皮细胞等软组织细胞长入骨缺损从而确保骨修复正常进行^[3-4]。

目前临床上应用的GBR膜根据其降解性与否划分为不可吸收性膜和可吸收性膜。不可吸收性膜具有良好的生物相容性和足够的机械强度以维持骨缺损修复的空间,但是需要二次手术取出极大地限制了其临床应用^[5]。可吸收性膜因具有良好的生

物相容性、可降解性而广泛应用于临床。但是可吸收性膜力学性能不足可能会导致骨缺损预后不佳^[6]。因此,理想的 GBR 膜除了应具有良好的生物相容性,还应具备足够的力学强度,以维持骨缺损修复的空间和防止膜的穿孔破裂。考虑到 GBR 膜的实际应用环境是在体内湿态环境下,所以 GBR 膜在湿润状态下的力学性能更是至关重要。

所以,本研究拟制备出一种具有良好的生物相容性,在干态和湿态下具有优异力学性能的新型 GBR 膜。CS 因具备良好的生物相容性、可降解性和抑菌性而被广泛的应用于组织工程^[7]。但是纯 CS 力学强度不够,常通过应用纳米复合材料、与聚合物混合以及通过化学交联等方法来提高 CS 的力学性能,但是这些提高 CS 机械强度的方法会影响到其生物活性,所以,如何做到在不影响 CS 生物活性的前提下提高其力学强度是当前研究的一个研究热点^[8-9]。

BC 是一种具有三维多孔网络结构的纳米纤维,因具有显著的物理性能(拉伸强度大)和优异的生物力学性能(生物相容性和低毒性)作为一种生物医学材料而备受关注^[10-11]。

因此,本研究以 CS 为主体,在 CS 体系中引入 BC 来提高复合膜的力学性能。通过超声破碎的方法将不同比例的 CS 和 BC 混合均匀后通过蒸发自沉积的方式制备出复合膜,将制备出来的复合膜使用氢氧化钠乙醇溶液浸泡除酸处理后备用。对所制备的各组复合膜在干态和湿态下进行拉伸强度的测试,可得在 CS:BC 为 10:7 时,复合膜的拉伸强度达到最大,分别是 (204.7 ± 63.0) MPa (干态)和 (44.4 ± 6.4) MPa (湿态)。Bio-Gide 膜作为临床上最常用的 GBR 膜之一,其在干湿态下的力学强度分别约为 3.7 MPa 和 1.16 MPa^[1],远远低于 CS-BC 复合膜的力学强度。BC 对 CS 力学性能的增强作用可能取决于以下两个方面:① BC 本身所具有的显著的拉伸强度^[12];② BC 具有高比表面积并且在 CS 基质中分散良好,有利于 BC 和 CS 间氢键形成^[13-14]。取力学强度最大的复合膜组进行后续生物相容性的实验,实验组和空白对照组相比结果差异无统计学意义,说明复合膜具备良好的生物相容性。

综上所述,本研究通过构建 CS-BC 二元体系的复合膜,探究复合膜的微观结构,复合膜在干态和湿

态下的力学性能以及复合膜的细胞相容性。实验结果显示,所制备的新型复合膜在干态和湿态下均具有较好的拉伸强度且具有优异的生物相容性,有望作为新型的 GBR 膜而应用于临床。

参考文献

- [1] Zhang K R, Gao H L, Pan X F, et al. Multifunctional bilayer nanocomposite guided bone regeneration membrane[J]. *Matter*, 2019, 1(3): 770-81.
- [2] Lian M, Han Y, Sun B, et al. A multifunctional electrowritten bilayered scaffold for guided bone regeneration[J]. *Acta Biomater*, 2020, 118: 83-99.
- [3] Lu J Y, Cheng C, He Y S, et al. Multilayered graphene hydrogel membranes for guided bone regeneration[J]. *Adv Mater*, 2016, 28(21): 4025-31.
- [4] Zhang X, Zhang C, Lin Y, et al. Nanocomposite membranes enhance bone regeneration through restoring physiological electric microenvironment[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(8): 7279-86.
- [5] Turri A, Elgali I, Vazirisani F, et al. Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment[J]. *Biomaterials*, 2016, 84: 167-83.
- [6] 张开润, 许 瑞, 邹多宏. 氧化石墨烯-壳聚糖复合膜的抗拉强度及其对人牙龈成纤维细胞增殖的影响[J]. *中华口腔医学杂志*, 2019(5): 322-7.
- [7] Di Martino A, Sittinger M, Risbud M V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(30): 5983-90.
- [8] Liu H, Qu X, Kim E, et al. Bio-inspired redox-cycling antimicrobial film for sustained generation of reactive oxygen species[J]. *Biomaterials*, 2018, 162: 109-22.
- [9] Zhang J, Neoh K G, Hu X, et al. Mechanistic insights into response of *Staphylococcus aureus* to bioelectric effect on polypyrrole/chitosan film[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(27): 7690-8.
- [10] Sionkowska A, Mężykowska O, Piątek J. Bacterial nanocellulose in biomedical applications: a review[J]. *Poly Int*, 2019, 68(11): 1841-7.
- [11] 周 璞, 程东东, 邹多宏. 抗菌高强复合膜的制备及其表征[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(11): 1692-6.
- [12] Lin N, Dufresne A. Nanocellulose in biomedicine: current status and future prospect[J]. *Europ Poly J*, 2014, 59: 302-25.
- [13] Fischer M J, Mayr M, Spirk S, et al. Pulp fines-characterization, sheet formation, and comparison to microfibrillated cellulose[J]. *Polymers (Basel)*, 2017, 9(8):366.
- [14] Jabłońska J, Onyszek M, Konopacki M, et al. Fabrication of paper sheets coatings based on chitosan/bacterial nanocellulose/ZnO with enhanced antibacterial and mechanical properties[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14):7383.

Preparation and biocompatibility of a chitosan-bacterial cellulose composite membrane

Xiao Jianhong¹, Zhao Zhengyi¹, Zou Duohong^{1,2}

(¹*School of Stomatology, Anhui Medical University, Stomatological Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Key Lab of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032;*

²*Dept of Oral Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University, Key Lab of Oral Medicine of Shanghai, Shanghai 200001)*

Abstract Objective To explore the feasibility of CS-BC composite membrane as guided bone regeneration (GBR) membrane by preparing chitosan (CS)-bacterial cellulose (BC) composite membrane, and testing the mechanical strength of the composite membrane both in dry and wet states as well as evaluating its cytocompatibility.

Methods The CS solution and BC solution were mixed in different weight ratios and were dispersed evenly by ultrasonic. Pure CS membrane and composite membranes with different weight ratios of CS and BC (10 : 1, 10 : 3, 10 : 5, 10 : 7 and 10 : 9) were prepared by self-evaporation process. Thereafter, the fabricated membranes were immersed into sodium hydroxide ethanol solution to remove the acid. The tensile strength of the as-fabricated membranes under dry condition and under hydration were measured *via* mechanical universal testing machine ($n = 6$). The microstructures of the composite membrane with the highest tensile strength were observed by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). To characterize the chemical composition of the composite membrane, Fourier transform infrared (FTIR) spectrometer and X-ray diffraction (XRD) were used. CCK-8 assay was carried out to evaluate the survival rate of cells in the control group (without any membrane), the pure CS membrane group and the composite membrane group with maximum tensile strength ($n = 5$) after cocultured with rat bone marrow stem cells (RBMSCs) for 1, 4 and 7 d. **Results** The cross-section of the composite membrane displayed ordered layer structure after introducing BC into CS matrix. The results of FTIR and XRD indicated the existence of BC in the composite membrane. The tensile strength of the CS-BC composite membrane increased first and then decreased with the increase of BC ratio. The tensile strength of the composite membrane reached the highest in dry and wet states when the weight ratio of CS and BC is 10 : 7, which were almost (204.7 ± 63.0) MPa and (44.4 ± 6.4) MPa respectively. After cocultured with RBMSCs for 1, 4 and 7 d, there was no significant difference in the number of cells among the pure CS group, the CS-BC composite membrane group and the blank control group. **Conclusion** When the weight ratio of CS and BC is 10 : 7, the tensile strength of the composite membrane are the best both in dry and wet state and the cell compatibility is excellent.

Key words chitosan; bacterial cellulose; composite membrane; tensile strength; biocompatibility materials