

DOI:10.13475/j.fzxb.20201008107

基于海藻酸钠/磷虾蛋白的 支架材料制备及其性能

殷聚辉¹, 郭静^{1,2}, 王艳^{1,2}, 曹政¹, 管福成^{1,2}, 刘树兴¹

(1. 大连工业大学 纺织与材料工程学院, 辽宁 大连 116034;

2. 辽宁省功能纤维及复合材料工程技术中心, 辽宁 大连 116034)

摘要 为提高海藻酸钠基支架材料的强度和生物相容性,以海藻酸钠(SA)和磷虾蛋白(AKP)构成聚电解质复合体系,通过低温诱导相分离-化学交联法制备SA/AKP支架材料,比较不同质量分数SA/AKP溶液制备的支架材料的结构形态、力学性能、孔隙率、透气性、吸水性及生物相容性。结果表明:在SA/AKP溶液质量分数为4%时,支架孔径在20~96 μm之间,孔径大小均一,形状规整;支架材料的孔隙率、透气性、液体吸收性随SA/AKP溶液质量分数增加而降低,断裂强度和断裂伸长率随SA/AKP溶液质量分数增加而增加,在质量分数为4%时,支架材料的孔隙率为86.4%,透气率为58.9%,且具有较高的强度与伸长;支架材料的细胞毒性等级为0级,具有优异的生物安全性。

关键词 海藻酸钠; 磷虾蛋白; 低温诱导相分离; 支架材料; 生物相容性; 医用纺织品

中图分类号: O 636.1; TB 34 **文献标志码**: A

Preparation and properties of sodium alginate/krill protein scaffold materials

YIN Juhui¹, GUO Jing^{1,2}, WANG Yan^{1,2}, CAO Zheng¹, GUAN Fucheng^{1,2}, LIU Shuxing¹

(1. School of Textile and Material Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China;

2. Functional Fiber and Its Composite Materials Engineering Technology Research Center of Liaoning Province, Dalian, Liaoning 116034, China)

Abstract In order to improve the strength and bio-compatibility of sodium alginate based scaffold materials made from polyelectrolyte composite system with sodium alginate (SA) and krill protein (AKP), SA/AKP scaffold materials were prepared by inducing phase separation-chemical cross-linking method at low-temperature. The structural morphology, mechanical properties, porosity, air permeability, water absorption and bio-compatibility of different concentrations of SA/AKP solutions were compared. The results show that when the concentration of SA/AKP sample is 4%, the pore size of the stent is between 20 and 96 μm with uniform and regular shape. The porosity, and absorptive characteristics of liquid and air permeability of the tissue scaffold decreased with the increasing concentration of SA/AKP solutions, and the fracture strength and elongation of the scaffold increased with the increasing concentration of SA/AKP solutions. When the concentration is 4%, the porosity of the scaffold material is 86.4%, the air permeability is 58.9%, while offering high strength and elongation. The cell toxicity grade of the scaffold is 0, indicating excellent biological safety.

Keywords sodium alginate; krill protein; low temperature induced phase separation; scaffold; bio-compatibility; medical textile

收稿日期:2020-10-29 修回日期:2020-11-06

基金项目:国家自然科学基金项目(51773024, 51373027);辽宁省科技创新团队项目(LT2017017)

第一作者:殷聚辉(1994—),男,硕士生。主要研究方向为高分子材料研发。

通信作者:郭静(1962—),女,教授,博士。主要研究方向为高分子材料改性与成型加工技术。E-mail:guojing8161@163.com。

因糖尿病、外伤和手术灼伤而导致的皮肤缺损是常见现象。直径 1 cm 以上的伤口或全层缺损需要植皮,以防止形成更严重的疤痕及由此导致的外观毁损和功能障碍^[1]。自体移植数量有限和自然资源供量不足使相关治疗受限,而人工组织支架材料的应用为患者的康复提供了更大的可能。

海藻酸钠因具有良好的生物相容性^[2]和生物降解性、低毒性及成膜性^[3]成为伤口愈合、软骨修复、药物输送等方面的优选材料^[4-6],但单一海藻酸钠制备的组织支架材料存在脆性大、强度低、耐水性差等^[7]问题,因此对其改性受到了越来越多的关注。在众多改性方法中,利用海藻酸钠的聚阴离子性质与具有阳离子特性的大分子,如纤维蛋白^[8]、丝素蛋白和透明质酸^[9],构筑聚电解质复合体系可有效改善支架材料的强度和生物相容性。其中,质量分数的改变会极大影响到材料的各项性能。文献^[10]分析了海藻含量变化对藻酸盐凝胶物理性质的影响发现,增加海藻酸钠浓度会使其直径和收缩率增大。陈娜丽等^[11]以海藻酸钠(SA)为软模板,采用原位氧化聚合法制备了聚苯胺/海藻酸钠(PANI/SA)电极材料,研究发现 PANI/SA 的比电容随 SA 质量分数的增加先升高后降低。由此可见,溶液质量分数对材料的性能有显著的影响。南极磷虾产量巨大,且富含与人体相似的蛋白质源^[12],经稀碱提取的磷虾蛋白(AKP)在弱碱性环境中具有阳离子特性,将其与海藻酸钠共混可明显提高纤维的力学性能^[13],改善耐水性。本文研究在前期工作基础^[14-15]上,使用低温诱导相分离-化学交联法制备了 SA/AKP 支架材料,并研究了不同质量分数对支架材料的微观结构和性能、细胞毒性等方面的影响。

1 实验部分

1.1 原料

南极磷虾粉:粒径 200~1 000 μm,含水率 15%,辽宁渔业集团有限公司;海藻酸钠,相对分子质量为 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$,青岛明月海藻集团有限公司;氯化钠、氢氧化钠、二水氯化钙、盐酸,均为分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;无水氯化钙,分析纯,西陇化工股份有限公司;L929 成纤维细胞,广州吉妮欧生物科技有限公司;Cell Counting Kit-8,合肥新恩源生物技术有限公司;75%乙醇,铁岭康泰消毒剂有限公司;PBS,北京索莱宝科技有限公司。

1.2 AKP 提取与 SA/AKP 支架材料的制备

先配制质量分数为 2% 的氢氧化钠溶液,升温

到 40 ℃,按浴比为 1:30 加入南极磷虾粉,搅拌并升温到 70 ℃,恒温处理 2 h,降温到常温,过滤,除去不溶物,向滤液中加入盐酸调节 pH 值到等电点,过滤,取滤饼,室温风干,得到南极磷虾蛋白 AKP,其相对分子质量约 20 000(SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法)。

将 AKP 用质量分数为 0.5% 的 NaOH 溶液溶解,调节溶液 pH 值至 7,然后加入 SA,搅拌直至完全溶解,配成质量分数为 3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0% 的 SA/AKP 溶液,其中 SA 与 AKP 质量比为 5:1。将制备的溶液静置脱泡,使用刮膜机刮膜、预冷冻、冷冻干燥、氯化钙凝固浴交联,水洗和干燥后制成 SA/AKP 支架材料,制备工艺流程见图 1。

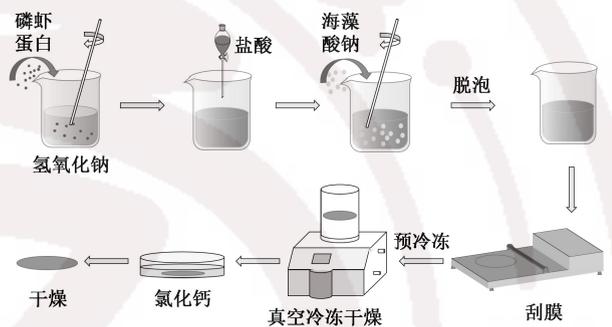


图 1 SA/AKP 支架的制备过程

Fig.1 Schematic diagram of preparation of SA/AKP scaffold

1.3 测试与表征

1.3.1 表面形貌观察

采用 JSM-7800F 型扫描电子显微镜(SEM,日本电子公司)观察 SA/AKP 支架的断面形貌,加速电压为 10 kV。SA/AKP 支架平均孔径和孔径分布通过 Nano Measurer 软件和高斯拟合进行统计学计算。

1.3.2 化学结构测试

采用 Spectrum-One B 型红外光谱仪(FT-IR,美国 PE 公司)分析 SA/AKP 支架材料的化学结构。将 SA/AKP 支架材料粉碎,用 KBr 压片制样,扫描范围为 $4\ 000 \sim 400\text{ cm}^{-1}$ 。

1.3.3 孔隙率与透气性测试

孔隙率:使用液体置换法测量 SA/AKP 支架孔隙率^[16]。

透气性:称量瓶中称取适量去离子水,用不同质量分数 SA/AKP 的样品密封瓶口,分别标为 D_1 、 D_2 、 D_3 、 D_4 、 D_5 ,以未放置样品的称量瓶为对照组,标号 D_0 ,在干燥器中避光放置 24 h,透气率公式^[17]为

$$R = \frac{D_n}{D_0} \times 100\%$$

式中: R 为样品透气率; D_n 为 n 号样品 24 h 失水量,

g; D_0 为对照组 24 h 失水量, g。

1.3.4 液体吸收性

使用容量瓶配置质量分数为 0.9% 的氯化钠溶液作为生理盐水备用; 仿人体血清由氯化钠和氯化钙的溶液组成, 溶液含 142 mmol 钠离子和 2.5 mmol 的钙离子, 此含量与人体血清相当。剪取 2 cm × 2 cm 样品, 置于干燥器中恒温干燥 24 h, 称量 W_0 , 再将样品分别置于生理盐水、仿人体血清、去离子水中 12 h, 用吸水纸轻拭将表面水分吸干后称量 W_1 。吸液率 K 通过下式求得:

$$K = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100\%$$

1.3.5 力学性能测试

将 SA/AKP 支架材料剪切成长为 40 mm、宽为 5 mm 的样条, 每个系列抽取 10 个样品, 用 YG004 型电子单纤维强力机(常州市第一纺织设备有限公司)测试支架断裂强度。其中, 拉伸速度为 20 mm/min, 夹具间隙为 30 mm。断裂强度、断裂伸长率通过下式可得:

$$P = \frac{F}{S}$$

$$E = \frac{L - L_0}{L_0} \times 100\%$$

式中: P 为断裂强度, N/mm²; F 为断裂强力, N; S 为横截面积, mm²; E 为断裂伸长率, %; L_0 为样品初始长度, mm; L 为断裂时的长度, mm。

1.3.6 细胞毒性测试

采用浸提液法对支架材料进行毒性测试, 将 SA/AKP 支架材料用 75% 乙醇浸洗 5 min, 然后用磷酸缓冲溶液 PBS 浸洗 5 min, 反复 3 次后加入纯培

养基直至没过材料, 静置 24 h 后作为浸提液备用。在 96 孔板中接种 L929 成纤维细胞悬液, 在潮湿的培养箱中预培养 24 h (37 °C、5% CO₂), 更换细胞培养液, 然后加入 10 μL 先前制备好的 SA/AKP 支架材料浸提液, 不加浸提液的为空白组。将培养板在细胞培养箱中培养 12~48 h。取出 L929 细胞培养板, 向板的每个孔中加入 110 μL CCK-8 培养基混合液, 将细胞板在培养箱中孵育 30 min 后取出, 使用酶标仪在 450 nm 波长条件下测定各孔吸光度, 取平均值并通过对照组评定材料的细胞毒性, 以细胞的增殖度为标准(见表 1)划分安全等级^[18]。

表 1 细胞增殖率与毒性水平的对应关系

Tab.1 Correspondence between cell proliferation rate and cytotoxicity level

细胞增殖率/%	毒性水平/级
≥100	0
75~99	1
50~74	2
25~49	3
1~24	4
0	5

2 实验结果和讨论

2.1 SA/AKP 支架材料形态结构分析

不同质量分数 SA/AKP 支架的 SEM 照片、孔径分布分别如图 2、3 所示。

从图可看到: SA/AKP 支架材料具有致密微孔结构, 在 SA/AKP 溶液质量分数为 3.0% 和 3.5% 时, 微孔大小形状相对杂乱, 孔径大小差异较大; 溶液质量分数为 4.0% 时, 微孔大小均一, 平均孔

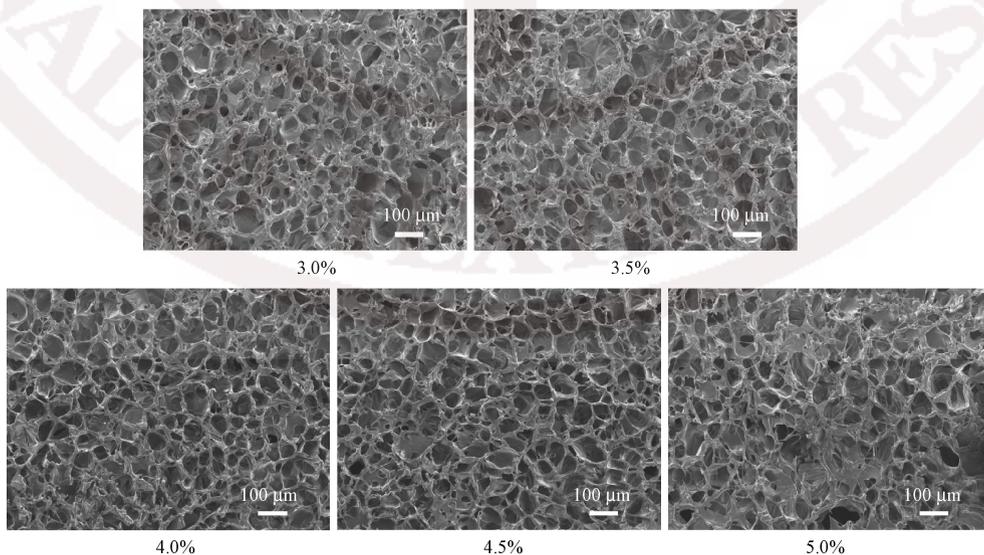


图 2 不同质量分数 SA/AKP 支架的 SEM 照片

Fig.2 SEM image of different mass fraction SA/AKP scaffold

径为 54.11 μm, 形状规整; 溶液质量分数增加到 4.5% 以后, 溶液质量分数过大, 出现粘连, 孔隙结构被破坏。据文献 [19] 报道, 细胞最适宜生长的

孔径为 20~125 μm, 质量分数为 4.0% 时的 SA/AKP 支架孔径大小适合人体细胞生长, 为本研究提供了前提条件。

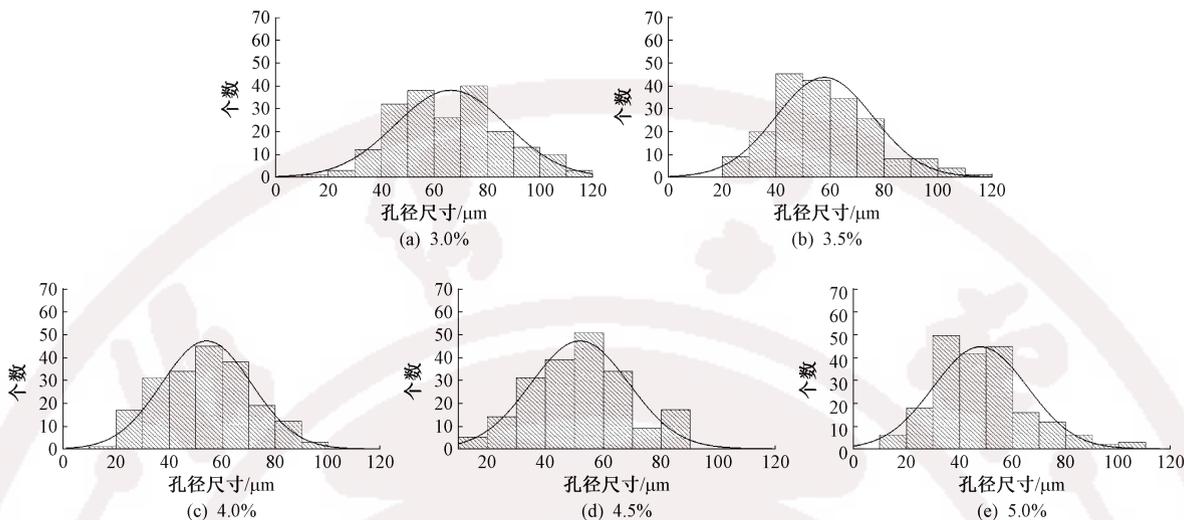


图 3 不同质量分数 SA/AKP 支架的孔径分布图

Fig.3 Pore size distribution image of different mass fraction SA/AKP scaffold

2.2 SA/AKP 支架材料的化学结构分析

SA 和 AKP 以及 SA/AKP 支架的 FT-IR 光谱如图 4 所示。从图可看出: AKP 在 1 657 cm⁻¹ (酰胺 I 谱带) 与 1 533 cm⁻¹ (酰胺 II 谱带) 处出现了蛋白质的特征吸收峰; SA 在 1 420 cm⁻¹ (COO⁻ 对称伸缩振动) 与 1 632 cm⁻¹ (不对称伸缩振动) 处, 2 922 cm⁻¹ (—CH 伸缩振动) 与 3 408 cm⁻¹ (—OH 伸缩振动) 处出现明显特征吸收峰。而 SA/AKP 支架未出现新峰, 但羟基、氨基特征峰向右偏移至 3 435 cm⁻¹ 处。

多重交联反应, 即 Ca²⁺ 与 COO⁻ 发生螯合作用, 同时 Ca²⁺ 与 AKP 中含有的 COO⁻ 反应生成凝胶, 正是这种作用提高了支架材料的强度和耐水性。

2.3 SA/AKP 支架材料孔隙率与透气率分析

不同质量分数 SA/AKP 支架的孔隙率和透气率如图 5 所示。

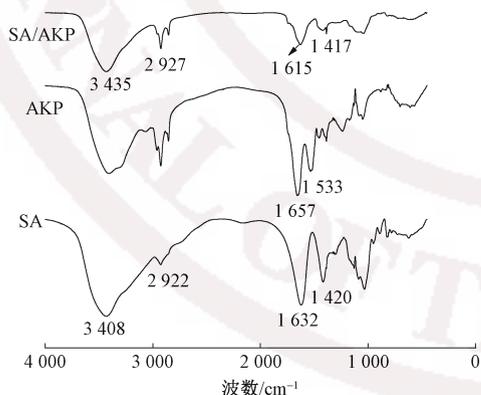


图 4 SA 和 AKP 以及 SA/AKP 支架的 FT-IR 光谱

Fig.4 FT-IR spectra of SA and AKP and SA/AKP scaffold

这是因为海藻酸钠 COO⁻ 与 Ca²⁺ 产生螯合作用, 使得 OH...O 类型氢键减少, 成键电子云密度升高而导致羟基峰右移。图中 1 632 和 1 420 cm⁻¹ 处 COO⁻ 不对称伸缩振动和对称伸缩振动峰位置向低波束移动到 1 615 cm⁻¹ 和 1 417 cm⁻¹ 处。这说明 SA 与 AKP 支架在引入 Ca²⁺ 之后, Ca²⁺ 与 COO⁻ 产生了

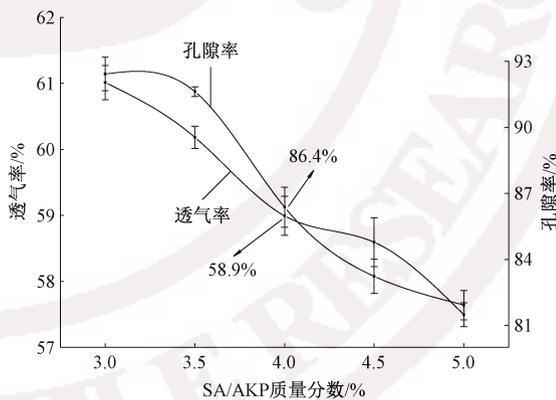


图 5 不同质量分数 SA/AKP 支架的孔隙率和透气率

Fig.5 Porosity and air permeability of different mass fraction SA/AKP scaffold

从图可看出, 随 SA/AKP 溶液质量分数的增加, 支架材料的孔隙率和透气率逐渐降低。这是因为随着 SA/AKP 溶液质量分数增加, SA/AKP 体系内有效分子数增多, 分子之间作用增强, 水含量减少, 预冻形成冰晶数量降低, 导致孔隙率下降, 而透气率也因为孔隙率下降而下降。海藻酸钠在二价阳离子作用下会发生胶凝反应, 主要是古洛糖醛酸片段的 Na⁺ 与二价 Ca²⁺ 发生离子交换, 形成四配位基

型“蛋盒”结构,稳定了支架材料的孔隙结构,使其具有较好的孔隙率和透气率。SA/AKP 支架的透气性模型如图 6 所示。水分子和氧气等通过相互连接的孔洞进出支架,实现了物质的运输。溶液质量分数为 4% 时,SA/AKP 支架孔隙率为 86.4%,透气率为 58.9%,满足了支架材料的需求^[20]。具备良好孔隙率和透气率的支架可促进成纤维细胞的生长,给皮下组织提供生长所需氧气和排出废气,并保持适当的环境潮湿度,从而有利于表皮组织的生长,是制备组织工程支架的重要前提。

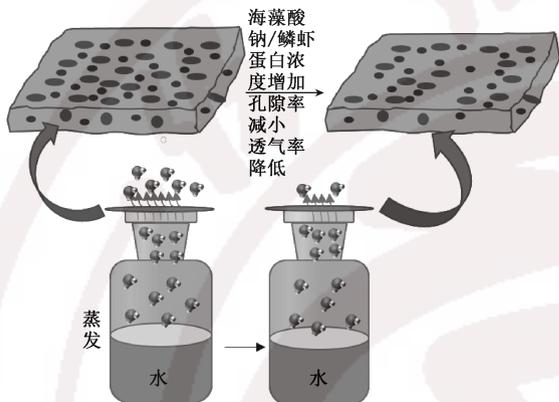


图 6 SA/AKP 支架的透气性模型

Fig.6 Mechanism diagram of air permeability of SA/AKP scaffold

2.4 液体吸收性分析

对于烧伤、烫伤、溃疡等伤口,一般会有脓液流出,所以支架应该具有良好的液体吸收性。不同质量分数 SA/AKP 支架的吸液率如图 7 所示。

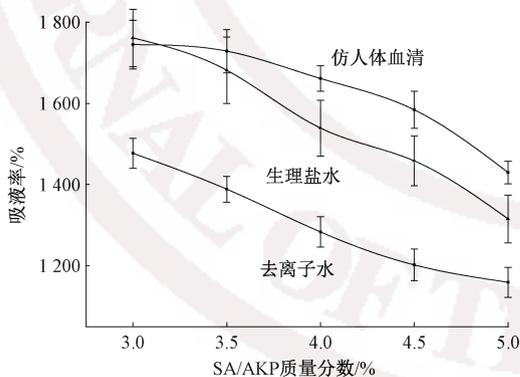


图 7 不同质量分数 SA/AKP 支架的吸液率

Fig.7 Liquid absorbency of different mass fraction SA/AKP scaffold

可看出,随溶液中 SA/AKP 质量分数的上升,SA/AKP 支架对仿人体血清、生理盐水、去离子水的液体吸收性逐渐降低。首先这是因为随溶液中 SA/AKP 质量分数的增加,材料孔隙率下降导致吸水率降低,其次是因为多重网络结构的形成导致闭孔或微小孔,限制了水分子的进入,液体吸收模型如图 8

所示,被吸收的液体储存在支架材料的孔洞结构中。当 SA/AKP 溶液质量分数为 4.0% 时,SA/AKP 支架对仿人体血清、生理盐水、去离子水的吸收率分别为 1 661.2%、1 539.0%、1 283.2%,满足支架对液体吸收性要求。

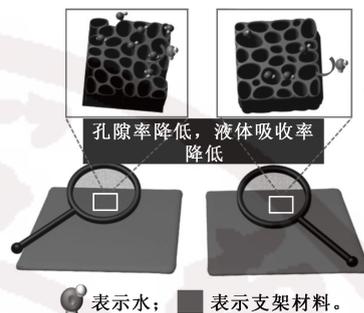


图 8 SA/AKP 支架的吸液模型

Fig.8 Mechanism diagram of liquid absorption of SA/AKP scaffold

2.5 力学性能分析

不同质量分数 SA/AKP 支架的力学性能如图 9 所示。

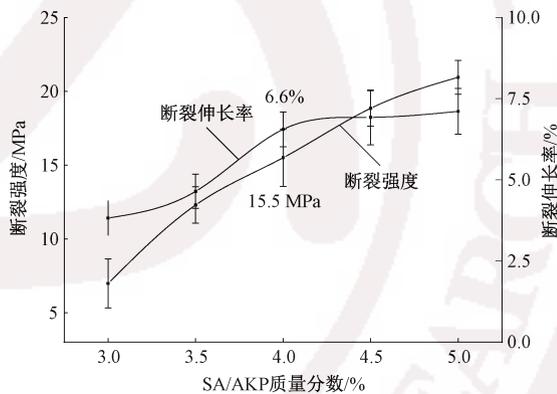


图 9 不同质量分数 SA/AKP 支架的力学性能

Fig.9 Mechanical properties of different different mass fraction SA/AKP scaffold

由图可看到,随溶液中 SA/AKP 质量分数的增加,支架的断裂强度呈现不断上升的趋势。这是因为随 SA/AKP 溶液质量分数的增加,体系交联点增多,相同界面上承受应力的有效面积增加,故断裂强度和断裂伸长率均增加。当溶液中 SA/AKP 质量分数为 4.0% 时,断裂强度达到 15.5 MPa,断裂伸长率达到 6.6%。结合支架孔洞结构和吸液性认为,SA/AKP 溶液质量分数为 4.0% 时最优。

2.6 细胞毒性分析

图 10 示出采用 CCK-8 法检测不同质量分数的 SA/AKP 材料浸提液对成纤维细胞增殖的影响。结合表 1 细胞增殖率与毒性水平的对应关系发现,不同质量分数 SA/AKP 支架浸提液的细胞相对增殖率

均大于 100%, 毒性水平为 0 级, 不具有细胞毒性。毒性测试表明, 材料对细胞增殖, 分化有一定的促进作用。因此可认为, 这种材料具有优异的细胞相容性和生物安全性, 可作为医用材料使用。

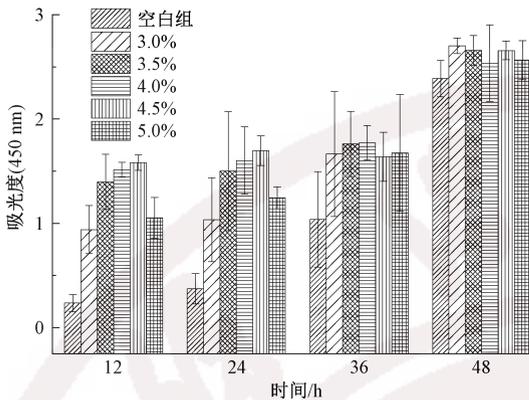


图 10 不同质量分数 SA/AKP 支架的细胞毒性

Fig.10 Cytotoxicity of different mass fraction of SA/AKP scaffolds

3 结 论

本文利用低温诱导相分离-化学交联法制备了海藻酸钠/磷虾蛋白(SA/AKP)支架材料, 并探讨了支架材料的形貌结构、孔隙率、力学性能及生物相容性。结果表明: SA/AKP 支架材料的孔隙率和透气率随 SA/AKP 质量分数增加呈现减少的趋势; 对仿人体血清、生理盐水、去离子水的吸收性随 SA/AKP 质量分数增加而减少; 材料的断裂强度与断裂伸长率随 SA/AKP 质量分数增加而增加。不同 SA/AKP 质量分数的支架的浸提液的分级均大于 90%, 毒性为 0 级。在 SA/AKP 质量分数为 4.0% 时, SA/AKP 支架材料的孔径大小在 20~96 μm 之间, 孔径大小均一, 形状规整; 透气率为 58.9%, 孔隙率为 86.4%, 满足了支架材料的需求; 对仿人体血清、生理盐水、去离子水吸收率分别为 1 661.2%、1 539.0%、1 283.2%; 断裂应力和断裂伸长率分别达到 15.5 MPa、6.6%; 毒性为 0 级, 材料具有优异的细胞相容性和生物安全性。本文研究为 SA/AKP 组织工程支架提供了基础数据, 为新型组织支架材料的应用提供了一种新思路。

FZXB

参考文献:

[1] YANG W, XU H J, LAN Y, et al. Preparation and characterisation of a novel silk fibroin/hyaluronic acid/sodium alginate scaffold for skin repair[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 130: 58-67.

[2] 孙范忱, 郭静, 于跃, 等. 聚羟基脂肪酸酯/海藻酸钠纳米纤维的制备及其性能[J]. 纺织学报, 2020, 41(5): 15-19.
SUN Fanchen, GUO Jing, YU Yue, et al. Preparation and properties of polyhydroxy fatty acid ester/sodium alginate composite electrospun nanofibers[J]. Journal of Textile Research, 2020, 41(5): 15-19.

[3] 王明强, 崔明洁, 蒋秋路, 等. 壳聚糖/海藻酸钠复合膜制备及性能研究[J]. 化工新型材料, 2017, 45(8): 59-61.
WANG Mingqiang, CUI Mingjie, JIANG Qiulu, et al. Preparation and property of chitosan/sodium alginate composite film [J]. New Chemical Materials, 2017, 45(8): 59-61.

[4] AYUB A D, CHIU H L, MAT YUSUF S N A, et al. Biocompatible disulphide cross-linked sodium alginate derivative nanoparticles for oral colon-targeted drug delivery [J]. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2019, 47(1): 353-369.

[5] MAO X Y, LI X Y, ZHANG W J, et al. Development of microspheres based on thiol-modified sodium alginate for intestinal-targeted drug delivery [J]. ACS Applied Bio Materials, 2019, 2: 5810-5818.

[6] DELIA N L, SILVA R R, SARTUQUI J, et al. Development and characterisation of bilayered periosteum-inspired composite membranes based on sodium alginate-hydroxyapatite nanoparticles [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2020, 572: 408-420.

[7] 舒华金, 吴春莹, 杨康, 等. 快速膨胀海藻酸钠/二氧化硅纤维复合支架的制备及其快速止血功能的应用[J]. 材料工程, 2019, 47(12): 124-129.
SHU Huajin, WU Chunxuan, YANG Kang, et al. Preparation of rapid expansion alginate/silica fiber composite scaffold and application of rapid hemostatic function [J]. Journal of Materials Engineering, 2019, 47(12): 124-129.

[8] SOLOVIEVA E V, FEDOTOV A Y, MAMONOV V E, et al. Fibrinogen-modified sodium alginate as a scaffold material for skin tissue engineering [J]. Biomedical Materials, 2018, 13(2): 025007.

[9] YANG W, XU H J, LAN Y, et al. Preparation and characterisation of a novel silk fibroin/hyaluronic acid/sodium alginate scaffold for skin repair[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 130: 58-67.

[10] LI L Y, CHEN Y Z, WANG Y W, et al. Effects of concentration variation on the physical properties of alginate-based substrates and cell behavior in culture[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 128: 184-195.

[11] 陈娜丽, 任亚鹏, 翁立娟, 等. 海藻酸钠的浓度对聚苯胺/海藻酸钠电化学性能的影响 [J]. 精细化工,

