

http://pmse.scu.edu.cn

壳聚糖接枝的还原氧化石墨烯在聚磷酸钙多孔支架上的构建

丁红梅¹, 彭旭², 余喜讯¹

(1. 四川大学 高分子科学与工程学院, 四川 成都 610065; 2. 四川大学 动物实验中心, 四川 成都 610225)

摘要: 通过酰胺反应制备了壳聚糖接枝的还原氧化石墨烯(CS-rGO), 并首次将其作为自组装涂层应用于聚磷酸钙(CPP)多孔支架的表面改性。红外光谱、X射线光电子能谱、X射线衍射和拉曼光谱等表征证明了CS-rGO的成功制备; 形态学观察发现, CS-rGO在CPP多孔支架表面上形成了均匀稳定的涂层; 力学测试结果表明, CS-rGO涂层增强了CPP多孔支架的压缩强度; 体外矿化实验表明, CS-rGO涂层提高了CPP多孔支架的矿化能力; 抗菌实验表明, 在与大肠杆菌和金黄色葡萄球菌共培养24 h之后, CPP/CS-rGO/0.3多孔支架对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌率分别为66%和71%。

关键词: 聚磷酸钙; 壳聚糖; 氧化石墨烯; 矿化; 抗菌性能

中图分类号:

文献标识码: A

文章编号: 1000-7555(2022)08-000

聚磷酸钙(CPP)是一种新型的无机聚合物(化学式 $[\text{Ca}(\text{PO}_3)_2]_n$, $\text{Ca:P}=0.5$), 由线型聚磷酸根主链和抗衡离子组成, 具有-34 mV的高Zeta电位^[1, 2]。CPP具有与天然骨相似的无机成分, 被广泛用于骨修复领域。以往研究证明, CPP多孔支架具有良好的骨传导性、可生物降解性和生物相容性^[3, 4]。然而, CPP多孔支架的抗菌性能很差, 在植入时面临严重的细菌感染问题, 有可能导致骨植入手术的失败。因此, 亟待对CPP多孔支架进行表面修饰, 构建具有抗菌作用的多功能涂层。

氧化石墨烯(GO)是带有含氧官能团的石墨烯衍生物, 其二维平面的表面含有羟基和环氧基, 边缘含有羧基^[5]。GO具有卓越的力学性能和较大的比表面积, 这些特性赋予GO优异的理化特性、生物活性和抗菌作用, 常常被作为抗菌涂层应用于骨修复支架的表面改性^[6, 7]。Ouyang等^[8]通过简单的浸涂法将GO固定在多孔聚醚醚酮骨修复支架的表面, 得到的复合支架具有良好的抗菌作用。Liu等^[9]通过偶联剂硅烷将GO固定在硅橡胶表面, 得到了具有GO抗菌涂层的改性硅橡胶, 抗菌实验表明, GO涂层显示出优异的抗菌活性。然而, 简单的物理结合使得GO与支架表面的作用力较弱, 不利于GO在

支架表面的均匀分布, 从而影响抗菌涂层的稳定性, 而中间连接介质硅烷的使用会在一定程度上影响支架表面的生物相容性。由于GO表面丰富的含氧官能团能为制备GO衍生物提供反应活性位点, 因此, 可以进一步对GO进行改性以获得稳定和多功能的抗菌涂层。

壳聚糖(CS)是一种天然的阳离子聚合物, 具有优异的抗菌活性、良好的生物降解性、突出的生物相容性和优良的理化性能, 广泛应用于生物医学植入物、支架、药物输送系统、生物传感器和其他生物医学领域^[10]。CS最初来源于几丁质, 是几丁质的衍生物, 具有优异的成膜性能^[11]。壳聚糖与其他多糖的区别在于, 其在酸性pH值下的阳离子性质, 在温和的酸性条件下, 其氨基被质子化, 能促进与其他分子的相互作用。利用这一特性, 可以对其结构、物理化学和生物学特性进行调整。

因此, 本文将CS接枝在GO表面, 制备了CS-rGO, 并首次将其作为涂层用于CPP多孔支架的表面改性, 得到一系列CPP/CS-rGO复合支架。其中, 在酸性条件下, CS-rGO上的氨基发生质子化, 使CS-rGO带有正电荷, 可以通过自组装方式涂覆在带有负电荷的CPP多孔支架表面上。同时, CS-rGO上

doi:10.16865/j.cnki.1000-7555.2022.0174

收稿日期: 2022-03-29

基金项目: 四川省重点研发计划(2019YFS0121)

通讯联系人: 余喜讯, 主要从事生物医用材料的研究, E-mail: yuxixun@163.com

的氨基和羟基与 CPP 分子链的磷酸基团产生氢键作用,进一步增强了 GO 与 CPP 多孔支架的界面结合力,形成了稳定的抗菌涂层。另外,GO 与 CS 的协同抗菌作用可以赋予 CPP 多孔支架显著的抗菌性能,使其在骨修复领域展现出更大的应用潜力。

1 实验部分

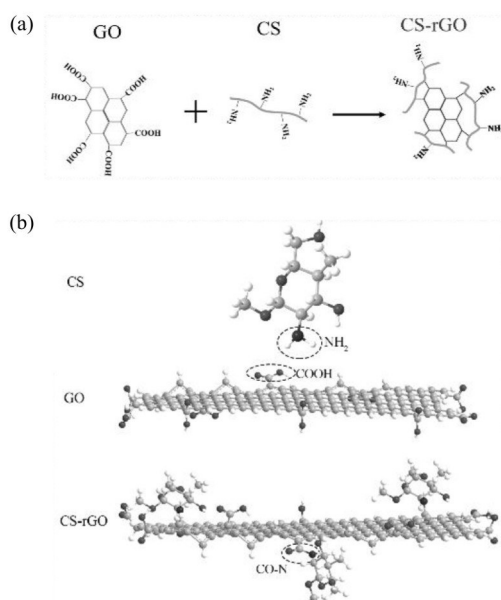
1.1 试剂与仪器

聚乙烯醇、碳酸钙、硬脂酸、磷酸、乙酸:分析纯,成都科龙化工试剂;氧化石墨烯:中科院成都有机研究所;壳聚糖:脱乙酰度大于 90%,酷而化学;实验用水:去离子水。

旋转蒸发仪:HEIZDAB,德国 Heidolph 公司;马弗炉:SRJX-4-13,天津市泰斯特仪器有限公司;球磨机:MM400,德国 RETSCH(莱驰)公司。

1.2 样品制备

1.2.1 CS-rGO 的制备:通过酰胺反应成功地合成了 CS-rGO (Scheme 1)。将均匀分散的 GO (1 mg/mL, 100 mL) 水悬浮液缓慢地添加到壳聚糖醋酸水溶液 (质量分数 1%, pH 为 5.5~6, 100 mL) 中。超声处理 10 min 后立即转移到水浴温度为 90 °C 的水浴锅中,并在磁力搅拌下反应 6 h。反应每隔 1 h 取样 1 次,在紫外分光光度计上获得取样产物的紫外光谱。反应完成后,将反应产物高速离心 (12000 r/min) 10 min,并用大量醋酸水溶液 (0.1 mol/L) 彻底清洗,以去除未反应完全的 CS。然后将洗涤后的 CS-rGO 溶液冻干,获得干燥的 CS-rGO,用于后续表征和实验。



Scheme 1 (a) Chemical structure of CS-rGO; (b) ball and stick structure of CS-rGO

1.2.2 CPP 多孔支架的制备:将碳酸钙加入浓度为 2 mol/L 的磷酸标准溶液中得到磷酸二氢钙溶液,其中碳酸钙与磷酸的摩尔比为 1:2.5。然后将磷酸二氢钙溶液在旋转蒸发仪中蒸干水分,得到磷酸二氢钙沉淀。收集沉淀,并用无水乙醇反复洗涤,直到沉淀滤液的 pH 值约为 7。然后将上述沉淀用红外灯干燥。将干燥的磷酸二氢钙粉末放入坩埚中,在马弗炉中进行聚合反应,缩聚反应温度为 500 °C、时间为 10 h。

聚合完成后,将温度升到 1100 °C,获得 CPP 的高温熔体。然后将熔融、黏稠的熔体从马弗炉中取出,迅速倒在冰块上,得到块状、透明的非晶态 CPP。将所得非晶态 CPP 研磨并过筛。

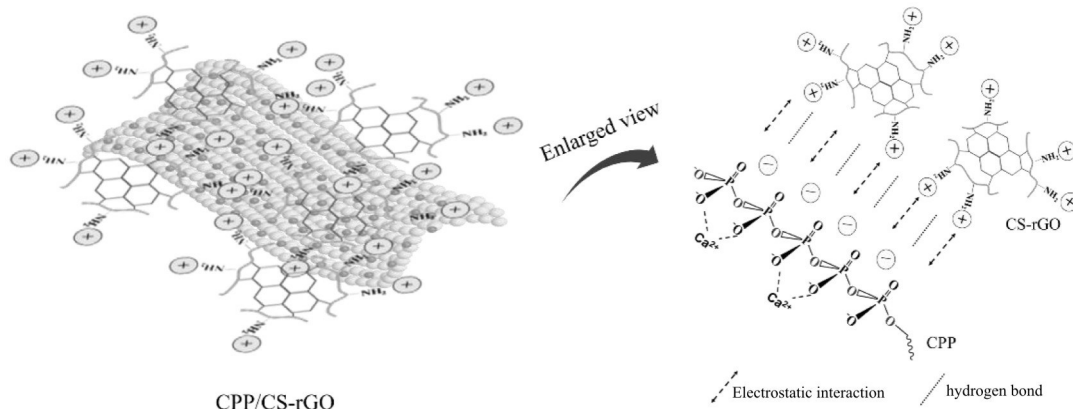
使用的致孔剂为硬脂酸,黏结剂为 4% 的聚乙烯醇。将 CPP 粉末和硬脂酸按照质量比 3:2 的比例进行混合,加入少量黏结剂,在压样机上压制成型,将获得的型坯放入马弗炉中进行烧结。烧结时,先以 5 °C/min 的升温速率从室温升到 300 °C,保温 3 h,挥发硬脂酸,形成多孔结构,然后再以 5 °C/min 的升温速率升到 850 °C,保温 1.5 h,得到具有 β 晶相结构的多孔 CPP 支架。

待炉温降至室温后,将支架取出,用 360# 的砂纸打磨支架,将支架表面的致密层打磨掉,露出孔隙,以方便进一步的表面改性。

1.2.3 CS-rGO 在 CPP 多孔支架上的构建:通过在乙酸水溶液 (pH=4) 中超声 CS-rGO,获得特定质量分数 (0.1%, 0.3% 和 0.5%) 的 CS-rGO 悬浮液。将 CPP 多孔支架浸入上述不同浓度的 CS-rGO 悬浮液 (pH=4) 中,10 min 后取出支架,用蒸馏水轻轻清洗,再 60 °C 干燥 3 h。由于氨基质子化,带正电荷的 CS-rGO 会与带负电荷的 CPP 分子链产生强静电作用,同时,CS-rGO 的含氢官能团会与 CPP 上的磷酸基团产生氢键作用。由于两者之间的强静电作用和氢键作用,CS-rGO 会自组装到 CPP 支架表面并形成稳定的涂层 (Scheme 2)。将制备的不同 CPP/CS-rGO 复合支架命名为 CPP/CS-rGO/X (X 是 CS-rGO 在乙酸水溶液中的浓度),例如 CPP/CS-rGO/0.1, CPP/CS-rGO/0.3 和 CPP/CS-rGO/0.5。

1.3 测试与表征

1.3.1 Zeta 电位分析:使用 Zetasizer Nano ZS (英国马尔文) 在 25 °C 测量 GO 和 CS-rGO 的 Zeta 电位。检测样品的制备:对于 GO,将 GO 溶解在中性的蒸馏水中,超声分散 2 h;对于 CS-rGO,以相同的浓度分别溶解在 pH=4, 5, 6 和 7 的醋酸水溶液中。另外,



Scheme 2 Interaction between CS-rGO and CPP

使用固体/薄膜表面 Zeta 电位仪 (SurPASS 3, 奥地利安东帕) 测定 CPP, CPP/CS-rGO/0.1, CPP/CS-rGO/0.3 和 CPP/CS-rGO/0.5 支架的表面电位。

1.3.2 电镜观察和 Mapping 分析: 使用场发射扫描电子显微镜 (SEM, 美国 FEI,) 观察支架的表观形貌。将多孔支架喷金, 在 8 kV 加速电压下, 使用 SEM 观察支架的内部结构和 CS-rGO 在 CPP 多孔支架表面的分布情况。为了进一步分析支架上 CS-rGO 的分布情况, 进行了 Mapping 分析。

1.3.3 热重分析: 使用热重分析仪 (TG, 瑞士 METTLER) 测定复合支架中 CS-rGO 的含量。升温速度为 10 °C/min, 从 50 °C 到 800 °C, 空气气流流速为 10 mL/min。

1.3.4 紫外光谱分析: 使用 UV-1750 (日本岛津) 光谱仪检测 GO 和 CS-rGO 在 200~800 nm 的紫外-可见吸收光谱。吸收强度范围为 0~1.5 A, 扫描速度为快速。

1.3.5 红外光谱分析: 为了评估支架材料的物理化学特性, 进行了傅里叶变换红外光谱 (FT-IR, 美国 Nicolet) 分析。将所有样品充分干燥后置于红外灯下碾碎, 然后按质量比 1:20 与 KBr 混合研磨, 用压片机压成均匀透明的薄片, 测试范围为 400~4000 cm^{-1} , 分辨率为 4 cm^{-1} 。

1.3.6 X 射线光电子能谱分析: 通过 X 射线光电子能谱仪 (XPS, AXIS Ultra DLD, 英国 Kratos) 分析 CS 和 CS-rGO 的元素全谱和氮元素的分峰谱。

1.3.7 X 射线衍射分析: 为了评估 GO 的还原情况和支架材料的晶相结构, 使用 X 射线衍射仪 (XRD, X'Pert Pro MPD, 荷兰) 进行测量。首先使用玛瑙杵将所有样品研磨成细粉末, 均匀地铺于载玻片的表面, 然后放在 XRD 的载物台上, 设置测试正极电压

为 40 kV, 灯丝电流为 35 mA, 以 2(°)/min 的扫描速度从 5° 到 80° 收集数据。测试完成后将 CPP 的 XRD 光谱与 β -CPP 的索引光谱 (JCPDS#01-0771953) 进行比较。

1.3.8 拉曼分析: 用激发波长为 532 nm 的激光, 采用 LabRAM HR 拉曼光谱仪 (HORIBA Jobin Yvon, 法国) 得到拉曼光谱。

1.3.9 力学性能测试: 使用万能测试机 (5567 型, 美国 Instron) 在圆柱形支架上 ($\Phi 5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$) 单轴压缩试验。在室温以 0.5 mm/min 的压缩速率进行压缩, 直到支架崩塌。

1.3.10 体外矿化: 将支架 ($\Phi 5 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$) 浸入 20 mL 的标准模拟体液 (SBF) 中, 每 2 d 更换 1 次 SBF。在 37 °C 孵育 14 d 后, 取出支架, 用去离子水冲洗 3 次, 在 60 °C 干燥 12 h, 使用 SEM 和 mapping 研究支架表面磷灰石的生长情况, 进而评估支架材料的体外生物活性。

1.3.11 抗菌率测定: 抗菌试验前将细菌菌液的浓度调为 1×10^6 CFU。以 CPP 和 CPP/CS-rGO/0.3 支架为例来探究 CS-rGO 涂层的抗菌作用。将大肠杆菌 (革兰氏阴性, *E.coli*) 和金黄色葡萄球菌 (革兰氏阳性, *S.aureus*) 的菌悬液分别与 CPP 和 CPP/CS-rGO/0.3 支架一起孵育 24 h。菌液与支架材料共培养后, 吸取 60 μL 菌液并稀释至特定浓度, 取稀释后的菌液 30 μL 均匀涂抹在琼脂板上继续培养 12 h, 然后取出琼脂板并对板内菌落进行拍照, 使用 IMAGEJ 软件测量琼脂板上的菌落数。抗菌率按式 (1) 计算

$$R = \frac{B - C}{B} \quad (1)$$

式中: R ——抗菌率; B ——空白对照组琼脂板的菌落数; C ——实验组琼脂板中的菌落数

1.3.12 细菌形态观察:通过SEM观察细菌的形态变化。通常,将共培养后的支架-细菌结合物样品用PBS洗涤,并在4 °C用2.5%戊二醛固定过夜。之后,使用一系列乙醇溶液(体积分数30%, 50%, 75%, 90%, 95%和100%)依次将样品脱水20 min。脱水完成后,用金溅射涂有细菌的干燥样品用于SEM观察。

1.3.13 数据统计分析:实验数据采用Origin 9.0数据处理软件。本研究相关数据都通过平均值±标准方差的形式给出。

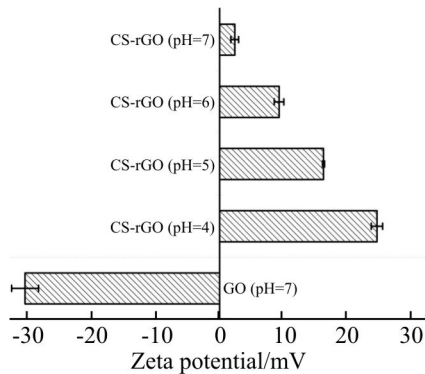


Fig.1 Zeta potential of GO and CS-rGO

2 结果与讨论

2.1 Zeta 电位

Fig.1中显示了GO和不同pH下CS-rGO的Zeta电位。GO的Zeta电位为-31 mV,而CS-rGO的Zeta电位在2.4~25 mV(pH=7~4),并且随着酸性的增加,CS-rGO的Zeta电位逐渐增加,这种现象是因为在酸性条件下,CS-rGO上的氨基发生质子化,并且酸性越强,质子化程度越大,电位也就越大。以上结果表明,CS-rGO上存在氨基,从而说明了CS在GO上的成功接枝。

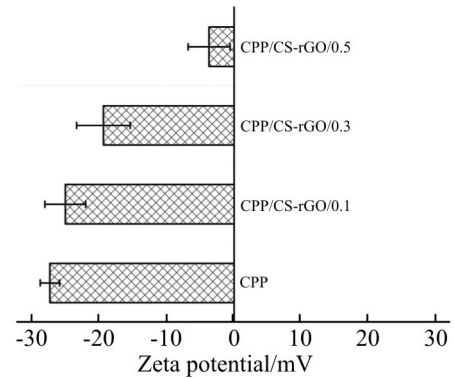


Fig.2 Zeta potential of CPP scaffold and CPP/CS-rGO composite scaffolds

CPP和CPP/CS-rGO复合支架的表面Zeta电位如Fig.2所示。CPP的Zeta电位为-27 mV,因此,在酸性条件下,带正电荷的CS-rGO可以通过自组装的方式涂覆到带负电荷的CPP多孔支架上。对于CPP/CS-rGO复合支架,随着CS-rGO含量的增加,电位逐渐接近正值,这也说明CS-rGO在CPP多孔支架上的成功涂覆。

2.2 形态学观察

研究表明,多孔支架需要具有相互连接的孔结构,以允许细胞和液体侵入支架并激活骨形成过程。如图.3所示, CPP多孔支架具有相互连通的孔结构,为细胞的黏附和增值提供了空间环境。同时,在高倍数下观察到,在支架大孔隙的表面还存在大量很小的微孔结构,其尺寸在几微米左右,使整个支架内部呈现出与骨组织相似的疏松多孔结构。其中,这种很小的微孔结构有利于营养物质的运输以及细胞代谢废物的排出。

Fig.4(a)是CPP和CPP/CS-rGO支架的光学照片,其中,从里圈到外圈依次代表CPP, CPP/CS-rGO/0.1, CPP/CS-rGO/0.3和CPP/CS-rGO/0.5多孔支架。

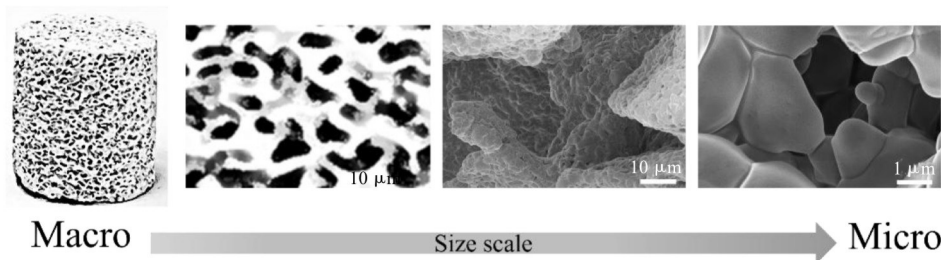


Fig.3 Morphology of CPP porous scaffolds ($\Phi 10\text{ mm}\times 10\text{ mm}$)

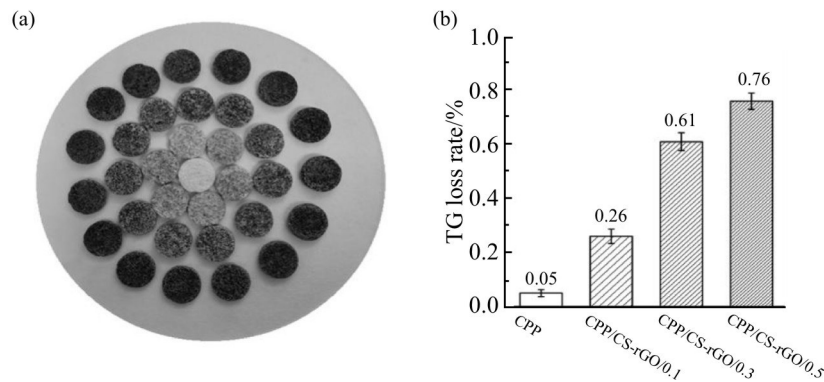


Fig.4 (a) Digital photo of CPP and CPP/CS-rGO scaffolds, the scaffolds from inner ring to outer ring represent CPP, CPP/CS-rGO/0.1, CPP/CS-rGO/0.3, and CPP/CS-rGO/0.5(Φ 10 mm \times 1 mm), respectively; (b) TG loss rate of CPP, CPP/CS-rGO/0.1, CPP/CS-rGO/0.3, and CPP/CS-rGO/0.5 scaffolds

从图中可以看到, CPP多孔支架呈现白色的外观, 而 CPP/CS-rGO复合支架由于表面涂覆了CS-rGO而呈现黑色的外观, 并且随着CS-rGO含量的增加, 颜色变得越深。此外, 为了计算支架表面分布的CS-rGO的精确含量, 进行了TG分析, Fig.4(b)是复合支架的热失重率。随着CS-rGO含量的增加, 复合支架的热失重率逐渐增加, 其中, 具有最高CS-rGO含量的CPP/CS-rGO/0.5的热重损失率仅为0.76%, 这说明复合支架的大部分都可以在体内降解, 而少量的CS-rGO可以通过胞吞的方式进行代谢。

以CPP/CS-rGO/0.3多孔支架为例, 通过SEM和Mapping评估了CS-rGO的分布情况。从Fig.5(b~e)可以看到, CS-rGO涂层均匀稳固地分布在CPP多孔支架的孔壁上。另外, 从Fig.5(d)观察到, 一些CS-rGO纳米片进入到小尺寸的微孔中, 一方面可以起到支撑支架的作用, 进而增加多孔支架的压缩强

度, 同时, 在多孔支架的体内降解过程中, 这些纳米片的支撑作用可以防止支架的突然崩塌。另一方面, 可以为细胞提供额外的黏附点。为了更大范围地评估CS-rGO的分布情况, 对复合支架进行了Mapping分析。Fig.5(i)和Fig.5(j)中C和N元素的均匀分布, 进一步说明了CS-rGO在CPP多孔支架上的均匀分布。

2.3 紫外光谱分析

为了监测整个反应, 反应过程中每隔1 h取样1次, 然后用紫外分光光度计获得取样产物的紫外光谱。取样产物的光学照片如图Fig.6(A)所示, GO的颜色是金黄色的, 随着反应的进行, 产物颜色逐渐变为黑色, 也就是还原氧化石墨烯的颜色, 这说明在反应过程中, GO逐渐被还原了。Fig.6(B)是GO和取样产物的紫外光谱, 231.3 nm的特征吸收峰是GO的特征吸收峰, 随着反应的进行, GO的吸收峰从231.3 nm

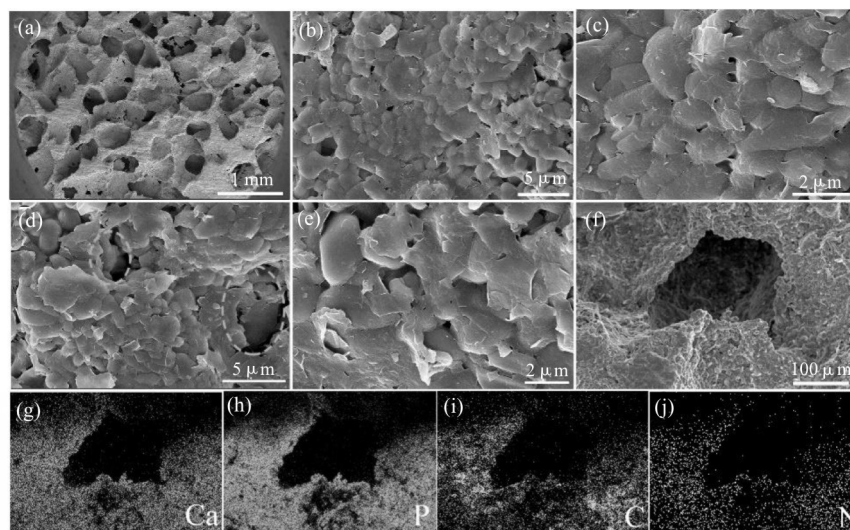


Fig.5 (a-f) SEM images of microstructures of CPP/CS-rGO/0.3 scaffolds; (g)Ca, (h) P, (i) C and (j) N mapping images of (f)

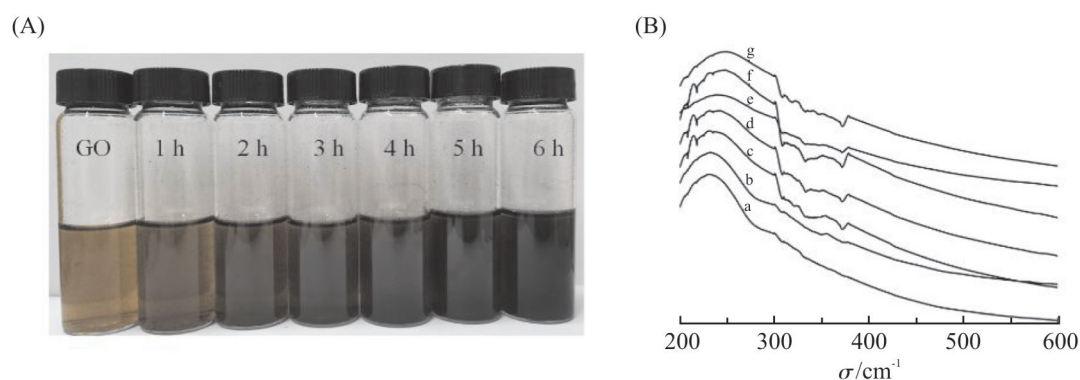


Fig.6 (A) Photographs and (B) UV spectra of reaction products at different time (a: GO;b:1 h;c:2 h;d:3 h;e:4 h;f:5 h;g:6 h)

慢慢偏移到 249.4 nm, 证明 GO 的成功还原^[6]。

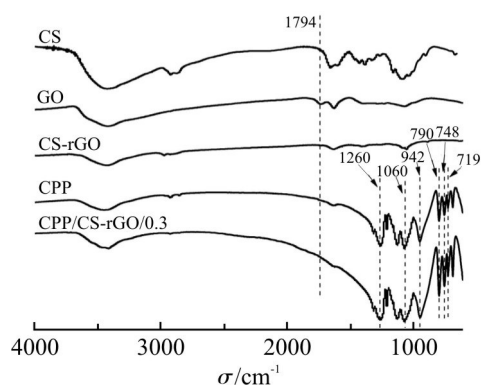


Fig.7 FT-IR spectra of CS, GO, CS-rGO, CPP and CPP/CS-rGO/0.3

2.4 红外光谱分析

Fig.7 显示了 CPP, GO, rGO, CS 和 CPP/CS-rGO/0.3 的 FT-IR 光谱。GO 曲线中 1794 cm^{-1} 处是羧基 C=O 的伸缩振动, 在 CS-rGO 曲线中, GO 的 C=O 伸缩振动的特征峰消失, 表明 GO 的羧基已被 CS 的氨基消耗。此外, 在 719 cm^{-1} , 748 cm^{-1} , 和 790 cm^{-1} 是 CPP 分子链中 P—O—P 的振动峰, 942 cm^{-1} 和 1060 cm^{-1} 分别是 PO_3^{2-} 的对称伸缩和不对称伸缩振动峰, 1260 cm^{-1} 是 PO_2 的对称伸缩振动特征峰, 证明了 CPP 的成功制备^[12]。另外, 同样的特征吸收峰出现在 CPP/CS-rGO/0.3 的曲线中, 说明在整个复合支架

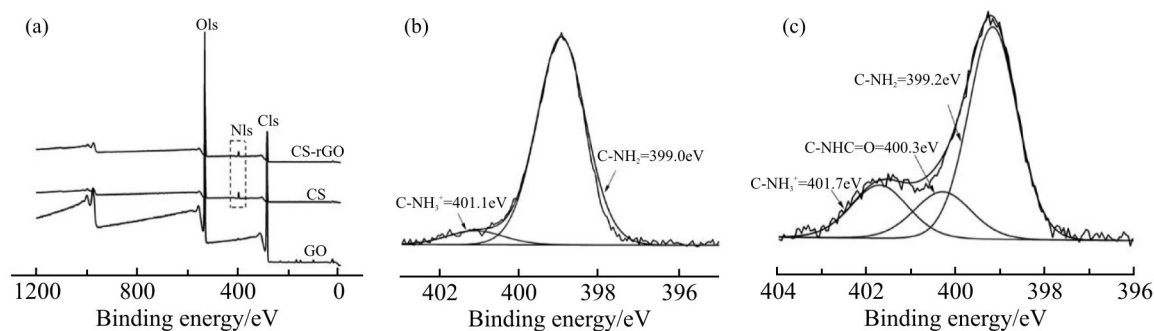


Fig.8 (a) Atomic contents of C, O, and N elements in CS, GO and CS-rGO; XPS spectra of (b) CS and (c) CS-rGO

制备的过程中, CS-rGO 的引入并没有改变 CPP 的分子链结构。

2.5 XPS 分析

通过 XPS 全谱分析 GO, CS 和 CS-rGO 中 C、O 和 N 元素的含量, 结果如 Fig.8(a) 所示, 在 CS-rGO 中出现了 CS 的特有 N 元素, 表明 CS 已成功接枝到

GO 上。Fig.8(b) 和 Fig.8(c) 分别是 CS 和 CS-rGO 的氮元素分峰谱图, CS 存在 2 个典型的特征峰 399.0 eV 和 401.1 eV, 分别对应 C—NH₂ 和 C—NH₃⁺。相比于 CS, CS-rGO 的 C—NH₂ 和 C—NH₃⁺ 发生少许偏移, 并且在 400.3 eV 出现了 C—NHCO 的特征峰, 这表明 CS 的氨基与 GO 的羧基形成了酰胺键。

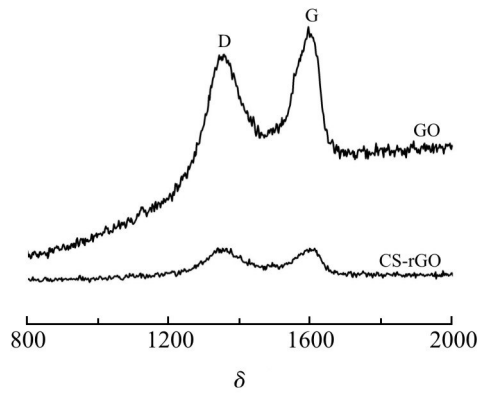


Fig.9 Raman spectra of GO and rGO

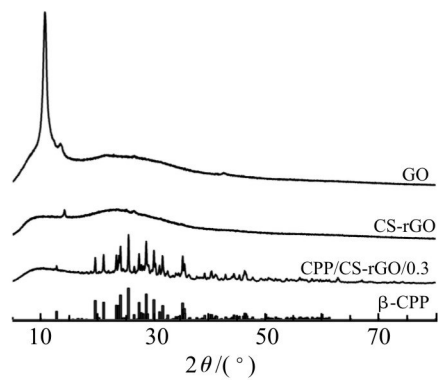


Fig.10 XRD patterns of GO, CS-rGO, CPP/CS-rGO/0.3 and β-CPP

2.6 拉曼光谱分析

石墨烯材料的拉曼光谱中存在典型的D峰和G峰，D峰代表石墨烯的缺陷及无定形结构，反映石墨烯材料中的无序程度，而G峰则代表有序的 SP^2 结构。通过拉曼光谱中D峰与G峰的强度之比，可以定性表征石墨烯材料的石墨化程度，比值越大，石墨化程度越低^[13]。GO和CS-rGO的拉曼光谱如图9所示，GO和CS-rGO典型的D峰和G峰大约在 1346 cm^{-1} 和 1595 cm^{-1} 附近，其中GO的 I_D/I_G 为0.91，CS-rGO的 I_D/I_G 为1.01，CS-rGO的 I_D/I_G 明显高于GO的 I_D/I_G ，说明了GO的成功还原。

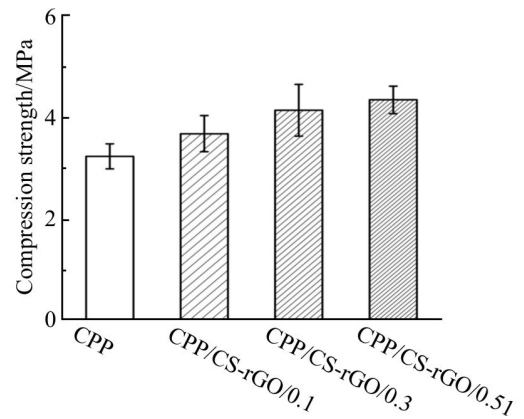


Fig.11 Compression strength of CPP, CPP/CS-rGO/0.1, CPP/CS-rGO/0.3 and CPP/CS-rGO/0.5 scaffolds

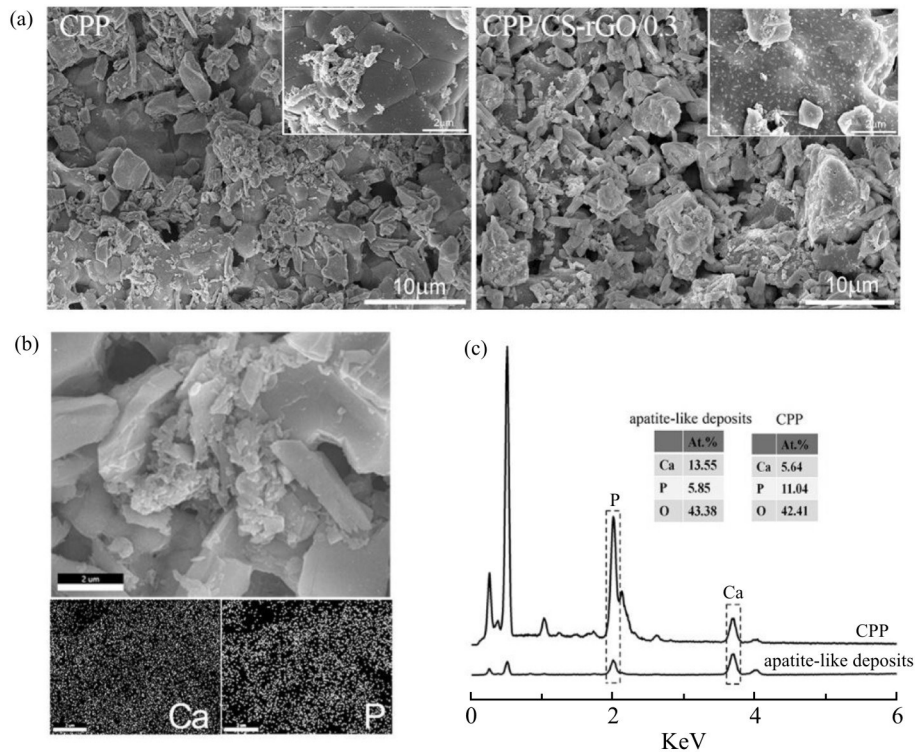


Fig.12 (a) SEM images of mineral deposited on CPP and CPP/CS-rGO/0.3 scaffolds in $1.5\times$ SBF for 14 d, the inset SEM images of (a) are higher magnification; (b) SEM and mapping images of apatite-like deposits; (c) Ca:P ratio of CPP and apatite-like deposits, the inset images in (c) are EDS mapping results

2.7 XRD 分析

从 Fig.10 可以看出, GO 的 XRD 图谱在 9.8° 处显示出典型的特征峰。这个典型的特征峰是 GO 表面含氧基团导致的特征峰, 而在 CS-rGO 的 XRD 图谱中, 这个特征峰消失, 说明了 GO 含氧基团的去除, 从而进一步证实了 GO 的还原。

另外, 之前的研究表明, 根据样品制备过程中的工艺条件, CPP 可以形成不同的相结构(无定形, α , β , γ , 可能还有 δ)。在 CPP 这些不同的相结构中, 只有 β -CPP 适合作为骨替代材料^[14]。CPP/CS-rGO/0.3 的 XRD 光谱与 β -CPP 的标准索引 XRD 图谱在对应的相同位置显示出峰值, 证实 CPP/CS-rGO/0.3 多孔支架中 β -CPP 是主导相, 说明 CPP/CS-rGO/0.3 多孔支架适合作为骨替代材料。

2.8 压缩强度

一定的力学强度对骨修复材料来说是非常重要的, 尤其当材料应用于负重部位时。Fig.11 是各种支架的压缩强度, 从图中可以看出, 随着 CS-rGO 含量的增加, 复合支架的压缩强度也在增加, 说明 CS-rGO 可以提高 CPP 多孔支架的压缩强度。一方面是因为一些 CS-rGO 嵌入小微孔中, 起到一定的支撑作用; 另一方面, CS-rGO 与 CPP 多孔支架之间的强静电作用和氢键作用也提高了 CPP 多孔支架的压缩强度。另外, 所有的支架都满足松质骨的力学要求(2~20 MPa)^[15]。

2.9 体外矿化

体外成骨生物活性通常通过模拟体液(SBF)中的生物材料表面形成磷灰石的能力来评估。本文以 CPP 和 CPP/CS-rGO/0.3 支架为例, 评估了 CS-rGO 对支架表面磷灰石形成的影响。在用 $1.5 \times$ SBF 中孵育 14 d 后, CPP/CS-rGO/0.3 支架表面的矿化沉积物明显多于 CPP 支架表面的矿化沉积物(Fig.12(a)), 这表明 CS-rGO 可以促进磷灰石在其表面的沉积, 同时, 在 CS-rGO 涂层上也观察到许多类似于羟基磷灰石晶核的物质。上述矿化沉积和羟基磷灰石的成核晶体可归因于 CS-rGO 上丰富的官能团与 SBF 中 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 之间的强相互作用。此外, CPP/CS-rGO/0.3 支架上的磷灰石样沉积物通过 EDS 图谱测试得到了进一步证实(Fig.12(b))。CPP 的钙磷比为 0.51, 而磷灰石沉积物的钙磷比约为 2.31, 与羟基磷灰石相似(Fig.12(c)), 证明了沉积物确实为磷灰石沉积物。

2.10 抗菌性能

本文以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌来 2 种模型细菌来评估 CS-rGO 涂层的抗菌性能。如 Fig.13 所示, 在支架与细菌共培养 24 h 后, CPP/CS-rGO/0.3 组中约 71% 的金黄色葡萄球菌和 66% 的大肠杆菌受到抑制, 这说明 CS-rGO 涂层对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有明显的抗菌作用。

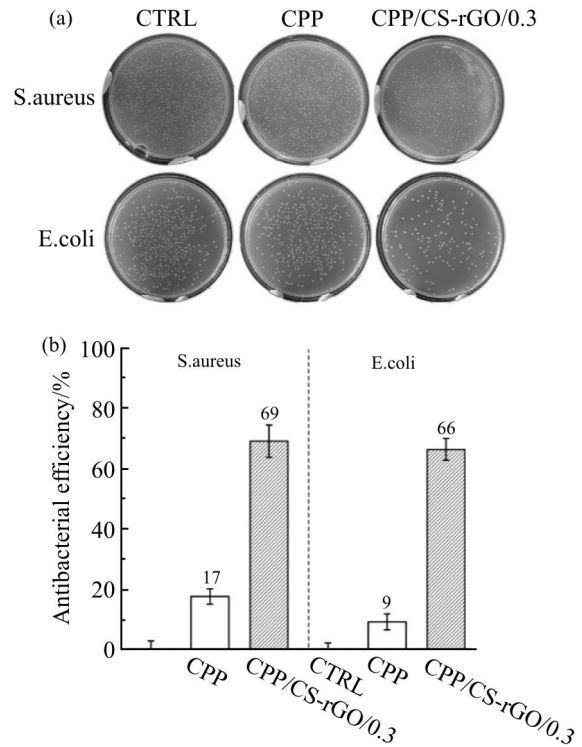


Fig.13 (a) Bacterial growth images on agar plates; (b) antibacterial activity (against *S. aureus* and *E. coli*) after incubating bacteria with scaffolds for 24 h

用 SEM 观察细菌与 CS-rGO 涂层接触后的形貌变化。从 Fig.14 的电镜图中可以看到, CPP/CS-rGO/0.3 支架表面的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌明显少于 CPP 组, 并且部分细菌轮廓边缘破裂, 这说明 CS-rGO 涂层对细菌的生长具有显著的抑制作用。此外, 在 CPP 和 CPP/CS rGO/0.3 支架表面均未观察到细菌生物膜的形成。CS-rGO 涂层可能的抗菌机理如下: 一方面, 在细菌感染的酸性环境下, CS-rGO 上的氨基质子化而带有正电荷, 正是这些正电荷可以与带负电荷的细菌膜作用, 从而杀死细菌; 另一方面, CS-rGO 与细菌接触后能够诱导氧化应激反应, 从而加大细菌细胞膜压力, 达到破坏细菌结构的作用。

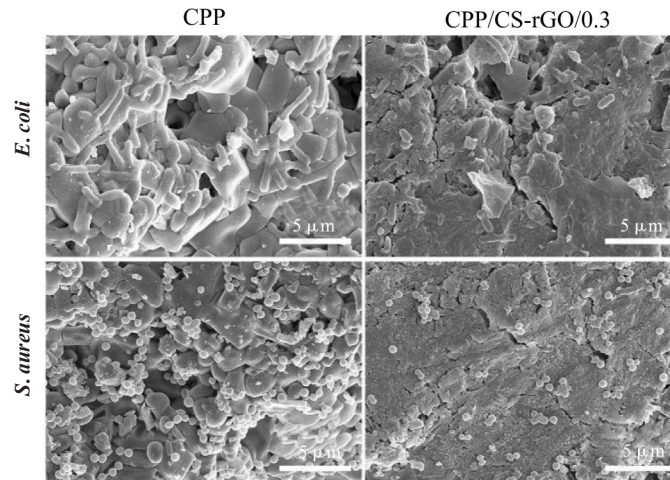


Fig.14 SEM images of bacteria attached on scaffolds

3 结论

本文通过酰胺反应成功制备了CS-rGO,并首次将其用于CPP多孔支架的表面改性,在CPP多孔支架的表面成功构建了具有抗菌作用的多功能CS-rGO涂层。结果表明,CS-rGO能够均匀稳定地分布在CPP多孔支架的表面,CS-rGO表面丰富的官能团促进了 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 的沉积,提高了CPP多孔支架的体外矿化能力。同时,CS-rGO涂层赋予了CPP多孔支架优异的抗菌性能,大大降低了骨修复过程中的细菌感染风险。总之,本文在CPP多孔支架上成功构建了多功能性的CS-rGO涂层,显著改善了CPP多孔支架的理化性能和抗菌性,制备的CPP/CS-rGO复合支架在骨修复和再生中显示出强大的应用前景。

参考文献:

- [1] Hu Y, Pilliar R, Gryn timer M, *et al.* Phase transformations during processing and in vitro degradation of porous calcium polyphosphates[J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2016, 27: 117.
- [2] Muller W E G, Wang S, Tolba E, *et al.* Transformation of amorphous polyphosphate nanoparticles into coacervate complexes: an approach for the encapsulation of mesenchymal stem cells[J]. *Small*, 2018, 14: e1801170.
- [3] Pilliar R M, Kandel R A, Gryn timer M D, *et al.* Porous calcium polyphosphate as load-bearing bone substitutes: in vivo study[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B- Applied Biomaterials*, 2013, 101: 1-8.
- [4] Pilliar R M, Kandel R A, Gryn timer M D, *et al.* Calcium polyphosphate particulates for bone void filler applications[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B- Applied Biomaterials*, 2017, 105: 874-884.
- [5] Cheng X, Wan Q, Pei X. Graphene family materials in bone tissue regeneration: perspectives and challenges[J]. *Nanoscale Research Letters*, 2018, 13: 289.
- [6] Xu L Q, Yang W J, Neoh K G, *et al.* Dopamine-induced reduction and functionalization of graphene oxide nanosheets[J]. *Macromolecules*, 2010, 43: 8336-8339.
- [7] Nizami M Z I, Takashiba S, Nishina Y. Graphene oxide: a new direction in dentistry[J]. *Applied Materials Today*, 2020, 19: 100576.
- [8] Ouyang L, Deng Y, Yang L, *et al.* Graphene-oxide-decorated microporous polyetheretherketone with superior antibacterial capability and in vitro osteogenesis for orthopedic implant[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2018, 18: e1800036.
- [9] Liu Y, Wen J, Gao Y, *et al.* Antibacterial graphene oxide coatings on polymer substrate[J]. *Applied Surface Science*, 2018, 436: 624-630.
- [10] Liu X, Song L, Li L, *et al.* Antibacterial effects of chitosan and its water-soluble derivatives on *E. coli*, plasmids DNA, and mRNA[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, 103: 3521-3528.
- [11] Di Martino A, Sittinger M, Risbud M V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering[J]. *Biomaterials*, 2005, 26: 5983-5990.

- [12] Müller W E G, Tolba E, Schröder H C, *et al.* A new polyphosphate calcium material with morphogenetic activity[J]. *Materials Letters*, 2015, 148:163-166.
- [13] Kudin K N, Ozbas B, Schniepp H C, *et al.* Raman spectra of graphite oxide and functionalized graphene sheets[J]. *Nano Letters*, 2008, 8: 36-41.
- [14] Pilliar R M, Hu X, Grynbas M D, *et al.* Processing and properties of Na- doped porous calcium polyphosphates - mechanical properties and in vitro degradation characteristics[J]. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2019, 91: 355-365.
- [15] Cabral C S D, Miguel S P, de Melo-Diogo D, *et al.* Green reduced graphene oxide functionalized 3D printed scaffolds for bone tissue regeneration[J]. *Carbon*, 2019, 146: 513-523.

Construction of Chitosan-Grafted Reduced Graphene Oxide on Calcium Polyphosphate Porous Scaffold

Hongmei Ding¹, Xu Peng², Xixun Yu¹

(1. College of Polymer Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China; 2. Experimental and Research Animal Institute, Sichuan University, Chengdu 610225, China)

ABSTRACT: Chitosan-grafted reduced graphene oxide (CS-rGO) was successfully prepared via amide reaction. Then, CS-rGO was first used as self-assembled coating for the surface modification of calcium polyphosphate(CPP) porous scaffolds. CS-rGO was characterized by FT-IR, XPS, XRD and Raman; the morphological observation indicates that CS-rGO is uniformly and stably distributed on the surface of CPP porous scaffold; the results of the mechanical experiment shows that CS-rGO can improve the compressive strength of CPP porous scaffolds; the in vitro mineralization experiment shows that CS-rGO can promote the mineralization ability of CPP porous scaffolds; the antibacterial experiment indicates that after 24 h exposure of scaffold to bacteria, about 71% of *S. aureus* and 66% of *E. coli* are inhibited in the CPP/CS-rGO/0.3 scaffold.

Keywords: calcium polyphosphate; chitosan; graphene oxide; mineralization; antibacterial properties