

# 壳聚糖/角蛋白/虎杖苷生物支架的制备及其性能的研究

杜伟斌<sup>1△</sup> 华爱兰<sup>1</sup> 沈福祥<sup>1</sup> 杨亚冬<sup>2</sup> 陈荣良<sup>1</sup> 王拓<sup>1</sup> 曹国平<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:应用冷冻干燥技术制备壳聚糖/虎杖苷/角蛋白复合支架,研究其物理化学性能。方法:采用 CCK-8 法比较 Vero、HeLa 细胞增殖抑制率,选择虎杖苷最适工作浓度;制备不同体积比壳聚糖/角蛋白基础生物支架,进行形态学观察后,选择适宜体积比基础生物支架;制备壳聚糖/角蛋白/虎杖苷生物支架,通过扫描电镜、孔隙率、吸水率、膨胀率等测定,对比物理化学性能。结果:不超过 200  $\mu\text{mol/L}$  虎杖苷浓度对细胞增殖抑制相对较低。4:6 和 3:7 体积比壳聚糖/角蛋白基础生物支架形态学更适宜。4:6 壳聚糖/角蛋白/虎杖苷生物支架孔隙最多,差异有统计学意义 ( $P<0.5$ ),且孔与孔间连通良好,孔隙率也相对更稳定。支架去酸后,4:6 组和 3:7 组吸水膨胀率,差异有统计学意义 ( $P<0.5$ ),且支架在水溶液中稳定。结论:4:6 壳聚糖/角蛋白配比含虎杖苷(最终浓度不超过 200  $\mu\text{mol/L}$ )的生物支架物理化学性能最佳,可为创面修复、软组织退肿等医用敷料的应用提供新思路。

**[关键词]** 壳聚糖;角蛋白;虎杖苷;支架材料;医用敷料;软组织损伤

**[中图分类号]** R-3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)12-0001-05

## Study of Preparation and Properties of Chitosan/ Keratin/Polydatin Biological Scaffolds

DU Weibin<sup>1△</sup> HUA Ailan<sup>1</sup> SHEN Fuxiang<sup>1</sup> YANG Yadong<sup>2</sup>  
CHEN Rongliang<sup>1</sup> WANG Tuo<sup>1</sup> CAO Guoping<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Jiangnan Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University (Hangzhou Xiaoshan Traditional Chinese Medicine Hospital), Hangzhou 311200, China;

<sup>2</sup> Hangzhou Medical College (Zhejiang Academy of Medical Sciences), Hangzhou 310013, China.

**Abstract Objective:** To prepare chitosan/polydatin/keratin composite scaffolds by freeze-drying technology and study their physical and chemical properties. **Methods:** CCK-8 method was used to detect and compare the proliferation inhibition rates of Vero and HeLa cells, and the optimal working concentration of polydatin was selected. The chitosan/keratin based biological scaffolds with different volume ratios were prepared. After morphological observation, the appropriate volume ratio of basic biological scaffolds was selected. The chitosan/keratin/polydatin biological scaffold was prepared and its physical and chemical properties were measured by scanning electron microscopy (SEM), porosity, water absorption and expansion rate. **Results:** The inhibition of cell proliferation was relatively low when the concentration of polydatin was less than 200  $\mu\text{mol/L}$ . The 4:6 and 3:7 volumes ratio of morphology of chitosan/keratin based biological scaffolds were more suitable. The 4:6 chitosan/keratin/polydatin biological scaffold had the largest pore size ( $P<0.5$ ). The pore-to-pore connectivity was good, and the porosity was relatively stable.

After the stents were deacidified, the water absorption and swelling rates of the 4:6 and 3:7 groups were significantly different ( $P<0.5$ ), and the stents were stable in aqueous solution. **Conclusion:** The biological scaffold with 4:6 chitosan/keratin ratio containing polydatin (the final concentration is no more than 200  $\mu\text{mol/L}$ ) has the best physical and chemical properties, which can provide a new idea for the application of wound repair, soft tissue swelling reduction and other medical dressings.

**Keywords:** chitosan; keratin; polydatin; scaffold material; medical dressings; soft tissue injury

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81904053)

浙江省医药卫生科技计划项目

(2020KY796, 2020KY797)

杭州市萧山区社会发展重大科技计划项目

(11216, 2019318)

<sup>1</sup> 浙江中医药大学附属江南医院(杭州萧山中医院)

(杭州, 311200)

<sup>2</sup> 杭州医学院(浙江省医学科学院)

<sup>△</sup> 通信作者 E-mail: dwbbdm@163.com

皮肤是免疫系统的重要组成部分,是外界与人体之间第一道保护屏障<sup>[1-2]</sup>。骨科临床上各种原因引起的皮肤创面或软组织损伤越来越多<sup>[3]</sup>。壳聚糖具有可降解、无毒、抑菌等优势,已广泛用于临床医学作为伤口敷料等<sup>[4-5]</sup>。角蛋白具有良好的生物相容性,是不错的环境友好型可降解材料<sup>[6-7]</sup>。现代药理学认为虎杖外敷可加速血液循环,增加血管新生,可促进骨折愈合和软组织修复等作用<sup>[8-9]</sup>。故设计制备壳聚糖/角蛋白/虎杖苷复合支架,研究其物化性能,为医用敷料的应用提供新方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

虎杖苷(CAS号27208-80-6,北京华威锐科化工有限公司,中国);角蛋白(CAS号69430-36-0,江苏艾康生物医药研发有限公司,中国);壳聚糖(CAS号9012-76-4,生工生物工程股份有限公司,中国)。冷冻干燥仪(Heto PowerDry LL3000,丹麦);扫描电镜(JSM-IT200,日本)。

1.2 方法

1.2.1 虎杖甙浓度筛选 称取虎杖苷3.9 mg,加入1 mL无水乙醇,充分混匀,溶解,放-4℃储存。用Vero、HeLa细胞进行药物的细胞毒性实验。

两种细胞复苏后待长满瓶底,分别用0.25%胰蛋白酶消化后,培养基吹打成单细胞悬液,细胞计数板计数,细胞悬液浓度为 $1\times10^6$ 个/mL,稀释10倍,以 $1\times10^5$ 个/mL的浓度铺于96孔板,每孔100 μL,37℃培养箱过夜后,用培养基将虎杖甙稀释成浓度分别为50,100,200,400,800,1 600 μmol/L,单加培养基作为正常对照组,最高浓度药物组药液相同浓度乙醇作为空白对照组,每孔200 μL,每组设置4个孔。作用48 h后,采用CCK8法检测细胞增殖情况,各孔加入10 μL CCK-8试剂,混匀后放于CO<sub>2</sub>培养箱培养,3.5 h后酶标仪450 nm波长处检测。计算比较细胞增殖抑制率,选取虎杖甙最适浓度进行后续实验。

1.2.2 壳聚糖/角蛋白生物支架的制备 采用2.0%的壳聚糖乙酸溶液和1.5%角蛋白溶液以体积比分别为10:0,5:5,4:6,3:7,2:8进行制备后冻干,体积比=V(2.0%壳聚糖)/V(1.5%角蛋白),见表1。上述配制的生物支架冻干8 h后进行形态学观察,选择相对适宜比例生物支架进行后续对比试验。

1.2.3 壳聚糖/角蛋白/虎杖苷生物支架的制备 最后选用2.0%的壳聚糖乙酸溶液与1.5%角蛋白溶液体积比为4:6和3:7的支架,200 μmol/L浓度的虎杖苷进行后续实验。各加入10 mmol/L的虎杖苷乙醇溶液260 μL,并用0.1 mol/L乙酸溶液将体积补齐至13 mL,铺于12孔板,各6孔,每孔2 mL。冻干后支架

表1 不同体积比中壳聚糖/角蛋白的含量

体积比	物质含量
10:0	20 mg 壳聚糖+0.1 mmol/L 乙酸溶液 1 mL
5:5	10 mg 壳聚糖+0.1 mmol/L 乙酸溶液 1 mL+7.5 mg角蛋白
4:6	8 mg 壳聚糖+0.1 mmol/L 乙酸溶液 1 mL+9 mg角蛋白
3:7	6 mg 壳聚糖+0.1 mmol/L 乙酸溶液 1 mL+10.5 mg角蛋白
2:8	4 mg 壳聚糖+0.1 mmol/L 乙酸溶液 1 mL+12 mg角蛋白

用2.0% NaOH浸泡30 min,再用双蒸水浸泡,每30 min换液,共8次,洗去残留NaOH,待浸泡液pH值为7.0左右,预冷冻后再次冻干,进行形态学观察比较。

1.2.4 生物支架扫描电镜观察 将2.0%的壳聚糖乙酸溶液和1.5%角蛋白溶液以体积比分别为4:6,3:7,200 μmol/L浓度的虎杖苷,制备的支架材料冻干后进行电镜扫描。切取约2 mm厚的支架横截面,用导电双面胶粘在金属托架上,喷铂金后,在扫描电镜下观察比较生物支架的内部结构、孔隙及孔径大小。

1.2.5 生物支架孔隙率和吸水率测定 在10 mL的量筒中加入适量的无水乙醇,体积记为V<sub>1</sub>,将支架切成适当大小投入其中,静置5 min,使支架完全被无水乙醇浸透且表面无明显气泡,此时的总体积记为V<sub>2</sub>;取出支架,试管中剩余的无水乙醇体积记为V<sub>3</sub>。每个样本测试3次,取平均值,两组进行比较。支架孔隙率k按下列公式计算: $[k=(V_1-V_3)/(V_2-V_3)]\times100\%$ 。

1.2.6 生物支架吸水膨胀率测定 取冻干好的支架,两组的取量为12孔板制成支架的整片,称质量记为m<sub>0</sub>,室温浸没在0.01 mol/L PBS(pH7.2)中30 min,取出后称量,记为m。每个样品测三次,取平均值,两组进行比较。吸水率按照下列公式计算: $x=[(m-m_0)/m_0]\times100\%$ 。

1.3 统计学方法

使用SPSS 22进行统计学分析。正态分布、方差齐的定量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较应用独立样本t检验。非正态分布或(且)方差不齐的定量资料,比较采用秩和检验。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同虎杖苷浓度对细胞增殖抑制率的影响

当虎杖苷浓度大于200 μmol/L时,细胞出现增殖抑制现象,提示在制作模型时选用的药物浓度最好不超过200 μmol/L(见图1)。

2.2 不同比例壳聚糖/角蛋白生物支架制备后大体观

去酸前支架色泽较白,较疏松,去酸后可观察到支架色泽较去酸前略显淡黄,体积有所缩小,孔隙较去酸

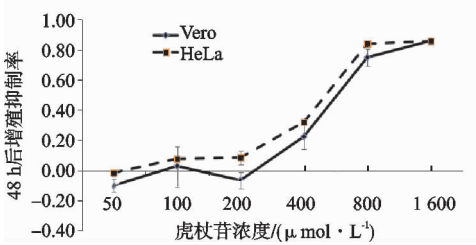


图1 虎杖苷作用两种细胞 48 h 后细胞增殖抑制率比较

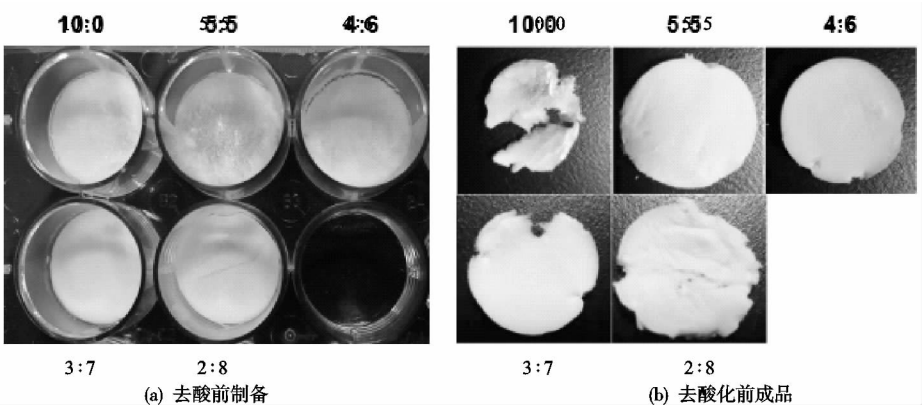


图2 不同比例壳聚糖/角蛋白生物支架去酸化前制作过程大体观察

础,制备成壳聚糖/角蛋白/虎杖甙生物支架,然后进行未脱酸和脱酸后大小、形态的比较,发现支架脱酸后明

显缩小,质地也更加具有韧性,颜色变黄(见图3)。

2.4 生物支架电镜结果

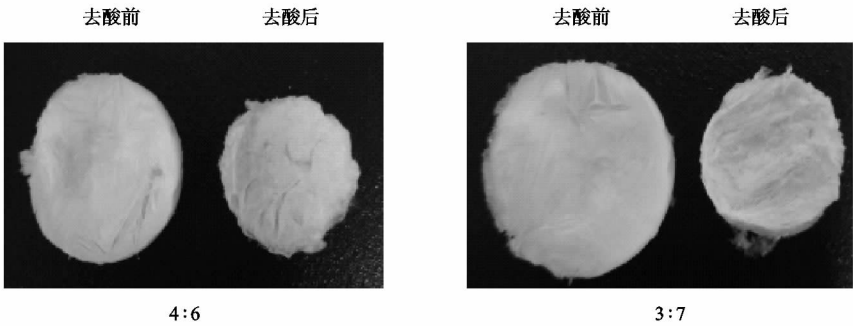


图3 不同比例壳聚糖/角蛋白/虎杖苷生物支架去酸前后大体观察

壳聚糖/角蛋白配比在 4:6 时,支架材料孔隙最多,且孔与孔间的连通良好(图 4a 为电镜下放大 140 倍表面观,图 4c 为电镜下放大 500 倍表面观)。壳聚糖/角蛋白配比在 3:7 时,随着壳聚糖含量减少,塑形能力下降,孔隙间的梁上有很多不溶于水的颗粒沉积,造成孔隙成型差,孔径相对较小(图 4b 为电镜下放大 140 倍表面观,图 4d 为电镜下放大 500 倍表面观)。

2.5 生物支架孔隙率测定结果

4:6 和 3:7 组支架去酸前后孔隙率组内比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但两组去酸后的孔隙率明显增加。4:6 组去酸前比 3:7 组去酸前孔隙率高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而去酸后两组组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),且 4:6 组孔隙率高于 3:7 组。说明 3:7 组支架孔隙在不同 pH 值处理后变化较大,4:6 组去酸前后孔隙率相对较稳定,且均高于

3:7 组,提示在应用时选用 4:6 配比的支架较好,见表 2。

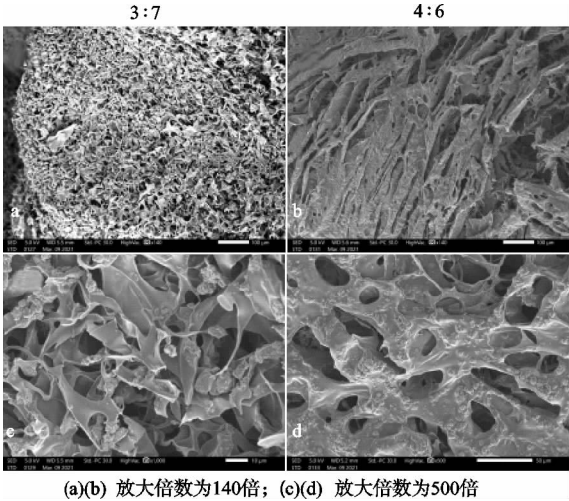


图4 壳聚糖/角蛋白不同体积配比配制的支架电镜图

表 2 不同体积配比配制的支架去酸前后孔隙率比较(±s)

体积比	去酸前/%	去酸后/%	<i>t</i>	<i>P</i>
4:6	72.76±1.16	75.48±4.30	1.058	>0.05
3:7	66.06±4.08	71.03±4.18	1.474	>0.05
<i>t</i>	2.736	1.285		
<i>P</i>	<0.05	>0.05		

2.6 生物支架吸水膨胀率测定

去酸前 4:6 与 3:7 组均在 10 min 水浴后化为溶胶(壳聚糖)及沉淀状(角蛋白),提示该材料配比制备的支架极易溶于水中。两种比例的复合支架有较好孔

隙率,吸水后质量可达到原来的 16~18 倍,具有非常好的吸水性。支架去酸后,4:6 组吸水率比 3:7 组小,组间差异有统计学意义(*P*<0.05),且支架在水溶液中稳定,不会出现支架溶化的现象,见图 5 及表 3。

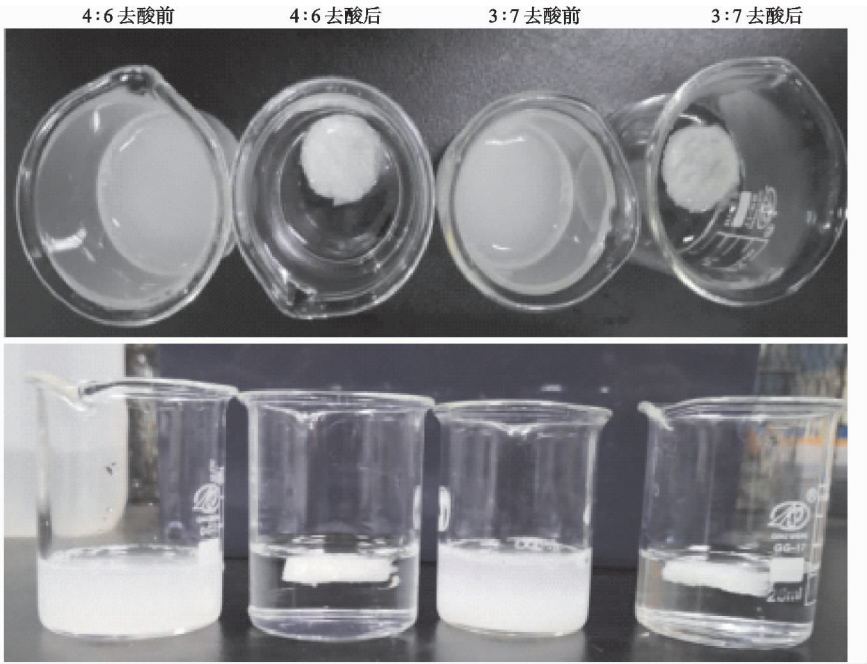


图 5 不同体积配比配制的支架去酸前后水溶液中形态比较

表 3 不同体积配比配制的支架去酸后吸水膨胀率比较

体积比	<i>m</i> <sub>0</sub> /mg	<i>m</i> /mg	<i>x</i> /%	<i>x</i> /%( $\bar{x}\pm s$ )
4:6	13.7	298.9	2 016.06	2 007.12±30.56
	14.9	317.7	2 032.21	
	13.0	269.5	1 973.08	
3:7	16.1	360.3	2 137.89	2 109.94±42.26
	10.6	229.1	2 061.32	
	14.7	327.9	2 130.61	
<i>t</i>				3.415
<i>P</i>				<0.05

3 结论

目前全球老龄化加剧,近 10 年我国人口老龄化增长率在 11%~17%之间,而皮肤损伤、外伤后引起的软组织肿胀问题也随之增加,尤其是创面护理和愈合问题越来越受到关注。医用敷料在加速伤口愈合,预防和治疗感染等方面具有优良特性。据相关研究指出,医用敷料的交易市场值预计在 2021 年将达到近 238 亿元<sup>[10-11]</sup>。干性纱布类敷料最常用的传统医用敷料,其来源广泛、成本低廉但存在破坏创口生长因子,无法有效阻挡外界病原菌的入侵的缺点。而生物材料

的医用敷料有着自己独特的优势,主要包括胶原蛋白敷料、海藻酸盐敷料和壳聚糖敷料等<sup>[12-13]</sup>。

壳聚糖是甲壳素经处理脱乙酰基后的多糖物质,国内外研究已表明,壳聚糖具有良好的生物相容性和生物降解性,能止血、消疤、抗感染、促愈和解除术后黏连等作用。其可单独制成薄膜或与其它高分子材料(胶原、明胶、透明质酸等),通过物理方法(共混、多层复合)或化学方法(交联、接枝共聚)制备成复合膜,而发挥协同作用<sup>[14-15]</sup>。脊椎动物上皮细胞中存在的角蛋白是最丰富的非食用蛋白质之一,其中具有大量的二

硫键,可使其表现出比其他生物材料高的机械强度。而角蛋白内包含的细胞粘附序列,又有利于细胞粘附、分化和增殖,是较好的生物相容性材料。相关研究指出,角蛋白相关医用敷料可通过生长因子进行生物功能化,促进创面早期血管化,促进皮脂腺早期形成,实现创口加速愈合<sup>[16-17]</sup>。传统中药虎杖能散瘀止痛、清热利湿,可用于关节痹痛、水火烫伤、跌扑损伤、痈肿疮毒等,其有效成分虎杖苷能促进伤口成纤维细胞的增殖,起到抗炎抑菌等作用,已广泛用于促进创伤创面的愈合研究。

本研究从创面修复、软组织退肿等医用敷料这一热点出发,基于壳聚糖、角蛋白、虎杖甙这三种物质的性能优势,应用冷冻干燥技术制备复合生物支架,选择探索最佳制备配比方案,研究了支架的细胞毒性、外观结构、孔隙率和吸水膨胀率。结果显示:1)虎杖甙浓度不超过 200  $\mu\text{mol/L}$  时,对 Vero 和 HeLa 细胞增殖无明显影响,而超过 200  $\mu\text{mol/L}$  时,细胞增殖明显被抑制,提示选用虎杖甙浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$  作为支架配比,在不损伤机体细胞的同时,可能将发挥虎杖甙清热解毒,散瘀定痛最佳功效。2)采用 2.0% 的壳聚糖乙酸溶液和 1.5% 角蛋白溶液以体积比 4:6 制备含虎杖甙(最终浓度 $<200 \mu\text{mol/L}$ )的支架孔隙最多,韧性塑形能力好,且孔与孔间连通良好,孔隙率也相对更稳定。支架去酸后,4:6 组和 3:7 组吸水膨胀率有显著差异( $2\ 007.12 \pm 30.56$  对  $2\ 109.94 \pm 42.26$ ,  $P < 0.5$ ),且支架在水溶液中稳定,提示 4:6 壳聚糖/角蛋白制备含虎杖甙(最终浓度 $<200 \mu\text{mol/L}$ )的支架可能是构建创面修复、软组织消肿等人工敷料的最佳配比,可以达到最佳效果。

综上所述,本研究通过冷冻干燥技术制备的 4:6 壳聚糖/角蛋白配比含虎杖甙(最终浓度不超过 200  $\mu\text{mol/L}$ )生物支架具有低细胞毒性,良好的孔隙空间结构和稳定的塑形能力。改生物支架材料可作为外用敷料,在皮肤修复及软组织消肿等应用中具有一定潜能。但本次支架发挥作用的内在机制及实体动物实验研究产生的实际性能有待进一步明确。

# 参考文献

- [1] DU W, HE L, WANG L, et al. Experimental vascular protective shield combined with vacuum sealing drainage prevents pressure on exposed vessels and accelerates wound repair[J]. Ann Palliat Med, 2020, 9(5): 3059-3069.
- [2] SU L, ZHENG J, WANG Y, et al. Emerging progress on the mechanism and technology in wound repair[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117: 109191.
- [3] DU W, BAO G, HU H, et al. An mRNA sequencing anal-

- ysis of the healing-promoting role of electroacupuncture a in rat skin wound model[J]. Ann Palliat Med, 2020, 9(4): 1462-1475.
- [4] 刘嘉鑫,安丽萍,贾耀飞,等.壳聚糖表面改性钛合金材料的研究进展[J].中国骨伤,2020,33(12):1175-1178.
- [5] 廖筱梅,罗兴前,代蕾,等.脂肪间充质干细胞-壳聚糖凝胶复合物治疗大鼠深 II 度烫伤创面实验研究[J].中国修复重建外科杂志,2019,33(1):101-108.
- [6] 孙晓霞,鲍艺,彭黔荣,等.角蛋白生物材料在创伤愈合中的应用研究进展[J].材料导报,2020,34(7):7161-7167.
- [7] 郭菊花,李涛,赵婷婷,等.角蛋白改性材料及其应用研究进展[J].高分子通报,2014(4):16-23.
- [8] 杨豪杰,曹涤平,卢子瑄,等.清热利湿方及虎杖苷对 SD 大鼠肛旁创面愈合作用的研究[J].上海中医药杂志,2017,51(5):86-92.
- [9] 卞徽宁,孙传伟,陈华德,等.虎杖苷对成纤维细胞生物学特性的影响[J].中国组织工程研究,2012,16(33):6111-6115.
- [10] OBAGI Z, DAMIANI G, GRADA A, et al. Principles of wound dressings: a review[J]. Surg Technol Int, 2019, 10(35): 50-57.
- [11] CHADWICK P, OUSEY K. Bacterial-binding dressings in the management of wound healing and infection prevention: a narrative review[J]. J Wound Care, 2019, 28(6): 370-382.
- [12] 刘嘉鑫,安丽萍,贾耀飞,等.壳聚糖表面改性钛合金材料的研究进展[J].中国骨伤,2020,33(12):1175-1178.
- [13] 邓金星,林君德,邓飞扬.纳米银医用抗菌敷料、康复新液与湿润烧伤膏联合应用治疗 IV 期压疮的疗效分析[J].中国烧伤创疡杂志,2020,32(4):245-247.
- [14] BAIDAMSHINA D R, KOROLEVA V A, TRIZNA E Y, et al. Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized Ficin[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 164: 4205-4217.
- [15] TAN Y, MA S, LEONHARD M, et al. Enhancing anti-biofilm activity with functional chitosan nanoparticles targeting biofilm cells and biofilm matrix[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 200: 35-42.
- [16] KONOP M, SULEJCZAK D, CZUWARA J, et al. The role of allogenic keratin-derived dressing in wound healing in a mouse model[J]. Wound Repair Regen, 2017, 25(1): 62-74.
- [17] KONOP M, CZUWARA J, KŁODZINSKA E, et al. Evaluation of keratin biomaterial containing silver nanoparticles as a potential wound dressing in full-thickness skin wound model in diabetic mice[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2020, 14(2): 334-346.

(收稿日期:2021-06-26)