

学校编码: 10384
学号: 24520071152515

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

壳聚糖-多壁碳纳米管复合膜
的制备及其生物相容性研究

Preparation of CS-MWNT and its biocompatibility

韩 敏

指导教师姓名: 张其清 教授/博导

叶社房 副教授

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2010 年 4 月

论文答辩时间: 2010 年 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

本研究利用壳聚糖和碳纳米管具有生物活性及对骨细胞的高亲和性,从组成和结构仿生的思路出发,把无机碳纳米管与有机壳聚糖两种材料复合,制备出界面结合好、溶解性好、稳定性好和分散性高的壳聚糖共价接枝碳纳米管复合膜,得到具有生物活性和生物相容性,能够促进骨细胞增殖、分化和引导骨组织器官再生的骨修复材料。

以壳聚糖和多壁碳纳米管为材料,用混酸对多壁碳纳米管表面进行羧基化修饰,使其与含有氨基的壳聚糖发生酰化反应,制备出一种新型的壳聚糖共价接枝碳纳米管复合膜,并探讨温度、pH 值、乙酸浓度和材料配比等条件对制备复合膜的影响;采用透射电镜 (TEM)、扫描电镜 (SEM)、红外光谱 (FTIR)、X 射线光电子能谱 (XPS)、X 射线衍射图谱 (XRD) 和热重分析 (TGA) 等对其进行表征。通过体外模拟矿化和复合膜与成骨细胞体外共同培养实验评价壳聚糖共价接枝碳纳米管复合膜的生物活性和生物相容性。采用 XRD、SEM、EDS、FTIR 和 TGA 对矿化沉积物进行表征和鉴定,并分析矿化过程中复合膜的重量变化、溶胀情况及其对 pH 值的响应性。采用 WST-1 法检测成骨细胞在复合膜上的增殖情况;采用 SEM 观察成骨细胞在复合膜表面的形态。

研究表明,共价接枝方法能够提高壳聚糖与多壁碳纳米管两相之间的结合力。TEM 结果发现,功能化多壁碳纳米管的端口和侧壁都有壳聚糖包裹,壳聚糖包裹能有效防止碳纳米管的团聚现象。SEM 表征壳聚糖共价接枝碳纳米管复合膜的表面形貌较为平整。壳聚糖共价接枝碳纳米管直径增大证实,壳聚糖对碳纳米管已经形成包裹。FTIR 和 XPS 分析表明,通过酰胺键壳聚糖已经共价接枝到碳纳米管的表面;XRD 结果则表明,壳聚糖高度分散在碳纳米管表面,并且与其发生了相互作用。TGA 对壳聚糖共价接枝碳纳米管复合膜定量分析结果证明,接枝在多壁碳纳米管表面壳聚糖的接枝率约为 75.6%。壳聚糖共价接枝碳纳米管复合膜在体外模拟环境中的矿化性能良好。在模拟体液中,壳聚糖逐渐发生降解,同时复合膜诱导沉积纳米级弱结晶的碳酸羟基磷灰石层。XRD 结果表明,壳聚糖共价接枝多壁碳纳米管复合膜在模拟体液中浸泡后表面形成白色沉积

层，其主要成分为新生的类骨磷灰石；随矿化时间的延长，类骨磷灰石的 XRD 特征峰不断增强；EDS 谱图中 Ca、P 吸收峰的出现进一步证明磷灰石层的沉积；FTIR 结果表明，沉积层的成分为碳酸取代的羟基磷灰石；SEM 表征矿化后复合膜表面新生类骨磷灰石层的形貌，类骨磷灰石层随矿化时间的延长而增多、增厚；达到 4 周时复合膜表面几乎完全被白色磷灰石层覆盖，此时的磷灰石层是由纳米级片状晶体交错排列组成，其结构呈珊瑚状或多孔网格状。壳聚糖膜、壳聚糖共价接枝碳纳米管复合膜分别与成骨细胞进行体外共同培养的结果表明，与壳聚糖膜相比，复合膜与成骨细胞表现出较好的亲和性。成骨细胞在复合膜表面铺展良好，与复合膜形成紧密结合。成骨细胞形态正常、分化良好、增殖状态较旺盛。体外模拟矿化及成骨细胞共同培养的研究结果提示，壳聚糖共价接枝碳纳米管复合膜具有良好的生物活性和生物相容性。

关键词：壳聚糖；多壁碳纳米管；骨修复材料；生物相容性

Abstract

The thought and main points of the design for Carbon nanotubes/chitosan composite were put forward according to structural feature of nature bone which is made of inorganic and organic, since both carbon nanotubes and chitosan are attractive biocompatibility and biological activity to osteoblast.

A novel Chitosan grafted multiwalled carbon nanotubes film (CS-MWNT) was prepared through covalently grafting a biocompatible polymer chitosan (CS) onto the surfaces of multiwalled carbon nanotubes (MWNT). The effect of temperature, pH, acid concentration and the ratio of materials were studied to test the solubility and dispersion of Chitosan-grafted multiwalled carbon nanotubes. The CS-MWNT was characterized by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), X-ray diffraction (XRD) and thermogravimetry analysis (TGA). Their morphology as analysed by scanning electron microscopy (SEM) and Transmission electron microscopy (TEM). The mineralisation and cell viability were done to test the biocompatibility and biological activity of CS-MWNT.

CS played a significant role in coating on the surface of MWNT, because its amino group could act with carboxyl group from CS to form a chemical bond at organic-inorganic interface. The covalent modification overcame the issue of poor interfacial bonding and resulted in beneficial and stable dispersibility of MWNT. TEM indicated that both the top and the side of MWNT were coated with polymer chains, which was also proved by the increased diameter of CS-MWNT in SEM. FTIR and XPS showed absorption peaks of amide group, concluding that the CS was covalently grafted onto MWNT. TGA data furnished quantitative information on the degree of functionalization. Combining XRD, SEM, EDS, FTIR and TGA results, it was proved that the spherical apatite with weak crystallinity formed on the surface of CS-MWNT after soaking in a simulated body fluid (SBF). With immersion time prolonged, the size and crystallinity of apatite increased. The crystals were partially

substituted with carbonate, namely bone-like apatite which played a very important role in the regeneration of bone. In the cell test, no cytotoxicity was observed while osteoblasts were cultured on CS-MWNT. Whereas the morphology and density of cells on CS-MWNT were better than those on CS film. The mineralisation and cell viability test showed CS-MWNT had good potential for orthopedic surgery as its nice in vitro biocompatibility.

Key words: chitosan; multi-walled carbon nanotubes; bone repair materials; biocompatibility

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
第一章 绪论.....	1
1.1 引言	1
1.2 骨与骨修复材料	1
1.3 碳纳米管	5
1.4 壳聚糖	10
1.5 碳纳米管/壳聚糖复合材料	12
1.6 本研究的立论依据和研究内容	14
参考文献	16
第二章 壳聚糖共价接枝多壁碳纳米管复合膜的制备与表征.....	23
2.1 引言	23
2.2 实验	24
2.2.1 实验材料和仪器	24
2.2.2 实验方法	25
2.3 结果与讨论	29
2.3.1 多壁碳纳米管的酸化	29
2.3.2 反应条件对 CS-MWNT 制备的影响	30
2.3.3 CS-MWNT 的理化表征	36
2.4 本章主要结论	44
参考文献	46
第三章 壳聚糖共价接枝多壁碳纳米管复合膜生物相容性研究.....	50
3.1 引言	50
3.2 实验	52

3.2.1 实验原料及仪器	52
3.2.2 实验方法	54
3.3 结果与讨论	58
3.3.1 CS-MWNT 在模拟体液矿化结果分析	58
3.3.2 CS-MWNT 细胞相容性评价	67
3.4 本章主要结论	72
参考文献	73
第四章 全文主要结论	76
硕士期间发表论文	77
致 谢	78

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Reviews	1
1.1 Introduction	1
1.2 Bone and bone repairing materials	1
1.3 Carbon nanotube (CNT)	5
1.4 Chitosan (CS)	10
1.5 CNT/CS	12
1.6 Main focus of this dissertation	14
References	16
Chapter 2 Preparation of CS-MWNT	23
2.1 Introduction	23
2.2 Experiment	24
2.2.1 Materials	24
2.2.2 Method	25
2.3 Results and discussion	29
2.3.1 Oxidization of MWNTs	29
2.3.2 Influence of preparation conditions	30
2.3.3 Characterization of CS-MWNT	36
2.4 Summary	44
References	46
Chapter 3 Biocompatibility of CS-MWNT	50
3.1 Introduction	50
3.2 Experiment	52

3.2.1 Materials	52
3.2.2 Method	54
3.3 Results and discussion	58
3.3.1 Mineralization of CS-MWNT in SBF	58
3.3.2 Cytocompatibility of CS-MWNT	67
3.4 Summary	72
References	73
Chapter 4 Conclusions	76
硕士期间发表论文.....	77
致 谢	78

第一章 绪论

1.1 引言

骨是一种天然具有复杂分级结构的无机物与有机物的复合材料^[1-2]。骨病缺损是临床上的常见病，自体或异体骨是当前骨修复的主要材料之一。自体骨虽然易被患者接受，但患者需要二次手术，会带来新的损伤，并且数量有限；异体骨取材简便，但是在生物安全性上存在着隐患，患者可能对其产生免疫排斥，并且可能因外源骨材料植入而感染上某种已知或未知的病毒^[3-5]。所以，临床上越来越广泛地采用人工制备的材料作为骨修复材料。

研制理想的骨修复材料，是医学和生物材料科学领域的一个重要课题。近年来，各种人工制备的生物材料取得很大的进展，尤其是随着细胞生物学和生物材料学的发展，组织工程作为一门跨学科综合研究的生物科学应运而生。障碍或丧失治疗的问题。骨组织是临床上能以再生方式完成损伤修复（骨折愈合等）的少数组织之一，其中最关键的是膜引导骨组织再生术的实际应用。膜引导骨组织再生术的原理是利用生物膜的物理屏障功能将骨病缺损区与周围组织隔离，创造一个相对封闭的组织环境，阻止上皮和纤维组织长入骨创区，保证理想的骨再生愈合空间，保护骨组织细胞增殖修复，促进骨创区良好快捷地愈合，使骨组织的再生功能得到最大程度的发挥^[6-7]。这种由膜引导的骨修复过程属于自然的骨再生过程，组织自身的修复潜能受到诸多因素影响，因而利用组织工程技术，选择适合的细胞和膜材，使其既能加速骨病缺损的修复又能恢复骨骼的原有结构和功能是非常重要的。膜引导骨组织再生术的研究为骨重建外科开辟新的治疗途径。

1.2 骨与骨修复材料

1.2.1 骨

骨与其它结缔组织基本相似，也由细胞、纤维和基质三种成分组成。骨的最大特点是细胞基质具有大量的钙盐沉积，成为很坚硬的组织，构成人体骨骼系统。

骨组织细胞包括成骨细胞、骨细胞和破骨细胞。而骨基质由胶原、非胶原蛋白、蛋白多糖类、脂质和磷酸钙（主要是结晶度很差的羟基磷灰石）等组成。骨作为一种复合材料，主要由无机羟基磷灰石和有机胶原组成。骨组织为内脏器官提供保护，提供肌肉附着点，组成骨骼系，维持人的正常形体与保护脏器并支持运动；并参与机体钙、磷的代谢，具有较强的重建、修复功能。图 1-1 是骨结构的示意图。

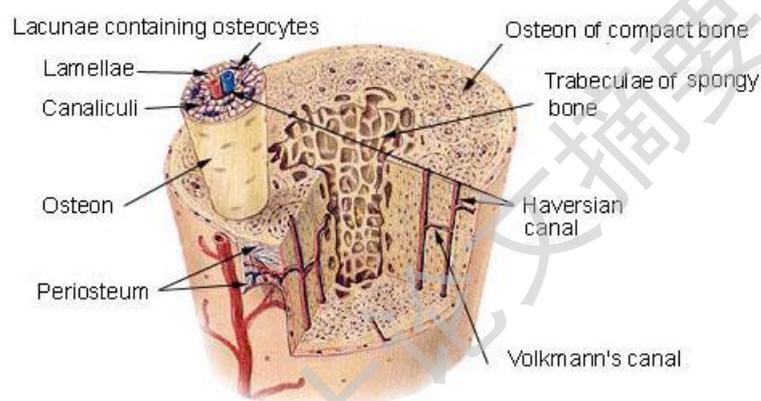


图 1-1 骨结构示意图^[2]

Figure 1-1 Bone Structure.

1.2.2 骨修复材料

理想的骨修复材料（Osteoinductive Material）必须考虑以下两个因素；第一，作为骨组织再生依托的支架材料和模板需得到优化和发展，使其能黏附和容纳软骨细胞、骨原细胞、成骨细胞等骨组织细胞及微血管，调控成骨细胞功能，释放骨生长因子，提供活体细胞生存所需的营养通道，最终在体内形成有生命的再生骨。第二，体外培养干细胞、骨组织细胞，分离或合成骨生长生物化学信号分子（如骨生长因子），并确保细胞及生长因子在体内存活或保持活性。

生物材料与工程材料不同，人体免疫系统会对植入体进行攻击，包括排异反应、产生肿胀和疼痛等；或者植入体对肌体具有有害作用，包括毒性、组织发炎、致畸甚至诱发癌变等。因此，除了材料的其他作用和性能要求之外，生物相容性是生物材料必须具备的重要条件，尤其是那些直接与植入功能相关的材料。生物相容性包括被其周围的组织和整个人体系统对植入体的接受与容纳。生物相容的

材料不会引起周围组织的兴奋，不会激起感染和过敏，不会导致细胞癌变。生物材料是否能够在机体内成功应用，与材料的结构、力学性能、化学稳定性以及生物相容性等密切相关，同时还受手术技术、患者健康状况与行为等因素的影响。

骨修复材料从其化学组分来划分，一般分为五种：医用金属材料，医用陶瓷材料，医用高分子材料和医用复合材料^[8]。

(1) 医用金属材料

金属材料 (Metallic materials) 是最早被采用的生物材料。从最初的金，银，铂等贵金属到现在的各种合金，因为其具有较高的强度和韧性，在骨替代修复方面有较长的应用历史。目前，常用的骨修复金属材料有不锈钢，钴基合金和钛基合金^[9-11]。

尽管医用金属具有一定的生物相容性，但本身缺乏生物活性，因此很难与周围的骨形成良好的骨键和。目前，通过对金属表面改性的方法可以解决这个问题，例如采用表面等离子喷涂等方法制备羟基磷灰石的陶瓷涂层，使金属表面具有生物活性。

(2) 医用生物陶瓷材料

生物陶瓷 (Bioceramics) 化学性质稳定，具有良好的组织相容性。根据生物陶瓷在人体内的反应情况，将其分为两类：生物惰性陶瓷和生物活性陶瓷。

生物惰性陶瓷是指化学稳定性好，无毒性，但在其周围将形成不同厚度的纤维组织包裹层。这层纤维膜与种植体之间不是紧密结合的，容易发生微小滑动，甚至松动断裂。生物活性的概念是指植入体与机体组织之间不会形成纤维包裹，不被机体排斥，而是与宿主组织形成化学键和^[12]。生物活性陶瓷能够在生理环境中逐步被降解和吸收；或者能够与机体组织之间形成稳定的化学键合，形成紧密的化学结合层，阻止种植体在体液中被腐蚀，提高种植体的使用寿命。常见的生物活性陶瓷有羟基磷灰石， α -TCP 以及 β -TCP 等，并已广泛用于临床^[13-15]。

然而，可降解生物陶瓷的降解速度受宿主个体差异，植入部位变化等因素影响，与骨形成速度难达到一致。因此，要制备一种能实现生物降解、吸收与新骨替换同步进行的可降解生物陶瓷是相当困难的。

(3) 医用高分子材料

高分子材料 (Polymeric materials) 曾被广泛用作骨修复材料。用于硬组织修复的高分子材料可分为人工合成聚合物和天然高分子材料两类。

人工高聚物可分为不可降解聚合物和可降解聚合物。不可降解聚合物有聚乙烯和聚甲基丙烯酸甲酯等, 一般不单独使用。在临床使用中, 聚甲基丙烯酸甲酯聚合期间会导致局部温度较高杀死细胞, 在体液中也会释放毒气。可降解聚合物主要有聚乳酸、聚乙醇酸和聚丙交酯等, 应用较广泛, 可用于口腔外科、骨固定以及骨填充等。但其生物相容性差, 疏水性又导致细胞难以粘附, 使用过程中易老化, 降解速度难于控制等问题^[16-17]。

天然高分子聚合物包括胶原、纤维蛋白、几丁质和藻酸盐等。这些天然高分子生物相容性好, 利于细胞黏附、增殖以及分化。但也存在机械强度差、不易大量获取等缺点。胶原还存在生理学性质不稳定和外来胶原引起的免疫反应等问题。因此难以单独作为骨修复材料。

(4) 医用生物衍生材料

医用生物衍生材料 (Biomedical bio-derived materials) 是经特殊处理的生物组织所形成的一类材料, 包括维持组织原有构型, 仅消除其免疫排斥反应的较轻微处理过的组织, 如经戊二醛处理定型的猪心瓣膜、牛心包、人颈动脉、脐动脉、冻干的骨片等, 以及经拆散原有构型处理的再生胶原、壳聚糖、透明质酸等的粉体、纤维膜、海绵体、凝胶等。其结构与人体组织极为相似, 生物相容性好, 但是目前尚处于起步研究阶段。其制备的困难和临床运用仍是今后需要解决的主要问题^[18-19]。

(5) 医用复合材料

随着现代医学水平的发展, 传统的金属及其合金材料, 生物陶瓷及高分子等已不能满足临床上对骨修复材料生物力学及生物活性的要求, 发展兼具优良力学相容性及生物活性的医用复合材料 (Biomedical composite materials) 已经成为必然趋势。利用不同性质的材料复合而成的生物医用复合材料, 不仅兼具组分材料的性质, 而且可以得到单组分材料不具备的新性能, 为获得结构和性质类似于人

体组织的生物医学材料开辟一条广阔的途径。生物医学复合材料主要分为三类：有机/有机复合，金属/无机复合，有机/无机复合。目前，有机/无机复合是应用研究最为广泛和深入的一类，主要作骨修复或骨固定材料来使用。

1.3 碳纳米管

1.3.1 碳纳米管的结构特点与性能

碳纳米管 (carbon nanotubes, CNTs) [20-22] 是一种特殊的中空碳微管，其管壁可以看作是由类似石墨结构的碳六边形网格卷绕而成的圆筒 (图 1-2)，因制备工艺和处理方法的不同，管的两端可能被由五边形、六边形和七边形网格构成的“碳帽”所封闭，也可能处于开口状态。研究表明，碳纳米管的端帽结构在碳纳米管的应用中十分重要[23-24]。

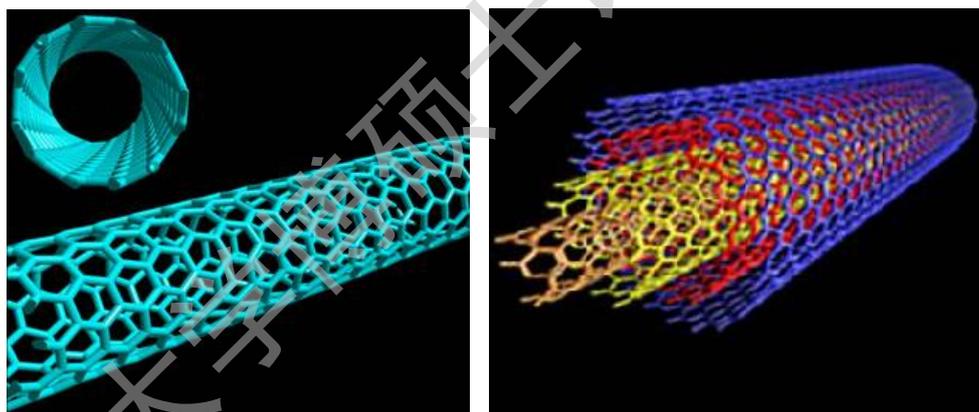


图 1-2 碳纳米管的结构示意图[24,27]

Figure 1-2 Former of SWNTs (a) and MWNTs (b).

1991 年 Iijima^[20]在日本首先发现碳纳米管。它的发现是继 C₆₀ 之后碳家族中出现的又一个新成员。根据组成碳管的石墨网格层数的不同，可以将它们分为单壁碳纳米管 (single-walled carbon nanotubes, SWNT) 和多壁碳纳米管 (multi-walled carbon nanotubes, MWNT) 两种。理论和实验研究表明，碳纳米管具有许多奇特的性质^[25-26]。碳纳米管的管径一般在几纳米到几十纳米之间，长度一般在几微米左右，长径比高达 1000，是一种典型的具有纤维结构的一维纳米材料。碳纳

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库