

电纺制备明胶/壳聚糖/羟基磷灰石/氧化石墨烯抗菌复合纳米纤维的研究

梁红培¹, 王英波¹, 粟智¹, 鲁雄², 王帅¹

(1. 新疆师范大学 化学化工学院, 乌鲁木齐 830054; 2. 西南交通大学 材料科学与工程学院, 成都 610031)

摘要: 本研究模拟细胞外基质成分与结构, 采用静电纺丝法成功制备出明胶/壳聚糖/羟基磷灰石/氧化石墨烯四元复合纤维。重点考察该体系中物质浓度对复合纤维形貌及抗菌性能的影响。结果表明: 明胶浓度增大会增大纤维的直径, 但浓度过大会出现粘连现象, 其最佳浓度为 15~20%; 加入壳聚糖(CS)会出现细纤维分支, 其浓度为 1%左右较佳; 增加羟基磷灰石(HA)浓度, 可提高电纺液的导电性, 降低纤维中的珠状物和粘联现象发生, 粒径为 12 μm 的 HA 浓度为 5%时纤维形态较好; 加入氧化石墨烯后可使纤维形态均匀、光滑。最后对四元复合纤维进行了抗菌性能考察, 发现氧化石墨烯的加入增强了复合纤维的抗菌性。明胶/壳聚糖/羟基磷灰石/氧化石墨烯四元复合纤维对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均具有较好的抗菌效果。

关键词: 壳聚糖; 羟基磷灰石; 氧化石墨烯; 电纺纤维; 抗菌率

中图分类号: TQ318 文献标识码: A

Electrospinning Gelatin/Chitosan/Hydroxyapatite/Graphene Oxide Composite Nanofibers with Antibacterial Properties

LIANG Hong-Pei¹, WANG Ying-Bo¹, SU Zhi¹, LU Xiong², WANG Shuai¹

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China; 2. School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

Abstract: Gelatin/chitosan/hydroxyapatite/graphene oxide composite nanofibers were prepared by electrospinning. The effect of composition on fiber morphology and antibacterial properties were investigated. The results show that increasing of gelatin concentration results in the increase of fiber diameter and then heavy fiber adhesion, showing ideal concentration scope of 15%–20%. Increasing chitosan concentration leads to thin fibers, with optimum concentration at 1%, while increasing hydroxyapatite (HA) concentration increases the ionic concentration of electrospinning solution, leading to the decrease of beads and fiber adhesion. Nanofibers with smooth morphology are obtained when the diameter of HA particles is 12 μm and at concentration of 5%. And the addition of graphene oxide (GO) enhances uniform, smooth and antibacterial property of the composite nanofibers, which enables the gelatin/chitosan/hydroxyapatite/GO fibers good antibacterial effect against both *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Key words: gelatin; chitosan; hydroxyapatite; graphene oxide; electrospun fibers; antibacterial property

收稿日期: 2014-10-14; 收到修改稿日期: 2014-12-16

基金项目: 新疆维吾尔自治区高校科研计划(XJEDU2011S32); 新疆师范大学博士科研启动基金(xjnubs1102); 自治区引进高层次紧缺人才启动经费; 新疆师范大学无机化学重点学科建设项目(13XSXZ0702)
Scientific Research Program of the Higher Education Institution of Xinjiang (XJEDU2011S32); Scientific Research Staring Foundation for Doctor of Xinjiang Normal University (xjnubs1102); High Level Short of Talent Starting Funds from the Autonomous Regions; Inorganic Chemistry Key Subject Construction Project of Xinjiang Normal University (13XSXZ0702)

作者简介: 梁红培(1989–), 女, 硕士研究生. E-mail: lhp19890725@163.com

通讯作者: 王英波, 副教授. E-mail: ybwang20002575@163.com

人体骨骼是一种由羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA)和胶原蛋白等组成的无机-有机复合物。HA具有良好的生物相容性和生物活性,是目前备受关注的人造骨骼材料之一。但因抗弯、抗压强度不足和脆性大而使其在医学应用上受限^[1]。胶原的变性产物明胶(Gelatin, Gel),是一种天然高分子材料,结构上与人体细胞外基质中的胶原蛋白相似^[2-4],其复合材料能很好地适应人体组织的内部环境^[5]。同时, Gel 含有丰富的氨基和羧基亲水基团^[6],有助于营养成分和氧气的渗入。壳聚糖(Chitosan, CS)具有良好的生物相容性、抗菌性^[7]及潜在的多种化学修饰和组合能力,便于实现所需的特定性能^[8],用作多种组织工程支架^[9]。

氧化石墨烯(Graphite Oxide, GO)是石墨烯的衍生物。由于带有羧基、环氧基和羟基等多种高活性反应基团,更易与其它物质结合,形成新型复合材料。近年来,GO被广泛地应用在生物医学方面。GO具有高强度的力学性能使其可以作为医疗植入物,在组织工程支架材料中作为填料或增强材料^[10]。GO还具有良好的抗菌性能^[11],可被用在各种外部伤口愈合上,防止感染^[12]。目前已有采用静电纺丝法成功制备基于GO复合材料的报道。Lu等^[13]制备了RGO/CS/聚乙烯醇(PVA)纳米纤维支架作为伤口愈合复合材料,结果表明RGO有利于细胞的粘附与生长。Andreia等^[14]在GO片上装饰Ag纳米粒子形成GO-Ag纳米复合材料,并考察材料的抗菌性,发现GO-Ag纳米复合材料可以抑制微生物增殖,但存在银突释现象。CARPIO等^[15]采用电沉积法制备了GO/聚乙烯基吡啶(PVK)纳米复合材料,研究表明此复合材料的抗菌性强于GO。上述报道说明GO和RGO有利于细胞的粘附和增殖,同时具有抗菌作用,与聚合物复合可增强其抗菌性。

不仅如此,RGO和GO可与细胞中的磷脂双分子层形成稳定结构^[16],其高表面积能促进细胞粘附^[17]和增殖^[18]。此外,RGO和GO通过巨噬细胞的吞噬作用可以进入细胞内部,从而与DNA、RNA有独特的信息传导作用^[19],可在溶酶体内降解^[20]。

有目的地设计复合材料的组分和微结构,制备具有特定结构的电纺纤维,使其具有与细胞外基质在结构形态上相似,将有利于胶原含量高的骨组织形成细胞外基质^[21-22]。充分利用上述几种成分各自的优点,制备骨组织工程用复合支架材料,目前尚未见相关报道。本研究采用电纺丝方法制备了与骨组织成分相似并具有抗菌性的Gel/CS/HA/GO复合纤维骨支架材料。由于不同浓度的纺丝成分对形成

细胞外基质有不同作用^[23],本研究重点考察了不同浓度的纺丝成分对复合纳米纤维形貌和抗菌性能的影响。

1 实验方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂及材料

乙酸(天津永晟精细化工有限公司);壳聚糖(Sigma公司);明胶(北京化工厂);羟基磷灰石(粒径为12 μm 和60 nm,上海华蓝试剂有限公司);石墨(上海山浦化工有限公司);硫酸(北京化工厂);高锰酸钾(陕西省西安化玻站总经销);30%过氧化氢(天津永晟精细化工有限公司);水合肼(洛阳市化学试剂厂)。

1.1.2 仪器

TL01静电纺丝机(深圳通力微纳科技有限公司);扫描电子显微镜(SEM, Carl Zeiss, LEO-1430VP, Germany);透射电子显微镜(TEM, JEOL JEM-2100F, Japan)。

1.2 实验过程

1.2.1 Hummers method 制备氧化石墨烯和还原氧化石墨烯

0℃下向盛有5 g石墨和115 mL浓硫酸的500 mL蒸馏瓶中缓慢加入25 g高锰酸钾,搅拌2 h。然后转移到35℃油浴中回流搅拌过夜。接着加入蒸馏水,在90℃油浴中加热30 min(黑色变成巧克力色)。此时加入约15 mL H_2O_2 ,搅拌30 min后,过滤,用去离子水和HCl溶液洗涤至接近中性,然后在60℃的干燥箱中干燥至恒重,得到GO。

将GO水溶液加入到有冷凝管的回流装置烧瓶中,加入一定量的水合肼,在100℃油浴下搅拌回流24 h,将得到的产物过滤后用乙醇及去离子水各洗涤3次,于60℃真空干燥至恒重,得到还原氧化石墨烯(RGO,黑色)。

1.2.2 纺丝液的配制

称取一定量的CS溶解在乙酸水溶液中,搅拌12 h后,接着加入Gel,在60℃水浴条件下溶解。然后再加入HA颗粒、GO或RGO粉末,恒温搅拌30 min,使HA和GO均匀分散在溶液中,配置成一定浓度的电纺液。

1.2.3 电纺纤维的制备

将配制电纺液注入到干燥注射器中,插上磨钝针头,注射器固定在微量注射泵卡槽中。取20 cm×30 cm铝箔固定在接地不锈钢板上作为接收装置,

固定注射器针头和铝箔之间距离为 15 cm。调节注射泵速率,使注射器中溶液能以控制的速度 2 mL/h 匀速流出,打开高压电源调节电纺电压,制备电纺纤维。实验室温度为 25℃ 左右,相对湿度在 45%~55%之间。制备好的纤维均在室温下真空干燥 3 d,除去残留溶剂。

1.2.4 抗菌性能测试

菌种为革式兰阴性菌(大肠杆菌, *Escherichia coli*)和革式兰阳性菌(金黄色葡萄球菌, *Staphylococcus aureus*),从定性和定量两方面来评价 Gel/CS/HA/GO 复合纤维的抗菌性能。定性分析采用平板涂布培养法(spread plate method),而定量分析采用薄膜表面粘附的方法(film adhering method)。抗菌实验分为三组: Gel/CS/HA、Gel/CS/HA/RGO 和 Gel/CS/HA/GO,每个实验组均有 3 个平行样,结果取平均值。

定性分析:首先将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌两种菌体分别接种于 LB 培养基上,于 37℃ 下进行 12 h 的活化培养,用接种环取适量的菌体将它们置于液体培养基中培养 12 h 得到菌悬液,再用磷酸盐缓冲液(PBS)把上述两种细菌配制成 10 mL 浓度为 1×10^8 cell/mL 的菌悬液。然后把样品放在 37℃、200 r/min 的摇床中培养 12 h。最后摇匀、取出 100 μ L 涂平板,在 37℃ 恒温培养箱中培养 12 h,观察细菌的生长情况并拍照。

定量分析:采用样品表面粘附的方法测试样品抗菌率。两种菌株都接种于 LB 培养基中,于 37℃ 下培养 12 h,此过程重复 3 次,以得到较纯的菌落。

取单菌落接种于液体培养基在 37℃、200 r/min 的摇床中培养 12 h。用磷酸盐缓冲液(PBS)将两种细菌配制成 3.0×10^7 cell/mL 的菌悬液,分别稀释 10^3 倍。将被测样品放置在培养皿中载玻片上,培养皿底部加入无菌水,以防止菌液蒸发。取 50 μ L 滴于样品表面,37℃ 培养 12 h,将菌液移至 500 μ L PBS 溶液中,摇匀,取 50 μ L 涂布平板,培养 12 h,即可数出菌落数。样品的抗菌作用可以通过如下计算样品的抗菌率来表示(分别以 Gel/CS/HA 为对照组,进行 3 次平行实验,以得到平均抗菌率):

$$\text{抗菌率} = \frac{\text{对照组菌落数} - \text{实验组菌落数}}{\text{对照组菌落数}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 Gel 浓度对纤维的影响

Gel 作为复合纤维的主要成分,其浓度是影响复合纤维形貌的主要因素。由图 1 可知, Gel 浓度过低($\leq 5\%$),表面张力过小,出现“电喷洒”现象(图 1(a))。随着 Gel 浓度的增大(10%),表面张力逐渐增大,开始有纤维形成,并出现纤维粘联、珠状物等现象(图 1(b))。当 Gel 浓度在 15%到 20%之间时,电纺纤维较均匀(图 1(c, d))。但是 Gel 浓度进一步增大(25%),表面张力较大,电场力不足以克服表面张力,致使纤维的直径增大,溶剂挥发变慢,造成纤维粘联和珠状物的出现(图 1(e))。Gel 浓度进一步增大到 30%时,电纺液的粘度过大,电纺过程中溶剂挥发过慢,造成纤维粘联、纤维扁平化(图 1(f))。

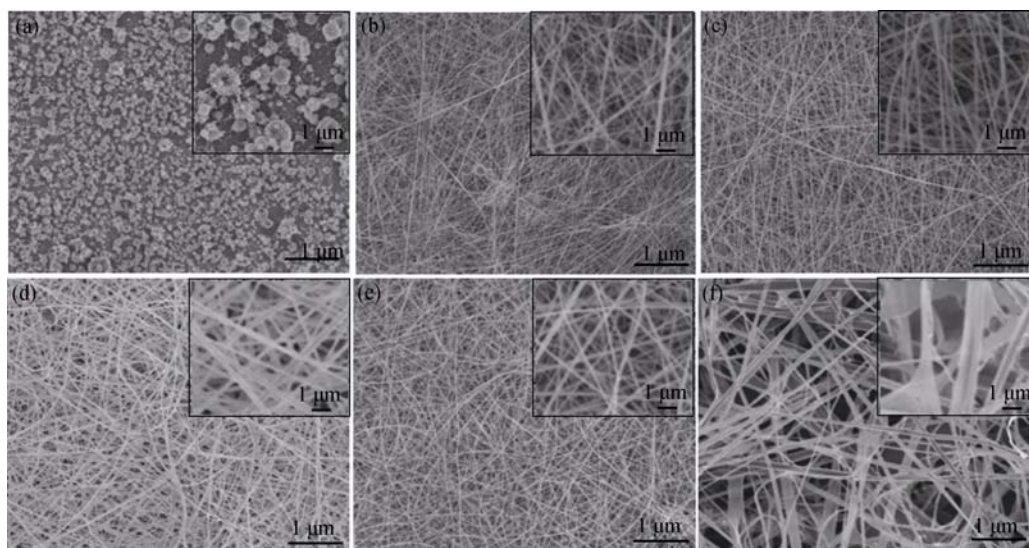


图 1 不同 Gel 浓度制备的纤维的 SEM 照片

Fig. 1 SEM images of fibers prepared with a series of Gel concentration

(a) 5%; (b) 10%; (c) 15%; (d) 20%; (e) 25%; (f) 30%

2.2 CS 浓度对纤维的影响

本实验主要目的是制备具有抗菌作用的复合纤维, 所以向Gel溶液中添加具有抗菌性能的CS。图2是Gel浓度分别为15%和20%条件下添加CS后的纤维形貌照片。Gel浓度为15%时, 当CS浓度较低, 电纺容易进行且电纺纤维较光滑(图2 (a)); 随着CS浓度增加, 电纺液表面张力增大, 电纺纤维较均匀且直径增大(图2 (b))。Gel浓度为20%时, 加入CS后, 有细小的纤维出现。CS浓度较低时, 有部分纤维粘联(图2(c)); CS浓度增加后, 电纺过程中有珠状物出现(图2(d))。其原因在于CS分子内有氢键作用, 致使其刚性强, 可以增强材料的力学性能, 但同时也增大了电纺液的表面张力, 增加电纺难度, CS的浓度不能过大。所以, Gel浓度为15%, CS浓度为1%时电纺制备的纤维较好。

2.3 HA 浓度和粒径对纤维的影响

HA 是人体骨骼的主要无机成分, 所以向上述Gel(Gel浓度为15%)和CS(CS浓度为1%)溶液中添加HA颗粒, 可以提高纤维的生物相容性。另外, HA分子的 Ca^{2+} 可以与CS分子的 $-\text{NH}_2$ 中的N发生螯合作用^[24], 从而使得形成的纤维更加均匀。本实验选择了粒径为12 μm 和60 nm的HA颗粒, 主要考察其浓度和粒径对纤维的影响。

当HA粒径为12 μm 时, 考察了HA浓度为2%、5%、8%时对电纺纤维的影响。HA浓度为2%时, 由于HA浓度较小, 电纺液中溶剂的含量相对较高, 电纺过程中, 溶剂没有完全挥发, 形成纤维相互粘联的结构(图3(a))。随着HA浓度增大, 纤维粘联现象逐渐降低, 纤维逐渐光滑均匀(图3(b, c))。12 μm

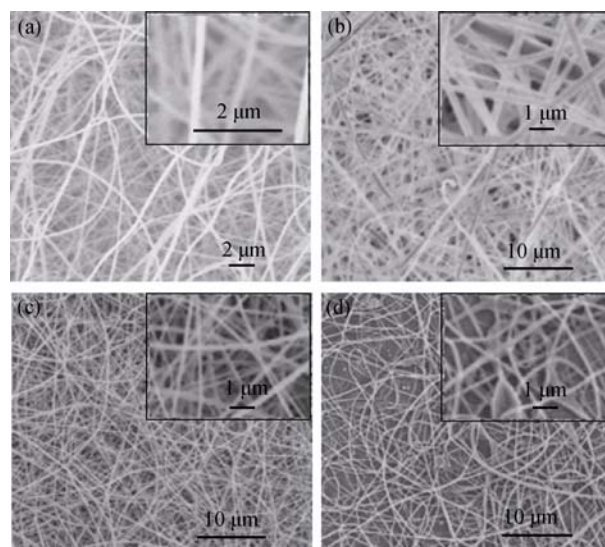


图2 不同CS浓度制备的纤维的SEM照片

Fig. 2 SEM images of fibers prepared with a series of CS concentration

(a) 15% Gel, 0.75% CS; (b) 15% Gel, 1% CS; (c) 20% Gel, 0.75% CS; (d) 20% Gel, 1% CS

的HA颗粒在酸性环境下会发生溶蚀现象, 造成HA颗粒细化。可以通过图4明显观察到酸性环境下HA颗粒细化现象, 其平均粒径为 (149 ± 29) nm。本实验制备的纤维直径约为1 μm 左右, 所以酸溶蚀过的HA颗粒可以被包覆在纤维中。

当HA粒径为60 nm时, 本实验也考察了HA浓度为2%、5%、8%条件下对电纺纤维的影响。由于纳米颗粒的团聚效应, 纤维的粘联现象比12 μm 的更严重(图3(d, e)), HA浓度增大到8%时, 粘联现象减弱(图3(f)), 但电纺液在电纺过程中出现HA沉降现象。

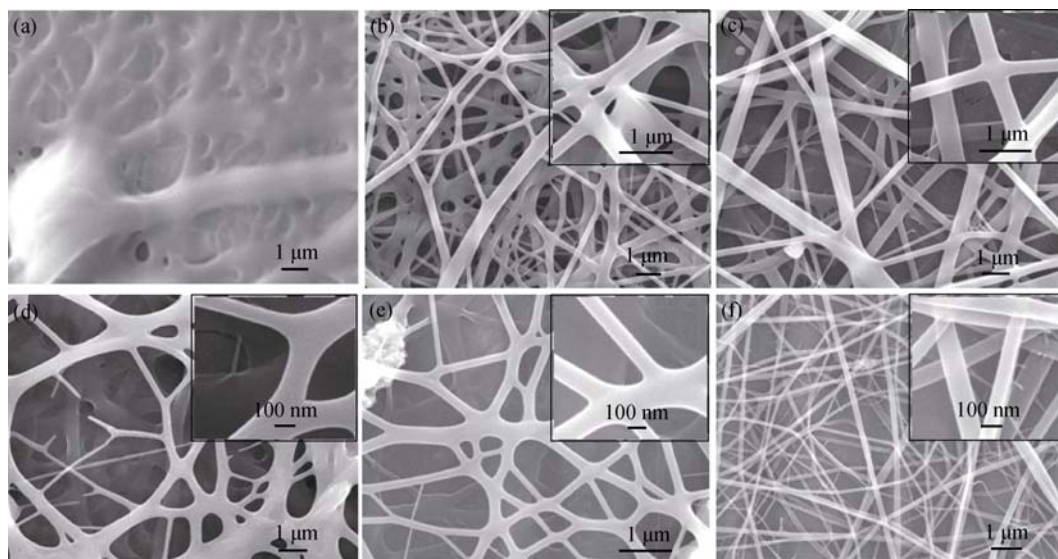


图3 不同HA浓度和粒径制备的纤维的SEM照片

Fig. 3 SEM images of fibers prepared with different HA concentrations and HA particle sizes

(a) 2%, 12 μm ; (b) 5%, 12 μm ; (c) 8%, 12 μm ; (d) 2%, 60 nm; (e) 5%, 60 nm; (f) 8%, 60 nm

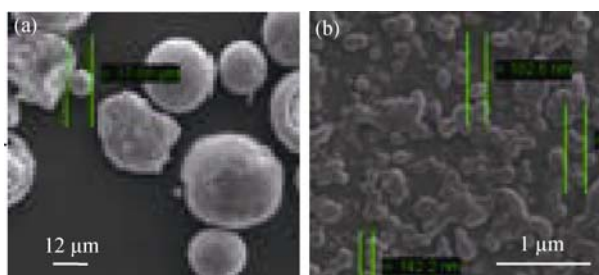


图 4 粒径为 12 μm 的 HA 溶蚀前后的 SEM 照片

Fig. 4 SEM images of HA with a size of 12 μm , before (a) and after (b) dissolution

由以上结果可知, HA 的粒径对复合纤维的形貌影响较大。HA 颗粒过小为纳米级时, 出现团聚效应, 电纺液不均一, 致使电纺纤维不均匀。HA 颗粒增大到微米时, 团聚效应消失, 电纺液均一, 复合纤维形貌较好。HA 颗粒粒径为 12 μm , HA 浓度为 5% 时所制备的复合纤维较佳。

据报道, 电纺液的导电性主要由可离子化盐类型、聚合物类型及其浓度等决定。电纺液中加入一些可电离的物质, 不会改变电纺液的电中性, 但分解生成的正、负离子可明显改变电纺液的电荷密度, 提高导电性, 对电纺纤维的形貌和直径产生明显的影响^[25-26]。本实验中 HA 浓度增大, 在酸性溶液中溶蚀的 HA 会增多, 纺丝液中的无机离子浓度增大, 从而增强纺丝液的导电性, 使纤维变细。天然高分子本质上是聚电解质, 如 CS 在酸性溶液中 $-\text{NH}_2$ 生成 $-\text{NH}_3^+$, 增大电纺液的导电性。在 CS 和 HA 的混合电纺液中, 质子化的 CS 分子中 N 会与 Ca^{2+} 杂化^[24], 形成络合物, 但不改变电纺液的电荷密度, 所以 CS 和无机离子本身的反应对可纺性没有影响。然而, CS 和无机离子的浓度不同会改变电纺液的导电性, 从而对电纺纤维的直径和形貌产生明显的影响。明胶在其等电点以下带正电荷, 其原理同 CS。

2.4 GO 浓度对纤维的影响

本研究目的之一在于制备具有抗菌作用的骨组织工程用支架材料。CS 具有抗菌作用, 但其抗菌性较弱, 所以本研究向电纺液中添加了抗菌性好的 GO。在 Gel 浓度为 15%, CS 浓度为 1%, HA(12 μm) 浓度为 5% 的条件下, 添加 GO。图 5 是在上述三元复合电纺液中分别添加了 2% GO 和 RGO 制备的复合纤维形貌照片, 可见纤维更加均匀。在此条件下通过透射电镜(图 6)可以看出无机相被包覆在纤维之中。当这两种物质的浓度进一步增大, 由于含量过大, 致使电纺液浓度过大, 在电纺过程中因溶剂挥发易堵塞针头。

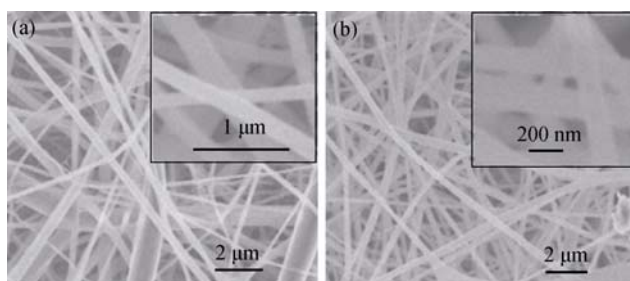


图 5 加入 GO 和 RGO 的纤维 SEM 照片

Fig. 5 SEM images of fibers with GO and RGO (a) 2% GO; (b) 2% RGO

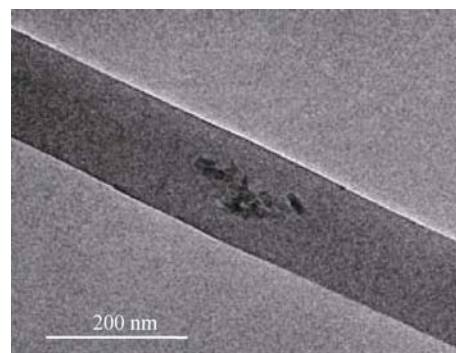


图 6 复合纤维的 TEM 照片

Fig. 6 TEM micrographs of the composite fiber

2.5 抗菌性能测试

通过上述实验, 得出优化条件 Gel 浓度为 15%、CS 浓度为 1%、HA(12 μm) 浓度为 5% 和 GO 浓度为 2%。在此条件下制备四元复合纤维, 考察其抗菌性能。

2.5.1 对大肠杆菌的抗菌性

为了考察复合纤维对大肠杆菌的抗菌效果, 利用平板涂布法对其进行定性抗菌研究。细菌恒温培养 12 h 后, 在 Gel/CS/HA/GO 表面, 基本没发现大肠杆菌的菌落(图 7(c)), Gel/CS/HA/RGO 只有少量的菌落(图 7(b))。而在对照样的 Gel/CS/HA 表面(图 7(a)), 已有一些菌落堆积在一起形成菌苔。该结果表明: Gel/CS/HA/GO 和 Gel/CS/HA/RGO 对大肠杆菌均具有较强的抗菌能力, 且 Gel/CS/HA/GO 对大肠杆菌的抗菌能力较强。同时对抗菌性能进行定量分析发现, Gel/CS/HA/GO 对大肠杆菌的抗菌率为 100%(图 7(d)), Gel/CS/HA/RGO 对其的抗菌率仅为 38.6%。这些结果均表明 Gel/CS/HA/GO 对大肠杆菌具有较强的抗菌性能。

2.5.2 对金黄色葡萄球菌的抗菌性

定性分析复合纤维对金黄色葡萄球菌的抗菌效果, 细菌在恒温培养 12 h 后, Gel/CS/HA/RGO 表面的菌落与 Gel/CS/HA 表面的菌落均较多且差异不明显(图 8(a,b)), Gel/CS/HA/GO 表面的菌落明显减少(图

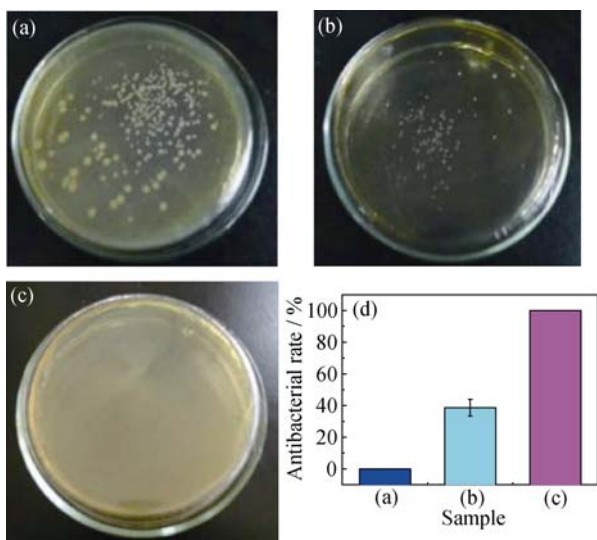


图7 复合纤维对大肠杆菌的抗菌率

Fig. 7 The composite fibers antibacterial rate determined by *Escherichia coli*

(a) Gel/CS/HA; (b) Gel/CS/HA/RGO; (c) Gel/CS/HA/GO; (d) Antibacterial rate

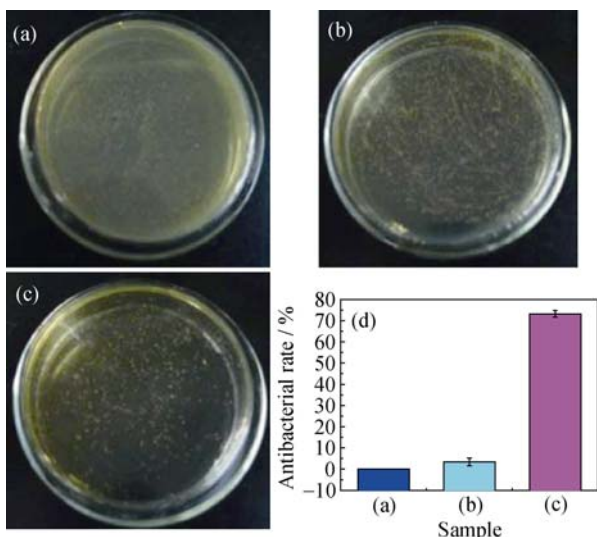


图8 复合纤维对金黄色葡萄球菌的抗菌率

Fig. 8 The composite fibers antibacterial rate determined by *Staphylococcus albus*

(a) Gel/CS/HA; (b) Gel/CS/HA/RGO; (c) Gel/CS/HA/GO; (d) Antibacterial rate

8(c))。研究表明 Gel/CS/HA/GO 对金黄色葡萄球菌具有较强的抗菌能力。定量分析的抗菌能力见图 8(d)。Gel/CS/HA/GO 的抗菌率达到 73.24%, 而 Gel/CS/HA/RGO 的抗菌作用较弱, 只达到 3.4%。定量实验结果和定性实验结果相一致, 表明 Gel/CS/HA/GO 对金黄色葡萄球菌具有较好的抗菌性能。

在本实验中, 复合纤维的 CS 含量很少, 其抗菌性主要来自于 GO 和 RGO 的贡献。据文献报道, GO 和 RGO 材料均具有抗菌性, 其抗菌机理主要有两种氧化应激和损坏细胞膜。氧化应激是由靶细胞中

活性氧簇(ROS)的产生而引起的, 如果细胞中的抗氧化酶不能清除活性氧, 就会损坏细胞大分子中的蛋白、DNA 和脂类等, 从而破坏细胞^[27]。另一种抗菌机制是 GO 和 RGO 通过其锐利边缘的物理作用给细胞膜造成损伤^[28]。Feng 等^[29]发现大肠杆菌与 GO 的直接作用造成细胞膜的完整性破坏和谷胱甘肽的氧化损失。这表明 GO 的抗菌作用是因为细胞膜的破坏和氧化应激。且石墨烯基材料的抗菌机制很大程度上取决于纳米材料的表面, 即石墨烯在复合材料中的分散越均匀, 其抗菌效果越好。在本实验中, GO 具有较好的亲水性, 确保了其在复合纤维中的分散性, 所以本实验中复合纤维可以表现出较强的抗菌活性^[30]。

3 结论

本实验采用静电纺丝法成功制备 Gel/CS/HA/GO 抗菌复合纳米纤维。考察了该体系中 Gel、CS、HA 和 GO 的浓度对复合纤维形貌的影响。Gel 浓度增大, 纤维直径增大, 其浓度过大会出现粘联现象, Gel 浓度为 15%~20%之间较佳。加入 CS 后, 出现细纤维分支, CS 浓度为 1%时电纺纤维形貌较好。在电纺液中加入无机相 HA, 其粒径为 12 μm , 浓度为 5%时的纤维形貌较好。为了提高复合纤维的抗菌性能, 加入 2% GO, 复合纤维变得更加均匀光滑, 且对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均具有较好的抗菌效果。

参考文献:

- [1] LI L H, WANG Y J, ZHU Y, *et al.* Poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2011, **22(8)**: 1873-1884.
- [2] HOFMAN K, TUCKER N, STANGER J, *et al.* Effects of the molecular format of collagen on characteristics of electrospun fibres. *J. Mater. Sci.*, 2012, **47(3)**: 1148-1155.
- [3] JAISWAL A K, CHHABRA H, SONI V P, *et al.* Enhanced mechanical strength and biocompatibility of electrospun polycaprolactone-gelatin scaffold with surface deposited nano-hydroxyapatite. *Mater. Sci. Eng.*, 2013, **33(4)**: 2376-2385.
- [4] PEREZ M A, GUARINO V, CIRILLO V, *et al.* In vitro mineralization and bone osteogenesis in poly (ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibers. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2012, **100(11)**: 3008-3019.
- [5] WANG H Y, FENG Y K, FANG Z C, *et al.* Fabrication and characterization of electrospun gelatin-heparin nanofibers as vascular tissue engineering. *Macromol. Res.*, 2013, **21(8)**: 860-869.

- [6] MENG Z X, LI H F, SUN Z Z, *et al.* Fabrication of mineralized electrospun PLGA and PLGA/gelatin nanofibers and their potential in bone tissue engineering. *Mat. Sci. Eng.*, 2013, **33(2)**: 699–706.
- [7] SARAIVANAN S, NETHALA S, PATTNNAIK S, *et al.* Preparation, characterization and antimicrobial activity of a bio-composite scaffold containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-silver for bone tissue engineering. *Int. J. Bio. Macromol.*, 2011, **49(2)**: 188–193.
- [8] OKUYAMA K, NOGUCHI K, HANAFUSA Y, *et al.* Structural study of anhydrous tendon chitosan obtained via chitosan/acetic acid complex. *Int. J. Bio. Macromol.*, 1999, **26(4)**: 285–293.
- [9] JAYAKUMAR R, PRABAHARAN M, NAIR S V, *et al.* Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. *Prog. Mater. Sci.*, 2010, **55(7)**: 675–709.
- [10] MU Q X, SU G X, LI L W, *et al.* Size-dependent cell uptake of protein-coated graphene oxide nanosheets. *ACS Appl. Mater. Inter.*, 2012, **4(4)**: 2259–2266.
- [11] ARTILES M S, ROUT C S, FISHER T S. Graphene-based hybrid materials and devices for biosensing. *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, 2011, **63(14/15)**: 1352–1360.
- [12] WANG G M, QIAN F, SALTIKOV C W, *et al.* Microbial reduction of graphene oxide by shewanella. *Nano Res.*, 2011, **4(6)**: 563–570.
- [13] LU B G, LI T, ZHAO H T, *et al.* Graphene-based composite materials beneficial to wound healing. *Nanoscale*, 2012, **4(9)**: 2978–2982.
- [14] FARIA A F, MARTINEZ D S, MEIRA S M, *et al.* Anti-adhesion and antibacterial activity of silver nanoparticle supported on graphene oxide sheets. *Colloid Surface B*, 2014, **113**: 115–124.
- [15] CARPIO I E, SANTOS C M, WEI X, *et al.* Toxicity of a polymer-graphene oxide composite against bacterial planktonic cells, biofilms, and mammalian cells. *Nanoscale*, 2012, **4(15)**: 4746–4756.
- [16] TITOV A V, KRAL P, PEARSON R. Sandwiched graphene-membrane superstructures. *ACS Nano*, 2010, **4(1)**: 229–234.
- [17] GOENKA S, SANT V, SANT S. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 2014, **173**: 75–88.
- [18] SHI X T, CHANG H X, CHEN S, *et al.* Regulating cellular behavior on few-layer reduced graphene oxide films with well-controlled reduction states. *Adv. Funct. Mater.*, 2012, **22(4)**: 751–759.
- [19] REN H L, WANG C, ZHANG J L, *et al.* DNA cleavage system of nanosized graphene oxide sheets and copper ions. *ACS Nano*, 2010, **4(12)**: 7169–7174.
- [20] SEABRA A B, PAULA A J, LIMA R, *et al.* Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. *Chem. Res. Toxicol.*, 2014, **27(2)**: 159–168.
- [21] SHIRKHAZADEH M. Direct formation of hydroxyapatite on cathodically polarized electrodes. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 1998, **9(2)**: 67–72.
- [22] MOHAMED K R, MOSTAFA A A. Preparation and bioactivity evaluation of hydroxyapatite-titania/chitosan-gelatin polymeric biocomposites. *Mat. Sci. Eng. C*, 2008, **28(7)**: 1087–1099.
- [23] CUI W G, LI X H, ZHOU S B, *et al.* Investigation on process parameters of electrospinning system through orthogonal experimental design. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2007, **103(5)**: 3105–3112.
- [24] WANG Y B, LU X, LI D, *et al.* Hydroxyapatite/chitosan composite coatings on titanium surfaces by pulsed electrochemical deposition. *Acta Polymerica Sinica*, 2011(**11**): 1244–1252.
- [25] 王策, 卢晓峰. 有机纳米功能材料: 高压静电纺丝技术与纳米纤维. 北京: 科学出版社, 2011: 42–44.
- [26] 丁彬, 俞建勇. 静电纺丝与纳米纤维. 北京: 中国纺织出版社, 2011: 41–44.
- [27] SEABRA A B, PAULA A J, LIMA R, *et al.* Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. *Chem. Res. Toxicol.*, 2014, **27(2)**: 159–168.
- [28] AKHAVAN O, GHADERI E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS nano*, 2010, **4(10)**: 5731–5736.
- [29] FENG L Z, LIU Z. Graphene in biomedicine: opportunities and challenges. *Nanomedicine*, 2011, **6(2)**: 317–324.
- [30] KUILA T, BOSE S, KHANRA P, *et al.* Recent advances in graphene-based biosensors. *Biosens Bioelectron.*, 2011, **26(12)**: 4637–4648.