

· 口腔医学研究 ·

仿生矿化前后静电纺复合支架的性能对比

龚春玲,陈飞扬,卜寿山*,庄海

南京医科大学第一附属医院口腔科,江苏 南京 210029

[摘要] 目的:用10倍模拟体液(10×SBF)仿生矿化丝素/壳聚糖(SF/CS)电纺支架制备骨仿生支架,并对比矿化前后支架的物理性能及诱导细胞成骨分化的能力。方法:通过扫描电镜(SEM)、傅里叶红外光谱(FT-IR)、吸水率和力学性能检测对比矿化前后支架成分及物理性能。通过活细胞染色和Cell Counting Kit-8(CCK-8)对比仿生矿化对于人骨髓间充质干细胞(HBMSC)在支架上黏附和增殖的影响。通过碱性磷酸酶(ALP)染色和茜素红染色(ARS)对比支架矿化前后对HBMSC成骨分化的诱导能力。结果:SEM、FT-IR、吸水率和力学性能证实了矿化的成功及支架物理性能的提高。活细胞染色和CCK8证明仿生矿化行为并未增加支架的细胞毒性,ALP和ARS证明矿化后支架更易诱导HBMSC的成骨分化。结论:经SBF仿生矿化后支架较原支架更符合骨组织工程的要求。

[关键词] 仿生矿化;模拟体液;骨仿生支架

[中图分类号] R783.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)05-748-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20200525

Performance comparison of electrospun composite scaffolds before and after biomimetic mineralization

GONG Chunling, CHEN Feiyang, BU Shoushan*, ZHUANG Hai

Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to prepare bionic bone scaffolds using 10 times simulated body fluid (10×SBF) mineralized silk fibroin/chitosan (SF/CS) electrospun scaffolds, and to compare the physical properties and the ability of inducing osteogenic differentiation of cells before and after mineralization. **Methods:** The compositions and properties of the scaffolds before and after mineralization were compared by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), water absorption and mechanical properties. The effects of biomimetic mineralization on the adhesion and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells (HBMSC) on scaffolds were compared by living cell staining and Cell Counting Kit-8 (CCK-8). Alkaline phosphatase (ALP) staining and alizarin red staining (ARS) were used to compare the osteoinductive ability of the scaffolds before and after mineralization. **Results:** SEM, FT-IR, water absorption and mechanical properties confirmed the success of mineralization and the improvement of physical properties. Live cell staining and CCK-8 showed that biomimetic mineralization did not increase the cytotoxicity of the scaffolds. ALP and ARS showed that the scaffolds after mineralization were more likely to induce osteogenic differentiation of HBMSC. **Conclusion:** SBF biomimetic mineralized scaffolds are more suitable for bone tissue engineering.

[Key words] biomimetic mineralization; simulated body fluids; bionic bone scaffold

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(05): 748-752]

临床中颌面部骨组织缺损往往由颌面部的肿瘤、外伤、先天畸形等造成。骨再生是体内生物矿化作用的结果,即生物体内的无机元素在细胞的调

控下有选择地沉积于特定有机物质上,并形成特殊结构,以满足生物体的组织功能需要^[1]。在临床上可以通过制备与天然骨组织结构及组成相似的支架来诱导及激发骨组织的再生。在先前研究中,我们通过静电纺丝法成功制备了丝素/壳聚糖(silk/chitosan, SF/CS)支架,证明其符合骨组织工程支架

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81670967)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: bushsh@vip.sina.com

的基本要求,但其存在机械性能差等缺点,且相较于天然的骨组织缺乏无机物成分,其余文献也曾报道此问题^[2]。因此本研究中希望通过模拟体液(simulated body fluid, SBF)仿生矿化法矿化SF/CS支架,在支架中加入矿化物质,形成与骨组织成分相似的骨仿生支架,增强支架的机械强度,并进一步增强其成骨诱导性能,探讨其作为骨组织支架的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

蚕茧(湖州新天丝生物技术有限公司);壳聚糖(上海阿拉丁试剂有限公司); α -MEM培养基、胎牛血清、成骨诱导培养基(Gibco公司,美国);Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒(上海碧云天生物技术公司);扫描电子显微镜(Leo 1530vp,德国);傅立叶变换红外光谱仪(Nicolet6700,美国);通用材料试验机(Instron 3365型,美国);共聚焦显微镜(蔡司LSM 710,德国);酶联免疫吸附测定仪(Molecular Device,美国);倒置显微镜(DM4000,德国)。

1.2 方法

1.2.1 仿生矿化SF/CS支架

采用Tas等方法制备10倍SBF(10 \times SBF),组成见表1^[3],将SF/CS静电纺丝支架浸泡于37 $^{\circ}$ C 10 \times SBF溶液,持续4 h,每2 h更换1次SBF,实现支架矿化。

表1 10 \times SBF成分表

Table 1 Composition of 500 mL 10 \times SBF

试剂	质量(g)	浓度(mmol/L)
NaCl	29.221 5	1 000
KCl	0.186 4	5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.837 7	25
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.508 3	5
NaH ₂ PO ₄	0.599 9	10

1.2.2 矿化前后支架的表征及性能检测

将支架切割成小方块,用扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)观察支架的形态同时检测矿化后支架中元素成分;使用傅立叶变换红外光谱仪(fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)记录支架从500~2 000 cm⁻¹的特征性光谱;在37 $^{\circ}$ C下将支架浸泡在磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)中24 h,称取湿重(m₁,吸除支架表面水分),称取干重(m₂,37 $^{\circ}$ C干燥过夜),采用公式:吸水率(%)=(m₁-m₂)/m₂ \times 100%计算支架的吸水率;采用通用材料试验机对支架行拉伸试验,绘制应力-应变图,同时统计支架的所能承受的

最大应力和断裂前延伸率。

1.2.3 矿化前后支架中细胞的粘附与增殖

从5例接受牙种植患者(男,平均年龄28.5岁)的牙槽骨中取约0.5 mm \times 0.5 mm小骨块,患者均来自南京医科大学第一附属医院,患者知情并已签署知情同意书,同时此行为已报备院伦理委员会并准许实施。将得到的游离骨块浸泡于 α -MEM完全培养基(89% α -MEM基础培养基、10%胎牛血清和1%青霉素链霉素)中。当细胞密度达到80%~90%时,去除悬浮细胞,对贴壁细胞以1:2的比例进行传代,得到人骨髓间充质干细胞(human bone mesenchymal stem cell, HBMSC)。在含有支架的24孔板中加入密度为50 000个/mL的细胞悬液0.1 mL。在预先确定的时间点(24 h),每孔加入10 μ L活细胞染色剂,用共聚焦显微镜观察细胞在支架中的早期黏附;在预先确定的时间点(1、4和7 d),每孔加入100 μ L完全培养基和10 μ L CCK-8试剂,用酶联免疫吸附测定仪测定450 nm处的吸光值。

1.2.4 矿化前后支架碱性磷酸酶和茜素红染色

在含有支架的24孔板中加入密度为50 000个/mL的细胞悬液0.1 mL。当细胞密度达到80%~90%时,加入成骨诱导培养基。在预先确定的时间点(3 d、5 d和7 d),将支架浸泡在0.5 mL碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)溶液中染色;在预先确定的时间点(7 d、14 d和21 d),将支架浸泡在1 mL茜素红染色(alizarin red staining, ARS)溶液中染色。用倒置显微镜观察染色后的支架。

1.3 统计学方法

本研究中实验数据均采用SPSS 23.0统计软件进行分析,对同一时点数据采用单因素方差分析,组间比较采用SNK检验,显著性水平为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 矿化前后支架的表征及物理性能检测

2.1.1 SEM及元素分析

SEM图显示未矿化组支架由无数光滑纤维丝交错组成(图1A);矿化组支架表面包裹许多细小颗粒,形成覆盖层(图1B),同时检测出钙、磷元素(图1C)。

2.1.2 FT-IR分析

FT-IR显示未矿化组的特征峰在1 626 cm⁻¹和1 537 cm⁻¹处,证明了SF及CS的存在;而矿化组支架的特征峰在1 054、604、566、1 626、1 537 cm⁻¹处,证明了矿化后SF及CS依旧存在,同时出现了代表PO₃²⁻的新峰值(图2)。

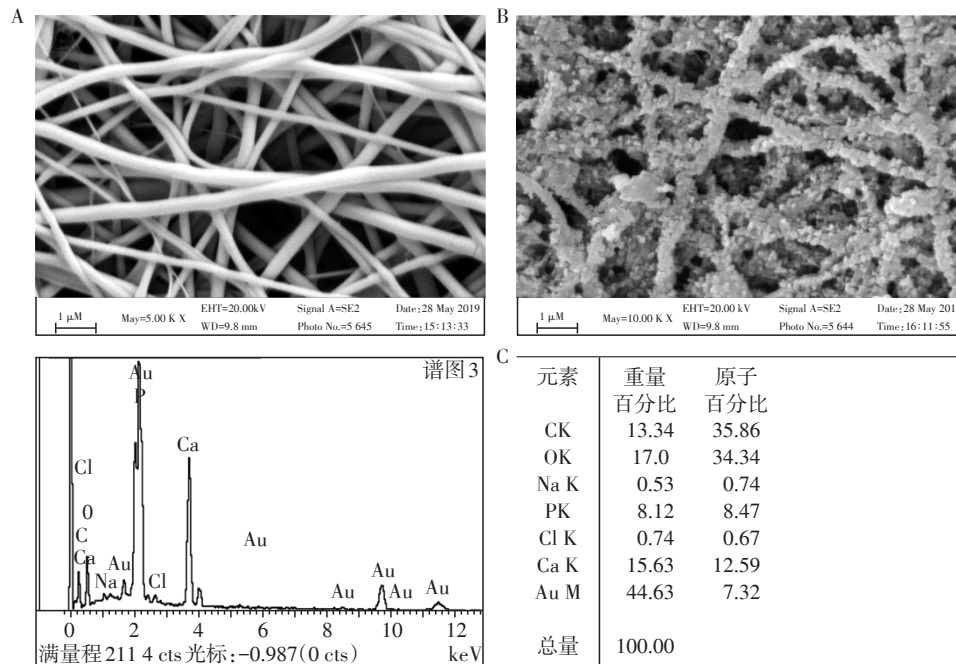


图1 两组支架SEM观察及矿化组组成元素表(A:×5 000,未矿化组;B:×10 000,矿化组;C:矿化组)
Figure 1 SEM micrographs of unmineralized scaffold (A), mineralization scaffold (B), Energy spectrum of mineralization scaffold (C)

2.1.3 吸水率分析

未矿化组与矿化组支架的吸水率分别为(105.34±2.51)%和(159.24±4.08)%($P < 0.01$)。

2.1.4 机械性能分析

支架的应力-应变曲线显示当两组支架受到的

应力达到其所能承受的最大应力后,支架发生断裂,同时达到断裂前的最大延伸率(图3)。未矿化组与矿化组支架所能承受的最大应力及能达到的最大延伸率分别为(2.54±0.062)Mpa、(3.10±0.067)MPa和(31.55±3.82)%、(21.98±2.55)%($P < 0.05$,图4)。

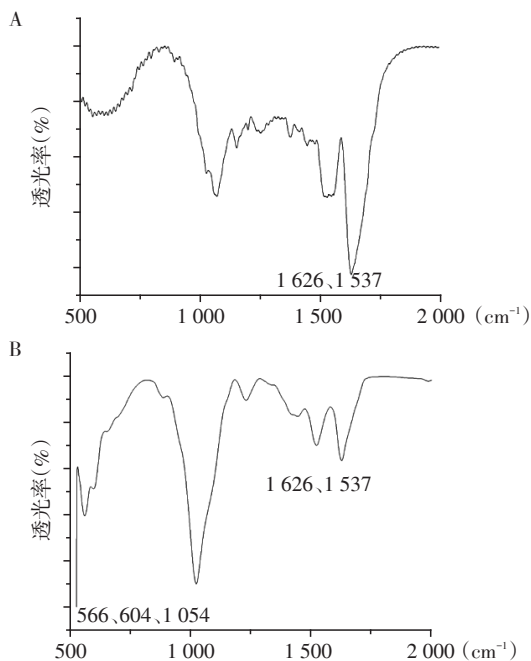


图2 两组支架FT-IR观察(A:未矿化组;B:矿化组)
Figure 2 FT-IR spectra of unmineralized scaffold (A), mineralization scaffold (B)

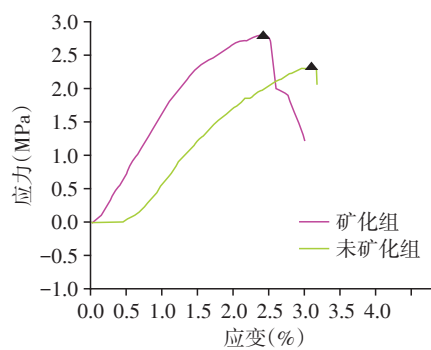


图3 两组支架应力-应变图
Figure 3 Stress-strain curve of the scaffolds in two groups

2.2 矿化前后支架体外细胞实验

24 h活细胞染色图显示HBMSC能顺利粘附于两组支架,但矿化组支架中的细胞数较未矿化组少(图5)。CCK8结果显示随着时间的增加,HBMSC在支架组及纯细胞组均可不断增殖($P < 0.05$,图6)。

2.3 ALP和ARS染色

ALP染色显示3 d时,两组支架上均可见少许蓝

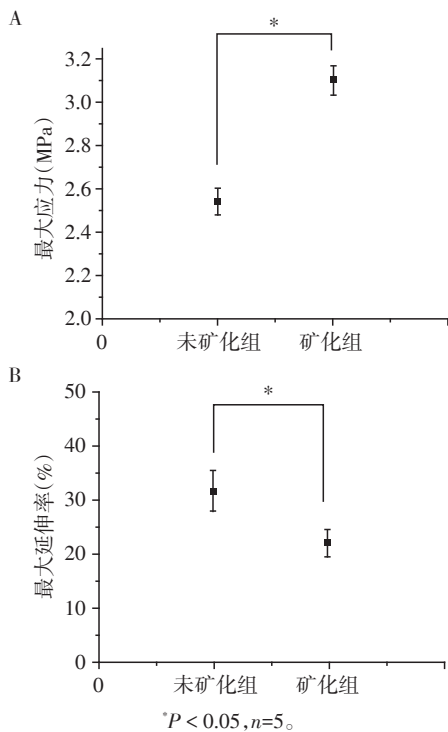


图4 两组支架断裂前所承受最大应力及最大延伸率
Figure 4 Maximum stress and maximum elongation before fracture in two groups

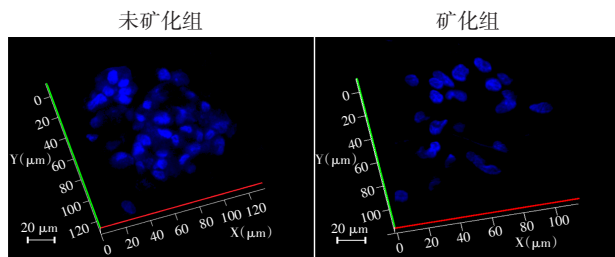


图5 两组支架活细胞染色图($\times 100$)
Figure 5 Adhesion of HBMSC in the scaffold in two groups ($\times 100$)

紫色染色,5 d和7 d时,两组支架蓝紫色染色部分均变多,且矿化组始终多于未矿化组(图7A);ARS染色显示7 d时,矿化组支架上有少许钙结节,而未矿化组支架几乎没有。14 d时,矿化组支架表面的钙结节数量增加,而未矿化组支架表面无明显变化。21 d时,两组支架上形成的钙结节均变多,同时矿化组支架明显多于未矿化组(图7B)。

3 讨论

用于骨缺损修复的骨仿生支架是细胞黏附及表达功能的载体,由于骨组织细胞的细胞外基质一般由 I、III型胶原、糖胺聚糖和磷酸钙构成^[4],因此骨仿生支架的制作材料最好包含两个基本成分:骨

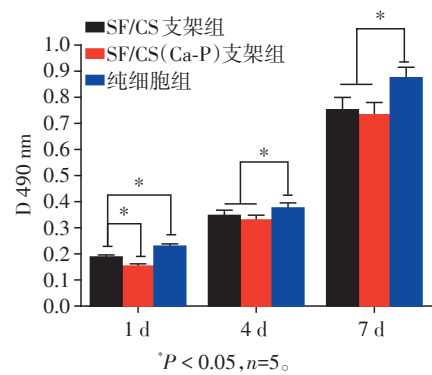


图6 支架细胞增殖比较

Figure 6 Comparison of the cell proliferation

矿物质和有机矿物质^[5]。在体外,有机高分子与无机物结合方法主要有包括分子模板法即通过原位生成或共沉淀,以溶液中的聚合物分子为模板调控矿化^[6-7];结构化聚合物模板法即采用SBF浸泡,在材料表面或内部交替沉积或原位沉积形成矿化物^[8-9];生物模板法即以微生物作为矿化模板实现矿化^[10];分子自组装法即通过设计实现矿化物质定点及按需形成^[11]等。结构化聚合物模板法是制作骨仿生复合支架的常用方法,其制备及矿化过程简单,且矿化效果较好。其中使用的SBF溶液最早由日本学者根据人体血浆中的离子浓度设计^[12],最初用于评价生物材料的生物活性^[13]。SBF溶液通过模拟人体体液中离子的成分和浓度,在材料表面成核、结晶、生长得到磷灰石覆盖层。经过长时间的发展及改进,不同浓度的SBF被研究并使用,且取得良好的效果^[14]。本实验采用10 \times SBF浸泡支架,10 \times SBF矿化时间较其他浓度SBF大大缩短,能在支架表面迅速获得磷灰石覆盖层,大大节约了实验成本,且矿化效果较好^[15]。

SEM图可以直观的看到矿化后支架表面形成颗粒状物质覆盖层,同时检测出钙、磷元素的存在。矿化组支架FT-IR图在1537 cm^{-1} 及1626 cm^{-1} 处的特征峰值显示原支架中SF及CS的存在^[16],证明原支架中的SF及CS并未因矿化行为而发生变化,而1054、604、566 cm^{-1} 处的峰值则与磷灰石覆盖层中p-o键拉伸和弯曲有关^[17]。SEM及FT-IR证明了仿生矿化的成功。

支架的吸水率是指支架浸泡于液体后,最大程度吸收液体的能力,其对营养物质的渗入,细胞的黏附、迁移和增殖均起着重要作用。已有研究表明在支架中加入羟基磷灰石类物质可以大大提高支架的吸水率^[18],这也与本实验的结果相符,表明仿生矿化可提高原支架的吸水性。

在力学检测中,支架所受拉应力逐渐增加,直

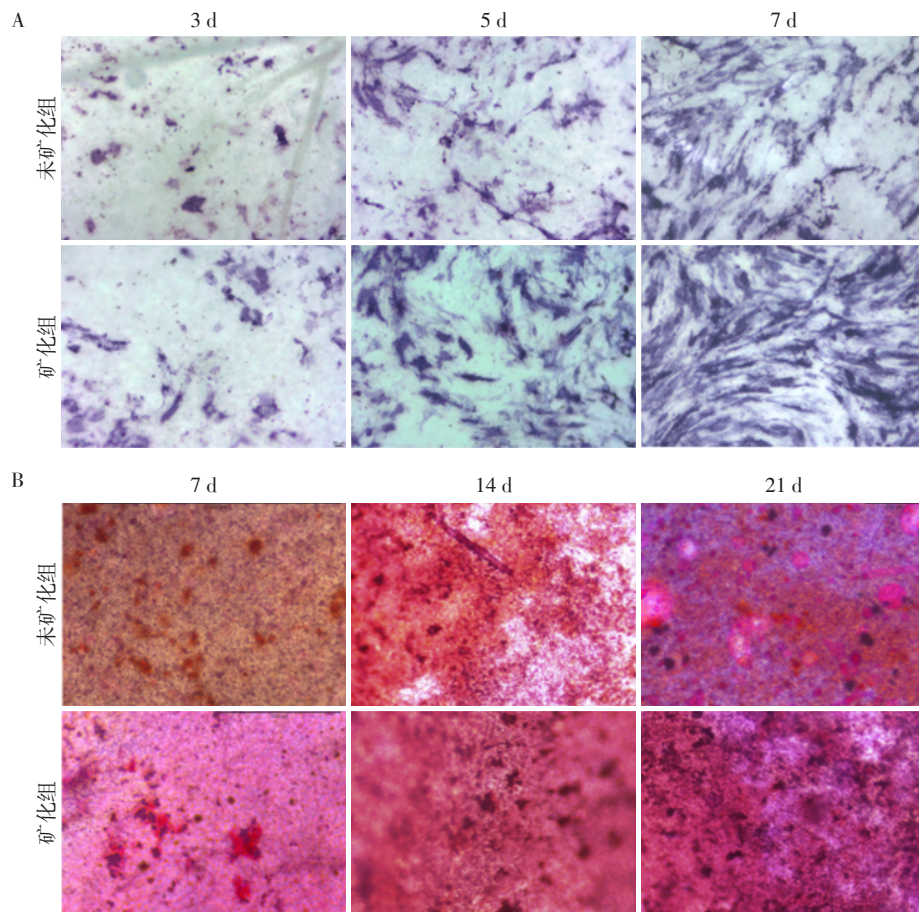


图7 两组支架ALP(A)及ARS(B)染色比较(×100)

Figure 7 Comparison of alkaline phosphatase(A)and alizarin red(B)staining in two groups(×100)

到支架断裂,断裂前矿化组支架较未矿化组能承受更大的应力,而产生的最大延伸率却较小,这是由于矿化组支架表面包裹磷灰石覆盖层,在矿化后由原先具有较好的弹性转变为具有较好的强度,增加了支架的刚性^[19]。虽然仿生矿化在一定程度上牺牲了原支架的弹性,但刚度的增加有助于保持支架在植入过程中的形态,并且在植入后能承受较大的载荷来支持骨新生。

24 h活细胞染色图显示在细胞定植于黏附期,未矿化组较矿化组有更多的细胞定植,这是由于矿化后产生的矿化物质包裹于纤维表面,使其孔径减小,一定程度上阻碍细胞进入支架。CCK-8结果表明,细胞在矿化组中随着时间的增加依旧不断增殖,表明仿生矿化并未增加支架对于细胞的毒性,其依旧具有良好的生物相容性。

ALP染色中碱性磷酸酶催化产生的高活性产物能与NBT反应生成不溶性的深蓝色NBT甲酰胺,是细胞早期成骨的标志^[20]。而ARS染色中茜素红可与HBMC成骨分化后沉积的细胞外基质结合,呈现

红色钙结节^[21],是细胞晚期成骨的标志。ALP和ARS染色中,矿化组支架所生成的深蓝色团块及钙结节随着时间的增加不断变多且均较未矿化组多,这表明矿化组支架对HBMSC的早期和晚期成骨分化均有更强的诱导作用,这可充分归功于矿化组支架中磷灰石覆盖层的存在,其作为人和动物骨骼的主要无机成分,对于细胞的成骨分化具有更好的刺激和诱导作用^[22]。

综上,本研究通过SBF浸泡法仿生矿化SF/CS支架,在其表面形成磷灰石覆盖层制备骨仿生支架。对矿化前后支架进行物理性能检测及体外细胞实验,证明矿化后的支架弥补了原支架机械性能差等缺点,同时进一步增强了诱导细胞成骨分化的能力,且仿生矿化行为并未增加支架的细胞毒性。所有结果均表明仿生矿化后的SF/CS支架更符合骨组织工程的要求,有望成为骨组织工程中非常有前途的支架。但SBF浸泡效果在一定程度上受浸泡时间、温度等影响,需进一步研究保证其效果,同时仿生矿化后支架在体内的应用仍需动物实验明确。

[参考文献]

- [1] ZHU L S, LUOD , LIU Y. Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration [J]. *Int J Oral Sci*, 2020, 12(1):6
- [2] WU JIANNAN, ZHENG AO, LIU YANG, et al. Enhanced bone regeneration of the silk fibroin electrospun scaffolds through the modification of the graphene oxide functionalized by BMP-2 peptide[J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 733-751
- [3] TAS A C, BHADURI S B. Rapid coating of Ti6Al4V at room temperature with a calcium phosphate solution similar to 10× simulated body fluid [J]. *Journal of Materials Research*, 2004, 19: 2742-2749
- [4] ZAIDA O, MARÍA E A, RICARDO D. Nanofibers and microfibrils for osteochondral tissue engineering [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1058: 97-123
- [5] NETO A, FERREIRA J. Synthetic and marine-derived porous scaffolds for bone tissue engineering [J]. *Materials*, 2018, 11(9): 1702
- [6] JIN S, HONG J, JAE W, et al. Osteogenic effect of inducible nitric oxide synthase (iNOS) - loaded mineralized nanoparticles on embryonic stem cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(2): 746-762
- [7] LI W H, CAI Y R, ZHONG Q W, et al. Silk sericin microcapsules with hydroxyapatite shells: protection and modification of organic microcapsules by biomimetic mineralization [J]. *J Mater Chem B*, 2016, 4: 340-347
- [8] HE J X, TAN W L, HAN Q M, et al. Fabrication of silk fibroin/cellulose whiskers-chitosan composite porous scaffolds by layer-by-layer assembly for application in bone tissue engineering [J]. *Mater Sci*, 2016, 51: 4399-4410
- [9] ZHANG C J, CAO M, LAN J L, et al. Regulating proliferation and differentiation of osteoblasts on poly(L-lactide)/gelatin composite nanofibers via timed biomineralization [J]. *Biomed Mater Res Part A*, 2016, 104(8): 1968-1980
- [10] LI K N, WANG J N, LIU X Q, et al. Biomimetic growth of hydroxyapatite on phosphorylated electrospun cellulose nanofibers [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90(4): 1573-1581
- [11] HUANG Y T, YAMAUCHI Y, RAWAT A . Gene pola as a suitable reference for studying antibacterial effect of hydroxyapatite [J]. *Biomed Nanotechnol*, 2015, 11(5): 906-912
- [12] Tadashi K, Hiroaki T. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(15): 2907-2915
- [13] Marc B, Jacques L. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(12): 2175-2179
- [14] Kyungsup S, Timothy A, Sean G, et al. Biomimetic mineralization of biomaterials using simulated body fluids for bone tissue engineering and regenerative medicine [J]. *Tissue Eng Part A*, 2017, 23(19-20): 1169-1180
- [15] Tadashi K, Seiji Y. Simulated body fluid and the novel bioactive materials derived from it [J]. *Biomed Mater Res A*, 2019, 107(5): 968-977
- [16] Abdel-Mohsena A M, Jancara J, Kalina L, et al. Comparative study of chitosan and silk fibroin staple microfibrils on removal of chromium (VI): Fabrication, kinetics and thermodynamic studies [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 15, 234: 115861
- [17] FAN J, YU M Y, LEI T D, et al. *In vivo* biocompatibility and improved compression strength of reinforced keratin/hydroxyapatite scaffold [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2018, 15(2): 145-154
- [18] ZHANG R, LI X W, LIU Y, et al. Acceleration of bone regeneration in critical-size defect using BMP-9-Loaded nHA/Coll/MWCNTs scaffolds seeded with bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 11, 2019: 7343957
- [19] MENG X Y, GONG K, SUN C, et al. Nonmineralized and mineralized silk Fibroin/Gelatin hybrid scaffolds: Characterization and cytocompatibility in vitro for bone-tissue engineering [J]. *Craniofac Surg*, 2019, 21: 1-4
- [20] 尤莹, 卜寿山, 庄海, 等. 钛表面碱热处理构建聚多巴胺膜层对细胞黏附的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(6): 833-837
- [21] LI J Q, WANG Q K, GU Y B, et al. Production of composite scaffold containing silk fibroin, chitosan, and gelatin for 3D cell culture and bone tissue regeneration [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 5311-5320
- [22] GAO Y F, SHAO W L, QIAN W, et al. Biomineralized poly(1-lactic-co-glycolic acid)-tussah silk fibroin nanofiber fabric with hierarchical architecture as a scaffold for bone tissue engineering [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2018, 84: 195-207

[收稿日期] 2019-10-09