

硅酸钙的掺入对胶原-壳聚糖支架的影响

李宝印^{1,2} 班硕丰¹ 戴桓琰¹ 段聪聪¹ 徐鸿玮¹ 韩冰^{1*}

(1. 吉林大学口腔医院颌面外科 吉林 长春 130021;

2. 吉林省牙发育及颌骨重塑与再生重点实验室 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的:探索不同质量分数的硅酸钙对胶原-壳聚糖支架性能的影响。方法:通过冷冻干燥法制成硅酸钙含量分别为0%、1%、2%、5%和8%(w/v)的支架,采用扫描电镜、能量色散谱分析,以及万能试验机检测其理化性能的变化。通过模拟体外矿化和细胞培养,检测其生物学性能的变化。结果:与对照组(0% w/v 硅酸钙)比较,随着硅酸钙含量的增加,支架的压缩弹性模量逐渐增加($P < 0.05$),降解速率也逐渐增加($P < 0.05$),而孔隙率逐渐减小($P < 0.05$);实验组均能促进成骨细胞的增殖以及碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的表达($P < 0.05$)。此外,实验组均有不同程度的羟基磷灰石晶体沉积,而对照组几乎无羟基磷灰石晶体沉积。结论:适量的硅酸钙能增强胶原-壳聚糖支架的理化性能,促进成骨及体外矿化,有作为骨组织工程支架的潜力。

[关键词] 硅酸钙 胶原蛋白 壳聚糖 组织工程

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2019)07—0716—05

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.07.023

Effect of Calcium Silicate Incorporation on Collagen-chitosan Scaffold. LI Baoyin^{1,2}, BAN Shuofeng¹, DAI Huan-yan¹, DUAN Congcong¹, XU Hongwei¹, HAN Bing^{1*}. 1. Department of Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Key Laboratory of Tooth Development and Bone Remodeling of Jilin Province, Changchun 130021, China.

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of calcium silicate incorporation on collagen-chitosan scaffold. **Methods:** The scaffolds with 0%, 1%, 2%, 5%, and 8% (w/v) calcium silicate were prepared by freeze-drying method. The physicochemical properties of the scaffolds were tested by scanning electron microscopy, energy dispersive spectroscopy, and universal testing machine. The changes of biological properties were detected by simulating mineralization and cell culture *in vitro*. **Results:** With the increase of calcium silicate, the compressive elastic modulus and degradation rate of the scaffolds increased while the porosity decreased gradually compared to the control group (0% calcium silicate, $P < 0.05$). The experimental group could promote the proliferation of osteoblasts and the expression of ALP ($P < 0.05$). Moreover, varying amount of HA crystals were deposited in different experimental groups, while no HA crystal was deposited in the control group. **Conclusion:** Appropriate amount of calcium silicate can enhance the physicochemical properties of collagen-chitosan scaffold and promote osteogenesis and mineralization *in vitro* suggesting a potential scaffold for bone tissue engineering.

[Key words] calcium silicate collagen chitosan tissue engineering

建立良好的营养供给是骨组织工程中组织成活的关键^[1],目前主要利用生长因子、共培养以及预血管化^[2,3]来使组织工程血管化,但都有一定的缺陷。如果材料通过自身的优化设计,而不是添加活体细胞或细胞因子来调动人体的自我修复功能,使材料

自身能促进组织生成血管,将为骨组织工程提供更有前景的方法。

在以往的研究中,硅离子能够通过细胞旁泌通路上调细胞生长因子而促进血管生成^[4]。在支架中掺杂硅能增加材料的机械力量还能促进成骨细胞增殖及分化^[5]。壳聚糖是天然带正电荷的多糖,能够促进成骨细胞的增殖和分化,也利于钙盐的沉积^[6,7],可以与胶原蛋白发生物理交联,同时其在碱性条件下能发生自身交联^[8,9],从而增强支架的机械性能。本实验在此基础上复合不同质量的硅酸

基金项目 吉林省科技发展规划项目(编号:20180201053YY)

吉林省省级产业创新专项资金项目(编号:2018C052-12)

作者简介 李宝印(1991~),男,安徽人,硕士在读,主要从事骨组织工程研究。

*** 通信作者** 韩冰, E-mail: hbing@jlu.edu.cn

钙,以获得合适的骨组织工程支架。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料 大分子 I 型胶原蛋白(Yaji Bio, 上海, 中国);壳聚糖(Sigma, USA);硅酸钙(Maclin, 上海, 中国);高糖培养基(H-DMEM, Hyclone, USA);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Gibco, USA)。

1.2 支架的制备 将等质量的胶原和壳聚糖充分溶于 1% 乙酸中,制成 1% (w/v) 的壳聚糖-胶原乙酸溶液。分成等质量的 5 份,分别加入不同质量硅酸钙粉末,磁力搅拌 12 h 充分混匀,制成 0%、1%、2%、5% 和 8% (w/v) 硅酸钙复合物,移入模具(48 孔板)中,冻干,制得固体复合支架,5% NaOH 溶液浸泡 24 h,去离子水反复冲洗,二次冻干,4 °C 保存备用。

1.3 硅酸钙的掺入对支架形态和结构的影响

1.3.1 硅酸钙的掺入对支架结构的影响 将样本干燥处理后,表面喷金,在扫描电镜(SEM, HITACHI S-4800, Japan)下观察并拍照。

1.3.2 硅酸钙的掺入对支架孔隙率的影响 根据阿基米德原理测量支架孔隙率(P): $P(\%) = (M_2 - M_1) / (M_2 - M_3) \times 100\%$, 其中 M_1 为支架干重, M_2 为支架从水中取出后拭去表面水分后的重量, M_3 为支架完全浸在水中时的重量。

1.4 硅酸钙的掺入对支架力学性能的影响

1.4.1 硅酸钙的掺入对支架弹性压缩模量的影响 利用电子万能试验机(SHIMADZU, AG-XPLUS10KN, Japan)测量支架材料的压缩模量。随机选取各组支架样本,37 °C 下磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)浸泡 24 h,以模拟体内生理环境,设置预荷载为 0.5 N,最大压缩应变为 10%,绘制应力-应变曲线,得出支架的压缩位移、压缩应变、弹性模量等参数,分析支架的力学性能。

1.4.2 硅酸钙的掺入对支架吸水率的影响 随机选取各组支架样本,将样本干燥后称重,记为 M_0 ;再将样本完全浸于 PBS 24 h,滤纸吸干表面水分后称重,记为 M_1 ,支架吸水膨胀率 (swelling ratio, S) 为: $S(\%) = (M_1 - M_0) / M_0 \times 100\%$ 。

1.4.3 硅酸钙的掺入对支架降解率的影响 随机选取各组支架样本,将样本浸入含 10% FBS 的 H-DMEM 中,37 °C、5% CO_2 培养箱孵育 28 d。支架的初始重量记为 M_1 ,28 d 后,将支架在去离子水中洗涤以去除吸附在表面上的离子并干燥,干重记

为 M_2 ,支架的降解率 (degradation rate, D) 为: $D(\%) = (M_1 - M_2) / M_1 \times 100\%$ 。

1.5 评估硅酸钙支架支持血管化的潜力

1.5.1 支架材料提取液的制备 取质量、大小相同的各组支架样本,按照国家标准(GB/T16886.12-2005/ISO 10993-12:2002)制备浸提液。将消毒后的材料浸入含 10% FBS 的 H-DMEM 中,使支架材料表面积/培养液体积为 $6 \text{ cm}^2/\text{mL}$,37 °C 孵育 72 h 后离心收集上清液,滤器(Millipore, $22 \mu\text{m}$)过滤后 4 °C 保存备用。

1.5.2 支架材料提取液相关离子浓度测定 通过电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES; Optima 3000DV, Perkin Elmer, USA)测量每组 Ca、Si 和 P 离子浓度。

1.6 评估硅酸钙支架对细胞活性的影响

1.6.1 小鼠前成骨细胞培养 选用小鼠颅骨来源的 MC3T3-E1 细胞系,37 °C、5% CO_2 恒温培养箱孵育,每隔 1 d 换液,细胞铺满培养瓶 80% 以上时,胰酶消化传代。

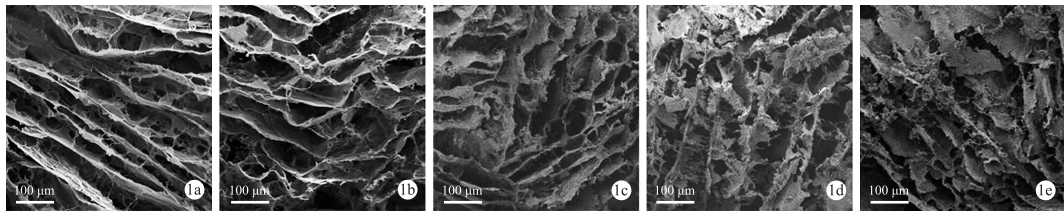
1.6.2 不同质量分数硅酸钙支架对细胞活性的影响 将生长状态较好的 MC3T3-E1 细胞以 5×10^3 个细胞/孔接种于 96 孔板中,孵育过夜,实验组加入 100 μL 各组支架提取液,对照组加入等量正常培养液。分别孵育 24、48、72 h,每孔加 10 μL 的细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)溶液,孵育 1 h 后测其在 450 nm 处的吸光度(A)值。

1.7 评估硅酸钙支架对成骨细胞成骨的影响

1.7.1 体外模拟矿化实验 参照文献[10]的描述,将各组支架材料浸泡于模拟体液(simulated body fluid, SBF)中,使材料表面积/SBF 体积为 $10 \text{ cm}^2/\text{mL}$,37 °C、5% CO_2 恒温培养箱中孵育 1 周后,去离子水反复轻轻冲洗,干燥后保存备用。

1.7.2 扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)与能量色散谱分析(energy dispersive spectroscopy, EDS)对 SBF 处理过的支架,通过 SEM 观察其表面产生的沉积物,并且通过 EDS 分析。

1.7.3 硅酸钙支架对成骨细胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性的影响 将生长状态较好的 MC3T3-E1 细胞以 1×10^5 个细胞/孔接种于 6 孔板中,孵育过夜,实验组加入 2 mL 各组支架提取液,对照组加入等量正常培养液,继续孵育 3 d,在超声波细胞粉碎机下破碎细胞,离心取上清液。按照 ALP 试剂盒(Beyotime, Shanghai, China)说明书铺板,在培养箱中孵育 30 min 后加终止液终止反



1a:0% (w/v)硅酸钙复合物;1b:1% (w/v)硅酸钙复合物;1c:2% (w/v)硅酸钙复合物;1d:5% (w/v)硅酸钙复合物;1e:8% (w/v)硅酸钙复合物

图 1 各组支架的 SEM 表现(×100)

Fig. 1 SEM micrographs of the surface of different types of scaffolds(×100).

应,测其在 405 nm 处的 A 值。

1.8 统计学分析 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。进行了 3 次独立实验并且每次测试至少有 3 个样品用于统计分析。使用单因素方差分析(One-way ANOVA)然后进行 Bonferroni 事后分析评估统计学差异。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 壳聚糖掺入对支架形态和结构的影响 电镜显示(图 1)各组支架孔隙大小无明显变化,孔隙较均匀,表观上无明显差异。与对照组(0% w/v 硅酸钙)比较,硅酸钙含量较少时(1%、2%),支架孔隙率无明显变化;当硅酸钙含量较高时(5%、8%),支架孔隙率随着硅酸钙比例的增加而减小[(88.16 ± 4.41)%、(88.91 ± 1.21)%、(86.14 ± 5.74)%、(82.42 ± 4.62)%和(81.38 ± 1.42)% , $P < 0.05$]。

2.2 硅酸钙的掺入对支架力学性能的影响 和对照组比较,硅酸钙含量较少时(1%、2%),支架的压缩模量、吸水率和降解速率均无明显变化。但当硅酸钙含量较高时(5%、8%),支架的压缩模量随着硅酸钙比例的增加而增加($P < 0.05$),支架的降解速率也明显增加($P < 0.05$),但支架的吸水率却降低($P < 0.05$,表 1)。

表 1 各组支架弹性压缩模量、吸水率、降解率变化

Tab. 1 Compressive modulus, swelling ratio, and degradation rate of different types of scaffolds $\bar{x} \pm s$

组别	弹性压缩模量/kPa	吸水率/%	降解率/%
0%CaSiO ₃	11.38±2.49	13.29±1.78	20.93±4.25
1%CaSiO ₃	14.24±1.94	14.24±2.43	27.30±2.63
2%CaSiO ₃	10.78±1.51	12.00±0.13	35.62±3.06
5%CaSiO ₃	23.73±3.00 ^{*1}	7.87±0.56 ^{*1}	49.89±7.29 ^{*1}
8%CaSiO ₃	33.32±5.13 ^{*3}	5.77±0.42 ^{*2}	52.40±3.41 ^{*2}

注:与 0%CaSiO₃ 组比较, * 1 $P < 0.05$, * 2 $P < 0.01$, * 3 $P < 0.001$

2.3 评估硅酸钙支架支持血管化的潜力 支架提取液中 Si、Ca、P 的含量通过 ICP 测得,随着硅酸钙含量的增加,支架提取液中 P 离子浓度并无明显变

化,Si 和 Ca 的离子浓度逐渐增高,但当硅酸钙含量达到 2%时,达到平衡,Si 和 Ca 的离子浓度并无明显变化(表 2)。

表 2 支架提取液中 Si、Ca、P 离子浓度

Tab. 2 Concentration of Si, Ca, and P ions in the extracts of scaffolds mg/L, $\bar{x} \pm s$

组别	Si	Ca	P
0%CaSiO ₃	0.23±0.05	0.28±0.07	1.39±0.47
1%CaSiO ₃	2.49±0.58 ^{*1}	1.16±0.23 ^{*1}	1.34±0.28
2%CaSiO ₃	7.18±1.16 ^{*3}	3.34±0.54 ^{*2}	1.43±0.36
5%CaSiO ₃	7.23±0.36 ^{*3}	3.88±0.71 ^{*2}	1.31±0.36
8%CaSiO ₃	7.74±1.04 ^{*3}	4.27±0.65 ^{*2}	1.35±0.42

注:与 0%CaSiO₃ 组比较, * 1 $P < 0.05$, * 2 $P < 0.01$, * 3 $P < 0.001$

2.4 评估硅酸钙支架对细胞活性及毒性的影响 各组细胞在 24 h 内的活性并无明显差异;细胞培养 48 h 后,细胞数量明显增加,实验组细胞活性均高于对照组($P < 0.05$),0%组和 1%组细胞活性明显低于 2%组和 5%组($P < 0.05$),和 8%组相比差异无统计学意义。而细胞生长 72 h 后各组细胞数下降,且各组间比较差异无统计学意义(图 2)。

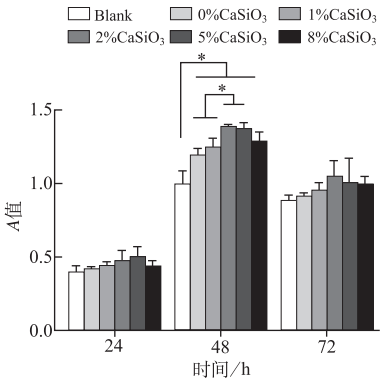


图 2 细胞培养 24 h、48 h、72 h 后 A 值

Fig. 2 Cell culture with different types of extracts for 24h, 48h, and 72h.

2.5 评估硅酸钙支架对成骨细胞成骨的影响 通过 SEM 及 EDS 分析体外矿化模拟结果,发现无硅酸钙组几乎无羟基磷灰石晶体沉积,而其他各组均

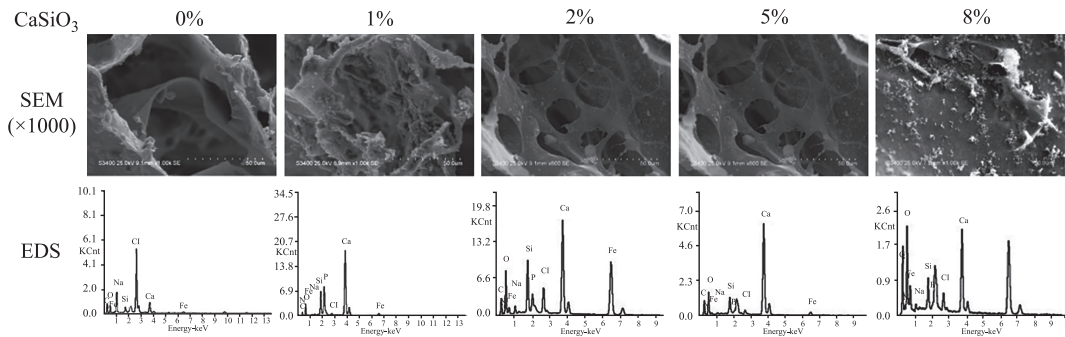


图3 各组支架在 SBF 中浸泡 7d 后 SEM 和 EDS 结果

Fig. 3 SEM and EDS photographs of the surface of scaffolds soaked in SBF for 7 days.

有不同程度的羟基磷灰石晶体沉积(图 3)。与对照组 $[(1.83 \pm 0.15) \text{ nmol}/(\text{mL} \cdot \text{min})]$ 比较,硅酸钙含量较少时,1% $[(2.01 \pm 0.19) \text{ nmol}/(\text{mL} \cdot \text{min})]$ 、2% $[(2.26 \pm 0.48) \text{ nmol}/(\text{mL} \cdot \text{min})]$,各组细胞 ALP 活性比较差异无统计学意义;当硅酸钙含量较高时,5% $[(2.44 \pm 0.19) \text{ nmol}/(\text{mL} \cdot \text{min})]$ 、8% $[(2.52 \pm 0.16) \text{ nmol}/(\text{mL} \cdot \text{min})]$,细胞 ALP 活性高于对照组($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究发现,少量的硅酸钙对支架形态和力学性能并无明显影响。但当硅酸钙含量较高时,支架的力学性能虽然得到了增强,但孔径和孔隙率均开始减小,这进一步导致支架吸水率的降低。而支架的吸水率越高,表示支架与机体的相容性越好^[11]。此外,支架的降解率随着硅酸钙含量的增加而增加,这是因为硅酸钙含量虽然少,但其相对分子量大。支架降解过程中硅酸钙分子失去依附而脱离,因而支架的整体重量随着硅酸钙含量的增加而下降。

细胞培养结果显示,在培养条件改变的第 2 天,各组细胞数量出现明显差异,而且在硅酸钙含量为 2%、5% 时最高,达到 8% 时细胞数开始下降,因而我们推测硅酸钙含量在 2%~5% 时为最佳浓度。然而,在第 3 天,各组细胞数均出现下降,这是因为细胞生长速度快,在第 2 天时已经基本长满,因生长空间和营养的限制,反而抑制了细胞的增殖,导致细胞数的降低。

在研究支架的成骨能力时,笔者发现硅酸钙能够促进 HA 晶体的沉积,这与前人的研究结果一致。这是由于硅酸钙颗粒增加了支架表面的粗糙度,为磷灰石的矿化沉积提供了更多的成核位点。支架材料在填补组织空缺时,如果表面有羟基磷灰石沉积,那么机体会将材料视为自身的一部分,从而和机体相容,否则会被视为异物而排斥^[12]。说明硅酸钙可以增加支架的组织相容性。而材料表面由于

羟基磷灰石的沉积,其界面也能够刺激成骨细胞的增殖和分化^[13]。

在探究支架成骨方面,本文不仅模拟了体外矿化实验,还研究了支架提取液对成骨细胞 ALP 活性的影响。而结果也正如预测的那样,低含量的硅酸钙并未能增加细胞 ALP 活性,而硅酸钙含量高于 5%w/v 时,有明显的促进作用。在一定浓度范围内,硅离子参与调控 ALP 基因的表达,促进成骨细胞的增殖和分化^[5]。

前人的研究结果表明,硅离子在促进血管生长过程中起重要作用,且最佳促进血管生长的硅离子浓度在 0.7~1.8 mg/L^[14]。含有 1%(w/v)硅酸钙支架释放的硅离子浓度最接近该浓度,并且当硅酸钙含量超过 2%(w/v)时硅离子浓度达到饱和。因此推测支架中有适量硅酸钙可以促进血管生长,进而增加人工植入的成活率。

综上,适量的硅酸钙能增强胶原-壳聚糖支架的理化性能,利于成骨和体外矿化,有望成为骨组织工程支架材料。

参考文献

[1] Grellier M, Bordenave L, Amédée J. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering [J]. Trends Biotechnol, 2009, 27 (10):562-571.

[2] Herbert SP, Stainier DY. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(9):551-564.

[3] Pei Y, Xin H, Shen J, et al. Development of a new pre-vascularized tissue-engineered construct using pre-differentiated rADSCs, arteriovenous vascular bundle and porous nanohydroxyapatite-polyamide 66 scaffold [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2013, 14:318

[4] Zhai W, Lu H, Chen L, et al. Silicate bioceramics induce angiogenesis during bone regeneration [J]. Acta Biomater, 2012, 8(1):341-349.

[5] Fielding GA, Bandyopadhyay A, Bose S. Effects of silica and

- zinc oxide doping on mechanical and biological properties of 3D printed tricalcium phosphate tissue engineering scaffolds [J]. Dent Mater, 2012, 28(2):113-122.
- [6] 钟志华,施斌,周先略.磷酸三钙/壳聚糖支架与牙周膜干细胞混合培养的动物实验[J].口腔医学研究,2015,31(1):31-33.
- [7] Arakawa C, Ng R, Tan S, et al. Photopolymerizable chitosan-collagen hydrogels for bone tissue engineering [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2017, 11(1):164-174.
- [8] Chaleawlerit-Umpun S, Nuchuchua O, Saesoo S, et al. Effect of citrate spacer on mucoadhesive properties of a novel water-soluble cationic β -cyclodextrin-conjugated chitosan [J]. Carbohydr Polym, 2011, 84(1):186-194.
- [9] 石珊珊,姚江武.壳聚糖-胶原复合 TGF- β 微球的复合支架的制备及用于牙周组织再生的可行性研究[J].口腔医学研究,2014,30(12):1138-1140.
- [10] Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity [J]. Biomaterials, 2006, 27(15):2907-2915.
- [11] Raschip IE, Vasile C, Macocinschi D. Compatibility and biocompatibility study of new HPC/PU blends [J]. Polym Int, 2010, 58(1):4-16.
- [12] Dutta SR, Passi D, Singh P, et al. Ceramic and non-ceramic hydroxyapatite as a bone graft material: a brief review [J]. Ir J Med Sci, 2015, 184(1):101-106.
- [13] Bhuniratan S, Grayson WL, Castaneda A, et al. Nucleation and growth of mineralized bone matrix on silk-hydroxyapatite composite scaffolds [J]. Biomaterials, 2011, 32(11):2812-2820.
- [14] Li H, Chang J. Stimulation of proangiogenesis by calcium silicate bioactive ceramic [J]. Acta Biomater, 2013, 9(2):5379-5389.
- [收稿日期:2018-11-06] (本文编辑 关隽)

2019 年中国中部国际口腔展欢迎你的到来

享誉全国的口腔医疗行业盛会——2019 中部国际口腔展将于 11 月 30 日至 12 月 2 日在武汉国际博览中心举行。

预计本届展会展出面积达 4 万平方米,将吸引全球 30 多个国家和地区的 500 多家企业齐聚中部武汉,展示口腔医疗研发最新技术和产品以及前沿发展趋势。届时将有来自国内外的 30,000 名专业观众到场参观。中部国际口腔展是口腔医疗企业开拓中部市场、品牌建设的首选推广平台,更是一个具有创新性、可持续性、可合作性的口腔医疗学术交流与人才交流的平台。

2019 年展会招展范围涵盖口腔医疗全产业链,口腔种植、正畸、义齿加工、根管治疗、口腔影像设备、口腔预防保健依然是热门主题。民营口腔蓬勃发展,未来可期。展会纵深口腔医疗垂直平台,紧跟口腔医疗互联网+的发展趋势,专注运营提效和品牌塑造领域,助力"健康中国 2030"国家医疗健康战略。2019 年招展范围将延伸至口腔互联网服务、营销推广、运营管理、政策法规等领域,助力口腔医生以及口腔机构的品牌提升。与此同时,各领域相互渗透交叉,上下游供应链客户共同展示,实现参展价值最大化。

同期热点学术会议及培训班,汇聚国内顶级讲师,全面助力口腔医生职业提升

2019 年展会将带来 120 余场学术会,8 大主题培训班,200 余位国内外权威专家汇聚中部武汉,向学员分享丰富的临床经验和技巧,帮助临床医生掌握工作技能,提升实战能力。会议期间还将举办湖北省口腔医学会专委会换届大会,“展”与“会”联动创造高附加值平台。

2019 中国口腔医学人才供需见面会,品质升级,吸引更多学生驻足

2019 中国口腔医学人才供需见面会是武汉大学口腔医学院口腔医学人才招聘大会的延续,2019 年人才供需见面会的求职范围将从传统的口腔医生、护士等岗位延伸到口腔医院运营、管理、市场、财务等岗位,并为应届毕业生提供海外留学咨询服务,丰富学生的晋升选择。活动同期还将举办五省口腔人才创新交流活动,让人才充分展示自己。

中部国际口腔展官方网站:<http://www.cwcde.com.cn>,咨询电话:13018043369