

丝素纤维/硫酸钙抗感染骨材料的制备及性能

刘世超¹ 连小洁^{*,1,2} 徐睿¹ 史振东^{1,3} 杜苗苗¹ 张斯若¹

何志敏⁴ 魏延^{1,2} 黄隽^{1,2} 王秀梅⁵ 崔福斋⁵

(¹太原理工大学力学学院, 生物医学工程系, 纳米生物材料与再生医学研究中心, 太原 030024)

(²太原理工大学应用力学与生物医学工程研究所, 材料强度与结构冲击山西省重点实验室, 太原 030024)

(³太原理工大学力学国家级实验教学示范中心, 太原 030024)

(⁴北京奥精医药科技有限公司, 北京 100176)

(⁵清华大学材料系, 北京 100084)

摘要: 通过控制丝素蛋白自组装过程制备了溶液状态下的丝素纳米纤维 (silk fibroin nanofibers, SFFs), 与硫酸钙、万古霉素 (vancomycin, VCM) 复合, 制备了 VCM/CS/SFFs 抗菌骨材料。通过 SEM、XRD、紫外分光光度计、万能力学试验机、抑菌圈、MTT 等手段分别研究了复合材料的微观形貌与结构、药物释放、力学、抑菌及细胞相容性等性能。结果显示, 与水作为固化液相比, 随着 SFFs 溶液 (0.017 5~2.1 mg·mL⁻¹) 的加入, 复合材料凝固时间可控, 降解率逐渐降低, 抗水性增强, 韧性提高; 同时随丝素纳米纤维含量的增加骨材料抗压强度表现为先增加后减小的趋势, 一周内药物释放速率降低; 材料同时具有抑菌作用; MTT 实验结果显示, 加入丝素纳米纤维后与纯的硫酸钙相比 MC3T3 细胞增殖明显。

关键词: 丝素纳米纤维; 半水硫酸钙; 感染性骨缺损; 力学性能; 细胞相容性

中图分类号: TQ174

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2018)03-0490-09

DOI: 10.11862/CJIC.2018.065

Silk Nanofibers/Calcium Sulfate Composite: Preparation and Properties on Infective Bone Repair

LIU Shi-Chao¹ LIAN Xiao-Jie^{*,1,2} XU Rui¹ SHI Zhen-Dong^{1,3} DU Miao-Miao¹

ZHANG Si-Ruo¹ HE Zhi-Min⁴ WEI Yan^{1,2} HUANG Di^{1,2} WANG Xiu-Mei⁵ CUI Fu-Zai⁵

(¹Department of Biomedical Engineering, Research Center for Nano-biomaterials & Regenerative Medicine, College of Mechanics, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

(²Institute of Applied Mechanics & Biomedical Engineering, Shanxi Key Laboratory of Material Strength & Structural Impact, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

(³National Demonstration Center for Experimental Mechanics Education, Taiyuan university of Technology, Taiyuan 030024, China)

(⁴Allgens Medical Science & Technology Co., Ltd., Beijing 100176, China)

(⁵Department of Materials Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Silk fibroin nanofibers solution (SFFs) was processed through controlling silk protein molecules self-assembly process, which were incorporated with vancomycin (VCM) to calcium sulfate (CS) for infective calcium sulfate-based materials. Surface morphology of the material was observed using SEM. Structure of the materials was studied with XRD. Drug release property of materials was evaluated using UV absorbance. Mechanical

收稿日期: 2017-09-30。收修改稿日期: 2017-11-30。

国家自然科学基金青年科学基金(No.51502192, 51503140, 11502158), 山西省基础研究计划项目一般青年基金(No.2014021039-6), 山西省高等学校科技创新(No.2016142), 太原理工大学青年基金(No.2014TD066, 2013Z020), 太原理工大学引进人才(No.tyut-rc201270a), 太原理工大学技术服务(No.143230043-J)和山西省研究生教育创新项目(No.2017SY023)资助。

*通信联系人。E-mail: yuhalian@126.com

property of the materials was tested using computer-controlled electronic universal testing machine. Antibacterial property was illustrated by inhibition zone. Cytocompatibility was assessed by MTT assay. The results show that the addition of SFFs can not only effectively reduce the degradation rate of the composite material, but also enhance toughness and water resistance comparing to water as setting liquid. And the compressive strength first increased, then decreased as the concentration of SFFs from 0.017 5 to 2.1 mg·mL⁻¹. The results also show that the composite with controllable setting time has excellent antibacterial properties and drug slow-release performance in a week as well as better cell proliferation with MC-3T3.

Keywords: silk fibroin nanofibers; calcium sulfate hemihydrate; infective bone defect; mechanical properties; cytocompatibility

0 引言

感染、骨髓炎、癌症、创伤等均可能导致感染性骨缺损^[1-2],相对于全身用药,局部治疗因其在感染局部植入载药骨材料支架使药物在局部释放而使毒副作用降低^[3]。在过去几十年中,研究人员已经进行了各种尝试来制备具有与天然骨性能相似的骨修复材料^[4]。其中 α 型半水硫酸钙(α -calcium sulfate hemihydrate, α -CS)被视为一种优良的骨移植替代材料。它可以原位固化、任意塑性、具有良好的骨传导性、生物相容性、不易引起免疫排斥反应,已被临床上使用^[5-7]。然而硫酸钙脆性大、降解速度快,以及载药后初期突释等问题^[8]限制了其在临床上广泛的应用^[9]。

丝素蛋白(Silk fibroin,SF)是从蚕丝中提取的结构蛋白,具有优良的生物相容性、可控的降解行为,可以制备成丝素纤维、丝素凝胶、丝素膜、丝素海绵等,并已应用于手术缝合线、皮肤、韧带及骨组织工程、细胞培养基质、药物释放等方面^[10-11]。丝素包含多种氨基酸,独特的氨基酸侧链及疏水性的有序排列使其能够发生自组装;同时,包括丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、酪氨酸、苏氨酸等氨基酸表面具有活性基团可与别的离子或基团结合,发生化学键合^[12-13]。已有研究将丝素溶液作为固化液来改善硫酸钙材料的力学性能^[14],但是本研究发现直接用溶解后的丝素溶液作为固化液使凝固时间延长明显,虽然韧性得到提高但是抗压强度降低。目前有较多使用纤维增强的方式来提高硫酸钙的力学性能^[15],同时有研究发现,由丝素蛋白制备的丝素纳米纤维(SFFs)可以同时抑制破骨细胞的生长和刺激成骨细胞分化,缩短骨折愈合时间,减少并发症^[16]。

本研究制备了丝素纳米纤维溶液,并作为硫酸钙的固化液,拟通过构建一种万古霉素(VCM)/硫酸

钙/丝素纳米纤维(VCM/CS/SFFs)的复合骨修复材料,具体考察复合骨修复材料的力学、降解、药物释放速率及抑菌、细胞相容性等性能随丝素纳米纤维浓度的变化,为该复合材料今后在感染性骨缺损临床应用中奠定基础。

1 材料和方法

1.1 SFFs的制备

称取一定量的蚕丝,在 0.02 mol·L⁻¹ 的碳酸钠溶液中脱胶 30 min,烘干。进一步溶于 9.3 mol·L⁻¹ 的 LiBr 中,冷却,溶液在去离子水中透析 72 h,经 9 000 r·min⁻¹ 离心(H1850 湘仪离心机仪器有限公司)后获得丝素蛋白溶液。

将丝素蛋白溶液放入 60 ℃ 烘干箱(BPG-9106A,上海一恒科学仪器有限公司),经缓慢浓缩至 20%(w/w),再稀释至 5 mg·mL⁻¹,放入 60 ℃ 的烘干箱中培养 24~48 h,得到丝素纳米纤维(SFFs)^[17]。在扫描电镜(Jeol JSM-7100F,日本电子)上进行形貌观察,工作电压 3 kV。

1.2 α -CS 的制备

医用硫酸钙为 α 型半水硫酸钙,分子式为 α -CaSO₄·1/2H₂O,本研究通过水热法制备 α -CS。将二水硫酸钙(calcium sulphate dehydrate,CSD)(德国Merk公司)在温度 127 ℃,饱和蒸汽压 0.1~0.2 MPa 下反应 8~10 h,放入烘箱中烘干,即制得白色粉末 α -CS^[18]。

1.3 VCM/CS/SFFs 的制备

选用 α -CS、VCM为固相,CSD为促凝剂,不同浓度的SFFs溶液为固化液,液固比(L/S)为 0.7 mL·g⁻¹的条件下,按表1中固相比比例和不同丝素纤维浓度搅拌均匀制成2种规格的试样。大试样规格为 Φ 10×15 mm,用于进行力学实验与凝固时间的测定;小试样规格为 Φ 4×3 mm,用于进行抑菌、药物释

表 1 复合材料中各组分的比例

Table 1 Proportion of components in composite materials

Sample	Solid phase	Liquid phase(SFFs)
1(VCM/CS/H ₂ O)		0
2(VCM/CS/0.0175SFFs)	α -CS(90%, w/w) CSD(5%, w/w) VCM(5%, w/w)	0.017 5 mg·mL ⁻¹
3(VCM/CS/0.035SFFs)		0.035 mg·mL ⁻¹
4(VCM/CS/0.07SFFs)		0.07 mg·mL ⁻¹
5(VCM/CS/0.21SFFs)		0.21 mg·mL ⁻¹
6(VCM/CS/2.1SFFs)		2.1 mg·mL ⁻¹

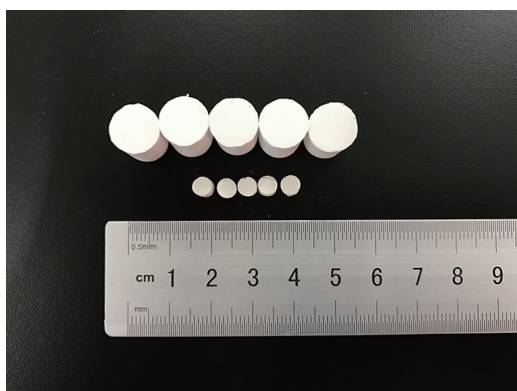


图 1 样品尺寸

Fig.1 Size of samples

放、降解、生物相容性 MTT 等实验。

1.4 VCM/CS/SFFs 的性能

凝固时间测定:采用维卡仪(上海金虞检测仪器有限公司)测定试样的凝固时间。维卡仪重针(350 g)自由并垂直下降,若试样表面没有明显可见的印记,定义为终凝。

抑菌实验:制备 VCM/CS/H₂O、VCM/CS/2.1SFFs 复合材料,每组 4 个重复样。分别将 2 组样品放入含有金黄色葡萄球菌的培养皿中,培养 16 h 后,测量其抑菌环的宽度。

药物释放实验:将复合材料制备成尺寸为 Φ 4×3 mm 的样品,每组 5 个重复样品。放入加有 PBS 缓冲液的离心管,将各离心管放置在 37 ℃ 的恒温振荡箱(SHA-C,上海比朗仪器有限公司),100 r·min⁻¹ 振荡。分别于 1 h,3 h,6 h,18 h,1 d,2 d,4 d 和 7 d 将上层清液取出、抽滤、冷冻保存备用,同时向离心管补充新鲜溶液,继续振荡。用紫外分光光度计测样品在 280 nm 的吸光度。药物释放标准曲线方程 $A=0.004\ 34C+0.004\ 36$,线性相关系数 $R^2=0.998\ 9$ 。式中, A 为吸光度; C 为溶液中万古霉素的浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),公式表现出药物的浓度与 280 nm 处的吸光度之间良好的线性关系。

抗水、降解实验:将复合材料制成 Φ 4×3 mm 的样品,脱模后,立刻放入装有定量 PBS 缓冲液的烧杯,置于 37 ℃ 的恒温振荡箱中(60 r·min⁻¹),6 h 后取出,以复合材料的质量损失率来定量考察复合材料的溃散性能^[19]。降解实验:将制备的样品干燥后放入 37 ℃ 的 PBS 缓冲液中恒温振荡,4 周后测量其质量损失率。

复合材料力学性能测定:分别制备 6 组尺寸为 Φ 10×15 mm 的复合材料,每组 5 个平行样品。常温下干燥 21 d,用砂纸将试件两端打磨平整。置于万能力学试验机(三思微机控制电子万能试验机)进行抗压强度的测定,施加载荷速度为 1 mm·min⁻¹,记录各样品的抗压强度。并计算每组试件的压缩断裂功。

复合材料生物相容性的测定:MTT 比色法测定 MC-3T3 细胞在 VCM/CS/H₂O 与 VCM/CS/2.1SFFs 复合材料上的增殖情况。

MC-3T3 用含有新生牛血清(15%, V/V)、100 IU·mL⁻¹ 青霉素、100 IU·mL⁻¹ 链霉素、DMEM 培养基的完全培养基,置于 37 ℃,CO₂(5%, V/V)孵化箱进行培养。用辐照剂量 15 kGy 灭菌 Φ 4×3 mm 的样品片,置于 96 孔培养板,将细胞密度为 $2.5\times 10^5\ \text{mL}^{-1}$ 每孔 200 μL 细胞悬浮液种到 96 孔培养板材料上进行培养,每 2 d 换一次培养液。培养 2、4 d 时,加入 MTT 20 μL ,继续培养 4 h,吸出,加入二甲亚砜(DMSO),形成紫色溶液,每个样品孔的 100 μL 溶液移入新的 96 孔板中,在 450 nm 测定其吸光度。每组样品每个时间点检测 4 个样品。

第 4 d 用 PBS 漂洗 2 次,除去样品表面未贴壁细胞,将样品放入 24 孔板中,加 4 ℃ 预冷的戊二醛(2.5%, V/V),4 ℃ 固定 2 h 后吸出,用 PBS 漂洗 2 次,每次 10 min,依次乙醇系列梯度(30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%, V/V)脱水,每次 10 min,干燥、喷金后,在扫描电镜下进行观察。

1.5 统计方法

数据经过 OriginPro8 软件处理,采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。应用 SPSS 19.0 进行统计学分析,根据显著性检验方法得到的 P 值是统计学对数据差异性的评价, P 值越小认为数据间存在差异的可能性越大,一般以 * 表示 $P<0.05$,代表有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 SFFs 形貌观察

如图 2,丝素纳米纤维的直径约为 15 nm,长度可达 1.5 μm 。当丝素纳米纤维溶液的浓度为 2.1 和 0.21 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,由于丝素纳米纤维的浓度大,丝素纤维发生了团聚现象(图 2(a,b))。当丝素纳米纤维溶液的浓度为 0.07 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,丝素纳米纤维虽然也有团聚现象,但是在边缘可以观察到不同长度丝素纳米纤维的存在(图 2(c))。随着丝素纳米纤维浓度的降低,纤维具有更好的分散性,纳米纤维的形貌逐渐变的清晰(图 2(d,e))。

丝蛋白分子由疏水段和亲水段组成,具有类似

于嵌段共聚物的性质,在水环境中难以长时间保持舒展状态,容易形成胶束,分子链末端大的亲水区主要存在于胶束的外部,疏水区和部分小的亲水区在胶束内部。由于丝蛋白的等电点是 4.2,中性条件下带有负电荷,且带负电荷基团主要分布在亲水区。因此,形成的胶束表面带有负电荷,负电荷的斥力使其能够在溶液中保持相对稳定^[20]。在丝素缓慢浓缩过程中,丝蛋白聚集成为直径 0.1~2 μm 的胶束,随着浓缩时间延长,丝蛋白仍然维持胶束状态,但胶束内的丝蛋白已经转变成直径在 15~20 nm 的纳米纤维^[21]。与此同时,由于胶束内外均有负电荷存在,内部负电荷斥力使得胶束处于亚稳态,而外部电荷作用则起到稳定作用,从而使得胶束受力平衡,在溶液中保持稳定。溶液稀释后,胶束外部电荷作用降低,而内部电荷作用不变,力平衡打破,胶束不稳定性提高,破裂,最终使得内部的纳米纤维释放出来。同时形成的丝素纳米纤维具有不溶于水,力学强度高等优点^[22]。

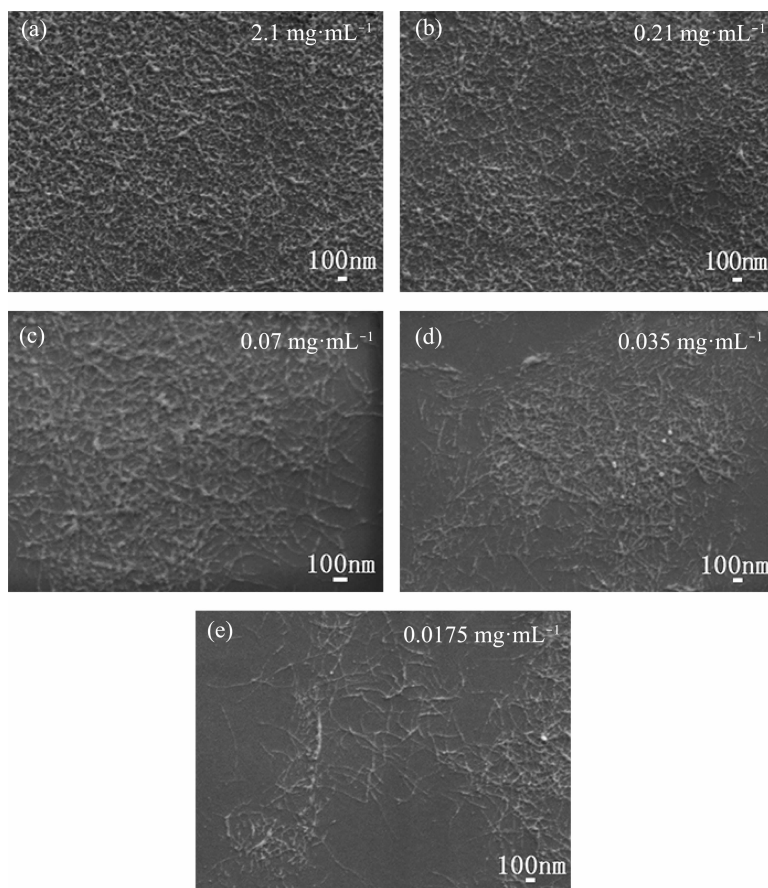


图2 不同浓度丝素纳米纤维的 SEM 照片,(a~e)的浓度分别为 2.1, 0.21, 0.07, 0.035, 0.017 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

Fig.2 SEM photographs of different concentrations of nanofibers (a~e) (2.1, 0.21, 0.07, 0.035, 0.017 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively)

2.2 VCM/CS/SFFs 形貌及微观结构观察

CSD 在 127 °C 饱和蒸气压条件下脱水, 形成晶体均一的 α -CS。图 3(a) 为 CSD, 可以看出, CSD 为片状或板状晶体。图 3(b) 为制备得到的 α -CS, 其晶形为棒状, 这表明 CSD 已转化为 α -CS, 晶体形貌发生了变化, 从片状或板状晶体变成了棒状晶体。

图 3(c)、3(d) 为 VCM/CS/H₂O、VCM/CS/2.1SFFs 复合材料的 SEM 照片。图中可以看出, 经过水化、结晶、硬固 3 个阶段后棒状的 α -CS 又转变成了片

状或板状结构, 表明 α -CS 与水搅拌固化后已经转变成 CSD。另外与 VCM/CS/H₂O 相比, VCM/CS/2.1SFFs 固化材料晶体交联在一起, 可能和丝素上的羧基、氨基等基团与硫酸钙中的 Ca²⁺ 的配位作用有关^[23-24]。

图 3(e、f) 分别为 VCM/CS/H₂O、VCM/CS/2.1SFFs 复合材料的 EDS 电子能谱。从能谱和元素分析可以看出, 丝素纳米纤维 SFFs 的加入, 使复合物中引入了氮元素, 这表明硫酸钙中混合有丝素纳米纤维。

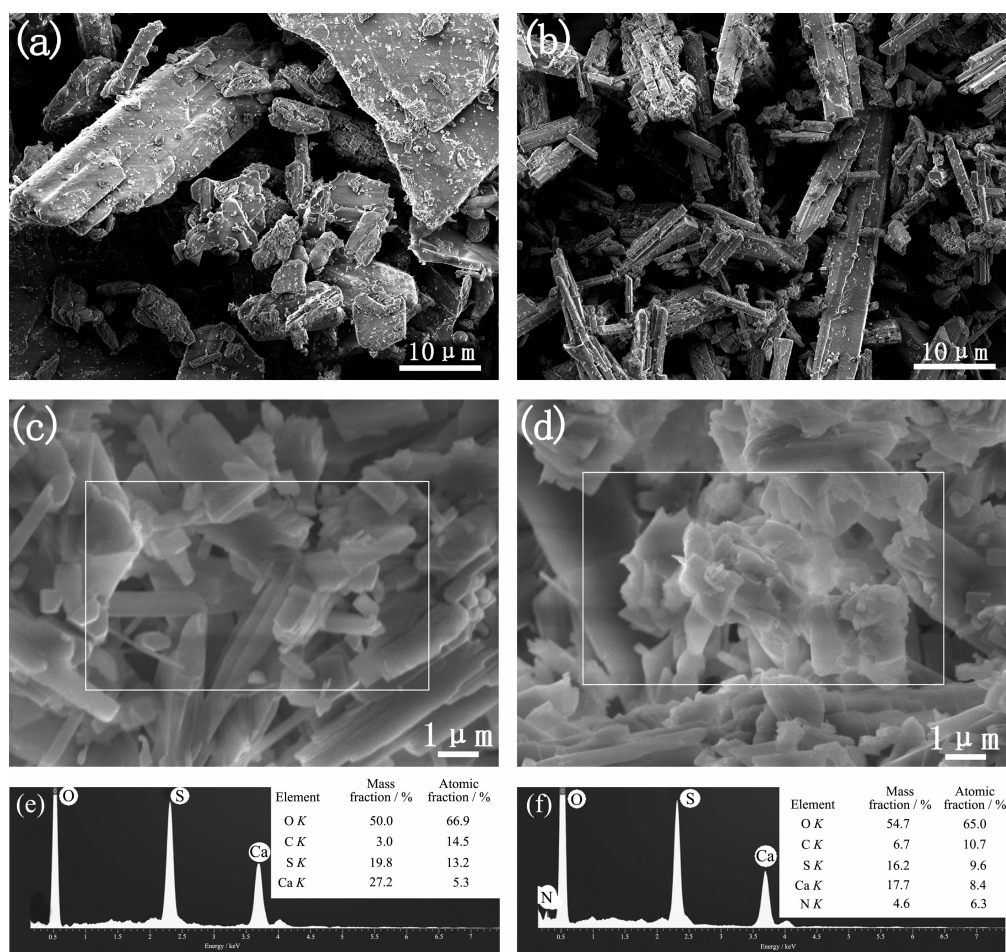


图 3 SEM 形貌: (a) CSD, (b) α -CS, (c) VCM/CS/H₂O, (d) VCM/CS/2.1SFFs, (e) VCM/CS/H₂O EDS 和 (f) VCM/CS/2.1SFFs EDS

Fig.3 SEM photographs of (a) CSD, (b) α -CS, (c) VCM/CS/H₂O, (d) VCM/CS/2.1SFFs, (e) EDS of VCM/CS/H₂O and (f) EDS of VCM/CS/2.1SFFs

2.3 VCM/CS/SFFs X 射线衍射分析

从 α -CS 的标准 X 射线衍射图得知(PDF No.41-0224), 其主要特征峰位置为 14.72°、25.67°、29.69°、31.90°、49.36°。从图 4(a) 可以看出, 制备的 α -CS 衍射峰图符合标准图, 说明制备的产物为 α -CS, 这与 SEM 观察结果一致。

图 4(b、c) 显示了 VCM/CS/H₂O、VCM/CS/2.1SFFs 复合材料的 X 射线衍射图。曲线都在 $2\theta=11.6^\circ$, 20.7° , 23.4° , 29.1° , 31.1° , 33.4° 等处出现了 CaSO₄·2H₂O 的特征衍射峰(PDF No.74-1433), 在 $2\theta=25.7^\circ$, 31.2° 处出现了 CaSO₄·1/2H₂O 的特征峰, 这表明复合材料固化后 CaSO₄·1/2H₂O 大部分转变为 CaSO₄·

$2\text{H}_2\text{O}$,同时仍然残留有少量的 $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ 。曲线(b)出现衍射峰的位置与曲线(c)相同,这说明硫酸钙中加入丝素纳米纤维后,未影响硫酸钙晶体的形成。

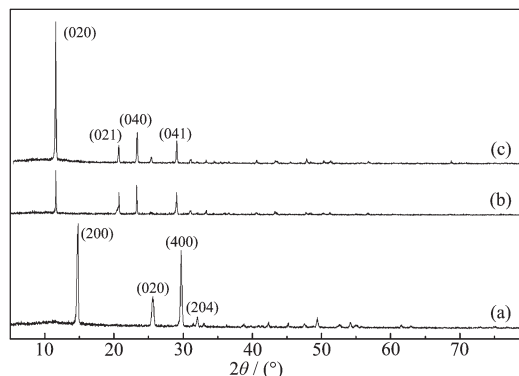


图4 (a) α -CS, (b) VCM/CS/ H_2O 和(c) VCM/CS/2.1SFFs 的 XRD 图

Fig.4 XRD patterns of (a) α -hemihydrate calcium sulfate (b) VCM/CS/ H_2O and (c) VCM/CS/2.1SFFs

2.4 VCM/CS/SFFs 凝固时间的测定

骨水泥的凝固时间与手术的操作有很大的关系,凝固时间太短使医生来不及调和即凝固,时间太长使创口暴露时间过长而易引起再感染。实验测得的样品凝固时间如图5所示。在相同 L/S 的条件下随着丝素纳米纤维浓度的增加,复合材料的凝固时

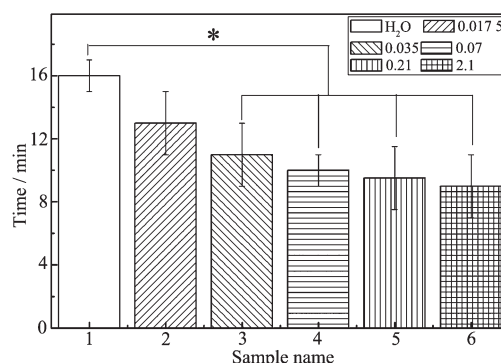


图5 复合材料的凝固时间

Fig.5 Solidification time of the composite

间逐渐缩短,说明丝素纳米纤维的加入可以在一定程度上缩短材料的凝固时间,使凝固时间可调节。

2.5 VCM/CS/SFFs 抑菌实验结果

检测依据卫生部《消毒技术规范》2002版,抑菌环宽度大于7 mm时,判为有抑菌作用。如图6所示,VCM/CS/2.1SFFs 抑菌环宽度为 (7.7 ± 0.1) mm, VCM/CS/ H_2O 抑菌环宽度为 (9.5 ± 0.2) mm,均有抑菌效果。另外,丝素纳米纤维的加入使得复合材料的抑菌环宽度变小,这可能是由于丝素纳米纤维的加入使得复合材料溃散和降解降低,从而使得复合在复合材料中的药物释放缓慢^[25]。这与材料的药物释放、抗水和降解结果一致。

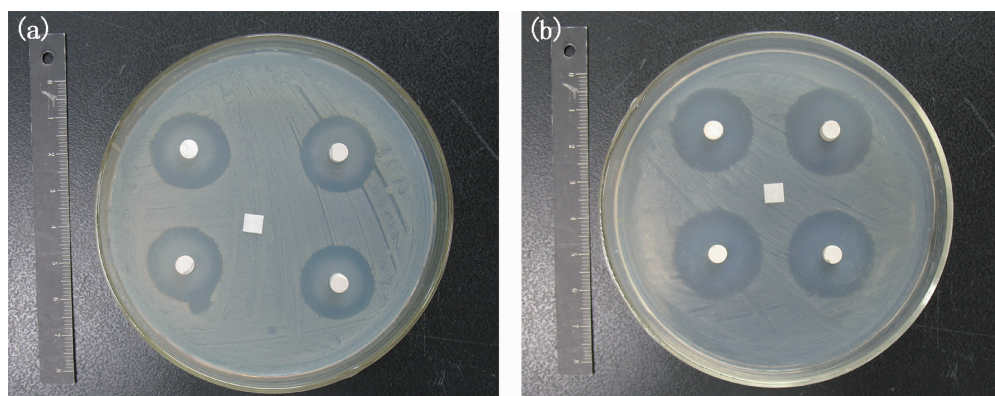


图6 (a) VCM/CS/2.1SFFs 抑菌环; (b) VCM/CS/ H_2O 抑菌环

Fig.6 Antibacterial test of (a) VCM/CS/2.1SFFs and (b) VCM/CS/ H_2O

2.6 VCM/CS/SFFs 药物释放结果

半水硫酸钙具有凝固过程发热不明显的优点,因此在使用过程中比较容易和药物及生长因子复合,方便临床使用,但是突释明显是存在的一个弊端。因硫酸钙具有孔隙结构,药物在硫酸钙里的释放一般通过2种方式,一种是药物的溶解和扩散,另一种方式是材料降解后药物的释放^[26]。如图7所

示发现,所有样品的万古霉素在初期释放迅速,这主要是由于复合材料表层万古霉素的释放。但是,VCM/CS/ H_2O 复合材料6 h的释放率为 $(35.8 \pm 1.6)\%$, VCM/CS/2.1SFFs 复合材料6 h的释放率为 $(19.6 \pm 1.3)\%$ 。因此丝素纳米纤维的加入,降低了复合材料中药物的初期释放速率。且研究发现,在一周的释放周期内,加入丝素纳米纤维的复合材料中万古霉

素的释放速率均随时间而减慢,可能是因为 VCM/CS/H₂O 更易降解,使得复合材料中复合的药物更易

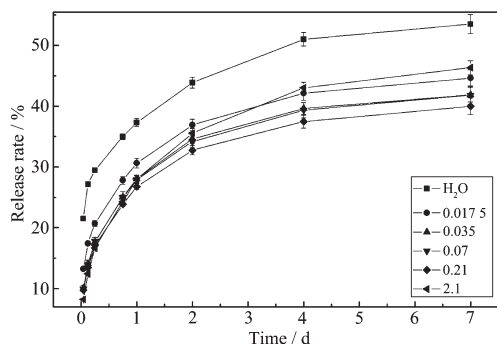


图 7 含不同浓度纤维的复合材料的药物释放曲线

Fig.7 Drug release test with different concentrations of nanofibers

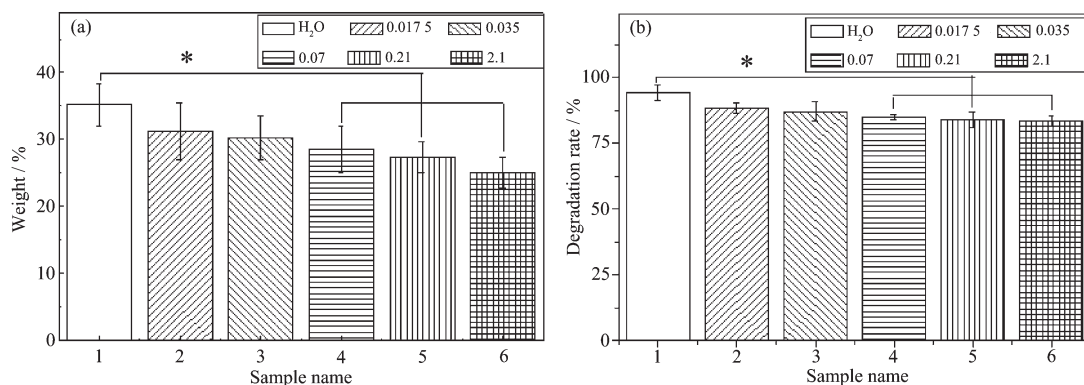


图 8 (a) SFFs 对抗水性能的影响(b) SFFs 对降解性能的影响

Fig.8 Effect of SFFs (a) on water resistance and (b) on degradation

2.8 VCM/CS/SFFs 的力学性能

人体松质骨的压缩强度为 1~15 MPa^[28],如图 9 (a)所示,VCM/CS/H₂O 复合材料的抗压强度为(7.90±1.05) MPa,其满足人松质骨最低限要求。VCM/CS/0.0175SFFs 复合材料的抗压强度达到 (10.45±0.68)

释放。

2.7 VCM/CS/SFFs 的抗水性

骨水泥类骨修复材料在固化过程中易受到体液的侵蚀而发生溃散,因此研究材料的抗水性很必要^[19]。如图 8(a)所示,当 SFFs 的浓度为 0.07、0.21、2.1 mg·mL⁻¹ 时复合材料的失重率降低,抗溃散能力显著提高。

材料的降解速率太快会导致不能匹配新骨的生长,使力学支撑不足,降解太慢会影响新生骨组织的长入^[27]。本工作前期研究了 1 个月内材料改性后的降解性变化,图 8(b)为复合材料 28 d 的降解率,可见丝素纳米纤维可以在一定程度上降低硫酸钙的降解率。原因可能是丝素纳米纤维使材料之间的结合增强,材料降解变慢。

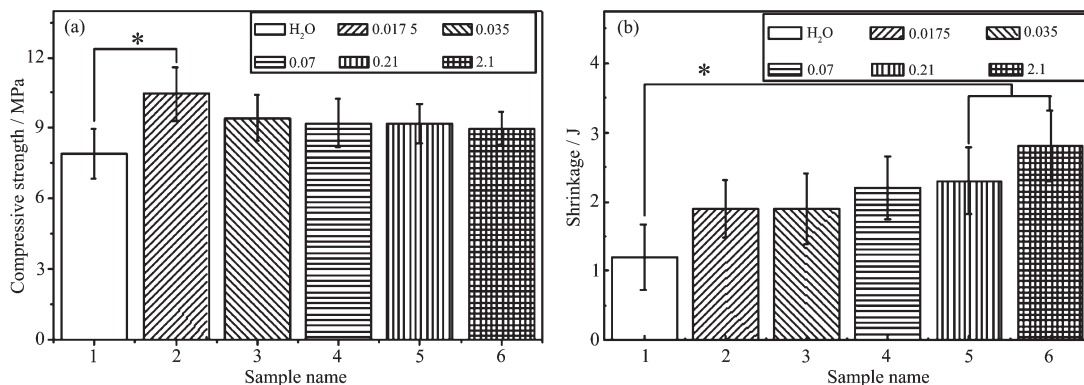


图 9 试样 (a) 压缩强度与 (b) 压缩断裂功

Fig.9 Compressive strength (a) and shrinkage(b) of samples

MPa。表明复合材料中加入丝素纳米纤维,提高了复合材料的抗压强度,随着丝素纳米纤维含量的增加,复合材料的抗压强度表现出先增加后减小的趋势。原因可能是当丝素纤维溶液浓度较高时,丝素纳米纤维发生了团聚,会不均匀的分散到复合材料

中,影响材料的力学性能。

另一方面 SFFs 的加入使得 Ca^{2+} 与丝素蛋白侧链上的羧基、羟基、氨基发生配位作用^[29]。当固液两相混合后,缩短复合材料凝固时间的同时,增强了硫酸钙颗粒间的结合强度,从而进一步提高复合材料的抗压强度。

材料的断裂韧性,即材料的断裂能(材料荷载位移曲线下的面积),指其抵抗裂纹扩展的能力^[30-31]。从图 9(b)可以看出,在硫酸钙材料中添加 SFFs,显著提高了复合材料的压缩断裂功。原因可能是由于复合材料有良好的应力分散特性,当外力作用到材料

上时,应力通过基体传到丝素大分子,丝素分子会产生变形、发生滑移,使复合材料的应变增加,最终使压缩断裂功增加^[32],表现为材料的韧性提高。

2.9 VCM/CS/SFFs 的生物相容性

本研究分别观察了成骨细胞 MC3T3 在空白材料 VCM/CS/ H_2O 和含有丝素纤维浓度较高的 VCM/CS/2.1SFFs 上的黏附和增殖情况。图 10 可以看出,细胞在 VCM/CS/ H_2O 和 VCM/CS/2.1SFFs 复合材料上均黏附、铺展,并伸出伪足。2 种材料对 MC3T3 细胞显示出良好的细胞相容性。

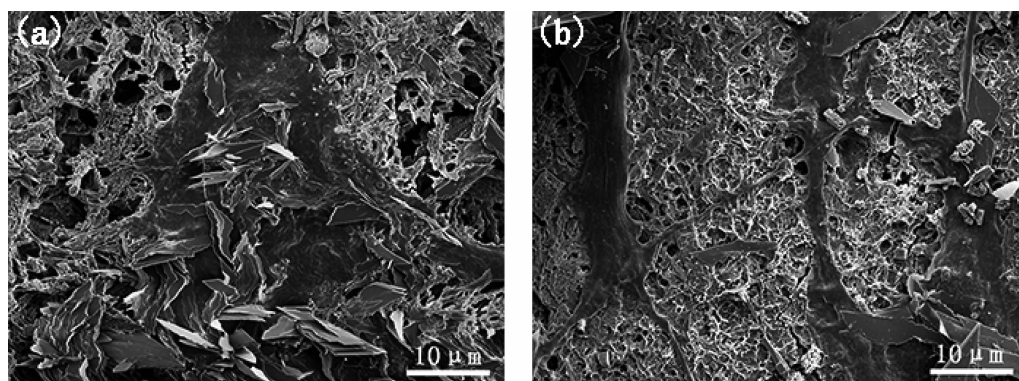


图 10 (a, b) 分别为 MC3T3 在 VCM/CS/ H_2O 、VCM/CS/2.1SFFs 材料上培养 4 d 后的 SEM 图

Fig.10 SEM images of MC3T3 cultured on VCM/CS/ H_2O (a), VCM/CS/2.1SFFs (b) for 4 d

MTT 试验常用来评价材料的细胞相容性^[33],是一种检测细胞存活和生长的简便方法。MTT 比色法的原理:活细胞中琥珀酸脱氢酶能将四唑盐还原成不溶于水的蓝紫色产物甲瓖(formazan),并沉淀在细胞中,而死细胞没有这种功能。二甲亚砜(DMSO)能溶解沉积在细胞中蓝紫色结晶物,溶液颜色深浅与所含的甲瓖量成正比。OD 值代表所测物质的吸光度值,本实验用酶标仪在 450 nm 下测定吸光度值,

OD 值越高,说明活细胞在材料上黏附和增殖越多。通过 MTT 法检测实验发现(如图 11),培养 2 d 时,MTT 法测定的 OD 值无明显差异。但到第 4 d 时,VCM/CS/ H_2O 与 VCM/CS/2.1SFFs 组 OD 值升高,同时 VCM/CS/2.1SFFs 组高于 VCM/CS/ H_2O 组,差别具有显著性差异。说明 VCM/CS/2.1SFFs 复合材料中丝素纤维成分可以促进 MC3T3 细胞的生长,这与文献中研究结果一致^[31]。

3 结 论

本研究用水热法制备了 α -半水硫酸钙,应用自组装的原理制备了丝素纳米纤维,并进一步以丝素纳米纤维溶液为固化液将 α -半水硫酸钙、万古霉素复合制备了 VCM/CS/SFFs 抗感染骨修复材料。复合材料降低了材料体外降解率、抑制了药物初期的突释;提高了材料的抗压强度、韧性和抗水性;材料具有抑菌性,并能促进 MC3T3 细胞的增殖和黏附。综上所述,VCM/CS/SFFs 复合材料改善了单纯硫酸钙材料的力学、药物释放及细胞相容性等性能,可以为非承力部位感染性骨缺损修复的临床研究提供

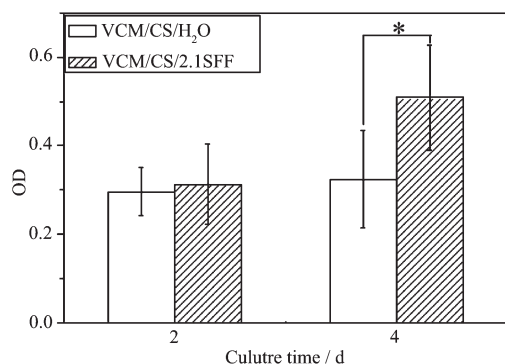


图 11 MC3T3 细胞在复合材料上的 MTT 实验

Fig.11 MTT assay of MC3T3 cultured in VCM/CS/ H_2O and VCM/CS/2.1SFFs

理论依据。

参考文献:

- [1] Lian X J, Mao K Z, Liu X, et al. *J. Nanomater.*, **2015**(5):13-21
- [2] Chen Y, Zhou Y, Yang S, et al. *Mater. Sci. Eng., C*, **2016**,**66**: 84-91
- [3] Xin L, Liang J, Zhao J, et al. *Med. Sci. Monit.*, **2016**,**22**:1959-1965
- [4] Wu H C, Wang T W, Sun J S, et al. *Materials*, **2016**,**9**(3):198-209
- [5] Qi X, Pei P, Zhu M, et al. *Sci. Rep.*, **2017**,**7**:42556-42568
- [6] Czechowska J, Zima A, Siek D, et al. *Ceram. Int.*, **2016**,**42** (14):15559-15567
- [7] Cao L, Weng W, Chen X, et al. *Int. J. Nanomed.*, **2017**,**12**: 1341-1352
- [8] Fan X, Ren H, Luo X, et al. *J. Biomater. Appl.*, **2016**,**30**(8): 1261-1272
- [9] Orellana B R, Hilt J Z, Puleo D A. *J. Biomed. Mater. Res., Part B*, **2015**,**103**(1):135-142
- [10] Mobini S, Hoyer B, Solatihashjin M, et al. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **2013**,**101A**(8):2392-2404
- [11] Imsombut T, Srisuwan Y, Srihanam P, et al. *Powder Technol.*, **2010**,**203**(3):603-608
- [12] MA Meng-Jia (马梦佳). *Thesis for the Master Degree of Shanghai Jiao Tong University*(上海交通大学硕士论文), **2014**.
- [13] Kaplan A R, Kaplan D L. *J. Mater. Chem.*, **2009**,**19**(36): 6443-6450
- [14] Wang P, Pi B, Wang J N, et al. *Front. Mater. Sci.*, **2015**,**9** (1):51-65
- [15] Zhou L, Hu C, Chen Y, et al. *J. Orthop. Surg. Res.*, **2017**,**12** (1):32-40
- [16] Lu Q, Wang X, Lu S, et al. *Biomaterials*, **2011**,**32**(4):1059-1067
- [17] Bai S, Zhang X, Lu Q, et al. *Biomacromolecules*, **2014**,**15** (8):3044-3051
- [18] ZHANG Dan(张丹). *Thesis for the Master Degree of Sichuan University*(四川大学硕士论文), **2007**.
- [19] YANG Sheng-bing(杨盛兵), WANG Jing(王靖), LIU Chang-Sheng(刘昌胜), et al. *Int. J. Inorg. Mater.*(无机材料学报), **2013**,**28**(1):85-90
- [20] ZHANG Cen-Cen(张崑崑). *Thesis for the Doctor Degree of Soochow University*(苏州大学博士论文), **2014**.
- [21] Zhang Y, Zhang C, Liu L, et al. *Front. Mater. Sci. China*, **2015**,**9**(4):382-391
- [22] Han F, Liu S, Liu X, et al. *Acta Biomater.*, **2014**,**10**(2):921-930
- [23] YANG Guo-Jing(杨国敬), LIN Mian(林勉), ZHANG Lei(张雷), et al. *Int. J. Inorg. Mater.*(无机材料学报), **2013**,**28**(8): 795-803
- [24] LÜ Zhi-Hui(吕智慧), HONG Tian-Zeng(洪天增), NAI Xue-Ying(乃学瑛), et al. *Int. J. Inorg. Mater.*(无机材料学报), **2017**,**32**(1):81-85
- [25] XU Guang-Tao(徐广涛), LIN Tian-Song(林天送), ZHOU Xin-Mei(周新妹), et al. *Tianjin Med. J.*(天津医药), **2010**,**38** (9):790-793
- [26] Ginebra M P, Canal C, Espanol M, et al. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2012**,**64**(12):1090-1100
- [27] Koh I, López A, Helgason B, et al. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **2014**,**34**(6):187-198
- [28] YANG Gui-Tong(杨桂通), CHEN Wei-Yi(陈维毅). *Biomechanics* (生物力学). Chongqing: Chongqing Publishing Group, **2000**.
- [29] DONG Wen-Xiu(董文秀), LI Jun-Sheng(李军生), LI Qiu-Jie(李秋杰), et al. *J. Instrum. Anal.*(分析测试学报), **2014**,**33** (12):1410-1415
- [30] ZHAO Peng(赵澎), LI Hong(李红), ZHOU Chang-Ren(周长忍), et al. *J. Mater. Sci. Eng.*(材料科学与工程学报), **2010**, **28**(3):390-394
- [31] DONG Wei-Qiang(董伟强), BAI Bo(白波), ZHANG Mei-Jiang(张妹江), et al. *J. Clin. Rehabil. Tissue Eng. Res.*(中国组织工程研究), **2010**,**14**(29):5363-5366
- [32] Chen S H, Lei M, Xie X H, et al. *Acta Biomater.*, **2013**,**9** (5):6711-6722
- [33] Lin S, Lu G, Liu S, et al. *J. Mater. Chem. B*, **2014**,**2**(17): 2622-2633