

# 双层左旋聚乳酸静电纺织纳米纤维支架与人牙周膜细胞的生物相容性

孙文娟, 江浩顺, 黄楠楠, 唐倩, 杨雨虹(中山大学附属第三医院口腔科, 广东省广州市 510630)

## 文章亮点:

- 1 支架材料在组织工程中的作用非常重要, 因此研制适合牙周膜细胞生长的支架材料是牙周组织工程首要任务之一。理想的牙周组织工程支架材料不仅应有利于牙周膜细胞的生长, 同时应具备屏障功能, 以阻挡上皮细胞向牙周缺损区域内生长。
- 2 实验静电纺织技术将左旋聚乳酸制备成双层纳米支架, 扫描电镜下显示该支架材料纤维直径分布均匀, 材料致密面纤维排列密集, 结构致密, 可起到屏障作用, 阻挡细胞迁移, 而疏松面纤维呈三维立体结构, 疏松多孔, 纤维间孔隙相互连接, 可为细胞生长提供良好的三维环境。
- 3 双层左旋聚乳酸静电纺织纳米支架的三维立体结构有利于牙周膜细胞攀附生长, 保证了组织再生空间的维持, 同时致密层可起到屏障膜作用, 阻挡牙龈上皮细胞进入支架内部, 使之更适合应用于牙周组织工程。

## 关键词:

生物材料; 材料相容性; 牙周组织工程; 左旋聚乳酸; 支架材料; 屏障膜; 静电纺织; 人牙周膜细胞

## 主题词:

牙周膜; 成纤维细胞; 组织工程

## 摘要

**背景:** 静电纺织制备的纳米纤维支架形态结构与天然细胞外基质相似, 为细胞的生长、增殖提供了良好的微环境, 可增强细胞的黏附、迁移、增殖及分化功能。

**目的:** 观察双层左旋聚乳酸静电纺织纳米纤维支架与人牙周膜细胞的生物相容性。

**方法:** 采用静电纺织技术制备双层左旋聚乳酸静电纺织纳米纤维支架。MTT 法评估不同浓度(100%、75%、50%、25%)双层左旋聚乳酸静电纺织纳米纤维支架浸提液对人牙周膜细胞的毒性; 将双层左旋聚乳酸静电纺织纳米纤维支架与人牙周膜细胞共培养, 以 MTT 法检测细胞的早期黏附能力, 扫描电镜观察细胞在支架上的生长情况。

**结果与结论:** 不同浓度双层左旋聚乳酸静电纺织纳米纤维支架浸提液对人牙周膜细胞无毒性。共培养 2, 6, 24 h, 人牙周膜细胞在双层左旋聚乳酸静电纺织纳米纤维支架上的黏附能力较差。复合培养 7 d, 人牙周膜细胞在支架疏松面黏附良好, 并保持原有的形态, 伸展良好, 伸出突起相互连接; 在支架致密面呈复层生长, 胞体呈梭形、多角形, 连接成片。表明双层左旋聚乳酸静电纺织纳米支架与人牙周膜细胞具有良好的生物相容性。

孙文娟, 江浩顺, 黄楠楠, 唐倩, 杨雨虹. 双层左旋聚乳酸静电纺织纳米纤维支架与人牙周膜细胞的生物相容性[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(52):8438-8443.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.52.014

## Biocompatibility of double-layer poly(L-lactic acid) electrospun nanofiber scaffold with human periodontal ligament cells

Sun Wen-juan, Jiang Hao-shun, Huang Nan-nan, Tang Qian, Yang Yu-hong (Department of Stomatology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** The morphological structure of nanofiber scaffold which fabricated by electrospinning technique is similar to the natural extracellular matrix, which provides a good microenvironment for cell growth and proliferation, and can also enhance cell adhesion, migration, proliferation and differentiation.

**OBJECTIVE:** To observe the biocompatibility of double-layer poly(L-lactic acid) electrospun nanofiber scaffold and human periodontal ligament cells.

**METHODS:** Electrospinning technique was used to prepare double layers poly(L-lactic acid) electrospun nanofiber scaffold. The toxicity of different concentrations of (100%, 75%, 50%, 25%) double-layer poly(L-lactic acid) electrospun nanofiber scaffold extracts to human periodontal ligament cells was evaluated by MTT assay. The double-layer poly(L-lactic acid) electrospun nanofiber scaffold was co-cultured with human periodontal ligament cells. The cell adhesive capacity in early stage was determined by MTT assay. The growth of cells on the scaffold was observed by scanning electron microscopy.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Different concentrations of double-layer poly(L-lactic acid) electrospun nanofiber scaffold extracts did not create any toxicity to human periodontal ligament cells. After co-culture for 2, 6, 24 hours,

孙文娟, 女, 1987年生, 山西省长治市人, 汉族, 2013年中山大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事牙周疾病治疗的研究。

通讯作者: 唐倩, 副主任医师, 中山大学附属第三医院口腔科, 广东省广州市 510630

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)52-08438-06

稿件接受: 2015-11-04

http://www.crter.org

Sun Wen-juan, Master, Physician, Department of Stomatology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Corresponding author: Tang Qian, Associate chief physician, Department of Stomatology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Accepted: 2015-11-04

human periodontal ligament cells were poorly adherent onto the double-layer poly(L-lactic acid) electrospun nanofiber scaffold. After 7 days of co-culture, human periodontal ligament cells adhered well on the loose surface of scaffold, maintained the original shape, stretched well, and interconnected processes were observed; on the dense surface of the scaffold, multi-layer cells were observed. The cells showed fusiform or polygonal appearance and were connected together. These results demonstrate that the double-layer poly(L-lactic acid) electrospun nanofiber scaffold has good biocompatibility with human periodontal ligament cells.

**Subject headings:** Periodontal Ligament; Fibroblasts; Tissue Engineering

Sun WJ, Jiang HS, Huang NN, Tang Q, Yang YH. Biocompatibility of double-layer poly(L-lactic acid) electrospun nanofiber scaffold with human periodontal ligament cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(52):8438-8443.

## 0 引言 Introduction

牙周病是人类口腔中最常见的疾病之一, 随着炎症的进展, 牙槽骨吸收不断加重, 使牙齿支持组织丧失, 牙齿逐渐松动, 最终导致脱落。理想的牙周病治疗不仅要求有效清除和控制菌斑及其他局部致病因子, 阻断牙周支持组织的破坏, 同时应实现牙周组织的再生<sup>[1-2]</sup>。由于牙周组织自我修复能力有限, 如何有效增加牙周附着, 促进牙周组织再生, 获得牙周组织结构和功能的重建, 是牙周病研究领域的重要课题。组织工程学是近几年来发展迅速的新兴学科, 它的基本方法是利用细胞的再生能力, 在体外支架上培养高浓度、功能相关的活性细胞, 并将这种细胞-支架复合体植入机体病损部位, 形成新的组织, 达到缺损修复和功能重建的目的<sup>[3-5]</sup>。本实验采用静电纺织技术制备了双层左旋聚乳酸静电纺织纳米纤维支架, 通过研究该支架材料与人牙周膜细胞的体外生物相容性, 为其进一步应用于牙周组织工程研究提供依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 体外细胞-支架共同培养实验。

1.2 时间及地点 于2014年4至12月在中山大学附属第三医院中心实验室完成。

1.3 材料 收集12-18岁健康青少年因正畸治疗而拔除的健康前磨牙, 患者本人及其监护人对实验知情同意。

#### 纳米纤维支架生物相容性实验的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
左旋聚乳酸	惠州华阳
胎牛血清、DMEM高糖培养基	HYCLONE
胰蛋白酶、MTT	Sigma
DMSO	MP
扫描电镜	Quanta 400
酶联免疫检测仪	BIO RAD
倒置显微镜	Nikon
细胞培养箱	Thermo

### 1.4 实验方法

**双层左旋聚乳酸静电纺织纳米纤维支架的制备:** 配制左旋聚乳酸溶液作为纺丝液, 将纺丝液注入纺丝装置中的

注射器内, 流速设置为0.5 mL/h, 与电源阳极输出端的针头连接, 阴极输出端与金属接受屏连接, 距离8 cm, 调节电压为18 kV, 用接受屏收集所纺织的左旋聚乳酸纳米纤维, <sup>60</sup>Co 25 kGy辐照消毒后备用。将支架材料裁剪为合适大小, 表面喷金, 扫描电镜观察表面形态。

**人牙周膜细胞的培养与鉴定:** 采用组织块培养法进行人牙周膜细胞原代培养。无菌条件下用PBS根冠向反复冲洗牙齿, 用手术刀刮取根中1/3牙周膜组织, 裁剪为约1 mm×1 mm×1 mm大小, 平铺于25 cm<sup>2</sup>塑料培养瓶底, 间隔约5 mm, 约30块。翻转倒置培养瓶, 加入培养液约4 mL, 于37 ℃、体积分数5%CO<sub>2</sub>、100%湿度培养箱孵育4 h。待组织块贴壁后, 翻转正置培养瓶常规培养。当细胞长满瓶底约80%, 消化传代。取第2代细胞制备细胞爬片, 免疫组织化学法进行波形丝蛋白和细胞角蛋白染色, 鉴定细胞来源。取4-8代细胞用于实验<sup>[6-7]</sup>。

**细胞毒性实验:** 按照中华人民共和国国家标准GB/T16886.12-2005/ISO 10993-12: 2002制备浸提液。将消毒后的材料裁剪为5 mm×5 mm×3 mm大小, 浸入含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液中, 使材料表面积/培养液体积为6 cm<sup>2</sup>/1 mL, 于培养箱内孵育72 h, 即为浓度100%的浸提液, 以培养基稀释, 配制浓度分别为75%、50%、25%的浸提液。

选择状态良好的人牙周膜细胞, 制备细胞悬液, 调整细胞浓度为3×10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup>, 接种于96孔板中, 每孔200 μL, 培养24 h, 待细胞贴壁后弃去原培养液, 分别加入不同浓度的支架浸提液, 阴性对照组加入含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液, 每组重复4孔, 常规培养, 隔天换浸提液及培养液。于第1, 3, 5, 7天进行MTT检测, 每孔加入MTT(5 g/L)20 μL, 继续培养4 h后, 弃去原培养液, 每孔加入DMSO 150 μL, 振荡10 min后用酶联免疫检测仪在490 nm波长下比色, 测定吸光度值(A), 调零后取均值, 按公式实验组A值/阴性对照组A值×100%计算出相对增殖率, 并按5级毒性分级法评分: 0级, 相对增殖率≥100%; 1级, 相对增殖率≥80%; 2级相对增殖率≥50%; 3级, 相对增殖率≥30%; 4级, 相对增殖率≥0<sup>[8]</sup>。

**细胞黏附情况:** 将支架材料用打孔器裁剪为直径为6.4 mm的圆片, 经DMEM预湿过夜后, 用无菌滤纸吸干水分, 置于96孔板板底, 作为实验组。选择状态良好的人牙

周膜细胞, 制备细胞悬液, 调整细胞浓度为 $6 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ , 实验组每块材料接种 $200 \mu\text{L}$ 细胞悬液, 对照组细胞直接接种于96孔板, 置于培养箱内。

接种后2, 6, 24 h取4孔进行MTT检测。PBS漂洗3次洗去未黏附细胞, 加入DMEM  $200 \mu\text{L}$ 、MTT( $5 \text{ g/L}$ )  $20 \mu\text{L}$ , 继续培养4 h后, 弃去原培养基, 每孔加入DMSO  $150 \mu\text{L}$ , 振荡10 min, 弃去支架材料, 用酶联免疫检测仪在490 nm波长下比色, 测定A值。

**细胞与支架材料复合培养情况:** 将支架材料裁剪为直径为1 cm的圆片, 经DMEM预湿过夜后, 用无菌滤纸吸干水分, 置于24孔板板底。选择状态良好的人牙周膜细胞, 制备细胞悬液, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ , 每块材料接种 $500 \mu\text{L}$ 细胞悬液, 置于培养箱内常规培养。取第7天的细胞支架复合物经2.5%戊二醛固定, 乙醇逐级脱水, 乙酸异内酯置换, 临界点干燥, 表面喷金后扫描电镜观察。

**1.5 主要观察指标** 人牙周膜细胞的培养情况; 双层左旋聚乳酸静电纺织纳米支架的形态; 人牙周膜细胞在支架材料上的黏附、生长情况。

**1.6 统计学分析** 采用SPSS 19.0软件进行数据的统计学处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用One-Way ANOVA分析,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 支架材料扫描电镜观察** 实验所制备的双层左旋聚乳酸静电纺织纳米支架纤维均匀, 相互连接呈网状, 同时具备双层结构, 致密层孔隙较小, 结构紧密, 可有效阻挡细胞向支架内部迁移; 疏松层孔隙较大, 纤维间孔隙相互连接, 可为细胞增殖迁移提供的良好环境, 见图1。

**2.2 人牙周膜细胞培养及免疫组化鉴定结果** 培养的原代人牙周膜细胞呈长梭形, 伸展良好, 细胞核边界清晰, 呈卵圆形, 位于细胞中央, 细胞排列均匀, 符合成纤维细胞形态特点; 细胞角蛋白免疫组化染色阴性, 波形丝蛋白免疫组化染色阳性, 提示细胞来源于外胚间充质, 见图2。

**2.3 细胞毒性实验结果** 实验组和阴性对照组的A值均随培养时间延长而增大, 第1, 3, 5, 7天各实验组与阴性对照组、各实验组之间的A值比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见图3。

4组不同浓度浸提液的毒性评级均为0至1级, 提示该支架材料对人牙周膜细胞无毒性, 见表1。

**2.4 细胞在支架材料上的黏附情况** 实验组和对照组A值均随孵育时间延长而增大, 实验组2, 6, 24 h的A值均低于对照组( $P < 0.05$ ), 见图4。提示人牙周膜细胞在支架材料上的早期黏附能力较差。

**2.5 细胞与支架材料复合培养情况** 扫描电镜下观察可见, 细胞包裹于材料纤维上, 提示支架材料具有良好的生物相容性, 支架材料疏松面可见大量细胞沿支架纤维黏附

表1 不同浓度双层左旋聚乳酸静电纺织纳米支架浸提液的毒性评级  
Table 1 Cytotoxicity rating of different concentrations of double-layer poly(L-lactic acid) electrospun nanofiber scaffold extracts

时间	100%	75%	50%	25%
1 d	1级	1级	1级	1级
3 d	1级	1级	0级	1级
5 d	0级	1级	1级	1级
7 d	1级	1级	1级	1级

表注: 4组不同浓度支架浸提液在1, 3, 5, 7 d的毒性评级均为0至1级, 提示该支架材料无细胞毒性。

生长, 长入支架内部, 胞体呈多角形, 伸出突起相互连接; 支架材料致密面可见细胞在纤维表面呈复层生长, 胞体呈梭形、多角形, 连接成片, 见图5。

## 3 讨论 Discussion

组织工程的核心是建立细胞与生物材料的三维空间复合体, 将该复合体植入体内后, 支架材料可在新生组织完全形成之前提供三维的结构空间, 使细胞处于良好的微环境, 发挥其生物活性, 进而分化形成具有特定功能的新生组织, 并且参与组织工程组织与受体组织的整合过程, 最终对病损区域的组织进行形态、结构及功能的重建。支架材料在组织工程中的作用非常重要, 因此, 研制适合牙周膜细胞生长的支架材料是牙周组织工程首要任务之一。理想的支架材料应具备良好的组织相容性、三维立体结构、良好的表面活性、可塑性、可吸收性、一定的机械强度等。组织工程支架的多孔结构、孔径大小及相互连通对其生物相容性有着重要的作用。高孔隙率支架材料有利于细胞的黏附、增殖, 连通的孔隙可为细胞提供有利的微环境, 利于细胞生长所需要的氧气、营养物质的输送及代谢废物的排出<sup>[9-12]</sup>。

左旋聚乳酸是一种无毒、可完全生物降解的高分子聚合物, 有良好的生物相容性, 在人体内最终降解产物是二氧化碳和水, 可在正常代谢后排出, 具有可靠的生物安全性, 被美国FDA作为第1批可降解吸收材料批准应用于临床<sup>[13-14]</sup>。

静电纺织技术最早发明于19世纪30年代, 是利用聚合物溶液在电场下喷射获得聚合物纤维的纺织加工方法。静电纺织制备的纳米纤维支架形态结构与天然细胞外基质相似, 有利于细胞的黏附、营养物质的渗入及代谢废物的排出, 为细胞的生长、增殖提供了良好微环境, 从而可以增强细胞的黏附、迁移、增殖及分化功能。纳米纤维具有较高的比表面积, 能够促进蛋白质的吸附, 改善细胞的黏附和增殖。静电纺织加工而成的支架材料可分为天然聚合物材料、合成聚合物材料及复合材料。天然材料包括胶原蛋白、蚕丝、纤维蛋白等, 合成高分子材料包括聚乳酸、聚乙醇酸、聚己内酯等。近年来, 采用静电纺织制备的聚合物纳米纤维已被广泛应用于皮肤、血管、软骨、骨、神经等组织工程研究领域, 显示出巨大的应用潜力<sup>[15-17]</sup>。

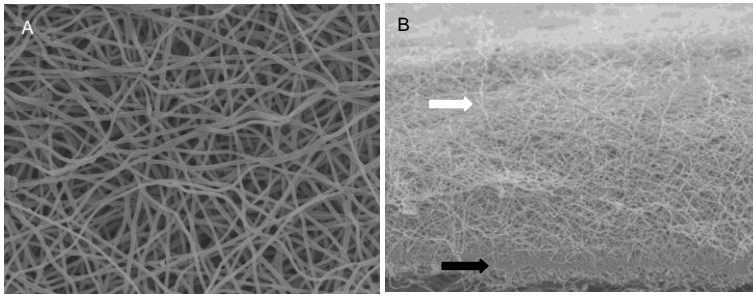


图 1 扫描电镜观察双层左旋聚乳酸静电纺纳米支架的形态

Figure 1 Morphology of double-layer poly(L-lactic acid) electrospun nanofiber scaffold observed by scanning electron microscope

图注: 图中 A 显示双层左旋聚乳酸静电纺纳米支架纤维均匀( $\times 1\,000$ ); B 显示双层左旋聚乳酸静电纺纳米支架侧面形态( $\times 100$ )。白色箭头指示疏松层, 黑色箭头指示致密层。

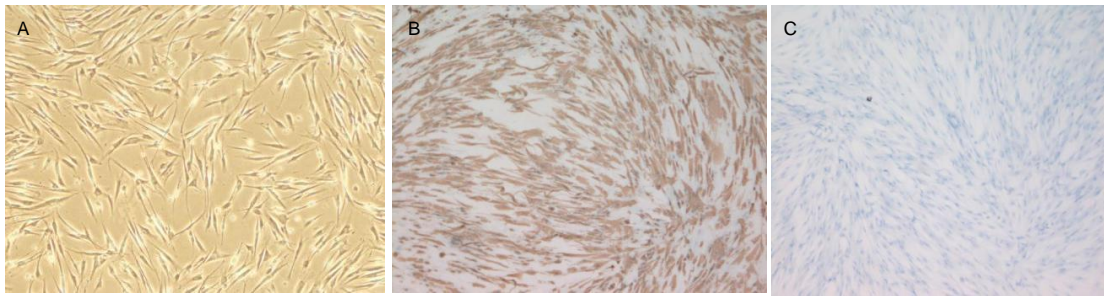


图 2 人牙周膜细胞的培养与鉴定( $\times 100$ )

Figure 2 Culture and identification of human periodontal ligament cells ( $\times 100$ )

图注: 图中 A 显示原代人牙周膜细胞呈长梭形, 伸展良好, 细胞核边界清晰, 卵圆形, 位于细胞中央, 细胞排列均匀(倒置相差显微镜观察); B 显示细胞波形丝蛋白免疫组织化学染色阳性(正置荧光显微镜); C 显示细胞角蛋白免疫组织化学染色阴性(正置荧光显微镜)。

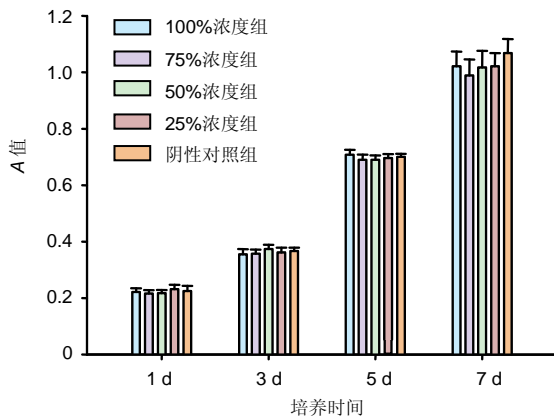


图 3 人牙周膜细胞在不同浓度双层左旋聚乳酸静电纺纳米支架浸提液中的增殖情况

Figure 3 The proliferation of human periodontal ligament cells in different concentrations of double-layer poly(L-lactic acid) electrospun nanofiber scaffold extracts

图注: 阴性对照组以含体积分数 10%胎牛血清的 DMEM 培养液培养人牙周膜细胞; 各组间细胞增殖情况比较差异均无显著性意义( $P > 0.05$ )。

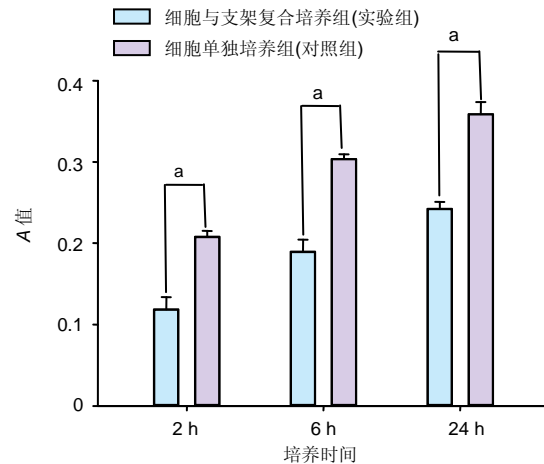


图 4 人牙周膜细胞在双层左旋聚乳酸静电纺纳米支架上的早期黏附情况

Figure 4 The attachment of human periodontal ligament cells on the double-layer poly(L-lactic acid) electrospun nanofiber scaffold in early stage

图注: <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。提示人牙周膜细胞在支架材料上的早期黏附能力较差。

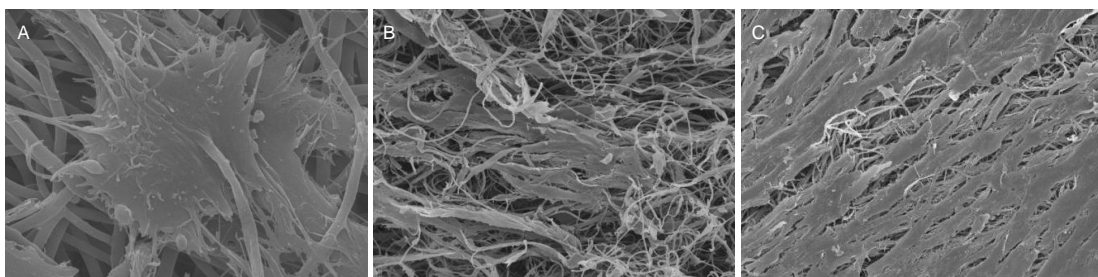


图 5 人牙周膜细胞与双层左旋聚乳酸静电纺纳米支架三维培养后第 7 天(扫描电镜)

Figure 5 Human periodontal ligament cells three-dimensionally co-cultured with double-layer poly(L-lactic acid) electrospun nanofiber scaffold at 7 days (scanning electron microscopy)

图注: 图中 A 显示细胞包裹于材料上, 细胞突起沿材料纤维伸展( $\times 4\,000$ ); B 显示支架疏松面, 细胞沿纤维黏附生长并长入支架内部, 细胞伸出突起相互连接( $\times 400$ ); C 显示支架致密面, 细胞在纤维表面呈复层生长, 胞体呈梭形、多角形, 连接成片( $\times 400$ )。

张静等<sup>[18]</sup>将牙周膜细胞接种于静电纺丝制成的聚乳酸膜,发现在接种后1 d,细胞数目并无明显差异,而3 d后,纤维膜上的细胞逐渐多于培养板上的细胞,7 d后,纤维膜上的细胞明显多于培养板上的细胞。研究结果提示,静电纺织的纤维膜类似于天然细胞外基质,可为细胞提供更合适的生存空间,随着培养时间的延长,可有效促进细胞增殖。本实验通过浸提液法研究所制备支架材料的细胞毒性,结果提示实验组和对照组细胞生长状态、增殖速度无统计学差异,4组不同浓度浸提液的毒性评级均为0至1级,证实所制备的支架材料无细胞毒性。通过MTT法研究细胞接种后2, 6, 24 h在支架材料上的黏附情况,发现细胞在支架材料上的黏附明显少于成品细胞培养板,差异有显著性意义,提示该材料亲水性不够理想,细胞早期黏附性能不及成品细胞培养板<sup>[19]</sup>。在进一步研究中可对该支架材料进行改性,以提高细胞亲和性。

牙周组织的再生与其他组织不同,具有一定特殊性。理想的牙周组织再生应形成新附着,而新附着的形成有赖于牙周膜前体细胞优先附着于根面,从而分化成成牙骨质细胞、成骨细胞和成纤维细胞。但在一般情况下,牙龈上皮细胞长速度最快,阻止了牙周膜前体细胞与根面贴附,从而难以形成新附着<sup>[20-21]</sup>。20世纪80年代初,Gottlow等<sup>[22]</sup>提出了引导组织再生,开创了牙周手术的新时代。牙周组织引导再生是借助膜性生物材料作为物理屏障,在牙槽骨丧失部位形成有利于牙周膜细胞生长的稳定空间,引导牙周膜细胞优先向根面迁移、生长、冠向增殖,同时阻止上皮细胞、结缔组织细胞向骨缺损区内增殖,促进缺损区域新生牙周组织的生长、重建,最终获得牙周组织的修复。动物实验、临床研究证实,引导组织再生技术是目前实现牙周新附着最有效的手段<sup>[23-25]</sup>。对于一些牙周缺损较严重的病例,由于炎症的破坏,牙周膜细胞来源非常有限且活性不足,生长缓慢,导致牙周组织再生量有限,疗效并不满意。为获得有效的牙周组织再生和功能重建,缺损区域需要一定数量且具有活性的牙周膜来源细胞。将组织工程技术与引导组织再生技术相结合,可克服活性细胞缺乏的问题<sup>[26-27]</sup>。因此,牙周组织工程所需要的支架材料不仅应有利于牙周膜细胞的生长,同时应具备屏障功能,以阻挡上皮细胞向牙周缺损区内生长。本实验通过静电纺织技术将左旋聚乳酸制备成双层纳米支架,扫描电镜下显示该支架材料纤维直径分布均匀,材料致密面纤维排列密集,结构致密,可起到屏障作用,阻挡细胞迁移,而疏松面纤维呈三维立体结构,疏松多孔,纤维间孔隙相互连接,可为细胞生长提供良好的三维环境。通过将细胞种植于支架材料表面,使细胞在支架材料上自由攀附迁移,构建细胞支架复合体,经过7 d三维复合培养后,扫描电镜观察可见人牙周膜细胞在材料疏松面黏附良好,并保持原有的形态,呈长梭形,多角形,伸展良好,并可见细胞伸出突起相互连接,提示该支架材料具有良好的相容性,人牙周膜细胞在支架上能够维持其形态学

特征,该支架的三维立体结构既有利于营养物质均匀扩散到细胞之间,又利于细胞与细胞之间的联系,促进细胞在支架材料上的攀附迁移,促进新组织的形成;而致密面可观察到大量细胞在支架表面呈复层生长,表明材料致密层可起到屏障作用,阻挡细胞进入支架内部,可发挥有效的屏障膜功能。

本实验的双层左旋聚乳酸静电纺织纳米支架结合了牙周组织工程支架及屏障膜的功能,研究证实该支架材料具有良好的生物相容性,其三维立体结构有利于牙周膜细胞攀附生长,保证了组织再生空间的维持,同时致密层可起到屏障膜作用,阻挡牙龈上皮细胞进入支架内部,使之更适合应用于牙周组织工程,然而其体内再生效果仍需要进一步研究。

**作者贡献:** 所有作者均参与研究设计、实验实施、结果分析、论文撰写。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

**伦理问题:** 离体牙提供者及其家属对实验知情同意。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 本刊实行双盲外审制度,文章经国内小同行外审专家审核,符合本刊发稿宗旨。

**学术术语:** 组织工程的核心问题? 组织工程的核心是建立细胞与生物材料的三维空间复合体,将该复合体植入体内后,支架材料可在新生组织完全形成之前提供三维的结构空间,使细胞处于良好的微环境,发挥其生物活性,进而分化形成具有特定功能的新生组织,并且参与组织工程组织与受体组织的整合过程,最终对病损区域的组织进行形态、结构及功能的重建。支架材料在组织工程中的作用非常重要,理想的支架材料应具备良好的组织相容性、三维立体结构、良好的表面活性、可塑性、可吸收性、一定的机械强度等。组织工程支架的多孔结构、孔径大小及相互连通对其生物相容性有着重要的作用。高孔隙率支架材料有利于细胞的黏附、增殖,连通的孔隙可为细胞提供有利的微环境,利于细胞生长所需要的氧气、营养物质的输送及代谢废物的排出。

**作者声明:** 第一作者对于研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

#### 4 参考文献 References

- [1] Parihar AS, Katoch V, Raiguru SA, et al. Periodontal Disease: A Possible Risk-Factor for Adverse Pregnancy Outcome. *J Int Oral Health*. 2015;7(7):137-142.
- [2] Slots J. Periodontal herpesviruses: prevalence, pathogenicity, systemic risk. *Periodontol 2000*. 2015;69(1):28-46.
- [3] Leszczynska A, Buczko P, Buczko W, et al. Periodontal pharmacotherapy-an updated review. *Adv Med Sci*. 2011;56(2): 123-131.
- [4] Galler KM, D'Souza RN. Tissue engineering approaches for regenerative dentistry. *Regen Med*. 2011;6(1):111-124.



- [5] Ivanovski S, Vaquette C, Gronthos S, et al. Multiphasic scaffolds for periodontal tissue engineering. *J Dent Res*. 2014;93(12): 1212-1221.
- [6] 鲁红, 田宇, 吴织芬, 等. 牙周膜细胞松质骨基质支架复合移植促进牙周组织再生的研究[J]. *北京口腔医学*, 2012, 20(4): 185-189.
- [7] Tian Y, Bai D, Guo W, et al. Comparison of human dental follicle cells and human periodontal ligament cells for dentin tissue regeneration. *Regen Med*. 2015; 10(4): 461-179.
- [8] 孙文娟, 唐倩, 黄楠楠, 等. 双层胶原支架与人牙周膜细胞的体外生物相容性[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2014, 35(2): 250-255.
- [9] Mitra, T, Sailakshmi G, Gnanamani A, et al. Preparation and characterization of malonic acid cross-linked chitosan and collagen 3D scaffolds: an approach on non-covalent interactions. *J Mater Sci Mater Med*. 2012; 23(5): 1309-1321.
- [10] Han P, Wu C, Chang J, et al. The cementogenic differentiation of periodontal ligament cells via the activation of Wnt/beta-catenin signalling pathway by Li<sup>+</sup> ions released from bioactive scaffolds. *Biomaterials*. 2012; 33(27): 6370-6379.
- [11] Wu C, Zhou Y, Lin C, et al. Strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with improved osteogenic/cementogenic differentiation of periodontal ligament cells for periodontal tissue engineering. *Acta Biomater*. 2012; 8(10): 3805-3815.
- [12] Chen FM, Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010; 16: 219-255.
- [13] Schofer MD, Roessler PP, Schaefer J, et al. Electrospun PLLA nanofiber scaffolds and their use in combination with BMP-2 for reconstruction of bone defects. *PLoS One*. 2011; 6(9): e25462.
- [14] Zamparelli A, Zini N, Cattini L, et al. Growth on poly(L-lactic acid) porous scaffold preserves CD73 and CD90 immunophenotype markers of rat bone marrow mesenchymal stromal cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2014; 25(10): 2421-2436.
- [15] 魏兴, 王香梅, 张志军, 等. 静电纺丝技术在聚乳酸改性及应用中的作用[J]. *山西化工*, 2012, 32(2): 26-30.
- [16] Petrie Abrigo M, McArthur SL, Kingshott P, et al. Comparative effects of scaffold pore size, pore volume, and total void volume on cranial bone healing patterns using microsphere-based scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2009; 89(3): 632-641.
- [17] Ingavle GC, Leach JK. Advancements in electrospinning of polymeric nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014; 20(4): 277-293.
- [18] 张静, 梅芳, 蔡晴, 等. 牙周膜细胞在网格型与无纺型聚乳酸纳米纤维支架材料上体外培养的研究比较[J]. *中国生物医学工程学报*, 2009, 28(5): 754-759.
- [19] 邵正仁, 颜玲, 陈卡娜. 改性聚乳酸与Schwann细胞的生物相容性研究[J]. *蚌埠医学院学报*, 2009, 34(9): 753-755.
- [20] Benatti BB, SHvefio KG, Cnsati MZ, et al. Physiological features of periodontal regeneration and approaches for periodontal tissue engineering using periodontal ligament cells. *Biosci Bioeng*. 2007; 103: 1-6.
- [21] Zhang C, Li J, Zhang L, et al. Effects of mechanical vibration on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Arch Oral Biol*. 2012; 57(10): 1395-1407.
- [22] Gottliff J, Nyman S, Lindhe J, et al. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol*. 1986; 13(6): 604-616.
- [23] Bottino MC, Thomas V. Membranes for Periodontal Regeneration-A Materials Perspective. *Front Oral Biol*. 2015; 17: 90-100.
- [24] Slotte C, Asklöv B, Lundgren D. Surgical guided tissue regeneration treatment of advanced periodontal defects: a 5-year follow-up study. *J Clin Periodontol*. 2007; 34(11): 977-984.
- [25] Nygaard-Østby P, Bakke V, Nesdal O, et al. Periodontal healing following reconstructive surgery: effect of guided tissue regeneration using a bioresorbable barrier device when combined with autogenous bone grafting. A randomized-controlled trial 10-year follow-up. *J Clin Periodontol*. 2010; 37: 366-373.
- [26] Sculean A, Nikolidakis D, Schwarz F, et al. Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials - biological foundation and preclinical evidence: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2008; 35(8 Suppl): 106-116.
- [27] Mopur JM, Devi TR, Ali SM, et al. Clinical and radiographic evaluation of regenerative potential of GTR membrane (Biomesh) along with alloplastic bone graft (Biograft) in the treatment of periodontal intrabony defects. *J Contemp Dent Pract*. 2013; 14(3): 434-439.