

## 载银纳米羟基磷灰石 / 聚己内酯复合纳米纤维支架的制备及成骨抗菌性能

<https://doi.org/10.12307/2022.456>

曹飞, 惠敏, 董西玲, 王乐, 王祖旭, 张敏, 张晓明, 刘童斌

投稿日期: 2021-05-22

采用日期: 2021-07-03

修回日期: 2021-09-04

在线日期: 2021-09-27

中图分类号:

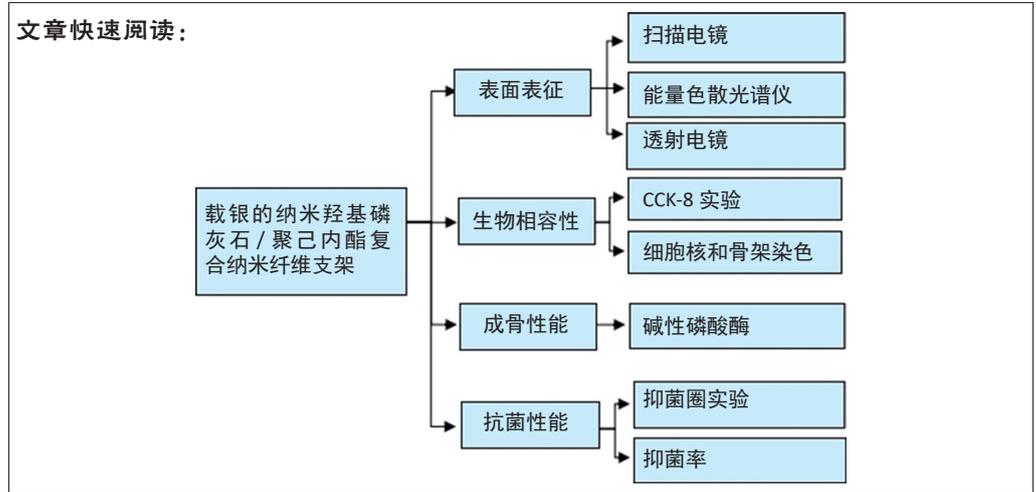
R459.9; R318.08; R-331

文章编号:

2095-4344(2022)34-05461-07

文献标识码: A

## 文章快速阅读:



## 文题释义:

**骨感染:** 骨感染的常见致病菌主要是金黄色葡萄球菌和大肠杆菌, 菌斑生物膜的形成是骨感染发生的主要诱因, 生物膜可保护其内的致病菌免受抗生素和药物等的破坏而持续入侵正常骨组织, 因此要想消除骨感染必须彻底根除菌斑生物膜。

**银纳米颗粒的抗菌机制:** 目前的研究认为银主要通过两种机制发挥抗菌作用, 一是银具有较高还原电位, 可以在其周围产生原子氧, 原子氧的强氧化性具有杀灭细菌的能力; 二是银与携带负电荷的细菌细胞膜接触时可穿透进入细胞膜, 并与胞质内蛋白质上的巯基发生反应, 进而影响细菌DNA的合成, 导致细菌裂解死亡。

## 摘要

**背景:** 骨组织具有自我更新重建并修复组织缺损的功能, 然而当发生大面积严重的骨缺损时往往需要骨移植或骨替代物来重建缺损, 这就加大了植入物周围骨感染的风险。

**目的:** 制备出载有不同银浓度的纳米羟基磷灰石/聚己内酯复合纳米纤维支架, 确定既促进细胞增殖又具有抗菌特性的银浓度。

**方法:** 利用静电纺丝技术制备出载有不同银浓度(0, 0.001, 0.01, 0.1 mol/L)的纳米羟基磷灰石/聚己内酯复合纳米纤维支架, 通过扫描电镜、能量色散光谱仪及透射电镜表征4组支架的微观形貌与元素组成。将MC3T3-E1成骨细胞与4组支架共培养, 检测支架对细胞增殖与成骨分化的影响。将4组支架分别与金黄色葡萄球菌(ATCC25923)和大肠杆菌(ATCC25922)共培养, 通过形成的抑菌圈和抑菌率观察支架的抗菌性能。

**结果与结论:** ①扫描电镜下可见, 4组静电纺丝纳米纤维较为连续, 直径较为均匀, 电纺丝呈现网状结构, 其中分散着大小各异的孔隙结构, 随着支架中载银含量的增加, 纳米纤维的直径逐渐增大。透射电镜下可见, 载银支架纳米纤维上均匀分散着黑色的银纳米颗粒, 颗粒的大小直径为(46±24) nm。②CCK-8实验显示, 与未载银支架相比, 载银0.001, 0.01 mol/L的纳米纤维支架可促进成骨细胞的增殖, 载银0.1 mol/L的纳米纤维支架抑制了成骨细胞的增殖。细胞核与细胞骨架染色显示, 载银0, 0.001, 0.01 mol/L的纳米纤维支架有利于成骨细胞形态的伸展, 载银0.1 mol/L的纳米纤维支架不利于成骨细胞形态的伸展。③碱性磷酸酶染色显示, 载银0, 0.001, 0.01 mol/L的纳米纤维支架有利于成骨细胞的分化, 载银0.1 mol/L的纳米纤维支架抑制了成骨细胞的分化。④抑菌圈实验显示, 未载银支架无抗菌性能, 随着支架中载银含量的增加, 载银支架的抗菌性能增强。抑菌率实验证明载银量为0.01 mol/L的纳米纤维支架具有较强的抗菌活性。⑤结果表明, 载银量0.01 mol/L的纳米羟基磷灰石/聚己内酯复合纳米纤维支架既具有良好的生物学活性又具备优秀的抗菌性能。

**关键词:** 静电纺丝; 纳米纤维; 纳米羟基磷灰石; 银纳米颗粒; 骨感染; 成骨性; 抗菌性

## Preparation of silver-loaded nanohydroxyapatite/polycaprolactone composite nanofiber scaffold and its osteogenic and antibacterial properties

Cao Fei, Hui Min, Dong Xiling, Wang Le, Wang Zuxu, Zhang Min, Zhang Xiaoming, Liu Tongbin

Department of Prosthodontics, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256600, Shandong Province, China

Cao Fei, Master candidate, Department of Prosthodontics, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256600, Shandong Province, China

**Corresponding author:** Zhang Xiaoming, Master, Chief physician, Master's supervisor, Department of Prosthodontics, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256600, Shandong Province, China

滨州医学院附属医院口腔修复科, 山东省滨州市 256600

第一作者: 曹飞, 男, 1995年生, 山东省威海市人, 汉族, 滨州医学院在读硕士, 主要从事口腔修复学研究。

通讯作者: 张晓明, 硕士, 主任医师, 硕士生导师, 滨州医学院附属医院口腔修复科, 山东省滨州市 256603

并列通讯作者: 刘童斌, 硕士, 滨州医学院附属医院口腔修复科, 山东省滨州市 256603

<https://orcid.org/0000-0002-4104-921X> (曹飞)

基金资助: 山东省医药卫生科技发展计划项目(2016WS0121), 项目参与者: 刘童斌; 滨州医学院科技计划项目(BY2017KJ05),

项目负责人: 刘童斌

引用本文: 曹飞, 惠敏, 董西玲, 王乐, 王祖旭, 张敏, 张晓明, 刘童斌. 载银纳米羟基磷灰石 / 聚己内酯复合纳米纤维支架的制备及成骨抗菌性能[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(34):5461-5467.



Co-corresponding author: Liu Tongbin, Master, Department of Prosthodontics, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256600, Shandong Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Bone tissue has the function of self-renewal, reconstruction and repair of tissue defects. However, when a large area of severe bone defect occurs, bone grafts or bone substitutes are often needed to reconstruct the defect, which increases the risk of bone infection around the implant.

**OBJECTIVE:** To prepare nanohydroxyapatite/polycaprolactone composite nanofiber scaffolds with different silver concentrations to determine the silver concentration that promotes cell proliferation and has antibacterial properties.

**METHODS:** Nanohydroxyapatite/polycaprolactone composite nanofiber scaffolds with different silver concentrations (0, 0.001, 0.01, 0.1 mol/L) were prepared by using electrospinning technology. The microscopic morphology and elemental composition of scaffolds of four groups were shown by scanning electron microscopy, energy dispersive spectroscopy and transmission electron microscope. MC3T3-E1 osteoblasts were co-cultured with four groups of scaffolds to study the effect of sample scaffolds on the cell proliferation and osteogenic differentiation. Four groups of scaffolds were co-cultured with *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) and *Escherichia coli* (ATCC25922) to study the antibacterial properties of scaffolds by the formation of antibacterial circle and antibacterial rate.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Scanning electron microscopy showed that the four groups of electrospinning films were more continuous and uniform in diameter. The electrospinning filaments displayed a mesh-like structure, in which pore structures of different sizes were dispersed. As the silver-loaded content of the scaffold increased, the diameter of the nanofibers gradually increased. Transmission electron microscope showed that the silver-loaded scaffold nanofibers were uniformly dispersed with black silver nanoparticles, and the particle size diameter was  $(46\pm 24)$  nm. (2) CCK-8 assay showed that compared with the unloaded silver scaffolds, silver-loaded 0.001, 0.01 mol/L nanofiber scaffolds could promote osteoblast proliferation. Silver-loaded 0.1 mol/L nanofiber scaffolds inhibited osteoblast proliferation. Nucleus and cytoskeleton staining showed that silver-loaded 0, 0.001, and 0.01 mol/L nanofiber scaffolds facilitated the extension of osteoblast morphology. Silver-loaded 0.1 mol/L nanofiber scaffolds were not conducive to the extension of osteoblast morphology. (3) Alkaline phosphatase staining showed that silver-loaded 0, 0.001, and 0.01 mol/L nanofiber scaffolds were beneficial to osteoblast differentiation, and silver-loaded 0.1 mol/L nanofiber scaffolds inhibited osteoblast differentiation. (4) Antibacterial circle experiment showed that the unloaded silver scaffolds had no antibacterial properties. As the silver-loaded content of the scaffold increased, the antibacterial properties of silver-loaded scaffolds increased. Antibacterial rate experiment proved that silver-loaded 0.01 mol/L nanofiber scaffolds had strong antibacterial activity. (5) The results confirm that the silver-loaded 0.01 mol/L nanohydroxyapatite/polycaprolactone composite nanofiber scaffold has both good biological activity and excellent antibacterial properties.

**Key words:** electrospinning; nanofiber; nanohydroxyapatite; silver nanoparticle; bone infection; osteogenesis; antibacterial property

**Funding:** the Medical and Health Science and Technology Development Plan Project of Shandong Province, No. 2016WS0121 (to LTB); the Science and Technology Program of Binzhou Medical University, No. BY2017KJ05 (to LTB)

**How to cite this article:** CAO F, HUI M, DONG XL, WANG L, WANG ZX, ZHANG M, ZHANG XM, LIU TB. Preparation of silver-loaded nanohydroxyapatite/polycaprolactone composite nanofiber scaffold and its osteogenic and antibacterial properties. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(34):5461-5467.

## 0 引言 Introduction

骨组织是人体中新陈代谢最活跃的组织之一,具有自我更新重建功能,其过程涉及骨的吸收和形成并贯穿人的一生<sup>[1]</sup>。然而,当发生大面积骨缺损时单纯依靠自身骨改建不能修复缺失的组织,这就需要骨移植或骨替代物来重建缺损。严重的骨缺损通常会增加植入物周围骨感染的风险,骨感染主要是由细菌感染所形成的生物膜造成的<sup>[2]</sup>,这种生物膜具有特殊的三维结构和生理特性,对抗菌剂和抗生素都可产生较强的抗药性<sup>[3]</sup>。因此,研究开发既具有促进骨组织重建又具备抑制细菌感染双重功能的生物移植材料,对预防和治疗骨感染具有重要的临床意义。

聚己内酯是半结晶脂肪族聚酯,具有良好的生物兼容性,并且已获得食品和药物管理局(FDA)的批准被广泛用于生物医学领域<sup>[4]</sup>,但由于聚己内酯的疏水性使其表面能降低,因而限制了细胞的渗透、黏附生长<sup>[5]</sup>。骨组织主要由嵌入在有机胶原基质中的纳米羟基磷灰石构成,纳米羟基磷灰石与骨矿化相非常接近,可直接参与骨祖细胞的分化和矿化,更重要的是纳米羟基磷灰石的加入可改善聚己内酯亲水性差的缺陷,这在 PARK 等<sup>[6]</sup>的研究中得到证实。静电纺丝因具备极高的比表面积和彼此连通的孔隙能够准确模拟细胞外基质的组成和构造,被广泛用于生物组织工程支架<sup>[7]</sup>。纳米羟基磷灰石/聚己内酯复合材料是良好的缓释支架,被广泛用于负载药物<sup>[8]</sup>、抗生素和细胞因子等<sup>[9-10]</sup>。

以上方法并未从根本上改善支架材料的抗菌能力,为了避免细菌抗药性等问题的产生,HE 等<sup>[11]</sup>尝试将抗菌肽通过微球的形式负载到静电纺丝膜中取得了显著的抗菌效果,但研究发现抗菌肽在体内极不稳定且缺乏骨诱导活性,因此限

制了其临床应用。有研究发现,金属银(Ag)对革兰阳性和革兰阴性菌及真菌菌株均具有良好的广谱抗菌活性,是一种强大的无机抗生素<sup>[12]</sup>,更重要的是银能够有效杀灭多种已产生耐药性的微生物菌株<sup>[13]</sup>。银本身具有一定的细胞毒性<sup>[14]</sup>,据报道 10 mg/L 是银对体细胞的最大毒性质量浓度<sup>[15]</sup>,这就要求所加入的银浓度在发挥抗菌性能的同时不能损害周围正常的细胞活性。QIAN 等<sup>[16]</sup>将电纺丝浸泡在 0.001 mol/L 的硝酸银(AgNO<sub>3</sub>)溶液中得到负载银的复合支架,证明其具有良好的抗菌及成骨性能。PATERSON 等<sup>[17]</sup>通过湿法沉淀法和电纺丝法将银负载到纤维支架上,证明了银浓度为 0.1 mol/L 时可发挥良好的生物学特性和抗菌能力。

实验以纳米羟基磷灰石/聚己内酯支架为载体,将不同浓度的银(0.001, 0.01, 0.1 mol/L)与纳米羟基磷灰石/聚己内酯结合形成复合纳米纤维支架,通过物理表征、细胞增殖及形态、成骨活性检测及抗菌检测来探究具有最适银浓度的纳米羟基磷灰石/聚己内酯复合纳米纤维支架,以期获得既具有骨诱导活性又有抗菌性能的多功能复合纳米纤维支架材料。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外观察实验,数据比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2020 年 11 月至 2021 年 4 月在滨州医学院临床医学实验室完成。

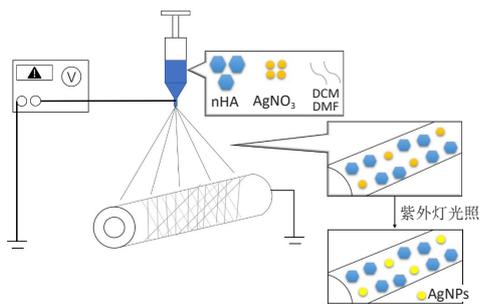
1.3 材料 小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1(由山东大学口腔医学院科研实验室赠送);金黄色葡萄球菌(ATCC25923,吉林大学赠送);大肠杆菌(ATCC25922,吉林大学赠送)。

**1.3.1 主要试剂** 聚己内酯 (美国 Sigma 公司); 二氯甲烷 (天津市致远化学试剂有限公司); N, N- 二甲基甲酰胺 (天津市致远化学试剂有限公司); 纳米羟基磷灰石 (上海麦克林生化科技有限公司); 硝酸银 (AgNO<sub>3</sub>, 上海吉至生化科技有限公司); 改良型 α-MEM 培养基、胎牛血清、青链霉素 (Bioind 公司); CCK-8 试剂盒 (上海基屹生物科技有限公司); 罗丹明标记鬼笔环肽 (北京索莱宝科技有限公司); DAPI 溶液 (北京索莱宝科技有限公司); BCIP/NBT 底物显色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司)。

**1.3.2 主要仪器与设备** 天平 (瑞士 METTLER TOLEDO 公司); 搅拌器 (金坛区西城新瑞仪器厂); 高压电源 (大连鼎通科技发展有限公司); 微量注射泵 (深圳市通力维纳科技有限公司); 超净工作台 (美国 Thermo Electron 公司); 荧光显微镜 (美国 Beckman-Coulter 公司)。

**1.4 实验方法**

**1.4.1 静电纺丝纳米纤维支架的制备** 经过查阅相关文献和前期的实验总结<sup>[18-21]</sup>, 将 5.714 3 mL 的二氯甲烷和 4.285 7 mL 的 N, N- 二甲基甲酰胺混合均匀配置成 10 mL 液体, 加入 1.428 6 g 聚己内酯和 214.3 mg 的纳米羟基磷灰石及一定质量 (分别为 0.001 7, 0.017 0, 0.170 0 g) 的硝酸银 (AgNO<sub>3</sub>), 用磁力搅拌器均匀搅拌至少 8 h。将混合液超声震荡 30 min 后移入注射器内, 针头为 8 号, 推进速度为 3 mL/h, 外界高压电源为 25 kV, 针头与轮轴接收器的距离为 20 cm, 在铝箔上制备出厚实的复合纳米纤维结构, 收集的纤维支架真空干燥后紫外线均匀光照 1 h。静电纺丝过程示意图, 见图 1, 样品分组情况, 见表 1。



图注: nHA 为纳米羟基磷灰石, DCM 为二氯甲烷, DMF 为 N, N- 二甲基甲酰胺, AgNPs 为银纳米颗粒

图 1 | 静电纺丝纳米纤维支架样品制备的示意图

Figure 1 | Schematic diagram of preparation of electrospinning membrane sample

表 1 | 静电纺丝纳米纤维支架样品的分组情况

Table 1 | Grouping of different electrospinning membrane samples

组别	组成
0 组	纳米羟基磷灰石 / 聚己内酯
0.001 组	载银量为 0.001 mol/L 的纳米羟基磷灰石 / 聚己内酯
0.01 组	载银量为 0.01 mol/L 的纳米羟基磷灰石 / 聚己内酯
0.1 组	载银量为 0.1 mol/L 的纳米羟基磷灰石 / 聚己内酯

**1.4.2 纳米纤维支架的微观形貌与元素组成**

**扫描电镜和能量色散光谱仪检测:** 将制备好的 4 组静电纺丝支架裁剪成 1 mm×1 mm 的正方形大小, 粘在扫描电镜

样品台上并连接导电胶, 对样品表面进行喷金处理, 使用场发射扫描电镜来观察静电纺丝纳米纤维支架的微观形态学的结构和特性。采用 Image J 软件从扫描电镜图像上测量并估计纳米纤维的平均直径和分布。使用能量色散光谱仪测定未载银和载银静电纺丝膜表面各个元素的组成和分布。

**透射电镜观察:** 在静电纺丝制备过程中直接将电纺丝收集到铜网上后烘干, 使用紫外线均匀照射收集到的样品 1 h。采用透射电镜观察未载银与载银静电纺丝纤维之间具体的微观差异。

**1.4.3 纳米纤维支架的细胞相容性** 将 4 种静电纺丝纳米纤维支架裁剪成直径为 15 mm 的圆形 (与 24 孔板直径相匹配), 并置于紫外线灯下消毒 (正反面各 2 h)。用相匹配的无菌不锈钢圆环将圆形样品固定在 24 孔板的培养皿底部, 缓慢加入培养基直至完全没过样品, 浸泡 2 h 后吸出培养基后待用。用完全培养基 (向已消毒的 50 mL 离心管内加入 10 mL 胎牛血清和 500 μL 青 - 链霉素, 再加入改良型 α-MEM 培养基定容至 50 mL) 培养 MC3T3-E1 细胞至对数生长期后进行下一步操作。

**细胞增殖:** 通过 CCK-8 法检测 4 组样品上的 MC3T3-E1 细胞增殖情况。将 MC3T3-E1 细胞以 1×10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> 的密度接种到消毒好后的样品上, 接种培养第 1, 3, 7 天后吸除原培养基, 每孔加入含有 30 μL CCK-8 和 270 μL 完全培养基的混合溶液, 避光环境下在含体积分数 5%CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恒温培养箱中维持 2 h。之后将每孔 100 μL 的溶液转移到 96 孔培养板上, 通过酶标仪测定 450 nm 处的吸光光度值 (A 值)。每组样品重复实验 3 次。

**细胞核和细胞骨架染色:** 采用细胞核和细胞骨架染色来检测 4 组样品上 MC3T3-E1 细胞的形态结构及伸展情况。按如上所述将 MC3T3-E1 细胞接种于样品上, 接种培养 24 h 后, 经 40 g/L 多聚甲醛固定细胞和 1%Triton X-100 破膜透明化处理细胞后, 避光室温下用现用现配的鬼笔环肽染色 30 min、DAPI 染色 5 min, 激光共聚焦显微镜下观察染色情况。

**1.4.4 碱性磷酸酶染色** 通过碱性磷酸酶染色检测 4 组样品上 MC3T3-E1 细胞的成骨分化潜能。MC3T3-E1 细胞以 1×10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> 的密度接种到消毒好后的样品上, 2 d 后改用成骨分化诱导培养基 (完全培养基、0.05 g/L 维生素 C、10 mmol/L β- 甘油磷酸钠、1×10<sup>-8</sup> mol/L 地塞米松)。在细胞接种后的第 14 天, 用 40 g/L 多聚甲醛固定细胞, 在避光室温下用现用现配的 BCIP/NBT 工作液染色 30 min 后, 以 ddH<sub>2</sub>O 洗涤来终止显色, 置于光学显微镜下观察染色情况。采用 Image J 软件分析染色区域面积占整个观察区域的比值, 每组样品的染色面积及比值测量 3 次, 取平均值。

**1.4.5 抗菌检测**

**抑菌圈检测:** 用抑菌圈法检测 4 组样品对革兰阴性大肠杆菌和革兰阳性金黄色葡萄球菌的抗菌活性。将 4 组样品制备成直径为 6 mm 的圆片, 消毒灭菌。在营养琼脂平板上接种 1 mL 菌液, 其中每种菌液中含有约 10<sup>6</sup> cfu/mL 的细菌。

将4组样品缓慢放置在已接种细菌的平板上, 37 °C下孵育24 h, 通过测量每个样品周围形成的透明区直径来确定细菌抑制区域。每组样品所产生的抑菌圈直径测量3次, 取平均值。

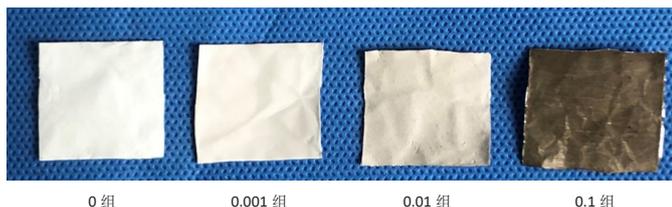
**抑菌率检测:** 采用抑菌率法检测4组样品对以上两种细菌的抗菌效果。将样品支架分别与1.5 mL(含有约 $10^6$  cfu/mL细菌)的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌在37 °C下共同培养。24 h后将样品支架取出, 加入1 mL的生理盐水并用振荡器振荡3 min后逐级稀释, 吸取100  $\mu$ L的菌悬液放置于琼脂培养板上并进行均匀划线, 之后在37 °C下孵育24 h, 对样品的菌落数目进行计数并按照以下公式计算其抑菌率, 重复实验3次。抑菌率(%)=(对照组的菌落数目-实验组的菌落数目)/对照组的菌落数目 $\times$ 100%, 其中对照组为0组。

**1.5 主要观察指标** 载有不同银浓度纳米羟基磷灰石/聚己内酯复合纳米纤维支架的物理表征及抗菌性能, 以及对成骨细胞的伸展形态、增殖及成骨性能的影响。

**1.6 统计学分析** 所有数据资料采用统计软件包 Graph Pad Prism 8.0 进行处理, 数据比较采用单因素方差分析, 设 $P < 0.05$ 时差异有显著性意义。计量资料表示为 $\bar{x} \pm s$ 。

## 2 结果 Results

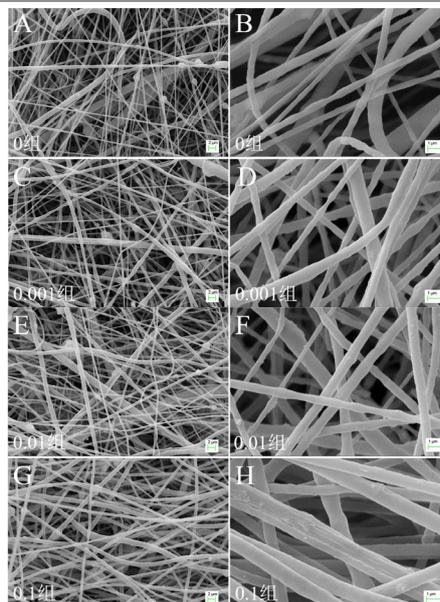
**2.1 各组纳米纤维支架的微观形貌与元素组成** 图2为4组样品的大体观, 随着载银含量的增加样品所呈现的颜色加深。



图注: 随着载银含量的增加样品所呈现的颜色加深  
图2 | 各组静电纺丝纳米纤维支架大体观

Figure 2 | General view of electrospinning membrane sample in each group

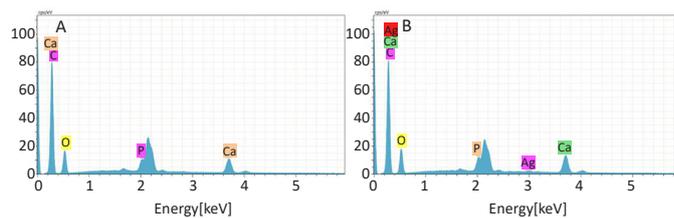
4组样品的扫描电镜观察结果, 见图3, 低倍镜下可见4组样品较为连续, 直径较为均匀, 纳米羟基磷灰石呈团块状散在分布在纳米纤维上, 未见明显的大液滴及杂质的混入, 静电纺丝随机乱序交错排列, 呈现网状结构, 其中分散着大小各异的孔隙; 高倍镜下可见载银支架中的纳米纤维表面散在轻微凸起的金属银颗粒, 并随着载银量的增加在纳米纤维上呈现增多的趋势。0组、0.001组、0.01组和0.1组静电纺丝纤维的平均直径分别为(538 $\pm$ 99), (542 $\pm$ 96), (693 $\pm$ 139), (775 $\pm$ 180) nm。4组样品的元素组成, 见图4, 未载银组(0组)检测到C、O、Ca、P元素, 说明聚己内酯支架中成功混入纳米羟基磷灰石; 载银组(以0.01组为例)除了检测到以上4种元素以外, 还检测到银元素的存在, 说明金属银成功载入了静电纺丝样品中。各组样品的透射电镜观察结果, 见图5, 载银组(以0.01组为例)纳米纤维上可见均匀分散的黑色颗粒(即银纳米颗粒), 颗粒直径为(46 $\pm$ 24) nm, 说明负载到纳米纤维支架上的银离子成功转化为银纳米颗粒。



图注: 图中A、C、E、G的标尺为2  $\mu$ m, B、D、F、H的标尺为1  $\mu$ m。低倍镜下可见4组样品直径较为均匀, 纳米羟基磷灰石呈团块状散在分布在纳米纤维上, 静电纺丝呈现网状结构, 其中分散着大小各异的孔隙; 高倍镜下可见载银支架中的纳米纤维表面散在轻微凸起的金属银颗粒, 并随着载银量的增加在纳米纤维上呈现增多的趋势

图3 | 各组静电纺丝纳米纤维支架的扫描电镜观察结果

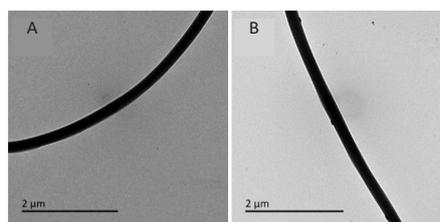
Figure 3 | Scanning electron microscope images of electrospinning membrane sample in each group



图注: 图中A为0组, 检测到C、O、Ca、P元素; B为0.01组, 除了检测到以上4种元素以外, 还检测到银元素的存在

图4 | 各组静电纺丝纳米纤维支架的能量色散光谱仪检测图谱

Figure 4 | Energy dispersive spectroscopy diagrams of electrospinning membrane sample in each group

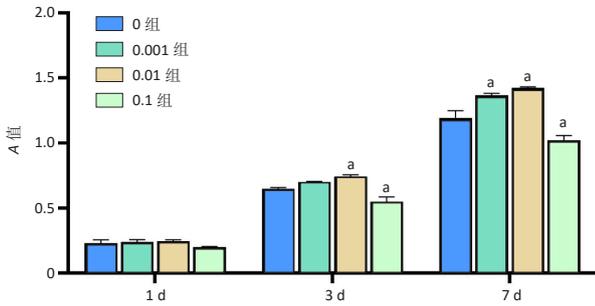


图注: 图中A为0组; B为0.01组, 纳米纤维上可见均匀分散的黑色银纳米颗粒

图5 | 各组静电纺丝纳米纤维支架的透射电镜观察结果

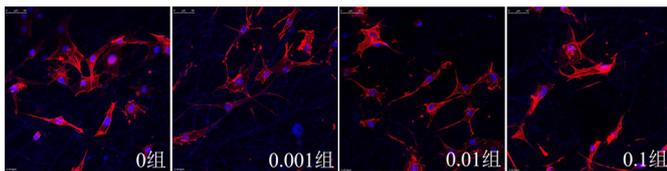
Figure 5 | Transmission electron microscope images of electrospinning membrane sample in each group

**2.2 各组纳米纤维支架的细胞相容性** 各组样品对成骨细胞增殖的影响, 见图6。细胞培养的第1天, 各组间细胞A值比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); 培养第3天, 0.01组细胞A值高于0组( $P < 0.05$ ), 0.1组细胞A值低于0组( $P < 0.05$ ), 0.001组细胞A值与0组比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); 培养第7天, 0.001组、0.01组细胞A值高于0组( $P < 0.05$ ), 0.1组细胞A值低于0组( $P < 0.05$ ), 说明0.1组表现为较强的细胞毒性, 进而抑制了细胞增殖。通过图6还可以发现, 随着培养天数逐渐增加, 0.1组细胞A值增高, 但细胞活性明显低于0组, 提示纳米羟基磷灰石所发挥的积极效果明显小于过量银所产生的细胞毒性。



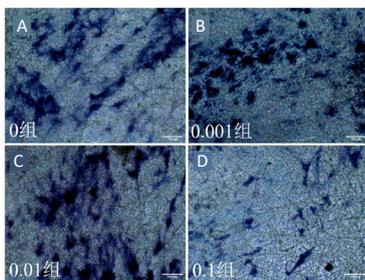
图注：与 0 组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$   
图 6 | 各组静电纺丝纳米纤维支架对成骨细胞增殖的影响  
Figure 6 | Effect of different electrospinning membrane samples on the proliferation of osteoblasts in each group

各组样品对成骨细胞伸展形态的影响，见图 7。0 组、0.001 组和 0.01 组的成骨细胞呈多边形，与 0 组相比较，0.001 组和 0.01 组的成骨细胞以多边形为主，可见明显突起的伪足并相互连接，表现出良好的细胞伸展性，具有典型的成骨细胞的生物学形态特征；0.1 组的成骨细胞呈现不规则形状，细胞的丝状伪足短而稀少，甚至没有，细胞的伸展性较差。



图注：与 0 组相比较，0.001 组和 0.01 组的成骨细胞以多边形为主，可见明显突起的伪足并相互连接，表现出良好的细胞伸展性；0.1 组的成骨细胞呈现不规则形状，细胞的丝状伪足短而稀少，细胞的伸展性较差  
图 7 | 各组静电纺丝纳米纤维支架对成骨细胞伸展形态的影响  
Figure 7 | Effect of different electrospinning membrane samples on the stretching morphology of osteoblasts in each group

2.3 各组纳米纤维支架的成骨性能 各组样品对成骨细胞成骨能力的影响，见图 8。

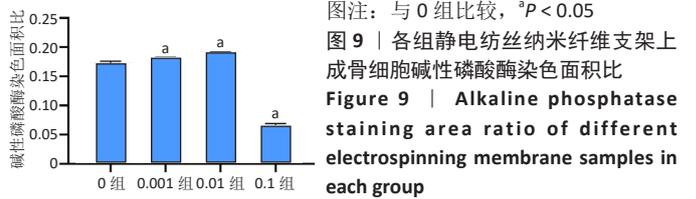


图注：图中 A-D 分别为 0 组、0.001 组、0.01 组、0.1 组。0.01 组碱性磷酸酶染色范围最大，呈团块状且染色较深，其次为 0 组和 0.001 组，0.1 组的蓝染范围最小且稀疏。标尺为 100  $\mu\text{m}$

图 8 | 各组静电纺丝纳米纤维支架对成骨细胞成骨能力的影响 (碱性磷酸酶染色)  
Figure 8 | Effects of different electrospinning membrane samples on the osteogenic ability of osteoblasts in each group (alkaline phosphatase staining)

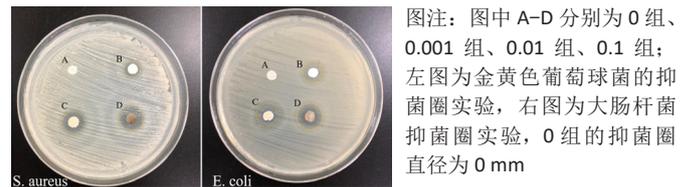
图 8 可见蓝染的范围代表成骨细胞的相关活力。0.01 组碱性磷酸酶染色的范围最大，呈团块状且染色较深，其次为 0 组和 0.001 组，也可见染色区域，0.1 组的蓝染范围最小且稀疏。通过对染色面积的比值计算分析发现，0.01 组的染色

面积比最高，0.1 组的染色面积比最低，0.001 组、0.01 组、0.1 组与 0 组比较差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ )，见图 9。



图注：与 0 组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$   
图 9 | 各组静电纺丝纳米纤维支架上成骨细胞碱性磷酸酶染色面积比  
Figure 9 | Alkaline phosphatase staining area ratio of different electrospinning membrane samples in each group

2.4 各组纳米纤维支架的抗菌性能 各组样品的抑菌圈实验见图 10 所示，只有 0 组的抑菌圈直径为 0 mm，提示纳米羟基磷灰石 / 聚己内酯支架对金黄色葡萄球菌与大肠杆菌没有抗菌活性。



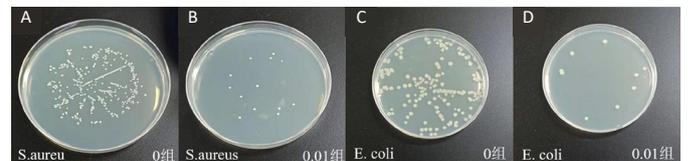
图注：图中 A-D 分别为 0 组、0.001 组、0.01 组、0.1 组；左图为金黄色葡萄球菌的抑菌圈实验，右图为大肠杆菌抑菌圈实验，0 组的抑菌圈直径为 0 mm  
图 10 | 各组静电纺丝纳米纤维支架对两种细菌的抑菌圈实验  
Figure 10 | Photos of inhibition zone of different electrospinning membrane samples in each group

各组样品的抑菌圈直径，见表 2，随着载银浓度的增加，样品的抑菌圈直径逐渐增大，表明复合支架的抗菌性能增强。

表 2 | 各组静电纺丝纳米纤维支架的抑菌圈直径 ( $\bar{x} \pm s$ , mm)  
Table 2 | Diameter of inhibition zone of different electrospinning membrane samples in each group

组别	金黄色葡萄球菌 ( <i>S.aureus</i> )	大肠杆菌 ( <i>E.coli</i> )
0 组	0	0
0.001 组	3.30 $\pm$ 0.84	3.84 $\pm$ 0.72
0.01 组	5.70 $\pm$ 0.58	6.56 $\pm$ 0.82
0.1 组	8.54 $\pm$ 0.52	9.86 $\pm$ 0.38

图 11 所示为未载银组 (0 组) 和载银组 (以 0.01 组为例) 与两种细菌的涂板照片，可见 0.01 组的菌落数明显减少，通过抑菌率公式计算得出，0.01 组对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌率分别为 94.91% 和 94.79%。



图注：图中 A、B 为金黄色葡萄球菌涂板照片，C、D 为大肠杆菌涂板照片，可见 0.01 组的菌落数明显减少  
图 11 | 各组静电纺丝纳米纤维支架的细菌涂板照片  
Figure 11 | Bacterial coated photos of electrospinning membrane samples in each group

2.5 纳米纤维支架的细胞相容性 由 CCK8 实验与细胞核及细胞骨架染色结果可知，载银 (0, 0.001, 0.01 mol/L) 的纳米羟基磷灰石 / 聚己内酯复合纳米纤维支架具有良好的细胞相容性。

### 3 讨论 Discussion

实验通过混合溶液静电纺丝法将银离子和纳米羟基磷灰石共纺到聚己内酯纳米纤维支架上, 通过有机溶剂 N, N-二甲基甲酰胺和紫外光照还原法将银离子进一步还原为银纳米颗粒。银纳米颗粒可稳定存在于静电纺丝支架上, 并发挥独特的生物学特性和良好的抗菌性能。扫描电镜下可见, 载银前后纳米羟基磷灰石 / 聚己内酯支架的形貌特征基本没有发生太大变化, 依然是无数连续的纳米纤维交错排列呈网状结构, 并形成大小各异的孔隙结构, 类似于细胞外基质; 随着载银量的增加, 纳米纤维上银颗粒的数量也逐渐增多。值得注意的是, 银的加入一开始并未明显改变纳米纤维的直径, 但随着载银含量的增加纳米纤维的直径也逐渐增大, 这与 BHULLAR 等<sup>[22]</sup> 将不同质量比的银纳米颗粒直接载入聚己内酯支架中的结果趋势相似。可能是由于银的加入使有机溶剂的电导率增大, 进而影响纳米纤维的直径<sup>[23]</sup>。能量色散光谱仪检测结果直接证明了银的成功载入。通过透射电镜可观察到载银复合纤维支架上存在显而易见的 (46±24) nm 的银纳米颗粒, 说明银离子成功转换为银纳米颗粒, 这与 QUIRÓS 等<sup>[24]</sup> 观察到的结果相似。事实上, 银纳米颗粒的形成在紫外线照射之前就开始了, 这是由于 N, N-二甲基甲酰胺是一种强有力的还原剂, 可以有效还原银离子而生成银纳米颗粒<sup>[25]</sup>。紫外光照射可以加速剩余银离子转化为纳米颗粒。

细胞增殖和细胞核及骨架染色实验证实, 0.001 组和 0.01 组样品对成骨细胞生物学行为及形态的积极作用效果是显著的, 说明此浓度下的银具有良好的生物兼容性, 能促进成骨细胞的生长繁殖活力; 但是 0.1 组样品不利于成骨细胞的增殖和伸展, 说明过高浓度的银具有极强的细胞毒性反应, 不能满足复合纳米支架的基本要求。碱性磷酸酶活性被认为是成骨细胞增殖分化过程中早期的标志性酶, 对化学成分和刺激十分敏感。实验发现 0.01 组的钙沉积量明显高于其他 3 组, 说明 0.01 mol/L 的银含量可以促进成骨细胞的分化潜能; 但是 0.1 组只有零星几点的染色区域, 说明过高浓度的银不但不促进成骨细胞的生物学行为, 反而抑制阻碍成骨细胞的活性, 严重违背了骨组织工程支架的初衷。虽然有报道指出金属银可以有效刺激成骨细胞及骨骼的生长<sup>[26]</sup>, 而且此次实验也证明了银确实具备优良的生物学特性, 但是前提一定是在合适的银浓度范围内, 如超出最适的银浓度范围则表现出事与愿违的结果<sup>[27]</sup>。实验证明了银浓度低于 0.01 mol/L 具有优秀的生物活性, 但当其浓度达到 0.1 mol/L 时则表现出极强的细胞毒性。需要注意的是, 此次实验不能确定银浓度在 0.01 mol/L 和 0.1 mol/L 之间的生物活性, 但根据图 12 所示<sup>[28]</sup>, 银浓度可能存在一个平衡参考点, 表现为既不促进也不抑制成骨细胞活性, 这需要后期实验探究复合纳米纤维支架中银的具体释放量, 来进一步验证其细胞毒性。

骨缺损修复失败的主要原因之一是细菌感染, 细菌入侵组织后定植生长繁殖并形成很难被根除的细菌生物膜<sup>[29]</sup>。骨感染中常见的致病菌是革兰阴性大肠杆菌和革兰阳性金黄

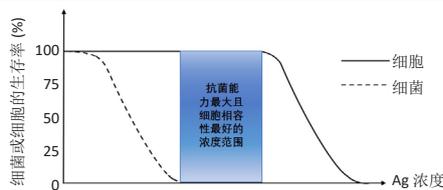


图 12 | 银 (Ag) 的适用浓度范围 (蓝色区域) 的概念图  
Figure 12 | Conceptual diagram of the suitable concentration range (blue-colored area) of Ag

色葡萄球菌<sup>[30-31]</sup>, 因此该实验以这两种菌株作为研究对象。银纳米颗粒具有强大抗菌灭菌效果及生物安全性等优势, 被广泛用于生物医学领域的研究<sup>[32]</sup>。目前的研究认为银主要通过两种机制发挥抗菌作用: 一是银具有较高还原电位, 可以在其周围产生原子氧, 原子氧的强氧化性具有杀灭细菌的能力<sup>[33-34]</sup>; 二是银与携带负电荷的细菌细胞膜接触时, 银离子可穿透进入细胞膜并与胞质内蛋白质上的巯基发生反应, 进而影响细菌 DNA 的合成, 导致细菌裂解死亡。银离子还可以从坏死崩解的细菌中释放出来达到反复杀菌的效果<sup>[35-36]</sup>。银不会使细菌产生抗药耐药性的风险。抑菌圈检测发现, 载银复合纳米纤维支架在两种菌株中均形成清晰明显的抑菌圈, 是由于银纳米颗粒从复合纳米纤维支架中扩散出来进而杀灭其周围的细菌; 而且随着银浓度的增大, 从样品支架中释放的银纳米颗粒量增多, 杀灭其周围细菌的数量也就越多, 导致抑菌圈的范围也逐渐增大, 抑菌圈范围的大小被认为是衡量致病菌对抗菌材料抗药性和有效性的重要指标<sup>[37]</sup>, 说明银的抗菌性能随着银浓度的增加而增强。通过抑菌率实验发现 0.01 组样品对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌率分别为 94.91% 和 94.79%, 进一步验证了载银量为 0.01 mol/L 的纳米纤维支架具有优异的抗菌性能。但是载银复合支架的长期抗菌效果还需要后期实验进一步研究。

综上所述, 实验发现载银含量为 0.1 mol/L 的样品对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均产生最大的抑菌区域; 而且载银含量为 0.01 mol/L 的样品具有最佳的促进成骨细胞增殖能力, 并且其对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌率分别为 94.91% 和 94.79%, 同样表现出优秀的抗菌活性, 同时该样品还具有较强的促进成骨细胞分化的潜能, 因此载银量为 0.01 mol/L 的纳米羟基磷灰石 / 聚己内酯复合纳米纤维支架既具有良好的生物学活性又具备优秀的抗菌性能, 有望成为修复骨缺损同时预防骨感染的新型复合纳米纤维支架。

**作者贡献:** 实验设计和成文为第一作者, 实验评估和审核为通讯作者, 实验实施及资料收集为第一、二作者。

**经费支持:** 该文章接受了“山东省医药卫生科技发展计划项目 (2016WS0121) 及滨州医学院科技计划项目 (BY2017KJ05)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

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

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经通过滨州医学院生物统计学专家审核。

**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。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] YANG JW, HIROKI U, MISHINA Y. Energy metabolism: A newly emerging target of BMP signaling in bone homeostasis. *Bone*. 2020;138:115467.
- [2] MASTERS EA, TROMBETTA RP, DE MESY BENTLEY KL, et al. Evolving concepts in bone infection: redefining “biofilm”, “acute vs. chronic osteomyelitis”, “the immune proteome” and “local antibiotic therapy”. *Bone Res*. 2019;7:20.
- [3] KARYGIANNI L, REN Z, KOO H, et al. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol*. 2020;28(8):668-681.
- [4] MALIKMAMMADOV E, TANIR TE, KIZILTAY A, et al. PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2018;29:863-893.
- [5] CHOU PY, CHOU YC, LAI YH, et al. Fabrication of Drug-Eluting Nano-Hydroxylapatite Filled Polycaprolactone Nanocomposites Using Solution-Extrusion 3D Printing Technique. *Polymers (Basel)*. 2021;13(3):318.
- [6] PARK S, KIM JE, HAN J, et al. 3D-Printed Poly( $\epsilon$ -Caprolactone)/Hydroxyapatite Scaffolds Modified with Alkaline Hydrolysis Enhance Osteogenesis In Vitro. *Polymers (Basel)*. 2021;13(2):257.
- [7] BARNES CP, SELL SA, BOLAND ED, et al. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(14):1413-1433.
- [8] MIRICĂ IC, FURTOS G, LUCACIU O, et al. Electrospun Membranes Based on Polycaprolactone, Nano-Hydroxyapatite and Metronidazole. *Materials (Basel)*. 2021;14(4):931.
- [9] EL-HABASHY S, ELTAHER H, GABALLAH A, et al. Biomaterial-Based Nanocomposite for Osteogenic Repurposing of Doxycycline. *Int J Nanomedicine*. 2021;16:1103-1126.
- [10] LIU HM, DU YY, YANG GJ, et al. Delivering Proangiogenic Factors from 3D-Printed Polycaprolactone Scaffolds for Vascularized Bone Regeneration. *Adv Healthc Mater*. 2020;9(23):2000727.
- [11] HE YZ, JIN YH, WANG XM, et al. An Antimicrobial Peptide-Loaded Gelatin/Chitosan Nanofibrous Membrane Fabricated by Sequential Layer-by-Layer Electrospinning and Electro spraying Techniques. *Nanomaterials (Basel)*. 2018;8(5):327.
- [12] JUNG WK, KOO HC, KIM KW, et al. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(7):2171-2178.
- [13] SILVER S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;27(2-3):341-353.
- [14] WYPIJ M, JEŃDRZEJEWSKI T, OSTROWSKI M, et al. Biogenic Silver Nanoparticles: Assessment of Their Cytotoxicity, Genotoxicity and Study of Capping Proteins. *Molecules*. 2020;25(13):3022.
- [15] VIK H, ANDERSEN KJ, JULSHAMN K, et al. Neuropathy caused by silver absorption from arthroplasty cement. *Lancet*. 1985;1:872.
- [16] QIAN YZ, ZHOU XF, ZHANG FM, et al. Triple PLGA/PCL Scaffold Modification Including Silver Impregnation, Collagen Coating, and Electrospinning Significantly Improve Biocompatibility, Antimicrobial, and Osteogenic Properties for Orofacial Tissue Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(41):37381-37396.
- [17] PATERSON TE, SHI R, TIAN JJ, et al. Electrospun Scaffolds Containing Silver-Doped Hydroxyapatite with Antimicrobial Properties for Applications in Orthopedic and Dental Bone Surgery. *J Funct Biomater*. 2020;11(3):58.
- [18] 王乐, 惠敏, 董西玲, 等. 缓释阿托伐他汀钙纳米纤维支架对细胞黏附增殖的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2020,24(28):4492-4497.
- [19] BALLESTEROS CAS, CORREA DS, ZUCOLOTTI V. Polycaprolactone nanofiber mats decorated with photoresponsive nanogels and silver nanoparticles: Slow release for antibacterial control. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;107:110334.
- [20] HASSAN AA, RADWAN HA, ABDELAAL SA, et al. Polycaprolactone based electrospun matrices loaded with Ag/hydroxyapatite as wound dressings: Morphology, cell adhesion and antibacterial activity. *Int J Pharm*. 2021;593:120143.
- [21] 刘丹丹. 静电纺丝法制备纳米级银颗粒 EVOH 导向纤维及其性能研究 [D]. 西安: 西安科技大学, 2019.
- [22] BHULLAR SK, RUZGAR DG, FORTUNATO G, et al. A Facile Method for Controlled Fabrication of Hybrid Silver Nanoparticle-Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Fibrous Constructs with Antimicrobial Properties. *J Nanosci Nanotechnol*. 2019;19(11):6949-6955.
- [23] ALI W, VALBONE S, MATTHIAS L, et al. Electrical conductivity of silver nanoparticle doped carbon nanofibres measured by CS-AFM. *RSC Adv*. 2019;9(8):4553-4562.
- [24] QUIRÓS J, BORGES JP, BOLTES K, et al. Antimicrobial electrospun silver-, copper- and zinc-doped polyvinylpyrrolidone nanofibers. *J Hazard Mater*. 2015;299:298-305.
- [25] PASTORIZA-SANTOS I, SERRA-RODRÍGUEZ C, LIZ-MARZÁN LM. Self-Assembly of Silver Particle Monolayers on Glass from Ag(+) Solutions in DMF. *J Colloid Interface Sci*. 2000;221(2):236-241.
- [26] CAO HL, ZHANG WJ, MENG FH, et al. Osteogenesis Catalyzed by Titanium-Supported Silver Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(6):5149-5157.
- [27] NING CY, WANG XL, LI LH, et al. Concentration Ranges of Antibacterial Cations for Showing the Highest Antibacterial Efficacy but the Least Cytotoxicity against Mammalian Cells: Implications for a New Antibacterial Mechanism. *Chem Res Toxicol*. 2015;28(9):1815-1822.
- [28] SHIMABUKURO M. Antibacterial Property and Biocompatibility of Silver, Copper, and Zinc in Titanium Dioxide Layers Incorporated by One-Step Micro-Arc Oxidation: A Review. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(10):716.
- [29] LÜTHJE FL, JENSEN LK, JENSEN HE, et al. The inflammatory response to bone infection- a review based on animal models and human patients. *APMIS*. 2020;128:275-286.
- [30] GUNDTOFT PH, PEDERSEN AB, SCHØNHEYDER HC, et al. One-year incidence of prosthetic joint infection in total hip arthroplasty: a cohort study with linkage of the Danish Hip Arthroplasty Register and Danish Microbiology Databases. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25(5):685-693.
- [31] SCHIERHOLZ JM, BEUTH J. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *J Hosp Infect*. 2001;49(2):87-93.
- [32] DURÁN N, DURÁN M, DE JESUS MB, et al. Silver Nanoparticles: A New View on Mechanistic Aspects on Antimicrobial Activity. *Nanomedicine*. 2016;12:789-799.
- [33] YAN L, XIANG Y, YU J, et al. Fabrication of Antibacterial and Antiwear Hydroxyapatite Coatings via In Situ Chitosan-Mediated Pulse Electrochemical Deposition. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(5):5023-5030.
- [34] RIEGER KA, CHO HJ, YEUNG HF, et al. Antimicrobial Activity of Silver Ions Released from Zeolites Immobilized on Cellulose Nanofiber Mats. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(5):3032-3040.
- [35] FENG QL, WU J, CHEN GQ, et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(4):662-668.
- [36] DAI GY, TANG SC, WANG TL. A novel approach to prepare high antibacterial polylactic acid surface encapsulated nano-silver through stereocomplexation. *Mater Res Express*. 2019;6(5):55310.
- [37] SHEIKH FA, BARAKAT NA, KANJWAL MA, et al. Electrospun titanium dioxide nanofibers containing hydroxyapatite and silver nanoparticles as future implant materials. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21:2551-2559.

(责任编辑: GW, ZN, ZJP)