

# 载抗菌肽壳聚糖 / 骨粉 / 纳米微晶纤维素颌骨修复支架的理化性能

于爱敏, 徐婷, 朱韵莹, 梁坚强, 武东辉

<https://doi.org/10.12307/2023.412>

投稿日期: 2022-04-20

采用日期: 2022-06-13

修回日期: 2022-08-20

在线日期: 2022-09-09

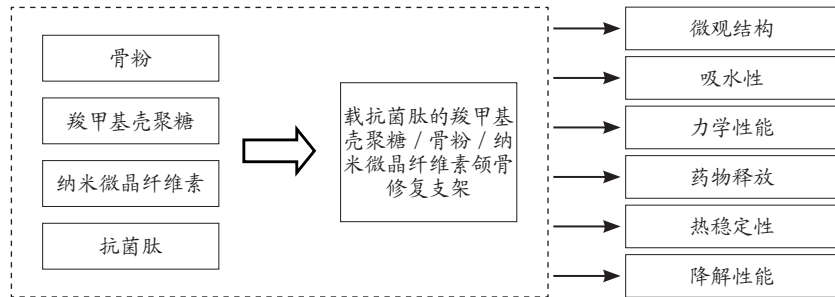
中图分类号:

R459.9; R318; R-331

文章编号:

2095-4344(2023)25-03999-07

文献标识码: A

**文章快速阅读:** 制备载抗菌肽的羧甲基壳聚糖 / 骨粉 / 纳米微晶纤维素颌骨修复支架


## 文题释义:

**壳聚糖:** 为一种天然活性成分材料, 具有优良的生物相容性和生物可降解性, 能够促进细胞的黏附、分化和增殖, 可有效促进骨形成, 但材料也存在强度低的问题。

**骨组织工程支架材料:** 能植入生物体并与骨组织活体细胞相结合, 具备替代功能的材料, 它相当于人工细胞外基质, 为细胞黏附、生长、增殖、新陈代谢、形成新组织提供三维支持。

## 摘要

**背景:** 单一生物材料较难达到理想骨组织工程支架材料的标准, 多种生物材料复合及优势互补是构建出理想支架的有效途径。

**目的:** 构建出新型颌骨修复支架, 并检测其关键理化性能。

**方法:** 采用冷冻干燥法制备羧甲基壳聚糖/骨粉/纳米微晶纤维素/抗菌肽颌骨修复支架, 观察分析支架的微观结构, 测定支架的抗拉强度、断裂伸长率, 评估支架的吸水率、体外降解率、热稳定性和抗菌肽缓释作用。

**结果与结论:** ①扫描电镜下可见, 制备的颌骨修复支架具有均匀多孔网状结构, 平均孔径为114.9 μm, 支架的吸水率为(698.8±53.8)%, 支架的断裂伸长率介于8%~10%, 抗拉强度介于0.7~0.9 MPa, 应力-应变关系与自然的软骨组织相类似; ②热重曲线显示, 在200 °C以下, 颌骨修复支架材料轻微失重; 在200~400 °C之间, 支架材料明显失重; 在600 °C以上时, 支架材料失重严重; ③体外药物释放结果显示, 该支架在最初的12 h内释放出(58.40±1.79)%的抗菌肽, 12 h后药物释放率下降, 近20%的抗菌肽在6 d后仍未释放, 有利于药效持续稳定; ④将支架分别浸泡于PBS与含溶菌酶的PBS中, 在28 d时, 无溶菌酶与含溶菌酶条件下的支架降解率分别为70%, 85%; ⑤结果显示, 载抗菌肽的羧甲基壳聚糖/骨粉/纳米微晶纤维素支架具有良好的吸水性能、热稳定性、降解性能与机械性能。

**关键词:** 羧甲基壳聚糖; 纳米微晶纤维素; 羟基磷灰石; 抗菌肽; 颌骨; 支架; 骨组织工程

## Physicochemical properties of chitosan/bone powder/cellulose nanocrystals scaffold loaded with antimicrobial peptides for jaw repair

Yu Aimin, Xu Ting, Zhu Yunying, Liang Jianqiang, Wu Donghui

Stomatology Hospital of Haizhu district, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Yu Aimin, Master, Stomatology Hospital of Haizhu district, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

**Corresponding author:** Wu Donghui, Associate chief physician, Stomatology Hospital of Haizhu district, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** It is difficult for a single biomaterial to reach the standard of an ideal scaffold material for bone tissue engineering. It is an effective way to construct an ideal scaffold by compounding and complementing the advantages of multiple biomaterials.

**OBJECTIVE:** To construct a new type of mandibular scaffold, and test the key physicochemical properties of the scaffold.

**METHODS:** Antimicrobial peptide-loaded carboxymethyl chitosan/bone powder/cellulose nanocrystals scaffold was prepared by freeze-drying method. The microstructure of the scaffold was observed and analyzed, and the tensile strength and elongation at break of the scaffold were measured. The water absorption, degradation rate *in vitro*, thermal stability and release of antimicrobial peptide of the scaffold were evaluated.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Scanning electron microscope showed that the scaffolds had a uniform porous network structure with an average pore size of 114.9 μm. The water absorption rate of the scaffold was 698.8±53.8%. The fracture elongation of the scaffold was 8%~10%. The tensile strength was 0.7~

广州市海珠区口腔医院, 广东省广州市 510405

第一作者: 于爱敏, 女, 1982年生, 山东省威海市人, 汉族, 硕士, 主要从事口腔组织工程相关研究。

通讯作者: 武东辉, 副主任医师, 广州市海珠区口腔医院, 广东省广州市 510405

<https://orcid.org/0000-0002-9096-3606> (于爱敏)

基金资助: 广州市海珠区科技项目 (2018-38), 项目负责人: 武东辉

引用本文: 于爱敏, 徐婷, 朱韵莹, 梁坚强, 武东辉. 载抗菌肽壳聚糖 / 骨粉 / 纳米微晶纤维素颌骨修复支架的理化性能 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(25):3999-4005.



0.9 MPa, and the stress-strain relationship was similar to that of natural cartilage tissue. (2) Thermogravimetric curve displayed that the weight loss of the stent was very slight below 200 °C, obvious between 200–400 °C, and severe above 600 °C. (3) The results of drug release *in vitro* showed that (58.40±1.79)% of antibacterial peptide was released from the scaffold within the first 12 hours, and the drug release rate decreased after 12 hours, and nearly 20% of antibacterial peptide was not released after 6 days, which was beneficial to the sustained and stable drug effect. (4) The scaffolds were separately soaked in PBS and PBS containing lysozyme. At 28 days, the degradation rates of scaffolds without lysozyme and with lysozyme were 70% and 85%, respectively. (5) These results exhibited that the carboxymethyl chitosan/bone powder/cellulose nanocrystals scaffold had good water absorption performance, thermal stability, degradation performance and mechanical property.

**Key words:** carboxymethyl chitosan; cellulose nanocrystals; hydroxyapatite; antimicrobial peptide; jawbone; scaffold; bone tissue engineering

**Funding:** Science and Technology Project of Haizhu District of Guangzhou, No. 2018-38 (to WDH)

**How to cite this article:** YU AM, XU T, ZHU YY, LIANG JQ, WU DH. Physicochemical properties of chitosan/bone powder/cellulose nanocrystals scaffold loaded with antimicrobial peptides for jaw repair. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(25):3999-4005.

## 0 引言 Introduction

颌骨因创伤、炎症、肿瘤或发育不良等原因造成的骨量不足，是口腔种植修复中的常见问题<sup>[1]</sup>，目前主要采用骨移植修复材料来增加牙槽骨骨量。骨移植材料来源主要有自体骨、同种异体骨、异种骨及其他人工合成骨<sup>[2-4]</sup>，但单一成分的骨移植材料在力学性能、降解速率、生物相容性等方面往往有欠缺。在此背景下，骨组织工程支架材料应运而生，并获得了口腔医学研究人员的广泛关注。

骨组织工程包括几个要素：细胞、生长活性因子以及承载这两者的支架材料。其中，支架材料作为三维结构，其主要作用是为成骨细胞的黏附、增殖、分化、迁移以及血管等组织的形成提供必要的场所。理想的骨组织工程支架材料需具备3方面特征：其一，良好的生物相容性、生物降解性、骨传导性和骨诱导性；其二，良好的力学性能，且力学强度与材料的多孔性结构和降解速率相适应；其三，很好的孔连通性，且孔径大小、孔隙率合适<sup>[5-7]</sup>。

目前单一的支架材料很难达到理想骨组织工程支架材料的标准。人工骨粉主要成分是羟基磷灰石，是骨组织工程常用的材料之一<sup>[8-10]</sup>。羟基磷灰石作为支架材料具有良好的生物相容性、骨传导性和骨诱导性，但存在脆性大、抗压强度低的问题<sup>[11-12]</sup>。羧甲基壳聚糖是壳聚糖梭甲基化的产物，具有良好的水溶性、抗菌性、成膜性和吸附性，还具有抗氧化、抗肿瘤、促进软骨细胞生长、诱导骨形成以及促进伤口愈合等诸多作用<sup>[13-16]</sup>。研究表明，羧甲基壳聚糖作为药物载体可有效提高药物利用率<sup>[17-19]</sup>；然而，壳聚糖也存在生物活性较弱、机械强度较低的问题，限制了其在临床实践中的应用<sup>[20-22]</sup>。这两种材料具有优势互补的可能性，但均存在力学性能的问题。纳米微晶纤维素是纤维素的衍生物，具有无毒、可降解、良好生物和细胞相容性等特点，在溶液中有良好的分散性，可被用作脱钙骨基质的载体<sup>[23]</sup>。纳米微晶纤维素具有高强度和硬度，可以作为增强剂与其他天然或合成聚合物一起用于生物医学应用<sup>[24-25]</sup>。如果纳米微晶纤维素能够与前两者相复合，就有可能形成一种综合性能非常好的骨组织工程支架。目前3种材料复合而成骨支架并用于骨修复重建领域的研究鲜有报道。

基于上述考虑，此次实验将羧甲基壳聚糖、纳米微晶纤维素及骨粉这3种生物材料进行复合，优势互补，并进一步加入能增强抗菌能力的抗菌肽<sup>[26]</sup>，形成新型理想的骨组织工程

支架，通过一系列的理化性质分析综合评价该支架的突出性能。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 新型植骨材料制备及物理性能测试实验。

1.2 时间及地点 实验于2021年1月至2022年1月在广州海珠区口腔医院测试中心完成。

1.3 材料

1.3.1 主要试剂 羟基磷灰石生物陶瓷(以下简称骨粉)(北京市意华健科贸有限责任公司, 中国); 纳米微晶纤维素(阿拉丁, 中国); 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺、N-羧基琥珀酰亚胺、羧甲基壳聚糖、抗菌肽(Aladdin)。

1.3.2 主要仪器 HJ-3 恒温磁力搅拌器(常州国华仪器有限公司, 中国); 去离子水纯水仪(Thermo Fisher Scientific, 美国); BCD-648WDBE 医用冰箱(海尔集团, 中国); BL610 分析天平(sartorius, 德国); H1650 离心机(湘仪集团, 中国); JP-040S 超声清洗机(深圳洁盟设备有限公司, 中国); H-800 透射电镜(Hitachi, 日本); LDS-05S 通用试验机(济南川佰仪器设备有限公司, 中国); TG209F3-ASC 热重分析仪(Netzsch, 德国); S-3400 扫描电子显微镜(Hitachi, 日本); SCIENTZ-10N 冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司, 中国); UV-2550 紫外分光光度计(Daojin, 日本); ZHWY-200D 恒温振荡箱(苏州净化设备有限公司, 中国); Zeta-Sizer Nano ZS 动态光散射仪(Malvern, 英国); Zeta-Sizer Nano ZS 粒径分析仪(Malvern, 英国); 傅里叶红外光谱仪(Bruker, 德国)。

1.4 实验方法

1.4.1 复合支架的制备

**制备纳米微晶纤维素:** 将微晶纤维素与质量分数为64%的浓硫酸溶液以1 g/15 mL的比例混合均匀, 经超声处理得到乳白色悬浮液。超声处理的参数为: 超声频率40 kHz, 功率250 W, 温度44 °C, 处理时间2.5 h。将乳白色悬浮液在12 000 r/min下高速离心处理, 当上层呈水溶胶体状时, 收集该溶胶体并将其超声处理30 min, 得到pH值为5.0-6.0的纳米纤维素晶体胶体。将纳米纤维素晶体胶体置于含去离子水透析液的透析袋中, 透析3 d, 至胶体pH值为中性, 冻干后得到纳米微晶纤维素。

**制备颌骨修复支架:** 称取400 mg羧甲基壳聚糖、10 mg纳米微晶纤维素、10 mg骨粉和10 mg抗菌肽, 溶解于

10 mL 的纯水中, 常温磁力搅拌 4 h, 搅拌速率 300 r/min。接着, 将分散均匀的液体倒入特制的聚四氟乙烯模具, 再将该模具放入 4 °C 冰箱, 以达到缓慢预冻和静止脱泡的目的。然后, 将模具放入 -20 °C 冰箱过夜。最后, 将模具放入冷冻干燥机, 24 h 后取出, 即得到未交联的海绵状材料。将未交联的海绵状材料浸泡于含 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (50 mmol/L)/N-N-羟基琥珀酰亚胺 (12.5 mmol/L) 的 50 mL 无水乙醇溶液中, 在室温下交联反应 24 h。反应完成后, 弃去多余的交联溶液, 用体积分数 75% 的乙醇浸泡清洗 5 次, 去除其中的交联剂。再次真空冷冻干燥处理, 即得到羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉 / 抗菌肽支架。同理, 制备羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉 / 抗菌肽支架。

#### 1.4.2 支架的表征测定

**红外光谱测定:** 首先取 3-5 mg 的样品 (交联前后的羧甲基壳聚糖支架、交联后的羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉 / 抗菌肽支架) 和适量干燥的溴化钾粉末 (质量比约为 5%) 于玛瑙研钵中, 充分研磨使两者均匀混合; 接着, 取适量研磨好的样品粉末进行压片 (真空压力 2.66 kPa, 压片 5 min), 得到样品薄片; 然后设定扫描范围为 4 000-500  $\text{cm}^{-1}$ , 利用傅里叶红外仪进行测试。

**支架的微观形貌:** 将纳米微晶纤维素用去离子水稀释调整至合适浓度, 超声分散均匀。在测试前, 各取一滴分散液滴于透射电镜铜网上, 40 °C 下真空干燥, 随后在透射电镜下观察微观形貌。扫描电镜下观察 4 种支架的微观形貌。

**纳米微晶纤维素的粒径测试:** 将 1 mg 的纳米微晶纤维素放入 1 mL 去离子水中进行分散处理。待分散均匀后, 用粒径分析仪进行动态光散射粒径测试, 测定纳米微晶纤维素分散液 (1 g/L) 的粒径及其分布。

**支架吸水率测试:** 用天平称量 4 种支架的质量, 记为  $m_0$ , 将支架置于 PBS (10 mmol/L, pH=7.4) 中, 30 min 后快速用滤纸吸去表面的水分, 称样品质量, 记为  $m_w$ 。每个样品平行做 3 次实验, 求其平均值。样品吸水率按照如下公式计算: 吸水率 (%) =  $(m_w - m_0) / m_0 \times 100\%$ 。

**支架力学性能测试:** 按照医药行业标准 YY/T 0471.4-2004 进行拉伸实验。在温度为 25 °C、相对湿度为 70% 的条件下, 用通用试验机测定支架的抗拉强度和断裂伸长率。测试时设定负载能力为 500 N, 效率在  $\pm 1\%$  以内, 每个支架的矩形试样 (25 mm 宽  $\times$  1.5 mm 厚) 以 300 mm/min 的速度拉伸。

**支架的降解性能:** 对 4 种支架的降解行为进行检测。称支架初始质量, 记为  $m_0$ 。将支架浸泡于 PBS 或含 10 000 U/mL 溶菌酶的 PBS 中, 然后将其置于恒温摇床内 (37 °C, 70 r/min) 于 3, 7, 14, 21, 28 d 取出支架, 超纯水清洗、冻干及称质量 ( $m_t$ ), 计算支架降解率: 降解率 (%) =  $(m_0 - m_t) / m_0 \times 100\%$ 。

14 d 时, 扫描电镜下观察支架形貌。

**支架的热重实验:** 使用热重分析仪测定 4 种支架的热稳定性。先取适量冻干后的支架进行烘干, 尽可能的除去所含水

分。各称取支架 5 mg 放入坩埚中, 设置升温速率 10 °C /min, 温度范围 25-800 °C。

**支架药物释放实验:** 精确称取 0.010 g 的抗菌肽溶于水, 于 10 mL 的容量瓶中定容, 得 1 000 mg/L 的抗菌肽药液。用水依次稀释得质量浓度为 400, 200, 100, 50, 25 和 12.5 mg/L 的抗菌肽溶液, 在最大吸收波长 210 nm 处测定个溶液的吸光度值, 再以质量浓度对吸光度值进行线性回归, 作标准曲线方程。进一步将羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉 / 抗菌肽支架沉浸在 20 mL 的 PBS 中, 密封后置于 37 °C、100 r/min 的恒温摇床中, 模拟体外释放。在指定的时间点取出 1 mL 释放液, 同时补加 1 mL 同温度的新鲜 PBS, 采用紫外分光光度计分别测定释放液中抗菌肽含量, 计算药物累计释放量。每组设置 3 个平行样。

1.5 主要观察指标 羧甲基壳聚糖 / 骨粉 / 纳米微晶纤维素 / 抗菌肽颌骨修复支架的理化性能。

## 2 结果 Results

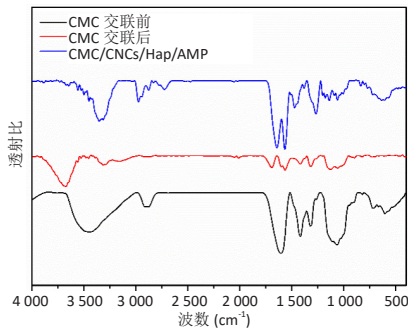
2.1 颌骨修复支架的红外光谱测定结果 未交联前, 羧甲基壳聚糖由于氨基之间的氢键作用而相互缔合, N-H 的伸缩振动吸收峰出现在 3 500  $\text{cm}^{-1}$  左右; 经 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 / N-N-羟基琥珀酰亚胺处理后, 羧甲基壳聚糖上的羧基与部分氨基发生酰胺化反应, 使得氨基之间的氢键作用减弱, N-H 的伸缩振动吸收峰向高波数方向偏移, 出现在 3 600  $\text{cm}^{-1}$  左右。在添加抗菌肽后, 由于抗菌肽多肽含有氨基, 可与羧甲基壳聚糖发生酰胺化反应, 从而接枝于支架上, 1 500  $\text{cm}^{-1}$  及 1 750  $\text{cm}^{-1}$  处出现的吸收峰分别归属于抗菌肽结构中酰胺键上 C=O 及 C-N 键的伸缩振动吸收峰, 见图 1。

2.2 各组支架的外观及微观形貌 4 种支架的外观及微观形貌见图 2, 支架材料均呈均匀多孔网状结构, 孔连通性比较好。4 种支架的平均孔径对比结果, 见图 3, 其中羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉 / 抗菌肽支架的平均孔径为 114.9  $\mu\text{m}$ 。

2.3 微晶纤维素的粒径测试结果 微晶纤维素经过硫酸酸解处理可去除纤维素中的无定形区和不完美的结晶区, 从而得到短棒状结构纳米微晶纤维素。粒度仪测得纳米微晶纤维素的平均粒径为 (403.6 $\pm$ 74.7) nm, 分散性指数为 0.345, 见图 4。

2.4 各组支架吸水率测试结果 4 种支架的吸水率测试结果见图 5A。羧甲基壳聚糖、羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素、羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉、羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉 / 抗菌肽支架的吸水率的分别为 (728.6 $\pm$ 24.7)%、(656.2 $\pm$ 19.3)%、(604.9 $\pm$ 23.5)%、(698.8 $\pm$ 53.8)%。

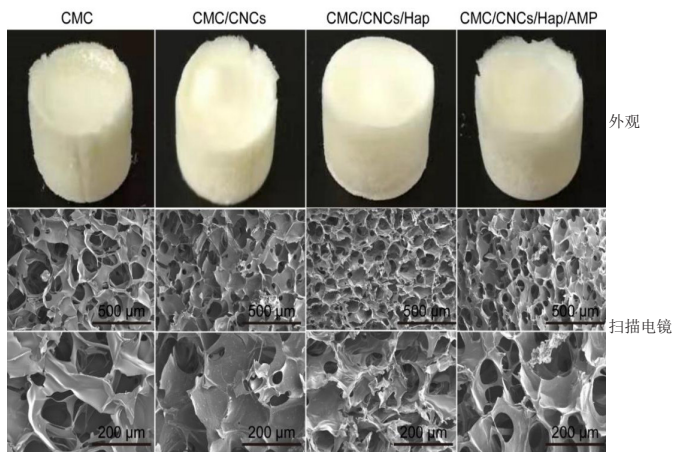
2.5 各组支架力学性能测试结果 4 种支架的拉伸强度、断裂伸长率和压缩强度 - 应变曲线, 见图 5B-D。4 种支架的抗拉强度范围为 0.7-0.9 MPa, 断裂伸长率都在 8%-10% 之间, 相互之间的差异较小。羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉和羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉 / 抗菌肽支架的抗拉强度相比另外两种支架有一定的升高。压缩强度 - 应变



图注：CMC 为羧甲基壳聚糖，CMC/CNCs/Hap/AMP 为羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉 / 抗菌肽

图 1 | 交联前后的羧甲基壳聚糖及羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉 / 抗菌肽支架的红外光谱图

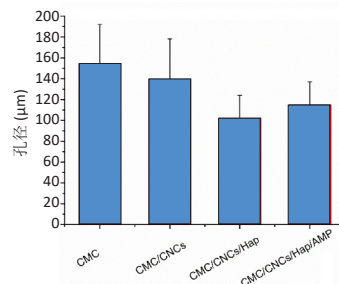
Figure 1 | Infrared spectra of carboxymethyl chitosan and antimicrobial peptide-loaded carboxymethyl chitosan/bone powder/cellulose nanocrystals scaffold before and after crosslinking



图注：CMC 为羧甲基壳聚糖，CNCs 为纳米微晶纤维素，Hap 为骨粉，AMP 为抗菌肽。4 组支架材料均呈均匀多孔网状结构，孔连通性较好

图 2 | 各组支架的外观及微观形貌

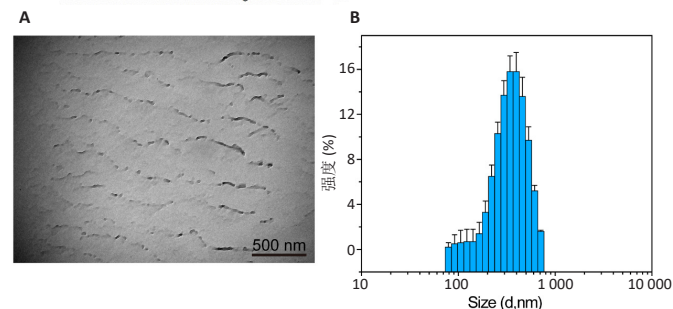
Figure 2 | Appearance and micromorphology of scaffolds of each group



图注：CMC 为羧甲基壳聚糖，CNCs 为纳米微晶纤维素，Hap 为骨粉，AMP 为抗菌肽

图 3 | 各组支架的孔径对比

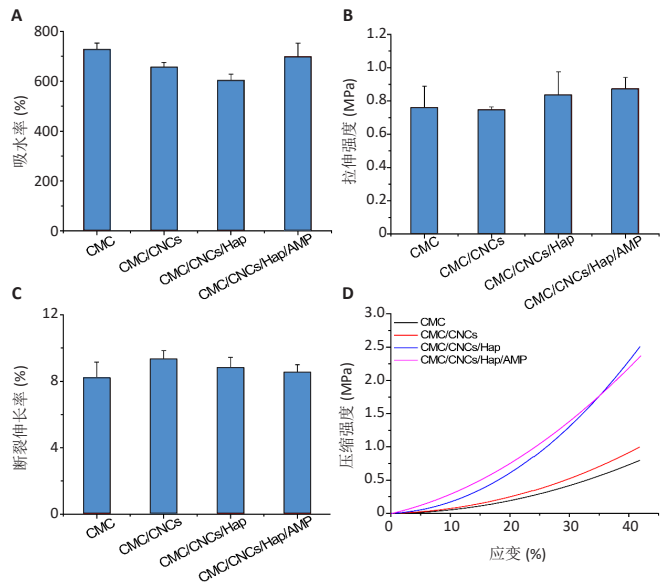
Figure 3 | Comparison of the pore size of scaffolds of each group



图注：A 为纳米微晶纤维素的微观形貌，呈短棒状结构；B 为纳米微晶纤维素的粒径分布，平均粒径为 (403.6±74.7) nm

图 4 | 纳米微晶纤维素的微观形貌与粒径分布

Figure 4 | Micromorphology and particle size distribution of cellulose nanocrystals



图注：CMC 为羧甲基壳聚糖，CNCs 为纳米微晶纤维素，Hap 为骨粉，AMP 为抗菌肽。A 为吸水率，B 为拉伸强度，C 为断裂伸长率，D 为压缩强度 - 应变曲线

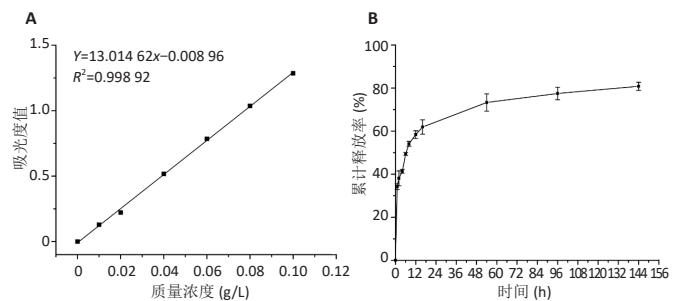
图 5 | 各组支架的吸水率与机械性能

Figure 5 | Water absorption rate and mechanical properties of the scaffold of each group

曲线显示，4 种支架都有良好的柔韧性，随着应力的增大，都产生了较大的形变。

### 2.6 羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉 / 抗菌肽支架药物释放实验结果

图 6A 为抗菌肽的标准曲线，利用测定药物累计释放浓度的方法，在 PBS 中测定了创伤敷料的抗生素释放曲线，结果见图 6B。羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉 / 抗菌肽支架在最初的 12 h 内释放出 (58.4±1.79)% 的抗菌肽，在 12 h 后药物释放率下降，近 20% 的抗菌肽在 6 d 后仍未释放。

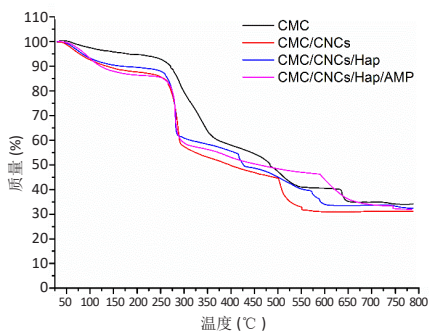


图注：A 为抗菌肽的标准曲线；B 为支架的药物释放，在最初的 12 h 内释放出 (58.4±1.79)% 的抗菌肽，在 12 h 后药物释放率下降，近 20% 的抗菌肽在 6 d 后仍未释放

图 6 | 羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉 / 抗菌肽支架的药物释放

Figure 6 | Drug release from carboxymethyl chitosan/cellulose nanocrystal/bone powder/antibacterial peptide scaffolds

2.7 各组支架热重实验结果 图 7 给出了各组支架的热重曲线结果，4 组支架热重曲线相差不大。200 °C 以下，4 组支架材料只是轻微失重；在 200-400 °C 之间，4 组支架材料明显失重；在 600 °C 以上时，4 组支架材料失重严重。

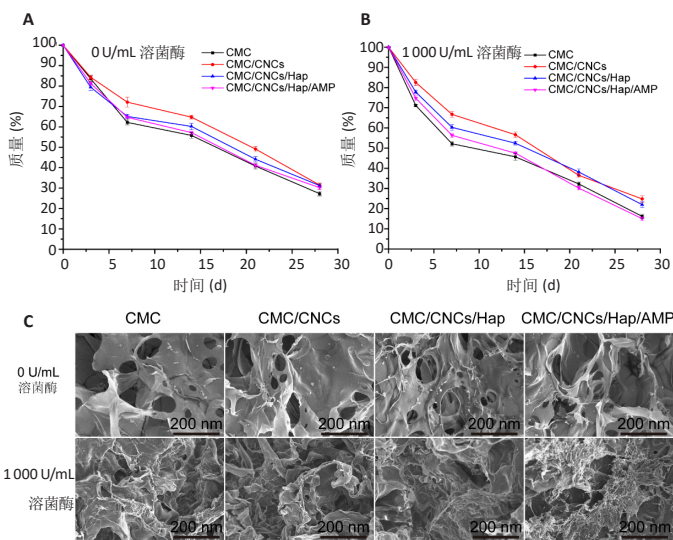


图注: CMC 为羧甲基壳聚糖, CNCs 为纳米微晶纤维素, Hap 为骨粉, AMP 为抗菌肽。4 组支架热重曲线相差不大, 200 °C 以下, 支架材料只是轻微失重; 在 200-400 °C 之间, 支架材料明显失重; 在 600 °C 以上时, 支架材料失重严重

图 7 | 各组支架的热重曲线

Figure 7 | Thermogravimetric curves of the scaffold of each group

2.8 各组支架降解性能实验 无酶条件下的各组支架降解曲线, 见图 8A, 溶菌酶浓度为 1 000 U/mL 下的各组支架降解曲线, 见图 8B, 溶菌酶的添加使得支架的降解速度稍微加快, 在 28 d 时, 羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉 / 抗菌肽支架在无酶添加的条件下降解了 70% 左右, 而在有酶的条件下其降解率增加到 85% 左右。图 8C 给出了有溶菌酶和无溶菌酶条件下各组支架降解 14 d 后的扫描电镜图片, 相较于无酶条件, 有酶条件下支架材料表面的裂缝和碎片更多, 说明材料在有酶条件下降解更快。综合以上结果, 羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉 / 抗菌肽支架材料具有良好的降解性能。



图注: CMC 为羧甲基壳聚糖, CNCs 为纳米微晶纤维素, Hap 为骨粉, AMP 为抗菌肽。A 为支架在无酶条件下的降解曲线, B 为支架在溶菌酶浓度为 1 000 U/mL 下的降解曲线, C 为支架在有酶与无酶条件下降解 14 d 后的扫描电镜图, 溶菌酶的添加使得支架的降解速度稍微加快

图 8 | 各组支架的体外降解

Figure 8 | *In vitro* degradation of the scaffold of each group

### 3 讨论 Discussion

骨支架是连接骨种子细胞和骨再生组织的桥梁<sup>[27]</sup>。理想的骨支架应该具有良好的机械性能、热稳定性、生物相容性、生物降解性、骨传导性和骨诱导性, 此外, 还需有合适

的孔隙和三维结构, 利于细胞的黏附生长和新生组织沿着支架结构生长<sup>[28]</sup>。单一的支架材料要想达到上述理想骨组织工程支架材料标准是比较困难的, 多种生物材料有机互补结合可能是合理的解决之道。主要成分为羟基磷灰石的人工骨粉, 具有良好的生物相容性、骨传导性和骨诱导性, 但存在脆性大、抗压强度低的问题。通过加入其他生物材料可克服该类问题, 有效改善合成纳米羟基磷灰石的机械性能。羧甲基壳聚糖还具有抗氧化、抗肿瘤、促进软骨细胞生长、诱导骨形成等诸多作用, 并且其水溶性、抗菌性、成膜性和吸附性较好, 但是壳聚糖机械强度较低、生物活性不高。无毒、可降解、生物和细胞相容性良好的纳米微晶纤维素, 可被用作脱钙骨基质的载体, 这种材料作为增强剂与其他生物材料一起耦合能提高整体强度和硬度。通过前期分析, 作者发现 3 种材料相互之间具有很好的互补性。如果能将 3 种材料的优点融合, 形成一种较为理想的骨组织工程支架材料有很大可能性。为此, 此次实验利用羧甲基壳聚糖、骨粉、纳米微晶纤维素这 3 种材料的优点及互补特性, 加入抗菌能力较强的抗菌肽, 构建出骨修复复合生物支架, 并对其进行了一系列理化性能测试, 良好的理化性能可以为复合材料的生物学性能打下良好的基础。

支架的孔径是支架性能及生物性能等判断的重要指标。有研究表明, 骨组织的长入受到支架材料的孔径尺寸和孔连通性的限制<sup>[29]</sup>。当孔与孔之间相互连通顺畅, 细胞能够在其内部迁移生长, 有利于营养物质的输送。羧甲基壳聚糖的平均孔径为 154.8  $\mu\text{m}$  左右, 添加了纳米微晶纤维素及骨粉后, 支架孔径有所减小, 所得的羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素及羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉支架的平均孔径分别为 139.8  $\mu\text{m}$  及 102.5  $\mu\text{m}$ , 在添加抗菌肽后支架孔径有所增加, 最终羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉 / 抗菌肽支架的平均孔径为 114.9  $\mu\text{m}$ , 接近于骨支架具有最大成骨面积、骨桥厚度以及定量化成骨体积的孔径<sup>[30]</sup>。多孔层状结构主要是由于羧甲基壳聚糖中的羧基与氨基之间形成互穿网络结构, 这种片层结构可以更好地吸收伤口渗出液, 保持合适的水分环境。根据现有文献<sup>[29-30]</sup>, 此次实验制备的支架孔隙结构将利于成骨细胞的附着、增殖和分化。

吸水率是评价支架的一项重要指标<sup>[31]</sup>。支架的良好吸水性可以有效吸收骨损伤渗出液, 减少渗液对健康组织的浸润, 起到保护周围组织的作用。羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉 / 抗菌肽支架具有良好的吸水性, 吸水率为 (698.8 $\pm$ 53.8)%, 较高的吸水率有利于细胞的生长、黏附及增殖, 符合治疗骨损伤支架的吸水性标准<sup>[31-32]</sup>。值得注意的是, 羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉 / 抗菌肽支架的吸水率比羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素 / 骨粉和羧甲基壳聚糖 / 纳米微晶纤维素支架略高, 可能是因为抗菌肽中具有良好亲水性肽键的原因。

颌骨组织支架植入人体后, 往往会受到各种各样的力作用。良好的支架需要具有一定的抗压强度, 才能够满足长

时间载荷作用下不失效。因此,在颌骨组织支架研究的文献中,支架的抗压强度往往是重要的评价指标<sup>[33]</sup>。此次实验涉及多孔支架,在保证一定孔隙率和孔径的前提下,支架抗压强度的测试也是重要的一个环节。断裂伸长率与材料的柔韧性有关,4种支架在断口处的伸长率都在8%~10%之间,羧甲基壳聚糖/纳米微晶纤维素/骨粉/抗菌肽支架与其他3种支架都有良好的柔韧性。4种支架的抗拉强度范围为0.7~0.9 MPa,羧甲基壳聚糖/纳米微晶纤维素/骨粉和羧甲基壳聚糖/纳米微晶纤维素/骨粉/抗菌肽支架的抗拉强度有一定的升高,原因可能与纳米级骨粉的加入增大了接触表面积有关。由于粉末状填料的加入及弥散作用,产生一种与现代建筑“钢筋混凝土结构”相似的现象,在网状中空的支架内填充了粉末状填料,使支架的抗拉能力得到提升。从4种支架的压缩强度-应变曲线可以看出,随着应力的增大都产生了较大的形变,在应力增大的过程中,支架没有发生脆性破坏,而是随着应变增大呈现指数形式增大,这种应力-应变关系与自然的软骨组织相类似<sup>[34]</sup>。随着纳米微晶纤维素及骨粉的加入,支架的压缩强度有所增强,可能是因为加入的纳米微晶纤维素和无机物纳米骨粉弥散在支架的孔内壁及外表,使得复合支架孔径变小的同时也增加了复合支架的压缩应力及压缩模量。羧甲基壳聚糖/纳米微晶纤维素/骨粉/抗菌肽支架的抗压强度虽略低于人体松质骨抗压强度<sup>[35]</sup>,但可以满足改建成骨前颌骨非功能负重。

引起骨缺损处感染的因素包括血运缺乏、软组织丢失及骨缺损区、内固定物表面和人工骨替代物表面易介导细菌黏附和生物膜形成等<sup>[36]</sup>。感染性骨缺损通常采用全身或局部应用抗生素控制感染,然后植入骨移植物修复骨缺损,然而,这些治疗方案耗时较长,需要多次手术,且疗效较差。具有抗菌性能的新型人工骨支架材料是解决此问题的一个好办法<sup>[37]</sup>。实验以抗菌肽作为抗菌药物交联在聚合物基质的方法,制备了羧甲基壳聚糖/纳米微晶纤维素/骨粉/抗菌肽支架,药物释放结果显示,支架在最初的12 h内释放出(58.4±1.79)%的抗菌肽。早期的累计药物释放增加,主要是因为支架表面抗生素的释放以及敷料表面的物理结合抗生素的释放;在12 h后药物释放率下降,近20%的抗菌肽在6 d后仍未释放,抗菌肽的持续释放是由于抗菌肽与羧甲基壳聚糖之间酰胺键的缓慢断裂造成的,抗菌肽在12 h内释放度超过了50%,起到了达峰效果,12 h后仍持续持续释放,有利于药效持续稳定。应用人工骨组织工程方法治疗感染性骨缺损,有望解决传统抗感染治疗中存在的问题<sup>[38]</sup>。

为了解交联复合敷料的热稳定性,同时为了确认各成分引入的影响,将羧甲基壳聚糖、羧甲基壳聚糖/纳米微晶纤维素、羧甲基壳聚糖/纳米微晶纤维素/骨粉、羧甲基壳聚糖/纳米微晶纤维素/骨粉/抗菌肽支架进行了热重分析比较,结果显示支架材料200℃以下只是发生轻微失重。因此,羧甲基壳聚糖/纳米微晶纤维素/骨粉/抗菌肽支架能够在体内温度条件下维持其外观性能,而且保持其理化特性,不

至于在体温条件下分解、氧化及发生一些化学反应。

骨组织具有增殖、分化和再生功能,支架材料在逐渐降解的过程中,将被新生骨组织所替代。如果支架降解过程过慢,往往会影响和阻碍骨组织再生,具有负面的作用。因此,此次实验安排了骨支架材料的降解性能对比实验。实验中分别采用无酶及溶菌酶浓度为1 000 U/mL的条件对支架的降解速度进行研究,在有溶菌酶存在的条件下,支架孔隙的崩解速度要快于无酶条件下的崩解速度,表明溶菌酶的存在会加快支架的降解速度,进一步说明支架材料具有良好的降解性能。

综上所述,此次实验通过冷冻干燥法制备出综合性能较好的载抗菌肽羧甲基壳聚糖/骨粉/纳米微晶纤维素颌骨修复支架,该复合支架具有多孔结构,微孔分布均匀,孔与孔之间的连通性好;支架还具有良好的吸水性,能有效吸收骨损伤渗出液,起到保护周围组织的作用;在原有的基础上加入纳米微晶纤维素和骨粉,使得复合支架的孔径变小的同时,增加了该复合支架的压缩应力及压缩模量,也增加了热稳定性和具有良好的降解性能。抗菌肽的加入有助于该复合支架在一段时间内抗菌能力的提升,扩大该支架应用的适应征,满足不同情况下的临床需要。在之后的研究中,将利用动物实验进一步研究该支架的抗菌性能、生物相容性、热稳定性和降解速率等性能。

致谢:感谢广州市海珠区口腔医院对实验提供的支持。

作者贡献:第一作者设计并构思实验,并与第二作者共同分析文献资料,通讯作者审核,第一作者对文章负责。

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。

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。

版权转让:文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: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。

## 4 参考文献 References

- [1] PACELLI S, BASU S, WHITLOW J, et al. Strategies to develop endogenous stem cell-recruiting bioactive materials for tissue repair and regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;120:50-70.
- [2] YU X, TANG X, GOHIL SV, et al. Biomaterials for bone regenerative engineering. *Adv Healthc Mater.* 2015;4(9):1268-1285.
- [3] KHOURY F, HANSER T. Mandibular Bone Block Harvesting from the Retromolar Region: A 10-Year Prospective Clinical Study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015;30(3):688-697.
- [4] SAKKAS A, WILDE F, HEUFELDER M, et al. Autonomic bone grafts in oral implantology-is it still a “gold standard”? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent.* 2017; 3(1):1-17.

- [5] YUNOS DM, BRETCANU O, BOCCACCINI AR. Polymer bioceramic composites for tissue engineering scaffolds. *J Mater Sci.* 2008;43(13):4433-4442.
- [6] FU Q, SAIZ E, TOMSIA AP. Bioinspired strong and highly porous glass scaffolds. *Adv Funct Mater.* 2011;21(6):1058-1063.
- [7] 高文伟, 孙丽莹, 张泽天, 等. 生物质基含硅骨修复复合支架材料的制备、特性及评价 [J]. *化工进展*, 2019,38(10):4595-4605.
- [8] BORDEA IR, CANDREA S, ALEXESCU GT, et al. Nano-hydroxyapatite use in dentistry: a systematic review. *Drug Metab Rev.* 2020;52(2):319-332.
- [9] HABRAKEN W, HABIBOVIC P, EPPL M, et al. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? *Mater Today.* 2016;19(2):69-87.
- [10] 仇旭童, 饶晨煜, 李婷, 等. 骨组织工程中纳米羟基磷灰石的仿生合成研究进展 [J]. *四川大学学报*, 2021,52(3):1-7.
- [11] YOSHIKAWA H, TAMAI N, MURASE T, et al. Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *J R Soc Interface.* 2009;6(3):341-348.
- [12] EPPL M. Review of potential health risks associated with nanoscopic calcium phosphate. *Acta Biomater.* 2018;77:1-14.
- [13] MUZZARELLI RA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydr Polym.* 2009;76(2):167-182.
- [14] WANG G, LU G, QIANG A, et al. Preparation of cross-linked carboxymethyl chitosan for repairing sciatic nerve injury in rats. *Biotechnol Lett.* 2010;32(1):59-66.
- [15] SLAVCHOV RI, NOVEV JK. Surface tension of concentrated electrolyte solutions. *J Colloid Interf Sci.* 2012;387(1):234-243.
- [16] LIU X, MILLER AL, PARK S, et al. Functionalized carbon nanotube and graphene oxide embedded electrically conductive hydrogels synergistically stimulates nerve cell differentiation. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017;9(17):14677-14690.
- [17] GUO J, LIU J, QIE H, et al. Efficient synthesis strategy of folate-modified carboxymethyl chitosan (FCMC)/CaCO<sub>3</sub> hybrid nanospheres and their drug-carrying and sustained release properties. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2021;32(6):799-812.
- [18] 韩冬琳, 亓洪昭, 赵瑾, 等. 增强纳米药物载体肿瘤内渗透分布的研究进展 [J]. *化学进展*, 2016,28(9):1397-1405.
- [19] LIN CC, LIN CW. Preparation of N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles as an insulin carrier. *Drug Deliv.* 2009;16(8):458-464.
- [20] DE TULLIO I, CAPUTI S, PERFETTI G, et al. A human clinical and histomorphometrical study on different resorbable and non-resorbable bone substitutes used in post-extractive sites. *Materials (Basel).* 2019;12(15):2408.
- [21] LI Z, DU T, RUAN C, et al. Bioinspired mineralized collagen scaffolds for bone tissue engineering. *Bioact Mater.* 2021;6(5):1491-1511.
- [22] 孙溪饶, 包佳昕, 王程越. 壳聚糖/矿化胶原多孔支架构建及体外成骨分化与生物相容性 [J]. *中国组织工程研究*, 2022,26(34):5498-5503.
- [23] NIZAN N, ZULKIFLI FH. Reinforcement of hydroxyethyl cellulose/poly(vinyl alcohol) with cellulose nanocrystal as a bone tissue engineering scaffold. *J Polym Res.* 2020;27(6):1-9.
- [24] SULAIMAN S, MOKHTAR MN, NAIM MN, et al. Penghasilan nanogentian selulosa (CNF) diperoleh dari gantian kulit kenaf dan potensinya sebagai penyokong pemegungan enzim. *Malay J Anal Sci.* 2016;20:309-317.
- [25] DAVOUDPOUR Y, HOSSAIN MS, ABDUL KHALIL HPS, et al. Optimization of high pressure homogenization parameters for the isolation of cellulosic nanofibers using response surface methodology. *Ind Crop Prod.* 2015;74:381-387.
- [26] KAZEMZADEH-NARBAT M, WANG Q, HANCOCK R, et al. Antimicrobial Peptide Delivery from Trabecular Bone Grafts. *J Biomater Tissue Eng.* 2014;4(11):967-972.
- [27] ZHANG C, WANG J, FENG H, et al. Replacement of segmental bone defects using porous bioceramic cylinders: A biomechanical and X-ray diffraction study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015;54(3):407-411.
- [28] PETER M, GANESH N, SELVAMURUGAN N, et al. Preparation and characterization of chitosan gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydr Polym.* 2010;80(3):687-694.
- [29] KARAGEORGIU V, KAPLAN D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005;26(27):5474-5491.
- [30] 李博, 王硕, 赵勇刚, 等. 仿生矿化胶原骨材料用于儿童颅骨再生修复的最新研究进展 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2021,35(3):278-285.
- [31] 樊鹏, 江雨棋, 张涛, 等. 壳聚糖管状组织工程复合支架制备及性能研究 [J]. *合成材料老化与应用*, 2018,47(6):31-35.
- [32] 毕博, 臧圣奇, 何懋典, 等. 还原氧化石墨烯修饰壳聚糖骨组织工程支架的制备及表征 [J]. *医学研究生学报*, 2021,34(4):350-356.
- [33] MANGANO C, MANGANO F, GOBBI L, et al. Comparative study between laser light stereolithography 3D printed and traditionally sintered biphasic calcium phosphate scaffolds by an integrated morphological, morphometric and mechanical analysis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):3118-3134.
- [34] 尹攀, 阎景龙. 自体微小颗粒骨复合红骨髓修复节段性骨缺损的实验研究 [J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2002,36(6):448-450+502.
- [35] HASIREI V, LEWANDROWSKI K, GRESSER JD, et al. Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo application. *J Biotechnol.* 2001;86(2):135-150.
- [36] JOHNSON CT, GARCIA AJ. Scaffold-based anti-infection strategies in bone repair. *Ann Biomed Eng.* 2015;43(3):515-528.
- [37] LU H, LIU Y, GUO J, et al. Biomaterials with antibacterial and osteoinductive properties to repair infected bone defects. *Int J Mol Sci.* 2016;17(3):334.
- [38] 伍家毅, 李巍明, 李夏林, 等. 抗菌人工骨支架材料研究进展 [J]. *国际骨科学杂志*, 2021,42(3):162-165.

(责任编辑: GW, ZN, ZJP)