

钛酸钡 / 聚乳酸复合压电薄膜材料对 MC3T3-E1 细胞黏附、增殖和成骨分化能力的影响

代香林, 张文凤, 姚喜军, 商佳琪, 黄秋瑾, 任怡帆, 邓久鹏

<https://doi.org/10.12307/2023.002>

投稿日期: 2021-11-23

采用日期: 2022-01-06

修回日期: 2022-01-24

在线日期: 2022-02-16

中图分类号:

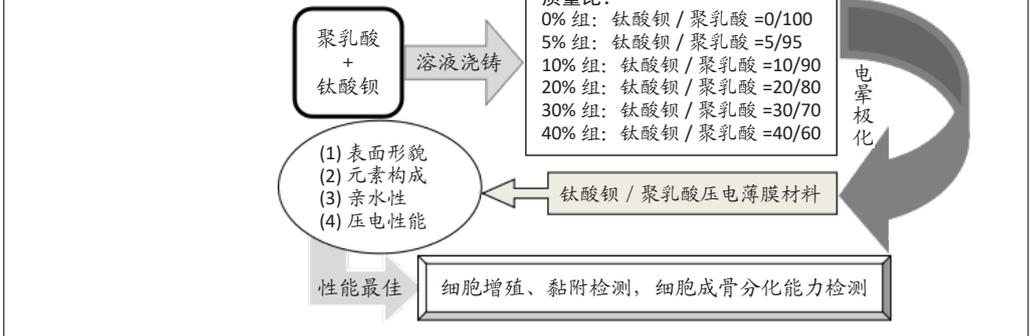
R459.9; R318; R314

文章编号:

2095-4344(2023)03-00367-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 促进骨组织再生的压电薄膜材料



文题释义:

压电效应: 某些电介质在沿一定方向上受到外力的作用而变形时, 其内部会产生极化现象, 同时在其2个相对表面上出现正负相反电荷; 当外力去除时, 又会恢复到不带电的状态, 这种现象称为正压电效应。相反, 当在电介质的极化方向上施加电场, 这些电介质也会发生变形, 电场去掉后, 电介质的变形随之消失, 这种现象称为逆压电效应。具有压电效应的材料包括: 压电陶瓷、压电聚合物和复合压电材料等。

MC3T3-E1细胞: 全称为小鼠胚胎成骨细胞前体细胞, 具有无限增殖的能力, 在外界培养条件改变时可发生不同程度的分化。其取自小鼠颅顶骨, 可贴壁生长, 被广泛应用于骨组织工程研究领域, 是观察细胞成骨分化能力的一种优良细胞系。

摘要

背景: 有文献指出电刺激可以促进骨再生, 具有生物电活性的压电材料可以应用于骨组织工程中。

目的: 研制一种能促进骨组织再生的压电薄膜材料, 表征其对MC3T3-E1细胞黏附、增殖和成骨分化能力的影响。

方法: 以聚乳酸为原料, 加入一定质量比例(0%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%)的压电陶瓷钛酸钡, 选择二氯甲烷为溶剂, 通过溶液浇铸法制备钛酸钡/聚乳酸复合薄膜材料, 电晕极化处理前后, 表征其表面形貌、晶相构成、亲水性、压电性能, 筛选出理化性能较优的材料。将极化处理前后的0%, 20%钛酸钡/聚乳酸复合薄膜材料分别与MC3T3-E1细胞共培养, 检测细胞的增殖、黏附与成骨分化能力。

结果与结论: ①扫描电镜、X射线衍射、水接触角实验及压电常数检测结果显示, 当加入20%的压电陶瓷钛酸钡时, 极化处理的复合薄膜材料具有良好的理化性能, 极化后压电常数 d_{33} 达到 (7.03 ± 0.26) pC/N, 处于骨组织正常压电范围; ②CCK-8实验结果显示, 培养第4天时, 极化20%组细胞增殖活性高于未极化20%组($P < 0.05$); 培养第7天时, 极化20%组细胞增殖活性高于空白对照组、未极化0%组和未极化20%组($P < 0.05$); ③荧光显微镜与扫描电镜下可见, 极化20%组细胞呈多边形且伪足明显, 较未极化20%组、极化0%组和未极化0%组体现出更好的细胞黏附能力; ④碱性磷酸酶活性检测结果显示, 培养第4天时, 极化20%组的碱性磷酸酶活性高于未极化0%组、未极化20%组($P < 0.05$); 培养第7天时, 极化20%组的碱性磷酸酶活性高于未极化0%组、未极化20%组、极化0%组($P < 0.05$); ⑤结果表明, 钛酸钡/聚乳酸复合压电薄膜材料具有较好的压电性能和细胞相容性。

关键词: 引导性骨组织再生; 压电材料; 钛酸钡; 聚乳酸; 溶液浇铸; 复合薄膜材料; 电晕极化; 压电性能; 成骨分化

Barium titanate/poly(lactide) piezoelectric composite film affects adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells

Dai Xianglin, Zhang Wenfeng, Yao Xijun, Shang Jiaqi, Huang Qiujin, Ren Yifan, Deng Jiupeng

School of Stomatology, North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, Hebei Province, China

Dai Xianglin, Master candidate, School of Stomatology, North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, Hebei Province, China

Corresponding author: Deng Jiupeng, Associate professor, School of Stomatology, North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, Hebei Province, China

Abstract

BACKGROUND: Electrical stimulation has been shown to promote bone regeneration and piezoelectric materials with bioelectrical activity can be used in bone tissue engineering.

OBJECTIVE: To prepare an ideal piezoelectric film material, which can promote bone regeneration and characterize its effects on the adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells.

华北理工大学口腔医学院, 河北省唐山市 063200

第一作者: 代香林, 女, 1996年生, 河北省青县人, 回族, 在读硕士, 主要从事骨组织工程研究。

通讯作者: 邓久鹏, 副教授, 华北理工大学口腔医学院, 河北省唐山市 063200

<https://orcid.org/0000-0002-1586-9169> (代香林)

基金资助: 大中学生科技创新能力培育专项(2021H020909), 项目负责人: 张文凤

引用本文: 代香林, 张文凤, 姚喜军, 商佳琪, 黄秋瑾, 任怡帆, 邓久鹏. 钛酸钡/聚乳酸复合压电薄膜材料对MC3T3-E1细胞黏附、增殖和成骨分化能力的影响[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(3):367-373.



METHODS: Barium titanate/poly(lactic acid) composite film was prepared by solution casting with poly(lactic acid) as raw material and a certain proportion (0%, 5%, 10%, 20%, 30%, and 40%) of piezoelectric ceramic barium titanate was added and methylene chloride was selected as the organic solvent. After corona polarization treatment, the surface morphology, crystal phase composition, hydrophilic and piezoelectric properties of films were investigated to select materials with better physical and chemical properties. The 0% and 20% barium titanate/poly(lactic acid) composite film materials before and after polarization treatment were separately co-cultured with MC3T3-E1 cells to test the ability of cell adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The scanning electron microscope, X-ray diffraction, water contact angle experiment, and pressure point constant test results showed that when the mass ratio of barium titanate to composite film was 20%, the polarized composite film material had good physical and chemical properties. The piezoelectric constant d_{33} after polarization reached (7.03 ± 0.26) pC/N, which was in the normal piezoelectric range of bone tissue. (2) CCK-8 assay results showed that on the 4th day of culture, the proliferation activity of the cells in the polarized 20% group was higher than that in the unpolarized 20% group ($P < 0.05$). On the 7th day of culture, the proliferation activity of the cells in the polarized 20% group was higher than that of the blank control group, the unpolarized 0% group, and the unpolarized 20% group ($P < 0.05$). (3) The fluorescence microscope and scanning electron microscope exhibited that the cells in the polarized 20% group were polygonal and had obvious pseudopodia. Compared with the unpolarized 20% group, polarized 0% group and unpolarized 0% group showed better cell adhesion ability. (4) The alkaline phosphatase activity detection results showed that on the 4th day of culture, the alkaline phosphatase activity of the polarized 20% group was higher than that in the unpolarized 0% group and the unpolarized 20% group ($P < 0.05$). On the 7th day of culture, the alkaline phosphatase activity of the polarized 20% group was higher than that of the unpolarized 0% group, the unpolarized 20% group, and polarized 0% group ($P < 0.05$). (5) The barium titanate/poly(lactic acid) composite piezoelectric film material has good piezoelectric properties and cytocompatibility.

Key words: conductive bone tissue regeneration; piezoelectric material; barium titanate; poly(lactic acid); solution-casting; composite film material; corona polarization; piezoelectric properties; osteogenic differentiation

Funding: Special Project for the Cultivation of Scientific and Technological Innovation Ability of College and Middle School Students, No. 2021H020909 (to ZWF)

How to cite this article: DAI XL, ZHANG WF, YAO XJ, SHANG JQ, HUANG QJ, REN YF, DENG JP. Barium titanate/poly(lactic acid) piezoelectric composite film affects adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(3):367-373.

0 引言 Introduction

生理电位在人体骨再生过程中扮演着重要角色，以往的骨组织工程研究中仅强调了模拟骨的结构、形态、机械和化学性质等特性，却忽略了恢复生理电微环境这一要点，所以在骨组织工程生物材料的设计中强调模拟内源性电势，开发高效生物压电材料，予以细胞适当电刺激，从而促进骨再生这一概念是非常值得研究的^[1-3]。

生物压电材料具备良好的生物相容性及压电效应，可以模拟骨组织的生理电微环境，从而促进骨的再生和重建^[3-8]。钛酸钡 (BaTiO_3) 作为一种性能优良的压电陶瓷，在骨组织工程应用方面具有广阔的前景^[9]。现有证据表明，钛酸钡的压电特性对自然骨形成途径有积极影响，使其在负重组织工程应用中得到更广泛的应用^[10-11]。钛酸钡虽不可被人体吸收，但其可以在人体中长期存在且无害。EHTERAMI 等^[12] 制备了一种采用明胶和纳米羟基磷灰石包覆的多孔钛酸钡基支架，通过体外实验证明了该支架能够促进细胞的黏附与增殖，具有良好的生物相容性，可应用于组织工程的研究中。LIU 等^[13] 将压电陶瓷材料钛酸钡涂覆于多孔钛合金支架表面，发现其具有良好的力学性能和电微环境，并可促进间充质干细胞的增殖、迁移和成骨分化，同时促进血管生成。

有机压电材料又称压电聚合物，其中以聚偏氟乙烯及其共聚物^[13]、聚羟基丁酸酯及其共聚物^[14-15]、聚 L- 乳酸等聚合物在组织工程的研究最为广泛^[5]。聚 L- 乳酸是一种优良的可降解生物压电材料，其不需烧结即可产生压电效应^[4]。聚乳酸材料具有较好的力学强度、生物相容性，有研究证实极化后的聚乳酸材料具有一定的压电性和抗菌性^[16]。LI 等^[17] 制备了钛酸钡 / 左旋聚乳酸随机取向排列的电活性纤维支架，发现其与天然骨的介电常数匹配，可显著促进大鼠骨髓间充质干细胞的多边形扩张，促进早期成骨分化。通常，聚乳酸中 C=O 偶极子方向随机分布不具备压电性，在经过外加电场或机械拉伸等处理后可产生剪切压电性^[18]。

近年来有关压电复合材料的研究逐渐兴起。SAEIDIK 等^[19] 制备了一种高压电系数的多孔钛酸钡 / 纳米生物玻璃复合支架，其具有良好的抗压强度和生物相容性，并能在一定程度上促进细胞的黏附与增殖。这些结果表明，高度多孔钛酸钡支架在组织工程中应用于骨组织修复和再生方面具有很大的潜力。也有研究采用固相烧结法制备了钛酸钡 / 硅酸钙复合生物活性压电陶瓷，经压电性能测试、体外矿化能力检测和人体成纤维细胞共培养证实了其具有良好的压电性和生物活性，为骨修复材料提供了新的选择^[20]。上述材料虽具有一定的抗压强度，但因其弹性模量较高不能完全满足骨修复材料力学性能的需求，所以近年来有研究将钛酸钡纳米颗粒与一些具有良好柔韧性和可加工性的高分子聚合物复合，以达到制备兼有两者优良性能的压电复合材料这一目的^[1, 21-24]。一些高分子材料虽有良好的可塑性和可加工性，但不具备理想骨组织工程材料中可降解这一特性，所以骨组织引导膜类材料需要考虑二次手术取出这一问题，骨支架类要考虑其在体内长期的生物安全性问题。针对这些问题，PROKHOROV 等^[25] 将过氧化氢改性的钛酸钡粒子与壳聚糖复合制备了一种可降解压电复合膜材料，并研究了其电学特性和生物相容性，结果表明该复合膜具备良好的压电性能和生物相容性，可为后期引导性骨组织再生膜研究提供一定的理论基础。

在聚合物基质中使用纳米颗粒作为填料，开发出模拟骨组织特性的生物材料，正日益引起人们的兴趣^[26]。此次实验结合了聚乳酸与纳米钛酸钡在生物学性能、力学性能和电学性能中的优势，将具有优良力学性能和极化后具有一定压电效应的可降解材料聚乳酸作为基体，与生物相容性良好的无铅压电陶瓷钛酸钡采用简单的溶液浇铸法制备成复合薄膜，再经过可应用于大面积材料极化处理的电晕极化法进行极化，从而得到钛酸钡 / 聚乳酸复合压电薄膜材料，这一方案解决了聚偏氟乙烯类压电聚合物在体内应用时的不可降解这一问题，避免了二次手术取出给患者带来的痛苦，同时也

避免了临床常用的引导性骨组织胶原膜力学性能不佳这一问题,该薄膜材料制备方法及处理工艺简单可靠,有望成为一种新型的引导性骨组织再生膜材料。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 材料表面特性实验,体外细胞学实验,组间数据比较采用方差分析及 t 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 3-10 月在华北理工大学口腔医学院实验室完成。

1.3 材料 聚乳酸(4032D,美国),钛酸钡(BaTiO_3 , 100 nm, 南京宏德),钛酸钡、聚乳酸材料的理化性能,见表 1。

表 1 | 材料的理化性能介绍

Table 1 | Introduction of physical and chemical properties

项目	钛酸钡	项目	聚乳酸(4032D)
来源	南京宏德纳米材料有限公司	来源	美国 Nature Work
外观	白色固体粉末	外观	乳白色粉末
规格	纯度 > 99%, 100 nm 左右	规格	粒径 20-50 μm
理化特性	钙钛矿型结构铁电体;极化后具有压电效应;无铅无毒害	产品特性	生物相容性好;可降解高分子聚合物;具有优良的机械性能
应用范围	无铅压电陶瓷领域	应用范围	药物缓释载体;骨组织工程修复材料;极化后可作为驻极体材料

小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1(上海生命科学园细胞库,中国);二氯甲烷、无水乙醇(分析纯,天津永大);电子天平(AR224CN,中国);集热式磁力搅拌器(JK-MSH-Pro-5B,中国);电热真空干燥箱(DZG-6050SA,中国);超声波清洗机(JP-080ST,中国);电晕极化装置(实验室自制);X射线能谱仪(APD 2000,意大利);哈科接触角测量仪(HARKE-SPCA,中国);冷场发射扫描电子显微镜(S-4800型,日本日立);准静态 d33 测量仪(LC2730A,上海蓝巢);胎牛血清(Cegrogen,德国);DMEM 培养基(Gibco 公司,美国);胰蛋白酶、地塞米松、抗坏血酸、 β -磷酸甘油钠、碘化丙啶(Sigma 公司,美国);2.5%戊二醛固定液(Labcoms 公司,中国);40 g/L 多聚甲醛(上海化学试剂厂,中国);0.5%Triton-X(上海索宝生物科技有限公司,中国);CCK-8 试剂盒(北京庄盟,中国);碱性磷酸酶定量试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、碱性磷酸酶染色试剂盒(碧云天公司,上海);酶标分析仪(HBS-1001,上海永创);光学倒置相差显微镜(YJ-23BZEISS,德国);体视显微镜(Stemi 508,德国)。

1.4 实验方法

1.4.1 复合薄膜材料的制备 根据薄膜材料钛酸钡与聚乳酸质量比不同分为 6 组($n=5$):0%组,钛酸钡/聚乳酸=0/100;5%组,钛酸钡/聚乳酸=5/95;10%组,钛酸钡/聚乳酸=10/90;20%组,钛酸钡/聚乳酸=20/80;30%组,钛酸钡/聚乳酸=30/70;40%组,钛酸钡/聚乳酸=40/60。

将 6 份质量为 3.5 g 的聚乳酸粉末溶于 6 份 30 mL 二氯甲烷中得到 6 组质量分数约为 8% 的聚乳酸溶液。将钛酸钡粉末按照如上比例(质量依次为 0, 0.184, 0.389, 0.875, 1.500, 2.333 g)均匀分散于上述聚乳酸溶液中,超声震荡 5 min 后,

置于磁力搅拌器上恒温搅拌 6 h。采用溶液浇铸法将混合溶液浇铸于干燥洁净的玻璃磨具上成膜,常温下自然干燥 24 h 得到钛酸钡/聚乳酸复合薄膜材料。无水乙醇中浸泡去除残留有机溶剂,去离子水洗涤 3 遍,放入真空干燥箱内 30 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 6 h,得到厚度为 80-100 μm 的均匀薄膜。使用实验室自制电晕极化装置对各组复合薄膜材料进行电晕极化处理。

1.4.2 复合薄膜材料的理化性能检测

薄膜表面形貌观察:将极化处理前的薄膜材料用打孔器剪裁成直径 10 mm 的圆片,采用扫描电镜观察薄膜材料的微观形貌。

X 射线衍射分析:将极化处理前后的薄膜材料用打孔器剪裁成直径 10 mm 的圆片,采用 X 射线衍射仪分析材料的晶相结构。

亲水性检测:将极化处理前后的材料固定于载玻片上,采用接触角测量仪分析材料的亲水性能。

压电性能检测:将极复合薄膜材料裁剪成 4 mm \times 4 mm 的正方形,每组随机选择 5 个样品,使用实验室自制电晕极化装置进行极化处理,用准静态 d33 测试仪直接测量极化后各组薄膜材料的压电常数,每个样品取 5 个点进行测量,取平均数。

1.4.3 复合薄膜材料的细胞相容性

细胞培养:使用含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 0.1 g/L 链霉素的 DMEM 培养基完全培养培养小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1,细胞培养 24 h 开始换液,每 2 d 换液一次。细胞在指数生长期占满培养瓶底面积的 80% 左右,按 1:2 的比例进行传代,三四天传一代,取第 4 代细胞进行实验。

细胞增殖实验:采用 CCK-8 法检测薄膜材料的细胞毒性。将极化处理 0%, 20% 与未极化处理 0%, 20% 的复合薄膜材料裁剪成直径为 6.5 mm 的圆形,紫外照射消毒后转移至 96 孔板中;每孔接种 2×10^3 的 MC3T3-E1 细胞,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中持续培养,2 d 换液一次。以单独培养的细胞为空白对照。共培养 1, 4, 7 d 后,每孔加入 10 μL CCK-8 液,避光孵育 2 h,将待测液移至新的 96 孔板中,酶标仪检测 450 nm 波长各组的吸光度值。

细胞黏附实验:将极化处理 0%, 20% 与未极化处理 0%, 20% 的复合薄膜材料裁剪成直径为 10 mm 的圆片,紫外照射消毒后转移至 48 孔培养板内,每孔接种 4×10^3 的 MC3T3-E1 细胞。常规培养 12 h 后取出材料,PBS 轻轻冲洗 3 次。① 荧光染色:多聚甲醛固定 1 h,以 PBS 清洗 3 次,每孔加入 200 μL 的 0.5%Triton-X,静置 20 min,以 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。每孔加入 200 μL 荧光 PI 染液,染色 5 min,使用免疫荧光显微镜观察每个试件上细胞的黏附和生长情况,并随机选取一个视野进行图像采集。② 扫描电镜观察:以 2.5% 戊二醛电镜专用固定液固定 3 h,PBS 清洗,梯度乙醇脱水,最后真空干燥 12 h。表面喷金固定,扫描电镜下观察细胞在材料表面的黏附和形态。

细胞成骨分化能力检测: 将极化处理 0%, 20% 与未极化处理 0%, 20% 的复合薄膜材料置于 48 孔板底部, 采用自制无菌塑料固定环固定, 每孔接种 4×10^3 的 MC3T3-E1 细胞。

24 h 待细胞黏附后弃旧培养基, 加入含 1.5% 成骨诱导液的培养基, 成骨诱导液由地塞米松、抗坏血酸、 β -磷酸甘油钠按比例配置, 每 2 d 换液一次。①碱性磷酸酶活性测定: 细胞接种后第 4, 7 天时吸弃培养液, PBS 清洗后加入双蒸水, 用超声细胞破碎仪破碎 30 s, -80°C 冰箱冻融过夜裂解细胞, 轻轻刮拭材料表面后, 用 1.5 mL EP 管收集裂解下细胞碎片, 12 000 r/min 低温离心 15 min, 收集上清液置于新的 EP 管中置于冰上操作。每孔取 50 μL 上清液置于 96 孔板, 按碱性磷酸酶检测试剂盒说明按照比例加入检测试剂, 避光孵育 30 min, 利用酶标仪于 405 nm 波长下检测各孔吸光度值。采用 BCA 试剂盒检测各组待测样品的蛋白浓度, 计算细胞碱性磷酸酶活性。②碱性磷酸酶染色: 为进一步验证实验结果, 采用碱性磷酸酶染色进行相同时间点的定性分析。采用体视显微镜观察染色情况, 随机选取视野进行图像采集。

1.5 主要观察指标 复合压电薄膜材料的细胞相容性。

1.6 统计学分析 实验所得的所有定量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, 采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析, 两组数据间比较采用 student's *t* 检验, 多组间数据的差异采用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, ANOVA), Levene's 检验方差齐性, 方差齐时采用 Bonferroni 法进行两组间差异比较, 方差不齐时采用 Dunnett's T3 方法进行两组间差异比较。检验标准设为 $\alpha=0.05$, $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。该文统计学方法已经华北理工大学统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 各组复合薄膜材料的微观形貌 见图 1。

根据图像可以直观地发现, 当钛酸钡含量在 0%~20% 时, 钛酸钡粒子在聚乳酸基体中分散程度均可; 当含量达 30% 时, 复合材料中钛酸钡出现明显团聚现象; 当含量为 40% 时, 团聚物进一步增多。这说明了随钛酸钡粒子的增多, 纳米级钛酸钡容易团聚, 使其不能被很好地分散在聚乳酸基体中, 从而在电镜下材料表面出现团聚亮点。有研究将纳米钛酸钡进行多种方式的表面改性处理, 再混入聚合物基体中, 已达到充分分散粒子减少团聚的目的^[27]。

2.2 各组复合薄膜材料的 X 射线衍射结果 见图 2。

由图 2 可知, 钛酸钡粒子在 $2\theta=31.4^\circ$ 呈现较强的晶相衍射峰 (图中 b 区域)。与 0% 组即纯聚乳酸薄膜材料相比, 其他含不同比例钛酸钡的各组复合膜显示出明显的钛酸钡特征峰值 (b、c 区域均为特征峰)。根据衍射峰特征显示, 极化前后各组材料分散在聚乳酸基体中的钛酸钡粒子结构没有发生变化, 表明钛酸钡粒子在复合材料制备中具有稳定性; 但极化后的复合薄膜中钛酸钡粒子的晶相显示出比未极化组中钛酸钡粒子更强的特征峰, 这可能是由于电晕极化提高了聚乳酸基体的结晶度和聚合物链段的规律性^[1]。同时, 纯

聚乳酸在 $2\theta=16.6^\circ$ 附近出现弥散的衍射峰 (图中 a 区域), 说明纯聚乳酸膜中的聚合物分子聚集成一个有序结构^[28]。当钛酸钡质量分数为 5% 和 10% 时, 复合材料中的衍射峰位置与纯聚乳酸膜相比无明显偏移。这一结果显示钛酸钡的加入并没有改变衍射峰的位置和数量, 说明以上两组钛酸钡含量对聚乳酸晶型结构基本没有影响。但当钛酸钡质量分数为 20%, 30% 和 40% 时, 复合膜中的 X 射线衍射特征峰与纯聚乳酸相比发生了一定改变, 说明钛酸钡粒子的加入破坏了聚乳酸有序排列的分子结构, 降低了其分子链的排列密度, 当材料受到冲击后, 分子链段活动空间增加, 冲击强度增加^[29]。

2.3 各组复合薄膜材料的水接触角检测结果 见图 3。

由图 3 可知, 钛酸钡含量和电晕极化处理对材料亲水性的影响不同。未极化复合薄膜材料的接触角比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 这表明该复合材料极化前的亲水性不随钛酸钡含量的变化而改变。极化后处理后, 极化 30%, 40% 组的接触角较其他极化组大 ($P < 0.05$), 同时极化 30%, 40% 组的水接触角均大于极化前 ($P < 0.05$), 亲水性较差。结果表明, 钛酸钡含量不同, 材料表面粗糙程度不同, 当钛酸钡含量为 30% 及以上时, 大体可观察到材料表面粗糙程度更明显, 且根据扫描电镜高倍数图像可观察到钛酸钡含量为 30% 及以上时团聚现象更明显, 结合 X 射线衍射结果分析, 高压电晕极化后材料表面分子链密度降低, 产生断裂并堆积在表面形成隆起, 形成纳米级孔隙, 这种纳米级粗糙也会影响材料的亲水性^[29]。

由 X 射线衍射结果可知, 5%, 10% 组聚乳酸基体特征衍射峰与纯聚乳酸相比较并未发生变化, 所以极化对于其表面分子链影响不大, 极化前后水接触角比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。20% 组的衍射峰虽发生改变, 其极化后表面水接触角本应增大, 但实际结果却无统计学差异 ($P > 0.05$), 这可能与该比例的钛酸钡 / 聚乳酸复合材料具有良好的分散性和最高的压电常数有关, 已有研究证实生物压电材料压电常数越大, 水接触角越小、亲水性越好^[30]。

用接触角测量仪测试各组材料的静态水接触角统计结果, 见表 2。

2.4 各组极化处理复合薄膜材料的压电常数结果 已知骨的压电常数为 4~11 pC/N^[25]。如表 2 所示, 在极化后 1 周测定各组材料压电常数, 可匹配骨骼压电常数范围的组别为 10%, 20%, 30% 和 40% 组, 其中 20% 组的压电常数最高, 平均值为 (7.03 ± 0.26) pC/N。在一定范围内, 随着钛酸钡含量的增加, 材料的压电常数升高、压电性能增强。但当钛酸钡含量超过 20% 时, 材料的压电常数在原有基础上不再进一步提高, 这可能是由于钛酸钡凝结成团导致膜性能降低, 从而极化效果减弱。但是该结果不能代表各组材料压电性能的衰减程度与时效性。

2.5 筛选较佳配比的复合薄膜材料 根据材料理化性能检测结果, 从材料表面特征和钛酸钡分散状况来看, 未极化 0%,

表 2 | 含不同质量分数钛酸钡复合薄膜材料极化后的压电常数 d33 和极化前后的水接触角 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 2 | Piezoelectric constant d33 after polarization of barium titanate/poly(lactic acid) composite films containing different mass fractions of barium titanate after polarization and water contact angle before and after polarization

组别	钛酸钡 / 聚乳酸质量比 (%)	压电常数 d33 (pC/N)	水接触角 (°)	
			极化前	极化后
0% 组	0/100	0.53±0.09	66.47±1.84	68.63±1.78
5% 组	5/95	1.67±0.05	66.10±3.00	70.47±0.61
10% 组	10/90	5.13±0.17	68.57±1.94	73.07±1.81
20% 组	20/80	7.03±0.26 ^a	70.13±2.30	72.57±1.11
30% 组	30/70	6.23±0.29	71.23±1.26	78.07±1.81 ^{bc}
40% 组	40/60	5.27±0.29	72.13±1.70	82.83±1.65 ^{bd}
F 值		59.281	2.879	27.26
P 值		< 0.001	0.0619	< 0.0001

表注: 与其他各组比较, ^a $P < 0.05$; 与极化 0%, 5%, 10% 组比较, ^b $P < 0.05$; 与未极化 30% 组比较, ^c $P < 0.05$; 与未极化 40% 组比较, ^d $P < 0.05$

5%, 10%, 20% 组有良好的表面特征, 表面钛酸钡分散较为均匀; 根据 X 射线衍射材料的晶相分析来看, 极化后的复合材料具有更强的衍射峰; 根据水接触角测试分析, 当钛酸钡含量在 30% 和 40% 时, 极化会使材料表面亲水能力降低; 根据静态压电常数测试得出极化 20% 组压电常数 d33 最高, 为 (7.03±0.26) pC/N。所以, 根据上述性能综合选择出极化 20% 组为实验组, 选择未极化 20% 组、极化 0% 组和未极化 0% 组为对照组进行后续细胞实验。

2.6 复合压电薄膜材料的细胞相容性

2.6.1 细胞增殖实验结果 见表 3。

表 3 | CCK-8 法检测各组 MC3T3-E1 细胞增殖情况 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$, 吸光度值)

组别	1 d	4 d	7 d
空白对照组	1.013±0.062	2.297±0.069	2.520±0.081
未极化 0% 组	0.901±0.016	2.178±0.030	2.490±0.016
极化 0% 组	1.003±0.073	2.297±0.077	2.595±0.041
未极化 20% 组	1.013±0.042	2.174±0.006	2.493±0.035
极化 20% 组	1.055±0.025	2.349±0.045 ^c	2.691±0.047 ^{abc}
F 值	2.392	4.545	6.129
P 值	0.120	< 0.05	< 0.05

表注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与未极化 0% 组比较, ^b $P < 0.05$; 与未极化 20% 组比较, ^c $P < 0.05$

在培养 1, 4, 7 d 时, 各组细胞增殖吸光度值均呈现增加趋势, 说明随着时间的延长细胞数量呈增长趋势; 培养第 1 天时, 各组细胞增殖吸光度值比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 培养第 4 天时, 各组细胞增殖吸光度值与空白对照组比较差异均无显著性意义 ($P > 0.05$), 极化 20% 组细胞增殖吸光度值高于未极化 20% 组 ($P < 0.05$); 培养第 7 天时, 极化 20% 组细胞增殖吸光度值高于空白对照组、未极化 0% 组和未极化 20% 组 ($P < 0.05$), 与极化 0% 组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。结果表明, 各组材料与空白对照组相比并不影响细胞增殖, 细胞增殖能力均良好。其中极化 20% 组促细胞增殖能力较空白对照组和未极化组好, 这是由于极化使压

电材料表面带有一定稳定排列的电荷, 而电荷产生的电刺激在一定程度上可以促进细胞的增殖^[31]。

2.6.2 细胞黏附观察结果

荧光染色: 共培养 12 h 后, 各组材料表面的细胞黏附状况, 见图 4。荧光染色结果显示, 未极化 0% 组、未极化 20% 组和极化 0% 组材料表面的细胞黏附数量无明显差异, 细胞呈三角形, 少数呈长梭形; 极化 20% 组材料表面的细胞黏附数量较多, 且细胞形态呈长梭形居多, 有明显的伪足。

扫描电镜观察: 图 5 为极化前后各组材料表面细胞黏附 12 h 后的扫描电镜图像, 由图可知, 未极化 0% 组细胞呈三角形, 伪足不明显; 未极化 20% 组细胞呈长梭形, 具有一两条伪足; 极化 0% 组细胞开始铺展, 体积增大, 且伪足数量增多; 极化 20% 组细胞呈多边形且伪足明显, 较未极化 20% 组、极化 0% 组和未极化 0% 组体现出更好的细胞黏附能力。

2.6.3 碱性磷酸酶活性检测与染色结果 见图 6, 7。

各组材料诱导 MC3T3-E1 细胞成骨分化 4, 7 d 后的碱性磷酸酶活性分析结果, 见表 4。各组 7 d 时的碱性磷酸酶活性较 4 d 时均有升高。培养第 4 天时, 极化 20% 组碱性磷酸酶活性明显高于其他 3 组 ($P < 0.05$)。培养第 7 天时, 极化 20% 组碱性磷酸酶活性增高更加显著, 明显高于其他 3 组 ($P < 0.05$), 且极化 0% 组碱性磷酸酶活性要高于未极化 0% 组, 表明极化后的材料对细胞成骨分化更为有利。

表 4 | 不同时间点各组材料诱导 MC3T3-E1 细胞的碱性磷酸酶活性比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

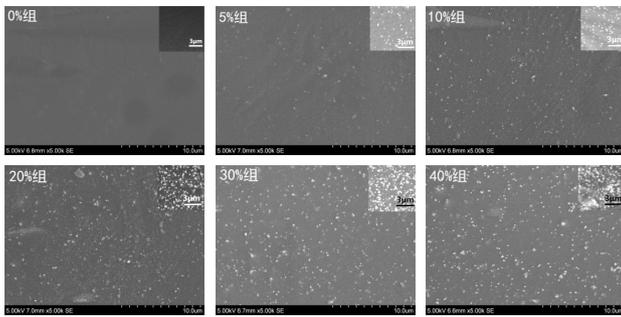
Table 4 | Comparison of alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells induced by materials at different time points

组别	碱性磷酸酶活性 (U/g)	
	4 d	7 d
未极化 0% 组	3.310±0.450	4.929±0.822
极化 0% 组	4.648±0.364	8.203±0.520 ^a
未极化 20% 组	3.451±0.588	6.191±0.174
极化 20% 组	6.918±1.090 ^{abc}	13.328±0.812 ^{abc}
F 值	11.92	66.93
P 值	< 0.05	< 0.001

表注: 与未极化 0% 组比较, ^a $P < 0.05$; 与极化 0% 组比较, ^b $P < 0.05$; 与未极化 20% 组比较, ^c $P < 0.05$

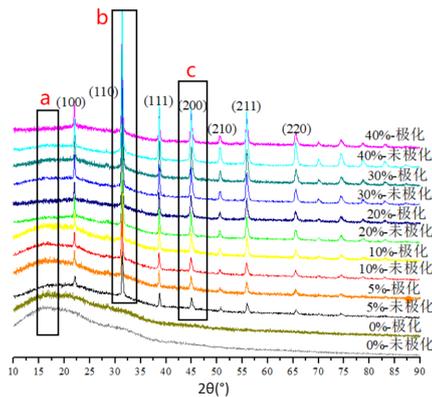
碱性磷酸酶染色结果显示, 培养第 4 天时, 未极化 0% 组、极化 0% 组和未极化 20% 组碱性磷酸酶染色情况无太大差异, 极化 20% 组碱性磷酸酶染色阳性细胞数量明显较其他 3 组多; 培养第 7 天时, 极化 20% 组碱性磷酸酶染色效果最好, 极化 0% 组次之, 未极化 0% 组和未极化 20% 组无明显差异; 同时, 根据染色结果能观察到极化后的两组细胞明显呈极性生长, 未极化两组细胞生长状态杂乱无规律。上述染色结果进一步验证了碱性磷酸酶活性检测的结果。

2.7 复合压电薄膜材料的细胞相容性 由细胞增殖实验、黏附检测与碱性磷酸酶活性检测结果可知, 钛酸钡 / 聚乳酸复合压电薄膜材料具有较好的细胞相容性。



图注：当钛酸钡含量在 0%~20% 时，钛酸钡粒子在聚乳酸基体中分散程度均可；当含量达 30% 时，复合材料中钛酸钡出现明显团聚现象；当含量为 40% 时，团聚物进一步增多。主图标尺 =10 μm

图 1 | 含不同质量分数钛酸钡复合薄膜材料极化处理前的微观形貌
Figure 1 | Micromorphology of composite films containing barium titanate with different mass fractions before polarization



图注：图中 a 区域为纯聚乳酸的衍射峰，b，c 区域为钛酸钡粒子的衍射峰。极化前后各组材料分散在聚乳酸基体中的钛酸钡粒子结构没有发生变化；极化后复合薄膜中钛酸钡粒子的晶相显示出比未极化组中钛酸钡粒子更强的特征峰

图 2 | 含不同质量分数钛酸钡复合薄膜材料极化处理前后的 X 射线衍射图

Figure 2 | X-ray diffraction pattern of composite films containing different mass fractions of barium titanate before and after polarization

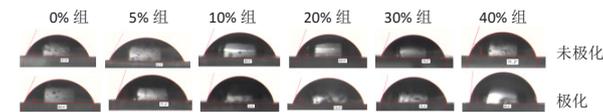
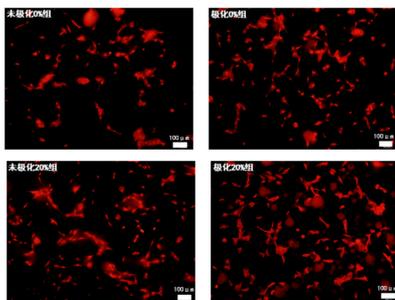


图 3 | 含不同质量分数钛酸钡复合薄膜材料极化处理前后的水接触角
Figure 3 | Water contact angle of composite films containing different mass fractions of barium titanate before and after polarization

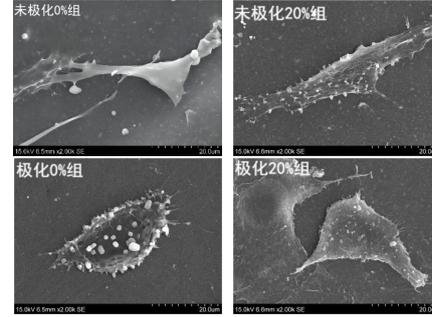


图注：未极化 0% 组、未极化 20% 组和极化 0% 组材料表面的细胞黏附数量无明显差异，细胞呈三角形，少数呈长梭形；极化 20% 组材料表面的细胞黏附数量较多，且细胞形态呈长梭形居多，有明显的伪足，标尺 =100 μm

图 4 | 各组薄膜材料初期细胞黏附的荧光染色结果
Figure 4 | Fluorescence staining results of initial adhesion of the four groups of film materials

3 讨论 Discussion

在引导性骨组织再生术中，屏障膜占据着主导地位，为了提高引导性骨组织再生的效果和成功率，有大量研究利用多种方法来制备多样的生物屏障膜进一步诱导成骨细胞的生长，提高骨质增生能力^[32]。聚乳酸复合屏障膜因其良好的生物学性能已被广泛研究^[33-35]。



图注：未极化 0% 组细胞呈三角形，伪足不明显；未极化 20% 组细胞呈长梭形，具有一两条伪足；极化 0% 组细胞开始铺展，体积增大，且伪足数量增多；极化 20% 组细胞呈多边形且伪足明显，较未极化 20% 组、极化 0% 组和未极化 0% 组体现出更好的细胞黏附能力

图 5 | 各组薄膜材料初期细胞黏附的扫描电镜观察结果 (×2 000)
Figure 5 | Scanning electron microscope results of initial adhesion of four groups of film materials (×2 000)

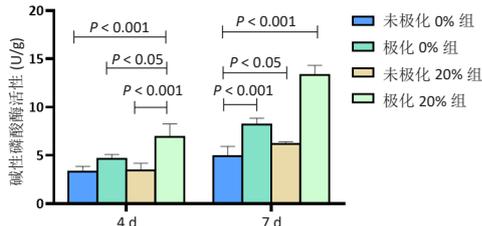
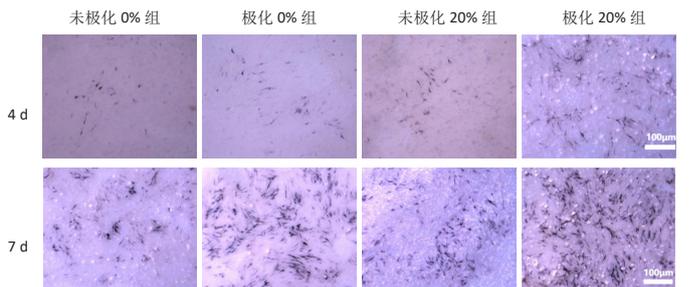


图 6 | 各组薄膜材料与 MC3T3-E1 细胞共培养 4, 7 d 的碱性磷酸酶活性
Figure 6 | Alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells co-cultured with materials in each group for 4 and 7 days



图注：培养第 4 天时，未极化 0% 组、极化 0% 组和未极化 20% 组碱性磷酸酶染色情况无太大差异，极化 20% 组碱性磷酸酶染色阳性细胞数量明显较其他 3 组多；培养第 7 天时，极化 20% 组碱性磷酸酶染色效果最好，极化 0% 组次之，未极化 0% 组和未极化 20% 组无明显差异
图 7 | 各组薄膜材料与 MC3T3-E1 细胞共培养 4, 7 d 时的碱性磷酸酶染色情况

Figure 7 | Alkaline phosphatase staining of each group of materials co-cultured with MC3T3-E1 cells for 4 and 7 days

骨是天然的压电材料，压电常数范围为 4~11 pC/N，压电在天然骨中的发现引起了人们对模拟生物电用于各种组织再生的广泛研究^[25, 36]。有关仿生电活性复合材料的研究也日益兴起，为其在骨组织再生领域的应用打下了基础^[1, 37-39]。

压电复合材料是通过物理或化学方法将不同类型电活性生物材料之间进行复合制备的一种材料，一般是在柔软的有机聚合物基底材料中嵌入各种形态的无机压电材料所构成，兼备两种材料的优良性能，可充分发挥电活性，具有模拟生物体生理电微环境的潜力^[4]。将聚乳酸和钛酸钡混合制备的膜材料植入人体后不需要二次手术取出，所以，将钛酸钡与聚乳酸基高分子材料复合来制备一种生物可降解压电复合膜应用于骨组织工程研究这一策略是非常必要的。

此次实验采用溶液浇铸法制备了钛酸钡 / 聚乳酸复合压电薄膜材料，通过扫描电镜可以观察到该复合薄膜制备成

功, X射线衍射分析证明了极化前后薄膜的纯相。水接触角测试结果显示,极化前复合材料的亲水性不随钛酸钡的含量而改变;极化处理后,30%和40%组水接触角较其他组接触角大,亲水性较差,这可能是由于极化后薄膜表面分子极性改变,分子链移动产生的纳米孔隙,造成材料亲水性下降。同时,材料表面粗糙程度不同,当钛酸钡含量为30%及以上时,材料表面粗糙程度更明显且钛酸钡在聚乳酸基体中出现明显的团聚,所以极化后其表面粗糙程度进一步增加,造成亲水性下降。压电常数测定结果证明了不同钛酸钡含量的复合材料极化后的压电性能有差异,具有统计学意义($P < 0.05$);10%,20%,30%,40%组具有良好的压电性能,能模拟人体骨组织的压电范围,其中20%组极化后压电常数最高,为 (7.03 ± 0.26) pC/N。综合上述材料理化特性,可选择出具有最佳性能的是极化20%组。细胞增殖实验说明各组材料均不影响细胞增殖,且极化20%组具有一定的促细胞增殖的能力。通过黏附实验观察细胞初期黏附数量与形态可发现,极化20%组细胞黏附数量较多,形态呈多边形,伪足明显。成骨分化测试结果显示,极化20%组具有更高的碱性磷酸酶活性,有利于细胞成骨分化。

此次实验采用溶液浇铸法成功制备出生物复合压电薄膜材料,其具有良好的细胞相容性和促细胞成骨分化能力,有望成为一种新型引导性骨组织再生屏障膜。此次实验数据可为后续动物实验、临床试验提供科学依据,实验的不足之处在于未进行动物体内成骨实验。

作者贡献: 代香林进行实验设计,实验实施为代香林、张文凤,实验评估为姚喜军,资料收集为商佳琪、黄秋瑾、任怡帆,代香林成文,邓久鹏审核。

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表宗旨。

4 参考文献 References

- ZHANG X, ZHANG C, LIN Y, et al. Nanocomposite Membranes Enhance Bone Regeneration Through Restoring Physiological Electric Microenvironment. *ACS Nano*. 2016;10(8):7279-7286.
- LEPPIK L, OLIVEIRA KMC, BHAVSAR MB, et al. Electrical stimulation in bone tissue engineering treatment. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2020;46(2):231-244.
- 朱子馨,周俊余,荀雪.可拉伸的钛酸钡压电膜上细胞黏附行为的研究[J]. *医用生物力学*,2021,36(S1):164.
- 熊莹,许燕,周建平,等.组织工程研究中的电活性生物材料[J]. *中国组织工程研究*,2019,23(34):5523-5530.
- ZHENG T, HUANG Y, ZHANG X, et al. Mimicking the electrophysiological microenvironment of bone tissue using electroactive materials to promote its regeneration. *J Mater Chem B*. 2020;8(45):10221-10256.
- KHARE D, BASU B, DUBEY AK. Electrical stimulation and piezoelectric biomaterials for bone tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2020;258:120280.
- TANDON B, BLAKER JJ, CARTMELL SH. Piezoelectric materials as stimulatory biomedical materials and scaffolds for bone repair. *Acta Biomater*. 2018;73:1-20.
- KAO FC, CHIU PY, TSAI TT, et al. The application of nanogenerators and piezoelectricity in osteogenesis. *Sci Technol Adv Mater*. 2019;20(1):1103-1117.

- TANG Y, WU C, WU Z, et al. Fabrication and in vitro biological properties of piezoelectric bioceramics for bone regeneration. *Sci Rep*. 2017;7:43360.
- 胡龙.HA/BaTiO₃压电仿生骨植入材料的制备及性能研究[D].西安:西安理工大学,2014.
- LIU W, LI X, JIAO Y, et al. Biological Effects of a Three-Dimensionally Printed Ti6Al4V Scaffold Coated with Piezoelectric BaTiO₃ Nanoparticles on Bone Formation. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(46):51885-51903.
- EHTERAMI A, KAZEMI M, NAZARI B, et al. Fabrication and characterization of highly porous barium titanate based scaffold coated by Gel/HA nanocomposite with high piezoelectric coefficient for bone tissue engineering applications. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018;79:195-202.
- LI Y, LIAO C, TJONG SC. Electrospun Poly(vinylidene Fluoride)-Based Fibrous Scaffolds with Piezoelectric Characteristics for Bone and Neural Tissue Engineering. *Nanomaterials (Basel)*. 2019;9(7):952.
- AMARO L, CORREIA DM, MARQUES-ALMEIDA T, et al. Tailored Biodegradable and Electroactive Poly(Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) Based Morphologies for Tissue Engineering Applications. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8):2149.
- AMARO L, CORREIA DM, MARTINS PM, et al. Morphology Dependence Degradation of Electro- and Magnetoactive Poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) for Tissue Engineering Applications. *Polymers (Basel)*. 2020;12(4):953.
- 郭莉莉.聚L-乳酸基柱体膜的制备及其性能研究[D].郑州:郑州大学,2013.
- LI Y, DAI X, BAI Y, et al. Electroactive BaTiO₃ nanoparticle-functionalized fibrous scaffolds enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:4007-4018.
- 段瑞侠,陈金周,刘文涛,等.聚乳酸基压电材料的研究和应用[J/OL]. *材料导报*:1-18[2021-11-17].http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1078.TB.20211115.1801.037.html.
- SAEIDI B, DERAKHSHANDEH MR, CHERMAHINI MD, et al. Novel Porous Barium Titanate/Nano-Bioactive Glass Composite with High Piezoelectric Coefficient for Bone Regeneration Applications. *J Mater Eng Perform*. 2020;29(8):1-8.
- 魏子钦,夏翔,李勤,等.钛酸钡/硅酸钙复合生物活性压电陶瓷的制备及性能研究[J/OL]. *无机材料学报*:1-8[2021-12-19].http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1363.TQ.20211118.1850.026.html.
- 朱子馨,周俊余,荀雪.可拉伸的钛酸钡压电膜上细胞黏附行为的研究[J]. *医用生物力学*,2021,36(S1):164.
- 刘国峰.自供电刺激骨支架的激光增材制造及其性能研究[D].赣州:江西理工大学,2021.
- LIU J, GU H, LIU Q, et al. An intelligent material for tissue reconstruction: The piezoelectric property of polycaprolactone/barium titanate composites. *Mater Lett*. 2019;236(FEB.1):686-689.
- MANCUSO E, SHAH L, JINDAL S, et al. Additively manufactured BaTiO₃ composite scaffolds: A novel strategy for load bearing bone tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;126:112192-112192.
- PROKHOROV E, BÄRCENAS GL, ESPAÑA SÁNCHEZ BL, et al. Chitosan-BaTiO₃ nanostructured piezopolymer for tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020;196:111296.
- BAGCHI A, MEKA SR, RAO BN, et al. Perovskite ceramic nanoparticles in polymer composites for augmenting bone tissue regeneration. *Nanotechnology*. 2014;25(48):485101.
- 傅志昂.辐射法制备有机-无机杂化纳米粒子及其在材料中的应用研究[D].北京:中国科学院大学(中国科学院上海应用物理研究所),2021.
- 尹兴,孙诚,付春英,等.纳米二氧化钛/聚乳酸抗菌薄膜的制备和性能[J]. *包装工程*,2017,38(15):36-40.
- 任煜,李猛,刘祥银.驻极体对聚乳酸熔喷材料性能的影响[J]. *纺织学报*,2015,36(9):13-17.
- 吴聪.钛表面生物压电涂层的构建及其骨修复促进机制研究[D].西安:西安理工大学,2021.
- 闫欢欢.贻贝仿生导电性苯胺聚生物材料的制备及在组织工程中的应用[D].北京:中国科学技术大学,2020.
- 曹钰彬,刘畅,潘韦霖,等.引导骨再生屏障膜改良的研究进展[J]. *华西口腔医学杂志*,2019(3):325-329.
- LI X, WEI L, LI J, et al. Multifunctional SDF-1-loaded hydroxyapatite/poly(lactic acid) membranes promote cell recruitment, immunomodulation, angiogenesis, and osteogenesis for biomimetic bone regeneration. *Appl Mater Today*. 2021;22:100942.
- 封小霞,侯玮玮,金晓婷,等.构建聚乳酸-羧基乙酸电纺丝-壳聚糖电喷微球牙周仿生膜[J]. *中国组织工程研究*,2020,24(4):511-516.
- 方炜.聚乳酸/生物玻璃引导骨再生膜制备及体外实验研究[D].广州:南方医科大学,2015.
- CHEN W, YU Z, PANG J, et al. Fabrication of Biocompatible Potassium Sodium Niobate Piezoelectric Ceramic as an Electroactive Implant. *Materials (Basel)*. 2017;10(4):345.
- 田春燕.电活性生物骨修复复合材料(BT-HA)/PVDF的制备和性能研究[D].北京:北京化工大学,2009.
- 朱培君,赖春花,程鸣威,等.电活性生物膜通过调控巨噬细胞极化促进骨再生修复的体外研究[J]. *实用医学杂志*,2021,37(10):1257-1262.
- 何逸恒,程鸣威,朱培君,等.电活性生物膜促进大鼠的体内成骨[J]. *中国组织工程研究*,2022,26(28):4662-4667.

(责任编辑:GW, ZN, ZJP)