

## 复合压电薄膜生物相容性及电输出性能与兔骨髓间充质干细胞的成骨分化

王 桢<sup>1, 2, 3</sup>, 许顺恩<sup>1, 2, 3</sup>, 汤 耿<sup>4</sup>, 罗四维<sup>2, 3</sup>, 滕建祥<sup>2, 3</sup>, 谢孟利<sup>2, 3</sup>, 何佳林<sup>2, 3</sup>, 叶 川<sup>1, 2, 3</sup><https://doi.org/10.12307/2024.139>

投稿日期: 2023-02-27

采用日期: 2023-04-14

修回日期: 2023-05-16

在线日期: 2023-05-31

中图分类号:

R459.9; R318; R314

文章编号:

2095-4344(2024)13-01969-07

文献标识码: A

## 文章快速阅读: 复合压电薄膜生物相容性及电输出对兔骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

材料准备:

聚 3-羟基丁酸酯 4-羟基丁酸酯 (P34HB)+ 锡钛酸钡钙 (BCST)

搅拌、超声混匀

真空、干燥

质量比:

0%组: BCST/P34HB=0/100

5%组: BCST/P34HB=5/95

10%组: BCST/P34HB=10/90

15%组: BCST/P34HB=15/85

20%组: BCST/P34HB=20/80

油  
溶  
极  
化

BCST/P34HB 压电薄膜

(1) 压电薄膜形态表征、水接触角、压电常数、电输出性能  
(2) 压电薄膜生物相容性、压电刺激细胞成骨分化检测。

## 文题释义:

锡钛酸钡钙: 是钛酸钡压电陶瓷的固溶体, 其压电常数高达460 pC/N, 具有良好的生物相容性。

3-羟基丁酸酯4-羟基丁酸酯(poly-3-hydroxybutyrateco/4-hydroxybutyrate, P34HB): 含有3-羟基丁酸酯与4-羟基丁酸酯的嵌段共聚物, 是一种由微生物发酵而成的天然高分子材料, 可应用于可吸收缝线合成、生物敷料、食品包装、污水处理等领域。

## 摘要

背景: 可控的压电效应能促进组织的再生与修复, 压电材料在负重组织工程领域应用广泛。

目的: 制备一种可促进骨组织再生的压电薄膜材料, 探究其结构表征、电输出性能、生物相容性及其电输出对兔骨髓间充质干细胞成骨分化的影响。

方法: 以聚3-羟基丁酸酯4-羟基丁酸酯(poly-3-hydroxybutyrateco/4-hydroxybutyrate, P34HB)为原料, 加入质量比分别为0%, 5%, 10%, 15%, 20%的锡钛酸钡钙( $Ba_{0.94}Ca_{0.06}Sn_{0.08}Ti_{0.92}O_3$ , BCST)粉末, 以二氯甲烷为溶剂, 通过真空干燥方法制得150–200  $\mu\text{m}$ 厚度BCST/P34HB压电薄膜材料, 经油浴极化后, 检测其表面形貌、物相组成、压电系数和开路电压, 以及BCST/P34HB在110 Hz、0.25 N力幅度下的电输出对兔骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化的影响。结果与结论: ①扫描电镜、X射线衍射、水接触角、压电系数检测及电输出性能测试显示, 当BCST质量比增加至20%时, BCST/P34HB压电薄膜有着良好的压电性能( $d_{33}=5.9$  pC/N)及电输出性能(180 mV), 更接近500 mV的合适电刺激成骨范围; ②活死染色显示, 与兔骨髓间充质干细胞共培养第1天, 15%组与20%组显示出较少的红色荧光; 当培养到第5天时, 各组绿色荧光数量较第1天明显增多, 10%组、15%组和20%组未见红色荧光, 仅0%组和5%组有少量的红色荧光; ③阿尔玛蓝染色显示, 与兔骨髓间充质干细胞共培养第1, 3, 5天, 随着时间的增加, 各组细胞都呈现出增长的趋势, 当培养到第5天时, 20%组的细胞量明显高于0%组( $P < 0.05$ ); ④成骨诱导第10天, 碱性磷酸酶染色结果显示20%组的染色阳性率明显高于0%组( $P=0.0001$ ); 成骨诱导第21天, 茜素红染色和钙结节定量分析显示出了与碱性磷酸酶染色相似的趋势, 与0%组相比, 15%组和20%组均显示出明显的差异( $P < 0.01$ ,  $P < 0.0001$ ); ⑤结果表明, 20%BCST/P34HB薄膜具有良好的压电性能、电输出性能、生物相容性及促骨髓间充质干细胞成骨分化能力。

关键词: 骨组织工程; P34HB; 压电材料; 薄膜材料; 成骨分化

## Biocompatibility and electrical output performance of composite piezoelectric film and osteogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells

Wang Zhen<sup>1, 2, 3</sup>, Xu Shun'en<sup>1, 2, 3</sup>, Tang Geng<sup>4</sup>, Luo Siwei<sup>2, 3</sup>, Teng Jianxiang<sup>2, 3</sup>, Xie Mengli<sup>2, 3</sup>, He Jialin<sup>2, 3</sup>, Ye Chuan<sup>1, 2, 3</sup><sup>1</sup>Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; <sup>2</sup>Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; <sup>3</sup>Research Center of Tissue Engineering and Stem Cell Technique, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; <sup>4</sup>College of Mechanical and Electrical Engineering, Guizhou Normal University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China

Wang Zhen, Master candidate, Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; Research Center of Tissue Engineering and Stem Cell Technique, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

<sup>1</sup>贵州医科大学附属医院骨科, 贵州省贵阳市 550004; <sup>2</sup>贵州医科大学, 贵州省贵阳市 550004; <sup>3</sup>组织工程与干细胞实验中心, 贵州省贵阳市 550004; <sup>4</sup>贵州师范大学机械与电气工程学院, 贵州省贵阳市 550025

第一作者: 王桢, 男, 1996年生, 湖南省娄底市人, 汉族, 贵州医科大学在读硕士, 主要从事组织工程支架、生物材料、干细胞研究。

通讯作者: 叶川, 主任医师, 贵州医科大学附属医院骨科, 贵州省贵阳市 550004; 贵州医科大学, 贵州省贵阳市 550004; 组织工程与干细胞实验中心, 贵州省贵阳市 550004

<https://orcid.org/0000-0003-2325-1761> (王桢); <https://orcid.org/0000-0001-5670-6289> (叶川)

基金资助: 贵州省科技厅资助项目(黔科合平台人才[2020]6013, 黔科合支撑项目[2020]4Y137), 项目负责人: 叶川

引用本文: 王桢, 许顺恩, 汤耿, 罗四维, 滕建祥, 谢孟利, 何佳林, 叶川. 复合压电薄膜生物相容性及电输出性能与兔骨髓间充质干细胞的成骨分化[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(13):1969-1975.



**Corresponding author:** Ye Chuan, Chief physician, Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; Research Center of Tissue Engineering and Stem Cell Technique, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Adjustable piezoelectric effect can promote tissue regeneration and repair. Piezoelectric materials are widely used in weight-bearing tissue engineering.

**OBJECTIVE:** To prepare a piezoelectric film material that can promote bone regeneration, and to explore its structural characterization, electrical output performance, biocompatibility, and effect of electrical output on osteogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells.

**METHODS:** Using poly-3-hydroxybutyrateco/4-hydroxybutyrate (P34HB) as raw material, barium calcium stannate titanate powder ( $\text{Ba}_{0.94}\text{Ca}_{0.06}\text{Sn}_{0.08}\text{Ti}_{0.92}\text{O}_3$ , BCST) was added according to mass ratios of 0%, 5%, 10%, 15%, and 20%. Dichloromethane was added to solve P34HB, and the thickness of 150–200  $\mu\text{m}$  BCST/P34HB piezoelectric film was prepared by vacuum drying method. After polarization in the oil bath, the surface morphology, crystal phase composition, piezoelectric coefficient and open circuit voltage were tested. The effect of BCST/P34HB electrical output at 110 Hz and 0.25 N force on the proliferation and osteogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells was tested.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Scanning electron microscopy, X-ray diffraction, water contact angle, piezoelectric coefficient and electrical output performance tests showed that when the mass ratio of BCST increased to 20%, the BCST/P34HB piezoelectric film had good piezoelectric properties ( $d_{33}=5.9$  pC/N) and electrical output performance (180 mV), which was closer to the suitable range of 500 mV for electrical stimulation. (2) Live and dead staining showed that on the first day of co-culture, 15% group and 20% group showed less red fluorescence. On the 5<sup>th</sup> day of culture, the number of green fluorescence in each group was significantly higher than that on the first day, and the red fluorescence was not observed in the 10%, 15% and 20% groups, and only a small amount of red fluorescence was observed in the 0% and 5% groups. (3) On the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup> days of co-culture with rabbit bone marrow mesenchymal stem cells, Almar blue staining exhibited that the number of cells in each group showed an increasing trend with the increase of time. On the 5<sup>th</sup> day of culture, the number of cells in the 20% group was significantly more than that in the 0% group ( $P < 0.05$ ). (4) On day 10 of osteogenic induction, alkaline phosphatase staining results showed that the positive rate of the 20% group was significantly higher than that of the 0% group ( $P=0.0001$ ). On day 21, alizarin red staining and quantitative analysis of calcium nodules showed a similar trend to alkaline phosphatase staining. Compared with the 0% group, the 15% group and 20% group showed significant differences ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.0001$ ). (5) The results showed that 20% BCST/P34HB films had good piezoelectric properties, electrical output properties, biocompatibility and the ability of promoting osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

**Key words:** bone tissue engineering; P34HB; piezoelectric material; film material; osteogenic differentiation

**Funding:** Guizhou Provincial Department of Science and Technology Project, No. Talents of Qiankehe Platform [2020]6013, Qiankehe Support [2020]4Y137 (to YC)

**How to cite this article:** WANG Z, XU SE, TANG G, LUO SW, TENG JX, XIE ML, HE JL, YE C. Biocompatibility and electrical output performance of composite piezoelectric film and osteogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(13):1969-1975.

## 0 引言 Introduction

高分子材料聚羟基脂肪酸酯类材料降解后不产生酸性产物,其较聚乳酸类高分子材料在成骨性能方面更具优势<sup>[1-3]</sup>。

第4代聚羟基脂肪酸酯类材料3-羟基丁酸酯4-羟基丁酸酯(poly-3-hydroxybutyrateco/4-hydroxybutyrate, P34HB)具有良好的生物相容性、生物降解性和成骨能力。P34HB静电纺丝薄膜有着良好的生物相容性和成骨能力,可修复SD大鼠颅骨缺损<sup>[4-5]</sup>。然而,较长的骨修复时间(16周)也提示其成骨活性具有较大的提升空间。

压电材料能将机械能和电能互相转换,其中压电陶瓷因制备工艺简单、成本低廉、性能优异等特点,已被广泛应用于科技、工业、军事、医学以及日常生活中<sup>[6-9]</sup>。基于钛酸钡压电陶瓷的固溶体具有较高的介电、压电和铁电性能,基于钛酸钡的器件已用于电容器、场效应晶体管和机电器件等产品<sup>[10]</sup>。该系列产品具有良好的生物相容性,其在生物领域也广泛应用,包括用于生物医学成像的血管内超声换能器、可穿戴传感器和用于骨再生的生物相容性复合材料<sup>[11-13]</sup>。

人体的皮肤、骨骼及神经组织等本身就是一个压电体,其在受力的情况下会释放出电荷,故将压电材料应用在组织工程尤为适合<sup>[14-17]</sup>。WANG等<sup>[18]</sup>通过静电纺丝方法将聚偏氟乙烯三氟乙烯[P(VDF-TrFE)]制成微纳米纤维薄膜,该薄膜在0.5 N、1 Hz机械震动作用下可产生约20 nA的短路电流和500 mV的开路电压,细胞增殖率提高1.6倍,在大鼠皮肤缺损模型中有效促进了创面的愈合。JIN等<sup>[19]</sup>通过将一种新型的摩擦/压电混合纳米发生器与纳米多孔神经导管集成在一起,产生一种生理自我调节的电信号(physiologically

self-regulated electrical signal, PSR-ES),以构建一个完全植入式神经电刺激(fully implantable neural electrical stimulation, FI-NES)系统,用于修复体内长段周围神经损伤(peripheral nerve injury, PNI)。LIU等<sup>[20]</sup>将聚左旋乳酸制成压电纤维薄膜,植入股骨内侧髁处有软骨缺损的兔膝关节内,兔膝关节透明软骨再生良好,但是聚左旋乳酸降解的酸性产物不利于成骨分化碱性微环境的形成,这限制了聚左旋乳酸压电纤维薄膜在骨组织工程的应用。

锡钛酸钡钙( $\text{Ba}_{0.94}\text{Ca}_{0.06}\text{Sn}_{0.08}\text{Ti}_{0.92}\text{O}_3$ , BCST)压电陶瓷是在 $\text{BaTiO}_3$ 基体中掺入Ca和Sn原子的固溶体系材料,压电常数得到提升,高达460 pC/N。前期研究中已证实BCST在体外具有良好的生物相容性,支撑材料见图1。研究发现在复合材料中掺入高压电系数材料可以获得压电性能<sup>[21]</sup>。受此启发,将压电性能优异的BCST与P34HB制成压电薄膜,以期赋予P34HB电生物活性从而获得更好的成骨效应。以P34HB为主材料,通过掺入不同质量分数的BCST,研究BCST/P34HB的表面微观形貌、亲水性及压电系数。研究者通过超声方式激发压电效应<sup>[22-25]</sup>,考虑到生物机械能产生的压电成骨效应可能对指导患者术后运动有更重要的意义,通过改装的YE2730A准静态 $d_{33}$ 测量仪施加类生物机械力激发BCST/P34HB的压电效应,探究其电输对兔骨髓间充质干细胞(rabbit bone marrow mesenchymal stem cells, rBMSCs)成骨分化的影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 基于浇铸法制备BCST/P34HB压电薄膜,体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验于2021年10月至2022年12月在贵州医科大学组织工程与干细胞实验室完成。

1.3 材料 P34HB( $M_w$  350 000, 珠海麦得发生物科技股份有限公司, 中国); BCST粉末(贵州大学材料与冶金学院, 中国)。

实验动物: 1只4周龄新西兰幼兔, 体质量1.0 kg左右, 雌雄不拘, 由贵州医科大学动物实验中心提供, 许可证号: SYXK(黔)2018-0001。动物实验获贵州医科大学实验动物伦理委员会批准, 批准号: 2201606。

实验主要试剂及仪器: 二氯甲烷(天津富宇化学试剂公司); 胎牛血清(上海卡迈舒生物科技有限公司); 激光共聚焦显微镜LSM5 Excitor(Carl Zeiss); 接触角测试仪(DropMaster, DMO-501); 示波器(TBS1102X, tektronix, USA); YE2730A准静态 $d_{33}$ 测量仪(上海双旭电子有限公司, 中国); 油浴极化(PZT-FJH20/3复合压电极化装置, 中国); 多功能酶标仪(SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA); Alamar Blue测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); rBMSCs成骨诱导液(江苏海星生物科技有限公司); 十六烷基吡啶(上海麦克林生化科技股份有限公司); 超声分散仪(Scientz-2400F, 宁波); 扫描电镜(Sigma 300, ZISS, Germany); X射线衍射仪(Miniflex600, 理学Rigaku Ultima IV, Japan); 其他分析级化学试剂和溶剂均来自细胞工程生物医药技术国家地方联合工程实验室(贵州医科大学, 贵阳, 中国)。

#### 1.4 实验方法

1.4.1 BCST/P34HB压电薄膜制备 根据薄膜材料BCST与P34HB质量比不同分为5组( $n=4$ ): 0%组, BCST/P34HB=0/100; 5%组, BCST/P34HB=5/95; 10%组, BCST/P34HB=10/90; 15%组, BCST/P34HB=15/85; 20%组, BCST/P34HB=20/80。

将5份质量为0.6 g的P34HB粉末溶于5份10 mL二氯甲烷中得到6% P34HB溶液, 磁力搅拌溶解2 h, 按照上述比例加入质量分别为0, 0.031 6, 0.067, 0.106, 0.150 g BCST粉末, 均匀分散于上述6% P34HB溶液中, 低温避光超声分散3 h, 功率为2 400 W。采用溶液浇铸法将混合溶液浇铸于洁净的模具(20 mm×20 mm)中, 真空干燥12 h自然成膜, 得到BCST/P34HB压电薄膜, 厚度为150–200  $\mu\text{m}$ 。使用油浴极化装置对各组复合薄膜材料进行油浴极化, 以铜片( $d=0.2$  mm,  $R=10$  mm)为电极, 极化电压为0.9 kV, 极化时间为30 min。

1.4.2 BCST/P34HB压电薄膜表面形态学检测 将薄膜裁剪成边长为15 mm的方片, 采用扫描电镜观察薄膜材料的表面微观形貌(加速电压为0.02–30 kV)并进行能谱分析(energy spectrum analysis, EDS)。

1.4.3 X射线衍射分析 将薄膜裁剪成边长为15 mm的方片, 采用X射线衍射仪(X-Ray Diffraction, XRD)分析材料的物相组成, 测试条件如下: Cu靶 $K\alpha$ 辐射( $\lambda=1.540 6$  Å,  $1$  Å=0.1 nm), 管电压为40 kV, 管电流为40 mA, 扫描模式为 $2\theta$ , 扫描范围为 $10^\circ$ – $80^\circ$ ,  $0.02$  ( $^\circ$ )/步及 $2$  ( $^\circ$ )/min, 衍射图由origin Pro 2016绘制。

1.4.4 BCST/P34HB压电薄膜亲水性能检测 采用接触角测量

仪分析材料的亲水性能, 将薄膜固定于载玻片上, 通过下压微量注射器推杆使得3  $\mu\text{L}$ 去离子水落在薄膜上, 等水滴稳定后拍照, 利用Image J中Contact angle模块测量其接触角, 每个样品取5个点测量, 每组取3个重复样。

1.4.5 BCST/P34HB压电薄膜 $d_{33}$ 系数检测 用准静态 $d_{33}$ 测试仪直接测试各组薄膜的压电常数, 每个样品取5个点进行测量, 记录范围, 取平均数。

1.4.6 BCST/P34HB压电薄膜电输出性能检测 将各组薄膜分别通过铜导线接入示波器, 使用绝缘胶布固定如图1, 利用改装的YE2730A准静态 $d_{33}$ 测量仪对薄膜施加110 Hz、0.25 N的压力, 测试薄膜的开路电压。

1.4.7 rBMSCs的分离培养 将幼兔注射过量麻醉药行安乐死, 分离股骨、胫骨及肱骨, 剔除表面多余软组织浸泡于体积分数为75%医用乙醇内3–5 min, 转移至超净工作台内部操作。用无菌PBS反复清洗幼兔骨, 去除表面残余乙醇, 骨头分离后将一侧骨髓剪断, 用5 mL注射器吸取一定量的无菌PBS, 将骨髓冲洗至无菌培养皿中, 将细胞悬液以1 000 r/min离心5 min, 去上清, 用DMEM完全培养基重悬细胞, 获得rBMSCs, 置于 $37$   $^\circ\text{C}$ 、体积分数5% $\text{CO}_2$ 培养箱中培养扩增至第3代。

#### 1.4.8 薄膜的细胞相容性实验

细胞增殖实验: 将5组薄膜裁剪成15 mm×15 mm大小置于24孔Transwell板小室中, 每孔板底接种 $1 \times 10^4$ 个rBMSCs( $2.5 \times 10^7$   $\text{L}^{-1}$ ), 培养1, 3, 5 d后, 根据Alamar Blue试剂盒说明书, 将测定溶液与细胞培养基以体积比1:10混合后, 每孔加入200  $\mu\text{L}$ 混合液体,  $37$   $^\circ\text{C}$ 孵育2 h。取每个样品的混合液体100  $\mu\text{L}$ 放入96孔板中, 使用多功能酶标仪在544 nm/590 nm的激发/发射波长下测量荧光强度。

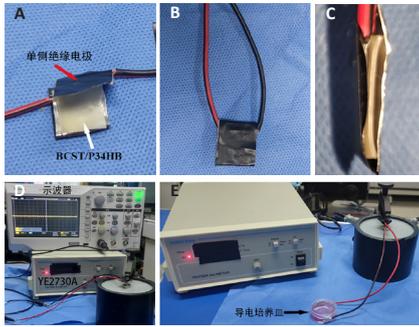
Live/Dead染色: 标本制备、细胞种植过程与增殖实验相同, 分别在1, 3, 5 d时用Live/Dead染色剂室温染色1 h; PBS冲洗2次, 每次5 min; 在共聚焦激光显微镜下观察, 红色荧光为死细胞, 绿色荧光为活细胞。

#### 1.4.9 细胞成骨分化能力检测

碱性磷酸酶染色: 压电激发方式与电输出性能测试相同, 取6孔板, 每孔分别赋予2条铂电极, 与铜线连接形成闭合电路, 见图1E, 每孔接种 $5 \times 10^4$ 个( $1 \times 10^8$   $\text{L}^{-1}$ )rBMSCs, 每孔加入2 mL成骨诱导液, 同时对薄膜施加110 Hz、0.25 N压力, 每天刺激30 min, 培养10 d后进行碱性磷酸酶染色。采用光学显微镜观察染色情况, 随机选取视野进行图像采集, 并以Image pro 6.0(Rockville, MD, USA)计算其染色区域面积。

茜素红染色: 干预方式与碱性磷酸酶染色相同, 在诱导第21天时, 40 g/L多聚甲醛固定, 每孔加入2 mL茜素红S溶液染色3 min, PBS清洗3次, 光学显微镜观察染色情况。

茜素红染色定量分析: 待茜素红染色结果观察结束后, 每孔加入500  $\mu\text{L}$  10%十六烷基吡啶, 室温置于摇床1 h, 取上清液100  $\mu\text{L}$ 放入96孔板中, 用酶标仪在波长570 nm处测定样本吸光度值。



图注：图 A-C 为 BCST/P34HB 压电薄膜单元，其中白色箭头所示为 BCST/P34HB 压电薄膜，红色箭头所示为单侧绝缘铂电极；D 为电学测试装置和改装后的力加载装置示意图，其中 YE2730A 为改装后的力加载装置；E 为压电刺激细胞培养装置，其中黑色箭头所指为贴有 2 条铂电极的培养皿。BCST：锡钛酸钡钙；P34HB：3-羟基丁酸酯 4-羟基丁酸酯

图 1 | BCST/P34HB 压电薄膜单元、力加载装置、电学测试装置及细胞培养示意图

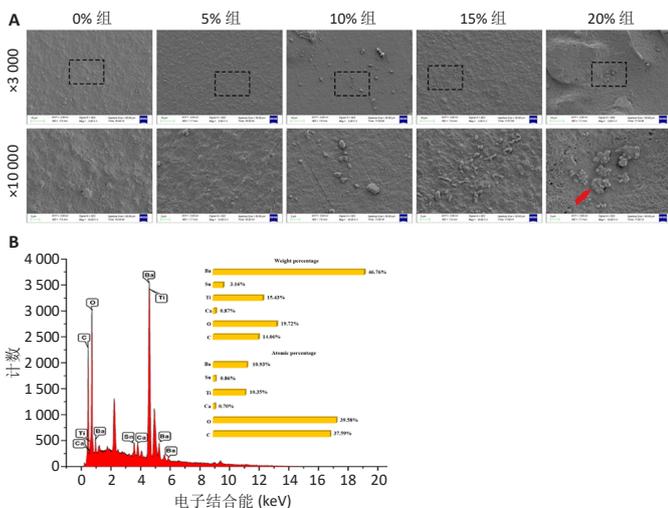
Figure 1 | Schematic diagram of the BCST/P34HB piezoelectric film unit, force loading device, electrical test device, and cell culture

1.5 主要观察指标 5 组压电薄膜的表面特征、压电系数、电输出、生物相容性及促成骨特性。

1.6 统计学分析 数据采用 SPSS 26.0 软件进行处理，所有实验至少进行 3 次，定量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Tukey 检验进行多重比较。该文统计学方法已经贵州医科大学生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

2.1 各组压电薄膜的表面微观形貌 图 2A 显示，当 BCST 含量依次增加时，可以看到长条形或方形的颗粒均匀镶嵌在 P34HB 薄膜上；当含量达到 20% 时，颗粒出现聚团现象；图 2B 显示，加入 BCST 后，能谱的颗粒出现 Ba, Ca, Sn 及 Ti 元素所对应的峰，说明颗粒为加入的 BCST 压电陶瓷。



图注：图 A 为各组 BCST/P34HB 压电薄膜表面微观形貌，红色箭头所指为 BCST 颗粒，0%，5%，10%，15%，20% 代表 BCST 与 P34HB 的质量比分别为 0/100, 5/95, 10/90, 15/85, 20/80；B 为 BCST/P34HB 压电薄膜能谱分析。BCST：锡钛酸钡钙；P34HB：3-羟基丁酸酯 4-羟基丁酸酯

图 2 | 各组 BCST/P34HB 压电薄膜的扫描电镜图像和能谱分析  
Figure 2 | Scanning electron microscopy images and energy dispersive spectroscopy analysis of BCST/P34HB piezoelectric films in each group

2.2 各组压电薄膜的 X 射线衍射结果 图 3 中下部是钛酸钡四方晶系的标准图谱 (PDF 79-2264)，随着 BCST 含量的增加，P34HB 峰的强度减小，压电陶瓷峰的强度增加，20% 组样品中几乎未见 P34HB 的峰。

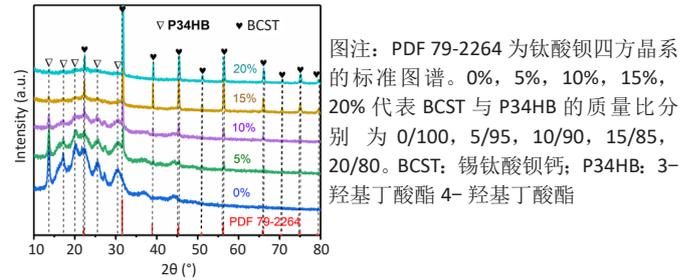


图 3 | 各组 BCST/P34HB 压电薄膜的 X 射线衍射图  
Figure 3 | X-ray diffraction pattern of BCST/P34HB piezoelectric films in each group

2.3 各组压电薄膜的水接触角测量结果 0% 组，5% 组，10% 组，15% 组及 20% 组薄膜的水接触角分别为  $(65.9 \pm 2.4)^\circ$ ， $(67.8 \pm 1.8)^\circ$ ， $(64.4 \pm 4.5)^\circ$ ， $(64.3 \pm 3.1)^\circ$ ， $(67.7 \pm 1.8)^\circ$ ，组间差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )，见图 4。

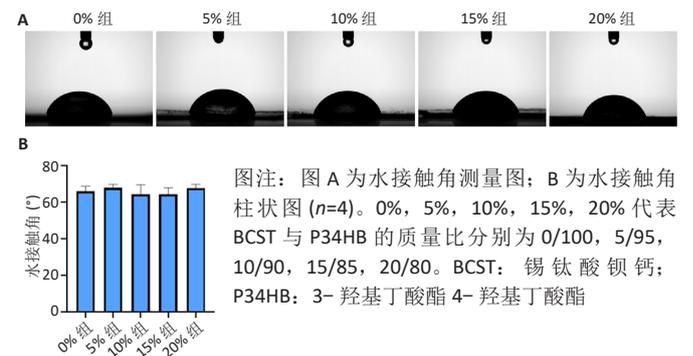
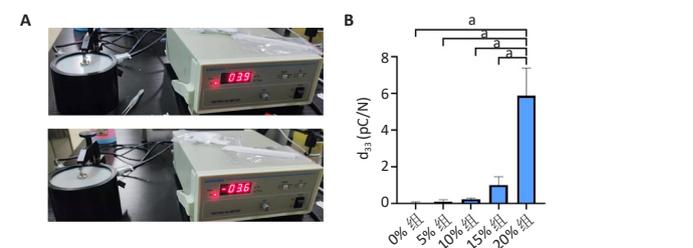


图 4 | BCST/P34HB 压电薄膜的水接触角测试  
Figure 4 | Water contact angle test of the BCST/P34HB piezoelectric films

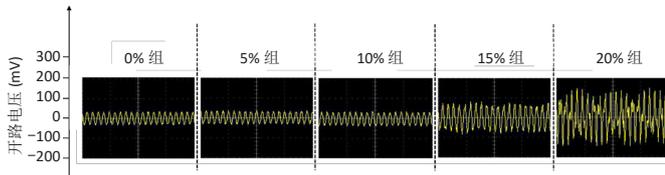
2.4 各组压电薄膜的压电常数 当 BCST 含量在 0%，5% 和 10% 时，BCST/P34HB 压电薄膜几乎测不出  $d_{33}$ ；当 BCST 含量增加至 15%， $d_{33}$  为  $(1.0 \pm 0.37) \text{ pC/N}$ ；继续提升 BCST 含量至 20%， $d_{33}$  有了明显提升 ( $P < 0.0001$ )， $d_{33}$  为  $(5.9 \pm 1.23) \text{ pC/N}$ ，见图 5。



图注：图 A 为 BCST/P34HB 压电薄膜压电系数  $d_{33}$  测量实物图；B 为各组压电薄膜压电系数柱状图 ( $n=3$ ,  $^a P < 0.0001$ )。0%，5%，10%，15%，20% 代表 BCST 与 P34HB 的质量比分别为 0/100, 5/95, 10/90, 15/85, 20/80。BCST：锡钛酸钡钙；P34HB：3-羟基丁酸酯 4-羟基丁酸酯

图 5 | BCST/P34HB 压电薄膜的压电系数  $d_{33}$  检测  
Figure 5 | Detection of the piezoelectric coefficient  $d_{33}$  of the BCST/P34HB piezoelectric films

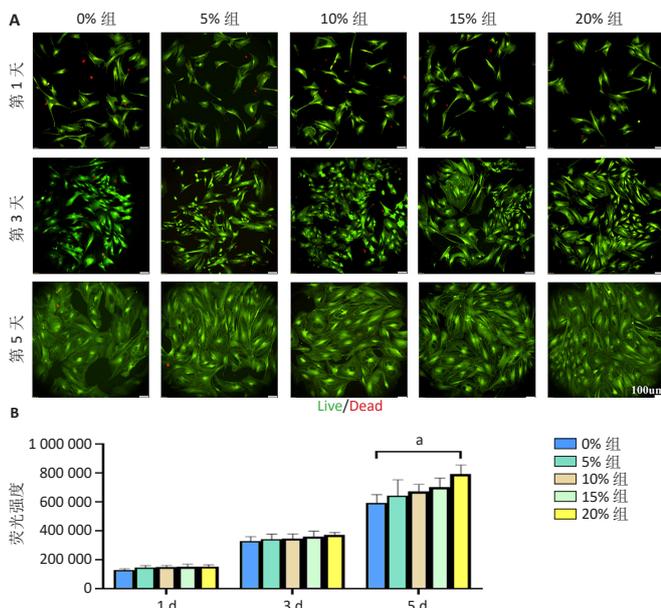
2.5 各组压电薄膜的电输出结果 在 110 Hz、0.25 N 的机械震动下, 0%, 5%, 10% 组未显示压电的电压波动, 当 BCST 含量提升到 15% 时, 显示出与力频 (110 Hz) 相似的电压波动, 约 80 mV; 继续提升 BCST 含量到 20% 时, 示波器记录到明显的压电电压波动, 峰值最高约为 180 mV, 见图 6。



图注: 电压波形由示波器获取, 采样频率 1 Gs/s。0%, 5%, 10%, 15%, 20% 代表 BCST 与 P34HB 的质量比分别为 0/100, 5/95, 10/90, 15/85, 20/80。BCST: 锡钛酸钡钙; P34HB: 3-羟基丁酸酯 4-羟基丁酸酯  
图 6 | BCST/P34HB 压电薄膜单元在 110 Hz、0.25 N 力加载作用下的开路电压

Figure 6 | Open-circuit voltage of the BCST/P34HB piezoelectric film unit under a force loading of 110 Hz and 0.25 N

2.6 各组 BCST/P34HB 压电薄膜的生物相容性 在活死染色实验中, 与 rBMSCs 共培养第 1 天, 各组 BCST/P34HB 压电薄膜均出现红色荧光 (死细胞), 随着 BCST 含量的提升, 15% 组与 20% 组显示出较少的红色荧光; 当培养到第 5 天时, 各组绿色荧光 (活细胞) 数量较第 1 天明显增多, 且细胞舒展, 10% 组、15% 组和 20% 组未见红色荧光, 仅 0% 组和 5% 组有少量的红色荧光, 见图 7A。在 Alamar Blue 染色第 1, 3, 5 天, 随着时间的增加, 各组细胞都呈现出增长的趋势, 当培养到第 5 天时, 20% 组的细胞量明显高于 0% 组 ( $P < 0.05$ ), 见图 7B。

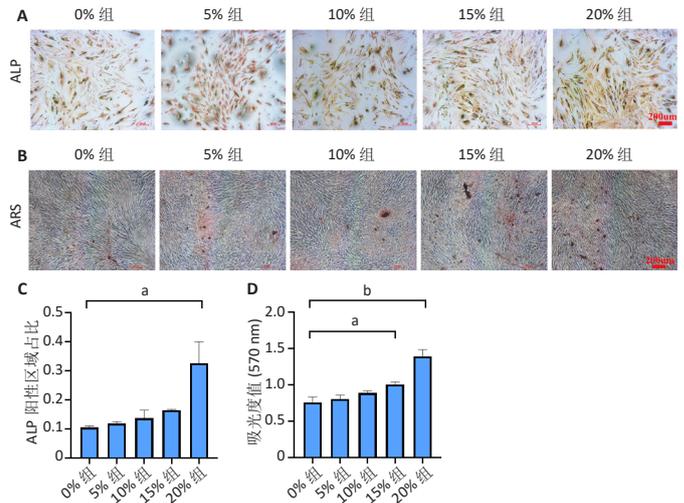


图注: 图 A 为各组 BCST/P34HB 压电薄膜与兔骨髓间充质干细胞在 Transwell 板中共培养第 1, 3, 5 天的活死荧光染色, 其中绿色为活细胞, 红色为死细胞, 标尺 =100 μm; B 为各组 BCST/P34HB 压电薄膜与兔骨髓间充质干细胞在 Transwell 板中共培养第 1, 3, 5 天的增殖情况 ( $n=3$ ,  $^aP < 0.05$ )。0%, 5%, 10%, 15%, 20% 代表 BCST 与 P34HB 的质量比分别为 0/100, 5/95, 10/90, 15/85, 20/80。BCST: 锡钛酸钡钙; P34HB: 3-羟基丁酸酯 4-羟基丁酸酯

图 7 | BCST/P34HB 压电薄膜的生物相容性检测

Figure 7 | Biocompatibility test of BCST/P34HB piezoelectric films

2.7 各组 BCST/P34HB 压电薄膜电输出对 rBMSCs 成骨分化的影响 碱性磷酸酶染色结果显示, 培养第 10 天时, 各组均出现不同数量的碱性磷酸酶染色阳性细胞, 见图 8A; 通过 Image J 统计分析碱性磷酸酶阳性区域面积与细胞面积比值, 20% 组的阳性率明显高于 0% 组 ( $P=0.0001$ ), 其余组与 0% 组之间差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 8B。第 21 天的茜素红染色和钙结节定量分析中, 显示出了与碱性磷酸酶染色相似的趋势, 与 0% 组相比, 15% 组和 20% 组均显示出明显的差异 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.0001$ ), 见图 8C, D。



图注: 图 A 为成骨诱导 & 各组压电薄膜刺激第 10 天碱性磷酸酶 (ALP) 染色, 标尺 =200 μm; B 为成骨诱导 & 各组压电薄膜刺激第 21 天茜素红 (ARS) 染色, 标尺 =200 μm; C 为 Image J 统计分析 ALP 染色阳性区域与视野下细胞总面积之比 ( $n=3$ ,  $^aP=0.0001$ ); D 为钙结节的定量分析 ( $n=3$ ,  $^aP < 0.01$ ,  $^bP < 0.0001$ )。0%, 5%, 10%, 15%, 20% 代表 BCST 与 P34HB 的质量比分别为 0/100, 5/95, 10/90, 15/85, 20/80。BCST: 锡钛酸钡钙; P34HB: 3-羟基丁酸酯 4-羟基丁酸酯

图 8 | BCST/P34HB 压电薄膜电输出对兔骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

Figure 8 | Effect of electrical output of BCST/P34HB piezoelectric films on osteogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells

### 3 讨论 Discussion

骨是人类主要的负重结缔组织, 也是人类最易变性的结缔组织。近年来, 由于交通事故、创伤和疾病等造成的人体骨组织创伤和缺损日益增多, 骨缺损修复材料的需求不断加大, 再生和修复是一个挑战。随着组织工程的快速发展, 日益增多的研究致力于组织工程支架。目前, 用于人工骨合成的组织工程支架材料包括了天然生物材料、合成有机高分子材料、生物陶瓷材料等。天然生物材料具有良好的生物相容性, 可广泛应用于再生医学领域。合成有机高分子材料如聚羟基脂肪酸酯, 虽具备良好的生物相容性和降解性能, 但较差亲水性及力学性能不可控等弊端限制了其在生物医学领域的应用。第 4 代聚羟基脂肪酸酯产品 P34HB 具有更出色的力学性能、更佳生物相容性和可降解性, 因而在骨与软骨组织工程中备受关注 [26]。

压电材料是一种可将能量进行转换的功能材料, 将其植入骨缺损处后, 通过机体的运动能将机械能转化为电效应,

产生的微电流可刺激骨与软骨再生和修复。值得注意的是,骨在剪切模式下压电常数高达  $0.7 \text{ pC/N}^{[27]}$ , 大多情况下压电支架的  $d_{33}$  系数明显高于  $0.7 \text{ pC/N}$ , 即压电支架比骨要产生更多的电荷。然而, 如果发现这些电荷不足以引起有益的细胞反应, 就需要改进支架的压电特性<sup>[21]</sup>。LIU 等<sup>[28]</sup> 制备了聚偏二氟乙烯和氧化石墨烯的核-壳结构复合亚微米纤维, 与纯聚偏二氟乙烯纤维相比, 压电常数增加了 426%, 这提示了不同材料的掺入能调节骨压电材料的压电性能。P34HB 暂未检测到压电属性, 掺入  $\text{BaTiO}_3$  ( $d_{33}=150\text{--}170 \text{ pC/N}$ ) 仍未能显示出有效的压电性能, 因此提高  $\text{BaTiO}_3$  压电性能有望解决这一问题。 $\text{BaTiO}_3$  陶瓷粉末掺杂 Sn 及 Ca 类元素后得到 BCST, 其压电性能明显提升 ( $d_{33}=460 \text{ pC/N}$ )。然而, 并不是压电性能越高就越好, LEWIS 等<sup>[29]</sup> 研究表明较高的压电性能所产生的电荷值可导致细胞死亡, 因此 BCST 在复合材料中的掺入比例也是值得注意的问题。

将具成骨分化潜力的 P34HB 高分子材料与压电性能优异的 BCST 陶瓷粉末制成薄膜。扫描电镜及能谱分析结果表明成功制备了 BCST/P34HB 薄膜, BCST 含量增加到 20% 时出现聚团现象, 这可能与 BCST 粉末较小的直径导致表面能增大有关。X 射线衍射结果显示 5%, 10%, 15% 及 20% 组样品中压电陶瓷相的衍射峰与 BCST 的四方晶系铁电相符合, 铁电相是具有自发极化的压电相, 说明复合材料具备压电性能的特征相。此外, 压电陶瓷的加入会减小 P34HB 的结晶度, 这一变化可能会使 BCST/P34HB 压电薄膜的力学性能发生改变<sup>[30]</sup>。随着不同质量 BCST 的加入, 各组 BCST/P34HB 的水接触角差异均无显著性意义, 因此认为 BCST 不会显著改变 P34HB 的亲水性。

当 BCST 含量增加时, BCST/P34HB 压电薄膜的压电系数  $d_{33}$  开始呈现逐步上升的趋势, 这是因为压电复合材料的性能主要与压电陶瓷的含量与性能相关。陶瓷介电性能一般与压电性能呈正相关, BCST 具有较高的压电性能, 因而提高 BCST 含量可以增加复合物的介电常数, 从而增加极化效应, 同时增加的压电陶瓷含量相当于在复合物中提升了压电陶瓷的联通度, 进而提升压电性能<sup>[31]</sup>。这种在陶瓷/聚合物复合材料增加压电陶瓷含量提升压电系数的趋势也与其他报道相一致<sup>[8, 32]</sup>。把 BCST/P34HB 压电薄膜组装成检测单元进行开路电压检测时, 可以观察到 0%, 5%, 10% 组几乎没有压电电压波动, 根据压电陶瓷开路电压方程  $U_0 = F_0 \cdot d_{33} / C_p$  ( $U_0$  表示开路电压,  $F_0$  为压电陶瓷表面所受力,  $C_p$  为理想条件下的压电陶瓷电容), 这可能与其较低的压电系数  $d_{33}$  有关; 当 BCST 含量增加至 15% 时, 可观察到与震动频率 (110 Hz) 一致的压电电压波动, 当继续增加 BCST 含量至 20% 时, 可观察到显著的压电电压波动, 峰值约为 180 mV, 这与 YAN 等<sup>[33]</sup> 报道的 500 mV 电刺激有利于 MC3T3-E1 细胞成骨更为接近。

各组压电薄膜在与 rBMSCs 共培养的情况下, Alamar Blue 染色结果表明, 随着 BCST 含量的增加, BCST/P34HB 压电薄膜的细胞相容性得到提升, 这说明了 BCST 的加入可以

改善 P34HB 的生物相容性。在成骨诱导培养中, 碱性磷酸酶染色、茜素红 S 染色及定量分析结果都说明了当 rBMSCs 受到压电刺激时, 一定程度上可以促进其向成骨细胞分化, 这或许是电刺激干预的情况下, rBMSCs 通过激活钙敏感受体和/或增加钙离子流入, 上调更多的胞质钙离子, 从而激活 rBMSCs 的成骨分化有关<sup>[34-36]</sup>。

综上所述, 此次实验基于高分子可降解材料 P34HB 和压电陶瓷 BCST 粉末, 采用共混、真空和干燥的方法制备得到不同质量分数的 BCST/P34HB 薄膜, 经油浴极化后得到 BCST/P34HB 压电薄膜, 该制备方法具有简单性、有效性, 制得的压电薄膜具有良好的生物相容性和压电刺激成骨特性, 实现了 P34HB 从惰性向压电生物活性的转变。此次实验的不足之处在于未能在模拟动物体活动时探讨应力传导下 BCST/P34HB 压电薄膜的压电效应对 rBMSCs 成骨分化的影响和未验证压电效应促进 rBMSCs 成骨分化的具体机制; 此外, 还缺乏体内实验进一步证明 BCST/P34HB 薄膜的成骨性能。尽管存在以上的不足, 但是不影响该研究的主要结论。此次实验均在体外进行, 受其在体外良好的压电性能、生物相容性及成骨分化能力的鼓励, 后续研究将通过动物实验进一步证明其良好的生物相容性和成骨效果, 为 BCST/P34HB 压电薄膜在骨组织工程的应用提供科学依据。

**致谢:** 感谢贵州医科大学附属医院骨科、贵州医科大学组织工程与干细胞实验中心、贵州师范大学机械与电气工程学院、贵州大学材料与冶金学院提供实验场所和技术支持。

**作者贡献:** 实验设计为王楨, 实验实施为王楨、许顺恩、滕建祥、谢孟利, 实验评估为汤耿、罗四维、叶川, 资料收集为何佳林。王楨成文, 叶川审校。

**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:** 该文章撰写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 次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

## 4 参考文献 References

- [1] 傅双庆, 杜洁, 贾新超, 等. 姜黄素生物可降解纳米胶囊制备综合实验设计 [J]. 实验技术与管理, 2022, 39(6): 30-33.
- [2] KOURILOVA X, PERNICOVA I, SEDLAR K, et al. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of Schlegella thermodepolymerans from xylose rich substrates. Bioresour Technol. 2020; 315: 123885.
- [3] 陈安琪, 吴清霖, 吴勇敏, 等. PLA/PVP-GEL 复合支架对 MC3T3-E1 细胞生物学行为的影响及成骨性能的初探 [J]. 口腔生物医学, 2022, 13(4): 234-240.
- [4] 刘崑, 杨龙, 王伟宇, 等. 聚 3- 羟基丁酸酯 4- 羟基丁酸酯 / 聚乙二醇 / 氧化石墨烯组织工程支架的制备和性能评价 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(22): 3466-3472.

- [5] YANG L, ZHAO Y, CUI D, et al. Coaxial bioelectrospinning of P34HB/PVA microfibers biomimetic scaffolds with simultaneity cell-laden for improving bone regeneration. *Materials & Design*. 2022; 213:110349.
- [6] SHAN J, WANG S, ZHOU F, et al. Designing New-Generation Piezoelectric Transducers by Embedding Superior Graphene-Based Thermal Regulators. *Adv Mater*. 2021;33(41):e2103141.
- [7] DHALL A, ISLAM S, PARK M, et al. Bimodal Nanocomposite Platform with Antibiofilm and Self-Powering Functionalities for Biomedical Applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2021;13(34):40379-40391.
- [8] ZHU P, CHEN Y, SHI J. Piezocatalytic Tumor Therapy by Ultrasound-Triggered and BaTiO<sub>3</sub>-Mediated Piezoelectricity. *Adv Mater*. 2020; 32(29):e2001976.
- [9] 梁帅博, 袁涛, 邱扬, 等. 钛酸钡介电调控提升纸基摩擦纳米发电机输出性能 [J]. *物理学报*, 2022, 71(7):306-315.
- [10] SONG E, KIM DH, JEONG EJ, et al. Effects of particle size and polymorph type of TiO<sub>2</sub> on the properties of BaTiO<sub>3</sub> nanopowder prepared by solid-state reaction. *Environ Res*. 2021;202:111668.
- [11] LI H, SONG H, LONG M, et al. Mortise-tenon joint structured hydrophobic surface-functionalized barium titanate/polyvinylidene fluoride nanocomposites for printed self-powered wearable sensors. *Nanoscale*. 2021;13(4):2542-2555.
- [12] WANG P, TANG Q, ZHANG L, et al. Ultrasmall Barium Titanate Nanoparticles for Highly Efficient Hypoxic Tumor Therapy via Ultrasound Triggered Piezocatalysis and Water Splitting. *ACS Nano*. 2021;15(7):11326-11340.
- [13] TANG Y, CHEN L, DUAN Z, et al. Graphene/barium titanate/polymethyl methacrylate bio-piezoelectric composites for biomedical application. *Ceramics International*. 2020;46(5):6567-6574.
- [14] SODANO HA, INMAN DJ. A Review of Power Harvesting From Vibration Using Piezoelectric Materials. *The Shock and Vibration Digest*. 2004; 36:197-205.
- [15] WU H, DONG H, TANG Z, et al. Electrical stimulation of piezoelectric BaTiO<sub>3</sub> coated Ti6Al4V scaffolds promotes anti-inflammatory polarization of macrophages and bone repair via MAPK/JNK inhibition and OXPHOS activation. *Biomaterials*. 2023;293:121990.
- [16] BASSETT CA, BECKER RO. Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. *Science*. 1962;137(3535):1063-1064.
- [17] 许言, 李平, 赖春花, 等. 血管化骨再生中压电生物材料的应用 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(7):1126-1132.
- [18] WANG A, LIU Z, HU M, et al. Piezoelectric nanofibrous scaffolds as in vivo energy harvesters for modifying fibroblast alignment and proliferation in wound healing. *Nano Energy*. 2018;43:63-71.
- [19] JIN F, LI T, YUAN T, et al. Physiologically Self-Regulated, Fully Implantable, Battery-Free System for Peripheral Nerve Restoration. *Adv Mater*. 2021;33(48):e2104175.
- [20] LIU Y, DZIDOTOR G, LE TT, et al. Exercise-induced piezoelectric stimulation for cartilage regeneration in rabbits. *Sci Transl Med*. 2022; 14(627):eabi7282.
- [21] WU C, TANG Y, ZHAO K, et al. Erbium-doped barium titanate/hydroxyapatite composites with enhanced piezoelectric and biological properties. *Micro & Nano Letters*. 2020;15(7):421-424.
- [22] CAI K, JIAO Y, QUAN Q, et al. Improved activity of MC3T3-E1 cells by the exciting piezoelectric BaTiO<sub>3</sub>/TC4 using low-intensity pulsed ultrasound. *Bioact Mater*. 2021;6(11):4073-4082.
- [23] ZHOU X, SHEN B, ZHAI J, et al. High Performance Generation of H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> under Piezophototronic Effect with Multi-Layer In<sub>2</sub>S<sub>3</sub> Nanosheets Modified by Spherical ZnS and BaTiO<sub>3</sub> Nanopiezoelectrics. *Small Methods*. 2021;5(6):e2100269.
- [24] DONG Y, DONG S, LIU B, et al. 2D Piezoelectric Bi<sub>2</sub>MoO<sub>6</sub> Nanoribbons for GSH-Enhanced Sonodynamic Therapy. *Adv Mater*. 2021;33(51):e2106838.
- [25] CHEN J, LI S, JIAO Y, et al. In Vitro Study on the Piezodynamic Therapy with a BaTiO<sub>3</sub>-Coating Titanium Scaffold under Low-Intensity Pulsed Ultrasound Stimulation. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2021;13(41): 49542-49555.
- [26] GUO W, YANG Z, QIN X, et al. Fabrication and Characterization of the Core-Shell Structure of Poly(3-Hydroxybutyrate-4-Hydroxybutyrate) Nanofiber Scaffolds. *Biomed Res Int*. 2021;2021:8868431.
- [27] BUR AJ. Measurements of the dynamic piezoelectric properties of bone as a function of temperature and humidity. *J Biomech*. 1976;9(8): 495-507.
- [28] LIU X, MA J, WU X, et al. Polymeric Nanofibers with Ultrahigh Piezoelectricity via Self-Orientation of Nanocrystals. *ACS Nano*. 2017; 11(2):1901-1910.
- [29] LEWIS JS, DOLGOVA NV, CHANCELLOR TJ, et al. The effect of cyclic mechanical strain on activation of dendritic cells cultured on adhesive substrates. *Biomaterials*. 2013;34(36):9063-9070.
- [30] 姚雪容, 任敏巧, 郑萃, 等. 聚丙烯流延膜厚度对结晶取向及力学性能的影响 [J]. *石油化工*, 2020, 49(6):557-564.
- [31] TANG Y, CHEN L, DUAN Z, et al. Enhanced compressive strengths and induced cell growth of 1-3-type BaTiO<sub>3</sub>/PMMA bio-piezoelectric composites. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;120:111699.
- [32] 代香林, 张文凤, 姚喜军, 等. 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.
- [33] YAN H, LI L, WANG Z, et al. Mussel-Inspired Conducting Copolymer with Aniline Tetramer as Intelligent Biological Adhesive for Bone Tissue Engineering. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020;6(1):634-646.
- [34] LOUKIN SH, TENG J, KUNG C. A channelopathy mechanism revealed by direct calmodulin activation of TrpV4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(30):9400-9405.
- [35] IKEDA F, NISHIMURA R, MATSUBARA T, et al. Activation of NFAT signal in vivo leads to osteopenia associated with increased osteoclastogenesis and bone-resorbing activity. *J Immunol*. 2006;177(4):2384-2390.
- [36] YANAI R, TETSUO F, ITO S, et al. Extracellular calcium stimulates osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by enhancing bone morphogenetic protein-2 expression. *Cell Calcium*. 2019;83:102058.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZM)