

# 仿生鱼胶原复合膜引导牙周 / 骨组织再生的体外研究

周 恬<sup>1</sup> 莫秀梅<sup>2</sup> 孙 皎<sup>1</sup>

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院·上海生物材料研究测试中心, 上海 200023 ;  
2. 东华大学化学化工与生物工程学院, 上海 201620)

**【摘要】** 目的 研制一种综合性能优异的仿生鱼胶原复合膜, 探讨其作为引导牙周 / 骨组织再生 (GTR/GBR) 膜的生物学潜能。方法 制备一种新型仿生静电纺鱼胶原 / 生物玻璃 / 壳聚糖 (Col/BG/CS) 复合纳米纤维膜, 分别研究复合膜的结构、性能、抗菌性及其诱导人牙周膜韧带细胞 (HPDLCs) 的生物学效应。结果 复合膜具有仿生结构和一定的力学强度。相比单纯的鱼胶原膜, 复合膜对变形链球菌显示出一定的抑菌效果。复合膜被证明能明显促进 HPDLCs 的粘附、增殖成骨分化以及 RUNX-2, OPN 蛋白的表达。结论 本研究首次开发一种具有主动诱导牙周组织再生能力并兼有一定抗菌性的多功能仿生鱼 Col/BG/CS 复合纳米纤维膜, 为其作为 GTR/GBR 膜的应用提供可能。

**【关键词】** 仿生 鱼胶原 引导牙周 / 骨组织再生膜 生物玻璃 壳聚糖 成骨分化

DOI : 10.11752/j.kqcl.2018.01.03

## Biomimetic fish collagen composite nanofibers induce periodontal/bone tissue regeneration *in vitro*

Zhou Tian<sup>1</sup> Mo Xiumei<sup>2</sup> Sun Jiao<sup>1</sup>

(1. Shanghai Biomaterials Research & Testing Center, Shanghai Key Laboratory of Stomatology,  
Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200023 ;  
2. College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620)

**【Abstract】 Objective** The aim of the present study was to develop a biomimetic fish collagen composite nanofibers with excellent properties and discuss the biological potential for application in guided tissue or bone regeneration (GTR/GBR) membranes. **Methods** To prepare a biomimetic electrospun fish collagen/bioactive glass/chitosan (Col/BG/CS) composite nanofibers membrane and determine its structure, mechanical property, antibacterial activity, and biological effects on human periodontal ligament cells (HPDLCs). **Results** The composite membrane had a biomimetic structure with a certain tensile strength. Compared to the pure fish collagen membrane, the composite membrane showed some antibacterial activity on *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). The composite membrane not only enhanced cell viability and osteogenic gene expression of HPDLCs, but also promoted the expression of RUNX2 and OPN protein. **Conclusion** The present study developed a biomimetic fish Col/BG/CS composite membrane that can actively induce tissue regeneration with a certain antibacterial activity, providing a basis for potential application as a GTR/GBR membrane.

**【Key words】** Biomimetic Fish collagen GTR/GBR membrane Bioactive glass Chitosan Osteogenic differentiation

基金项目 : 国家自然科学基金项目 (31470917) ; 上海市科委项目 (15DZ2290100)  
通信作者 : 孙皎, E-mail: jiaosun59@126.com

牙周组织缺损的功能性修复是牙周治疗的重要挑战。其中,应用引导组织或骨组织再生(GTR/GBR)膜往往是临床上必不可少的治疗手段。然而,目前临床上应用的一些GTR/GBR膜仍存在各自的不足,如聚四氟乙烯等不可吸收性膜需要二次手术取出,而可吸收性膜如聚酯类和胶原基膜虽然表现出良好的生物相容性和细胞亲和性,但往往具有强度不足和降解速率不可控的缺点。据报道牛胶原还可能与疯牛病有关<sup>[1]</sup>,且会受到宗教原因限制。因此,研发一种价廉、安全、兼具有一定抗菌性、能主动诱导牙周组织再生的新型GTR/GBR膜,这对于牙周组织缺损的修复具有重大意义。课题组前期研究发现从罗非鱼皮中来源的鱼胶原,来源广,价格低,富含多种氨基酸,具有良好的细胞亲和性,能促进鼠皮肤伤口愈合<sup>[2]</sup>,且水解罗非鱼胶原具有良好的骨诱导性<sup>[3]</sup>。然而,鱼胶原是否有可能被用于引导牙周组织或骨组织再生领域,目前并不清楚。

理想的GTR/GBR膜不仅应具备主动诱导牙周组织或骨组织再生的能力,同时还具有一定的抗菌性。研究发现:生物玻璃具有广谱抗菌性,良好的成骨活性和成血管性,可用于骨感染的治疗<sup>[4-6]</sup>。壳聚糖对变形链球菌(*S.mutans*)和牙龈卟啉单胞菌(*P.Gingivalis*)等多种口腔细菌有抗菌作用<sup>[7]</sup>。如果能通过材料复合技术,将鱼胶原与生物玻璃和壳聚糖复合制备出一种全新的多功能GTR/GBR膜,将对牙周组织的再生起到重要的促进作用。此外,膜材料的结构特点是生物学功能发挥的关键之一,其中静电纺丝技术制得的膜结构具有高孔隙率和比表面积,能仿细胞外基质(ECM)结构和形态,能促进细胞之间和细胞与基质之间的反应。因此,本研究采用静电纺丝法研制仿生鱼胶原/生物玻璃/壳聚糖复合纳米纤维膜(Col/BG/CS),探讨复合膜对牙周组织修复中的关键细胞——牙周膜韧带细胞(HPDLCs)的粘附、增殖和成骨分化的影响,揭示其发挥成骨作用的可能机制。同时研究其对口腔感染中的主要细菌——变形链球菌的抑菌效果,为该新型罗非鱼Col/BG/CS复合膜作为GTR/GBR膜的应用潜能提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 静电纺鱼Col/BG/CS纳米纤维膜制备

罗非鱼胶原由上海市水产研究所提供。将鱼胶原溶解于六氟异丙醇溶液中得到8%鱼胶原溶液,将4g P123, 6.7g 硅酸乙酯(TEOS), 1.4g  $(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.73g 磷酸三乙酯(TEP)和1g 0.5M HCl溶于60g无水乙醇里,用磁力搅拌器强烈搅拌24h制成生物玻璃前驱液(Si/Ca/P=80:15:5摩尔比)。将壳聚糖溶于六氟异丙醇和三氟乙酸的混合溶液中得到8%壳聚糖溶液。将鱼胶原,生物玻璃前驱液和壳聚糖溶液按照20:1:1的体积比制得混合溶液,然后将聚合物溶液置于注射器中,在高电压作用下,形成静电纺鱼胶原/生物玻璃/壳聚糖复合纳米纤维膜。纤维膜用戊二醛蒸汽交联后保存于真空干燥箱。

### 1.2 鱼Col/BG/CS复合膜表征

采用扫描电镜(SEM)(JEOL, JSM-5600, Japan)观察复合膜的形貌。采用Image J测试复合膜的纤维直径。万能材料试验机(H5K-S, Hounsfield, UK)测定纤维膜的力学拉伸强度和延展性。采用接触角测量仪(OCA40, Dataphysics, Germany)测量接触角。

### 1.3 细胞粘附和活力

选择因正畸原因拔除的人前磨牙,从其牙周膜组织中提取并获得HPDLCs。该方案由上海交通大学医学院附属第九人民医院伦理委员会批准。HPDLCs的分离培养参考Bottino等的方法<sup>[8]</sup>。将HPDLCs按照 $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>接种于含有Col/BG/CS复合膜的24孔板中,玻片作为空白对照组。一部分24h后SEM观察细胞形态。另一部分在24h和72h后采用MTT法,加入5mg/ml MTT(Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA)作用4h,然后加入DMSO溶解结晶,用分光光度计(Labsystems Dragon Wellscan MK3, Finland)在570nm和630nm处测量OD值,评价细胞活力。

### 1.4 PCR试验

将HPDLCs按照 $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>和 $1 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>的密度分别接种于含有Col/BG/CS复合

膜的6孔板中培养3d和10d,玻片作为空白对照组。用RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany)提取RNA后,逆转录为cDNA。用Bio-Rad序列检测系统(MyiQ2, USA)和real-time PCR (SYBR Premix EX Taq, TaKaRa)检测HPDLCs成骨分化相关基因RunX-2和OPN的表达。以GAPDH为内参照,引物见表1。

表1 细胞引物设计

Gene/Oligo Name	Oligo Sequence
RUNX2 forward	AGACCAACAGAGTCAGTGAG
RUNX2 reverse	TGGTGTCACTGTGCTGAAGA
OPN forward	CAGTTGTCCCCACAGTAGACAC
OPN reverse	GTGATGTCCTCGTCTGTAGCATC
GAPDH forward	CTTTGGTATCGTGAAGGACTC
GAPDH reverse	GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT

### 1.5 Western Blot 试验

将HPDLCs按 $1.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>接种于含有Col/BG/CS复合膜的6孔板中,玻片作为空白对照组。接触培养3d后,收集细胞。细胞裂解后提取蛋白,上样到SDS聚丙烯酰胺凝胶。4下用一抗孵育过夜,分别是anti-RUNX-2 (1:600, a rabbit monoclonal antibody, Bioworld, USA), anti-OPN (1:600, a rabbit monoclonal antibody, Bioworld, USA) and  $\beta$ -actin (1:1000, rabbit polyclonal antibodies, Abcam, UK), Western blot方法检测RUNX-2、OPN和 $\beta$ -ACTIN蛋白表达。再经二抗孵育后,用ECL化学发光剂(Millipore, U.S.A.)显影。

### 1.6 抑菌试验

将*S. mutans*按 $1 \times 10^6$  cfu/ml接种于鱼胶原或Col/BG/CS复合膜上,24h后,采用扫描电镜观察细菌形态,同时,取菌液用分光光度计测吸光度值,稀释后取100ul均匀涂在琼脂平板上,37培养24h后计数。计数采用了自动菌落计数仪。

### 1.7 统计学分析

3次独立实验取得的数据表示为均值 $\pm$ 标准差。对各组之间是否具有显著统计学差异进行student-T检验,单因素方差分析和Tukey's多重比较。使用SPSS11.0软件进行数据分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Col/BG/CS 复合膜表征

SEM观察静电纺Col/BG/CS复合膜的形态,由图1A和图1B可见纤维直径为 $(159 \pm 59)$  nm。力学强度为12.87MPa,满足GTR/GBR膜的临床应用的基本需求。复合膜的接触角为 $11.06^\circ$ (图1C),提示复合膜具有良好的亲水性。

### 2.2 细胞粘附和活力

图2A和图2B结果显示,HPDLCs在复合膜上贴附牢固,铺展良好。MTT试验用于检测细胞活力,图3C显示复合膜能促进HPDLCs的活力,表现为生长迅速。

### 2.3 HPDLCs 成骨分化基因的表达

HPDLCs成骨分化基因的表达见图3A和图3B,3d和10d时,Col/BG/CS复合膜能促进成骨分化相关基因RUNX-2和OPN的表达,由此提示

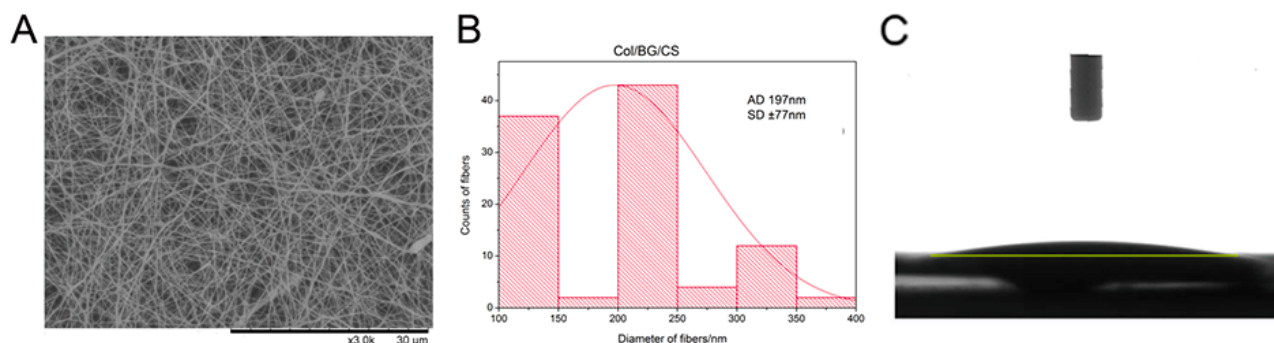


图1 Col/BG/CS 复合膜的表征

注:(A) SEM 图像;(B) 直径图;(C) 接触角

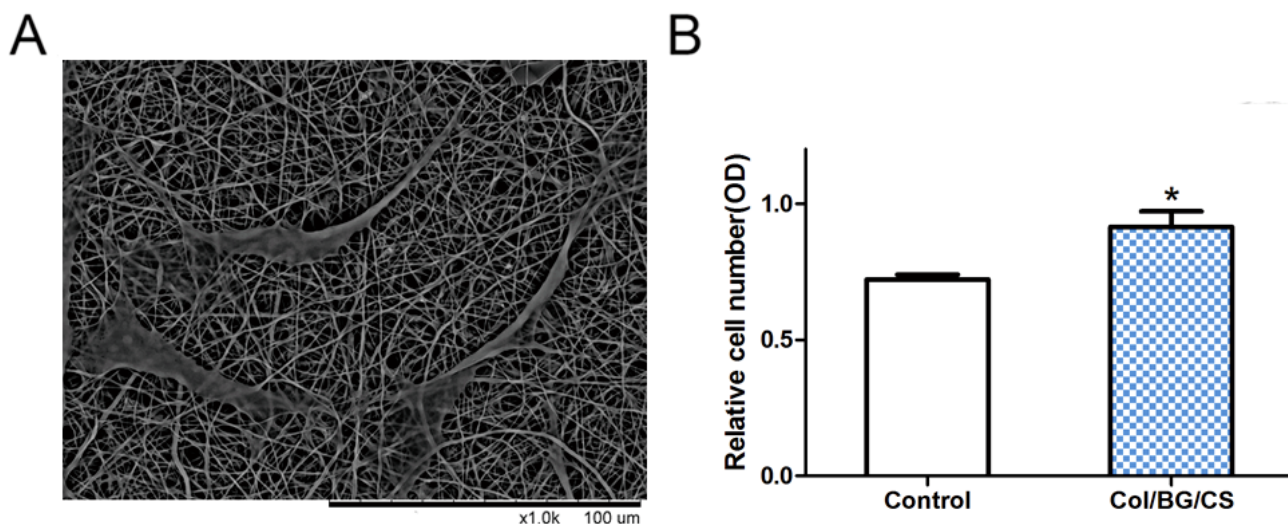


图2 HPDLCs 培养在 Col/BG/CS 复合膜上的细胞粘附和细胞活力

注 : (A) 培养 1d 的 SEM 图像 ; (B) HPDLCs 培养 1d 的细胞活力 ; \*p < 0.05, 代表组间差异有统计学意义

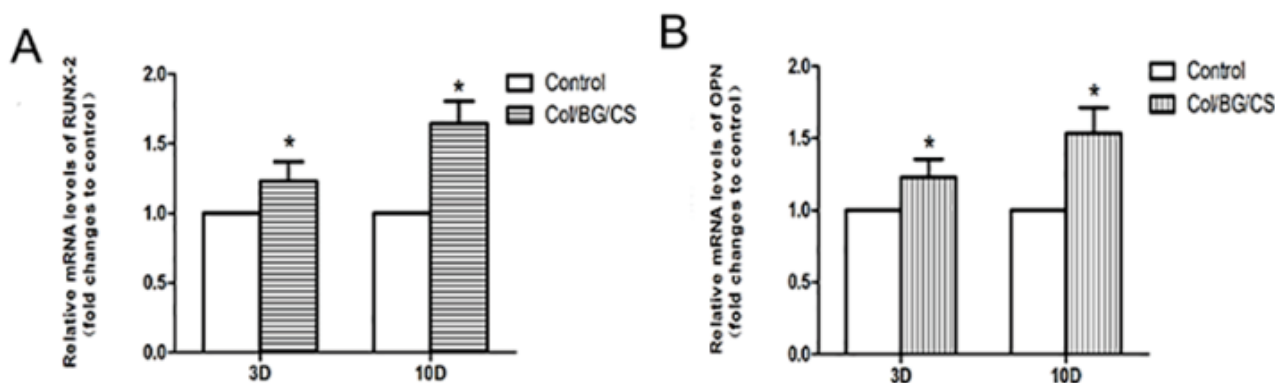


图3 成骨相关基因的表达

注 : (A) RUNX-2 基因表达 ; (B) OPN 基因表达 ; \*p < 0.05, 代表组间差异有统计学意义

复合膜具有促进 HPDLCs 成骨分化的潜能。

#### 2.4 HPDLCs 成骨蛋白的表达

Western blot 检测结果见图 4。由图可见, Col/BG/CS 复合膜能诱导 HPDLCs 内 RUNX-2 和 OPN 的蛋白表达水平上调。

#### 2.5 Col/BG/CS 复合膜的抗菌活性

Col/BG/CS 复合膜的抗菌活性结果见图 5, 图 5A 显示, 复合膜上的 S.mutans 比胶原膜和空白对照组上的更为分散。图 5B 和图 6 显示复合膜上 S.mutans 的数量最少, 提示复合膜对 S.mutans 有一定的抑菌效果。

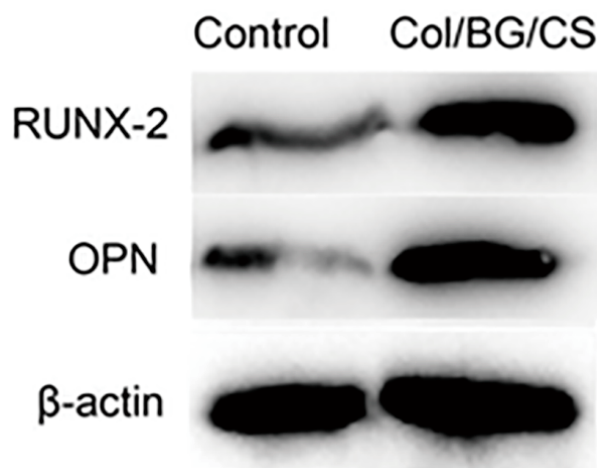


图4 成骨相关蛋白表达

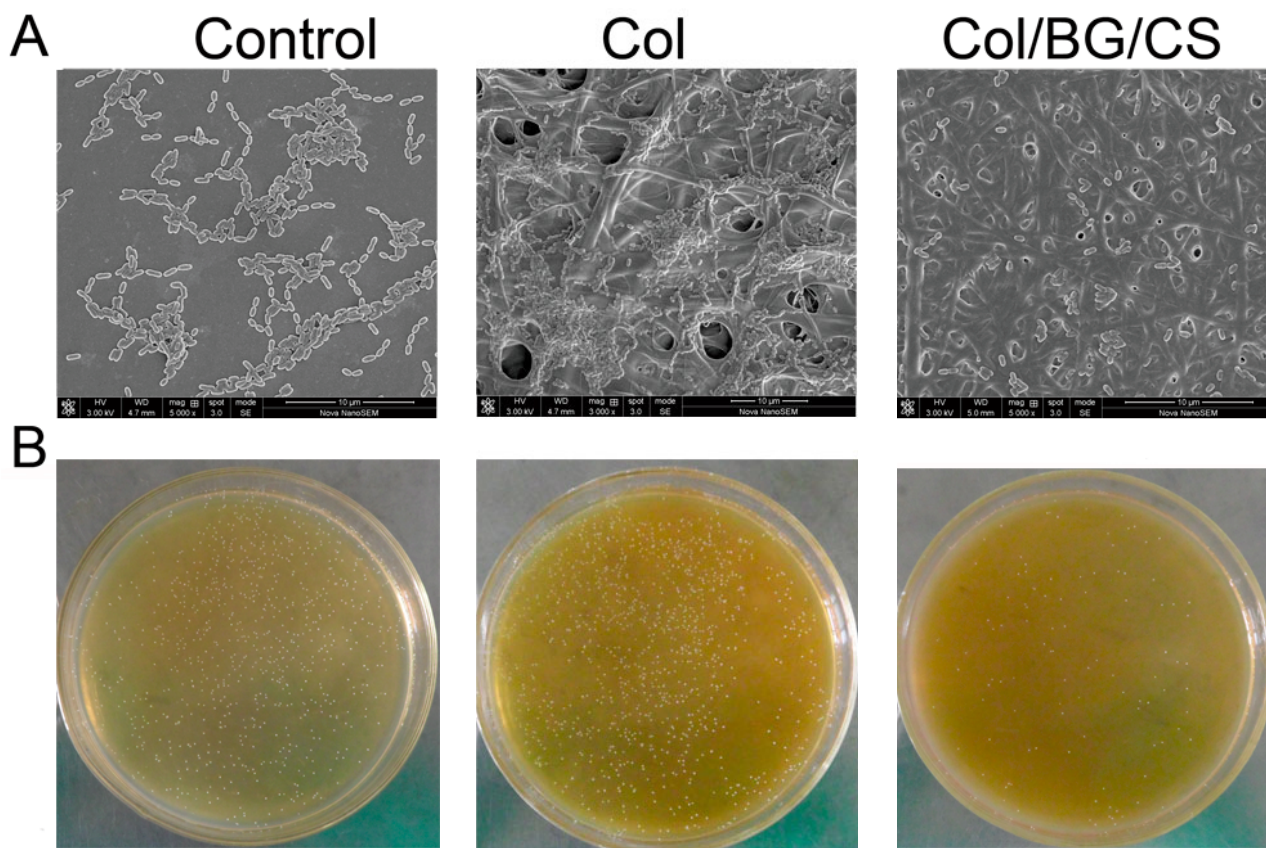


图5 Col/BG/CS复合膜的抗菌活性

注 (A) *S. mutans* 培养 1d 的 SEM 图, 对照组培养在玻片上 (B) *S. mutans* 培养在 AGAR 上 1d

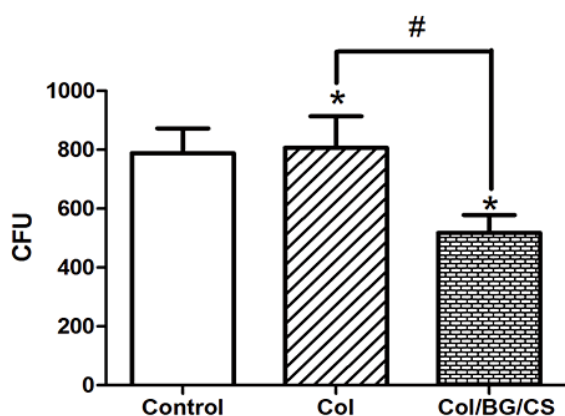


图6 CFU计数

注 \* $P < 0.05$ , 组间有统计学差异

### 3 讨论

鱼胶原作为一种预期用于牙周组织修复的生物材料, 与其他现有的 GTR/GBR 膜一样仍缺乏抗菌性的问题。本研究尝试在鱼胶原中添加生物玻璃和壳聚糖成分, 构建新型的仿生鱼胶原/生物玻

璃/壳聚糖复合膜, 通过研究复合膜的抗菌性和诱导 HPDLCs 成骨分化能力, 揭示其作为新一代综合性能优异的 GTR/GBR 膜的潜能。

由于复合膜在制备过程中, 只有将 3 种材料均匀融合, 才能形成有利于细胞生物学功能发挥的仿生 ECM 结构。因此, 本研究首先通过大量的摸索, 选择合适的配比, 将少量生物玻璃前驱液和壳聚糖溶液加入鱼胶原溶液中完全混合, 成功制成静电纺 Col/BG/CS 复合膜 (图 1A 和图 1B), 该膜具有一定的力学强度, 高于单纯鱼胶原的力学强度 ( $6.72 \pm 0.44$  MPa)<sup>[2]</sup>, 并且能与产品相比较, 如 Bio-Guide® ( $7.75$  MPa)<sup>[8-9]</sup>, 这些特点满足 GTR/GBR 膜的临床应用的基本需求。另外, 选用生物玻璃前驱液作为添加成分制备具有仿生结构的纳米纤维, 是由于生物玻璃具有良好的生物活性。而鱼胶原和添加的壳聚糖成分均含有羧基、羟基和其它亲水基团, 它们能增强复合膜的亲水性。

作为预期用于 GTR/GBR 膜的 Col/BG/CS 复合膜,能否对牙周组织再生过程中参与新骨形成的关键细胞-HPDLCs 起作用呢?由图 2 结果显示:复合膜能促进 HPDLCs 的粘附和增殖,表现为 HPDLCs 在复合膜上贴附牢固,铺展良好,生长迅速。这一现象可能与 Col/BG/CS 复合膜的亲水性有关(图 1C),亲水性表面能调节纤连蛋白等蛋白吸附,增强细胞粘附等行为<sup>[10]</sup>。然而仅仅具有促进 HPDLCs 粘附、增殖的能力是不够的,临床上更需要膜能诱导 HPDLCs 的成骨分化,有效促进牙槽骨的功能性再生。为此,我们进一步研究了 Col/BG/CS 复合膜对 HPDLCs 的促成骨能力。结果发现:3d 和 10d 时,Col/BG/CS 复合膜能促进成骨分化相关基因 RUNX-2 和 OPN 的表达(图 3A 和图 3B)。由此提示复合膜具有促进 HPDLCs 成骨分化的潜能。产生这一效应的原因可能与鱼胶原中富含的甘氨酸、脯氨酸等多种氨基酸能调节细胞功能。另外,复合膜中添加了一定含量的 BG,其中钙,磷等离子能形成磷灰石表面层,促进纤维膜生物活性的发挥。硅离子能刺激成骨细胞分化,可能通过影响胶原的合成和/或稳定促进早期成骨<sup>[11]</sup>。

尽管上述研究提示 Col/BG/CS 复合膜能明显上调 HPDLCs 成骨分化的基因,但这些成骨基因是否最终能转录翻译为蛋白而真正发挥其成骨的功效仍需进一步验证。因此,我们接着重点探讨了复合膜促进 HPDLCs 成骨相关蛋白表达的情况。由图 4 结果显示:复合膜可以诱导 HPDLCs 内 RUNX-2 和 OPN 的蛋白表达水平上调。RUNX2 蛋白作为成骨分化过程中关键的转录因子,可以激活下游相应基因的表达。OPN 被认为能促进细胞粘附到细胞外基质。由此提示 Col/BG/CS 复合膜可以促进 HPDLCs 成骨分化。

口腔通常是个有菌的环境,细菌的存在在一定程度上会干扰 GTR/GBR 膜的功能,因此,如果 Col/BG/CS 复合膜能在发挥良好成骨性能的同时兼有一定的抗菌性,这将具有更大的临床应用潜能。由图 5 结果显示,虽然 Col/BG/CS 复合膜中仅添加了少量的生物玻璃和壳聚糖,但是相比于单纯

的鱼胶原膜,复合膜仍能明显抑制口腔中 *S.mutans* 的粘附和增殖,显示出一定的抑菌效果。我们推测:生物玻璃的抗菌作用可能与静电纺纳米纤维的结构、生物玻璃和壳聚糖的功能有关。首先,静电纺纳米纤维含有的小孔径能有效抵抗细菌的感染<sup>[12]</sup>。第二,生物玻璃的抗菌作用受到它的化学组成和周围溶解环境的影响<sup>[13]</sup>。由于复合膜向培养基中释放了一定含量的钙,磷,硅离子,它们可能影响环境中的渗透压,从而阻碍细菌生长。第三,壳聚糖的抗菌作用可以推测为是由于壳聚糖与微生物细胞外膜的接触<sup>[14]</sup>。Abdel-Rahman RM 等报道含有壳聚糖的无纺布棉织物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有抗菌性,其抗菌作用可能与壳聚糖含有的阳离子和细菌细胞膜的阴离子有关<sup>[15]</sup>。

#### 4 结论

本研究成功研制了一种仿生的 Col/BG/CS 复合膜,这种复合膜对 *S.mutans* 具有一定的抑菌性,能促进 HPDLCs 的粘附、增殖和成骨分化。这一系列生物学现象的发生可推测与 Col/BG/CS 复合膜的仿生 ECM 结构、亲水性和成分相关。

#### 参考文献

- 1 Carruthers J, Carruthers A. Mad cows, prions, and wrinkles. *Archives of dermatology*, 2002,138(5):667-70.
- 2 Zhou T, Wang N, Xue Y, et al. Electrospun tilapia collagen nanofibers accelerating wound healing via inducing keratinocytes proliferation and differentiation. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*, 2016,143:415-22.
- 3 刘超,孙皎.水解罗非鱼胶原促进人牙周膜细胞活力及成骨分化的效应. *口腔材料器械杂志*, 2017, 26(2): 74-78.
- 4 Aurégan J-C, Bégué T. Bioactive glass for long bone infection: a systematic review. *Injury*, 2015,46:S3-S7.
- 5 Hu S, Chang J, Liu M, et al. Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass. *Journal of materials science Materials in medicine*, 2009,20(1):281-6.
- 6 Day RM. Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. *Tissue Engineering*,

(下转第 24 页)

- dental prostheses. *J Prosthetic Dent*, 2009, 101: 239-247.
- 6 翁蓓军, 黄伟昊, 李国强. CAD/CAM 全瓷冠于激光熔覆烤瓷冠边缘适合性的研究. *口腔材料器械杂志*, 2014, 23(4): 185-188.
  - 7 黄伟昊, 焦婷. 氧化锆全瓷冠的临床应用研究进展. *口腔材料器械杂志*, 2011, 20(4): 199-201.
  - 8 Felon DA, Kanoy BE, Bayne SC, et al. Effect of in vivo crown margin discrepancies on periodontal health. *J Prosthet Dent*, 1991, 65(3): 357.
  - 9 Sadowsky SJ. An overview of treatment considerations for esthetic restorations: a review of the literature. *J Prosthet Dent*, 2006, 96(6): 433-442.
  - 10 Wassell RW, Walls AW, Steele JG. Crowns and extracoronary restorations: materials selection. *Br Dent J*, 2002, 192(4): 199-202.
  - 11 Witkowski S, Komine F, Gerds T. Marginal accuracy of titanium copings fabricated by casting and CAD/CAM techniques. *J Prosthet Dent*, 2006, 96: 47-52.
  - 12 Fradeani M, Redemagni M. An 11-year clinical evaluation of leucite-reinforced glass-ceramic crowns: A retrospective study. *Quintessence Int*, 2002, 33(7): 503-510.
  - 13 Kang SH, Chang J, Son HH. Flexural strength and microstructure of two lithium disilicate glass ceramics for CAD/CAM restoration in the dental clinic. *Restor Dent Endod*, 2013, 8(3): 134-140.
  - 14 Gorten M, Girthofer Porbster L. Marginal fit consistency of copy-milled all-ceramic crowns during fabrication by light and scanning electron microscopic analysis in vitro. *J Oral Rehabil*, 1997, 24: 871-881.
  - 15 Kyu-Bok LEE, Charn-Woon PARK, Kyo-Han KIM. Marginal and Internal Fit of All-ceramic Crowns Fabricated with Two Different CAD/CAM Systems. *Dental Materials Journal*, 2008, 27(3): 422-426.
  - 16 Carter SM, Wilson PR. The effect of die-spacing on crown retention. *Int J Prosthodont*, 1996 Jan-Feb; 9(1): 21-9.

(收稿日期: 2016-12-07 修回日期: 2017-10-25)

(上接第 18 页)

- 2005, 11(5-6): 768-77.
- 7 Ji QX, Zhong de Y, Lu R, et al. In vitro evaluation of the biomedical properties of chitosan and quaternized chitosan for dental applications. *Carbohydrate research*, 2009, 344(11): 1297-302.
  - 8 Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, et al. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration--a materials perspective. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 2012, 28(7): 703-21.
  - 9 Coïc M, Placet V, Jacquet E, et al. Mechanical properties of collagen membranes used in guided bone regeneration: a comparative study of three models. *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale*, 2010, 111(5-6): 286-90.
  - 10 Wei J, Igarashi T, Okumori N, et al. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. *Biomedical materials*, 2009, 4(4): 045002.
  - 11 Vahabzadeh S, Roy M, Bose S. Effects of Silicon on Osteoclast Cell Mediated Degradation, In Vivo Osteogenesis and Vasculogenesis of Brushite Cement. *Journal of materials chemistry B, Materials for biology and medicine*, 2015, 3(46): 8973-82.
  - 12 Zahedi P, Rezaeian I, Ranaei Siadat SO, et al. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polymers for Advanced Technologies*, 2010, 21(2): 77-95.
  - 13 Mortazavi V, Nahrkhalaji MM, Fathi MH, et al. Antibacterial effects of sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle on aerobic bacteria. *Journal of biomedical materials research Part A*, 2010, 94(1): 160-8.
  - 14 Xu C, Lei C, Meng L, et al. Chitosan as a barrier membrane material in periodontal tissue regeneration. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*, 2012, 100(5): 1435-43.
  - 15 Abdel-Rahman RM, Abdel-Mohsen AM, Hrdina R, et al. Wound dressing based on chitosan/hyaluronan/nonwoven fabrics: Preparation, characterization and medical applications. *International journal of biological macromolecules*, 2016, 89: 725-36.

(收稿日期: 2016-12-08 修回日期: 2017-01-10)