

缓释骨诱导因子的玉米醇溶蛋白/左旋聚乳酸纳米纤维材料对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

李荣俊^{1△} 张萌² 赵文海³

[摘要] **目的:**探讨缓释骨诱导因子的玉米醇溶蛋白(Zein)/左旋聚乳酸(PLLA)同轴静电纺丝纳米纤维支架对骨髓间充质干细胞(MSCs)成骨分化作用。**方法:**制备载有骨形态发生蛋白-2(BMP-2)和地塞米松(DEX)的壳-核型同轴静电纺丝支架,使用透射电子显微镜(TEM)验证纳米纤维的壳-核结构。分离原代骨髓间充质干细胞并培养,使用扫描电子显微镜(SEM)评估骨髓间充质干细胞的黏附、生长情况。检测碱性磷酸酶(ALP)活性并定量分析,茜素红染色(ARS)检测钙矿化沉积物并定量分析。**结果:**骨髓间充质干细胞经成骨诱导分化后,表现出成骨细胞的特性。透射电子显微镜观察到以玉米醇溶蛋白和左旋聚乳酸为原料,利用同轴静电纺丝技术制备的纳米纤维具有完整的壳-核结构。扫描电子显微镜观察到骨髓间充质干细胞在加载骨形态发生蛋白-2和地塞米松的纳米纤维支架显示出良好的细胞黏附、伸展能力。加载双重诱导因子的 Zein-DEX/PLLA-BMP-2 纳米纤维支架上骨髓间充质干细胞表现出更高的碱性磷酸酶活性和细胞外基质(ECM)矿物沉积,优于对照组。**结论:**以天然生物材料玉米醇溶蛋白和生物高分子材料左旋聚乳酸为原料制备了加载生物活性因子骨形态发生蛋白-2和地塞米松的壳-核结构的新型同轴静电纺丝纳米纤维支架,形成类似细胞外基质样结构,刺激骨髓间充质干细胞早期黏附、增殖、诱导成骨分化,适合骨组织工程的应用。

[关键词] 生物纳米纤维支架;骨髓间充质干细胞;成骨分化;同轴静电纺丝;药物缓释

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2023)05-0001-06

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.230501

Effect of Bone Induction Factor-Loaded Zein/PLLA Scaffolds on Vitro Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells

LI Rongjun^{1△} ZHANG Meng² ZHAO Wenhai³

¹ Department of Orthopedics, Dalian Second People's Hospital, Dalian 116000, Liaoning China;

² Department of Orthopedics, Zhongshan Hospital Affiliated to Dalian University, Dalian 116000, Liaoning China;

³ Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130021, China.

Abstract Objective: To study the effect of Zein/PLLA co-axial electrospun nanofiber scaffold with sustained release of bone induction factor on the osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods:** The core-shell coaxial electrospun scaffolds containing bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and dexamethasone (DEX) were prepared, and the core-shell structure of the nanofibers was verified by transmission electron microscopy (TEM). The primary MSCs were isolated and cultured, and the adhesion and growth of MSCs were evaluated by scanning electron microscopy (SEM). Osteoblast differentiation and mineralization were determined by Alkaline phosphatase (ALP) activity and quantitative assay and Alizarin Red S (ARS). **Results:** MSCs showed osteoblastic characteristics after osteogenic induction and differentiation. TEM observed that the nanofibers prepared by coaxial electrospinning with zein and PLLA as raw materi-

als had a complete shell core structure. SEM observed that MSCs showed good cell adhesion and extension ability in the nanofiber scaffold loaded with BMP-2 and DEX. MSCs on Zein DEX/PLLA-BMP-2 nanofiber scaffold loaded with double inducers showed higher ALP activity and extracellular matrix (ECM) mineral deposition, and were superior to the control group. **Conclusion:** A novel coaxial electrospun nanofi-

基金项目:大连市医学科学研究计划项目(1911024)

¹ 大连市第二人民医院骨科(辽宁 大连,116000)

² 大连大学附属中山医院骨科

³ 长春中医药大学附属医院骨伤科

[△]通信作者 E-mail: lironjun666@163.com

ber scaffold with core-shell structure loaded with bioactive factors BMP-2 and DEX was prepared from natural biomaterials (Zein) and biopolymers (PLLA). It shows ECM like structure, stimulates early adhesion and proliferation of MSCs, induces osteogenic differentiation, and is suitable for the application of bone tissue engineering.

Keywords: bio-nanofiber scaffolds; bone mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; coaxial electrospinning; controlled dual drug release

骨组织工程修复骨缺损或促进骨组织再生,解决自体骨移植的感染和手术并发症,避免异体骨移植的受体免疫反应和传播疾病情况等^[1]。玉米醇溶蛋白(Zein)作为一种天然生物材料,具备良好的生物降解性和生物相容性^[2],利用同轴静电纺丝技术将骨诱导作用的骨形态发生蛋白(BMP)和地塞米松(DEX)分别引入到纳米纤维支架的壳-核结构内,避免生物因子快速释放及失效^[3]。本实验通过验证制备的纳米纤维支架的细胞外基质(ECM)支架仿生结构,在骨形态发生蛋白和地塞米松的协同作用下骨髓间充质干细胞(MSCs)的成骨分化作用,探索新型天然生物材料作为骨组织工程材料的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3 周龄雄性 SD 大鼠 10 只,体重为 60~70 g,购自吉林大学实验动物中心,动物生产许可证号为 SCXK(吉)-2013。实验动物符合实验动物管理协会相关规定操作。

1.2 实验材料

左旋聚乳酸(PLLA, 济南岱罡公司);玉米醇溶蛋白(Zein, 美国 Sigma 公司);骨形态发生蛋白-2(BMP-2, 北京中科物源公司);地塞米松(DEX, 美国 Sigma 公司);茜素红(美国 Sigma 公司);碱性磷酸酶(ALP)染色试剂盒(南京凯基公司)。

1.3 实验仪器

环境扫描电子显微镜(SEM, 美国 FEI 公司);激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司);透射电子显微镜(TEM, 日本 HITACHI 公司);静电纺丝机(北京富友马公司);酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);高效液相色谱

仪(日本 SHIMADZU 公司)。

1.4 方法

1.4.1 大鼠骨髓间充质干细胞的分离和培养 颈椎脱臼法处死动物,在无菌的操作台上取出大鼠股骨和胫骨,用 PBS 中浸洗血液,去除两端的骨软骨,避免标本被软组织污染。把针头插入骨髓腔,用含青霉素和链霉素的 DMEM/F12 培养液,冲洗骨髓腔。用离心管收集骨髓冲洗液,以 1 000 r/min 离心 8 min。用含 10% 血清的 L-DMEM/F12 培养液 10 mL 重悬细胞,接种到 T25 培养瓶中,置于 37 ℃ 恒温、5% CO₂ 培养箱内。细胞传代,实验中取第 2 代骨髓间充质干细胞进行实验。

1.4.2 制备骨诱导因子的壳-核结构的同轴静电纺丝纳米纤维支架 将骨形态发生蛋白-2 先用 1% BSA 固定,再溶解在左旋聚乳酸溶液中,获得 PLLA-BMP-2 溶液。用六氟异丙醇(HFIP)溶解 Zein、PLLA、Zein-DEX 和 PLLA-BMP-2,在 25 ℃ 下搅拌 6 h。将含有骨诱导因子的外层溶液(Zein 或 Zein-DEX)与芯层溶液(PLLA 或 PLLA-BMP-2)以 3:1 比例混合,在设定接收距离的接收板和 15 kV 恒定电压下制备同轴静电纺丝纳米纤维支架(见图 1)。在 25 ℃ 下干燥、备用。根据壳-核结构内不同成分分为不同实验组(见表 1)。

表 1 静电纺丝溶液实验组和壳-核组成部分

分组	壳	核
A	Zein	PLLA
B	Zein-DEX	PLLA
C	Zein	PLLA-BMP-2
D	Zein-DEX	PLLA-BMP-2

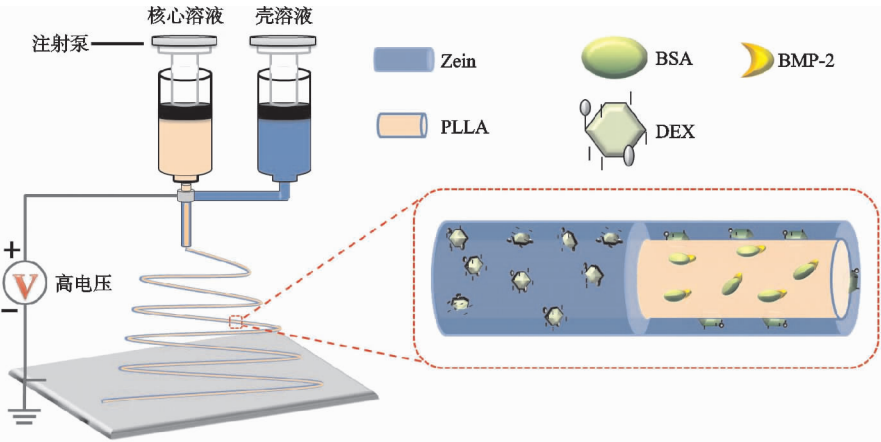


图 1 制备骨诱导因子的壳-核结构的同轴静电纺丝纳米纤维支架示意图

1.4.3 使用 TEM 验证纳米纤维支架的核-壳结构及纤维直径 制备的纳米纤维支架用 TEM(H-7650,日立株式会社,日本)观察纳米纤维的核壳结构,使用纳米测量软件 v1.2(复旦大学)测量纤维直径及其在纳米纤维膜中的分布。

1.4.4 使用扫描电子显微镜评估纳米纤维支架上的骨髓间充质干细胞的生物形态学情况 通过扫描电子显微镜(SEM,S-3400N 日立株式会社,日本)观察骨髓间充质干细胞在 Zein/PLLA、Zein-DEX/PLLA-BMP-2 和空白玻璃爬片上生物学特点。培养 12 h 或 7 d 后,用 4%戊二醛固定、脱水,并在乙醇梯度中冷冻干燥过夜。

1.4.5 静电纺丝纳米纤维支架对骨髓间充质干细胞的成骨分化作用及相关机制的研究

1.4.5.1 碱性磷酸酶(ALP)定性和定量分析:在本研究中,碱性磷酸酶使用 Gomori 染色方法进行染色。细胞接种后 5 d、10 d、15 d 和 20 d,用酒精固定标本 10 min,然后在 25℃下加入 Gomori 试剂。根据制造商的说明书从标准曲线估计蛋白质浓度,从而定量分析碱性磷酸酶表达。

1.4.5.2 研究骨髓间充质干细胞在生物纳米支架上沉积的钙矿化物茜素红染色和定量分析:用茜素红染色由不同静电纺丝支架诱导的钙矿化。7 d、14 d 和 21 d 后,将样品在 4℃下固定在 4%多聚甲醛中,然后在 25℃下浸入 1%茜素红染色溶液中 1 h。使用光学显微镜观察矿化。钙矿化产物用 10%氯化十六烷基吡啶(美国西格玛-奥尔德里奇)水中溶解 10 min。在 562 nm 波段下用酶标仪测量茜素红染色提取物的吸光度,绘制曲线,定量分析。

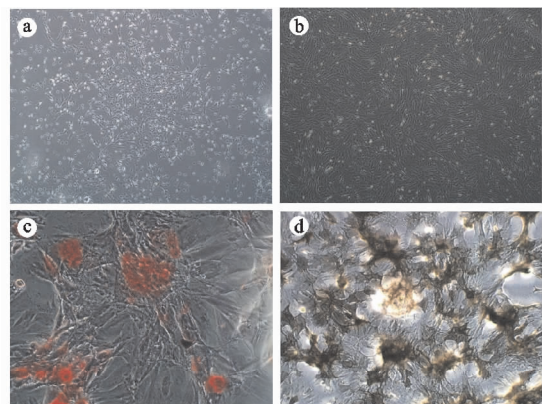
1.5 统计学方法

采用 SPSS25.0 统计软件进行数据分析,所有数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代骨髓间充质干细胞的分离、培养及成骨诱导分化

用密度梯度离心法分离大鼠骨髓间充质干细胞(P_0)(见图 2a),利用贴壁法将分离的骨髓间充质干细胞(P_1)在培养瓶内培养(见图 2b),细胞贴壁后集簇状、螺旋形生长,显示出干细胞的生长特点。将传代后的第二代干细胞成骨诱导培养 3 周,观察细胞沿爬片表面舒展生长,细胞外基质上可见钙化的矿化物,茜素红染色后显示出红色结节,表现出成骨细胞的成骨矿化能力(见图 2c)。成骨诱导后的骨髓间充质干细胞胞浆内高表达碱性磷酸酶,Gomori 法染色后细胞呈现出黑色染色结节,显示细胞的活跃的成骨能力(图 2d)。

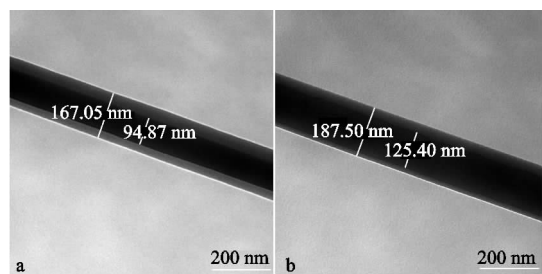


(a) 用密度梯度离心法分离大鼠骨髓间充质干细胞的原始细胞($\times 4$); (b) 用贴壁法分离培养后大鼠骨髓间充质干细胞第一代细胞($\times 4$); (c) 茜素红染色后细胞外基质中可见红色的钙化矿物结节($\times 10$); (d) 对细胞内的碱性磷酸酶进行Gomori法染色,细胞胞浆内呈现出明显的黑色染色物($\times 10$)

图 2 原代骨髓间充质干细胞和成骨诱导分化

2.2 载有骨形态发生蛋白-2 和地塞米松的核-壳型同轴静电纺丝生物材料的验证

利用透射电镜观察制备的静电纺丝纳米纤维支架的同轴壳-核结构,显示加入生物活性因子后纳米纤维支架同轴结构无破坏,Zein/PLLA(见图 3a)和 Zein-DEX/PLLA-BMP-2(800 ng)(见图 3b)都显示出连续的壳-核结构,但加入骨形态发生蛋白-2 和地塞米松后纳米纤维支架的内外侧厚度发生了变化,同轴结构中内层比例增加,内外侧层的边界变得模糊。



(a) Zein/PLLA; (b) Zein-DEX/PLLA-BMP-2(800 ng)纳米支架的纤维均呈现出同轴壳-核结构

图 3 同轴静电纺丝纳米纤维支架的透射电子显微镜图像

2.3 扫描电镜观察骨髓间充质干细胞在纳米纤维支架上的生物形态学情况

骨髓间充质干细胞在 Zein/PLLA(见图 4a)和 Zein-DEX/PLLA-BMP-2(见图 4b)纳米纤维支架上接种 12 h 后,表现出出色的细胞黏附能力。加载生物活性因子的 Zein-DEX/PLLA-BMP-2 上的骨髓间充质干细胞快速地沿支架表面各个方向开始延伸,放大的图像(见图 4c)显示骨髓间充质干细胞沿纤维方向伸出大量的细胞伪足,牢固地固定在纤维支架表面上。在纳米纤维支架上培养 7 d 后,Zein/PLLA(见图 4d)和 Zein-DEX/PLLA-BMP-2(见图 4e)上的骨髓间充质干细胞比玻璃爬片(见图 4f)上铺展得更大,更完整。载有生物活性因子的 Zein-DEX/PLLA-BMP-2

纳米纤维支架上细胞大量增殖,细胞伸展率明显高于 其他实验组。

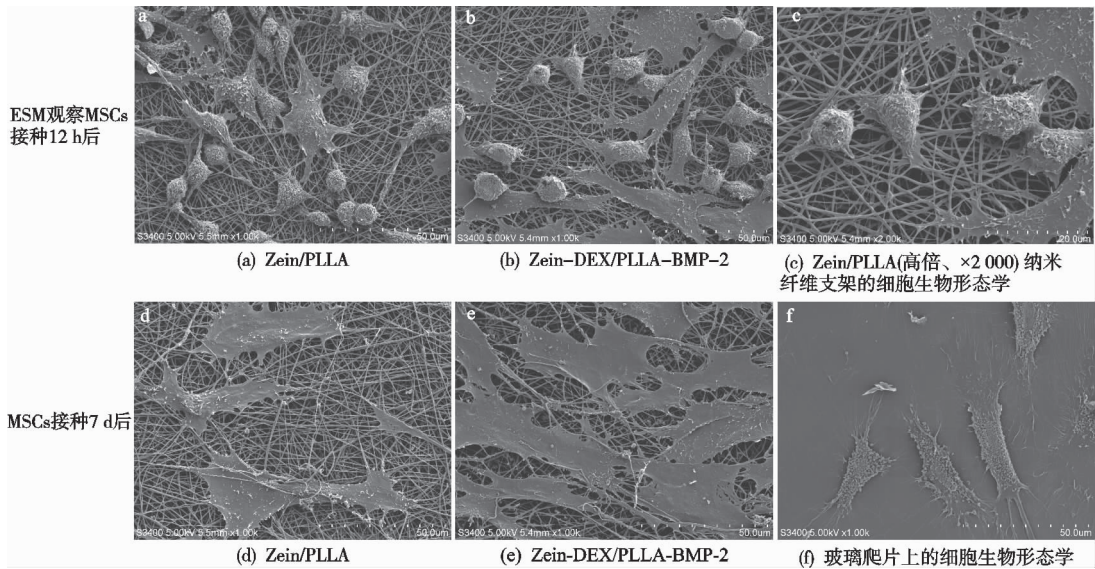
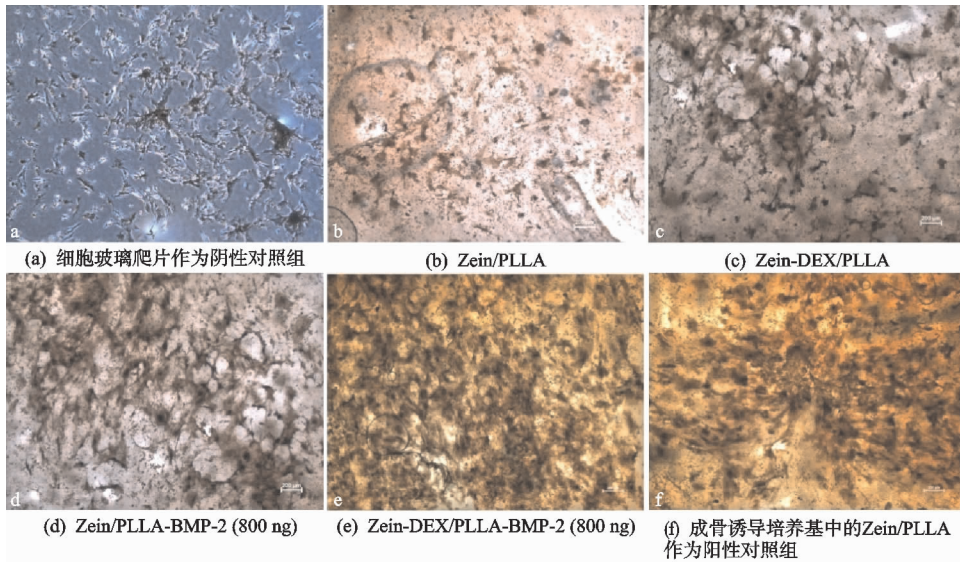


图4 扫描电镜观察纳米纤维支架上的骨髓间充质干细胞形态学变化($\times 1\,000$)

2.4 静电纺丝纳米纤维支架对骨髓间充质干细胞的成骨分化作用

2.4.1 纳米纤维支架上骨髓间充质干细胞诱导分化后碱性磷酸酶表达和定量分析 骨髓间充质干细胞接种 20 d 后,进行 Gomori 法染色(见图 5A),利用成骨

诱导培养液的 Zein/PLLA 阳性对照组(PC)(f)和含有骨形态发生蛋白-2 的纳米纤维支架 Zein/PLLA-BMP-2 (800 ng)(d)、Zein-DEX/PLLA-BMP-2 (800 ng)(e)均可见明显的黑色染色结节,并且同时含有骨形态发生蛋白-2和地塞米松的壳-核结构的纳米



(A) 骨髓间充质干细胞在纳米纤维材料上接种20 d后,细胞内碱性磷酸酶进行Gomori法染色

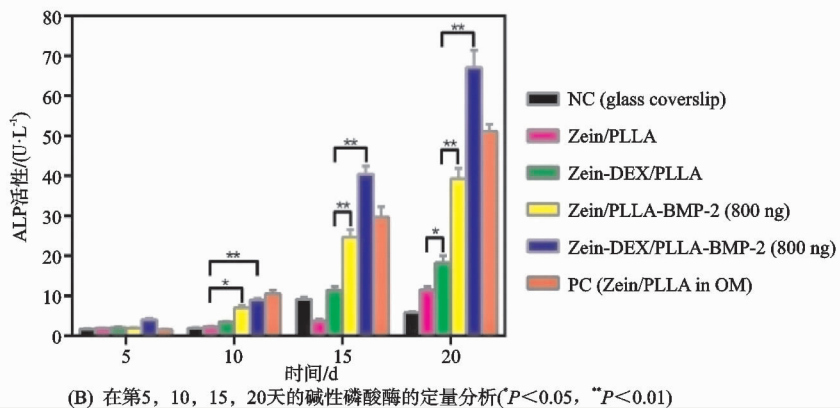


图5 纳米纤维支架上骨髓间充质干细胞诱导分化后碱性磷酸酶表达和定量分析($\times 4$)

纤维支架的碱性磷酸酶表达也优于其他两组,差异有统计学意义($P<0.05$)。分别在 5,10,15,20 d 定量分析碱性磷酸酶的表达(见图 5B),骨髓间充质干细胞培养 10 d 后,加载骨形态发生蛋白-2 的 Zein/PLLA-BMP-2、Zein-DEX/PLLA-BMP-2 和阳性对照组纳米纤维支架上就可以观察到碱性磷酸酶的表达,而其他实验组无明显表达碱性磷酸酶。骨髓间充质干细胞培养 15 d 和 20 d 后,加载生物活性因子骨形态发生蛋白-2 或地塞米松的 Zein-DEX/PLLA(c)、Zein/PLLA-BMP-2(d) 和 Zein-DEX/PLLA-BMP-2(e)纳米纤维支架中碱性磷酸酶表达增加,高于 Zein/PLLA 和阴性对照组(NC)。加载骨形态发生蛋白-2 的纳米纤维支架的碱性磷酸酶表达高于加载地塞米松实验组,而同时加载骨形态发生蛋白-2 和地塞米松的纳米纤维支架的碱性磷酸酶表达明显高于其他实验组,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.4.2 钙盐矿化物的茜素红染色(ARS)和定量分析 骨髓间充质干细胞接种 21 d 后,纳米纤维支架矿化结节进行茜素红染色(见图 6A),双重加载骨形态发生蛋白-2 和地塞米松的 Zein-DEX/PLLA-BMP-2(e) 纳米纤维支架显示出明显的枣红色染色矿化物结节,表明骨形态发生蛋白-2 和地塞米松的协同作用下,纳米纤维支架的类似细胞外基质结构促进了纳米纤维支架的成骨分化作用。在第 7,14,21 天的矿物沉积的定量分析显示(见图 6B),加载生物因子的 Zein-DEX/PLLA(c)、Zein/PLLA-BMP-2(d)、Zein-DEX/PLLA-BMP-2(e)和阳性对照组(f)均显示茜素红染色阳性,与阴性对照组(a)相比,各组差异有统计学意义($P<0.05$),同时加载骨形态发生蛋白-2 和地塞米松的纳米纤维支架与无生物因子加载的 Zein/PLLA 比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

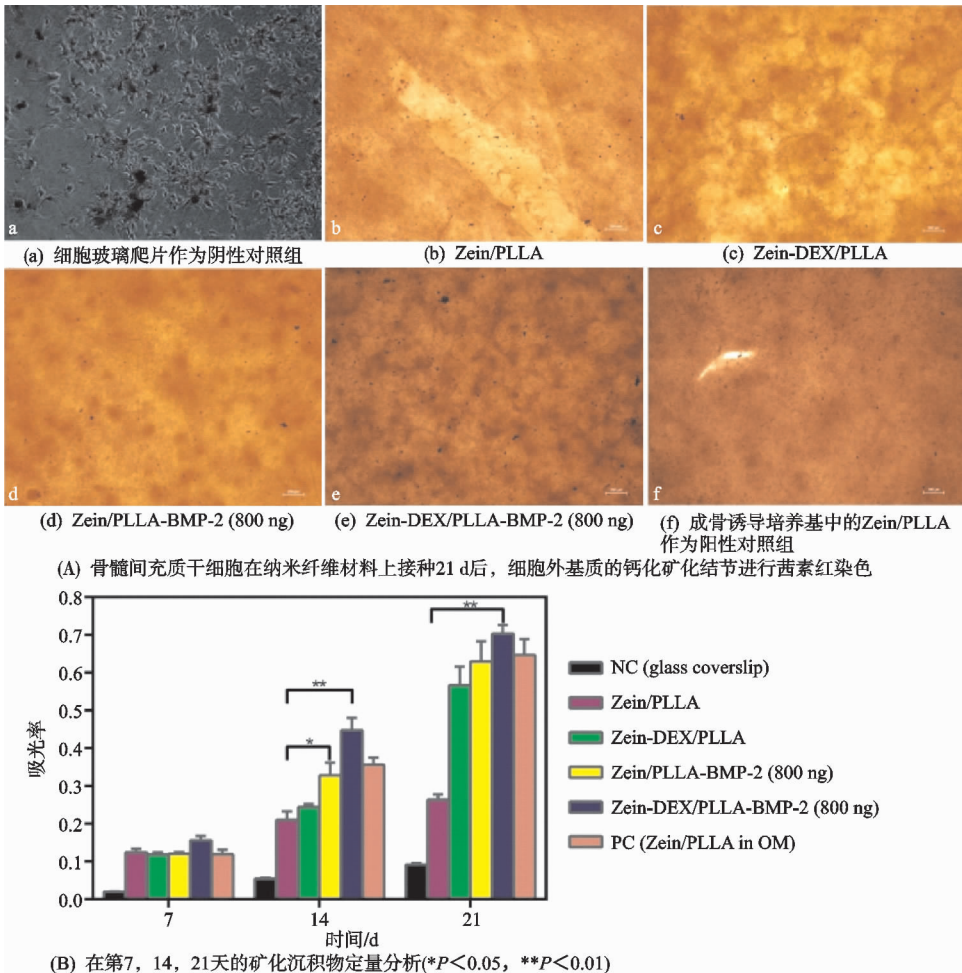


图 6 骨髓间充质干细胞在纳米纤维支架上的钙盐矿化物茜素红染色和定量分析($\times 4$)

3 讨论

在临床诊疗中骨科和矫形外科医生常用自体骨移植、异体骨移植和人工骨移植等方法修复创伤、骨不愈合和病理性改变后的骨缺损^[1,4-5]。自体骨移植由于其良好的骨诱导性可作为治疗骨缺损的首选方案,但自体骨移植来源有限,供区易出现感染等手术并发症,影

响了其广泛应用^[6]。异体骨移植虽然可以克服这些缺点,但受体也会出现感染、排异反应等风险^[7]。

骨组织工程材料为骨缺损的治疗提供了可选择的方案,骨组织工程中生物仿生材料提供了细胞黏附、增殖、分化的类细胞外基质结构。骨组织工程材料的化学组成和物理结构特点也直接影响细胞的生物学行

为,激活细胞相应受体,诱发干细胞成骨分化的不同信号通路。静电纺丝技术可制备微纳米级的纳米纤维支架,通过喷嘴的直径和形状可控制单纤维的形态。静电纺丝技术制备的二维和三维支架可以传递调节细胞行为(包括细胞黏附、增殖、分化)的化学和物理信号^[8-10]。同轴静电纺丝形成的两个不同特性的同芯层克服了生物活性分子失活、快速释放等缺点,将不同生物活性因子加载于不同纤维材料层中,通过改变纤维层的厚度和药物位置来调控其生物因子的释放^[11]。

设计完善的骨组织工程仿生材料应该给细胞周围环境提供可调节细胞生物学行为细胞活性因子。目前在临床应用的在骨生长因子中,骨形态发生蛋白用作骨不愈合和椎体融合的成骨诱导因子^[12]。然而,临床应用中重组人骨形成蛋白(rhBMP)在局部高浓度释放后异位骨化和维持局部有效治疗浓度相关的高成本限制其使用^[13]。另外,在体外成骨诱导实验中地塞米松可与 β -甘油磷酸、抗坏血酸共同作用下诱导骨髓间充质干细胞体外成骨分化^[14-15]。将骨形态发生蛋白-2和地塞米松同时加载到生物材料支架中,控制其缓慢、有序释放,保持细胞外微环境中有效作用浓度,避免生物因子的快速耗尽,可提高生物仿生支架的成骨能力。

制备生物支架的原料应具备一定的形状稳定性、良好的生物相容性、低毒性和可塑性。来自植物的天然生物材料-玉米醇溶蛋白,具备合成聚合物缺乏的高生物降解性、无毒性 and 优异的生物相容性,已作为药物承载、释放和组织再生的载体开始应用^[2]。本实验以玉米醇溶蛋白和左旋聚乳酸为原料,利用同轴静电纺丝技术将具有成骨诱导能力的骨形态发生蛋白-2和地塞米松加载到纳米支架壳-核结构的不同纤维层内。从实验结果可看出,制备的纳米纤维支架的高孔隙率和类似细胞外基质样纤维支架结构有利于细胞黏附和增殖。在制备的纳米纤维支架上接种骨髓间充质干细胞后快速、顺利黏附,细胞沿支架表面各个方向开始延伸,SEM显示骨髓间充质干细胞沿纤维方向伸出大量的细胞伪足,牢固地固定在纤维支架表面上。纳米纤维支架上细胞大量增殖,充分伸展显示出良好的相容性及无细胞毒性。另一方面,Zein-DEX/PLLA-BMP-2纳米纤维支架的双重载药系统表现出良好的释放效能,地塞米松和骨形态发生蛋白-2保持了其生物活性,有顺序地、缓慢持续释放,促使骨髓间充质干细胞表现出良好的成骨分化能力。

综上所述,以天然生物材料玉米醇溶蛋白和生物高分子材料左旋聚乳酸为原料制备了加载生物活性因子骨形态发生蛋白-2和地塞米松的核-壳结构的新型同轴静电纺丝纳米纤维支架,形成类似细胞外基质样结构,刺激骨髓间充质干细胞早期黏附、增殖,诱导成骨分化,适合骨组织工程的应用。

参考文献

- [1] GULATI K, ABDAL-HAY A, IVANOVSKI S. Novel nano-engineered biomaterials for bone tissue engineering[J]. *Nanomaterials* (Basel), 2022, 12(3):333.
- [2] DE MARCO I. Zein microparticles and nanoparticles as drug delivery systems [J]. *Polymers* (Basel), 2022, 14(11):2172.
- [3] DOS SANTOS D M, CORREA D S, MEDEIROS E S, et al. Advances in functional polymer nanofibers: from spinning fabrication techniques to recent biomedical applications[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(41):45673-45701.
- [4] 历龙飞, 张朝旭, 张馨丹, 等. 先进材料在骨缺损修复中的应用研究进展[J]. *中华骨与关节外科杂志*, 2022, 15(1):63-69.
- [5] 邹波, 高秋明, 黄强, 等. 大段骨缺损外科治疗方法的应用研究进展[J]. *山东医药*, 2021, 61(36):91-95.
- [6] MISCH C M. Autogenous bone is still the gold standard of graft materials in 2022[J]. *J Oral Implantol*, 2022, 48(3):169-170.
- [7] YANG P, ZHOU J, AI Q, et al. Comparison of individual tissue-engineered bones and allogeneic bone in treating bone defects: a long-term follow-up study[J]. *Cell Transplant*, 2020, 29:963689720940722.
- [8] GUO Y, WANG X, SHEN Y, et al. Research progress, models and simulation of electrospinning technology: a review[J]. *J Mater Sci*, 2022, 57(1):58-104.
- [9] MADRUGA L Y C, KIPPER M J. Expanding the repertoire of electrospinning: new and emerging biopolymers, techniques, and applications [J]. *Adv Healthc Mater*, 2022, 11(4):e2101979.
- [10] NAYL A A, ABD-ELHAMID A I, AWWAD N S, et al. Recent progress and potential biomedical applications of electrospun nanofibers in regeneration of tissues and organs[J]. *Polymers* (Basel), 2022, 14(8):1508.
- [11] AMEER J M, KUMAR A, KASOJU N. Strategies to tune electrospun scaffold porosity for effective cell response in tissue engineering[J]. *J Funct Biomater*, 2019, 10(3):30.
- [12] RANJBARNEJAD F, KHAZAEI M, SHAHRYARI A, et al. Recent advances in gene therapy for bone tissue engineering [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2022, 16(12):1121-1137.
- [13] HYC A, OSIECKA-IWAN A, MOSKALEWSKI S. Could BMPs therapy be improved if bmps were used in composition acting during bone formation in endochondral ossification? [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18):10327.
- [14] VATER C, KASTEN P, STIEHLER M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells[J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(2):463-477.
- [15] ZHANG Z H, GONG L L, LI M, et al. The osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells induced by nanofiber scaffolds using bioinformatics[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(12):166245.

(收稿日期:2022-11-14)