

学者介绍

Author introduction

上海交通大学医学院

崔文国
研究员、博士生导师
博士

CUI Wen-guo

Ph.D
Professor,
Doctoral Supervisor

ORCID ID: 0000-0002-6938-9582

崔文国 (1980—), 上海交通大学医学院附属瑞金医院 / 上海市伤骨科研究所研究员。2009 年获西南交通大学博士学位, 2013 年赴哈佛大学医学院进修再生医学材料。现任中国生物材料学会骨再生技术专业委员、中国抗癌协会纳米肿瘤学专业委员、中国康复医学会修复重建外科专业委员会青年委员和基础与材料学组委员、中华医学会骨科基础青年委员, 并担任 *Materials Science & Engineering C* 杂志副主编。

• 主要从事基于纳米医用材料的骨和关节等组织重建和疾病治疗研究, 根据疾病治疗方案设计新型生物支架和药物载体。先后主持国家自然科学基金面上项目、重点项目、青年科学基金项目及上海市各类基金 10 余项。相关研究成果以第一作者或通信作者发表论文 (SCI 收录) 80 余篇 (IF>10 的 20 余篇), H=37, 他引 4 000 余次, 单篇最高达 300 余次; 授权专利 13 项, 参编学术专著 9 本。2012 年和 2013 年获教育部高等学校科学研究优秀成果奖二等奖 2 次 (第三完成人) 以及中华医学奖和华夏医学奖等荣誉; 2014 年获上海市科技进步奖一等奖 (第四完成人); 2015 年获中华医学会骨科基础研究学者奖和优秀论文一等奖; 2017 年入选上海市教育委员会高峰高原学科建设计划; 2018 年入选上海市人才发展基金和国家万人计划青年拔尖人才。

CUI Wen-guo born in 1980, professor of Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine and Shanghai Institute of Traumatology and Orthopedics. He received his Ph.D from Southwest Jiao Tong University in 2009 and engaged in advanced studies in regenerative medicine & materials at Harvard Medical School in 2013. He is a specialized member of China Society for Biomaterials for bone regeneration and China Anti-Cancer Association for nanooncology, as well as a member of Youth Committee of Chinese Association of Rehabilitation Medicine for restoration surgery and Chinese Orthopedic Association. He also serves as deputy editor of *Materials Science & Engineering C*.

• Prof. CUI's research focused on the development of novel bioscaffolds and nanomaterials for tissue regeneration, drug delivery and disease treatment. He worked as the principal investigator of 10 projects sponsored by National Natural Science Foundation of China (including Key Program, General

Program and Youth Program) and various grants from Shanghai Municipality. He has published more than 80 SCI papers as the first author or corresponding author (H=37, citation>4 000, including 20 articles with IF>10 and one article with citation over 300 times). He has been granted 13 patents and has published chapters in nine books. He has won the second prize of Outstanding Achievement Award in Science Research of the Ministry of Education for twice as the third accomplisher, Chinese Medicine Prize and Huaxia Medical Prize in 2012 and 2013, the first prize of Shanghai Science and Technology Advancement Award as the fourth accomplisher in 2014, the Orthopedic Basic Research Scholar Award of Chinese Medical Association in 2015. He was enrolled in Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support in 2017 and the National High-level Talents Special Support Plan (Top Young Talents) in 2018, and was supported by the Development Fund for Shanghai Talents in 2018.



论著·基础研究

携载抗菌黏性脂质体的水凝胶构建及促进骨修复的研究

相 宜^{1,2}, 刘立立^{1,2}, 崔文国^{1,2}

1. 苏州大学骨科研究所, 苏州 215000; 2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海市伤骨科研究所, 上海市中西医结合防治骨与关节病重点实验室, 上海 200025

[摘要] **目的**·构建一种携载抗菌黏性脂质体的水凝胶 (A-LIP-PEG), 探究其抗菌及促进骨修复作用。**方法**·基于脂质体和多巴胺的席夫碱反应, 制备黏性脂质体 (A-LIP)。将 A-LIP 和巯基化的聚乙二醇 (4SH-PEG) 混合, 用 Ag⁺ 交联 4SH-PEG 制备复合脂质体水凝胶。通过 A-LIP 对骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) 的包载, 实现 BMP-2 在水凝胶网络中均匀分散和缓慢释放。采用粒度仪考察 A-LIP 的粒径和电位; 采用透射电镜观察 A-LIP 的形态; 采用冲洗黏附实验评估 A-LIP 的黏性; 通过 CCK-8 验证 A-LIP-PEG 的生物相容性; 通过骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶测定及茜素红 S 染色评定其促成骨活性。**结果**·体外研究表明, A-LIP 对软组织有很强的黏附性; A-LIP-PEG 对金黄色葡萄球菌有明显的抑制作用; A-LIP-PEG 具有较脂质体水凝胶 (LIP-PEG) 更显著的促成骨分化作用, 且不影响细胞的增殖。**结论**·该 A-LIP-PEG 在拓宽水凝胶装载和控释药物及抗菌、骨修复方面有良好的前景。

[关键词] 黏性脂质体; 抗菌; 水凝胶; 骨修复

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.09.003 **[中图分类号]** R687.3 **[文献标志码]** A

Fabrication of an antibacterial hydrogel laden with adhesive liposomes for bone repairment

XIANG Yi^{1,2}, LIU Li-li^{1,2}, CUI Wen-guo^{1,2}

1. Institute of Orthopaedics, Soochow University, Suzhou 215000, China; 2. Shanghai Key Laboratory for Prevention and Treatment of Bone and Joint Disease, Shanghai Institute of Traumatology and Orthopaedics, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To construct an antibacterial hydrogel laden with adhesive liposomes (A-LIP-PEG) for bone repair. **Methods**·Adhesive liposomes (A-LIP) were fabricated based on the Schiff-based reaction between dopamine and the liposome. To prepare the liposome composite hydrogel, the A-LIPs were mixed with thiolated polyethylene glycol (4SH-PEG) which was then crosslinked with Ag⁺. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) was loaded in the A-LIPs for its uniform dispersion and sustained release in the hydrogel network. The size distribution and zeta-potential of the A-LIPs were characterized with a particle size analyzer. The morphology of the A-LIPs was observed under transmission electron microscope. Flushing test was employed to examine the viscosity of the A-LIPs, and CCK-8 assay was conducted to demonstrate the biocompatibility of the A-LIP-PEG. Osteogenic activity of the A-LIP-PEG was evaluated by alkaline phosphatase assay and alizarin red S staining in bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Results**·Strong adhesion toward soft tissue of the A-LIPs was indicated by *in vitro* study. A-LIP-PEG showed significant inhibition on *Staphylococcus aureus*. A-LIP-PEG showed superior promotion of osteogenic differentiation to hydrogel laden with liposomes (LIP-PEG), without disrupting cell proliferation. **Conclusion**·The A-LIP-PEG developed in this study shows notable potential to expand the application of hydrogels to drug delivery, antibacteria and bone repair.

[Key words] adhesive liposome; antibacteria; hydrogels; bone repair

骨骼是人的重要器官, 具有造血、运动、储藏矿物质和保护体内器官等功能。创伤、肿瘤、感染、先天性疾病等导致的大段骨缺损疾病, 依靠骨组织的自愈能力无法实现完全修复^[1]。在临床上, 骨移植体主要包括自体骨和同种异体骨。自体骨来源少, 手术过程中容易产生疼痛、出血、感染或瘢痕等并发症^[2]; 自体骨的移植不仅会对患者其他部位造成缺损, 还会增加感染的风险。虽

然同种异体骨具有良好的骨诱导性和来源广泛的优点, 但是会出现免疫排斥反应和增加感染的风险^[3]。因此, 开发优良的用于骨移植的骨修复材料越来越受重视。目前, 骨修复材料主要分为无机物材料 (羟基磷灰石、磷酸钙)、合成高分子聚合物 (聚己内酯、聚乳酸) 和天然高分子材料 (壳聚糖、胶原蛋白)^[4]。骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) 是目前研究最为广泛的

[基金项目] 国家自然科学基金 (51873107); 上海市人才发展资金 (2018099); 上海市教育委员会高峰高原学科建设计划 (20171906); 上海交通大学医学转化交叉基金 (ZH2018ZDA04) (National Natural Science Foundation of China, 51873107; Shanghai Talent Development Fund, 2018099; Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support, 20171906; Shanghai Jiao Tong University “Medical and Research” Program, ZH2018ZDA04)。

[作者简介] 相 宜 (1994—), 女, 硕士生; 电子信箱: xy9408@163.com。

[通信作者] 崔文国, 电子信箱: wgcui80@hotmail.com。

成骨细胞转化因子,能诱导特定的骨膜祖细胞不可逆地分化为软骨和骨细胞^[5]。用纳米材料负载 BMP-2 来进行骨修复已是目前的热点之一。但因 BMP-2 在骨缺损区域快速释放,无法长时间维持有效浓度,导致临床效果不佳。因此,开发负载 BMP-2 的组织黏性纳米材料越来越被关注。此外,由细菌引起的术后感染,对于骨移植手术仍然是一个挑战。目前,抗菌骨移植替代物主要分为无机抗菌骨修复材料和有机抗菌骨修复材料。无机抗菌材料主要以负载抗生素的羟基磷灰石和磷酸钙研究最为广泛,具有优良的生物相容性。以负载抗生素的骨水泥为代表的有机抗菌材

料具有优良的机械强度。但 2 类材料大多负载抗生素,一方面会引起细菌的耐药性,另一方面抗生素容易快速释放,达不到长期抗菌的效果。

基于此,我们构建了一种抗菌黏性脂质体水凝胶(A-LIP-PEG,图 1)来促进骨修复。负载 BMP-2 的 A-LIP-PEG 中脂质体末端的邻苯双酚会对组织产生黏附作用,从而缓释 BMP-2。由于 A-LIP-PEG 中 Ag^+ 与巯基化的聚乙二醇(4SH-PEG)之间的化学键作用,所以能缓释 Ag^+ ,避免抗生素滥用的问题。因此,A-LIP-PEG 在骨修复方面有良好的应用前景。

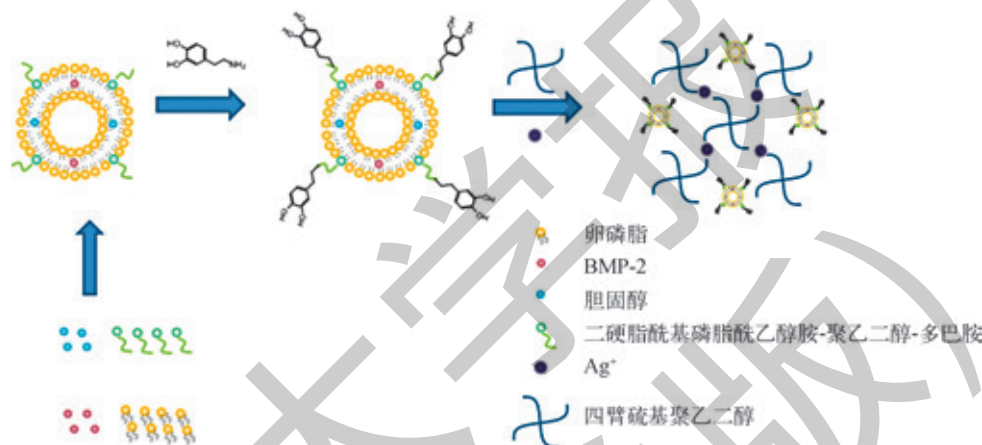


图 1 A-LIP-PEG 形成的示意图

Fig 1 Schematic formation of A-LIP-PEG

1 材料与方法

1.1 实验材料

卵磷脂(批号为 S30870,源叶生物)、胆固醇(批号为 A0369775,Acros)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-醛基(DSPE-PEG-CHO,批号为 A1822081,阿拉丁)、氯仿(批号为 20160523,上海凌峰)、多巴胺(CAS 号为 62-13-7,阿法埃莎)、4SH-PEG(批号为 TZQ09095,Creative PEG Works)、硝酸银(批号为 20170808,国药)、BMP-2(批号为 MSA5518011,R&D Systems)、香豆素-6(CAS 号为 38215-36-0,Sigma-Aldrich)、CCK-8 试剂盒(货号为 CK04,Dojindo)、BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色试剂盒(批号为 C3206,碧云天)、茜素红 S 染色液(批号为 MKCC2711,Sigma-Aldrich)、SD 大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导培养基(批号为 RASMIX-90021,赛业生物)、 α -MEM 培养基(批号为 AD16700296,Hyclone)。

1.2 黏性脂质体的制备和表征

1.2.1 黏性脂质体的制备 薄膜分散法用于制备装载

BMP-2 的黏性脂质体(A-LIP)。简而言之,将卵磷脂/胆固醇/DSPE-PEG-CHO(4:1:0.1,质量比)配制成磷脂-氯仿溶液。用旋转蒸发仪在 50 r/min(离心半径 4.5 cm)和 60 °C 下蒸发,在圆底烧瓶中形成薄膜。随后,用预热的含有 0.3 μg BMP-2 和 0.1 mg/mL 多巴胺的 2 mL 去离子水在 25 °C、50 r/min(离心半径 4.5 cm)下对薄膜进行水合。将产物超声处理并分别通过具有 450 nm 和 220 nm 孔径的聚碳酸酯膜过滤器挤出,以获得 BMP-2 浓度为 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的装载 BMP-2 的 A-LIP。以类似方式制备普通脂质体(LIP),但磷脂-氯仿溶液中不含 DSPE-PEG-CHO。荧光黏性脂质体(FI-A-LIP)和荧光脂质体(FI-LIP)以类似方法制备,但在配制磷脂-氯仿溶液时额外加入 200 μL 1 mg/mL 香豆素-6 的乙醇溶液。

1.2.2 脂质体的表征 分别取适量 A-LIP 和 LIP 溶液稀释至合适浓度,通过动态光散射粒度分散仪(Nano-ZS90,Malvern,英国)对其粒径分布以及电位进行测量。将铜网放在覆有滤纸的表面皿中,分别滴加 20 μL A-LIP 和 LIP 溶液于铜网上。当铜网上的溶剂挥干后,采用透射电子显微镜(Tecna G-20,FEI,美国)观察脂质体形态。

为了量化脂质体的黏附性,将香豆素-6 标记的 FI-A-LIP 和 FI-LIP 分别在赖氨酸包被的 48 孔板中 37 °C 孵育 30 min^[7]。孵育后,用 PBS 洗涤 48 孔板,除去 FI-LIP。除去所有液体后,将 500 μ L DMSO 加入到 48 孔板中,溶解黏附在孔板表面的 FI-A-LIP。将该板用铝箔包裹并置于摇床里 10 min,随后,使用荧光分光光度计在 513 nm 下测量荧光强度,激发波长为 470 nm。

1.3 脂质体水凝胶的制备和表征

1.3.1 脂质体水凝胶的制备 称取 4SH-PEG 25 mg,将其溶解于 175 μ L A-LIP 中,待充分溶解后,加入 75 μ L 硝酸银交联,得到 A-LIP-PEG。称取 4SH-PEG 25 mg,将其溶解于 175 μ L LIP 中,待充分溶解后,加入 75 μ L 硝酸银交联,得到 LIP-PEG。

1.3.2 脂质体水凝胶的表征 用柯比鲍尔技术测试水凝胶抗菌能力^[8]。简而言之,将 10 mL 金黄色葡萄球菌(金葡菌,在 600 nm 的 *D* 值约 0.07)分散到 LB 琼脂平板上;分别将 A-LIP-PEG 和 LIP-PEG 置于琼脂平板上,并在 37 °C 下温育 24 h;孵育后,观察水凝胶样品周围的抑菌环。

利用扫描电子显微镜(s-4800, Hitachi, 日本)对冷冻干燥后的水凝胶进行评价。切取冷冻干燥 2 d 的 A-LIP-PEG 和 LIP-PEG 的薄片(0.5 cm \times 0.5 cm \times 0.1 cm)固定在导电板上,然后,采用离子溅射仪(SC7620, Quorum, 英国)对其进行 60 s 喷金处理,最后利用扫描电子显微镜采集图像。

1.4 细胞实验

1.4.1 材料生物相容性观察 使用 CCK-8 法测定小鼠胚胎成骨细胞前体细胞(MC3T3-E1)的增殖。收集 A-LIP-PEG 和 LIP-PEG 的浸出液,考察其对 MC3T3-E1 细胞活力的影响。使用各组的浸出液于 96 孔板中培养 MC3T3-E1 细胞(2 000 个/孔),以使用 α -MEM 培养基培养的 MC3T3-E1 作为对照组,分别于第 1、3、5 日使用 CCK-8 检测 MC3T3-E1 的活力^[10]。具体过程为:去除培养液,用 PBS 清洗 3 次,接着每个孔中加入 100 μ L 培养基和 10 μ L CCK-8 试剂,放入培养箱 2 h。然后,用酶标仪在 450 nm 波长下检测吸光度。

收集 A-LIP-PEG 和 LIP-PEG 的浸出液,使用各组的浸出液于 24 孔板中培养 MC3T3-E1 细胞(30 000 个/孔),以使用 α -MEM 培养基培养的 MC3T3-E1 细胞作为对照组。培养 2 d 后,去除培养液,用 PBS 清洗 3 次,将 200 μ L 活死染色溶液(5 μ L 钙黄绿素、20 μ L 溴乙非啶豪

莫二聚体、10 mL PBS)加入到每个孔中,室温避光孵育 30 min,去除染色溶液,PBS 清洗 3 次,用荧光显微镜采集图像。

1.4.2 碱性磷酸酶测定 将小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)(30 000 个/孔)接种在 24 孔 Trans-well 板中,并用 α -MEM 培养基对其进行培养。24 h 后,将 50 mg 的 A-LIP-PEG 或 LIP-PEG 放于 Trans-well 板的上部隔室中,以不加入材料的 BMSC 作为对照组,并用成骨诱导培养基替代 α -MEM 培养基。培养 7 d 后,用 PBS 洗涤 3 次,然后用无水乙醇于室温下固定细胞 30 min,随后用去离子水洗涤 3 次,加入碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染液。在室温下避光孵育 30 min 后,用蒸馏水洗涤,用显微镜采集图像。

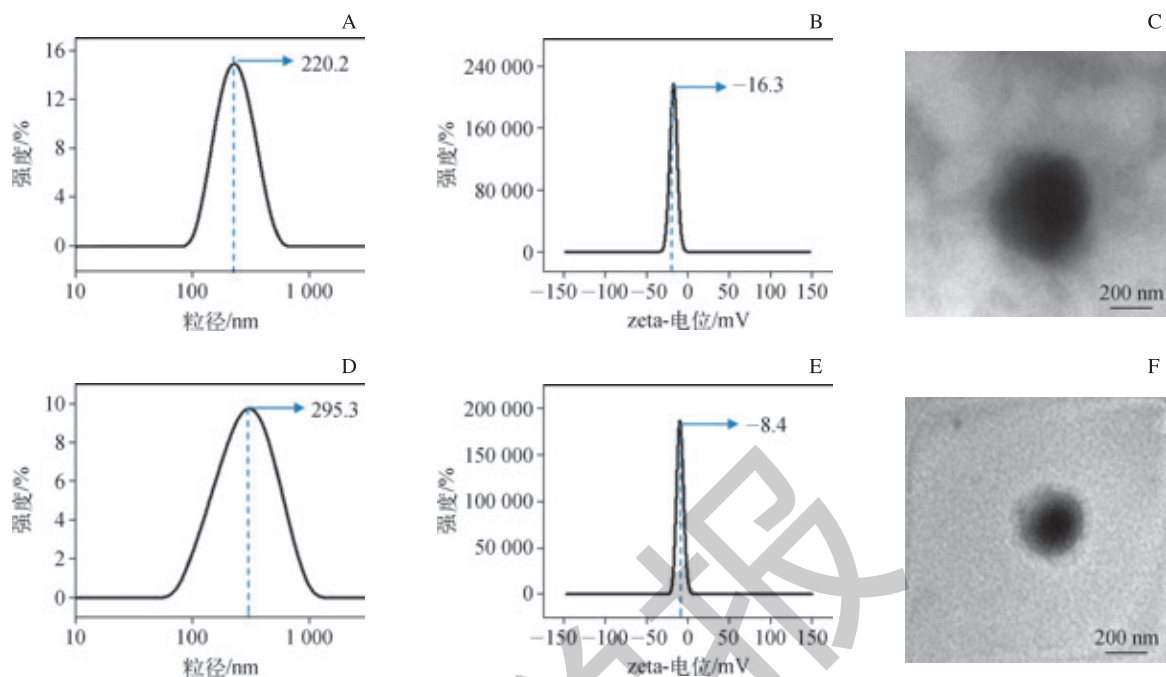
1.4.3 茜素红 S 染色 将 BMSC(30 000 个/孔)接种在 24 孔 Trans-well 板中,并用 α -MEM 培养基对其进行培养。24 h 后,将 50 mg 的 A-LIP-PEG 或 LIP-PEG 放于 Trans-well 板的上部隔室中,以不加入材料的 BMSC 作为对照组,并用成骨诱导培养基替代 α -MEM 培养基。21 d 后,用 PBS 洗涤 3 次,然后用 4% 多聚甲醛溶液于室温下固定细胞 30 min,随后用去离子水洗涤 3 次,加入茜素红 S 染液。在室温下孵育 10 min 后,用蒸馏水洗涤,用显微镜采集图像。

2 结果

2.1 脂质体的观察

利用粒度分散仪和透射电子显微镜对 A-LIP、LIP 的粒径分布、电位、形态进行了测量。A-LIP 的平均粒径为 220.2 nm,多分散系数(polydispersion index, PDI)为 0.205,说明粒径分散性良好(图 2A);A-LIP 的平均电位为 -16.3 mV(图 2B);A-LIP 具有圆形的外观,而且 A-LIP 周围有黑色絮状物包裹,可能是因为多巴胺被修饰到了脂质体表面(图 2C)。LIP 的平均粒径为 295.3 nm, PDI 为 0.222,说明粒径分散性良好(图 2D);LIP 的平均电位为 -8.4 mV(图 2E);LIP 具有圆形的外观(图 2F)。

FI-A-LIP 和 FI-LIP 的黏性结果显示:FI-A-LIP 组荧光强度为(832.0 \pm 63.9) A.U.,FI-LIP 组荧光强度为(397.3 \pm 43.7) A.U.,2 组之间差异有统计学意义($P=0.000$)。FI-A-LIP 的儿茶酚基团会和赖氨酸反应,故可以黏附赖氨酸。在用 PBS 洗涤除去非黏性荧光脂质体(FI-LIP)后,FI-A-LIP 仍黏附于赖氨酸包被的 24 孔板,这导致 FI-A-LIP 组具有比 FI-LIP 更高的荧光强度。根据上述结果,FI-A-LIP 对组织有较强的黏附能力。



注: A. A-LIP 粒径分布; B. A-LIP zeta- 电位分布; C. A-LIP 透射电子显微镜结果; D. LIP 粒径分布; E. LIP zeta- 电位分布; F. LIP 透射电子显微镜结果

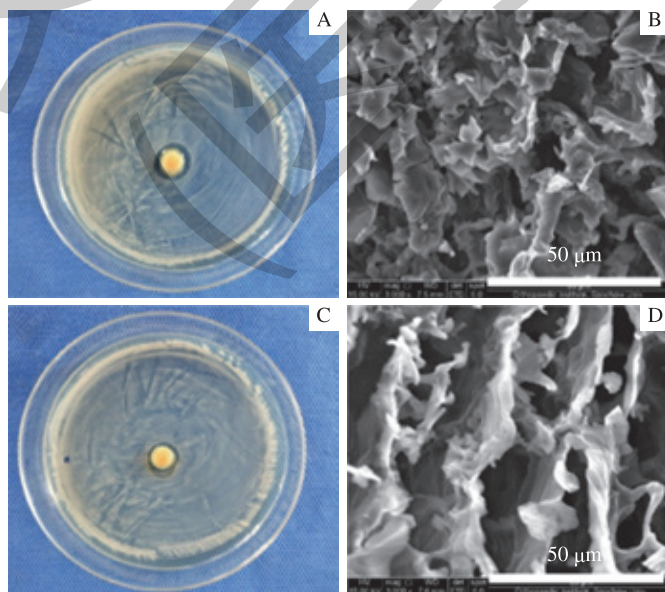
图 2 A-LIP 及 LIP 的粒径分布、电位、形态

Fig 2 Particle size distribution, zeta-potential and morphology of A-LIP and LIP

2.2 脂质体水凝胶的观察

图 3A 和图 3C 分别是 A-LIP-PEG 和 LIP-PEG 的抗金葡菌结果, 2 组都出现了明显的抑菌环, 说明 A-LIP-PEG 和 LIP-PEG 对金葡菌都有明显的抑制作用。但是 A-LIP-PEG 组的抑菌环较 LIP-PEG 组的抑菌环大, 说明 A-LIP-PEG 组对金葡菌的抑制能力强于 LIP-PEG 组。图

3B 和图 3D 分别为 A-LIP-PEG 和 LIP-PEG 的扫描电子显微镜结果, A-LIP-PEG 的排布不如 LIP-PEG 有序, LIP-PEG 呈现出片状的微观结构, 而 A-LIP-PEG 的片状微观结构不明确。未能修饰到脂质体上的多巴胺可能降低水凝胶内部的交联度, 但未影响水凝胶的整体交联与宏观性能。



注: A. A-LIP-PEG 抑菌环; B. A-LIP-PEG 的扫描电子显微镜图; C. LIP-PEG 抑菌环; D. LIP-PEG 的扫描电子显微镜图

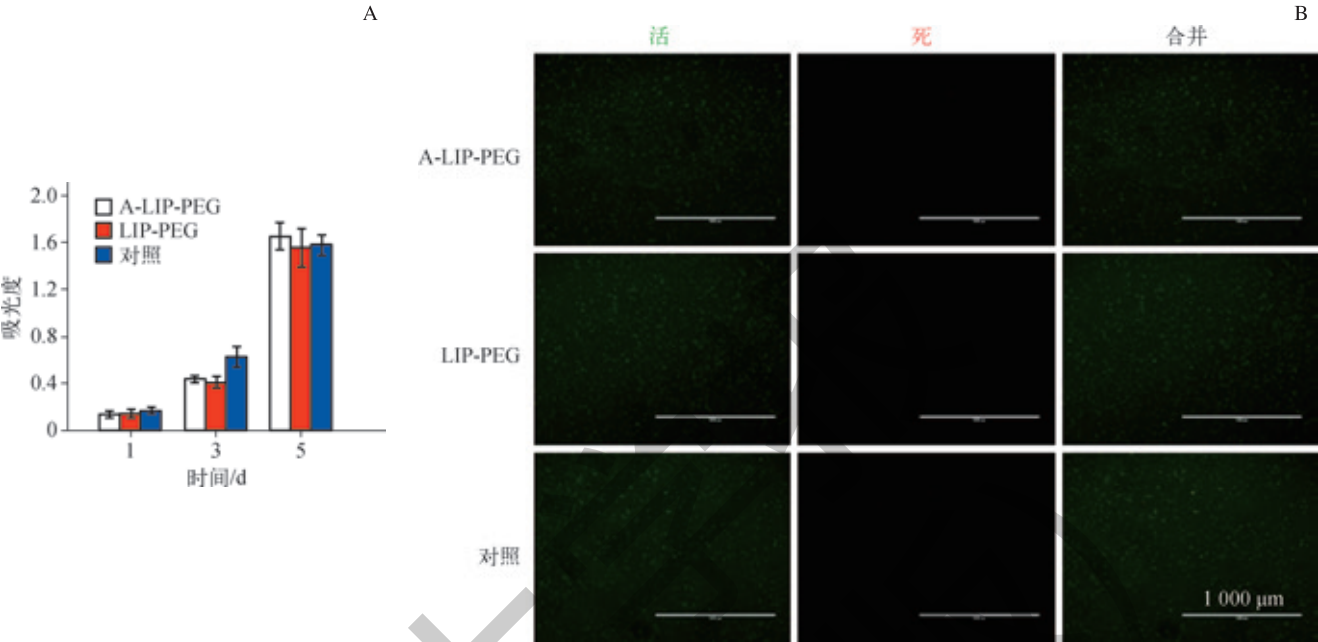
图 3 A-LIP-PEG 及 LIP-PEG 的抑菌作用和微观结构

Fig 3 Bacteriostasis and microstructure of A-LIP-PEG and LIP-PEG

2.3 脂质体水凝胶的生物相容性

为了证明 A-LIP-PEG 的生物相容性, 使用 CCK-8 定量考察 MC3T3-E1 的增殖。在第 3 日, A-LIP-PEG 组的 *D* 值略低于对照组, 但是各组之间的 *D* 值没有明显的

差别 (图 4A)。图 4B 为细胞活死染色结果, A-LIP-PEG 组、LIP-PEG 组和对照组没有明显的差别, 进一步证明了 A-LIP-PEG 的生物相容性。

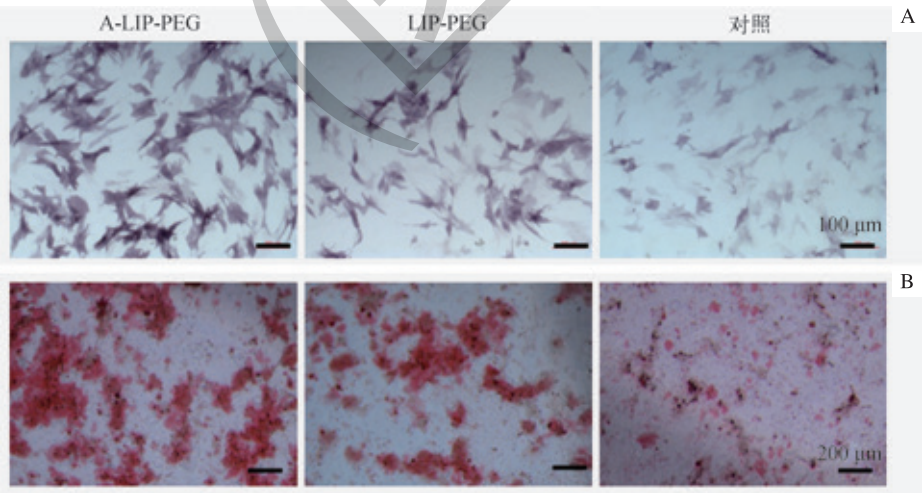


注: A. A-LIP-PEG 和 LIP-PEG 浸出液的 CCK-8 结果; B. A-LIP-PEG 和 LIP-PEG 浸出液的活死细胞染色结果
图 4 A-LIP-PEG 和 LIP-PEG 的生物相容性
Fig 4 Biocompatibility of A-LIP-PEG and LIP-PEG

2.4 脂质体水凝胶的促成骨分化作用

为了考察 A-LIP-PEG 和 LIP-PEG 的前期促成骨能力, 通过检测 ALP 活性来对 A-LIP-PEG 和 LIP-PEG 的成骨分化能力进行评估。A-LIP-PEG 组的 ALP 活性高于其他 2 组 (图 5A), 也证明了 A-LIP-PEG 的前期促成骨能力强

于 LIP-PEG。通过检测钙结节的表达水平来评估 A-LIP-PEG 和 LIP-PEG 的后期促成骨能力。A-LIP-PEG 组的钙结节表达水平高于 LIP-PEG 组和对照组 (图 5B)。这些结果都证明 A-LIP-PEG 是理想的促成骨分化材料。



注: A. ALP 染色; B. 茜素红 S 染色
图 5 A-LIP-PEG 和 LIP-PEG 的促成骨分化能力
Fig 5 Osteogenic differentiation capacity of A-LIP-PEG and LIP-PEG

3 讨论

水凝胶是由两亲性高分子交联聚合形成的以水为分散介质的网络体系^[11], 根据其原料来源, 可分为天然水凝胶和人工合成水凝胶。前者往往具有良好的生物相容性, 因而易于作为组织工程支架、组织修复材料得以应用; 后者在理化性能调节和功能性的建立上具有更大的潜能, 因而也在生物医学领域备受关注。在人工合成水凝胶材料中, 基于聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 高分子的水凝胶基材备受关注。PEG 无刺激性, 毒性轻微, 性质稳定不易变质, 作为生物材料具有良好的安全性, 已广泛作为注射剂、栓剂、软膏剂等的辅料应用于制药领域。此外, PEG 分子结构含有的丰富的羟基, 可以作为化学反应位点对其自身进行修饰来赋予其更多作为生物医学材料所需的性能。例如, 基于丙烯酰氯与 PEG 链上的羟基之间的酯化反应, 可以合成具有光引发自由基聚合交联性能的聚乙二醇二丙烯酸酯 (polyethylene glycol diacrylate, PEGDA); 利用光交联过程良好的可操纵性和对反应条件的低选择性, 可以制备各种所需形态的水凝胶, 如微球、多孔支架等^[12]。然而, 自由基聚合反应在 PEGDA 分子间形成了不可逆且非常稳定的 C-C 共价键, 导致 PEGDA 及类似材料在受到外力破坏时会出现不可逆的损伤。这种不稳定性大大影响了水凝胶生物材料的寿命, 限制了它作为组织修复材料的功能, 特别是在骨组织修复这样需承受较大应力的场景中的应用。

为了延长水凝胶材料的使用寿命, 交联机制更加灵活的基于非共价交联的水凝胶应运而生。基于银离子 (Ag^+) 和巯基 (-SH) 之间的可逆的配位反应, 本研究制备了一种 Ag^+ 交联的巯基化 PEG (4SH-PEG) 水凝胶。文献报道及本课题组的前期研究^[14]表明, 基于这种交联方式的 PEG 水凝胶不仅具有一定的力学强度, 并且具备自愈合性能, 在受到外力破坏后, 可自发恢复其原有形貌。然而, 这种水凝胶沿袭了 PEG 生物惰性的特点, 无法为组织修复提供生物活性。因此, 本研究在 PEG 水凝胶中复合了装载有 BMP-2 的脂质体 (LIP), 利用脂质体水凝胶的双重缓释作用在局部持续递送 BMP-2 以促进骨修复。同时, 为了进一步延长从 PEG 中释放出的脂质体在给药局部的滞留时间, 使其不随体液流动迅速流失, 本研究对脂质体表面进行改性, 使之对组织具有高度黏附性。贻贝对岩石、船体等的高度黏附性在黏附性生物材料的设计中备受关注, 其黏附主要依赖于足丝分泌的贻贝黏蛋白中的正电荷和邻苯二酚结构。受贻贝黏蛋白的黏附性机制启发, 本文通过席夫碱反应对脂质体表面进行多巴胺接

枝, 利用多巴胺单体的邻苯二酚结构对组织的黏附性^[8, 15], 制得黏附性脂质体 (A-LIP), 脂质体可在自 PEG 水凝胶中释出后在组织局部长时间滞留, 提高药物的生物利用度。

结果表明 (图 2A、D), A-LIP 和 LIP 都具有较为均一的粒径分布。A-LIP 平均粒径较 LIP 小, 可能是由于表面接枝的多巴胺对粒度分散仪的测定有一定的掩蔽作用。LIP 表面带有微弱的负电荷, 而 A-LIP 表面负电荷稍有增强 (图 2B、E), 这一现象与多巴胺单体的邻苯二酚结构可在水中解离后形成 OH^- 的性质相吻合。A-LIP (图 2C) 的透射电子显微镜图像较 LIP (图 2F) 周围多出了黑色絮状物, 这进一步印证了 A-LIP 表面多巴胺的成功接枝。为了验证多巴胺接枝对脂质体在组织表面滞留的增强作用, 进行了冲洗试验。在聚赖氨酸包被的孔板中, A-LIP 由于表面多巴胺的黏附作用, 可在 PBS 洗涤后仍然留在孔板中; 而 LIP 没有这种黏附作用, 因此更易脱落。在脂质体表面用 FITC 进行荧光标记, 可以用 PBS 洗涤后的残留荧光强度对 A-LIP 的黏附和滞留作用进行定量。如图 3C 所示, FI-A-LIP 的荧光强度显著高于 FI-LIP, 数值几乎是后者的 2 倍, 说明表面多巴胺的接枝显著提高了脂质体在组织表面的滞留时间, 而这种性能对于具有药物缓释作用的脂质体而言, 有助于其生物利用度的提升。

随后, A-LIP 或 LIP 与 4SH-PEG 共混, 用 Ag^+ 交联, 分别制备成 A-LIP-PEG 和 LIP-PEG 水凝胶。A-LIP-PEG 和 LIP-PEG 在冻干后皆成典型的水凝胶内部多孔微观结构 (图 3B、D)。体外成骨考察则印证了 PEG 水凝胶装载 A-LIP 的滞留作用对 BMP-2 生物利用度及组织修复的提升作用 (图 5)。尽管 BMP-2 装载量一致, 7 d 后 ALP 染色 (图 5A) 表明 A-LIP-PEG 共培养的 BMSC 的 ALP 表达显著高于 LIP-PEG 共培养组或对照组, 提示 A-LIP-PEG 中 A-LIP 的滞留作用在 7 d 内即增加细胞对 BMP-2 的利用。培养 21 d 后的茜素红 S 染色结果 (图 5B) 也表明 A-LIP-PEG 共培养组的钙离子沉积显著多于 LIP-PEG 共培养组或对照组, 提示 21 d 后 A-LIP-PEG 共培养组细胞相较于 LIP-PEG 共培养组细胞出现更显著的成骨分化趋势。

此外, 由于 Ag^+ 在 PEG 交联网络中的存在^[16], A-LIP-PEG 和 LIP-PEG 呈现出显著的抗菌作用 (图 3A、C), 且 A-LIP-PEG 抑菌环大于 LIP-PEG。这可能是由于表面多巴胺接枝为 A-LIP 带来了更多的负电荷, 与细菌表面的负电荷相斥, 导致细菌相对 LIP-PEG 更难以靠近 A-LIP-PEG。尽管 LIP-PEG 具有显著的抗菌效果, CCK-8 实验 (图 4A) 和细胞活死染色实验 (图 4B) 表明, 其对

于细胞的增殖、生长不产生抑制作用,而 A-LIP-PEG 尽管表现出了更强的抗菌作用,也并未对细胞活性产生影响。这可能是由于多巴胺本身良好的生物相容性以及 PEG 交联网络对 Ag^+ 的限制作用。

综上,本文报道了构建一种受贻贝启发的抗菌黏性脂质水凝胶并将其运用到骨修复的研究。在本研究中,基

于席夫碱反应,制备出有黏附性能的 A-LIP。为了实现 BMP-2 的进一步缓释,将 A-LIP 负载到 4SH-PEG 和 Ag^+ 交联的水凝胶里,制备出 A-LIP-PEG。体外实验表明, A-LIP-PEG 具有增强的抗金黄色葡萄球菌能力、良好的生物相容性和促成骨分化性能。因此,这种脂质体水凝胶有望在药物缓释和促成骨修复的应用中成为一个有前景的新选择。

参·考·文·献

- [1] Tang D, Tare RS, Yang LY, et al. Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration[J]. *Biomaterials*, 2016, 83: 363-382.
- [2] 陈岩松,陈哲,王硕凡. 骨修复生物材料临床研究进展[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2018, 28(10): 892-895.
- [3] 胡永成,王志强,孙世荃,等. 同种异体骨移植后的病理组织学观察[J]. *中华骨科杂志*, 2004, 24(10): 597-603.
- [4] 陈泰瀛. 新型抗菌骨修复支架的制备及其性能评价[D]. 广州:暨南大学, 2016.
- [5] 康凯,白东昱,薛建利,等. 骨折修复过程中骨形态发生蛋白 2 对趋化因子 12 表达的调控及其意义[J]. *中国骨与关节杂志*, 2017, 6(11): 837-843.
- [6] Casuso P, Odriozola I, Pérez-San Vicente A, et al. Injectable and self-healing dynamic hydrogels based on metal(I)-thiolate/disulfide exchange as biomaterials with tunable mechanical properties[J]. *Biomacromolecules*, 2015, 16(11): 3552-3561.
- [7] Deng Y, Yang F, Cocco E, et al. Improved i.p. drug delivery with bioadhesive nanoparticles[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(41): 11453-11458.
- [8] Guo J, Wang W, Hu J, et al. Synthesis and characterization of anti-bacterial and anti-fungal citrate-based mussel-inspired bioadhesives[J]. *Biomaterials*, 2016, 85: 204-217.
- [9] Guo J, Sun W, Kim JP, et al. Development of tannin-inspired antimicrobial bioadhesives[J]. *Acta Biomater*, 2018, 72: 35-44.
- [10] 程若昱,崔文国. 基于氢键力学增强型维生素 D₃ 脂质体复合水凝胶的构建及骨修复研究[J]. *高分子学报*, 2018(10): 1315-1327.
- [11] Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications[J]. *Biomaterials*, 2003, 24(24): 4337-4351.
- [12] Nemir S, Hayenga HN, West JL. PEGDA hydrogels with patterned elasticity: novel tools for the study of cell response to substrate rigidity[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(3): 636-644.
- [13] Song P, Qin H, Gao HL, et al. Self-healing and superstretchable conductors from hierarchical nanowire assemblies[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2786.
- [14] Mao X, Cheng R, Zhang H, et al. Self-healing and injectable hydrogel for matching skin flap regeneration[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2018, 6(3): 1801555.
- [15] Ryu J, Ku SH, Lee H, et al. Mussel-inspired polydopamine coating as a universal route to hydroxyapatite crystallization[J]. *Adv Funct Mater*, 2010, 20: 2132-2139.
- [16] Reithofer MR, Lakshmanan A, Ping AT, et al. In situ synthesis of size-controlled, stable silver nanoparticles within ultrashort peptide hydrogels and their anti-bacterial properties[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(26): 7535-7542.

[收稿日期] 2019-01-24

[本文编辑] 邵碧云