



上海交通大学医学院
Shanghai Jiao Tong University School of Medicine

SHANGHAI JIAO TONG
UNIVERSITY
SCHOOL OF MEDICINE

学者介绍



崔文国 博士

CUI Wen-guo Ph.D

研究员、博士生导师

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 and Engineering: C Materials for Biological Applications* 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 SCI 收录论文 110 余篇 (IF>10 的 30 余篇), H 指数 42, 他引 6 200 余次, 单篇最高达 400 余次; 授权专利 17 项, 参编学术专著 9 本。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 (1980—), professor of Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine and Shanghai Institute of Traumatology and Orthopaedics, 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, a specialized member of China Anti-Cancer Association for Nanooncology, a member of Youth Committee of Chinese Association of Rehabilitation Medicine [CARM] for Restoration Surgery, a member of Basic and Material Science Group of CARM, and a member of Youth Committee of Chinese Orthopedic Association. He also serves as deputy editor of *Materials Science and Engineering: C Materials for Biological Applications*.

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 110 SCI-indexed papers as the first or corresponding author (H index=42, citation>6 200, 30 articles with IF>10). He has been granted 17 patents and has published chapters in nine books. 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

负载骨形态发生蛋白 2 微球的可注射水凝胶的抑菌和成骨性能评价

刘立立¹, 崔文国^{1,2}

1. 苏州大学药学院, 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损重点实验室, 上海 200025

[摘要] **目的**·构建一种负载骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 微球的新型抗菌和可注射水凝胶, 检测其生物相容性、抗菌和促成骨性能。**方法**·通过微流控技术制备负载 BMP-2 的光交联明胶微球, 将微球与巯基化的聚乙二醇 [4-arm thiol-terminated poly (ethylene glycol), 4SH-PEG] 混合, 用 Ag⁺ 交联 4SH-PEG, 制备含有微球的可注射 4SH-PEG 复合水凝胶 (BMP/Gel/SH-Ag)。光学显微镜和扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察微球和水凝胶的微观形态; 在 100 转/min、37℃ 的摇床中进行药物释放实验; 使用针头直径为 0.5 mm 的注射器注射 BMP/Gel/SH-Ag, 评价其可注射性; 通过琼脂扩散实验评价 BMP/Gel/SH-Ag 对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 和大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 的抗菌性能; 通过 CCK-8 实验考察 BMP/Gel/SH-Ag 的生物相容性; 通过骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 的碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 染色和钙结节染色评价其促成骨活性。**结果**·明胶微球外表光滑, 粒径分布均匀 (~ 350 μm); BMP/Gel/SH-Ag 呈现孔洞状的微观结构; 在摇床中温育 8 d, BMP/Gel/SH-Ag 中的 BMP-2 累积释放量为 (81.8±3.6) %; BMP/Gel/SH-Ag 可以用直径小至 0.5 mm 的注射器针头来注射, 以产生水凝胶细丝; BMP/Gel/SH-Ag 对 *S. aureus* 和 *E. coli* 有抑制作用; CCK8 结果表明, BMP/Gel/SH-Ag 具有良好的生物相容性; BMP/Gel/SH-Ag 可提高 BMSCs 的 ALP 的表达和钙结节的含量。**结论**·该 BMP/Gel/SH-Ag 水凝胶在促进成骨和抗感染方面有好的表现。

[关键词] 微流控; 微球; 抗菌; 可注射水凝胶; 促成骨**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.09.004 **[中图分类号]** R94 **[文献标志码]** A

Injectable hydrogel loaded with bone morphogenetic protein-2 microspheres for bacteriostasis and osteogenesis

LIU Li-li¹, CUI Wen-guo^{1,2}

1. College of Pharmaceutical Sciences, 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 School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To construct a novel antibacterial and injectable hydrogel (BMP/Gel/SH-Ag) loaded with bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) microspheres, and investigate its biocompatibility, antibacterial properties and bone-promoting properties. **Methods**·The photocrosslinked gelatin microspheres loaded with BMP-2 were prepared by microfluidics. The microspheres were mixed with 4-arm thiol-terminated poly (ethylene glycol) (4SH-PEG) and crosslinked with Ag⁺ to prepare injectable sulfhydrylated PEG hydrogels (BMP/Gel/SH-Ag). The micromorphology of microspheres and hydrogels was observed by light microscope and scanning electron microscope. The drug release profile was investigated at 37℃ in a shaker (100 r/min). The injectability of BMP/Gel/SH-Ag was evaluated by injecting hydrogel using a syringe with a tip diameter of 0.5 mm. The antibacterial activity of BMP/Gel/SH-Ag against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) was evaluated by agar diffusion test. The biocompatibility of BMP/Gel/SH-Ag was verified by CCK-8, and the bone-promoting activity was evaluated by alkaline phosphatase (ALP) assay and calcium nodule staining in bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Results**·Gelatin microspheres had smooth appearance and uniform particle size distribution (~ 350 μm). BMP/Gel/SH-Ag had porous microstructure and can be injected with a syringe needle with a diameter of up to 0.5 mm in diameter to produce hydrogel filament. The cumulative release of BMP-2 from BMP/Gel/SH-Ag was (81.8±3.6)% after being incubated for 8 d. BMP/Gel/SH-Ag had obvious inhibitory effect on *S. aureus* and *E. coli*. CCK-8 results showed that BMP/Gel/SH-Ag had good biocompatibility. BMP/Gel/SH-Ag can increase the expression of ALP and the content of calcium nodules in rat BMSCs. **Conclusion**·The BMP/Gel/SH-Ag has good performance in promoting osteogenesis and anti-infection.

[Key words] microfluidics; microsphere; bacteriostasis; injectable hydrogel; promoting osteogenesis**[基金项目]** 国家自然科学基金 (51873107); 上海市人才发展基金 (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)。**[作者简介]** 刘立立 (1993—), 男, 硕士生; 电子信箱: 13295152709@163.com。**[通信作者]** 崔文国, 电子信箱: wgcui80@hotmail.com。**[Funding Information]** 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)。**[Corresponding Author]** CUI Wen-guo, E-mail: wgcui80@hotmail.com。

骨髓炎是指细菌感染骨骼, 形成炎性反应, 累及单一或多处骨骼并导致骨质破坏的骨炎症性疾病^[1]。高能量损伤导致的开放性骨折容易引发感染^[2], 形成死骨, 进而导致骨折迁延不愈甚至骨髓炎发生。由于局部感染难以控制、成骨较困难, 慢性骨髓炎更是难以治疗, 从而导致高截肢率和高致残率^[3]。目前, 临床上常常全身应用抗生素治疗骨感染, 但抗生素的广泛应用促使了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌等耐药菌株的出现^[4-5]。由于普通抗生素不能完全杀死耐药细菌, 所以装载普通抗生素的植入材料在治疗骨感染中的价值有限^[6]。因此, 开发一种无耐药性且具有抗菌及骨再生作用的材料已成为骨感染治疗的迫切需要。

水凝胶具有高含水量、良好的生物相容性和可调的机械性能等特点, 是一种良好的骨组织再生支架材料^[7]。各种功能性水凝胶均已开发并有望应用于临床, 如细胞膜抗炎水凝胶^[8]、响应性水凝胶^[9]、黏附性水凝胶^[10]、可注射水凝胶^[11]、自愈合水凝胶^[12]等。聚乙二醇[poly(ethylene glycol), PEG]水凝胶是基于美国食品药品监督管理局批准的聚乙二醇均聚物, 由于其具有良好的生物相容性而被广泛应用于生物医学材料的研发^[13]。Ag⁺交联的PEG水凝胶具有优良的抗菌性能。然而, 当PEG水凝胶被植入机体后, 成骨生物活性分子会快速释放, 难以在病灶局部维持有效浓度, 降低了成骨生物活性分子的生物利用度, 促成骨作用差, 且导致了昂贵的成骨生物活性分子的浪费。因此, 有必要开发一种能增加目标组织中生物活性分子缓释性的水凝胶。

基于此, 本研究利用Ag⁺和巯基(-SH)的配位交联原理, 开发一种无活性基团的可注射、抗菌和自愈合的PEG水凝胶, 再使用微流控技术制备负载重组人骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)的光交联明胶微球, 将两者混合从而构建负载BMP-2微球的可注射水凝胶BMP/Gel/SH-Ag, 并评价其抗菌和成骨性能。该体系具有如下优点: ①BMP/Gel/SH-Ag中的Ag⁺具有广谱抗菌性和优良的抗菌性能, 可在一定程度上缓解抗生素滥用问题。②负载BMP-2的明胶微球通过缓释作用, 长期维持局部药物浓度, 持续发挥促成骨作用。因此, BMP/Gel/SH-Ag的载药系统在促成骨和抗感染方面有良好的表现, 并有望在骨髓炎的预防中发挥作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

1.1.1 试剂 明胶(批号180LB8, 罗赛洛明胶有限

公司), 甲基丙烯酸酐(CAS号760-93-0, 阿拉丁试剂有限公司), 2-羟基-4'-(2-羟基乙氧基)-2-甲基苯丙酮(CAS号106797-53-9, 北京百灵威科技有限公司), 巯基化的聚乙二醇[4-arm thiol-terminated poly(ethylene glycol), 4SH-PEG](批号TZQ09095, 美国Creative PEG Works; 相对分子质量20 000), 硝酸银溶液(批号20170808, 国药集团化学试剂有限公司), 红色钢笔墨水(货号204, 上海英雄有限公司), BMP-2(批号10426-HNAE, 北京索莱宝科技有限公司), ELISA试剂盒(货号70-EK1108-48, 杭州联科生物技术股份有限公司), CCK-8试剂盒(货号CK04, 日本Dojindo), 氯化硝基四氮唑蓝/氯化硝基四氮唑蓝(nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, BCIP/NBT)碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒(批号C3206, 上海碧云天生物技术有限公司), SD大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨诱导培养基(货号RASMIX-90021, 赛业生物科技有限公司), α -MEN培养基(货号30265.01, 美国Hyclone)。

1.1.2 细胞和菌株 大鼠BMSCs(实验室自提取并分选鉴定), 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)和大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)(货号Atcc43300、Atcc11229, 北京陆桥技术股份有限公司)。

1.1.3 仪器 微流控装置(保定兰格恒流泵有限公司), 荧光显微镜(德国Zeiss), 扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)(日本Hitachi), 酶标仪(美国BioTek)。

1.2 BMP/Gel/SH-Ag的制备及表征

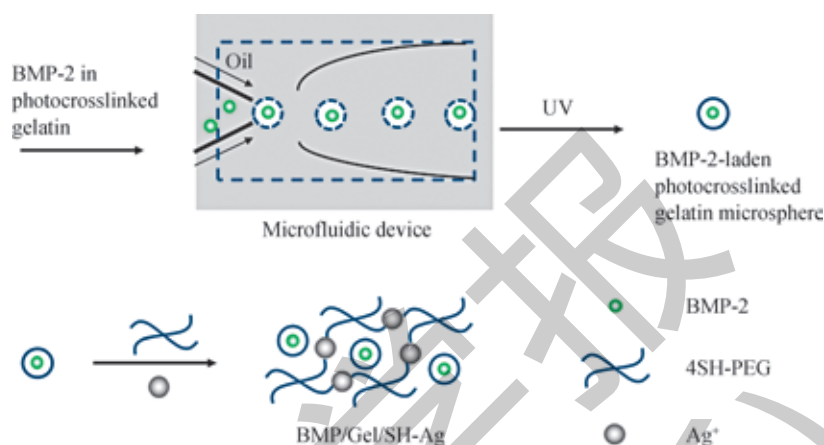
1.2.1 光交联明胶的制备 将10 g明胶溶解在100 mL磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)。待明胶完全溶解后, 在60℃下, 向锥形瓶内逐滴加入8 mL甲基丙烯酸酐, 滴加过程持续0.5 h。滴加结束2 h后, 将预热至50℃的400 mL PBS加入锥形瓶中稀释溶液以停止反应, 再持续搅拌30 min。之后将锥形瓶内的液体倒入透析袋中(截留相对分子质量8 000~14 000), 透析2周。收集透析袋内的液体, 冷冻干燥得到修饰后的光交联明胶。

1.2.2 光交联明胶微球的制备 微流控技术用于制备负载BMP-2的光交联明胶微球(图1)。简而言之, 制备明胶微球, 向10.0%(质量分数)的光交联明胶溶液加入2.5%的BMP-2, 再加入1.0% 2-羟基-4'-(2-羟基乙氧基)-2-甲基苯丙酮(光引发剂)和0.25%的海藻酸钠作为分散相, 含有15.0%山梨醇酐单油酸酯的肉豆蔻酸

异丙酯作为连续相。将2种相分别注入微通道,分散相形成单分散液滴。调节分散相和连续相的流速以获得直径约350 μm 的液滴。收集的油包水型乳状液在紫外光(365 nm)照射15 s后聚合成光交联明胶微球(图1)。

1.2.3 BMP/Gel/SH-Ag的制备 称取4SH-PEG 10 mg,溶解于50 μL 去离子水,再加入40 μL 负载BMP-2的

光交联明胶微球。将30 μL 硝酸银溶液(0.1 mol/L)用20 μL 去离子水稀释。将2种液体混合,其在数秒后形成负载光交联明胶微球的水凝胶BMP/Gel/SH-Ag(图1)。称取4SH-PEG 10 mg,溶解于50 μL 含有1 mg BMP-2的去离子水中,再与硝酸银溶液混合,以类似方式制备负载BMP-2的水凝胶BMP/SH-Ag。



Note: UV—ultraviolet.

图1 BMP/Gel/SH-Ag形成的示意图

Fig 1 Schematic formation of BMP/Gel/SH-Ag

1.2.4 BMP/Gel/SH-Ag的表征 利用SEM对冷冻干燥后的水凝胶进行评价。切取冷冻干燥2 d的厚度为2 mm的水凝胶片,固定在导电板上,采用离子溅射仪对其进行45 s喷金处理,最后利用SEM采集图像。为了考察BMP/Gel/SH-Ag和BMP/SH-Ag的释药行为,将每组3个样品浸没于PBS中,于转速为100转/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 的摇床中进行药物释放实验。温育1、2、4、6、8 d取释放介质,用ELISA试剂盒测定BMP-2的释放量。用1 mL注射器(针头直径0.5 mm)注射携带红色钢笔墨水的BMP/Gel/SH-Ag,观察BMP/Gel/SH-Ag的可注射性。用琼脂扩散法测试水凝胶抗菌性能。将100 μL *S. aureus*和100 μL *E. coli* [吸光度值 D (600 nm)约0.07]分别分散到LB琼脂平板上。分别将BMP/Gel/SH-Ag和BMP/SH-Ag置于琼脂平板上并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育24 h,每组3个样品,观察水凝胶样品周围的细菌环并于24 h测定抑菌环直径。

1.3 细胞实验

1.3.1 CCK-8 收集BMP/Gel/SH-Ag和BMP/SH-Ag的浸出液,加至铺有BMSCs的96孔板中(5 000个/孔),分别于第1、3、5日去除培养液,用PBS洗涤2次,每孔加入100 μL 培养基和10 μL CCK-8试剂,放入培养箱避光孵育2 h。酶标仪450 nm波长下检测吸光度值[D (450 nm)]。

以使用 α -MEM培养基培养的BMSCs作为对照组。每组3个样品。

1.3.2 活/死细胞染色 使用BMP/Gel/SH-Ag和BMP/SH-Ag的浸出液于24孔板中培养BMSCs(30 000个/孔)。以使用 α -MEM培养基培养的BMSCs作为对照组。每组3个样品。培养1 d后,去除培养液,用PBS洗涤3次。将5 μL 钙黄绿素和20 μL 溴乙非啶豪莫二聚体分别加入10 mL PBS,配制成活/死细胞染色溶液。将200 μL 活/死细胞染色溶液加入每孔中,室温避光孵育30 min,去除染色溶液,PBS洗涤2次,用荧光显微镜采集图像。

1.3.3 ALP测定 将大鼠BMSCs接种在24孔Transwell板中(30 000个/孔),并加入 α -MEM培养基进行培养。1 d后,分别将BMP/Gel/SH-Ag、BMP/SH-Ag放于Transwell板的上室中,不加入水凝胶材料的BMSCs作为对照组,每组3个样品,并用成骨诱导培养基替代 α -MEM培养基。14 d后,PBS洗涤2次,无水乙醇于室温下固定细胞30 min,去离子水洗涤3次,加入ALP染色液。在室温下避光孵育30 min后,去离子水洗涤,用光学显微镜采集图像。

1.3.4 茜素红S染色 将大鼠BMSCs接种在24孔Transwell板中(30 000个/孔),并加入 α -MEM培养基进行培养。1 d后,将BMP/Gel/SH-Ag、BMP/SH-Ag放于Trans-

well 板的上室中, 不加入水凝胶材料的 BMSCs 作为对照组, 每组 3 个样品, 并用成骨诱导培养基替代 α -MEM 培养基。21 d 后, PBS 洗涤 2 次, 无水乙醇于室温下固定细胞 30 min, 去离子水洗涤 3 次, 加入茜素红 S 染色液。在室温下孵育 10 min 后, 去离子水洗涤 2 次, 用显微镜采集图像。

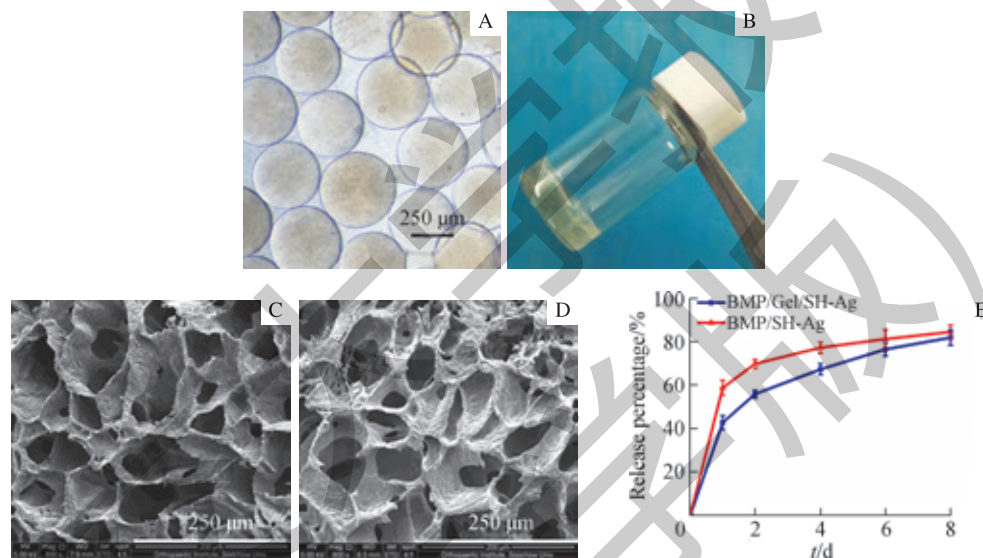
1.4 统计学分析

采用 Origin 软件进行绘图和统计学分析。定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组间比较采用 t 检验, 3 组间比较采用 ANOVA 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMP/Gel/SH-Ag 的考察

2.1.1 BMP/Gel/SH-Ag 的外观、微观结构和药物释放 光交联明胶微球外表光滑, 粒径分布均匀 ($\sim 350 \mu\text{m}$) (图 2A)。将稀释后的硝酸银溶液加入 4SH-PEG 溶液中, 2 种溶液在数秒后形成淡黄色的 BMP/Gel/SH-Ag (图 2B)。SEM 结果显示, BMP/Gel/SH-Ag 和 BMP/SH-Ag 都呈现孔洞状的微观结构, 孔径为 $50 \sim 150 \mu\text{m}$ (图 2C、2D)。在药物释放考察中, BMP/Gel/SH-Ag 和 BMP/SH-Ag 在第 8 日分别释药 (81.8 ± 3.6) % 和 (84.4 ± 3.2) % (图 2E)。相较于 BMP/SH-Ag, BMP/Gel/SH-Ag 具有更好的缓释效果。



Note: A. Morphology of photocrosslinked gelatin microspheres. B. Morphology of BMP/Gel/SH-Ag. C. SEM image of BMP/Gel/SH-Ag. D. SEM image of BMP/SH-Ag. E. Drug release of BMP/Gel/SH-Ag and BMP/SH-Ag.

图 2 光交联明胶微球及 BMP/Gel/SH-Ag 形态和药物释放

Fig 2 Morphology of photocrosslinked gelatin microspheres and BMP/Gel/SH-Ag and the drug release profile

2.1.2 BMP/Gel/SH-Ag 的可注射性 BMP/Gel/SH-Ag 可水凝胶细丝 (图 3), 从而能够较好地填充骨感染区域。以用针头直径小至 0.5 mm 的 1 mL 注射器来注射, 以产生

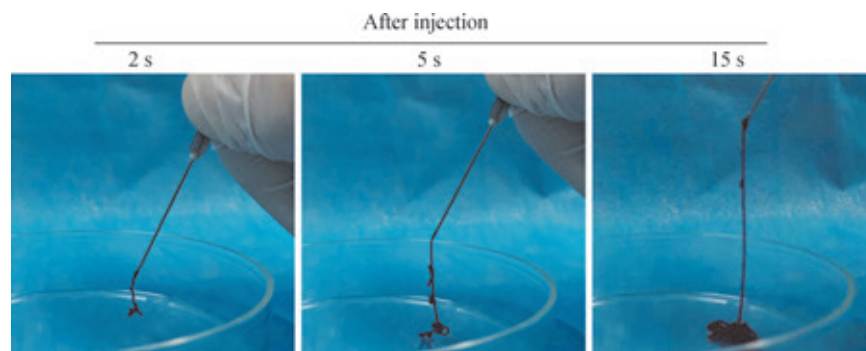
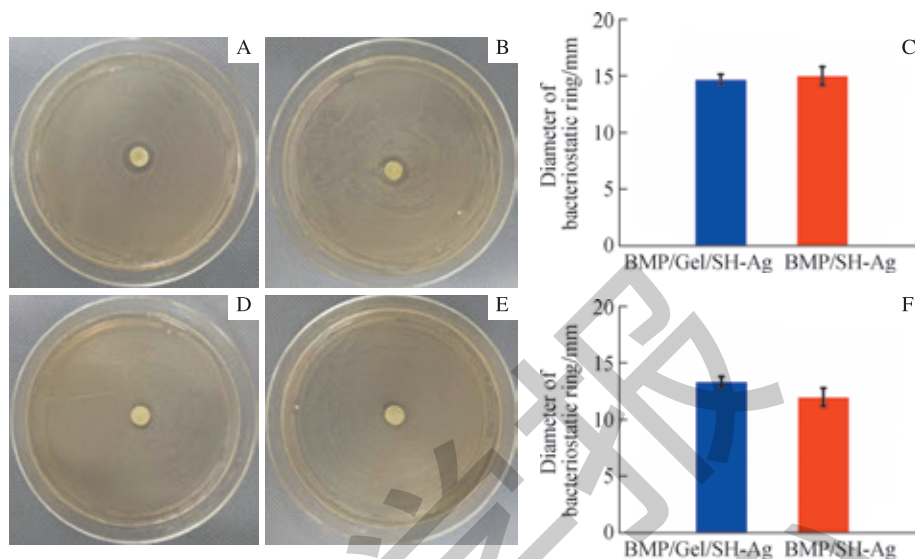


图 3 红色墨水染色的 BMP/Gel/SH-Ag 水凝胶的注射性

Fig 3 Injectability of red ink-dyed BMP/Gel/SH-Ag

2.1.3 BMP/Gel/SH-Ag 的抗菌性能 BMP/Gel/SH-Ag 和 BMP/SH-Ag 分别置于涂有 *S. aureus* 和 *E. coli* 的琼脂板 1 d 后, 均出现了抑菌环, 表明 BMP/Gel/SH-Ag 和 BMP/

SH-Ag 对 *S. aureus* (图 4A、B) 和 *E. coli* (图 4D、E) 有抑制作用。BMP/SH-Ag 的抗菌效果与 BMP/Gel/SH-Ag 相当, 抑菌环直径差异无统计学意义 (图 4C、F)。



Note: A. Bacteriostatic ring of BMP/Gel/SH-Ag against *S. aureus*. B. Bacteriostatic ring of BMP/SH-Ag against *S. aureus*. C. Diameter of bacteriostatic ring of BMP/Gel/SH-Ag and BMP/SH-Ag against *S. aureus*. D. Bacteriostatic ring of BMP/Gel/SH-Ag against *E. coli*. E. Bacteriostatic ring of BMP/SH-Ag against *E. coli*. F. Diameter of bacteriostatic ring of BMP/Gel/SH-Ag and BMP/SH-Ag against *E. coli*.

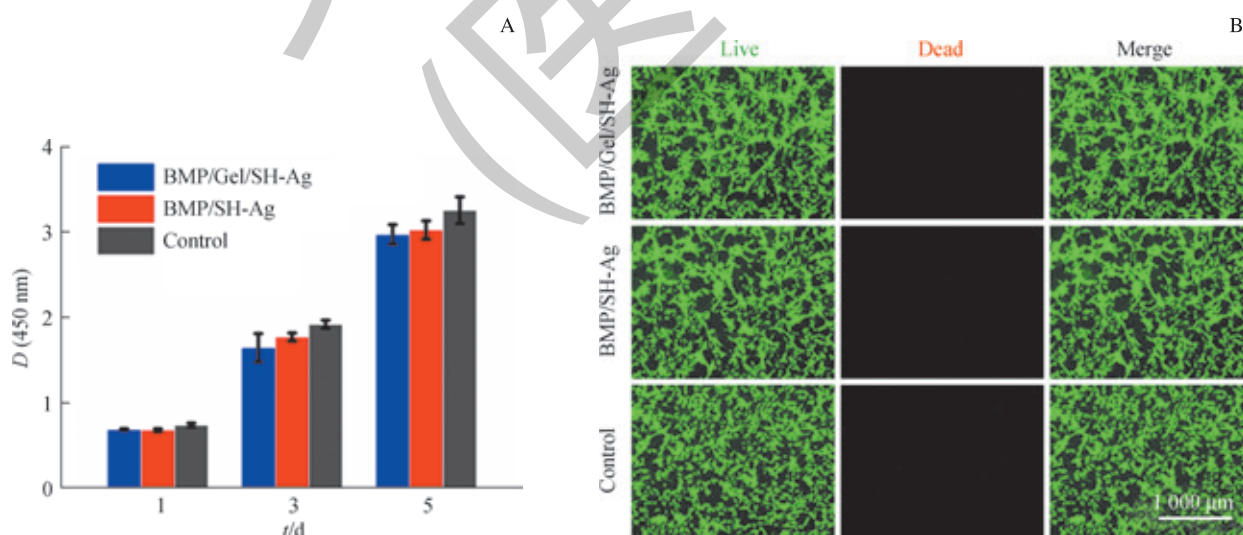
图 4 BMP/Gel/SH-Ag 及 BMP/SH-Ag 的抗菌性能

Fig 4 Antibacterial properties of BMP/Gel/SH-Ag and BMP/SH-Ag

2.2 BMP/Gel/SH-Ag 的生物相容性

为了研究 BMP/Gel/SH-Ag 的生物相容性, 使用 CCK-8 实验考察 BMP/Gel/SH-Ag 和 BMP/SH-Ag 浸出液对 BMSCs 增殖的影响。CCK-8 结果显示, 在第 1、3、5 日, BMP/Gel/SH-Ag 组和 BMP/SH-Ag 组的吸光度值略低

于对照组, 但各组吸光度值之间的差异无统计学意义 (图 5A)。观察 BMSCs 存活情况, 发现 BMP/Gel/SH-Ag 组、BMP/SH-Ag 组和对照组的细胞生长状态良好 (图 5B), 进一步证明了 BMP/Gel/SH-Ag 的生物安全性。



Note: A. Proliferation of BMSCs cultured with the extracts of BMP/Gel/SH-Ag and BMP/SH-Ag. B. Live/dead staining of BMSCs.

图 5 BMP/Gel/SH-Ag 及 BMP/SH-Ag 的生物相容性

Fig 5 Biocompatibility of BMP/Gel/SH-Ag and BMP/SH-Ag

2.3 BMP/Gel/SH-Ag 的促成骨分化

采用 ALP 染色和茜素红 S 染色对 BMP/Gel/SH-Ag 和 BMP/SH-Ag 的促成骨分化能力进行评价。ALP 染色越深, 表示其活性越高。BMSCs 在成骨诱导培养基中培养 14 d 后, BMP/Gel/SH-Ag 组的 ALP 活性高于 BMP/SH-Ag 组 and 对照组 (图 6), 表明 BMP/Gel/SH-Ag 的促成骨能力要强于 BMP/SH-Ag。

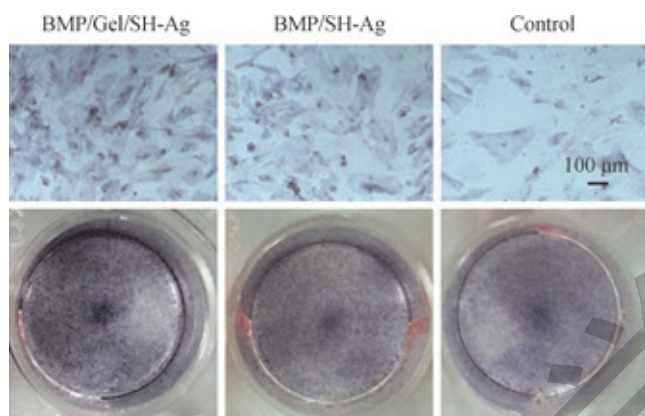


图 6 BMSCs 的 ALP 染色情况
Fig 6 ALP staining images of the BMSCs

在成骨分化后期, 成骨细胞分泌矿化基质, 形成的钙结节可被茜素红 S 染成橘红色。BMSCs 在成骨诱导培养基中培养 21 d 后, BMP/Gel/SH-Ag 组的钙结节水平高于 BMP/SH-Ag 组和对照组 (图 7), 表明 BMP/Gel/SH-Ag 的促成骨分化能力高于 BMP/SH-Ag。

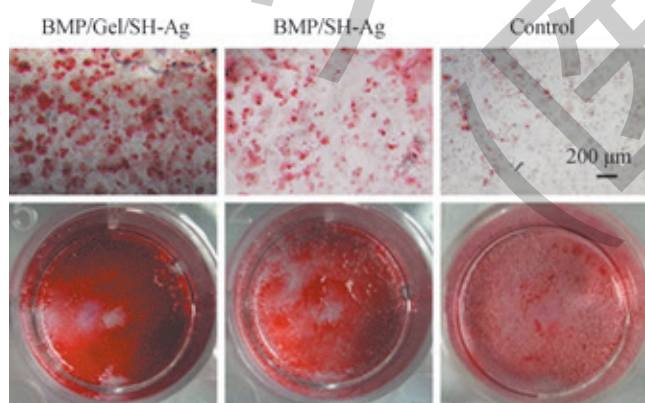


图 7 BMSCs 的茜素红 S 染色情况
Fig 7 Alizarin red staining images of the BMSCs

3 讨论

本研究基于 Ag^+ 和 $-\text{SH}$ 之间的配位反应, 制备了一种 4SH-PEG 和 Ag^+ 交联的 PEG 水凝胶。然而, 单纯负载

BMP-2 的水凝胶无法延缓 BMP-2 释放, 导致 BMP-2 的生物利用度降低。因此, 在 PEG 水凝胶中复合了装载有 BMP-2 的光交联明胶微球, 利用微球水凝胶的缓释作用在局部持续递送 BMP-2 以促进感染性骨损伤的修复。

微球是指药物分散在成球材料中, 形成的骨架型微小球形微粒, 可以供注射、口服、滴鼻或皮下埋植使用^[14]。根据其制备材料的不同, 分为天然高分子微球、合成高分子微球和无机微球。由于广泛分布于自然界且具有良好的生物相容性, 天然高分子成为备受欢迎的制备微球的材料。常用天然高分子材料包括多糖、明胶、类聚异戊二烯、聚酯、聚酚。明胶是动物结缔组织或表皮组织中的胶原降解的产物, 具有非常低的抗原性^[15]。分子内部含有丰富精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp, RGD) 序列, 对细胞的黏附和迁移有促进作用^[16]。因此, 明胶微球不但可以发挥药物载体的作用, 还可以促进细胞黏附和迁移。目前, 明胶微球可以负载药物、生长因子和细胞。Kudva 等^[17]通过明胶微球负载转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 在体外促进软骨形成。Zhao 等^[18]通过制备负载 BMSCs 的明胶微球促进成骨; 明胶微球可在靶部位释放至 BMSCs, 并促进其分化。因此, 明胶微球已经成为一种极具吸引力的生物医用材料。

微流控技术比传统的机械搅拌乳化技术更具优越性。本研究用甲基丙烯酸酐与明胶中的氨基进行化学反应, 合成了光交联明胶, 并用微流控装置制备了负载 BMP-2 的明胶微球。该微流控装置产生的液滴具有高度的单分散性和大小可控的特点。光交联明胶溶液和油相的流速是控制微球尺寸的重要因素。通过改变光交联明胶溶液与油相速率的比值可调节明胶微球粒径的大小。对于负载药物的微球载体而言, 微球的粒径越大, 药物缓释效果越好。Zhao 等^[18]制备负载 BMSCs 的明胶微球。其选择 163 μm 的微球尺寸是为了平衡 2 个要求: 尺寸大于 60 μm , 可确保有足够数量的封装细胞以促进细胞接触和增殖^[19]; 小于 200 μm , 可允许通过水凝胶随时进行氧气交换, 以实现细胞的长期存活^[20]。而本研究采用的尺寸 (约 350 μm) 是为了确保单个微球能够负载足量的 BMP-2 以提升缓释效果。

本研究将稀释后的 Ag^+ 溶液加入负载光交联明胶微球的 4SH-PEG 溶液中, 2 种溶液在数秒后形成 BMP/Gel/SH-Ag。其机制可能是通过 Ag-S 和二硫键的作用, 形成了相互交错的水凝胶网络^[21]。BMP/Gel/SH-Ag 和 BMP/SH-Ag 都呈现孔洞状结构, 孔径相对较大, 可能是由于内部化学交联程度不高所致。BMP/Gel/SH-Ag 可以用注射器注射来产生水凝胶细丝, 具有优良的可注射性, 能通过微创的

方式更好地填充骨感染区域。但是当注射的水凝胶面临恒定的机械力时, 可能导致变形或损坏。在这种情况下, 拥有自我修复功能的水凝胶将拥有更长的应用寿命^[22]。Cai 等^[23]通过双重交联的方法制备了一种负载干细胞的注射水凝胶来提高细胞的存活率。当水凝胶被注射时, 星形多肽-聚乙二醇共聚物与工程重组蛋白组装形成的物理网络会被破坏; 但当注射完成后, 物理网络能够重新形成。而 BMP/Gel/SH-Ag 可能可以通过恢复损伤的水凝胶碎片来实现自愈。此外, 这种水凝胶还可以允许医师在预先不知道缺损的情况下填充复杂的形状, 例如, 其可应用于复杂骨折的治疗^[24]。这可能是因为当 BMP/Gel/SH-Ag 水凝胶受到剪切力时, Ag^+ 与 SH 的配位键会断裂; 而当剪切力消失时, Ag^+ 与 SH 的配位键重新恢复。

BMP/Gel/SH-Ag 和 BMP/SH-Ag 对 *S. aureus* 和 *E. coli* 均有抑制作用。这是由于 BMP/Gel/SH-Ag 和 BMP/SH-Ag 释放的 Ag^+ 能够干扰细菌膜通透性、抑制呼吸酶活性和使 DNA 分子凝聚^[25]。Guo 等^[26]通过 Ag^+ 交联鞣酸 (tannin) 制备一种可注射的抗菌黏性水凝胶。因为 Ag^+ 在水凝胶中不仅用作抗菌剂, 而且还用作水凝胶的交联剂, 使得水凝胶具有优良的抗菌性能和生物相容性。Tian 等^[27]用无毒抗菌剂 (Fe^{3+}) 与乙二胺四乙酸交联透明质酸制备了可自愈的抗菌水凝胶。作为交联剂的一部分, Fe^{3+} 可填充整个水凝胶, 大大提高了抗菌剂的负载量, 延长了抗菌剂的有效期, 使水凝胶能够持续释放抗菌剂, 直到水凝胶被完全分解。BMP/Gel/SH-Ag 中的 Ag^+ 同样作为水凝胶的抗菌剂和交联剂。将抗菌的金属离子作为水凝胶的交联剂不仅可以提高抗菌剂的负载量, 提高抗菌性能, 而且还可以延长抗菌的有效期。这是由于金属离子与其他化合物的化学键作用限制了金属离子的释放。因此, BMP/Gel/SH-Ag 是具有优良的抗菌性能的骨修复生物材料。

作为促成骨和抗感染的生物材料, BMP/Gel/SH-Ag 的生物相容性十分重要。而 BMP/Gel/SH-Ag 中的 Ag^+ 有较低的生物毒性, 同时也有研究^[28]表明当 Ag^+ 在涂层中的装载量低于 $9.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时, 材料无细胞毒性。本研究中, BMP/Gel/SH-Ag 装载的 Ag^+ 远低于这一细胞毒性阈值。此外, Ag^+ 还用作水凝胶的交联剂。与直接在水凝胶中装载 Ag^+ 相比, BMP/Gel/SH-Ag 中的 Ag^+ 与 4SH-PEG 结合, 导致 Ag^+ 释放较慢, 降低了 Ag^+ 的毒性。4SH-PEG 本身良好的生物相容性也可能对此有所贡献。CCK-8 和活/死细胞染色实验结果印证了 BMP/Gel/SH-Ag 对于 BMSCs 没有毒性作用。

尽管 BMP/Gel/SH-Ag 和 BMP/SH-Ag 中 BMP-2 的装载量一致, BMP/Gel/SH-Ag 组的 ALP 表达量和产生的钙结节数量均高于 BMP/SH-Ag 组。这些结果印证了 BMP/Gel/SH-Ag 装载光交联明胶微球的缓释作用提升了 BMP-2 的生物利用度。Li 等^[29]研发了一种负载辛伐他汀微球的水凝胶系统, 在体外释放实验的第 3 日, 未负载微球的水凝胶释放近 75% 的药物, 而负载微球的水凝胶释放近 37% 的药物, 表明微球可增强药物的缓释作用。而相较于 BMP/SH-Ag、BMP/Gel/SH-Ag 的 BMP-2 的释放需要突破 2 层屏障, 首先 BMP-2 要从微球释放到水凝胶, 然后释放到水中。因此, BMP/Gel/SH-Ag 具有更好的缓释效果。

综上, 本研究通过微流控技术制备负载 BMP-2 的光交联明胶微球; 为了实现 BMP-2 的缓释, 将光交联明胶微球负载到 4SH-PEG 和 Ag^+ 交联的 PEG 水凝胶中, 制备出 BMP/Gel/SH-Ag。体外试验表明, BMP/Gel/SH-Ag 具有优良的抗菌性能、可注射性、生物相容性和促成骨分化性能。因此, 这种负载 BMP-2 微球的可注射水凝胶在促成骨和抗感染方面有良好的表现, 有望在骨髓炎的预防中发挥作用。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis[J]. Lancet, 2004, 364(9431): 369-379.
- [2] 虞伟琴, 谢垒, 钱小毛. 开放性骨折患者手术部位感染的危险因素分析[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2017, 32(5): 550-551.
- [3] Maffulli N, Papalia R, Zampogna B, et al. The management of osteomyelitis in the adult[J]. Surgeon, 2016, 14(6): 345-360.
- [4] Kullar R, Sakoulas G, Deresinski S, et al. When sepsis persists: a review of MRSA bacteraemia salvage therapy[J]. J Antimicrob Chemother, 2016, 71(3): 576-586.
- [5] Byrne FM, Wilcox MH. MRSA prevention strategies and current guidelines[J]. Injury, 2011, 42(Suppl 5): S3-S6.
- [6] Li Y, Liu LN, Wan P, et al. Biodegradable Mg-Cu alloy implants with antibacterial activity for the treatment of osteomyelitis: *in vitro* and *in vivo* evaluations[J]. Biomaterials, 2016, 106(6): 250-263.
- [7] Kim SH, Lee HR, Yu SJ, et al. Hydrogel-laden paper scaffold system for origami-based tissue engineering[J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2015, 112(50): 15426-15431.
- [8] Fan ZY, Deng JJ, Li PY, et al. A new class of biological materials: cell membrane-derived hydrogel scaffolds[J]. Biomaterials, 2019, 197(44): 244-254.
- [9] Yu YB, Feng RX, Yu SH, et al. Nanostructured lipid carrier-based pH and temperature dual-responsive hydrogel composed of carboxymethyl chitosan and poloxamer for drug delivery[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 114(29): 462-469.
- [10] Hong S, Pirovich D, Kilcoyne A, et al. Supramolecular metallo-bioadhesive for minimally invasive use[J]. Adv Mater, 2016, 28(39): 8675-8680.
- [11] Wang K, Han ZC. Injectable hydrogels for ophthalmic applications[J]. J Control Release, 2017, 268(39): 212-224.
- [12] Hsieh FY, Han HW, Chen XR, et al. Non-viral delivery of an optogenetic tool into cells with self-healing hydrogel[J]. Biomaterials, 2018, 174(23): 31-40.
- [13] Hoogenboom R, Schubert U, Fischer DC, et al. Poly(ethylene glycol) in drug

- delivery: pros and cons as well as potential alternatives[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2010, 49(36): 6288-6308.
- [14] 陆新月, 吕慧侠. 微球给药系统载体材料的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(5): 528-536.
- [15] Santoro M, Tataro AM, Mikos AG. Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering[J]. J Control Release, 2014, 190(17): 210-218.
- [16] Wang HN, Boerman OC, Sariibrahimoglu K, et al. Comparison of micro-*vs.* nanostructured colloidal gelatin gels for sustained delivery of osteogenic proteins: bone morphogenetic protein-2 and alkaline phosphatase[J]. Biomaterials, 2012, 33(33): 8695-8703.
- [17] Kudva AK, Dikina AD, Luyten FP, et al. Gelatin microspheres releasing transforming growth factor drive *in vitro* chondrogenesis of human periosteum derived cells in micromass culture[J]. Acta Biomater, 2019, 90(12): 287-299.
- [18] Zhao X, Liu S, Yildirim L, et al. Injectable stem cell-laden photocrosslinkable microspheres fabricated using microfluidics for rapid generation of osteogenic tissue constructs[J]. Adv Funct Mater, 2016, 26(17): 2809-2819.
- [19] Shah RK, Shum HC, Rowat AC, et al. Designer emulsions using microfluidics[J]. Mater Today, 2008, 11(4): 18-27.
- [20] Herrero EP, Valle EMM, Galán MA. Immobilization of mesenchymal stem cells and monocytes in biocompatible microcapsules to cell therapy[J]. Biotechnol Prog, 2007, 23(4): 940-945.
- [21] Chen H, Cheng RY, Zhao X, et al. An injectable self-healing coordinative hydrogel with antibacterial and angiogenic properties for diabetic skin wound repair[J]. NPG Asia Mater, 11(1): 32-38.
- [22] Li L, Yan B, Yang JQ, et al. Novel mussel-inspired injectable self-healing hydrogel with anti-biofouling property[J]. Adv Mater, 2015, 27(7): 1294-1299.
- [23] Cai L, Dewi RE, Heilshorn SC. Injectable hydrogels with *in situ* double network formation enhance retention of transplanted stem cells[J]. Adv Funct Mater, 2015, 25(9): 1344-1351.
- [24] Rahman CV, Saeed A, White LJ, et al. Chemistry of polymer and ceramic-based injectable scaffolds and their applications in regenerative medicine[J]. Chem Mater, 2012, 24(5): 781-795.
- [25] Liu JY, Sonshine DA, Shervani S, et al. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces[J]. ACS Nano, 2010, 4(11): 6903-6913.
- [26] Guo JS, Sun W, Kim JP, et al. Development of tannin-inspired antimicrobial bioadhesives[J]. Acta Biomater, 2018, 72(11): 35-44.
- [27] Tian R, Qiu XY, Yuan PY, et al. Fabrication of self-healing hydrogels with on-demand antimicrobial activity and sustained biomolecule release for infected skin regeneration[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(20): 17018-17027.
- [28] He M, Wang Q, Zhang J, et al. Substrate-independent Ag-nanoparticle-loaded hydrogel coating with regenerable bactericidal and thermoresponsive antibacterial properties[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9(51): 44782-44791.
- [29] Li XW, Liu XH, Ni SL, et al. Enhanced osteogenic healing process of rat tooth sockets using a novel simvastatin-loaded injectable microsphere-hydrogel system[J]. J Cranio-Maxillofac Surg, 2019, 47(7): 1147-1154.

[收稿日期] 2020-01-10

[本文编辑] 崔黎明

“双一流”暨高水平地方高校建设项目

一流学科——临床医学

以“总体规划、集成优势、突出重点、整体提升”为原则，重点围绕如何解决危害人类健康的多发病、慢性病及疑难病，以“临床研究能力体系”建设为核心，以搭建科研大平台为基础，以临床研究支撑队伍和技术体系建设为抓手，整合优势，凝练大方向，组成大团队，重点突破，联合攻关，全面提升临床医学学科专科整体水平，产生一批临床成果。在国家 and 第三方的学科评估中继续保持国内第一，国际排名稳步提升。

