

合成锂皂土-海藻酸钠复合屏障膜的制备及研究

程东东¹, 周璞¹, 邢新¹, 邹多宏^{1,2}

摘要 目的 通过制备合成锂皂土(LAP)-海藻酸钠(SA)复合膜,测试其力学性能及生物相容性,研究其应用于组织工程屏障膜的可能性。方法 将LAP溶液与SA溶液按比例混合,搅拌均匀,通过热喷涂组装方法成膜,制备LAP与SA的质量分数比分别为1:10、3:10、5:10、7:10、9:10的复合膜和纯SA膜。采用力学万能实验机测试各组膜样品($n=6$)抗拉强度。取纯SA膜组和抗拉强度最大的复合膜组样品,用扫描电镜和透射电镜观察微观结构,X射线衍射仪和傅立叶变换红外光谱仪分析各成分。同时取抗拉强度最大的复合膜组,重新制备膜样品浸泡于0.5 mol/L氯化钙溶液中5 s,待其自然干燥后测试抗拉强度。空白对照组、纯SA膜组和抗拉强度最大的复合膜组($n=5$)与NIH/3T3共培养24.48 h后用CCK-8检测各组细胞存活率。结果 加入LAP后复合膜的截面呈有序的层状结构,X射线衍射及傅立叶变换红外光谱分析显示复合膜中存在LAP。复合

膜抗拉强度随LAP比例增加而先增加后降低,LAP与SA的质量分数比为5:10时抗拉强度最大,达(166.9±11.5) MPa。此组复合膜用Ca²⁺螯合后抗拉强度为(178.0±14.8) MPa。培养细胞24.48 h时,纯SA膜组、复合膜组NIH/3T3数量与空白对照组差异均无统计学意义。结论 LAP与SA的质量分数比为5:10时复合膜抗拉强度最大,且细胞相容性良好。

关键词 合成锂皂土;海藻酸钠;复合膜;仿生结构材料
中图分类号 R 782

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)10-1560-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.010

目前临床上应用的可吸收引导骨再生(guided bone regeneration,GBR)膜通常受到机械强度弱、力学性能不足的限制,易发生穿孔和破裂^[1]。海藻酸钠(sodium alginate,SA)是组织工程支架的常用材料,能促进实验性骨缺损的骨再生,是GBR的合适材料^[2]。合成锂皂土(Laponite[®],LAP)除了作为粘土材料应用于传统医药和化妆品,还可作为开发新的纳米医学功能材料,成为骨组织工程应用的理想选择^[3]。有序的“砖-泥”微观结构赋予了贝类优异的抗拉强度、刚度和韧性,受此启发,引入无机纳米填料制备类似特殊的层状微结构,成为近十年

2021-07-01 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31870969)

作者单位:¹安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究重点实验室,合肥 230032

²上海交通大学医学院附属第九人民医院·口腔医学院口腔外科,上海市口腔医学重点实验室,上海 200001

作者简介:程东东,男,硕士研究生;

邹多宏,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: zhdhy@ahmu.edu.cn

vagina of vulvovaginal candidiasis (VVC) patients was purified and identified, and the Sap enzyme activity was detected; Humans and mice vaginal epithelial cells were cultured by enzyme stepwise digestion and co-cultured with *Candida albicans* with different Sap enzyme activities; The expression of NLRP3 inflammasome was detected in vaginal epithelial cells by immunofluorescence method; The levels of interleukin(IL)-1 β and IL-18 in cell supernatant was detected by ELISA method; Cell morphology was observed by HE staining. The culture methods of humans and mice vaginal epithelial cells were in the same way. **Results** The levels of NLRP3 inflammasome, IL-1 β and IL-18 in the group with strong Sap activity were all higher than those in the group with weak Sap activity, and reached their peaks in the early stage of infection. As the infection time increases, cells could be seen to rupture and die, and NLRP3 inflammasomes also declined, this presented the same tendency in humans and mice vaginal epithelial cells. **Conclusion** *Candida albicans* could stimulate the expression of NLRP3 inflammasome, IL-1 β and IL-18 in vaginal epithelial cells, and *Candida albicans* with strong Sap activity was more effective. Humans and mice vaginal epithelial cells had the same inflammatory response after infection, so mice could replace humans as the model animal for VVC *in vivo* research.

Key words vulvovaginal candidiasis; *Candida albicans*; cell culture; Sap enzyme activities; NLRP3 inflammasome

来提高“软基”聚合物力学性能的最常用方法^[4]。该研究采用喷涂组装方法构建仿贝壳结构的二元体系 LAP-SA 复合膜,通过测试该复合膜的抗拉强度及其对 NIH/3T3 增殖的影响,探讨其应用于组织工程屏障膜的可能性。

1 材料与方法

1.1 合成材料 SA [粘度(10 g/L, 20 °C) / (Pa · s) ≥ 0.02, 上海国药集团化学试剂有限公司]; LAP (东莞市樟木头镇佳桐塑胶原料经营部); 无水氯化钙(美国 Sigma-Aldrich 公司)。

1.2 主要试剂和仪器 DMEM、胰酶消化液(美国 Hyclone 公司); 胎牛血清(美国 Gibco 公司); CCK-8 试剂盒(日本株式会社同仁化学研究所); 力学万能实验机(5565A, 美国英斯特朗公司); CO₂ 孵箱(美国 Thermo 公司); 扫描电镜(Supra40, 德国蔡司公司); 透射电镜(HT7700, 日本日立公司); X 射线衍射仪(XPert3 Powder, 荷兰帕纳科公司); 傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet 8700, 美国热电尼高力仪器公司); 酶标仪(美国 Bio-tek 公司); 高温高压灭菌锅(HVE-50, 日本 Hirayama 公司)。

1.3 原料配制 分别配制质量浓度为 2% 的 SA 溶液及 LAP 溶液。分别称取 2 g 原料粉末溶于 98 ml 去离子水中,室温下搅拌直至完全溶解分散。

1.4 复合薄膜的制备 首先制备 LAP 与 SA 的质量分数比为 1:10 的复合膜(设为 1 组),取 1 ml LAP 溶液与 10 ml SA 溶液混匀,磁子搅拌 0.5 h 直至完全分散,真空箱内除气泡后通过热喷涂组装方法,将混合液喷涂到热的基材上,待水蒸发后干燥成

膜。同理分别制备 LAP 与 SA 的质量分数比为 3:10、5:10、7:10、9:10 的复合膜和纯 SA 膜(图 1),分别命名为 3、5、7、9 组和 0 组;随后取抗拉强度最大的复合膜用 Ca²⁺ 螯合后作为 Ca²⁺ 组,共 6 组。同时为后面材料表征,将抗拉强度最大的复合膜组直接设为复合膜组,将制备的纯 SA 膜设为纯 SA 膜组。

1.5 力学测试 在室温下将每组薄膜裁剪为长 50 mm、宽 4 mm 的测试样品,并用螺旋测微仪测量每组样品厚度,通过力学万能实验机以 0.1 mm/s 的拉伸速度直至样品断裂,记录其抗压强度,每组样品重复测试 6 次。取抗拉强度最大的复合膜组,重新制备测试样品后浸泡于 0.5 mol/L 的氯化钙溶液中 5 s,室温下自然干燥后,以同样方法测试抗拉强度。最后绘制出相应的应力-应变曲线和断裂应力值表。

1.6 样品表征 取抗拉强度最大的复合膜组和纯 SA 膜组,采用扫描电镜观察两组膜截面的微观结构。取 LAP 稀释溶液滴在透射铜网表面,待干燥后采用透射电镜观察 LAP 纳米片的形貌。取少量 LAP 纳米片、SA 膜和复合膜分别平铺于观测台上,采用 X 射线衍射仪分析各组成成分。研磨 LAP 纳米片、复合膜及 SA 膜,采用傅里叶变换红外光谱仪分析各成分。

1.7 细胞相容性实验 取抗拉强度最大的复合膜组和纯 SA 膜组,用 0.5 mol/L 的 CaCl₂ 溶液预处理 5 s 后 PBS 洗净。制备直径为 6 mm 的圆形复合膜和纯 SA 膜薄片,每组 10 个,高温高压灭菌。细胞系选用鼠胚胎成纤维细胞(NIH/3T3 细胞,由中国

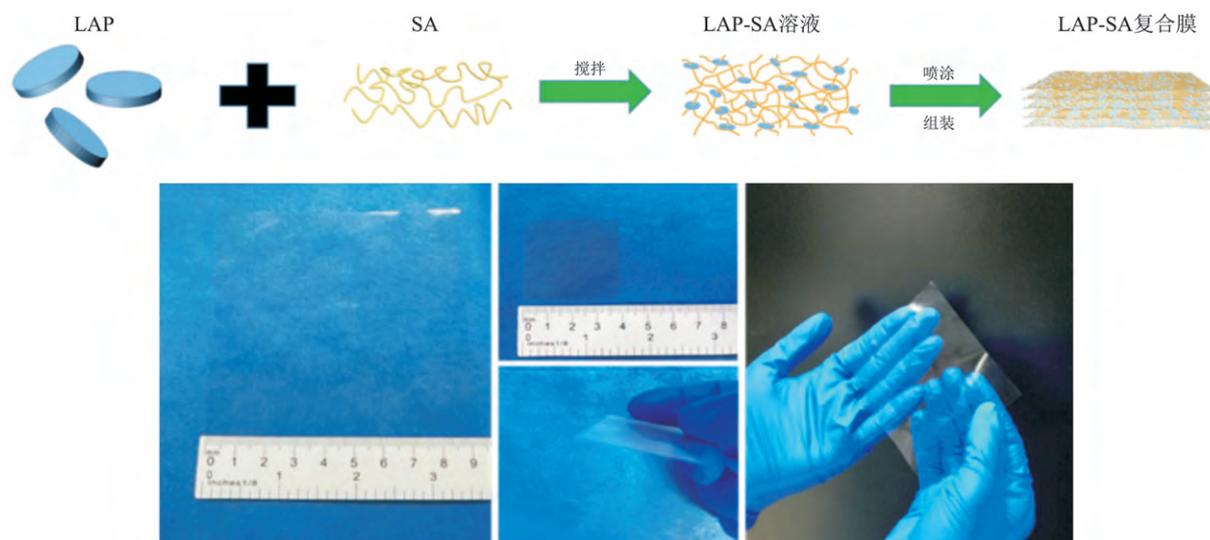


图 1 LAP-SA 复合膜制备过程示意图与展示图

科学院细胞库提供),以 8×10^3 /孔接种,每组每个时间点 5 个复孔(空白对照组仅接种 NIH/3T3) 37°C 、5% CO_2 培养。24、48 h 后将 CCK-8 试剂与 DMEM 按 1 : 9 比例混合,每孔加 $100 \mu\text{l}$ 37°C 、5% CO_2 培养 2 h。用酶标仪在 450 nm 处读取吸光度值(optical density, OD)。

1.8 统计学处理 使用 SPSS Statistics 进行统计分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析对各组的结果进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组膜抗拉强度的比较 如图 2 所示各组膜的应力 - 应变曲线及断裂应力值。随着 LAP 与 SA 质量分数比的增加,LAP-SA 复合膜的抗拉强度也随之增加,当 LAP 与 SA 的质量分数比为 5 : 10 时,即 5 组复合膜的抗拉强度达最大,之后继续增加 LAP 含量,LAP-SA 复合膜抗拉强度开始下降,各组总体差异有统计学意义 ($F = 77.385, P < 0.001$)。且 5 组膜样品用 Ca^{2+} 螯合后,即 Ca^{2+} 组的抗拉强度相比螯合前有一定增加且差异无统计学意义。

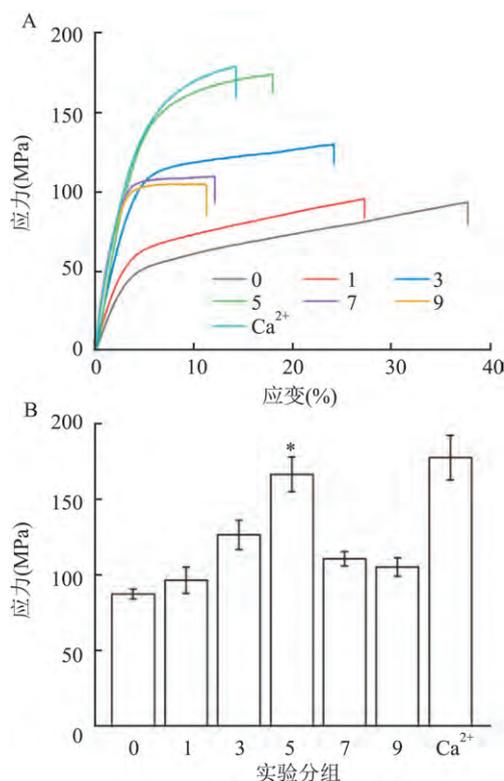


图 2 不同 LAP-SA 复合膜组和 SA 膜组样品的抗拉强度比较

A: 各组样品的应力 - 应变曲线; B: 各组样品的断裂应力值; 与 0、1、3、7、9 组比较: * $P < 0.05$

2.2 样品表征 LAP 与 SA 的质量分数比为 5 : 10 时,扫描电镜下可见复合膜厚度约为 $30 \mu\text{m}$,截面呈明显的有序层状结构(图 3)。透射电镜示 LAP 纳米片呈薄片状,透光性和分散性良好(图 4)。X 射线衍射仪、傅里叶变换红外光谱仪分析证实复合膜中存在 LAP(图 5)。

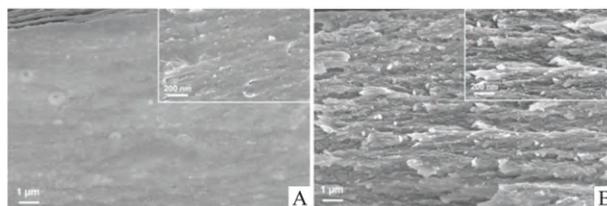


图 3 扫描电镜下观察样品截面的微观结构 $\times 10\,000$
A: 纯 SA 膜组的截面; B: 复合膜组的截面

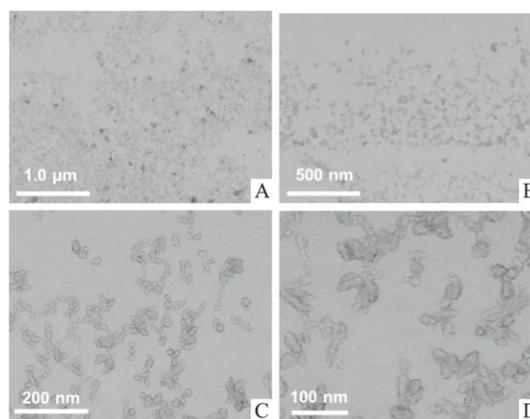


图 4 LAP 纳米片不同倍数下的透射电镜观察

A: $\times 10\,000$; B: $\times 20\,000$; C: $\times 50\,000$; D: $\times 100\,000$

2.3 细胞相容性实验结果 如图 6 所示,选取 LAP 与 SA 质量分数比为 5 : 10 复合膜作为复合膜组进行细胞相容性实验,结果显示 NIH/3T3 与空白对照组、纯 SA 膜组和复合膜组共培养的 24、48 h 内,相同时间点各组 OD 值差异无统计学意义。

3 讨论

临床常用的 GBR 膜可分为不可吸收性膜和生物可吸收性膜。然而,不可吸收性膜在创口愈合过程中存在软组织开裂,导致屏障膜暴露的风险,可能造成创口感染甚至需要提前将其取出,从而影响 GBR 的再生效果;同时,在新骨形成之后必须实施第 2 次手术,将不可吸收性膜取出,从而不可避免地增加患者的痛苦和费用,并增加并发症发生的概率^[5-6]。生物可吸收性膜主要由可降解的合成或天然聚合物组成,无需二次手术,并且很少发生软组织

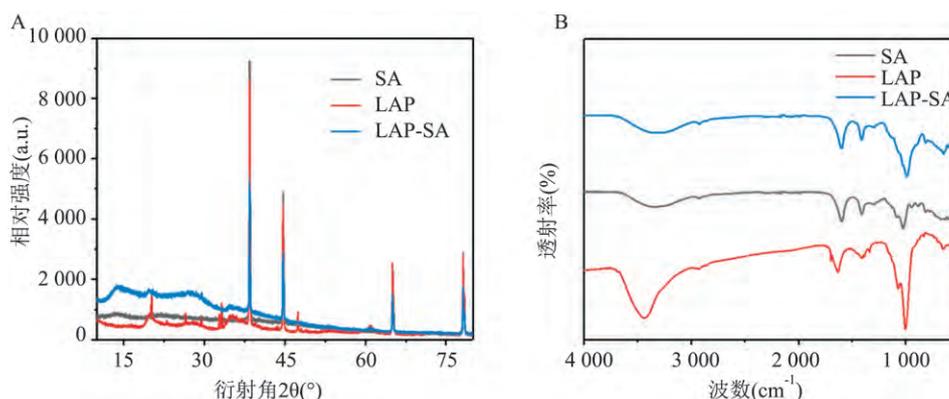


图5 LAP-SA 复合膜的组成成分分析

A: 复合膜的 X 射线衍射结果; B: 复合膜的傅里叶变换红外光谱结果

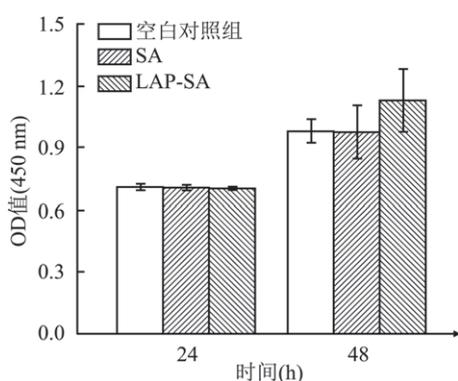


图6 各组膜材料与 NIH/3T3 共培养不同时间后细胞计数的比较

开裂等并发症,但屏障膜的机械强度不足会导致成骨效果不确定,如临床上应用广泛的 Bio-Gide 及其他可吸收膜的抗拉强度均低于 100 MPa^[7]。

因此,本研究拟制备一种新型可代谢高机械性能 GBR 膜。藻酸盐是一种天然存在的阴离子聚合物,具有良好的生物相容性、低毒性,且成本相对低廉,以及通过添加二价阳离子(如 Ca^{2+}) 可发生凝胶化等特性,在生物医学领域中被大量研究^[8]。然而,由于该类聚合物在生理条件下的不稳定性和较差的机械性能限制了其临床应用。LAP 是一种人工合成的可生物降解的层状硅酸盐^[9],具有易于大量生产、廉价易得、纯度、组成和晶体尺寸均可控等优势,此外由于其纳米材料的层状结构,具有纳米晶体组成的附加优势,如较高的比表面积、吸附能力、表面反应性及阳离子的交换能力,因此能够作为具有流变特性的改性剂和成膜剂在技术层面广泛应用^[10]。其可通过带负电荷表面和带正电荷边缘与生物大分子发生多种物理结合,已有多个研究^[11]表

明,向聚合物网络中引入 LAP 纳米颗粒可以大大提高复合物的机械性能。同时,近年来的研究^[9-12]表明, LAP 可以释放 Mg^{2+} 等离子,是一种极具潜力的骨修复材料,可以改善细胞黏附,诱导骨髓间充质干细胞成骨分化。Wang et al^[12]研究了 LAP 生物陶瓷在骨组织工程应用中潜在的适用性,其结论显示 LAP 生物陶瓷具有良好的生物安全性以及表面亲水性和蛋白质吸附活性,同时体内骨愈合效果良好,在骨组织工程中具有广阔的应用前景。

因此,本课题组拟向 SA 体系中加入 LAP 作为物理交联剂以及硅酸盐填料来提高复合膜的机械性能和成骨诱导功能。为使纳米晶体在体系中分散均匀,本课题组将混有 LAP 的 SA 悬浮溶液喷涂到热的基材上,待水蒸发后便可形成有序的层状微结构。完成复合膜制备后便进行力学抗拉强度测试,当 LAP 与 SA 的质量分数比为 5:10 时,复合膜的抗拉强度达到最大 (166.9 ± 11.5) MPa。为了进一步提高复合膜的机械性能,本课题组采用氯化钙浸泡的方法,使 Ca^{2+} 与 SA 产生螯合作用从而稳固复合膜^[13],并测试其抗拉强度。结果显示 Ca^{2+} 螯合后的抗拉强度可增加至 (178.0 ± 14.8) MPa,相比螯合前有一定增加,但差异无统计学意义。

参考文献

- [1] Elgali I, Omar O, Dahlin C, et al. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited [J]. Eur J Oral Sci, 2017, 125(5): 315-37.
- [2] He H, Huang J, Ping F, et al. Calcium alginate film used for guided bone regeneration in mandible defects in a rabbit model [J]. Cranio, 2008, 26(1): 65-70.
- [3] Ibrahim D M, Sani E S, Soliman A M, et al. Bioactive and elastic

- nanocomposites with antimicrobial properties for bone tissue regeneration [J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2020, 3(5): 3313–25.
- [4] Mao L, Gao H, Yao H, et al. Synthetic nacre by pre-designed matrix-directed mineralization [J]. *Science*, 2016, 354(6308): 107–10.
- [5] Turri A, Elgali I, Vazirani F, et al. Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment [J]. *Biomaterials*, 2016, 84: 167–83.
- [6] 周琳, 杨慧, 吴梦楠, 等. MTAN 对种植体周围炎致病菌及生物膜抑制作用的体外研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(11): 1661–5.
- [7] An Y, Kim Y, Lim S, et al. Physicochemical properties and re-sorption progress of porcine skin-derived collagen membranes: *In vitro* and *in vivo* analysis [J]. *Dental Mater J*, 2018, 37(2): 332–40.
- [8] 陈慧敏, 宋婷婷, 吴齐越, 等. 海藻酸钠壳聚糖支架复合成骨细胞特异性多肽修复兔颅骨缺损 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(4): 504–7.
- [9] Dawson J I, Oreffo R O C. Clay: new opportunities for tissue regeneration and biomaterial design [J]. *Adv Mater*, 2013, 25(30): 4069–86.
- [10] Tomás H, Alves C S, Rodrigues J. Laponite®: A key nanoplat-form for biomedical applications [J]. *Nanomedicine*, 2018, 14(7): 2407–20.
- [11] Loiseau A, Tassin J. Model nanocomposites based on laponite and poly(ethylene oxide): preparation and rheology [J]. *Macromolecules*, 2006, 39(26): 9185–91.
- [12] Wang C, Wang S, Li K, et al. Preparation of laponite bioceramics for potential bone tissue engineering applications [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99585.
- [13] Ueyama Y, Ishikawa K, Mano T, et al. Usefulness as guided bone regeneration membrane of the alginate membrane. [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(9): 2027–33.

Preparation and research of a Laponite® – sodium alginate guided bone regeneration composite film

Cheng Dongdong, Zhou Pu, Xing Xin, et al

(*Stomatological College of Anhui Medical University, The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University Key Lab of Oral Diseases Research of Anhui Province Hefei 230032*)

Abstract Objective To research the feasibility of Laponite® (LAP) –sodium alginate (SA) guided bone regeneration composite film used as tissue engineering barrier films by testing its mechanical properties and biocompatibility. **Methods** Pure SA solution and binary mixture with different LAP and SA ratios (1 : 10, 3 : 10, 5 : 10, 7 : 10, 9 : 10) were formed into films through thermal spraying. The tensile strength of the composite films were tested by mechanical universal testing machine ($n = 6$). The microstructure of pure SA film and the composite film with the best tensile strength was observed by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared (FTIR) spectrometer were used to characterize the ingredients of the material. Samples with the highest tensile strength was prepared again, followed by immersing in 0.5 mol/L calcium chloride solution for 5 s. The tensile strength of the new group of samples was tested after natural drying. Cell counting kit-8 (CCK-8) was applied to detect cell counts in the blank control group, the pure SA film group, the composite film group with the highest tensile strength ($n = 5$) and all groups co-cultured with the NIH/3T3 for 24 h and 48 h. **Results** After adding LAP, the cross-section of the composite film showed ordered layer structure. XRD and FTIR showed that LAP could be found in the composite film. The tensile strength first increased and then decreased with the increase of LAP proportion in composite films. The optimal mass ratio of LAP and sodium alginate in composite film was (5 : 10), and the tensile strength reached (166.9 ± 11.5) MPa before and (178.0 ± 14.8) MPa after Ca^{2+} chelation. The CCK-8 test of NIH/3T3 showed that there was no significant difference in absorbance between the pure SA film group and the LAP-SA composite film group when they were compared with the blank control group. **Conclusion** When the mass ratio of the composite film is 5 : 10, the composite film has the best tensile strength and good cytocompatibility.

Key words Laponite®; sodium alginate; the composite film; biomimetic structural materials