

# 负载 BMP-2 的自放电 PVDF/BT 纳米纤维支架促进成骨分化

吴锋锋 金明超 陈卓 王国荣 徐艳

(浙江省湖州市中心医院骨科 浙江湖州 313000)

**摘要:**目的: 通过静电纺丝技术制备负载 BMP-2 的 PVDF/BT 纳米支架, 并评价其促成骨分化性能。方法: 利用静电纺丝技术制备 PVDF/BT 纳米纤维支架, 随后使用多巴胺涂布其表面, 用于负载 BMP-2, 以实现 BMP-2 的缓释。以 PVDF/BT 纳米纤维支架为对照组, 用扫描电镜 (Scanning electron microscope, SEM) 对纳米纤维支架进行形貌表征, 用 ELISA 分析 BMP-2 的负载率和累计释放情况, 最后用 SEM、CCK-8、PCR 等方法评估成骨细胞 MC3T3-E1 在支架上的增殖分化情况。结果: 制备的静电纺丝支架在涂布多巴胺之后直径较 PVDF/BT 支架普遍更大, 表面更粗糙, 说明多巴胺成功涂布于静电纺丝支架上; ELISA 结果表明, 涂布多巴胺之后, 支架对 BMP-2 的负载率高达 71%, 且负载在支架上的 BMP-2 可持续释放长达 28 天。SEM 图提示负载 BMP-2 的自放电 PVDF/BT 纳米纤维支架 (PDB) 上成骨细胞生长状态较纯 PVDF/BT 纳米纤维 (P) 更好, CCK-8 结果也提示其细胞活性更高。PCR 结果表明 PDB 组成骨细胞 ALP、COL-1、OCN 和 RUNX2 等成骨基因表达较 P 组明显升高, 提示 PDB 支架可促成骨分化。

**关键词:** 成骨分化; 压电效应; 静电纺丝纤维; 多巴胺; BMP-2

现今, 骨缺损的病例出现, 给全球人类健康带来重大挑战。面对骨缺损问题, 临床上常采用骨移植手术解决。但是骨移植手术时间长、供体有限, 还会出现移植区域的感染、骨折、疼痛等问题<sup>[1]</sup>。近年来, 骨组织工程技术成为治疗骨缺损的新策略, 一定程度上克服了传统骨移植手术的弊端。骨组织工程支架可以模拟细胞外基质 (ECM) 的纳米纤维结构, 为细胞的粘附增殖分化提供支持<sup>[2]</sup>。随着对骨组织微环境研究的不断深入, 越来越多的研究提出骨组织具有压电效应这一特性, 压电效应可以使骨组织内的压力转化为电信号并激活细胞内的信号转导进而促进细胞增殖分化<sup>[3-5]</sup>。因此, 制备具有压电效应的仿生支架在骨缺损治疗中更具前景。

聚偏氟乙烯 (PVDF) 是一种具有压电效应的材料, 其有五种晶体相, 其压电性能主要取决于  $\beta$  相晶体的含量<sup>[6]</sup>, 而本项目采用静电纺丝技术可一定程度提升 PVDF 中  $\beta$  相晶体含量<sup>[7-10]</sup>, 增强压电效应。钛酸钡 (BaTiO<sub>3</sub>, BT) 是骨组织工程中应用最广泛的压电生物活性陶瓷<sup>[11]</sup>。通过静电纺丝技术制备 PVDF/BT 复合纳米纤维, 能显著提升 PVDF 的  $\beta$  相晶体含量使支架的压电性能得到明显增强。因此在本研究中, 我们通过静电纺丝技术制备了

PVDF/BT 纳米纤维膜, 增强了 PVDF 的压电性能, 同时赋予了支架大表面积和多孔结构等特性, 为成骨细胞的附着、增殖和分化提供支持。

在骨修复领域, 应用细胞因子已成为一种常见做法。其中, BMP-2 作为一种能够促进骨细胞成骨分化的生物因子, 对治疗骨缺损效果显著<sup>[12]</sup>。然而, 未经控制的 BMP-2 释放可能引发多种不良反应<sup>[13]</sup>。因此, 如何实现 BMP-2 的控制释放成为当务之急。多巴胺是一种具有出色吸附性的物质, 能够与各种支架、生物膜和金属表面结合, 实现对生物活性物质的固定和缓慢释放。本研究采用了在 PVDF/BT 静电纺丝膜表面涂覆多巴胺的方法, 成功实现了 BMP-2 的持续释放。最终, 通过细胞实验证实了该仿生生物支架促成骨分化的显著效果, 为解决骨缺损问题提供了一种全新的解决思路。

## 1. 材料和方法

### 1.1 制备 PVDF/BT 静电纺丝膜

将 VDF 和 BT 聚合物溶解于混合了二甲基甲酰胺和丙酮的溶剂中, 形成纺丝溶液并搅拌过夜。然后, 将溶液装入 22G 钝头针注射器中, 调整针尖与铝集电板的距离为 11cm。施加 19kV 的静电纺丝场电压差, 同时控制

注射泵以 1.8ml/h 的速率释放纺丝溶液。最终，将制得的纺丝膜置于真空烘箱中 12 小时，以去除残留溶液。

### 1.2BMP-2 的固定与释放

向 9.9ml 去离子水中加入 20mg 多巴胺和 100ul 1M Tris-HCL 缓冲液 (PH 8.5)，制成多巴胺涂布液并将静电纺丝膜浸入其中，在水平摇床上摇动 8 小时。随后用去离子水清洗掉未结合的多巴胺。涂布完成将其浸泡在含有 BMP-2 溶液 (浓度为 500ng/ml, 1ml) 中，在 37℃ 环境下，于水平摇床中摇动 24 小时以负载 BMP-2。最后将支架置于 1ml PBS 溶液中，分别在第 1、3、5、7、14、21 和 28 天收集 PBS 并加入 1ml 新的 PBS 以确保持续释放 BMP-2。将收集的 PBS 溶液保存于 -80℃ 冰箱中，最后使用 BMP-2 ELISA 试剂盒检测 BMP-2 的浓度，并绘制 BMP-2 释放曲线。

### 1.3 支架表征

首先，对支架进行金喷镀处理。随后，利用扫描电镜 (SEM) 对静电纺丝的形貌进行详细观察，并进行拍照以记录形态特征。使用 Nano Measure 软件对 SEM 图像中的静电纺丝直径进行精确计算和分析。最后，借助静态 d33 测试设备，对比测量 PVDF 和静电纺丝支架的压电常数。

### 1.4 细胞实验

使用 MC3T3-E1 亚克隆 14 细胞系进行体外实验。细胞培养基中含有 10% 胎牛血清的 MEM- $\alpha$ ，并添加了 1% 的青霉素链霉素溶液。细胞在 37℃ 和 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养，每两天更换一次培养基，每四天进行一次细胞传代。在 24 孔板中，使用无菌铁环固定纺丝支架。接种细胞后，每两天更换一次培养基，并使用成骨分化诱导培养基促进细胞分化。在培养的第 7 和 14 天，固定并清洗细胞，进行电镜观察并评估细胞活性。同时进行 CCK-8 实验评估细胞活性。在第 14 天，提取细胞总 RNA 进行基因表达分析，检测 COL-I, OCN, ALP 和 RUNX2 等成骨相关基因的表达水平。

PCR 引物详细信息如下：

#### COL-I

上游引物: GAGGGCCAAGACGAAGACATC

下游引物: CAGATCACGTCATCGCACAAC

#### RUNX2

上游引物: TGGTACTGTCATGGCGGGTA

下游引物: TCTCAGATCGTTGAACCTTGCTA

#### ALP

上游引物: ACTGGTACTCAGACAACGAGAT

下游引物: ACGTCAATGTCCCTGATGTTATG

#### OCN

上游引物: GGCGCTACCTGTATCAATGG

下游引物: GTGGTCAGCCAACTCGTCA

#### GAPDH

上游引物: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC

下游引物: TGGTGAAGACGCCAGTGA

## 2.结果

### 2.1 PVDF/BT 支架的表征

扫描电镜结果 (图 1 A) 提示，涂布多巴胺的静电纺丝支架其纺丝直径明显较涂布前有所增加，PDB 支架纺丝纤维直径为  $262.0 \pm 61.3$  nm，P 支架纺丝纤维直径为  $221.3 \pm 55.8$  nm，PDB 支架纺丝表面较 P 支架明显更加粗糙，这些均提示多巴胺已成功涂布于纺支架表面。随后使用静态 d33 测试仪对纺丝支架的压电性能进行了测试，结果提示 PDB 支架中的 PVDF 压电性能得到了提升 (表 1)。

表 1 压电常数测试结果

	压电常数(d33) (pC/N)
PVDF	18.79 $\pm$ 4.55
PVDF/BT 支架	27.14 $\pm$ 3.96

### 2.2BMP-2 的释放

ELISA 结果提示，BMP-2 溶液浸泡过纺丝支架 PDB 后，剩余溶液中的 BMP-2 的浓度为  $145 \pm 8.89$  ng，由此

计算可得 BMP-2 的固定率约为 76%，且在持续 28 天的释放实验中，仅有大约 6% 的 BMP-2 被释放出来。以上实验结果提示，使用多巴胺有助于 BMP-2 的负载，且负载的 BMP-2 能够实现有限的缓释。

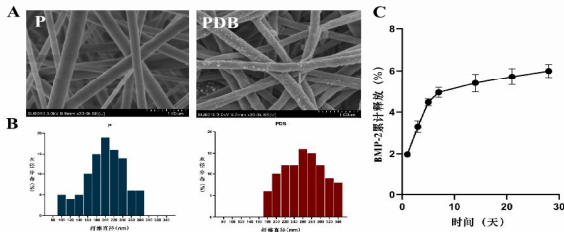


图 1. 静电纺丝膜表征结果：(A) P 支架和 PDB 支架的电镜扫描照片，比例尺：1 $\mu$ m；(B) P 支架和 PDB 支架中静电纺丝纤维的直径分布情况；(C) PDB 支架上 BMP-2 的释放情况。

### 2.3 支架上成骨细胞的生长状态

图 2 展示了通过 SEM 观察的静电纺丝支架上成骨细胞的生长状态。与 P 支架相比，PDB 支架上的成骨细胞生长状态更加健康，且细胞数量明显增加。这表明多巴胺对成骨细胞没有明显毒性，反而有助于细胞的黏附和生长。CCK-8 实验进一步证实了这一观察结果。

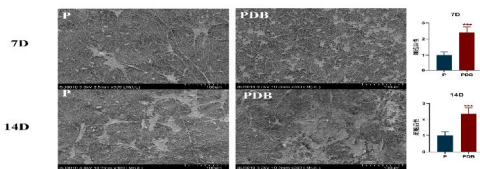


图 2 扫描电镜观测成骨细胞在静电纺丝支架上的生长状态，开展 CCK-8 实验检测细胞活性。(\*\*\*:  $p < 0.001$ )

### 2.4 成骨相关基因的表达

图 3 展示了 PCR 分析结果，与 P 组相比，PDB 组中成骨相关基因包括 ALP、COL-I、OCN 和 RUNX2 的表达明显增加。这表明该成骨支架在体外具有出色的促进成骨能力。

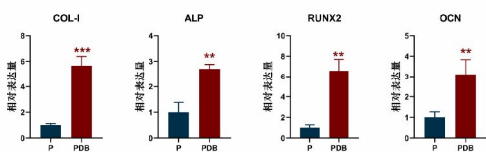


图 3 PCR 检测 P 支架和 PDB 支架上细胞成骨相关基因的表达量，PDB 组成骨基因表达量明显高于 P 组 (\*\*:  $p < 0.01$ )

$p < 0.01$  \*\*\*:  $p < 0.001$ )

### 3 讨论：

骨缺损是全球健康领域的一大挑战，传统的骨移植手术存在诸多问题。骨组织工程技术为克服这些问题提供了新的途径。然而，骨组织的细胞外基质具有压电效应，因此需要寻找能模拟这种特性的新材料来制备更有效的仿生支架。PVDF 作为压电材料，具有良好的生物相容性，可用于制备仿生骨支架，增强修复效果。本研究中，我们利用静电纺丝技术制备了 PVDF/BT 静电纺丝支架，并证明了其具有较强的压电性能。同时在支架表面涂布多巴胺，促进细胞粘附增殖，并固定 BMP-2 以实现缓释效果。实验结果显示，在 28 天内，仅有约 6% 的 BMP-2 被释放，大部分仍保留在支架上，这表明多巴胺成功固定了 BMP-2，且释放速率相对稳定。

成功制备了自供电仿生骨支架后，我们进行了体外实验来验证其成骨性能。在这些实验中，我们将成骨细胞分别种植在 P 支架和 PDB 支架上，并通过 SEM 和 CCK-8 实验评估细胞活性，以分析多巴胺对细胞粘附增殖的影响。结果表明，多巴胺对成骨细胞没有毒性，反而有利于细胞的粘附生长。此外，RT-qPCR 实验显示，PDB 支架上的细胞表达的成骨基因水平更高，说明 PDB 支架促进了细胞的成骨分化。

在本研究中，我们制备了 PVDF/BT 静电纺丝膜，并通过多巴胺将 BMP-2 固定在其上，该支架的压电效应、BMP-2 的可控释放及其粗糙的表面增强了其促成骨分化性能。

### 参考文献

[1]Graham, S. M., Leonidou, A., et al. 2010 Biological therapy of bone defects: the immunology of bone allo-transplantation Expert Opin Biol Ther,10 (6):885-901.  
 [2]Wang,X.Yu,J.et al.2016 Electrospun nanofibrous materials: a versatile medium for effective oil/water separation Materials Today,

19(7):403–414.

[3]Shamos, M. H., Lavine, L. S., et al. 1963 Piezoelectric effect in bone *Nature*,197:81.

[4]Damaraju,S.M.Shen,Y.et al.2017 Three–dimensional piezoele

ctric fibrous scaffolds selectively promote mesenchymal stem cell differentiation *Biomaterials*,149:51–62.

[5]Fernandes, M. M., Correia, D. M., et al. 2019 Bioinspired Three–Dimensional Magnetoactive Scaffolds for Bone Tissue Engine

ering *ACS Appl Mater Interfaces*,11 (48):45265–45275.

[6]Gregorio, R. and Cestari, M. 1994 EFFECT OF CRYSTALLIZATION TEMPERATURE ON THE CRYSTAL LINE PHASE CONTENT AND MORPHOLOGY OF POLY(VINYLLIDENE FLUORIDE) *Journal of Polymer Science Part B–Polymer Physics*,32 (5):859–870.

[7]Sencadas, V., Gregorio, R., et al. 2009  $\alpha$  to  $\beta$  Phase Transformation and Microstructural Changes of PVDF Films Induced by Uniaxial Stretch *Journal of Macromolecular Science, Part B*,48 (3):514–525.

[8]Shepelin, N. A., Glushenkov, A. M., et al. 2019 New developments in composites, copolymer technologies and processing techniques for flexible fluoropolymer piezoelectric generators for efficient energy harvesting *Energy &*

*Environmental Science*,12 (4):1143–1176.

[9]Bouhamed, A., Binyu, Q., et al. 2021 A hybrid piezoelectric composite flexible film based on PVDF–HFP for boosting power generation *Composites Science and Technology*,208.

[10]Ongun, M. Z., Oguzlar, S., et al. 2020 Enhancement of piezoelectric energy–harvesting capacity of electrospun  $\beta$ –PVDF nanogenerators by adding GO and rGO *Journal of Materials Science–Materials in Electronics*,31 (3):1960–1968.

[11]Wu,H.Dong,H.et al. 2023 Electrical stimulation of piezoelectric BaTiO<sub>3</sub> coated Ti6Al4V scaffolds promotes anti–inflammatory polarization of macrophages and bone repair via MAPK/JNK inhibition and OXPHOS activation *Biomaterials*,293:121990.

[12]Lo,K.W,Ulery,B.D,et al.2012 Studies of bone morphogenetic protein–based surgical repair *Adv Drug Deliv Rev*,64 (12):1277–1291.

[13]Elias,E.Nasser,Z., et al. 2018 Bone Morphogenetic Protein Usage in Anterior Lumbar Interbody Fusion: What Else Can Go Wrong? *World Neurosurg*,111:55–59.

基金项目：浙江省科技厅公益项目（编号：LGF21H060001）；浙江省卫生厅创新人才支持计划（编号：2021RC029）