

明胶基复合水凝胶中微纳米生物活性玻璃含量对其 体外矿化及降解性能的影响

杨 振¹, 刘 聪², 陈晓峰², 杨 磊¹

(1. 河北工业大学材料科学与工程学院, 天津 300131; 2. 华南理工大学材料科学与工程学院, 广州 510641)

摘 要:近年来, 基于明胶和微纳米生物活性玻璃(MNBG)的复合水凝胶被广泛用于组织再生领域, 然而 MNBG 对水凝胶矿化和降解性能的调控规律尚不明确。通过制备不同 MNBG 含量的明胶基复合水凝胶, 探究了 MNBG 含量对复合水凝胶体外矿化及降解性能的影响。结果表明: 复合水凝胶体系不影响 MNBG 的生物活性离子释放, 而表层高含量 MNBG 团聚体形成负曲率接触界面则是复合水凝胶发生体外矿化的必要条件; 此外, 提高 MNBG 的含量和快速矿化形成羟基磷灰石层均能够有效降低明胶基复合水凝胶的降解速率。

关键词: 微纳米生物活性玻璃; 复合水凝胶; 体外矿化; 降解

中图分类号: TB332 文献标志码: A 文章编号: 0454-5648(2023)10-2536-08

网络出版时间: 2023-08-07



Effect of Micro-Nano Bioactive Glass Content in Gelatin Based Composite Hydrogel on Its Mineralization and Degradation *In Vitro*

YANG Zhen¹, LIU Cong², CHEN Xiaofeng², YANG Lei¹

(1. School of Materials Science and Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300131, China; 2. School of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: In recent years, the composite hydrogels composed of micro-nano bioactive glass (MNBG) and gelatin are widely used in tissue regeneration. However, the relationship between hydrogels and MNBG in terms of mineralization and degradation is still unclear. In this paper, gelatin based composite hydrogels with different concentrations of MNBG were prepared, and the effect of MNBG on the mineralization and degradation properties of composite hydrogel was investigated by *in vitro* experiments. The results show that the composite hydrogel does not affect the bioactive ion release of MNBG, and the formation of negative curvature interface by a high concentration of MNBG aggregates is a necessary condition for composite hydrogels to mineralize. In addition, increasing the concentration of MNBG and quickly mineralizing to form hydroxyapatite layer can effectively reduce the degradation rate of gelatin based composite hydrogel.

Keywords: micro-nano bioactive glass; composite hydrogel; *in vitro* mineralization; degradation

生物活性玻璃(BG)是由 Larry Hench 教授团队发明的一种具有无机非晶态结构和组织修复活性的

玻璃材料^[1], 自 20 世纪 90 年代获美国 FDA 批准以来, 已被广泛应用于骨、齿和皮肤等领域的组织再

收稿日期: 2023-04-01。 修订日期: 2023-04-17。

基金项目: 国家自然科学基金杰出青年基金(8205025); “十三五”国家重点研发计划项目课题(2020YFC1107401); 河北省全职引进高端人才项目(2020HBQZY012); 河北省自然科学基金创新研究群体项目(H2022202007); 云南省杨磊专家工作站(202205AF150025); 天津市多元投入基金项目重点项目(S21DYD5171)。

第一作者: 杨 振(1993—), 男, 博士。

通信作者: 陈晓峰(1970—), 男, 博士, 教授。

杨 磊(1982—), 男, 博士, 教授。

Received date: 2023-04-01. Revised date: 2023-04-17.

First author: YANG Zhen (1993—), male, Ph.D.

E-mail: yangzhenqdu@163.com

Correspondent author: CHEN Xiaofeng (1956—), male, Ph.D., Professor.

YANG Lei (1982—), male, Ph.D., Professor.

E-mail: chenxf@scut.edu.cn; ylel@hebut.edu.cn

生修复治疗中。在骨修复领域, BG 可通过与体液进行离子交换释放 Si、Ca 等生物活性离子, 诱导骨祖细胞成骨分化^[2], 并通过矿化形成羟基磷灰石(HA)实现材料与骨的整合, 引导新骨生长并最终实现骨损伤的重建^[3]。但 BG 由于生产工艺的限制, 其粉体形貌及组分均一性较差, 近年来随着 BG 生产加工工艺的不断优化改进, 使用溶胶-凝胶法与模板法相结合制备的微纳米生物活性玻璃(MNBG)已成功实现了粉体形貌、尺寸和组成的可控制备, 成为新一代 BG 骨修复材料的研究重点^[4-5]。

然而, MNBG 由于缺乏有效的自固化方法, 在骨修复材料的开发中常将其与高分子材料相复合, 如 MNBG 复合纤维^[6]、复合支架^[7]及复合水凝胶材料等^[8]。特别是以明胶或透明质酸等天然高分子为主要成分的复合水凝胶, 由于能够形成类细胞外基质环境, 在组织工程材料的开发中逐渐成为研究热点^[9]。已有多种基于 MNBG 和天然高分子的可注射原位成型、3D 打印或智能响应复合水凝胶被应用于骨损伤的再生修复, 并在研究中取得了极佳的修复效果^[10-12]。但在复合水凝胶的相关研究中, MNBG 常被作为一种释放生物活性离子的功能单元进行添加, 而其矿化形成 HA 这一骨整合能力的重要体现在水凝胶中如何被影响, 以及 MNBG 对天然高分子水凝胶降解性的作用在研究中却并未引起足够的重视, 其相互作用关系仍有待研究。

在本工作中, 将 MNBG 与多巴胺改性明胶相混合, 通过 HRP/H₂O₂ 酶交联反应制备了一种 MNBG 明胶基复合水凝胶 Gel-MNBG, 以其为例详细研究了 MNBG 在水凝胶中的离子释放和体外矿化的一般过程及其影响因素, 并进一步探究了 MNBG 对明胶基天然高分子水凝胶降解性的影响。

1 实验

1.1 材料

所用分析纯硅酸四乙酯(TEOS)、磷酸三乙酯(TEP)、十二胺(DDA)、明胶、盐酸多巴胺、碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)及过氧化物脱氢酶(HRP)均购买自上海阿拉丁试剂有限公司; 无水乙醇、四水合硝酸钙和过氧化氢购买自广州化学试剂厂。

1.2 MNBG 粉体的制备

采用溶胶-凝胶法结合模板法制备了 MNBG^[13]。首先将 4 g DDA 溶解于 100 mL 乙醇与去离子水的

混合溶液中(乙醇:水的体积比为 4:1), 随后将 16 mL TEOS 加入至上述溶液中并在 40 °C 搅拌形成乳白色溶液。30 min 后滴加 1.22 mL TEP 并在分散均匀后称取 2.57 g 四水合硝酸钙缓慢加入, 继续反应 3 h。反应结束后静置产物 1 d, 离心分离沉淀并使用乙醇和去离子水交替清洗, 烘干后将粉体置于重庆雅马拓公司 FO311C 型程序控温马弗炉中 650 °C 煅烧 3 h, 得到最终产物。

1.3 多巴胺改性明胶及复合水凝胶的制备

将 5 g 明胶加入浓度为 50 mmol/L 的吗啉乙磷酸缓冲液中(pH=5.0), 60 °C 溶解后冷却至室温。将 0.37 g EDC、0.11 g NHS 和 3 g 盐酸多巴胺依次加入到上述溶液中, 室温避光反应 24 h, 反应结束后产物使用截留分子量 3 500 的透析袋对水透析 4 d, 冷冻干燥后得到白色絮状产物。

向 5 mL 去离子水中分别加入 0、0.05 g 和 0.10 g 的 MNBG 粉体(分别对应 Gel、Gel-5MNBG 和 Gel-10MNBG 3 种组分)超声分散均匀。随后将 1.0 g 多巴胺改性明胶溶解于上述溶液, 并加入 50 μ L HRP 溶液(质量浓度为 30 mg/mL), 得到水凝胶前体溶液。将前体溶液注入聚二甲基硅氧烷模具中(ϕ 10 mm $\times$ 8 mm), 4 °C 静置 20 min 使其能够顺利脱模, 随后将水凝胶浸泡入浓度为 5 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液中 10 min 使其完全交联, 使用去离子水置换水凝胶内溶液后进行后续测试。

1.4 复合水凝胶体外矿化及降解的检测

MNBG 及其复合水凝胶的表面形貌通过德国 Zeiss 公司 DSM 982i 型扫描电子显微镜(SEM)进行观察。复合水凝胶的体外矿化通过将其浸泡于模拟体液(SBF)中孵育不同时间进行测试, 将各组复合水凝胶分别投入自身质量 20 倍的 SBF 中, 置于 37 °C 摇床内 100 r/min 孵育, 分别在第 1、3、5 d 和 7 d 将复合水凝胶取出, 冷冻干燥后通过 SEM 观察其表面形貌, 通过德国 Bruker 公司 D8 Advance 型 X 射线衍射仪(XRD)分析样品表面的晶相组成; 于各时间点取 10 mL 矿化溶液使用美国 Leeman 公司 PS 1000-AT 型电感耦合等离子发射光谱仪测定溶液中 Si、Ca 和 P 3 种元素的浓度。

对于降解性的研究, 将各组复合水凝胶冷冻干燥后记录其质量为 m_0 , 随后将其置于 SBF 中分别孵育 7、14 d 和 21 d, 过滤并冷冻干燥收集水凝胶, 分别记录其质量 m_t , 水凝胶剩余质量分数 $m_r=m_t/m_0\times 100\%$ 。

2 结果与讨论

2.1 MNBG 及其复合水凝胶的显微结构

首先基于溶胶-凝胶法与模板法制备了 MNBG。如图 1 所示, MNBG 具有良好的球形形貌和单分散性, 其平均粒径为 649 nm。进一步通过 HRP/H₂O₂ 酶交联反应, 使用多巴胺改性明胶和 MNBG 分别

制备了不同 MNBG 含量的复合水凝胶。如图 1d 和图 1f 所示, 不含 MNBG 的 Gel 水凝胶表面形貌光滑, 对于添加了 MNBG 的复合水凝胶, Gel-5MNBG 复合水凝胶表面可见较为稀疏的微球分布, Gel-10MNBG 组表面的 MNBG 分布则更加密集, 可明显观察到微球在 Gel-10MNBG 复合水凝胶中形成了大量团聚体。

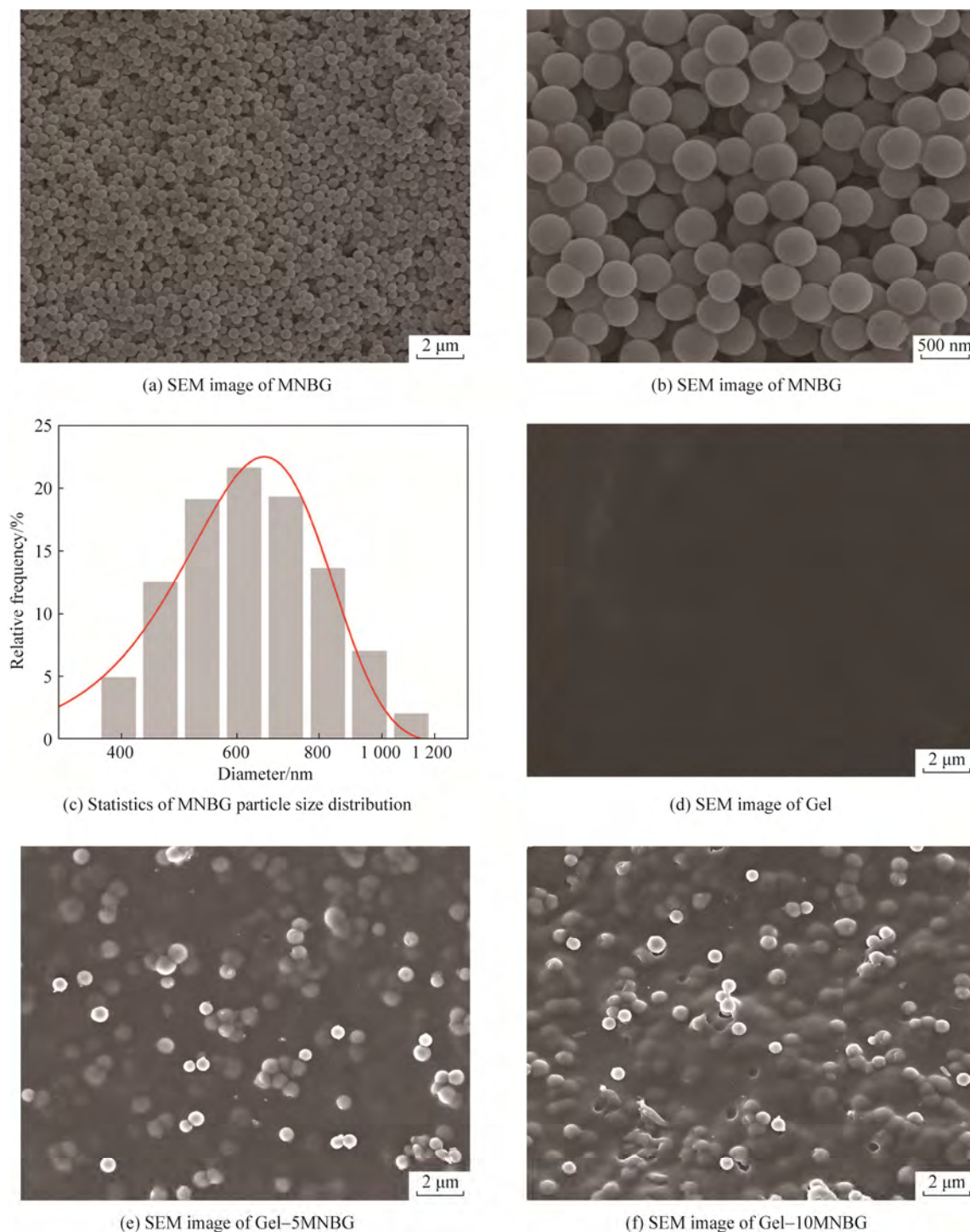


图 1 MNBG 和复合水凝胶的形貌检测

Fig. 1 Morphological detection of MNBG and composite hydrogels

2.2 复合水凝胶体外矿化特性

通过生物矿化形成 HA 是 MNBG 复合材料实现骨整合的基础, 在本工作中利用体外矿化实验详细研究了 MNBG 复合水凝胶的矿化规律。如图 2 所示, 在矿化实验周期内 Gel 组水凝胶的表面形貌未发生明显改变。Gel-5MNBG 复合水凝胶在实验过程中可观察到微球由分散向聚集的变化, 但团聚体被聚合物包裹, 最终无明显矿化产物生成。而对于 Gel-10MNBG 复合水凝胶, 体外矿化 1 d 时即可明

显观察到复合水凝胶表面的 MNBG 团聚体上有颗粒状矿化产物形成; 体外矿化 3 d 和 5 d 的 SEM 照片显示矿化产物逐渐增加, 微球间的界面已被新生产物完全覆盖, 微球互相连接形成整体; 此外, 可明显观察到视野内 MNBG 的数量随体外矿化实验的进行显著增加, 且其分布层次感较强; 在体外矿化 7 d 时, SEM 照片显示矿化区域的 MNBG 已完全被新形成的矿化产物所取代, 片状的矿化产物互相结合形成花状结构, 覆盖于复合水凝胶表面。

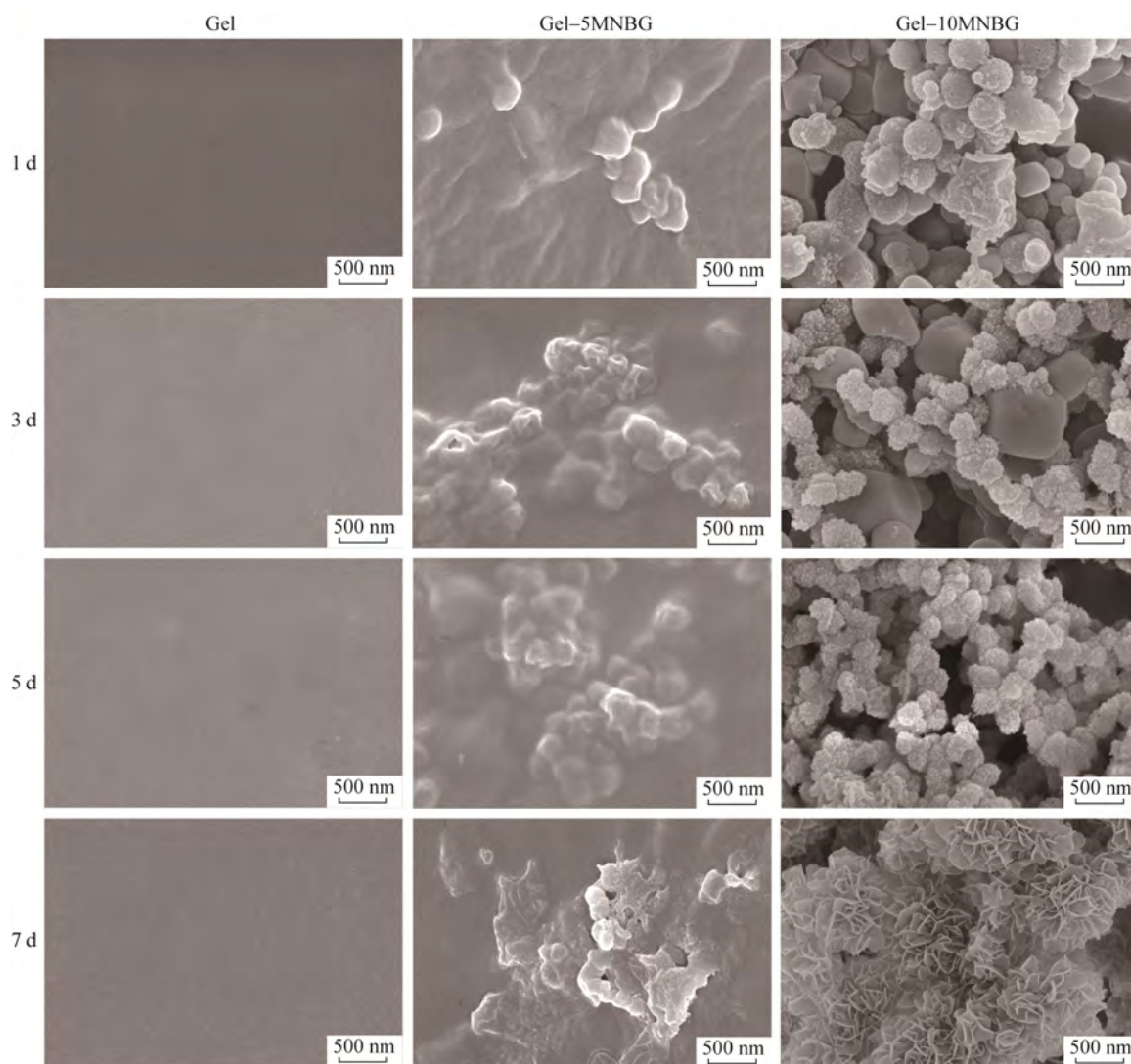


图 2 复合水凝胶矿化 1、3、5 d 和 7 d 后的表面 SEM 照片

Fig. 2 SEM images of composite hydrogels after mineralization for 1, 3, 5 d and 7 d, respectively

进一步检测矿化过程中矿化液各元素的质量浓度(表 1)发现, Gel 组在此过程中矿化液内 Si、Ca 和 P 3 种元素的质量浓度未发生明显变化, 而复合水凝胶则均会在初期出现矿化液内 Si、Ca 元素质量浓度的升高。在各元素的变化趋势中, Si 元素质量浓度在初期快速升高后变化逐渐趋于平稳, 而 Ca 和 P 2 种元素质量浓度的变化趋势在不同

MNBG 含量的复合水凝胶中差异较大。对于 Gel-5MNBG, 其 Ca 元素质量浓度在矿化周期内呈缓慢增长的趋势, P 元素浓度在整个周期内未观察到明显变化; 而对于 Gel-10MNBG, 其 Ca 元素质量浓度在矿化前 3 d 增长较快, 随后迅速降低, 同时 P 元素在矿化 1 d 后也出现了质量浓度快速降低的趋势。

表 1 复合水凝胶矿化各时间点矿化液的元素质量浓度(c)

Table 1 Element mass concentration (c) of mineralizing solution at each time of composite hydrogel mineralization

Time/d	c/(mg·L ⁻¹)								
	Gel			Gel-5MNBG			Gel-10MNBG		
	Si	Ca	P	Si	Ca	P	Si	Ca	P
0	0.08	96.07	37.97	0.02	95.70	38.32	0.12	97.38	37.99
1	0.10	96.91	35.66	9.35	97.88	37.96	16.04	101.42	37.96
3	0.07	96.79	36.09	15.46	97.53	38.01	29.35	103.05	35.97
5	0.05	97.16	36.89	18.75	97.89	37.97	29.84	98.07	33.92
7	0.07	96.90	37.28	19.30	98.34	38.56	30.10	68.14	15.97

通过 XRD 对复合水凝胶矿化过程的表面产物进行了分析。如图 3 所示, 对于 Gel 组, 其矿化过程材料晶相结构无明显变化, XRD 谱中未见新峰生成; 对于 Gel-5MNBG 组, 复合水凝胶在矿化后于约 32°左右形成了较弱的弥散峰, 表明其表面发生了一定程度的 Ca、P 沉积; 而对于 Gel-10MNBG 复合水凝胶组, 体外矿化 5 d 时可在 26°和 32°左右

观察到明显的衍射峰生成, 随后在 7 d 时该衍射峰强度增加, 并伴有新衍射峰出现, 通过对比可明确位于 26°, 32°, 39°, 46°, 49°和 53°的衍射峰分别与 HA 的(002), (211), (310), (222), (213)和(004)晶面对应, 验证了 Gel-10MNBG 复合水凝胶在矿化过程中是通过 Ca 和 P 的沉积逐渐矿化形成 HA。

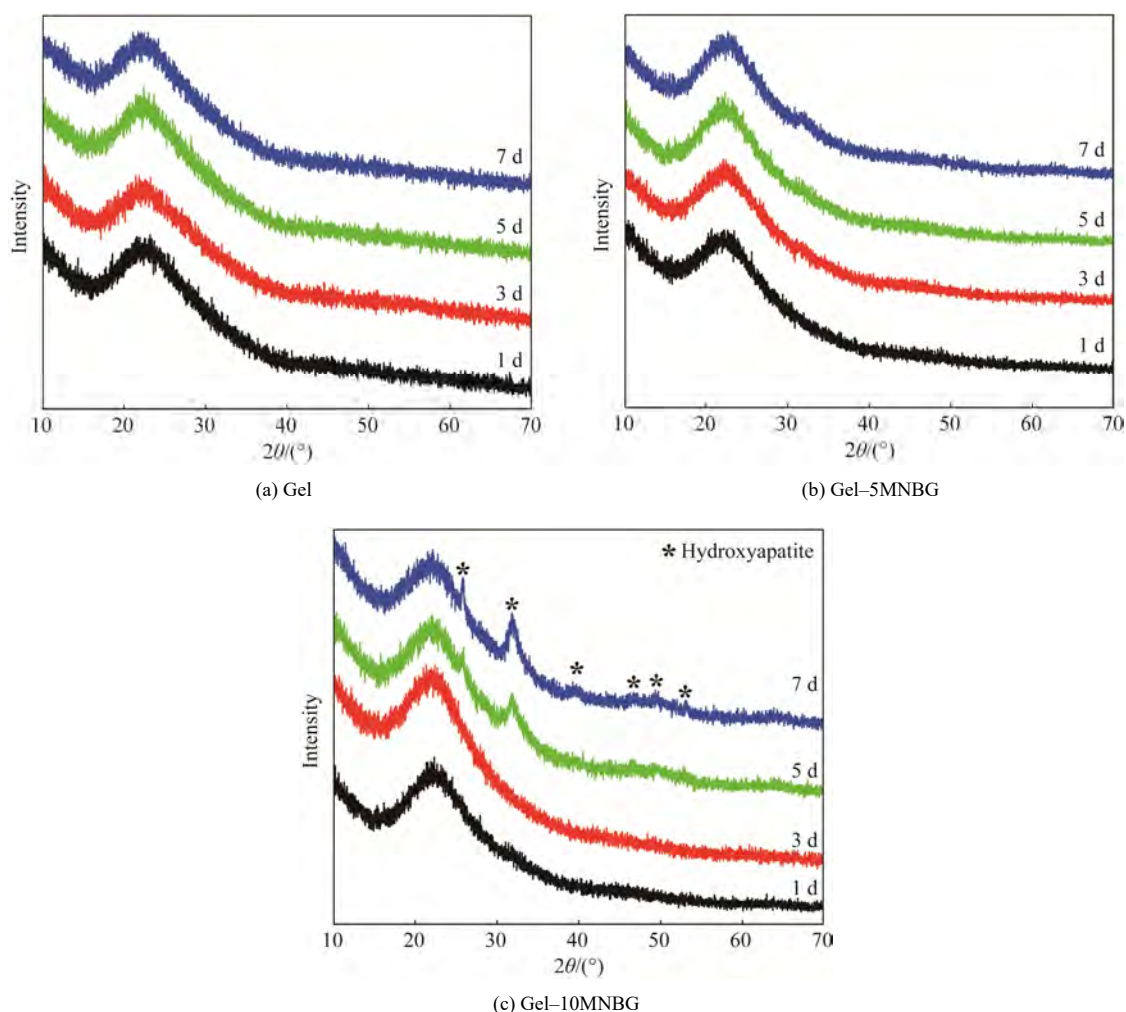
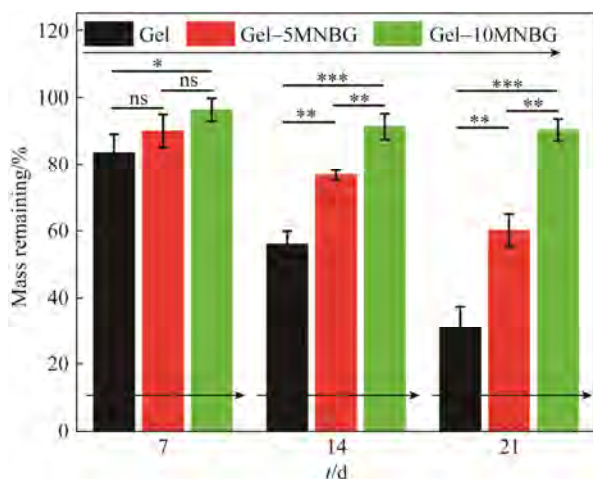


图 3 复合水凝胶矿化不同时间的 XRD 谱

Fig. 3 XRD spectra of composite hydrogel mineralization at different time

2.3 复合水凝胶体外降解性能

过快的降解速率一直是限制明胶等天然高分子用于组织修复的重要因素,在探索 MNBG 复合水凝胶矿化规律的基础上,进一步研究了添加 MNBG 对明胶基天然高分子水凝胶降解速率的影响。如图 4 所示,在降解过程中 Gel 水凝胶表现出较快的质量损失速率,而添加了 MNBG 的复合水凝胶质量损失较少,其中 Gel-10MNBG 复合水凝胶在 21 d 时剩余质量仍保持在 90%左右。



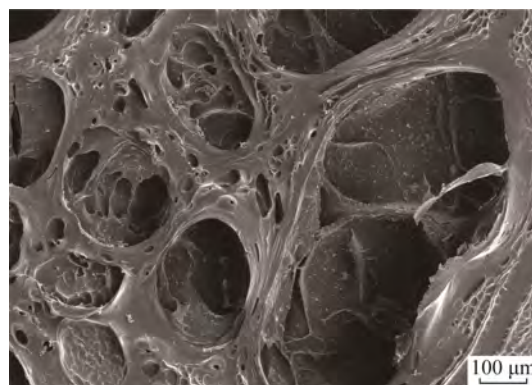
ns means no statistical difference, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

图 4 复合水凝胶降解 7、14 d 和 21 d 后的剩余质量分数
Fig. 4 Mass remaining of composite hydrogels degraded by 7, 14 d and 21 d, respectively

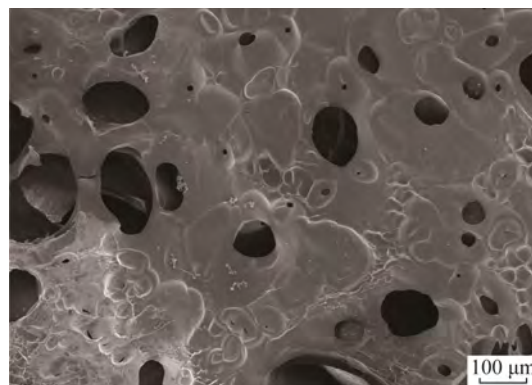
对比图 5 所示各复合水凝胶降解 14 d 后的表面形貌可发现, Gel 水凝胶在 14 d 时结构损坏严重; Gel-5MNBG 复合水凝胶表面出现大量孔洞, 但结构相对完整; 而 Gel-10MNBG 复合水凝胶在 14 d 时其表面被 HA 矿化层所覆盖, 整体结构完整。通过对比可发现 MNBG 的添加可有效降低明胶基水凝胶的降解速率, 而这一效果在复合水凝胶形成 HA 层后更加明显。这可能是由于 MNBG 与明胶分子链间的相互作用增强了材料的整体稳定性, 而更为关键的是对于高 MNBG 含量的复合水凝胶, 其表面 HA 层的形成阻碍了明胶与溶液间的接触, 抑制支架的降解并保证了水凝胶整体结构的完整性。

2.4 复合水凝胶体外矿化规律及机理分析

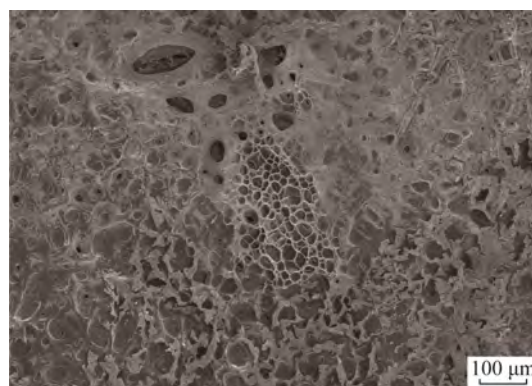
基于生物活性玻璃的矿化机理^[14-15], 结合各复合水凝胶表面形貌、矿化液离子浓度、XRD 检测结果及降解速率的变化, 可对 MNBG 明胶基天然高分子水凝胶的体外矿化规律进行如下分析(图 6)。实验结果表明, 添加 MNBG 的复合水凝胶在矿化初期均



(a) Gel



(b) Gel-5MNBG



(c) Gel-10MNBG

图 5 复合水凝胶降解 14 d 的 SEM 照片
Fig. 5 SEM images of composite hydrogels after degradation for 14 d

有明显的 Ca 和 Si 溶出现象, 这是因为复合水凝胶在进入 SBF 环境中后, MNBG 硅氧网络中通过离子键与 Ca^{2+} 连接的非桥氧 $[(\text{Si}-\text{O})_2\text{Ca}]$ 将首先因为 Ca^{2+} 与 H^+ 的离子交换而发生结构断裂, 溶出 Ca^{2+} 并在局部形成弱碱性微环境。在弱碱性环境作用下, 水分子攻击 $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ 网络使其进一步被破坏, 从而在 MNBG 表面形成含水硅酸凝胶层, 并以可溶性硅酸凝胶的形式溶出 HSiO_3^- 和 SiO_3^{2-} 。

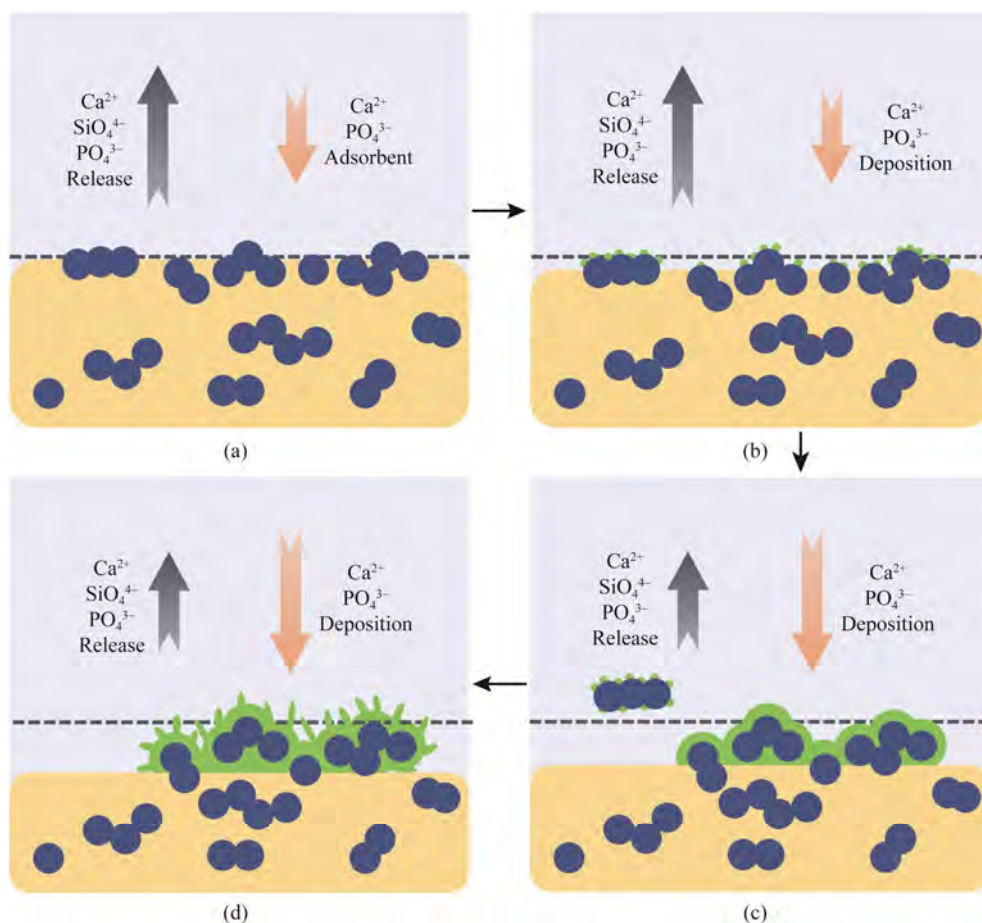
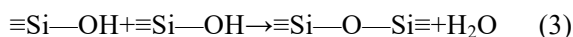
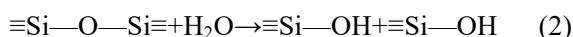
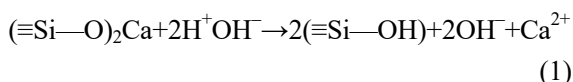


图6 复合水凝胶体外矿化过程分析

Fig. 6 Analysis of mineralization process of composite hydrogel *in vitro*

随后, MNBG 的矿化需要表层硅羟基间脱水聚合形成富 SiO_2 层(富硅层), 使微球内部及 SBF 中的 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 在富硅层中沉积以形成无定形 $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ 层, 并随沉积过程逐渐形成晶核并生长为 HA 晶体。而这一过程与 MNBG 的含量和聚集态关系密切, 相互团聚的微球交界形成的负曲率界面有利于硅羟基间的脱水聚合, 且其局部 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 的浓度也相对较高, 二者均能加速其矿化的进行。因此对于 MNBG 含量较高的复合水凝胶, 表面高密度的 MNBG 团聚体使其在矿化 1 d 时即可在微球表面及间隙处观察到明显的沉积物生成; 而对于 MNBG 含量较低的复合水凝胶, 微球分布较为分散, 独立的微球具有曲率为正的球形表面, 对于其弱碱性微环境的形成、硅羟基的脱水聚合以及钙和磷的沉积而言均具有不利影响, 致使其矿化速率缓慢。

此外, 复合水凝胶在矿化过程中, 还伴随着明

胶逐步降解的过程。对于 MNBG 含量较低的复合水凝胶, 随着水凝胶的逐步降解, 分布在其表层的未完全矿化的 MNBG 会由于失去附着而脱落, 从而始终无法在水凝胶表面形成矿化层。而对于 MNBG 含量较高的复合水凝胶, 由于 MNBG 团聚体间快速进行硅羟基的聚合和 Ca 、 P 沉积, 在复合水凝胶表面形成相互连接的整体, 伴随水凝胶的逐步降解, 大部分密度较高的团聚体由于可不断地与下一层团聚体间通过快速矿化形成连接而稳定在复合水凝胶表面, 从而能够逐渐形成羟基磷灰石矿化层, 这也是在图 2 中 Gel-10MNBG 矿化过程中观察区域内微球密度逐渐升高的原因。

3 结论

通过制备不同 MNBG 含量的明胶基复合水凝胶, 研究了 MNBG 对水凝胶体外矿化和降解性能的影响。结果表明水凝胶体系对 MNBG 生物活性离子的溶出无明显影响, 而复合水凝胶的矿化和降解性能则由其 MNBG 的含量决定。高含量 MNBG 在水凝胶中团聚并形成负曲率界面是复合水凝胶能够在

表面快速矿化形成 HA 的必要条件, 且 MNBG 的添加和复合水凝胶表面 HA 层的形成均能显著降低明胶基水凝胶的降解速率。因此, 通过改变 MNBG 的添加含量可有效调控明胶等天然高分子复合水凝胶的矿化及降解性能, 基于此方法有望使其更好的匹配骨组织的再生修复需求。

参考文献:

- [1] JONES J R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids[J]. *Acta Biomater*, 2013, 9(1): 4457–4486.
- [2] BOSETTI M, CANNAS M. The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(18): 3873–3879.
- [3] BRAUER D S. Bioactive glasses-structure and properties[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54(14): 4160–4181.
- [4] LEI B, CHEN X F, HAN X, et al. Unique physical-chemical, apatite-forming properties and human marrow mesenchymal stem cells (HMSCs) response of sol-gel bioactive glass microspheres[J]. *J Mater Chem*, 2011, 21(34): 12725–12734.
- [5] HU Q, LI Y L, MIAO G H, et al. Size control and biological properties of monodispersed mesoporous bioactive glass sub-micron spheres[J]. *RSC Adv*, 2014, 4(43): 22678–22687.
- [6] AFGHAH F, IYISON N B, NADERNEZHAD A, et al. 3D fiber reinforced hydrogel scaffolds by melt electrowriting and gel casting as a hybrid design for wound healing[J]. *Adv Health Mater*, 2022, 11(11): e2102068.
- [7] TIAN T, XIE W H, GAO W D, et al. Micro-nano bioactive glass particles incorporated porous scaffold for promoting osteogenesis and angiogenesis *in vitro*[J]. *Front Chem*, 2019, 7: 186.
- [8] BAI X, GAO M Z, SYED S, et al. Bioactive hydrogels for bone regeneration[J]. *Bioact Mater*, 2018, 3(4): 401–417.
- [9] WU S, WU X M, WANG X H, et al. Hydrogels for bone organoid construction: From a materiobiological perspective[J]. *J Mater Sci Technol*, 2022, 136: 21–31.
- [10] HUANG K, DU J, XU J, et al. Tendon-bone junction healing by injectable bioactive thermo-sensitive hydrogel based on inspiration of tendon-derived stem cells[J]. *Mater Today Chem*, 2022, 23: 100720.
- [11] GAO F, XU Z Y, LIANG Q F, et al. Osteochondral regeneration with 3D-printed biodegradable high-strength supramolecular polymer reinforced-gelatin hydrogel scaffolds[J]. *Adv Sci*, 2019, 6(15): 1900867.
- [12] YANG Z, ZHAO F J, ZHANG W, et al. Degradable photothermal bioactive glass composite hydrogel for the sequential treatment of tumor-related bone defects: From anti-tumor to repairing bone defects[J]. *Chem Eng J*, 2021, 419: 129520.
- [13] ZHAO F J, XIE W H, ZHANG W, et al. 3D printing nanoscale bioactive glass scaffolds enhance osteoblast migration and extramembranous osteogenesis through stimulating immunomodulation[J]. *Adv Health Mater*, 2021, 10(20): 2101840.
- [14] 陈晓峰, 王迎军, 赵娜如, 等. 溶胶-凝胶生物活性玻璃表面在模拟生理溶液中的碳酸羟基磷灰石形成[C]//第九届全国生物材料学术会议. 2002.
- [15] 陈晓峰, 王迎军, 赵娜如, 等. CaO—P₂O₅—SiO₂ 系统溶胶-凝胶玻璃的生物矿化行为[J]. *材料研究学报*, 2003, 17(3): 268–275.

CHEN Xiaofeng, WANG Yingjun, ZHAO Naru, et al. *Chin J Mater Res (in Chinese)*, 2003, 17(3): 268–275.