DOI:10.16016/j.2097-0927.202404134

# 不对称多孔抗菌 nZnO/P34HB 复合引导骨再生膜的制备及性能初步研究

刘 畅,刘 为,罗婧美,韩 莉,张 超,唐婉容 637000 四川 南充,川北医学院附属医院口腔科

[摘要] **目的** 制备不对称多孔抗菌纳米氧化锌(zinc oxide nanoparticle,nZnO)/聚 3-羟基丁酸酯 4-羟基丁酸酯[Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxy butyrate) copolymer, P34HB]复合引导骨再生(guided bone regeneration,GBR)膜,并检测其成骨性能。**方法** 本研究采用超声分散技术、溶剂置换法和冷冻干燥技术制备负载 nZnO 的 P34HB 复合 GBR 膜(实验分为空白对照组和 0%、0.5%、1.0%、1.5%nZnO/P34HB 材料组),采用扫描电子显微镜(scanning electron microscope,SEM)、能谱仪(energy dispersive spectrometer,EDS)等明确 nZnO 的负载并观察其结构;CCK-8 检测细胞增殖能力;划痕实验检测细胞迁移能力;蛋白吸附实验检测 GBR 膜的蛋白吸附能力;酶解实验检测 GBR 膜的体外降解;成骨实验检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性;茜素红染色观察钙化结节;体外抑菌实验检测 GBR 膜的抑菌能力。**结果** 本研究成功制备了负载 0%、0.5%、1.0%、1.5%nZnO 的 4 组 nZnO/P34HB 复合 GBR 膜,SEM 结果显示,该复合膜一面疏松多孔,另一面致密;EDS 表明复合膜上出现锌元素的掺入。细胞增殖实验结果显示,0.5%、1.0%nZnO/P34HB 组促进 MC3T3-E1 增殖且增殖数量均高于空白对照组、0%、1.5%nZnO/P34HB 组 ($P<0.05$);细胞划痕实验结果显示,在含有 0.5%nZnO/P34HB 组的浸提液培养基中 MC3T3-E1 明显越过划痕边缘进行迁移,且 48 h 时的 0.5%nZnO/P34HB 组细胞迁移率高于其他 3 个实验材料组($P<0.05$);蛋白吸附实验结果显示,4 组实验材料组光密度值差异无统计学意义,表明 nZnO 的加入不会降低材料本身的蛋白吸附能力;酶解实验结果显示,4 组实验材料组的质量均随着酶解时间增加而持续降低,28 d 后仍保持较低的降解率;ALP 活性检测结果显示,0.5%nZnO/P34HB 组 ALP 染色更深且活性高于其他 3 个实验材料组 ($P<0.01$)。茜素红染色结果显示,0.5%nZnO/P34HB 组与其他 3 个实验材料组比较,观察到较多的典型红色深染钙化结节,0%、0.5%nZnO/P34HB 组的细胞矿化程度在 4 组中更高($P<0.01$)。体外抑菌实验结果显示,0.5%nZnO/P34HB 组平板上的菌落数量显著少于空白对照组和 0%nZnO/P34HB 组($P<0.01$)。**结论** 本研究成功制备了负载 nZnO 的 P34HB 复合 GBR 膜,筛选出的 0.5%nZnO/P34HB 组具有不对称多孔结构,能够促进细胞增殖,利于细胞成骨,同时具有抑菌能力。

[关键词] 不对称多孔结构;径向排列纤维;纳米氧化锌;生物可降解材料;引导性骨再生
[中图法分类号] R318.08; R782.13; R944.9 [文献标志码] A

# Preparation and properties of asymmetric porous antimicrobial nZnO/P34HB composite guided bone regeneration membrane

LIU Chang, LIU Wei, LUO Jingmei, HAN Li, ZHANG Chao, TANG Wanrong Department of Stomatology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan Province, 637000, China

[**Abstract**] **Objective** To develop an asymmetric porous guided bone regeneration (GBR) membrane made from antibacterial zinc oxide nanoparticle (nZnO)/poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxy butyrate) copolymer (P34HB), and detect its osteogenic performance. **Methods** Ultrasonic dispersion technique, solvent displacement method and freeze-drying technique were used to prepare P34HB composite

[基金项目] 川北医学院博士科研启动基金项目(CBY22-QDA11)
[通信作者] 唐婉容,E-mail:642533674@qq.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

GBR membrane loaded with nZnO at different doses (0%, 0.5%, 1.0% and 1.5%). Scanning electron microscopy (SEM) and energy spectrometry (EDS) were conducted to determine the load of nZnO and observe the structure of the prepared membrane. Then MC3T3-E1 cells were implanted in a 24-well culture plate with the prepared GBR membrane pre-laid in the well. Thus the experiment included blank control group (no membrane) and groups with membranes composing 0%, 0.5%, 1.0% and 1.5% nZnO, respectively. CCK-8 and cell scratch assays were used to detect cell proliferation capacity and migration ability. The protein adsorption capacity of GBR membrane was detected by protein adsorption experiment. The *in vitro* degradation of GBR membrane was tested; the activity of alkaline phosphatase (ALP) was detected with chemical test. And calcified nodules were observed with alizzarin red staining; the antibacterial ability of GBR membranes was tested with *in vitro* antibacterial experiments. **Results** Four groups of nZnO/P34HB composite GBR membranes with 0%, 0.5%, 1.0% and 1.5% nZnO were successfully prepared. SEM results showed that the composite membrane was porous on one side and dense on the other side. EDS indicated the incorporation of zinc elements in the composite membrane. The results of cell proliferation assay showed that 0.5% and 1.0% nZnO/P34HB group promoted the proliferation of MC3T3-E1 cells, when compared with the blank control group and 0% and 1.5% nZnO/P34HB groups ($P<0.05$). The results of cell scratch assay showed that MC3T3-E1 cells in the 0.5% nZnO/P34HB group migrated significantly over the scratch edge, with the cell mobility higher than that of the other 3 membrane groups in 48 h after culture ($P<0.01$). Protein adsorption experiment displayed there was no significant difference in optical density of the 4 group of membrane, indicating that the addition of nZnO had no effect on the protein adsorption capacity of the material itself. The results of enzymatic experiment showed that though the quality of the 4 membranes was continuously decreased with elapse of time, the degradation rate was still relatively lower after 28 d of treatment. ALP staining and alizarin red staining displayed that the 0.5%nZnO/P34HB group obtained the strongest ALP activity and the largest amount of calcified nodules when compared with the other 3 groups ($P<0.01$). Higher mineralization was observed in the 0% and 0.5%nZnO/P 34 HB groups than the other 2 groups ($P<0.01$). The results of *in vitro* antibacterial experiments showed that the number of colonies in the 0.5%nZnO/P 34 HB group was significantly less than that in the blank control group and the 0% nZnO/P34HB group ($P<0.01$). **Conclusion** Our prepared P34HB composite GBR membrane loaded with nZnO is in asymmetric porous structure, and can promote cell proliferation, facilitate cell osteogenesis and have bacteriostatic ability.

[**Key words**] asymmetric porous structure; radial arrangement of fibers; zinc oxide nanoparticles; biodegradable materials; guided bone regeneration

Supported by the Scientific Research Initiation Foundation for Doctors of North Sichuan Medical College (CBY22-QDA11). Corresponding author: TANG Wanrong, E-mail: 642533674@qq.com

牙种植术目前已成为牙齿缺失的常规修复治疗手段。然而,肿瘤、创伤、增龄性改变、牙周炎等多种因素都可能导致缺牙区牙槽骨宽度和高度的不足,口腔临床医师常需进行骨增量技术,以解决牙槽骨量不足这一种植修复过程中的难点[1]。其中,引导骨再生(guided bone regeneration,GBR)技术操作简便、效果稳定,是目前应用最为普遍的骨增量技术[2],而 GBR 技术[3]的关键是 GBR 膜的运用,也是目前研究的热点。

聚 3-羟基丁酸酯 4-羟基丁酸酯[Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxy butyrate) copolymer,P34HB],作为聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoates,PHA)家族的第四代聚合物,是一类在微生物胞内共聚形成的碳源和能源的储备物。P34HB 具有良好的生物相容性、适宜的生物降解性、无明显组织毒性及高度的可塑性等优点,在组织工程材料研究中展现出巨大的潜力[4]。此外,与聚乳酸及其共聚物等高分子聚合物相比,P34HB 可以在生物降解过程中保持更加稳定的局部 pH 值,对细胞和体内其他组织的刺激性更小,引起的免疫排异反应更轻[5]。此外,P34HB 的降解产物为低聚羟基烷酸,可参与细胞代谢,有利于细胞生长。

细菌感染可能导致种植体周围牙槽骨的逐渐丧失和种植体失败[6]。氧化锌(ZnO)是被美国食品药物管理局(Food and Drug Administration,FDA)认定为安全

物质的金属氧化物之一,已成功作为抗菌剂应用于食品包装、口腔修复材料、伤口敷料和组织工程中。其中,纳米氧化锌(zinc oxide nanoparticle,nZnO)尺寸小,易于进入细胞内,能产生特定的生物学效应,且其尖端较多的表面原子数量,增强了 nZnO 与细菌的亲和力,从而提高抗菌效率[7]。

本研究以 P34HB 材料为主体结构,并将 nZnO 添加到此结构中,旨在开发一种兼具成骨和抗菌活性的 GBR 膜,对该 GBR 膜的生物相容性、成骨活性、抑菌性能进行了体外实验和检测,预期为优化 GBR 骨增量技术提供重要实验基础,为临床牙槽骨缺损修复提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验细胞与细菌

MC3T3-E1 小鼠颅顶前骨细胞株购自中国尚恩生物有限公司;金黄色葡萄球菌菌株购自中国上海保藏生物技术中心。

### 1.2 试剂和主要仪器

本研究采用的主要实验试剂:P34HB 粉末(中国珠海麦得发生物科技有限公司);nZnO 粉末(中国阿拉丁公司);氯仿和无水乙醇(川北医学院科技创新中心);α-MEM 培养基、胎牛血清(FBS)、胰酶(EDTA)、青-链霉素(PS)和 PBS(中国四川智悦双辰生物科技有限公司);CCK-8 检测试剂盒、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)显色及检测试剂盒、Western 及 IP 细胞裂解液(中国江苏碧云天公司);溶菌酶、庆大霉素、茜素红染色试剂盒、地塞米松、β-甘油磷酸钠、维生素 C、LB 液体培养基、LB 固体培养基(中国北京索莱宝公司);氯代十六烷基吡啶(CPC)、无水磷酸氢二钠(中国上海麦克林公司)。

本研究采用的主要实验仪器:电子天平(德国 Sartorius 公司);磁力搅拌器(中国大龙兴创实验仪器有限公司);超声波清洗机(中国科盟实验仪器有限公司);真空冷冻干燥机(德国 Christ 公司);扫描电子显微镜(美国 Thermo 公司);能谱仪(英国 Oxford 公司);倒置光学显微镜、正置显微镜(日本 Olympus 公司);多功能酶标仪(美国 Biorad 公司);恒温振荡器(中国国旺仪器制造有限公司);恒温培养箱(中国科晟实验仪器有限公司)。

### 1.3 不对称多孔抗菌 nZnO/P34HB 复合 GBR 膜的制备

将 0.5 g P34HB 粉末溶解在 10 mL 氯仿溶液中,磁力搅拌器搅拌形成均匀溶液;分别称取 0、0.05、0.10、0.15 g nZnO 粉末,与上述 P34HB 粉末和氯仿形成的均匀溶液分别混合。混合液在超声波清洗机中放置 10 min,以确保 nZnO 均匀分布。将溶液转移至平底玻璃皿中,静置 5 min。在大玻璃皿中准备 500 mL 无水乙醇,将平底玻璃皿放入无水乙醇中直至混合液充分浸没,并覆盖一层铝箔防止无水乙醇蒸发。溶液交换约 6 h 后,nZnO/P34HB-氯仿溶液转变为白色半固体膜,放入-80 ℃冰箱预冻,放置真空冷冻干燥机中 48 h 得到 0%、0.5%、1.0%、1.5% nZnO 梯度的 nZnO/P34HB 复合 GBR 膜(图 1)。

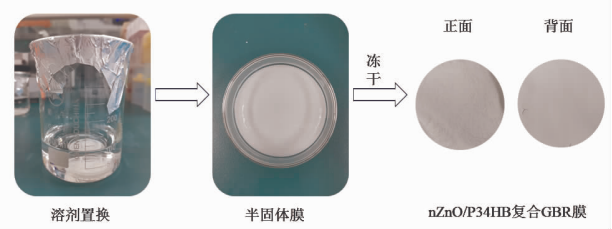



**图 1 nZnO/P34HB 复合 GBR 膜的制备**

### 1.4 实验分组

实验分 5 组:空白对照组和 4 组实验材料组(0%、0.5%、1.0%、1.5%nZnO/P34HB 材料组)。空白对照组为有细胞而不含材料组,用于 CCK-8 实验、成骨实验、抑菌实验;实验材料组根据 nZnO 粉末的含量分为 0%、0.5%、1.0%、1.5% nZnO/P34HB 组。

### 1.5 nZnO/P34HB 复合 GBR 膜的微观表征及成分分析

4 组实验材料组清洗干燥后,喷金处理,在 20 kV 的加速电压下,采用扫描电子显微镜(scanning electron microscope,SEM)观察 GBR 膜的表面形貌。采用能谱仪(energy dispersive spectrometer,EDS)对材料表面微区成分元素种类进行分析。

### 1.6 nZnO/P34HB 复合 GBR 膜生物相容性评价

1.6.1 细胞培养 MC3T3-E1 接种于含 10%FBS 和 1%PS 的 α-MEM 培养基中,培养于 37 ℃、5%$CO_2$ 的饱和湿度孵箱。

1.6.2 CCK-8 法测定细胞增殖 将 4 组实验材料组切成直径与 24 孔板孔大小相匹配的圆片,紫外线消毒 2 h,用完全生长培养基预湿。除 4 组实验组外,设立空白对照组,将 MC3T3-E1 以 $1\times10^4$ 个细胞/孔的密度接种在 24 孔细胞培养板中的 GBR 膜上及空白对照孔上。细胞培养 1、5、7 d 后,丢弃原有培养基,PBS 洗涤,将 100 μL 混合溶液(CCK-8 试剂与 α-MEM 完全培养基的溶液比值为 1∶9)添加到每个孔中,37 ℃下孵育 3 h,转移至 96 孔板后,使用 450 nm 波长在酶标仪测定光密度值[$D$(450)]。

1.6.3 细胞划痕实验 4 组实验材料组紫外线消毒后,分别浸泡在 α-MEM 培养基中 24 h。按照 $3\times10^5$

个/孔的密度将 MC3T3-E1 细胞接种至 6 孔板中,待细胞密度达 80%左右时,用灭菌的 1 mL 枪尖在细胞生长中心区域进行划线,PBS 洗涤 2 次,将浸泡有不同材料的 α-MEM 培养基加入相应的孔中,依次在划痕刮除后 0、24、48 h 时,用倒置光学显微镜观察拍照,用 Image J 软件分析实验数据[划痕愈合率(%)=(初始划痕面积-现有划痕面积)/初始划痕面积×100%]。

1.6.4 蛋白吸附实验 4 组实验材料组紫外线消毒后,置于 24 孔中,每孔中加入 1 mL 含 10% FBS 的 PBS 溶液,孵育 24 h。取培养溶液,使用 290 nm 波长在酶标仪测定光密度值[$D$(290)]。

1.6.5 酶解实验评估 GBR 膜的体外降解 将 4 组实验材料分别浸泡在含 100 μg/mL 溶菌酶、(500 U/mL 青霉素、500 μg/mL 链霉素)PS 和 25 μg/mL 庆大霉素的 PBS 溶液中,每 2 天更换 1 次溶液。在溶液中浸泡 7、14、21、28 d 后,取出样品,去离子水洗净,真空冻干,称量记录质量变化,绘制质量变化线,并根据简单抽样方法选 1 组样品采用 SEM 拍摄,观察其结构变化。

1.7 成骨实验

1.7.1 ALP 染色及定量分析 4 组实验材料组消毒、种板处理方法同 1.6.2。待空白对照组细胞密度达约 80%时,吸去原培养基,更换为成骨诱导培养基避光培养,每 2~3 天换 1 次液。成骨诱导培养 7 d 后,用配置好的碱性磷酸酶显色试剂盒染色并拍照。诱导 7 d 同期进行 ALP 定量分析,每孔加入 300 μL 的 Western 及 IP 细胞裂解液,充分裂解后,按照碱性磷酸酶检测试剂盒说明书操作步骤进行实验,测定光密度值[$D$(450)],计算 ALP 含量。

1.7.2 茜素红染色及定量分析 4 组实验材料组消毒、种板操作方法同 1.6.2,成骨诱导处理方法同 1.7.1。成骨诱导培养 14 d 后,用茜素红染色试剂盒检测各组的染色情况,用含 10% CPC 的磷酸氢二钠溶液溶解染色剂,洗脱后的溶液测定光密度值[$D$(562)]。

1.8 体外抑菌实验测定

1.8.1 细菌培养 本研究选用金黄色葡萄球菌作为研究对象。取 0.2 mL 的 PBS 溶液将金黄色葡萄球菌冻干粉溶解后,用无菌涂布棒将菌液涂布于 LB 固体琼脂板上,然后在 37 ℃恒温培养箱中倒置培养过夜。使用无菌接种环从琼脂板上取单个菌落,将其分散于 5 mL 的 LB 液体培养基中,在 37 ℃气浴恒温振荡器中培养 10 h,制备菌悬液。通过梯度稀释后,将菌液涂布在 LB 固体琼脂板上进行菌落计数,以确保细菌浓度稳定在 $10^5$~$10^7$ CFU/mL。

1.8.2 抑菌实验 将上述生物相容性实验及成骨实验筛选出的 0%、0.5% nZnO/P34HB 复合 GBR 膜 2 组材料组消毒后分别放入 24 孔板中,各加入 2 mL 菌悬液;空白对照组的孔板中只加入 2 mL 菌悬液。在 37 ℃恒温培养箱中培养 12 h。最后将每组菌液进行梯度稀释后,取 100 μL 菌液均匀涂布在 LB 固体琼脂板上,倒置培养 2 d,拍照记录菌落形成情况,并计算菌落形成数量。

1.9 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.4.1、Image J(10.0.7)、Origin 2021 以及 Adobe PhotoShop 23.0 对本实验数据进行统计分析和绘图,计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2 组间比较采用独立样本 $t$ 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 则认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

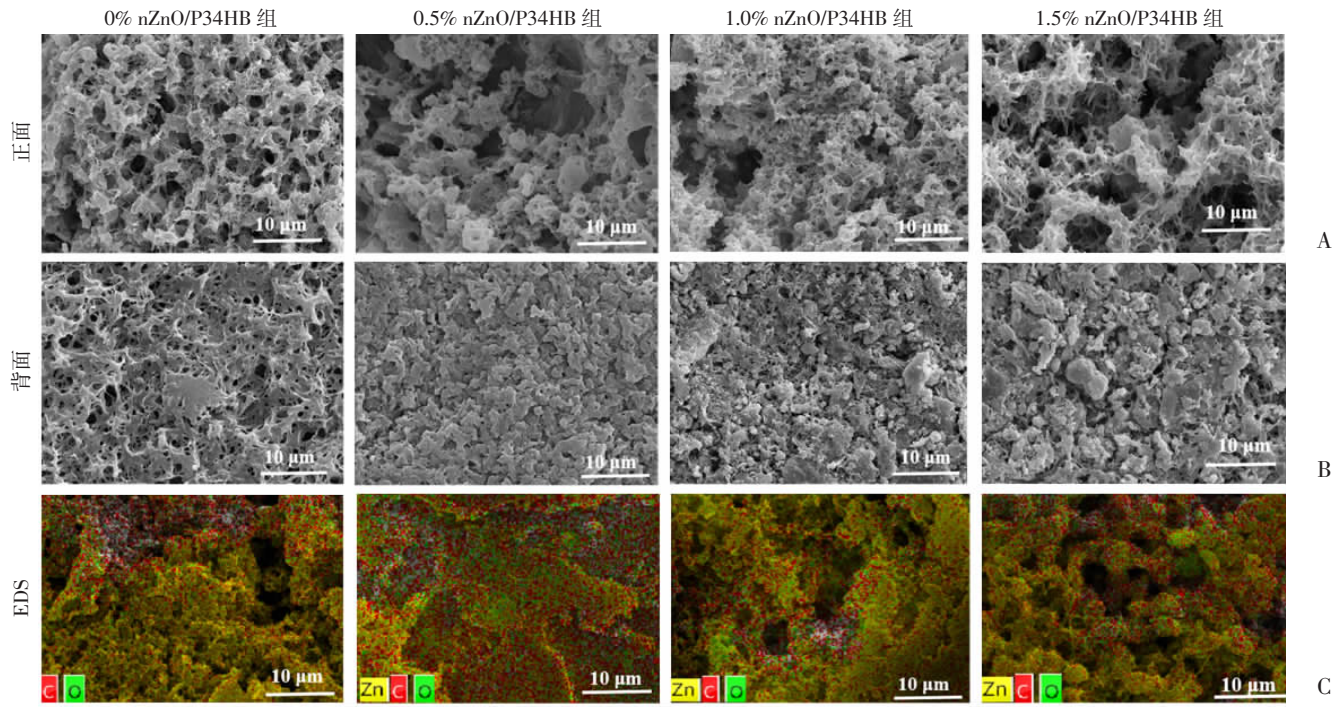
2.1 复合膜的结构表征及成分分析

扫描电镜结果显示,4 组实验材料组的正面为疏松多孔结构,孔径较大,均匀且相互连接(图 2A),背面呈现致密多孔结构(图 2B)。证明已成功制备了具有不对称多孔结构且负载不同浓度 nZnO 的 P34HB 沉积支架。

EDS 检测该 GBR 膜中的碳(C)、氧(O)、锌(Zn)元素。对于 0% nZnO/P34HB 组,只有红色和绿色可见;而在含 nZnO 的 P34HB 中,可见黄色的 Zn 分散在红色骨架上,表明 nZnO 成功掺入到 P34HB 支架中(图 2C)。

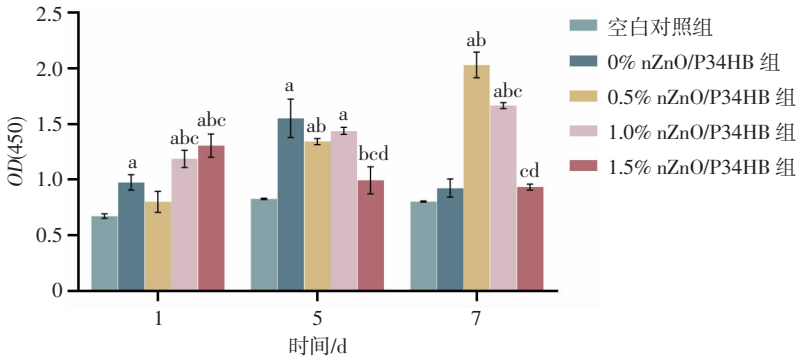
2.2 复合膜的体外生物相容性

2.2.1 细胞增殖实验 CCK-8 检测结果提示,含 0.5%、1.0% nZnO 的 nZnO/P34HB 复合 GBR 膜对 MC3T3-E1 的增殖有促进作用。0.5%、1.0% nZnO/P34HB 组的细胞数量随培养时间增加而增加,而 1.5%nZnO/P34HB 组细胞数量随培养时间减少。第 1 天时,0%、1.0%、1.5%nZnO/P34HB 组细胞增殖情况优于空白对照组($P<0.05$);第 5 天时,与空白对照组、1.5%nZnO/P34HB 组比较,0%、0.5%、1.0%nZnO/P34HB 组细胞数量更多($P<0.05$),且 0% nZnO/P34HB 组多于 0.5%nZnO/P34HB 组($P<0.05$);而第 7 天时,与空白对照组、0%、1.5% nZnO/P34HB 组比较,0.5%、1.0% nZnO/P34HB 组的细胞数量多($P<0.05$),且 0.5%nZnO/P34HB 组数量多于 1.0%nZnO/P34HB 组($P<0.05$,图 3)。




A、B:4 组实验材料组的正面和背面 SEM 图;C:4 组实验材料组的 EDS 分析

**图 2　nZnO/P34HB 复合 GBR 膜的微观形貌和成分分析**



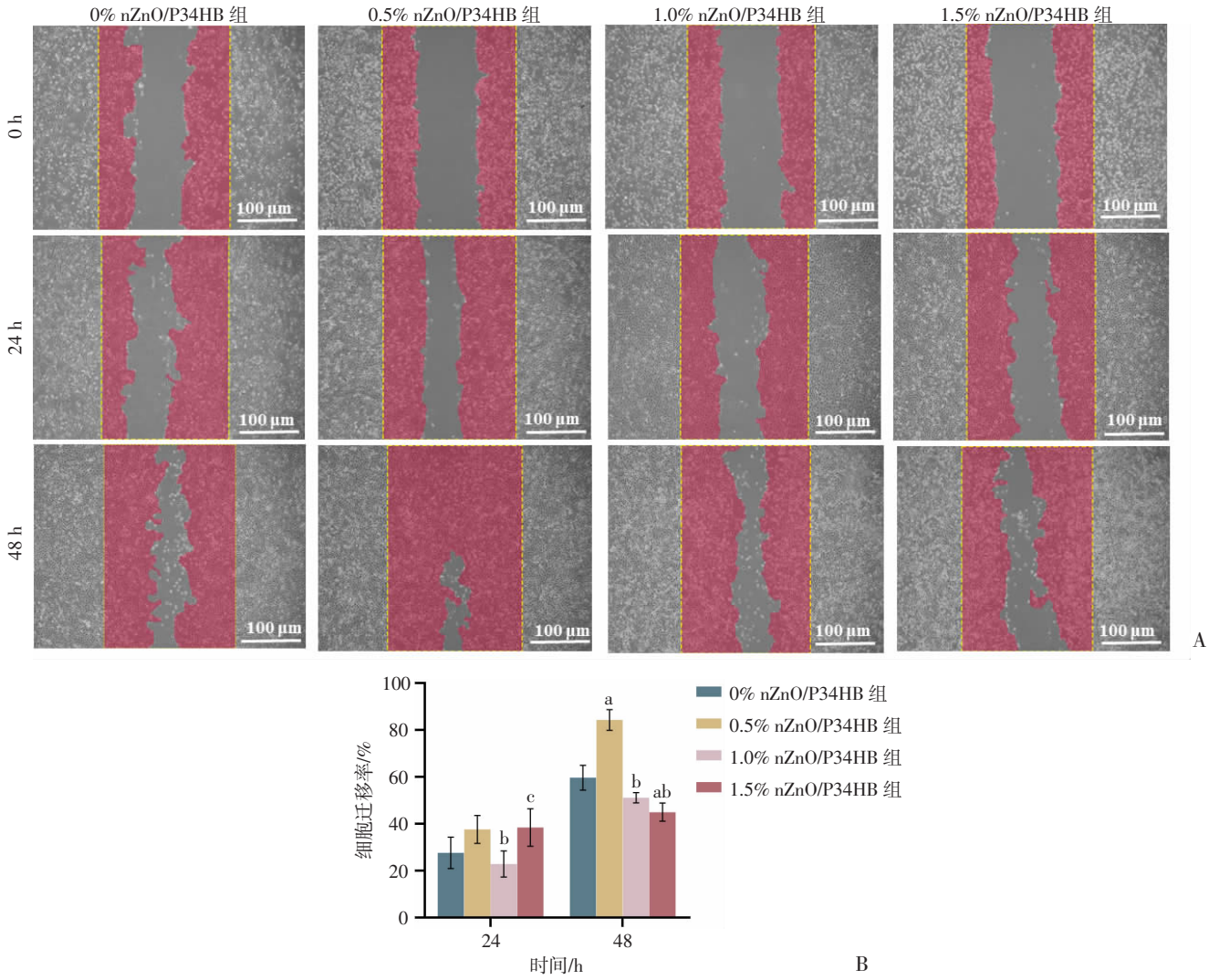

a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与 0%nZnO/P34HB 组比较;c:$P<0.05$,与 0.5%nZnO/P34HB 组比较;d:$P<0.05$,与 1.0%nZnO/P34HB 组比较

**图 3　作用不同时间后各组的 MC3T3-E1 细胞增殖能力比较**　($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.2.2　细胞划痕实验　　细胞划痕实验结果提示,在含有 0.5%nZnO/P34HB 组的浸提液培养基中 MC3T3-E1 细胞迁移速率最快。随着时间延长,相比 0%、1.0%、1.5%nZnO/P34HB 组,0.5%nZnO/P34HB 组的大量细胞明显越过划痕边缘进行迁移(图 4A);定量分析结果显示,24 h 时,0.5%、1.5%nZnO/P34HB 组的细胞迁移率均高于 1.0%nZnO/P34HB 组($P<0.05$,图 4B),48 h 时 0.5%nZnO/P34HB 组的细胞迁移率高于其他 3 组($P<0.05$,图 4B)。

2.2.3　蛋白吸附实验　　蛋白吸附实验的检测结果提示,nZnO 的加入不会降低材料本身的蛋白吸附能力。4 组实验材料组的培养液光密度 OD 值相互之间差异无统计学意义(图 5)。

2.2.4　酶解能力　　酶解实验结果提示,4 组实验材料组的质量均随着酶解时间增加而持续降低,但 28 d 后仍保持较低的降解率(图 6A)。酶解 28 d 后,根据简单随机抽样方法选取的 0%nZnO/P34HB 组材料在 SEM 下观察,发现材料表面的结构无明显变化(图 6B)。




A:MC3T3-E1 细胞在浸提液中的划痕愈合图像;B:MC3T3-E1 细胞在浸提液中的划痕迁移率($n=3,\bar{x}\pm s$) a:$P<0.05$,与 0% nZnO/P34HB 组比较;b:$P<0.05$,与 0.5% nZnO/P34HB 组比较;c:$P<0.05$,与 1.0% nZnO/P34HB 组比较

**图 4 MC3T3-E1 在 4 组实验材料浸提液中的细胞迁移能力比较**

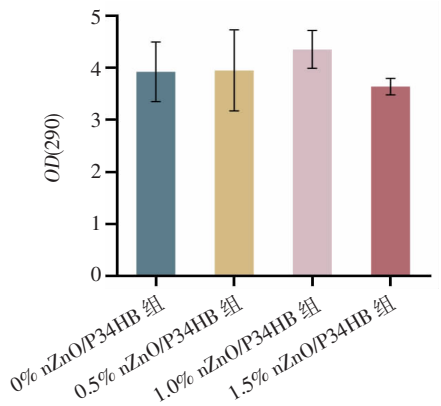
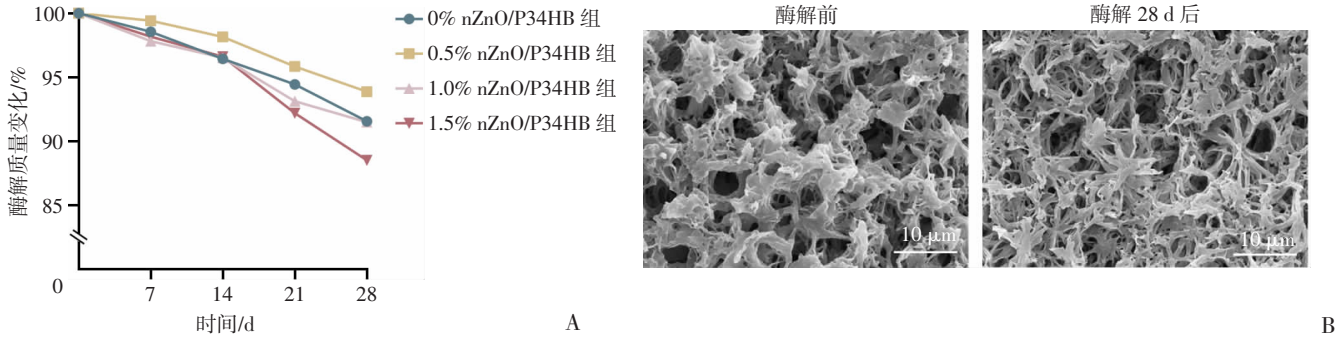



**图 5 4 组实验材料组的蛋白吸附能力比较** ($n=3,\bar{x}\pm s$)

### 2.3 复合膜的促成骨能力

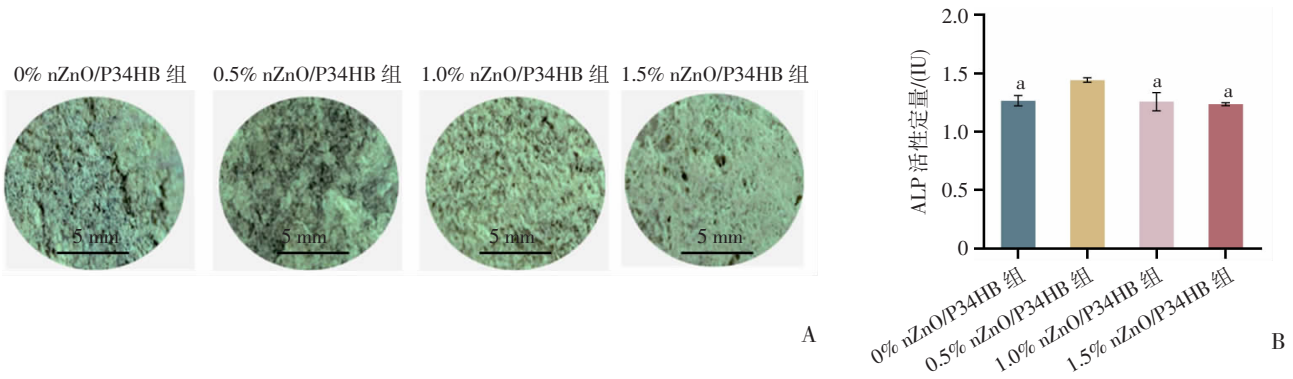
ALP 活性染色检测 MC3T3-E1 细胞早期向成骨细胞分化的情况。成骨诱导培养 7 d 后,正置显微镜下可见 0.5%nZnO/P34HB 组的染色更深(图 7A)。定量测试结果显示,0.5%nZnO/P34HB 组的 ALP 活性高于 0%、1.0%、1.5%nZnO/P34HB 组($P$<0.01,图 7B)。

茜素红染色实验结果提示,成骨诱导培养 14 d 后,4 组实验材料组成骨钙化分析,可见 0.5% nZnO/P34HB 组的桔红色沉积更为显著(图 8A),具有更高的矿化程度。定量测试结果显示,与 1.0%、1.5% nZnO/P34HB 组比较,0%、0.5%nZnO/P34HB 组的细胞矿化程度高($P$<0.01,图 8B)。



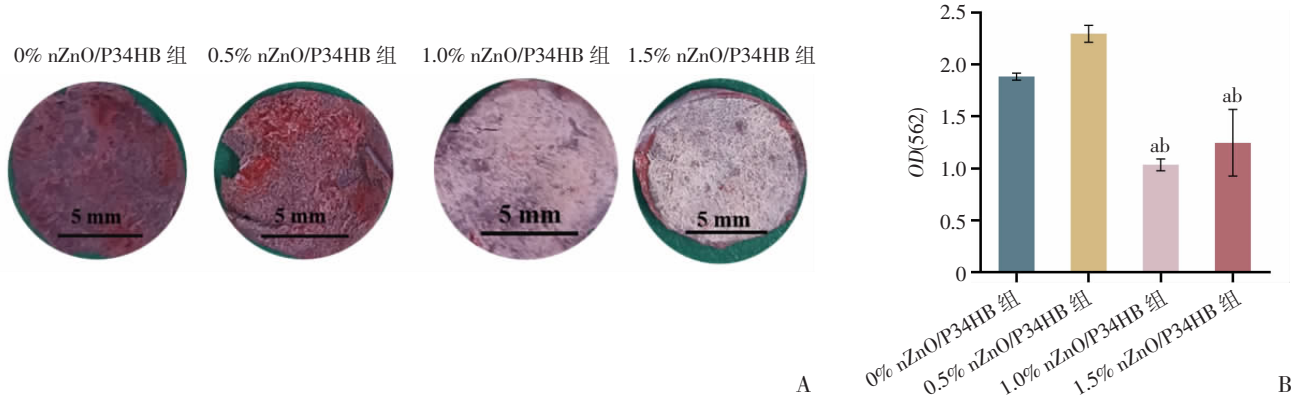

A:4 组实验材料组的酶解质量变化曲线;B:0%nZnO/P34HB 组在酶解前及酶解 28 d 后的 SEM 图像对比

**图 6 4 组实验材料组的降解性能比较**



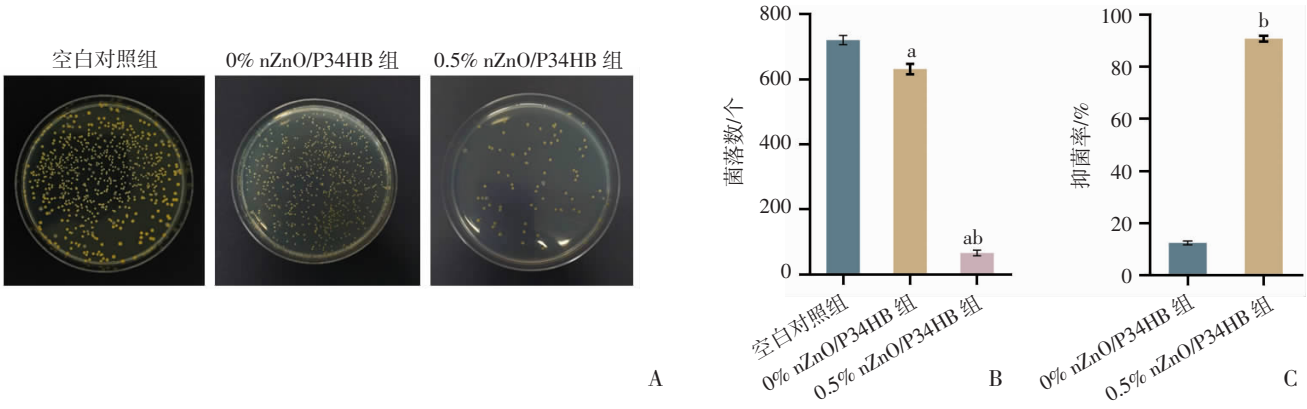

a:$P$<0.01,与 0.5%nZnO/P34HB 组比较

**图 7 MC3T3-E1 细胞在 4 组实验材料组上的 ALP 染色(A)和活性定量分析(B)** ($n$=3,$\bar{x}\pm s$)




a:$P$<0.01,与 0%nZnO/P34HB 组比较;b:$P$<0.01,与 0.5%nZnO/P34HB 组比较

**图 8 MC3T3-E1 细胞在 4 组实验材料组上的茜素红染色结果(A)和定量分析(B)** ($n$=3,$\bar{x}\pm s$)




a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.01$,与 0%nZnO/P34HB 组比较

A:各组琼脂板菌落形成情况;B:各组的琼脂板菌落数量统计($n=3,\bar{x}\pm s$);C:0%、0.5%nZnO/P34HB 组的抑菌率比较($n=3,\bar{x}\pm s$)

**图 9 0%、0.5%nZnO/P34HB 组材料的体外抑菌活性比较**

### 2.4 复合膜的体外抑菌能力

0%、0.5%nZnO/P34HB 组体外抑菌实验结果显示,与空白对照组比较,0%、0.5%nZnO/P34HB 组琼脂板上的菌落数量少(图 9A),菌落计数统计分析 0%、0.5%nZnO/P34HB 组均具有抑菌性($P<0.01$,图 9B),而 0.5%nZnO/P34HB 组抑菌率更高($P<0.01$,图 9C)。

## 3 讨论

### 3.1 复合 GBR 膜材料的研究进展

GBR 已被公认为牙周骨缺损的先进治疗技术,GBR 技术依靠屏障膜的应用来修复骨缺损。常用的 GBR 膜有可吸收性和不可吸收性两种。目前不可吸收屏障膜的“金标准”是高密度聚四氟乙烯(n-PTFE)和钛增强版的高密度聚四氟乙烯(tn-PTFE),但由于其不可生物降解的性质,需要二次手术去除,增加患者痛苦和治疗成本[8-9]。因此,各种天然、合成的材料被开发出来,用可吸收膜来取代不可吸收膜,如胶原蛋白、壳聚糖、海藻酸盐、脂肪族聚酯类等[10]。虽然这些膜材料已经证明了它们在骨组织工程中的潜力,如良好的生物相容性和骨诱导性,但也存在一些局限性和并发症,如降解快、结构完整性和尺寸稳定性差、伤口感染等[11]。本研究引入 P34HB 这一可降解高分子材料,其力学性能跨度更宽,具有柔韧性良好和生物相容性、生物降解性可控、结构规整及不溶于水等特点[12],还具有促进骨髓间充质干细胞成骨向分化的能力,提示其在骨组织工程中具有巨大的应用潜力[13],是一种理想的 GBR 膜材料。

### 3.2 纳米氧化锌的抗菌能力

研究发现,细菌感染往往影响骨缺损部位软、硬组织的愈合,临床上常在 GBR 手术后 1 周通过全身或局部应用抗生素制剂防止伤口感染,但其抗感染效果不佳,且抗生素的滥用易引起菌株耐药性[14]。因此,随着新型抗菌基质的发展,纳米和微米技术开始应用于抗菌膜的制备,负载的抗菌纳米颗粒可以渗透到生物膜中并避免过快降解[15]。本研究加入 nZnO 来达到抗菌目的,研究表明,nZnO 可以通过活性氧途径(reactive oxide species,ROS)损伤细菌细胞膜;另一方面,可以通过缓慢释放 Zn 离子,吸引结合到细菌表面,破坏细胞膜的生物性能,并且过剩的 Zn 离子可以穿过细胞膜,妨碍细菌的正常功能活动及代谢,从而达到抗菌的目的[16-18]。

理想的 GBR 膜应具有一定柔韧性,易于植入手术操作[19],具备良好的生物相容性,可选择性地引导组织细胞再生及定向分化[20],同时降解速率与组织再生过程相协调,且降解产物无毒性[21]。本研究通过超声分散技术、溶剂置换法和冷冻干燥技术成功制备了不对称 nZnO/P34HB 复合膜,并对其进行了理化性能探究和体外实验。

该 nZnO/P34HB 复合 GBR 膜正面朝向骨缺损面,为粗糙且为疏松多孔层,可以促进成骨细胞的黏附和血凝块的稳定;背面朝向软组织面,为光滑且为致密多孔层,在允许营养物质渗透的同时可以防止纤维组织渗透到骨缺损中,从而搭建一个引导骨再生的稳定环境。细胞增殖实验结果显示,MC3T3-E1 细胞在 nZnO/P34HB 复合 GBR 膜上的增殖情况优于空白对照组,表明 P34HB 材料有良好的生物相容性,其表面的疏松多孔结构可以为细胞的增殖和生长提供更多的空间。适宜浓度的锌离子也同样有良好的生物相容性,但随着 nZnO 浓度增加至 1.5%,细胞活性显著降低,这可能是由于氧化锌浓度较高,释放过量的 ROS,

诱导氧化应激,导致细胞凋亡所致。细胞划痕实验证明 nZnO/P34HB 复合膜能够促进细胞的迁移。生物材料吸附蛋白的能力,是材料生物相容性的重要指标之一,材料植入体内后应能吸附足够的蛋白、生长因子等,为成骨细胞的增殖和分化提高营养,材料表面的微孔越多蛋白吸附能力越强,0%、0.5%、1.0%、1.5% nZnO/P34HB 复合 GBR 膜的蛋白吸附结果无显著差异,表明 nZnO 的加入也不会降低材料本身的蛋白吸附能力。种植植骨要求 GBR 膜材料能够稳定维持适宜的时间,从而来引导成骨细胞的迁移和增殖,阻挡牙龈结缔组织及上皮软组织向骨缺损处生长。酶解实验结果表明,nZnO/P34HB 复合膜前期即 28 d 的降解率较低,且结构稳定,可以预期为种植体周围骨缺损修复创造一个相对密闭有利的空间。后续实验应该延长观察时间至 3 个月,以便更加全面地了解该膜的稳定性。

通过 ALP 染色、茜素红染色及定量实验结果表明,含 0.5%nZnO 的 nZnO/P34HB 复合 GBR 膜有良好的促成骨能力,推测是当 nZnO 浓度增加到 1.0%、1.5%时,多孔结构发生了变化,纳米颗粒的团聚干扰了其网络结构的形成,导致孔隙的减少,不利于细胞的黏附与成骨向分化[22]。体外抑菌实验表明,nZnO 的加入能显著提高材料抑菌率,其原理可能为 nZnO 能防止微生物粘附或在微生物附着到生物膜后杀死微生物[23]。

综上所述,根据细胞增殖、细胞迁移、蛋白吸附、酶解、成骨、抗菌等实验,表明 nZnO/P34HB 复合 GBR 膜基本性能满足理想 GBR 膜的要求,同时筛选出含 0.5%nZnO 的 nZnO/P34HB 复合 GBR 膜具有良好的理化性能、体外细胞相容性、促成骨能力和抑菌能力。下一步本课题组将深入探索该复合 GBR 膜的抗菌性能及屏障功能,以及在体内的生物相容性和成骨性能。

**参考文献:**


[1] JIAO X Y, WU F H, YUE X S, *et al*. New insight into biodegradable macropore filler on tuning mechanical properties and bone tissue ingrowth in sparingly dissolvable bioceramic scaffolds[J]. Mater Today Bio, 2023, 24: 100936. DOI: 10.1016/j.mtbio.2023.100936.

[2] CHEN K, ZHAO L, SUN J, *et al*. Utilizing biodegradable alloys as guided bone regeneration (GBR) membrane: feasibility and challenges[J]. Sci China Mater, 2022, 65(10): 2627-2646. DOI: 10.1007/s40843-022-2118-3.

[3] WU S Y, LUO S L, CEN Z H, *et al*. All-in-one porous membrane enables full protection in guided bone regeneration[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 119. DOI: 10.1038/s41467-023-43476-9.

[4] YANG L, ZHAO Y, CUI D B, *et al*. Coaxial bioelectrospinning of P34HB/PVA microfibers biomimetic scaffolds with simultaneity cell-laden for improving bone regeneration[J]. Mater Des, 2022, 213: 110349. DOI: 10.1016/j.matdes.2021.110349.

[5] LIU W, JIAO T J, SU Y R, *et al*. Electrospun porous poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)/lecithin scaffold for bone tissue engineering[J]. RSC Adv, 2022, 12(19): 11913-11922. DOI: 10.1039/d2ra01398c.

[6] 姜兆霞, 孔德婧, 李雨萱, 等. 引导骨再生对种植体周围软组织炎症易感性的影响[J]. 口腔医学研究, 2023, 39(8): 715-720. DOI: 10.13701/j.cnki.kqyxyj.2023.08.010.
JIANG Z X, KONG D J, LI Y X, *et al*. Effect of guided bone regeneration on inflammatory susceptibility of peri-implant soft tissue[J]. J Oral Sci Res, 2023, 39(8): 715-720. DOI: 10.13701/j.cnki.kqyxyj.2023.08.010.

[7] HIGUCHI J, KLIMEK K, WOJNAROWICZ J, *et al*. Electrospun membrane surface modification by sonocoating with HA and ZnO: Ag nanoparticles-characterization and evaluation of osteoblasts and bacterial cell behavior *in vitro*[J]. Cells, 2022, 11(9): 1582. DOI: 10.3390/cells11091582.

[8] QASIM S S B, AL-ASFOUR A A, ABUZAYEDA M, *et al*. Differences in mechanical and physicochemical properties of several PTFE membranes used in guided bone regeneration[J]. Materials, 2023, 16(3): 904. DOI: 10.3390/ma16030904.

[9] KORZINSKAS T, JUNG O, SMEETS R, *et al*. *In vivo* analysis of the biocompatibility and macrophage response of a non-resorbable PTFE membrane for guided bone regeneration[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 2952. DOI: 10.3390/ijms19102952.

[10] WANG J, WANG L, ZHOU Z, *et al*. Biodegradable polymer membranes applied in guided bone/tissue regeneration: a review[J]. Polymers, 2016, 8(4): E115. DOI: 10.3390/polym8040115.

[11] FLORJANSKI W, ORZESZEK S, OLCHOWY A, *et al*. Modifications of polymeric membranes used in guided tissue and bone regeneration[J]. Polymers, 2019, 11(5): 782. DOI: 10.3390/polym11050782.

[12] 朱艺丹, 何苗苗, 刘加涛, 等. 载 PTH-Fc/PLCL/SF 静电纺丝屏障膜的构建与性能研究[J]. 口腔医学研究, 2018, 34(8): 913-918. DOI: 10.13701/j.cnki.kqyxyj.2018.08.027.
ZHU Y D, HE M M, LIU J T, *et al*. Fabrication and characterization of fibrous barrier mat of poly(L-lactide-co-caprolactone)/silk fibroin loaded with PTH-fc[J]. J Oral Sci Res, 2018, 34(8): 913-918. DOI: 10.13701/j.cnki.

kqyxyj.2018.08.027.

[13] LU T, YANG L, LI Z Y, *et al*. Immediate implantation of ultrafine fiber slow-release system based on cell electrospinning to induce osteogenesis of mesenchymal stem cells[J]. Regen Biomater, 2023, 11: rbad113. DOI: 10.1093/rb/rbad113.

[14] SUN X Y, XU C, WU G, *et al*. Poly(lactic-co-glycolic acid): applications and future prospects for periodontal tissue regeneration[J]. Polymers, 2017, 9(6): 189. DOI: 10.3390/polym9060189.

[15] FRANCOLINI I, DONELLI G, CRISANTE F, *et al*. Antimicrobial polymers for anti-biofilm medical devices: state-of-art and perspectives[J]. Adv Exp Med Biol, 2015: 831: 93-117. DOI: 10.1007/978-3-319-09782-4_7.

[16] LUO Z H, LIU J, LIN H, *et al*. *In situ* fabrication of nano ZnO/BCM biocomposite based on MA modified bacterial cellulose membrane for antibacterial and wound healing[J]. Int J Nanomedicine, 2020, 15: 1-15. DOI: 10.2147/IJN.S231556.

[17] PATRA P, ROY S, SARKAR S, *et al*. Damage of lipopolysaccharides in outer cell membrane and production of ROS-mediated stress within bacteria makes nano zinc oxide a bactericidal agent[J]. Appl Nanosci, 2015, 5(7): 857-866. DOI: 10.1007/s13204-014-0389-z.

[18] 张宇承, 张文云, 宝福凯, 等. 多孔 HAPw/n-ZnO 骨修复材料的抗菌机理及抗生物膜研究[J]. 口腔医学研究, 2016, 32(10): 1010-1014. DOI: 10.13701/j.cnki.kqyxyj.2016.10.003.
ZHANG Y C, ZHANG W Y, BAO F K, *et al*. Antibiofilm and antibacterial mechanism of porous HAPw/n-ZnO bone restorative material[J]. J Oral Sci Res, 2016, 32(10): 1010-1014. DOI: 10.13701/j.cnki.kqyxyj.2016.10.003.

[19] VALAMVANOS T F, DEREKA X, KATIFELIS H, *et al*. Recent advances in scaffolds for guided bone regeneration[J]. Biomimetics, 2024, 9(3): 153. DOI: 10.3390/biomimetics9030153.

[20] SHIDO R, OHBA S, TOMINAGA R, *et al*. A prospective study of the assessment of the efficacy of a biodegradable Poly(l-lactic acid/ε-caprolactone) membrane for guided bone regeneration[J]. J Clin Med, 2023, 12(18): 5994. DOI: 10.3390/jcm12185994.

[21] 曹钰彬,刘畅,潘韦霖,等. 引导骨再生屏障膜改良的研究进展[J]. 华西口腔医学杂志,37(3), 2019, 37(3): 325-329. DOI: 10.7518/hxkq.2019.03.019.
CAO Y B, LIU C, PAN W L, *et al*. Research progress on the modification of guided bone regeneration membranes[J]. West China J Stomatol, 2019, 37(3): 325-329. DOI: 10.7518/hxkq.2019.03.019.

[22] XU X P, CAI Y Q, *et al*. Preparation and properties of Ag-loaded zinc oxide antibacterial coating on medical cobalt-chromium alloy[J]. Dig J Nanomater Biostruct, 2022, 17(4): 1511-1526. DOI: 10.15251/djnb.2022.174.1511.

[23] BARMA M D, MUTHUPANDIYAN I, SAMUEL S R, *et al*. Inhibition of *Streptococcus mutans*, antioxidant property and cytotoxicity of novel nano-zinc oxide varnish[J]. Arch Oral Biol, 2021, 126: 105132. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2021.105132.

(**收稿**:2024-04-28;**修回**:2024-10-11)

(编辑 刘秋池)