

氧化石墨烯/磷酸钙生物水泥体外生物相容性研究

宁黔冀, 刘梦璐, 杨洪

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要:等摩尔的 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2-\text{CaHPO}_4-\text{CaCO}_3$ (CPCs) 水泥系为固相, 不同质量浓度的氧化石墨烯(GO)水分散液(0~24 mg/mL)为液相, 按一定的固液比固化, 得到复合材料 GO/CPCs. 以成骨细胞 MC3T3-E1 为对象, 初步探究该复合材料试样的体外生物相容性. 扫描电镜观察细胞贴壁形态, MTT 法评价细胞活力, 碱性磷酸酶(ALP)活性检测探讨材料的骨诱导性. 结果显示: MC3T3-E1 细胞在材料表面状态良好, 产生胞质突; GO 的添加能够增强 MC3T3-E1 细胞活力; GO/CPCs 在短期内(1d)促进 MC3T3-E1 细胞早期分化. GO/CPCs 有望成为一种新型骨组织替代材料.

关键词:磷酸钙生物水泥; 氧化石墨烯; 生物相容性

中图分类号: TB34

文献标志码: A

磷酸钙生物水泥(Calcium Phosphate Cements, CPCs)的应用可以追溯到1983年^[1], Brown 等将等摩尔磷酸四钙和磷酸氢钙(Dicalcium Phosphate Anhydrous, DCPA)粉末混合, 加入去离子水调和固化, 水化过程具有可塑性、自固化和发热少等特点, 产物具有良好的生物相容性^[2-4]. CPCs 在模拟人体环境下的自固化产物为羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HAP), 其孔隙大小介于100 μm 至几百微米, 符合骨组织工程中支架材料的要求^[5], 已得到广泛应用. 材料的生物相容性要求材料本身对机体无毒性, 此外, 希望亦能对生物体生长有积极的促进作用. 研究发现, 将 CPCs 浸提液加入人骨髓间充质干细胞培养液中, 细胞生长良好, 并在材料表面边缘附着^[6]. Costantion 将 CPCs 植入猫颌下组织, 证明具有骨传导性, 诱导成骨作用^[7]. 但 CPCs 的力学性能仅与松质骨相当^[8], 因此应用范围限制在牙科^[9]、整形外科^[10]、骨填充^[11-12]等承载压力较小的临床. 有学者尝试改变 CPCs 粉末成分^[13]或者将纳米金^[14]、骨胶原蛋白^[15]、壳聚糖^[16]等加入 CPCs 制作复合材料, 使其力学性能得以改善.

石墨烯是一种单层碳原子厚度的二维材料, 是目前已知杨氏模量最大的材料(130 GPa). 氧化石墨烯(Geaphene oxide, GO)是化学法制备石墨烯的中产物^[17], 力学性能与石墨烯相当^[18], 且其表面具有很多含氧官能团, 接触角检测结果显示其具有良好的亲水性^[19], 生物相容性优于其他纳米碳化物^[20]. GO 和磷酸钙能够协同促进人类间充质干细胞成骨作用^[21]; GO 与明胶和羟基磷灰石组成的复合材料能够促进人类间充质干细胞的成骨分化^[22]. 我们的前期研究表明, GO 的加入能增强 CPCs 的机械性能^[23], 当添加 GO 质量比为0.5%时, 增强效果尤为显著. 据此, 本文以小鼠颌前骨 MC3T3-E1 细胞[iCell Bioscience (ATCC CRL-2594, Shanghai, China)]为材料, 对该复合材料的体外生物相容性进行探讨.

1 材料方法

1.1 GO/CPCs 复合材料的制备

将 $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ($\alpha\text{-TCP}$)、 CaHPO_4 (DCPA)、 CaCO_3 (CC₃) (国药集团化学试剂有限公司)按摩尔比1:1:1

收稿日期:2017-04-14; 修回日期:2018-02-10.

基金项目:国家自然科学基金(30940008); 河南省自然科学基金(0411031900).

作者简介:刘梦璐(1992-), 女, 河南新乡人, 河南师范大学硕士研究生, 研究方向为生物材料, E-mail:527968232@qq.com.

通信作者:宁黔冀, 河南师范大学教授, 博士生导师, E-mail:nqjnqj1964@163.com.

混合,外加乙醇为球磨介质,球磨 4 h,80 °C 烘烤 4 h,得到 CPCs 固相粉末。

GO(南京吉仓纳米科技有限公司)加去离子水,经超声振动制得不同质量浓度的 GO 水分散液(0~24 mg/mL)作为为固化液,按固液比 2.5 与 CPCs 粉末调和,制备 GO/CPCs 水泥膏,置入 $\varnothing 5\text{ mm}\times 8\text{ mm}$ 圆柱模具中固化。在相对湿度 100%、37 °C 条件下固化。7 d 后,将 GO/CPCs 从模具中取出,砂纸打磨两端至平整、光滑,每片质量控制在(0.1±0.01) g。GO/CPCs 经体积分数 75%乙醇浸泡 1 h、紫外照射 30 min 后与细胞共培养。各材料编号及 GO 含量见表 1。

表 1 GO/CPCs 的 GO 含量

NO.	GO-0	GO-1	GO-2	GO-3
GOwt%	0	0.06	0.24	0.96

1.2 MC3T3-E1 细胞培养

MC3T3-E1 细胞培养液为 α -MEM 培养液(GE Healthcare Life Sciences, Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA),在 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养,每 2 d 更换一次培养液。

1.3 MC3T3-E1 细胞形态观察

MC3T3-E1 细胞按浓度 $6\times 10^4\sim 8\times 10^4$ cells/ml 与 GO/CPCs 共培养在 24 孔细胞培养板中。经 1、3 和 7 d 培养后,移去培养液,加入 2.5%戊二醛(中国郑州派尼化学试剂场),4 °C 过夜。用磷酸盐缓冲液漂洗 3 次,每次 10 min,置于叔丁醇(天津市科密欧化学试剂开发中心)/乙醇(北京化工厂)体积分数分别为(30%、50%、70%、80%、90%)进行等级脱水,每级 5 min;置入纯叔丁醇 3 次,每次 5 min,最后一次放置 4 °C 冰箱内。经真空干燥仪(德国 CHRIST, 1-2LD)干燥、离子溅射仪(中科科仪, SBC -12)镀金后扫描电镜(日立, TM3030Plus)观察细胞在 GO/CPCs 表面的贴壁状态。

1.4 MC3T3-E1 细胞活力的测定

细胞活力测定采用 MTT 法^[24]。细胞接种浓度同 2.3,共培养 1、3 和 7 d 后加入 5% MTT 溶液(合肥博美生物科技有限公司),继续培养 4 h。加入 DMSO 震荡 10 min,使结晶得以充分溶解,使用酶标仪(Thermo scientific, MOLTISKAN SPECTRUM 1500)测量 490 nm 下的吸光值,重复 3 次。

1.5 碱性磷酸酶(ALP)活力测定

细胞培养方法同 2.4。用碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP)试剂盒(南京建成生物工程研究所)检测细胞 ALP 活力,未处理细胞作为空白对照。

2 结果和讨论

2.1 MC3T3-E1 细胞形态

MC3T3-E1 细胞在 GO/CPCs 能正常生长、黏附,且伸张状态良好,多为梭形和多角形(图 1)。细胞在材料表面延伸出胞质突,材料表面相邻细胞产生的胞质突彼此相互作用、相互牵制,伸展并交织形成网状(图 1(h), (i)),有助于细胞紧紧地贴附在材料表面或进入大小合适的孔隙(图 1a)。进入材料孔隙的细胞可以通过胞质突作为锚而吸附到孔内。该结果与之前的报道一致^[25-27]。

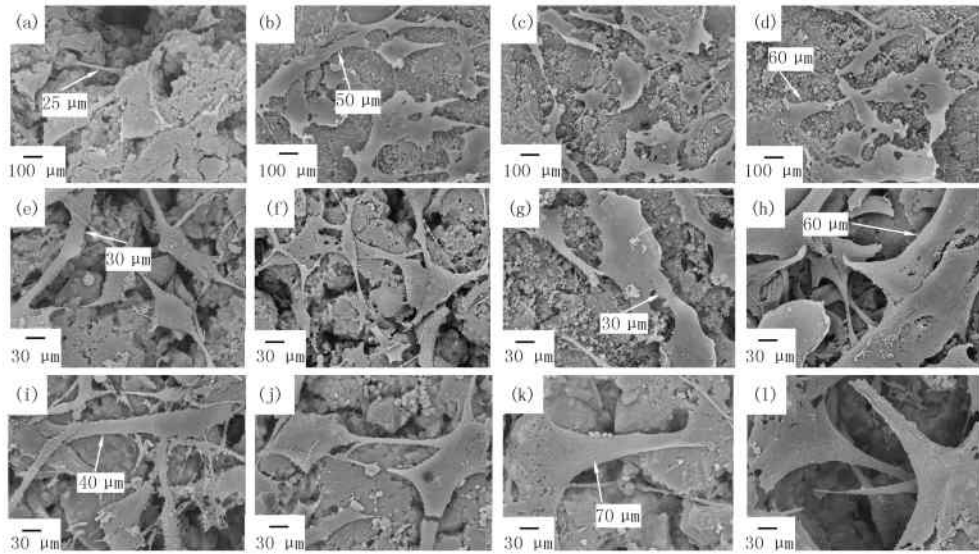
GO 的添加更有利于细胞的贴附。细胞在材料表面形成的胞质突直径随培养时间延长而逐渐变大,例如 GO-0 处理第 1d 约为 25 μm ,第 7d 为 40 μm 。此外,与 GO-0 相比,细胞在 GO/CPCs 表面形成的胞质突直径略大,例如 GO-3 处理第 7d 约为 60 μm (图 d),是第 1d 的 2.4 倍(图 1a)。

2.2 细胞活力

在培养早期,GO 的添加能够提升 MC3T3-E1 细胞活力(图 2)。随 GO/CPCs 材料中 GO 含量增加,细胞活力逐渐上升,在第 1 d 和第 3 d,GO-2 和 GO-3 的 OD 值显著高于 GO-0($P<0.05$)。第 7 d,细胞活力随 GO 含量增加而提升,但均低于 GO-0。

与之前研究一致^[28],GO-0 的细胞活力均低于空白对照(无材料处理)(图 2)。CPCs 的水化产物 HAP 促进成骨细胞增殖的效应低于其他骨组织替代品^[28],这可能与其固有的碱性有关^[29]。研究表明,碱性不利于细胞生长^[30],HAP 释放到培养液中,改变了培养液原有的 pH。我们之前的研究显示^[23],浸泡初期材料浸提

液为弱酸性或弱碱性,均不利于细胞活力;至7 d后浸提液 pH 接近于人体,但存在离子种类、浓度的差异,可能影响细胞活力.共培养初期(第1 d、3 d),随 GO 含量的增加,细胞活力呈现上升趋势(图2),SEM 观察显示,细胞在材料表面贴壁良好且长出了突起(图1),结果表明 GO 具有较好的生物相容性.据报道,GO 自身超氧阴离子基团所产生的氧化应激反应对细胞活力有抑制作用,影响细胞活力^[26,29],这与本文的结果不符.GO/CPCs 复合材料改善了 HAP 以及 GO 对细胞的不利影响,原因可能是复合材料中 HAP 颗粒和 GO 颗粒与培养液中阴阳离子相互作用,减小了氧化应激反应对细胞的不利影响,此机制需要进一步研究.共培养7 d后,GO/CPCs 组细胞活力低于 GO-0,可能是浸泡时间延长导致培养液中 GO 含量增加,氧化应激反应作用明显,影响了细胞活力.另外,材料浸泡时间可能会影响其内部颗粒大小、表面粗糙程度以及孔隙(图1)等,之前研究表明^[23],不添加 GO 的材料表面较粗糙,可能有利于细胞胞质突附着,提升细胞活力.

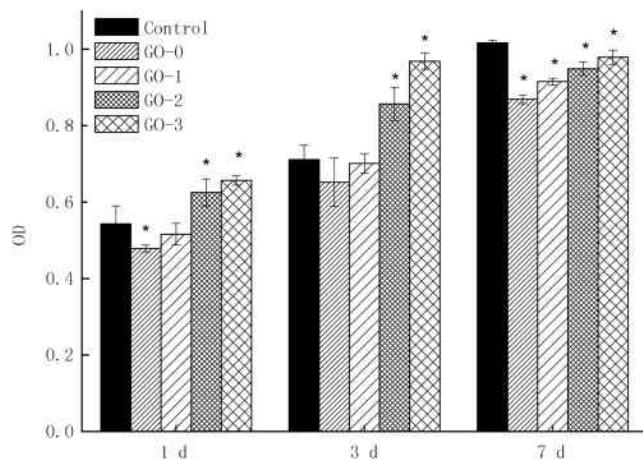


(a), (e), (i):GO-0; (b), (f), (j):GO-1; (c), (g), (k):GO-2; (d), (h), (l):GO-3; 其中, (a)-(d):1d; (e)-(h):3d; (i)-(j):7d.

图1 SEM观察MC3T3-E1细胞与GO/CPCs共培养1、3、7d后细胞形态

2.3 ALP 活力

GO/CPCs 对细胞的影响存在时间依赖性,各处理细胞的 ALP 活力随培养时间均呈现上升趋势.第1 d, GO-0 处理的细胞 ALP 活力显著低于对照,可能与细胞活力低下有关(见图2). GO-1, GO-2 和 GO-3 与对照基本持平显著高于 GO-0, GO 在培养早期能够促进细胞分泌碱性磷酸酶,与之前结果一致^[30].第3 d、第7 d GO-0 处理的细胞 ALP 活力高于对照,复合材料处理的 ALP 活力随



*表示与同一时间点对照相比,有显著性差异($P < 0.05$).

图2 共培养不同时间MC3T3-E1细胞活力的变化

GO 含量增加而呈下降趋势,原因可能与材料表面的粗糙度有关^[31].之前 SEM 结果显示^[23],GO/CPCs 表面较 GO-0 均匀、细腻.培养时间的延长,粗糙面有助于吸附更多培养液中的离子,比如 Ca^{2+} ,高浓度的 Ca^{2+}

为细胞分化提供了良好的环境^[5]. GO 表面具有很多含氧官能团,可与溶液中的阴离子、阳离子相互作用^[32],改变细胞微环境,可能影响细胞 ALP 活力.此机制需要进一步研究.

3 结 论

本试验探究了氧化石墨烯/磷酸钙生物水泥对成骨细胞 MC3T3-E1 的相容性.MC3T3-E1 细胞在新型复合材料 GO/CPCs 表面贴壁良好,呈现梭形并产生胞质突;GO 的添加能够增强 MC3T3-E1 细胞活力,GO/CPCs 在短期内(1d)促进 MC3T3-E1 细胞早期分化.GO/CPCs 有望作为一种新型骨组织替代材料应用,具有一定的前景.

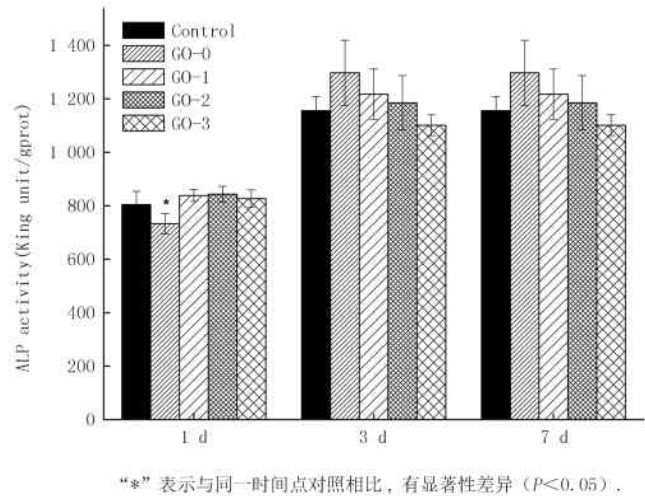


图 3 共培养不同时间对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活力的影响

参 考 文 献

- [1] VOGEL G L, CHOW L C, BROWN W E. A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples[J]. Caries Res, 1983, 17(1): 23-31.
- [2] SORENSEN R G, WIKESJO U M, KINOSHITA A, et al. Periodontal repair in dogs: evaluation of a bioresorbable calcium phosphate cement (Ceredex) as a carrier for rhBMP-2[J]. J Clin Periodontol, 2004, 31(9): 796-804.
- [3] REAL R P, OOMS E, WOLKE J G, et al. *In vivo* bone response to porous calcium phosphate cement[J]. J Biomed Mater Res A, 2003, 65(1): 30-36.
- [4] KHAIROUN I, MAGNE D, GAUTHIER O, et al. *In vitro* characterization and *in vivo* properties of a carbonated apatite bone cement[J]. J Biomed Mater Res A, 2002, 60(4): 633-642.
- [5] 温世锋, 刘清华, 郭奇峰, 等. 新型磷酸钙骨水泥与骨髓间充质干细胞的共培养研究[J]. 临床医学工程, 2009, 16(11): 1-4.
- [6] CHU T M G, ORTON D G, HOLLISTER S J, et al. Mechanical and *in vivo* performance of hydroxyapatite implants with controlled chitectures[J]. Biomaterials, 2002, 23(5): 1283-1293.
- [7] COSTANTINO P D, FRIEDMAN C D, JONES K, et al. Experimental hydroxyapatite cement cranioplasty[J]. Plast Reconstr Surg, 1992, 90(2): 174-185.
- [8] KRÜGER R, GROLL J. Fiber reinforced calcium phosphate cements-on the way to degradable load bearing bone substitutes? [J]. Biomaterials, 2012, 33(25): 5887-5990.
- [9] 沈晴映, 李恺, 李国强. 新型钙镁磷酸复合物理机械性能的初步评价[J]. 口腔医学, 2016, 228(10): 865-869.
- [10] 刘晓飞. CPC 水化过程液固态演化及其复合材料的研究[D]. 济南: 山东大学, 2008.
- [11] 梁新杰, 杨俊英. 生物医用材料的研究现状与发展趋势[J]. 新材料产业, 2016, 267(2): 2-5.
- [12] 赵立升, 李俊杰, 温宁. 磷酸钙类生物材料在口腔临床应用中的研究进展[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2016, 14(3): 184-187.
- [13] 刘健休, 沈莹, 储彬, 等. 一种可注射生物活性磷酸钙骨修复材料的制备及表征[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(6): 821-828.
- [14] GREULICH C, DIENDORF J, SIMON T, et al. Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells[J]. Acta Biomater, 2011, 7(1): 347-354.
- [15] HABRAKEN W J, WOLKE J G, JANSEN J A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering[J]. Adv Drug Deliver Rev, 2007, 59(4-5): 234-248.
- [16] 袁宁, 刘运德, 李雪, 等. 庆大霉素和 O-羧甲基壳聚糖对硫酸钙骨水泥改性研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2017, 31(3): 306-312.
- [17] 袁小亚. 石墨烯的制备研究进展[J]. 无机材料学报, 2011, 26(6): 561-570.
- [18] POKHAREL P, LEE S H, LEE D S. Thermal, Mechanical, and Electrical Properties of Graphene Nanoplatelet/Graphene Oxide/ Polyurethane Hybrid Nanocomposite[J]. J Nanosci Nanotechno, 2015, 15(1): 211-214.
- [19] RAFIEE J, RAFIEE M A, YU Z, et al. Superhydrophobic to Superhydrophilic Wetting Control in Graphene Films[J]. Adv Mater, 2010, 22

- (19):2151-2154.
- [20] HOLT B D, WRIGHT Z M, ARNOLD A M, et al. Graphene oxide as a scaffold for bone regeneration[J]. *Wires Nanomed Nanobi*, 2017, 9(3):1437-1455.
- [21] TATAVARTY R, DING H, LU G, et al. Synergistic acceleration in the osteogenesis of human mesenchymal stem cells by graphene oxide-calcium phosphate nanocomposites[J]. *Chem Commun*, 2014, 50(62):8484-8487.
- [22] ZHANG Wenhui, SUN Hongyu, MOU Yongchao, et al. Graphene Oxide-Collagen Matrix Accelerated Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells[J]. *J Biomater Tiss Eng*, 2015, 5(4):257-266.
- [23] 杨洪, 张昊焯, 陈新艳. 氧化石墨烯增强磷酸钙生物水泥[J]. *复合材料学报*, 2016, 33(4):852-858.
- [24] 唐琪, 陈莉丽, 严杰. 骨碎补提取物促小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 细胞增殖、分化和钙化作用的研究[J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(2):73-77.
- [25] OH S A, LEE G S, PARK J H, et al. Osteoclastic cell behaviors affected by the α -tricalcium phosphate based bone cements[J]. *J Mater Sci-Mater M*, 2010, 21(11):3019-3027.
- [26] MOREAU J L, WEIR M D, XU H H. Self-setting collagen-calcium phosphate bone cement: mechanical and cellular properties[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2009, 91(2):605-613.
- [27] ZHAO Qinghui, QIAN Jiangchao, ZHOU Huanjun, et al. In vitro osteoblast-like and endothelial cells' response to calcium silicate/calcium phosphate cement[J]. *Biomed Mater*, 2010, 5(3):1-9.
- [28] TURHANI D, WEISSENBOCK M, WATZINGER E, et al. In vitro study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials[J]. *Int J Oral Max Surg*, 2005, 34(5):543-550.
- [29] ZHOU Q, HU X. Systemic Stress and Recovery Patterns of Rice Roots in Response to Graphene Oxide Nanosheets[J]. *Environ Sci Technol*, 2017, 51(4):2022-2030.
- [30] ZHU S, XU Y, YIN K. The promising application of graphene oxide as coating materials in orthopedic implants: preparation, characterization and cell behavior[J]. *Biomed Mater*, 2015, 10(1):25-27.
- [31] KANAYAMA I, MIYAJI H, TAKITA H, et al. Comparative study of bioactivity of collagen scaffolds coated with graphene oxide and reduced graphene oxide[J]. *Int J Nanomed*, 2014, 9(24):3363-3373.
- [32] ROMANCHUK A Y, SLESAREV A S, KALMYKOV S N, et al. Graphene oxide for effective radionuclide removal[J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2013, 15(7):2321-2327.

***In Vitro* study on biocompatibility of graphene oxide/calcium phosphate cements**

Ning Qianji, Liu Menglu, Yang Hong

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 - \text{CaHPO}_4 - \text{CaCO}_3$ (molar ratio 1 : 1 : 1) and different concentrations of GO aqueous dispersion (0~24 mg/ml), dividedly used as the cement solid phase and the liquid component, are mixed at a certain powder/liquid ratio to set as GO/CPCs sample of composite cement. MC3T3-E1 cells are used to study the biocompatibility of GO/CPCs *in vitro*. The cell morphology on the surface of materials is observed by scanning electron microscopy. The viability of the cells is evaluated by MTT testing, and the bone-induction of cells is investigated by alkaline phosphatase (ALP) assay. The results show that the MC3T3-E1 cells get along well with GO/CPCs and have a cytoplasm-forming process. The activity of MC3T3-E1 cells and their differentiation at the short-term (1d) can be enhanced by GO/CPCs. The results observed above suggest that GO/CPCs may become a new material instead of bone tissue.

Keywords: calcium phosphate cements; graphene oxide; biocompatibility

[责任编辑 王凤产]