

聚醚醚酮纤维负载氧化铋的压电效应对成骨细胞分化的刺激作用

梁露娴¹, 宋安琪¹, 周扬¹, 孙平^{1,2}, 王德强¹, 魏杰¹

(1. 华东理工大学材料科学与工程学院, 超细材料制备与应用教育部重点实验室, 上海 200237;
2. 上海市第八人民医院骨科, 上海 200235)

摘要 采用超声剥离法制备压电性能优良的氧空位氧化铋(BiO_{2-x}), 利用绿原酸将 BiO_{2-x} 负载在聚醚醚酮(PEEK)纤维表面, 制备了一种具有压电效应的肩袖补片材料, 研究了该材料对巨噬细胞极化和成骨细胞分化行为的影响. 结果表明, 负载 BiO_{2-x} 后, PEEK 纤维不仅表面性能(粗糙度、亲水性和表面能等)明显改善, 而且压电性能也显著提高(压电系数为 3.8 pC/N , 开路电压为 0.97 V , 短路电流为 $575.6 \text{ }\mu\text{A}$). 该材料不仅促进巨噬细胞向抗类型 M2 极化, 而且促进成骨细胞黏附、增殖和成骨分化, 在修复肩袖撕裂方面具有潜在的应用前景.

关键词 聚醚醚酮纤维; 表面改性; 压电性能; 巨噬细胞极化; 成骨细胞分化

中图分类号 O631

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240169

Piezoelectric Effect of Polyether Ether Ketone Fibers Loaded with Bismuth Oxide Stimulating Osteogenic Differentiation

LIANG Luxian¹, SONG Anqi¹, ZHOU Yang¹, SUN Ping^{1,2*}, WANG Deqiang^{1*}, WEI Jie^{1*}

(1. Key Laboratory for Ultrafine Materials of the Ministry of Education, School of Materials Science and Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;
2. Department of Orthopaedics, Shanghai Eighth People's Hospital, Shanghai 200235, China)

Abstract Oxygen-vacancy bismuth oxide (BiO_{2-x}) with excellent piezoelectric property was prepared by ultrasonic peel method and loaded on polyether ether ketone (PEEK) fiber by using chlorogenic acid. A kind of rotator cuff patch material with piezoelectric effect was designed, and its effects on macrophage polarization and osteoblast behavior were studied. The results showed that after loading BiO_{2-x} , not only the surface properties (roughness, hydrophilicity, and surface energy, etc.) of PEEK fibers were obviously improved, but also the piezoelectric properties were significantly enhanced (piezoelectric coefficient of 3.8 pC/N , output voltage of 0.97 V and output current of $575.6 \text{ }\mu\text{A}$). The patch material not only promoted the anti-inflammatory M2 macrophage polarization, but also promoted the adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of osteoblasts. The patch material has potential application for repairing rotator cuff tear.

Keywords Polyether ether ketone fiber; Surface modification; Piezoelectric effect; Macrophage polarization; Osteoblast differentiation

巨大肩袖撕裂是常见的运动损伤, 导致肩关节功能障碍. 临床一般采用人工肩袖补片修复, 重建

收稿日期: 2024-04-04. 网络首发日期: 2024-05-28.

联系人简介: 魏杰, 男, 博士, 研究员, 主要从事生物材料方面的研究. E-mail: jwei@ecust.edu.cn

孙平, 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事骨科创伤与修复方面的研究. E-mail: sunping1127@126.com

王德强, 男, 博士, 副教授, 主要从事生物复合材料方面的研究. E-mail: Derek_wang@ecust.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 32171340)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.32171340).

肩袖结构,恢复肩关节功能;但术后肩袖组织愈合不良导致肩袖再撕裂等并发症是目前肩袖补片应用面临的难题^[1].一些合成高分子材料(如聚碳酸酯、聚氨酯、聚四氟乙烯、聚丙烯等)由于具有高的抗拉强度,可以减少修复部位的机械张力,为肩袖愈合提供稳定的力学保障,因而常用于肩袖补片材料^[2,3].然而,这些高分子是生物惰性材料,不能促进骨组织再生,形成骨愈合,这将导致肩袖再撕裂的发生^[4].聚醚醚酮(PEEK)作为骨植入材料已广泛用于临床^[5].通过高温熔融纺丝制备的PEEK纤维具有优良的力学性能(如抗拉强度、耐疲劳和耐磨性等)^[6],因此,PEEK纤维有望成为一种新型的肩袖补片材料.然而,PEEK纤维是一种生物惰性材料,植入体内难以刺激细胞响应/骨再生,形成骨愈合,可能导致异物/炎症反应^[7].因此需要对PEEK纤维表面进行改性,赋予其抗炎和促骨再生等功能.

人体骨组织具有压电效应,能将所受应力转化为电信号,在骨代谢、发育、生长、重塑及修复过程中起着至关重要的作用^[8,9].基于骨组织的生物电作用,外源电刺激也已被证明是一种有效的治疗手段,可促进骨愈合^[10].电刺激通过增加ATP含量使间充质干细胞肌动蛋白重塑,激活相关信号通路,增强成骨分化^[11].然而,受限于骨微环境的复杂性,电刺激促进骨再生的机制尚不十分明确.模拟骨组织的电微环境,设计具有压电性能的骨修复材料引起了人们的兴趣^[12,13].压电材料能利用机体运动或外部刺激(如超声波)调控成骨相关的关键信号通路和因子,促进成骨细胞分化和骨再生^[14].压电材料产生的电信号可激活电压门控Ca²⁺通道和BMP2/Smad5信号通路,刺激间充质干细胞成骨分化^[15].近年来,利用电信号调控免疫细胞命运和组织再生也引起了一定的关注.外部电刺激可诱导巨噬细胞向抗炎型M2型极化,触发抗炎因子的选择性表达和分泌,调节局部免疫微环境,促进组织修复^[16].

绿原酸(CA)是一种天然多酚化合物,分子上存在大量酚羟基,可与多种高分子材料形成氢键,因而常用于材料表面改性^[17].氧化铋(Bi₂O₃)是一种压电材料,但压电性能不高^[18].通过缺陷工程制造阴离子空位,引起晶格畸变,可以提高材料的压电性能^[19].因此,本文采用超声剥离法制备氧空位丰富的氧化铋(BiO_{2-x}),利用CA将BiO_{2-x}负载在PEEK纤维表面,制备了一种具有压电效应的人工肩袖补片材料.利用该材料的压电效应,不仅刺激了M2巨噬细胞极化,而且促进了成骨细胞的增殖与分化/骨再生.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

五水合硝酸铋[Bi(NO₃)₃·5H₂O]、铋酸钠(NaBiO₃)、氢氧化钠(NaOH)和CA,化学纯,上海泰坦科技股份有限公司;PEEK,常州创赢新材料科技有限公司;磷酸盐(PBS)缓冲液(分析纯)、α-最低必需培养基(α-MEM培养基)、鬼笔环肽(分析纯)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(分析纯)、驴抗小鼠FITC和驴抗兔Cy3,美国赛默飞世尔科技公司;乙基苯基聚乙二醇(Nonidet P-40),化学纯,美国默克集团;PrimeScript RT试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司;BCIP/NBT碱性磷酸酯酶显色试剂盒、碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、茜素红(ARS)溶液和钙含量显色检测试剂盒和细胞计数试剂盒-8(CCK-8),上海碧云天生物技术股份有限公司;小鼠巨噬细胞(RAW 264.7)和大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC),上海交通大学细胞库;一抗诱导型一氧化氮合酶(一抗iNOS)和甘露糖受体(CD206),艾博抗(上海)贸易有限公司.

X Pert Pro-MPD型X射线衍射仪(XRD),荷兰Panalytical B. V.公司;EMX-8/2.7型电子顺磁共振波谱仪(EPR),美国Bruker公司;K-Alpha型X射线光电子能谱仪(XPS)和Applied Biosystems型实时荧光定量聚合酶链式反应仪(PCR),美国赛默飞世尔科技公司;JEM-2100型透射电子显微镜(TEM),日本电子公司;iS 10型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR),美国Nicolet公司;Sigma 300型场发射扫描电子显微镜(SEM)和能量色散X射线能谱仪(EDS),德国Zeiss公司;Multimode 8型原子力显微镜(AFM),德国Bruker公司;ZJ-3型d₃₃压电测试仪,德国Borosa公司;OCA200型接触角测量仪(CAM),德国Dataphysics公司;TBS1102C型示波器,美国Tektronix公司;SR570型放大器,美国Stanford公司;A1R型共聚焦激光扫描显微镜(CLSM),日本Nikon公司;Prima型压电力显微镜(PFM),俄罗斯NT-MDT

公司.

1.2 氧空位氧化铋的制备与表征

将 3.6 g $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 加入 18 mL 乙二醇和 36 mL 乙醇的混合溶液中并搅拌 1 h, 将溶液转移至反应釜中, 于 160 °C 水热反应 5 h. 所得沉淀物经干燥后分散于 30 mL 去离子水和无水乙醇(体积比 1:1) 的混合溶液中, 超声剥离 4 h, 差速离心, 用去离子水洗涤 3 次, 于 60 °C 干燥得到 Bi_2O_3 .

将 1.40 g NaBiO_3 和 1.12 g NaOH 加入 30 mL 去离子水中, 搅拌 2 h, 将混合物转移至反应釜中, 于 180 °C 水热反应 5 h; 沉淀物经离心、干燥后分散于 30 mL 去离子水和无水乙醇(体积比 1:1) 的混合溶液中, 超声剥离 4 h, 差速离心, 用去离子水洗涤 3 次, 于 60 °C 干燥, 得到 BiO_{2-x} .

通过 TEM, XRD, EPR, XPS 和 PFM 等方法对 Bi_2O_3 和 BiO_{2-x} 进行表征.

1.3 PEEK 纤维表面 CA/ BiO_{2-x} 涂层的制备与表征

将 0.105 g CA 加入 30 mL 去离子水中, 在室温下搅拌至溶解, 再加入 0.05 g PEEK 纤维, 搅拌 12 h, 得到 0.0518 g CA 涂层的纤维(PKCA). 将 6 mg BiO_{2-x} 纳米颗粒加入 10 mL CA 溶液中, 再加入 0.0518 g PKCA, 搅拌 2 h, 干燥后得到 0.0529 g CA 涂层负载 BiO_{2-x} 的纤维(PCBO). 通过 FTIR 检测样品的官能团; 通过 SEM 观察样品的表面形貌, 使用 EDS 表征样品的组成及元素分布; 通过 AFM 测试样品的粗糙度; 通过 CAM 测量样品的水和二碘甲烷接触角, 根据 Owen-Wendt 公式计算样品表面能; 通过 d_{33} 压电测试仪测量样品的 d_{33} 系数; 通过示波器联用放大器, 使用压力施加器模拟产生机械应力, 检测样品的开路电压和短路电流.

1.4 PEEK 纤维表面 CA/ BiO_{2-x} 涂层对巨噬细胞行为的影响

将 RAW 264.7 培养于含有 10% (体积分数) 胎牛血清和青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中. 将 PEEK, PKCA 和 PCBO 分别与 RAW 264.7 细胞在 24 孔板中共培养 3 d, 经固定、脱水、干燥和喷金后, 采用 SEM 观察细胞形态.

将 RAW 264.7 细胞与样品 PEEK, PKCA 和 PCBO 置于细胞培养基中共培养 3 d, 用 2.5% (质量分数) 戊二醛溶液固定 RAW 264.7 细胞, 用 0.1% (体积分数) 的免疫染色通透液在 Triton-X 中通透 30 min, 然后用 5% (体积分数) 羊血清终止通透. 将一抗 iNOS 和 CD206 与 RAW 264.7 细胞在 4 °C 下共培养 12 h, 随后加入驴抗小鼠 FITC 和驴抗兔 Cy3 结合 1 h, 用 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚染色 8 min, 用 CLSM 观察并拍照.

将 RAW 264.7 细胞分别与 PEEK, PKCA 和 PCBO 共培养 3 d, 用 Trizol 试剂提取 RAW 264.7 细胞中的总 RNA, 用 PrimeScript RT 试剂盒反转录成 cDNA, 进行逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)定量分析, 引物如表 1 所示. 收集培养基上清液并保存, 使用 ELISA 试剂盒检测培养基上清液中的 IL-1 β , TNF- α , IL-4 和 IL-10 水平.

Table 1 Primers used in this assay

Gene	Primer direction	Primer sequence (5' to 3')
Mouse IL-1 β	Forward	GCAACTGTTCTGAACTCAACT
	Reverse	ATCTTTTGGGGTCCGTCACCT
Mouse IL-6	Forward	TAGTCCTTCTACCCCAATTTC
	Reverse	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
Mouse IL-4	Forward	GCCATATCCACGGATGCGACA
	Reverse	TCCATCTCCGTGCATGGCGTC
Mouse IL-10	Forward	GGCTGGACGAGACCCGAACG
	Reverse	CCCGGGGTGTAGGCACCACT

1.5 PEEK 纤维表面 CA/ BiO_{2-x} 涂层对成骨细胞行为的影响

将大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)培养于含有 10% (体积分数) 胎牛血清和 1% (体积分数) 青霉素/链霉素的 α -MEM 培养基中. 将 PEEK, PKCA 和 PCBO 分别与 BMSC 细胞在 24 孔板中共培养 4, 6 和 12 h 后, 每孔加入 500 μL CCK-8 溶液, 用酶标仪在 450 nm 处检测溶液的吸光度(OD 值). BMSC 细胞培养 1, 3 和 7 d 后, 加入 500 μL CCK-8 溶液培养 6 h, 用酶标仪在 450 nm 处检测溶液的 OD 值. 将 BMSC 细胞

培养 1 和 3 d 后, 固定细胞, 经梯度脱水、干燥和喷金后, 用 SEM 观察 BMSC 细胞形态. 每孔加入 FITC 标记鬼笔环肽染色 45 min, 随后在孔板中加入 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶染色 8 min, 用磷酸盐缓冲液清洗 3 次, 通过 CLSM 观察细胞形貌.

将 BMSC 细胞与样品 PEEK, PKCA 和 PCBO 共培养 14 d 后固定细胞, 用 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒染色, 用光学显微镜观察并拍照. 每孔加入 200 μL 1% Nonidet P-40 获得细胞裂解物. 将裂解物离心, 取 50 μL 上清液至 96 孔板内, 用碱性磷酸酶检测试剂盒在 450 nm 处, 使用酶标仪检测裂解液的 OD 值; 通过 BCA 试剂盒检测细胞的总蛋白质量 (ALP 活性=吸光度/总蛋白质量). 将 BMSC 与样品 PEEK、PKCA 和 PCBO 共细胞培养 21 d 后, 固定细胞, 用 2% ARS 溶液染色 10 min, 通过光学显微镜观察并拍照; 采用钙含量显色检测试剂盒定量分析钙结节的形成.

2 结果与讨论

2.1 BiO_{2-x} 的表征

图 1(A) 示出 BiO_{2-x} 的 TEM 照片. 可以看出, BiO_{2-x} 为粒径 50~100 nm 的纳米颗粒. 由高分辨率 TEM 照片 [图 1(A) 插图] 可以看出, BiO_{2-x} 的 (200) 晶面条纹间距为 0.279 nm. 图 1(B)~(F) 示出 Bi_2O_3 和 BiO_{2-x} 的 XRD 谱图、EPR 谱图、XPS 全谱及 O_{1s} 和 Bi_{4f} 分峰谱图. 由图 1(B) 可以看出, Bi_2O_3 和 BiO_{2-x} 的主要特征峰与氧化铋标准卡片 (PDF 47-1057) 基本吻合^[20]; 与 Bi_2O_3 相比, BiO_{2-x} 个别峰的位置略有降低, 这是由于引入氧空位导致其晶格产生了缺陷. EPR 结果 [图 1(C)] 表明, BiO_{2-x} 在 g 值为 2.002 处有明显的信号, 这是氧空位的典型特征峰^[21], 而 Bi_2O_3 没有明显相关信号.

由图 1(D) 可以看出, Bi_2O_3 和 BiO_{2-x} 都含有 O 和 Bi 元素. 由图 1(E) 可以看出, Bi_2O_3 和 BiO_{2-x} 的 O_{1s} 峰位置分别为 531.26 和 531.38 eV. BiO_{2-x} 的 O_{1s} 峰向更高结合能移动, 这是氧空位导致的. Bi_2O_3 的氧空位含量为 19.73% (表面缺陷自然形成), 而 BiO_{2-x} 的氧空位含量为 36.39%, 提高了 16.66%. 由图 1(F) 可以看出, Bi_2O_3 的 Bi_{4f} 峰在 164.42 和 159.05 eV 处, 而 BiO_{2-x} 的 Bi_{4f} 峰在 164.61 和 159.37 eV 处, BiO_{2-x} 的

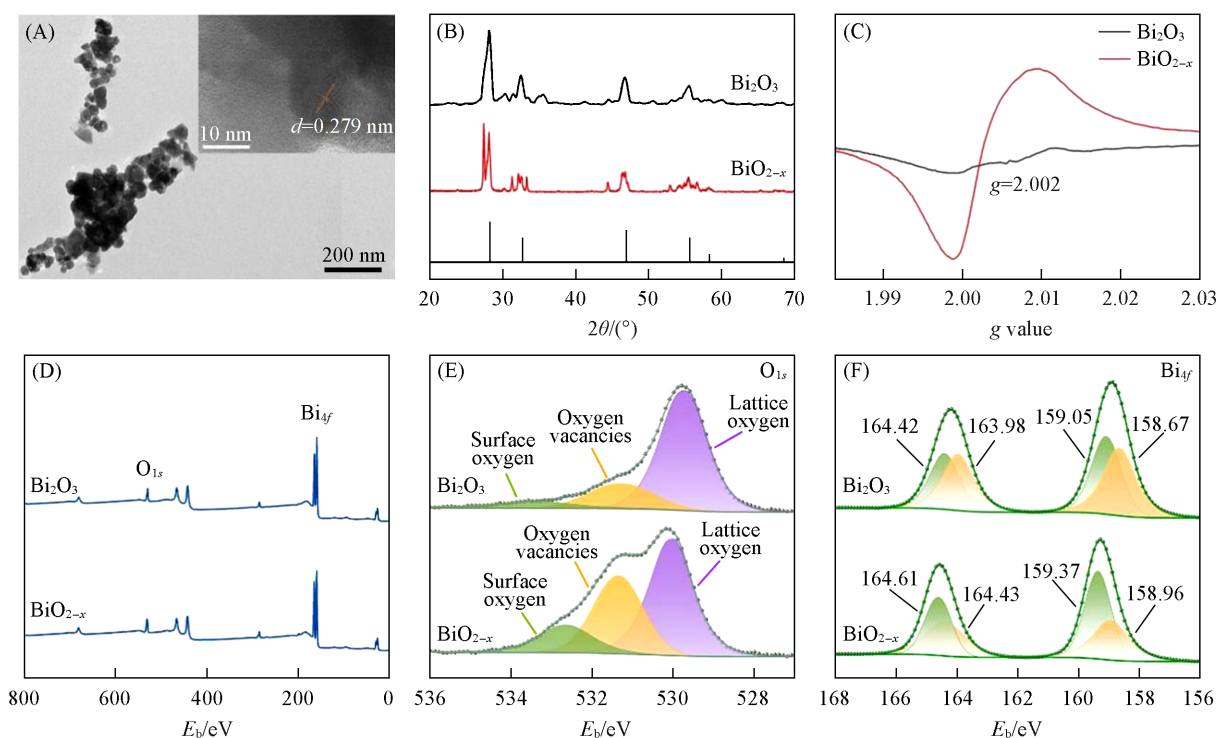


Fig. 1 TEM image of BiO_{2-x} (A), XRD (B), EPR (C), XPS (D), high-resolution O_{1s} (E) and Bi_{4f} (F) XPS spectra of Bi_2O_3 and BiO_{2-x}

Inset in (A): HRTEM image of BiO_{2-x} .

Bi_{4f} 峰向更高结合能移动,这是氧空位导致的。

图2示出 Bi_2O_3 和 BiO_{2-x} 的PFM振幅图、相位图、振幅曲线和相位滞回曲线。由PFM振幅图[图2(A)和(E)]和相位图[图2(B)和(F)]可以看出, Bi_2O_3 和 BiO_{2-x} 均有压电性能。振幅曲线表明,与 Bi_2O_3 [图2(C)]相比, BiO_{2-x} [图2(G)]的振幅变化更高,外加电场使其表面产生更大应变,表明其具有更好的压电性能。根据振幅曲线计算PFM压电系数(d_{33} , pm/V), Bi_2O_3 和 BiO_{2-x} 的 d_{33} 分别为16.7和34.5 pm/V。相位滞回曲线结果表明, Bi_2O_3 [图2(D)]和 BiO_{2-x} [图2(H)]均呈现出相位反转,说明电压变化可以改变其局部极化。与 Bi_2O_3 相比, BiO_{2-x} 的相位滞回曲线显著变窄,表明其压电性能更佳。可见,氧空位提高了 BiO_{2-x} 压电性能,这是由于氧空位使晶格发生畸变,晶体不对称性导致的^[22]。

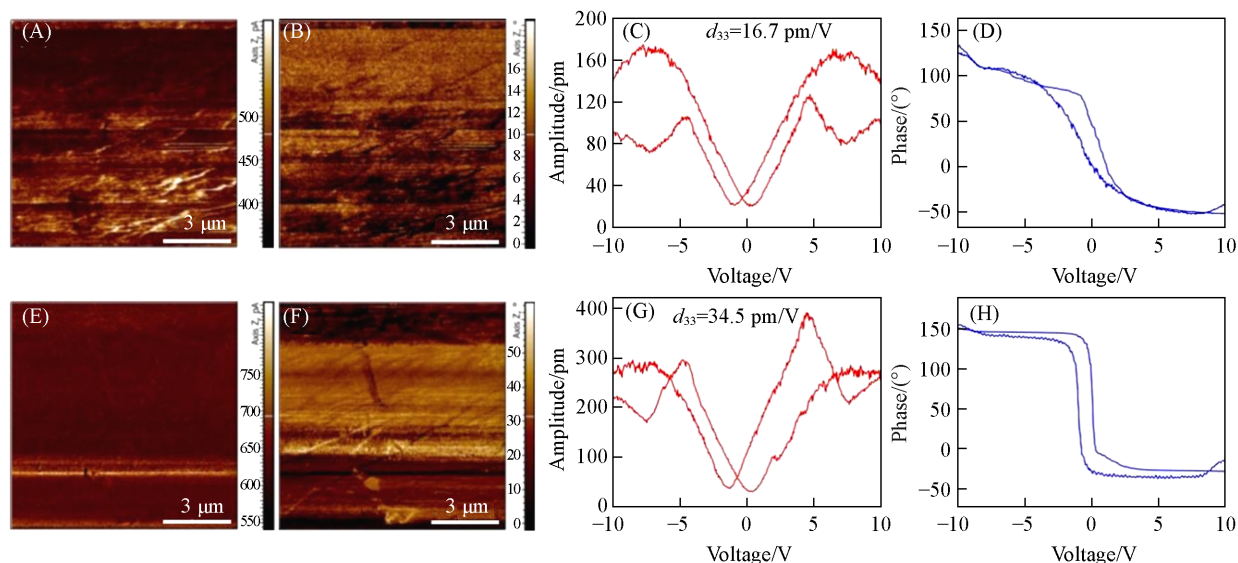


Fig. 2 PFM amplitude(A, E) and phase(B, F) plots, amplitude curves(C, G) and phase hysteresis loops(D, H) of Bi_2O_3 (A—D) and BiO_{2-x} (E—H)

2.2 PEEK 纤维涂层的表征

图3示出PEEK, PKCA和PCBO的SEM照片和EDS谱图。由图3(A)~(C)可以看出,PEEK和PKCA

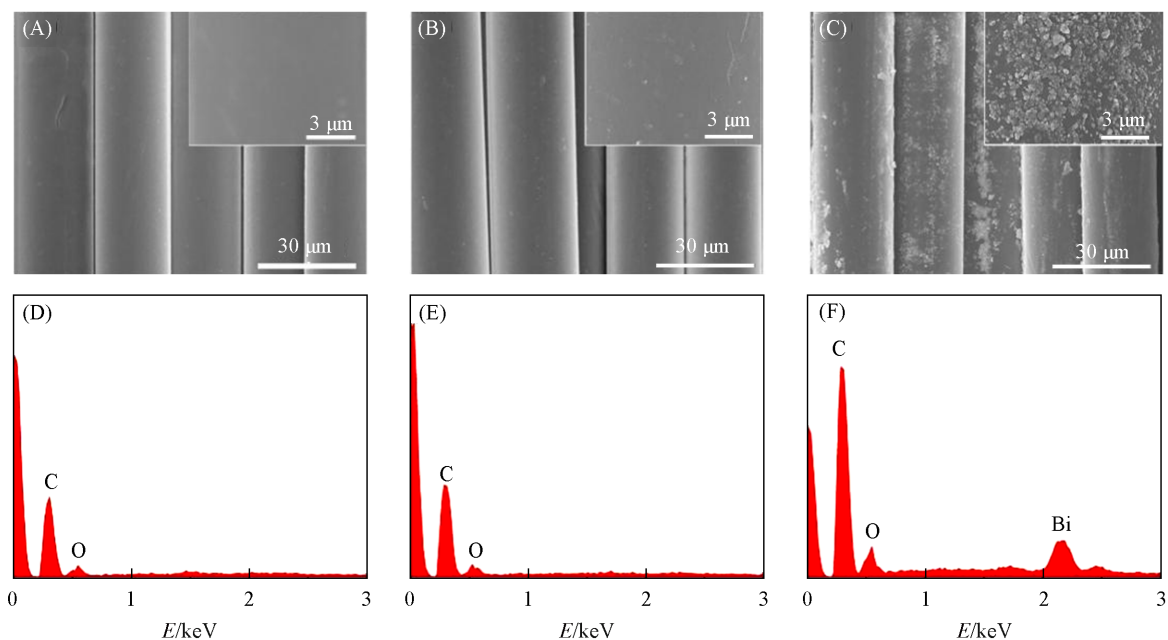


Fig. 3 SEM images(A—C) and EDS(D—F) of PEEK(A, D), PKCA(B, E) and PCBO(C, F)

Insets: SEM images with high magnification.

表面光滑, 没有明显区别, 而PCBO表面有很多类球形颗粒, 尺寸在50~100 nm之间. 由图3(D)~(F)可以看出, PEEK, PKCA和PCBO表面均存在C和O元素, 而PCBO出现Bi元素, 说明表面存在BiO_{2-x}.

图4示出PEEK, PKCA和PCBO的FTIR谱图、粗糙度、水接触角、表面能、d₃₃压电系数、短路电流和开路电压. 由图4(A)可以看出, PKCA和PCBO都出现了PEEK的特征峰, 1652, 1490和1226 cm⁻¹处分别对应C=O的伸缩振动、苯环中R—O—R的面内伸缩振动和非对称伸缩振动. 此外, 在PKCA和PCBO的谱线中还出现了CA的酚羟基伸缩振动特征峰(3367 cm⁻¹)^[23], 表明其表面是CA涂层.

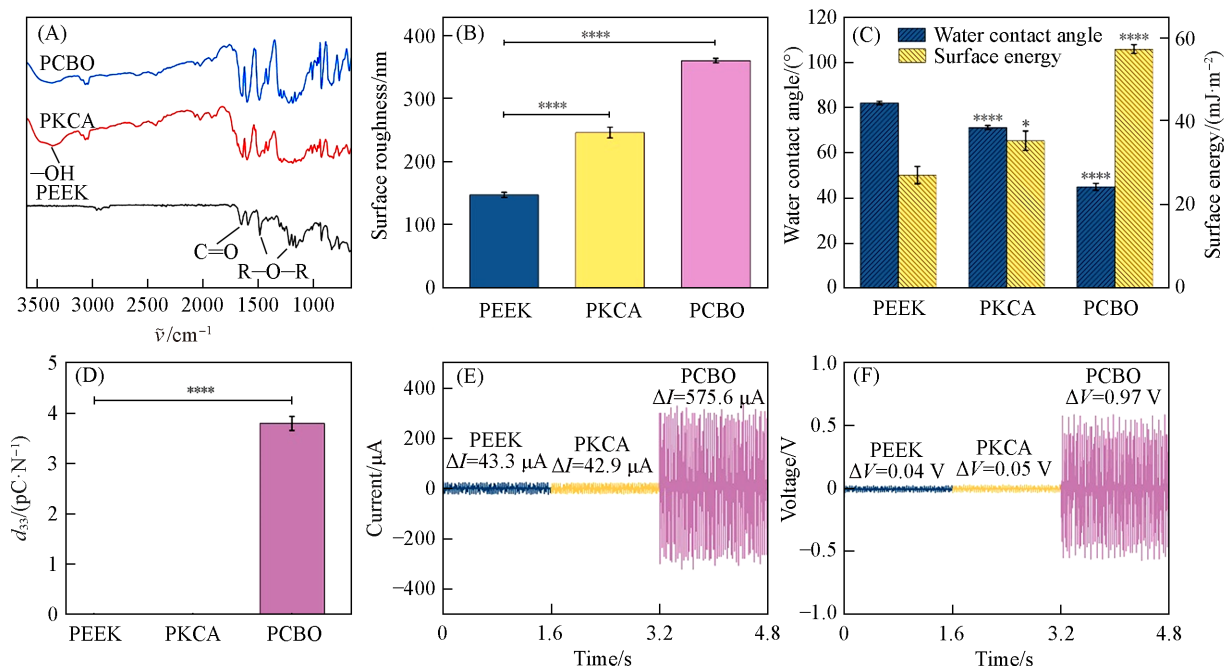


Fig. 4 FTIR spectra(A), surface roughness(B), water contact angle and surface energy(C), d₃₃(D), output current(E) and output voltage(F) of PEEK, PKCA and PCBO

(B, C) Error bars represent standard deviation (n=3); *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 vs. PEEK group.

材料的表面特性(如微观形貌、粗糙度、亲水性和表面能等)显著地影响细胞行为和功能^[24]. 由图4(B)可以看出, PEEK, PKCA和PCBO的粗糙度分别为(147.33±4.04), (246±8.54)和(360±3.61) nm, 表明粗糙度逐渐增加. 材料的润湿性是调控细胞行为和功能的关键因素, 亲水表面有利于细胞黏附和铺展^[25]. 由图4(C)可以看出, PEEK, PKCA和PCBO的水接触角分别是(82.03±0.7)°, (71.2±0.9)°和(44.9±1.5)°, 表明亲水性逐渐增加; PEEK, PKCA和PCBO的表面能分别为(27.12±2.08), (35.38±2.32)和(57.37±1.05) mJ/m², 表明表面能逐渐增加. 综上所述, 与PEEK相比, PKCA的表面性能(粗糙度、亲水性和表面能等)明显改善, 这是由于其表面CA涂层引起的; 与PKCA相比, PCBO的表面性能进一步提高, 这是由于其表面涂层含有BiO_{2-x}.

由图4(D)可以看出, PEEK和PKCA的压电系数为零, 表明二者没有压电性能; 而PCBO压电系数为3.8 pC/N, 这是由于涂层中的BiO_{2-x}具有压电性能, 因而赋予PCBO压电性能. 压电材料具有压电效应, 能将机械能转化成电能, 即将外力转化为微电流^[26]. 由图4(E)和(F)可以看出, PEEK, PKCA和PCBO的开路电压分别为0.04, 0.05和0.97 V, 短路电流分别为43.3, 42.9和575.6 μA. 可见, 负载BiO_{2-x}的PCBO具有明显的压电效应.

2.3 对巨噬细胞极化的影响

图5示出RAW264.7细胞在PEEK, PKCA和PCBO上培养3 d的SEM和荧光染色照片. 由图5(A)~(C)可以看出, RAW264.7细胞在材料表面培养3 d后, PEEK表面的细胞呈椭圆形, 这是促炎型M1巨噬细胞的典型形态, 表明PEEK促进M1巨噬细胞极化; PKCA表面的细胞部分呈椭圆形(M1形态), 部

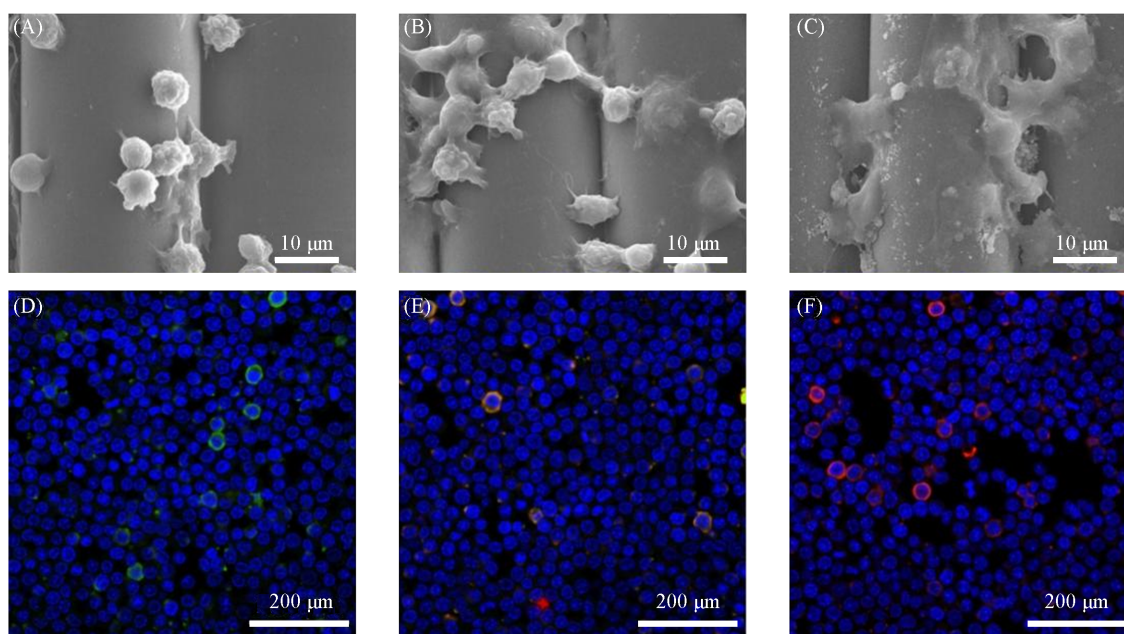


Fig. 5 SEM(A—C) and fluorescence(D—F) images of RAW264. 7 cells after culturing on PEEK(A, D), PKCA(B, E) and PCBO(C, F) for 3 d(iNOS of M1 marker: green; CD206 of M2 marker: red)

分铺展并形成一些伪足(M2形态);而PCBO表面的细胞呈纺锤形,铺展明显并形成许多伪足,这是抗炎症M2巨噬细胞的典型形态,表明PCBO促进M2巨噬细胞极化.由图5(D)~(F)可以看出,PEEK的巨噬细胞主要为M1型(绿色标记),PKCA为M1和M2型(红色标记)并存,而PCBO主要为M2型.因此,PEEK促进M1巨噬细胞极化,而PCBO促进M2巨噬细胞极化.M1型巨噬细胞极化促进炎症相关基因表达,分泌炎症因子,激活破骨细胞,促进骨吸收;而M2型巨噬细胞极化促进抗炎相关基因表达,分泌抗炎因子,刺激成骨细胞分化,促进骨形成^[27].因此,PCBO促进M2巨噬细胞极化,形成抗炎微环境,有利于成骨细胞分化和骨再生.

图6示出巨噬细胞在PEEK,PKCA和PCBO上培养3d后的炎症相关基因及因子的表达情况.由图6(A)~(D)可知,对于促炎相关基因(IL-1 β 和IL-6)的表达水平,PEEK最高,PKCA次之,PCBO最低,表明PEEK明显上调促炎相关基因表达;而对于抗炎相关基因(IL-4和IL-10)的表达水平,PEEK最

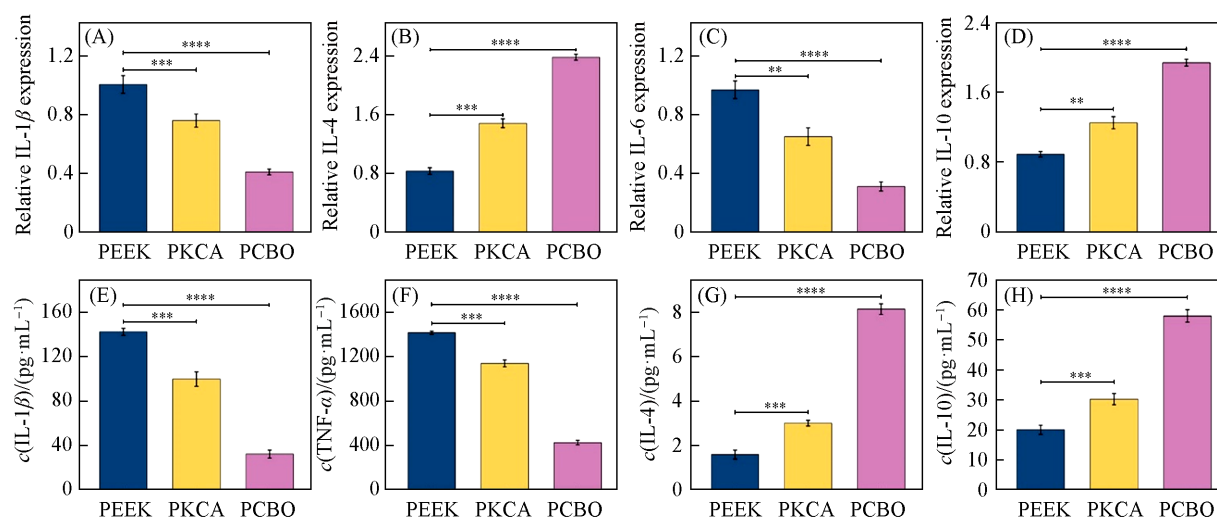


Fig. 6 Expression of inflammation-related genes(A—D) and secretory of inflammatory cytokines(E—H) of RAW264. 7 cells after culturing on PEEK, PKCA and PCBO for 3 d

Error bars represent standard deviation($n=3$); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs. PEEK group.

低, PKCA次之, PCBO最高, 表明PCBO显著上调抗炎相关基因表达. 由图6(E)~(H)可知, 对于促炎细胞因子(TNF- α 和IL-1 β)的分泌水平, PEEK最高, PKCA次之, PCBO最低, 表明PEEK明显促进促炎细胞因子分泌; 而对于抗炎细胞因子(IL-4和IL-10)的分泌水平, PEEK最低, PKCA次之, PCBO最高, 表明PCBO显著促进抗炎细胞因子分泌. 因此, 与PEEK相比, PKCA促进部分M2巨噬细胞极化, 表明绿原酸有一定的抗炎作用, 抗炎机理是由于其分子上的功能基团——酚羟基; 而PCBO显著地促进M2巨噬细胞极化, 表明BiO_{2-x}具有优良的抗炎性能, 抗炎机理是由于它的压电效应. 压电材料产生电信号刺激M2抗炎型巨噬细胞极化, 促进抗炎相关基因表达, 分泌抗炎因子, 缓解局部炎症, 形成有利于成骨的抗炎微环境, 从而促进成骨分化/骨再生. 压电材料介导的电信号可以调控免疫进程, 对骨修复具有重要意义.

2.4 成骨细胞响应

图7示出BMSC在PEEK, PKCA和PCBO上培养1 d和3 d后的SEM和CLSM图像以及培养不同时间后的细胞黏附和增殖率. 由图7(A₁)~(A₆)可以看出, 与PEEK和PKCA相比, PCBO表面细胞铺展形态更好, 且有大量丝状伪足伸展. 由图7(B₁)~(B₆)可以看出, PCBO表面细胞数量明显多于PEEK和PKCA. 由图7(C)和(D)可见, 随着培养时间的延长, 细胞黏附和增殖率均有所提高, 而PCBO的细胞黏附和增殖明显高于PEEK和PKCA, 表明PCBO显著地促进了细胞响应.

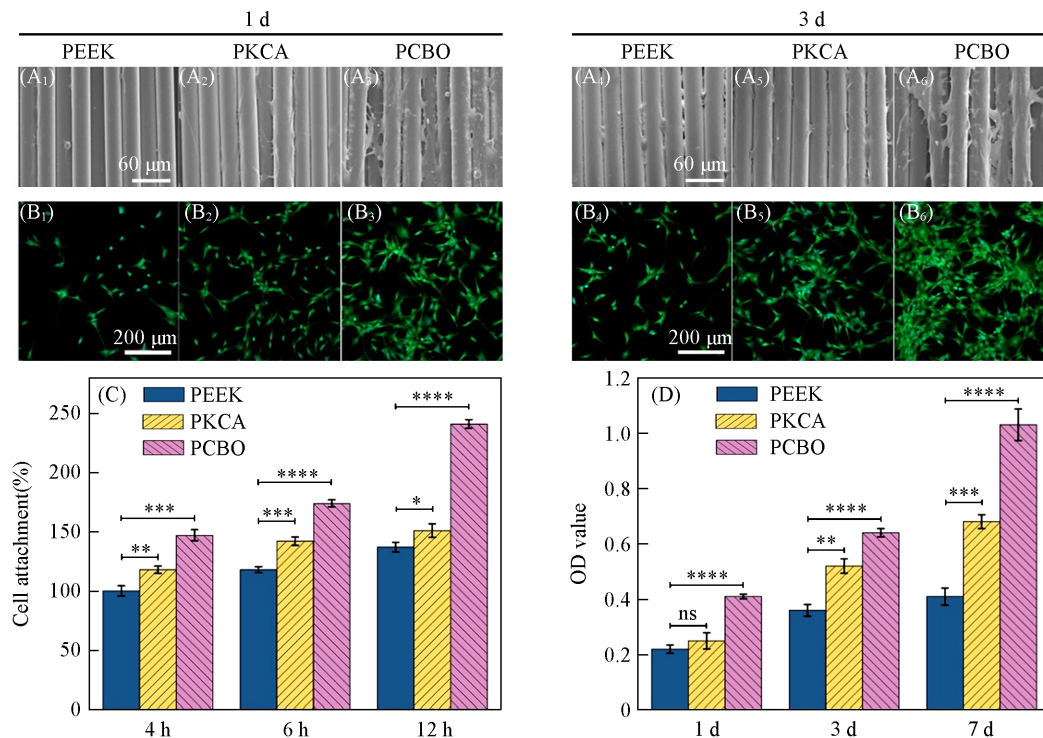


Fig. 7 SEM(A₁—A₆) and CLSM(B₁—B₆) images of BMSC after culturing on PEEK, PKCA and PCBO for 1 d and 3 d, and cell adhesion(C) and proliferation(D) of BMSC after culturing on PEEK, PKCA and PCBO for different time

(C, D) Error bars represent standard deviation ($n=3$); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$) vs. PEEK group.

碱性磷酸酶(ALP)是细胞早期成骨分化的重要生化标志物^[28]. 由ALP显色试剂盒染色图片[图8(A)]可以看出, PEEK, PKCA和PCBO的颜色依次逐渐加深, 表明ALP生成量逐渐增加, PCBO最多. ALP活性定量分析[图8(C)]结果表明, PEEK, PKCA和PCBO的ALP活性依次增加, PCBO最高, 表明其促进了成骨分化. 钙沉积是细胞后期成骨分化的重要生化标志物^[29]. ARS染色图像[图8(B)]结果表明, PEEK, PKCA和PCBO的颜色依次逐渐加深, 表明钙沉积量逐渐增加, PCBO最多. ARS定量

分析[图8(D)]结果表明, PEEK, PKCA 和 PCBO 的钙沉积量依次增加, PCBO 最高, 表明其促进了成骨分化.

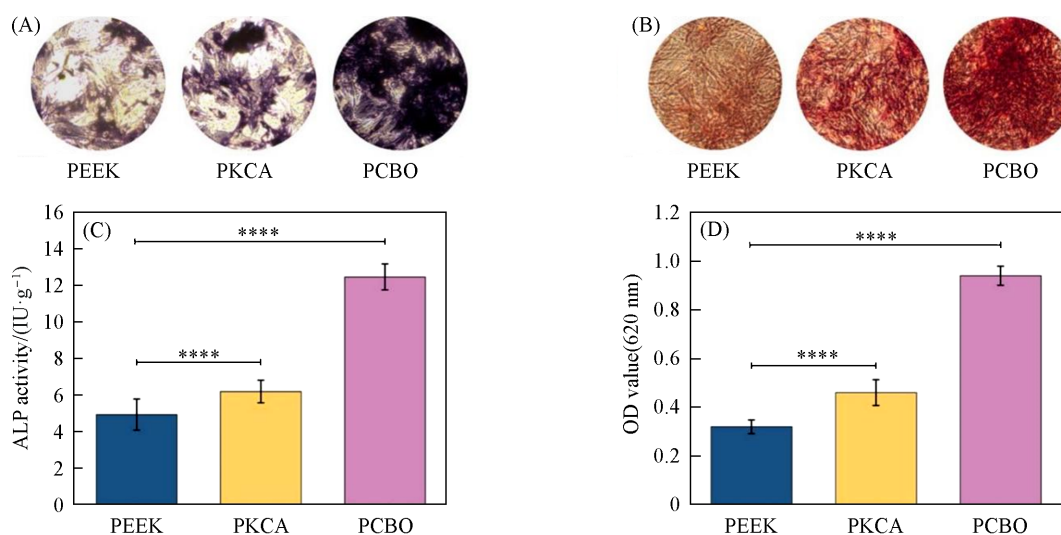


Fig. 8 Views of ALP staining(A) and ARS staining(B), quantitative evaluation of ALP activity(C) and calcium module formation(D) of BMSC after culturing on PEEK, PKCA and PCBO for 14 d(A, C) and 21 d (B, D)

(C, D) Error bars represent standard deviation ($n=3$); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs. PEEK group.

Wang 等^[30]发现压电效应能够促进细胞响应(如黏附、增殖和分化). 此外, 材料的表面性能(比如粗糙度、水接触及表面能)显著地影响细胞行为^[31]. 与 PEEK 和 PKCA 相比, PCBO 的表面性能和压电性能都显著提高, 因此, PCBO 的表面性能和压电效应协同作用促进了成骨细胞分化. 另外, 压电材料产生电信号刺激 M2 巨噬细胞, 触发抗炎因子的选择性表达和分泌, 调节局部免疫微环境, 也是协同促进成骨分化的关键因素^[32]. 压电材料通过能量代谢方式调控巨噬细胞极化, 促进成骨细胞分化, 为骨再生修复提供了一个新策略^[16].

3 结 论

通过超声剥离法制备了 BiO_{2-x} , 由于氧空位引起晶格畸变, 其压电性能得到提高; 通过绿原酸将 BiO_{2-x} 负载在 PEEK 纤维表面, 设计了一种具有压电效应的肩袖补片材料(PCBO). 结果表明, 负载 BiO_{2-x} 后, PCBO 的表面性能(如形貌, 粗糙度、亲水性和表面能)显著改善, 并具有压电性能. PCBO 的压电效应诱导 M2 巨噬细胞极化, 促进了抗炎相关基因表达和抗炎因子分泌. 另外, PCBO 的压电效应显著地促进了成骨细胞的黏附、增殖和成骨分化. 因此, PCBO 的表面性能和压电效应协同作用促进了成骨相关细胞的响应, 在肩袖组织修复方面具有潜在的应用前景.

参 考 文 献

- [1] Jiang X. P., Wu S. H., Kuss M., Kong Y. F., Shi W., Streubel P. N., Li T. S., Duan B., *Bioact. Mater.*, **2020**, 5(3), 636—643
- [2] Chen C., Zhu J., Chen J., Yu F., Huang K., Jiang, J., Zhu T., Mo X., Zhao J., *Mater. Today Chem.*, **2022**, 23, 100655
- [3] Yu C. X., Feng S. J., Li Y. X., Chen J., *Macromol. Biosci.*, **2023**, 23(12), 2300259
- [4] Han F., Li T., Li M. M., Zhang B. J., Wang Y. F., Zhu Y. F., Wu C. T., *Bioact. Mater.*, **2023**, 20, 29—40
- [5] Chen Z. Y., Chen Y., Ding J. D., Yu L., *Compos. Part B-Eng.*, **2023**, 250, 110427
- [6] Wang C. L., Luan J. S., Xu Z. P., Zhao W. Y., Zhang M., *High Perform. Polym.*, **2018**, 30(7), 794—802
- [7] Wang F., Wang M. Y., He Q. S., Wang X. H., Sun P., Ji Y. J., Niu Y. F., Li F. Q., Wei J., *J. Mater. Sci. Technol.*, **2023**, 133, 195—208
- [8] Kapat K., Shubhra Q. T. H., Zhou M., Leeuwenburgh S., *Adv. Funct. Mater.*, **2020**, 30(44), 1909045

- [9] Liu W. W., Li X. K., Jiao Y. L., Wu C., Guo S., Xiao X., Wei X. H., Wu J., Gao P., Wang N., Lu Y. J., Tang Z., Zhao Q. M., Zhang J. S., Tang Y. F., Shi L., Guo Z., *ACS Appl. Mater. Inter.*, **2020**, *12*(46), 51885—51903
- [10] Liu J., Cheng Y. Y., Wang H. Y., Yang D. Y., Liu C. S., Dou W. X., Jiang X., Deng H. Z., Yang R. S., *Nano Energy*, **2023**, *115*, 108742
- [11] Liu X., Wan X. Y., Sui B. Y., Hu Q. H., Liu Z. R., Ding T. T., Zhao J., Chen Y. X., Wang Z. L., Li L. L., *Bioact. Mater.*, **2024**, *35*, 346—361
- [12] Wu J. N., Jiao C., Yu H. J., Naqvi S. M. R., Ge M. X., Cai K. Z., Liang H. X., Liu J., Zhao J. F., Tian Z. J., Wang D. S., Shen L. D., *Mat. Sci. Eng. C-Mater.*, **2024**, *158*, 213783
- [13] Donate R., Paz R., Moriche R., Sayagués M. J., Alemán-Domínguez M. E., Monzón M., *Mater. Design*, **2023**, *231*, 112085
- [14] Chen A. N., Su J., Li Y. J., Zhang H. B., Shi Y. S., Yan C. Z., Lu J., *Int. J. Extreme Manuf.*, **2023**, *5*(3), 032007
- [15] Li Z. X., He D. Q., Guo B. W., Wang Z. K., Yu H. J., Wang Y., Jin S. S., Yu M., Zhu L. S., Chen L. Y., Ding C. Y., Wu X. L., Wu T. H., Gong S. Q., Mao J., Zhou Y. H., Luo D., Liu Y., *Nat. Commun.*, **2023**, *14*(1), 6963
- [16] Wu H., Dong H., Tang Z., Chen Y., Liu Y. C., Wang M., Wei X. H., Wang N., Bao S. S., Yu D. M., Wu Z. G., Yang Z. D., Li X. K., Guo Z., Shi L., *Biomaterials*, **2023**, *293*, 121990
- [17] Jiang X. F., Wang J. Y., Li L. X., Bodjrenou D. M., Lu X., Zheng B. D., *Food Hydrocolloid*, **2023**, *144*, 108925
- [18] Yang Q. Q., Hu J. C., Fang Y. W., Jia Y. Y., Yang R., Deng S. Q., Lu Y., Dieguez O., Fan L. L., Zheng D. X., Zhang X. X., Dong Y. Q., Luo Z. L., Wang Z., Wang H. H., Sui M. L., Xing X. R., Chen J., Tian J. J., Zhang L. X., *Science*, **2023**, *379*(6638), 1218—1224
- [19] Yang L., Tian B. S., Xie Y., Dong S. M., Yang M. Q., Gai S. L., Lin J., *Adv. Mater.*, **2023**, *35*(29), 2300648
- [20] Liu H. M., Cheng R., Dong X. H., Zhu S., Zhou R. Y., Yan L., Zhang C. Y., Wang Q., Gu Z. J., Zhao Y. L., *Inorg. Chem.*, **2020**, *59*(6), 3482—3493
- [21] Hu X. Y., Wang J. T., Wang J., Deng Y., Zhang H. D., Xu T., Wang W. L., *Appl. Catal. B-Environ.*, **2022**, *318*, 121879
- [22] Zhao Y., Zhu Y. M., Zhu J. P., Wang H. L., Ma Z., Gao L. H., Liu Y. B., Yang K. J., Shu Y. C., He J. L., *J. Mater. Sci. Technol.*, **2022**, *104*, 172—182
- [23] Rui L. Y., Xie M. H., Hu B., Zhou L., Saeeduddin M., Zeng X. X., *Carbohydr. Polym.*, **2017**, *170*, 206—216
- [24] Liu W. J., Li Y. Y., Ding X. T., *Biofabrication*, **2017**, *9*(2), 025006
- [25] Zou Q. Y., Zhou Q., Liu L. L., Dai H. L., *Polymers*, **2016**, *8*(12), 441
- [26] Damaraju S. M., Shen Y. Y., Elele E., Khusid B., Eshghinejad A., Li J. Y., Jaffe M., Arinzeh T. L., *Biomaterials*, **2017**, *149*, 51—62
- [27] Sun L., Chen X. Z., Ma K., Chen R. G., Mao Y., Chao R., Wang H., Yu B., Wang J. F., Zhang S. Y., *Adv. Healthc. Mater.*, **2023**, *12*(11), 2202620
- [28] Maharjan B., Park J., Kaliannagounder V. K., Awasthi G. P., Joshi M. K., Park C. H., Kim C. S., *Carbohydr. Polym.*, **2021**, *251*, 117023
- [29] Zhou Y., Wang X. L., Yi B. C., Yu Z. P., Yang S. Y., Shen Y. B., Zhang Y. Z., *Chem. J. Chinese Universities*, **2018**, *39*(7), 1554—1563(周颖, 王先流, 易兵成, 余哲泡, 杨上莹, 沈炎冰, 张彦中. 高等学校化学学报, **2018**, *39*(7), 1554—1563)
- [30] Zhang Y. M., Dai Y. J., Hao W. L., Zhu S. M., Wang C. Y., Wang R., Gou X., *Appl. Mater. Today*, **2024**, *36*, 102026
- [31] Wang Y. F., Yu Z., Li K. M., Hu J., *Mat. Sci. Eng. C-Mater.*, **2021**, *128*, 112349
- [32] Sun J. W., Zhang J. Y., Yang L. A., Zhang C. C., Wang Y. F., Lei H. Q., Wo K. Q., Fan W. J., Zhao B. Y., Wang J. Y., Shi Y. S., Luo Z. Q., Su B., Song J. L., Chu Y. Y., Chen L. L., *Chem. Eng. J.*, **2024**, *480*, 147931

(Ed.: W, K, M)