

# 聚己内酯—聚乙二醇—血小板浓缩生长因子复合支架的制备及其对人牙周膜干细胞生物学特性的影响

高丽<sup>1,2</sup> 赵明月<sup>1,2</sup> 杨顺<sup>1</sup> 王茹楠<sup>1</sup> 程佳佳<sup>1,2</sup> 陈广生<sup>1,2</sup>

1. 遵义医科大学口腔医学院, 遵义 563099; 2. 遵义医科大学附属口腔医院牙周科, 遵义 563099

**[摘要]** **目的** 探究负载了血小板浓缩生长因子 (CGF) 的聚己内酯 (PCL) —聚乙二醇 (PEG) 支架对人牙周膜干细胞 (hPDLSCs) 黏附、增殖及成骨分化能力的影响。**方法** 通过浸入及冻干法制备 PCL-PEG-CGF 复合支架, 观察复合支架的显微结构并检测其机械性能及生物相容性。酶消化法培养 hPDLSCs, 并通过流式细胞术鉴定 hPDLSCs。选取第三代 hPDLSCs, 分别通过 CCK-8 实验、4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 染色、碱性磷酸酶 (ALP) 染色、茜素红染色及 Western blot 实验检测 PCL-PEG-CGF 复合支架对 hPDLSCs 黏附、增殖及成骨分化能力的影响及成骨相关蛋白 [Runx 相关转录因子 2 (Runx2)、ALP、骨形态发生蛋白 2 (BMP2)] 的表达情况。**结果** PCL-PEG-CGF 复合支架在扫描电镜下呈孔隙大小不等的蜂窝状结构, 其亲水性 6 s 时  $\theta$  角接近  $0^\circ$ , 弹性模量为  $(4.590 0 \pm 0.149 3)$  MPa, 其亲水性、断裂拉伸强度及断裂延伸率均与 PCL-PEG 支架相似; hPDLSCs 在 PCL-PEG-CGF 复合支架上的黏附能力明显优于 PCL-PEG 支架 ( $P < 0.01$ ), 与对照组相比, 第 3、5、7 天时各实验组的 hPDLSCs 增殖速率显著增加 ( $P < 0.01$ ), 且 PCL-PEG-CGF 复合支架与其余组间差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); PCL-PEG-CGF 复合支架组 ALP 活性明显升高 ( $P < 0.05$ ), 矿化结节数量明显增加及成骨相关蛋白 (Runx2、BMP2、ALP) 的表达均明显增强 ( $P < 0.05$ )。**结论** PCL-PEG-CGF 复合支架具有较好的机械性能及生物相容性, 可促进 hPDLSCs 黏附及增殖, 并通过增强成骨相关蛋白的表达促进 hPDLSCs 的成骨分化能力。

**[关键词]** 血小板浓缩生长因子; 聚己内酯—聚乙二醇—血小板浓缩生长因子复合支架; 聚己内酯—聚乙二醇支架; 人牙周膜干细胞; 细胞增殖; 成骨分化

**[中图分类号]** R781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2025.2025044



本文链接 开放科学标识码

## Preparation of polycaprolactone-polyethylene glycol-concentrated growth factor composite scaffolds and the effects on the biological properties of human periodontal ligament stem cells

Gao Li<sup>1,2</sup>, Zhao Mingyue<sup>1,2</sup>, Yang Shun<sup>1</sup>, Wang Runan<sup>1</sup>, Cheng Jiajia<sup>1,2</sup>, Chen Guangsheng<sup>1,2</sup>

1. School of Stomatology, Zunyi Medical University, Zunyi 563099, China; 2. Dept. of Periodontology, Affiliated Stomatological Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563099, China

Supported by: Science and Technology Fund Project of Guizhou Provincial Health and Health Commission (gzkj2023-202); National Natural Science Foundation of China (82060204); Science and Technology Department of Guizhou Province (ZK[2021]437)

Correspondence: Gao Li, E-mail: 467278759@qq.com

**[Abstract]** **Objective** This study investigated the effects of a polycaprolactone (PCL)-polyethylene glycol (PEG) scaffold incorporated with concentrated growth factor (CGF) on the adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs). **Methods** The PCL-PEG-CGF composite scaffold was fabricated using an immersion and freeze-drying technique. Its microstructure, mechanical proper-

**[收稿日期]** 2025-02-06; **[修回日期]** 2025-06-02

**[基金项目]** 贵州省卫健委科学技术基金 (gzwkj2023-202); 国家自然科学基金 (82060204); 贵州省科技计划项目 [基金黔科合基础—ZK (2021) 一般 437]

**[第一作者]** 高丽, 副教授, 硕士, E-mail: 467278759@qq.com

**[通信作者]** 高丽, 副教授, 硕士, E-mail: 467278759@qq.com

ties, and biocompatibility were systematically characterized. The hPDLSCs were isolated through enzymatic digestion, and the hPDLSCs were identified through flow cytometry. Third-passage hPDLSCs were seeded onto the composite scaffolds, and their adhesion, proliferation and osteogenic differentiation were assessed using CCK-8 assays, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, alkaline phosphatase (ALP) staining, alizarin red staining, and Western blot analysis of osteogenesis-related proteins [Runx2, ALP, and morphogenetic protein 2 (BMP2)].

**Results** Scanning electron microscopy revealed that the PCL-PEG-CGF composite scaffold exhibited a honeycomb-like structure with heterogeneous pore sizes. The composite scaffold exhibited excellent hydrophilicity, as evidenced by a contact angle ( $\theta$ ) approaching  $0^\circ$  within 6 s. Its elastic modulus was measured at  $(4.590 \pm 0.149 \text{ 3}) \text{ MPa}$ , with comparable hydrophilicity, fracture tensile strength, and fracture elongation to PCL-PEG scaffold. The hPDLSCs exhibited significantly improved adhesion to the PCL-PEG-CGF composite scaffold compared with the PCL-PEG scaffold ( $P < 0.01$ ). Additionally, cell proliferation was markedly improved in all the experimental groups on days 3, 5, and 7 ( $P < 0.01$ ), and statistically significant differences were found between the PCL-PEG-CGF group and other groups ( $P < 0.01$ ). The PCL-PEG-CGF group showed significantly elevated ALP activity ( $P < 0.05$ ), increased mineralization nodule formation, and upregulated expression of osteogenic-related proteins (Runx2, BMP2 and ALP;  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The PCL-PEG-CGF composite scaffold exhibited excellent mechanical properties and biocompatibility, enhancing the adhesion and proliferation of hPDLSCs and promoting their osteogenic differentiation by upregulating osteogenic-related proteins.

**[Key words]** concentrated growth factor; polycaprolactone-polyethylene glycol-concentrated growth factor composite scaffold; polycaprolactone-polyethylene glycol scaffold; human periodontal ligament stem cells; cell proliferation; osteogenic differentiation

牙周病是导致成年人牙齿丧失的首要原因, 其治疗核心在于牙周组织的再生或修复, 其最终目标在于实现牙周膜、牙骨质及牙槽骨的功能性再生。依赖传统的治疗方法通常难以实现复杂牙周结构的重建, 牙周组织工程学是将细胞生物学、发育生物学和生物材料学的知识与牙周临床转化的目的相结合, 通过四大基本要素的相互作用(多向分化潜能的干细胞群、支撑作用的支架/基质材料、调控细胞和基因表达的生长因子和新的血运循环)构建“组织工程化基质或结构”来实现牙周组织的重建和再生修复<sup>[1-5]</sup>。支架材料在牙周组织工程学中具有举足轻重的作用, 近年来研究者聚焦于优化支架材料的性能, 使其具有更好的机械性能、生物相容性和生物活性; 其中, 天然可降解支架材料因其优越的生物相容性和生物活性已广泛应用于研究中<sup>[6]</sup>。目前用于口腔支架材料研发的可生物降解合成聚合物主要是聚己内酯(polycaprolactone, PCL)及其共聚物, 因PCL为疏水性材料且缺乏生物活性, 不利于细胞的黏附、增殖及分化<sup>[7]</sup>。将PCL与亲水性较好的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)共轭形成聚合物支架(PCL-PEG支架)<sup>[8]</sup>可改善材料的亲水性, 而血小板通过调节二者比例可控制材料的降解速度及机械强度<sup>[9]</sup>, 但缺乏生物活性信号<sup>[10]</sup>。血小板浓缩生长因子(concentrated growth factor, CGF)富含多

种生长因子, 且具有3D纤维蛋白网格, 其中生长因子彼此紧密结合, 在一定的空间内可以缓慢释放生长因子, 具有一定的生物活性, 可促进人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs)的增殖及分化<sup>[11]</sup>; 但单独用于牙周组织再生治疗却因容易降解, 缺乏屏障膜支持而不利功能化牙周结构的重建。本研究拟通过调节PCL/PEG比例制备PCL-PEG支架并检测其表征, 并将CGF负载于PCL-PEG复合纳米纤维上构建一种新型的复合支架, 探索该复合支架对hPDLSCs黏附、增殖及成骨分化的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂

0.25%胰蛋白酶、青霉素—链霉素混合液、Triton X-100、胶原酶I型、阿利新蓝染色液、BCA试剂盒、高效RIPA裂解液(北京索莱宝科技有限公司); 胎牛血清(Gbico公司, 美国); PCL、PEG(北京化学试剂公司); 茜素红染色液(广州赛业生物科技有限公司); 成脂诱导分化培养基(普诺赛, 上海经科化学科技有限公司); CCK-8试剂盒[亚科因(武汉)生物技术有限公司]; COL1抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);

碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2) 抗体 (杭州华安生物技术有限公司)。

### 1.1.2 仪器

静电纺丝仪 (青岛盘丝科技有限公司); CGF 离心机 (Medifuge 200, SILFRADENT SRL, 意大利); 扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) (Sigma 公司, 德国); 冷冻干燥机 (Thermo 公司, 美国); 相差显微镜 (Olympus 公司, 日本); 水浴恒温振荡器 (上海智城分析仪器制造有限公司); 细胞计数仪 [艾力特生物科技 (上海) 有限公司]; 流式细胞仪 (Beckman 公司, 美国); 凝胶成像系统 (BIO-RAD 公司, 美国); 磁力搅拌器 (上海梅颖谱有限公司)。

### 1.1.3 牙周膜及 CGF 样本来源

收集就诊于遵义医科大学附属口腔医院口腔颌面外科的 25 岁以下健康人群因正畸需要拔除的第一、第二前磨牙或牙周健康、牙根完整的第三磨牙; 同时抽取肘静脉全血 10 mL。该研究经过遵义医科大学附属口腔医院医学伦理委员会审查 (YJSKTLS-2021-2022-018H), 患者知情同意并签署相关知情同意书, 符合相关的伦理要求。

### 1.2 酶解组织块法及有限稀释法克隆纯化获取 hP-DLSCs

生理盐水反复冲洗拔除的离体牙后再用含有 2% 青霉素-链霉素的 PBS 液自根部至冠方冲洗 10 次, 刮取根中 1/3 牙周膜组织并收集于 10 mL 离心管内, 加入 I 型胶原蛋白水解酶、37 °C 温水浴摇床下持续 30 min, 加入等体积含有 10% FBS+2% 青霉素-链霉素-两性霉素 B 的  $\alpha$ -MEM, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 再加入 10% FBS+2% 青霉素-链霉素-两性霉素 B 的  $\alpha$ -MEM, 均匀吹打后移入 T75 专用瓶, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温箱培养, 每 3 d 换培养液, 当细胞扩增至 90% 时, 以 1:3 进行传代, 取 P3 代细胞用于后续实验。

### 1.3 流式细胞术鉴定 hPDLSCs

取 P3 代 hPDLSCs, 0.25% 胰酶 2 min 后加入等量完全培养基, 800 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤, 再次离心, 调整浓度为每毫升  $2 \times 10^6$  个, 分别接种于预先含有鼠抗人单克隆抗体 (CD90、CD73、CD44、CD105) 以及阴性对照混合液 CD19/CD34/CD11b/CD45/HLADR 的离心管内, 涡旋, 避光条件下孵育 30 min, 加入洗涤液, 1 000 r/min 离心 6 min, 弃上清, 再次离心, 加入 PBS 重悬上机检测。

### 1.4 负载 CGF 的 PCL-PEG 支架的制备

#### 1.4.1 PCL-PEG 纳米纤维的制备及形态观察

在室温条件下, 分别称取 2 g PEG、1.62 g Sn (Oct)<sub>2</sub> 混和搅拌均匀放入干燥烧瓶中, 加入甲苯同时升高温度并回流 2 h, 减压除去溶剂甲苯, 最后加入 2.48 g PCL, 120 °C 下反应 24 h。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶解产物, 冰冻乙醚沉淀、过滤并烘干, 获得 4.30 g PCL-PEG 聚合物, 8 mL 有机溶剂 (乙醇: 六氟异丙醇=1:4) 溶解 PCL-PEG 聚合物并将其吸入 10 mL 注射器内, 静电纺丝机设定接收距离为 20 cm、电压 12 kV、推进速度 2 mL/h, 铝箔纸收集的定向电纺纳米纤维网厚度为 100  $\mu$ m, 多次折叠直至静电纺丝纤维达到实验要求 (厚度为 0.30 mm) 后, 将静电纺丝纤维放入 37 °C 烘箱中干燥 48 h 去除溶剂, 保存备用。

#### 1.4.2 CGF 提取液的制备

将收集的静脉血采用 Medifuge 200 离心机离心, 设定 CGF 离心程序离心 13 min, 获得的血浆制品分为 3 层 (最上层为贫血小板血浆层, 中间 CGF 凝胶层, 底层为血小板及红细胞等), 取中间层及与下层交界区域的 CGF, 分装收集至无菌冻存管, 封口膜密封, 即刻液氮冰冻 8 min, 置于 37 °C 水浴融化 8 min, 重复 4 次, 转移至 10 mL 离心管, 室温下静置 70 min 后, 3 000 r/min 离心 25 min, 收集上清液 1 mL, 0.22  $\mu$ m 滤器滤过除菌后, 即为 100% CGF 提取液。-80 °C 冷冻干燥 36 h。

#### 1.4.3 负载 CGF 的 PCL-PEG 支架的制备

将 PCL-PEG 支架裁剪为直径为 15 mm 的圆盘, 使其形状适合平铺于 12 孔四氟乙烯细胞播种板, 65 °C (PCL 的熔化温度) 下蜂窝化 5 min, 储存在干燥容器中备用。裁剪 PCL-PEG 支架为 1 cm<sup>2</sup> 的圆盘, PBS 洗涤 5 次后将圆盘浸入 1 mL 体积浓度为 10% CGF 液中, 4 °C 浸泡 4 h, 转移至 24 孔板, 冻干机冻干 12 h, -80 °C 保存。后续实验中负载 10% CGF 的 PCL-PEG 称为 PCL-PEG-CGF 复合支架。

### 1.5 PCL-PEG 支架与 PCL-PEG-CGF 复合支架的机械性能及生物相容性的检测

#### 1.5.1 微观结构

将 2 种支架裁剪成 2 cm $\times$ 2 cm 大小, 表面喷金 150 s, SEM 观察 2 种支架的微观结构。

#### 1.5.2 亲水性检测

将 2 种支架裁剪成 2 cm $\times$ 2 cm 大小, 各取 3 个样本进行测量, 在支架上滴去离子水, DSA10 型接触角测量仪测量角度值。

### 1.5.3 弹性模量检测

将2种支架裁剪成9.0 mm×4.0 mm大小,固定于万能力学测量仪上,设定拉伸力为55 N、拉伸速度为1 mm/min对纤维膜进行拉伸直到断裂,重复3次。

### 1.5.4 生物相容性

取P3代hPDLSCs,并调整细胞浓度为每毫升 $2\times 10^3$ 个,分别接种于200  $\mu$ L铺好PCL-PEG-CGF与PCL-PEG静电纺丝纳米纤维膜的96孔板中,置于恒温孵箱内进行培养,每3 d换1次培养基,3 d后取出96孔板,无菌PBS清洗3次,4%多聚甲醛固定30 min,无菌PBS冲洗,加入适量4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色液避光染色10 min,置于倒置荧光显微镜下观察,并拍照。

### 1.6 hPDLSCs在PCL-PEG-CGF复合支架上的黏附能力及生长情况

实验分为PCL-PEG支架组和PCL-PEG-CGF复合支架组。根据实验需要将2种支架分别裁剪成相应培养板板底大小的圆盘形状,将支架的正反面分别在紫外灯下照射3 h, PBS冲洗3次,用无菌钢环固定支架,置于含有2%双抗无菌培养皿中浸泡5 min,无菌PBS冲洗3次。然后将2种支架分别放入24孔培养板内,每组设3个复孔,取P3代hPDLSCs并调整细胞浓度为每毫升 $2\times 10^5$ 个,每孔分别接种400  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>恒温孵箱内培养,每24 h换1次培养液,第3天取出培养板, PBS冲洗3次后进行后续实验。

#### 1.6.1 DAPI染色实验

4%多聚甲醛固定0.5 h, PBS冲洗3次,加入适量DAPI染色液避光染色10 min,弃掉染液,无菌PBS冲洗3次,将支架分别置于倒置荧光显微镜下观察拍照并随机各取3个视野计细胞数。

#### 1.6.2 SEM观察支架上细胞的生长情况

将培养板内PCL-PEG纳米纤维转移至戊二醛溶液中,室温固定2 h, PBS清洗,乙醇梯度脱水,冷冻干燥后将2组支架分别黏于胶托上,真空喷金处理, SEM观察。

### 1.7 PCL-PEG-CGF复合支架对hPDLSCs增殖能力的影响

实验分为对照组(仅加入培养液)、10%CGF组、PCL-PEG支架组、PCL-PEG-CGF复合支架组。PCL-PEG支架组和PCL-PEG-CGF复合支架组支架处理方法同1.6。取P3代hPDLSCs以每孔 $2.0\times 10^3$ 个按实验分组分别接种于96孔板内,每组

设3个复孔, 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>孵箱培养,每3 d更换培养液,分别于第1、3、5、7天取出96孔板,弃培养基, PBS冲洗3次,每孔分别加入15  $\mu$ L CCK-8液和185  $\mu$ L 10%完全培养液,恒温孵箱内避光孵育2 h,置于450 nm酶标仪检测光密度(optical density, OD)值并记录,每天依此类推,制作细胞的生长条形图。

### 1.8 PCL-PEG-CGF复合支架对hPDLSCs成骨分化能力的检测

实验分组同1.7。取P3代hPDLSCs,调整细胞浓度为每毫升 $1.5\times 10^5$ 个,按实验分组接种于12孔板中, 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>温箱中培养。48 h后,更换培养基为成骨诱导培养基,3 d换一次成骨诱导液。然后进行以下实验。

#### 1.8.1 ALP染色

成骨诱导到第7天,弃成骨诱导液, PBS清洗3次,4%多聚甲醛浸润固定细胞45 min, PBS轻轻清洗3次,按说明书配置ALP试剂A液:B液=2:1。染色90 min,超纯水漂洗3~4次,体式显微镜拍照,倒置显微镜观察比较细胞染色情况;采用ALP试剂盒检测ALP活性,重复3次。

#### 1.8.2 茜素红染色

成骨诱导培养到第21天,弃成骨诱导液, PBS清洗3次,4%多聚甲醛浸润固定45 min, PBS轻轻清洗3次,各加入1 mL茜素红试剂,置于37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>温箱孵育3 h,超纯水清洗,倒置显微镜观察,重复3次。

#### 1.8.3 Western blot检测成骨相关基因的表达

成骨诱导7 d后, PBS冲洗,加入RIPA+PM-SF+蛋白磷酸酶抑制剂(100:1:1)混合液,低温高速离心5 min,吸收上清,采用BCA法测定蛋白浓度,通过凝胶电泳分离传递膜,并在脱脂牛奶中密封2 h。加入一抗工作介质,18 h后用TBST洗涤,加入二抗室孵育40 min, Western HRP发光底物暴露,以磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参,检测ALP、骨形态发生蛋白2(morphogenetic protein 2, BMP2)及成骨相关基因Runx2的表达情况,以上实验重复3次,采用ImageJ图像处理软件对实验结果进行灰度值的相对定量分析。

### 1.9 统计学分析

采用SPSS 29.0软件进行统计学分析, Graph-Pad Prism 9.5.0软件进行绘图,计量资料先进行正态分布检验,然后采用独立样本t检验; CCK-8采用多因素方差分析;其余数据采用单因素方差分

析,进一步组间比较时,方差齐选用LSD检验,方差不齐选用塔姆黑尼检验。 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

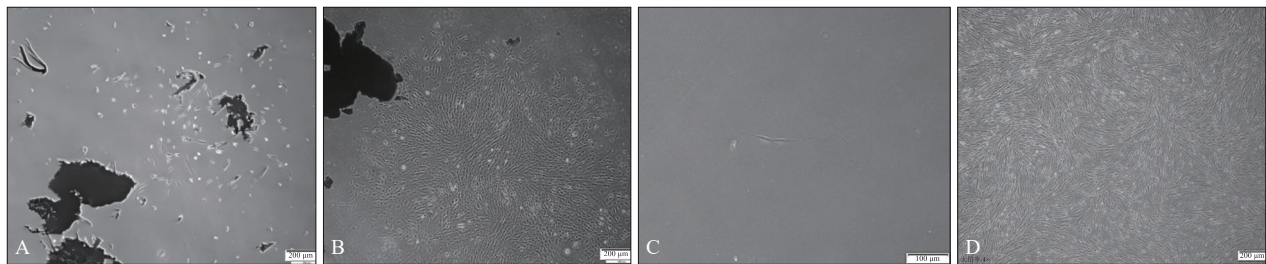
### 2.1 hPDLSCs的培养及传代

原代细胞(图1A)自组织块边缘爬出,呈点状或多边形,培养至3d后,hPDLSCs表现出漩涡状生长,细胞呈梭形(图1B)。接种于12孔板12h后挑选标记单个贴壁细胞(图1C);8~10d后

单个hPDLSCs克隆成簇的细胞集落,细胞呈短梭形或多角形,贴壁、快速生长(图1D)。

### 2.2 流式细胞术鉴定hPDLSCs

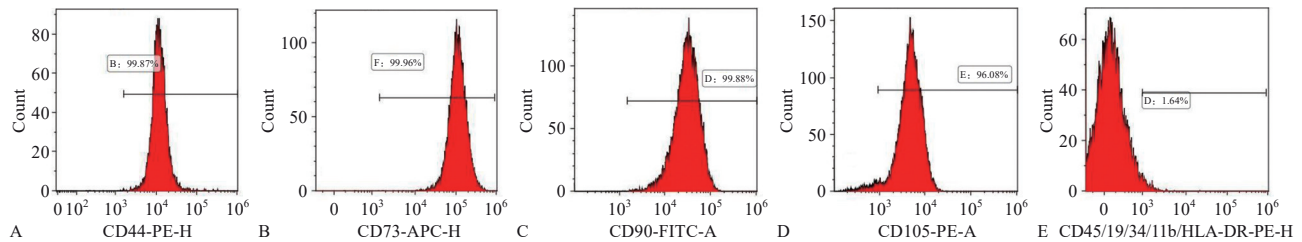
流式细胞仪检测结果显示细胞表面标志物CD44、CD73、CD90、CD105的表达率分别为99.87%、99.96%、99.88%、96.08%,CD45、CD19、CD34、CD11b、HLA-DR为阴性表达(图2),表明本实验所培养的细胞符合间充质干细胞相关表型特征,结合取材部位及流式细胞术结果可确认为hPDLSCs来源。



A、B: hPDLSCs的原代培养; C、D: 有限稀释法克隆纯化hPDLSCs及传代。

图1 显微镜下原代及传代的hPDLSCs

Fig 1 Primary and subcultures of hPDLSCs under the microscope



A: CD44; B: CD73; C: CD90; D: CD105; E: CD45/CD19/CD34/CD11b/HLA-DR。

图2 流式细胞仪检测hPDLSCs相关表型分子的表达

Fig 2 Expression of the relevant phenotypic molecules of hPDLSCs was determined by flow cytometry

### 2.3 PCL-PEG-CGF复合支架的形态特征

SEM下PCL-PEG支架呈纵横交错排列的“渔网状”结构(图3A),粗细及孔隙大小不等;PCL-PEG-CGF复合支架的形态为粗细、孔隙大小不等的蜂窝状结构(图3B),这可能是因为负载了CGF后导致其微观结构发生改变。

### 2.4 PCL-PEG支架与PCL-PEG-CGF复合支架的机械性能及生物学性能

#### 2.4.1 亲水性检测结果

2种支架6s时 $\theta$ 角均接近 $0^\circ$ (图4),接近完全亲水,表明2种支架均具有良好的亲水性能。

#### 2.4.2 PCL-PEG支架与PCL-PEG-CGF复合支架的应力-应变检测

2种支架的力学性能检测结果见表1及图5。2

种支架的断裂拉伸强度及断裂延伸率均无明显差异( $P>0.05$ ),PCL-PEG-CGF复合支架的杨氏弹性模量小于PCL-PEG支架( $P<0.05$ ),表明经10%CGF处理后的PCL-PEG支架的拉伸强度未发生明显变化,但其杨氏弹性模量即支架材料抵抗形变的能力有一定减弱。

### 2.5 hPDLSCs在PCL-PEG-CGF复合支架上的黏附能力及生长情况

经DAPI染色后,荧光显微镜下可见PCL-PEG-CGF复合支架上的hPDLSCs细胞核数量明显较PCL-PEG支架上多(图6A、B),差异具有统计学意义( $P<0.01$ )(图6C),表明hPDLSCs在PCL-PEG-CGF复合支架上的黏附能力明显强于PCL-PEG支架。SEM下hPDLSCs部分或完全嵌入支架

孔隙内生长，且PCL-PEG-CGF复合支架上的hPDLSCs较PCL-PEG支架上多，因受支架孔径影响，故细胞形态的延展性不够(图7)。2种支架微观结构均从“鱼网状”变成“多孔状”结构，这可能由PCL-PEG静电纺丝纳米纤维在乙醇梯度脱水过程中部分纤维溶解导致(图7)。

2.6 PCL-PEG-CGF复合支架对hPDLSCs增殖能力的影响

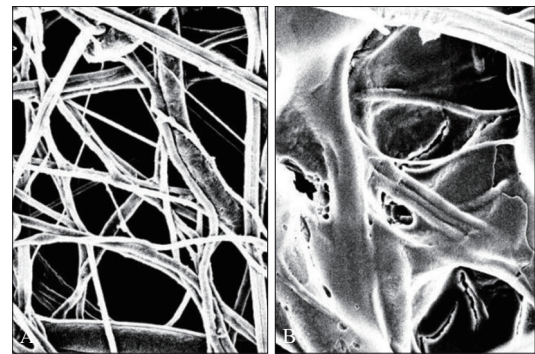
第1天时组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )，第3、5、7天时组间比较各组OD值差异均有统计学意义( $P<0.01$ )(图8)，提示CGF、PCL-PEG对hPDLSCs的增殖均有促进作用，且二者联合制备的复合支架可显著促进hPDLSCs的增殖。

2.7 PCL-PEG-CGF复合支架对hPDLSCs成骨分化能力的影响及成骨相关基因的表达情况

2.7.1 ALP染色

hPDLSCs成骨诱导培养到第7天后，可见PCL-PEG支架组及对照组染色最浅，且PCL-PEG

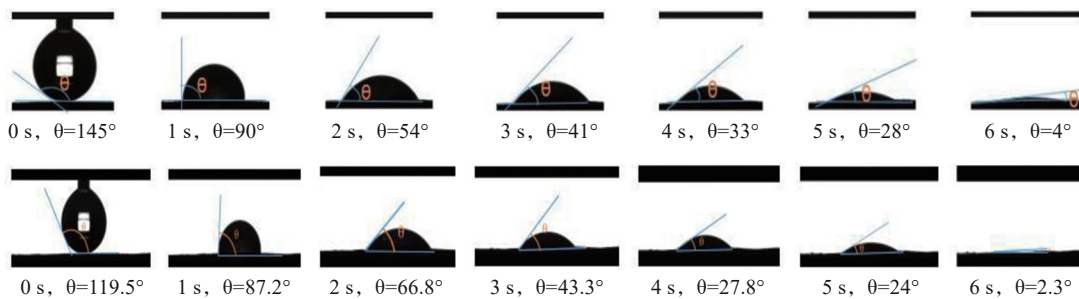
支架组与对照组间相比差异无统计学意义，PCL-PEG-CGF复合支架组染色最深，组间差异有统计学意义( $P<0.01$ )(图9)，表明PCL-PEG-CGF复合支架可促进hPDLSCs的早期成骨分化能力。



A: PCL-PEG 支架; B: PCL-PEG-CGF 复合支架。

图3 PCL-PEG 支架与PCL-PEG-CGF 复合支架的结构特征 SEM  $\times 5 \mu\text{m}$

Fig 3 Structural features of the PCL-PEG scaffold and the PCL-PEG-CGF composite scaffold under SEM  $\times 5 \mu\text{m}$



上: PCL-PEG 支架; 下: PCL-PEG-CGF 复合支架。

图4 PCL-PEG 支架与PCL-PEG-CGF 复合支架的亲水性检测

Fig 4 Hydrophilicity detection of the PCL-PEG scaffold and the PCL-PEG-CGF composite scaffold

表1 PCL-PEG 支架与PCL-PEG-CGF 复合支架的力学性能

Tab 1 Mechanical properties of the PCL-PEG scaffold and the PCL-PEG-CGF composite scaffold

项目	PCL-PEG 支架	PCL-PEG-CGF 复合支架	$P$ 值
断裂拉伸强度	4.573 3±0.105 0	4.440 0±0.115 3	0.213
断裂延伸率	123.333 3±0.577 4	124.000 0±1.000 0	0.374
杨氏弹性模量	5.270 0±0.111 4	4.590 0±0.149 3	0.003*

注: \* $P<0.05$ 。

2.7.2 茜素红染色

hPDLSCs成骨诱导培养到第21天后，倒置相差显微镜下可见PCL-PEG-CGF复合支架组结节最多，10%CGF组次之，PCL-PEG支架组及对照组矿化结节最少，着色不明显(图10)，表明CGF能

促进hPDLSCs的矿化能力。

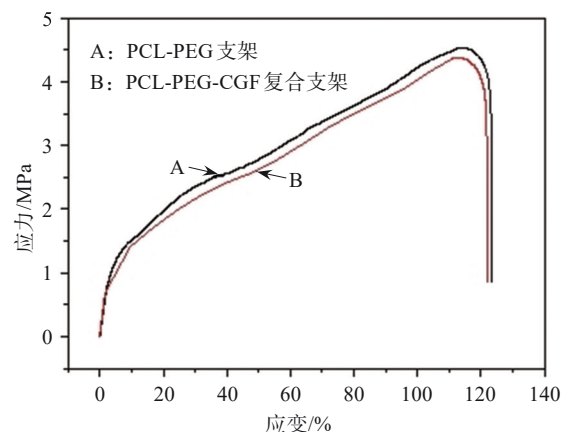
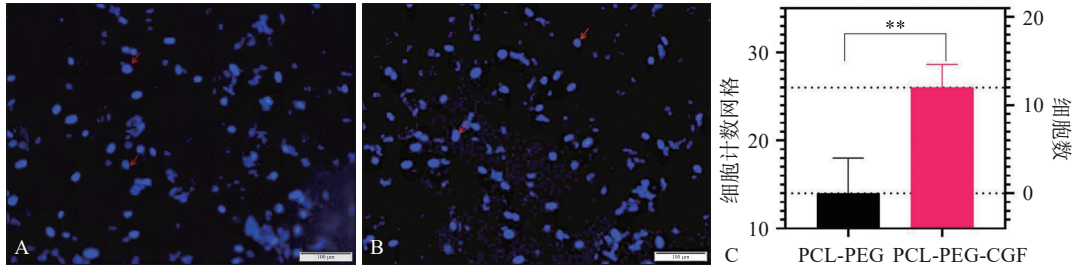


图5 PCL-PEG 支架与PCL-PEG-CGF 复合支架的应力-应变检测

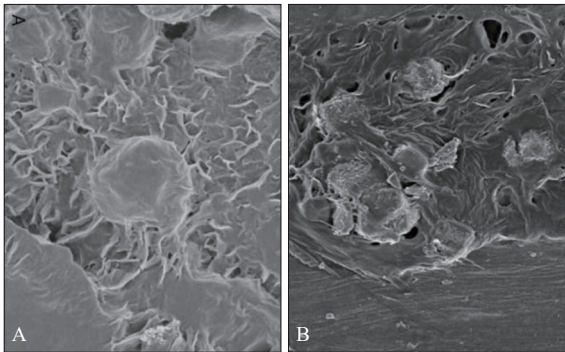
Fig 5 Stress-strain detection of the PCL-PEG scaffold and the PCL-PEG-CGF composite scaffold



A、B: 分别为PCL-PEG支架和PCL-PEG-CGF复合支架,红色箭头代表支架上的细胞核; C: 2组支架上黏附的hPDLSCs细胞核的数量, \*\* $P<0.01$ 。

图6 经DAPI染色的hPDLSCs细胞核

Fig 6 Nuclei of hPDLSCs stained with DAPI



A: PCL-PEG支架; B: PCL-PEG-CGF复合支架。

图7 hPDLSCs在2种支架上的生长情况 SEM  $\times 10\mu\text{m}$

Fig 7 hPDLSCs growth on two scaffolds SEM  $\times 10\mu\text{m}$

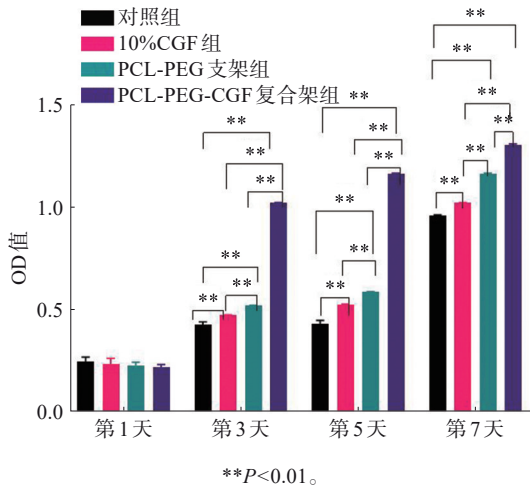


图8 CCK-8检测各组1、3、5、7 d hPDLSCs的增殖情况

Fig 8 CCK-8 assay results of hPDLSCs proliferation in each group at 1, 3, 5, and 7 days

### 2.7.3 Western blot 检测各组 hPDLSCs 中成骨相关基因的表达情况

hPDLSCs 成骨诱导培养到第7天后,成骨相关蛋白Runx2、BMP2、ALP在对照组、PCL-PEG支架组、10%CGF组、PCL-PEG-CGF复合支架组的表达量依次增加(图11)。各组间Runx2及ALP差异具有统计学意义( $P<0.05$ );与其余3组相比,

BMP2在PCL-PEG-CGF复合支架组中表达量增强( $P<0.05$ ),BMP2在CGF组与PCL-PEG组中的表达量无明显升高(图11),可能与成骨诱导培养时间较短有关,表明PCL-PEG-CGF复合支架可通过调控Runx2、BMP2、ALP的表达促进hPDLSCs的成骨分化能力。

### 3 讨论

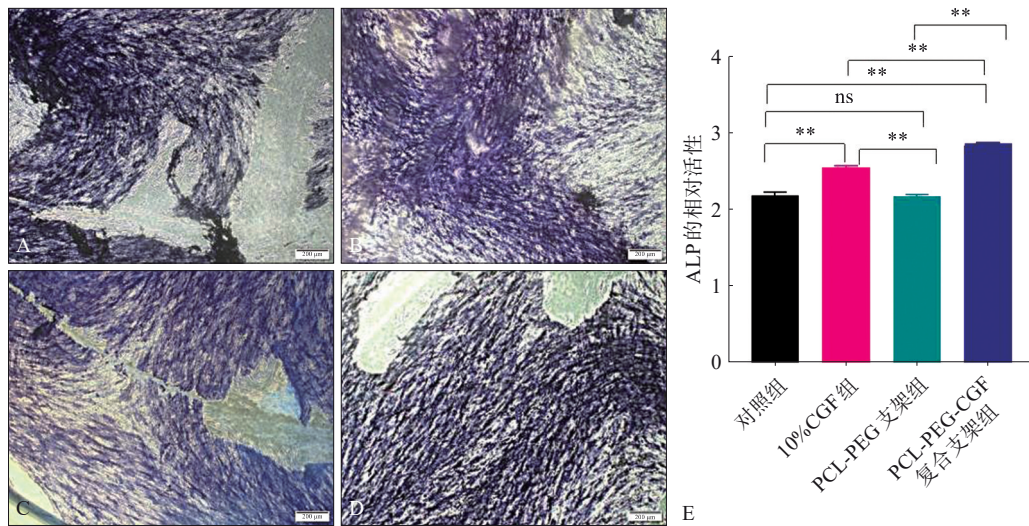
本研究通过调整PCL与PEG比例制备亲水性能及机械性能相对良好的PCL-PEG支架,并通过浸泡与冻干的方法将CGF负载于PCL-PEG静电纺丝纳米支架上构建PCL-PEG-CGF复合支架,系统探究了2种支架对hPDLSCs黏附、增殖及成骨分化能力的调控作用。实验结果表明,制备的PCL-PEG支架呈渔网状结构,其亲水性及机械性能均较好,经10%CGF处理后的PCL-PEG支架亲水性能未发生明显变化,其断裂拉伸强度及断裂延伸率也未发生明显变化,这在一定程度上有利于支架的空间支撑作用<sup>[12]</sup>,复合支架的显微结构由渔网状变为多孔状结构,因其负载了富含多种生长因子的CGF,PCL-PEG-CGF复合支架可显著促进hPDLSCs的黏附与增殖,并通过激活BMP2/Runx2/ALP信号轴增强成骨分化能力。以下从支架的特性与细胞行为的关联性、支架对细胞成骨分化行为的影响及支架的应用前景等方面进行讨论。

#### 3.1 PCL-PEG-CGF复合支架对hPDLSCs细胞黏附与增殖的影响

良好的生物材料需具备与细胞外基质相似的理化特性,以支持细胞与材料表面发生恰当的黏附,进而促进细胞的增殖及分化<sup>[13]</sup>。CGF提取物在1%~10%的浓度范围内以剂量依赖的方式促进人间充质干细胞的增殖、成骨成熟和矿化,但在

较高浓度时，可能由于CGF内炎性细胞因子对骨形成的抑制作用超过生长因子的促进作用，从而对骨再生产生不利影响，具有抑制作用<sup>[12]</sup>，故本研究采用10%的CGF来构建PCL-PEG-CGF复合支架。本研究显示黏附在PCL-PEG-CGF复合支架组的hPDLSCs比PCL-PEG支架组更为密集，提示PCL-PEG-CGF复合支架粗细不等的孔隙为hPDLSCs提供了三维生长空间，hPDLSCs能更有效地附着在PCL-PEG-CGF复合支架上；PCL-PEG-CGF复合支架能显著提高细胞的黏附率（细胞数量较PCL-PEG支架上明显增加）。此外，PCL-PEG-CGF复合支架的弹性模量（4.590 0 MPa±

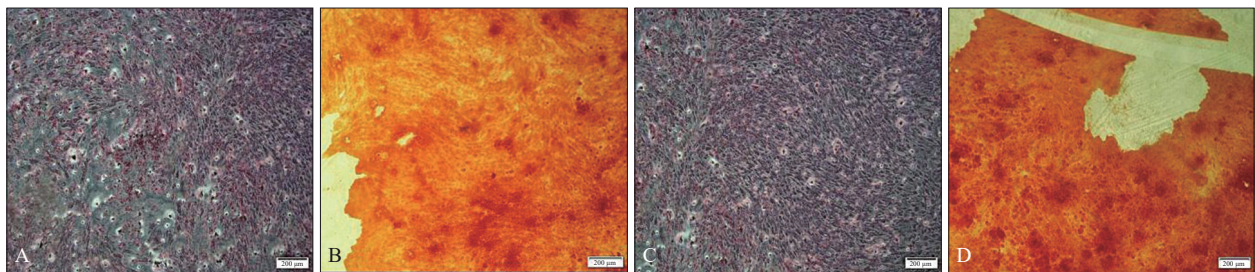
0.149 3 MPa）接近天然牙周膜组织（1~10 MPa）<sup>[14]</sup>，弹性模量可能通过调控hPDLSCs的机械感受（整合素-YAP/TAZ通路）影响其增殖、分化和材料重塑的能力<sup>[15]</sup>。CCK-8结果显示，复合支架组hPDLSCs在培养5~7 d后的增殖速率较其他组明显提高，这与PCL-PEG支架优异的机械性能及CGF缓释的生长因子[如表皮生长因子（epidermal growth factor, EGF）、血小板源性生长因子（platelet-derived growth factor, PDGF）等]刺激干细胞的增殖密切相关<sup>[16]</sup>。综上，PCL-PEG-CGF复合支架兼具PCL-PEG支架优异的机械性能与CGF的生物活性，可显著促进hPDLSCs增殖能力。



A: 对照组; B: 10%CGF组; C: PCL-PEG支架组; D: PCL-PEG-CGF复合支架组; E: ALP定量分析。 \*\*P<0.01; ns为差异无统计学意义。

图 9 各组hPDLSCs成骨诱导7 d后ALP染色及活性

Fig 9 ALP staining and activity of hPDLSCs after 7 days of osteogenesis induction



A: 对照组; B: 10%CGF组; C: PCL-PEG支架组; D: PCL-PEG-CGF复合支架组。

图 10 各组hPDLSCs成骨诱导21 d后茜红素染色

Fig 10 Alizarin Red S staining of hPDLSCs after 21-day osteogenic induction

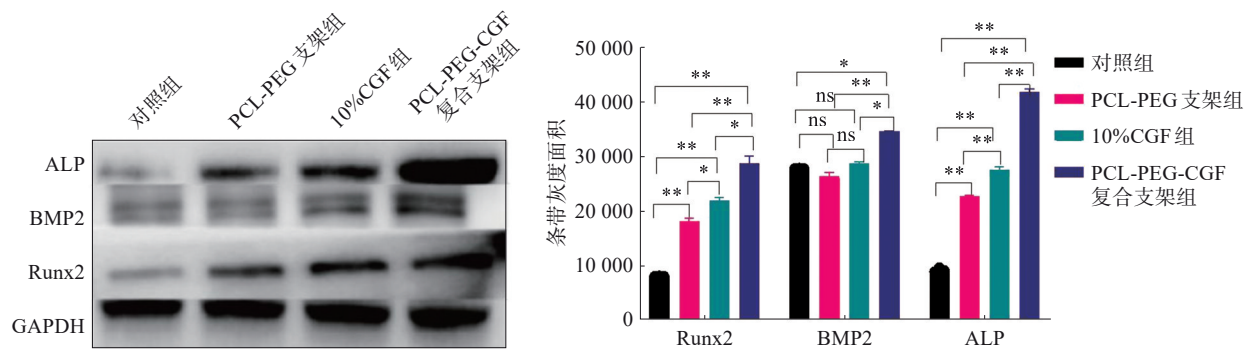
### 3.2 支架材料在牙周组织工程中诱导hPDLSCs成骨分化的分子机制

牙周组织工程旨在通过干细胞、支架材料、生物活性因子和力学微环境的协同作用，促进牙周复合结构的再生，以修复因牙周炎、创伤或先

天缺陷导致的牙周组织缺损。其中hPDLSCs的成骨分化是牙周组织工程中支架功能的核心评价指标之一。成骨相关蛋白ALP、BMP2和Runx2为在细胞的不同阶段产生或合成<sup>[17]</sup>，并与骨形成过程中的成骨分化和矿化密切相关，被认为是hPDL-

SCs向牙槽骨成骨分化的主要生物学标志物。本研究发现成骨诱导14 d后PCL-PEG支架hPDLSCs的ALP活性无明显升高,但制备的PCL-PEG-CGF复合支架因加入了具有生物活性的CGF,其ALP活性显著增强,且Runx2与BMP2蛋白表达在PCL-PEG-CGF复合支架中最高( $P<0.05$ );这一现象可能归因于以下机制:首先是PCL-PEG-CGF复合支架的多孔结构通过激活细胞骨架重排,增强力学信号(如RhoA/ROCK)传递,进而促进Runx2核转位,促进Runx2的表达增加<sup>[18]</sup>;其次复合支架内的CGF逐渐释放多种生长因子,如转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)、PDGF-BB、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、血管内皮生长因

子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等,提供持续的生物活性支持,激活促进干细胞分化,为成熟骨细胞的信号通路协同促进成骨基因表达<sup>[19-20]</sup>,如Runx2作为成骨分化的核心转录因子,可调控成骨相关基因(如Osterix、Osteocalcin)的表达<sup>[21]</sup>;BMP信号可通过Smad依赖和非依赖途径调控干细胞向成骨细胞分化<sup>[22-23]</sup>。值得注意的是,PCL-PEG-CGF复合支架上hPDLSCs中ALP、Runx2、BMP2的表达在成骨诱导早中期(7 d)即表现出明显升高,而矿化结节的沉积(茜红素染色)则是在成骨诱导21 d时表现出明显增强。这表明PCL-PEG-CGF复合支架可通过精确调控成骨分化阶段(增殖期—基质成熟期—矿化期)模拟生理性骨形成过程<sup>[24]</sup>。



左: Runx2、BMP2、ALP 的蛋白电泳图; 右: Runx2、BMP2、ALP 蛋白灰度值的相对定量分析。ns 为差异无统计学意义,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ 。

图 11 各组 hPDLSCs 成骨相关蛋白灰度值的相对定量分析

Fig 11 Relative quantification of hPDLSCs osteogenesis-related protein expression in each group

### 3.3 PCL-PEG-CGF 复合支架的应用前景及局限性

本研究建立了 CGF 与可生物降解合成聚合物的复合体系,为满足牙周再生中“材料屏障需求”与“生物活性维持”提供新方案,为设计“价廉物美”的牙周再生支架奠定理论基础,可推动个体化组织工程产品的临床转化。从体外的初步研究结果可见,通过采用浸泡+冻干的方法构建的 PCL-PEG-CGF 复合支架有望为临床骨修复提供了一种新的骨再生策略,为其在牙槽骨再生、颌骨缺损修复等临床场景中的应用提供了理论基础。然而,关于复合支架的体内变化及促 PDLSCs 成骨分化的分子机制仍需进一步探究,后续将聚焦于 PCL-PEG-CGF 复合支架的体内降解速率与新生骨组织形成速度匹配、探究支架在体内的血管化能力及开发仿生的牙周膜组织用于个性化牙周组织再生的治疗。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

### [参考文献]

- [1] Pigeot S, Klein T, Gullotta F, et al. Manufacturing of human tissues as off-the-shelf grafts programmed to induce regeneration[J]. *Adv Mater*, 2021, 33(43): e2103737.
- [2] Maia FR, Bastos AR, Oliveira JM, et al. Recent approaches towards bone tissue engineering[J]. *Bone*, 2022, 154: 116256.
- [3] Atala A. Bioengineered tissues for urogenital repair in children[J]. *Pediatr Res*, 2008, 63(5): 569-575.
- [4] Elghblawi E. Platelet-rich plasma, the ultimate secret for youthful skin elixir and hair growth triggering[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2018, 17(3): 423-430.
- [5] Sarkar R, Gupta M. Platelet-rich plasma in melasma-A systematic review[J]. *Dermatol Surg*, 2022, 48(1): 131-134.
- [6] Sheikh Z, Hamdan N, Ikeda Y, et al. Natural graft tissues

- and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review[J]. *Biomater Res*, 2017, 21(1): 9.
- [7] 王妮,程佳佳,高丽. 静电纺丝复合支架在骨组织工程中的应用[J]. *遵义医科大学学报*, 2024, 47(2): 194-200. Wang N, Cheng JJ, Gao L. Application of electrospinning composite scaffold in bone tissue engineering[J]. *J Zunyi Med Univ*, 2024, 47(2): 194-200.
- [8] Pan L, Yang J, Xu L. Preparation and characterization of simvastatin-loaded PCL/PEG nanofiber membranes for drug sustained release[J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 7158.
- [9] Koupaei N, Karkhaneh A, Daliri Joupari M. Preparation and characterization of (PCL-crosslinked-PEG)/hydroxyapatite as bone tissue engineering scaffolds[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2015, 103(12): 3919-3926.
- [10] Dai T, Ma J, Ni S, et al. Attapulgit-doped electrospun PCL scaffolds for enhanced bone regeneration in rat cranium defects[J]. *Biomater Adv*, 2022, 133: 112656.
- [11] Mijiritsky E, Assaf HD, Peleg O, et al. Use of PRP, PRF and CGF in periodontal regeneration and facial rejuvenation-A narrative review[J]. *Biology (Basel)*, 2021, 10(4): 317.
- [12] Honda H, Tamai N, Naka N, et al. Bone tissue engineering with bone marrow-derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in *Rattus norvegicus* calvaria defect model[J]. *J Artif Organs*, 2013, 16(3): 305-315.
- [13] Kashef-Saberi MS, Hayati Roodbari N, Parivar K, et al. Enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on electrospun polyethersulfone/poly (vinyl alcohol)/platelet rich plasma nanofibrous scaffolds[J]. *ASAIO J*, 2018, 64(5): e115-e122.
- [14] Pini M. Mechanical properties of the periodontal ligament: a systematic review[J]. *J Biomech*, 2019, 87: 1-11.
- [15] Ritsvall O, Albinsson S. Emerging role of YAP/TAZ in vascular mechanotransduction and disease[J]. *Microcirculation*, 2024, 31(4): e12838.
- [16] Inchingolo AD, Inchingolo AM, Malcangi G, et al. Effects of resveratrol, curcumin and quercetin supplementation on bone metabolism-A systematic review[J]. *Nutrients*. 2022, 14(17): 3519.
- [17] Liu Y, Cooper PR, Barralet JE, et al. Influence of calcium phosphate crystal assemblies on the proliferation and osteogenic gene expression of rat bone marrow stromal cells[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(7): 1393-1403.
- [18] McMurray RJ, Gadegaard N, Tsimbouri PM, et al. Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency[J]. *Nat Mater*, 2011, 10(8): 637-644.
- [19] Bharti R, Anisha, Tikku AP, et al. Effect of platelet-rich fibrin and concentrated growth factor on the regenerative potential of human-induced pluripotent stem cells: a comparative analysis[J]. *J Conserv Dent Endod*, 2024, 27(9): 975-982.
- [20] Dipalma G, Inchingolo AM, Colonna V, et al. Autologous and heterologous minor and major bone regeneration with platelet-derived growth factors[J]. *J Funct Biomater*, 2025, 16(1): 16.
- [21] Arya PN, Saranya I, Selvamurugan N. RUNX2 regulation in osteoblast differentiation: a possible therapeutic function of the lncRNA and miRNA-mediated network [J]. *Differentiation*, 2024, 140: 100803.
- [22] Wu M, Wu S, Chen W, Li YP. The roles and regulatory mechanisms of TGF- $\beta$  and BMP signaling in bone and cartilage development, homeostasis and disease[J]. *Cell Res*, 2024, 34(2): 101-123.
- [23] Beederman M, Lamplot JD, Nan G, et al. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation[J]. *J Biomed Sci Eng*, 2013, 6(8A): 32-52.
- [24] Bartold M, Gronthos S, Haynes D, et al. Mesenchymal stem cells and biologic factors leading to bone formation [J]. *J Clin Periodontol*, 2019, 46 (Suppl 21): 12-32.

(本文编辑 杜冰)