

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20251010.001

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1089.R.20251010.0911.002>

静电纺丝人工骨膜的构建及其引导成骨和血管化作用研究

方君怡^{1,2}, 张 凯³, 闫伏龙^{1,2}, 汪振华³✉

(1. 石河子大学第一附属医院, 新疆 石河子 832000; 2. 国家卫生健康委中亚高发防治重点实验室(共建), 新疆 石河子 832000; 3. 乌鲁木齐市口腔医院修复科, 新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘要] **目的:** 采用静电纺丝技术制备负载黑磷(black phosphorus, BP)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)纳米复合人工骨膜, 并对其理化性能、生物相容性及体内外成血管成骨性能进行研究。**方法:** 称取一定量的左旋聚乳酸(poly-L-lactic acid, PLLA)固体颗粒, 溶解于二氯甲烷与N,N-二甲基甲酰胺中制备静电纺丝溶液, 然后采用静电纺丝技术分别制备PLLA纤维膜、BP/PLLA纤维膜、VEGF/PLLA纤维膜、BP/VEGF/PLLA纤维膜等4种纳米复合人工骨膜。之后对各组人工骨膜进行理化性能及体外研究, 并通过SD大鼠颅骨缺损的原位修复实验探究该材料在动物体内促进成骨分化的能力。**结果:** (1)表征: 各组膜呈现为多孔网状结构, 且BP与VEGF的负载改善了纤维膜的亲水性; (2)生长因子缓释性能: ELISA检测结果示BP/VEGF/PLLA和VEGF/PLLA组能缓慢且持续释放VEGF; (3)生物相容性: 活死荧光染色及CCK-8结果示各组纤维膜具有较好的生物相容性; (4)体外成骨分化性能: ALP、ARS染色及qRT-PCR结果示负载BP与VEGF的纤维膜可明显促进BMSCs成骨分化。(5)构建大鼠缺损模型及复合膜回植: Micro-CT结果显示术后4周实验组骨缺损区较Control组有明显新骨形成。**结论:** 负载BP和VEGF的静电纺丝人工骨膜具有较好的促进成骨矿化性能, 可为骨膜组织工程进展提供一定的研究依据。

[关键词] 静电纺丝; 人工骨膜; 组织工程; 成骨; 血管化

[中图分类号] R318.08 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2026)16-1215-09

Construction of electrostatically spun artificial periosteum and its role in guiding osteogenesis and vascularization

FANG Junyi^{1,2}, ZHANG Kai³, YAN Fulong^{1,2}, WANG Zhenhua³✉

(1. The First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2. National Health Commission Key Laboratory of Prevention and Treatment of Central Asia High Incidence Diseases (Co-construction), Shihezi 832000, China; 3. Department of Prosthodontics, Stomatological Hospital of Urumqi, Urumqi 830000, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2023D01A69)

[Author]: FANG Junyi, E-mail: 447455551@qq.com.

[Correspondence to]: WANG Zhenhua, Chief Physician, Professor, Master's Supervisor, E-mail: 670952885@qq.com.

Received: 2025-06-18

Revised: 2025-09-24

JHMu, 2026;32(16):1215-1223

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective:** To prepare nanocomposite artificial periosteum loaded with black phosphorus (BP) and vascular endothelial growth factor (VEGF) by electrostatic spinning technology, and to investigate its physicochemical properties, biocompatibility, and *in vivo* and *in vitro* vasculogenic osteogenic properties. **Methods:** A certain amount of solid particles of poly-L-lactic acid (PLLA) was weighed and dissolved in dichloromethane and N,N-dimethylamine to prepare the electrostatic spinning solution, and then the four nanocomposite artificial osteosynthesis membranes: PLLA fiber membrane, BP/PLLA fiber membrane, VEGF/PLLA fiber membrane, and BP/VEGF/PLLA fiber membrane were prepared by the electrostatic spinning technique. Afterward, the physicochemical properties and *in vitro* studies of each group of artificial periosteum were carried out, and the ability of the materials to promote osteogenic differentiation in animals was investigated by *in situ* repair experiments of cranial defects in

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2023D01A69)

[作者简介] 方君怡, E-mail: 447455551@qq.com。

[通讯作者] 汪振华, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, E-mail: 670952885@qq.com。

[收稿日期] 2025-06-18

[修回日期] 2025-09-24

网络出版时间: 2025-10-10 11:01:44

SD rats. **Results:** (1) Characterization: The membranes of each group showed a porous mesh structure, and the loading of BP and VEGF improved the hydrophilicity of the fiber membranes; (2) Growth factor slow-release properties: ELISA results showed that the BP/VEGF/PLLA and VEGF/PLLA groups were able to release VEGF slowly and continuously; (3) Biocompatibility: The results of live-dead fluorescence staining and CCK-8 showed that the fiber membrane of each group had good biocompatibility; (4) *In vitro* osteogenic differentiation: The results of ALP and ARS staining and qRT-PCR showed that fiber membranes loaded with BP and VEGF could significantly promote the osteogenic differentiation of BMSCs. (5) Construction of rat defect model and composite membrane replantation: Micro-CT results showed that there was significant new bone formation in the bone defect area of the experimental groups compared to that of the control group at 4 weeks after surgery. **Conclusion:** The electrostatically spun artificial periosteum loaded with BP and VEGF has better performance in promoting osteogenesis and mineralization, which can provide a certain research basis for the progress of periosteal tissue engineering.

[**Key words**] Electrostatic spinning; Artificial periosteum; Tissue engineering; Osteogenesis; Vascularization

口腔骨缺损的愈合一直是口腔临床研究领域备受瞩目的热点议题。在正常情况下,健康的骨组织通常具备自我修复与改建的能力,能在受损后逐步实现自然愈合。然而,当受到肿瘤侵袭、严重感染等复杂因素,骨缺损面积较大时,骨组织自愈往往难以达到理想的修复效果^[1,2]。在漫长的临床实践探索中,自体骨及骨膜的移植始终是增强骨再生能力、加速骨缺损修复的主要手段。但自体骨移植面临着诸多现实困境:如自体骨及骨膜材料来源有限,难以满足大量临床需求;手术操作过程复杂,增加了患者的痛苦等。因此,如何选择更为适宜的骨缺损修复材料,以及怎样确保修复效果的长期稳定性,仍是口腔临床研究领域亟待攻克的难题,需要进一步深入探索^[3,4]。

骨膜在结构上可划分为2个层次,包括外层的纤维层和较为薄嫩的内层-生发层。外层纤维结构主要由致密的胶原纤维交织而成,在骨修复过程中起到支撑与屏障作用;而内层的生发层则募集各种细胞和生长因子,为骨修复过程源源不断地输送细胞和营养物质^[5]。

黑磷(black phosphorus, BP)是一种仅由磷元素构成的材料,其化学组成与天然骨骼中的无机成分具有高度相似性^[6]。在一定条件下, BP可水解成磷酸盐吸附于周围组织环境中的钙离子,并促进磷酸钙的形成。曾有多项科学研究揭示了BP在骨组织修复领域所展现出的卓越成骨活性与效能^[7-9]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)通过促进血管生成、调节骨细胞功能及参与骨代谢等机制,为骨组织的修复与再生提供重要支持。在骨损伤部位局部应用缓慢释放的VEGF药物制剂,是促进骨修复的有效疗法^[10]。将二者联合应用既能提升BP的稳定性,也能使VEGF缓慢持续地释放。

静电纺丝技术在组织工程领域应用广泛。在

静电纺丝过程中,聚合物溶液或熔体在高压电场作用下形成“泰勒锥”,并因静电斥力而拉伸细化,最终沉积在接收装置上形成纳米纤维膜。该技术具有操作简单、成本低廉、原料易得、可大规模生产等优点,被认为是骨再生领域中一种很有前途的制备仿生膜的方法^[11,12]。

基于以上研究背景,本研究采用静电纺丝技术构建一种负载BP和VEGF的纳米复合人工骨膜,并探究其促进骨缺损修复的应用效果,为骨膜组织工程进展提供研究依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 左旋聚乳酸(poly-L-lactic acid, PLLA)、司班80(Span-80)、透明质酸、DAPI、苏木素(美国Sigma公司, 81273、S6760、924474、D8417-1MG、H9627-25G);茜素红染液(Servicebio, G1038);BP(江苏先丰纳米材料科技有限公司, 100944);N-甲基吡咯烷酮、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(上海阿拉丁试剂有限公司, M434297、D433566、D119450);大鼠VEGF、大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)、大鼠BMSCs完全培养基、大鼠BMSCs成骨诱导培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司, PCK266、CP-R131、CM-R131、PD-008);人脐静脉内皮细胞(Icell, iCell-h110);整合素(Integrin β 1)抗体(ABclonal, A21234);OCN抗体(Proteintech, 23418-1-AP);胎牛血清、鬼笔环肽、Calcein-AM/PI(YEASEN, 40130ES76);DMEM/F-12培养基(Cytiva, SH30023.01);多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司, 80096618);大鼠VEGF ELISA试剂盒、TRI pure Total RNA Extraction Reagent、EntiLink™ 1st Strand cDNA Synthesis Super Mix、EnTurbo™ SYBR Green PCR SuperMix(ELK Biotechnology, ELK-2320、EP013、EQ031、EQ001);CCK-8试剂盒、碱性磷酸酶试剂盒、4%多聚甲醛

(上海碧云天生物技术股份有限公司,C0038、C3206、P0099)。

1.1.2 主要仪器设备 高压静电纺丝机 TL01(深圳市通力微纳科技有限公司);电纺丝收集滚筒(实验室自制);电子天平(美国赛默飞世尔科技公司);磁力搅拌仪(德国 IKA 公司);扫描电子显微镜(日本日立公司);傅里叶红外光谱仪(美国赛默飞世尔科技公司);电子万能试验机(MTS-E43.104);接触角测量仪(德国 LAUDA Scientific LSA);恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);CO₂恒温培养箱(Heal Force);洁净工作台(苏净安泰空气技术有限公司);正置荧光拍照显微镜(Nikon);倒置白光/荧光拍照显微镜(Olympus);冷冻离心机(宁波新芝生物科技股份有限公司);酶标仪(Molecular公司);荧光定量 PCR 仪(Life technologies);Micro-CT(Bruker, SkyScan 1276)。

1.1.3 实验动物 雄性 SD 大鼠 30 只,8 周龄,SPF 级,体质量(300±20)g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2024-0001,于 SPF 级动物房中饲养。所有手术步骤及术后处理经石河子大学第一附属医院医学伦理委员会批准,审批号:2023-151-01。

1.2 实验方法

1.2.1 BP 的处理 参考赵闻天^[13]的方法,采用液相剥离法制备 BP 纳米片。将 10 mg 具有金属光泽的 BP 晶体研磨成粉,加入冰 N-甲基吡咯烷酮,超声周期 6 s,超声粉碎 5 h,随后 6 000 r/min 离心 20 min,取上清液 11 000 r/min 离心 20 min,弃上清即得到 BP 纳米片,PBS 缓冲液溶解,真空干燥保存。

1.2.2 静电纺丝人工骨膜的构建 (1) PLLA 电纺液:将 0.5 g PLLA 和 8.0 g 二氯甲烷搅拌至完全溶解后,加入 4.0 g DMF 搅匀。(2) BP/PLLA 电纺液:将 50 μL 透明质酸溶液(1%)、10 μL BP 纳米片和 0.01 g Span-80 超声分散于 8.0 g 二氯甲烷中。按照制备 PLLA 电纺液的步骤,依次加入 0.5 g PLLA 和 4.0 g DMF,用高速搅拌仪搅匀。(3) VEGF/PLLA 电纺液:将 50 μL 透明质酸溶液(1%)、10 μL VEGF 和 0.01 g Span-80 超声分散于 8.0 g 二氯甲烷中。按照制备 PLLA 电纺液的步骤,依次加入 0.5 g PLLA 和 4.0 g DMF,用高速搅拌仪搅匀。(4) BP/VEGF/PLLA 电纺液:将 50 μL 透明质酸溶液(1%)、10 μL BP 纳米片、10 μL VEGF 和 0.01 g Span-80 超声分散于 8.0 g 二氯甲烷溶液中。按照制备 PLLA 电纺液的步骤,依次加入 0.5 g PLLA 和 4.0 g DMF,用高速搅拌仪搅匀。

将上述制备好的 4 种电纺液依次加入 5 mL 注射器,接入 18G 不锈钢钝头钢针。将直流高压电源的正负极分别连接针头、自制接收器。纺丝过程中,保持恒定电压(20 kV)、推注速度(40 μL/min)、接收距离(10 cm)。制备完成即得到 4 组复合人工骨膜(依次记为 PLLA、BP/PLLA、VEGF/PLLA、BP/VEGF/PLLA 纤维膜)。

1.3 材料表征

1.3.1 扫描电子显微镜观察 将各组膜裁剪成适宜尺寸,经喷金处理后,置于扫描电镜下观察膜的微观形貌。

1.3.2 能量色散光谱 对各组纤维膜样品进行切割,采用能量色散光谱仪对断口截面进行扫描分析,通过观察核层区域化学元素的相对含量变化,验证药物的有效负载情况。

1.3.3 水接触角测试 为确定 BP 的负载对纤维膜表面浸润性的影响,用接触角测试仪对不同纤维膜的水接触角进行测量。

1.4 VEGF 释放性能

将 10 mg 的 VEGF/PLLA、BP/VEGF/PLLA 组人工骨膜分别放入离心管,加入含有 1% 牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 2 mL 充分浸泡。37 °C 恒温摇荡,分别在各时间点节点完全置换释放介质,采用 ELISA 实验测量释放液中 VEGF 含量。

1.5 体外细胞实验

1.5.1 人工骨膜生物相容性 ⁶⁰Co 辐照消毒后,将 4 组纤维膜置于孔板中,随后接种定量大鼠 BMSCs,37 °C、5% CO₂ 培养,Control 组不处理。

1.5.1.1 荧光法细胞黏附实验 24 h 弃培养基,用 4% 多聚甲醛固定液固定 20 min,PBS 冲洗,组化笔画圈。用 5% BSA 稀释抗体,滴加适量 Integrin β1 一抗,4 °C 过夜。PBS 冲洗,滴加二抗,37 °C 避光孵育。加入鬼笔环肽、DAPI 染色,显微镜下观察拍照。

1.5.1.2 活死荧光染色 培养 3 d,弃去培养基,用配置好的 Calcein-AM 和 PI 染液孵育,Calcein 呈现绿色荧光,PI 呈现红色荧光,荧光显微镜下观察染色情况。

1.5.1.3 CCK-8 实验 培养 1、3、5 d,孔板中加入 CCK-8 溶液,培养箱中孵育 2 h,使用酶标仪测定 450 nm 吸光值。

1.5.2 人工骨膜体外成骨 将 4 组纤维膜样品均匀铺于 24 孔板,Control 组采用 0.2% 明胶包裹普通培养板。以 2×10⁴/孔接种 BMSCs,培养至约 60% 汇合度时更换为成骨诱导分化培养基。分别于诱导

第7天采用碱性磷酸酶定量试剂盒检测成骨早期标志物 ALP 活性,qRT-PCR 检测成骨相关基因表达;第14天通过免疫荧光染色分析成骨特异性标记物 OCN 表达;第21天采用茜素红染色观察矿化钙结节的形成情况,系统评估材料的成骨诱导能力。

1.5.3 人工骨膜体外成管 24孔板中加入生长因子减少型基质胶,待基质胶固化后,将4组纤维膜和0.2%明胶Control组置于孔板上层浸泡处理,下层接种人脐静脉内皮细胞进行成管培养。3h后固定细胞,使用荧光标记的绿光鬼笔环肽染色细胞骨架,结合DAPI核染,显微观察成管结构。

1.6 体内动物实验

将30只8周龄SD大鼠随机分为5组:PLLA组、BP/PLLA组、VEGF/PLLA组、BP/VEGF/PLLA组、Control组,每组6只。建立大鼠双侧颅骨缺损:仰卧固定大鼠,麻醉,备皮,消毒,无菌条件下沿颅骨中缝做约2cm纵行切口,切透骨膜层并钝性分离充分暴露术区。用外科环钻于颅骨中缝双侧制备直径5mm的全层圆形骨缺损,避免伤及硬脑膜,生理盐水降温。材料回植:Control组制备颅骨缺损后不回植材料;其余各组分别植入相应材料,见图1。分层固定缝合,术后常规分笼喂养。腹腔注射青霉素(16万单位/kg体重)预防感染,每日1次,连续3d。密切观察大鼠生命体征、有无不良反应。取材:术后4周处死大鼠,收集颅骨组织样本,4%多

聚甲醛固定。Micro-CT扫描:设置电压85kV、电流200 μ A,分辨率9.055 014 μ m,曝光时间240ms,扫描角度180度。将扫描数据进行三维重建,使用CTAn软件分析成骨相关数据:骨体积分数、骨小梁数目。

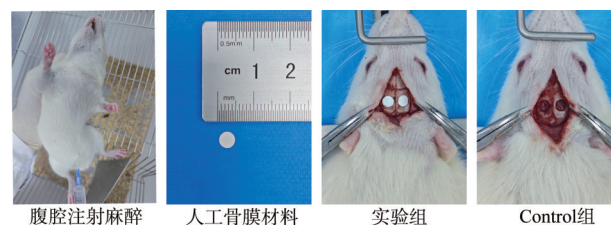


图1 实验动物模型的构建

Fig 1 Establishment of experimental animal models

1.7 统计学处理

采用GraphPad Prism 10.1.2软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。符合正态性及方差齐性则进行one-way ANOVA分析与Tukey检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 人工骨膜材料表征

2.1.1 微观形貌 在扫描电子显微镜下各组材料的显微结构见图2。各组纤维膜的大体表面形貌无明显差别,呈随机取向,纳米纤维相互交错穿插形成网状,整个骨膜呈现多孔样结构。BP/VEGF/PLLA组纤维直径较前3组略大。

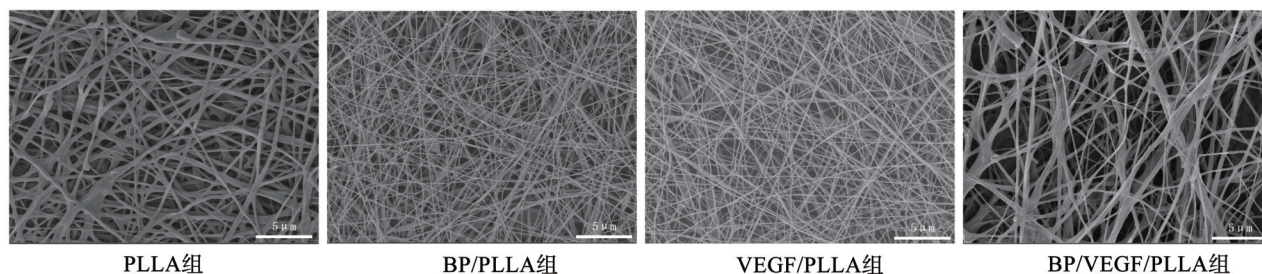


图2 各组人工骨膜扫描电子显微镜下观察结果

Fig 2 Observation results of artificial periosteum under scanning electron microscope of each group

2.1.2 药物负载 能量色散光谱检测结果显示,BP/PLLA组与BP/VEGF/PLLA组磷元素含量增加,这表示BP已成功负载于人工骨膜内(图3)。

2.1.3 亲水性能 为确定药物负载对人工骨膜表面浸润性的影响,采用接触角测试仪对各组膜的水接触角进行了测量。结果显示,各组水接触角分别为:115.0° $\pm$ 3.2°、35.2° $\pm$ 2.9°、68.9° $\pm$ 5.4°、67.4° $\pm$ 3.3°(图4)。

2.2 生长因子缓释性能

ELISA结果显示BP/VEGF/PLLA组和VEGF/PLLA组前2天的VEGF释放速率较快,累计释放率分别为(20.103 $\pm$ 1.508)%和(21.362 $\pm$ 1.199)%,二者间没有明显差异。从第4天开始2组的释放速率都相对放慢,且BP/VEGF/PLLA组的释放更为缓慢,考虑BP纳米片的高比表面积结构与表面化学特性可能为生长因子提供了丰富的活性位点,增强了生长因子在纳米片表面的稳定性,

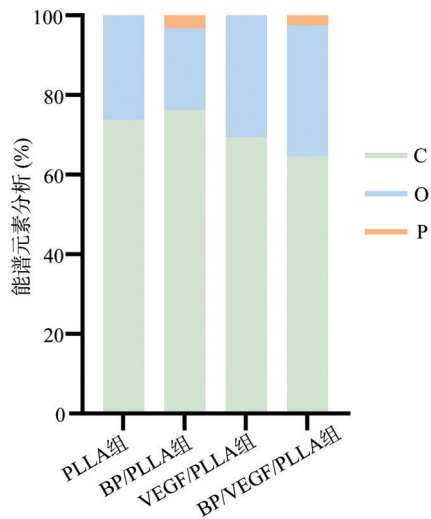


图3 各组能量色散X射线光谱元素分析

Fig 3 Elemental analysis by energy dispersive X-ray spectroscopy of each group

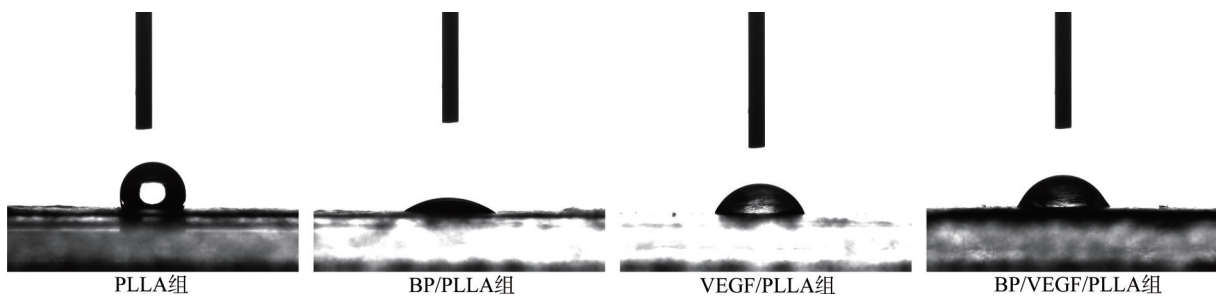


图4 各组水接触角测量

Fig 4 Measurement of water contact angle of each group

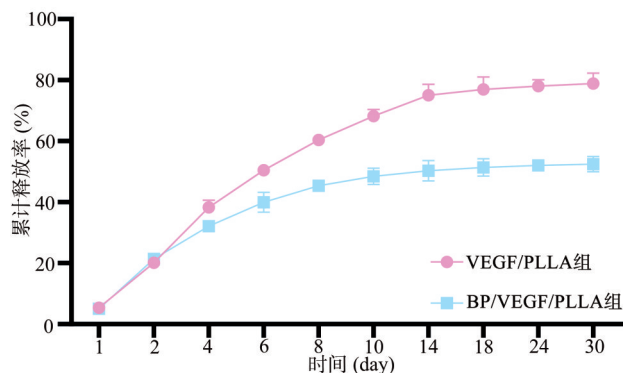


图5 人工骨膜血管内皮生长因子的体外释放

Fig 5 *In vitro* release of vascular endothelial growth factor of artificial periosteum

2.3.2 体外成骨性能 成骨诱导第7天, Control组和PLLA组碱性磷酸酶染色颜色较浅, 密度也较低。其次是BP/PLLA组、VEGF/PLLA组, 其中BP/PLLA组阳性染色稍多。BP/VEGF/PLLA组染色颜色最深, 阳性染色面积也最大, 表明BP与

从而延长生长因子的作用时间, 提高治疗效果(图5)。

2.3 体外细胞实验

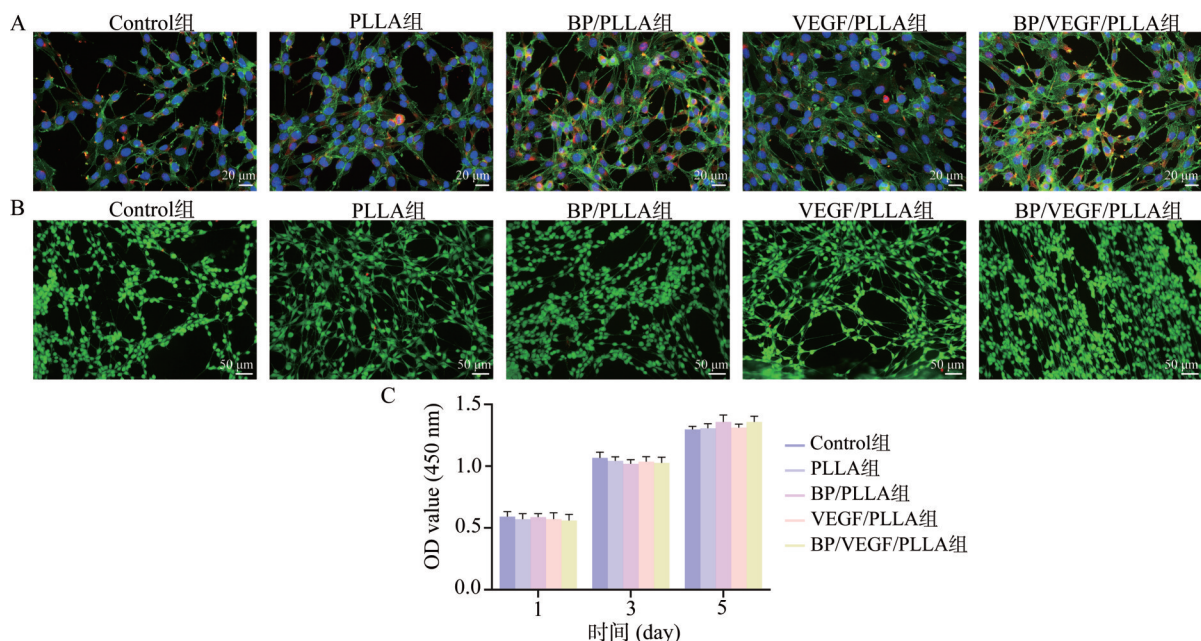
2.3.1 生物相容性检测

2.3.1.1 荧光法细胞黏附实验 整合素 Integrin $\beta 1$ (红), 反映细胞和材料间的相互黏附作用。Control组和PLLA组荧光信号最弱, 二者没有明显差异, 其次是VEGF/PLLA组, BP/PLLA组和BP/VEGF/PLLA组信号最强(图6A)。

2.3.1.2 活死荧光染色 各组可见大量活细胞存在且细胞形态较好, 说明本实验人工骨膜材料无明显细胞毒性作用(图6B)。

2.3.1.3 CCK-8实验 各组细胞数量随时间递增, 呈上升趋势。第1、3、5天所有实验组与Control组相比吸光度差异无统计学意义($P > 0.05$), 说明各组人工骨膜材料具有良好的生物相容性(图6C)。

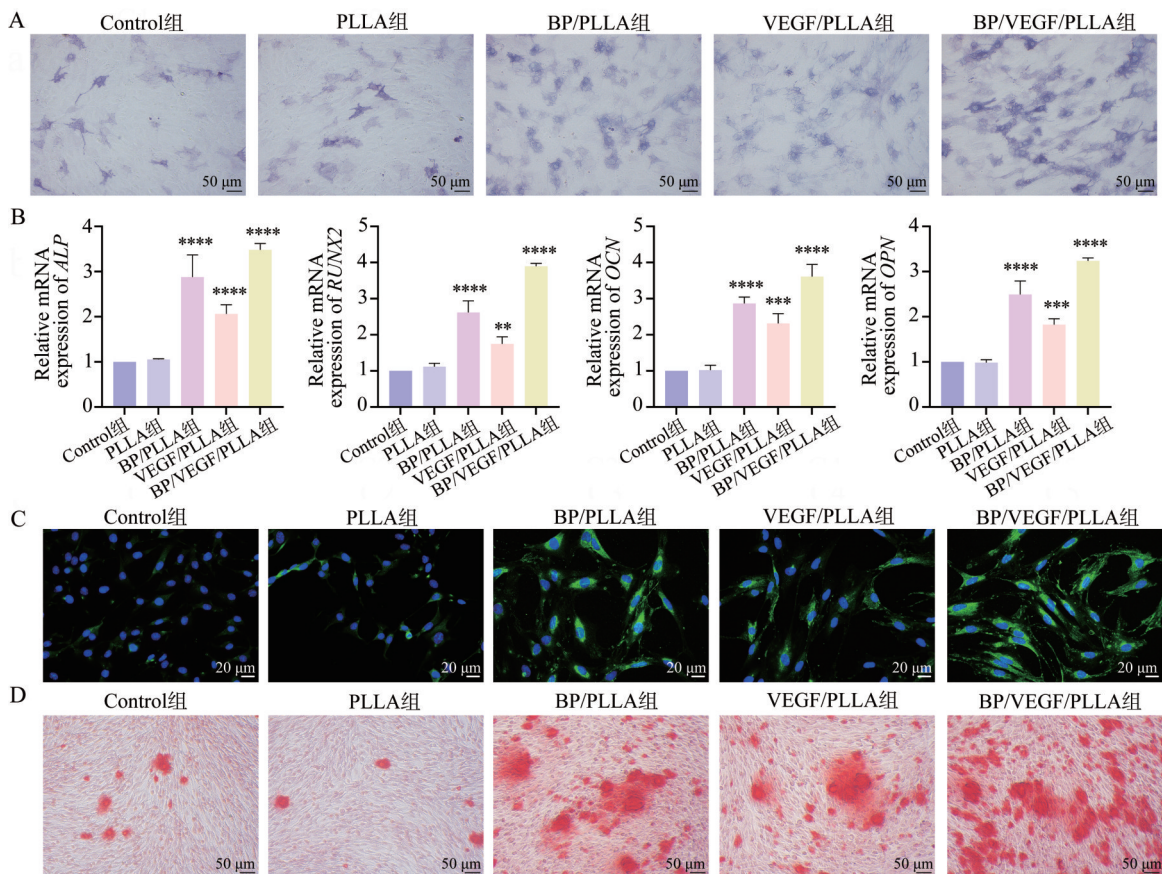
VEGF的负载可明显促进成骨(图7A)。BP在生理条件下缓慢降解, 释放磷酸盐离子, 磷酸盐是骨矿化的关键成分, 可直接参与羟基磷灰石的沉积, 促进骨基质矿化。qRT-PCR检测成骨相关基因ALP、RUNX2、OCN、OPN表达。BP/VEGF/PLLA组表达最高, 其次是BP/PLLA组和VEGF/PLLA组。Control组和PLLA组表达差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图7B。成骨诱导第14天, OCN染色分析结果显示, Control组和PLLA组荧光信号最弱, 二者差异无统计学意义($P > 0.05$), 其次是VEGF/PLLA组。BP/PLLA组和BP/VEGF/PLLA组信号最强($P < 0.01$), 见图7C。成骨诱导第21天, 茜素红染色结果显示, Control组和PLLA组的染色阳性较少。其次是BP/PLLA组和VEGF/PLLA组, 其中BP/PLLA组阳性染色稍多。BP/VEGF/PLLA组染色阳性染色面积最大, 表明有更多钙盐沉积(图7D)。



A:荧光法细胞黏附实验结果;B:活死荧光染色结果;C:CCK-8实验结果

图 6 各组人工骨膜生物相容性检测

Fig 6 Biocompatibility testing of artificial periosteum of each group



A:碱性磷酸酶染色结果;B:qRT-PCR检测成骨相关基因表达情况;C:骨钙素免疫荧光染色结果;D:茜素红染色结果; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

图 7 各组体外成骨性能实验

Fig 7 *In vitro* osteogenic performance experiment of each group

2.3.3 体外成管性能 PLLA组和BP/PLLA组细 PLLA组形成的血管较长,相互交织成网(图8)。胞大多较为分散。VEGF/PLLA组、BP/VEGF/

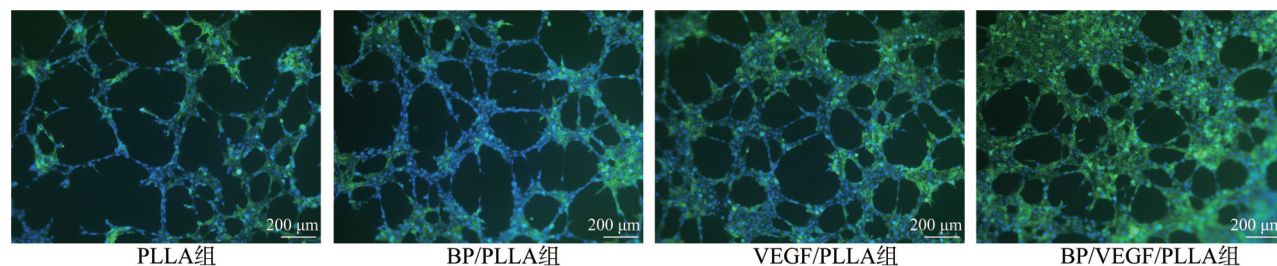


图8 各组体外成管性能实验

Fig 8 *In vitro* tube formation performance experiment of each group

2.4 体内成骨效果

术后4周, Micro-CT扫描检测大鼠颅骨缺损的成骨修复情况。与Control组相比, 实验组植入人工骨膜材料的骨体积分数和骨小梁数目明显升高(P

<0.0001), 其中BP/VEGF/PLLA组效果最佳, 表明本材料在促进体内成骨过程中发挥了一定作用(图9A、B)。

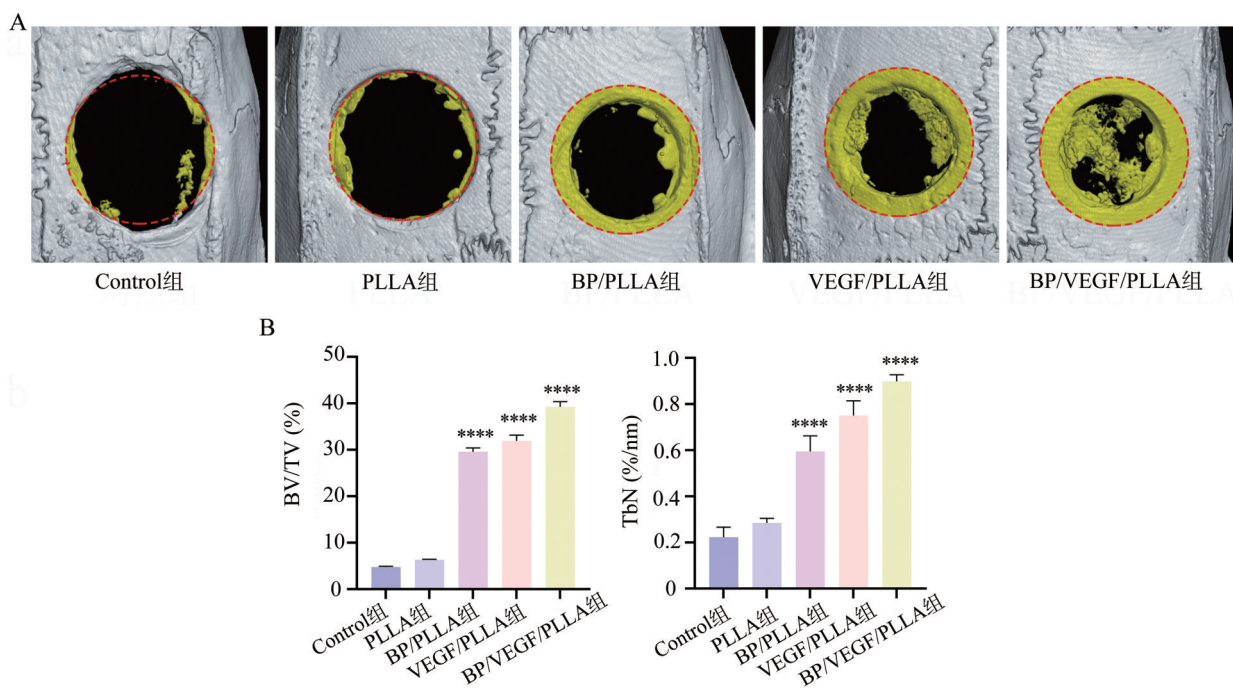
A: 术后4周Micro-CT结果; B: 术后4周骨体积分数和骨小梁数目; **** $P<0.0001$

图9 各组人工骨膜修复大鼠颅骨缺损的成骨效果

Fig 9 Osteogenic effects of artificial periosteum in the repair of cranial bone defects in rats of each group

3 讨论

在骨组织再生修复的过程中, 功能性血管网络的早期构建具有至关重要的意义^[14]。作为组织工程化骨的“生命供给线”, 新生血管系统为后续骨形成提供了必需的营养物质输送通道。当骨缺损区域无法形成有效的血管网时, 成骨细胞将陷入增殖停滞, 基质矿化过程受阻, 最终导致骨再生失败或形成纤维化修复等^[15]。骨膜作为祖细胞和生长因子的存储部位及募集性支架, 在骨组织供血和再生过程中发挥关键作用^[16-18]。因此, 构建血管化的组

织工程骨需要真正意义上重现天然骨组织的结构-功能一体化特征。

VEGF能通过自分泌或旁分泌的方式, 与血管内皮细胞表面的特异性受体结合, 进而触发一系列信号传导, 促进内皮细胞增殖, 诱导形成新生血管, 为局部骨再生及代谢活动构建有利的微环境。Xu等^[19]构建出一种纳米纤维支架, 通过激活缺氧诱导因子-1/VEGF信号通路促进血管形成。作为一种高度特异的促血管内皮细胞增生及血管生成因子, VEGF在血管再生的生理及病理过程中发挥着至

关重要的作用^[20]。Largo等^[21]研究表明,外源性VEGF的加入实现了骨缺损移植材料早期血液灌注与组织再生。Byambaa等^[22]基于3D打印技术构建出一种微骨样的组织结构,该结构内芯由含有hBMSCs和hUVECs的甲基丙烯酸酯基制成,在内芯周围包裹VEGF,为治疗临界骨缺损的血管化工程骨构建提供了思路。

近年来,BP因其独特的理化性质,在骨组织工程领域受到广泛关注^[23-25],且磷与人体骨基质中天然存在的无机磷酸盐具有高度同源性,赋予其良好的生物相容性基础^[6,26]。实验研究表明^[8,27],在降解过程中,BP逐步释放的磷酸根离子能与周围微环境中的钙离子发生螯合作用,形成钙磷复合物并进一步矿化沉积,这种降解-矿化耦合机制可明显改善局部成骨微环境,通过上调碱性磷酸酶活性和骨形态发生蛋白表达,有效促进间充质干细胞成骨分化,最终实现骨缺损区域的再生修复与功能重建。研究显示^[28-30],BP纳米片特殊层状结构具有高表面积与体积比,易作为药物载体,且其在抑菌方面也表现出巨大潜力。

本实验采用静电纺丝技术制备出一种新型人工骨膜,将BP、VEGF和PLLA制成混合溶液,通过共混静电纺丝制备载药纤维支架,模拟天然骨膜结构。在扫描电子显微镜下各组人工骨膜纤维呈随机取向,无明显串珠样结构,BP/VEGF/PLLA组纤维直径较前3组略大,推测其溶液整体浓度比前3组高,在制备过程中纺丝液稠度更大时,容易出现滴液现象,不易形成“泰勒锥”,因此平均直径较大。BP及VEGF的负载改善了人工骨膜的亲水性,使得人工骨膜为细胞的黏附生长以及后续的功能性表达提供更好的平台。从体外细胞实验结果得出,该复合材料具有较好的生物安全性,无明显细胞毒性。体外BMSCs成骨诱导分化实验发现,PLLA组成骨诱导性能与Control组相比差异无统计学意义,而负载BP、VEGF后碱性磷酸酶活性明显增强,BP/VEGF/PLLA组钙结节形成最多,显示出良好的成骨分化性能,这可能与BP在生理条件下缓慢降解释放磷酸盐离子,直接参与羟基磷灰石的沉积,促进骨基质矿化有关。在动物实验中,术后4周Micro-CT显示各实验组有明显骨质再生修复,但仍有不同程度骨缺损未实现完全愈合,考虑当面对复杂的体内环境时,静电纺丝纤维膜单独应用于口腔颌面部骨缺损修复时缺乏一定的支撑,后期实验将进一步研究改善该材料的力学性能及理化性能。

综上所述,本实验发现静电纺丝人工骨膜具有较好的生物相容性,能缓慢持续释放VEGF,进一步促进骨缺损的修复,为骨膜组织工程发展提供了一定的研究依据。

作者贡献度说明:

方君怡:参与实验研究、资料收集、数据分析、撰稿;闫伏龙:协助完成实验研究、数据采集及分析;汪振华、张凯:负责实验设计、校稿、实验经费。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- Verrier S, Alini M, Alsberg E, et al. Tissue engineering and regenerative approaches to improving the healing of large bone defects [J]. *Eur Cell Mater*, 2016, 32: 87-110.
- Alonzo M, Primo FA, Kumar SA, et al. Bone tissue engineering techniques, advances, and scaffolds for treatment of bone defects [J]. *Curr Opin Biomed Eng*, 2021, 17: 100248.
- Tang D, Tare RS, Yang LY, et al. Biofabrication of bone tissue: Approaches, challenges and translation for bone regeneration [J]. *Biomaterials*, 2016, 83: 363-382.
- Badylak SF, Nerem RM. Progress in tissue engineering and regenerative medicine [J]. *PNAS*, 2010, 107(8): 3285-3286.
- Bombaldi de Souza RF, Bombaldi de Souza FC, Thorpe A, et al. Phosphorylation of chitosan to improve osteoinduction of chitosan/xanthan-based scaffolds for periosteal tissue engineering [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 143: 619-632.
- Bohner M, Gbureck U, Barralet JE. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(33): 6423-6429.
- Wu A, Ma G, Chen Y, et al. Improved black phosphorus nanocomposite hydrogel for bone defect repairing: Mechanisms for advancing osteogenesis [J]. *Adv Healthc Mater*, 2025, 14(7): e2404934.
- Long J, Yao Z, Zhang W, et al. Regulation of osteoimmune microenvironment and osteogenesis by 3D-printed PLAG/black phosphorus scaffolds for bone regeneration [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(28): e2302539.
- 苗雅丽. 纳米黑磷复合生物水凝胶的构建及其骨再生修复研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- Miao YL. Construction of black phosphorus nanocomposite hydrogel for bone regeneration [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.

- 10 Street J, Bao M, deGuzman L, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover [J]. *PNAS*, 2002, 99(15): 9656-9661.
- 11 赵永华. 电纺负载羟基磷灰石与氧化镁的双层复合仿生骨膜用于骨缺损修复的作用研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2024.
Zhao YH. Study on the impact of bionic periosteum reinforced by electrospun hydroxyapatite and magnesium oxide on bone defect repair [D]. Qingdao: Qingdao University, 2024.
- 12 Roseti L, Parisi V, Petretta M, et al. Scaffolds for bone tissue engineering: State of the art and new perspectives [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 78: 1246-1262.
- 13 赵闻天. 黑磷纳米片载药体系的制备及其抗缺血性脑损伤的作用研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2022.
Zhao WT. Preparation of black phosphorus nanosheets drug delivery system and its effect on ischemic brain injury [D]. Shihezi: Shihezi University, 2022.
- 14 Xing F, Xiang Z, Rommens PM, et al. 3D bioprinting for vascularized tissue-engineered bone fabrication [J]. *Materials (Basel)*, 2020, 13(10): 2278.
- 15 Almubarak S, Nethercott H, Freeberg M, et al. Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration [J]. *Bone*, 2016, 83: 197-209.
- 16 常文辽, 赵杰, 孙晓亮, 等. 人工骨膜的材料选择, 理论设计及生物仿生功能 [J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(4): 600-606.
Chang WL, Zhao J, Sun XL, et al. Material selection, theoretical design and biomimetic function of artificial periosteum [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2021, 25(4): 600-606.
- 17 翟传兴, 王志梦, 王国栋, 等. 3D生物打印在骨组织血管网络形成中的研究进展 [J]. *组织工程与重建外科*, 2023, 19(3): 298-301.
Zhai CX, Wang ZM, Wang GD, et al. Research progress of three dimensional bio-printing technology for formation of vascular network in bone tissue [J]. *J Tissue Eng Reconstruct Surg*, 2023, 19(3): 298-301.
- 18 Shahabipour F, Ashammakhi N, Oskuee RK, et al. Key components of engineering vascularized 3-dimensional bioprinted bone constructs [J]. *Transl Res*, 2020, 216: 57-76.
- 19 Xu C, Kang Y, Guan S, et al. Iron-based metal-organic framework as a dual cooperative release system for enhanced vascularization and bone regeneration [J]. *Chin Chem Lett*, 2023, 34(5): 107825.
- 20 Gianni-Barrera R, Di Maggio N, Melly L, et al. Therapeutic vascularization in regenerative medicine [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2020, 9(4): 433-444.
- 21 Largo RD, Burger MG, Harschnitz O, et al. VEGF over-expression by engineered BMSC accelerates functional perfusion, improving tissue density and in-growth in clinical-size osteogenic grafts [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 755.
- 22 Byambaa B, Annabi N, Yue K, et al. Bioprinted osteogenic and vasculogenic patterns for engineering 3D bone tissue [J]. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6: 1700015.
- 23 Nowsherwan GA, Khan M, Iqbal MA, et al. Reviewing black phosphorus for biomedical and optoelectronic applications [J]. *Inorgan Chem Commun*, 2024, 160: 111912.
- 24 Ma S, Wei Y, Sun R, et al. Calcium phosphate bone cements incorporated with black phosphorus nanosheets enhanced osteogenesis [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2023, 9(1): 292-302.
- 25 Jing X, Xiong Z, Lin Z, et al. The application of black phosphorus nanomaterials in bone tissue engineering [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(12): 2634.
- 26 刘子扬, 单烁, 周欢, 等. 具有生物活性的多聚磷酸盐材料在骨修复中的应用: 基础, 进展与挑战 [J]. *生物骨科材料与临床研究*, 2023, 20(6): 66-72.
Liu ZY, Shan S, Zhou H, et al. Bioactive polyphosphate biomaterials for bone regeneration: Fundamental, progress and challenge [J]. *Orthop Biomechan Mater Clin Study*, 2023, 20(6): 66-72.
- 27 Cheng L, Cai Z, Zhao J, et al. Black phosphorus-based 2D materials for bone therapy [J]. *Bioact Mater*, 2020, 5(4): 1026-1043.
- 28 Zhang L, You J, Lv H, et al. Black phosphorus-A rising star in the antibacterial materials [J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18: 6563-6584.
- 29 Pandey A, Nikam AN, Fernandes G, et al. Black phosphorus as multifaceted advanced material nanoplateforms for potential biomedical applications [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2020, 11(1): 13.
- 30 Zhang F, Peng F, Qin L, et al. pH/near infrared dual-triggered drug delivery system based black phosphorus nanosheets for targeted cancer chemo-photothermal therapy [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 180: 353-361.