

本文引文格式:邱荣敏,梁雁. 石墨烯/丝素蛋白复合支架材料及其在组织工程的研究进展[J]. 右江民族医学院学报, 2020, 42(4): 509-511, 515.

【综述与讲座】

石墨烯/丝素蛋白复合支架材料及其在组织工程的研究进展

邱荣敏, 梁雁

(广西医科大学口腔医学院儿童牙病科, 广西南宁 530021)

摘要: 石墨烯与丝素蛋白在生物医学中的应用研究众多,但材料本身各自仍存在缺点,故将二者结合以取长补短。本文叙述了两种材料各自的性能和应用,并总结了石墨烯/丝素蛋白复合支架材料的性能、作用及在组织工程中的应用。总结文中研究可知材料复合后理化及生物性能改善,但材料毒性仍存在剂量及时间依赖性,且目前缺乏进一步的动物及临床研究。

关键词: 石墨烯;丝素蛋白;复合材料;组织工程

中图分类号: R782 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2020)04-0509-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-5817.2020.04.024

石墨烯具有独特的理化性质,自问世以来便受到生物医学领域的青睐,但由于生物降解性差、毒性呈剂量依赖等问题而限制其进一步的应用,这些缺点需要通过结合其他生物材料方可解决。丝素蛋白(silk fibroin, SF)作为一种具有许多优点的天然高分子材料,力学性能却不尽人意。近年来,研究者们根据优势互补的原理,将石墨烯材料与SF进行结合获得一种性能更加优越的复合材料,并将其应用于生物医学研究和组织工程领域中。本文将对石墨烯材料/SF复合材料及其在组织工程领域相关研究进展进行总结,并提出了一些设想的挑战和未来的展望。

1 石墨烯性能及应用

石墨烯是一种二维碳纳米材料,因碳原子以 sp^2 杂化轨道排列而呈蜂巢晶格的六角形状^[1],主要分类有氧化石墨烯(graphene oxide, GO)、还原性氧化石墨烯(reduced graphene oxide, RGO)及石墨烯量子点(Graphene quantum dot, GQDs)等。由于石墨烯具有独特的微观结构和良好的理化性能、生物相容性,同时还具有抗菌、抗炎特性^[2-4],现已倍受医学领域的关注。石墨烯被广泛运用于药物/基因载体,提高药物溶解度,延长循环周期,针对性地释放药物^[5];可作为生物学标记物用于血糖、血脂等的检测,具有操作简单、成本低、选择性高等可取之处^[6-7];还可作为生物传感器^[8]。此外,因有优越的促成骨特性,以石墨烯作为支架的研究呈爆发式增长^[9],并被组织工程学高度关注。然而,石墨烯是二维材料,作为支架,功能尚有欠缺,不

能解决三维成形问题;细胞的毒性仍然具有剂量和时间依赖性,并抑制细胞的增殖和分化^[10-11]、抗菌和抗炎性能也因剂量的不同而呈现差别^[12-13];生物降解性相对较低。因此,石墨烯很难单独被制作成可广泛应用的产品,要利用其突出的性能并和具有优势的其他材料进行复合,相互取长补短,获得新型复合材料。

2 丝素蛋白性能及应用

SF是从蚕丝中提取的一种天然高分子蛋白,因容易获取和制作、具有高度的可塑性和良好的生物相容性,现已广泛作为生物缝合线使用。SF的生物降解性可调控,因此可利用不同结晶度的SF负载药物而达到控释效用^[14]。SF因可储存生物分子活性、促进细胞生长等优点而被广泛使用于组织工程领域中,但SF作为支架材料单独应用时机械强度不足,降解速率不确定^[15]、促细胞分化作用不足,在骨组织工程中尤其明显^[16]。此外,抗菌性能低^[17],因此,需要结合其它材料进行改性。

3 石墨烯/SF复合支架材料的性能和作用

由于石墨烯和SF各自存在优缺点,并且性能存在优势互补,学者们尝试将石墨烯与SF制作为石墨烯/SF复合支架材料以期达到最佳的效果。石墨烯/SF复合支架材料的制作方法多种多样,包括逐层组装^[18],或者将石墨烯与SF混合,然后使用冷冻干燥或空气干燥^[19]、静电纺丝^[20]、光化学交联等方法^[21]。这些方法包括了物理结合、化学结合或理化兼之。考虑到理化结合过程繁琐、条件苛刻和化学试剂的使用,一

基金项目: 广西自然科学基金项目(2015GXNSFBA139127);广西医科大学青年科学基金项目(GXMUYSF201320)

第一作者简介: 邱荣敏(1982-),女,博士,副教授,研究方向:口腔医学, E-mail: 9056732@qq.com

些学者尝试了环保、方便的生物合成:Wang Q 等^[22-23]使用喷洒有石墨烯的桑叶饲养家蚕或血管注射法将 GQDs 注入家蚕幼虫体内,可获得力学性能提高的蚕丝纤维。总而言之,在实际的研究中,可以根据不同性能的需求而采取不同方式制作石墨烯/SF 复合支架材料。

石墨烯/SF 复合支架通常在机械强度、热导率、导电率、稳定性方面表现出不同程度的改善,同时还呈现良好的生物相容性。如 Zhang H 等^[24]制备了具有高导电性的复合薄膜,在干、湿两种条件下都具有优异的力学性能,同时具有良好的刚度和韧性平衡。SF 气凝胶因超高孔隙率可以降低热传导而显示出优异的隔热性能,但力学性能差,不利于热管理应用,因此利用湿法纺丝和冷冻干燥与 GO 结合可得到具有相当孔隙率和力学性能显著提高的 SF/GO 气凝胶纤维。除此之外石墨烯还具有红外升温功能,所以也显著改善了气凝胶的加热性能^[25]。良好的力学性能,有助于解决材料的折叠问题,从而使石墨烯/SF 复合支架材料具备了三维成形的功效。

正如上文所述,石墨烯和 SF 均可促进某些特定细胞的增殖和分化,因此,二者结合不仅使性能得到改善,且呈现更佳生物相容性,为细胞的生长提供一个良好的自然微环境,对成骨细胞、成纤维细胞、成软骨细胞和各种干细胞等均起到良好的促进增殖和分化作用。Nalvuran H 等的研究^[26]中发现,采用低浓度 RGO 与 SF 形成纳米复合纤维,材料的热稳定性和力学性能得到了提高;当 RGO 浓度为 1.0 mg/ml 时,RGO/SF 具有最佳的生物相容性,使细胞在支架内有良好的存活率和增殖能力;同样,由 Rodriguez-Lozano FJ 等^[27]制备的 GO 和 SF 复合膜具有良好的生物相容性,SF 增加 GO 或 RGO 表面的粗糙度,使牙周膜干细胞更易于黏附在支架上,促进其生长、增殖和分化。由此可见,石墨烯/SF 复合支架材料能够保障细胞的正常生物学行为,这提示该复合材料在组织工程以及其他生物医学领域将有更加广阔的应用前景。

4 石墨烯/SF 复合支架材料在组织工程的应用

由于石墨烯/SF 复合材料具有良好的性能、三维成形的功能和促细胞生长的能力,目前已作为支架材料,在组织工程研究中作为支架应用,其中骨组织工程研究最为多见。

4.1 骨组织工程的应用 研究表明,将 GO、SF 和羟基磷灰石(HA)共沉积出光滑、均匀的复合薄膜,溶血率分析和血小板黏附试验表明薄膜具有良好的血液相容性,人骨肉瘤 MG63 细胞在该复合膜上具有良好的黏附和增殖行为,碱性磷酸酶 ALP 活性增强,说明此复合材料适用于骨组织工程^[28]。骨形态发生蛋白

(bone morphogenetic protein, BMP)能刺激 DNA 的合成和细胞的复制,从而促进间充质细胞定向分化为成骨细胞。有学者将 BMP-2 多肽 P24 接枝到 GO 上合成了功能化的 GO,并通过静电作用将 GO 覆盖于 SF 合成具有良好生物相容性的复合支架。体外细胞实验证实涂层支架的亲水性、细胞黏附性和增殖效果相比未涂层支架均有所提高;而在动物实验中,P24 功能化的 GO/SF 支架对人工制造的 SD 大鼠颅骨缺损修复和再生的效果最佳,促进了临界骨缺损的骨再生^[29]。

4.2 神经再生组织工程的应用 由于石墨烯材料具有一定的导电性,因此可用于神经组织工程研究。与对照组(纯 SF 支架)相比,rGO 涂层能改善 PC 12 细胞的黏附能力;同时,SF/rGO 支架结合电刺激促进神经表型分化,达到与传统神经生长因子(NGF)处理相当甚至更高的水平^[30]。另一研究表明随着石墨烯含量的增加,干细胞向神经分化程度增加,其机制可能是石墨烯能够传递电刺激信号,刺激神经元的伸展和生长;然而,在同一研究中过量的石墨烯对干细胞的生长和分化都是不利的,这可能是由于高含量的石墨烯所带来的细胞毒性^[31]。因此,复合材料中石墨烯毒性的剂量依赖性仍需探讨。

4.3 牙周组织工程的应用 牙周病和牙外伤等引起牙周组织丧失的问题亟待解决,如何使用牙周膜细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)进行组织再生而形成相关牙周组织,是目前研究的热点。研究表明,将 PDLSCs 放置 GO/SF 和 RGO/SF 复合薄膜上培养,细胞不仅表现出间充质干细胞的多向分化功能,在无须添加成骨培养基或其它生长因子情况下,牙周膜干细胞更是可以向成骨细胞甚至成牙骨质细胞自发分化^[32],提示石墨烯/SF 今后将会在牙周组织再生领域发挥重要的作用,但目前尚缺乏相关的动物模型及临床研究等。

综上所述,石墨烯和 SF 结合后达到相辅相成的效果,不仅理化性能得到改善,能够三维成形,还具有良好的生物相容性,促进细胞增殖、分化。这些优越的性能必使石墨烯/SF 在生物医学和组织工程领域中大放异彩。然而,石墨烯/SF 复合材料中石墨烯的细胞毒性仍然具有剂量和时间依赖性,如何进一步降低毒性有待研究;另外,尚需开展动物模型及临床研究以证实该复合材料的相关应用功效。

参考文献:

- [1] Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films [J]. Science, 2004, 306(5696):666-669.

- [2] He J, Zhu X, Qi Z, et al. Killing dental pathogens using antibacterial graphene oxide [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(9):5605-5611.
- [3] Radunovic M, De Colli M, De Marco P, et al. Graphene oxide enrichment of collagen membranes improves DPSCs differentiation and controls inflammation occurrence [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2017, 105(8):2312-2320.
- [4] Sergej Tomić, Kristina Janjetović, Dušan Mihajlović, et al. Graphene quantum dots suppress proinflammatory T cell responses via autophagy-dependent induction of tolerogenic dendritic cells [J]. *Biomaterials*, 2017, 146: 13-28.
- [5] Li Z, Fan J, Tong C, et al. A smart drug-delivery nanosystem based on carboxylated graphene quantum dots for tumor-targeted chemotherapy [J]. *Nanomedicine(Lond)*, 2019, 14(15):2011-2025.
- [6] Huang Y, Tan J, Cui L, et al. Graphene and Au NPs mediated enzymatic silver deposition for the ultrasensitive electrochemical detection of cholesterol [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 102:560-567.
- [7] Zhou Z, Zhao L, Wang Z, et al. Colorimetric detection of 1,5-anhydroglucitol based on graphene quantum dots and enzyme-catalyzed reaction [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 112:1217-1224.
- [8] Ryu J, Lee E, Lee K, et al. A graphene quantum dots based fluorescent sensor for anthrax biomarker detection and its size dependence [J]. *J Mater Chem B*, 2015, 3(24):4865-4870.
- [9] Nayak TR, Andersen H, Makam VS, et al. Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *ACS Nano*, 2011, 5(6): 4670-4678.
- [10] Pang L, Dai C, Bi L, et al. Biosafety and Antibacterial Ability of Graphene and Graphene Oxide In Vitro and In Vivo [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2017, 12(1):564.
- [11] Cheng X, Wan Q, Pei X. Graphene Family Materials in Bone Tissue Regeneration: Perspectives and Challenges [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2018, 13(1):289.
- [12] Liu S, Zeng TH, Hofmann M, et al. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress [J]. *ACS Nano*, 2011, 5(9):6971-6980.
- [13] Hoyle C, Rivers-Auty J, Lemarchand E, et al. Small, Thin Graphene Oxide Is Anti-inflammatory Activating Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 via Metabolic Reprogramming [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(12): 11949-11962.
- [14] Pignatelli C, Perotto G, Nardini M, et al. Electrospun silk fibroin fibers for storage and controlled release of human platelet lysate [J]. *Acta Biomater*, 2018, 73:365-376.
- [15] Su D, Yao M, Liu J, et al. Enhancing Mechanical Properties of Silk Fibroin Hydrogel through Restricting the Growth of β -Sheet Domains [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(20):17489-17498.
- [16] Midha S, Kumar S, Sharma A, et al. Silk fibroin-bioactive glass based advanced biomaterials: towards patient-specific bone grafts [J]. *Biomed Mater*, 2018, 13(5): 055012.
- [17] Altman GH, Diaz F, Jakuba C, et al. Silk-based biomaterials [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(3):401-416.
- [18] Hu K, Gupta MK, Kulkarni DD, et al. Ultra-robust graphene oxide-silk fibroin nanocomposite membranes [J]. *Adv Mater*, 2013, 25(16):2301-2307.
- [19] Wang S, Ma Q, Wang K, et al. Strong and biocompatible three-dimensional porous silk fibroin/graphene oxide scaffold prepared by phase separation [J]. *Int Biol Macromol*, 2018(111):237-246.
- [20] Wang SD, Ma Q, Wang K, et al. Improving Antibacterial Activity and Biocompatibility of Bioinspired Electrospinning Silk Fibroin Nanofibers Modified by Graphene Oxide [J]. *ACS Omega*, 2018, 3(1):406-413.
- [21] Balu R, Reeder S, Knott R, et al. Tough Photocrosslinked Silk Fibroin/Graphene Oxide Nanocomposite Hydrogels [J]. *Langmuir*, 2018, 34(31):9238-9251.
- [22] Wang Q, Wang C, Zhang M, et al. Feeding Single-Walled Carbon Nanotubes or Graphene to Silkworms for Reinforced Silk Fibers [J]. *Nano Lett*, 2016, 16(10):6695-6700.
- [23] Ma L, Akurugu MA, Andoh V, et al. Intrinsically reinforced silks obtained by incorporation of graphene quantum dots into silkworms [J]. *Sci China Mater*, 2019, 62(2):245-255.
- [24] Zhang H, Zhao J, Xing T, et al. Fabrication of Silk Fibroin/Graphene Film with High Electrical Conductivity and Humidity Sensitivity [J]. *Polymers (Basel)*, 2019, 11(11):1774.
- [25] Wang Z, Yang H, Li Y, et al. Robust Silk Fibroin/Graphene Oxide Aerogel Fiber for Radiative Heating Textiles [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(13): 15726-15736.
- [26] Nalvuran H, Elçin AE, Elçin YM. Nanofibrous silk fibroin/reduced graphene oxide scaffolds for tissue engineering and cell culture applications [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 114:77-84.

- cinoma and pathologic factors on diffusion-weighted MRI at 3.0 Tesla[J]. *J Magn Reson Imaging*, 2015, 41(1): 175-182.
- [11] Sheth D, Abe H. Abbreviated MRI and Accelerated MRI for Screening and Diagnosis of Breast Cancer[J]. *Top Magn Reson Imaging*, 2017, 26(5): 183-189.
- [12] Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(S3): 43-46.
- [13] Bui E, Belli P, Costantini M, et al. Role of the Apparent Diffusion Coefficient in the Prediction of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients With Locally Advanced Breast Cancer[J]. *Clin Breast Cancer*, 2015, 15(5): 370-380.
- [14] 秦明明, 冯钢, 章健, 等. HMGA1 mRNA 在乳腺癌中的表达及临床价值[J]. *右江民族医学院学报*, 2018, 40(3): 223-226.
- [15] Maxwell AJ, Lim YY, Hurley E, et al. False-negative MRI breast screening in high-risk women[J]. *Clin Radiol*, 2017, 72(3): 207-216.
- [16] Monticciolo DL. Practical Considerations for the Use of Breast MRI for Breast Cancer Evaluation in the Preoperative Setting[J]. *Acad Radiol*, 2017, 24(11): 1447-1450.
- [17] Leong KM, Lau P, Ramadan S. Utilisation of MR spectroscopy and diffusion weighted imaging in predicting and monitoring of breast cancer response to chemotherapy [J]. *J Med Imaging Radiat Oncol*, 2015, 59(3): 268-277.
- [18] 温栋梁. 磁共振动态增强扫描联合磁共振扩散加权成像在乳腺癌患者诊断中的应用价值[J]. *实用医学影像杂志*, 2018, 19(2): 131-133.
- [19] 张晖, 单春辉, 王勇. 磁共振动态对比增强及扩散加权成像技术在诊断和预估乳腺癌复发中的价值[J]. *磁共振成像*, 2017, 8(11): 827-833.
- [20] Banaie M, Soltanian-Zadeh H, Saligheh-Rad HR, et al. Spatiotemporal features of DCE-MRI for breast cancer diagnosis[J]. *Comput Meth Prog Bio*, 2018, 155: 153-164.
- [21] Kousi E, Smith J, Ledger AE, et al. Quantitative evaluation of contrast agent uptake in standard fat-suppressed dynamic contrast-enhanced MRI examinations of the breast[J]. *Med Phys*, 2018, 45(1): 287-296.
- [22] Uematsu T. MRI findings of inflammatory breast cancer, locally advanced breast cancer, and acute mastitis: T2-weighted images can increase the specificity of inflammatory breast cancer[J]. *Breast Cancer*, 2012, 19(4): 289-294.
- [23] Palma G, Frasci G, Chirico A, et al. Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29): 26560-26574.
- [24] 吴津民, 王海宝, 徐丽艳, 等. 多模态磁共振成像在乳腺癌诊断中的应用价值[J]. *安徽医学*, 2017, 38(8): 963-965.
- [25] Price ER, Wong J, Mukhtar R, et al. How to use magnetic resonance imaging following neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer[J]. *World J Clin Cases*, 2015, 3(7): 607-613.

收稿日期: 2019-11-04; 修回日期: 2019-11-19

(上接第 511 页)

- [27] Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, Aznar-Cervantes S, et al. Effects of composite films of silk fibroin and graphene oxide on the proliferation, cell viability and mesenchymal phenotype of periodontal ligament stem cells [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2014, 25(12): 2731-2741.
- [28] Ming LI, Pan X, Maosong MO, et al. Electrophoretic-deposited novel ternary silk fibroin/graphene oxide/hydroxyapatite nanocomposite coatings on titanium substrate for orthopedic applications [J]. *Frontiers of Materials Science*, 2016, 10(3): 1-11.
- [29] Wu J, Zheng A, Liu Y, et al. Enhanced bone regeneration of the silk fibroin electrospun scaffolds through the modification of the graphene oxide functionalized by BMP-2 peptide [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 733-751.
- [30] Aznar-Cervantes S, Pagán A, Martínez JG, et al. Electrospun silk fibroin scaffolds coated with reduced graphene promote neurite outgrowth of PC-12 cells under electrical stimulation [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 79: 315-325.
- [31] Niu Y, Chen X, Yao D, et al. Enhancing neural differentiation of induced pluripotent stem cells by conductive graphene/silk fibroin films [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2018, 106(11): 2973-2983.
- [32] Vera-Sánchez M, Aznar-Cervantes S, Jover E, et al. Silk-Fibroin and Graphene Oxide Composites Promote Human Periodontal Ligament Stem Cell Spontaneous Differentiation into Osteo/Cementoblast-Like Cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(22): 1742-1754.

收稿日期: 2020-05-28; 修回日期: 2020-06-08