

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.01.023

自固化载硒纳米微球/磷酸钙复合骨 修复材料的制备及性能

张 驰¹, 吴海燕², 冉 青², 商龙臣¹, 李光大³, 刘信平²

(1. 湖北民族学院生物科学与技术学院, 恩施 445000; 2. 湖北民族学院化学与环境工程学院, 恩施 445000;
3. 河南科技大学医学技术与工程学院, 洛阳 471003)

摘 要: 研究制备具有促修复、抗肿瘤的注射缓释硒纳米微球复合磷酸钙骨水泥材料. 采用乳化交联法制备 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 缓释硒纳米微球, 将微球与磷酸钙骨水泥(CPC)复合, 制备 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}/\text{CPC}$ 骨修复系统, 对该系统的固化时间、力学强度、缓释硒及降解性能、形貌、晶相构成进行测定和表征分析, 并对其体外细胞活性进行研究. 结果表明: 相对于纯的 CPC, 当掺入 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 纳米微球的量为 4% 时, 复合 CPC 的注射性良好, 固化时间 5.75~11.5 min, 固化强度提高, 微观结构显示 CPC 均匀地包裹在壳聚糖微球表面并形成了针片状 HA 晶体, 微球的添加对复合 CPC 材料的晶相组分无显著影响, 缓释硒效应良好, 有效缓释达 22 d, 降解性优于纯 CPC, 形成了蜂窝状完善的网状三维立体多孔结构, 利于组织细胞和血管及神经的黏附长入. 体外细胞实验表明, 复合 CPC 对人乳腺癌细胞 MCF-7 及 MG-63 人骨肉瘤细胞增生的抑制作用显著, 且对两株细胞增生的抑制性差异不显著. 本研究为非承重骨微创、缺陷修复及骨肿瘤的术后恢复、防止复发和转移的预防和治疗提供一种新思路, 同时为拓展功能元素硒的合理应用奠定实验基础.

关键词: 磷酸钙骨水泥; 壳聚糖微球; 硒; 建构; 性能

中图分类号: O611.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2019)01-0125-10

Construction and properties of self-solidified combined bone repair system with loaded selenium nanospheres/calcium phosphate

ZHANG Chi¹, WU Hai-Yan², RAN Qing², SHANG Long-Chen¹, LI Guang-Da³, LIU Xin-Ping²

(1. College of Biological Science and Technology, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China;

2. College of Chemistry and Environment Engineering, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China;

3. College of Medical Technology and Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: The study was to prepare composite calcium phosphate cement with improved repair and anti-tumor injectable sustained-release selenium nanoparticle. $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ sustained release selenium nanospheres were prepared by emulsification and crosslinking method. The microspheres were combined with calcium phosphate cement (CPC) to prepare the $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}/\text{CPC}$ bone repair system. The curing time, mechanical strength, sustained release selenium and degradation properties, morphology and phase composition of the system were measured and characterized, and the activity of the cells in vitro

收稿日期: 2018-10-07

基金项目: 国家自然科学基金(21461009, 81402225)

作者简介: 张驰(1965-), 男, 教授, 硕士, 从事功能元素硒材料的研发. E-mail: zhtzu@163.com

通讯作者: 刘信平. E-mail: xingping-liu@163.com

was studied. The results showed that compared with pure CPC, when the amount of $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ nano microspheres was 4 %, the injection of composite CPC was good, the curing time was 5.75–11.5 minutes and the curing strength was improved. The microstructure showed that CPC was evenly wrapped on the surface of chitosan microspheres and formed a needle like HA crystal. The addition of the microspheres to the crystalline phase of the composite CPC material had no significant effect in the components. The sustained release selenium effect was good, the effective release was 22 d, and the degradation was better than the pure CPC. The honeycomb like three-dimensional porous structure of the network was formed, which was beneficial to the adhesion of tissue cells and blood vessels and nerves. In vitro cell test showed that the inhibitory effect of compound CPC on the proliferations of MCF-7 and MG-63 human osteosarcoma cells in human breast cancer cells was significant, and the inhibitory difference between the two cell proliferations was not significant. This study provided a new idea for non-bone bearing minimally invasive, defect repair and postoperative recovery of bone tumors, prevention and treatment of recurrence and metastasis, and provided an experimental basis for the rational application of functional element selenium.

Keywords: Calcium phosphate cement; Chitosan microsphere; Selenium; Construct; Property

1 引言

因感染、肿瘤等各种先天性疾病术后造成的骨缺损常需人工植骨材料修复。设计制备促修复、抗菌抗肿瘤骨修复生物活性材料是当前乃至今后一段时间内临床用人工植骨材料研发的主要目标之一^[1-4]。近代研究证实：人体必需微量元素硒不仅具有抗肿瘤、抗氧化、抗菌、提高免疫力等广泛的生物学功能和药理作用^[5-8]，而且人体内的硒水平更是与骨骼健康密切相关。含硒植骨材料因具有促进骨修复、抗肿瘤、抗菌等生物活性，成为当前关注热点。硒可降低一些药物（如阿那曲唑、抗甲状腺药甲巯基咪唑）对骨骼的侵害，保护骨骼^[9,10]。Wang 等制备的含 SeO_3^{2-} 羟基磷灰石支架，修复大鼠颅骨缺损，效果明显优于不含硒的对照组^[11]。Rodriguez-Valencia 等在金属植入物表面沉积含硒 HA 涂层，当硒含量适当时能增殖前成骨细胞，同时能抑制铜绿假单胞菌和金色葡萄球菌形成菌膜^[12]。镀纳米硒层的钛可抑制金色葡萄球菌生长，防止菌膜形成^[13-15]。壳聚糖包裹的镀硒钛纳米管能显著抑制大肠杆菌生长^[16]。在骨肿瘤的治疗和预防领域，硒作用显著。Wang 等研究表明茶叶中富硒活性成分能显著抑制人骨肉瘤细胞生长，并显著减小骨肉瘤荷瘤老鼠瘤体^[17]。Zhou 等研究结果显示掺硒后的四氧化三铁对人成骨肉瘤 MG-63 细胞即显示出较强毒性^[10]。Tran 和 Wang 两个课题组的研究都表明，将能释放活性硒的镀有纳米硒涂层的钛植入体与

正常成骨细胞和骨肿瘤细胞共同培养时，材料能在促进正常细胞增殖的同时显著抑制骨肿瘤细胞的生长^[18,19]。

因此，含硒植骨材料有着广阔的骨科微创修复应用前景。但目前这方面研究尚处于非常初级阶段，而且硒与其他功能元素一样是把双刃剑^[20-21]，适量有益，超量有害。简单的表面直接涂层硒化物的载硒方式不能有效控制硒的释放量，突释效应使得短时间内硒释放量过大，不仅不能有效促进正常细胞增长、抑制肿瘤细胞增殖，反而会对细胞/组织造成严重中毒破坏。怎样让硒长时间内缓慢地释放有效作用浓度是直接影响该类材料临床应用的关键因素。本文以天然 CS (Chitosan, 壳聚糖) 为壁材，制备纳米 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 缓释硒微球，将微球与磷酸钙骨水泥基质复合，制备可注射、自固化的载硒纳米微球复合 CPC 骨修复材料，以期使功能性硒元素在骨修复时能长时间持续缓慢地释放有效作用浓度，为临床上骨修复时辅助治疗及防止肿瘤复发和转移提供一种新思路及实验依据，为硒活性功能的合理利用开发新用途。

2 实验方法

材料与主要试剂、仪器包括：CS(上海伯奥生物科技有限公司，脱乙酰度>90%)、乙酸、HCl、戊二醛、液体石蜡、Span-80、石油醚、丙酮、无水乙醇、NaCl、 NaHCO_3 、KCl、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 NaH_2PO_4 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 、 Na_2SO_4 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot$

4H₂O、(NH₄)₂HPO₄、CaCO₃、DCPD(二水磷酸氢钙)、三羟甲基氨基甲烷、硒标准溶液(100 μg/mL, 中国计量科学研究院), 所有药品和试剂均为 AR 或 GR; 微波消解仪(CEM Corporation, 美国)、pH 计(PHSJ-3F, 上海精密科学仪器有限公司)、AFS-9760 双道原子荧光光度计(北京海光仪器公司)、SEM 扫描电镜(JSM-7001F, 日本)、酶标仪(Thermo Fisher Scientific 美国)、超净工作台(苏州苏杰净化设备有限公司)、X 射线衍射仪(MAXima XRD-7000 型, 日本岛津)、行星式球磨机(AM-100)、激光粒径仪(Zetasizer Nano ZSP, 英国)、万能材料试验仪(HY-1080)。

2.1 材料的制备

α -TCP 的制备: 采用共沉淀法。称取 35.780 g Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 和 13.339 g (NH₄)₂HPO₄ 各自加水溶解并定容至 1000 mL。37 °C 水浴、磁力搅拌条件下, 将配制的 1000 mL Ca(NO₃)₂ 溶液逐滴加入到 (NH₄)₂HPO₄ 溶液中, 继续搅拌 4 h 直至反应完全。在此过程中, 以氨水调节 pH 使整个反应过程中体系的 pH 保持在 8.0~10.0 范围。调节水浴温度至 40 °C, 静置过夜, 分别用蒸馏水和无水乙醇抽滤洗涤数次。将所得固体粉末于 100 °C 烘箱中烘干后, 置于管式炉中, 1300 °C 条件下煅烧 2 h, 取出急冷, 小型粉碎机粉碎, 再将粉体用变频行星式球磨机球磨 8 h, 激光粒径仪测得其平均粒径为 20 nm, 得到粒径范围在 10~30 nm 的 α -TCP 粉体。

Na₂SeO₃/CS 纳米缓释硒微球的制备^[22]: 25 mL Span-80 于 500 mL 烧杯中, 加入 475 mL 液体石蜡, 磁力搅拌混匀, 为微球制备所用油相; 磁力搅拌下, 将 0.05 g Na₂SeO₃ 完全溶解于 50 mL 的醋酸(1 % (v/v)) 溶液后, 再加入 1.0 g 壳聚糖, 搅拌溶解得制备微球所用水相; 取 50 mL 油相于 100 mL 烧杯中, 磁力搅拌(转速为 1000 rpm) 下将 10 mL 水相逐滴加入油相, 加完继续 25 °C 乳化 30 min 后, 转移至 50 °C 的水浴锅中, 保持搅拌速度不变, 滴加 0.2 mL 交联剂(25 % 的戊二醛) 反应 10 min 后, 加入 25 mL 丙酮破乳, 减压过滤, 并先后以丙酮和无水乙醇抽滤洗涤数次, 40 °C 烘干, 得到形状独立完整、无粘连、外形光滑、平均粒径 20 μm、缓释性能良好、包封率和载药量分别为 69.45 % 和 5.21 % 的 Na₂SeO₃/CS 纳米微球。

基质 CPC 的调制: 将 AR 纯 CaCO₃ 和 DCPD

粉体分别用球磨机球磨 7 h, 激光粒径仪测得其平均粒径为 20 nm, 粒径范围在 10~30 nm 的原料。按摩尔比 α -TCP : CaCO₃ : DCPD = 0.90 : 0.05 : 0.05 的比例配制 CPC 基质粉体。

Na₂SeO₃/CS/TCP 纳米复合 CPC 材料的制备: 0.25 mol/L 的 NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 混合溶液作为调和液, 将 Na₂SeO₃/CS 纳米缓释硒微球按质量分数 0 %、1 %、2 % 和 4 % 添加到 CPC 基质中, 充分混匀配制成含硒量不同的复合粉体, CPC 复合粉体与调和液按液固比 L/P = 0.7 mL/g 进行固液调和形成均匀浆体, 然后置于聚四氟乙烯模具(Φ16 mm × 10 mm) 中, 抹平两端固化, 再将其在 37 °C 和 100 % 相对湿度环境下养护 24 h, 养护结束取出, 室温自然干燥得目标产品。

2.2 样品的测试和表征

2.2.1 可注射性、固化时间、抗压能力的测定 参照文献[23]测注射能力系数法测定 Na₂SeO₃/CS/TCP 复合 CPC 材料的可注射性。选取内径 20 mm、注射针内径 2 mm 的 20 mL 一次性注射器, 将一定量搅均匀的复合 CPC 浆体填入注射器中, 以 2 kg 的重物垂直压在活塞上以挤出骨水泥, 以 2 min 内被挤出骨水泥的重量占填入的总骨水泥重量的百分比来表征可注射性。

采用 Gillmore 双针法^[24]的维卡仪测定试样固化时间, 采用电子万能力学试验机测试铸模成 Φ16 mm × 10 mm 圆柱体样品的抗压强度。

2.2.2 物相、微观形貌的测定 用 X 射线衍射仪测定样品的物相组分, SEM 扫描电子显微镜对复合 CPC 样品体外释硒实验前、后的形貌进行检测; 双道原子荧光法测定硒含量, 并根据公式 1、2 计算微球的包封率和载药量:

$$\text{包封率} = \frac{\text{微球中硒的质量}}{\text{投入硒的质量}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{载药量} = \frac{\text{微球中硒的质量}}{\text{微球的质量}} \times 100\% \quad (2)$$

2.2.3 缓释硒能力和降解性测定 将样品材料在 37 °C 密闭环境中养护 24 h, 取 5.0 g 置于 10 mL SBF 模拟体液中, SBF 液温度恒定 37 °C, 在缓释 0.5、1、2、4、6、10、14、26 h 时各取样 1 次, 之后每隔 24 h 取样一次, 每次取出缓释液 4 mL, 并同时补加同体积和温度的 SBF, 用原子荧光光度计测缓释液的硒含量, 同时检测缓释液的 pH、Ca²⁺ 量。

2.2.4 样品的体外抗肿瘤活性检测 以乳腺癌细胞 MCF-7、人骨肉瘤 MG-63 为细胞模型, 采用

CCK-8 法^[25] 检测材料体外抗肿瘤活性, SPSS 20.0 软件进行统计处理。

测试样品液: 取 1.0 g 复合 CPC 材料 4 份, 置于 10 mL 具塞样品管中, 紫外照射 30 min 后, 每管加入 6 mL 细胞培养液摇匀, 移至 37 °C 培养箱中缓释。第 1 份缓释 0.5 h、第 2 份缓释 3 h、第 3 份缓释 10 h、第 4 份缓释 50 h。缓释结束, 离心取上清液, 0.2 μm 的微孔滤膜过滤除菌备用。

取出液氮罐中冻存的人乳腺癌 MCF-7、人骨肉瘤 MG-63 细胞进行复苏-传代-培养, 直至细胞呈对数生长期, 用 2.5 mg/mL 胰蛋白酶消化后制成细胞悬液, 以细胞计数板对其计数, 调整细胞浓度至 4.375×10^4 个/mL, 接种至 96 孔板中, 每孔 200 μL, 放入培养箱中预培养 24 h。取出, 吸去培养液, 将不同缓释时间的样品液各 200 μL 加入到 96 孔板中, 每个试样设置 3 个复孔, 同时设置对照孔和空白孔。将培养板转移至培养箱中分别培养 24、48 和 72 h 后, 每孔加入 20 μL CCK-8 试剂, 培养箱孵育 40 min 取出, 酶标仪测定其在 450 nm 处的吸光度, 计算各试样对人乳腺癌细胞 MCF-7、人骨肉瘤 MG-63 的生长抑制率, 以 SPSS 20.0 软件进行试验数据的统计分析处理, 采用单因素方差分析比较组间差异的显著性水平, 抑制率按公式(3)计算。

$$\text{抑制率} = [(Ac - As) / (Ac - Ab)] \times 100\% \quad (3)$$

其中, A_s 为实验孔的吸光度; A_c 为对照孔的吸光度; A_b 为空白孔的吸光度。

3 结果与分析

3.1 可注射性、固化时间和抗压性能

表 1 是用医用注射器测量的掺入不同含量 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 纳米微球复合 CPC 的可注射性。由表 1 可知, 随着复合 CPC 中 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 微球含量的增加, 浆体的粘度逐渐变小, 可注射性逐渐增加, 相对于未添加微球的对照组 CPC, 复合骨水泥的可注射性随着掺入 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 微球量的增加呈现一定增大, 加入质量分数 1%、2%、4% 的 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 微球复合的 CPC 分别为 $87.9 \pm 3.38\%$ 、 $91.3 \pm 5.14\%$ 、 $92.1 \pm 4.62\%$, 注射测试中, 未出现明显分层或硬膏从注射器中挤出现象, 但当加入微球的量达到 5% 时, 复合 CPC 挤出时出现微弱的硬膏现象, 再继续加大掺入 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 微球的量, 注射时硬膏现象更明显。

表 1 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}/\text{TCP}$ 复合 CPC 的可注射性

Tab. 1 Injectability of $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}/\text{TCP}$ composite CPC

No.	微球含量(%)	Injectability
1	0	84.6 ± 4.12
2	1	87.9 ± 3.38
3	2	91.3 ± 5.14
4	4	92.1 ± 4.62

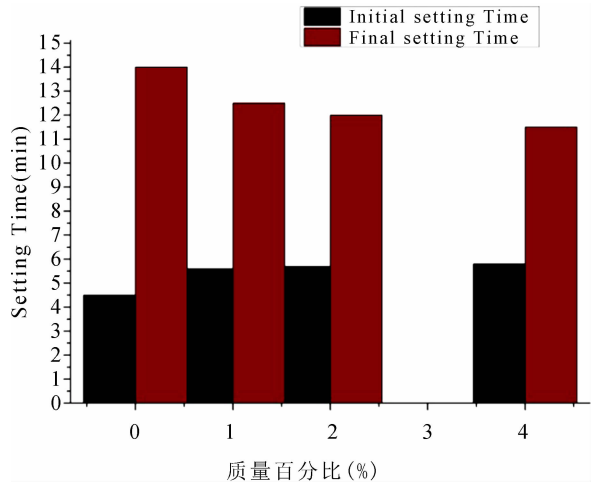


图 1 不同含量 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 纳米微球复合 CPC 的固化时间

Fig. 1 Effect of content different $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ Microspheres on coagulation time of composite CPC

图 1 为不同含量 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 微球复合 CPC 的固化时间, 由图 1 可知, 同纯 CPC 的固化时间 $T_i = 4.5$ min, $T_f = 14$ min 相比, 含 1%、2%、4% $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 微球的复合 CPC 的 T_i 分别为 5.6、5.7、5.75 min, T_f 分别为 12.5、12、11.5 min, 即 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 微球的添加对 CPC 初凝时间稍有延长, 而终凝时间略微缩短。这可能是因为, 复合 CPC 固相中, CPC 纳米粉体包裹于 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 微球, 使得 CPC 粉体间相对空间有所增大, 调和液刚开始加入时固-液接触面小些, 增大了液体在固材表面吸附和润湿时间, 致使 T_i 有所增大, 随着润湿过程结束, 由于 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 具有的促进 CPC 凝固的作用^[26], 使得复合 CPC 的凝固速度在一定的时间内有所增加, 且随着壳聚糖微球量的增加, T_f 呈一定降低趋势。 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 微球的掺入对复合 CPC 的固化时间略有缩短, 符合临床手术要求。

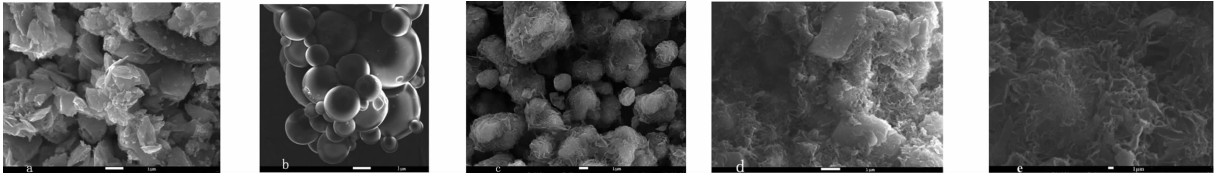


图 2 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 微球、纯 CPC、复合 CPC 的缓释前后 SEM 图: a-空白 CPC 的 SEM 图; b- $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 纳米微球的 SEM 图; c-复合 CPC 的 SEM 图; d-空白 CPC 缓释后的 SEM 图; e-复合 CPC 缓释后的 SEM 图

Fig. 2 Pictures of SEM for $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ microsphere and blank CPC and composite CPC fore-and-aft sustained release: a-SEM picture of blank CPC; b-SEM picture of $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ microsphere; c-SEM picture of composite CPC; d-SEM picture of blank CPC after sustained release; e-SEM picture of composite CPC after sustained release

电子万能力学试验机测得, 纯 CPC、含 1%、2%、4% $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 微球的复合 CPC 的抗压强度分别为: 71.22、86.11、91.34、98.22 MPa, $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 微球的添加提高了材料的抗压能力, 且与微球掺入量呈正相关. 这可能一方面为 CPC 基质的几种粉体的粒径均为粒径为 20 nm 左右的小颗粒, 颗粒粒度相匹配, 表面积大, 相互间接触充分, 使得 CPC 水化反应充分, 水化产物量多, 晶体接触点多, 达到紧密的堆积, 另外 CS 具有一定的促凝作用, 能与 Ca^{2+} 、羟基磷灰石之间形成链内及链间紧密结合的螯合物, 对其机械性能起到了良好的作用, 使得复合 CPC 抗压性增强.

3.2 SEM 扫描电镜及降解性分析

采用均相包埋的方式, 将载硒壳聚糖微球包埋于磷酸钙骨水泥中, 固化 24 h 后取出压断, 电镜扫描观察其断面结构, 同时对材料在 SBF 模拟体液中缓释 22 d 后进行断面结构电镜扫描观察, 复合 CPC 材料缓释前后 SEM 扫描结果见图 2.

由图 2 可知, a 图显示纯 CPC 表面形成了较规整的针片状 HA 晶体, 当将圆滑的 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 纳米微球(图 b)掺入 CPC 得到的复合 CPC, 其形貌 c 图可看出, 骨水泥基质粉体将微球均相包埋, 表面基本上形成的是针状 HA 晶体. 材料在 SBF 模拟体液中浸泡 22 d, 空白 CPC(d 图)降解显著, 部分形成了一定的立体孔隙, 而 e 图显示, 复合 CPC 缓释后形成了蜂窝状完善的网状三维立体多孔结构, 说明微球的缓释、粒子的溶出, 有利于孔隙的形成. 这样的降解结构将非常有利于组织细胞黏附生长和血管及神经长入、细胞外基质沉积、营养和氧气进入、代谢产物排出. 即纳米复合 CPC 材料表面的这种特异微纳结构将促使其具有良好的细胞生物学效应和成骨活性.

3.3 XRD 物相衍射分析

纯 CPC、不同含量 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 微球的复合 CPC 及各样品缓释后的 XRD 物相衍射图如 3.

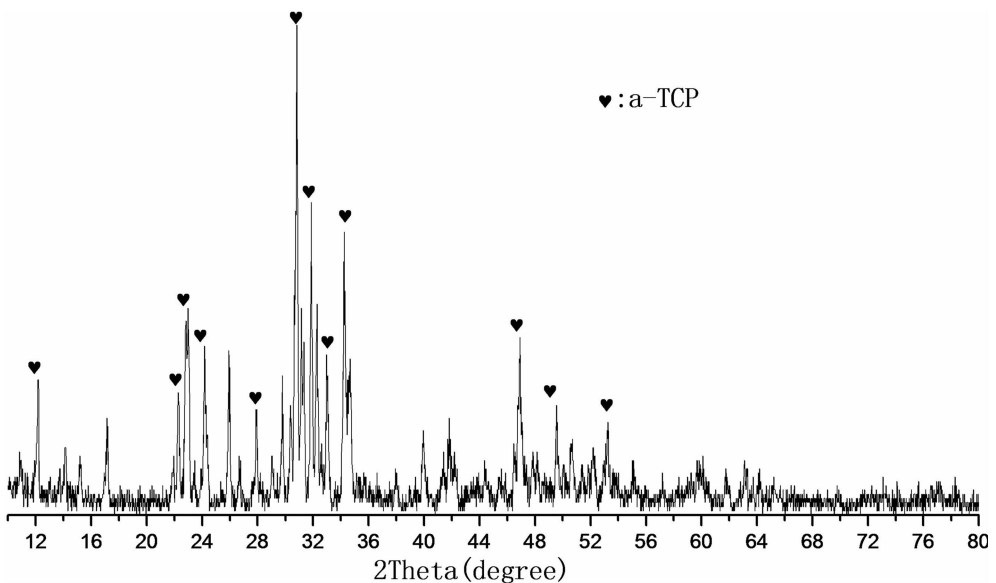


图 3 a-TCP 的 XRD 图谱
Fig. 3 XRD pattern of a-TCP

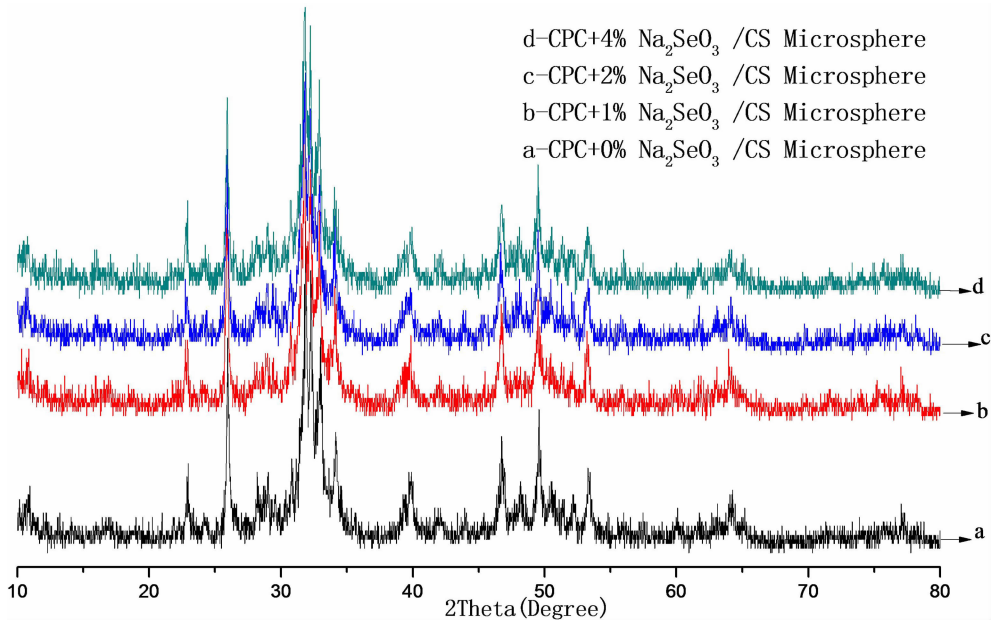


图 4 含不同微球量的复合 CPC 的 XRD 曲线

Fig. 4 XRD patterns of compositel CPC with different contents of $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ Microsphere

对照标准图谱 PDF-29-0359 发现, 图 3 的 XRD 相图主要是 α -TCP 的特征峰, 因此自制的 CPC 粉体主要组分 α -TCP 粉末纯度较高. 图 4 显示, 在 CPC 中掺入不同量 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 微球, XRD 曲线的特征峰与纯 CPC 的相比没有明显差异, 只是随着微球掺量的增加, 峰高度略微升高, 说明微球加入不会影响复合 CPC 材料的晶相成分, 峰高微小升高可能是高分子 CS 使得 CPC 结

晶度提高造成的. 由图 5、6 可知, 纯 CPC 和复合 CPC 固化后均呈现了几种粉体组物质 (α -TCP、 CaCO_3 、DCPD) 以及晶种 HA 的特征峰, 而缓释后 α -TCP 的特征峰消失, HA 特征峰增强, 未发现其它新物质的峰, 说明 α -TCP 全部降解为 HA, $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 微球的加入对水化终产物的成分没有影响.

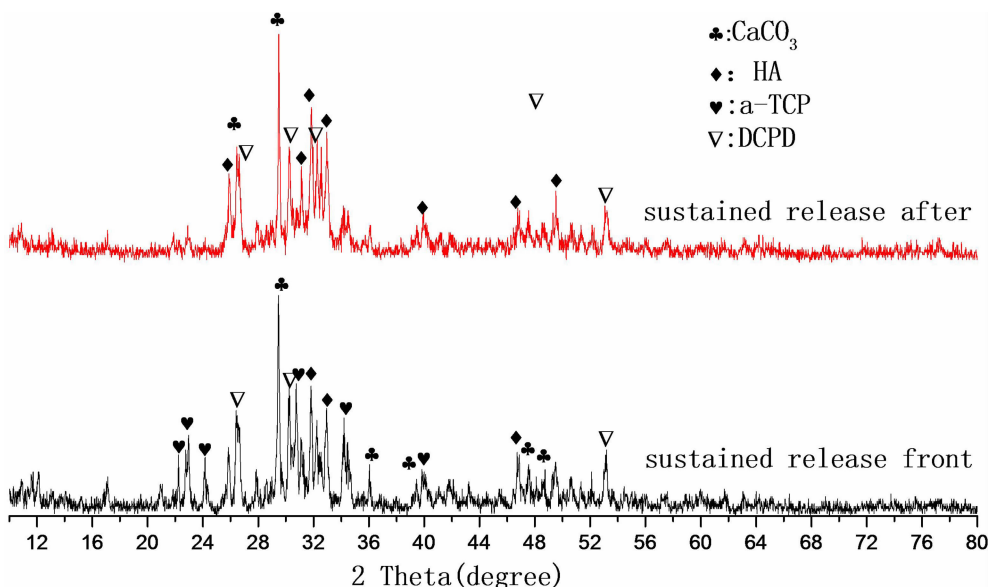


图 5 纯 CPC 缓释前后的 XRD 图谱

Fig. 5 XRD patterns of sustained release fore-and-aft for CPC

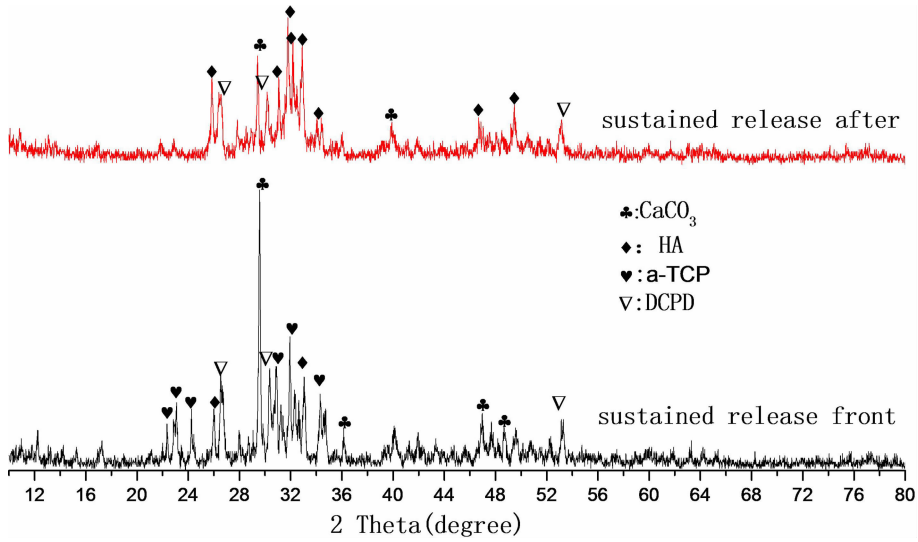


图 6 复合 CPC 缓释前后的 XRD 曲线图
 Fig. 6 XRD patterns of Release fore-and-aft of composite CPC

3.4 缓释能力的检测及分析

复合 CPC 在 SBF 模拟溶液中缓释硒的效果、缓释过程中 Ca^{2+} 浓度及 PH 变化分别如图 7~9 所示. 由图 7 可知, 纳米复合 CPC 具有明显的缓释硒效应, 但弱于 Na_2SeO_3/CS 微球的, 这说明微球壁和 CPC 壁的双重壁垒对硒的缓释起到了很好的调控作用. 缓释过程分 4 个阶段, 第 1 阶段为材料在浸入 SBF 溶液的 0.5 h 内呈现小的短期突释, 硒的累计释放率达到 3.666%, 这是由材料外围的微球表面上依附的易溶性 Na_2SeO_3 粒子迅速溶解扩散至溶液中所致; 第 2 阶段是 0.5~10 h 区间, 缓释趋于平稳上升期, 累计缓释时间与累计释放率呈正的线性相关, 10 h 时累计释放率达

4.49%, 此为扩散机制控制, 包裹于微球中的 Na_2SeO_3 通过微球 CS 壁的溶胀、CPC 的水化反应、微球表面 Na_2SeO_3 溶迁后留下的微隙等途径, 从球壁逐渐扩散到溶剂, 实现硒的缓释; 第 3 阶段为 10~120 h 时间范围, 硒缓释速率较上阶段有所减缓, 120 h 的累计释放率为 5.93%, 第 4 阶段即 120 h 以后, 释放效应非常微弱, 400 h 时累计释放率 6.14%, 530 h 只有 6.16%. 3、4 阶段的缓释任为扩散机制控制, 但随着 CPC 水化反应生成的 HA 沉积于材料表面, 使 Na_2SeO_3 迁移受阻, 缓释速率与沉积的 HA 量呈负相关, 在当材料水化至形成坚固的三维立体网状结构时, 使 Na_2SeO_3 的扩散严重受抑, 释放非常微弱.

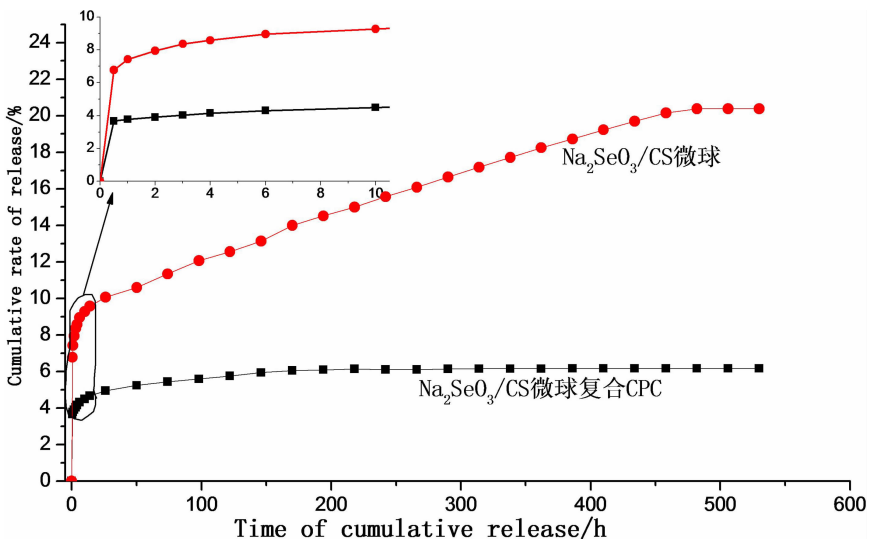


图 7 Na_2SeO_3/CS 微球、复合 CPC 材料的硒缓释曲线
 Fig. 7 Sustained release curve of Na_2SeO_3/CS microsphere and composite CPC

PH 值的变化能敏感反映溶液中各物质成分情况的变化, Ca^{2+} 浓度变化体现 CPC 材料在 SBF 模拟体液中降解速率. 由图 8 可知, 引起溶液的 PH 值变化, 复合 CPC 和空白 CPC 材料浸泡在 SBF 溶液中时 PH 值变化曲线的形态相似, 均为起初的 6 h 内呈现较大幅度减小(空白 PH 从 7.33 至 7.16, 复合 PCP 的 PH 从 7.35 至 7.21), 6 h 是最低拐点, 紧接着是短期内的大幅度升高(6~

50 h 时间段空白 PH 从 7.16 至 7.36, 6~27 h 时间段复合 PCP 的 PH 从 7.21 至 7.37), 随后又是短时期小幅度的降低(50~74 h 空白 PH 从 7.38 至 7.35, 26~74 h 复合 PCP 的 PH 从 7.37 至 7.34)、升高(74~120 h 时间范围内, 空白的 PH 从 7.33 至 7.16、复合 PCP 的 PH 从 7.34 至 7.4)过程, 120 h 后 PH 值稳定在 7.4 附近趋于平衡, 只是具体的 PH 数值和时间分布有所差异.

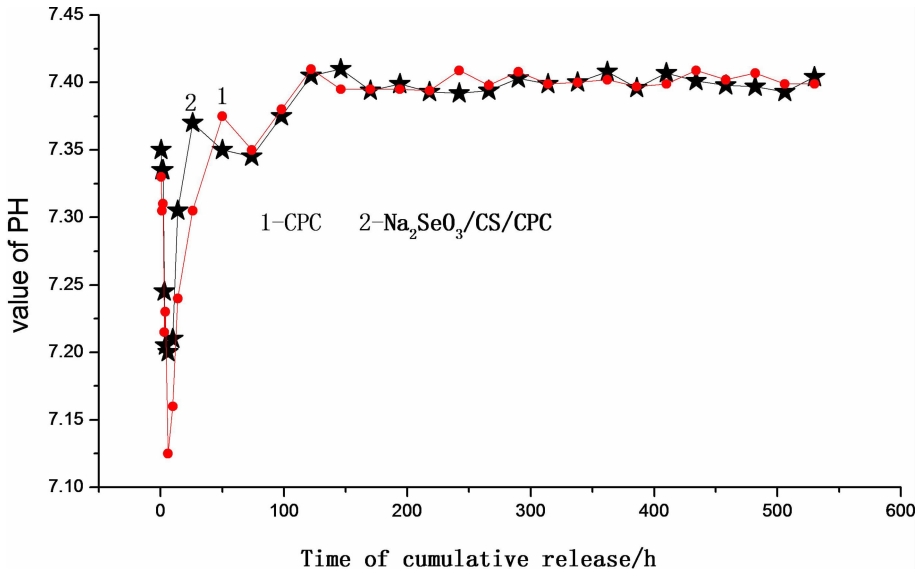


图 8 $Na_2SeO_3/CS/CPC$ 缓释过程中介质的 PH 变化曲线

Fig. 8 PH Curve of during the sustained release process of $Na_2SeO_3/CS/CPC$

图 9 材料浸泡在 SBF 溶液中 Ca^{2+} 浓度的变化与溶液中 PH 值的变化相一致, 0~10 h Ca^{2+} 迅速增加到 0.005 82 mol/L, 10~120 h 时间段 Ca^{2+} 逐

渐降低至 0.003 53 mol/L, 120 h 以后溶液中 Ca^{2+} 浓度趋于稳定, 在 0.0034 mol/L 附近平衡. 说明材料的水化反应主要集中在 10 h 内进行.

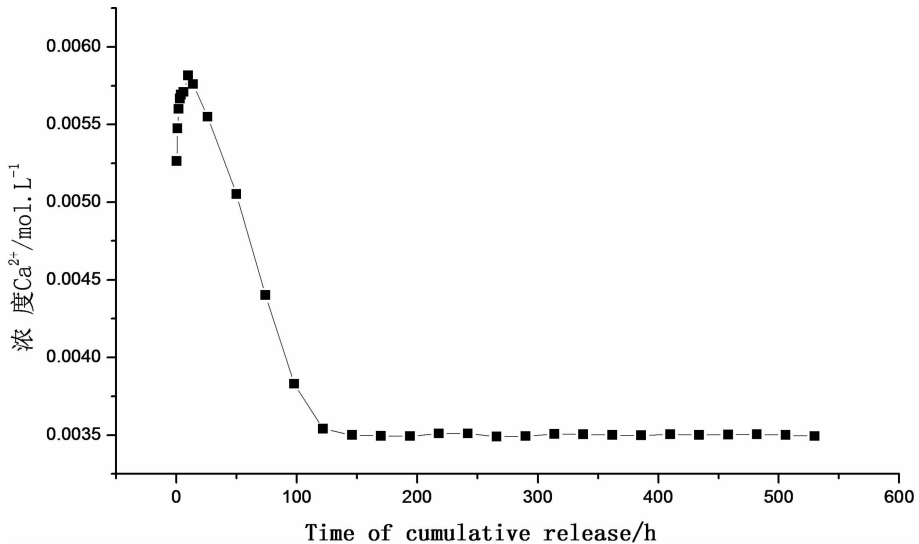


图 9 $Na_2SeO_3/CS/CPC$ 材料缓释过程中介质的 Ca^{2+} 浓度变化曲线

Fig. 9 PH Curve of during the sustained release process of $Na_2SeO_3/CS/CPC$

3.5 对 MCF-7、MG-63 肿瘤细胞生长的抑制作用

以不同浓度的 Na_2SeO_3 以及缓释不同时间的复合 CPC 缓释液作用于 MCF-7 人乳腺癌细胞和 MG-63 人骨肉瘤细胞 24、48、72 h, CCK-8 法测

定对细胞增生的抑制作用, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 紫杉醇为阳性对照组, 不加样品的细胞为空白对照组, 各实验组对 MCF-7 和 G-63 细胞生长的抑制率如表 2 所示.

表 2 样品对 MCF-7、MG-63 肿瘤细胞增殖的抑制率

Tab. 2 Percentage inhibitions of samples against the growth of human breast cancer cells MCF-7 and MG-63 for 24, 48 and 72 hours

处理	细胞增殖抑制率(%)					
	24 h		48 h		72 h	
	MCF-7MG-63		MCF-7MG-63		MCF-7MG-63	
空白对照	0	0	0	0	0	0
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 (\mu\text{g}/\text{mL})$						
60	16.53*#	17.21*#	22.18*#	21.22*#	23.94*#	22.14*#
120	36.83*#	34.33*#	45.05*#	38.67*#	46.01*#	39.01*#
240	67.20*#	51.45*#	71.89*#	59.12*#	72.20*#	61.08*#
380	80.00*#	71.88*#	86.65*#	77.86*#	89.26*#	78.12*#
复合 CPC 缓释液(h)						
0.5	3.61*#	3.92*#	6.81*#	5.97*#	6.97*#	6.51*#
3	6.35*#	6.12*#	10.34*#	8.99*#	10.87*#	9.74*#
10	12.58*#	11.19*#	23.45*#	21.95*#	24.04*#	22.07*#
50	15.26*#	14.96*#	30.74*#	28.24*#	31.11*#	29.01*#
阳性对照						
$1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 紫杉醇	68.73*	25.68*	89.76*	31.76*	89.96*	32.14*

注: * 与空白对照组相比, 差异显著($P < 0.01$); # 与阳性对照组相比, 差异显著($P < 0.01$)

由表 2 可知, Na_2SeO_3 及复合 CPC 缓释液均对人乳腺癌细胞 MCF-7 及 MG-63 人骨肉瘤细胞有明显的抑制作用, 与对照组相比差异显著, 且抑制率与硒化物浓度和作用时间呈正相关性, 但抑制速率在 48 h 前大于其后的速率. 对于两种细胞的抑制作用, 阳性对照的紫杉醇对 MCF-7 的抑制作用远大于对 MG-63 的抑制, 而 Na_2SeO_3 虽对肿瘤细胞的抑制能力较紫杉醇弱, 但对 MCF-7 和 MG-63 两种不同细胞增殖的抑制力差异不十分明显, 这可能与两种药物的抑制机理不同, 有待于后期深入研究.

4 结 论

本文将磷酸钙骨水泥优良的生物相容性、壳聚糖微球持久稳定的控释性以及硒元素多种独特的生理活性相结合, 制备掺 Se 功能元素的纳米复合 CPC, 并对其基本性能、缓释硒能力、断面结构和晶相组成以及体外肿瘤细胞抑制作用进行了测试分析. 结果表明: $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 微球的添加对 CPC

固化时间有一定的影响, 当掺加 4 % 的 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CS}$ 纳米微球时, 复合 CPC 材料的注射性良好, 初凝时间为 5.6 min, 终凝时间为 11.5 min, 微观结构显示 $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{CSCPC}$ 微球被 CPC 均匀包裹且表面形成了明显的针片状晶体, 且对复合 CPC 材料的晶相成分无明显影响; 复合 CPC 是良好的缓释硒系统, 缓释速率先快后慢, 有效缓释硒达 22 d, 降解后形成了完善的网状三维立体多孔结构, 即纳米复合 CPC 具有良好的微纳细胞生物学效应和成骨活性, 缓释后 a-TCP 全部转化形成了 HA. 体外细胞实验表明复合 CPC 缓释液对人乳腺癌细胞 MCF-7 及 MG-63 人骨肉瘤细胞均有显著的抑制作用, 抑制率与硒化物浓度和作用时间呈正相关性, 且对两种细胞的抑制作用差异不十分明显. 本研究可为临床上骨修复及骨肿瘤的预防和治疗提供一种新思路, 同时也可为合理利用硒的生化特性, 开辟硒新用途, 提供实验依据及理论支持.

参考文献:

- [1] 张亮, 陈统一. 载药磷酸钙骨水泥研究进展[J]. 高分子通报, 2012, 33: 228.
- [2] 黄顺勇. 磷酸钙骨水泥的临床应用与研究进展[J]. 中外医学研究. 2015, 13: 1719.
- [3] 张海燕, 邹伟魁, 宋伟, 等. 磷酸钙骨水泥载药研究[J]. 中国实验方剂学杂, 2012, 18: 224.
- [4] 殷力, 胡明鑫, 王海涛, 等. 载阿仑膦酸钠/磷酸钙骨水泥复合体系微观结构的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34: 94.
- [5] 商龙臣, 李娇, 倪书萍, 等. (Hg_mSe_n) ($m=1, 2, 3, n=1, 2$) 分子离子团簇结构和光谱性质[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2016, 53: 138.
- [6] 陈红霞. Cr 掺杂 ZnSe 团簇稳定性和磁性[J]. 原子与分子物理学报, 2018, 35: 429.
- [7] 袁丽君, 袁林喜, 尹雪斌. 硒的生理功能、摄入现状与对策研究进展[J]. 生物技术进展, 2017, 7: 506.
- [8] 陈红霞, 杜思洁. ZnSe 小团簇结构稳定性和电子性质研究[J]. 原子与分子物理学报, 2018, 35: 789.
- [9] Vekariya K K, Kaur J, Tikoo K. Alleviating anastrozole induced bone toxicity by selenium nanoparticles in SD rats [J]. Toxicol Appl Pharm, 2013, 268: 212.
- [10] Zhou Y, Jia X, Tan L, *et al.* Magnetically enhanced cytotoxicity of paramagnetic selenium-ferroferic oxide nanocomposites on human osteoblast-like MG-63 cells [J]. Biosens Bioelectron, 2010, 25: 1116.
- [11] Wang Y H, Lv P, Ma Z, *et al.* Enhanced healing of rat calvarial critical size defect with selenium-doped lamellar biocomposites [J]. Biol Trace Elem Res, 2013, 155: 72.
- [12] Rodríguez-Valencia C, López-Álvarez M, Cochón-Cores B, *et al.* Novel selenium-doped hydroxyapatite coatings for biomedical applications [J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 101: 853.
- [13] Tran P A, Taylor E, Sarin L, *et al.* Novel anti-cancer, anti-bacterial coatings for biomaterial applications; Selenium nanoclusters [J]. Mater Res Soc Symp Proc, 2010, 1209: 205.
- [14] Tran P A, Webster T J. Antimicrobial selenium nano-particle coatings on polymeric medical devices [J]. Nanotechnology, 2013, 24: 155.
- [15] Wang Q, Webster T J. Nanostructured selenium for preventing biofilm formation on medical devices [J]. Mater Res Soc Symp Proc, 2012, 1415: 105.
- [16] Tran P A, Sarin L, Hurt R H, *et al.* Transforming orthopedic biomaterials into bone cancer inhibiting implants: The role of selenium nanoclusters [J]. Mater Res Soc Symp Proc, 2008, 1136: 122.
- [17] Wang Y, Chen J, Zhang D, *et al.* Tumoricidal effects of a selenium (Se)-polysaccharide from Ziyang green tea on human osteosarcoma U-2OS cells [J]. Carbohydr Polym, 2013, 98: 1186.
- [18] Tran P A, Taylor E, Sarin L, *et al.* Novel anti-cancer, anti-bacterial coatings for biomaterial applications; selenium nanoclusters [J]. Mater Res Soc Symp Proc, 2010, 1209: 205.
- [19] Wang Q, Webster Thomas J. Nanostructured selenium for preventing biofilm formation on medical devices [J]. Mater Res Soc Symp Proc, 2012, 1415: 105.
- [20] Zwolak I, Zaporowska H. Selenium interactions and toxicity: a review [J]. Cell Biol Toxicol, 2012, 28: 31.
- [21] Brozmanova J, Mániková D, Vleková V, *et al.* Selenium; a double-edged sword for defense and offence in cancer [J]. Arch Toxicol, 2010, 84: 919.
- [22] 冉青, 商龙臣, 吴少尉, 等. SeMet/CS 纳米复合微球的制备、缓释性能及抑制肿瘤活性 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2018, 55: 1058.
- [23] 邓育红, 崔旭, 彭松林. SrHA/PMMA 复合骨水泥的制备、理化性能及细胞相容性研究 [J]. 生物骨科材料与临床研究, 2016, 13: 1.
- [24] 张涛. 不同钙磷摩尔比/多重孔隙磷酸钙骨水泥的研究 [D]. 西南交通大学, 2007: 11.
- [25] Zhang H X, He Q Y. Optimization study on the detection of tumor cell proliferation with CCK-8 method [J]. J Pharm Res, 2016, 35: 63.
- [26] Takagi S, Chow L C, Hirayama S, *et al.* Properties of elastomeric calcium phosphate cement-chitosan composites [J]. Dent Mater, 2003; 19: 797.

引用本文格式:

中文: 张驰, 吴海燕, 冉青, 等. 自固载硒纳米微球/磷酸钙复合骨修复材料的制备及性能 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2019, 56: 125.

英文: Zhang C, Wu H Y, Ran Q, *et al.* Construction and properties of self-solidified combined bone repair system with loaded selenium nanospheres/calcium phosphate [J]. J Sichuan Univ; Nat Sci Ed, 2019, 56: 125.