

# VPI-7 分子筛的合成及生物学性能

李瑞廷<sup>1</sup>, 王 双<sup>2</sup>, 李冬冬<sup>3</sup>, 秦彦国<sup>1</sup>, 于吉红<sup>2</sup>

(1. 吉林大学第二医院, 长春 130041; 2. 吉林大学化学学院, 3. 材料科学与工程学院, 长春 130012)

**摘要** 采用水热法, 通过调变反应溶胶的量合成了不同尺寸的不规则圆片状多孔锌硅分子筛 VPI-7, 并研究了其生物学性能. 扫描电子显微镜观测结果表明, 制备的样本由 VPI-7 条状晶体聚集成微球, 并进一步相互交联形成微米级孔隙, 其形貌可以促进钙磷化合物在样品表面的沉积, 同时可以负载并缓释蛋白. 细胞学检测结果表明, VPI-7 分子筛有利于细胞黏附增殖, 具有良好的生物相容性.

**关键词** 锌硅分子筛 VPI-7; 生物相容性; 负载并缓释蛋白

**中图分类号** O614; R318      **文献标志码** A

分子筛是一种天然存在或经人工合成的具有规则孔道结构的晶体材料, 主要用作催化剂、吸附及分离剂、离子交换剂等<sup>[1,2]</sup>. 近年来分子筛在生物医学领域的应用也日益受到关注. 例如天然斜发沸石分子筛可作为抗肿瘤治疗的佐剂; 含有抗菌金属离子及负载 NO 的沸石分子筛涂层可用于医疗器械表面抑菌<sup>[3]</sup>; 耐腐蚀的分子筛涂层可以促进人胎儿成骨细胞成骨分化, 提高骨整合能力, 在骨科材料领域具有广阔应用前景<sup>[4]</sup>; Li 等<sup>[5]</sup>通过体内及体外实验证明了在钛合金表面制备 MFI 分子筛涂层可以促进 MC3T3 细胞成骨分化, 并促进骨组织与材料的结合; 微介孔分子筛材料还可被用作药物的载体<sup>[6]</sup>, 其中 ZSM-5 分子筛涂层可以促进骨髓干细胞增殖, 能携带并缓释庆大霉素达到抗菌效果<sup>[7]</sup>. 随着不同分子筛在生物医学领域的逐渐应用, 越来越多的分子筛被发现具有良好的生物性能并可被应用于医学领域.

VPI-7 是一种锌硅分子筛, 具有三元环孔道结构, 最大孔径 0.431 nm, 主要由硅、锌、钠元素组成<sup>[8]</sup>. 钠是人体的常量元素, 硅、锌两种元素都是人体必备的微量元素, 无生物毒性, 这为 VPI-7 良好的生物相容性提供了元素基础. 锌被认为是对成骨分化和骨组织发育具有直接影响的元素, 同时可作为信号分子影响细胞内信号传导, 且被证明可以诱导碱性磷酸酶及胶原蛋白的合成, 对成骨有显著的促进作用<sup>[9-11]</sup>. 水热法合成的 VPI-7 分子筛可以聚集成团块状, 晶体聚集成微球, 微球间进一步形成了较大的孔隙, 这一多孔结构为载药及负载生物大分子物质提供了可能<sup>[12]</sup>.

良好的生物相容性、高孔隙结构、药物及生物大分子负载缓释能力均是载药植入物所必需的性能<sup>[13,14]</sup>. 同时满足这 3 个条件的材料将有望被用作骨填充材料, 负载药物进行骨缺损的修复, 或用于巨细胞瘤切除后的骨填充, 从而解决大块骨缺损难以用同种异体骨或自体骨移植修复的难题. 本文通过水热法合成了 VPI-7 分子筛, 并通过模拟体液实验、体外细胞实验从蛋白缓释、生物相容性及类骨磷灰石沉积三方面考察了 VPI-7 的生物活性.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

白炭黑为工业级, 购于长岭化学品公司; 氢氧化钠和六水合硝酸锌均为分析纯, 分别购于北京化

收稿日期: 2017-05-26. 网络出版日期: 2017-10-10.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 51627805)、吉林省省级产业专业创新专项资金(批准号: 2016C037)和吉林省科技发展计划项目(批准号: 20150414006GH)资助.

联系人简介: 秦彦国, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物骨科材料研究. E-mail: qinyanguo@hotmail.com

李冬冬, 男, 博士, 讲师, 主要从事医用植入材料表面处理研究. E-mail: lidongdong@jlu.edu.cn

工厂和天津市福晨化学试剂厂. 基础培养基 (DMEM) 购于美国 Hyclone 公司; 胎牛血清 (FBS) 购于杭州四季青公司; CCK-8 试剂购于中国 BBI 公司; 胰酶、双抗 (青霉素钠、链霉素) 和磷酸盐缓冲液 (PBS) 均购于美国 Gibco 公司.

D/MAX-III A 2550 型 X 射线衍射仪 (XRD, 日本 Rigaku 公司), Cu  $K\alpha$ ,  $\lambda = 0.15418$  nm, 管电压 40 kV, 管电流 30 mA; JSM-7401F 型扫描电子显微镜 (SEM, 日本 JEOL 公司), 加速电压 30.0 kV; JSM-6700F 型扫描电子显微镜 (SEM, 日本 JEOL 公司), 加速电压 5.0 kV; XL30 型扫描电子显微镜 (SEM, 荷兰 Philips 公司), 加速电压 10.0 kV; X 射线荧光能谱仪 (EDS, 日本 Hitachi 公司); COULTER EPICS X 型流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); Varioskan Flash 酶标仪 (美国 Thermo 公司); HERAcell 150i 型  $\text{CO}_2$  培养箱 (美国 Thermo 公司).

## 1.2 VPI-7 的制备

参考文献 [15], 采用水热法合成 VPI-7, 选取的溶胶摩尔组成为  $n(\text{Na}_2\text{O}) : n(\text{ZnO}) : n(\text{SiO}_2) : n(\text{H}_2\text{O}) = 0.65 : 0.2 : 1 : 44$ . 在保证溶胶中各物质摩尔比不变的情况下调变溶胶的量, 分别称取 0.495, 0.990, 1.485 和 2.475 g 六水合硝酸锌于氢氧化钠水溶液中, 控制好相应水量, 待搅拌均匀后, 按溶胶配比加入白炭黑, 继续搅拌 2 h. 将搅拌均匀的溶胶分别装入具有相应容量的带有聚四氟乙烯内衬的不锈钢反应釜中, 陈化 24 h 后, 置于 220 °C 烘箱中, 在自生压力下恒温静置晶化 7 d. 产物用超纯水反复超声洗涤后于 60 °C 烘箱中干燥, 即得到 VPI-7 不规则圆片.

## 1.3 VPI-7 的生物相容性表征

1.3.1 材料清洗及灭菌 将制备好的 VPI-7 分子筛薄片浸泡在 PBS 中以中和过量的酸碱, 随后依次用 PBS、蒸馏水和超纯水超声清洗 15 min. 清洗后的样品经高压蒸气灭菌, 烘干后留待后续实验使用.

1.3.2 细胞培养 使用髓腔冲洗法获取胎兔骨髓间充质干细胞 (r-BMSCs) [16], 并在完全培养液 (含 1% (体积分数) 双抗, 10% (体积分数) 胎牛血清) 中培养. 每隔 2 d 换液一次, 3 d 后传代培养, 第 3~5 代细胞用于后续细胞实验.

将 VPI-7 样本置于 24 孔细胞培养板中, 细胞  $1 \times 10^4$  Cell/孔的浓度接种在样本上. 培养板在培养箱中孵育 48 h 后用 PBS 清洗样本, 随后在中性戊二醛中固定 4 h, 用梯度酒精脱水, 干燥后表面喷金, 在电子显微镜下观察细胞形态并拍照.

1.3.3 浸提液的配制 将清洗灭菌后的 VPI-7 样本浸入基础培养基中, 随后放入 37 °C 温箱中, 每隔 3 d 收集浸提液并加入新的培养基. 将收集的浸提液加入 1% (体积分数) 的双抗和 10% (体积分数) 的胎牛血清配成完全培养液进行材料毒性检测, 并与正常的完全培养液进行对比评价.

1.3.4 材料毒性检测 将细胞分为 3 组, 以  $1 \times 10^3$  Cell/孔的密度接种到 96 孔板中, 孵育 24 h 后, 分别换上新的培养液、VPI-7 浸提液和含 5% 二甲基亚砜 (DMSO) 的培养液, 继续孵育 48 h 后, 每孔按 100:10 比例加入培养液和 CCK-8 试剂的混合液, 置于细胞培养箱避光孵育 3 h, 通过检测在 450 nm 波长下的光密度 (OD) 对材料毒性进行评价. 其中培养液作为正常对照, 含 5% DMSO 的培养液为阳性对照.

1.3.5 细胞增殖实验 将 VPI-7 薄片置于 24 孔板中, 并设立 2 组 24 孔细胞培养板作为对照, 以  $2 \times 10^4$  cell/mL 的浓度将细胞随机接种在 3 组 24 孔板上: VPI-7 薄片组 (VPI-7)、培养板用正常培养液培养组 (TCPS) 及培养板用材料浸提液换液培养组 (V-TCPS), 每组设立 4 个复孔. 细胞培养 1, 4, 7 d 时, 每孔按 100:10 比例加入培养液和 CCK-8 试剂的混合液, 置于细胞培养箱避光孵育 3 h 后用酶标仪检测 450 nm 波长下的光密度, 通过 OD 值对细胞增殖情况进行定量分析.

## 1.4 VPI-7 类骨磷灰石沉积能力检测

按照文献 [17,18] 方法配制模拟体液 (SBF), 将一定量的 VPI-7 研磨成粉末放入 SBF 中, 于 37 °C 下恒温搅拌, 每隔 24 h 更换一次模拟体液, 72 h 后将上层清液倒掉, 沉淀用超纯水反复离心、洗涤后于 60 °C 下空气干燥, 所得产物用扫描电子显微镜和 X 射线荧光能谱仪 (EDS) 进行表征.

## 1.5 VPI-7 的蛋白负载释放性能

将清洗后的 VPI-7 薄片浸入胎牛血清中, 24 h 后取出, 用 PBS 冲洗. 清洗后的样本放入 PBS 溶液中进行蛋白缓释实验 [19], 每隔 24 h 用 BCA 法检测蛋白浓度, 即利用酶标仪检测 405 nm 下的光密度.

样品从血清中取出后,分别取剩余血清和血清原液,稀释 40 倍后检测蛋白浓度,计算蛋白吸附率( $w, \%$ ):  $w = [(c_1 - c_2) / c_1] \times 100\%$ , 式中,  $c_1 (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$  为血清原液中蛋白浓度,  $c_2 (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$  为吸附后蛋白的浓度。

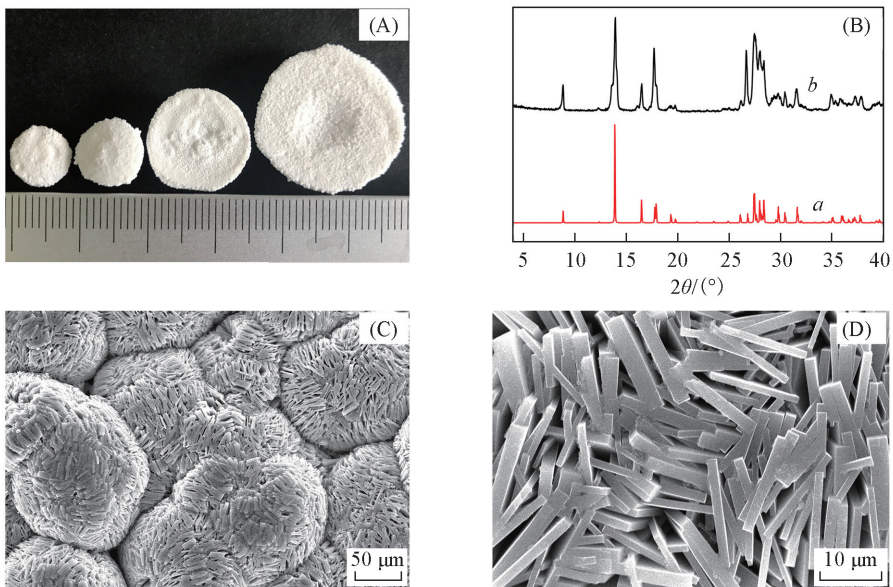
## 1.6 统计分析

实验样本量  $n \geq 4$ , 采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行作图、统计学分析, 实验数据用  $\text{Mean} \pm \text{SD}$  表示,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 VPI-7 的表征

作为骨填充材料, 我们希望其形状大小可以通过改变实验条件进行调变。为此, 通过控制溶胶中 ZnO 的含量合成了直径可调控的不规则圆片, 如图 1(A) 是经超声处理后的 VPI-7 试样的照片, 其直径从 8 mm 到 23 mm 不等, 可见采用简单的水热法即可得到不同尺寸的填充支架, 该支架由聚集态的 VPI-7 组成。图 1(B) 示出了所得产物的 XRD 谱图和 VPI-7 的模拟谱图, 二者完全吻合<sup>[20]</sup>, 表明合成出的产物为 VPI-7 纯相。图 1(C) 和 (D) 是不同放大倍率下 VPI-7 的 SEM 照片, 可见, VPI-7 分子筛由条状晶体聚集成球形并进一步互相交联。在照片中可以看出条状晶体之间形成微米级的小孔隙, 而微球之间形成了较大的孔隙。晶体之间的小孔隙可以用来负载小分子药物, 微球之间大孔隙为负载多肽、蛋白、核酸等生物大分子物质提供了结构基础。

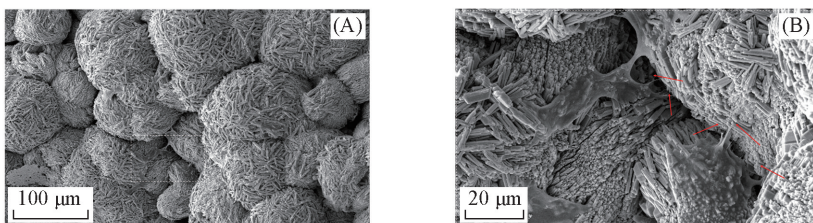


**Fig.1** Photograph of the VPI-7 discs with different sizes(A), XRD powder patterns of VPI-7(B) and SEM images of VPI-7 at different magnifications(C, D)

(B) a. Experimental; b. simulated.

### 2.2 VPI-7 表面的细胞黏附及形态

图 2 示出了 VPI-7 样本表面生长细胞的形态, 从低倍显微镜下[图 2(A)]可以观察到 r-BMSCs 黏



**Fig.2** SEM images of r-BMSCs cultured on VPI-7 sample for 2 d

(A) 250×; (B) 1000×. Red arrow: filopodia.



附在 VPI-7 的表面. 从高倍显微镜[图 2(B)]下可以看到细胞伸出较多片状伪足和丝状伪足(红色箭头所示位置), 这表明细胞以良好的形态黏附在样品表面. 以上结果表明 VPI-7 具有良好的生物相容性, 利于细胞黏附生长.

### 2.3 VPI-7 的毒性

图 3 示出了材料的毒性检测结果, 3 组细胞分别换液后继续孵育 48 h, 毒性对照组(5% DMSO)细胞明显少于其它两组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ). 而 VPI-7 浸提液组与正常对照组(DMEM)无明显差异. 这一结果表明 VPI-7 无细胞毒性.

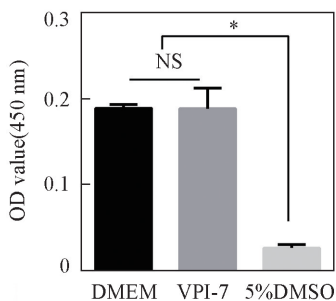


Fig.3 Cytotoxicity test of VPI-7

\*  $P < 0.05$ ; NS: not significant.

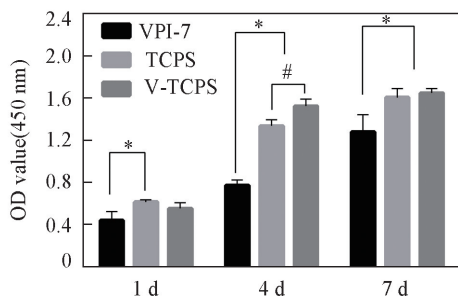


Fig.4 Cell proliferation of different groups

\* Indicates statistical significance  $P < 0.05$  vs. VPI-7.

# Indicates statistical significance  $P < 0.05$  vs. TCPS.

### 2.4 VPI-7 的生物相容性

图 4 为 VPI-7、培养板组(TCPS)和浸提液换液组(V-TCPS)3 组细胞的增殖结果. 由图 4 可见, 3 组细胞均随时间延长不断增殖, TCPS 和 V-TCPS 组细胞增殖在 4 d 后逐渐进入平台期. 其中浸提液组在 4, 7 d 时细胞数量均高于其它两组, 尤其是 4 d 时, 浸提液组细胞数量明显高于其它两组, 且差异有统计学意义. 这表明 VPI-7 浸提液有利于细胞增殖. 而细胞直接接种在 VPI-7 材料上的细胞数量一直低于其它两组, 这是 VPI-7 样品立体形貌结构与培养板的差异造成的. 但 VPI-7 样本上细胞一直处于良好的增殖状态, 在 7 d 时细胞数量已经接近其它两组. 结合材料浸提液组细胞增殖情况, 表明细胞可以在 VPI-7 表面增殖, VPI-7 具有良好的生物相容性. 植入物修复骨缺损, 是植入物周围环境中的骨髓干细胞不断黏附在其表面并增殖、分化, 最终在植入物表面形成新生骨组织的过程. 骨髓干细胞可以在 VPI-7 材料表面持续增殖, 这有利于骨缺损的愈合.

### 2.5 VPI-7 的蛋白缓释作用

血清原液蛋白浓度为  $(0.2134 \pm 0.005)$  mg/mL, 吸附后血清蛋白浓度为  $(0.1789 \pm 0.008)$  mg/mL, 经计算蛋白吸附率为  $(16.17 \pm 0.25)\%$ . 图 5 为 VPI-7 的蛋白缓释曲线, 由图可见, 蛋白浓度从第 1 天开始逐渐升高, 直到第 4 天释放趋于平稳, 在 7 d 的缓释实验中, VPI-7 可以持续缓释蛋白. 这与电子显微镜下观察到的结构基本相符, 表明微球之间的大孔隙可以负载蛋白. 蛋白的分子量较大, VPI-7 可以负载并缓释蛋白表明 VPI-7 可以负载生物大分子物质. 骨生长因子如骨形成蛋白、胰岛素样生长因子等, 常为大分子蛋白或多肽. VPI-7 有望通过负载这些具有促进骨生成作用的蛋白多肽, 并在骨缺损区域持续缓释, 促进骨髓干细胞的增殖分化, 进而促进骨缺损的修复.

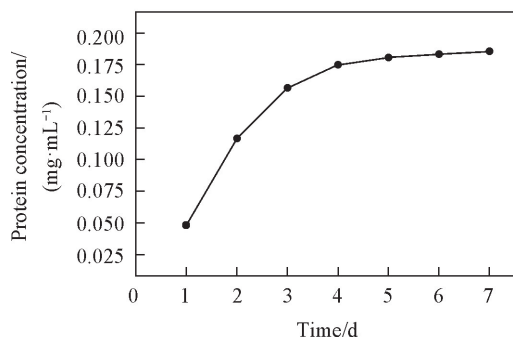


Fig.5 Release of protein from VPI-7

### 2.6 VPI-7 的表面类骨磷灰石沉积

经过 72 h 的 SBF 浸泡实验, 观察表面类骨磷灰石沉积情况. 图 6(A)和(B)是所得 VPI-7 粉末在不同放大倍数下的 SEM 照片, 其表面可以看到明显的类骨磷灰石沉积, X 射线荧光能谱仪检测结果进一步证实其表面确实有钙磷化合物的沉积[图 6(C)], 表明所得 VPI-7 分子筛表面能够促进类骨磷灰石

沉积. SBF 溶液与人体血浆中离子组成几乎完全一致, 用 SBF 体液浸泡可以模拟人体内骨骼形成的过程. 经 SBF 浸泡后 VPI-7 表面有大量的钙磷化合物沉积, 表明其具有较好的成骨活性. 骨修复不仅仅是成骨细胞不断增殖、分化的过程, 骨组织矿化对骨骼修复同样重要. 钙、磷等无机盐不断沉积在骨组织中进而矿化形成坚硬的骨骼. VPI-7 能够诱导钙磷化合物沉积, 这有利于骨组织的矿化, 最终修复骨缺损.

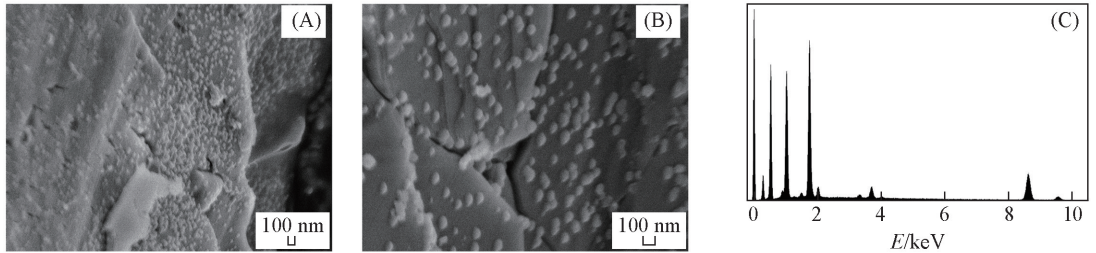


Fig.6 SEM images with different magnifications(A, B) and EDS pattern(C) of VPI-7 after immersed in SBF for 72 h and

### 3 结 论

采用水热法制备了不规则圆片状多孔硅锌分子筛 VPI-7, 且可通过调变溶胶的量来控制分子筛圆片的尺寸. 通过细胞培养及细胞增殖试验证明 VPI-7 具有良好的生物相容性且无细胞毒性. 通过蛋白负载-释放实验验证了 VPI-7 分子筛的蛋白缓释性能, 其具备负载药物及生物大分子物质的结构基础. VPI-7 可以促进钙磷化合物的沉积, 具有较好的成骨活性. VPI-7 分子筛可以作为骨填充材料负载药物或生物大分子物质促进骨修复, 其作为骨填充修复材料拥有广阔的应用前景.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Liu X. W., Li J. W., Zhou L., Zhou Y. P., *Materials Review*, **2006**, 20(2), 86—90(刘秀伍, 李静雯, 周理, 周亚平. 材料导报, **2006**, 20(2), 86—90)
- [ 2 ] Xu R. R., Pang W. Q., Huo Q. S., *Chemistry-Zeolites and Porous Materials*, Science Press, Beijing, **2015**, 12—16(徐如人, 庞文琴, 霍启升. 分子筛与多孔材料化学, 北京: 科学出版社, **2015**, 12—16)
- [ 3 ] Chen B. P., Wang Z. P., Liu J. J., Wang J. C., Yu J. H., *Chem. J. Chinese Universities*, **2011**, 32(3), 485—493(陈炳鹏, 王卓鹏, 柳菁菁, 王金成, 于吉红. 高等学校化学学报, **2011**, 32(3), 485—493)
- [ 4 ] Bedi R. S., Beving D. E., Zanello L. P., Yan Y., *Acta Biomater.*, **2009**, 5(8), 3265—3271
- [ 5 ] Li Y., Jiao Y., Li X., Guo Z., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2015**, 460(2), 151—156
- [ 6 ] Rimoli M. G., Rabaioli M. R., Melisi D., Curcio A., Mondello S., Mirabelli R., Abignente E., *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2008**, 87(1), 156—164
- [ 7 ] Guo Y. P., Long T., Song Z. F., Zhu Z. A., *J. Biomed. Mater. Res. B*, **2014**, 102(3), 583—591
- [ 8 ] Annen M. J., Davis M. E., Higgins J. B., Schlenker J. L., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 17, 1175—1176
- [ 9 ] Beyersmann D., Haase H., *Biomaterials*, **2001**, 14(3/4), 331—341
- [ 10 ] Hirano T., Murakami M., Fukada T., Nishida K., Yamasaki S., Suzuki T., *Adv. Immunol.*, **2008**, 97, 149—176
- [ 11 ] Ferreira E. C., Bortolin R. H., Freire-Neto F. P., Souza K. S., Bezerra J. F., Ururahy M. A., Ramos A. M., Himelfarb S. T., Abreu B. J., Didone T. V., *Nutrition Research*, **2017**, 40, 48—56
- [ 12 ] Chorny M., Fishbein I., Danenberg H. D., Golomb G., *J. Control Release*, **2002**, 83(3), 389—400
- [ 13 ] Vallet-Regí M., Balas F., Arcos D., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46(40), 7548—7558
- [ 14 ] Li Z., Wen J., Jia W., Ding S., Xia X., Zhou C., Huang Y., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2016**, 32(3), 406—413
- [ 15 ] Jing X. Z., Xu H., Fan M. M., Dong J. X., *Chinese J. Inorg. Chem.*, **2002**, 18(2), 177—180(荆学珍, 徐红, 樊明明, 董晋湘. 无机化学学报, **2002**, 18(2), 177—180)
- [ 16 ] Zhang Z. Y., Teoh S. H., Chong M. S., Schantz J. T., Fisk N. M., Choolani M. A., Chan J., *Stem Cells*, **2009**, 27(1), 126—137
- [ 17 ] Kokubo T., Takadama H., *Biomaterials*, **2006**, 27(15), 2907—2915
- [ 18 ] Huang R., Pan C. L., Zhang L., *Chem. J. Chinese Universities*, **2017**, 38(4), 522—529(黄润, 潘成岭, 张兰. 高等学校化学学报, **2017**, 38(4), 522—529)

2017, 38(4), 522—529)

[19] Mellott M. B., Searcy K., Pishko M. V., *Biomaterials*, **2001**, 22(9), 929—941

[20] Röhrig C., Dierdorf I., Gies H., *J. Phys. Chem. Solids*, **1995**, 56(10), 1369—1376

## Synthesis and Biological Evaluation of VPI-7 Zeolite<sup>†</sup>

LI Ruiyan<sup>1</sup>, WANG Shuang<sup>2</sup>, LI Dongdong<sup>3\*</sup>, QIN Yanguo<sup>1\*</sup>, YU Jihong<sup>2</sup>

(1. *The Second Hospital, Jilin University, Changchun 130041, China;*

2. *College of Chemistry, 3. College of Materials Science and Engineering, Jilin University, Changchun 130012, China)*

**Abstract** Porous zincosilicate zeolite, VPI-7, was synthesized through hydrothermal approach, and the size of samples were adjusted by varying amounts of sol. Also, the biological properties of the samples were characterized. The characteristic results showed that the prepared samples were aggregated into microspheres by VPI-7 rod-shaped crystals, and the crystals further cross-linked and formed numerous micron-sized pores, which provided good morphological features for their biological properties. In addition, the surface topography for VPI-7 had the ability to promote the deposition of calcium phosphate, and load/release protein. The *in vitro* experiments suggested that VPI-7 was conducive to cell adhesion and proliferation, with good biocompatibility. VPI-7 showed excellent biological properties, and has potential to be applied as implant used in bone repair and replacement.

**Keywords** Zincosilicate zeolite VPI-7; Biocompatibility; Load/release protein

(Ed.: F, K, M)

<sup>†</sup> Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.51627805), the Special Fund Project of Jilin Provincial Industrial Innovation, China(No.2016C037) and the Science and Technology Development Program of Jilin Province, China(No.20150414006GH).