

溶胶-凝胶生物活性玻璃的结构特征及其对糖尿病创面修复作用的研究

林 才^{1,2,3}, 毛 葱^{1,2}, 李玉莉^{1,2}, 张娟娟^{1,2}, 苗国厚^{1,2}, 陈晓峰^{1,2}

(1. 国家人体组织功能重建工程技术研究中心, 广州 510006; 2. 华南理工大学 材料科学与工程学院, 广州 510640; 3. 温州医学院附属第一医院 烧伤科, 温州 325000)

摘 要: 采用熔融法和溶胶-凝胶法分别制备了生物活性玻璃 45S5 和 SGBG, 通过 SEM、BET 及 XRD 等方法对它们的微观结构进行了表征, 并建立了 SD 大鼠糖尿病皮肤创面模型, 通过对创面愈合时间、创面愈合率以及 HE 染色分析, 探讨了生物活性玻璃对促进糖尿病难愈创面愈合的效果。结果表明, 与凡士林组相比, 生物活性玻璃组能加速创面愈合, 且 SGBG 具有纳米结构, 其比表面积更大, 与 45S5 相比能缩短糖尿病创面的愈合时间, 提高愈合速度。组织学分析表明生物活性玻璃能促进肉芽组织的生长。由此表明生物活性玻璃能促进大鼠糖尿病创面的修复, 且具有纳米结构的 SGBG 效果更好。

关 键 词: 生物活性玻璃; 溶胶-凝胶; 创面修复; 糖尿病

中图分类号: TQ174 文献标识码: A

Structural Properties and Wound Healing Effect of the Sol-Gel Bioactive Glass on Diabetic Skin Wounds

LIN Cai^{1,2,3}, MAO Cong^{1,2}, LI Yu-Li^{1,2}, ZHANG Juan-Juan^{1,2}, MIAO Guo-Hou^{1,2}, CHEN Xiao-Feng^{1,2}

(1. The National Engineering Research Center for Tissue Restoration and Reconstruction, Guangzhou 510006, China; 2. The School of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China; 3. Department of Burns, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

Abstract: The 45S5 bioactive glass (45S5) was prepared by a melting process, while sol-gel bioactive glass (SGBG) was obtained by Sol-Gel method. The bioactive glasses were characterized by SEM, BET and XRD. Then the wound healing effect was investigated through the wound healing time, wound healing rate and histology examination. The results indicate that the bioactive glass can lessen the wound healing time and increase the healing rates of diabetic rats. Compared with the 45S5, SGBG can promote wound healing of diabetic rats more quickly and efficiently due to the larger surface area and nanostructure. Histological examination shows that bioactive glasses promote the proliferation of fibroblasts and growth of granulation tissue. All results suggest that bioactive glass can accelerate the recovery of skin wounds and SGBG with nanostructure has a better healing effect in diabetes-impaired models.

Key words: bioactive glass; Sol-Gel method; wound healing; diabetes

收稿日期: 2012-04-13; 收到修改稿日期: 2012-06-09

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2011CB606204, 2012CB619100); 国家自然科学基金(50830101, 51172073); 华南理工大学中央高校基本科研业务费(2012ZP0001); 浙江省自然科学基金重点项目(Z2080985) 973 Program (2011CB606204, 2012CB619100); National Natural Science Foundation of China (50830101, 51172073); Fundamental Research Funds for the Central Universities (2012ZP0001); Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Z2080985)

作者简介: 林 才(1969-), 男, 副主任医师. E-mail: lincai0577@hotmail.com

通讯作者: 陈晓峰, 教授. E-mail: chenxf@scut.edu.cn

糖尿病(DM)是一组由多种病因引起的以慢性高血糖为特征的代谢性疾病群^[1]。糖尿病难愈创面是影响糖尿病人群健康状况和生活质量的重要原因之一,因此开发一种能加速糖尿病难愈创面愈合的材料一直是研究者关注的焦点。

自 Hench 教授于 1969 年研制成功生物活性玻璃以来,经过近三十年的研究,证明了生物活性玻璃具有良好的生物活性和骨修复功能^[2-3]。后来还发现 45S5 生物活性玻璃与软组织也能很好结合,并可促进皮肤等软组织的再生^[4-5]。此外,生物活性玻璃能够促进成纤维细胞增殖,并刺激血管内皮生长因子(VEGF)的表达和蛋白分泌^[6-8]。基因芯片研究发现其能激活具有造血功能的 CD44 抗原形成前体、成纤维母细胞生长因子受体(N-sam)和血管细胞粘附蛋白(V-CAM1)等对创面修复起关键作用的基因^[9]。同时,它还有一定的抗菌功能^[10]。因此,生物活性玻璃将给难愈创面的治疗带来新的希望。

研究表明,生物活性玻璃(Bioactive glass, BG)的生物活性与离子溶出量和比表面积相关^[11]。本研究通过溶胶-凝胶法制备了具有更高比表面积的新型生物活性玻璃,并研究了将其应用于糖尿病大鼠创面后产生的生物学反应及愈合效应,以便对其创面修复作用进行更深入的理解。

1 实验

1.1 原料与试剂

所用原料二氧化硅,磷酸三钙,碳酸钙和碳酸钠、盐酸、正硅酸乙酯(TEOS)、磷酸三乙酯(TEP)和四水硝酸钙等均为分析纯级,购于光华化学有限公司(广东,汕头)。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购于 sigma。

1.2 生物活性玻璃的制备与结构表征

生物活性玻璃 45S5(摩尔组成: 46.1% SiO₂, 24.4% Na₂O, 26.9% CaO, 2.6% P₂O₅)通过熔融法制备^[12],溶胶-凝胶生物活性玻璃 SGBG 通过溶胶-凝胶法制备(摩尔组成: 60% SiO₂, 36% CaO, 4% P₂O₅)。按照一定比例依次将每种原料加入烧杯后搅拌 1h 制成均匀溶胶,在室温下陈化 72 h,使水解-缩聚反应充分进行,形成凝胶。将凝胶置 70℃和 150℃的鼓风干燥箱中分别干燥 72 和 48 h,将得到的凝胶块在 700℃的箱式电阻炉内热处理 3 h。将两种材料球磨,过筛,选取粒径≤53 μm 的生物活性玻璃粉末,分别将其加入 80℃水浴加热致其融化在液体的凡士林中,以一定比例混合均匀,冷却后既可得

到软硬适当的膏剂,干热灭菌法灭菌备用。膏剂分别标记为 45S5 和 SGBG。

生物活性玻璃的理化性能采用 Panlytical 公司生产的 XpertPRO X 射线衍射仪(Cu-Kα 射线)分析试样的相结构;采用德国 LEO 公司生产的 LEO1530VP 扫描电子显微镜(SEM)观察试样的显微结构;采用 Micromeritics 公司的 ASAP2010 比表面积测试仪(BET)对材料的比表面积、孔径分布等进行表征。将 0.3 g 生物活性玻璃浸泡在 200 mL 模拟体液(SBF)中考察 pH 的变化。

1.3 动物模型及分组

实验动物选用温州医学院实验动物中心提供的雄性 SD 大鼠,体重 180~220 g。实验前 12 h 禁食,按 65 mg/kg 腹腔注射 STZ。SPF 级环境饲养 2 w 后,测定血糖大于 16.7 mmol/L 时,认为糖尿病模型制备成功。实验当日,取用 250 g 左右已成模的糖尿病大鼠,以 30 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,再将大鼠背部脱毛,生理盐水清洗,碘伏擦试消毒。以脊柱为中线,制作四个直径为 1.8 cm 全层切除皮肤的创面。以双盲随机法分别采取膏剂 45S5、SGBG 和凡士林外敷创面,即实验组分为 45S5 和 SGBG 组,对照组为白凡士林(V)。外用纱布覆盖固定,隔天换药。

1.4 创面愈合评价

术后各时间点观察伤口愈合情况,以创面完全上皮化、无渗出作为创面愈合的依据,记录创面愈合时间。用照相、透明膜描记法记录创面面积,计算创面愈合率。创面愈合率=[(原始创面面积-未愈合创面面积)/原始创面面积]×100%。术后 7、14 d 取材,采取从创面部位切除全层组织的方法,10% 福尔马林固定,进行 HE 染色,观察组织变化。

1.5 统计学分析

定量结果均采用平均值±标准差表示,所得数据均用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学处理,所有实验组间差异用单因数方差分析进行检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 生物活性玻璃的结构形态分析

由熔融法制备的 45S5(图 1(a))结构致密,且在连续的玻璃相中有分相结构,显示材料组成和结构具有一定的微不均匀性。这是由于[SiO₄]和[PO₄]之间的结构、尺寸差异从而导致玻璃液在冷却过程中进行结构网络的重排及各元素在不同相中分布浓度

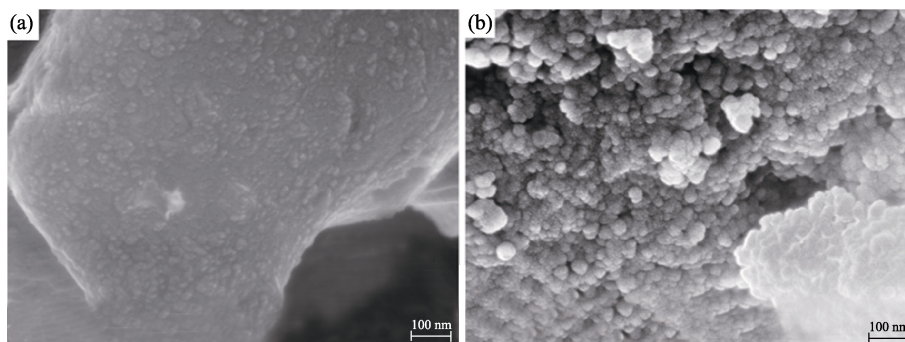


图1 两种生物活性玻璃 45S5 (a)和 SGBG (b)的 SEM 照片

Fig. 1 SEM images of 45S5 (a), SGBG (b)

不同所致。SGBG(图 1(b))的显微结构和 45S5 则完全不同,是由大量纳米级微球组成,微球直径在 15~50 nm,每个微球又是由尺寸更小的微球团聚而成,因此 SGBG 可能具有二级微球结构,这种结构可增加它的比表面积和液体吸附性能。

2.2 生物活性玻璃的 XRD 分析

图 2 中两种玻璃的 XRD 图谱均显示出较宽阔、弥散的衍射峰,说明水解反应形成的 SGBG 纳米团粒是非晶态或无定形态固体物质。两种生物活性玻璃的 XRD 图谱相似,均属于磷硅酸盐系统,在网络结构中的 Si-O-Si、Si-O-P 和 P-O-P 键的键角均在一定的范围内变动,不像结晶态物质那样具有固定的键角和晶格间距。这样一种键角的变动导致无定形态物质具有长程无序、短程有序的特殊结构,从而形成弥散的 XRD 图谱,故它们均是以非晶态作为其主要特征。

2.3 生物活性玻璃的 BET 分析

经测试 45S5 比表面积较小,只有 3.22 m²/g 左右,而 SGBG 的比表面积为 115.89 m²/g 左右,是 45S5 的几十倍。这主要是由于 SGBG 具有特殊的纳米结构所致。在溶胶-凝胶法制备 SGBG 过程中,

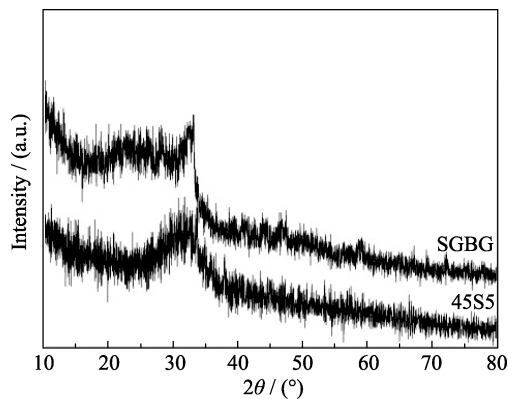


图2 两种生物活性玻璃的 XRD 图谱

Fig. 2 XRD patterns of 45S5 and SGBG

TEOS 和 TEP 在催化剂的作用下发生水解、浓缩和聚合反应,形成球形的、具有[SiO₄]和[PO₄]顶角相连三维网络结构的纳米溶胶颗粒,进而通过颗粒间相互链接,在整个液体中构建成三维多孔的网络骨架^[13]。作为网络外体的氧化钙引入使得材料的硅氧网络被打断,Ca²⁺均匀分布在断点周围,实现局部的电荷平衡。从原子尺度来看,质点的排列较为松散,使材料比表面积和活性都得到提高。

氮气吸-脱附曲线研究可揭示材料的多孔性。由图 3 可以看出,SGBG 的吸-脱附等温线,有明显的滞后环存在,是典型的中孔多孔材料的吸附类型。而由孔径分布图可以看出,SGBG 的孔径分布在 5~20 nm 范围内,且具有双峰,进一步证实了 SEM 中观察到的二级微球结构。45S5 则没有明显的滞后环,是一种致密的材料。

2.4 浸泡生物玻璃的 SBF 溶液 pH 值分析

45S5 和 SGBG 的 SBF 浸泡液在 0~336 h 时间段(图 4),pH 值变化趋势基本一致,在同一时间点 45S5 大于 SGBG。这主要是由于 45SS 中的 Na₂O、CaO 总体含量比 SGBG 中高造成的。由于 45S5 中含有的 Na₂O 对玻璃网络结构的破坏更加明显,与 SBF 接触后会更快发生离子交换,Na⁺对 pH 值的贡献高于 Ca²⁺,因此 45S5 pH 值变化比 SGBG 要大。在两种生物活性玻璃中 Na⁺和 Ca²⁺等阳离子从玻璃网络里溶出,和 OH⁻发生离子交换在玻璃表面形成硅烷醇,离子交换将进一步使溶液中的羟基浓度变大,加速玻璃网络内硅烷醇的形成和玻璃表面的溶解,随着 pH 值的逐渐增大,硅烷醇表面的羟基再次聚合在玻璃表面形成一层富硅层^[14]。这种 pH 值及表面结构和化学键的变化对促进创面愈合主要有两方面的作用:(1)局部形成碱性环境,有效地中和创面的酸性渗出物,抑止感染;(2)独特的表面活

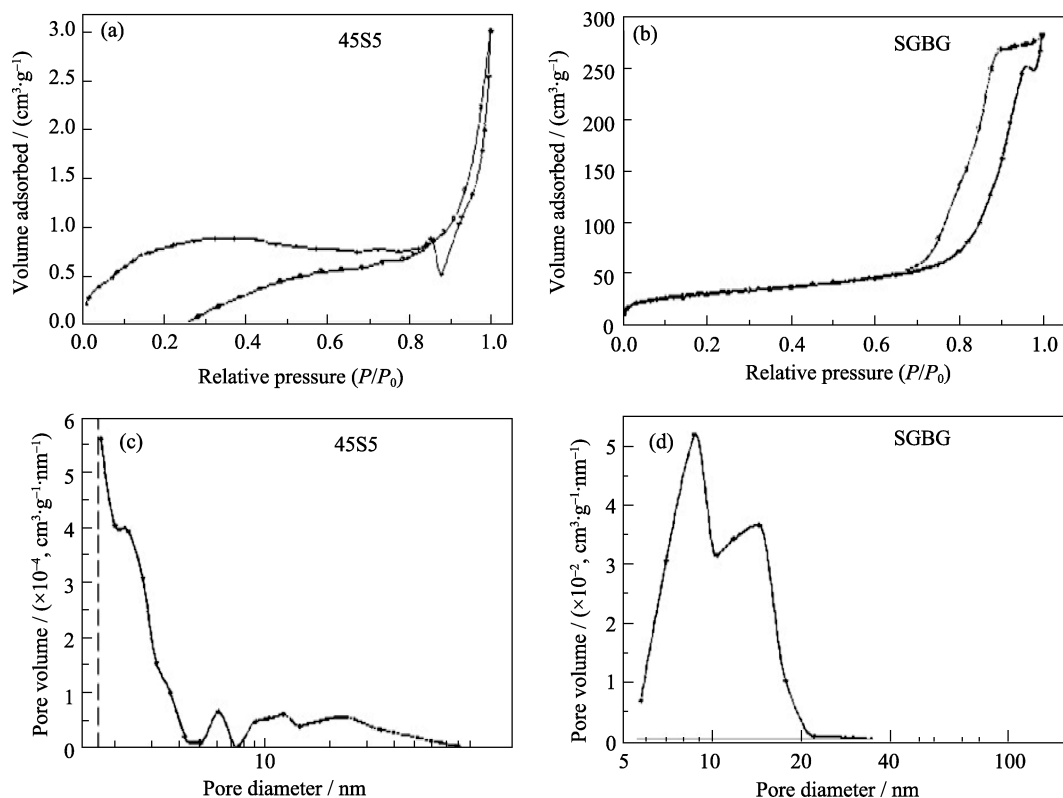


图 3 45S5 和 SGBG 生物活性玻璃的吸附-脱附等温曲线(a, c)和孔径分布图(b, d)

Fig. 3 Adsorption-desorption isotherms (a, c) and pore size distributions patterns (b, d) of 45S5 and SGBG Bioglass

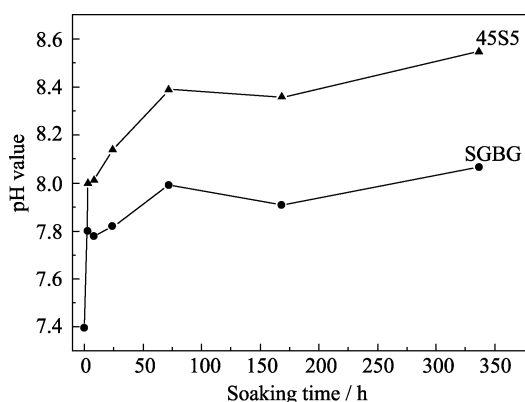


图 4 两种生物活性玻璃浸泡液 pH 值随时间变化曲线

Fig. 4 pH values of SBF in different immersion times for two types of the bioglass

性, 当与软组织接触时, 材料与组织间发生离子交换, 提高局部氧压和 pH 值, 并在其表面形成负电势而吸附周围的细胞、纤维蛋白及胶原蛋白, 并通过钙、磷层的快速形成稳定这些细胞和蛋白, 从而加速溃疡的愈合^[15-16]。但 45S5 的 pH 值最大值有 8.39, 临床中耐受度低的病人可能会产生疼痛感。因此, SGBG 更适宜临床应用。

2.5 创面愈合情况

通过创面的大体观察(图 5)发现: 2 d 时, 各组创

面区别不大, BG 表面有一层黄白色物质。4 d 时, BG 组创面缩小, 肉眼可见明显的肉芽组织填充创面。8 d 时, BG 组创面明显缩小, 肉芽组织已充满创面, 透明上皮层爬移迅速, SGBG 组最为明显, 已能覆盖距创缘 2~3 mm 的新生肉芽组织, 创面颜色开始变淡, 而凡士林组创面也有所缩小。12 d 时, BG 组创面继续缩小, SGBG 组新生的透明上皮组织已完全覆盖创面。16 d 时, BG 组创面已基本愈合, 而凡士林组仅有少部分愈合。因此, SGBG 组的创面愈合效果要好于对照组。

从愈合时间来看(图 6(a)), SGBG 平均愈合时间

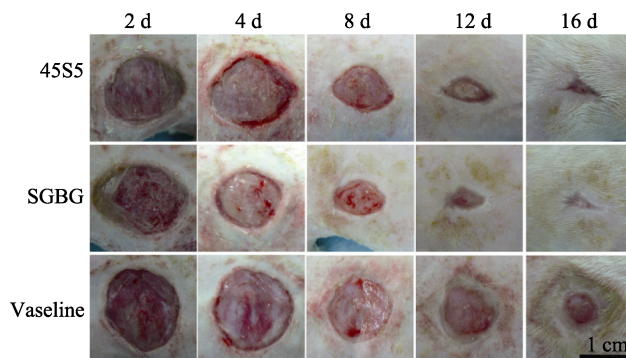


图 5 糖尿病大鼠术后各时相点创面愈合情况

Fig. 5 Wound healing image following treatments with SGBG, 45S5 and vaseline

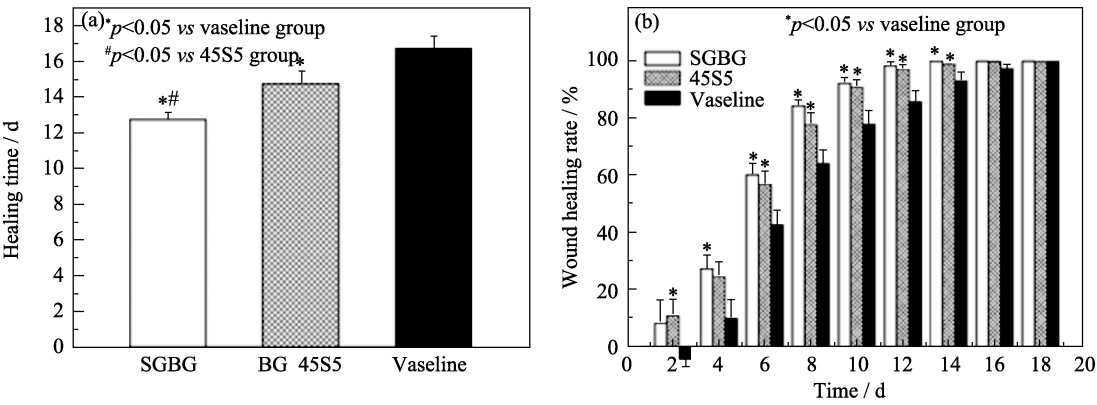


图 6 各组的创面愈合时间(a)和各组各时相点的创面愈合率(b)
Fig. 6 (a) Wound healing times of three groups and (b) Wound healing rates of the diabetic rats treated by different methods (n=8)

为(12.75±0.37) d, 45S5 为(14.75±0.65) d, 凡士林组为(16.75±0.65) d, 且生物活性玻璃组与凡士林组相比有显著性差异($P<0.05$), SGBG 组的创面愈合时间也明显短于 45S5 组($P<0.05$)。从创面愈合率来看(图 6(b)), 同一时间点生物活性玻璃组的创面愈合率显著高于凡士林组($P<0.05$), 但 SGBG 和 45S5 组之间相比无显著差异。

2.6 组织学分析

术后 7 d, 各组创面均可观察到细胞核呈圆形和类圆形的炎症细胞, 并且有梭形的成纤维细胞(图 7)。SGBG 和 45S5 组镜下可见少量炎症细胞, 大量成纤维细胞和丰富的胶原, 毛细血管密集并与创面垂直, 向创面表层生长。凡士林组仍然有大量炎症细胞存在, 也可见成纤维细胞, 但几乎不见新生血管芽。且 SGBG 组中, 部分生物活性玻璃颗粒进入创面内部并留下孔道, 并可见更多胶原的沉积。术后 14 d, SGBG 组最早见上皮完全覆盖创面, 并有丰富的细胞外基质, 其余组上皮还未完全覆盖创面。

创面修复是一个动态、交互的过程, 涉及可溶性调节因子、细胞和细胞外基质。创面修复包括三个相互重叠的阶段, 分别是炎症期、增殖期和重塑期^[17]。相比正常创面, 由于糖尿病产生的血管病变、神经病变、免疫功能和生物学功能紊乱, 糖尿病创面的愈合要复杂的多, 因此往往难以愈合^[18-19]。而肉芽组织的生成与退缩是伤口愈合、组织重建的关键步骤。肉芽组织中含有许多功能活跃的类上皮样细胞和干细胞, 它们具有强大的增殖能力, 对肉芽组织增殖填充伤口具有重要作用^[20]。根据实验中大体观察和组织切片结果, 可将各组的肉芽组织形成时间作出区分(表 1)。可以看出, 相对凡士林组, 生物活性玻璃可以通过促进肉芽组织的生长, 缩短肉芽组织存在的时间, 从而促进了创面的快速愈合。

表 1 各组创面愈合过程的肉芽组织形成时间(d)
Table 1 The stages time of granulation tissue formation in different groups (d)

Granulation tissue	Bioactive glass/d	Vaseline
Prophase	0–2	0–4
Early stage	2–4	6–10
Peaking stage	4–6	10–16
Reducing stage	8–12	16–18
Vanishing stage	After 12	After 18

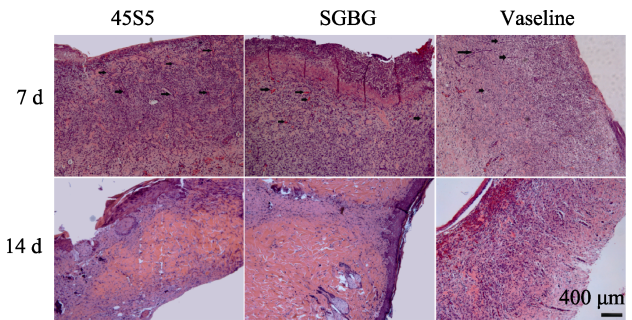


图 7 术后 7 和 14 d 各组的 HE 染色图
Fig. 7 Representative images of H&E staining of wound sections at 7 d and 14 d after surgery. All pictures were taken under 10 times magnification using a Zeiss microscope (bar represents 400 μm). Arrows indicate blood vessels

3 结论

- 1) SGBG 和 45S5 都为无定形态结构。熔融法生物活性玻璃结构致密, 比表面积较小, 因含碱金属的量较高, 所以在 SBF 中浸泡后其 pH 值升幅大; 溶胶-凝胶生物活性玻璃 SGBG 具有二级微球结构, 比表面积较 45S5 大得多, 在 SBF 中浸泡一定时间后具有弱碱性, 有利于创面愈合。
- 2) 生物活性玻璃在促进糖尿病创面愈合方面主要表现为: ①SGBG 能较快诱导上皮细胞增殖、分化、移行, 从而形成透明的新生上皮; ②局部形成

碱性环境,可有效中和创面的酸性渗出物,抑制感染,利于创面的快速愈合;③促进肉芽组织生长,且 SGBG 组要优于 45S5。

参考文献:

- [1] Brem Harold, Tomic-canic Marjana. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 2007, **117(5)**: 1219–1222.
- [2] Hench L L. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1998, **41(4)**: 511–518.
- [3] Hencl L L, Splinter R J, Allen W C, *et al.* Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1971, **5(6)**: 117–141.
- [4] Gatti A, Valdr G, Andersson H. Analysis of the in vivo reactions of a bioactive glass in soft and hard tissue. *Biomaterials*, 1994, **15(3)**: 208–212.
- [5] Verrier S, Blaker J J, Hench L L, *et al.* PDLLA/Bioglass® composites for soft-tissue and hard-tissue engineering: an *in vitro* cell biology assessment. *Biomaterials*, 2004, **25(15)**: 3013–3021.
- [6] Day R M. Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis *in vitro*. *Tissue Engineering*, 2005, **11(5)**: 768–777.
- [7] Day R M, Boccaccini A R, Hench L L, *et al.* Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 2004, **25(27)**: 5857–5966.
- [8] Keshaw H, Forbes A, Day R M. Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass. *Biomaterials*, 2005, **26(19)**: 4171–4179.
- [9] Xynos I D, Edgar A J, Buttery L D K, *et al.* Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, **55(2)**: 151–157.
- [10] Mortazavi V, Naahrkhalaji M M, Fathi M H, *et al.* Antibacterial effects of Sol-Gel-derived bioactive glass nanoparticle on aerobic bacteria. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010, **94A(1)**: 160–168.
- [11] Hench L L. Genetic design of bioactive glass. *Journal of the European Ceramic Society*, 2009, **29(7)**: 1257–1265.
- [12] Chen Xiao-feng, Meng Yong-chun, Li Yu-li, *et al.* Investigation on bio-mineralization of melt and Sol-Gel derived bioactive glasses. *Applied Surface Science*, 2008, **255(2)**: 562–564.
- [13] Hench L L, West J K. The Sol-Gel process. *Chemical Reviews*, 1990, **90(1)**: 33–72.
- [14] Hench L L. Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, 1991, **74(7)**: 1487–1510.
- [15] Ye Yue-Li, Wang Shi-Hui, Sun Ju-Mei, *et al.* Healing effect of inorganic elements on second degree burn wounds. *Clinical Medicine*, 2007, **27(7)**: 48–49.
- [16] Zhou Lai-sheng, Liao Zhen-jiang, Zhang Qin, *et al.* Bio-inductive effects of inorganic elements on skin wound healing. *Chinese Journal of Burns*, 2005, **21(5)**: 363–366.
- [17] Epstein F H, Singer A J, Clark R A F. Cutaneous wound healing. *New England Journal of Medicine*, 1999, **341(10)**: 738–746.
- [18] Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabetic Medicine*, 2006, **23(6)**: 594–608.
- [19] Maruyama K, Asai J, Li M, *et al.* Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing. *The American Journal of Pathology*, 2007, **170(4)**: 1178–1191.
- [20] Gurtner G C, Werner S, Barrandon Y, *et al.* Wound repair and regeneration. *Nature*, 2008, **453(7193)**: 314–321.