

网络出版时间: 2023-05-30 17:23:30 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.R.20230529.1631.001.html>

◇基础医学研究◇

负载褐藻多酚的丝素蛋白 GBR 生物膜制备及其性能的体外实验研究

陈文泽¹ 邹多宏^{1,2}

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.001

摘要 目的 通过制备负载褐藻多酚 (PT) 的双层丝素蛋白 (SF) 膜, 测试其力学性能、生物相容性及其对成骨分化的影响, 研究其作为引导骨再生屏障膜的可能性。方法 将不同脱胶时间处理后的 SF 溶液通过溶液浇筑技术、定向冷冻技术以及冷冻干燥技术处理后制备成 SF 双层膜, 采用力学万能试验机测定湿态条件下各组膜样品 ($n=5$) 的抗拉强度。取抗拉强度最大的 SF 双层膜所对应的 SF 溶液重新制备膜样品, 用扫描电镜观察其微观结构。通过在粗糙面负载 PT 制备 PT-SF 双层膜, 使用傅里叶红外光谱仪分析 PT 与 SF 双层膜的相互作用。利用扫描电镜观察人牙槽骨来源的骨髓间充质干细胞 (hABMSCs) 在粗糙面的黏附情况, 通过 CCK-8 及活死细胞染色探究 PT-SF 双层膜的生物相容性。用 qRT-PCR 法、ALP 染色和茜素红染色检测各组 hABMSCs 的成骨向分化情况。结果 由脱胶时间为 30 min 的 SF 溶液制备出的 SF 双层膜的抗拉强度最大, 达 (3.293 ± 0.1228) MPa。SF 双层膜的光滑面致密光滑, 粗糙面呈纵向有序的疏松多孔结构。褐藻多酚通过氢键、疏水作用力等方式负载到 SF 双层膜的粗糙面上, 空白组、SF 组及 PT-SF 组之间的 CCK-8 及活死细胞染色结果均无明显差异, 且与空白组和 SF 组相比 PT-SF 促进了 hABMSCs 的成骨向分化。结论 PT-SF 双层膜兼具良好的机械性能和生物学性能, 可在一定程度上促进 hABMSCs 的成骨向分化。该研究成功制备了 PT-SF 双层膜。

关键词 褐藻多酚; 丝素蛋白; 复合膜; 定向冷冻; 成骨分化
中图分类号 R 782

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0885-06

2023-03-16 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 32171347); 上海交通大学医学院生物材料与再生医学研究院联合攻关项目(编号: 2022LHA04); 上海交通大学医学院附属第九人民医院临床研究助推计划项目(编号: JYLJ202102)

作者单位: ¹ 安徽医科大学口腔医学院, 安徽医科大学附属口腔医院, 安徽省口腔疾病研究重点实验室, 合肥 230032

² 上海交通大学口腔医学院, 上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔外科, 上海市口腔医学重点实验室, 上海 200001

作者简介: 陈文泽, 男, 硕士研究生;

邹多宏, 男, 教授, 研究员, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zdhyy@ahmu.edu.cn

由牙周炎症、外伤、感染等原因造成的牙槽骨骨量不足使得口腔种植体在植入后无法实现充分的骨整合, 从而不利于口腔种植术后获得良好的预后^[1]。引导骨再生(guided bone regeneration, GBR)技术是临床上治疗牙槽骨缺损常用且有效的方法之一, 通过屏障膜隔绝骨缺损区域外非成骨细胞向缺损区域的迁移, 从而为缺损区域内骨组织的形成提供了空间, 因此, 屏障膜在 GBR 技术中发挥着至关重要的作用^[2]。理想的 GBR 屏障膜应具备良好的机械性能、生物相容性、生物可降解性以及一定的促成骨能力等特性^[3]。如何获得兼具这些特性的 GBR 屏障膜仍是亟待解决的问题。该实验使用丝素蛋白(silk fibroin, SF)制备了双层丝素蛋白膜, 并在其粗糙面上负载褐藻多酚(phlorotannins, PT), 使该膜兼具生物可降解性、良好的抗拉强度、良好的生物相容性以及促进人牙槽骨骨髓间充质干细胞成骨向分化的能力, 可作为新型骨组织工程生物屏障膜使用。

1 材料与方法

1.1 合成材料 蚕茧(浙江久恒蚕丝制品经营部); 碳酸钠、溴化锂(美国 Sigma-Aldrich 公司); MWCO 3500 透析袋(美国 Pierce 公司); 褐藻多酚(陕西帕尼尔公司)

1.2 主要试剂与仪器 α -MEM、胰酶消化液、青-链霉素溶液、BCIP/BNT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); 活死细胞染色试剂盒(美国 Proteintech 公司); 胎牛血清(美国 Gibco 公司); 人骨髓间充质干细胞成骨诱导分化试剂盒(广州赛业生物科技有限公司); CCK-8 试剂(日本同仁化学研究所); PCR 引物(上海生物工程股份有限公司); CO₂ 孵育箱、酶标仪、实时荧光定量 PCR 仪、傅里叶红外光谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 扫描电子显微镜(日本电子株式会社); 高温

高压灭菌锅(厦门致微仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 人牙槽骨骨髓干细胞的分离与培养 门诊收取 18~24 周岁女性患者骨阻生第 3 磨牙时去除的牙槽骨,放入取材液(含 5%青-链霉素双抗溶液的 α-MEM 的培养基)中,冰盒内保存。用含有 2% 双抗的 PBS 冲洗 3 次,用无菌手术刀片清除附着软组织,用组织剪分离骨松质并剪碎,5 d 后首次换液,以后每 3 d 换液 1 次,培养 10~12 d 获得 P0 代。将获得的原代细胞进行传代扩增,计数,将细胞冻存备用。取第 3 代 hABMSCs 供实验用。

1.3.2 制备 SF 溶液 蚕茧在 0.02 mol/L 碳酸钠溶液中煮沸 30、60、90 min 后在蒸馏水中冲洗 3 次,每次 30 min 进行脱胶处理。脱胶后的蚕丝干燥 12 h 后在 60 °C 的 9.3 mol/L 溴化锂溶液中溶解 4 h,所得的溶液装入 MWCO 3500 透析袋内在蒸馏水中透析 2 d。最后将透析袋内的溶液移入离心管,18 000 r/min 离心 2 次,每次 20 min,收集上清液。

1.3.3 制备 PT-SF 双层膜 将 SF 溶液浇铸于亚克力板上,室温放置 24 h 后成膜,真空水蒸气处理 24 h,取出后固定于不锈钢板上,在膜上涂布 SF 溶液,放入 -80 °C 冰箱,使不锈钢板与冰箱隔板紧密接触,冷冻过夜后将其转入冻干机冻干,再经真空水蒸气处理 24 h 获得 SF 双层膜。将 3.5 μg 的 PT 溶解于 1 ml 无水乙醇中制备 PT 溶液,按照 6.5 μl/cm² 的比例在 SF 双层膜的粗糙面上滴加 PT 溶液,放置在生物安全柜中直到干燥,并保存在 -80 °C 冰箱中供后续使用。

1.3.4 力学测试 将不同脱胶时长的 SF 双层膜裁剪为长 100 mm、宽 10 mm 的测试样品,浸泡于 PBS 内室温过夜,并通过力学万能实验机以 0.01 mm/s 的拉伸速度匀速拉伸直至样品断裂,测量其室温条件下的湿态抗拉强度,每组样品重复测试 5 次。

1.3.5 结构表征 取抗拉强度最大的 SF 双层膜所对应的 SF 溶液重新制备膜样品。低真空下喷金后使用扫描电镜在 15.0 kV 的加速电压下拍摄样品的光滑面与粗糙面,取 PT 粉末、SF 膜和 PT-SF 双层膜采用傅立叶变换红外光谱仪分析各成分。

1.3.6 细胞生物相容性实验 按照国际标准组织(ISO/EN10993-12)规定提取 SF 双层膜与 PT-SF 双层膜的浸提液,将高温高压消毒后的各组样品浸泡于含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素溶液的 α-MEM 培养基内 24 h,样品与培养基比例为 1 g/10 ml^[4]。在 96 孔板内接种细胞,每组每个时间点 5 个副孔,

每孔接种 1 × 10⁴ 个 hABMSCs。接种 24 h 后更换培养基,对照组使用普通培养基培养,SF 组与 PT-SF 组使用对应的浸提液培养,此后每 3 d 换液 1 次。在 1、4、7、14 d 时分别弃去培养基,PBS 清洗 2 次,每孔加入 CCK-8 溶液(CCK-8 : DME = 1 : 9) 100 μl,37 °C 孵育 2 h 后使用酶标仪读取每孔在 450 nm 处的吸光度值。

1.3.7 细胞活力及细胞黏附实验 细胞活力实验:将 SF 双层膜、PT-SF 双层膜制备成直径 10 mm 的圆形样品。在每个样品上接种 5 × 10⁴ 个 hABMSCs,空白组将细胞接种于 24 孔板底,每组 3 个复孔,培养 24 h 后按照活死细胞染色试剂盒使用说明进行染色操作,使用荧光显微镜进行观察;细胞黏附实验:将 PT-SF 双层膜制备成直径 6 mm 的圆形样品。在每个样品的粗糙面上接种 1 × 10⁴ 个 hABMSCs,48 h 后,PBS 清洗 3 遍,用 4% 多聚甲醛固定样品 30 min 后 PBS 清洗 3 遍,使用扫描电镜拍摄样品。

1.3.8 细胞成骨分化的检测 qRT-PCR:将 1 × 10⁵ 个 hABMSCs 分别接种在 SF 双层膜和 PT-SF 双层膜的粗糙面上,细胞接种 24 h 后吸弃培养基,PBS 清洗 2 次后每孔加入成骨诱导培养基 1 ml,此后每 3 d 更换 1 次,在成骨诱导第 7 天用 TRIzol 提取细胞中的 RNA 并根据试剂说明书逆转录合成 cDNA。采用 qRT-PCR 检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP),RUNX 相关转录因子 2(RUNX family transcription factor 2,RUNX2)和成骨细胞特异性转录因子(Osterix,OSX)基因表达水平(引物序列见表 1)。ALP 染色与茜素红染色:将消毒后的各组样品分别浸泡于成骨诱导培养基内 24 h,样品与培养基的比例为 1 g/10 ml,获得浸提液。将 hABMSCs 接种于 12 孔板内,每孔 1 × 10⁵ 个,24 h 后更换成骨诱导培养基或相应浸提液,每 3 d 换液 1 次,7 d 后采用 ALP 染色的方法检测 ALP 活性,14 d 后采用茜素红染色的方法检测钙盐沉积情况。

表 1 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
ALP	F: GTGAACCGCAACTGGTACTC
	R: GAGCTGCGTAGCGATGTCC
RUNX2	F: TGGTTACTGTTCATGGCGGGTA
	R: TCTCAGATCGTTGAACCTTGCTA
OSX	F: CCTCTGCGGGACTCAACAAC
	R: AGCCCATTAGTGCTTGTAAGG
GAPDH	F: GTCAGTGGTGGACCTGACCT
	R: TGCTGTAGCCAAATTCCTTG

1.4 统计学处理 采用 SPSS Statistics 进行统计学

分析,所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,分别采用双因素方差分析和单因素方差分析对 CCK-8 和 qRT-PCR 结果进行分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同脱胶时间的丝素蛋白溶液制备的膜抗拉强度的比较 图 1A 为分别由脱胶时间 30、60、90 min 的丝素蛋白溶液制备而成的丝素蛋白双层膜在湿态条件下的拉伸曲线;随着脱胶时间从 30、60 min 增加至 90 min,丝素蛋白双层膜的抗拉强度从 (3.293 ± 0.1228) 、 (2.649 ± 0.0966) MPa 降低至 (2.077 ± 0.1813) MPa(图 1B)。

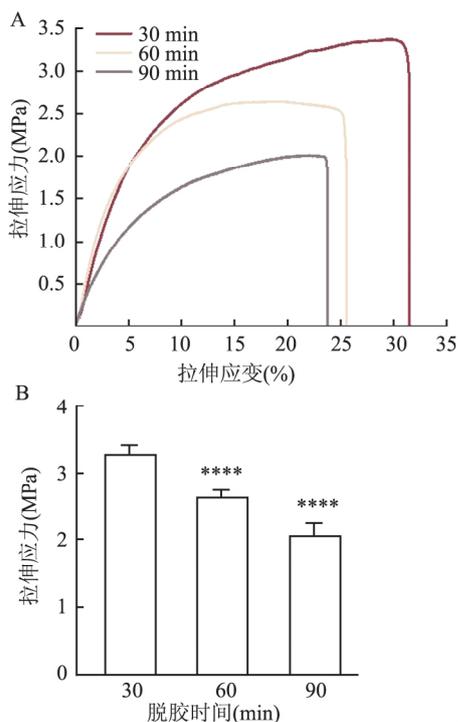


图 1 SF 双层膜的抗拉强度测试

A: 经不同脱胶时间处理后的 SF 溶液制备的 SF 膜的拉伸曲线; B: 不同脱胶时间处理后的 SF 溶液制备的 SF 膜的拉伸强度;与 30 min 组比较: **** $P < 0.0001$

2.2 样品表征 扫描电镜可见 SF 双层膜光滑面表面致密光滑(图 2A),粗糙面疏松多孔(图 2B),截面可见粗糙面呈纵向有序多孔的结构(图 2C);与 SF 相比,在 PT-SF 中氢键和 N-H 伸缩振动由 3275 cm^{-1} 移动至 3274 cm^{-1} ,C-H 伸缩振动由 2937 cm^{-1} 移动至 2930 cm^{-1} ,C-N 伸缩振动和 N-H 弯曲振动由 1514 cm^{-1} 移动至 1512 cm^{-1} (图 2D)。这表明 PT 可能通过氢键、疏水作用等作用力与 SF 发生了相互作用,从而结合到了 SF 双层膜的粗糙面上。

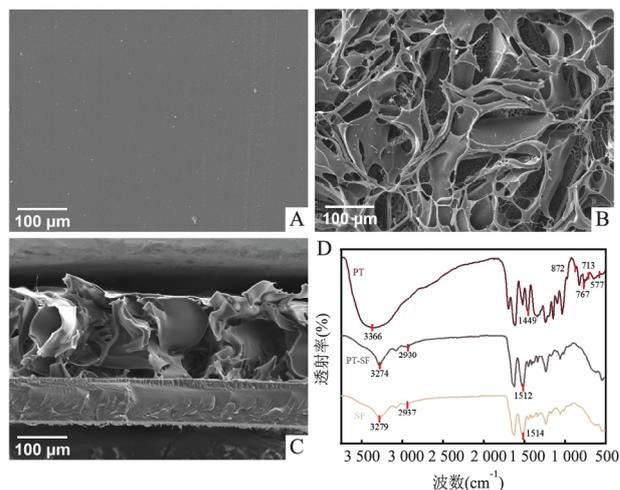


图 2 SF 双层膜及 PT-SF 双层膜的微观结构及成分分析

A - C: 光滑面、粗糙面、横断面 PT-SF 双层膜的扫描电镜 $\times 200$; D: FTIR 结果

2.3 细胞黏附能力及 PT-SF 双层膜生物相容性实验 hABMSCs 接种在 PT-SF 双层膜的粗糙面 48 h 后,扫描电镜结果表明细胞可以较好的黏附在 PT-SF 双层膜的粗糙面上(图 3A、B)。CCK-8 结果显示,使用浸提液培养 1、4、7、14 d 后,空白组、SF 组和 PT-SF 组之间的吸光度值无明显差异(图 3C);活死细胞染色结果如图 3D 显示,活细胞呈绿色荧光(Live),死细胞呈红色荧光(Dead),空白组、SF 组及 PT-SF 组粗糙面上活死细胞比例无明显差异。

2.4 促成骨分化能力 qRT-PCR 结果显示,与空白组及 SF 组相比,PT-SF 组的成骨相关基因 ALP、RUNX2 ($P = 0.0565$, $F = 10.38$) 以及 OSX 的表达显著性增强,其中 ALP 与 OSX 的差异有统计学意义 ($P = 0.0087$, $F = 36.66$; $P = 0.0475$, $F = 11.89$) (图 4A - C) 且成骨诱导至第 7 天时 ALP 染色及第 14 天时茜素红染色结果显示,PT-SF 组的 ALP 阳性结果及茜素红着色更加明显(图 4D、E)。

3 讨论

临床上使用的可吸收性 GBR 膜多由人工合成高分子材料或天然高分子材料制成,人工合成高分子材料制备的 GBR 膜在降解过程中可能会引发局部的炎症反应不利于成骨^[5],而天然高分子材料制备的膜则通常力学性能较差^[6]。丝素蛋白是一种来源广泛的天然高分子蛋白材料,具有优异生物相容性和力学性能,同时其分子结构与构成骨组织的主要有机成分 I 型胶原纤维具有高度的相似性,因此,在骨组织工程领域被公认为颇具潜力的天然材

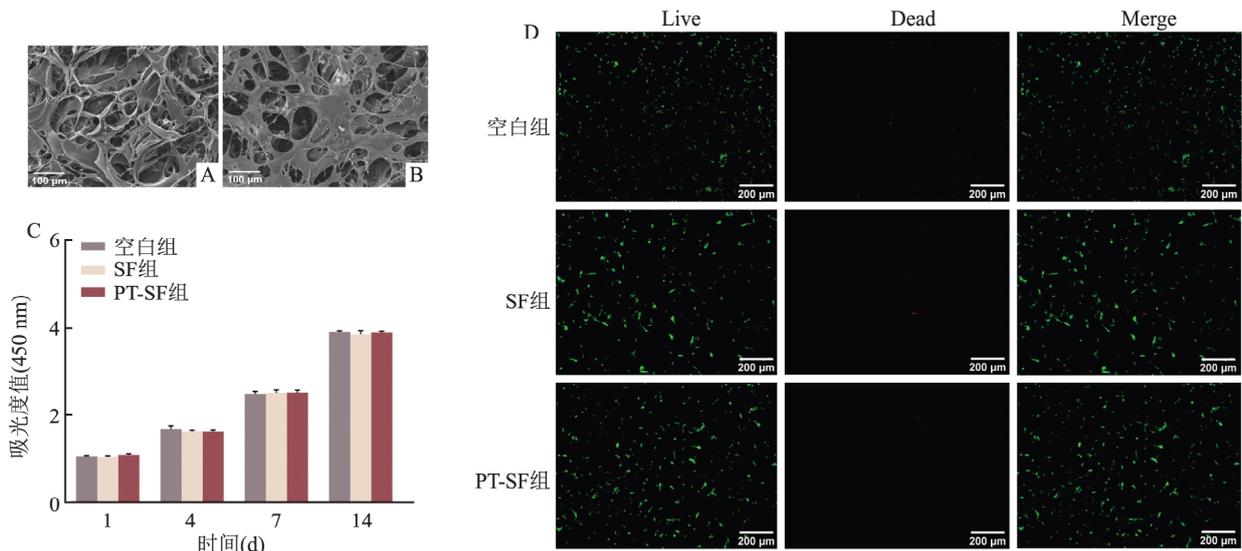


图3 PT-SF 膜的生物相容性

A: 未接种细胞的粗糙面 ×200; B: 接种细胞 48 h 后的粗糙面 ×200; C: CCK-8 结果; D: 接种细胞 24 h 后活死细胞染色结果 ×100

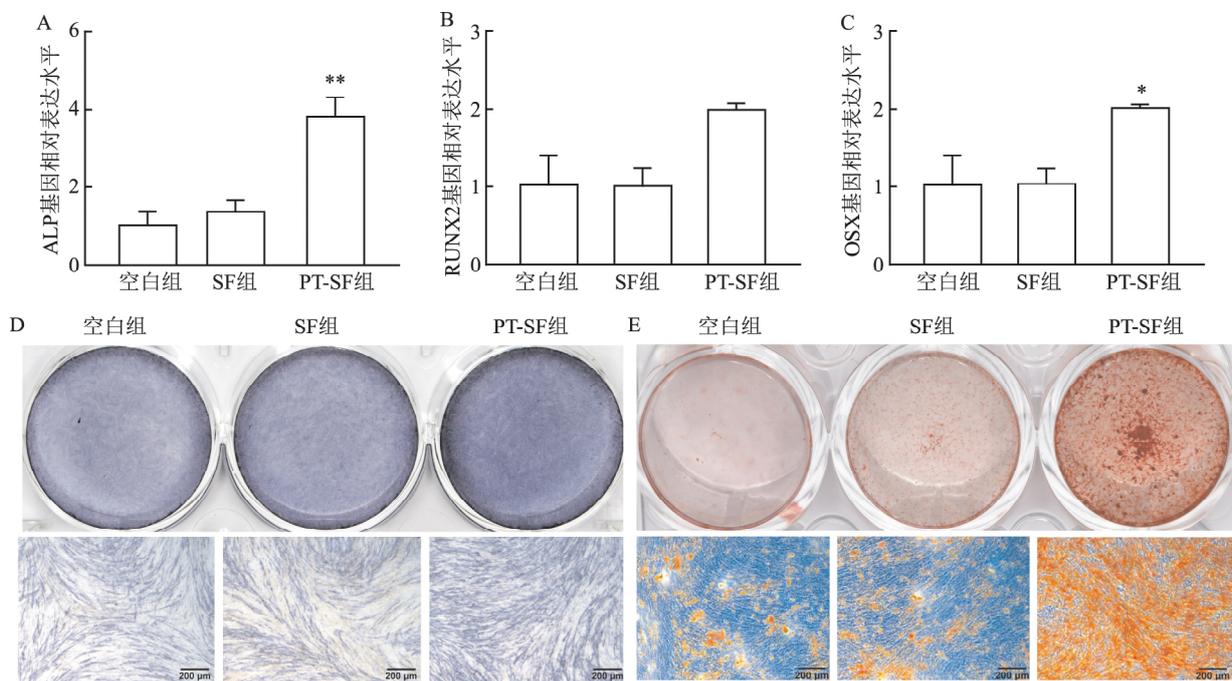


图4 PT-SF 双层膜的促成骨分化能力检测

A - C: 成骨相关基因表达的检测; D: ALP 染色 ×100; E: 茜素红染色 ×100

料^[7]。褐藻多酚是一种来源于褐藻的多酚类物质，既往研究^[8]表明褐藻多酚具有抗氧化、抗菌等作用，同时也有研究^[9-10]表明褐藻多酚具有促进骨髓间充质干细胞成骨方向分化的能力。

该实验通过溶液浇铸、定向冷冻及冷冻干燥技术制备了由致密层和多孔层共同构成的双层丝素蛋白膜。其朝向软组织面的致密层表面光滑结构致密，致密的结构可为 SF 双层膜提供良好的力学性

能，拉伸实验^[11]结果表明其湿态下抗拉强度可达 (3.293 ± 0.122) MPa，显著高于市售 Bio-Gide 胶原膜的 (1.68 ± 0.54) MPa；朝向骨组织面的多孔层则具有粗糙表面，呈现出且与致密层的表面相垂直的“蜂窝”状多孔结构，这种结构可为细胞提供有效的附着位点，对于骨缺损区域内成骨相关细胞的黏附具有一定的促进作用^[12]。在此基础上利用多酚类物质易与蛋白质通过氢键、疏水键及共价键发生反

应的特点,在SF双层膜的粗糙面上实现了褐藻多酚的负载^[13]。体外细胞实验结果表明细胞可以较好的与PT-SF双层膜共存并能随培养时间的延长而不断增殖。既往研究^[9]表明,褐藻提取物可能通过激活Wnt和BMP通路上调成骨相关基因RUNX2、OSX以及ALP的表达。体外实验表明,与空白组和SF组相比PT-SF组由于PT的加入,hABMSCs内RUNX2与OSX的表达增强,同时ALP表达水平及活性也均高于空白组和SF组。以上结果表明PT-SF双层膜具有良好的机械性能以及生物安全性,双层膜的结构设计兼顾了屏障功能以及促进细胞黏附的功能,同时结合在粗糙面上的PT弥补了SF双层膜在促成骨能力上的缺陷。

综上所述,该研究通过溶液浇铸、定向冷冻及冷冻干燥技术构建了PT-SF双层膜。相关实验结果显示,所制备的PT-SF双层膜有望作为新型的GBR膜应用于临床。

参考文献

- [1] Lian M, Han Y, Sun B, et al. A multifunctional electrowritten bi-layered scaffold for guided bone regeneration[J]. *Acta Biomater*, 2020, 118: 83–99.
- [2] Toledano-Osorio M, Manzano-Moreno F J, Ruiz C, et al. Testing active membranes for bone regeneration: a review[J]. *J Dent*, 2021, 105: 103580.
- [3] Elgali I, Omar O, Dahlin C, et al. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited[J]. *Eur J Oral Sci*, 2017, 125(5): 315–37.
- [4] 赵正宜,肖剑虹,刘重远,等. 聚乙烯醇-细菌纤维素复合可吸收生物屏障膜的制备及理化性能研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(10): 1513–7.
- [5] Tumedei M, Mijiritsky E, Mourão C F, et al. Histological and biological response to different types of biomaterials: a narrative single research center experience over three decades[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(13): 7942.
- [6] Sionkowska A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: review[J]. *Prog Polym Sci*, 2011, 36(9): 1254–76.
- [7] Bhattacharjee P, Kundu B, Naskar D, et al. Silk scaffolds in bone tissue engineering: an overview[J]. *Acta Biomater*, 2017, 63: 1–17.
- [8] Catarino M D, Amarante S J, Mateus N, et al. Brown algae phlorotannins: a marine alternative to break the oxidative stress, inflammation and cancer network[J]. *Foods*, 2021, 10(7): 1478.
- [9] Oh J H, Ahn B N, Karadeniz F, et al. Phlorofucofuroeckol A from edible brown alga *Ecklonia cava* enhances osteoblastogenesis in bone marrow-derived human mesenchymal stem cells[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(10): 543.
- [10] Kim M, Kim G. Electrospun PCL/phlorotannin nanofibres for tissue engineering: physical properties and cellular activities[J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90(1): 592–601.
- [11] Raz P, Brosh T, Ronen G, et al. Tensile properties of three selected collagen membranes[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 5163603.
- [12] Zhang K R, Gao H L, Pan X F, et al. Multifunctional bilayer nanocomposite guided bone regeneration membrane[J]. *Matter*, 2019, 1(3): 770–81.
- [13] 赵建波,姜海鑫,吴慧彬,等. 负载褐藻多酚的麦醇溶蛋白纳米递送体系的制备及特性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(5): 136–41.

Preparation and *in vitro* performance of silk fibroin GBR membrane loaded with phlorotannins

Chen Wenze¹, Zou Duohong^{1,2}

(¹*Stomatological College of Anhui Medical University, The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Key Lab of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032;*

²*Stomatological College of Shanghai Jiao Tong University, Dept of Oral Surgery of Shanghai Jiao Tong University Affiliated Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai 200001)*

Abstract Objective To explore the feasibility of silk fibroin (SF)–phlorotannins (PT) double layer membranes as barrier membrane for guided bone regeneration (GBR) by exploring the mechanical property, biocompatibility, and the effect on osteogenic differentiation of SF-PT double layer membranes. **Methods** The SF solution treated with different degumming time was prepared into SF bilayer by solution cast technique, ice template method and lyophilization. The tensile strength of the membranes under hydration were measured *via* mechanical universal machine ($n=5$). The microstructures of the composite membranes with the highest tensile strength under hydration condition were observed by scanning electron microscopy. Then the rough surfaces of SF double layer membranes was loaded with PT to prepare SF-PT double layer membranes, Fourier transformed infrared spectroscopy was

IL-10 调控 HaCaT 细胞增殖及分化的分子机制

尹雪莉¹, 贾波², 刘莉³, 李明聪⁴, 张军⁵, 杨振⁵, 白红枚⁵, 胡伟康⁵, 张素梅⁵, 张胜权⁵

摘要 目的 探讨白细胞介素 10 (IL-10) 对皮肤角质形成细胞 (HaCaT) 增殖影响和对氯化钙 (CaCl₂) 诱导的角质形成细胞分化标志物的表达影响及其可能的分子机制。方法 以不同浓度 IL-10 (0、3、10、30 ng/ml) 处理 HaCaT 细胞不同时间 (0、24、48、72 h), MTS 分析细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞周期; IL-10 (终浓度为 10 ng/ml) 预处理 HaCaT 1 h, 加入或不加 CaCl₂ (终浓度为 1.2 mmol/L) 培养 24、48、72 h, Western blot 检测 IL-10 对 HaCaT 分化标志物表达影响; 丝裂原蛋白激活激酶-胞外信号调节激酶 (MAPKs-ERK1/2) 特异性抑制剂 PD98059 及磷脂酰肌醇激酶-丝氨酸/苏氨酸激酶 (PI3K-AKT) 特异性抑制剂 LY294002 预处理 HaCaT 细胞, 分别提取细胞总 RNA 和蛋白, 荧光定量 PCR (RT-qPCR) 和 Western blot 检测 IL-10 对 HaCaT 细胞分化标志物

(Keratin1、Keratin5、Involucrin) 表达影响。结果 MTS 结果显示, 在 72 h 内, IL-10 (30 ng/ml 和较低浓度) 对 HaCaT 细胞增殖无影响; 流式细胞分析结果提示 IL-10 不影响 HaCaT 细胞周期进程。Western blot 分析显示, IL-10 上调 HaCaT 角质形成细胞角质细胞分化标志物 Involucrin 表达, 而对 Keratin1 及 Keratin5 没有显著的影响。机制研究分析显示, IL-10 能够活化 ERK1/2 和 AKT 增加其磷酸化水平; RT-qPCR 和 Western blot 结果显示 PD98059 及 LY294002 部分阻断 IL-10 诱导的 Involucrin 的表达。结论 IL-10 在一定浓度范围内不影响 HaCaT 的增殖; IL-10 部分通过 MAPKs-ERK1/2 和 PI3K-AKT 途径上调 HaCaT 分化标志物 Involucrin 表达。

关键词 HaCaT 细胞; 细胞增殖; IL-10; 分化标志物; 信号途径

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0890-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.002

2023-03-06 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 2108085MH266); 安徽省高校科学研究项目(编号: 2022AH050737); 安徽医科大学博士科研资助基金(编号: XJ201939)

作者单位: 安徽医科大学¹ 机能实验中心、³ 科研实验中心、⁵ 生物化学与分子生物学教研室, 合肥 230032

² 湖北省襄阳市食品药品监督管理局, 襄阳 441000

⁴ 合肥市第二人民医院病理科, 合肥 230011

作者简介: 尹雪莉, 女, 实验师;

张胜权, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhangshengquan@ahmu.edu.cn

人白细胞介素(interleukin, IL)-10 属于 II 类 IL-10 家族细胞因子, 细胞因子家族包括 IL-19、IL-20、IL-28A、IL-28B 以及 IL-29 等。IL-10 由 Th2 细胞分泌, 抑制 Th1 细胞分泌细胞因子^[1]。其基因定位于 1 号染色体(1q32.1), 编码 17~20 ku 糖蛋白^[1-2]。IL-10 受体由 α 、 β 两个亚单位组成, 广泛表达于多种组织、细胞, 包括皮肤角质形成细胞^[3]。

carried out to characterize the interaction between PT and SF double layer membranes, and the bone marrow mesenchymal stem cells of human alveolar origins (hABMSCs) adhesion was studied by SEM. CCK-8 assay and live dead staining were used to evaluate the biocompatibility of SF-PT double layer membranes. qRT-PCR, ALP staining and alizarin red stain were carried out to measure the osteogenic differentiation of hABMSCs in different groups. **Results** The SF membranes prepared from SF solution with a degumming time of 30 min has the highest tensile strength, reaching (3.293 ± 0.122 8) MPa. The smooth surface of SF double layer membrane was dense and smooth, while the rough surface was longitudinally ordered loose porous structure. PT was loaded onto the rough surface of the SF double layer membranes by hydrogen bond, hydrophobic interaction and other forces. There was no significant difference in the results of CCK-8 and live dead staining between blank group, SF group and PT-SF group. Compared with blank group and SF group, PT-SF double layer membranes promoted osteogenic differentiation of hABMSCs. **Conclusion** Thus, the PT-SF double layer membranes expressed desired mechanical, biological properties and can promote the osteogenic differentiation of hABMSCs to a certain extent. These results indicate that PT-SF double layer membranes is successfully fabricated, providing a solid foundation for future *in vivo* experiments.

Key words phlorotannins; silk fibroin; composite membrane; directional freezing; osteogenic differentiation