



载纳米氧化锌定向纤维膜促进肌腱 细胞增殖分化的研究*

范佳 辜鹏程 成锡婷 姜强 赵雅 潘晓芳 白燕**

(重庆医科大学药学院, 重庆 400016)

摘要 目的 为模拟肌腱组织的显微结构和力学性能, 促进肌腱组织的再生修复, 制备负载不同质量分数纳米氧化锌且同时具备取向结构的左旋聚乳酸 (PLLA) 纤维膜, 对其进行理化表征和生物性能评价, 探讨其对肌腱细胞增殖分化的影响。方法 利用静电纺丝技术制备 PLLA 纤维支架及含不同质量分数纳米 ZnO 的 PLLA/ZnO 纤维支架。通过扫描电镜、力学拉伸、能谱仪 (EDS) 图谱表征支架的理化性能, 并将支架与小鼠肌腱细胞共培养检测其生物相容性及对细胞增殖、分化的调控作用。结果 纤维支架均呈取向性排列, 锌元素在纤维中均匀分布, PLLA/0.1% ZnO 纤维支架拉伸强度和杨氏模量均显著高于 PLLA 组。PLLA/0.1% ZnO 纤维支架表面细胞数量显著高于 PLLA 组, 且活性更好; 小鼠肌腱细胞沿纤维排列方向呈定向性黏附和生长。结论 取向 PLLA/0.1% ZnO 纤维支架具有优良的理化性能, 并可显著促进肌腱细胞定向生长和增殖分化, 未来有望用于肌腱组织的再生修复。

关键词 纳米氧化锌, 取向纤维, 肌腱修复

中图分类号 R318, R686.1

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0473

肌腱损伤是最常见的肌肉骨骼疾病之一, 且发生率逐年提高。肌腱主要由高度排列的 I 型胶原纤维组成, 是连接肌肉和骨骼的致密纤维结缔组织^[1]。据临床统计: 腱骨损伤占骨骼肌临床病例的 30%, 全球每年新增患者近 400 万例^[2]。每年有超过 30 万例肌腱/韧带相关手术, 在美洲和欧洲国家支出超过 150 亿欧元^[3-5]。显然, 肌腱组织损伤已经成为一个日益严重的公共健康问题。然而, 临床上常用的理疗和手术等方法难以从根本上恢复肌腱组织的结构、功能和生物力学特征。

组织工程技术在肌腱组织的再生领域中有着显著优势。组织工程支架可以提供良好的再生微环境并为新生组织提供结构支撑, 纤维结构与肩袖或肌腱组织的相似性较大, 具有相似的显微结构和力学性能。肌腱结构由排列整齐的纤维束形成, 具有取向结构的纤维可以模仿肌腱组织中天然胶原纤维的结构和功能。为了修复肌腱损伤, 研究人员从多角度对取向纤维支架开展了研究。对齐排列的 3D 取向聚 (ϵ -己内酯) 纳米纤维纱线 (NFYs) 能够模

仿天然肌腱的胶原束和纤维的形貌和机械性能, 增强了腱调蛋白 (tenomodulin, TNMD) 和 I 型胶原等肌腱相关基因和蛋白质的表达。NFYs 通过诱导新胶原的生成和方向来促进体内肌腱修复^[6]。研究通过稳定喷射静电纺丝制备装载聚精氨酸 (Arg) 和透明质酸 (HA) 的左旋聚乳酸 (PPLA) 纤维支架, Arg/HA/PLLA 取向纤维可能通过下调 p53 通路抑制肌腱黏附和凋亡, 以及上调 Esr1 介导的 ER- α 通路促进肌腱再生^[7]。研究表明^[8], 非取向聚己内酯/丝素蛋白电纺纤维膜的弹性模量为 (3.93 \pm 0.05) MPa, 而取向电纺纤维膜为 (70.52 \pm 2.83) MPa, 显著高于非取向静电纺丝纤维膜。此外, 通过制备模拟天然肌腱微观结构与机械性能的壳聚糖取向纳米纤维, 发现该取向纤维能够促进多

* 国家自然科学基金 (32371415), 重庆市自然科学基金 (CSTB2023NSCQ-MSX0307) 和重庆医科大学未来医学青年创新团队发展支持计划 (W0055) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 13883218225, E-mail: baiyan@cqmu.edu.cn

收稿日期: 2023-11-30, 接受日期: 2024-02-27

能干细胞分化为肌腱样细胞, 而原位肌腱修复实验则进一步证实该取向纤维支架可显著改善损伤肌腱的结构及力学性能^[9]。

对于肌腱再生, 除了通过支架材料的拓扑结构诱导组织再生, 还应该提供生物活性因子调控细胞生长分化, 如细胞因子和Ca²⁺、Cu²⁺、ZnO等生物活性离子^[10]。研究表明, 金属离子在人体的正常生命活动过程中发挥着重要作用^[11], 参与许多重要的生物学功能, 调节人体新陈代谢以及促进组织修复。例如, 锌是成纤维细胞增殖和合成胶原蛋白所必需的元素^[12], 具有出色的血管生成和抗菌特性, 可促进伤口愈合^[13], 同时减少肌腱与周围组织黏连, 改善滑动功能和组织病理学特征^[14]。

本文基于锌元素对肌腱组织再生修复的特殊诱导能力, 采用静电纺丝技术, 构建取向结构、微米孔隙和纳米ZnO均匀分布的聚乳酸纤维支架, 对其形貌、结构、理化性能以及生物效应评价, 为今后促肌腱修复支架的设计、研发以及临床应用提供参考, 为促进肌腱组织的再生提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

左旋聚乳酸 (poly(L-lactic acid), PLLA, 分子量: 180 000, 济南岱罡生物); 纳米氧化锌 (ZnO, 粒径: (50±10) nm, 麦克林); 三氯甲烷 (成都市科龙化工试剂厂); 小鼠肌腱细胞 TT-D6 (中国科学院分子细胞科学卓越创新中心细胞库/干细胞库); α -MEM培养基 (大连美仑生物技术有限公司); 胎牛血清 (GIBCO); 钙黄绿素-AM (Calcein-AM) 和碘化丙啶 (PI) 活细胞/死细胞双染试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); CCK-8试剂盒 (APEX BIO)。

1.2 仪器与设备

台式电纺设备 (FM1101, 北京富友马有限公司); 傅里叶红外光谱仪 (Nicolet™ iS™5, Thermo); 力学拉伸仪 (UniVert, CellScale); 台式场发射扫描电镜 (Phenom Pharos G1); 酶标仪 (iMark14071, Bio-Rad); 倒置荧光显微镜 (ECLIPSE Ti, Nikon)。

1.3 ZnO/PLLA纤维膜制备

取0.4 g PLLA溶于5 ml三氯甲烷中, 制成质量浓度 (w/v) 为8%的PLLA溶液; 分别称取0.0025、0.005、0.015、0.025 g纳米ZnO混悬于上述溶液中, 使ZnO浓度分别为0.05%、0.1%、0.3%和

0.5% (w/v)。将纺丝溶液注入一次性注射器, 安装型号为22G的纺丝针头, 设置电压17 kV, 推速0.002 mm/s, 接收器滚筒的转速为1 200 r/min, 调节针头到滚筒的距离为18 cm。制备PLLA、PLLA/0.05%ZnO、PLLA/0.1%ZnO、PLLA/0.3%ZnO、PLLA/0.5%ZnO纤维膜。

1.4 纤维膜形貌表征

通过扫描电子显微镜 (SEM) 观察纤维膜的形貌与取向排列: 将样品裁剪成0.5 cm×0.5 cm大小, 在喷金50 s后放置于真空仓中。使用ImageJ软件对显微镜下PLLA纤维照片中随机选出的30根纤维进行测量, 计算平均直径。

1.5 傅里叶红外光谱

通过傅里叶红外光谱仪 (FTIR) 对不同纤维膜支架进行表征, 将干燥的样品和溴化钾以1:100的比例混合均匀并磨碎制备薄片, 利用透射模式, 记录在4 000~400 cm⁻¹波数范围内的FTIR光谱, 进一步分析其化学组成。

1.6 力学性能测试

纤维支架裁剪成1 cm×4 cm矩形样品, 利用万能力学试验机检测拉伸力学性能。用夹具固定材料两侧, 调整夹具的距离, 保证测试前材料处于伸直状态, 以10 mm/min恒定的速度进行拉伸检测, 直到材料完全断裂为止, 每组样品测试3次取平均值。

1.7 体外细胞培养实验

将不同纤维膜样品按96孔板孔径裁剪后, 浸泡于75%酒精中, 置于紫外灯下照射24 h灭菌, 然后置于96孔板内, 每组设置3个复孔, 每孔加入100 μ l的完全培养基, 于37°C和5% CO₂的培养箱中过夜。取对数生长期的小鼠肌腱细胞, 用胰酶消化后吹散打匀, 利用血细胞计数板进行计数并稀释, 每孔接种6×10³个细胞, 于细胞培养箱中培养待用。

1.7.1 细胞活力

在细胞培养1 d、3 d后, 用PBS清洗3遍, 每孔加入100 μ l Calcein/PI细胞活力和细胞毒性测试染色工作液。避光孵育30 min, 用PBS清洗后通过荧光倒置显微镜观察细胞的活力。

1.7.2 细胞形态

细胞接种72 h后将纤维膜取出, PBS洗涤, 2.5%戊二醛固定过夜。使用梯度酒精浸泡法脱水, 每个梯度10 min。冷冻干燥、喷金, SEM观察表面细胞黏附状态并拍照。

1.7.3 细胞增殖

将纤维膜分别与生长状态良好的小鼠肌腱细胞共培养1、3、5 d后用CCK-8试剂盒检测细胞增殖能力, 于450 nm处检测吸光度(A)值。

1.8 统计学分析

采用SPSS20.0统计软件对实验结果进行分析, 所有统计数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm SD$)表示, $P<0.05$ 表示差异有统计意义(*表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$)。

2 结果与分析

2.1 ZnO/PLLA纤维膜的形貌表征

载不同浓度ZnO的PLLA纤维支架的扫描电镜和直径分布如图1所示, 纤维表面光滑, 取向度高, 且束间具有孔隙结构, 利于营养物质的输送和代谢废物的排出。纳米ZnO质量分数较低时, 在

纤维膜中均匀分散, 随着质量分数的增大, 纤维表面明显可以看见较多聚集状态的ZnO颗粒, 尤其是当ZnO质量分数大于0.3%之后, 聚集情况明显。质量分数为0%、0.05%、0.1%、0.3%、0.5%的ZnO/PLLA纤维的平均直径分别为(2.79±0.65)、(2.90±0.70)、(3.14±0.69)、(3.37±1.09)、(4.82±1.26) μm , 即随着ZnO质量分数的增加, 纤维直径逐渐增大。

2.2 能谱仪分析

用能谱仪(energy dispersive spectrometer, EDS)图谱进一步分析元素组成和分布(图2)。EDS图谱初步证明纳米ZnO颗粒被成功负载于PLLA纤维中, 质量分数较低时, 纳米ZnO在纤维膜中分布较为均匀, 随着质量分数的增大, 检测到锌原子的浓度百分比也随之增大, 同时可以明显观察到聚集。

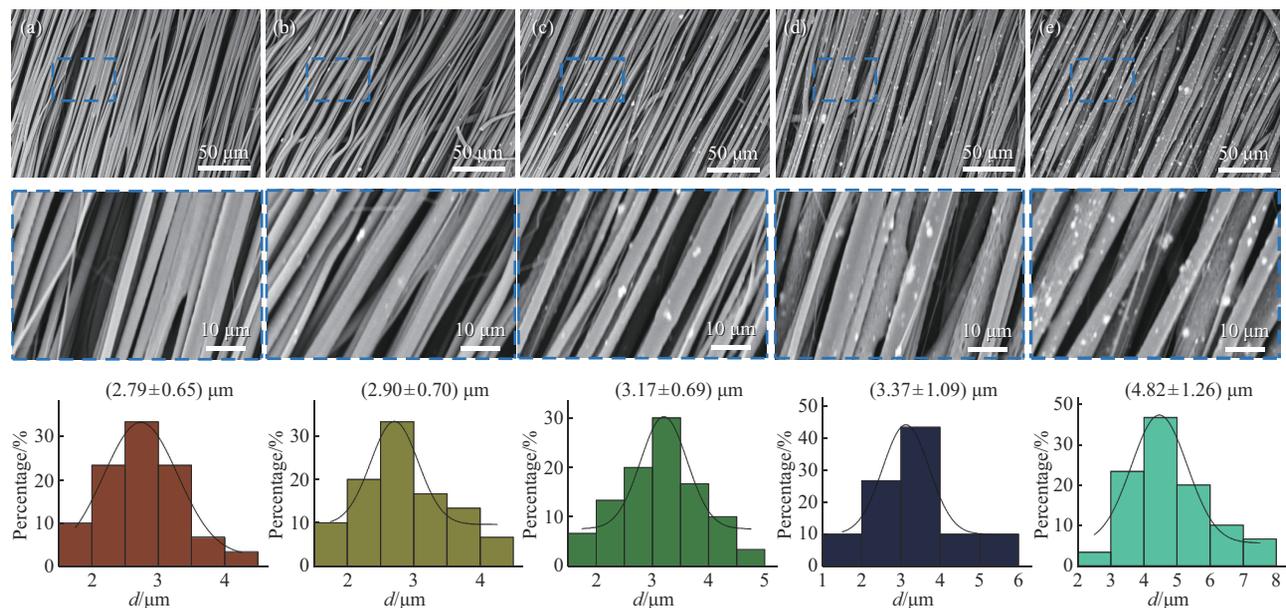


Fig. 1 SEM images and diameter distribution of PLLA fibers with different nanometer ZnO mass fractions

(a-e) Corresponding to 0%ZnO, 0.05%ZnO, 0.1%ZnO, 0.3%ZnO, 0.5%ZnO, respectively.

2.3 傅里叶红外光谱分析

使用FTIR对PLLA、PLLA/0.05%ZnO、PLLA/0.1%ZnO、PLLA/0.3%ZnO、PLLA/0.5%ZnO纤维膜官能团进行分析, 结果如图3。纳米ZnO的特征峰在 426 cm^{-1} 处, 对比PLLA的红外光谱图可知, PLLA/ZnO红外光谱上都出现了ZnO的特征峰, 证明聚乳酸支架上有效负载了纳米ZnO。

2.4 力学性能测试

肌腱连接着骨骼和肌肉系统, 是一个特殊而重要的力学传导组织, 因此具有良好机械强度的生物支架更利于促进肌腱重建。目前可用于静电纺纤维支架制备的基质材料主要有天然聚合物包括胶原蛋白、蚕丝、壳聚糖、透明质酸和海藻酸盐等, 以及聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)、聚己内酯(PCL)、聚乳酸(PLA)等合成材料。天然聚合物

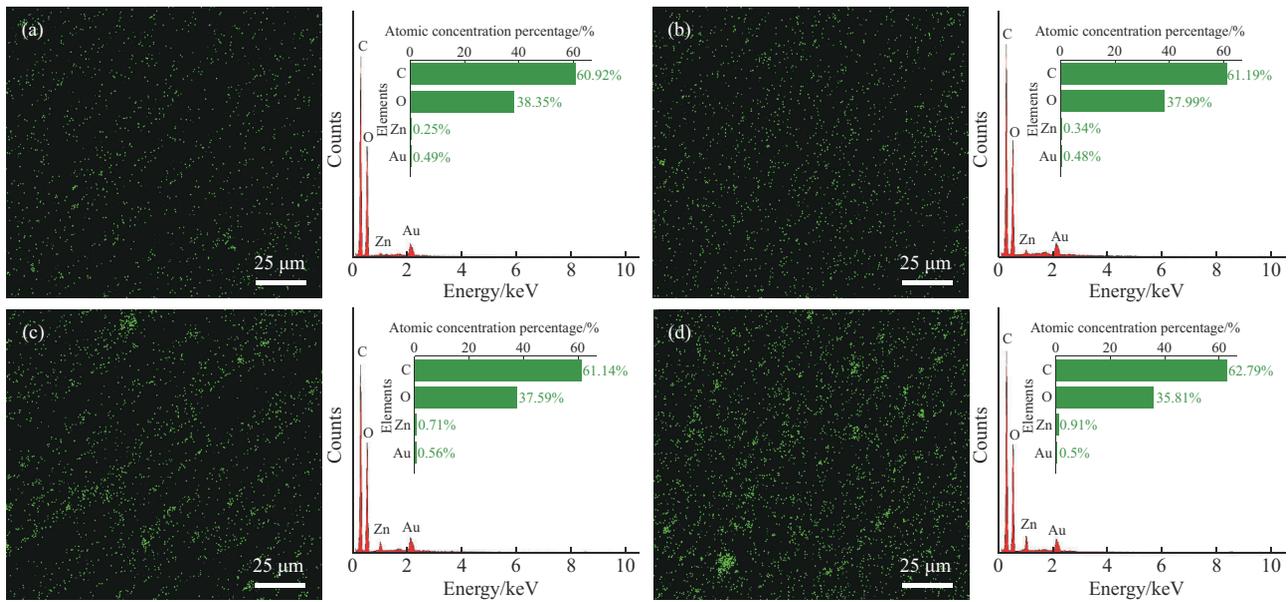


Fig. 2 EDS images of PLLA fibers of nano-ZnO with different mass fractions

(a-d) Corresponding to 0.05%ZnO, 0.1%ZnO, 0.3%ZnO, 0.5%ZnO, respectively.

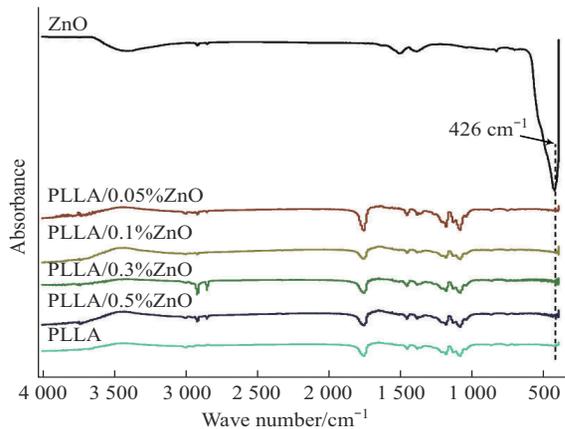


Fig. 3 Infrared spectra of ZnO, PLLA and PLLA-ZnO scaffolds

制成的支架都有比较相似的缺点：较低的机械性能和较差的加工性能。为解决丝素蛋白薄膜机械强度不足的问题，对其进行水退火改性处理，构筑了10、15、20 μm宽度微结构的丝素蛋白薄膜，当微结构为10 μm时最大载荷和杨氏模量与原生肌腱无明显差异^[15]。而合成材料的优点就在于它们的机械性能一般相对较好，并且可通过掺杂纳米粒子、改变结构等方法增强和调节电纺纤维支架的强度和刚度。通过改变PCL纳米纤维的排列方向和几何形状能够显著影响支架的机械性能，取向纤维薄片具有最大的弹性模量比无规纤维薄片高125%，可

用于韧带和肌腱组织工程^[16]。小肠黏膜下层(SIS)是一种天然细胞外基质，将SIS掺入纯PLGA中增强了支架的断裂应变、拉伸强度和弹性模量。并且与无取向排列的纳米纤维相比，无论是否掺入SIS，排列的纳米纤维的极限抗拉强度都有所提高^[17]。

本文制备的5种PLL A纤维的纵向载荷-伸长曲线和力学性能数据表明，随着纳米ZnO含量的增加，纤维的拉伸强度先增加再降低(图4)。PLL A/0.05%ZnO、PLL A/0.1%ZnO的极限抗拉强度分别为(9.26±1.25) MPa、(8.45±0.48) MPa，显著高于其他3组(PLL A: (4.52±0.86) MPa、PLL A/0.3%ZnO: (4.78±0.71) MPa、PLL A/0.5%ZnO: (3.41±0.30) MPa)。此外，杨氏模量结果也表明，与其他组相比(PLL A: (257.41±23.23) MPa、PLL A/0.3%ZnO: (300.13±5.62) MPa、PLL A/0.5%ZnO: (269.83±53.17) MPa)，PLL A/0.05%ZnO((524.88±79.87) MPa)、PLL A/0.1%ZnO((452.29±19.39) MPa)显示出更好的机械性能，更能满足组织再生所需的力学性能要求^[18]。这是因为当纳米ZnO在纤维支架材料中的含量较低时，其能够被较好地分散，ZnO本身具有的高刚性对PLL A纤维起到了补强增韧的效果，使得纤维支架的抗拉强度和杨氏模量都得以增加。但是超过一定用量后，ZnO为无机粒子，PLL A为有机高分子材料，两者相容

性差的缺点暴露出来, 使得较多的 ZnO 粒子无法在 PLLA 纤维表面均匀分散, 出现了团聚现象, 从

而无法达到增强力学性能的效果。

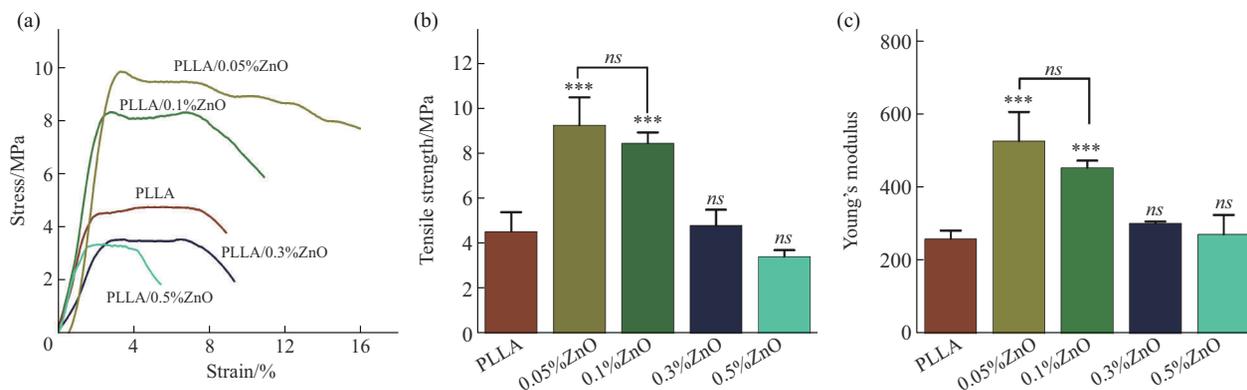


Fig. 4 Mechanical properties of ZnO/PLLA fibers with different mass fractions of ZnO

(a-c) Corresponding to load-elongation curve, tensile strength, Young's modulus, respectively. ns: $P \geq 0.05$, *** $P < 0.001$.

2.5 纤维膜的生物相容性

2.5.1 死活双染

利用死/活细胞染色的方法对细胞的生长情况进行分析, 其中死细胞呈现红色而活细胞则呈现绿色。PLLA、PLLA/0.05%ZnO、PLLA/0.1%ZnO 组大部分 TT-D6 细胞能够存活, 死细胞极少, 证明负载较低浓度 ZnO 的支架对细胞没有明显的毒性 (图 5)。然而, 随着 ZnO 含量增加, PLLA/0.3%ZnO、PLLA/0.5%ZnO 纤维组活细胞的数量逐渐减少, 死细胞的数目逐渐增多, 证明随 ZnO 含量的增加, TT-D6 细胞的活性受到抑制, 因此选择合适的浓度用于肌腱组织重建与修复至关重要。此外, 金属离子的粒径对组织再生也具有一定影响。

ZnO 平均粒径范围在 50~200 nm 内有利于肌腱组织的再生修复, 本研究所使用的纳米 ZnO 平均粒径为 (50 ± 10) nm。研究证明, 将壳聚糖与 ZnO 纳米颗粒 (粒径为 80~200 nm) 联合制备新型管状肌腱修复支架, 植入兔子体内 8 周后肌腱周围黏连减少、滑动功能改善以及表现出更好的组织病理学特征, 表明这种管状支架有利于损伤肌腱的愈合^[14]。静电纺丝聚己内酯/羟基磷灰石/ZnO (粒径为 50~100 nm) 薄膜作为骨-肌腱界面修复的潜在生物材料, 表现出优异的细胞相容性和细胞黏附性, 显著促进成骨、软骨形成、纤维软骨形成和肌腱愈合, 在腱骨界面 (bone-tendon interface, BTI) 修复领域具有巨大的应用潜力^[19]。Zhang 等^[20] 开发了一

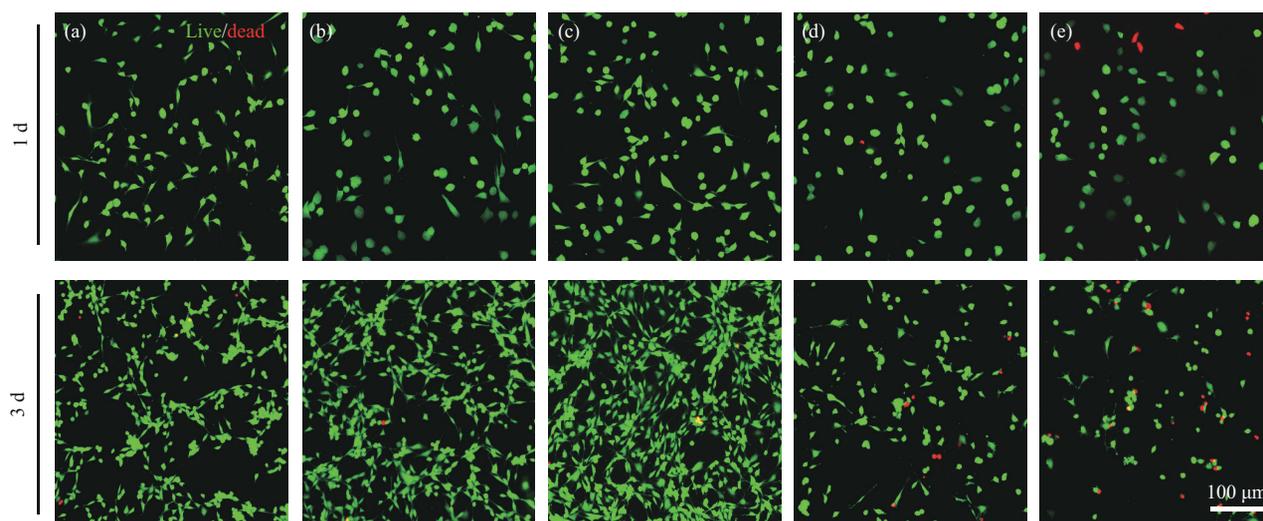


Fig. 5 Effect of fiber scaffolds on cell viability

(a-e) Corresponding to 0%ZnO, 0.05%ZnO, 0.1%ZnO, 0.3%ZnO, 0.5%ZnO, respectively.

种具有黏性和坚固性的双层 Janus 贴片，内层通过明胶-甲基丙烯酰基 (GelMA) 和 ZnO 纳米颗粒共纺，ZnO 纳米颗粒的尺寸约为 78.82 nm，多功能电纺水凝胶补片 (multifunctional electrospun hydrogel patch, MEHP) 表现出优异的机械性能、黏附强度和卓越的抗氧化、抗炎和抗菌性能，为安全有效的肌腱治疗提供一种有前景的策略。

2.5.2 细胞增殖

CCK-8 实验结果显示，PLLA/0.3%ZnO、PLLA/0.5%ZnO 纤维膜具有较高的毒性，细胞存活率较低 (图 6)，与死活双染结果一致。而随着培养时间延长，PLLA、PLLA/0.05%ZnO、PLLA/0.1%ZnO 组细胞数量均明显增加。其中，PLLA/0.1%ZnO 组吸光度值明显高于其他各组，存在显著性差异，能更好地促进小鼠肌腱细胞的增殖。金属元素在人体的正常生命活动过程中发挥着重要作用^[11]，参与许多重要的生物学功能，且金属离子的含量对促进组织修复作用影响较大。研究证明，将 500 μ l 0.05 mol/L 硫酸铜或硫酸锌溶液分别与

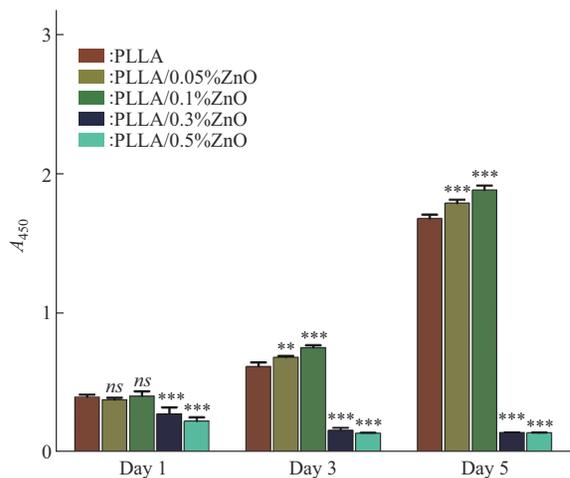


Fig. 6 Effect of fiber scaffold on cell proliferation

ns: $P \geq 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

20%明胶前体溶液混合，通过巯基与铜和锌离子的一步配位交联构建梯度双金属 (Cu 和 Zn) 离子基水凝胶，利用不同金属离子可以诱导不同组织的再生，实现基于金属离子的生物材料调控不同梯度组织的过渡生长，促进肌腱到骨骼界面的愈合^[21]。含有壳聚糖总固体重量 0.01% ZnO 纳米颗粒的新型管状支架，具备良好的生物相容性和降解能力，有效减少了肌腱周围黏附，改善了新生肌腱的滑动功能^[14]。也有研究报道，随着壳聚糖薄膜中 ZnO 纳米颗粒百分比的增加，薄膜的显微硬度、纳米硬度及其相应的弹性模量增加。然而在较高百分比的 ZnO NPs (高于 5% (w/w)) 掺入壳聚糖薄膜中观察到显著的细胞毒性，表明尽管 ZnO 纳米颗粒可以改善纯壳聚糖薄膜的力学性能，但由于细胞毒性作用，只有低比例的 ZnO 纳米颗粒可以应用于生物医学工程^[22]。可生物降解骨植入物 Zn-3Mg 合金在低浓度 (<0.5 g/L) 下与正常人成骨细胞具有细胞相容性，其碱性磷酸酶活性优于纯 Mg。具有开发为可生物降解骨植入物材料的潜力，但必须在毒性范围内使用^[23]。因此，利用 ZnO 纳米颗粒促进组织再生修复需结合理化性能和体内外生物学效应深入评估其最适含量。

2.5.3 细胞黏附

肌腱和韧带区别于其他结缔组织的关键在于胶原纤维的特殊排列结构。图 7 是小鼠肌腱细胞在取向 ZnO/PLLA 纤维膜上培养 3 d 的扫描电镜结果。可观察到，PLLA、PLLA/0.05%ZnO、PLLA/0.1%ZnO 组纤维支架上细胞的排列明显具有方向性，细胞沿着纤维的排列方向定向生长，且 PLLA/0.1%ZnO 纤维膜上的肌腱细胞数量最多。表明此种纤维膜可以满足模拟肌腱细胞天然细胞外基质定向特征的要求。通过调控组织工程支架材料的物理、化学特性，如排列方向、亲水性及黏性、负载的生

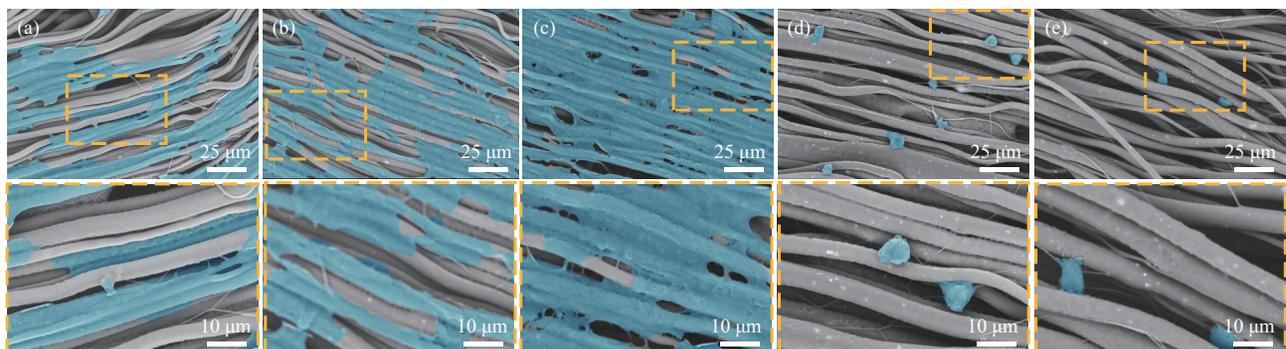


Fig. 7 Cell morphology of TT-D6 on ZnO/PLLA nanofiber films at different mass fractions

(a-e) Corresponding to 0%ZnO, 0.05%ZnO, 0.1%ZnO, 0.3%ZnO, 0.5%ZnO, respectively.

长因子等, 可有效地改善其调节细胞生长分化行为、恢复受损组织的功能^[24]。研究证明, 定向排列的 ϵ -己内酯NFYs可以模仿天然肌腱的胶原束和纤维的形貌和机械性能, 增强了TNMD和I型胶原等肌腱相关基因和蛋白的表达, NFYs通过诱导新胶原的生成和方向来促进体内肌腱修复^[6]。与光滑硅膜相比, 在各向异性微沟硅胶膜上培养的猪腱细胞显示肌腱标志物肌腱调节蛋白和I型胶原的基因表达升高^[25]。研究通过稳定喷射静电纺丝制备了装载两种生物活性物质(聚精氨酸和透明质酸)的肌腱组织工程支架, Arg/HA/PLLA定向纤维可能通过下调p53通路抑制肌腱黏附和凋亡, 并通过上调Esrl介导的ER- α 通路促进肌腱再生^[7]。

3 结 论

本研究通过静电纺丝技术制备了负载不同含量纳米ZnO的取向纤维支架, 并进行理化性能表征和生物学评价, 主要结论如下:

a. 微米纤维束中纤维呈高度取向结构, 质量分数为0.05%和0.1%纳米ZnO的载入可以有效提高纤维取向方向的拉伸强度, 以满足肌腱组织修复的需要。PLLA纤维可以有效均匀地负载纳米ZnO, 生物相容性较好。

b. PLLA/0.05%ZnO和PLLA/0.1%ZnO纤维支架可有效促进TT-D6的黏附和增殖, 且载有0.1%ZnO的支架促增殖作用显著, 有望用于肌腱组织的再生修复。

c. 纤维支架上的TT-D6细胞可沿着纤维的排列方向呈明显的定向分布和生长, 模拟肌腱细胞天然细胞外基质定向特征, 表面支架材料的微观拓扑结构可有效地调节细胞生长分化行为。

d. 本研究存在一些不足: 仅考察了PLLA/0.1%ZnO纤维膜在体外促进肌腱细胞增殖分化行为, 在体内对肌腱组织的再生修复的作用及机制还需要进行深入研究, 为肌腱损伤的治疗提供更坚实的实验基础。

参 考 文 献

- [1] Jin J, Yang Q Q, Zhou Y L. Non-viral delivery of gene therapy to the tendon. *Polymers*, 2022, **14**(16): 3338
- [2] Lim W L, Liao L L, Ng M H, *et al.* Current progress in tendon and ligament tissue engineering. *Tissue Eng Regen Med*, 2019, **16**(6): 549-571
- [3] King C M, Vartivarian M. Achilles tendon rupture repair: simple to complex. *Clin Podiatr Med Surg*, 2023, **40**(1): 75-96
- [4] Costa-Almeida R, Calejo I, Gomes M E. Mesenchymal stem cells empowering tendon regenerative therapies. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(12): 3002
- [5] Ivanova V S, Tong K P S, Neagu C, *et al.* Current concepts in Achilles tendon ruptures. *Clin Podiatr Med Surg*, 2024, **41**(1): 153-168
- [6] Yang Q, Li J, Su W, *et al.* Electrospun aligned poly(ϵ -caprolactone) nanofiber yarns guiding 3D organization of tendon stem/progenitor cells in tenogenic differentiation and tendon repair. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, **10**: 960694
- [7] Xuan H, Zhang Z, Jiang W, *et al.* Dual-bioactive molecules loaded aligned core-shell microfibers for tendon tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2023, **228**: 113416
- [8] Chen C H, Chen S H, Kuo C Y, *et al.* Response of dermal fibroblasts to biochemical and physical cues in aligned polycaprolactone/silk fibroin nanofiber scaffolds for application in tendon tissue engineering. *Nanomaterials*, 2017, **7**(8): 219
- [9] Zhang C, Yuan H, Liu H, *et al.* Well-aligned chitosan-based ultrafine fibers committed teno-lineage differentiation of human induced pluripotent stem cells for Achilles tendon regeneration. *Biomaterials*, 2015, **53**: 716-730
- [10] 王雷. 聚多巴胺修饰钛金属表面载铜涂层的制备及抗菌性能与促进骨整合的实验研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2018
Wang L. Mussel-inspired Deposition of Copper on Titanium for Bacterial Inhibition and Enhanced Osseointegration in a Periprosthetic Infection Model[D]. Suzhou: Soochow University, 2018
- [11] Jomova K, Makova M, Alomar S Y, *et al.* Essential metals in health and disease. *Chem Biol Interact*, 2022, **367**: 110173
- [12] Wychowski P, Malkiewicz K. Evaluation of metal ion concentration in hard tissues of teeth in residents of central Poland. *Biomed Res Int*, 2017, **2017**: 6419709
- [13] Han Z, Deng L, Chen S, *et al.* Zn²⁺-Loaded adhesive bacterial cellulose hydrogel with angiogenic and antibacterial abilities for accelerating wound healing. *Burns Trauma*, 2023, **11**: tkac048
- [14] Yousefi A, Sarrafzadeh-Rezaei F, Asri-Rezaei S, *et al.* Fabrication of novel tubular scaffold for tendon repair from chitosan in combination with zinc oxide nanoparticles. *Vet Res Forum*, 2018, **9**(2): 105-111
- [15] 陆康. 微结构丝素蛋白薄膜的仿生制备及其在肌腱修复中的应用[D]. 重庆: 陆军军医大学, 2021
Lu K. Biomimetic Preparation of Microstructured Silk Fibroin Film and Its Application in Tendon Repair. Chongqing: Army Medical University, 2021
- [16] Pauly H M, Kelly D J, Popat K C, *et al.* Mechanical properties and cellular response of novel electrospun nanofibers for ligament tissue engineering: effects of orientation and geometry. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2016, **61**: 258-270
- [17] Kim K, Kim H, Do S, *et al.* Potential of aligned electrospun PLGA/SIS blended nanofibrous membrane for tendon tissue engineering. *Polymers*, 2023, **15**(10): 2313
- [18] Griffith K M, Hammer L C, Iannuzzi N P, *et al.* Review of human

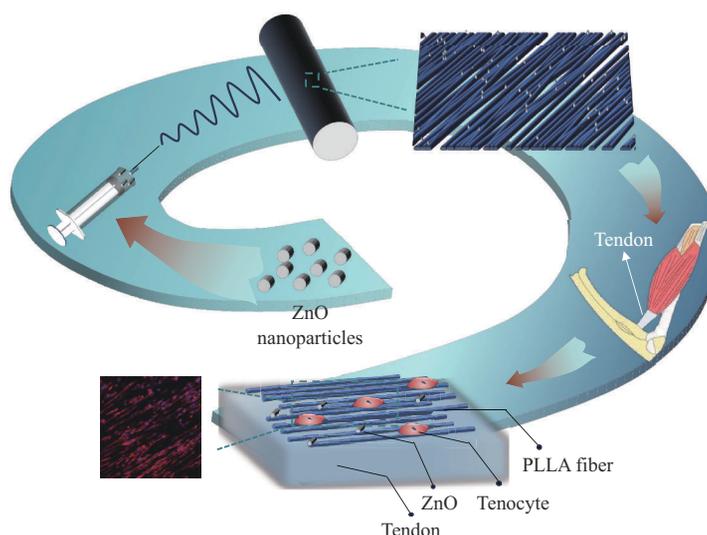
- supraspinatus tendon mechanics. Part I: fatigue damage accumulation and failure. *J Shoulder Elbow Surg*, 2022, **31**(12): 2671-2677
- [19] He X, Huang Z, Liu W, *et al.* Electrospun polycaprolactone/hydroxyapatite/ZnO films as potential biomaterials for application in bone-tendon interface repair. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2021, **204**: 111825
- [20] Zhang Q, Yang Y, Suo D, *et al.* A biomimetic adhesive and robust Janus patch with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-bacterial activities for tendon repair. *ACS Nano*, 2023, **17**(17): 16798-16816
- [21] Yang R, Li G, Zhuang C, *et al.* Gradient bimetallic ion-based hydrogels for tissue microstructure reconstruction of tendon-to-bone insertion. *Sci Adv*, 2021, **7**(26): eabg3816
- [22] Jayasuriya A C, Aryaei A, Jayatissa A H. ZnO nanoparticles induced effects on nanomechanical behavior and cell viability of chitosan films. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013, **33**(7): 3688-3696
- [23] Dambatta M S, Murni N S, Izman S, *et al.* *In vitro* degradation and cell viability assessment of Zn-3Mg alloy for biodegradable bone implants. *Proc Inst Mech Eng H*, 2015, **229**(5): 335-342
- [24] Jin G, He R, Sha B, *et al.* Electrospun three-dimensional aligned nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2018, **92**: 995-1005
- [25] Zhu J, Li J, Wang B, *et al.* The regulation of phenotype of cultured tenocytes by microgrooved surface structure. *Biomaterials*, 2010, **31**(27): 6952-6958

Study on The Promotion of Tenocyte Proliferation and Differentiation by Oriented Fiber Membrane Loaded With Nano-zinc Oxide*

FAN Jia, GU Peng-Cheng, CHENG Xi-Ting, JIANG Qiang, ZHAO Ya, PAN Xiao-Fang, BAI Yan**

(College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Graphical abstract



Abstract Objective To simulate the microstructure and mechanical properties of tendon tissue and promote its regeneration and repair, electrospinning technology was used to prepare L-poly(lactic acid) (PLLA) fiber membranes loaded with different nano zinc oxide contents and with oriented structures. Physical and chemical characterization and biological performance evaluation were carried out to explore their effects on tendon cell proliferation and differentiation. **Methods** Preparation of PLLA fiber scaffolds and PLLA/ZnO fiber scaffolds containing different mass fractions of nano ZnO was performed using electrospinning technology. The physicochemical properties of the scaffold were characterized by scanning electron microscopy, mechanical stretching, and EDS spectroscopy. The scaffold was co-cultured with mouse tendon cells to detect its biocompatibility and regulatory effects on cell differentiation behavior. **Results** The fiber scaffolds were arranged in an oriented manner, and zinc elements were uniformly distributed in the fibers. The tensile strength and Young's modulus of PLLA/0.1%ZnO fiber scaffolds were significantly higher than PLLA fiber scaffolds. The number of cells on the surface of PLLA/0.1%ZnO fiber scaffold was significantly higher than that of the PLLA group, and the activity was better; mouse tendon cells exhibit directional adhesion and growth along the fiber arrangement direction. **Conclusion** The oriented PLLA/0.1%ZnO fiber scaffold had excellent physicochemical properties, which can significantly promote the oriented growth, proliferation and differentiation of tendon cells. It is expected to be used for tendon tissue regeneration and repair in the future.

Key words nano zinc oxide, oriented fibers, tendon repair

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0473

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32371415), Chongqing Natural Science Foundation (CSTB2023NSCQ-MSX0307), and Development Support Program for Future Medical Youth Innovation Team of Chongqing Medical University (W0055).

** Corresponding author.

Tel: 86-13883218225, E-mail: baiyan@cqmu.edu.cn

Received: November 30, 2023 Accepted: February 27, 2024