

# 氧化石墨烯修饰的聚醚酮酮复合材料的成骨性能研究

王煜慧, 王海锋, 刘亚男

(首都医科大学康复医学院, 中国康复研究中心, 北京博爱医院口腔科 北京 100068)

**[摘要]目的:** 研究氧化石墨烯(Graphene oxide, GO)修饰的聚醚酮酮(Polyetherketoneketone, PEKK)材料对成骨细胞增殖及成骨分化的影响。**方法:** 聚醚酮酮(PEKK)经过硫化(S)、氧化石墨烯(GO)处理后制备GO-SPEKK复合材料。MC3-T3细胞分别与PEKK、SPEKK、GO-SPEKK复合材料共培养。实验分为: PEKK组、SPEKK组、GO-SPEKK组。通过CCK-8检测细胞生物活性, 判断不同支架对MC3-T3细胞生存状态的影响。qRT-PCR检测成骨相关基因RUNX2、COL-1、OCN的表达水平。**结果:** CCK-8检测结果提示与PEKK组和SPEKK组相比较, GO-SPEKK复合材料对MC3-T3细胞增殖有促进作用( $P < 0.001$ ), SPEKK降低了MC3-T3细胞生物学活性( $P < 0.05$ )。qRT-PCR结果提示, 7 d时GO-SPEKK组OCN的表达量升高( $P < 0.05$ ), RUNX2、COL-1表达差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论:** GO-SPEKK复合材料, 在一定程度上改善了PEKK支架性能, 能促进MC3-T3细胞的成骨。

**[关键词]** 聚醚酮酮; 氧化石墨烯; MC3-T3细胞; 成骨性能

[中图分类号]R318.08 [文献标志码]A [文章编号]1008-6455(2025)10-0027-04

## Study on Osteogenic Properties of Polyetherketoneketone Modified by Graphene Oxide

WANG Yuhui, WANG Haifeng, LIU Yanan

(Department of Stomatology, Beijing Boai Hospital, China Rehabilitation Research Center, Capital Medical University School of Rehabilitation Medicine, Beijing 100068, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of graphene oxide (GO) modified polyetherketoneketone (PEKK) on the proliferation and osteogenic differentiation of osteoblasts. **Methods** PEKK was vulcanized and treated with graphene oxide to prepare GO-SPEKK composites. MC3-T3 cells were co-cultured with PEKK, SPEKK and GO-SPEKK respectively. The experiment was divided into PEKK group, SPEKK group and GO-SPEKK group. The biological activity of MC3-T3 cells was detected by CCK-8, and the effects of different scaffolds on the survival status of MC3-T3 cells were judged. QRT-PCR was used to detect the expression levels of osteogenesis-related genes RUNX2, COL-1 and OCN. **Results** The results of CCK-8 showed that GO-SPEKK composite could promote the proliferation of MC3-T3 cells ( $P < 0.001$ ), while SPEKK reduced the biological activity of MC3-T3 cells ( $P < 0.05$ ). The results of qRT-PCR showed that the expression of OCN in GO-SPEKK group increased at 7 days ( $P < 0.05$ ), and the expression of RUNX2 and COL-1 was significantly different ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** GO-SPEKK composite can improve the performance of PEKK scaffold to some extent and promote the osteogenesis of MC3-T3 cells.

**Key words:** polyetherketoneketone; graphene oxide; MC3-T3 cells; osteogenic property

外伤、感染或肿瘤等原因会导致颌骨缺损<sup>[1]</sup>, 钛和钛合金被广泛用作口腔修复的材料。然而, 越来越多的研究表明, 使用金属材料会有很多不足, 应力疲劳导致植入物周围的骨吸收等<sup>[2]</sup>。因此, 非金属植入物PEKK家族材料发展成为研究的热点, 主要包括聚醚酮酮(PEKK)和聚醚醚酮(Polyetheretherketone, PEEK)<sup>[3]</sup>。PEKK与PEEK相比, 其机械性能、环境适应性、稳定性更好<sup>[4]</sup>, 因此PEKK备受研究者的关注。美国食品和药物管理局已批准PEKK用于口腔临床<sup>[5]</sup>。但纯PEKK的生物惰性限制了其更全面的应用。

氧化石墨烯(GO)是表面含有大量的含氧基团的一种具有代表性的二维碳纳米材料, 易进行功能化和修饰, 被

广泛用于骨组织工程<sup>[6-7]</sup>。GO可以改善骨再生支架的性能, 它被用作钛合金、氧化锆、铝、二硅酸盐、PEEK和PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)的表面涂层, 以改善骨整合并减少微生物黏附<sup>[8]</sup>。然而将PEKK表面改性利用GO作为表面涂层检测其成骨活性鲜有相关研究。本研究通过制备GO-SPEKK复合材料, 通过成骨相关指标检测其生物性能及成骨性能, 为验证GO-SPEKK是一种具有良好成骨能力的骨修复材料提供理论依据, 以期扩大该材料在骨组织工程的应用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验材料及仪器

1.1.1 材料: PEKK片(规格为10 mm×10 mm×1 mm)(Pektkon ivory, ARKEMA, 美国), GO分散体(先丰, 中国南京), DMEM培养液(Gibco, 美国), 胎牛血清(Gibco, 美国), 青链霉素双抗(Thermo, 美国), 0.25%胰酶(Gibco, 美国), CCK-8试剂盒(新赛美生物, 中国), PCR试剂(Takara, 日本)。

1.1.2 仪器: 离心机5804R(Eppendorf, 德国), 扫描电子显微镜(Hitachi, 日本), 倒置相差显微镜(Olympus, 日本), 二氧化碳培养箱(SANYO, 日本), 实时荧光定量PCR(Eppendorf, 德国)。

## 1.2 方法

1.2.1 实验分组及样本制备: 将PEKK切割成直径为10 mm、厚度为1 mm的试件, 并使用碳化砂纸(#400/500/600/800/1 000)逐级抛光, 去离子水和无水乙醇超声荡洗, 烘干备用。共制备42个试件。根据表面处理不同, 分为三组, 每组13个, PEKK组: 表面不做处理; SPEKK组: 将PEKK片垂直浸入98%浓硫酸中, 反应5 min, 后取出试件SPEKK, 并用丙酮、无水乙醇和去离子水冲洗, 然后进行超声振荡清洗5 min。自然晾干后备用。GO-SPEKK组: 将PEKK片垂直浸入98%浓硫酸中, 反应5 min, 后取出试件SPEKK, 并用丙酮、无水乙醇和去离子水冲洗, 然后进行超声振荡清洗5 min, 将40 mg的GO分散到40 ml蒸馏水中, 超声振动4 h, 形成均匀的氧化石墨烯分散液, 将SPEKK试样浸入浓度为1 mg/ml的GO分散液中10 min, 然后取出并在60℃的烘箱中干燥5 min, 重复上述步骤5次, 确保SPEKK表面完全被氧化石墨烯覆盖。最终样品GO-SPEKK在100℃过夜处理。

1.2.2 扫描电子显微镜观察: 将三组试件中随机选取一块, 喷金, 于扫描电镜下观察表面形貌(200×)。

1.2.3 MC3-T3的培养及增殖情况: 将小鼠胚胎成骨细胞MC3-T3细胞在补充有1%双抗的DMEM培养基中培养, 并在37℃、5% CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中培养。实验前, 每组选取6个试件在高压灭菌器中灭菌0.5 h并将样品放置超净台紫外照射24 h, 将MC3-T3细胞接种在24孔板中, 密度为1×10<sup>4</sup>每孔细胞数。使用CCK-8试剂盒测试细胞增殖。细胞培养1 d、3 d。在相应的时间获得样品, 用PBS冲洗两次, 然后转移到新板中。接下来, 向每个孔中加入500 μl培养基和50 μl CCK-8溶液, 继续孵育1 h, 酶标仪在450 nm处测量OD值。

1.2.4 qRT-PCR检测成骨相关基因RUNX2、COL-1、OCN表达情况: 每组选取6个试件进行qRT-PCR检测。为了检测成骨相关基因Runx2相关转录因子2(Runx2)、I型胶原(COL-1)、骨钙素(OCN)表达, 在标本上培养细胞后(密度为10<sup>5</sup>每孔细胞数)在培养后3 d和7 d, 根据说明使用Trizol法从MC3-T3细胞中分离总RNA, 逆转录为互补DNA(cDNA), β-actin作为内参对照。所选基因的正向和反向引物序列列于表1中。qRT-PCR实验所得数据运用2<sup>-ΔΔCt</sup>公式计算。

表1 qRT-PCR引物

基因名称	引物序列 (F=forward, R=reverse)
<i>β-actin</i>	F: 5' -CCTCTATGACAACACAGT-3' R: 5' -AGCCACCAATCCACACAG-3'
Runx2	F: 5' -ATCATTAGTACACACACCA-3' R: 5' -GTAGGGGCTAAAGGCAAAAG-3'
COL-1	F: 5' -AGCTCGATACACAATGGCCT-3' R: 5' -CCTATGACTTCTGCGTCTGG-3'
OCN	F: 5' -CAGACAAGTCCCACACAGCA-3' R: 5' -CCAGCAGAGTGAGCAGAGAG-3'

1.3 统计学分析: 采用Graphpad prism9软件进行统计分析, 结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间两两比较采用Turkey分析,  $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组材料扫描电镜: 扫描电镜下三种材料的二维表面形貌可见PEKK组试件表面的打磨痕迹, 呈沟槽状; SPEKK表面可见大量微孔结构; GO-SPEKK表面大量微孔结构被GO覆盖。见图1。

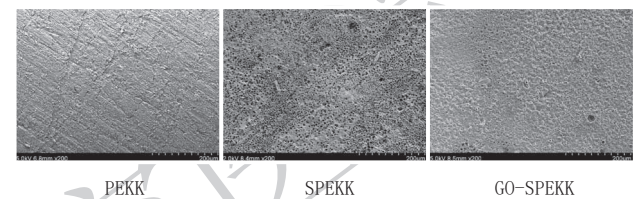
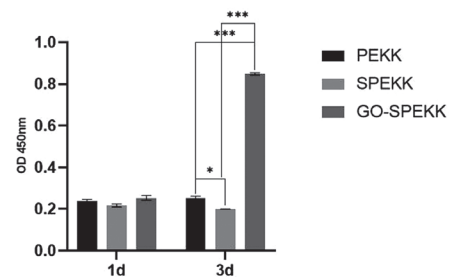


图1 扫描电镜观察三种材料表面形貌(200×)

2.2 CCK-8法检测不同材料对MC3-T3细胞增殖的影响: 第1天的OD值组间比较差异无统计学意义; 第3天的GO-SPEKK组的OD值明显高于PEKK、SPEKK组, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ ), 说明GO-SPEKK能促进MC3-T3的增殖, PEKK组OD值第3天与第1天比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 但高于第3天SPEKK组, 说明SPEKK组抑制MC3-T3的活性。见图2。



注: \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$

图2 CCK8法检测细胞增殖

2.3 qRT-PCR法检测成骨相关基因mRNA的表达情况: 在7 d时, 相较于PEKK组, GO-SPEKK组OCN基因表达量升高

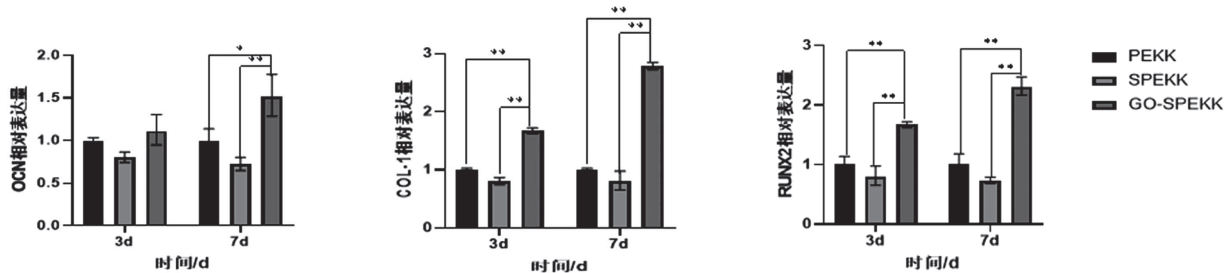


图3 MC3-T3内OCN、COL-1和RUNX2 mRNA表达情况

( $P < 0.05$ )，相较于SPEKK组，GO-SPEKK组OCN基因表达量明显升高 ( $P < 0.01$ )；在3、7 d时GO-SPEKK组RUNX2和COL-1基因mRNA水平表达量增高，较PEKK、SPEKK组差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见图3。

### 3 讨论

聚醚酮酮 (PEKK) 作为新一代的口腔修复材料，因其优异的机械性能、射线透光性和耐化学腐蚀性，越来越受到人们的关注。然而，PEKK的疏水表面和生物惰性往往会限制与周围天然骨的骨整合<sup>[9-10]</sup>，因此很大程度上限制了其在临床工作中的应用。为了提高PEKK材料成骨性能，可以将材料表面结构改性或增加生物活性物质表面涂层等方法<sup>[11]</sup>。Tan X等<sup>[12]</sup>将等离子体浸没离子注入 (PIII) 将镁 (Mg) 和银 (Ag) 离子引入玻璃纤维增强聚醚酮酮 (PEKK-GF) 中促进了人牙龈成纤维细胞的增殖和黏附，上调了黏附相关基因和蛋白质的表达，并抑制了变形链球菌和牙龈卟啉单胞菌代谢和黏附，Mg/Ag PIII表面处理改善了PEKK-GF的软组织整合和抗菌活性；Liu H等<sup>[13]</sup>制备了多孔PEKK-HAp支架，其具有高度互连的孔隙和功能表面结构，有利于生物相容性和骨诱导性，从而促进骨再生。氧化石墨烯 (GO) 因优异的抗菌性能<sup>[14]</sup>、良好的细胞相容性<sup>[15]</sup>和成骨性能<sup>[16]</sup>而成为一种有前途的引导骨再生的表面改性材料。研究发现，GO悬浮液对最常见的口腔病原菌有杀菌作用。GO纳米片已显示出对革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌的抗菌活性<sup>[17]</sup>。此外，GO已被证明可诱导BMSCs分化为成骨细胞<sup>[18]</sup>。但是由于PEKK材料为生物惰性材料，表面很难形成理想的微孔隙结构。既往研究显示浓硫酸可以在聚芳醚酮材料表面形成网络微孔隙，可以显著促进细胞黏附、细胞增殖和成骨分化<sup>[19]</sup>。因此本研究采用98%浓硫酸酸化处理PEKK (SPEKK)，但实验结果发现SPEKK有一定的细胞毒性，3 d时MC3-T3细胞活性明显降低 ( $P < 0.05$ )，低价的磺基化合物可能产生氧自由基损伤细胞。因此，有必要减少磺官能团以消除磺化的毒性<sup>[20]</sup>。PEKK及SPEKK与经过GO处理的PEKK相比，GO涂层修饰的多孔PEKK材料增强了MC3-T3的细胞活性，可能是由于涂层中芳香环之间积累了 $\pi-\pi$ 堆积键，使蛋白质能够快速附着，并为细胞黏附和增殖提供了有利的环境。GO边缘的亲水性基团，如OH<sup>-</sup>和COO<sup>-</sup>，可能通过静电相互作用吸收蛋白质，从而刺激成骨

基因的表达<sup>[21]</sup>。植入物的骨整合能力取决于其骨传导性和骨诱导作用<sup>[22]</sup>。OCN是成骨主要标志物，能够反映成骨细胞的活性，RUNX2是调控成骨细胞、促进骨性形成的关键性调控因子<sup>[23]</sup>，COL-1能够促进硬组织形成和再生<sup>[24]</sup>。本研究GO的加入使得GO-SPEKK组RUNX2、COL-1、OCN mRNA表达水平上调，刺激了相关成骨基因 (OCN、RUNX2、COL-1) 的表达，经过改性的PEKK复合材料在一定程度上优化了其骨诱导能力。

本研究用简单的沉积方法成功地对PEKK表面进行了GO涂层。结果表明，与PEKK、SPEKK相比，GO-SPEKK作为植入材料，表现出优异的细胞相容性和促进成骨分化的能力。因此，获得的GO-SPEKK材料是一种很有前途的生物医学材料。

### [参考文献]

- [1]Liu L N, Zhang X H, Liu H H, et al. Osteogenesis differences around titanium implant and in bone defect between jaw bones and long bones[J]. J Craniofac Surg, 2020,31(8):2193-2198.
- [2]Panayotov I V, Orti V, Cuisinier F, et al. Polyetheretherketone (PEEK) for medical applications[J]. J Mater Sci Mater Med, 2016,27(7):118.
- [3]党薇, 王珍珍, 谭灵. PEEK与钴铬合金铸造支架可摘局部义齿的临床应用效果对比分析[J].中国美容医学,2023,32(10):123-127.
- [4]Choupin T, Fayolle B, Regnier G, et al. A more reliable DSC-based methodology to study crystallization kinetics: application to poly(ether ketone ketone) (PEKK) copolymers[J]. Polymer, 2018,155:109-115.
- [5]王慧慧, 付丽, 刘艺萍, 等. 聚醚酮酮在口腔修复领域的研究进展[J].国际老年医学杂志, 2022,43(3):365-367,371.
- [6]纪玉洁, 秦汉, 向学熔. 氧化石墨烯在骨组织工程中的应用[J].中国生物工程杂志,2023,43(4):71-78.
- [7]Kim H S, Ji M K, Jang W H, et al. Biological Effects of the novel mulberry surface characterized by Micro/Nanopores and Plasma-Based Graphene Oxide deposition on titanium[J]. Int J Nanomedicine, 2021,28(16):7307-7317.
- [8]Silveira S R, Sahn B D, Kreve S, et al. Osseointegration, antimicrobial capacity and cytotoxicity of implant materials coated with graphene compounds: A systematic review[J]. Jpn Dent Sci Rev, 2023,59:303-311.
- [9]Yuan B, Cheng Q, Zhao R, et al. Comparison of osteointegration property between PEKK and PEEK: effects of surface structure and chemistry[J]. Biomaterials, 2018,170:116-126.
- [10]Kersten R F, van Gaalen S, de Gast A, et al. Polyetheretherketone (PEEK) cages in cervical applications: a systematic review[J]. Spine J, 2015,15(6):1446-1460.
- [11]Xie Y, Hu C, Feng Y, et al. Osteoimmunomodulatory effects of biomaterial modification strategies on macrophage polarization and

- bone regeneration[J]. *Regen Biomater*, 2020,7:233-245.
- [12]Tan X, Wang Z, Yang X, et al. Enhancing cell adhesive and antibacterial activities of glass-fibre-reinforced polyetherketoneketone through Mg and Ag PIII[J]. *Regen Biomater*, 2023,10:rbad066.
- [13]Liu H, Liu T, Yin Z, et al. Bio-functional hydroxyapatite-coated 3D porous polyetherketoneketone scaffold for enhanced osteogenesis and osteointegration in orthopedic applications[J]. *Regen Biomater*, 2024,11:rbae023.
- [14]Sindi A M. Applications of graphene oxide and reduced graphene oxide in advanced dental materials and therapies[J]. *J Taibah Univ Med Sci*, 2024,19(2):403-421.
- [15]Peng X, Liu X, Yang Y, et al. Graphene Oxide functionalized gelatin methacryloyl microgel for enhanced biomimetic mineralization and in situ bone repair[J]. *Int J Nanomedicine*, 2023,18:6725-6741.
- [16]Inchingolo F, Inchingolo A M, Latini G, et al. Application of Graphene Oxide in oral surgery: a systematic review[J]. *Materials (Basel)*, 2023,16(18):6293.
- [17]Azizi-Lalabadi M, Hashemi H, Feng J, et al. Carbon nanomaterials against pathogens; the antimicrobial activity of carbon nanotubes, graphene/graphene oxide, fullerenes, and their nanocomposites[J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2020,284:102250.
- [18]Li Q, Shen A, Wang Z. Enhanced osteogenic differentiation of BMSCs and M2-phenotype polarization of macrophages on a titanium surface modified with graphene oxide for potential implant applications[J]. *RSC Adv*, 2020,10:16537-16550.
- [19]Zhao Y, Wong H M, Wang W, et al. Cytocompatibility, osseointegration, and bioactivity of three-dimensional porous and nanostructured network on polyetheretherketone[J]. *Biomaterials*, 2013,34(37):9264-9277.
- [20]Ouyang L, Zhao Y, Jin G, et al. Influence of sulfur content on bone formation and antibacterial ability of sulfonated PEEK[J]. *Biomaterials*, 2016,83:115-126.
- [21]Roma M, Hegde S. Implications of graphene-based materials in dentistry: present and future[J]. *Front Chem*, 2024,11:1308948.
- [22]Facca S, Lahiri D, Fioretti F, et al. In vivo osseointegration of nanodesigned composite coatings on titanium implants[J]. *ACS Nano*, 2011,5:4790-4799.
- [23]张义林, 侯旭, 汪莉, 等. miR-130a-5p靶向Runx2对牙槽骨成骨细胞增殖和分化的影响及其调控机制研究[J]. *中国美容医学*, 2024,33(6):51-55.
- [24]王煜慧, 吕慧欣, 张明锐, 等. 富血小板纤维蛋白促进牙龈组织修复和再生的研究[J]. *口腔医学研究*, 2022,38(2):144-149.

[收稿日期]2024-07-11

本文引用格式: 王煜慧, 王海锋, 刘亚男. 氧化石墨烯修饰的聚醚酮酮复合材料的成骨性能研究[J]. *中国美容医学*, 2025,34(10):27-30.

(上接第16页)

- an algorithm based on defect location[J]. *J Craniofac Surg*, 2022,33(3):821-826.
- [4]Park K S, Park D D. Objective outcome measurement after upper blepharoplasty: an analysis of different operative techniques[J]. *Aesthetic Plast Surg*, 2017,41(1):64-72.
- [5]陈刚, 张怡, 高远, 等. 眼轮匝肌-上睑提肌固定在重睑成形术中的应用[J]. *中华医学美容杂志*, 2017,23(5):307-309.
- [6]Alghoul M S, Vaca E E. Creating harmonious ares: the importance of brow shape in determining upper lid aesthetics[J]. *Clin Plast Surg*, 2022,49(3):389-397.
- [7]Liu R, Sun Y, Huang J, et al. Brow position change and its potential risk factors following upper blepharoplasty: a systematic review and Meta-analysis[J]. *Aesthetic Plast Surg*, 2023,47(4):1394-1409.
- [8]陈刚, 张天琦, 马志兵, 等. 眶隔前脂肪联合眼轮匝肌后脂肪处理在上睑成形术中的临床应用[J]. *中华医学美容杂志*, 2020,26(3):185-188.
- [9]Wang H C, Ting W, Tong D, et al. Will the patient's double eyelid shape be like that of the surgeon performing the procedure? A study of surgeons' aesthetics in East Asian Blepharoplasty[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2021,20(4):1208-1213.
- [10]Rodrigues C, Carvalho F, Marques M. Upper eyelid blepharoplasty: surgical techniques and results-systematic review and Meta-analysis[J]. *Aesthetic Plast Surg*, 2023, 47(5):1870-1883.
- [11]Khoshab N, Donnelly M R, Sayadi L R, et al. Historical tools of anthropometric facial assessment: a systematic raw data analysis on the applicability of the neoclassical canons and golden ratio[J]. *Aesthet Surg J*, 2022,42(1):NP1-NP10.
- [12]Vaca E E, Alghoul M S. Upper blepharoplasty with endoscopically assisted brow lift to restore harmonious upper lid arc curvatures[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2020,146(5):565e-568e.
- [13]Pham T V. Upper blepharoplasty: management of the upper eyelid and brow complex via transblepharoplasty approach[J]. *Facial Plast Surg*, 2018,34(2):183-193.
- [14]王晓静, 汪效仿, 赵喜群, 等. 老年就医者上睑成形术后美学效果预测模型的构建研究[J]. *中国美容医学*, 2023,32(10):9-12.
- [15]Barmettler A, Wang J, Heo M, et al. Upper eyelid blepharoplasty: a novel method to predict and improve outcomes[J]. *Aesthet Surg J*, 2018,38(11):NP156-NP164.
- [16]Zhao S, Zheng D, Wang S, et al. Category of upper eyelid morphology and the preferred double eyelid shape in Asians according to questionnaire survey[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2023,22(12):3362-3368.
- [17]Xu L, Lee E I, Ma T, et al. Aesthetic analysis of alteration of eyebrow position after double eyelidplasty[J]. *Aesthetic Plast Surg*, 2020,44(2):373-378.

[收稿日期]2024-03-11

本文引用格式: 曹林, 席庆春, 方明松. 眼睑、眼眉定量测量参数与上睑成形术后就医者面部美观度的关系[J]. *中国美容医学*, 2025,34(10):14-16,30.