

羧甲基壳聚糖/还原氧化石墨烯复合支架的孔径结构对 MC3T3-E1 细胞增殖的作用

周荣汇

福建医科大学附属口腔医院 福建福州

【摘要】目的 探讨不同浓度还原氧化石墨烯 (rGO) 对羧甲基壳聚糖 (CMC) 支架孔径的调控作用, 分析孔径变化与 MC3T3-E1 细胞增殖之间的关系。**方法** 采用溶液共混结合冷冻干燥技术, 制备 rGO 质量分数分别为 0%、0.5%、1%和 2%的 CMC-rGO 复合支架。通过扫描电镜观察支架微观形貌及孔径分布, 使用 ImageJ 软件测量平均孔径。将 MC3T3-E1 成骨前体细胞与各组支架共培养, 采用 CCK-8 法检测培养第 1、3、5、7 天的细胞增殖活性。**结果** 扫描电镜显示, 纯 CMC 支架孔径小于 70 μm , 结构呈不规则卷曲; 0.5%和 1% rGO 使支架孔径增大至 70-120 μm , 孔壁光滑规整; 2% rGO 则导致孔径显著减小、结构趋于致密化。CCK-8 结果显示, 0.5% rGO 组细胞活性在各时间点均显著高于纯 CMC 组 ($P<0.05$), 1% rGO 组与纯 CMC 组无显著差异, 2% rGO 组持续低于纯 CMC 组 ($P<0.05$)。**结论** rGO 对 CMC 支架孔径的调控呈非线性特征, 0.5%-1% rGO 可形成 70-120 μm 的适宜孔径范围, 该结构有利于细胞增殖。0.5%组因孔径分布更为均匀, 综合效果最优。本研究为羧甲基壳聚糖基骨修复材料的孔径设计提供了实验依据。

【关键词】 羧甲基壳聚糖; 还原氧化石墨烯; 孔径; 细胞增殖

【基金项目】 福建省自然科学基金资助项目 (2022J01759)

【收稿日期】 2026 年 5 月 5 日 **【出刊日期】** 2026 年 6 月 2 日 **【DOI】** 10.12208/j.ijmd.20260052

Effect of Pore Size Structure of Carboxymethyl Chitosan/Reduced Graphene Oxide Composite Scaffolds on MC3T3-E1 Cell Proliferation

Ronghui Zhou

Stomatological Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian

【Abstract】Objective To investigate the regulatory effect of different concentrations of reduced graphene oxide (rGO) on the pore size of carboxymethyl chitosan (CMC) scaffolds and to analyze the relationship between pore size changes and MC3T3-E1 cell proliferation. **Methods** CMC-rGO composite scaffolds with rGO mass fractions of 0%, 0.5%, 1%, and 2% were prepared by solution blending combined with freeze-drying technology. The microstructure and pore size distribution of the scaffolds were observed by scanning electron microscopy, and the average pore size was measured using ImageJ software. MC3T3-E1 osteoblast precursor cells were co-cultured with the scaffolds, and cell proliferation activity was detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay on days 1, 3, 5, and 7. **Results** Scanning electron microscopy showed that the pure CMC scaffold had a pore size of less than 70 μm with an irregular curled structure. Addition of 0.5% and 1% rGO increased the pore size to 70-120 μm with smooth and regular pore walls, while 2% rGO led to a significant reduction in pore size and structural densification. CCK-8 results showed that cell viability in the 0.5% rGO group was significantly higher than that in the pure CMC group at all time points ($P<0.05$), the 1% rGO group showed no significant difference compared with the pure CMC group, and the 2% rGO group was consistently lower than the pure CMC group ($P<0.05$). **Conclusion** rGO exhibits a nonlinear regulatory effect on the pore size of CMC scaffolds. The 0.5%-1% rGO concentration range forms a favorable pore size range of 70-120 μm , which facilitates cell proliferation. The 0.5% group exhibits more uniform pore size distribution and achieves the best

overall effect. This study provides experimental evidence for the pore size design of carboxymethyl chitosan-based bone repair materials.

【Keywords】 Carboxymethyl chitosan; Reduced graphene oxide; Pore size; Cell proliferation

1 引言

口腔颌面骨缺损是口腔颌面外科及种植修复领域的常见临床难题。自体骨移植虽为金标准,但存在供区来源有限、需开辟第二术区等局限^[1-2]。因此,开发新型骨修复材料是当前的研究重点。羧甲基壳聚糖(CMC)因良好的生物相容性和可降解性而受到关注,但其力学性能薄弱、骨诱导活性不足^[3-4]。还原氧化石墨烯(rGO)具有优异的力学性能和调控细胞行为的潜力,其生物学效应呈现浓度依赖性^[5-6]。支架孔径是影响细胞行为的关键结构参数。孔径过小限制细胞迁入,过大则降低比表面积^[7-8]。本研究从“结构-功能”关系出发,探讨不同浓度 rGO 诱导的 CMC 支架孔径变化对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响。

2 材料与方法

2.1 CMC-rGO 复合支架的制备

采用溶液共混结合冷冻干燥技术。称取 2.0g CMC 粉末,加入 100mL 0.1M 盐酸溶液中,冰水浴搅拌 3 小时至完全溶解,用 0.1M NaOH 或 HCl 调节 pH 至 7.25 ± 0.05 。分别称取相当于终浓度 0.5%、1%、2%的 rGO 粉末,各加入 10mL 去离子水,37℃水浴超声 1 小时制成分散液。在持续搅拌下将 rGO 分散液逐滴加入 CMC 溶液中,配制 rGO 质量分数为 0%、0.5%、1%、2%的混合液,继续搅拌 2 小时。将混合液注入模具,-80℃冷冻 12 小时,随后在-50℃、真空度低于 10Pa 条件下冷冻干燥 48 小时,获得三维多孔支架^[9]。

2.2 支架形貌观察与孔径测定

将各组支架在液氮中脆断暴露断面,喷金后用扫描电镜观察。每组分取 3 个样品,每个样品随机观察 3 个视野。使用 ImageJ 软件测量孔径,每视野至少测量 20 个孔,计算平均孔径。

2.3 MC3T3-E1 细胞接种与增殖检测

支架经环氧乙烷灭菌(37℃, 600mg/L, 6 小时)并解析 7 天后使用。将支架置于 24 孔板中,用含 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基预浸 24 小时。取对数生长期的 MC3T3-E1 细胞,消化后制成 1×10^4 个/mL 的细胞悬液。每孔取 100 μ L 细胞悬液(约 1000 个细胞)滴加于支架表面,静置 4 小时使细胞黏附,然

后补加培养基至 1mL^[10]。分别于培养第 1、3、5、7 天,每孔加入 300 μ L 含 10% CCK-8 的无血清培养基,避光反应 4 小时后测定 450nm 处 OD 值。

2.4 数据分析

数据以均值 $\pm$ 标准差表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey 检验, $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 支架孔径结构

扫描电镜观察显示,纯 CMC 支架孔径小于 70 μ m,结构不规则卷曲。0.5%和 1% rGO 使孔径增大至 70-120 μ m,孔壁光滑规整。2% rGO 导致孔径显著减小,结构致密化并出现片层状堆积。定量分析表明,0.5%和 1% rGO 组平均孔径均大于纯 CMC 组($P<0.05$),但两组间无显著差异($P>0.05$)。2% rGO 组平均孔径小于 0.5%和 1%组($P<0.05$)。从电镜图像可见,0.5%组的孔径分布比 1%组更为均匀^[11]。

检测 CMC-rGO 0%、0.5%、1%、2%组支架的孔径大小,数据以均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示($n=3$), $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。结果显示,支架孔径随 rGO 浓度升高呈先增大后减小的趋势,CMC-rGO 1% 组孔径达到峰值。

3.2 细胞增殖活性

CCK-8 结果显示, rGO 对细胞增殖的影响呈浓度依赖性。第 1 天,各组 OD 值无差异($P>0.05$)。第 3 天,0.5% rGO 组 OD 值高于纯 CMC 组($P<0.05$),1%组与纯 CMC 组无差异,2%组低于纯 CMC 组($P<0.05$)。第 5 天和第 7 天,组间差异进一步扩大:0.5%组 OD 值始终保持最高,1%组与纯 CMC 组相近,2%组持续低于纯 CMC 组^[12]。将增殖结果与孔径数据对照分析,孔径较大的两组(0.5%和 1% rGO)细胞活性最佳或接近正常水平;孔径较小的纯 CMC 组和结构致密化的 2%组细胞活性较低。0.5%与 1%组平均孔径相近,但 0.5%组增殖活性更高,这可能与孔径分布更为均匀有关。

CCK-8 法检测各组细胞在 1、3、5、7 d 的活力,数据以均值 $\pm$ 标准差表示($n=3$), $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。各组细胞活力随培养时间延长而升高,相同时间点下随 rGO 浓度升高呈梯度下降。

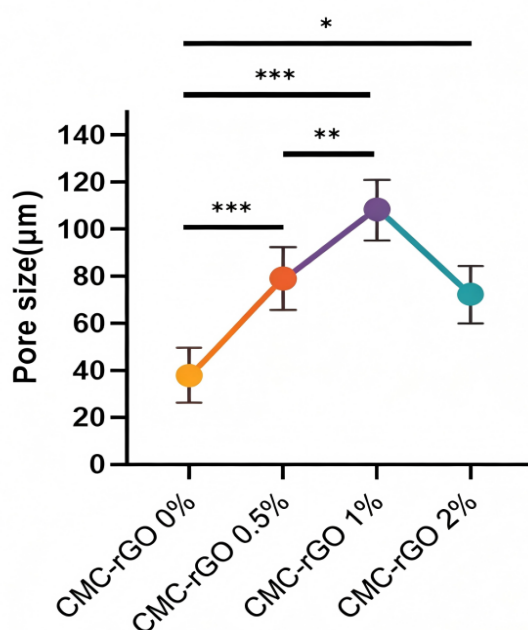


图1 各组 CMC-rGO 支架的孔径尺寸变化

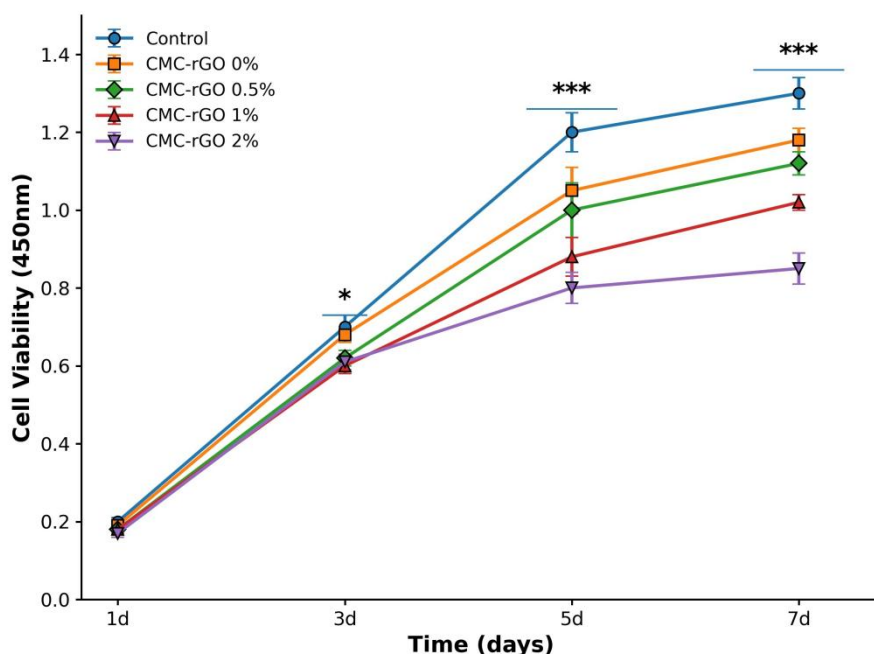


图2 各组细胞增殖活性 (CCK-8 法)

4 讨论

4.1 rGO 浓度对孔径的非线性调控

本研究发现, rGO 浓度从 0% 增至 0.5% 再至 1% 时孔径增大, 达 2% 时孔径反而减小。冷冻干燥过程中, 水结晶形成冰晶, 升华后留下孔隙^[13]。纯 CMC 溶液缺乏刚性支撑, 分子链在冷冻中自聚集收缩, 孔径偏小。适量 rGO (0.5%-1%) 作为异质成核点,

促进冰晶均匀生长; 同时 rGO 的力学增强作用维持孔壁结构完整, 形成更大、更规整的孔隙^[14]。当 rGO 达 2% 时, 过量片层团聚形成物理屏障, 阻碍冰晶生长, 且片层间范德华力增强导致堆叠致密化^[15]。

4.2 孔径大小与细胞增殖的关系

支架孔径与细胞增殖存在明确关联。孔径 70-120μm 的 0.5% 和 1% rGO 组细胞活性优于孔径较小

的纯 CMC 组,支持“临界孔径阈值”观点^[16]。对于 CMC 体系,该阈值约为 70 μm 。低于此阈值时,细胞迁移和营养获取受结构限制。2% rGO 组虽 rGO 含量最高,但孔径塌陷致密,细胞难以迁入,生物学表现反而不如低浓度组。高浓度 rGO 抑制增殖的机制还包括:纳米片破坏细胞膜完整性、诱导线粒体功能障碍和氧化应激损伤^[6]。Shamekhi 等^[14]发现 1% GO 组性能最佳而 3% GO 组有抑制效应,Wong 等^[13]指出孔径>100 μm 的支架细胞浸润更佳,本研究结果与之一致。

4.3 孔径均匀性的重要性

0.5%和 1% rGO 组平均孔径相近,但 0.5%组增殖活性更高。电镜显示 0.5%组孔壁更光滑、孔径分布更集中;1%组局部有偏小孔洞。提示在平均孔径相近时,孔径分布的均匀性可能比平均孔径更重要^[17]。孔径不均匀会形成局部“结构缺陷区”,降低支架有效功能体积。0.5% rGO 分散更均匀,对冰晶调控更一致;1% rGO 局部浓度偏高导致成核不均匀。

4.4 研究局限

本研究的局限:第一,孔径与细胞行为的关联基于组间平均数据对比,未在单细胞水平建立直接联系。第二,未用共聚焦显微镜观察细胞在支架内部的三维分布。第三,仅考察孔径参数,未考虑孔隙率、孔连通性等因素。

5 结论

(1)rGO 浓度对 CMC 支架孔径呈非线性调控:0.5%-1% rGO 形成 70-120 μm 孔径,2% rGO 导致孔径塌陷。(2)孔径大小直接影响 MC3T3-E1 细胞增殖,70-120 μm 孔径范围内细胞活性最佳。(3)孔径均匀性同样重要,0.5%组因孔径分布更均匀,效果优于平均孔径相近的 1%组。(4) rGO 主要通过调控孔径结构影响细胞行为,优化物理结构应作为支架设计的优先考量。

参考文献

- [1] Misch CM. Autogenous Bone is Still the Gold Standard of Graft Materials in 2022. *J Oral Implantol*. 2022;48(3):169-170.
- [2] Zhao J, Zhou YH, Zhao YQ, et al. Oral cavity-derived stem cells and preclinical models of jaw-bone defects for bone tissue engineering. *Stem Cell Res Ther*. 2023;14(1):39.
- [3] Shariatnia Z. Carboxymethyl chitosan: Properties and biomedical applications. *Int J Biol Macromol*. 2018;120(Pt B):1406-1419.
- [4] Agarwal T, Narayan R, Maji S, et al. Gelatin/Carboxymethyl chitosan based scaffolds for dermal tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol*. 2016;93(Pt B):1499-1506.
- [5] He Y, Li Y, Chen G, et al. Concentration-dependent cellular behavior and osteogenic differentiation effect induced in bone marrow mesenchymal stem cells treated with magnetic graphene oxide. *J Biomed Mater Res A*. 2020;108(1):50-60.
- [6] Zhang X, Wei C, Li Y, et al. Dose-dependent cytotoxicity induced by pristine graphene oxide nanosheets for potential bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2020;108(3):614-624.
- [7] Roseti L, Parisi V, Petretta M, et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;78:1246-1262.
- [8] Mukasheva F, Adilova L, Dyussenbinov A, et al. Optimizing scaffold pore size for tissue engineering: insights across various tissue types. *Front Bioeng Biotechnol*. 2024;12:1444986.
- [9] Valencia C, Valencia CH, Zuluaga F, et al. Synthesis and Application of Scaffolds of Chitosan-Graphene Oxide by the Freeze-Drying Method for Tissue Regeneration. *Molecules*. 2018;23(10):2651.
- [10] Wong S, Lim SS, Tiong TJ, et al. Preliminary In Vitro Evaluation of Chitosan-Graphene Oxide Scaffolds on Osteoblastic Adhesion, Proliferation, and Early Differentiation. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15):5202.
- [11] Zhang Y, Zhang M, Jiang H, et al. Bio-inspired layered chitosan/graphene oxide nanocomposite hydrogels with high strength and pH-driven shape memory effect. *Carbohydr Polym*. 2017;177:116-125.
- [12] Sun J, Chen C, Zhang B, Yao C, Zhang Y. Advances in 3D-printed scaffold technologies for bone defect repair: materials, biomechanics, and clinical prospects. *Biomed Eng Online*. 2025;24(1):51.
- [13] Shamekhi MA, Mirzadeh H, Mahdavi H, et al. Graphene

- oxide containing chitosan scaffolds for cartilage tissue engineering. *Int J Biol Macromol.* 2019;127:396-405.
- [14] Lei H, Zhou Z, Liu J, et al. Structural Optimization of 3D-Printed Porous Titanium Implants Promotes Bone Regeneration for Enhanced Biological Fixation. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2025;17(12):18059-18073.
- [15] Zhou K, Yu P, Shi X, et al. Hierarchically Porous

Hydroxyapatite Hybrid Scaffold Incorporated with Reduced Graphene Oxide for Rapid Bone Ingrowth and Repair. *ACS Nano.* 2019;13(8):9595-9606.

版权声明: ©2026 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS