

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)18-1660-03

## 新型骨组织工程支架材料 $\beta$ -TCP/CPPF/PLLA 的性能观察

李毅<sup>1</sup>, 张珍妮<sup>2</sup>, 陈君长<sup>2</sup>, 王坤正<sup>2</sup>, 郭雄<sup>3</sup>, 石宗利<sup>4</sup>, 同志超<sup>1</sup>, 杨团民<sup>1</sup> ( <sup>1</sup> 西安市红十字会医院骨关节科, 陕西西安 710054, 西安交通大学: <sup>2</sup> 医学院附属第二医院, 陕西西安 710004, <sup>3</sup> 环境与疾病相关基因教育部重点实验室, 陕西西安 710061, <sup>4</sup> 兰州交通大学机电工程学院材料研究所, 甘肃兰州 730070 )

### Property study of a novel bone tissue engineering scaffold $\beta$ -TCP/CPPF/PLLA composite

LI Yi<sup>1</sup>, ZHANG Zhen-Ni<sup>2</sup>, CHEN Jun-Chang<sup>2</sup>, WANG Kun-Zheng<sup>2</sup>, GUO Xiong<sup>3</sup>, SHI Zong-Li<sup>4</sup>, TONG Zhi-Chao<sup>1</sup>, YANG Tuan-Min<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Bone and Joint Surgery, Xi'an Red Cross Hospital, Xi'an 710054, China, <sup>2</sup>Second Affiliated Hospital, Medical School, Xi'an 710004, China, <sup>3</sup>Key Laboratory of Ministry of Education for Environment and Genes Related to Diseases, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China, <sup>4</sup>Institute of Materials, School of Electromechanical Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China

**【Abstract】** AIM: To study the biocompatibility and degradation of a new-type bone tissue engineering scaffold  $\beta$ -TCP/ CPPF/ PLLA composite. **METHODS:** The scaffold specimens were immersed in Hank's liquid after vacuum drying to original weight and degraded tightly for 15 weeks at 37°C. The microstructure and the objective aperture of the scaffold composites were observed with scanning electron microscope (SEM). Bone marrow stromal cells (BMSCs) were seeded onto three-dimensional porous  $\beta$ -TCP/CPPF/PLLA scaffolds to construct tissue engineering bone, which was cultured for 3 and 7 d *in vitro*. The growth, adhesiveness, proliferation and differentiation of cells at the surface of and inside the scaffold were observed by SEM. **RESULTS:** This scaffold got degraded obviously after the specimens were immersed in physiological saline for 15 weeks, and still had 3-dimensional, interconnected, micro-hole network structure of cross sections under SEM. SEM observation revealed that the growing BMSCs showed normal morphology at the surface of or inside the scaffold. **CONCLUSION:** The  $\beta$ -TCP/CPPF/PLLA scaffold composites have a three-dimensional network structure with reasonable micro-pore diameter, high porosity, satisfactory degradation ability, and good biocompatibility. This scaffold may be regarded as a novel material to meet the elementary requests of bone tissue engineering.

收稿日期 2006-12-12; 接受日期 2007-06-13

作者简介: 李毅, 博士, 主治医师. Tel: (029) 81989173 Email: liyidocor@163.com

**【Keywords】** tissue engineering; bone and bones; braces; biocompatibility; degradation ability

**【摘要】** 目的: 研究新型骨组织工程支架材料  $\beta$ -TCP/ CPPF/ PLLA 的降解性能及生物相容性. 方法: 将试样真空干燥至恒重后放入盛有人工降解液的试管中, 在 37°C 下密闭降解. 用扫描电镜观察材料的微观结构. 将骨髓基质细胞 (BMSCs) 与材料复合构建人工骨, 在体外培养 3, 7 d 后, 扫描电镜观察骨髓基质细胞在材料上的附着及生长情况. 结果: 降解后的材料仍然具有三维网状的立体结构. 扫描电镜 (SEM) 见在材料表面及内部有大量细胞正常生长. 结论:  $\beta$ -TCP/ CPPF/ PLLA 骨组织工程支架复合材料具有合理的微孔直径、较高的孔隙率, 良好的降解性及生物相容性, 基本满足骨组织工程的要求.

**【关键词】** 组织工程; 骨和骨组织; 支架 (骨科); 生物相容性; 降解性

**【中图分类号】** R318.08; Q813.11

**【文献标识码】** A

## 0 引言

支架材料作为骨组织工程的要素之一, 与种子细胞共同构成组织工程的核心—三维空间复合体<sup>[1]</sup>. 支架材料是细胞种植的场所以及组织再生的模板, 引导组织再生和控制组织结构, 是组织工程能否应用于临床的关键因素. 本实验我们研究新型骨组织工程  $\beta$ -TCP/ CPPF/ PLLA 支架的降解性能及生物相容性, 为今后进一步利用组织工程修复骨缺损提供实验和理论基础.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 按支架复合物质量比  $\beta$ -TCP: CPPF: PLLA = 2:3:5 采用溶媒浇注/ 粒子滤取技术与气体发泡相结合的方法制备新型骨组织工程支架材料  $\beta$ -TCP/ CPPF/ PLLA, 由兰州交通大学复合材料研究室石宗利教授合成.

### 1.2 方法

**1.2.1 骨髓基质细胞 (bone marrow stromal cell, BMSCs) 的培养方法** 参见文献 [2].

**1.2.2 支架材料的降解性能测试**  $\beta$ -TCP/ CPPF/

PLLA (Wt :30/37/33) 材料呈白色多孔状,直径 11 mm,长 15 mm. 液体置换方法测得支架材料密度  $0.15 \text{ g/cm}^3$ ,孔隙率 81.35%,孔径为  $150 \sim 200 \mu\text{m}$ ,压缩模量为  $(7.2 \pm 0.54) \text{ MPa}$ . 支架材料的横截面和纵截面的扫描电镜 (SEM),可以看出支架材料为高孔隙率的三维网状、连通微孔结构, CPP 纤维表面包裹有一层 PLLA 基体,纤维随机分布,纤维之间由 PLLA 黏接.  $\beta$ -TCP 在横截面及纵截面上分布较均匀. 将试样真空干燥至恒重 ( $W_0$ ) 后放入盛有人工降解液 (Hank's 液,  $\text{pH} = 7.4$ ) 的试管中 (固液比 1:20), 在  $37^\circ\text{C}$  下密闭降解,分别在降解的 6, 15 wk 时将试样取出. 将降解试样干燥处理后, 锐刀横切、喷金, 用扫描电子显微镜观察.

1.2.3 BMSCs/ $\beta$ -TCP/PPF/PLLA 复合体的体外构建及检测 将  $\beta$ -TCP/PPF/PLLA 支架材料切割成  $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$  长方形块状物, 环氧乙烷熏蒸消毒后保存. 支架材料在使用前无菌条件下用  $750 \text{ mL/L}$  乙醇浸泡 6 h, 含血清培养基置换 4 次, 每次浸泡 20 min, 以改善材料的亲水性. 取出材料, 用 DMEM 培养液、含血清 DMEM 培养液浸泡后, 吸干液体待用. 将诱导培养 7 d 的细胞消化后, 经计数 (台盼蓝染色细胞活度大于 90%) 后, 调整细胞悬液密度为  $1 \times 10^{10}/\text{L}$ , 接种到处理后的支架中至饱和, 置入  $37^\circ\text{C}$ ,  $50 \text{ mL/L CO}_2$ , 饱和湿度孵箱内孵育 4 h (2 h 后翻面) 后, 小心取出细胞-材料复合体, 将其置于  $10 \text{ mL}$  离心管底部, 每管加入诱导培养基  $4 \text{ mL}$ , 置入  $37^\circ\text{C}$ ,  $50 \text{ mL/L CO}_2$ , 饱和湿度孵箱内孵育, 每 2~3 d 换液一次. 体外培养 3~5 d 后, 取出材料细胞复合体, 用  $30 \text{ mL/L}$  的戊二醛固定 24 h 后, 液氮冷冻后, 断开材料, 乙醇系列脱水, 自然干燥, 表面喷金, 扫描电子显微镜观察其表面及内部微观结构.

## 2 结果

2.1 降解后支架材料的细微结构变化 经过 6 wk 降解, 支架仍为三维连通微孔结构, 与降解前相比较其微观结构没有明显的变化, 但 15 wk 以后, 可以看出 CPPF 已经大部分降解, 材料中间纤维为空洞样, 支架还保持三维连通微孔结构 (图 1).

2.2 支架材料细胞复合物扫描电镜观察 培养 3~5 d 在材料表面有大量细胞贴附生长, 呈圆球形, 并有不规则突起 (图 2, 3). 断面剖开后观察, 见材料内部有大量细胞贴附生长, 呈圆球形, 细胞被分泌的胶原基质包裹, 在微孔壁及边缘密集分布, 部分区域细胞堆积 (图 4).

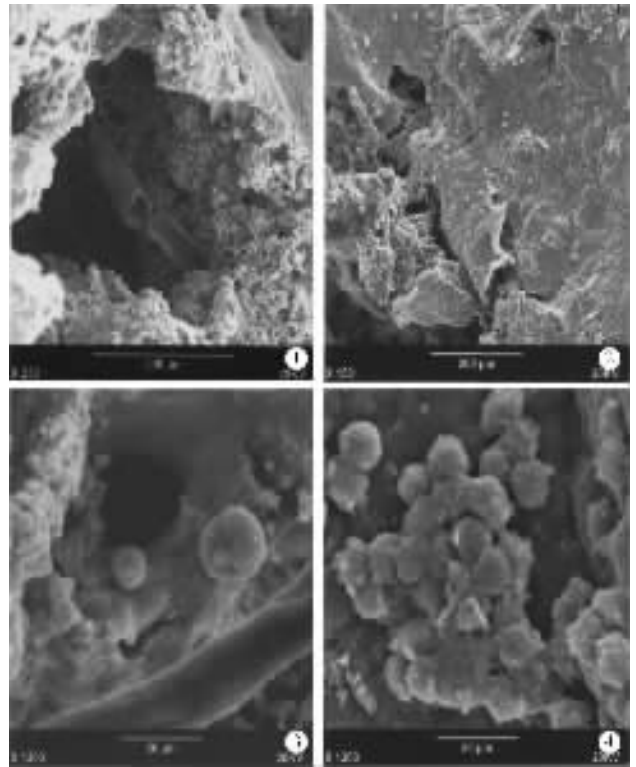


图 1 降解 15 wk (SEM  $\times 200$ )

图 2 细胞材料表面 (SEM  $\times 150$ )

图 3 材料壁的少数细胞 (SEM  $\times 1300$ )

图 4 材料壁的细胞团 (SEM  $\times 1300$ )

## 3 讨论

3.1 支架材料的特性 在骨组织工程支架材料研究中, 无机材料主要指生物活性陶瓷, 优点是生物相容性好, 降解速度可调控, 可加工成多孔支架. 缺点是塑形难, 脆性大. 有机高分子材料优点是具有良好的生物相容性和可降解吸收性, 易于加工、塑形和消毒. 缺点是易引起炎症反应、强度低、受力时易变形, 易损伤种植细胞. 为克服上述材料单独使用时的缺点, 近年来支架材料研制中的一个新方向是将有机材料同无机材料复合, 把碱性物质, 如磷酸钙, HA,  $\beta$ -TCP 等引入人工合成聚合物 PLLA, PDLA 中, 有助于防止聚合物降解引起的 pH 值下降及无菌性炎症, 同时合成的聚合物如 PLLA 也有助于改善陶瓷类材料的脆性, PLLA 的强度也得以提高<sup>[3]</sup>.  $\beta$ -TCP 是生物相容性最好的骨组织替代材料之一, 对蛋白或细胞吸附性好, 形成利于细胞生长的微碱性环境, 易克服 PLLA 降解引起的 pH 值下降, 并降解出骨组织所需要的元素 ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ), 有利于成骨细胞表型等<sup>[4]</sup>. CPPF 具有良好的组织与细胞生物相容性, 其降解产物为磷酸钙, 降解后能中和局部的酸碱度, 使 pH 值基本维持

在中性,国内外已开始了将其作为骨替代材料的研究<sup>[5-6]</sup>。聚乳酸(包括 PLLA, PDLA)在体内的降解产物乳酸进入三羧酸循环后,最终转化为 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sup>[7]</sup>,易于代谢和排出体外。然而其降解产物引起材料周围 pH 值的降低,反过来可以加速聚合物的降解速率及引起炎症反应;其又是疏水性高分子材料,表面缺乏细胞识别信号,成骨细胞难于在其表面黏附与增殖<sup>[8]</sup>,研究表明未经过表面处理的聚乳酸植入骨缺损区后是通过纤维组织与周围的骨组织结合,骨传导能力较弱,常需要引入其他物质来改善材料性能<sup>[9-10]</sup>。

本实验我们选用 PLLA 为基质材料,以高强度模量可设计降解吸收速率的 CPPF 和  $\beta$ -TCP 颗粒为增强材料,制备了  $\beta$ -TCP/CPPF/PLLA 骨组织工程支架复合材料。SEM 下可以看出支架材料为高孔隙率的三维网状、连通微孔结构。体外降解实验证实,15 wk 左右该材料就能明显的降解,仍维持三维连通的网状结构。

**3.2 支架材料生物相容性** BMSCs 作为骨组织工程中的主要种子细胞,承担着骨的修复和改建功能,将其接种在生物材料,观察其在材料表面和内部的状态及功能变化,可客观反映该替代材料的细胞相容性,较之其它细胞如成纤维细胞更灵敏可靠。我们在既往研究的基础上,将 BMSCs 体外培养、扩增,并诱导为成骨细胞表型,将其接种在  $\beta$ -TCP/CPPF/PLLA 复合材料上,行体外复合培养,构建骨组织工程人工骨。观察到 BMSCs 可以在  $\beta$ -TCP/CPPF/PLLA 复合材料表面附着并增殖良好,细胞分泌大量细胞外基质并连接成网,在材料内部也有大量细胞贴附生长,呈圆球形,细胞被分泌的胶原基质包裹,在微孔壁及边缘密集分布,部分区域细胞堆积。这说明 BMSCs 与  $\beta$ -TCP/CPPF/PLLA 复合材料之间具有良好的相容性。复合材料三维联通网状空间结构,能为组织细胞的生长繁殖、提供适宜的营养空间和排泄交换条件,有利于 BMSCs 发挥特定的生理功能。当然,体外实

验并不能完全反映出该材料长期植入体内可能发生的生物学反应,因此有必要以体内实验加以完善。

本文结果证实该  $\beta$ -TCP/CPPF/PLLA 骨组织工程支架复合材料具有合理的微孔直径、较高的孔隙率,对 BMSCs 的增殖、分化及分泌功能均无明显影响,具有较好的细胞黏附能力,生物相容性良好,基本满足骨组织工程的要求。

## 【参考文献】

- [1] Langer RS, Vacanti JP. Tissue engineering: The challenges ahead [J]. *Sci Am*, 1999, 280(4): 86-89.
- [2] 李毅, 陈君长, 王坤正, 等. 兔骨髓基质细胞同种异体移植修复骨缺损的实验研究[J]. *陕西医学杂志*, 2004, 33(5): 387-389.
- [3] Agrawal CM, Athanasios KA. Technique to control PH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants[J]. *J Biomed Mater Res*, 1997, 38(2): 105-114.
- [4] 张亮, 新安民, 郭志民. 三维多孔骨复合材料 DL-PLA 及  $\beta$ -TCP/DL-PLA 的体外降解研究[J]. *骨与关节损伤杂志*, 2001, 16(3): 184-186.
- [5] 石宗利, 戴刚, 李重庵, 等. 一种新型骨组织工程材料-CPP 纤维的制备和性能[J]. *兰州大学学报*, 2001, 37(2): 47-51.
- [6] Pilliar RM, Filiaggi MJ, Wells JD, et al. Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications: In vitro characterization[J]. *Biomaterials*, 2001, 22(9): 963-972.
- [7] An YH, Woolf SK, Friedman RJ. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(24): 2635-2652.
- [8] Kellomaki M, Niiranen H, Puumanen K, et al. Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation[J]. *Biomaterials*, 2000, 21(24): 2495-2505.
- [9] Gogolewski S, Pineda L, Busing CM. Bone regeneration in segmental defects with resorbable polymeric membranes: IV. Does the polymer chemical composition affect the healing process? [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(24): 2513-2520.
- [10] BoKstman O, Viljanen J, Salminen S. Response of articular cartilage and subchondral bone to internal fixation devices made of poly-L-lactide: A histomorphometric and microradiographic study on rabbits [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(24): 2553-2560.

编辑 井晓梅