



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.09.015

www.csumed.org/xbwk/fileup/PDF/201409949.pdf

纳米羟基磷灰石 / 明胶仿生复合材料的制备及其细胞相容性

李斯日古楞¹, 胡晓文²

(1. 广州医科大学卫生职业技术学院, 广州 510450; 2. 中山大学光华口腔医学院附属口腔医院, 广州 510055)

[摘要] **目的:** 评价纳米羟基磷灰石/明胶仿生复合材料的一般理化性质及细胞相容性。**方法:** 采用冷冻干燥技术将纳米羟基磷灰石与明胶复合物制成3D多孔支架材料,并用扫描电镜、傅里叶红外光谱、万能试验机对复合材料进行表征; 原代培养BALB/c小鼠成骨细胞,取第3代与复合材料共培养,采用扫描电镜、细胞毒性实验、细胞增殖实验和碱性磷酸酶活性测定法观察支架材料对细胞分化、增殖的影响。**结果:** 扫描电镜显示复合材料为三维多孔状,孔径大小约150~400 μm; 傅里叶变换红外光谱显示复合材料无机相和有机相之间有较强的化学键合; 复合材料抗压强度为(3.28±0.51)MPa, 孔隙率为(80.6±4.1)%, 接近人松质骨。扫描电镜观察和MTT实验结果显示复合材料具有良好的细胞相容性,小鼠成骨细胞在材料上黏附和伸展情况良好; 细胞毒性I~II级; 与材料共培养第5, 7天的细胞增殖率与对照组差异有统计学意义($P<0.05$); 第1, 3天的碱性磷酸酶活性与对照组之间的差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:** 明胶与纳米羟基磷灰石在一定比例和条件下,采用冷冻干燥法可制备出具有较高孔隙率、适宜孔径大小的三维连通多孔结构的仿生支架材料,具有良好的细胞相容性,有望成为一种新型骨组织工程支架材料。

[关键词] 纳米羟基磷灰石; 明胶; 骨组织工程; 细胞相容性; 冷冻干燥; 仿生

Biomimetic nanohydroxyapatite/gelatin composite material preparation and in vitro study

LI Siriguleng¹, HU Xiaowen²

(1. College of Health Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510450;

2. Guanghua School of Stomatology, Hospital of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510055, China)

ABSTRACT

Objective: To prepare nHA/gelatin porous scaffold and to evaluate its physical and chemical properties and biocompatibility.

Methods: We used nanopowders of HA and gelatin to prepare 3D porous composite scaffold by freeze-drying technique, and used scanning electron microscope, fourier transform infrared spectroscopy and universal testing machine to characterize the composite material. Osteoblasts were primarily cultured, and the third-passaged osteoblasts were co-cultured with the composite

收稿日期(Date of reception): 2014-07-14

作者简介(Biography): 李斯日古楞, 硕士研究生, 助教, 主要从事口腔种植与修复的研究。

通信作者(Corresponding author): 胡晓文, Email: dentisthuxiaowen@gmail.com

material. The cell adhesion and morphology were examined under scanning electron microscope. The cell viability analysis was performed by MTT assay, and the alkaline phosphatase activity was measured with alkaline phosphatase kit.

Results: Scanning electron microscope showed that the scaffold possessed a 3-dimensional interconnected homogenous porous structure with pore sizes ranging from 150 to 400 μm . Fourier transform infrared spectroscopy showed that the composite material had a strong chemical bond between the inorganic phase and organic phase. The scaffold presented the compressive strength of (3.28 ± 0.51) MPa and porosities of $(80.6 \pm 4.1)\%$. Composite materials showed features of had good biocompatibility. Mouse osteoblasts were well adhered and spread on the materials. The grade of the cell toxicity ranged from I to II. On the 5th and 7th day the proliferative rate of osteoblasts on scaffolds in the composite materials was significantly higher than that in the control group. The activity of alkaline phosphatase was obviously higher than that in the control group on Day 1 and 3.

Conclusion: Nano-hydroxyapatite and gelatin in certain proportions and under certain conditions can be prepared into a composite biomimetic porous scaffolds with high porosity and three-dimensional structure using freeze-drying method. The scaffold shows good biocompatibility with mouse osteoblasts and may be a novel scaffolds for bone tissue engineering.

KEY WORDS

nano-hydroxyapatite; gelatin; bone tissue engineering; biocompatibility; freeze-drying technique; biomimetic

充足的骨量是牙种植体植入及获得长久成功率的先决条件。然而临床上经见到因各种原因引起的受植区骨量不足情况, 所以骨修复材料的研究和开发是目前的热点问题, 是生物材料研究中一个非常活跃的领域。

纳米羟基磷灰石(nanohydroxyapatite, nHA)是目前公认具有生物活性的材料, 与人体骨骼成分和结构更为相似, 有助于细胞及体内的大分子对其进行识别, 从而使得材料的生物活性、利用度和生物相容性得以提高, 并在表面面积、细胞亲和性和体内降解速率等方面也具有更佳的性能。研究^[1]表明在成骨分化的晚期, 成骨细胞分泌大量胞外基质并发生矿化, 其产物就是纳米级的羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)。在骨缺损修复方面也展现良好的生物相容性和骨传导性^[2-3]。尽管nHA作为骨修复材料优势明显, 但仍存在脆性大、骨诱导活性低、机械强度和力学性能相对较差及塑型困难等问题^[4-5]。复合材料是近几年研究和应用最为广泛的一种骨修复材料, 是两种或两种以上材料的合成。材料之间的复合可以满足机体多样性的要求, 又可以同时发挥它们各自的优势, 更好地实现其在生物体内的修复功能。因此nHA与其他材料复合是提高生物相容性和力学性能的一种有效途径。目前有很多复合材料表现出较好的生物相容性和力学性能^[6-8], 如nHA/胶原、

nHA/壳聚糖及nHA/聚乳酸等。

明胶是胶原在酸、碱、酶等的作用下发生化学变化或在光、紫外线、热等物理条件作用下的变性产物, 与胶原一样由氨基酸组成, 是一种天然高分子蛋白类材料。明胶具有很多优异的物理化学性能, 如胶体保护性、成膜性、表面活性、凝胶与溶胶态可逆转变、两性聚电解质特性以及侧基的高化学反应活性, 使其成为最早并且最重要的商品化蛋白质; 明胶来源丰富, 具有良好的细胞相容性, 还具有较好的黏附作用和被人体降解吸收等特点, 且相对胶原而言, 具有水溶性、无毒、无抗原性、价格相对便宜等优点^[9]。另外, 研究^[10]表明: 明胶的氨基酸成分里富含羧酸根负离子, 在适当温度条件下, 能与羟基磷灰石的钙离子形成化学键, 诱导羟基磷灰石的成核和生长, 利于复合材料的自组装和生成。天然的骨间质是由纳米级低结晶的磷灰石和少量碳酸钙与胶原纤维有机组合而成的三维结构。从仿生学的角度看, nHA与明胶复合不仅可以提高生物相容性和力学性能, 而且两者的复合从成分和结构上更好地模拟天然骨。因此nHA/明胶复合物有望成为新型骨组织工程支架材料。本研究拟利用冷冻干燥方法将nHA和明胶制备成与天然骨组织相似成分的仿生多孔支架材料, 旨在为其在骨缺损修复领域中的临床应用提供实验依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料和主要仪器

nHA和明胶系上海晶纯实业有限公司产品; 戊二醛、乙醇系广州化学试剂厂产品; 恒温磁力搅拌器(MR3001)系德国Heidolph公司产品; 冷冻干燥机系美国Labconco公司产品; 扫描电镜(FEI Quanta 200)系荷兰FEI公司产品; 傅里叶变换红外光谱仪(EQUINOX 55)系德国Bruker公司产品; DMEM低糖培养基、胰蛋白酶及II型胶原酶系美国Gibco公司产品; 胎牛血清为以色列Bioind公司产品; MTT粉剂为美国Sigma公司产品; 碱性磷酸酶试剂盒系南京建成生物工程研究所产品; TECAN SUNRISE酶标仪为瑞士Tecan公司生产。

1.2 方法

1.2.1 多孔支架材料制备方法

在Azami等^[11]的实验方法基础上略有改进。将2 g明胶溶于20 mL去离子水中, 加入1 g nHA, 于40 °C恒温、磁力搅拌器1 000 r/min持续搅拌45 min。待反应结束后将悬液倒入塑料模具中, 放入-20 °C冰箱过夜, 冷冻干燥24 h, 将复合物制成理想大小和形状后用1%戊二醛于4 °C交联24 h, 之后分别用75%乙醇和去离子水漂洗3次, 逐步除去多余的戊二醛和乙醇, 置-80 °C冻存后冷冻干燥24 h, 得nHA/明胶多孔支架材料, 将材料封装, 用钴-60灭菌(25 kGy, 广州华大生物科技有限公司), 备以后实验中应用。

1.2.2 扫描电子显微镜观察表面结构及微形貌

把干燥的复合材料修整成小块, 粘于小圆形金属板上, 用离子溅射仪喷金镀膜后用Quanta 200环境扫描电子显微镜观察支架材料的微形貌、孔径大小、连通性、孔壁等结构。

1.2.3 支架材料的红外光谱

采用溴化钾(KBr)压片法制备样品, 在4 000~400 cm⁻¹光谱范围内测定样品红外光谱。

1.2.4 力学性能测试

采用WD-5A型电子万能材料试验机测试样品的抗压强度, 待测样品加工成直径8 mm, 长度为15 mm的圆柱状, 加载速率0.5 mm/min, 抗压测试记录最大压力, 计算最大压缩强度及其压缩模量($n=5$)。

1.2.5 材料孔隙率的测定

将待测样品加工成直径8 mm, 长度为15 mm的圆柱状, 记录已知体积 V_0 和测得重量 W_0 , 之后把样品浸泡于无水乙醇中48 h, 使样品吸收无水乙醇至饱和状态, 小心拿出样品, 用滤纸轻蘸去表面多余

液体后称重得质量 W_1 。最后计算材料孔隙率^[12]: $P=W_1-W_0/\rho V_0$, ρ 为无水乙醇的密度($n=5$)。

1.2.6 小鼠成骨细胞的原代培养和传代

酶消化法, 在司徒镇强等^[13]的方法上略有改进。取24 h内新生BALB/c小鼠10只(中山大学实验动物中心提供), 75%乙醇溶液中浸泡3~5 min。无菌条件下剪开头部皮肤, 取下头盖骨, 将头盖骨置于磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)内, 清除骨膜、血管等结缔组织, 用PBS洗2次后将洗净的头盖骨剪成约1 mm×1 mm×1 mm大小碎片。将骨片移入5 mL 0.25%胰蛋白酶溶液内, 于37 °C恒温下消化20 min, 以清除纤维组织。弃去胰酶加入5 mL 0.1%II型胶原酶, 于37 °C继续消化细胞20 min。加上含10%血清的DMEM培养基终止消化, 将混合液移到离心管, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 用含20%胎牛血清的DMEM培养液重悬细胞, 吹打数次, 再次离心。弃上清, 添加上述培养基, 接种到培养瓶中于37 °C, 5%CO₂培养箱中培养, 每两天换1次液。细胞铺满瓶底70%~80%后, 即可进行传代。

1.2.7 材料浸提液的制备及细胞毒性检测

钴-60灭菌处理过的nHA/明胶复合材料, 按质量/浸提介质=1 g/10 mL的比例加入含10%血清的DMEM培养液, 置于37 °C环境下24 h后离心, 即得材料浸提液, 过滤除菌, 于4 °C保存备用。

第3代小鼠成骨细胞, 按每孔 1×10^4 个细胞接种到96孔板中, 每孔接种细胞悬液100 μ L。在37 °C, 5% CO₂及饱和湿度环境下培养24 h。细胞贴壁24 h后, 吸去上清液, 加入浸提液200 μ L(浸提液组, 又分为全浸提液和50%浸提液组), 阴性对照为含10%血清的DMEM培养液, 每组同时设6个平行孔, 于37 °C, 5% CO₂及饱和湿度环境下培养。在培养第1, 3, 5天时, 每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μ L, 于37 °C, 5% CO₂及饱和湿度环境下继续孵育4 h, 小心吸弃孔内培养液, 每孔加入二甲基亚砷100 μ L, 震荡10 min, 在酶标仪490 nm波长下测定各孔吸光度值, 计算相对增殖率(relative growth rate, RGR)=实验组吸光度值/对照组吸光度值×100%。按6级毒性分级法确定材料毒性^[14](表1)。

表1 细胞毒性分级标准

Table 1 Standard of cytotoxic levels

等级	0	I	II	III	IV	V
RGR/%	≥100	75~99	50~74	25~49	1~24	0
毒性程度	无	轻度	轻度	中度	中度	重度

1.2.8 细胞与材料共培养

将材料制成直径8 mm, 厚度约1.5 mm的圆片装, 钴-60灭菌后置入24孔培养板中, 用PBS漂洗2次, 吸去PBS, 加入含10%血清的DMEM培养基, 置于37 ℃, 5% CO₂及饱和湿度环境下浸泡30 min后吸去大部分培养基, 准备接种。取第3代小鼠成骨细胞, 按每孔 2×10^4 个细胞接种到24孔板中, 每孔接种细胞悬液500 μL(材料组), 以未加材料的孔为阴性对照, 每2 d换液1次。细胞接种后1, 3 d, 各取1片材料, 用2.5%戊二醛在4 ℃下固定24 h, 以PBS冲洗, 乙醇梯度脱水, 丙酮置换乙醇, 乙酸异戊酯置换丙酮, 临界点干燥, 把干燥的复合材料修整成小块, 粘于小圆形金属板上, 用离子溅射仪喷金镀膜后用Quanta 200环境扫描电镜观察细胞在材料上的黏附及伸展情况。

分别于细胞接种后1, 3, 5, 7 d, 每孔加入100 μL的MTT, 37 ℃, 5%CO₂及饱和湿度环境下继续孵育4 h, 小心吸弃孔内培养液, 每孔加入二甲基亚砜500 μL, 震荡10 min, 从每孔取150 μL上清液移入96孔酶标板, 置酶标仪490 nm波长下测定各孔吸光度值。

分别于细胞接种后第1, 3, 5天吸去孔内培养液, 以PBS漂洗两遍, 然后加入0.5%TritonX-100 500 μL, 置于4 ℃冰箱过夜, 按照碱性磷酸酶检测试剂盒操作说明, 检测碱性磷酸酶活性。

碱性磷酸酶 = $\frac{\text{测定管吸光度}}{\text{标准管吸光度}} \times \frac{\text{标准管含酚的量}}{(0.005 \text{ mg})} \times \frac{100 \text{ mL}}{0.05 \text{ mL}}$
(金氏单位/100mL)

1.3 统计学处理

实验所得数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用SPSS16.0统计分析软件对每个时间点的实验组和对照组之间进行t检验, 方差不齐者采用校正t检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 支架材料的电镜观察

nHA/明胶支架材料为三维立体多孔状, 孔洞丰富, 分布较均匀, 孔径约150~400 μm, 且孔孔相通, 利于成骨细胞等的长入及营养物质的传递, 也有助于材料自身的降解。在高倍镜下可见, 孔壁上沉积着大小不一的HA结晶簇及直径<5 μm的微孔(图1)。

2.2 支架材料的红外光谱

图2A为nHA的红外光谱。HA的特征性吸收峰

较为明显, 如3 570 cm⁻¹对应HA中OH⁻的伸缩振动吸收峰; 603 cm⁻¹和566 cm⁻¹对应PO₄的ν₄振动吸收峰; 962 cm⁻¹对应PO₄的ν₁振动吸收峰; 1 034 cm⁻¹为PO₄的ν₃振动吸收峰。从图2B中可以看出复合材料的组成成分, 无机和有机相之间形成的化学键。如1 336 cm⁻¹对应的吸收峰表示来自明胶的羧基与HA的钙离子之间已形成Ca-COO化学键(表2)。

2.3 力学性能及孔隙率

合成的多孔支架材料的压缩强度为(3.28±0.51) MPa, 孔隙率达(80.6±4.1)%(表3)。

2.4 成骨细胞的形态观察

小鼠成骨细胞呈贴壁生长, 接种培养瓶3~4 h后即可贴壁并部分伸展, 形态呈梭形、三角形和鳞片形; 细胞质透明颗粒较少, 生长密集区形成“铺路石”样结构, 细胞边界模糊, 在暗视野下呈浮雕状(图3)。

2.5 成骨细胞在材料上的黏附、伸展情况

细胞接种后第1天, 细胞呈梭形, 丝状伪足附着在材料孔壁上, 部分细胞还伸展出板状伪足, 细胞伸展不彻底。接种后第3天, 细胞伸展良好, 胞质在板状伪足之间扩展或完全伸展, 呈多角形或三角形(图4)。

2.6 材料的细胞毒性

浸提液组吸光度值随时间延长而逐渐降低, 随浓度降低而升高, 对照组随培养时间的延长而逐渐升高。材料的细胞毒性评级为I~II级, 为轻度(表4)。

2.7 细胞在材料上的增殖情况

MTT法检测细胞在支架材料上增殖的结果, 材料组和对照组吸光度值随时间延长而逐渐升高, 而材料组大于对照组, 第5天和第7天的材料组与对照组之间的差异有统计学意义($P < 0.05$, 表5)。

2.8 细胞在材料上的分化

采用碱性磷酸酶试剂盒检测细胞在支架上的碱性磷酸酶活性表达的结果显示: 随着时间的延长, 材料组和对照组碱性磷酸酶活性都升高, 材料组活性高于对照组, 接种后第1天和第3天两组之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$, 表6)。

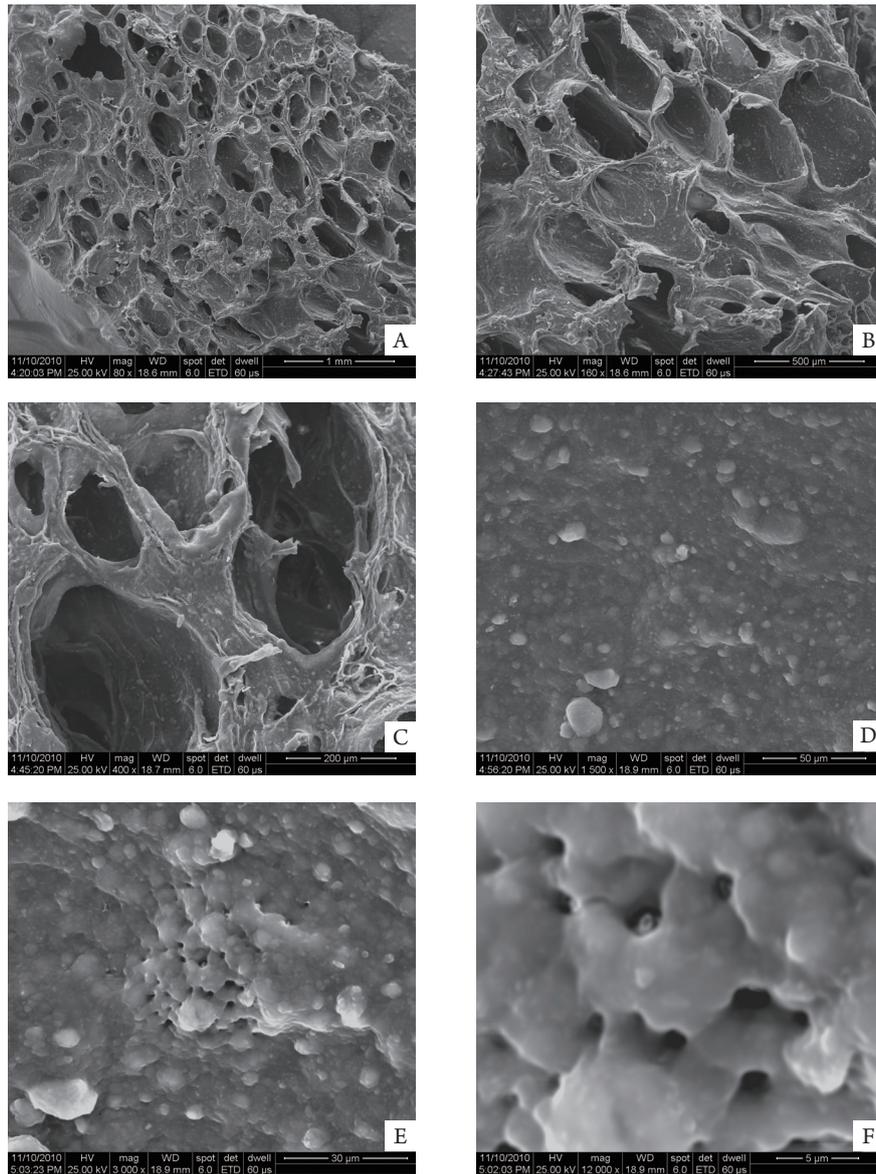


图1 nHA/明胶支架材料的微形貌

Figure 1 Micromorphology of nHA/Gel scaffold

A–C: At low magnification, the pore size and the interconnected structure; D–F: At high magnification, the nHA precipitated clusters and micropore (black arrows)

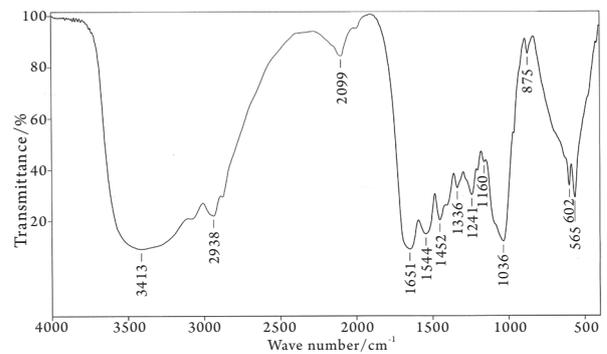
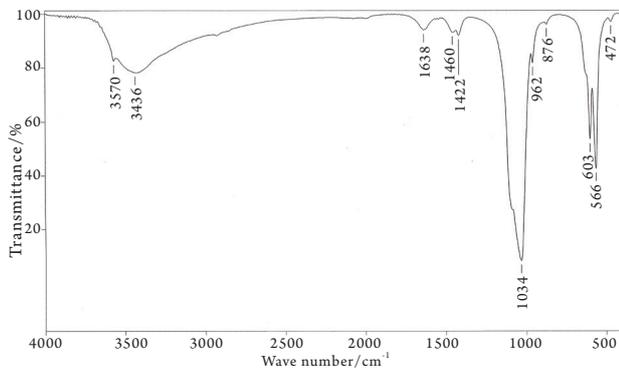


图2 傅里叶变换红外光谱图谱

Figure 2 Spectrogram of fourier transform infrared spectroscopy

A: nHA; B: nHA/Gel composite material

表 2 nHA/ 明胶复合物的傅里叶变换红外光谱
Table 2 Fourier transform infrared spectroscopy of prepared nHA/Gel composites

复合物	红外波数/cm ⁻¹	对应官能团
HA	565~1 036	PO ₄
HA	875	CO ₃ ²⁻
Gel	1 241	N-H
HA/明胶	1 336	Ca-COO
明胶	1 452	COO
明胶	2 938	C-H

表 3 多孔支架材料以及人体松质骨的抗压缩强度或孔隙率的比较

Table 3 Comparison of the anti-compressive intensity or porosity between the porous nHA/Gel scaffold and spongy bone

样品	孔径/μm	抗压强度/MPa	孔隙率/%
nHA/明胶材料	150~400	3.28 ± 0.51	80.6 ± 4.1
人松质骨	300~1 500*	4~12†	30~90†
CHA500R‡	100~600	1.5	30~70

*数据来源于Koeter等^[15]的研究; †数据来源于Murugan等^[16]的研究; ‡CHA: 珊瑚羟基磷灰石, 数据来源于天博齿固羟基磷灰石生物陶瓷说明书(北京市意华健科贸有限责任公司)

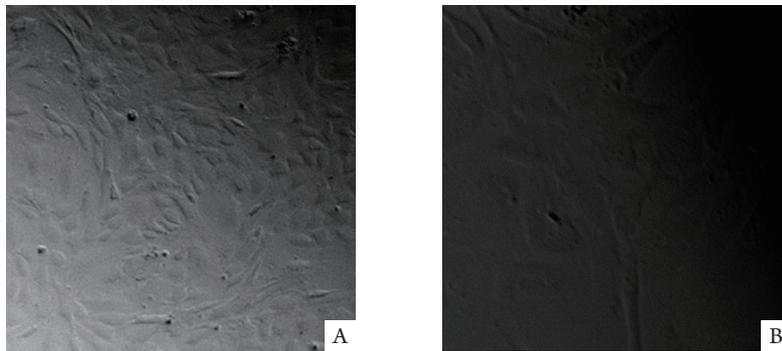


图3 倒置显微镜下的成骨细胞形态(第3代), 呈梭形、三角形、短杆状
Figure 3 Morphology of osteoblasts under the inverted microscope (the third-passage)
A: Dense cell growth, like paving stone (×50); B: Cells under dark field, like relief (×200)

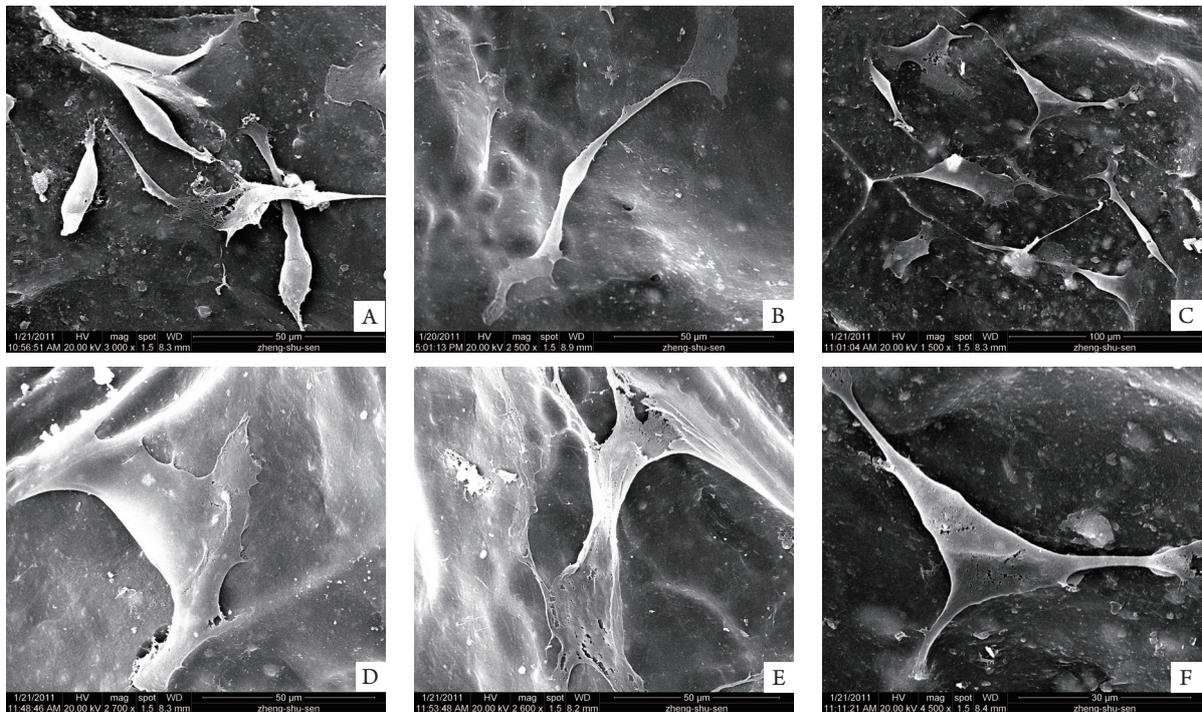


图4 成骨细胞在材料上黏附、伸展情况
Figure 4 Electron micrographs of the osteoblasts on the scaffold material after cultured for 1 day (A and B) and for 3 days(C-F)

表 4 支架材料的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Cytotoxicity of scaffold materials ($\bar{x} \pm s$)

组别	第1天			第3天			第5天		
	吸光度值	RGR/%	毒性	吸光度值	RGR/%	毒性	吸光度值	RGR/%	毒性
A组	0.2058 ± 0.0304	90.9	I	0.2017 ± 0.0175	70.6	II	0.1665 ± 0.0309	58.2	II
B组	0.2124 ± 0.1261	93.8	I	0.2175 ± 0.0334	76.1	I	0.1894 ± 0.0337	57.1	II
C组	0.2262 ± 0.0965	100.0	0	0.2857 ± 0.0737	100.0	0	0.3313 ± 0.0935	100.0	0

A组: 全浸提液; B组: 50%浸提液+DMEM; C组: 阴性对照组

表 5 细胞在支架材料上的增殖 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Proliferation of cells on the scaffold ($\bar{x} \pm s$)

组别	第1天	第3天	第5天	第7天
材料组	0.4354 ± 0.021	0.4811 ± 0.006	0.5300 ± 0.011*	0.5866 ± 0.038*
对照组	0.3349 ± 0.051	0.3620 ± 0.052	0.3802 ± 0.045	0.4748 ± 0.007

与对照组比较, *P<0.05

表 6 碱性磷酸酶测定 ($\bar{x} \pm s$, 金氏单位 /100 mL)

Table 6 Determination of alkaline phosphatase ($\bar{x} \pm s$, King unit/100 mL)

组别	第1天	第3天	第5天
材料组	4.702 ± 0.513*	5.058 ± 1.297*	5.385 ± 1.441
对照组	3.037 ± 0.163	3.204 ± 0.079	3.490 ± 0.178

与对照组比较, *P<0.05

3 讨论

目前, 用于骨修复的材料根据其化学组成主要分为以下4大类^[17]: 1)金属类, 如钛、钛合金; 2)陶瓷类, 惰性陶瓷主要有氧化铝和氧化锆, 活性陶瓷如HA、磷酸三钙等; 3)高分子材料, 不可吸收材料主要有聚乙烯和聚甲基丙烯酸甲酯等, 可吸收材料主要有胶原、壳聚糖等; 4)复合材料, 两种或两种以上材料的合成。金属材料属于惰性材料, 没有生物活性, 具有高强度和抗腐蚀性等优点, 但比较容易出现应力集中, 有时会影响或损坏周围好的骨组织; 此外, 医用金属材料长期在体液中浸泡, 容易腐蚀。陶瓷类材料相对而言具有良好的生物相容性和骨传导性, 但缺乏骨诱导性和机械脆性大等特点限制其广泛应用。高分子材料的种类繁多、质量轻、容易制备, 但由于它们的使用寿命较短, 力学性能较差, 在体内降解不易控制, 且降解速度和骨生长速度不一致等缺点还不能满足骨修复的需要。复合材料是近几年研究和应用得最为广泛的一种骨修复材料, 可以满足人体机体多样性的要求, 把几种材料复合在一起使复合材料同时发挥它们各自的优势, 更好地实现其在生物体内的修复功能。

本实验利用冷冻干燥技术将把按一定比例混合的nHA和明胶溶液制备成具有三维多孔状结构的复合支架材料。目前, 文献报道中HA和明胶复合物的制备方法主要有两种: 一种是采用直接在明胶基体中合成沉积HA, 使HA和明胶共沉积沉淀, 之后再行交联、成型和干燥, 这种方法也被称为原位合成^[18]; 第二种方法是直接在明胶溶液中加入已合成的HA粉末, 充分均匀混合后, 交联、成型和干燥^[11]。第一种方法采用的是液相反应, 在此状态下钙离子和磷酸根更容易结合形成纳米级颗粒尺寸的HA, 使得HA直接沉淀在明胶的C轴上, 但要求在特定pH和准确钙磷比例下才能进行反应, 对操作技术和反应环境的要求高。本实验采用第二种方法, 即直接在明胶溶液里加入已合成的纳米级的HA制备复合物。

制备复合材料多孔状结构的方法很多, 其中冷冻干燥技术一直被广泛应用在制备聚合物支架材料的过程中^[19]。冷冻真空干燥又称冷冻干燥或冻干, 是进行物质干燥的方法之一。该方法是将含有大量水分的生物活性物质先行降温预冻成固体, 再在真空和适度加温条件下使固体分子直接升华成水汽抽出, 最后使生物活性物质形成疏松多孔、体积不变的干燥物的过程。由于冷冻真空干燥全过程都在低温真空条件下进行, 所以能有效地保护热敏性物质的生物活性, 更不会使体系中的聚合物热降解。采用冷冻干燥法制备的支架既能维持其在冻干前的外形, 又能根据冷冻干燥时间长短来可调孔隙结构。

孔隙的形状及大小对种子细胞的附着和长期生存、分化具有深远的意义, 也是衡量骨代用材料优劣的重要指标。支架材料的高孔隙率和孔

孔相通的结构能提高材料的内表面积,这不仅利于细胞的黏附和长入,而且有助于新生组织的重组及血管化^[19]。目前对适宜的微观孔径大小一直存在争议,有研究^[20]指出骨组织长入的适宜孔径是200~400 μm 。而有些学者认为孔径大于150 μm 的孔结构更有利于细胞的增殖、血管的长入以及矿化骨的形成^[21]。对于多孔支架材料而言,单一的孔隙大小适宜是不够的,若孔隙之间连接不充分则新生骨很难向材料内部生长,这在以往的研究^[22]中已经得到证实。相互连通孔径大于100 μm 时,才能形成矿化的骨质;当40~100 μm 时,类骨质长入;而10~40 μm 时只有纤维组织能长入^[23]。对此国内学者严宁等^[24]提出:人工骨材料的孔径在200~500 μm ,且孔隙率大于75%时,利于骨组织的生长。一直以来材料的孔隙率和强度是相互矛盾的,高孔隙率实质上是以牺牲材料的抗压强度为代价的。本实验所制备的支架材料孔径约150~400 μm ,孔隙率为(80.6 \pm 4.1)%,孔隙分布较均匀,且相互连通,接近人松质骨,基本符合上述植骨材料要求,利于体液和营养物质的传送、细胞的长入和组织血管的形成,但抗压强度略低于人松质骨。

制备和研究支架材料的最终目的是为了植入体内,修复组织缺损。机体组织要想长入材料内部首先要细胞长入材料内部,并在材料上能黏附、伸展和增殖。所以细胞相容性是组织工程对支架材料最基本的要求之一。

本实验以24 h内新生BALB/c小鼠颅骨为组织来源,采用胰蛋白酶消化离心法获得成骨细胞,此方法已被广泛地应用在细胞原代培养,并得到大家的认可。原代培养的最大优点是组织和细胞刚刚离开机体,生物学特性及形态尚未发生明显变化,在一定程度上能够反映机体内的状态,而且本实验中制备的材料是为骨组织修复所用,故采用成骨细胞来评价材料的细胞相容性能一定程度上模拟体内状态,除了孔径大小、孔隙率及相互连通的结构、表面粗糙度、化学组成等理化特性外,组成材料的颗粒级别也影响材料与细胞之间的相互作用^[11]。纳米级的HA比普通级的HA更具有细胞亲和性,因为纳米级的HA更容易蛋白吸附及释放钙离子。有研究^[25-26]报道成骨前体细胞及成骨细胞等具有成骨功能的细胞表面具有钙敏感受体;而细胞黏附材料表面,不是直接接触,而是通过细胞外基质蛋白(ECM)作为中间体来实现的,纳米级的HA在介质中容易吸附这些蛋白,进而黏附成骨细胞。明胶是胶原的水解产物,与胶原有着相同的氨基酸成分,而胶原是ECM的主要

组成成分,其中含有天冬氨酸-甘氨酸-谷氨酸-丙氨酸细胞结合结构域,利于成骨细胞黏附、迁移和分化^[27]。本实验所制备的nHA与明胶的复合支架材料,从仿生学的角度来讲,很好地模拟了骨组织的化学组成及物理特性,利于成骨细胞的迁移、黏附和伸展。

交联是优化胶原来源材料力学性能的一种有效方法^[28]。戊二醛是最常用的一种化学交联剂,可在较短时间内有效交联明胶,但主要缺点在于具有细胞毒性^[29-30]。戊二醛含量低于8%时,复合物中未交联的交联剂能被除去,可以减少对成骨细胞的危害,过去20年大量戊二醛交联胶原类材料植入体内的实践表明,这种材料可以用于临床,并具有提高材料的力学性能而且还解决了明胶易吸水溶解的特性,延缓支架材料的降解时间,为骨组织的长入及矿化提供充分的时间等优点^[31]。本实验以1%的戊二醛为交联剂,发现材料浸提液的细胞毒性在I~II级,第3,5天时表现为轻度毒性,这也与Wang等^[32]的实验结果相似。

本实验结果表明:一定比例的明胶与nHA混合后,在一定条件下,采用冷冻干燥法可制备出具有良好细胞相容性、较高孔隙率、适宜孔径大小的三维连通多孔结构的仿生支架材料,类似人松质骨,有望成为新型骨组织工程支架材料。

参考文献

1. 吴苑,席咏梅,刘玉侃,等. 纳米羟基磷灰石颗粒对成骨前体细胞的增殖和分化影响[J]. 浙江大学学报:理学版, 2008, 35(6): 664-667.
WU Yuan, XI Yongmei, LIU Yukan, et al. Effect of hydroxyapatite nanocrystals on proliferation and differentiation of preosteoblasts[J]. Journal of Zhejiang University. Science Edition, 2008, 35(6): 664-667.
2. 富建明,苗波,贾刘合,等. 纳米羟基磷灰石修复兔颌骨缺损的骨密度分析[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(12): 2387-2390.
FU Jianming, MIAO Bo, JIA Liuhe, et al. Nano-hydroxyapatite for repair of rabbit jaw bone defect bone mineral density analysis[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2009, 13(12): 2387-2390.
3. Zhu W, Xiao J, Wang D, et al. Experimental study of nano-HA artificial bone with different pore sizes for repairing the radial defect[J]. Int Orthop, 2009, 33(2): 567-571.
4. Huang J, Best SM, Bonfield W, et al. In vitro assessment of the biological response to nano-sized hydroxyapatite[J]. J Mater Sci Mater Med, 2004, 15(4): 441-445.

5. 李颖华, 曹丽云, 黄剑锋, 等. 生物医用纳米羟基磷灰石的性质及其制备[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(41): 8143-8146.
LI Yinghua, CAO Liyun, HUANG Jianfeng, et al. Characteristics and preparation of nanometer hydroxyapatite in medical science[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008, 12(41): 8143-8146.
6. Kikuchi M, Itoh S, Ichinose S, et al. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo[J]. Biomaterials, 2001, 22(13): 1705-1711.
7. Thein-Han WW, Misra RD. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering[J]. Acta Biomater, 2009, 5(4): 1182-1197.
8. 魏丽, 李德超, 王静, 等. 聚乳酸-壳聚糖纤维/羟基磷灰石-硅酸钙复合支架材料的细胞相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(8): 1397-1401.
WEI Li, LI Dechao, WANG Jing, et al. Compatibility of osteoblasts on the polylactic acid-chitosan fiber/hydroxyapatite-calcium silicate composite scaffold material[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010, 14(8): 1397-1401.
9. 裴莹, 郑学晶, 汤克勇. 胶原及明胶基天然高分子复合材料研究进展[J]. 高分子通报, 2010(2): 58-68.
PEI Ying, ZHENG Xuejing, TANG Keyong. Natural polymer composites with collagen and gelatin as the matrices: A review[J]. Polymer Bulletin, 2010(2): 58-68.
10. Chang MC, Douglas WH, Tanaka J. Organic-inorganic interaction and the growth mechanism of hydroxyapatite crystals in gelatin matrices between 37 and 80 degrees C[J]. J Mater Sci Mater Med, 2006, 17(4): 387-396.
11. Azami M, Samadikuchaksaraei A, Poursamar SA. Synthesis and characterization of a laminated hydroxyapatite/gelatin nanocomposite scaffold with controlled pore structure for bone tissue engineering[J]. Int J Artif Organs, 2010, 33(2): 86-95.
12. Zhang Y, Zhang M. Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering[J]. J Biomed Mater Res, 2001, 55(3): 304-312.
13. 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 2004.
SITU Zhenqiang, WU Junzheng. Cell culture[M]. Xi'an: World Publishing Corporation, 2004.
14. 明敏, 吴小涛, 王运涛, 等. 经表面修饰的 β -TCP对BMSCs细胞增殖及分化作用的研究[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2009, 6(2): 10-14.
MING Min, WU Xiaotao, WANG Yuntao, et al. Surface modified β -tricalcium phosphate ceramic on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells[J]. Orthopaedic Biomechanics Materials and Clinical Study, 2009, 6(2): 10-14.
15. Koëter S, Tigchelaar SJ, Farla P, et al. Coralline hydroxyapatite is a suitable bone graft substitute in an intra-articular goat defect model[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009, 90(1): 116-122.
16. Murugan R, Ramakrishna S. Development of nanocomposites for bone grafting. Compos Sci Technol, 2005, 65(15/16): 2385-2406.
17. 陈高礼, 林海莉, 曹静, 等. 用于骨修复的明胶/HAP复合材料研究进展[J]. 淮北煤炭师范学院学报: 自然科学版, 2008, 29(2): 35-40.
CHEN Gaoli, LIN Haili, CAO Jing, et al. Development of gelatin/HAP composite materials used in the field of bone repair[J]. Journal of Huaibei Coal Industry Teachers College. Natural Science Edition, 2008, 29(2): 35-40.
18. Kim HW, Knowles JC, Kim HE. Porous scaffolds of gelatin-hydroxyapatite nanocomposites obtained by biomimetic approach: characterization and antibiotic drug release[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005, 74(2): 686-698.
19. Puppi D, Chiellini F, Piras AM, et al. Polymeric materials for bone and cartilage repair[J]. Prog Polym Sci, 2010, 35(4): 403-440.
20. Leong KF, Cheah CM, Chua CK. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs[J]. Biomaterials, 2003, 24(13): 2363-2378.
21. Hing KA, Best SM, Bonfield W. Characterization of porous hydroxyapatite[J]. J Mater Sci Mater Med, 1999, 10(3): 135-145.
22. Lu JX, Flautre B, Anselme K, et al. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo[J]. J Mater Sci Mater Med, 1999, 10(2): 111-120.
23. Shors EC. Coralline bone graft substitutes[J]. Orthop Clin North Am, 1999, 30(4): 599-613.
24. 严宁, 张汉东, 周磊, 等. Y500R可吸收珊瑚羟基磷灰石人工骨不完全热液置换反应前后结构的扫描电镜分析[J]. 实用医学杂志, 2006, 22(18): 2086-2088.
YAN Ning, ZHANG Handong, ZHOU Lei, et al. Scanning electron microscope analysis of structure of absorbable coral hydroxyapatite-produced by incomplete hydrothermal replacement reaction [J]. The Journal of Practical Medicine, 2006, 22(18): 2086-2088.
25. Ye CP, Yamaguchi T, Chattopadhyay N, et al. Extracellular calcium-sensing-receptor (CaR)-mediated opening of an outward K^+ channel in murine MC3T3-E1 osteoblastic cells: evidence for expression of a functional CaR[J]. Bone, 2000, 27(1): 21-27.
26. Siebers MC, ter Brugge PJ, Walboomers XF, et al. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review[J]. Biomaterials, 2005, 26(2): 137-146.
27. 赵峰, 尹玉姬, 姚康德, 等. 壳聚糖-明胶网络/羟基磷灰石复合材料支架的研究——成骨细胞培养[J]. 中国修复重建外科杂志, 2002, 16(2): 130-133.
ZHAO Feng, YIN Yuji, YAO Kangde, et al. Tissue engineering study

- on chitosan-gelatin/hydroxyapatite composite scaffolds-osteoblasts culture[J]. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery, 2002, 16(2): 130-133.
28. Chang MC, Douglas WH. Cross-linkage of hydroxyapatite/gelatin nanocomposite using imide-based zero-length cross-linker[J]. J Mater Sci Mater Med, 2007, 18(10): 2045-2051.
29. Lin FH, Yao CH, Sun JS, et al. Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyde cross-linked gelatin[J]. Biomaterials, 1998, 19(10): 905-917.
30. Liu HC, Yao CH, Sun JS, et al. Osteogenic evaluation of glutaraldehyde crosslinked gelatin composite with fetal rat calvarial culture model[J]. Artif Organs, 2001, 25(8): 644-654.
31. 蒋挺大. 胶原与胶原蛋白[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006. JIANG Tingda. Collagen and collagen proteins[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006.
32. Wang M, Li Y, Wu J, et al. In vitro and in vivo study to the biocompatibility and biodegradation of hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol)/gelatin composite[J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 85(2): 418-426.

(本文编辑 陈丽文)

本文引用: 李斯日古楞, 胡晓文. 纳米羟基磷灰石/明胶仿生复合材料的制备及其细胞相容性[J]. 中南大学学报: 医学版, 2014, 39(9): 949-958. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.09.015

Cite this article as: LI Siriguleng, HU Xiaowen. Biomimetic nanohydroxyapatite/gelatin composite material preparation and in vitro study[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2014, 39(9): 949-958. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.09.015