

聚己内酯-壳聚糖磷酸钙骨水泥复合骨组织工程支架的制备及细胞毒性研究

福建省福州市第二医院（福州 350007） 吴学军¹ 冯尔宥²

【摘要】 目的 以磷酸钙骨水泥（CPC）为基体，聚己内酯-壳聚糖（PCL-CS）网络结构为增强有机物，利用 CPC 的自固化及二次冻干技术制备一种复合骨组织工程支架，并对其细胞毒性进行考察。**方法** 采用二次冻干技术制备聚己内酯-壳聚糖磷酸钙骨水泥，分别采用场发射扫描电镜带能谱仪、孔径分布分析仪、比重瓶法对其表面微观形貌、孔径大小及孔隙率进行表征。将 PCL-CS/CPC 和 CPC 分别设为实验组和对照组，进行细胞毒性试验，用 MTT 法测定体外细胞活力；通过细胞计数板计数法测定细胞黏附率。**结果** PCL-CS/CPC 孔径小，孔隙率高，其对体外细胞的毒性评价合格；在共培养的第 1、3、5、7 d，PCL-CS/CPC 复合支架较 CPC 支架的 BMSCS 增殖活力更高（ $P < 0.05$ ），黏附率差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。**结论** PCL-CS/CPC 复合骨组织工程支架成功制备，相较于传统的 CPC 骨架，其在细胞活力、促进细胞增殖及黏附上更具优势。

【关键词】聚己内酯-壳聚糖/磷酸钙；骨水泥；骨组织工程支架；细胞毒性

【中图分类号】R318 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1002-2600(2018)06-0126-03

骨组织的修复与替代材料是生物医学材料的重要组成部分，支架材料不仅对细胞、组织起支持及物理连接作用，而且还与细胞各种功能活动的调节有关。磷酸钙骨水泥（CPC）作为一种新型自固化

基金项目：福州市卫计系统科技计划项目（2017-S-wq4）；福州市科技计划项目（2016-S-123-7）

1 手足显微外科；2 关节外科，通信作者，Email: wuxuejun_fj@126.com

型人工骨替代材料^[1], 相对于传统的陶瓷型羟基磷灰石 (HA) 材料, 其具有降解缓慢、制备简便、可任意塑形等优点, 目前已广泛应用于临床修复骨缺损、牙科、整形外科和脑外科方面, 但其存在脆性大, 弹性模量、韧性等机械性能不高等缺点, 因此需要研究性能更好的骨组织修复与替代材料。由于单一支架材料存在各种缺点, 不能满足骨组织工程支架材料的要求, 所以目前研究支架材料的重心主要集中在对复合材料的研究, 比如壳聚糖 (CS) / 聚乳酸、壳聚糖/羟基磷灰石、聚乳酸/羟基磷灰石等复合材料。

本研究以 CPC 为基体, 聚己内酯-壳聚糖 (PCL-CS) 网络结构为增强有机物, 利用 CPC 的自固化及二次冻干技术, 制备并表征具有较好的力学性能、良好的微结构的仿生网络结构复合多孔支架。通过观察 PCL-CS/CPC 多孔复合支架的形态、孔径大小、孔隙率等, 以及与 CPC 进行细胞毒性试验对比, 评价 PCL-CS/CPC 多孔复合支架的生物安全性。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器: PCL (深圳市光华伟业实业有限公司); CS、CPC (青岛药物研究所), 噻唑蓝 (MTT) 试剂盒 (美国 Sigma 公司), DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司), 胎牛血清 (天津 TBD 公司), 新西兰兔 (福建医科大学实验动物中心), 深温冷冻粉碎机 (菏泽市华科低温工程装备有限公司), 场发射扫描电镜 (日本 JEOL 公司), 多功能酶标仪 (美国宝特公司), 流式细胞仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 方法:

1.2.1 PCL-CS/CPC 复合支架的制备: 将液氮、PCL 颗粒加入深温冷冻粉碎机中, 粉碎 PCL 颗粒, 然后将 PCL 粉末均匀平铺于选择性激光烧结机器加工舱的烧结平台上进行烧结。精确称量磷酸三钙 (TCP), 加入去离子水, 搅拌 30 min 后超声波处理。在处理后的乳液状混合物中按 1:1 加入 CS 和 PCL, 维持有机相浓度在 2.7%~6.8% 之间, 加入适量乙酸。将混合物置于 40 °C 水浴中搅拌, 使有机物充分溶解, 加入戊二醛溶液后 4 °C 冰箱冷藏 3 h, 预冷冻 8 h, 冻干 30 h 后加入含 0.5% NaOH 的乙醇溶液搅拌均匀, 加入硼氢化钠溶液转变混合液中的残留醛基, 置于冻干机中进行第 2 次冻干后即可得 PCL-CS/CPC 复合支架。

1.2.2 PCL-CS/CPC 复合支架的表征: 通过场发

射扫描电镜带能谱仪观察所制备支架的平均孔径、表面微观形貌; 使用全自动比表面积和孔径分布分析仪检测所制备支架的孔容及比表面积; 利用比重瓶法测定支架的孔隙率。

1.2.3 兔骨髓间充质干细胞 (bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs) 的制备: 对新西兰大白兔行全身静脉麻醉, 取其骨髓离心, 反复吹打成单细胞悬液, 接种于含 10% 牛血清蛋白 (FBS) 的低糖 DMEM 培养液中, 放置在细胞培养箱中培养。分别在培养的 48、72 h 后进行一次半换液以及全换液, 之后每隔 2 d 进行一次换液。用胰蛋白酶消化生长至 80%~85% 的细胞, 进行传代培养。

1.2.4 PCL-CS/CPC 复合支架对体外细胞的毒性效果实验: 实验分为 2 组, 实验组为 PCL-CS/CPC 支架细胞培养基浸提液, 对照组为放入同样大小的 CPC 细胞培养基浸提液, 照培养基与支架体积比为 1 mL/cm³, 于 37 °C 培养箱中培养, 取第 3 代 BMSCs, 以细胞浓度为 1×10⁸/L 每孔 100 μL 接种到 96 孔板中, 分别于 1、2、3 d 随机取一孔板, 采用 MTT 法及酶联免疫检测仪测定 450 nm 波长吸光度 (A) 值, 测定细胞活力。其中细胞毒性相对增值率 (RGR) = 各浓度实验组 A 值/对照组 A 值 × 100%, RGR (×10⁻²) ≥ 100 时为合格。

1.2.5 PCL-CS/CPC 复合支架对体外细胞增殖活力、黏附的影响: 取第 3 代 BMSCs, 每孔接种细胞浓度为 6×10⁷/L 的 100 μL 于 96 孔板中, 实验组和对照组分别加入同等质量的 PCL-CS/CPC 及 CPC 支架材料, 并在细胞箱中培养。分别在 1、3、5、7 d 随机选取一孔板, 用 MTT 法测定各孔 A 值, 细胞活性 = (实验组 A 值 - 背景 A 值) / (对照组 A 值 - 背景 A 值) × 100%, 细胞黏附率 = (接种细胞数 - 未附着细胞数) / 接种细胞数 × 100%。

1.3 统计学分析: 用 SPSS 19.0 统计软件对结果进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差表示, 两组间的比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 表示结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 PCL-CS/CPC 多孔复合支架的形态特征: PCL-CS/CPC 多孔复合支架的表征结果见表 1。

2.2 PCL-CS/CPC 复合支架对体外细胞的毒性实验: 通过测得实验前 3 天的实验组及阴性对照组 A 值, 根据 A 值计算出 RGR, 并与材料毒性等级 (CTG) 进行对比。结果显示前 3 天 PCL-CS/CPC

支架材料对 BMSCs 无细胞毒性, 见表 2。

表 1 PCL-CS/CPC 多孔复合支架的表征

项目	孔容/ (cm ³ /g)	平均孔径/ μm	孔隙率/ %	比表面积/ (m ² /g)
数值	26.44	367.42	91.84	63.2

表 2 PCL-CS/CPC 多孔复合支架对 BMSCs 的细胞毒性 (%)

时间	RGR	CTG	评价结果
1 d	115.44	0	合格
2 d	139.27	0	合格
3 d	141.86	0	合格

2.3 PCL-CS/CPC 多孔复合支架对支架内细胞增殖活力的影响: 细胞在支架上的数量随着共培养天数的增加而明显增加, 同时细胞生长状态良好。实验组与对照组在第 1、3、5、7 d 的增殖活力比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 PCL-CS/CPC 多孔复合支架对 BMSCs 增殖活力的影响 (A 值)

时间	对照组	实验组
1 d	0.064±0.009	0.121±0.017*
3 d	0.176±0.010	0.225±0.013*
5 d	0.321±0.025	0.434±0.031*
7 d	0.764±0.053	0.559±0.046*

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

2.4 PCL-CS/CPC 复合支架对支架内细胞黏附的影响: 实验组与对照组细胞黏附率随着时间增加均增大, 两组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 4。

表 4 PCL-CS/CPC 多孔复合支架对 BMSCs 黏附的影响 (%)

时间	对照组	实验组
1 d	73.28±0.465	75.31±0.503
3 d	80.63±0.792	81.13±0.644
5 d	88.38±0.936	89.13±0.835
7 d	91.44±0.891	92.32±0.919

注: 与对照组比较, P 值均 > 0.05 。

3 讨论

骨组织工程是组织工程的一个重要分支, 具有量大面广的特点。目前临床上使用的各种人工骨替代材料都有各自的优缺点, 并且都是基于“爬行替代”的机制实现新骨的生长, 存在成骨量有限, 难以实现缺陷的修复和再生等诸多缺点, 仍未能有效解决大范围骨缺陷问题。骨组织工程是用骨生长因

子、骨组织细胞、支架材料做成三维复合体, 为解决这一难题提供了希望。骨组织工程通过以“诱导成骨”取代“爬行替代”实现骨的修复和再生^[2-3], 其中细胞外基质支架材料的选择是其核心技术。

目前对于支架材料的研究基本围绕无机非金属材料、合成高分子材料、天然生物材料来展开。无机非金属材料有 HA、CPC 等, CPC 因为具有操作方便、可降解性、可塑性强等优点被认为是骨缺损重建材料的一个突破, 但其存在着韧性、弹性模量等机械性能不高, 脆性大等缺点, 因此需要进一步研究性能更好的材料。合成高分子材料主要有已被美国食品与药物管理局 (FDA) 批准使用的 PCL、聚乳酸、聚乙醇酸等^[4-5]。这些材料的突出优点是提供了可控植入细胞的环境, 但存在缺乏细胞识别信号, 细胞亲和性差等缺点, 需对其进行进一步的改善。天然生物材料如 CS、胶原、明胶 (Gel) 等, 虽然有助于细胞黏附、增殖和分化, 但存在成型性能差等不足, 也需要进一步加工处理。

本研究通过以 CPC 为基体, PCL-CS 网络结构为增强有机物, 利用 CPC 的自固化及二次冻干技术, 制备并表征具有较好的力学性能、良好的微结构的仿生网络结构复合多孔支架。结果表明, PCL-CS/CPC 支架孔径小、孔隙率高, 其对体外细胞的毒性评价合格, BMSCs 增殖活力较 CPC 支架更高。但本实验只是体外细胞实验, 对于 PCL-CS/CPC 是否在动物体内仍有很好的生物相容性还未知, 需要进一步在动物模型上进行实验。

参考文献

- [1] Li X, Zhang S J, Zhang X, et al. Biocompatibility and physico-chemical characteristics of poly (ϵ -caprolactone) /poly (lactide-co-glycolide) /nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering [J]. Mater Des, 2017, 114: 149-160.
- [2] 刘涛, 李健, 卢康, 等. 新型大孔隙磷酸钙骨水泥作为骨组织工程支架的相关研究 [J]. 国际生物医学工程杂志, 2012, 35 (2): 116-120.
- [3] 马新芳, 张静莹. 骨组织工程支架材料的研究现状与应用前景 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18 (30): 4895-4899.
- [4] Nguyen T B, Lee B T. A combination of biphasic calcium phosphate scaffold with hyaluronic acid-gelatin hydrogel as a new tool for bone regeneration [J]. Tissue Eng Part A, 2014, 20 (13-14): 1993-2004.
- [5] Coelho P G, Hollister S J, Flanagan C L, et al. Bioresorbable scaffolds for bone tissue engineering: optimal design, fabrication, mechanical testing and scale-size effects analysis [J]. Medical Eng Phys, 2015, 37 (3): 287-296.