

亲水改性聚乳酸基可降解骨支架的制备及性能研究

厦门大学附属福州第二医院骨科研究所 (福州 350007) 伍林招 张 韬¹ 刘 岩 刘楠楠

【摘要】 目的 利用 3-氨基-1,2-丙二醇对聚乳酸进行亲水改性,制备具有多孔形貌的亲水性仿生骨组织工程支架。**方法** 利用氨解反应对聚乳酸进行亲水改性,利用热致相分离法结合冷冻干燥法制备亲水性多孔骨组织工程支架,研究不同凝胶化时间对多孔支架的微观形貌及亲水性能的影响。**结果** SEM 图显示支架呈多孔状结构,支架的亲水性能增强。**结论** 本研究开发的亲水性聚乳酸基多孔海绵状结构的骨组织工程支架适合于细胞生长,有利于细胞黏附,更有利于骨组织修复,有望应用于临床。

【关键词】 骨组织工程; 骨组织修复; 支架

【中国分类号】 R68 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2021)03-0106-03

Preparation and properties of hydrophilic modified polylactide based degradable bone scaffolds WU Linzhao, ZHANG Tao, LIU Yan, LIU Nannan. Department of Orthopedics Institute, the Affiliated Fuzhou Municipal Second Hospital, Xiamen University, Fuzhou, Fujian 350007, China

【Abstract】 Objective To prepare a hydrophilic bionic bone tissue engineering scaffold with porous morphology by hydrophilic modification of polylactic acid with 3-amino-1,2-propanediol. **Methods** The hydrophilic porous bone tissue engineering scaffolds were prepared by thermally induced phase separation and freeze-drying method. The effects of different gelation time on the microstructure and hydrophilicity of the scaffolds were studied. **Results** SEM showed that the scaffold had a porous structure and its hydrophilicity was enhanced. **Conclusion** The hydrophilic polylactide based spongy structure scaffold developed in this study is suitable for cell growth, conducive to cell adhesion and more conducive to bone tissue repair and is expected to be used in clinic.

【Key words】 bone tissue engineering; bone repair; scaffold

组织损伤严重危害健康,其修复材料需求巨大^[1]。传统的骨修复材料存在诸多缺点,自体骨移植作为骨修复的金标准,存在供区有限,挖肉补疮的问题;异体骨移植存在着病原体传播的危险以及免疫排斥反应的问题^[2-3]。用组织工程方法构建的生物活性材料的应用和开发可以避免上述问题^[4]。聚乳酸是一种良好的组织工程材料,但存在亲水性差的问题,不利于细胞黏附^[5]。本研究利用氨解反应在聚乳酸分子链中引入亲水性的羟基和氨基,制备仿生多孔亲水性聚乳酸基骨组织工程支架。

1 材料与方法

1.1 试剂与设备: 3-氨基-1,2-丙二醇 (AR)、1,4-二氧六环 (AR), 购买自国药集团。聚乳酸 (PLLA, 分子量 2×10^5), 购买自江苏优利科技有限公司。DW-FL90 型超低温冰箱购买自中科美菱低温科技有限责任公司。Alpha 1-2 LDplus 冷冻干燥机购买自德国 Christ 公司。SHP 系列低温生化培养箱购买自上海精宏实验设备有限公司。DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器购买自巩义市予华仪器责任有限公司。

1.2 方法:

1.2.1 聚乳酸的溶解和改性: 将质量比为 7% 的聚乳酸溶

解于 83.7% 的 1,4-二氧六环溶液中,在 DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器中 60 °C 溶解 1 h,溶解后溶液清澈透明无气泡,然后加入总质量比 9.3% 的浓度为 1% 的 3-氨基-1,2-丙二醇水溶液对聚乳酸进行改性,继续密闭反应 30 min,制备 3-氨基-1,2-丙二醇改性的聚乳酸基前液。

1.2.2 多孔骨组织工程支架的制备: 将制备好的改性聚乳酸基前液倒入 25 mL 烧杯模板中置于超低温冰箱中 -15 °C 凝胶化 0.25、0.5、1、2、4、8 h,置于 4 °C 冰箱中冷水抽提 7 d,然后置于冷冻干燥机中干燥。观察凝胶化时间对支架微观形貌及其性能的影响。

1.3 测试骨组织工程支架的性能的方法: 扫描电镜 (SEM) 可用于观察样品的表面形貌,支架用导电胶粘在铜台上,表面喷金后用日本 JEOL 公司生产的 JEOL7500F 发射扫描电子显微镜进行分析,加速电压为 5 kV,工作电流为 20 μ A。上海梭伦信息科技有限公司 SL200B 型静态水接触角测量仪用于测量骨组织工程支架的水接触角,将支架压片后置于水接触角仪上调节相机和载物台高度用水滴法测量支架的水接触角。万能材料试验机用于测量支架的抗压性能,压头下降速度 0.5 mm/s,使用的是德国 Instron 公司的 Instron Co 5567。

基金项目: 2019 年福州市科技计划项目 (2019-SZ-13); 2020 年福州市卫生健康科技创新平台建设项目 (2020-S-wp3); 福建省级临床重点专科建设项目

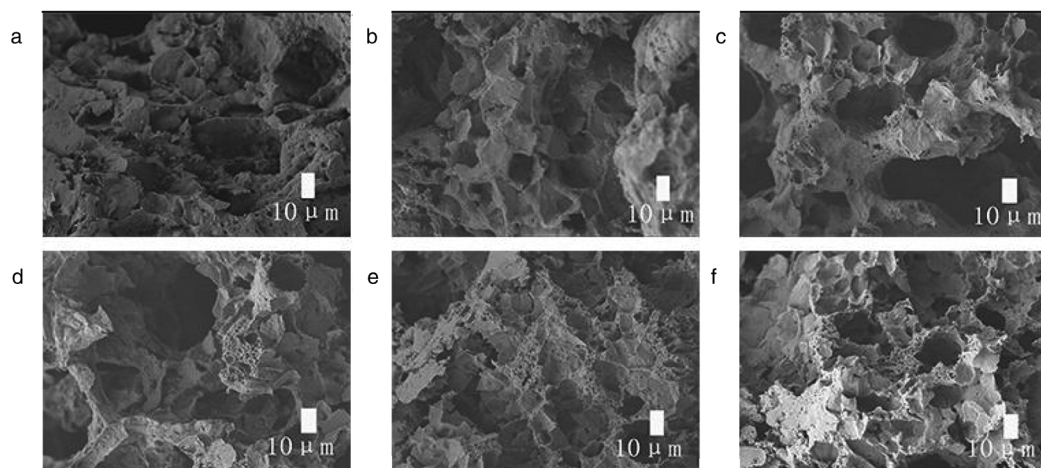
1 通信作者

2 结果

2.1 骨组织工程支架的微观相貌分析：经不同凝胶化时间制备的亲水性聚乳酸基骨组织工程支架的微观形貌 SEM 图，随着凝胶化时间的增长，支架的孔隙结构更加复杂，由不规则固壁蜂窝状结构变成多孔海绵状结构。凝胶化 2 h 以上，支架的孔壁由实心结构变成海绵结构，凝胶化 4 h 和 8 h 支架上大小孔相互贯通，支架大体观出现类似于细胞外基质的多孔海绵状结构，与松质骨的微观形貌极为相似。这主要是因为凝胶化过程是一个动态过程，凝胶化前期主要是形成大孔状结构，随着凝胶化时间的延长，凝胶化后期，在支

架的大孔壁上支架的小孔结构开始显现，并且呈微孔纤维化发展，这一过程稳定后，支架的微观形貌就开始稳定下来。见图 1。

2.2 亲水性能分析：纯聚乳酸是一种疏水性的材料，疏水性表面不利于细胞的黏附，经 3-氨基-1,2-丙二醇改性后的聚乳酸支架是一种亲水性的材料，水接触角为 70° 左右，说明 3-氨基-1,2-丙二醇与聚乳酸发生了氨解反应，在聚乳酸的分子链中引入了亲水性的官能团，从而增强了聚乳酸基材料的亲水性能。凝胶化时间对支架的水接触角影响不大，材料的亲疏水性能主要受材料本身的性质决定。见图 2。



注：图 a、b、c、d、e 和 f 分别表示凝胶化 0.25、0.5、1、2、4、8 h。

图 1 聚乳酸基骨组织工程支架的微观形貌扫描电镜图

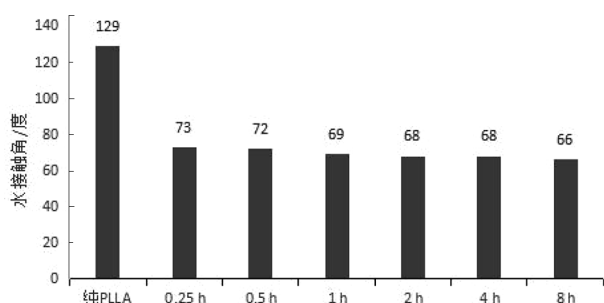


图 2 聚乳酸基骨组织工程支架的水接触角柱状图

2.3 抗压性能和孔隙率分析：经 3-氨基-1,2-丙二醇改性后的聚乳酸基支架的弹性模量达到 20.0 MPa，机械性能良好，满足骨组织工程对支架力学性能的要求。支架的孔隙率在 65% 以上，支架的孔隙相互贯通，有利于营养物质的传输和血管的长入。凝胶化时间超过 2 h 的亲水性聚乳酸基支架呈大小孔相互贯通的多孔海绵状结构。

3 讨论

本文利用利用 3-氨基-1,2-丙二醇对聚乳酸进行亲水改性，在聚乳酸溶液中加入氨解剂 3-氨基-1,2-丙二醇发生氨解反应从而在聚乳酸分子链中引入亲水性的羟基和氨基，增强聚乳酸基材料的亲水性能，从而增强材料表面对细胞的黏附，有利于细胞的生长繁殖。由于聚乳酸材料本身是一种经

FDA 批准的具有生物安全性的可降解材料，因此制备的亲水改性聚乳酸基材料也是可降解的。实验过程中使用热致相分离法制备多孔海绵状的仿生骨组织工程支架，探讨了凝胶化时间对支架微观形貌的影响，随着凝胶化时间的增长，支架的孔隙结构更加复杂，由不规则固壁蜂窝状结构变成类似于细胞外基质的多孔海绵状结构，类似于松质骨的微观形貌。凝胶化过程是一个动态过程，凝胶化前期形成大孔状结构，随着凝胶化时间的延长，凝胶化后期，在支架的大孔壁上出现小孔结构，并向微孔纤维化方向发展，并趋于稳定。聚乳酸的疏水性表面不利于细胞的粘附，经 3-氨基-1,2-丙二醇改性后的聚乳酸基支架水接触角为 70° 左右，更有利于细胞的粘附。水接触角的改变说明 3-氨基-1,2-丙二醇对聚乳酸具有改性作用，其机理主要是在聚乳酸的分子链中引入亲水性的官能团，从而增强支架的亲水性能。凝胶化时间对支架亲水性能影响不大，材料的亲疏水性能主要受材料本身性质决定。支架机械性能良好，满足骨组织工程对支架力学性能的要求。支架的孔隙率在 65% 以上，孔隙相互贯通，有利于血管的长入和营养物质的传输。

综上所述，本研究制备了一种孔隙相互贯通的多孔海绵状的亲水性仿生骨组织工程支架，相比疏水性的聚乳酸支架，该支架将更有利于细胞粘附，更有利于骨组织修复。4 h 以上的凝胶化时间更容易形成多孔海绵状的微观结构，后续研究将进一步探讨这种多孔海绵状的结构对血管的长入、

细胞的生长、骨损伤修复的作用；多孔海绵状结构本身也是良好的药物和生长因子的载体，后续将研究支架对药物和生长因子的缓释作用，开发一系列功能性组织工程支架运用于临床。

参考文献

- [1] Hoang N H, Lim C, Sim T, et al. Characterization of a triblock copolymer, poly (ethylene glycol)-polylactide-poly (ethylene glycol) with different structures for anticancer drug delivery applications [J]. Polymer Bulletin, 2017, 74 (5): 1595-1609.
- [2] Chen S Y, He Z H, Xu G J, et al. Fabrication and characterization of modified nanofibrous poly (L-lactic acid) scaffolds by thermally induced phase separation technique and aminolysis for promoting cytocompatibility [J]. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2016, 27 (10): 1058-1068.
- [3] Wang J J, Zhou Z M, Zhang Z B, et al. Biomimetic synthesis of platelet-shaped hydroxyapatite mesocrystals in a collagen mimetic peptide-PEG hybrid hydrogel [J]. Materials Letters, 2015, 159 (15): 150-153.
- [4] Mohammadi M, Li Y, Abebe D H, et al. Folate receptor targeted three-layered micelles and hydrogels for gene delivery to activated macrophages [J]. Journal of Controlled Release, 2016, 244 (1): 269-279.
- [5] You R, Xu Y M, Liu Y, et al. Comparison of the in vitro and in vivo degradations of silk fibroin Scaffolds from mulberry and non-mulberry silkworms [J]. Biomedical Materials, 2015, 10 (1): 15003.

• 基础研究 •

NLRP3 在小鼠氧诱导视网膜新生血管中的作用

中山大学肿瘤防治中心防癌体检健康管理中心 华南肿瘤学国家重点实验室 (广州 510060) 孙玉莹 黄春雨¹

【摘要】目的 本研究旨在小鼠氧诱导视网膜新生血管病变模型中探讨 NLRP3-VEGF 信号通路在视网膜新生血管形成中的作用。**方法** 用 NLRP3 基因敲除 (NLRP3^{-/-}) 小鼠及对照的同种系 C57BL/6J 小鼠建立氧诱导视网膜新生血管病变模型 (OIR)。分别在 P12、P17、P21 天时取材，通过视网膜荧光灌注铺片，观察新生血管情况。选取建立 OIR 模型的正常 C57BL/6J 小鼠在 P12、P17、P21 天时取材，进行视网膜荧光灌注铺片，与 OIR 模型小鼠进行对比分析，验证 OIR 模型建立成功。两组 OIR 小鼠 P17 时取材，通过 RT-PCR 检测 VEGF 的 RNA 水平变化，评价 NLRP3 缺失对 VEGF 表达的调控作用。结果 视网膜荧光灌注铺片发现，在正常 C57BL/6J 未建立 OIR 模型时，视网膜未出现无灌注区和新生血管，说明 OIR 模型建立成功。在 P12、P17 和 P21，与 C57BL/6J 的 OIR 小鼠相比，在 NLRP3^{-/-} OIR 小鼠中，新生血管的范围明显缩小，无灌注区减少，正常血管相对增多。P17 时，与正常 OIR 小鼠相比，NLRP3^{-/-} OIR 的 VEGF 表达水平显著下降。结论 通过对 OIR 小鼠视网膜新生血管病变进行研究，发现 NLRP3 参与调控 VEGF 的表达，影响视网膜新生血管的形成。本研究提出一条新的调控视网膜新生血管形成的通路，为视网膜血管损伤及新生血管形成的病理机制研究和治疗提供了新的思路和靶点。

【关键词】 NLRP3；视网膜新生血管；OIR 动物模型；NLRP3 基因敲除小鼠

【中图分类号】 R-332；R774.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2021)03-0108-05

Role of NLRP3 in oxygen-induced retinal neovascularization in mice SUN Yuying, HUANG Chunyu. Department of Cancer Prevention Sun Yat-Sen University Cancer Center, State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangzhou, Guangdong 510060, China

【Abstract】Objective To explore the role of NLRP3-VEGF signal pathway in retinal neovascularization in mice with oxygen-induced retinal neovascularization. **Methods** Oxygen-induced retinal neovascularization model (OIR) was established in NLRP3 knockout (NLRP3^{-/-}) mice and control homologous C57BL/6J mice. The samples were taken at P12, P17 and P21 days, and the neovascularization was observed by retinal fluorescence perfusion. The normal C57BL/6J mice that established the OIR model were selected and the samples were collected at P12, P17, and P21 days, and the retina was perfused with fluorescence. The OIR model was compared with the OIR model mice to verify the success of the establishment of the OIR model. The samples of the two groups of OIR mice were taken at P17, and the RNA level of VEGF was detected by RT-PCR to evaluate the regulation of NLRP3 deletion on VEGF expression. **Results** It was found that no perfusion area and neovascularization were found in the retina when the OIR model was not established in normal C57BL/6J, indicating that our OIR model was established successfully. Compared with OIR mice of C57BL/6J, the range of neovascularization in NLRP3^{-/-} OIR mice was significantly reduced, the area of no perfusion was reduced, and the number of normal blood vessels was relatively increased in P12, P17 and

1 中山大学肿瘤防治中心内镜中心 华南肿瘤学国家重点实验室，通信作者，E-mail: huangchy@sysucc.org.cn