

支架材料。本研究的实验内容分为 3 个部分进行：

一 高分子纳米材料的制备及表征

1 本实验以赖氨酸二异氰酸酯-甘油共聚物通过超临界抗溶剂结晶技术 (SAS) 成功制备出多孔高分子支架材料, 其平均孔径为 $100.0\sim 400.0\ \mu\text{m}$ ($276.0\pm 87.2\ \mu\text{m}$), 孔隙率为 75.6%。

2 通过一系列方法对高分子材料进行表征, 证实该高分子材料具有作为组织工程支架材料所需要的理化性能。

3 制备高分子支架材料的全过程均采用无毒原料和无毒工艺, 有机溶剂基本去除, 获得的高分子材料对机体无毒, 符合“绿色化学”观点。

二 高分子纳米材料的生物相容性评价

通过对高分子支架材料 (LDIG) 进行急性毒性实验、溶血反应、热原实验和肌肉内植入实验, 结果表明, 该材料无毒性, 无热原性、不引起溶血反应, 植入后局部组织反应小, 生物相容性良好。

三 高分子纳米材料与骨髓源成骨细胞的生物相容性研究

大鼠成骨细胞能在多孔高分子支架材料表面正常粘附、爬行、增殖并分泌细胞外基质, 说明该材料具有良好的骨细胞相容性。

关键词: 组织工程, 支架材料, 高分子, 生物降解, 生物相容性

ABSTRACT

Tissue engineering emerge as the times require in 1980s of the 20th century. One of its characteristics is that seed cells are planted on scaffolds materials and the tissue engineering tissue is planted into the bone defect area once it form. Nowadays, scaffolds research is the hotspot in tissue engineering field. An ideal tissue engineering material should meet the demands as follows: (1) right biocompatibility; (2) right biodegradability or resorbability; (3) its degradation speed corresponds with the bone growth capability; (4) porous fabrication with aperture from 200 μm to 400 μm ; (5) very strong penetration power; (6) exact lacuna size for growth of seed cells; (7) mechanical strength providing micro-stress circumstance for cells; etc.

Scaffold materials in existence involve in natural and synthetic materials. The scaffold materials which received considerable investigation include collagen, PLA, PGA, PMMA, HA, TCP and coral. Synthetic macromolecule materials have advantages such as controllable capability, no immunogenicity and right biocompatibility. PLA, PGA and PLGA are the biodegradable materials applied most broadly. Their disadvantages include as following: low mechanical strength, acid degradation outcomes unfavorable to cells growth, not corresponding biodegradaton speed with bone growth, toxic organic

solvents remained.

In this study, the obtained macromolecule material—LDIG polymer was purified and nanometerized by means of SAS. A macromolecule scaffold material with certain aperture and lacuna rate was acquired. The experimental study was divided into 3 portions as follows:

1. Preparation and characteristics of polymeric scaffolds nano-material

(1) The polymeric scaffolds material was measured by scanning electron microscope as 100.0~400.0 μm (average $276.0 \pm 87.2 \mu\text{m}$), 75.6%, respectively.

(2) The macromolecule material was revealed as a potential tissue engineering material by a series of characterization in physical capability.

(3) The obtained macromolecule material was pure and nontoxic due to innocuous raw material and process which accorded with the viewpoint of 'green chemistry' and elimination of organic solvent in the course of preparation.

2. Biological evaluation of macromolecule nano-materials

According to the correlative regulations of Technical Evaluation Standards of Biomedical Materials and Medical Instruments promulgated by National Ministry of Health, the experiments of acute toxicity, pyrogen, hemolysis and implantation into muscles were investigated to evaluate the biocompatibility of the polymer. The results of experiments on acute

toxicity,pyrogen,hemolysis,implantation into muscles met the regulatons mentioned above.

3. Biocompatibility of macromolecule nano-material and marrow osteoblast

(1) Mice osteoblasts sticked to the surface of the material and proliferated in the course of nature normally since they were seeded on the scaffolds.As the time of osteoblast culture extended,the density of cells on the macromolecule material scaffolds increased and osteoblasts secreted extracellular matrix.It was proved that the polymer material had favourable biocompatibility of osteoblasts and was an ideal material in bone tissue engineering.

KEY WORDS: tissue engineering, scaffold material, nanometer, polymer, biodegradation, biocompatibility

缩略词英汉对照表

缩写	英文全称	中文全称
ADA	Association of Dental Academy	国际牙科学会
ASTM	American Society of Materail Testing	美国材料实验学会
BD	bone defect	骨缺损
BMSC	bone marrow stromal cell	骨髓基质细胞
ddH ₂ O	double-distilled water	双蒸水
EBC	environmental benign chemistry	环境无害化学
FDA	Food and Drug Administration	美国食品与药品管理局
FDM	fused deposition modeling	熔融成型
GC	green chemistry	绿色化学
HA	hydroxyapatite	羟基磷灰石
HE	hematoxylin and eosin	苏木素-伊红
h	hour	小时
ISO	International Standardization Organization	国际标准化组织
LA	lactic acid	乳酸
LDI	lysine diisocyanate	赖氨酸二异氰酸酯
min	minute	分钟
m. w.	molecular weight	分子量
NBT	nitro-blue-terazolium	四唑氮蓝
NT	nano-technology	纳米技术
OB	osteoblast	成骨细胞
OD	optical density	光密度
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PDLA	poly-dextrogyr-lactic acid	聚右旋乳酸
PDLLA	poly-dextrogyr, levogyr-lactic acid	消旋聚乳酸
PGA	polyglycolic acid	聚乙醇酸
PHB	poly- β -hydroxybutyrate	聚 β -羟基丁酯
PLA	polylactic acid	聚乳酸
PLLA	poly-levogyr-lactic acid	聚左旋乳酸
PMMA	polymethylmethacrylate	聚甲基丙烯酸甲酯
PPF	propylene fumarate	聚反丁烯二酸酯
PU	polyurethane	聚氨酯

RESS	rapid expansion of supercritical solution	超临界流体快速膨胀技术
SAS	supercritical anti-solvent precipitation	超临界流体抗溶剂结晶
SCF	supercritical fluid	超临界流体
SCFE	supercritical fluid extraction	超临界流体萃取
SCFT	super critical fluid technology	超临界流体技术
SC/PL	solution casting/ particulate leaching	溶液浇铸/颗粒沥滤
SEM	scanning electron microscopy	扫描电镜
SE/SD	spontaneous emulsification/solvent diffusion	自乳化/溶剂扩散法
SO/ED	salting out/emulsification-difusion method	盐析/乳化-扩散法
SR-PLLA	self-reinforced poly-L-lactic acid	自增强聚左旋乳酸
TIPS	thermally induced phase separation	热致相分离技术
V/v	volume/volume	体积/体积
W/v	weight/volume	重量/体积

前言

20 世纪 80 年代,随着细胞生物学、分子生物学、生物化学等学科的发展和生物医学材料的开发与应用,出现了组织工程学(Tissue engineering),这门新学科为组织缺损修复提供了一种新的选择。其方法是将种子细胞种植于细胞支架材料上,形成组织工程复合材料,这是最理想的修复材料,它具有自体组织的优点,同时避免了供体有限和二次创伤等缺点。骨组织是由骨基质和细胞两大部分构成的复合物,从仿生出发,工程化骨组织替代物的设计常遵循以下原则:骨细胞+ECMs(细胞外基质)+支架+信号分子=骨替代物。其中支架材料是骨组织工程研究的重点。

90年代,人们对骨组织工程细胞支架材料做了大量研究,认为支架材料的骨传导性、生物相容性与生物降解性、孔隙大小与孔隙率、表面拓扑结构等因素对细胞的粘附与生长产生重要影响,并最终决定对骨缺损部位的修复效果,据此提出12条骨组织工程支架材料应具备的条件:(1)便于手术操作;(2)支架材料的吸收速率与骨生长速率相匹配;(3)可以塑形;(4)具有骨传导性或骨诱导性;(5)保证精确的力学性能;(6)促进骨质沉积;(7)促进骨生长;(8)可防止软组织向移植物-骨组织界面生长;(9)平均孔径在200~400 μm 之间;(10)对周围组织无不良影响;(11)消毒过程不影响支架材料的性能;(12)降解产物无毒。

现有支架材料包括天然和人工合成两类,研究较多且较理想的有胶原(collagen)、聚乳酸(poly-lactic acid,PLA)、聚羟基乙酸(polyglycolic acid,PGA)、聚甲基丙烯酸甲酯(polymethylmethacrylate,PMMA)、羟基磷灰石(HA)、磷酸三钙(tricalcium phosphate,TCP)、珊瑚(coral)等。其中合成聚合物具有性能可控、无免疫排斥反应以及生物相容性好等优点,从20世纪60年代中期就开始用作骨修复材料,PLA、PGA以及PLGA是目前应用最广的几种可降解性材料,其不足之处在于:机械强度不够,降解产物呈酸性不利于骨细胞生长,降解速度与成骨速度欠协调,植入局部无菌性炎症,残留溶剂对机体有毒,等等。

鉴于当前组织工程支架材料存在的不足点,人们一直设想利用现代高科技手段人工合成理想的支架材料,并进而制备出性能优异的仿生型人工骨。该研究已成为生物材料学、组织工程学及临床医学共同努力的目标,高分子技术为制备这种支架材料提供了可行的途径。从理论上讲,纳米聚合物材料较传统支架材料具有更精确的微细结构与更好的可控性,便于根据需要制备出符合仿生原理的组织工程支架,为骨细胞的生长繁殖提供三维空间和营养代谢环境。目前关于用纳米级聚合物作为组织工程材料的研究很少报道。

本研究选择赖氨酸二异氰酸酯-甘油共聚物，采用超临界抗溶剂结晶过程（SAS）等技术将高分子材料纯化，并获得具有一定孔径和孔隙率的高分子支架材料。聚合物制备过程符合国际上“绿色化学”的要求。本课题重点研究高分子材料支架的制备工艺、理化特性和生物相容性，旨在获得一种无毒、可以生物降解、具有生物活性的组织工程支架材料，为制造理想的骨组织工程复合材料并用于骨修复提供理论和实验依据。

第一部分 组织工程用高分子支架材料的制备与表征

引言

20世纪90年代以来,人们对组织工程细胞支架材料做了大量研究,认为支架材料的生物降解性与生物相容性、孔隙大小与孔隙率、表面拓扑结构等^[1]因素对细胞的粘附与生长产生重要影响,并最终决定对组织缺损部位的修复效果。

生物可降解支架材料的研制是组织工程研究中的重要内容之一,它可为细胞生长提供附着载体和生长空间,最终形成具有一定形态和功能的组织或器官。现有支架材料包括天然和人工合成两类,研究较多且较理想的有胶原(collagen)、聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)、聚羟基乙酸(polyglycolic acid, PGA)、聚甲基丙烯酸甲酯(polymethylmethacrylate, PMMA),等等^[2,3]。这些聚合物具有性能可控、无免疫排斥反应以及生物相容性好等优点,PLA、PGA以及PLGA是目前应用最广的几种可降解性材料,但真正用于组织工程的材料多为国外厂家生产,价格昂贵,购买困难。

本研究旨在利用卫生部纳米生物技术重点实验室研制的新一代高分子材料—赖氨酸二异氰酸酯-甘油共聚物(LDIG),通过加工成型制备组织工程用细胞支架材料,并加以表征分析,探索其作为组织工程支架的可行性。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料和仪器设备

1.1.1 材料和试剂

赖氨酸二异氰酸酯-甘油共聚物(LDIG)	卫生部纳米生物技术重点实验室
二氯甲烷	长沙汇虹化玻仪器试剂有限公司
氮气	中南大学湘雅医学院试剂中心
二氧化碳	中南大学化工学院
聚苯乙烯	上海振兴化学一厂
无水乙醇	中南大学湘雅医院试剂中心
氯仿	汕头光华化工厂

1.1.2 仪器设备

三颈圆底瓶、圆底烧瓶、量杯	长沙汇虹化玻仪器试剂有限公司
玻璃仪器气流烘干机	长沙汇虹化玻仪器试剂有限公司
RE-52 旋转蒸发器	上海青浦沪西仪器厂
DSC2910 热分析仪	中南大学分析测试中心
H-800 透射电镜	德国 Hettich 公司

超声粉碎仪	德国 Hettich 公司
JB90-D 型强力电动搅拌机	中国标本模型场制造
电热恒温真空干燥箱	上海市精慧仪表公司
电子天平	湖南湘仪医疗器械厂
600 型三用水箱	江苏金坛市富华仪器有限公司
WRS-1A 数字熔点仪	上海物理光学仪器厂
5DXFT-IR 红外光谱仪	美国 Nicolt 公司
乌氏粘度计	上海天平仪器厂
Dataphysics 15 表面接触角分析仪	德国
凝胶色谱仪	湖南师范大学化工研究院
JEOL JSM-5600LV 型扫描电子显微镜	湖南师范大学分析测试中心
生物力学试验机 (SHIMADZU AG-20KNG)	日本岛津试验机株式会社
超临界萃取与反应装置	北京新特科技发展公司

1.2 实验方法

1.2.1 高分子多孔支架材料的制备

采用卫生部纳米生物技术重点实验室提供的赖氨酸二异氰酸酯-甘油共聚物 (LDIG) 材料, 以 SC25-42 型 (容积 25×2 L, 压力 42 MPa) 超临界流体装置制备。操作流程为 (图 1-1): 实验前调好高压釜水浴、冷凝槽, 启动高压柱塞泵, 将 CO_2 输入高压釜中, 调节压力为 8.0~12.0 Mpa, 温度为 $35^\circ\text{C} \sim 38^\circ\text{C}$, 将溶有 50 g 聚合物的氯仿输入到高压釜中, CO_2 继续输入, 维持温度和压力恒定 (温度为 36°C , 压力 10.0 Mpa, CO_2 密度 700 kg/m^3 , CO_2 与氯仿流量比为 36), 输入溶液 30 min 后停止, 继续输入 CO_2 30 min, 然后打开高压釜喷嘴, 排放 CO_2 至 1 个大气压, 于流化床收集结晶聚合物。

测支架材料孔隙率的方法如下: 取已知体积的 3 个样品, 置于不锈钢板上, 重物锤击, 破坏其孔隙结构, 然后测其体积, 孔隙率 = $[(\text{初始体积} - \text{锤击体积}) / \text{初始体积}] \times 100\%$ 。

1.2.2 高分子多孔支架材料的表征

(1) 熔点 (T_m) 和玻璃化温度 (T_g) 测定^[4]

采用 WRS-1A 数字熔点仪检测。测定范围: 室温至 120°C , “起始温度” 控制精度 $\pm 0.8^\circ\text{C}$ 。线性升温速率偏差: 小于 10%。测定熔点精度: 小于 20°C 范围内: $\pm 0.5^\circ\text{C}$, $100 \sim 200^\circ\text{C}$: $\pm 0.8^\circ\text{C}$ 。标准毛细管尺寸: 外径 $\phi 1.4 \text{ mm}$, 内径 $\phi 1.0 \text{ mm}$ 。样品填装高度: 3 mm。LDIG 聚合物在室温、真空条件下干燥后, 密封于铝制器皿中, 然后用 USA DSC 2910 微分扫描热量计检测 T_m , 在氮气持续净化下以 $10^\circ\text{C} / \text{min}$ 的速度升温。

(2) 亲水性能测试

用德国 Dataphysics 15 表面接触角分析仪, 测试范围 $0\sim 180^\circ$ (误差 $< 0.1^\circ$)。将聚合物样品溶于氯仿中, 在载玻片上流延成膜。将载玻片水平放在接触角分析仪的平台上, 用微量注射计将三蒸水滴在样品膜上, 然后迅速计量接触角大小。

(3) 生物力学测试

用 SHIMADZU AG-20KNG 型生物力学试验机 (日本岛津试验机株式会社) 对聚合物样品 (5×20 mm 圆柱体) 进行抗压缩强度、断裂强度测试。

(4) 红外吸收光谱测定

以压片法用 5DXFT-IR 红外光谱仪测定 LDIG 聚合物的红外光谱图, 以表征各分子键的波数和吸热峰特征。

(5) 电子显微镜观察

将高分子支架材料经过酒精系列脱水及液态二氧化碳临界点干燥, 于其表面喷金, JEOL JSM-5600LV 型扫描电子显微镜观察材料表面形态, 并测量颗粒大小, 加速电压: 20 Kv, 分辨率: 1024×1024 。

1.2.3 统计学分析

所有计量数据均以均数士标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 统计学分析均以 SPSS10.0 软件行 t 检验; 计数资料行 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 表示差异具有显著统计学意义, $P<0.01$ 表示差异具有非常显著性统计学意义。

2 结果

2.1 熔点 (T_m) 和玻璃化温度 (T_g)

经 WRS-1A 数字熔点仪测得熔点 (T_m) 为 93.4°C , 熔程为 $93.4\sim 94.7^\circ\text{C}$ 。以 USA DSC 2910 微分扫描热量计测得聚合物的玻璃化温度 (T_g) 为 88.6°C 。

2.2 亲水性

用 Dataphysics 15 表面接触角分析仪测试聚合物的接触角为 67.3° 。

2.3 力学性能

用 SHIMADZU AG-20KNG 型生物力学试验机 (日本岛津试验机株式会社) 对聚合物样品 (5×20 mm 圆柱状) 进行抗压测试, 样品 10 个, 获得其平均初始压缩强度为 4.26 ± 0.78 Mpa、抗断裂强度为 11.63 ± 2.30 Mpa。

2.4 红外吸收光谱测定

以压片法测得的红外光谱图在 $2260\sim 2270\text{ cm}^{-1}$ 处有数个与异氰酸基团相关的特征性增强峰, 在 1107.3 cm^{-1} 有 $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ 吸收峰, 于 1677.8 cm^{-1} 处有一强吸收带 (图 1-2), 这一吸收带的形成是由于反应过程中 $-\text{NHCOO}-$ 基团的生成伴随着 2262 cm^{-1} 处异氰酸酯基团 ($-\text{NCO}$) 的定量消失。

2.5 电子显微镜观察

该支架材料经超临界流体抗溶剂结晶技术 (SAS) 得到泡沫状多孔材料, 不同部位的孔隙率不一, 其孔径大小在 10 μm ~2 mm, 平均在 100~400 μm , 孔隙率为 75.6%。通过进一步控制 SAS 过程的相关参数(T 32°C, F 12.0 Mpa, CO₂ 密度 ρ 600kg/m³, CO₂与氯仿流量比为 40), 得到孔径为 100~300 μm , 孔隙率达到 82.6%, 材料的孔径相对均匀, 扫描电镜下呈网状交织 (图 1-3a, b)。

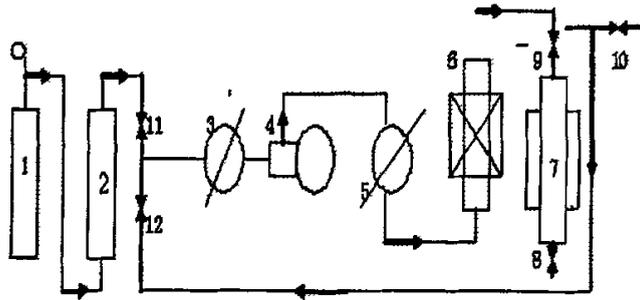


图 1-1, CO₂超临界流体抗溶剂结晶技术工艺流程示意图

- 1-CO₂气瓶; 2-纯化器; 3-冷凝器; 4-高压阀; 5-加热器;
- 6-萃取器; 7-分离器; 8-放油器; 9-减压阀; 10、11、12-阀门

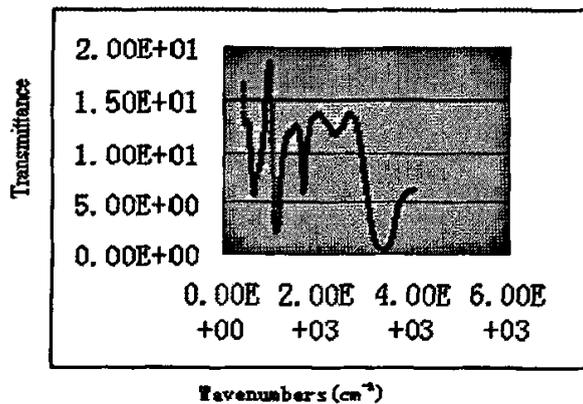


图 1-2, 高分子支架材料 (LDIG) 的红外吸收特征光谱

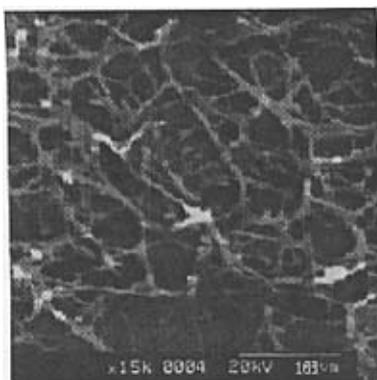


图 1-3a (SEM × 1500)

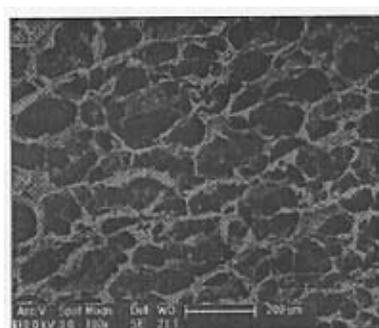


图 1-3b (SEM × 2000)

图 1-3a, b: 扫描电镜下, 高分子支架材料断面显示大小不一的孔隙, 其孔径大小在 $10\ \mu\text{m} \sim 2\ \text{mm}$, 平均为 $100.0 \sim 400.0\ \mu\text{m}$ (276.0 ± 87.2) μm .

3. 讨论

3.1 超临界流体抗溶剂结晶技术^[6-7] (SAS)

应用超临界流体技术 (SCFT) 制备超净物质的方法较多, 主要有超临界流体快速膨胀技术 (RESS)、超临界流体抗溶剂结晶技术 (SAS)、超临界流体包覆技术等。RESS 技术是先将溶质溶解在超临界流体中, 然后在极短时间内通过一个喷嘴快速减压, 使流体膨胀到低压或常压体系, 利用强烈的机械扰动达到极高的过饱和度, 从而产生粒径分布均匀的超细微粒。关于这方面的报道^[8-11]很多, 但 RESS 对高分子量 (>500) 的聚合物不适用, 原因是聚合物在 CO₂ 中溶解度太低。超临界流体包覆技术^[12]是将溶解有两种不同溶质的 SCF 通过一个喷嘴进行减压膨胀, 通过控制萃取和预膨胀条件使包覆剂在细颗粒析出后即刻析出, 包覆在细颗粒周围形成球形包覆颗粒。

本实验采用的 SAS 技术是以超临界 CO₂ 作为反萃取剂, 溶剂氯仿与超临界 CO₂ 互溶, 溶质为 LDIG 共聚物, 在超临界 CO₂ 中的溶解度很小, 当 SCF 溶解到溶液中时, 使溶液稀释膨胀, 降低氯仿对溶质的溶解能力, 在短时间内形成较大的过饱和度, 使溶质结晶析出, 形成纯度高、尺寸分布均匀的微粒或微丝, 微粒或微丝成型后得到一定孔径和孔隙率的材料。其特点^[13-15]是操作温度较低, 残留溶剂少, 造粒、干燥一步完成。而且溶剂和抗溶剂可以回收循环利用。大大减少了有机溶剂的用量, 减少了对环境的污染。与 RESS 相比, SAS 不需要考虑溶质溶解, 操作的温度和压力相对温和; 与液体抗溶剂法相比, 减少了在液体抗溶剂过程中, 复杂的后处理过程。超临界流体的扩散系数可以达到液体扩散系数的两倍数量级, 超临界流体抗溶剂可以快速扩散到液体溶液中, 形成的过饱和度是液体抗溶剂过程无法达到的, 故沉析微粒的粒径比用液体抗溶剂过程小。

自 Gallagher 等^[16,17]于 1989 年首先应用 SAS 以来。人们相继用相平衡、结晶动力学、喷嘴雾化和质量传递解释超临界抗溶剂结晶过程, 但许多现象目前未得到满意的解释。有报道^[18-20]降低温度有利于聚合物结晶生成分散体, 而较高的温度会使之塑化, 溶液浓度的增加, 不利于聚合物结晶形成微粒; 另外, 在超临界状态下搅拌作用及 CO₂ 所含杂质亦不利于聚合物的结晶。SAS 过程的独立参数^[21-23]包括溶液浓度、溶液流量、气体流量、高压釜温度、高压釜压力等。本实验控制温度为 36℃, 压力 10.0 Mpa, CO₂ 密度 700 kg/m³, CO₂ 与氯仿流量比为 36 和 40, 得到的材料在宏观上呈网状多孔隙分布。

综上所述, 本研究制备高分子纳米粒的原料选择、设计实施、微粒化过程及其产物均符合国际上绿色化学^[24,25] (Green chemistry) 的要求。绿色化学又称为环境无害化学 (environmental benign chemistry, EBC), 是利用化学来防止污染的一门科学。目的是通过利用一系列的原理与方法来降低或消除化学产品设

计、制造与应用中有害物质的使用与产生,使所设计的化学产品或过程更加环境友好。绿色化学包括所有可以降低对人类健康与环境产生负面影响的化学方法、技术和过程。

3.2 高分子材料的表征

一种用于组织工程的高分子材料,必须有适当的玻璃化温度(T_g),以便在应用时提供稳定的结构强度。对 LDIG 共聚物的玻璃化温度评价表明,熔点(T_m)和玻璃化温度(T_g)分别为 93.4°C、88.6°C,其热容量在低于 88.6°C 时不会发生改变,故适用于生物体。经 Dataphysics 15 表面接触角分析仪测得本聚合物的接触角为 67.3°,这与当前组织工程中应用广泛的聚羟基乳酸非常接近,后者接触角为 64.4°。可见本品具有足够的亲水性,允许营养液和代谢产物的接触及细胞粘附生长。理想的组织工程材料应具备一定的支撑强度,本研究采用的共聚物平均初始压缩强度为 4.26±0.78 Mpa、抗断裂强度为 11.63 ±2.30 Mpa,这个强度用于组织工程细胞支架及非承重部位的骨缺损填充^[26,27]完全适用。

该共聚物支架材料(LDIG)的红外光谱图在1107.3 cm^{-1} 处有-C-O-C-吸收峰,于1640 cm^{-1} 处是C=O伸缩振动峰,与Storey、Knolker等^[28,29]学者报道的一致。在1720 cm^{-1} 处有一强吸收带,是由于反应过程中-NHCOO-基团的生成伴随2262 cm^{-1} 处异氰酸酯基团(-NCO)的定量消失形成的。

扫描电镜发现,高分子支架材料不同部位的孔隙率不一,其孔径大小在 10 μm ~2 mm,平均在 100.0~400.0 μm (276.0±87.2 μm),孔隙率为 75.6%,经改进工艺后达到 82.6%。共聚物的断面观显示,由纳米晶须交织形成的内部孔隙不仅为细胞生长提供了巨大的表面,而且这些孔隙相互交通允许营养液和代谢产物自由流动。这一结构特征类似于当前生物医学领域应用的多孔聚亚氨酯^[30,31]。

4 小结

- (1) 本实验以赖氨酸二异氰酸酯-甘油共聚物通过超临界抗溶剂结晶技术(SAS)成功制备出多孔高分子支架材料,其平均孔径为100.0~400.0 μm (276.0±87.2 μm),孔隙率为75.6%。
- (2) 通过一系列方法对高分子材料进行表征,证实该高分子材料具有作为组织工程支架材料所需要的理化性能。
- (3) 制备高分子支架材料的全过程均采用无毒原料和无毒工艺,有机溶剂基本去除,获得的高分子材料对机体无毒,符合“绿色化学”观点。

参考文献

- [1]. Thomson RC,Wake MC,Yaszemski MJ,et al.Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs[J].Advances in polymers,Science ,1995,122:245-274.

- [2]. Langer R. Tissue Engineering[J]. Science, 1993, 260 (5110) :529.
- [3]. 郑俊民, 平其能. 药用天然及合成高分子材料[A]. 见: 郑俊民. 高分子材料学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 81-134.
- [4]. Bruder SP, Fox BP. Tissue engineering of bone[J]. Clin Orthop, 1999, 367S: 684.
- [5]. 朱自强. 超临界流体技术—原理和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 517.
- [6]. 蔡建国, 周展云. 超临界流体沉析制备微细颗粒的技术及其应用[J]. 化工进展, 1996, 6: 53-59.
- [7]. 任慧, 丁一刚, 吴元欣, 等. 超临界流体技术在超微粒子制备中的应用[J]. 化工进展, 2001, 9: 30-32.
- [8]. Matson DW, Fulton JL, Petersen RC, et al. Rapid expansion of supercritical fluid solutions: solute formation of powders, thin films and fibers[J]. Ind Eng Chem Res, 1987, 26 (11) : 2298-2306.
- [9]. Tom JW, Debenedetti PG. Formation of bioerodible polymeric microspheres and microparticles by rapid expansion of supercritical solutions[J]. Biotechnol Prog, 1991, 7: 403-411.
- [10]. Türk M. Formation of small organic particles by RESS: Experimental and theoretical investigations[J]. Journal of Supercritical Fluids, 1999, 15: 79-89.
- [11]. Türk M, Hils P, Helfgen B, et al. Micronization of pharmaceutical substances by the rapid expansion of supercritical solutions (RESS) : a promising method to improve bioavailability of poorly solute pharmaceutical agents[J]. Journal of Supercritical Fluids, 2002, 22: 75-84.
- [12]. 孙晓宇, 王亭杰, 金涌. RESS过程及其用于微细颗粒制备研究[J]. 化工进展, 2002, 21 (1) : 29-33.
- [13]. Thies C, Ribeiro D, Richard J, et al. A supercritical fluid-based coating technology: Process considerations[J]. Journal of Microencapsulation 2003, 20 (1) : 87-96.
- [14]. Kim JH, Paxton TE, Tomasko DL. Microencapsulation of naproxen using rapid expansion of supercritical solutions[J]. Biotechnol Prog, 1996, 12: 650-661.
- [15]. Tu LS, Dehghani F, Foster NR. Micronisation and microencapsulation of pharmaceuticals[J]. Powder Technology, 2002, 126: 134-149.
- [16]. Bleich J, Kleinebudde P, Muller BW, et al. Aerosol solvent extraction system—a new microparticle production technique[J]. Int J Pharm, 1993, 106: 77-84.
- [17]. Reverchon E, Dellaporta G, Ditroliao A, et al. Supercritical antisolvent precipitation of nanoparticles of superconductors precursors[J]. Ind. Eng. Chem. Res, 1998, 37: 952-958.

- [18]. 陈鸿雁,蔡建国,邓修,等.超临界流体溶液快速膨胀法制备灰黄霉素微细颗粒[J].化工学报,2001,52(1):56-60.
- [19]. 陈鸿雁,周永传,邓修,等.超临界溶液快速膨胀法制灰黄霉素微粒的预膨胀[J].华东理工大学学报,2000,26(1):18-20.
- [20]. 张敬畅,吴向阳,曹维良.超临界二氧化碳二元体系相平衡性质的研究[J].高等学校化学学报,2002,21(1):10-13.
- [21]. 王欣,李元瑞.超临界流体萃取过程参数的优化选择[J].中国油脂,25,(6):200-203.
- [22]. Shekunov BY, Baldyga J, York P. Particle formation by mixing with supercritical antisolvent at high Reynolds numbers[J]. Chemical Engineering Science, 2001, 56:2421-2433.
- [23]. Reverchon E, Porta GD, Falivene MG. Process parameters and morphology in amoxicillin micro and submicro particles generation by supercritical antisolvent precipitation[J]. J Supercritical Fluids, 2000, 17(3):239-248.
- [24]. 张镜澄, 主编.超临界流体萃取[M].北京:化学工业出版社,2000:2-8.
- [25]. 胡爱军,丘泰球.超临界流体结晶技术及其应用研究[J].化工进展,2002,21(2):127-130.
- [26]. Breitbar AS, Grande DA, Kessler R, et al. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells[J]. Plast Reconstr Surg, 1998, 101:567-574.
- [27]. Vacanti CA, Upton SL. Tissue Engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices[J]. Clin Plast Surg, 1994, 27(3):445.
- [28]. Storey RF, Wiggins JS, Mauritz KA. Bioabsorbable composites. II: nontoxic, L-lysine-based poly(ester-urethane) matrix composites[J]. Polymer Comp 1993, 14:17-25.
- [29]. Knolker HJ, Braxmeier T, Schlechtingen G. A novel method for the synthesis of isocyanates under milder conditions[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 1995, 34:2497-2500.
- [30]. Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, et al. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow[J]. J Bone Miner Res, 1996, 11:312-324.
- [31]. Planck H, Syre I, Danner M, Egbers G. Polyurethanes in biomedical engineering II[P]. New York: Elsevier, 1987.

第二部分 组织工程用高分子支架材料的生物相容性研究

引言

生物相容性是组织工程材料的一个基本条件。赖氨酸二异氰酸酯-甘油共聚物具有作为组织工程支架材料所必需的理化性能,要成为骨组织工程材料,尚需对其进行生物相容性检测。

生物学评价标准^[1,2]主要是针对直接与人体接触或在体内使用的医疗器械,提供一套生物学评价程序,通过微生物实验(体外实验)和动物实验(体内实验)评价医疗器械对细胞和动物体的有害作用,并通过以上实验综合评价推测在临床使用时是否安全。如何保证生物材料的安全性越来越受到国内外学术界的重视。为了保障医疗器材在临床使用时的安全有效性,1976年美国最早立法、授权食品药品监督管理局(FDA)管理医疗器械^[3],并实行售前审批制度。同时,国际各学术机构和团体也加强了医疗器械的安全性评价研究。

1979年的国际牙科会议制订了口腔材料的生物学评价标准^[4,5]。1982年美国材料实验学会^[6](American Society of Material Testing, ASTM)制订了生物材料和医疗器材生物学评价项目选择以及相关评价方法、标准。我国卫生部于1997年11月颁布了《生物材料和医疗器械生物学评价技术要求》^[7][卫药发(1997)第81号]。

本实验旨在根据当前国内外生物材料和医疗器械生物学评价的相关标准和办法,对制备的高分子支架材料进行生物学评价,为进一步研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器设备

1.1.1 材料和试剂

75%酒精	中南大学湘雅医院药剂科
2.5%戊巴比妥钠	湖南岳阳市制药一厂
2%草酸钾液	长沙丽欣生物技术有限公司
10%甲醛	湖北化工厂
环氧乙烷	上海振兴化学一厂
生理盐水	中南大学湘雅医院药剂科

1.1.2 仪器设备

试管、玻璃瓶、烧杯	长沙汇虹化玻仪器试剂有限公司
水银肛表	长沙汇虹化玻仪器试剂有限公司
0.2 μm 分子筛	长沙博美生物科技有限公司
自动三重纯水蒸馏器	上海青浦沪西仪器厂

电热恒温水浴箱	湖南湘仪医疗器械厂
TGL-18G 型台式高速离心机	上海医疗器械厂
台式恒温水浴振荡器	江苏金坛市富华仪器有限公司
UV 分光光度计	上海市精慧仪表公司
光学显微镜	上海物理光学仪器厂

1.2 实验方法

1.2.1 材料浸提液的制备

将高分子材料置于 37℃ 水浴箱中用生理盐水持续浸泡 72 h (0.1 g/ml), 将获得的材料浸提液用 0.2 μm 分子筛加压过滤, 以此除去细菌及病毒, 得到生物大分子。然后密封于无菌瓶, 置于 4℃ 冰箱中备用。

1.2.2 溶血实验

(1) 新鲜稀释兔血的制备

经股静脉抽取新西兰兔 (雄性, 2.2~2.5 kg) 静脉血 5 ml, 加入 2% 草酸钾 0.5 ml, 取此兔血 4 ml 加入生理盐水 5 ml 进行稀释即制备出新鲜稀释兔血。在 0.2 ml 兔血样本中加入 10 ml 蒸馏水, 用 UV 分光光度计 (波长为 540 nm) 测量, 其吸光度为 0.67。如果材料符合要求, 则标准的吸光度应在 0.8±0.5 范围内。

(2) 实验过程

实验组: 将高分子材料制备成 5 mm 大小, 分为 3 份, 每份 5 g, 用蒸馏水冲洗 2 次, 每次 1 min, 然后分别浸泡于 3 支含 10 ml 生理盐水的试管内, 在 37℃ 水温中维持 30 min, 然后加入 0.2 ml 稀释兔血, 缓慢混合, 在 37℃ 水温中维持 60 min。

阴性对照组: 在 10 ml 生理盐水中加入 0.2 ml 稀释兔血。

阳性对照组: 在 10 ml 蒸馏水中加入 0.2 ml 稀释兔血, 轻轻振动, 使之 100% 溶血。

阴性和阳性对照均需要 3 只试管, 所有实验条件与实验组相同。

以 2000 rpm×5 min 将所有试管离心, 取上清, 用 UV 分光光度计测量吸光度 (optical density, OD), 波长 540 nm, 每组取 3 只试管 OD 平均值。溶血程度按以下公式计算:

$$\text{溶血率} = (\text{实验组 OD} - \text{阴性对照组 OD}) / (\text{阳性对照组 OD} - \text{阴性对照组 OD}) \times 100\%$$

(3) 判定标准^[9]: 溶血率 ≤ 5%, 合格; 溶血率 > 5%, 不合格。

1.2.3 热原实验

(1) 筛选动物

选用中南大学湘雅医学院实验动物中心提供的新西兰兔 8 只, 体重 2.2~2.5 kg, 雌雄不限, 在实验前 7 d 开始测体温, 室温 20~22℃, 相对湿度 75~80%。测肛温前禁食、水 2 h, 用 2.5% 戊巴比妥钠经耳缘静脉注射麻醉 (1ml/kg) 成功后, 将温度计插入兔肛门内, 深度为 5, 6 cm, 10 min 后读数。每小时测 1 次, 共 4 次。体温在 38.4~39.6℃ 之间, 最高和最低的差距不超过 0.4℃ 者符合实验要求, 予以编号备用。

(2) 实验方法

将浸提液置于 37℃ 恒温水浴箱中备用。按上述方法将兔麻醉, 每 30 min 测 1 次肛温, 共 2 次, 以两次温度的平均值为正常体温。测定正常体温 15 min, 自耳缘静脉缓慢推注高分子材料浸提液, 剂量为 10 ml/kg, 注射后每隔 60 min 测肛温 1 次, 共 3 次, 最高的 1 次减去正常体温, 即为升高的度数。

(3) 判定标准^[9]

每组 3 只, 体温升高均在 0.6℃ 以下, 且 3 只兔肛温升高度数在 1.4℃ 以下, 则材料合格; 每组 3 只, 有 1 只体温升高 $\geq 0.6^\circ\text{C}$ 或 3 只合计 $\geq 1.4^\circ\text{C}$, 则应该增加 2 只重复实验; 每组 3 只, 体温升高 $\geq 0.6^\circ\text{C}$ 的动物超过 1 只, 则不合格。

1.2.4 急性毒性实验

(1) 动物分组及实验方法

选用中南大学湘雅医学院实验动物中心提供的健康成年小鼠 40 只, 体重 20~25g, 雌雄各半, 随机分为实验组和对照组, 每组 20 只, 实验组用材料浸提液进行小鼠尾静脉内注射 (50 ml/kg), 对照组用生理盐水尾静脉注射 (50 ml/kg)。观察注射后第 24、48、72 h 动物的生存状态、毒性表现和死亡情况。

(2) 毒性程度分级 (见表 2-1)

毒性程度	症状
无毒	无任何异常症状
轻度毒性	有轻度症状, 但无运动减少、呼吸困难或腹部症状
中度毒性	有腹部刺激症状, 呼吸困难, 运动减少, 眼睑下垂, 腹泻, 体重明显下降至 15~17 g
重度毒性	衰竭、发绀、震颤, 严重腹部刺激症状, 眼睑下垂, 呼吸困难, 体重下降至 <15 g
死亡	注射后死亡

(3) 结果判断^[10]: 在 72 h 观察期内实验组反应不大于对照组, 认为符合要求; 实验组中 40% 死亡或 60% 出现明显毒性反应或小鼠普遍出现进行性体重下降, 则认为不符合要求; 在 72 h 内实验组 40% 轻度毒性或 20% 明显毒性或全部小鼠体重

下降, 则小鼠数量加倍, 重复实验。

1.2.5 肌肉内植入实验

(1) 植入手术

将高分子材料 LDIG 和 PDLLA 切成直径 4 mm×4 mm, 形状规则的圆盘体, 尽量使边缘光滑, 紫外线照射消毒后备用。选用中南大学湘雅医学院实验动物中心提供的 SD 大白鼠 24 只, 雌雄不限, 体重 200~250g。用 3%戊巴比妥钠经耳缘静脉注射麻醉后 (3 ml/kg), 大白鼠股部常规备皮、消毒、铺巾, 切开双侧股部皮肤, 等距离各选取 2 个植入点, 选无血管区, 用蚊式止血钳分离肌肉, 植入支架材料, 深度为 0.5~1.0 cm, 缝合肌膜和皮肤。左侧为实验组 (植入 LDIG 材料), 右侧为对照组 (植入 PDLLA 材料)。术后 1、7、15、30、90、180 d 取材, 每个时相点 2 只, 切取样品周围 0.5~1.0 cm 范围的肌肉, 于 10%甲醛溶液中固定, 石蜡包埋切片, 切片厚度为 5 μm, HE 染色, 每个标本做 2 张组织学切片, 在光学显微镜下观察。

(2) 评价标准^[11]

① 大体观察

观察植入物周围组织的大体形貌, 注意不同时间材料与组织间发生的变化。

② 组织学评价: 包括炎症细胞反应与纤维囊形成分级 (见表 2-2、表 2-3)。

表 2-2

炎症细胞反应分级

分级	炎症细胞反应程度
I 级	周围仅见极少量的淋巴细胞
II 级	周围可见少量的淋巴细胞
III 级	周围可见少量的嗜中性粒细胞、淋巴细胞浸润和巨细胞反应
IV 级	周围可见以嗜中性粒细胞浸润为主的炎性反应、可见吞噬细胞

表 2-3

纤维囊形成分级

分级	炎症细胞反应程度
I 级	囊壁厚度稳定 ≤ 0.03 mm, 无继续增生现象
II 级	纤维化囊壁致密, 壁的厚度比形成初期薄
III 级	周围纤维母细胞与胶原纤维, 并已形成纤维囊腔结构
IV 级	周围可见小血管与纤维母细胞增生, 可见形成疏松的囊壁

③ 评定标准 (见表 2-4)

植入时间 (d)	炎症细胞反应程度	纤维囊形成分级
7	≤IV级	无
15	≤III级	≤IV级
30	≤II级	≤III级
60	≤I级	≤II级
90	I级	I级
180	<I级	<I级

* 每期试样组织学观察, 反应程度超过标准 I 级的切片数不得多于总数的 1/4。

1.2.6 统计学处理

所有计量数据均以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学分析均以 SPSS 10.0 软件进行处理。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异具有非常显著统计学意义。

2 结果

2.1 溶血实验

溶血实验结果见表 2-5。根据计算公式: 溶血率 = (实验组 OD - 阴性对照组 OD) / (阳性对照组 OD - 阴性对照组 OD) × 100% = 3.83%。因此, 根据中国卫生部颁布的《生物材料和医疗器材生物学评价的技术要求》的相关评价标准, 高分子纳米材料浸提液引起的溶血率 < 5%, 符合生物医学要求。

组别	1	2	3	平均值
实验组	0.0610	0.0620	0.0610	0.0614
阳性对照组	0.4510	0.5060	0.5580	0.5050
阴性对照组	0.0480	0.0390	0.0440	0.0437

2.2 热原实验

热原实验结果见表 2-6。可以看出, 8 只兔体温升高均为 0℃, 符合热原检测要求, 即 LDIG 材料对动物无致热作用。

家兔 编号	注药前体温 (°C)			注药后体温 (°C)			差值
	1h	2h	平均值	1h	2h	3h	

1	38.65	38.70	38.70	37.90	37.90	37.90	0
2	39.30	39.20	39.40	38.30	38.20	38.20	0
3	39.50	39.50	39.50	38.90	38.80	38.80	0
4	39.40	39.30	39.35	36.80	36.70	36.60	0
5	39.30	39.30	39.30	38.50	38.40	38.50	0
6	39.70	39.60	39.65	38.30	37.20	38.20	0
7	39.20	39.30	39.25	38.80	38.70	38.70	0
8	39.50	39.50	39.50	38.00	37.50	37.40	0

2.3 急性毒性实验

所有实验动物未发生死亡,无惊厥、瘫痪、呼吸困难、腹泻、运动减少和体重下降等不良反应。按毒性剂量分级,LDIG 高分子材料属于无毒级。

2.4 肌肉内种植实验

2.4.1 大体观察

植入术后,大鼠进食、活动情况如常,未见伤口红肿、流脓及破溃裂开,所有伤口均愈合良好。肉眼观察植入体周围肌肉无变色、硬化、肿胀现象。

2.4.2 组织学观察

- (1) 植入 7 d, 实验组中有 18 张切片的炎症细胞反应程度为 II 级 (图 2-1), 另外 6 张为 III 级, 全部切片未见囊壁形成。
- (2) 植入 14 d, 实验组中有 20 张切片的炎症细胞反应程度为 I 级 (图 2-2), 4 张为 II 级; 19 张切片的囊壁形成程度为 II 级, 另外 1 张为 I 级, 4 张未见囊壁形成。
- (3) 植入 28 d, 实验组中有 22 张切片的炎症细胞反应程度 < I 级 (图 2-3), 2 张切片的炎症细胞反应程度为 I 级, 所有切片囊壁形成 < I 级。
- (4) 植入 60 d、90 d、180 d, 实验组中 24 张切片的炎症细胞反应程度和囊壁形成均 < I 级。
- (5) 材料植入 4 周, 大白鼠心、肝、肺、肾等重要器官组织切片未见明显病理改变 (见图 2-4, 图 2-5, 图 2-6, 图 2-7)。

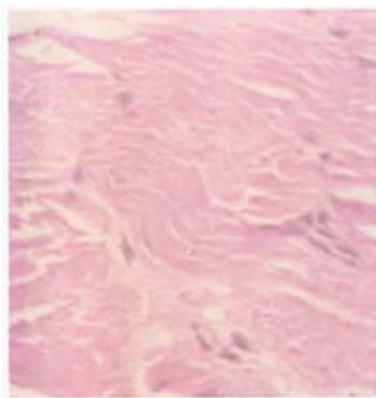


图 2-1: 材料植入 1 周, 炎症细胞反应为 II 级, 未见囊壁形成 (HE x40)



图 2-2, 材料植入 2 周, 炎症细胞反应程度为 I 级, 囊壁形成 I 级 (HE x40)

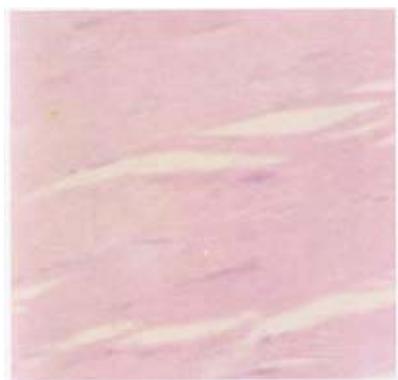


图 2-3, 材料植入 4 周, 炎症细胞反应程度和囊壁形成 < I 级 (HE x200)

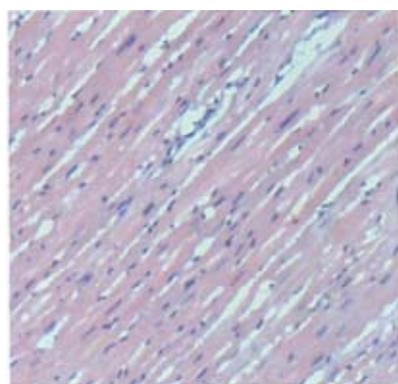


图 2-4, 材料植入 4 周, 心肌无明显炎症细胞浸润 (HE x60)

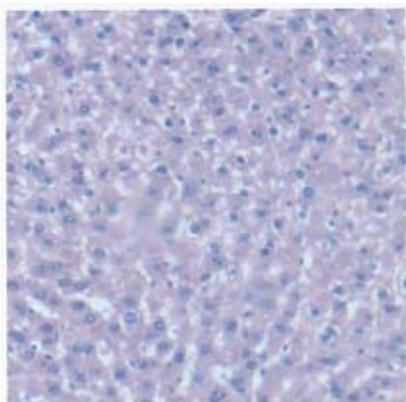


图 2-5，材料植入 4 周，肝组织无明显炎症细胞浸润 (HE x60)

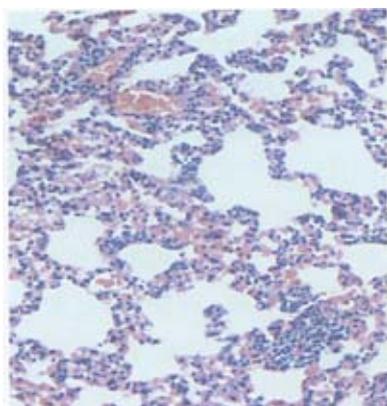


图 2-6，材料植入 4 周，肺组织未见明显异常 (HE x60)

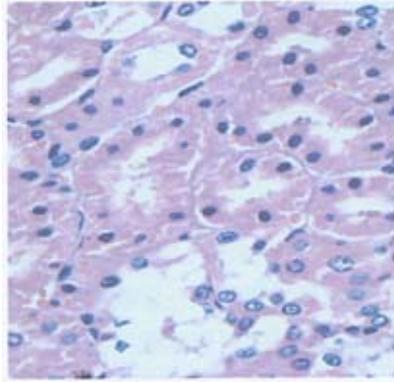


图 2-7, 材料植入 4 周, 肾脏未见明显异常改变 (HE x60)

3 讨论

3.1 生物相容性评价的意义

生物材料用于临床前必须对其进行生物相容性评估, 通过体外细胞培养来评定材料的细胞毒性^[12~14]是目前国际上一种评价生物材料安全性的标准方法。当生物材料释放成分在机体内达到一定浓度时, 可能导致全身毒性。急性全身毒性实验^[16]是一种非特异性急性毒性实验, 是指 24 h 内一次或多次大剂量给予机体后造成机体全身代谢的毒性反应, 从而评价材料对生物体的急性毒性作用。本实验采用鼠尾静脉注射途径, 将无菌的材料浸提液直接注入血液循环, 这是材料与动物体接触的最直接和最快速的一种方式。溶血实验作为体外细胞毒性实验的重要补充, 在材料筛选初期评价中发挥作用。该实验的目的是通过试样在体外与血液直接接触, 测定红细胞释放的血红蛋白量以评价材料是否对红细胞的功能和代谢造成不良影响。当材料有溶血活动时, 提示材料具有细胞毒性。结果表明制备的高分子材料在体外实验无明显溶血反应, 可以满足医用生物材料的应用要求。热原实验是将一定量材料浸提液经静脉注入兔体内, 在规定时间内观察其体温变化, 以确定浸提液中热原含量是否符合人体应用要求的一种方法。体内植入实验主要用于从宏观和微观水平来评价生物材料对组织的局部反应。以上几种实验均为中国卫生部《生物材料和医疗器材生物学评价的技术要求》[卫药发(1997)第 81 号]中的标准要求, 对于客观评价本课题中所研制的 LDIG 高分子纳米材料的生物学特性有重要指导作用。

3.2 高分子支架材料符合生物学评价标准

医用材料生物学评价方法及结果判断标准^[16~18]已被各国药典、ISO、ASTM 等有关标准中收入的方法约有40多种,仅牙科材料评价就有多种标准。总的归纳为体外、半体内和体内试验三个方面。本实验挑选部分项目^[19,20]对新合成的高分子纳米材料进行生物学评价,方法是有效可靠的。理想的骨组织工程材料必须具有良好的生物特性,即无毒性及热原性,对周围组织无刺激性,不发生过敏反应,不引起溶血反应和血液成分改变,能逐步被降解吸收和被机体组织取代。通过急性毒性实验、溶血实验、热原实验及肌肉内植入实验,我们发现该材料无毒性、无热原性、不引起溶血反应,在家兔肌肉内种植实验中也发现该纳米材料能逐渐降解,植入早期发生的急性炎性细胞浸润系创伤反应所致,这些实验结果符合中国卫生部《生物材料和医疗器材生物学评价的技术要求》中的相关条文,表明新型高分子纳米材料具有良好的生物相容性,用于骨组织工程是安全可靠的。

由于生物学实验依赖于动物模型和微生物模型^[21,22],因此在某些情况下,在动物体内出现的组织反应,可能在人体内不一定同样出现;同时由于人体与动物的差异,在生物学评价中符合要求的产品,也许会在某些病人身上产生不良反应。这就需要在临床研究中进一步验证,以确保大范围临床应用时的安全性。同时,必须从分子水平上^[23~25]去考察生物材料对细胞DNA、RNA以及细胞外基质的胶原蛋白和非胶原蛋白的mRNA基因表达的影响。由于时间和条件所限,本实验未能对材料进行遗传毒性、致癌作用、生殖和发育毒性等方面的实验,骨细胞相容性(即成骨细胞与高分子纳米材料的生物相容性)实验留待下一章实施。

4 小结

通过对高分子支架材料(LDIG)进行急性毒性实验、溶血反应、热原实验和肌肉内植入实验,结果表明,该材料无毒性,无热原性、不引起溶血反应,植入后局部组织反应小,生物相容性良好。

参考文献

- [1]. 杨晓芳. 生物材料生物相容性评价研究进展[J]. 生物医学工程学杂志,2001, 18(1):123.
- [2]. 张玉梅. 牙科用Ti-Zr合金的生物安全性评价[J]. 生物医学工程学杂志,2001,18(1):9.
- [3]. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration: Premarket Notification 510(k), Regulatory Requirements for Medical Devices[P]. Washington DC, Health and Human Services Publication, 1995, 4158:1-1 to 4-4.
- [4]. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials: An overview of the basic

- science.Clin Ortho,2000,371 (1) :10-27.
- [5]. Hayakawa T,Yoshinari M, Nemoto K. et al. Effect of surface roughness and calcium phosphate coating on the implant/bone response[J]. Clin Oral Implants Res,2000,11 (4) :296-304.
- [6]. 田文华.生物材料体外评价的理论及应用[J].国外医学,生物医学工程分册,1991,14 (5):280.
- [7]. 奚连斐.医疗器械生物学评价[J].中国医疗器械信息,1999,5:34-9.
- [8]. 中国卫生部.生物材料和医疗器材生物学评价技术要求[P].北京:人民卫生出版社,1997,附件五:溶血实验.502-505.
- [9]. 中国卫生部.生物材料和医疗器材生物学评价技术要求[P].北京:人民卫生出版社,1997,附件六:热原实验.508-511.
- [10]. 刘晓亮,张彩霞,闻学雷. 评价生物材料的体内外实验相关性研究一体外细胞培养的 MTT 法与体内皮下埋植试验 [J]. 口腔材料器械杂志,1999,8:10-13.
- [11]. 中国卫生部.生物材料和医疗器材生物学评价技术要求[P].北京:人民卫生出版社,1997,附件八:植入实验.517-523.
- [12]. Ignatius AA, Betz O, Augat P,et al. In vivo investigations on composites made of resorbable ceramics and poly (lactide) used as bone graft substitutes[J].J Biomed Mater Res,2001,58 (6) :701-709.
- [13]. 奚连斐.医用装置生物相容性评价指南[J].国外医学,生物医学工程分册,1988,11 (1) :73.
- [14]. Bucholz RW.Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes[J].Clin Ortho,2002,395 (1) :44-52.
- [15]. Rose FR, Oreffo RO.Bone tissue engineering:hope vs hype.Biochem[J]. Biophys Res Commun,2002,292 (1) :1-7.
- [16]. Kim SC,Kim DW,Shim YH,et al. In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formation:toxicity and efficacy[J].J Control Release,2001,72 (2) :191-202.
- [17]. Iwata H,Sakano S,Itoh T,et al.Demineralized bone matrix and native insoluble bone morphogenetic protein/noncollagenous protein in orthopaedic surgery[J]. Clin Ortho,2002,395 (1) :109-119.
- [18]. 奚连斐.欧共体医用装置管理概况[J]. 世界医疗器械,1996,2 (12) :357.
- [19]. Sims CD, Butler PE, Cao YL, et al.Tissue Engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes[J].Plast Reconstr Surg,

- 1998, 101 (6) :1580-1587.
- [20]. Anderson JM. Perspectives on the in vivo responses of biodegradable polymers. In: Biomedical applications of synthetic biodegradable polymers[J]. Boca Raton: CRC Press,1995,223-233.
- [21]. Barelille R,Lafage-Proust MH,Fauchoux C,et al. Various evaluation techniques of newly formed bone in porous hydroxyapatite loaded with human bone marrow cells implanted in an extra-osseous site[J].Biomaterials,2000,21 (11) :1345-1352.
- [22]. 奚连斐,等译.医用装置标准.ASTM 标准年鉴[J],成都:成都科技大学出版社,1991:42-47.
- [23]. Mostafa EL. Molecular interface characterization in human bone matrix[J]. Biomaterials,1993,14 (3) :978.
- [24]. Goldstein SA,Patil PV, Moalli MR. Perspectives on tissue engineering of bone[J] . Clin Orthop,1999, (367) :419.
- [25]. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing[J].Clin Orthop,1998,355:S7-21.

第三部分 组织工程用高分子支架材料与大鼠成骨细胞复合培养的观察

引言

组织工程材料的生物相容性研究一般分为体内直接植入法和体外复合细胞培养法^[1-3]。体内直接植入由于受多种体内环境因素的影响,不能准确反映生物材料与组织细胞的相容性。而体外复合细胞培养可以直接观察细胞与生物材料复合生长的情况,较前者更为敏感、客观,并且迫于现代社会动物保护和减少动物实验的压力,体外评价方法^[4]是近年来研究生物材料相容性的主要方法。体外成骨细胞培养模型可以排除体内多种因素的影响,控制实验条件,也便于观察。同时,成骨细胞作为材料植入部位的主要功能细胞,可以直接反映材料与细胞之间的相互作用。成骨细胞与细胞支架的联合培养也是骨组织工程由体外研究向在体研究的重要环节。本实验选用经鉴定具有成骨细胞多种生物学特性的家兔成骨细胞,与新型高分子纳米材料(LDIG)复合培养,并以消旋聚乳酸(PDLLA)材料作为对照,从细胞学角度评价该材料的生物相容性,通过倒置相差显微镜和扫描电子显微镜等观察细胞生长情况,为构建临床应用的组织工程化纳米人工骨提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器设备

1.1.1 材料和试剂

多孔高分子支架材料(LDIG)	自制
消旋聚乳酸(PDLLA)	长沙丽欣生物技术有限公司
F12 培养基	Sigma
小牛血清(FCS)	Sigma
兔抗鼠 I 型胶原单克隆抗体	Boster
ABC 染色试剂盒	Boster
DAB 显色剂	Boster
APEC 涂片剂	Sigma
BCIP/NBP 显色盒试剂	Boster
D-Hanks 液	中南大学湘雅医学院试剂中心
马血清	Sigma
碱性磷酸酶试剂盒	长沙博美生物科技有限公司
肝素、青霉素、链霉素	哈尔滨制药六厂

1.1.2 仪器设备

0.2 μm 分子筛	长沙博美生物科技有限公司
微量加样器	长沙丽欣生物技术有限公司
培养用器皿(25 ml培养瓶、吸管、离心管等)	长沙丽欣生物技术有限公司
96孔培养板	长沙丽欣生物技术有限公司
血细胞计数板	长沙博美生物科技有限公司
石蜡自动包埋脱水机、连续切片机	德国
净化工作台	山东蚌埠净化设备厂
SHEL-LAB2000型CO ₂ 孵箱	美国
恒温水浴箱	上海跃进医疗器械厂
恒温真空干燥箱	上海市精慧仪表公司
自动三重纯水蒸馏器	上海青浦沪西仪器厂
AMARY-1000电子扫描显微镜	美国
低温冰箱	上海跃进医疗器械厂
电子天平	湖南湘仪医疗器械厂
全自动CO ₂ 培养箱	日本
超净工作台	苏州净化器厂
倒置相差显微镜及照像系统	日本Olympus
高、低速离心机	北京医用离心机厂

1.2 实验方法

1.2.1 材料准备

(1) 多孔三维高分子支架的制备

① 实验组：采用已制备的高分子支架材料，其孔径大小为100~300 μm ，孔隙率为82.6%，材料的孔径相对均匀，呈网状交织。

② 对照组：参照文献^[5-7]采用溶剂浇铸/颗粒滤沥法：在半球形容器中按一定比例加入消旋聚乳酸(PDLLA)(分子量 3.8×10^4 道尔顿)、二氯甲烷和氯化钠(粒径50~150 μm)，搅拌均匀，静置至定形。样品置通风柜48 h除去溶剂，然后用蒸馏水反复浸泡、滤沥除去盐粒，所得多孔聚合物支架于100 mmHg真空干燥48 h备用。制得的支架材料大小孔隙相互连通，孔径100~200 μm ，同法测得孔隙率85.3%。

(2) 支架成型、灭菌

将两种高分子材料制备成直径5.0 \times 5.0 \times 1.5 mm的方形薄片，将材料置于96孔培养板的孔底，75%的乙醇浸泡2 h，然后用三蒸水冲洗15 min，反复5次，置真空干燥箱(37 $^{\circ}\text{C}$)除去水分，在超净工作台上用高效紫外灯照射1 h，灭菌后的材料用培养基浸泡1 h备用。

(3) 0.25%胰蛋白酶液的配制

电子天平称取胰蛋白酶 0.1 g, 用 2 ml D-Hanks 液将胰蛋白酶粉调成糊状, 加适量 D-Hanks 液, 室温下磁力搅拌 3 天后溶解, 溶解后的胰蛋白酶液以 0.2 μm 分子筛滤过除菌分装, -20°C 冻存备用。

1.2.2 成骨细胞与支架复合培养

(1) 成骨细胞的获取传代

实验用成骨细胞 (osteoblast, OB) 由中南大学湘雅医学院细胞中心提供, 系 SD 大白鼠骨髓基质细胞 (bone marrow stromal cell, BMSC) 经分离、诱导获得, 性状稳定, 生长活跃, 光镜下贴壁生长, 呈多角形或三角形, 胞浆丰富清晰, 为典型的成骨细胞形态特征^[9,10]。成骨细胞贴壁生长至 80% 以上时, 倾去培养液, PBS 液冲洗 2 次, 加入 0.25% 的胰蛋白酶液, 没至瓶底, 放入细胞孵箱 4~6 min, 倒置显微镜下观察细胞收缩变圆, 即加入 1, 2 ml 含 10% FCS 的培养基终止消化, 并以吸管反复吹打制成单细胞悬液, 按 1:3 传代接种于 25 ml 培养瓶, 置于 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度下培养, 隔日换液, 显微镜下观察细胞形态。选用第三代成骨细胞用于实验。

(2) 细胞接种支架培养

① 用 96 孔培养板, 每孔先加 100 μl 培养基, 再放入材料, 两种材料均设 1 d、3 d、5 d、7 d、9 d 组, 每组 3 孔。

② 将细胞浓度为 $2.0 \times 10^6/\text{ml}$ 的成骨细胞悬液 100 μl 接种于消毒备用的两种材料表面, 静置于 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度下培养 2 h, 取出翻转材料, 另一面加 100 μl 细胞悬液, 再置于 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度下培养 2 h, 然后加入培养基没过材料。

③ 继续培养 7~14d, 隔日换液 1 次, 倒置相差显微镜下观察材料边缘情况。

1.2.3 I 型胶原蛋白检测

(1) 细胞样本的制备

取常规培养的处于指数生长期的细胞, 仿上述方法用 F12 培养基制备成 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 细胞悬液, 接种于放置有洁净无菌盖玻片的 6 孔培养板中, 待细胞贴壁后, 以 PBS 液洗涤 2 次, 4°C 丙酮固定 20 min, 自然干燥后用于免疫组化和碱性磷酸酶染色。

(2) I 型胶原^[9,11]免疫组化染色

按 ABC 试剂盒说明操作步骤如下: ① 3% 双氧水孵育 10 min, 消除内源性过氧化氢酶活性; ② 蒸馏水漂洗, PBS 液浸泡 3 min \times 3 后, 以大白鼠血清工作液封闭, 室温下孵育 15 min, 倾去血清液; ③ 滴加一抗 (1:80), 4°C 过夜, PBS 洗 3 min \times 3; ④ 滴加生物素标记二抗工作液, 室温下孵育 15 min, PBS 洗 3 min

×3; ⑤ 滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液 (S-A/HRP), 室温下孵育 15 min, PBS 漂洗 3 min×3; ⑥ DAB 显色, 显微镜下控制显色程度; ⑦ 自来水冲洗, 脱水、透明, 中性树脂封片; ⑧ 用 PBS 液替代一抗作为阴性对照。

(3) 结果判定

光镜下, 阳性产物于成骨细胞的胞浆内或胞膜上可见棕黄色颗粒。

1.2.4 碱性磷酸酶^[12, 14] (ALP) 染色

(1) 成骨细胞碱性磷酸酶染色步骤如下: ① 揭去盖玻片, 用 PBS 液洗涤 6 孔培养板 5 min×4; ② 在 1 ml PBS 液中加入 20 μl BCIP/NBP 显色盒试剂, 混匀; ③ 标本风干后, 加显色液至标本; ④ 室温避光显色 20 min; ⑤ 自来水冲洗后, 梯度酒精脱水, 干燥封片。

(2) 结果判定: 阳性染色为蓝色颗粒。

1.2.5 支架联合培养成骨细胞计数

从培养液中将培养 1 d、3 d、5 d、7 d 的标本取出, PBS 液冲洗 3 次, 加入 1.0 ml 消化液 (含 0.25%胰蛋白酶, 0.02%EDTA) 消化 5 min, 用吸管吹打, 加入 0.1 ml PBS 终止消化, 用细胞计数板计数, 每孔重复 3 次, 取平均值。

1.2.6 统计学处理

所有计量资料均以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学分析均以 SPSS 10.0 软件进行处理。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异具有非常显著性意义。

2 结果

2.1 成骨细胞的联合鉴定及光镜观察

第三代大鼠成骨细胞增殖活跃, 接种 4 h 开始附壁生长, 沉降贴壁后展开成为不规则形, 有多个突起, 呈三角形、多角形, 1~3 个核仁, 胞浆丰富清晰, 汇合时可见铺路石状外观 (图 3-1a、b)。在支架上培养 9~12 d 后, 可见成骨细胞呈现复层生长, 排列呈条索状, 并见小钙化灶出现 (图 3-2)。光镜下可见两种高分子材料边缘成骨细胞生长, LDIG 组较 PDLLA 组略多 (图 3-3、图 3-4)。I 型胶原免疫组化染色呈强阳性, 光镜下可见部分成骨细胞的胞浆内或胞膜上有棕褐色颗粒, 形态不规则, 大小不一 (图 3-5)。碱性磷酸酶染色则表现为大多数细胞内出现不规则蓝色或蓝紫色颗粒, 大小深浅不一, 边界清楚 (图 3-6)。

2.2 细胞在两种支架上的增殖

经光镜下细胞计数板计数, 成骨细胞增殖情况见表 3-1, 图 5-7。材料表面的细胞数量随着时间延长而逐渐增加, 两组细胞自第 3 d 开始, 成骨细胞增殖较快, 与第 1 d 相比, 差异具有显著统计学意义 ($P < 0.05$)。至 5 d 后, 同 PDLLA

支架相比,成骨细胞在 LDIG 支架材料表面增殖较快,差异具有显著统计学意义 ($P < 0.05$),尤其 9 d 后,两组差异具有极显著性意义 (< 0.001)。

表 3-1 两组支架材料上成骨细胞增殖情况 ($\times 10^4$)

组别	复合培养时间 (d)				
	1	3	5	7	9
实验组	1.18±0.14	1.35±0.28	1.87±0.45	2.26±0.58	2.87±0.66
对照组	1.15±0.13	1.28±0.26	1.41±0.33	1.53±0.40	1.58±0.47
P 值	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.001

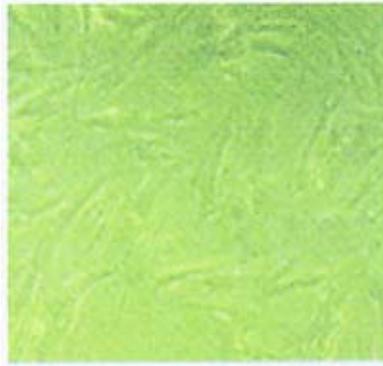


图 3-1a, 成骨细胞 (OB) 接种 4 h 开始附着生长, 沉降贴壁后展开成为不规则形, 有多个突起, 呈三角形、多角形 ($\times 100$)



图 3-1b, 成骨细胞 (OB) 沉降贴壁后展开成为不规则形, 有多个突起, 1~3 个核仁, 胞浆丰富, 汇合时呈铺路石状外观 ($\times 100$)。

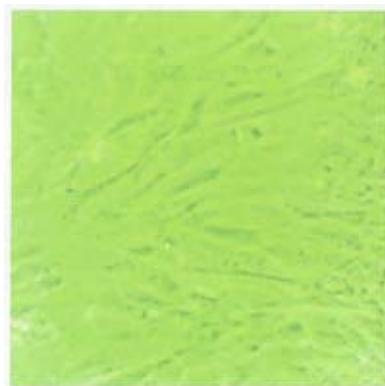


图 3-2, 在 高 分 子 支 架 上 培 养 9 d 后, 可 见 成 骨 细 胞 呈 现 复 层 生 长, 排 列 呈 条 索 状, 有 小 钙 化 灶 出 现 (x100).



图 3-3, 光 镜 下 可 见 PDLA 材 料 边 缘 成 骨 细 胞 生 长, 数 量 较 少 (x40)

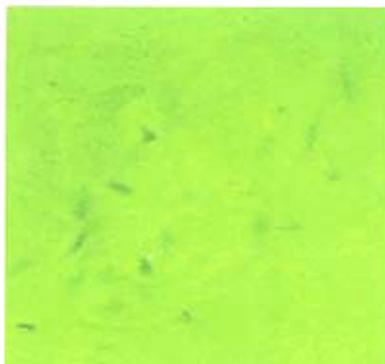


图 3-4，光镜下可见 LDIG 材料边缘成骨细胞生长，数量较 PDLLA 组略多 (x40)。

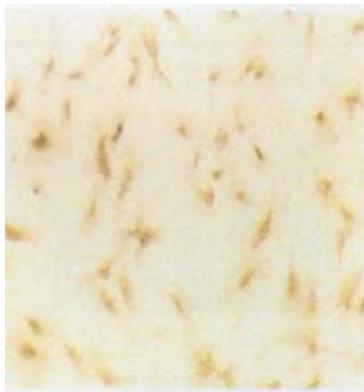


图 3-5，I 型胶原免疫组化染色呈强阳性，光镜下可见部分成骨细胞的胞浆内或胞膜上有棕褐色颗粒，形态不规则，大小不一 (x100)。



图 3-6, 碱性磷酸酶染色阳性: 大多数细胞内出现不规则蓝色或蓝紫色颗粒, 大小深浅不一, 边界清楚 (x100)。

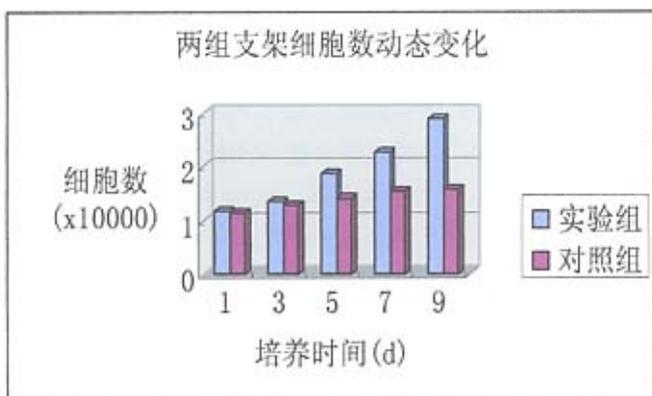


图 3-7, 两组支架上成骨细胞增殖较快, 与第 1 d 相比, 差异具有显著统计学意义 ($P < 0.05$)。至 5 d 后, 同 PDLLA 支架相比, 成骨细胞在 LDIG 纳米材料表面增殖较快, 差异具有显著统计学意义 ($P < 0.05$), 至 9 d 后, 两组差异具有极显著性意义 ($P < 0.001$)

3 讨论

3.1 组织工程骨组织的构建

组织工程骨组织的建造总体上分为体内建造和体外建造两种形式^[14~18]。体内建造是将成骨细胞-支架复合物直接植入体内修复骨缺损。体外建造是通过体外组织培养的方法应用水降解支架材料接种成骨细胞建造骨组织。其基本步骤是：在体外分离培养细胞，将一定量的细胞种植到具有一定空间结构的三维立体支架上，然后将细胞-支架复合体植入体内或在体外继续培养，通过细胞之间的相互粘附，生长繁殖，分泌细胞外基质，形成具有一定结构和功能的组织器官。体外建造具有某些体内建造无法替代的优越性，如直观、可控，重复性好等。

组织工程骨按其构成原理^[19,20]有三种：支架材料+成骨细胞，支架材料+生长因子，支架材料+成骨细胞+生长因子。不论哪一种构成方式均离不开支架材料，应用孔隙状可降解聚合物为支架是当前研究最多^[21~26]的课题。本实验就是将两种多孔高分子材料制备成直径 $5.0 \times 5.0 \times 1.5$ mm的方形薄片，然后接种成骨细胞复合培养。光镜下可见细胞生长活跃，并分泌骨基质，约5~7天时，扫描电镜下显示细胞在材料表面呈锚状牢固贴附，分泌的细胞外基质包裹于细胞周围。

3.2 孔径和孔隙率对成骨细胞的影响

孔径和孔隙率是骨组织工程支架材料的两个主要评价指标^[25,26]，也是学者们普遍关注^[27~29]的指标。在体外悬液中，成骨细胞直径约 $20 \mu\text{m}$ ，附着时细胞直径约 $30 \mu\text{m}$ ，一个成骨细胞占据的面积约 $700 \mu\text{m}^2$ ，一般认为孔径小于 $100 \mu\text{m}$ ，不利于骨长入。Robinson等^[30]认为孔径在 $200 \sim 300 \mu\text{m}$ 有利于骨介导。孔隙率要求在能维持一定外形的情况下，应尽可能高而有利于细胞种植，常规细胞种植技术只能在使用75%以上的孔隙率的材料才能成功。

Widmer等^[7]在注模过程中加入不溶于溶剂的结晶颗粒(盐、糖等)，通过筛网控制颗粒的大小，通过改变颗粒的重量分数控制孔隙率，得到了孔隙率在80%以上的泡沫材料。而采用层加技术，可以将PDLLA加工成均匀多孔，三维立体聚合物泡沫材料。Attawia等^[31~34]用三维立体的多孔聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)培养成骨细胞，12 h后有80%的细胞粘附在PLGA材料上，24 h后细胞已经开始增殖。

本实验使用的LDIG支架材料孔径为 $100 \sim 300 \mu\text{m}$ ，孔隙率达到82.6%，大小孔隙相互连通；PDLLA支架材料孔径为 $100 \sim 200 \mu\text{m}$ ，孔隙率85%以上。两种材料孔径和孔隙率均适于足量成骨细胞的存留和迁入，支架有效空间大，可以为种子细胞粘附、分化及成骨提供适宜的场所。另外，聚合物支架中小孔相互连通，大孔中还包含有无数小孔，这种多孔结构为细胞生长、营养物质和代谢产物的运输、组织的长入和血管形成创造了条件。本实验观察到高分子支架材料与成骨细

胞在体外环境中有良好的复合能力,并随培养时间的延长,细胞支架中成骨细胞的数量有明显的增加,证明成骨细胞在支架中进行了正常的增殖,且性能优于对照组。

3.3 高分子支架材料的骨细胞相容性

可降解的组织工程支架材料应具有良好的生物相容性,即要求材料不仅在使用的全过程对组织细胞无毒副作用,而且与细胞有好的亲和力或相互作用。骨细胞相容性研究属于骨组织工程材料生物相容性检测的范畴。体外细胞培养法直接方便、敏感快捷、条件可控、直观性和重复性好,现已被广泛用于对材料细胞相容性、界面结合机制研究以及新材料的筛选等^[4,35,36]。生物材料的细胞相容性与生物学评价中提到的细胞毒性不同,前者侧重的是材料与细胞之间的相互关系,即材料与细胞的双相影响。所以,我们选用植入部位的功能细胞—成骨细胞,既能反映材料的细胞毒性,又能考察材料与细胞之间的相互作用,从更深层次探讨材料与细胞界面结合的机制,与体内环境更为接近。

骨组织是通过骨基质钙化形成的,而骨基质由成骨细胞所合成、分泌。成骨细胞的主要功能^[37~42]是分泌碱性磷酸酶(ALP),合成I型胶原等细胞外基质,进一步基质矿化形成骨组织,成骨细胞的这些特征被作为其鉴定及成骨作用的评价标准。ALP^[43~45]是成骨细胞分化的重要标志酶之一,ALP活性越高,说明前成骨细胞向成熟成骨细胞分化越明显。在基质开始钙化时,成骨细胞的碱性磷酸酶(ALP)活性最高,在钙化接近结束时,活性则最低,其活力在一定程度上反映了成骨细胞的分化程度和功能状态。I型胶原免疫组织化学染色阳性,表明培养的细胞具有旺盛的合成和分泌功能,对骨的钙化起着关键作用。

成骨细胞作为骨组织的主要功能细胞,承担着骨的修复和改建功能,因而将成骨细胞接种在高分子支架上,以此考察其形态与功能变化,实验证明,新型高分子支架材料具有良好的骨细胞相容性。选择PDLLA作为对照,一方面是因为该材料是当前骨组织工程领域研究和应用广泛的聚乳酸类聚合物,另一方面是因为该材料具有良好的加工性能和较高的分子量(3.8×10^4 道尔顿),其作为细胞支架材料的生物相容性已被大量研究^[22,25]所证实。本实验结果显示,成骨细胞在LDIG材料表面的增殖速度快于PDLLA,说明LDIG高分子材料的骨细胞相容性优于PDLLA材料。

4 小结

大鼠成骨细胞能在多孔高分子支架材料表面正常粘附、爬行、增殖并分泌细胞外基质,说明该材料具有良好的骨细胞相容性。

参考文献

- [1]. Niedzwiedzki T, Dabrowski Z, Miszta H, et al. Bone healing after bone marrow stromal cell transplantation to the bone defect[J]. *Biomaterials*, 1993,14:115.
- [2]. 刘旺, 邹京宁, 陈玉林, 等. 无细胞异种真皮与表皮细胞膜片复合移植的研究[J]. *中国医师杂志*, 2001,3(10):733-735.
- [3]. Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI. Culture-expanded periosteal-derived cells exhibit osteoblast chondrogenic potential in porous calcium phosphate ceramics in vivo[J]. *Clin Orthop*, 1992,276:291-298.
- [4]. Itakuta Y, Kosugi A, Sudo H, et al. Development of a new system for evaluating biocompatibility of implant materials using an osteogenic cell line[J]. *J Biome Mat Res*, 1988,22(4):613-622.
- [5]. 张胜民, 李世普, 阎玉华, 等. 骨组织工程用聚DL-乳酸多孔三维结构的制备与表征[J]. *生物医学工程学杂志*, 1999,16 :105-106.
- [6]. 史廷春, 岳秀艳, 熊卓, 等. 可降解聚合物多孔骨框架的快速制造[J]. *生物医学工程学杂志*, 2002, 19 (2):348-349.
- [7]. Widmer MS, Gupta PK, Lu L, et al. Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration[J]. *Biomaterials*, 1998, 19(21):1945-1955.
- [8]. 张超, 胡蕴玉, 白建萍, 等. 骨膜成骨细胞分离培养的方法[J]. *第四军医大学学报*, 2001,22 (11) :978-980.
- [9]. Knabec, Gildenhar R, Berger G, et al. Morphological evaluation of osteoblasts cultured on different calcium phosphate ceramics[J]. *Biomaterials*, 1997, 18(7): 339-1347.
- [10]. Beresford JN, Bennet JH, Devlin C, et al. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures[J]. *J cell sci*, 1992,102:341.
- [11]. Kim HD, Valentini RF. Human osteoblast response in vitro to PDGF and TGF- β delivered from controlled-release polymer rods[J]. *Biomaterials*, 1997,18 (8):1175-1184.
- [12]. 韩君, 陈锐, 陈槐卿, 等. 大鼠骨髓基质细胞的生长特点和在诱骨条件下的成骨特性[J]. *华西医科大学报*, 2001, 32(2):235-239.
- [13]. 郭昭庆, 党耕町, 王志国. 成人成骨细胞培养[J]. *中华骨科杂志*, 1995, 9(15),9:627-630.
- [14]. Cerroni L, Filocamo R, Fabbri M, et al. Growth of osteoblast-like cells on porous

- hydroxyapatite ceramics:an in vitro study[J].Biomolecular Engineering,2002,19(2):119-124.
- [15]. Sandhu HS,Kanim LE,Kabo JM,et al.Effective doses of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in experimental spinal fusion[J].Spine,1996,21(18):2115-2122.
- [16]. Higashi S.Polymer-hydroxyapatite composites for biodegradable bone fillers[J].Biomaterials,1986,7(2):183-187.
- [17]. Stal S,Tjelmeland K,Hick J,et al . Compartmentalized bone regeneration of cranial defects with biodegradable barriers:an animal model[J]. J Craniofac Surg,2001,12 (1);41-47.
- [18]. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, et al. Bone regeneration by implantation of purified,culture-expanded human mesenchymal stem cells[J].J Orthop Res,1998,16(2):155-162.
- [19]. Rose FR,Oreffo RO.Bone tissue engineering:hope vs hype[J].Biophys Res Commun.2002,292(1):1-7.
- [20]. Rizzi SC,Heath DL,Coombes AG,et al.Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites:surface analysis and initial attachment of human osteoblasts[J].J Biomed Mater Res,2001,55(4):475-486.
- [21]. 朱惠光, 计剑, 高长有,等. 聚乳酸组织工程支架材料[J].功能高分子学报, 2001,14(4):487-492.
- [22]. 谭祖键,李起鸿,许建中,等. 聚乳酸作为骨形态发生蛋白载体修复骨缺损的实验研究[J]. 中华骨科杂志,2000,20(12):742-746.
- [23]. Stoller NH,Johnson LR,Garrett S,et al. Periodontal regeneration of a class II furcation defect utilizing a bioabsorbable barrier in a human :a case study with histology[J].J Periodontol,2001,72 (2):238-242.
- [24]. 俞耀庭. 生物医用材料[M].天津: 天津大学出版社,2000. 48-49.
- [25]. 王常勇,王 勤,毛天球,等.生物降解聚合物-聚乳酸泡沫材料(D,L-PLA)的研制及物理机械性能检测[J].生物医学工程学杂志,2000,17(4):396-399.
- [26]. Lu HH, El-Amin SF, Scott KD, et al. Three-dimensional, bioactive, biodegradable, polymer-bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro[J].J Biomed Mater Res,2003,64(3):465-474.
- [27]. Mikos AG, Sarakinos G,Lyman MD, et al. Preparation of porous biodegradable polymers[J]. Biotech Bioengin, 1993,6:427.

- [28]. Hillsley MV, Frangas JA. Review:Bone tissue engineering:the role of interstitial fluid flow[J]. *Biotechnol Bioeng*,1994, 43(7):573-581.
- [29]. Golden MA,Hanson SR,Kirkman TR, et al.Healing of polytetrafluoroethylene arterial grafts is influenced by graft porosity [J].*J Vasc Surg* ,1990, 11(6):383-385.
- [30]. Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, et al. Regulation of human bone marrow derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors[J]. *J Clin Invest* 1995,95(2):881.
- [31]. Attawia MA ,Herbert KM,Laurencin CT. Osteoblast-like cell adherence and migration through 4-dimensional porous polymer matrices [J].*Biochem Biophys Commun*,1995,213(2):639-644.
- [32]. Miki T,Imai Y. Osteoinductive potential of freeze-dried, biodegradable,poly (glycolic acid-co-lactic acid) disks incorporated with bone morphogenetic protein in skull defects of rats [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*,1996,25 (5): 402-406.
- [33]. Miki T, Masaka K, Imai Y,et al . Experience with freeze-dried PGLA/HA/rhBMP-2 as a bone graft substitute[J]. *J Craniomaxillofac Surg*,2000,28 (5): 294-299.
- [34]. Mike T,Masaka K,Imai Y,et al.Experience with freeze-dried PGLA/HA/rhBMP-2 as a bone graft substitute[J].*J Craniomaxillofac Surg*,2000,28(5): 294-299.
- [35]. Wiess KG,Heinemann DE,Ostermerier D,et al.Biomaterial properties and biocompatibility in cell culture of a novel self-inflating hydrogel tissue expander[J].*J Biomed Mater Res*,2001,54(2):179-188.
- [36]. Winn SR,Hollinger JO.An osteogenic cell culture system to evaluate the cytocompatibility of osteoset,a calcium surface bone void filler[J]. *Biomaterials*,2000,21(23):2413-2425.
- [37]. Amsel S, Dell ES. Bone formation by hemopoietic tissue:separation of preosteoblasts from hemopoietic stem cell function in the rat[J]. *Blood*, 1992,39(20):267.
- [38]. Martinez ME, Medina S, Campo MT, et al.Effect of polyethylene on osteocalcin,alkaline phosphatase and procollagen secretion by human osteoblastic cells[J]. *Calc Tiss Int*,1998,62:453-456.
- [39]. Fleet JC, Hock JM. Identification of osteocalcin mRNA in nonosteoid tissue of

- rats and humans by reverse transcription-polymerase chain reaction[J]. *J Bone Miner Res*, 1994,9:1565-1573.
- [40]. Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM, et al. Formation of surface reaction products on bioactive glass and their effects on the expression of the osteoblastic phenotype and the deposition of mineralized extracellular matrix[J]. *Biomaterials*, 1997,18(4):295-298.
- [41]. Murphy WL, Simmons CA, Kaigler D, et al. Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis[J]. *Dent Mater Res*, 2004,83(3):204-210.
- [42]. Lynch MP, Stein JL, Stein GS, et al. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization[J]. *Exp Cell Res*, 1995,216(1):35-45.
- [43]. Huamin J, Ci Z, Hui S. Determination of Pretransplant viability of leydig cells by MTT Colorimetric Assay[J]. *Transplantation Proceedings*, 2002,34:3419-3421.
- [44]. Hart DA, Sciore P, Boykiw R, et al. Pregnancy induces complex changes in the pattern of mRNA expression in knee ligaments of the adolescent rabbit[J]. *Matrix Biol*, 1998,17:21-34.
- [45]. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, et al. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow[J]. *Bone*, 1992,13(1):81-88.

全文结论

1. 本研究以赖氨酸二异氰酸酯-甘油共聚物通过超临界抗溶剂结晶技术 (SAS) 成功制备出多孔高分子支架材料, 其平均孔径为 $100.0\sim 400.0\ \mu\text{m}$ ($276.0\pm 87.2\ \mu\text{m}$), 孔隙率为75.6%; 通过一系列方法对高分子材料进行表征, 证实该高分子材料具有作为组织工程支架材料所需要的理化性能; 制备高分子支架材料的全过程均采用无毒原料和无毒工艺, 有机溶剂基本去除, 获得的高分子材料对机体无毒, 符合“绿色化学”观点。
2. 通过对高分子支架材料 (LDIG) 进行急性毒性实验、溶血反应、热原实验和肌肉内植入实验, 结果表明, 该材料无毒性, 无热原性、不引起溶血反应, 植入后局部组织反应小, 生物相容性良好。
3. 大鼠成骨细胞能在多孔高分子支架材料表面正常粘附、爬行、增殖并分泌细胞外基质, 说明该材料具有良好的骨细胞相容性。

综述

高分子组织工程材料的应用进展

齐贵新综述 张阳德审校

摘要: 高分子材料在组织工程领域的研究日益广泛深入,可降解、多孔隙的细胞外支架对调节细胞生长和功能分化有重要意义,高分子支架材料的选择和制备技术是组织工程的关键。本文综述了组织工程领域常用的高分子材料和最新进展。

关键词: 高分子材料; 组织工程; 多孔支架; 制备技术

Progress of application of polymeric materials for tissue engineering

QI Gui-xin, ZHANG Yang-de

Abstract: Research of polymeric materials in the tissue engineering field is increasingly extensive and profound, porous biodegradable polymeric materials provide a scaffold and for cell proliferation and play an important role in regulating cell growth and functional differentiation. To choose and prepare available polymeric materials is crucial to constructing tissue-engineered bone successfully. In this article, polymeric materials usually employed in tissue engineering, the latest progress are systematically reviewed.

Key words: polymeric materials; tissue engineering; porous scaffolds; preparative methods

1 引言

组织工程的关键技术之一就是具有良好生物相容性和生物降解的生物材料制备成具有特定形状和相连孔结构的三维多孔细胞支架(细胞外基质替代物)。

组织工程学是应用生命科学与工程学的原理和方法来设计、组建、维护人体细胞和组织的生长，以恢复损伤的组织或器官的功能和形态的一门新兴学科^[1]。其基本方法是将体外培养的高浓度的功能相关的活组织细胞扩增，种植于一种生物性能良好、可降解的天然或人工合成的细胞支架上，然后将它们共同移植到所需部位，在机体内细胞继续增殖，而生物支架结构则逐渐被降解、吸收，结果形成新的有功能的组织器官，从而达到修复结构、恢复功能之目的^[2~4]。高分子生物材料是组织工程研究的重要内容，其中骨组织工程支架材料的研究已成为当前的热点之一。

2 常用于组织工程的高分子材料

2.1 天然高分子材料

常用的天然高分子生物材料主要包括多糖类和蛋白质两大类。前者有纤维素、甲壳素、硫酸软骨素、透明质酸等；后者主要是结构蛋白如胶原和纤维蛋白等。天然高分子的优点是包含许多生物信息，有很好的生物相容性，与活体组织接触后一般不会发生血液凝固、炎症或排异反应等现象，缺点是来源有限、难以规模化生产。

2.1.1 透明质酸

透明质酸(hyaluronic acid, HA)是一种结构简单的氨基聚糖，存在于脊椎动物的连接组织、关节滑液和软骨中，因结构疏松、含水及多孔性而特别适于细胞的迁移及增殖，可作为软骨细胞在体外培养的基质。将HA植入物的三维支架可使软骨细胞和间充质干细胞在支架上有效地增殖^[5]。其它多糖类还有琼脂糖、明胶、硫酸角质素等。

2.1.2 纤维素

纤维素(cellulose)是含量最多的有机高分子物质，是植物细胞壁的主要成分。纤维素具有良好的吸水性，主要用于创面处理，在酸作用下降解得到葡萄糖。

2.1.3 甲壳素

甲壳素(chitin)是一种来源于甲壳动物的天然多糖，常与蛋白质以共价键结合形式存在，在碱液中脱乙酰基即得壳聚糖(chitosan)。壳聚糖生物相容性好，制成钉或棒形材料，可在皮下和骨内埋植，有助于骨折愈合^[6, 7]，并有镇痛、杀菌、干燥和止血的效果。

2.1.4 胶原蛋白(collagen)

即胶原，是动物体内含量最丰富的蛋白质，约占人体蛋白质总量的30%以上，其基本结构单位是由3条肽链构成的三股螺旋结构^[8]。在细胞培养中，胶原能促进多数细胞的生长、分化、生殖和代谢。胶原与羟基磷灰石和磷酸三钙制成

糊状复合材料,可治疗急性骨折和创伤骨缺损^[9]。胶原也是软骨组织工程中培养软骨细胞的支架材料,Wkitanis 报道用包埋于胶原凝胶中的软骨组织进行修复兔关节软骨的研究。胶原的缺点是机械强度小、降解太快。

2.1.5 纤维蛋白

纤维蛋白作为天然细胞外基质,有较好介导细胞间信号传导及其相互作用的性能。Haisch 等^[10]用纤维蛋白凝胶和另一种聚合物材料构建一种体外组织工程软骨的新模型,将软骨细胞与纤维蛋白质交联后以生物相容性可吸收的聚合物进行包裹是体外软骨产生的较理想方法^[11]。纤维蛋白胶也是表皮细胞培养的基质和载体^[12]。

2.2 人工合成高分子材料

人工合成的高分子材料由于具有良好的物理机械性能,可以精确地控制其分子量,设计制造过程中能对材料的许多性能进行控制,易加工成不同的形状等特点而广泛用作生物材料。合成高分子材料在组织工程中的应用可分为两个方面,一是与细胞或组织复合,形成具有特定功能的人工器官;二是与细胞或组织复合,高分子起暂时支架的作用,在组织生长过程中逐步降解。

2.2.1 脂肪族聚酯

有良好的生物相容性,在生物体内降解,并随生物组织的生长而逐渐消失。常用的有聚乳酸(polylactic acid, PLA)、聚乙醇酸(polyglycolic acid, PGA)和聚羟基丁酸等。高分子量的PLA通常用丙交酯的开环聚合来制备^[13, 14]。PLA可用作骨折内固定及组织修复材料、软骨组织培养支架及人工真皮等^[15, 16]。PLA与聚氨酯共聚可改善其机械性能^[17],与聚氧化乙烯(PEO)共混制备可生物降解PLA多孔膜^[18]。聚乙醇酸(PGA)也是一类用得较多的生物降解材料,与PLA共混形成复合聚合物(PGA-PLA)^[19],以提高支架对细胞的粘附力。

2.2.2 医用聚氨酯(PU)

PU具有优异的力学强度、高弹性、耐磨性、润滑性、耐疲劳性、生物相容性、可加工性等性能,因此被广泛用于生物材料,尤其是血液接触材料以及组织工程中的支架材料,以促进细胞和组织的再生。采用热致相分离(TIPS)法制备PU微孔膜,并对膜表面进行光化学接枝和固定生物活性分子,能得到氨基化、羟基化、羧基化、酰胺化及阳离子化聚氨酯表面,使聚氨酯材料具有良好细胞相容的^[20, 21]。

2.2.3 聚氨基酸

是一类新型聚合物,具有良好的生物相容性,其降解产物体内可吸收。但目前尚缺乏理想的生成高分子量聚氨基酸的聚合方法,使其实际应用受到限制。

2.2.4 医用硅橡胶

有机硅橡胶主要采用薄膜形式,当前主要用于制作人工皮。硅橡胶具有很多医学材料的性能:①良好的生物惰性;②很高的透气性和透气选择性;③耐生物老化性;④无味无毒无致癌性;⑤有较好的抗血栓性能;⑥易于消毒灭菌。

2.2.5 聚甲基丙烯酸羟乙酯(PHEMA)

PHEMA不含水时和有机玻璃一样,是一种透明无色的固体,可进行机械加工,吸水后变成柔软而富有弹性的水凝胶。该材料亲水、透氧,具有良好的生物相容性,可煮沸消毒。PHEMA可用作喷雾的粉状烧伤敷料,适用于皮肤的Ⅲ、Ⅳ度烧伤。

其它用于组织工程的高分子材料有聚四氟乙烯、聚酞类、聚乙烯醇等。

3 组织工程支架的制备

3.1 组织工程支架的制备要求

在骨组织工程中,多孔支架起到细胞外基质的作用,是对细胞外基质的结构和功能的仿生^[22]。用于骨组织工程的支架材料一般应具备以下性能^[23, 24]:①良好的生物相容性,即无明显的炎性反应、免疫性和细胞毒性;②合适的生物可降解性,即与细胞、组织生长速率相适应的降解吸收速率;③合适的孔径(200~400 μm)和高孔隙率(>90%)以及相连的孔结构;④具有很强的渗透能力;⑤具有良好的力学性能为细胞提供适宜的微应力环境;⑥具有适宜的表面结构以促进细胞的粘附;⑦促进细胞分泌细胞外基质的能力;⑧充当信号分子如生长因子的载体;⑨易于塑形和重复制作;⑩易于消毒、消毒过程不影响支架材料的性能。

骨组织工程的关键技术之一就是生物材料制成具有特定形状和孔隙结构的三维支架。关于多孔支架的制备方法已有不少报道^[22, 25~27]。组织工程多孔支架孔结构具有4个尺寸等级:解剖外形和尺寸(~cm)、大孔尺寸(~102 μm)、孔壁尺寸(~ μm)、孔壁内微细结构尺寸(如微纤,微孔,50~500 nm)。从制备方法上看,大孔尺寸、孔壁尺寸、孔壁内微细结构取决于致孔方法,而解剖外形和尺寸则取决于成型方法。因而,组织工程支架的制备通常分为致孔和外形成型两个层次,二者必不可少,相互结合才能制得满足要求的支架。因而,组织工程多孔支架的制备也主要有两个方面的问题需要解决,即获得相连的多孔结构和合适的外形。

3.2 组织工程支架的制备方法

3.2.1 纤维粘接

组织工程中最先采用的一种方法是以PGA纤维作为支架材料。Mikos等采用纤维固定技术将PGA纤维浸入到PLLA的氯仿溶液中,待溶剂挥发后,PGA纤维网嵌入到PLLA中。另一种方法是通过雾化或喷雾对纤维表面进行涂层^[28]。

3.2.2 溶液浇铸/粒子沥滤

溶液浇铸/粒子沥滤技术^[29, 31]的优点是可形成孔径和孔隙率可控的聚合物骨架。其方法是：将聚合物溶解在氯仿中，然后将溶液浇铸到充满致孔剂（盐粒）的培替氏培养皿上，溶剂挥发后，将混合物在水中沥滤除去致孔剂。骨架的孔隙率由所加盐的用量来控制，孔的直径由盐晶粒的大小决定。当盐的重量百分比达到或超过70%时，孔与孔之间高度相互连通。将采用这一技术制备的泡沫材料应用于不同类细胞的培养，并未观察到材料对新组织的形成有任何不良的影响。然而，泡沫暴露在空气中的外侧部分比浸润在培养皿中的部分粗糙，即两部分具有不同的形态，故采用该技术不能制备太厚的骨架，一般在2 mm 以下。

3.2.3 熔融成型

与粒子沥出相似，不使用有机溶剂。方法是：将PLGA 粉末与明胶粒子混合物放在四氟乙烯模具中，将模具加热到超过PLGA的玻璃化温度(Tg)，加压使PLGA 和明胶粒子结合在一起。冷却后将复合物放入水中，明胶粒子溶解后得到PLGA骨架。所制备的骨架可用于生物活性分子的控制释放，也可以构造复杂的三维骨架^[26]。

3.2.4 气体发泡

以气体作为致孔剂。方法是：在加热模具中通过模压成型制备PGA、PLLA 或PLGA 固体片材。将固体片材置于高压CO₂(515MPa)室内3天，然后使压力快速下降到大气压，使聚合物中形成气穴。所得支架的孔隙率高达93%，孔直径达100 μm。其优点是不需滤除，不使用有机溶剂^[31, 32]，但孔隙之间大多数是非连通的。

3.2.5 相分离/乳化

包括乳化/冷冻干燥和液-液相分离^[33, 34]。方法是：PLGA 溶于CH₂Cl₂后，加水形成乳状液，浇铸到模具中，置于液氮中骤冷，然后将支架于-55℃下冷冻干燥。制备的支架孔隙率高达95%，但孔径很小（13~35 μm）。孔隙率和孔直径的大小主要取决于高分子溶液/水的比以及乳状液的粘度，因为这些参数在骤冷之前可影响乳状液的稳定性。因此，对这些参数进行调控，可望提高孔的尺寸。该技术具有许多优点，也不需特殊的洗涤/沥滤步骤，但有机溶剂的使用限制了细胞和生物活性分子的引入；同时考虑到该技术所得到的孔尺寸较小，表明这一技术目前在组织工程领域中的应用还存在局限性。

3.2.6 热致凝胶化

纳米级纤维基质由聚合物溶液经过热致凝胶化、溶剂交换和冷冻干燥过程制备^[35]。高凝胶化温度得到的一般为片晶状结构；低凝胶化温度得到的是纳米级结构。此法制备的支架孔隙率高达98.5%，孔径在50~500 μm范围内。纳米级纤维基质的表面/体积比较纺织技术所得无纺网状织物或粒子-沥滤技术制备的泡沫

高出2~3个数量级。这一新技术制备的高度多孔结构因结合了生物可降解聚合物和细胞外基质的纳米结构而更类似于天然细胞外基质，因此，有可能为细胞的贴附和功能性提供一个更好的环境。

3.2.7 聚合物微球聚集法

将可降解高分子微球加入模具中，加热至玻璃化温度(T_g)以上，保持一定时间后冷却、脱模可制得烧结微球支架。热处理时微球相互接触处由于链运动而连结在一起，冷却至室温后该结构被固定下来，因而得到多孔的烧结微球支架。微球紧密堆积产生的孔隙成为支架的孔，孔尺寸范围为 $37\sim 150\mu\text{m}$ ，与微球尺寸成正比，孔隙率则随微球尺寸增大略有增加，为 $31\sim 39\%$ ，孔相连续性很好。支架压缩模量为 $241\sim 349\text{Mpa}$ ，随微球尺寸减小而增大。该支架的孔隙率与松质骨中组织分率(30%)相近，力学性能也与松质骨相当，因而可作为松质骨修复的“负”模板，修复完成后孔的部分成为组织，聚合物微球部分降解后成为松质骨的孔隙。该法优点在于孔相连续性好，孔尺寸易调控，力学强度大，缺点则在于孔尺寸偏小，孔隙率亦低。

3.2.8 相连管道“负”支架法

将水溶性糖纤维预构具有特定结构的三维“负”支架，“负”支架经水蒸汽处理后形成连结，然后将聚合物溶液滴在“负”支架上，冷冻使聚合物溶液凝胶化，用水浸出糖纤维，然后冷冻干燥脱除溶剂，得到的多孔支架孔隙率高达90%以上，并具有纳米纤维孔壁结构^[36]。“负”支架的构建既可手工完成，也可用快速成型技术来实现自动化。与通常的快速成型技术不同的是，首先形成的是最终的多孔支架的“负”复制品。该支架的相连管状孔道结构更有利于支架内的传质过程，其纳米纤维孔壁结构则更有利于细胞粘附。

3.3 组织工程多孔支架外部成型技术

将传统的模压成型与粒子浸出等致孔方法相结合，将聚合物/致孔剂混合物在聚合物玻璃化温度(T_g)以上进行模压，然后浸出致孔剂粒子，可制备外形复杂的三维多孔支架。或采用特殊的模具设计模压成型，如基于溶剂的冷压/粒子浸出法和热压/粒子浸出法^[37]。前者利用含少量溶剂的可降解高分子/致孔剂混合物在室温下的可塑性和尺寸稳定性、后者利用可降解聚合物/致孔剂混合物在 T_g 以上的可塑性和 T_g 以下的尺寸稳定性，分别将加工对象以模压方法成型，脱模后浸出致孔剂粒子，从而获得外形复杂、孔隙率高于90%的多孔支架。这两种新的制备方法具有设备和过程简单、脱模容易、所得支架外形复杂、孔隙率高、孔分布均匀、孔结构相连通等特点。

应用机械制造领域的快速成型法(rapid prototyping manufacturing, RPM)亦可制备骨组织工程三维多孔支架。三维打印(3-dimensional printing, 3-DP)

和熔融堆积成型(fused deposition modeling, FDM)是目前用于多孔支架制备的两个主要的快速成型方法。三维打印(3-dimensional printing, 3-DP)和熔融堆积成型(fused deposition modeling, FDM)是目前用于多孔支架制备的两个主要的快速成型方法。三维打印技术首先由MIT 开发成功,并很快用于组织工程多孔支架的制备^[39]。三维打印法制备多孔支架时,打印喷头依次“打印”出高分子粉末和粘合剂,粘合剂将粉末粘合成一层,在计算机控制下,按预定程序逐层打印,即可形成三维支架。三维打印在室温下进行,但所得支架的孔尺寸偏小,力学性能和成型精度尚有待于提高。

4 高分子材料的新技术

4.1 高分子纳米粒子的制备

4.1.1 分散法

包括溶剂蒸发法、自乳化/溶剂扩散法(spontaneous emulsification/solvent diffusion method)、盐析/乳化-扩散法(salting out/emulsification-diffusion method)等^[39]。① 溶剂蒸发法:聚合物先溶于有机溶剂,然后加入水中,形成水包油的乳液,再将有机溶剂蒸发。此法也用于制备载药的高分子纳米粒子。② 自乳化/溶剂扩散:采用与水互溶的有机溶剂(如丙酮)与水同时扩散,因界面湍流形成较小的粒子。纳米胶粒具有典型的核-壳结构,粒径均匀,大小可控。③ 盐析/乳化-扩散法^[40]:美国的Allemann实验室采用此法,不需有机溶剂。

4.1.2 聚合法

用自由基(单体)聚合可以合成大小可控的温敏性高分子纳米凝胶。该凝胶在室温下处于膨胀状态,而高于体温时则收缩。

4.2 超临界流体技术^[41~43]

4.2.1 应用超临界流体技术制备纳米粒子

(1) 超临界流体快速膨胀技术^[44~46](RESS)

RESS技术是先将溶质溶解在超临界流体中,然后在极短时间内($10^{-4} \sim 10^{-5}$ s)通过一个喷嘴($25 \sim 60 \mu\text{m}$)快速减压使流体膨胀到低压或常压体系,利用强烈的机械扰动达到极高的过饱和度(约 10^6)和均相成核条件,从而产生粒径及形态分布均匀的亚微米级至纳米级的超细微粒。Tom等^[47]用超临界 CO_2 制备了多乳酸和豆甾醇微粒。Turk^[48,49]则用超临界 CO_2 在预膨胀压力为 $13 \sim 30 \text{MPa}$,预膨胀温度为 $350 \sim 420 \text{K}$,喷嘴直径为 $50 \mu\text{m}$ 条件下制备了粒径为 $100 \sim 150 \text{nm}$ 的灰黄霉素纳米粒。

(2) 超临界流体抗溶剂结晶技术(SAS)

许多物质溶于有机溶剂但不溶于超临界流体,同时超临界流体在许多有机溶

剂中溶解度很大,以SCF为抗溶剂与溶液相混合,使溶液膨胀形成微滴,在较短的时间内形成较高的过饱和度,溶质结晶析出,得到粒度分布均匀的晶体颗粒。SAS技术已在物质重结晶、天然产物的分离及微粒制备等^[60,61]方面得到广泛的应用。

(3) 超临界流体包覆技术制备纳米胶囊

Tom等^[62]认为SAS有利于制造蛋白颗粒,而RESS更适合药物颗粒的包覆控释。其原理是溶解有两种不同溶质的SCF通过一个喷嘴进行减压膨胀,通过控制萃取和预膨胀条件来控制细颗粒和包覆剂成核的先后顺序,包覆剂在细颗粒析出后即刻析出,包覆在细颗粒周围形成较理想的球形包覆颗粒。

5 问题和展望

高分子材料在组织工程中的应用研究已取得了很大进展,然而,在已知的天然高分子、合成高分子材料及其复合材料中,当前尚没有一种符合所有条件、真正理想的骨组织工程支架材料,组织工程需要继续深入研究。当前,对已有材料的性能进行改进,以改善其加工、机械性能以及提高其生物相容性是十分必要的。可以采用表面改性、生物因子固定化等手段,或将人工合成的高分子材料与天然生物材料偶联起来,以制备兼有二者优点的新型材料,这是比较方便的方法。针对不同组织、器官的特点,设计与合成新型生物材料,进而制备专用的骨组织工程支架,将是高分子组织工程材料发展的重要方向之一。相信随着科学技术和各学科的相互渗透,理想的组织工程骨必将从实验研究转入临床应用。

参考文献

- [1]. Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering[J]. Science, 1993,260(8):920.
- [2]. Langer R. Tissue Engineering[J]. Sciences, 1993,260(5110):529.
- [3]. Crane GM, Lshaug SL, Mikos AG, et al. Bone tissue engineering[J]. Nature Medicine, 1995,1(12):1322.
- [4]. Vacanti CA, Upton J, Tissue engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices[J]. Clin Plast Surg, 1994,27(3):445.
- [5]. Lisa E. Freed, Gordana Vunjak-Novakovic. Tissue engineering of cartilage[M]. The Biomedical Engineering Handbook, CRC press, 1995:1788.
- [6]. 张建湘, 汤健, 徐斌, 等. 壳聚糖钉固定兔胫骨近端截骨的实验研究[J]. 生物医学工程学杂志, 1998, 15 (2):179.
- [7]. 张建湘, 汤健, 徐斌, 等. 壳聚糖棒材的组织相容性和安全性评价[J]. 生物

- 医学工程学杂志, 1996, 13 (4):293.
- [8]. Bateman JF, L amande SR, Ram shaw JAM. Collagen superfamily, in extracellular matrix, Vol2:Molecular components and interactions[M]. Edited by Comper W.D.,Overseas Publishers Association, Amsterdam B.V., 1996:22-67.
- [9]. Kimura T,Yasai N, Chsawa S, et al. Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long term cultures[J]. Clin Orthop Rel Res, 1984:186(3):231.
- [10]. Haisch A,Schultz O,Perka C,et al.Tissue engineering of human cartilage tissue for reconstructive surgery using biocompatible resorbable fibrin gel and polymer carries[J].HNO,1996,44(11):624.
- [11]. Sittinger M,Braunling J,Dauner M,et al. Resorable polyesters in cartilage engineering:affinity and biocompatibility of polymer fiber structure to chondrocytes[J].Laryngorhinootologie,1997,76(2):96.
- [12]. Kaiser HW,Stark GB,Kopp J,et al.Cultured autologous keratinocytes in fibrin glue suspension, exclusively and combined with STS allograft preliminary clinical and histological report of a new technique[J]. J Burns,1998,20(1):23.
- [13]. Kricheldorf HR,Boettcher C.Polylactones 26:lithium ~ alkoxide-initiated polymerizations of L-lactide[J]. Makromo l Chem,1993,194(6):1665.
- [14]. Kricheldorf HR, Lee Soo-Ran. Polylactones 32:high molecular weight polylactides by ring opening polymerization with dibutyl magnesium or butylmagnesium chloride[J]. Polymer,1995,36(15):2995.
- [15]. 李孝红,袁明龙,黄志镗,等.聚乳酸及其共聚物的合成和在生物学上的应用[J].高分子通报,1999,(1):24.
- [16]. Hansborough JF,Cooper ML,Cohen R. Evaluation of a biodegradable matrix containing cultured human fibroblasts as a dermal replacement beneath meshed skin grafts on athymic mice[J].J Surgery,1992,111(4):438.
- [17]. H iltunen K. Synthesis and characterization of lactic acid based poly (ester-urethanes)[J]. Acta Polytechnica Scandinavica,Chemical Technology Series, 1997,251 (1):48.
- [18]. Tsuji H,Smith R,Bonfield W, et al.Porous biodegradable polyesters: preparation of porous poly(L-lactide) films by extraction of poly (ethylene oxide) from their blends. J Appl Polym Sci,2000,75(5):629.
- [19]. Sittinger M, Reitzel D,Dauner, et al.Resorbable polyesters in cartilage

- engineering. *J Biomed Mater Res*,1996,33(1):57.
- [20]. Guan JJ, Gao CY, Feng LX, et al. Surface photografting of polyurethane with 22 hydroxyethyl acrylate for promotion of human endothelial cell adhesion and growth. *J Biomater Sci:Polymer Edn*,2000,11(5):523.
- [21]. Guan JJ, Gao CY, Feng LX, et al. Functionalizing of polyurethane surfaces by photografting with hydrophilic monomers. *J Appl Polym Sci*,2000,77(11):2505.
- [22]. Kim BS,Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering[J]. *Trends in Biotechnology*,1998,16:224-230.
- [23]. Dietmar WH. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage[J]. *Biomaterials*, 2000,21:2529-2543.
- [24]. Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, et al. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts[J]. *J Biomed Mater Res*,1997,34: 211-220.
- [25]. Agrwal CM, Ray RB. Biodegradable polymer scaffolds for musculoskeletal tissue engineering[J]. *J Biomed Mater Res*,2001,55:141-150.
- [26]. 高建平,马朋高,姚康德,等.组织工程与生物可降解高分子骨架[J]. *高分子通报*,2000,(4):89-95.
- [27]. 罗丙红,卢泽俭.组织工程用高度多孔生物可降解支架的制备[J]. *国外医学生物医学工程分册*,2001,24(4):154-158.
- [28]. Mooney DJ, Mazzoni CL, B reuer C, et al. Stabilized polyglycolic acid fiber-based tubes for tissue engineering[J]. *Biomaterials*,1996,17:115-124.
- [29]. Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, et al. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds[J]. *J Biomed Mater Res*, 1997,36:17-28.
- [30]. Shastri VP, Martin I, Langer R. Macroporous polymer foams by hydrocarbon templating[M]. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 2000,97:1970-1975.
- [31]. Nam YS, Yoon JJ, Park TG. A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive[J]. *J Biomed Mater Res*,2000,53:127.
- [32]. Mooney DJ, Baldwin DF, Suh NP, et al. Novel approach to fabricate porous sponges of poly (D,L-lactic coglycolic acid) without the use of organic solvents [J]. *Biomaterials*,1996,17:1417-1422.
- [33]. Nam YS, Park TG. Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by

- thermally phase separation[J].*J Biomed Mater Res*,1999,47:8217.
- [34]. Nam YS,Park TG.Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation methods[J].*Biomaterials*,1999,20:1783-1790.
- [35]. Ma PX,Zhang R.Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix [J].*J Biomed Mater Res*,1999,46(1):60-72.
- [36]. Zhang RY,Ma PX.Synthetic nano-fibrillar extracellular matrix with predesigned macroporous architectures[J]. *J Biomed Mater Res*,2000,52:430-438.
- [37]. 朱文,张俊川,吴林波,等.用于组织工程的合成高分子支架材料[C].第三届全国组织工程学术会议暨第一届中国国际组织工程会议论文汇编,成都,2002:451-453.
- [38]. Park A,Wu B,Griffith LG. Integration of surface modification and 3-D fabrication techniques to prepare patterned poly(L-lactide)substrates allowing regionally selective cell adhesion[J].*J Biomater Sci Polym Ed*,1998,9(2):89-110.
- [39]. 郑俊民,平其能.药用天然及合成高分子材料[A].见:郑俊民.高分子材料学[M].北京:中国医药科技出版社,2000:81-134. ...
- [40]. Jaeghere FD,Alleman E,Leroux JC,et al.Formulation and lyoprotection of poly (lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles:influence on the physical stability and in vitro cell uptake[J].*Pharm Res*,1999,16:859.
- [41]. 朱自强.超临界流体技术—原理和应用[M].北京:化学工业出版社,2000:517.
- [42]. 孙晓宇,王亭杰,金涌.RESS过程及其用于微细颗粒制备研究[J].*化工进展*,2002,21(1):29-33.
- [43]. Bustami RT,Chan HK,Dehghani F,et al.Recent applications of supercritical fluid technology to pharmaceutical powder systems[J].2001,19:57-69.
- [44]. 蔡建国,周展云.超临界流体沉析制备微细颗粒的技术及其应用[J].*化工进展*,1996,6:53-59.
- [45]. 任慧,丁一刚,吴元欣,等.超临界流体技术在超微粒子制备中的应用[J].*化工进展*,2001,9:30-32.
- [46]. Matson DW,Fulton JL,Petersen RC,et al.Rapid expansion of supercritical fluid solutions:solute formation of powders,thin films and fibers[J].*Ind Eng Chem Res*,1987,26(11):2298-2306.
- [47]. Tom JW,Debenedetti PG.Formation of bioerodible polymeric microspheres and

- microparticles by rapid expansion of supercritical solutions[J].*Biotechnol Prog*, 1991,7:403-411.
- [48]. Türk M. Formation of small organic particles by RESS: Experimental and theoretical investigations[J]. *Journal of Supercritical Fluids*, 1999, 15: 79-89.
- [49]. Türk M, Hils P, Helfgen B, et al. Micronization of pharmaceutical substances by the rapid expansion of supercritical solutions (RESS) : a promising method to improve bioavailability of poorly soluble pharmaceutical agents[J]. *Journal of Supercritical Fluids*, 2002, 22: 75-84.
- [50]. 胡爱军, 丘泰球. 超临界流体结晶技术及其应用研究[J]. *化工进展*, 2002, 21(2) : 127-130.
- [51]. Shekunov BY, Baldyga J, York P. Particle formation by mixing with supercritical antisolvent at high Reynolds numbers[J]. *Chemical Engineering Science*, 2001, 56: 2421-2433.
- [52]. Thies C, Ribeiro D, Richard J, et al. A supercritical fluid-based coating technology: Process considerations[J]. *Journal of Microencapsulation* 2003, 20(1) : 87-96.

致 谢

本课题研究是在导师张阳德教授的悉心指导下完成的。在此我衷心感谢张老师对我的培养，以及在学业上的教导，生活和科研中的极大帮助。张老师知识渊博、治学严谨、极具创新精神。对工作、事业的无比热情，以及严于律己、宽于待人、实事求是的为人处世原则，是永远值得我学习的地方。在课题研究过程中张老师付出了大量的心血，在使我的论文得以顺利完成的同时，也增长了自己的知识点和知识面。在此，我谨向张老师表示我崇高的敬意和衷心的感谢。

在科研研究过程中得到了李年丰老师，潘一峰老师的大力支持；特别是课题组的李坚博士在实验和论文完成期间给予了极大的帮助，在此表示衷心感谢。

感谢中南大学湘雅医学院 3 年来对我的培养，感谢国家卫生部肝胆肠外科研究中心，国家卫生部纳米生物技术重点实验室各位老师和学友对我学业的帮助，感谢各位专家老师莅临指导，参加我的答辩会。

攻读学位期间主要的研究工作

一 主要发表的论文

- 1 齐贵新, 张阳德. 高分子组织工程材料的应用进展[J]. 中国医学工程, 2006, 4(4):65-70.
- 2 李 坚, 齐贵新, 张阳德, 等. 直肠癌根治术中吻合器应用的若干问题及对策[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(12):83-85.

二 主要参加的科研活动

- 1 作为技术成员, 参加了国家“十五”863计划课题“纳米药物载体治疗肝脏恶性肿瘤技术”的申报和实施。
- 2 作为课题成员参加了国家十五“863”计划课题“组织工程用纳米生物活性材料”的申报和实施。该制备工艺已申请国家生物与现代农业技术领域专利, 申请专利号: 01126182。