

超临界流体技术合成的复合型骨替代生物材料：体内外生物学评价☆

李冀¹, 何丽娜¹, 彭晨², 原林², 王志强¹

Substitution of biomaterials by a composite bone fabricated by supercritical fluid technique: *In vivo* and *in vitro* biological evaluation

Li Ji¹, He Li-na¹, Peng Chen², Yuan Lin², Wang Zhi-qiang¹

Abstract

BACKGROUND: Polymer based materials can improve surface chemical structure *via* increasing inside inorganic material. A series of techniques have been produced and developed for synthesizing biodegradable materials, and supercritical fluid technique is a superior one.

OBJECTIVE: To substitute biomaterials by a composite bone fabricated by supercritical fluid technique, and to evaluate the biological characteristics of the novel composite biomaterial.

METHODS: Granulated allogeneic bone and polymer of lactic acid (PLA) were compounded to fabricate the composite scaffold by the supercritical fluid technique. The composite scaffold was cytological estimated through on osteoblasts line culture. Meanwhile the sensitization and tissue inflammation were observed by animal experiment that the saturation was injected subcutaneously and the scaffold was implanted directly into muscle.

RESULTS AND CONCLUSION: The figuration, volume and micro-structure of the scaffold were controllable and the biological characteristics of the novel composite biomaterial were excellent. *In vivo* test demonstrated that, no sensitization response occurred, but the material had no ability of heterotopic osteogenesis. The results illustrated that the prepared novel composite biomaterial can meet the requirement of cellular compatibility and biocompatibility, which has a broad prospect in future.

Li J, He LN, Peng C, Yuan L, Wang ZQ. Substitution of biomaterials by a composite bone fabricated by supercritical fluid technique: *In vivo* and *in vitro* biological evaluation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(25):4577-4580. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

¹Second Hospital of Tangshan, Tangshan 063000, Hebei Province, China; ²Institute of Clinical Anatomy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Li Ji☆, Doctor, Associate chief physician, Second Hospital of Tangshan, Tangshan 063000, Hebei Province, China
hbtstliji@163.com

Received: 2010-01-11
Accepted: 2010-02-17

摘要

背景: 在复合材料内部增加细胞黏附性较好的高分子材料或同骨组织羟基磷灰石成分相似的无机材料,可以改善材料的表面化学结构。过去的十几年,产生和发展了许多合成生物降解支架材料的新技术,虽然超临界流体技术应用在合成支架中时间尚短,但有着其他技术不可比拟的众多优点,目前越发受到学者的重视。

目的: 以聚乳酸和同种异体骨粉为原材料,通过超临界流体技术合成复合型骨替代生物材料,评价其生物学特性。

方法: 首先将同种异体皮质骨粉与聚乳酸在超临界二氧化碳作用下合成多孔复合型骨生物替代材料。将材料浸提液与成骨细胞系复合培养,体外观察细胞形态、增殖情况;通过材料浸提液皮内注射实验和材料肌袋内埋入实验,体内观察动物的致敏、组织炎症发生情况。

结果与结论: 体外大体观察该种复合材料形状、大小、孔隙可控,孔径适中,有较好的硬度,体外实验表明细胞相容性良好,对细胞的增殖无毒副作用;体内实验表明材料植入动物体内未发生致敏反应,组织相容性良好,但无异位成骨作用。说明制备的新型复合骨组织生物材料在细胞学和生物相容性检测上可以满足组织工程支架和骨组织替代的要求,该种合成技术及多孔生物材料有广阔发展前景。

关键词: 聚乳酸; 同种异体骨; 超临界流体技术; 复合材料; 组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.25.005

李冀, 何丽娜, 彭晨, 原林, 王志强. 超临界流体技术合成的复合型骨替代生物材料: 体内外生物学评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(25):4577-4580. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹唐山市第二医院, 河北省唐山市 063000; ²南方医科大学临床解剖研究所, 广东省广州市 510515

李冀☆, 男, 1974年生, 河北省唐山市人, 汉族, 2006年南方医科大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事创伤、人工骨材料研究。
hbtstliji@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)25-04577-04

收稿日期: 2010-01-11
修回日期: 2010-02-17
(20090811003/M · Z)

0 引言

理想的骨组织工程支架材料具有生物相容性好, 有骨诱导性和骨传导性, 力学性能和天然骨相近, 能支持血管化, 降解速率和新组织形成速率互相匹配等特点。目前人们研究骨组织工程支架材料集中在材料内部结构、材料表面细胞黏附性及组织相容性的设计上。超临界流体现象研究是从20世纪40年代开始的, 从目前的研究状况来看, 超临界技术作为一种新的

分离技术已为人们所公认, 在热敏性、难分离物质的回收、微量杂质脱除方面具有明显的优势^[1-3]。传统羟基磷灰石等无机成分与多聚物等通过不同技术合成复合材料, 是目前研究的热点^[4], 而同种骨本身来自于生物体, 具有良好的细胞亲和性和组织亲和性, 容易吸收, 不易产生炎症反应等优点得到了广泛应用。

实验在合成材料基础理论研究的基础上, 将天然的皮质骨粉与聚乳酸颗粒混合, 应用超临界流体合成技术, 开发设计出新的复合型骨组织替代支架材料, 通过细胞学和动物实验对

复合材料的生物学性质进行评价, 希望能更加符合细胞爬行、组织移植要求。

1 材料和方法

设计: 体外实验为单因素实验设计; 体内实验为随机对照动物实验。

时间及地点: 材料合成实验于2005-12在暨南大学化学系实验室完成; 体外实验于2006-03/05在南方医科大学临床解剖研究所组织工程实验室完成; 体内实验于2006-05/08在山西省医用组织库完成。

材料:

实验动物: 健康SD大鼠9只, 五六个月龄, 体质量200~250 g, 由山西省医用组织库提供, 实验过程中对动物的处置复合动物伦理要求。

实验材料和试剂:

实验材料和试剂	来源
聚乳酸粉末(粒径为 150~200 μm)	山东医疗器械研究所
新鲜健康成人尸体股骨干标本	山西省医用组织库
食用级二氧化碳	暨南大学化学系
成骨细胞	南方医科大学临床解剖研究所组织工程实验室
胰酶	美国 Sigma 公司
胎牛血清	美国 HyClone 公司

实验方法:

同种异体骨粉的制备: 无菌条件下取新鲜健康成人尸体股骨干标本, 刮除表面的骨膜等软组织, 深低温(-80 °C)冰箱冷冻3个月。锯骨机将标本骨干部分锯成0.8 cm×0.8 cm×0.3 cm大小骨片。超声振荡清洗, 取出后用体积分数为75%乙醇浸泡, 真空冻干机冻干, 然后液氮冷冻, 骨粉机打碎, 粉末过200目筛网, 再冻干, 备用。

超临界CO₂技术合成复合材料: 聚乳酸粉末与上述方法制备的同种异体皮质骨粉按质量比为70:30, 磁性搅拌充分混合均匀, 置于圆柱形铸模内, 将该容器置于超临界CO₂设备反应釜中, 密封, 并通过液泵将冷凝到0 °C以下的CO₂压进釜内, 当压力接近实验需压力时停止压入CO₂, 开始升温, 令釜体内部压力和温度达到实验所设计的条件, 并通过仪器内置的热电偶和放空阀对釜体内的温度和压力进行调节, 达到超临界状态, 保持温度变化不超过±0.5 °C, 压力变化在±0.1 MPa以内。经过一定反应时间后, 打开釜体, 取出样品, 浸泡滤除制孔剂, 冻干, 3层塑料封装, ⁶⁰Co辐照消毒备用。

细胞学检测:

浸提液的制备: 选择含血清DMEM培养基做为浸

提介质, 液氮作用下将复合材料研磨成粉末, 按0.2 g/mL的比例加入浸提介质中, 在37 °C中浸提72 h, 1 000 r/min离心后过400目筛网, 取过滤液做为材料的浸提液。

成骨细胞的培养: 成骨细胞冰冻复苏后, 转入培养瓶, 达到(5.0~6.0)×10⁶密度后取出, 消化、离心、浸提液重悬、孵箱中孵育, 空白对照为不放浸提液的DMEM培养基培养。倒置显微镜观察细胞一般形态、空泡形成、脱落、溶解、死亡、增长密度变化等。

MTT比色法绘制细胞生长曲线: 将培养的成骨细胞悬液以10³/孔的密度接种于96孔板中, 每孔100 μL, 24 h后弃去原培养基, PBS液冲洗2次, 实验组加入100%浸提液, 阴性对照、阳性对照分别加入培养液和100%聚乳酸浸提液。测定4 h前弃去浸提液或培养液, 每孔加20 μL MTT液, 测试时, 吸去原液, 加SDS液振荡10 min, 酶标仪检测各孔A_{570 nm}值, 记录细胞增殖度, 连续测定7 d后, 绘制生长曲线。

材料与细胞直接复合培养: 将传至第3代的成骨细胞以1.5×10⁴/孔的密度接种于24孔培养板, 37 °C、体积分数5%CO₂及饱和湿度条件下培养, 每孔各加4 mm×4 mm×2 mm相应材料1块。倒置显微镜观察细胞大体情况, 扫描电镜观察材料表面孔隙、孔径, 材料表面黏附细胞的形态, 细胞合成基质等情况。

动物安全性评价:

浸提液皮下注射过敏实验: 9只大鼠分为3组, 每组3只, 实验组为材料生理盐水浸提液, 与完全弗氏佐剂等体积混合, 用力搅拌数分钟至完全乳化为止, 体积分数为5%甲醛溶液为阳性对照组, 生理盐水为阴性对照组。剔除大鼠背部4~6 cm²毛发, 用乙醇清洁暴露区域, 每只大鼠去毛区作6点对称、相距1.0 cm的皮内注射。

材料肌袋内埋入: 浸提液实验完成后, 随机取其中3只大鼠, 在两侧股部中下1/3处、偏外侧作长2 cm的小切口, 切开皮肤、皮下组织。由外侧肌间隔进入, 钝性分开肌肉, 将大小为3 mm×3 mm×5 mm的材料植入股部肌肉内, 并标记, 常规缝合切口, 4万U庆大霉素局部应用预防感染。

主要观察指标: 体外实验观察细胞形态、增殖情况; 体内实验观察动物的致敏情况、组织炎症情况。

设计、实施、评估者: 设计为第一作者, 实施为全部作者, 评估为全部作者, 均经过正规培训。

2 结果

2.1 复合材料大体观察 经超临界CO₂技术制备的复合材料色泽乳白, 形状与圆形铸模相同, 表面可见均匀的孔隙结构, 孔径适中, 有较好的硬度。

2.2 材料浸提液体外实验

形态学观察: 培养3 d后, 倒置显微镜下见实验组细胞生长状态良好, 增殖旺盛, 排列有一定的方向性, 细胞呈梭形, 有粗大的突起, 细胞核大, 圆形。实验组和空白对照组细胞没有明显差别。培养6 d后, 成骨细胞增殖迅速, 呈密集贴壁生长, 无明显接触抑制。见图1。

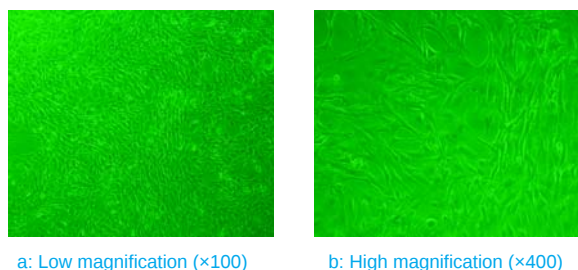


Figure 1 Cells status at 6 d after culture in extract liquid of novel composite biomaterial
图1 细胞在浸提液中培养6 d后情况

细胞生长曲线: 经MTT法检测后, 实验组细胞增殖较快, 优于阴性对照组和阳性对照组。第1, 2天, 细胞增殖缓慢, 为生长潜伏期, 在第3天均进入对数生长期, 细胞增殖迅速, 第6天, 细胞进入生长平台期。见图2。

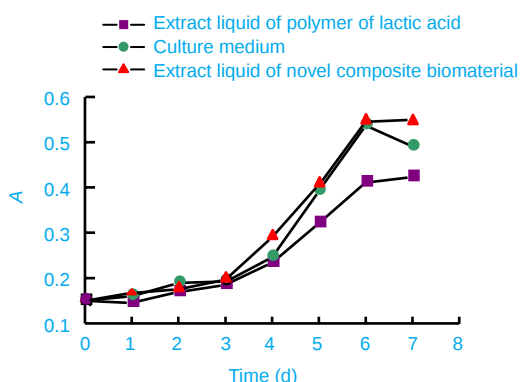


Figure 2 MTT experimental results
图2 MTT 实验结果

2.3 材料与细胞直接培养结果 材料表面孔隙均匀, 皮质骨颗粒均匀分布在聚乳酸支架表面。细胞与材料复合培养24 h后, 即发现有较多细胞黏附于材料表面, 3 d后, 倒置显微镜下可见材料碎屑周围, 成骨细胞生长良好, 增殖旺盛, 细胞呈聚集现象, 无明显方向性, 无明显接触移植。扫描电镜观察材料有良好的孔隙, 骨粉均匀分布在孔隙表面, 细胞较好的黏附于材料表面, 细胞呈梭形, 有突起, 多数细胞生长状态良好, 表面有大量微绒毛, 周围可见正常的基质分泌, 且有向多孔材料内部延伸趋势, 培养7 d可见细胞进一步融合, 细胞和细胞外基质呈膜状, 与材料黏附紧密。见图3。

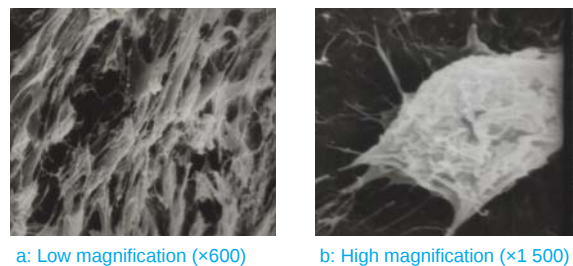


Figure 3 Condition of the cells cultured directly with the novel composite biomaterial under a scanning electron microscope
图3 材料细胞直接培养后细胞黏附于材料表面扫描电镜观察情况

2.4 动物安全性评价结果

浸提液皮下注射过敏实验结果: 实验组大鼠注射材料浸提液后24 h时有1只大鼠背部2点出现红斑, 界限清楚, 但在48 h后消失, 未出现水肿、水泡, 阳性对照组24 h内均出现轻微红斑和水肿, 48 h后1只大鼠的红斑和水肿加重, 水肿高出皮肤约1 mm, 72 h后出现水肿仍未消失。

肌袋内埋入材料实验结果: 肌袋内埋入材料8周后, 取出标本, 大体观察见标本与周围组织粘连紧密, 周围组织正常, 未发现明显水肿及纤维包裹, 经苏木精-伊红染色后, 观察标本与肌肉组织界限清楚, 材料内部有大量的成纤维细胞侵入, 并有纤维素样渗出, 无炎性反应, 偶见炎性细胞。见图4。

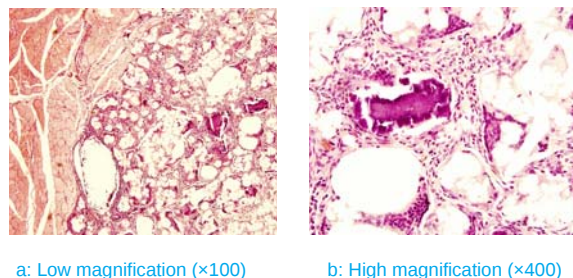


Figure 4 Embedding results at 8 wk after operation
图4 复合材料埋入肌袋8周结果

3 讨论

目前有许多合成生物可降解支架材料的技术^[5], 超临界流体现象研究是从20世纪40年代开始的, 它的作用原理是: 在足够高的压力下, 聚合物会吸收某种气体而导致本身体积增大, 发生溶胀, 能够提高相对分子质量较大掺杂物的扩散系数(如生物活性分子、药物或其他无机物分子等), 有时甚至加大几个数量级, 从而可以在合适的时间内把这些掺杂物掺入到聚合物的骨架之中。一旦降压后, 超临界流体从聚合物界面上移去, 掺杂物要

从聚合物中扩散出来的速度却比原来进入时要小得多, 而且降压产生的气体会在材料内部产生三维多孔结构。改变气体的压力、多聚物与二氧化碳之间的浓度和放气速度, 内部的孔隙结构也是可以控制的^[1]。本实验制备的复合支架形状与铸模形状相同, 表面可见均匀的孔隙结构, 孔径适中, 有较好的硬度, 扫描电镜观察材料内部有均匀的孔隙。

随着人们对骨移植研究的深入, 发现皮质骨与松质骨愈合的基质有明显的不同, 皮质骨为高密度结构, 植入宿主后首先通过破骨细胞吸收, 然后成骨细胞和毛细血管进入哈佛系统, 形成新骨, 新骨形成十分缓慢^[6]。大段同种异体骨临床应用中, 经长期随访发现常发生异体骨骨折、感染、骨不连等并发症, 特别是异体骨骨折发生率高达16.0%~19.0%^[7]。因此骨库在生产临床大量需求异体松质骨的同时, 留下了大量的皮质骨原料, 如何充分利用这些原料是技术上的一个难题。与磷酸钙、硫酸钙、生物活性玻璃等人工骨传导材料不同^[8], 皮质骨本身来自于生物体, 其细胞亲和性和组织亲和性得到保证, 容易吸收而不产生炎症反应。实验将同种异体皮质骨打碎, 通过超临界流体技术制备复合材料, 扫描电镜中观察到异体骨颗粒均匀附着在聚乳酸支架表面, 为细胞的爬行、组织的生长提供合适的化学表面结构。本研究利用的超临界流体是二氧化碳, 这种状态下的二氧化碳兼具气体和液体的性质, 是一种特殊的聚合物加工介质, 减压后二氧化碳形成材料内部气孔的同时完全挥发, 避免既往如溶液浇铸/粒子滤除技术、热诱发相分离技术、静电纺丝技术中有机溶剂的残留或制备过程出现高温容易引起蛋白活性破坏等问题^[5,9], 通过该种技术制备的复合材料, 最终制品中无残留溶剂, 有利于细胞和组织的生长, 本实验观点与国外学者的观点是一致的^[2-3]。从细胞学的检测上可以看出, 培养6 d后, 成骨细胞增殖迅速, 呈密集贴壁生长, 无明显接触抑制; MTT法是目前对细胞增殖及活力测定的常用方法, 本研究发现实验组的细胞不但生长良好, 浸提液与成骨细胞培养3 d后细胞进入对数增长期, 形态良好, 而且较空白对照组结果更好, 可能是该材料保留了异体骨中多种细胞因子和微量元素, 与Bouxsein等^[10]推测它们在成骨中的“鸡尾酒”协同作用或是续贯反应有关; 而细胞与材料直接复合, 细胞黏附性良好, 培养7 d可见细胞进一步融合, 细胞和细胞外基质呈膜状, 并和材料黏附紧密, 也证明了这一点。

从动物过敏实验的结果可以看出只有1只大鼠对复合材料浸提液出现反应, 但在48 h后消失, 未出现水肿、水泡, 考虑与机械刺激有关, 与阴性对照没有明显区别。而阳性对照的大鼠24 h内均出现轻微红斑和水肿, 48 h后1只大鼠的红斑和水肿加重。本材料致敏率0, 属于1级, 所以无致敏性^[11]。肌袋内埋入材料标本经苏木精-

伊红染色后, 标本与肌肉组织界限清楚, 材料内部有大量的成纤维细胞侵入, 并有纤维素样渗出, 无炎症反应, 无明显炎症细胞浸润。证明了该种材料组织相容性良好, 适合动物体内植入。

结论: 聚乳酸和天然衍生物同种异体骨粉材料经过超临界技术合成的多孔支架复合材料, 具有形状、大小、材料的孔隙可控性, 细胞学性质和生物相容性方面非常良好, 可以满足组织工程支架和骨组织替代的要求。

4 参考文献

- [1] Elvassore N, Baggio M, Pallado P, et al. Production of different morphologies of biocompatible polymeric materials by supercritical CO₂ antisolvent techniques. *Biotechnology and Bioengineering*. 2001;73(6):449-457.
- [2] Harris LD, Kim BS, Mooney DJ. Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *J Biomed Mater Res*. 1998; 42(3):396-402.
- [3] Barry JJ, Gidda HS, Scotchford CA, et al. Porous methacrylate scaffolds: supercritical fluid fabrication and in vitro chondrocyte responses. *Biomaterials*. 2004;25(17):3559-3568.
- [4] Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater*. 2003;5:29-39.
- [5] Li J, Zhang YM, Wang ZQ. *Zhonghua Chuangshang Guke Zazhi*. 2006;8(8):773-776.
李冀, 张育敏, 王志强. 骨组织工程支架材料合成技术的进展[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2006, 8(8):773-776.
- [6] Lewandrowski KU, Schollmeier G, Ekkemkamp A, et al. Incorporation of perforated and demineralized cortical bone allografts. Part I: radiographic and histologic evaluation. *Biomed Mater Eng*. 2001;11(3):197-207.
- [7] Scarborough MT. Allograft-allograft healing? Salvage of massive allografts after fracture. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;(382):28-33.
- [8] Li J, Wang ZQ, Zhang YM, et al. *Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi*. 2006;20(1):81-84.
李冀, 王志强, 张育敏, 等. 人工骨传导材料的研究进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2006, 20(1):81-84.
- [9] Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng*. 2004;32(3):477-486.
- [10] Bouxsein ML, Turek TJ, Blake CA, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A(8): 1219-1230.
- [11] Hao HP, Xi TF, Pu CS. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science & Technology Publishing House. 2000:221-227.
郝和平, 奚廷斐, 卜长生. *医疗器械监督管理和评价*[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000:221-227.

来自本文课题的更多信息--

利益冲突: 无利益冲突。

课题的意义: 该研究将超临界流体技术应用于制备复合型骨移植材料, 不仅充分保留了移植材料的生物活性, 避免其他方法致使材料内残留有毒溶剂, 而且利用皮质骨合成材料, 为骨库充分利用皮质骨提供一种有效的途径, 变废为宝。本篇文章从体内和体外实验两个方面研究材料的生物相容性, 为临床应用提供有益的基础研究资料。

设计或课题的偏倚与不足: 目前合成过程均为实验室内进行, 因此大规模生产以供临床应用还需大量研究, 另外临床应用的前期实验目前尚未进行。

提供临床借鉴的价值: 制备出的新型复合骨组织生物材料在细胞学和生物相容性检测上可以满足组织工程支架和骨组织替代的要求, 该种合成技术及多孔生物材料有广阔发展前景, 为临床大块骨缺损患者的治疗发现一种治疗方法, 提供一种新希望。