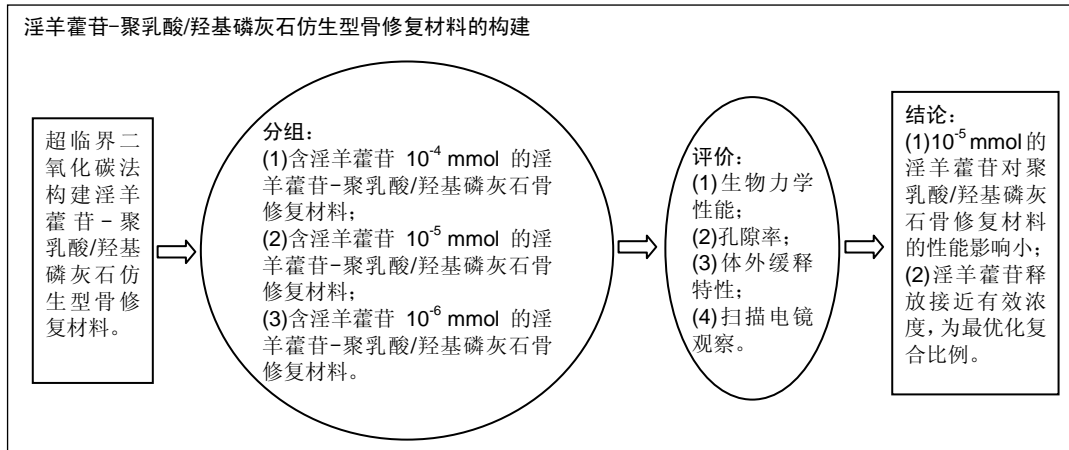


超临界二氧化碳法构建淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石仿生型骨修复材料

张育敏¹, 王建茹², 韩波¹, 牛晓军¹ (¹山西中医药大学, 山西省太原市 030024; ²山西医科大学, 山西省太原市 030006)
DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0786 ORCID: 0000-0002-0702-3067(张育敏)

文章快速阅读:



张育敏, 男, 1977年生, 山西省阳城县人, 汉族, 2007年南方医科大学毕业, 博士, 副教授, 主要从事中医药在再生医学中的应用研究。

通讯作者: 张育敏, 副教授, 山西中医药大学, 山西省太原市 030024

中图分类号: R318

文献标识码: A

稿件接受: 2018-01-11



文题释义:

超临界二氧化碳合成法: 一种聚合物制备的新技术, 被广泛应用于物质分离、提纯、分析化学、材料制造、药物缓释、化学反应等各个方面, 具有环境友好、反应过程无需引入高温和有机溶剂、无需药物溶解等优点, 特别适合含药物、生长因子等生物活性材料的制备。

淫羊藿苷: 来源于传统中药淫羊藿的植物黄酮——淫羊藿苷, 已有研究证实淫羊藿苷对干细胞的增殖和成骨分化具有促进作用, 可作为一种良好的骨诱导活性因子替代物。此外, 淫羊藿苷来源广泛、提取工艺相对简单、性质稳定、易于储存、可耐受消毒灭菌, 这些特性均有利于其在组织工程支架材料中的应用。

摘要

背景: 前期实验采用超临界二氧化碳法制备了具有良好理化性能和生物相容性的聚乳酸/羟基磷灰石材料, 但该材料仅具有骨传导活性, 缺乏骨诱导活性。

目的: 构建具有骨传导和骨诱导活性的淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石仿生型骨修复材料。

方法: 通过超临界二氧化碳法制备每克材料中含淫羊藿苷 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mmol 的淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石骨修复材料, 分别记为 IC-PLA/HA(1000)、IC-PLA/HA(100)和 IC-PLA/HA(10), 以聚乳酸/羟基磷灰石骨修复材料为对照, 通过生物力学性能、孔隙率、缓释特性、扫描电镜检测, 筛选出淫羊藿苷的最佳复合比例。

结果与结论: ①IC-PLA/HA(1000)组、IC-PLA/HA(100)组和 IC-PLA/HA(10)组的压缩强度与弹性模量与对照组比较均无差异; ②各组材料孔隙率均大于 75%, IC-PLA/HA(1000)组、IC-PLA/HA(100)组和 IC-PLA/HA(10)组的孔隙率与对照组比较均无差异; ③IC-PLA/HA(1000)组、IC-PLA/HA(100)组和 IC-PLA/HA(10)组材料淫羊藿苷释放在前 3 d 较快, 以后逐渐下降, 且下降速率减慢, 但 7 d 后淫羊藿苷释放处于一个缓慢下降的平台期, 其中 IC-PLA/HA(100)组各时间点淫羊藿苷释放量接近前期实验证实的淫羊藿苷有效浓度 10^{-7} mmol/L;

④扫描电镜显示 IC-PLA/HA(100)组材料中, 羟基磷灰石与聚乳酸混合均匀, 可见微球, 淫羊藿苷在材料中不易识别, 材料孔径在 50–150 μm 之间; ⑤结果表明, 构建的淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石仿生型骨修复材料具有良好的力学性能及缓释性能。

关键词:

淫羊藿苷; 聚乳酸; 羟基磷灰石; 骨修复材料; 超临界二氧化碳; 山西省自然科学基金; 生物材料

主题词:

中草药; 羟基磷灰石类; 仿生材料; 组织工程

基金资助:

山西省自然科学基金项目(201601D011126); 山西中医药大学博士启动基金项目(2014bk05); 山西省中医药科研课题(2016ZYCC02)

Zhang Yu-min, M.D.,
Associate professor, Shanxi
University of Chinese
Medicine, Taiyuan 030024,
Shanxi Province, China

Corresponding author:
Zhang Yu-min, Shanxi
University of Chinese
Medicine, Taiyuan 030024,
Shanxi Province, China

Preparation of icariin-poly(lactic acid)/hydroxyapatite composite bone-graft substitutes by supercritical carbon dioxide method

Zhang Yu-min¹, Wang Jian-ru², Han Bo¹, Niu Xiao-jun¹ (¹Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China; ²Shanxi Medical University, Taiyuan 030006, Shanxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Our previous findings have shown that poly(lactic acid)/hydroxyapatite (PLA/HA) composite biomaterials prepared by the supercritical carbon dioxide method have good physicochemical properties and biocompatibility. However, the composite materials only have osteoconductivity but no osteoinductivity.

OBJECTIVE: To prepare icariin-PLA/HA (IC-PLA/HA) composite biomaterials with good osteoconduction and osteoinduction.

METHODS: The supercritical carbon dioxide method was used to prepare IC-PLA/HA composite biomaterials containing 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mmol/g IC, named as IC-PLA/HA(1 000), IC-PLA/HA(100) and IC-PLA/HA(10). PLA/HA composite material served as controls.

Biomechanical properties, porosity, sustained release characteristics were detected, and scanning electron microscope observation was performed, in order to screen out the optimal IC content in the composite materials.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compressive strength and elastic modulus of IC-PLA/HA(1 000), IC-PLA/HA(100) and IC-PLA/HA(10) showed no difference from those of PLA/HA. (2) The porosity of all the composite materials was over 75%, and there was still no difference among groups. (3) The IC release from IC-PLA/HA was faster within the first 3 days, and then reduced gradually. However, after 7 days, the IC release plateaued, and the IC release amount from the IC-PLA/HA(100) was close to 10^{-7} mol/L that had been confirmed to be an effective and safe concentration in the previous experiments. (4) Under the scanning electron microscope, HA and PLA were mixed homogeneously and IC was difficult to be identified. The pore size of the IC-PLA/HA(100) ranged from 50 μ m to 150 μ m. Overall, the IC-PLA/HA composite biomaterials have good mechanical and sustained-release properties.

Subject headings: Drugs, Chinese Herbal; Hydroxyapatites; Biomimetic Materials; Tissue Engineering

Funding: the Natural Science Foundation of Shanxi Province of China, No. 201601D011126; Scientific Research Fund for the Doctoral Young Scholars, Shanxi University of Chinese Medicine, No. 2014bk05; Shanxi Scientific Research Fund of Traditional Chinese Medicine, No. 2016ZYC02

0 引言 Introduction

骨组织移植已成为仅次于输血的第二大组织移植^[1-2], 骨移植需要骨修复材料, 而理想的骨修复材料应具备骨传导和骨诱导活性^[3-4], 但目前临床上应用的大多数骨修复材料(如羟基磷灰石、磷酸钙、碳酸钙、聚乳酸等)虽具有良好的骨传导性能, 但缺乏骨诱导活性^[5-6], 而将生长因子与这些材料进行复合, 构建同时具备骨传导和骨诱导活性的骨修复材料成为解决这一问题的常用方法^[7-8]。然而, 以骨形态发生蛋白和碱性成纤维细胞生长因子为代表的生长因子提取过程复杂、成本昂贵、产率较低、活性不稳定, 且具有潜在毒性与致癌性, 限制了其在骨组织工程与临床中的应用^[9-10], 寻找一种安全有效、价格低廉的可替代骨生长因子的生物活性物质, 成为了骨修复材料构建的必然要求^[11]。

淫羊藿具有补肾壮阳、祛风除湿、强筋健骨等功效, 常用于治疗骨质疏松、更年期综合征等老年性疾病^[12-13]。淫羊藿苷为淫羊藿的主要活性成分, 现代药理学研究证实, 淫羊藿苷能促进骨髓间充质干细胞向骨细胞的增殖和分化, 提高DNA形成和骨组织蛋白质合成^[14-15]。张黎声等^[16]证实淫羊藿苷可促进骨髓间充质干细胞的增殖、存活和迁移, 且SDF-1/CXCR4信号通路参与淫羊藿苷调控骨髓间充质干细胞的迁移。鲍远等^[17]实验表明无论是否存在成骨诱导培养条件, 淫羊藿苷均能促进成骨分化相关基因的表达, 在体内显著促进骨小梁的生成。曲美娟等^[18]探讨加载在种植体表面的淫羊藿苷对骨结合的影响, 发现加载在种植体表面的淫羊藿苷有促进种植体周围新骨形成的作用。这些结果均提示淫羊藿苷可作为一种骨诱导活性因子的替代剂用于骨修复材料的制备。

超临界二氧化碳技术是一种复合材料制备的新方法^[19], 在制备过程中无需引入高温和有机溶剂, 避免了有机溶剂残留对材料生物相容性的影响, 由于反应过程没有高温, 可避免对药物、生长因子等生物活性成分的破坏^[20-21], 超临界二氧化碳在反应过程中对聚合物具有溶胀作用, 特别适合制备三维多孔材料, 还有研究发现其在制备过程中对材料具有消毒灭菌的效果^[22], 这些均非常有利于含生物活性药物生物材料的制备。研究拟采用淫羊藿苷作为骨诱导生长因子替代剂, 经超临界二氧化碳技术将其与煅烧羟基磷灰石、聚乳酸进行复合, 制备出淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石仿生型骨修复材料。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 工艺研究。

1.2 时间和地点 实验于2016年1月至2017年1月在山西中医药大学实验中心和中国辐射防护研究院完成。

1.3 材料 聚乳酸(Nature Works, 美国); 羟基磷灰石为山西中医药大学实验中心自制; 淫羊藿苷标准品(纯度>98%, CAS: 489-32-7, 上海如吉生物科技); 标准胎牛血清(Hyclone, 美国); 其余试剂均为国产分析纯; 超临界二氧化碳反应装置(SFE-2, Applied Separations, Inc., Allentown, 美国); 高效液相色谱仪(SHIMADZU岛津高效液相色谱仪LC-2010HT); RGT-20A 生物学力测试机(深圳瑞格尔); 扫描电镜(JSM6360LVV扫描电镜, 日本电子)。

1.4 实验方法

1.4.1 不同浓度淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石材料的制备 获取雄性2年龄牛股骨和胫骨各一(山西省恒通肉牛养殖

场), 去除软组织后, 获取松质骨, 锯成1.0 cm×1.0 cm×(1.0-5.0) cm, 超声清洗后在超临界二氧化碳装置中脱脂24 h后, 浸泡于0.5 mol/L NaOH 溶液中超声4 h, 然后700 °C马弗炉有氧煅烧4 h, 按10 g/L的比例用PBS (pH=7.0)清洗3次, 每次1 h, 干燥后粉碎成50-150 μm的羟基磷灰石粉末。

将粒径为50-150 μm的聚乳酸($M_w=1 \times 10^5$ g/mol)与羟基磷灰石按质量比2:8混合, 在前期实验中已证实 10^{-4} mmol/L的淫羊藿苷具有较低的细胞毒性及与重组骨形态发生蛋白2相接近的骨诱导活性, 故参考淫羊藿苷的安全有效剂量, 制备每克材料含1 000倍、100倍和10倍有效淫羊藿苷剂量的复合材料。

具体描述如下: 将6.77 mg(10^{-2} mmol)淫羊藿苷加入100 g聚乳酸/羟基磷灰石混合物中, 制备含 10^{-4} mmol/g淫羊藿苷的聚乳酸/羟基磷灰石混合物, 记为IC-PLA/HA(1000); 取1 g上述混合物加入9 g聚乳酸/羟基磷灰石混合物中, 制备含 10^{-5} mmol/g淫羊藿苷的聚乳酸/羟基磷灰石混合物, 记为IC-PLA/HA(100); 重复上述步骤制备含 10^{-6} mmol/g淫羊藿苷的聚乳酸/羟基磷灰石混合物, 记为IC-PLA/HA(10)。将1 g不同浓度的淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石混合物依次装入超临界二氧化碳装置的反应容器中($\Phi=1$ cm), 将反应容器中的压力逐渐升高至20 MPa, 温度升高至37 °C, 并保持压力(20.0 ± 0.1) MPa和温度(37.0 ± 0.5) °C条件下反应30 min, 以5 MPa/min的速度排气, 取出所制备样品后进行冷冻干燥, 3层聚乙烯塑料封装后, 20 kGy ^{60}Co 灭菌备用。

1.4.2 不同材料的生物力学性能检测 将聚乳酸/羟基磷灰石材料和不同浓度淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石复合材料修剪成直径为10 mm, 高度为10 mm的规则圆柱体, 每组5块, 用RGT-20A微机控制万能试验机测定其抗压强度和弹性模量, 加载速率为1 mm/s, 加载负荷为5 N。

1.4.3 不同材料的孔隙率检测 孔隙率的检测采用液体置换法^[23], 使用易渗透到材料孔隙内而难渗透到材料内部的乙醇作为置换液体, 将质量为 m_1 的样品置入含乙醇(体积为 V_1)的100 mL量筒内, 保持5 min, 待乙醇渗入材料孔隙后, 通过量筒读数记录剩余乙醇和材料的总体积 V_2 , (V_2-V_1)代表材料的体积, 将含乙醇的材料从量筒中取出并称质量, 记录为 m_2 , 将剩余乙醇记录为 V_3 , (V_2-V_3)为材料的体积, 材料的密度 $\rho=W/(V_2-V_3)$, 通过 $(m_2-m_1)/\rho_{乙醇}$ 计算材料的孔隙总体积($\rho_{乙醇}=0.789$ g/cm³), 再通过下式计算材料的孔隙率: 孔隙率= $(m_2-m_1)/\rho_{乙醇}/(V_2-V_3)$ 。

1.4.4 不同浓度淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石材料的淫羊藿苷体外缓释特性 将直径为10 mm、高度为5 mm的不同浓度淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石浸泡在5 mL PBS中(pH=7.4), 置于37 °C温箱中, 分别于1, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 20, 25, 30 d离心取上清, 置于4 °C保存备用, 离心后再加入5 mL PBS浸泡, 每组5样品。将所取上清,

2 000×g离心5 min, 取0.5 mL上清, 加入0.5 mL乙腈, 4 000×g离心10 min后, 取20 μL上清用于HPLC分析, 记录峰面积积分值(A), 根据下列标准曲线回归方程计算淫羊藿苷释药浓度C:

$$A=28\ 624.38C+58\ 795.3(r=0.999\ 6)。$$

1.4.5 淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石材料的扫描电镜观察 选取最佳浓度淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石多孔复合材料, 冷冻干燥后, 离子溅射仪表面及切面喷金处理, 电子扫描显微镜观察孔隙情况。

1.5 主要观察指标 淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石材料的生物力学强度、孔隙率及体外缓释特性。

1.6 统计学分析 采用SPSS 17.0统计软件包进行统计分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学检验采用析因设计资料的方差分析法, 多组间比较采用最小显著性差异法(LSD), 检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果 Results

2.1 不同材料的生物力学性能 聚乳酸/羟基磷灰石材料、淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石材料的压缩强度和弹性模量分别见图1, 2。随着淫羊藿苷的加入, 材料的压缩强度和弹性模量均略降低, 但差异无统计学意义, 表明每克中加入 10^{-6} - 10^{-4} mmol的淫羊藿苷对聚乳酸/羟基磷灰石材料的力学性能无显著影响。

2.2 不同材料的孔隙率 聚乳酸/羟基磷灰石材料和不同浓度淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石的孔隙率, 见图3, 各材料孔隙率均大于75%, 其中聚乳酸/羟基磷灰石材料的孔隙率为82.12%, IC-PLA/HA(10)的孔隙率高于PLA/HA, 为84.02%; IC-PLA/HA(10)和IC-PLA/HA(100)的孔隙率略低于聚乳酸/羟基磷灰石材料, 但各组间孔隙率比较无差异($P > 0.05$), 表明每克材料中加入 10^{-6} - 10^{-4} mmol的淫羊藿苷对聚乳酸/羟基磷灰石材料的孔隙率无明显影响。

2.3 不同浓度淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石材料的淫羊藿苷体外缓释特性 图4为不同浓度淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石材料淫羊藿苷体外缓释情况, 由图可知, 各组材料淫羊藿苷释放在前3 d较快, 以后逐渐下降, 且下降速率减慢, 7 d后淫羊藿苷的释放处于一个平台期。其中IC-PLA/HA(10)材料淫羊藿苷第1天释放浓度为 3.24×10^{-8} mol/L, 并随时间逐渐下降, 至30 d降至 1.62×10^{-9} mol/L, 均低于前期实验证实的淫羊藿苷骨诱导的有效剂量 10^{-7} mol/L。IC-PLA/HA(100)材料淫羊藿苷第1天释放浓度为 2.42×10^{-7} mol/L, 至第9天降至 9.80×10^{-8} mol/L, 之后淫羊藿苷维持在一个较稳定浓度, 至30 d为 6.18×10^{-8} mol/L, 均接近淫羊藿苷有效浓度。

IC-PLA/HA(1000)材料淫羊藿苷第1天释放浓度为 2.05×10^{-6} mol/L, 高于淫羊藿苷有效浓度, 考虑到材料在实际应用时多大于1 g, 故综合考虑选取IC-PLA/HA(100)材料作为淫羊藿苷复合最佳比例。

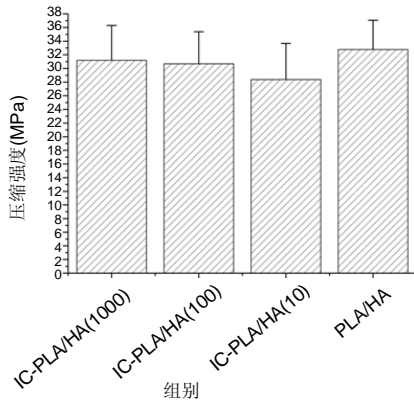


图1 不同材料的压缩强度

Figure 1 Compressive strength of poly(lactic acid)/hydroxyapatite and icariin-poly(lactic acid)/hydroxyapatite with different icariin contents

图注: IC-PLA/HA(1000)、IC-PLA/HA(100)和 IC-PLA/HA(10)分别为每克材料中含淫羊藿苷 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mmol 的淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石材料。PLA/HA 为聚乳酸/羟基磷灰石材料。各组材料的压缩强度无差异。

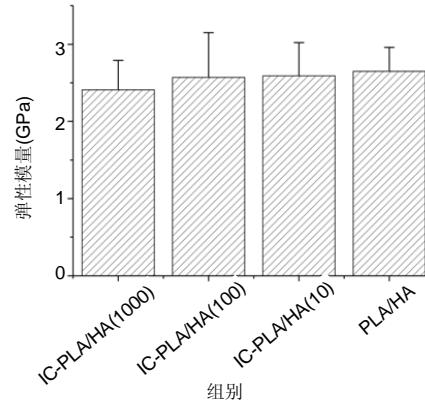


图2 不同材料的弹性模量

Figure 2 Elastic modulus of poly(lactic acid)/hydroxyapatite and icariin-poly(lactic acid)/hydroxyapatite with different icariin contents
图注: IC-PLA/HA(1000)、IC-PLA/HA(100)和 IC-PLA/HA(10)分别为每克材料中含淫羊藿苷 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mmol 的淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石材料。PLA/HA 为聚乳酸/羟基磷灰石材料。各组材料的弹性模量无差异。

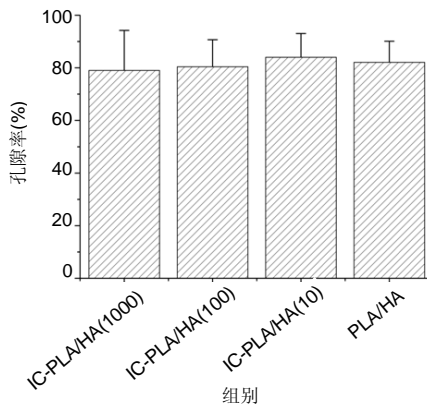


图3 不同材料的孔隙率

Figure 3 Porosity of poly(lactic acid)/hydroxyapatite and icariin-poly(lactic acid)/hydroxyapatite with different icariin contents

图注: IC-PLA/HA(1000)、IC-PLA/HA(100)和 IC-PLA/HA(10)分别为每克材料中含淫羊藿苷 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mmol 的淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石材料。PLA/HA 为聚乳酸/羟基磷灰石材料。各组材料孔隙率均大于 75%, 各组间比较无差异。

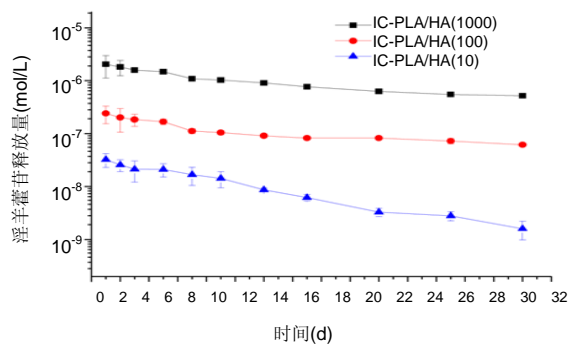


图4 不同浓度淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石材料的淫羊藿苷体外缓释曲线

Figure 4 Sustained release curves of icariin from the icariin-poly(lactic acid)/hydroxyapatite with different icariin contents *in vitro*

图注: IC-PLA/HA(1000)、IC-PLA/HA(100)和 IC-PLA/HA(10)分别为每克材料中含淫羊藿苷 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mmol 的淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石材料。各组材料淫羊藿苷释放在前 3 d 较快, 以后逐渐下降, 且下降速率减慢, 7 d 后淫羊藿苷的释放处于一个平台期。其中 IC-PLA/HA(10)材料淫羊藿苷第 1 天释放浓度为 3.24×10^{-8} mol/L, 并随时间逐渐下降, 至 30 d 降至 1.62×10^{-9} mol/L, 均低于前期实验证实的淫羊藿苷骨诱导的有效剂量 10^{-7} mol/L。

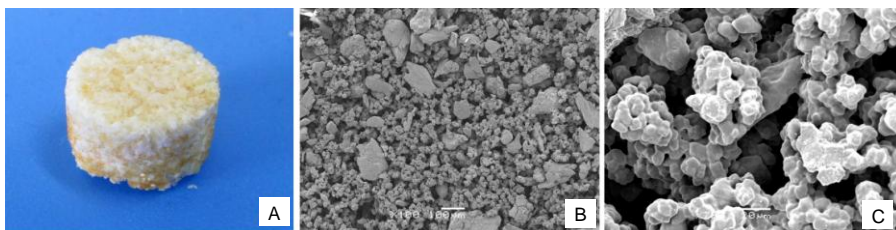


图5 淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石材料的大体和扫描电镜图

Figure 5 The gross and scanning electron microscope observations of the icariin-poly(lactic acid)/hydroxyapatite with 10^{-5} mmol/g icariin

图注: 复合材料中淫羊藿苷浓度为 10^{-5} mmol/g。图中 A 为材料大体观察, 为带多孔的略显黄色的白色圆柱体; B 为材料扫描电镜观察结果($\times 100$), 可见羟基磷灰石与聚乳酸混合均匀; C 为材料扫描电镜观察结果($\times 750$), 显示材料孔径在 50-150 μm 。

2.4 扫描电镜观察结果 图5为超临界CO₂制备IC-PLA/HA(100)材料大体及扫描电镜图,大体观察IC-PLA/HA(100)为带多孔的略显黄色的白色圆柱体(图5A);扫描电镜观察可见羟基磷灰石与聚乳酸混合均匀(图5B),而淫羊藿苷在材料中不易曲分,可见大量微球,可能为淫羊藿苷被聚乳酸包裹所形成,材料的孔径在50-150 μm之间(图5C),材料表面粗糙,有利于营养物质储留和细胞贴附。

3 讨论 Discussion

各种原因造成的骨缺损需通过植骨修复骨缺损,而植骨所需的理想骨修复材料应同时具备骨传导和骨诱导性能^[24-27],前期实验采用超临界二氧化碳法制备了具有良好理化性能和生物相容性的聚乳酸/羟基磷灰石材料^[28],但材料仅具有骨传导活性而缺乏骨诱导活性,为赋予材料骨诱导活性,此次实验中将具有促进成骨作用的来源于传统中药淫羊藿的提取物淫羊藿苷,通过超临界二氧化碳法加入聚乳酸/羟基磷灰石材料,制备淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石。淫羊藿苷已被众多研究证实具有促进成骨作用,有望成为骨形态发生蛋白替代物用于骨修复^[29-31]。确定材料中所需复合淫羊藿苷的量是材料制备的关键,淫羊藿苷的复合量既不能影响到材料的主要理化性能,同时还必需使从材料中释放的淫羊藿苷浓度达到有效剂量和时间。前期实验(另文发表)已证实 10^{-7} mol/L淫羊藿苷具有较低的细胞毒性与及重组骨形态发生蛋白2相接近的骨诱导活性,可作为一种骨诱导生长因子替代剂用于骨修复材料促进骨组织再生,这一结果与一些文献报导相一致^[32],张秀珍等^[33]证实不同浓度淫羊藿苷均可促进大鼠成骨细胞表达骨保护素mRNA,且以 10^{-7} mol/L作用最显著。本项目前期实验也证实 10^{-6} mol/L和 10^{-5} mmol/L淫羊藿苷抑制细胞增殖且细胞死亡数量增加,一些研究实验结果表明低于 10^{-8} mol/L的淫羊藿苷细胞毒性很低^[34-35], 10^{-5} mol/L淫羊藿苷与对照组相比虽显示出了一定的细胞毒性,但是其存活率仍高于91%,而 10^{-4} mol/L淫羊藿苷对细胞的抑制作用则较为显著(存活率为85%),说明 10^{-4} mol/L淫羊藿苷具有细胞毒性,因此选择 10^{-7} mol/L淫羊藿苷作为促进成骨的安全有效浓度。

实验中,分别按照每克复合材料中含安全有效浓度的10倍、100倍和1 000倍制备了3组淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石材料,生物力学性能和孔隙率检测结果表明按此比例加入淫羊藿苷对聚乳酸/羟基磷灰石材料的制备无显著影响。而体外缓释性能检测证实IC-PLA/HA(10)材料淫羊藿苷释放浓度低于有效剂量 10^{-7} mol/L,IC-PLA/HA(1000)材料淫羊藿苷第1天释放浓度为 2.05×10^{-6} mol/L,具有一定的细胞毒性,而IC-PLA/HA(100)材料淫羊藿苷第1天释放浓度为 2.42×10^{-7} mol/L,至第9天降至 9.80×10^{-8} mol/L,之后淫羊藿苷维持在一个较稳定浓度,至30 d为 6.18×10^{-8} mol/L,均接近淫羊藿苷有效浓度。诱导成骨的时间通

常发生于2-4周内,而30 d的有效缓释浓度基本可满足成骨诱导的时间需求。虽然体外缓释浓度和时间能基本能满足骨诱导的条件,但药物在体内与体外缓释仍然存在一定差别,仍需进一步的体内实验加以证实。

IC-PLA/HA(100)复合材料淫羊藿苷的释放基本符合一级方程,虽然在释药早期(1-3 d)发生了突释,但之后释药速度明显减低,释药规律接近零级,至30 d后仅释放了淫羊藿苷的70%左右,仍有30%的药物存留于材料中;IC-PLA/HA(10)和IC-PLA/HA(1000)组也有类似的结果,表明所制备的淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石具有良好的缓释效果。由于羟基磷灰石具有较大的表面积,而前3 d药物的突释可能源于材料表面及羟基磷灰石吸附的淫羊藿苷,而后期药物的缓慢释放可能源于聚乳酸降解导致其内部包裹淫羊藿苷的释放。

综上所述,采用超临界二氧化碳法构建的淫羊藿苷-聚乳酸/羟基磷灰石仿生型骨修复材料,淫羊藿苷的缓释性能基本能满足骨修复材料对骨诱导的要求,但复合材料的体内缓释性能、骨诱导性能和骨缺损修复能力,仍需进一步实验证实。

致谢: 感谢山西中医药大学实验动物中心的支持与帮助。

作者贡献: 实验设计,实验实施为第一、二作者,评估为全部作者,撰文为第一作者。

经费支持: 该文章接受了“山西省自然科学基金项目(201601D011126)”、“山西中医药大学博士启动基金项目(2014bk05)”、“山西省中医药科研课题(2016ZYCY02)”的基金资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 该作者声明在课题研究和文章撰写过程,不存在利益冲突。

伦理问题: 研究用材料学的实验方案符合相关伦理学要求,文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对于研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Windhager R, Hobusch GM, Matzner M. Allogeneic transplants for biological reconstruction of bone defects. Orthopade. 2017; 46(8):656-664.

- [2] Divi SN, Mikhael MM. Use of Allogenic Mesenchymal Cellular Bone Matrix in Anterior and Posterior Cervical Spinal Fusion: A Case Series of 21 Patients. *Asian Spine J.* 2017;11(3):454-462.
- [3] Hettwer W. Synthetic bone replacement: Current developments and perspectives. *Orthopade.* 2017;46(8):688-700.
- [4] 罗有福, 高金鉴, 高浩然, 等. 负载重组人骨形态发生蛋白2的 α 型半水硫酸钙/纳米羟基磷灰石复合植骨材料的成骨性能研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2016, 26(4):348-353.
- [5] Iqbal H, Ali M, Zeeshan R, et al. Chitosan/hydroxyapatite (HA)/hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) spongy scaffolds-synthesis and evaluation as potential alveolar bone substitutes. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017;60:553-563.
- [6] 唐智明, 熊龙, 曾建华, 等. 中空羟基磷灰石复合重组人骨形态发生蛋白2微球体修复骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(2): 177-181.
- [7] Zhu X, Zhang H, Zhang X, et al. Dent Mater J. In vitro study on the osteogenesis enhancement effect of BMP-2 incorporated biomimetic apatite coating on titanium surfaces. *Dent Mater J.* 2017;36(5):677-685.
- [8] 臧晓龙, 孙健, 李亚莉, 等. 3D生物打印构建聚乳酸羟基乙酸/纳米羟基磷灰石支架骨形态发生蛋白2缓释复合体的实验研究[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(16):2405-2411.
- [9] Faundez A, Tourmier C, Garcia M, et al. Bone morphogenetic protein use in spine surgery-complications and outcomes: a systematic review. *Int Orthop.* 2016;40(6):1309-1319.
- [10] Lykissas M, Gkiatas I. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spine surgery. *World J Orthop.* 2017;8(7):531-535.
- [11] 许静, 张晶晶, 郭非非, 等. 淫羊藿黄酮类主要成分促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞增殖分化作用及机制的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(14):113-120.
- [12] Wei Q, He M, Chen M, et al. Icaritin stimulates osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal stem cells by increasing TAZ expression. *Biomed Pharmacother.* 2017;91: 581-589.
- [13] Zhang SC, Feng PB, Mo GY, et al. Icaritin influences adipogenic differentiation of stem cells affected by osteoblast-osteoclast co-culture and clinical research adipogenic. *Biomed Pharmacother.* 2017;88:436-442.
- [14] Li M, Gu Q, Chen M, et al. Controlled delivery of icaritin on small intestine submucosa for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;71:260-267.
- [15] Wu T, Shu T, Kang L, et al. Icaritin, a novel plant-derived osteoinductive agent, enhances the osteogenic differentiation of human bone marrow- and human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med.* 2017;39(4):984-992.
- [16] 张黎声, 韩小晶, 罗志荣, 等. 淫羊藿苷对大鼠骨髓间充质干细胞迁移作用的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(2):44-48.
- [17] 鲍远, 黄俊明, 靖兴志, 等. 淫羊藿苷促进骨髓间充质干细胞成骨分化[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(24):6501-3507.
- [18] 曲美娟, 丁超, 王屹博, 等. 加载在种植体表面的淫羊藿苷对骨结合的影响[J]. 现代口腔医学杂志, 2016, 30(6):330-333.
- [19] Zhang Y, Wang J, Wang J, et al. Preparation of porous PLA/DBM composite biomaterials and experimental research of repair rabbit radius segmental bone defect. *Cell Tissue Bank.* 2015;16(4):615-622.
- [20] Liu X, Yang L, Li J, et al. GS/DBM/PLA porous composite biomaterial for the treatment of infective femoral condyle defect in rats. *Exp Ther Med.* 2016;11(6):2107-2116.
- [21] Han FY, Thurecht KJ, Whittaker AK, et al. Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading. *Front Pharmacol.* 2016;7:185.
- [22] Scognamiglio F, Blanchy M, Borgogna M, et al. Effects of supercritical carbon dioxide sterilization on polysaccharidic membranes for surgical applications. *Carbohydr Polym.* 2017; 173:482-488.
- [23] Zhang R, Ma PX. Poly(alpha-hydroxy acids)/hydroxyapatite porous composites for bone tissue engineering. I. Preparation and morphology. *J Biomed Mater Res.* 1999;44:446-455.
- [24] 吴涛, 吴金辉, 郑国栋, 等. 仿生组装淫羊藿苷-壳聚糖/羟基磷灰石骨修复材料的体外释药行为[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(52):8399-8404.
- [25] 唐俊杰, 李文杰, 李根, 等. 骨组织工程诱导性支架材料修复骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(3):340-346.
- [26] Zhang Y, Wang J, Ma Y, et al. Preparation and biocompatibility of demineralized bone matrix/sodium alginate putty. *Cell Tissue Bank.* 2017;18(2):205-216.
- [27] Kim HS, Park JC, Yun PY, et al. Evaluation of bone healing using rhBMP-2 soaked hydroxyapatite in ridge augmentation: a prospective observational study. *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2017;25;39(1):40.
- [28] Zhang Y, Wang J, Ma Y, et al. Preparation of poly(lactic acid)/sintered hydroxyapatite composite biomaterial by supercritical CO₂. *Biomed Mater Eng.* 2018;29(1):67-79.
- [29] 张艳丽. 二氧化钛纳米管负载淫羊藿苷对骨髓间充质干细胞及成骨细胞的影响[D]. 南方医科大学, 2015.
- [30] Lai Y, Cao H, Wang X, et al. Porous composite scaffold incorporating osteogenic phytomolecule icaritin for promoting skeletal regeneration in challenging osteonecrotic bone in rabbits. *Biomaterials.* 2018;153:1-13.
- [31] Wang Q, Cao L, Liu Y, et al. Evaluation of synergistic osteogenesis between icaritin and BMP2 through a micro/meso hierarchical porous delivery system. *Int J Nanomedicine.* 2017;19;12:7721-7735.
- [32] 朱鸿飞, 郑军, 徐小燕, 等. 不同浓度淫羊藿苷修复骨损伤: 争议与探索[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(2):301-306.
- [33] 张秀珍, 杨黎娟. 淫羊藿苷对大鼠成骨细胞护骨素、RANKL表达的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2006, 22(3):222-225.
- [34] Wei Q, He M, Chen M, et al. Icaritin stimulates osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal stem cells by increasing TAZ expression. *Biomed Pharmacother.* 2017;91: 581-589.
- [35] Wu Y, Cao L, Xia L, et al. Evaluation of Osteogenesis and Angiogenesis of Icaritin in Local Controlled Release and Systemic Delivery for Calvarial Defect in Ovariectomized Rats. *Sci Rep.* 2017;7(1):5077.