

负载去铁胺聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石复合支架的血管化成骨

<https://doi.org/10.12307/2022.448>张圣敏¹, 曹长红¹, 王宁宁¹, 王静¹, 李章一²

投稿日期: 2021-03-11

采用日期: 2021-04-23

修回日期: 2021-09-06

在线日期: 2021-09-27

中图分类号:

R459.9; R318.08; R782.1

文章编号:

2095-4344(2022)34-05413-06

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点一

△负载去铁胺的聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石复合支架可实现去铁胺的缓慢持续释放,大鼠脂肪干细胞体外研究在基因和蛋白水平证实该复合支架具有成骨成血管双重作用。

3D 打印

聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石/去铁胺支架

支架特征研究:

- (1) 表面形貌;
- (2) 体外降解实验;
- (3) 体外去铁胺释放实验。

细胞研究:

- (1) 细胞增殖实验;
- (2) 活死细胞染色;
- (3) 定量反转录聚合酶链式反应检测血管内皮生长因子、骨钙素基因表达;
- (4) 免疫荧光分析血管内皮生长因子、骨钙素蛋白表达。

文题释义:

去铁胺: 是一种安全性高、不良反应小的铁离子螯合剂, 临床上常用于治疗铁中毒和铁过量。

3D打印技术: 也称为快速成型技术, 是通过输入3D数字模型文件并运用金属粉末或可黏合材料, 通过逐层打印的方式构造物体形状的技术。

摘要

背景: 3D打印的聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石支架因其个性化的外型、优异的生物相容性和骨传导性, 被广泛应用于临界骨缺损修复, 然而由于支架内部缺乏早期的血管供应, 植入后对骨组织再生会产生不利影响。

目的: 验证负载去铁胺的聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石复合支架的成骨与成血管作用。

方法: 采用低温3D打印技术分别构建聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石复合支架(对照支架)与负载去铁胺的聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石复合支架(实验支架), 表征支架的微观形貌与体外降解性能, 同时检测负载去铁胺的聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石复合支架的去铁胺缓释性能。将大鼠脂肪干细胞分别接种于两组支架上, 以接种培养板的细胞为对照, 分别进行细胞骨架观察、细胞增殖实验、活死细胞染色、qRT-PCR检测与免疫荧光分析。

结果与结论: ①扫描电镜下可见, 两种支架具有均匀分布的大孔结构, 表现形貌无明显差异, 支架孔径约510 μm; ②体外降解实验显示, 两组支架均缓慢稳定的降解, 第8周时的降解率均小于10%; 两种支架周围的pH值稳定在7.1-7.4; ③体外缓释实验显示, 实验支架浸泡在PBS中前2周时去铁胺释放较快, 后期释放较为平缓, 在8周内释放了75%左右; ④荧光倒置显微镜下可见, 两种支架上的脂肪干细胞均呈纺锤形, 铺展较大; 扫描电镜下可见, 两组支架上均有很多细胞伪足, 细胞在材料表面有较大的铺展; ⑤CCK-8实验显示, 3组细胞增殖无差异($P > 0.05$); ⑥qRT-PCR检测显示, 与对照组及对照支架组比较, 实验组支架组的血管内皮生长因子、骨钙素基因表达升高($P < 0.01$); 免疫荧光分析显示, 与对照组及对照支架组比较, 实验组支架组的血管内皮生长因子、骨钙素蛋白表达升高($P < 0.01$); ⑦结果表明, 3D打印聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石/去铁胺支架有望发挥良好的成骨和血管化双重作用。

关键词: 聚乳酸-羟基乙酸; 羟基磷灰石; 骨再生; 血管化; 3D打印; 去铁胺; 脂肪干细胞; 复合支架

Desferrioxamine-loaded polylactic-co-glycolic acid/hydroxyapatite composite scaffold: vascularization and osteogenesis

Zhang Shengmin¹, Cao Changhong¹, Wang Ningning¹, Wang Jing¹, Li Zhangyi²

¹Department of Stomatology, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, Hebei Province, China; ²Department of Stomatology, Tianjin Fifth Central Hospital, Tianjin 300450, China

Zhang Shengmin, Master, Lecturer, Attending physician, Department of Stomatology, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, Hebei Province, China

Corresponding author: Li Zhangyi, Master, Associate chief physician, Department of Stomatology, Tianjin Fifth Central Hospital, Tianjin 300450, China

¹ 沧州医学高等专科学校口腔系, 河北省沧州市 061001; ² 天津市第五中心医院口腔科, 天津市 300450

第一作者: 张圣敏, 女, 1986年生, 河北省沧州市人, 汉族, 2012年天津医科大学毕业, 硕士, 讲师, 主治医师, 主要从事骨组织工程研究。

通讯作者: 李章一, 硕士, 副主任医师, 天津市第五中心医院口腔科, 天津市 300450

<https://orcid.org/0000-0003-4520-3031> (张圣敏)

基金资助: 沧州市科技计划项目(183302068), 项目负责人: 张圣敏; 沧州医学高等专科学校博士指导科研项目(19Z013), 项目负责人: 张圣敏

引用本文: 张圣敏, 曹长红, 王宁宁, 王静, 李章一. 负载去铁胺聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石复合支架的血管化成骨[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(34):5413-5418.



Abstract

BACKGROUND: Three-dimensional printed polylactic-co-glycolic acid/hydroxyapatite scaffold is widely used in bone defect repair, because of personalised shapes, excellent osteoconductivity and biocompatibility. However, implanted scaffolds have an adverse effect on bone tissue regeneration due to their poor ability to induce neovascularisation.

OBJECTIVE: To verify the osteogenic and angiogenic effects of the desferrioxamine-loaded polylactic-co-glycolic acid/hydroxyapatite composite scaffold.

METHODS: The polylactic-co-glycolic acid/hydroxyapatite composite scaffold (control scaffold) and desferrioxamine-loaded polylactic-co-glycolic acid/hydroxyapatite composite scaffold (experimental scaffold) could be fabricated using a low-temperature three-dimensional-printing technique. The microstructure and *in vitro* degradation of the scaffold were characterized. At the same time, the sustained-release properties of the deferramine from the desferrioxamine-loaded polylactic-co-glycolic acid/hydroxyapatite composite scaffold were detected. The rat derived adipose stem cells were seeded on the two groups of scaffolds respectively, and the cells inoculated on the culture plate were used as the control group. Cytoskeleton observation, cell proliferation test, staining of live and dead cells, qRT-PCR detection, and immunofluorescence analysis were performed.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Scanning electron microscopy showed that the control scaffold and experimental scaffold had uniformly distributed macroporous structure, and there was no obvious difference. The pore size of the scaffolds was about 510 μm . (2) *In vitro* degradation experiments showed that the degradation rate of the control scaffold and experimental scaffold was less than 10% at 8 weeks, and the pH value remained relatively stable and always remained at 7.1 to 7.4. (3) *In vitro* sustained-release experiments showed that the deferoxamine had a burst release from the experimental scaffolds within 2 weeks and sustained a steady level, at about 75% within 8 weeks. (4) It can be seen under a fluorescent inverted microscope that the adipose stem cells on the two scaffolds were spindle-shaped and spread larger. Scanning electron microscopy showed that there were many pseudopods of cells on both scaffolds, and the cells were spread well on the surface of the scaffolds. (5) CCK-8 assay showed there was no difference in cell proliferation among the three groups ($P < 0.05$). (6) qRT-PCR showed that compared with the control group and control scaffold group, the gene expression of vascular endothelial growth factor and osteocalcin in the experimental scaffold group was increased ($P < 0.01$). Immunofluorescence analysis showed that compared with the control group and the control scaffold group, the protein expression of vascular endothelial growth factor and osteocalcin in the experimental scaffold group increased ($P < 0.01$). (7) The results showed that the three-dimensional-printed desferrioxamine-loaded polylactic-co-glycolic acid/hydroxyapatite composite scaffold was expected to play a good dual role in osteogenesis and vascularization.

Key words: polylactic-co-glycolic acid; hydroxyapatite; osteogenesis; vascularisation; three-dimensional printing; desferrioxamine; adipose derived stem cells; composite scaffolds

Funding: the Cangzhou Municipal Science and Technology Project, No. 183302068 (to ZSM); Cangzhou Medical College Doctoral Supervision Research Project, No. 19Z013 (to ZSM)

How to cite this article: ZHANG SM, CAO CH, WANG NN, WANG J, LI ZY. Desferrioxamine-loaded polylactic-co-glycolic acid/hydroxyapatite composite scaffold: vascularization and osteogenesis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(34):5413-5418.

0 引言 Introduction

自体骨移植之所以能够最有效地修复临界骨缺损, 是因为其早期就能够建立血液微循环和骨传导构架^[1-4]。以高分子材料和陶瓷类材料为主要研究对象的组织工程化骨材料, 需要在机械性能、降解速度和诱导血管化成骨等多方面综合考虑^[5]。3D 打印聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石复合支架因其生物相容性、价格低、机械特征、可降解性、骨传导性等优点, 被认为是理想的组织工程骨的构建基石^[6-14], 但是早期血管化不足的问题一直是该复合支架无法在临床推广应用的主要原因^[15]。

聚乳酸-羟基乙酸是理想的生物支架和药物载体, 可溶于有机溶剂并与生物活性物质混合, 通过冷冻干燥可去除有机溶剂, 然后生物活性物质被混入聚乳酸-羟基乙酸中, 通过聚乳酸-羟基乙酸的降解, 生物活性物质被可控释放, 并作用于细胞促进其分化^[16-18]。羟基磷灰石的加入可以进一步改善支架的力学性能和骨传导性。

去铁胺是一种安全性高、不良反应小的铁离子螯合剂, 临床上常用于治疗铁中毒和铁过量^[19]。研究发现, 去铁胺可以通过上调缺氧诱导因子 1 α 信号通路支配的血管生成和成骨相关基因的表达, 进而促进血管化成骨^[20-22]。去铁胺已成功应用于多种载药支架, 如聚己内酯^[23]、聚(D, L-丙交酯)膜^[24]、二氧化钛纳米管和聚乳酸-羟基乙酸等^[25-26], 并促进了血管化成骨。

基于以上分析, 实验将去铁胺和羟基磷灰石均匀混入聚乳酸-羟基乙酸均质溶液制备成 3D 打印墨水, 采用低温沉积 3D 打印技术制备聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石/去铁胺支架结构。去铁胺被封装在聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰

石支架中, 通过支架的可控降解去铁胺从支架中稳定释放, 有利于平衡血管化骨生成与支架降解的关系。

因此, 聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石/去铁胺支架在促进成骨和血管生成的双重作用下, 可能具有修复骨缺损的长期疗效。聚乳酸-羟基乙酸的可降解性和可塑性, 羟基磷灰石优越的力学性能和骨传导性, 去铁胺的成骨成血管双重作用可优势互补, 实现适用于骨缺损再生的血管化的 3D 打印支架材料构建。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞实验, 单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2020 年 1 月至 2021 年 3 月在沧州医学高等专科学校科技实训中心完成。

1.3 材料 聚乳酸-羟基乙酸 [聚乳酸/聚乙醇酸=75/25, 平均相对分子质量 (M_w) \approx 21 万, 黏度 = 1.22 dL/g] 购自济南岱罡生物材料有限公司; 羟基磷灰石 (粒径 \approx 15 μm) 购自南京埃普瑞纳米材料有限公司; 去铁胺甲磺酸盐购自百灵威科技有限公司; CCK-8 试剂盒 (Dojindo); I 型胶原酶 (BioFroxx); RNA 提取试剂盒 (Fastagen); 反转录酶 (Toyobo); Alexa Fluor 488、骨钙素 (Abcam); 血管内皮生长因子 (Invitrogen); 鬼笔环肽 (Denver); 胎牛血清 (Solarbio); TRIzol 试剂 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); 低温 3D 打印机上 (BP11, 上普生物技术有限公司); 酶标仪 (SYNERGY H1, BioTek, USA); 扫描电子显微镜 (Regulus8100, Hitachi)。

1.4 实验方法

1.4.1 支架制造 根据预先设计的三维结构模型, 在低温 3D 打印机上制备了 3D 打印的聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石

(对照支架)、聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石/去铁胺支架(实验支架)。首先将聚乳酸-羟基乙酸溶解在1,4-二氧六环中形成均匀的500 g/L溶液,然后与羟基磷灰石和去铁胺混合,聚乳酸-羟基乙酸、羟基磷灰石及去铁胺的质量比为10:6:0.002,用磁力搅拌器搅拌聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石/去铁胺混合物,形成均匀的液体糊状物。将制备好的液体糊状物加热到45℃,然后将3D打印平台温度设置为-30℃,以18 mm/s的速度制备尺寸为2 cm×2 cm×0.2 cm的支架。在-20℃冰箱中保持复合支架的形态,并缓慢挥发1,4-二氧六环,通过真空冷冻干燥将1,4-二氧六环完全去除。聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石的支架(对照支架)制备过程同聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石/去铁胺支架,但不需加入去铁胺。

1.4.2 支架特征研究 用电子照相机对两种支架拍照,并用扫描电子显微镜对其表面特征进行表征。

1.4.3 支架体外降解实验 将两种支架置于PBS中,在37℃恒温下100 r/min持续震荡,进行支架的体外降解。每周更换一次新鲜的PBS,测定PBS的pH值,以第0周为基线计算pH值的变化。每周称量支架质量,持续8周,以第0周为基线计算支架质量下降情况。质量下降(%)= $m_t/m_0 \times 100\%$, m_0 和 m_t 分别为降解前和降解后的支架质量。

1.4.4 支架去铁胺释放实验 将聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石/去铁胺支架置于PBS中,在37℃恒温下100 r/min持续震荡,在指定的时间点向溶液中加入足量FeCl₃,利用酶标仪在485 nm波长时测量每孔的吸光度值。根据去铁胺标准曲线计算去铁胺累计释放量。

1.4.5 大鼠脂肪干细胞提取 大鼠脂肪干细胞取自1只雄性SD大鼠,4-6周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证编号:SCXK-(京)2016-0006,SPF级。取大鼠腹股沟部分的皮下脂肪组织,置于含100 U/mL青霉素和100 mg/L链霉素的PBS中洗涤2次,并用无菌剪刀剪碎成0.1 cm×0.1 cm×0.1 cm大小的脂肪块。之后,将2倍体积0.1%的I型胶原酶添加到脂肪块中,并在37℃恒温摇床消化1 h,1 000 r/min离心5 min获得脂肪干细胞,利用含体积分数10%胎牛血清、1%双抗的低糖DMEM培养液培养细胞,待细胞80%融合时进行传代。实验使用第3-5代细胞。

1.4.6 细胞骨架观察 将 2×10^4 个第3代大鼠脂肪干细胞在两种支架上培养48 h,然后用40 g/L多聚甲醛溶液固定细胞10 min, X-100通透细胞10 min, 5%BSA溶液封闭细胞30 min,鬼笔环肽孵育细胞1 h, DAPI孵育细胞10 min。最后,利用蔡司LSM800荧光倒置显微镜采集大鼠脂肪干细胞(骨架和核)的荧光图像。

为进一步观察大鼠脂肪干细胞在两种支架上的形貌,培养48 h后以PBS冲洗3次,2.5%戊二醛固定隔夜,分别用体积分数30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%和100%的乙醇进行逐级脱水,冷冻干燥机冷冻干燥2 h,最后在Regulus8100扫描电子显微镜下观察细胞的形态。

1.4.7 细胞增殖实验 将两种支架置于24孔板中,将 2×10^4 个大鼠脂肪干细胞接种于支架表面,培养第1, 3, 5天时,将10%体积的CCK-8溶液加入培养板并孵化2 h。利用酶标仪在450 nm波长时测量每孔的吸光度值。

1.4.8 活死细胞染色 将两种支架置于24孔板中,将 2×10^4 个大鼠脂肪干细胞接种于支架表面,培养48 h后,利用活/死细胞染色试剂盒进行细胞染色,并观察支架上的细胞活力。Calcein-AM染色活细胞为绿色,PI染色死细胞为红色。

1.4.9 定量反转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测 将两种支架置于24孔板中,将 2×10^4 个大鼠脂肪干细胞接种于支架表面,培养14 d。按照制造商说明,使用TRIzol试剂从细胞中提取总RNA。用纳米分光光度计(Quawell)测定RNA纯度和浓度。采用qRT-PCR对内参基因 β -actin和血管内皮生长因子、骨钙素基因进行分析。内参基因为 β -actin,实验使用的引物序列为(5'-3'):血管内皮生长因子, F: CTA CCT CCA CCA TGC CAA GT, R: CTC GAT TGG ATG GCA GTA GC; 骨钙素, F: CAG ACA AGT CCC ACA CAG CA, R: CAG ACA AGT CCC ACA CAG CA; β -actin, F: CCT CTA TGA CAA CAC AGT, R: AGC CAC CAA TCC ACA CAG。

1.4.10 免疫荧光分析 将第3代大鼠脂肪干细胞接种在两种支架上培养14 d后,免疫荧光分析血管内皮生长因子、骨钙素蛋白的表达。40 g/L多聚甲醛溶液固定细胞10 min, X-100通透细胞10 min, 5%BSA溶液封闭细胞30 min; 4℃用一抗骨钙素和血管内皮生长因子孵育细胞过夜,使用Alexa Fluor 488标记的二抗分别对骨钙素和血管内皮生长因子进行染色; PBS洗净二抗后,鬼笔环肽孵育细胞1 h, DAPI孵育细胞10 min; 利用蔡司LSM800荧光倒置显微镜采集染色细胞图像,利用Image J软件进行免疫荧光定量。

1.5 主要观察指标 两种支架对大鼠脂肪干细胞增殖、成骨与成血管的影响。

1.6 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用GraphPad software软件进行单因素方差分析。

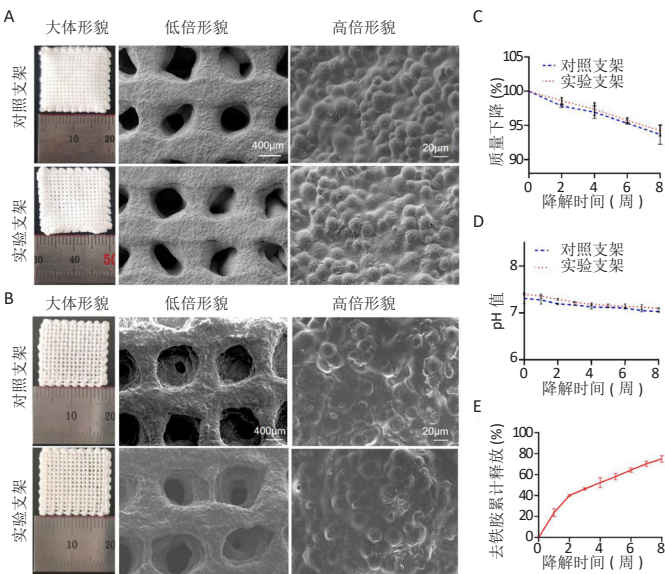
2 结果 Results

2.1 两种支架的表面形貌 扫描电子显微镜下可见两种支架具有均匀分布的大孔结构,经测量显示支架的孔径约510 μ m,在高倍镜下支架表面略粗糙,可见直径约15 μ m的羟基磷灰石微球均匀分散在支架表面,见图1A。数字化照片和扫描电镜显示,两种支架在表面形貌上并没有明显的差别,表明去铁胺的添加并不会改变支架表面形貌。

2.2 两种支架的体外降解性能 将两种支架在PBS中浸泡8周,发现支架形貌保持相对稳定,在第8周时支架未表现出形貌缺失,高倍放大扫描电镜显示支架孔径变大、边缘支撑结构变的窄小,表明支架出现了轻微的降解,见图1B,但并没有影响整体的形貌。两种支架缓慢稳定的出现质量丢失,在第8周时降解率均小于10%,见图1C,实验支架相比对照支架降解速率相对较慢,可能是由于去铁胺表面的羟基会与

聚乳酸-羟基乙酸表面的羧基发生共价结合，这也表明去铁胺与支架材料具备稳定结合的能力；两种支架周围的 pH 值稳定在 7.1-7.4，见图 1D，与人体微环境的 pH 值相似，有利于维持周围细胞的活力和分化潜能，其中实验支架相比对照支架检测的 pH 值略高，这可能与实验支架降解速率较慢有关。

2.3 实验支架的体外缓释性能 将实验支架在 PBS 中浸泡 8 周发现，去铁胺在前 2 周释放较快，这有利于支架在植入前期迅速构建血管化成骨，后期去铁胺释放较为平缓，在 8 周内释放了 75% 左右，见图 1E，这表明去铁胺后期释放速度较为稳定，这对支架植入后维持长期的血管化成骨有望发挥更好的作用。

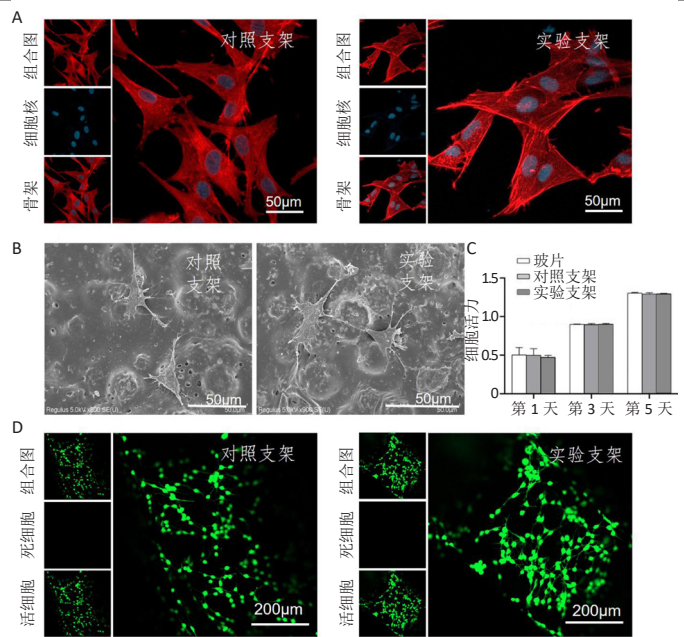


图注：A 为对照支架、实验支架的数码照片和扫描电镜图像，两种支架具有均匀分布的大孔结构，直径约 15 μm 的羟基磷灰石微球均匀分散在支架表面。B 为体外降解实验 8 周时两种支架的数码照片和扫描电子显微镜图像，两种支架轻微降解，未表现出明显的形貌缺失。C 为 0-8 周两种支架的质量下降，两种支架缓慢稳定降解，在第 8 周时降解率均小于 10%。D 为 0-8 周两种支架体外降解过程中 pH 值的变化，两种支架周围的 pH 值稳定在 7.1-7.4。E 为去铁胺在体外降解过程中从实验支架中的累积释放，去铁胺在前 2 周释放较快，后期释放较为平缓

图 1 | 两种 3D 打印复合支架的表征
Figure 1 | Characterization of two 3D printed composite scaffolds

2.4 两种支架的生物相容性 免疫荧光染色显示，大鼠脂肪干细胞在两种支架表面均呈纺锤形，铺展较大，两者形貌之间并没有明显的区别，见图 2A。扫描电镜显示，细胞在两种支架均伸出很多伪足，使细胞在材料表面有较大的铺展，见图 2B，这表明两种支架均有利于细胞的铺展和黏附。

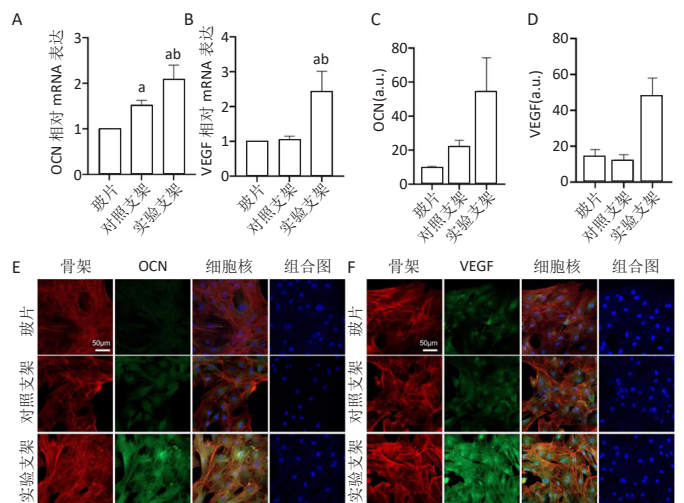
CCK-8 细胞增殖实验显示，两种支架上的细胞在第 1, 3, 5 天表现出持续增殖趋势，3 组间细胞增殖无明显差异 ($P > 0.05$)，见图 2C，表明两种支架材料均不会对细胞的增殖趋势产生明显影响。活死细胞染色显示，两种支架上未见明显的死亡细胞，见图 2D，表明两种支架材料均具有良好的生物相容性。



图注：A 为大鼠脂肪干细胞在对照支架、实验支架培养 48 h 的骨架免疫荧光染色，细胞在两种支架表面均呈纺锤形，铺展较大，两者形貌之间并没有明显的区别。B 为大鼠脂肪干细胞在两种支架培养 48 h 的扫描电镜图像，细胞在两种支架均伸出很多伪足。C 为大鼠脂肪干细胞在两种支架上的增殖分析，3 组间细胞增殖无明显差异 ($P > 0.05$)。D 为大鼠脂肪干细胞在两种支架培养 48 h 的活死细胞染色，未见明显的死细胞

图 2 | 两种支架的生物相容性
Figure 2 | Biocompatibility of the two scaffolds

2.5 两种支架的成骨特性 qRT-PCR 检测结果如图 3A, B 所示，相比 Plate 细胞培养板、对照支架，实验支架不仅显著增强了大鼠脂肪干细胞成骨基因骨钙素的表达，也增强了血管生成基因血管内皮生长因子的表达。免疫荧光染色检测骨钙素和血管内皮生长因子的蛋白表达，见图 3C-F。



图注：A、B 分别为大鼠脂肪干细胞在对照支架、实验支架培养 14 d 的骨钙素 (OCN) 与血管内皮生长因子 (VEGF) 基因表达，与玻片组比较， $^aP < 0.01$ ；与对照支架比较， $^bP < 0.01$ 。C、D 分别为大鼠脂肪干细胞在两种支架培养 14 d 的 OCN 与 VEGF 蛋白定量分析，与玻片组比较， $^aP < 0.01$ ；与对照支架比较， $^bP < 0.01$ 。E、F 分别为大鼠脂肪干细胞在两种支架培养 14 d 的 OCN 与 VEGF 免疫荧光染色

图 3 | 两种支架的成骨特性
Figure 3 | Osteogenic characteristics of the two scaffolds

相比 Plate 细胞培养板、对照支架, 实验支架显著增强了大鼠脂肪干细胞成骨蛋白钙素和成血管蛋白管内皮生长因子的表达。而对照支架上的细胞虽然在骨钙素的基因和蛋白水平也具有一定优势, 但对血管内皮生长因子的基因和蛋白水平表达不能发挥积极作用。

3 讨论 Discussion

3D 打印技术的主要优势在于可制备个性化外形和可控孔隙结构的支架材料^[27], 理想的 3D 打印支架应尽可能模仿细胞外环境^[28], 一般认为孔径 > 100 μm 为大孔径, 可为细胞黏附、新血管形成和骨内生长提供空间和隧道^[29-31], 可通过允许血管形成及营养物质的运输直接促进成骨, 是骨组织再生的理想选择。很多研究表明, 孔径在 300-500 μm 的多孔支架具有良好的生物相容性和成骨潜能^[32-34]。此次实验扫描电镜显示, 3D 打印的聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石、聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石/去铁胺支架可形成规则且均匀的大孔结构, 孔径为 510 μm 左右; 同时, 聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石/去铁胺支架模拟了天然骨成分, 羟基磷灰石均匀分布在聚乳酸-羟基乙酸基体中, 支架中的聚乳酸-羟基乙酸在骨中起胶原基质的作用, 为成骨提供结构支撑。随着支架的降解, 两种支架出现缓慢稳定的质量丢失, 这个结果表明在支架中加入羟基磷灰石可以更好地稳定聚合物基体。支架的质量损失伴随着聚乳酸-羟基乙酸酸性副产物的释放, 羟基磷灰石的碱性产物缓冲了聚乳酸-羟基乙酸的酸性副产物, 使支架材料周围保持中性环境, pH 值始终稳定在 7.1-7.4, 为细胞爬行、细胞黏附和成骨分化提供良好的环境。3D 打印的聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石、聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石/去铁胺支架在体外降解过程中支架表现出相对稳定的多孔结构和形状, 并保持了至少 8 周, 没有出现变形和裂纹, 这有利于新骨形成过程中的营养和结构支持。

以往研究表明, 去铁胺可以通过上调缺氧诱导因子 1 α 信号通路支配的血管生成和成骨相关基因的表达, 进而促进血管化成骨。去铁胺通常通过口服或静脉注射全身给药, 但其半衰期较短, 难以维持局部骨缺损修复所需的最佳药物剂量, 去铁胺结合可降解支架达到药物缓释可能是解决此问题的有效办法^[25]。研究表明, 多种载药支架如聚己内酯^[23]、聚(D, L-丙交酯)膜^[24]、二氧化钛纳米管和聚乳酸-羟基乙酸等^[25-26], 能够有效负载并释放去铁胺。然而, 上述研究中去铁胺均为负载于支架表层或滴加到材料表面^[23-26], 易受到体外敏感环境和体内酶降解的影响而导致难以获得稳定和长期的释放, 对于大块组织工程骨内部的血管化促进作用有限, 难以获得长效的修复作用。此次实验将去铁胺作为打印墨水混合在聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石基体材料中, 去铁胺被包覆在材料中, 因此可以获得更加缓慢长期的释放; 同时, 整个打印过程保证低温环境, 避免了高温环境可能导

致的去铁胺活性丧失。此次实验结果表明, 去铁胺在前 2 周释放较快, 有利于在前期迅速构建血管化成骨, 后期释放较为稳定, 在 8 周内释放了 75% 左右, 这表明去铁胺释放速度对维持长期的血管化成骨有望发挥更好的作用。

体外细胞实验验证了以上推论。细胞骨架染色和扫描电镜显示, 两种支架均有利于大鼠脂肪干细胞的铺展和黏附。活死细胞染色和 CCK-8 细胞增殖实验显示两种支架上的细胞具有良好的生物相容性, 去铁胺的添加不会改变聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石原本优越的生物学性能。分别利用 qRT-PCR 和免疫荧光检测大鼠脂肪干细胞在基因和蛋白水平的成骨和成血管分化能力, 结果显示相比 Plate 细胞培养板、聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石支架, 聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石/去铁胺支架在基因和蛋白水平增加了骨钙素和血管内皮生长因子的表达, 而聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石支架虽然在骨钙素的基因和蛋白水平也具有一定优势, 但对血管内皮生长因子的基因和蛋白表达不能发挥积极作用, 表明去铁胺的添加可以有效提升成骨和成血管作用。

通过 3D 打印技术制备了一种具有潜在生物活性的复合聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石/去铁胺支架, 从体外研究了该支架的生物安全性及成骨成血管诱导能力, 结果证实了该支架有较大的孔径, 拥有良好的生物相容性、较强的骨诱导性和血管诱导性。聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石/去铁胺支架是一种很有前途的植入物, 有望成为骨组织工程的理想去铁胺料, 但去铁胺的最佳用药量、与骨再生匹配的聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石支架降解、体内成骨和成血管的效果以及聚乳酸-羟基乙酸/羟基磷灰石/去铁胺支架的安全性还有待进一步探讨。

作者贡献: 张圣敏、李章一进行实验设计, 实验实施为张圣敏, 实验评估为李章一, 资料收集为曹长红、王宁宁、王静, 张圣敏成文, 李章一审核。

经费支持: 该文章接受了“沧州市科技计划项目(183302068)及沧州医学高等专科学校博士指导科研项目(19Z013)”的资助。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: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南: 本研究遵守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: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经沧州医学高等专科学校生物统计学专家审核。

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 4.0”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] LIU WC, CHEN S, ZHENG L, et al. Angiogenesis Assays for the Evaluation of Angiogenic Properties of Orthopaedic Biomaterials- A General Review. *Adv Healthc Mater.* 2017;6(5):1600434.
- [2] SARAN U, GEMIBU PIPERNI S, CHATTERJEE S, et al. Role of angiogenesis in bone repair. *Arch Biochem Biophys.* 2014;1(561):109-117.
- [3] HAUSMAN MR, SCHAFFLER MB, MAJESKA RJ, et al. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone.* 2001; 29(6):560-564.
- [4] HUANG JH, LIN D, WEI ZY, et al. Parathyroid Hormone Derivative with Reduced Osteoclastic Activity Promoted Bone Regeneration via Synergistic Bone Remodeling and Angiogenesis. *Small.* 2020;16(6): 1905876.
- [5] DANHIER F, ANSORENA E, SILVA JM, et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release.* 2012; 161(2): 505-522.
- [6] WENZ A, BORCHERS KIRSTEN, TOVAR GEM, et al. Bone matrix production in hydroxyapatite-modified hydrogels suitable for bone bioprinting. *Biofabrication.* 2017;9(4):044103.
- [7] BENDTSEN ST, QUINNELL SP, WEI M, et al. Development of a novel alginate-polyvinyl alcohol-hydroxyapatite hydrogel for 3D bioprinting bone tissue engineered scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2017;105(5): 1457-1468.
- [8] YOU F, CHEN XB, COOPER DML, et al. Homogeneous hydroxyapatite/alginate composite hydrogel promotes calcified cartilage matrix deposition with potential for three-dimensional bioprinting. *Biofabrication.* 2018;11(1):015015.
- [9] JAKUS AE, SHAH RN. Multi and mixed 3D-printing of graphene-hydroxyapatite hybrid materials for complex tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2017;105(1):274-283.
- [10] SZCZES A, HOLYSZ L, CHIBOWSKI E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Adv Colloid Interfac.* 2017;249:321-330.
- [11] SATTARY M, RAFIENIA M, KAZEMI M, et al. Promoting effect of nano hydroxyapatite and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in polycaprolactone/gelatin scaffold for bone tissue engineering. *Mat Sci Eng C-Mater.* 2019;97:141-155.
- [12] GAO L, HUANG ZY, YAN SF, et al. Sr-HA-graft-Poly(gamma-benzyl-L-glutamate) Nanocomposite Microcarriers: Controllable Sr(2+) Release for Accelerating Osteogenesis and Bony Nonunion Repair. *Biomacromolecules.* 2017;18(11):3742-3752.
- [13] MARX RE, SAWATARI Y, FORTIN M, et al. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 63(11):1567-1575.
- [14] MONDAL S, DOROZHKIN SV, PAL U, et al. Recent progress on fabrication and drug delivery applications of nanostructured hydroxyapatite. *Wires Nanomed Nanobi.* 2018;10(4):e1504.
- [15] GENTILE P, CHIONO V, CARMAGNOLA I, et al. An overview of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci.* 2014;15(3):3640-3659.
- [16] XIE XH, WANG XL, ZHANG Z, et al. Structural and degradation characteristics of an innovative porous PLGA/TCP scaffold incorporated with bioactive molecular icaritin. *Biomed Mater.* 2010;5(5):054109.
- [17] QIN L, YAO D, ZHENG LZ, et al. Phytomolecule icaritin incorporated PLGA/TCP scaffold for steroid-associated osteonecrosis: Proof-of-concept for prevention of hip joint collapse in bipedal emus and mechanistic study in quadrupedal rabbits. *Biomaterials.* 2015;59:125-143.
- [18] WANG XL, XIE XH, ZHANG G, et al. Exogenous phytoestrogenic molecule icaritin incorporated into a porous scaffold for enhancing bone defect repair. *J Orthop Res.* 2013;31(1):164-172.
- [19] HOLDEN P, NAIR LS. Deferoxamine: An Angiogenic and Antioxidant Molecule for Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part B-Re.* 2019;25(6): 461-470.
- [20] TCHANQUE-FOSSUO CN, DAHLE SE, BUCHMAN SR, et al. Deferoxamine: potential novel topical therapeutic for chronic wounds. *Brit J Dermatol.* 2017;176(4):1056-1059.
- [21] DUSCHER D, TROTSYUK AA, MAAN ZN, et al. Optimization of transdermal deferoxamine leads to enhanced efficacy in healing skin wounds. *J Control Release.* 2019;308:232-239.
- [22] QAYOOM A, ANEESHA VA, ANAGHA S, et al. Lecithin-based deferoxamine nanoparticles accelerated cutaneous wound healing in diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2019;858:172478.
- [23] YAN YF, CHEN H, ZHANG HB, et al. Vascularized 3D printed scaffolds for promoting bone regeneration. *Biomaterials.* 2019;190-191:97-110.
- [24] LI HH, LUO BH, WEN W, et al. Deferoxamine immobilized poly(D,L-lactide) membrane via polydopamine adhesive coating: The influence on mouse embryo osteoblast precursor cells and human umbilical vein endothelial cells. *Mat Sci Eng C-Mater.* 2017;70:701-709.
- [25] RAN QC, YU YL, CHEN WZ, et al. Deferoxamine loaded titania nanotubes substrates regulate osteogenic and angiogenic differentiation of MSCs via activation of HIF-1alpha signaling. *Mat Sci Eng C-Mater.* 2018;91: 44-54.
- [26] JIA P, CHEN H, KANG H, et al. Deferoxamine released from poly(lactic-co-glycolic acid) promotes healing of osteoporotic bone defect via enhanced angiogenesis and osteogenesis. *J Biomed Mater Res A.* 2016; 104(10):2515-2527.
- [27] WEN Y, XUN S, HAOYE M, et al. 3D printed porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering: a review. *Biomater Sci-UK.* 2017;5(9): 1690-1698.
- [28] VENKATESAN J, BHATNAGAR I, MANIVASAGAN P, et al. Alginate composites for bone tissue engineering: A review. *Int J Biol Macromol.* 2015;72:269-281.
- [29] LECOMTE A, GAUTIER H, BOULER JM, et al. Biphasic calcium phosphate: a comparative study of interconnected porosity in two ceramics. *J Biomed Mater Res B.* 2008;84(1):1-6.
- [30] PEI X, MA L, ZHANG BQ, et al. Creating hierarchical porosity hydroxyapatite scaffolds with osteoinduction by three-dimensional printing and microwave sintering. *Biofabrication.* 2017;9(4):045008.
- [31] WANG XJ, LOU T, ZHAO WH, et al. The effect of fiber size and pore size on cell proliferation and infiltration in PLLA scaffolds on bone tissue engineering. *J Biomater Appl.* 2016;30(10):1545-1551.
- [32] LAI YX, CAO HJ, WANG XL, et al. Porous composite scaffold incorporating osteogenic phytomolecule icaritin for promoting skeletal regeneration in challenging osteonecrotic bone in rabbits. *Biomaterials.* 2018;153:1-13.
- [33] CHEN SH, LEI M, XIE XH, et al. PLGA/TCP composite scaffold incorporating bioactive phytomolecule icaritin for enhancement of bone defect repair in rabbits. *Acta Biomater.* 2013;9(5):6711-6722.
- [34] XIE XH, WANG XL, ZHENG G, et al. Biofabrication of a PLGA-TCP-based porous bioactive bone substitute with sustained release of icaritin. *J Tissue Eng Regen M.* 2015;9(8):961-972.

(责任编辑: GW, ZN, ZJP)