

# 3D 打印聚乳酸 - 纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖 / 多西环素抗菌支架的性能

刘岩, 郑雪新

<https://doi.org/10.12307/2024.529>

投稿日期: 2023-09-04

采用日期: 2023-10-21

修回日期: 2023-11-15

在线日期: 2023-11-23

中图分类号:

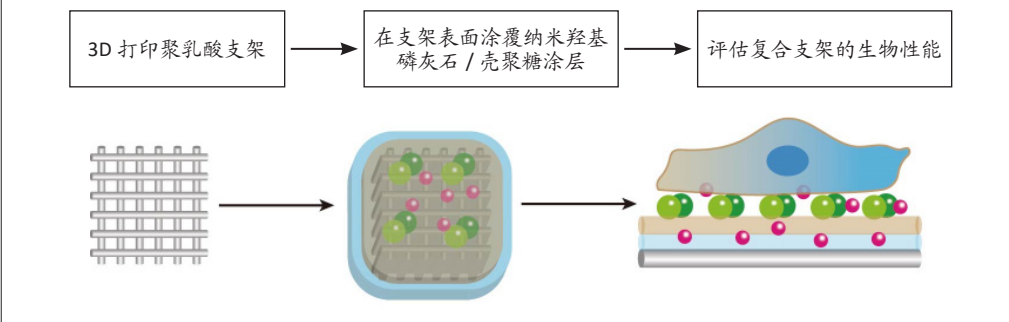
R459.9; R318.08; TB324

文章编号:

2095-4344(2024)22-03532-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 3D 打印聚乳酸 - 纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖支架的制备与表征



文题释义:

**聚乳酸:** 是美国食品和药品管理局(FDA)批准的可与生物组织直接接触的生物材料之一, 具有良好的生物相容性和生物降解性。  
**羟基磷灰石:** 是人体和动物骨骼和牙齿的主要无机成分, 常被广泛用作硬组织修复和骨填充材料。

摘要

**背景:** 聚乳酸具有良好的生物相容性和生物降解性, 成为一种新型的骨科固定材料, 然而该材料缺乏细胞识别信号, 不利于细胞黏附和成骨分化, 限制了其在生物材料中的应用。

**目的:** 3D打印聚乳酸-纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架, 评估其药物缓释及生物性能。

**方法:** 采用熔融沉积技术打印孔隙交互的多孔聚乳酸支架(记为PLA支架), 将该支架浸泡于多巴胺溶液中制备聚乳酸-多巴胺支架(记为PLA-DA支架); 将纳米羟基磷灰石投入壳聚糖溶液中, 然后将PLA-DA支架浸没其中, 制备聚乳酸-纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架(记为PLA-nHA/CS支架), 表征3组支架的微观形貌、孔隙率、水接触角与压缩强度。采用冷冻干燥法制备负载药物多西环素的PLA-nHA/CS支架(记为PLA-nHA/CS-DOX支架), 表征其药物释放。将PLA、PLA-DA、PLA-nHA/CS、PLA-nHA/CS-DOX支架分别与MC3T3-E1细胞共培养, 检测细胞增殖与成骨分化能力; 将不同浓度的金黄色葡萄球菌悬液分别与4组支架共培养, 采用抑菌圈实验检测支架的抗菌性能。

**结果与结论:** ①扫描电镜下可见PLA、PLA-DA支架表面致密光滑, PLA-nHA/CS支架表面可见纳米羟基磷灰石颗粒; PLA、PLA-DA、PLA-nHA/CS支架的孔隙率逐渐降低, 压缩强度逐渐升高, PLA-nHA/CS支架的弹性模量满足松质骨要求; PLA-DA、PLA-nHA/CS支架的水接触角小于PLA支架; PLA-nHA/CS支架体外可持续释放药物达8 d。②CCK-8检测显示, 4组支架均未显著影响MC3T3-E1细胞的增殖; PLA-DA组、PLA-nHA/CS组、PLA-nHA/CS-DOX组细胞碱性磷酸酶活性均高于PLA组; 茜素红染色显示, 与PLA组相比, PLA-nHA/CS组、PLA-nHA/CS-DOX组细胞表现出较高的矿化水平。③抑菌圈实验显示PLA、PLA-DA支架无抗菌性能, PLA-nHA/CS支架具有一定的抗菌性能, PLA-nHA/CS-DOX支架具有超强的抗菌性能。④结果表明, PLA-nHA/CS-DOX支架具有良好的药物缓释性能、细胞相容性、促成骨性能及抗菌性能。

**关键词:** 3D打印; 聚乳酸支架; 纳米羟基磷灰石; 多巴胺; 壳聚糖; 抗菌涂层; 药物缓释; 骨再生

## Performance of 3D-printed polylactic acid-nano-hydroxyapatite/chitosan/doxycycline antibacterial scaffold

Liu Yan, Zheng Xuexin

Department of Scientific Research, Fuzhou Second Hospital, Fuzhou 350007, Fujian Province, China

Liu Yan, Master, Research assistant, Department of Scientific Research, Fuzhou Second Hospital, Fuzhou 350007, Fujian Province, China

**Corresponding author:** Liu Yan, Master, Research assistant, Department of Scientific Research, Fuzhou Second Hospital, Fuzhou 350007, Fujian Province, China

Abstract

**BACKGROUND:** Polylactic acid has good biocompatibility and biodegradability, and has become a new orthopedic fixation material. However, the lack of cell recognition signal of this material is not conducive to cell adhesion and osteogenic differentiation, which limits its application in biomaterials.

**OBJECTIVE:** 3D-printed polylactic acid-nano-hydroxyapatite (nHA)/chitosan (CS) scaffold to evaluate its drug sustained-release and biological properties.

**METHODS:** The porous polylactic acid scaffold (recorded as PLA scaffold) with interporous pores was printed by fused deposition modeling technique, and the scaffold was soaked in dopamine solution to prepare polylactic acid-dopamine scaffold (recorded as PLA-DA scaffold). Nano-hydroxyapatite was immersed in

福州市第二医院科研办, 福建省福州市 350007

第一作者: 刘岩, 女, 1989年生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 硕士, 研究实习员, 主要从事生物医用材料研究。

通讯作者: 刘岩, 硕士, 研究实习员, 福州市第二医院科研办, 福建省福州市 350007

<https://orcid.org/0000-0001-5157-9161> (刘岩)

基金资助: 福建省卫生健康科研人才培养项目 (2019-2-27), 项目负责人: 刘岩; 福建省创伤骨科急救与康复临床医学研究中心项目 (2020Y2014)

引用本文: 刘岩, 郑雪新. 3D 打印聚乳酸 - 纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖 / 多西环素抗菌支架的性能 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(22):3532-3538.



chitosan solution, and then the PLA-DA scaffold was immersed in it to prepare polylactic acid-nano-hydroxyapatite/chitosan scaffold (recorded as PLA-nHA/CS scaffold). The micro-morphology, porosity, water contact angle, and compressive strength of the three scaffolds were characterized. PLA-nHA/CS scaffold loaded with doxycycline (recorded as PLA-nHA/CS-DOX scaffold) was prepared by freeze-drying method, and its drug release was characterized. PLA, PLA-DA, PLA-nHA/CS, and PLA-nHA/CS-DOX scaffolds were co-cultured with MC3T3-E1 cells, separately, to detect cell proliferation and osteogenic differentiation. Staphylococcus aureus suspensions of different concentrations were co-cultured with four groups of scaffolds. The antibacterial performance of scaffolds was detected by inhibition zone test.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Under scanning electron microscopy, the surfaces of PLA and PLA-DA scaffolds were dense and smooth, and nHA particles were observed on PLA-nHA/CS scaffolds. The porosity of PLA, PLA-DA and PLA-nHA/CS scaffolds decreased gradually, and the compressive strength increased gradually. The elastic modulus of PLA-nHA/CS scaffolds met the requirements of cancellous bone. The water contact angle of PLA-DA and PLA-nHA/CS brackets was smaller than that of PLA scaffolds. The PLA-nHA/CS scaffold sustainably released drugs *in vitro* for 8 days. (2) CCK-8 assay showed that the proliferation of MC3T3-E1 cells was not significantly affected by the four groups of scaffolds. The activity of alkaline phosphatase in PLA-DA group, PLA-nHA/CS group, and PLA-nHA/CS-DOX group was higher than that in PLA group. Alizarin red staining showed that compared with PLA group, the cells in PLA-nHA/CS group and PLA-nHA/CS-DOX group showed higher mineralized water level. (3) Inhibition zone test exhibited that PLA and PLA-DA scaffolds had no antibacterial properties. PLA-nHA/CS scaffolds had certain antibacterial properties. PLA-nHA/CS-DOX scaffolds had super antibacterial properties. (4) The results showed that the PLA-nHA/CS-DOX scaffold had good drug release performance, cell compatibility, osteogenic properties, and antibacterial properties.

**Key words:** 3D printing; polylactic acid scaffold; nano-hydroxyapatite; dopamine; chitosan; antibacterial coating; drug sustained release; bone regeneration

**Funding:** Fujian Provincial Health Technology Project, No. 2019-2-27 (to LY); Fujian Provincial Clinical Medical Research Center for First Aid and Rehabilitation in Orthopaedic Trauma, No. 2020Y2014

**How to cite this article:** LIU Y, ZHENG XX. Performance of 3D-printed polylactic acid-nano-hydroxyapatite/chitosan/doxycycline antibacterial scaffold. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2024;28(22):3532-3538.

## 0 引言 Introduction

由于骨质疏松、创伤、术后切除和先天畸形而引起的骨缺损一直是临床面临的常见问题，大多需要手术干预来再生新骨<sup>[1]</sup>，因此骨修复材料的需求迫切。目前自体骨是最好的选择，但当自体骨供给量不足时亟需能够与周围组织相容来修复受损骨的骨替代材料<sup>[2]</sup>。理想的骨支架材料应具备模拟骨成分、结构和力学性能的特点，能够为细胞增殖和分化提供临时场所，并且引导细胞和血管在支架的空隙生长和繁殖<sup>[3-4]</sup>。

目前常用的支架制备方法有静电纺丝法、自组装技术、热致相分离法及3D打印法。3D打印技术为快速准确再生医学提供了一种新的策略，可以个性化设计支架形状，更好地控制孔径和孔隙率<sup>[5-6]</sup>，同时优化支架的结构和力学性能<sup>[7-8]</sup>。YANG等<sup>[9]</sup>通过3D打印聚乳酸支架，负载抗癌药后植入体内实现精准给药，抑制乳腺癌的生长和转移。

聚乳酸具有良好的生物相容性和生物降解性，常用于治疗小型骨缺损，成为一种新型的骨科固定材料<sup>[10-11]</sup>，然而其作为一种疏水性高分子材料缺乏细胞识别信号，不利于细胞的黏附和成骨分化，限制了聚乳酸在生物材料中的应用。为克服这些缺点，常用的方法是对其进行表面改性，一种是将纳米羟基磷灰石结合到聚合物表面，因其与骨组织相似<sup>[12-13]</sup>，能够调节成骨细胞的增殖和分化<sup>[14]</sup>。纳米羟基磷灰石 $[Ca_5(PO_4)_3(OH)]$ 是人体和动物骨骼和牙齿的主要无机成分，对骨质增生有刺激或诱导作用，能促进缺损组织的修复，通过添加天然高分子材料可提高其骨再生能力<sup>[15]</sup>。此外，多巴胺具有较强的金属螯合能力，可以成功高效地引入纳米羟基磷灰石<sup>[16]</sup>。壳聚糖常作为药物缓释控释载体，经过交联作用能够延长包裹药物的释放时间，表现出了良好的性能<sup>[17]</sup>。金黄色葡萄球菌是骨相关感染的主要病原体，能在骨和植入物表面黏附形成生物膜<sup>[18]</sup>。将3D打印支架与抗生素相结合使抗生素受控释放，是一种改进支架不足的方法<sup>[19-20]</sup>。目前已有研究将打印支架与控制抗生素递送结合用于治疗骨感染<sup>[20]</sup>。在治疗骨感染时多西环素可能是一种很好的支架负载选择<sup>[21]</sup>。

此次实验通过多巴胺辅助共沉积方法在聚乳酸支架表面构建纳米羟基磷灰石/壳聚糖涂层，以期在保证骨植入物力学性能的同时改进聚乳酸支架的生物活性，并且减缓抗生素药物的释放速率。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 材料表征及生物性能表征，对数据进行单因素方差分析。

**1.2 时间及地点** 实验于2020年6月至2022年10月在福州市第二医院完成。

**1.3 材料** 聚乳酸、纳米羟基磷灰石、壳聚糖、乙酸、氢氧化钠(国药集团);多巴胺(阿拉丁);多西环素(上海源叶生物科技有限公司);PBS、 $\alpha$ -MEM培养基、青霉素、链霉素、胎牛血清(Hyclone公司);CCK-8试剂盒、碱性磷酸酶试剂盒、BCA试剂盒及茜素红试剂盒(碧云天);MC3T3-E1成骨细胞(西格玛生物技术有限公司);金黄色葡萄球菌(福州市第二医院医学检验科);场发射扫描电子显微镜(德国Sigma, 500);傅里叶红外光谱仪(美国, iS50);X射线衍射仪(荷兰, X'Pert3);接触角测量仪(中国, JC2000D);力学测试仪(中国, ZQ990B);X射线光电子能谱(美国, 250i);酶标仪(美国, iD3)。

### 1.4 方法

**1.4.1 支架的制备** 采用德国Envision Tec 3D Bioplotter进行支架打印。将10 g聚乳酸投入至料筒中，加热至完全熔融状态进行打印，设置温度190 °C，压力(100±20) kPa，打印速度(5.0±1.0) mm/s，线间距0.5 mm，冷却后得到1 cm×1 cm×1 cm的三维支架(记为PLA支架)。在室温避光条件下，将PLA支架浸泡于2 mg/mL的多巴胺溶液(10 mmol/L Tris缓冲液, pH=8.5)中24 h，使多巴胺修饰到支架表面，用大量去离子水超声冲洗以去除游离的多巴胺，然后在烘箱中干燥得聚乳酸-多巴胺支架(记为PLA-DA支架)。

称取0.5 g的纳米羟基磷灰石投入到50 mL 2%壳聚糖乙酸(1%)溶液中，超声、搅拌至溶液均匀，然后将PLA-DA支

架浸没其中,取出烘干,循环5次。用0.5 mol/L的NaOH浸泡支架5 min,用去离子水清洗至中性,烘干后得到聚乳酸-纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架(记为PLA-nHA/CS支架)。

将PLA支架、PLA-nHA/CS支架分别浸泡于2.5 mg/mL的多西环素溶液中使孔中充分填充药物,采用冷冻干燥法将其干燥,然后用去离子水冲洗支架表面的药物,得到负载多西环素的支架(分别记为PLA-DOX支架、PLA-nHA/CS-DOX支架)。

1.4.2 支架的表征 采用场发射扫描电子显微镜对PLA、PLA-DA、PLA-nHA/CS支架的形貌和孔径进行表征。

采用X射线光电子能谱分析PLA、PLA-DA、PLA-nHA/CS支架表面的元素组成。使用傅里叶变换红外光谱仪,在400-4 000  $\text{cm}^{-1}$ 范围内以2  $\text{cm}^{-1}$ 的分辨率进行64次扫描,分析纳米羟基磷灰石、多巴胺、壳聚糖粉末及PLA、PLA-DA、PLA-nHA/CS支架表面的化学基团。

使用X射线衍射仪(Cu anode tube of wavelength  $\lambda_1=0.1541\text{ nm}$ 和 $\lambda_2=0.1544\text{ nm}$ )测量纳米羟基磷灰石、壳聚糖粉末及PLA、PLA-DA、PLA-nHA/CS支架的结晶结构,扫描范围为 $5^\circ-60^\circ$ 。通过接触角测量仪评价PLA、PLA-DA、PLA-nHA/CS支架的湿润性。

利用力学测试仪对PLA、PLA-DA、PLA-nHA/CS支架进行压缩实验,以5 mm/min的十字头速度进行加压,绘制应力-应变曲线,记录抗压强度。

采用液体置换法测量PLA、PLA-DA、PLA-nHA/CS支架的孔隙率,称取支架质量( $m_1$ ),在室温下将支架浸泡于一定体积( $V_1$ )的乙醇中,超声1 min使乙醇完全渗透到孔隙中,记录支架和乙醇的体积( $V_2$ ),取出支架并记录质量( $m_2$ ),支架孔隙率 $=\frac{(m_2-m_1)/[\rho_{乙醇}]\times(V_2-V_1)}{V_1}$ 。

1.4.3 支架的药物释放 将PLA-DOX支架、PLA-nHA/CS-DOX支架浸泡于10 mL PBS(pH=7.4)溶液中,于37.0  $^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡器中振荡(100 r/min),间隔一定时间取出1 mL上清液并添加等体积PBS,保持释放液体积不变,采用酶标仪于350 nm处检测释放溶液吸光度值,根据标准曲线计算药物释放浓度<sup>[22]</sup>。此外在完成释放实验后将支架进一步超声,以溶解支架中残留吸附的多西环素<sup>[20]</sup>。药物释放的百分比是通过每次测量时PBS中的药物浓度除以最终在缓冲液中释放的药物量来计算<sup>[23]</sup>。

1.4.4 支架对成骨细胞增殖的影响 加入含体积分数10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的 $\alpha$ -MEM培养基培养MC3T3-E1细胞,置于37  $^\circ\text{C}$ 、体积分数5% $\text{CO}_2$ 增湿培养箱中,每3 d更换一次培养基。将PLA、PLA-DA、PLA-nHA/CS和PLA-nHA/CS-DOX支架均切割成片状(10 mm $\times$ 10 mm $\times$ 1 mm),在细胞接种之前,将支架浸入体积分数75%乙醇中浸泡30 min,然后在紫外光下灭菌1 h。将支架置于24孔板底后分别接种MC3T3-E1细胞,细胞密度 $2\times 10^4$ /孔,置于37  $^\circ\text{C}$ 、体积分数5% $\text{CO}_2$ 增湿培养箱中培养。培养第1,3,5,7天,每孔加入100  $\mu\text{L}$  CCK-8试剂37  $^\circ\text{C}$ 孵育1 h,使用酶标仪在450 nm

波长处测定吸光度值。

1.4.5 支架对成骨细胞成骨分化的影响

碱性磷酸酶活性:PLA、PLA-DA、PLA-nHA/CS和PLA-nHA/CS-DOX支架灭菌处理后分别置于24孔板底,将MC3T3-E1细胞接种于各支架表面,细胞密度 $1\times 10^5$ /孔,置于37  $^\circ\text{C}$ 、体积分数5% $\text{CO}_2$ 增湿培养箱中培养。培养7,14 d后,去除培养基并用PBS清洗,使用1%Triton X-100裂解细胞30 min,加入终止液终止反应,使用酶标仪在405 nm处测量吸光度值。所有实验均一式三份进行。此外培养7,14 d后,使用BCA蛋白质测定试剂盒检测细胞总蛋白量,在562 nm处测量吸光度值。以空白样品作对照,所有实验均一式三份进行。

茜素红染色:PLA、PLA-DA、PLA-nHA/CS和PLA-nHA/CS-DOX支架灭菌处理后分别置于6孔板底,将MC3T3-E1细胞接种于各支架表面,细胞密度 $2\times 10^5$ /孔,置于37  $^\circ\text{C}$ 、体积分数5% $\text{CO}_2$ 增湿培养箱中培养。培养21 d后,40 g/L多聚甲醛溶液固定20 min,用PBS洗涤3次,进行茜素红染色评估矿化结节形成。

1.4.6 支架的抗菌活性 实验按照药敏试验标准(CLSI)执行。将金黄色葡萄球菌接种于无菌生理盐水中,制成菌悬液,细菌含量分别为 $1\times 10^8$  CFU和 $1\times 10^5$  CFU。蘸取菌液均匀涂布于MH琼脂平板中,分别放入PLA、PLA-DA、PLA-nHA/CS、PLA-nHA/CS-DOX支架,37  $^\circ\text{C}$ 下培养3 d后,使用游标卡尺测量抑菌圈直径,用数码相机拍摄照片。

1.5 主要观察指标 各组支架的理化性能、细胞毒性、促成骨性能及抗菌活性。

1.6 统计学分析 所有数据应用SPSS 22.0统计软件分析,对数据进行单因素方差分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 表明两组数据之间比较差异有显著性意义。该文统计学方法已经福州市第二医院生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

2.1 支架形貌表征结果 3D打印由于其可设计性、精确性常用于骨组织工程。试验将3D打印技术与多层涂覆方法相结合获得了多功能支架。扫描电镜下观察PLA、PLA-DA、PLA-nHA/CS支架的表面形态,见图1。低倍镜下,所有多孔支架均具有相似的宏观结构,同一层的丝线相互平行,逐层以 $90^\circ$ 相互交错,形成互通的大孔结构。高倍镜下,PLA支架表面致密光滑,孔径为 $(257\pm 27)\mu\text{m}$ ;PLA-DA支架表面依旧保持光滑,孔径降至 $(200\pm 20)\mu\text{m}$ ;PLA-nHA/CS支架表面可以清楚看到纳米羟基磷灰石颗粒,孔径与PLA-DA支架相比没有明显变化。

2.2 支架湿润性检测结果 植入生物材料主要通过其表面与生物系统相互作用,而生物材料的表面特性(如润湿性)会影响细胞黏附和蛋白质吸附<sup>[24-25]</sup>,因此为了评估表面湿润性的变化,对所有支架进行静态水接触角测量。图2A显示各组支架的湿润性变。纯PLA支架的疏水性较强,水接触角为

( $86.50\pm 0.67$ )°; PLA-DA 支架表面的接触角下降到 ( $72.50\pm 4.17$ )°, 材料向亲水型转变, 说明多巴胺完全覆盖到支架表面; PLA-nHA/CS 支架表面的接触角为 ( $80.30\pm 3.75$ )°, 较 PLA-DA 支架略有升高, 这可能与纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖的涂覆量有关。显然, 多巴胺涂层和纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖涂层改善了聚乳酸表面的润湿性, 因为多巴胺中邻苯二酚基团和纳米羟基磷灰石中羟基的存在使涂层具有亲水性, 这有利于组织愈合和早期骨整合<sup>[26]</sup>。

**2.3 支架孔隙率与力学性能检测结果** 骨组织工程支架的机械性能对其生物力学性能至关重要, 支架的机械性能和药物释放取决于支架的孔隙率<sup>[27]</sup>, 因此实验评估了支架的孔隙率。表 1 显示了各组支架的压缩力学性能和孔隙率。随着多巴胺和纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖的涂覆, 支架的孔隙率减小, 压缩强度增加, 这是由于支架孔壁厚度增加。

表 1 | 各组支架的孔隙率与机械性能

Table 1 | Porosity and mechanical properties of scaffolds of each group

支架	孔隙率 ( $\bar{x}\pm s$ , %)	压缩强度 (MPa)	弹性模量 (MPa)
聚乳酸支架	$32.70\pm 8.72$	22.10	477.87
聚乳酸-多巴胺支架	$27.38\pm 3.65$	31.32	674.35
聚乳酸-纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖支架	$11.19\pm 0.21$	38.98	483.18

据报道, 致密骨的弹性模量为 3.9–11.7 GPa、压缩强度为 88–164 MPa, 松质骨的弹性模量为 50–500 MPa、压缩强度为 2–12 MPa<sup>[28-29]</sup>。PLA-nHA/CS 支架的弹性模量检测曲线与应力-应变曲线, 见图 2B、C, 显示 PLA-nHA/CS 为脆性材料, 其弹性模量满足松质骨要求, 抗压强度介于致密骨和松质骨之间, 且明显高于松质骨, 因此可以作为松质骨修复的合适候选者。

**2.4 支架表面元素组成与结晶结构检测结果** 为研究支架的化学结合状态, 进行了 X 射线光电子能谱分析, 图 2D 显示了 3 种支架的曲线拟合结果。多巴胺修饰后, 支架中 O1s 从 25.65% 减少到 22.66%, 同时出现 N1s 峰, 浓度从 0% 增加到 3.95%, 表明多巴胺沉积在 PLA 支架上。涂覆纳米羟基磷灰石和壳聚糖后, 支架中 C1s 从 72.15% 减少到 66.79%, O1s 和 N1s 的浓度均有所增加, 分别从 22.66% 到 26.53%、3.95% 到 5.34%。结果表明多巴胺和纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖成功改性 PLA 支架。

各组材料的傅里叶变换红外光谱分析结果, 见图 3A。PLA 支架在  $1748\text{ cm}^{-1}$  处有 C-O 键伸缩振动的特征吸收峰, 在  $1180\text{ cm}^{-1}$  和  $1453\text{ cm}^{-1}$  处分别有 C-O 键和甲基 C-H 键的特征吸收峰<sup>[9-30]</sup>。在 PLA-DA 支架中, 未出现多巴胺的特征峰。在 PLA-nHA/CS 支架,  $556\text{ cm}^{-1}$  和  $1017\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰分别对应纳米羟基磷灰石的 O-P-O 弯曲和 P-O 伸缩振动<sup>[31]</sup>,  $1153\text{ cm}^{-1}$  处对应壳聚糖的 C-N 特征吸收峰。

各组材料的 X 射线衍射分析, 见图 3B。在 PLA 支架中, 以  $2\theta$  (约  $19^\circ$ ) 为中心的宽衍射峰, 显示了聚乳酸结构的浇注结晶特性<sup>[20]</sup>。当 PLA 支架经过多巴胺、壳聚糖和纳米羟基磷灰石功能化形成 PLA-DA 和 PLA-nHA/CS 支架时, 可以观察到

宽峰向较高的  $2\theta$  值 ( $20^\circ$ – $23^\circ$ ) 轻微移动。在复合支架的 X 射线衍射结果中没有出现壳聚糖和纳米羟基磷灰石的衍射峰, 尽管它们的结晶良好, 这表明 PLA-nHA/CS 支架表面上壳聚糖和纳米羟基磷灰石的含量低于检测限。由于壳聚糖和纳米羟基磷灰石的涂覆量很低, 很难形成均匀的结晶结构。

**2.5 支架的药物释放** 通过计算总药物释放量得到支架的载药量, PLA 支架的载药量为 ( $1870\pm 637$ )  $\mu\text{g}$ , PLA-nHA/CS 支架的载药量为 ( $2207\pm 613$ )  $\mu\text{g}$ 。

PLA 支架和 PLA-nHA/CS 支架的药物释放曲线, 见图 4A。药物在 9 h 内显示突然释放, 大量药物从支架中释放到周围环境, PLA 支架中的药物完全释放, 而 PLA-nHA/CS 支架中的药物释放率为 ( $56.55\pm 9.85$ )%, 然后进入缓释阶段, 释放时间达到 8 d。在缓释阶段, PLA-nHA/CS 支架内部的药物迁移到支架表面, 由于纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖涂层的覆盖, 药物随着该涂层的降解释放到环境中, 药物释放速率稳定均匀, 呈线性趋势, 基本符合零级释放 (图 4B)。

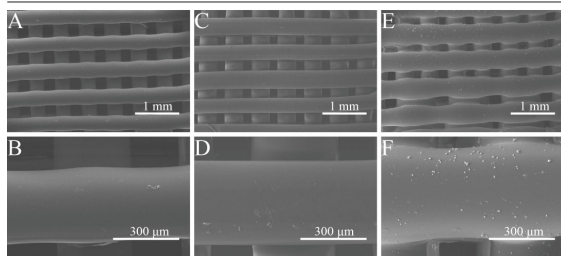
**2.6 支架对成骨细胞增殖的影响** CCK-8 检测结果显示所有支架均无细胞毒性, 见图 5A。培养 1, 3, 5 和 7 d 后, 所有支架组细胞均明显增殖且与对照组相差不大, 说明材料适于细胞生长。细胞的黏附可能与材料表面的亲水性有关<sup>[32]</sup>。因此得出结论, 多巴胺和纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖涂覆后的支架有利于细胞的黏附、迁移和增殖。

**2.7 支架对成骨细胞成骨分化的影响** 碱性磷酸酶是成骨细胞早期分化的标志酶, 其分泌量可以反映成骨细胞的分化状况<sup>[33]</sup>。培养 7, 14 d 后, 在 PLA-DA、PLA-nHA/CS 和 PLA-nHA/CS-DOX 支架上培养细胞中的碱性磷酸酶和蛋白分泌量均高于 PLA 支架, 见图 5B、C, 说明多巴胺和纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖涂层具有显著的成骨作用, 且负载多西环素后不影响支架的生物活性。有研究表明, 多巴胺和羟基磷灰石涂层材料可促进干细胞的增殖和分化<sup>[34-36]</sup>, 因此 PLA-nHA/CS 支架可在成骨过程中发挥长期作用。

培养 21 d 后, 各组支架上的钙沉积见图 5D 所示。值得注意的是, 该图中只有钙化的无机相被染成红色。与 PLA 支架相比, PLA-nHA/CS 及 PLA-nHA/CS-DOX 支架上的钙染色更强烈, 表现出较高的矿化水平。可以看出, 纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖涂层和多西环素药物增强了 MC3T3-E1 细胞的成骨分化。

**2.8 支架体外抗菌活性检测结果** 各组支架琼脂平板抗菌测定结果见图 6 所示。

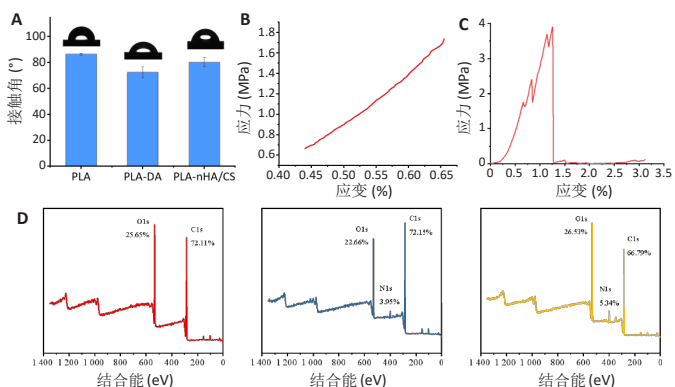
当细菌含量为  $1\times 10^8$  CFU 时, 在 PLA-nHA/CS、PLA-nHA/CS-DOX 支架周围清楚地观察到细菌抑制区, 而 PLA、PLA-DA 支架周围未观察到抑制区; 从不同孵育时间的抑菌圈直径来看, 第 1 天, PLA-nHA/CS-DOX 自制的抑菌圈最大, 抑制区直径为 35 mm, 连续培养 3 d 后抗菌效果没有明显变化, 抑制区直径为 33 mm; PLA-nHA/CS 支架的抑菌圈直径始终为 21 mm。为确定 PLA、PLA-DA 支架的抗菌性, 将菌液稀释 1 000 倍后可以观察到该两组支架周围长满细菌, 说明 PLA、PLA-DA 支架不具有抗菌性。



图注: A、B 为聚乳酸支架, 表面致密光滑, 孔径为 (257±27) μm; C、D 为聚乳酸-多巴胺支架, 支架表面依旧保持光滑, 孔径降至 (200±20) μm; E、F 为聚乳酸-纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架, 支架表面可以清楚看到纳米羟基磷灰石颗粒, 孔径与聚乳酸-多巴胺支架相比没有明显变化。

图 1 | 各组支架的微观形貌 (扫描电镜)

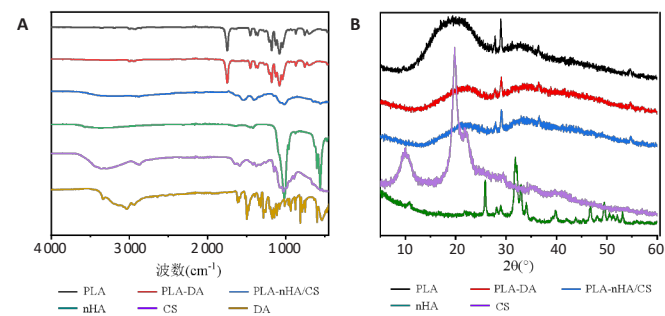
Figure 1 | Microstructure of scaffolds of each group (scanning electron microscope)



图注: A 为聚乳酸 (PLA)、聚乳酸-多巴胺 (PLA-DA)、聚乳酸-纳米羟基磷灰石/壳聚糖 (PLA-nHA/CS) 支架的水接触角; B 为 PLA-nHA/CS 支架的弹性模量; C 为 PLA-nHA/CS 支架的应力-应变曲线; D 为支架的 X 射线光电子能谱图, 从左至右依次为 PLA、PLA-DA、PLA-nHA/CS 支架。

图 2 | 各组支架的水接触角、力学性能及元素组成

Figure 2 | Water contact angle, mechanical properties and element composition of the scaffolds of each group



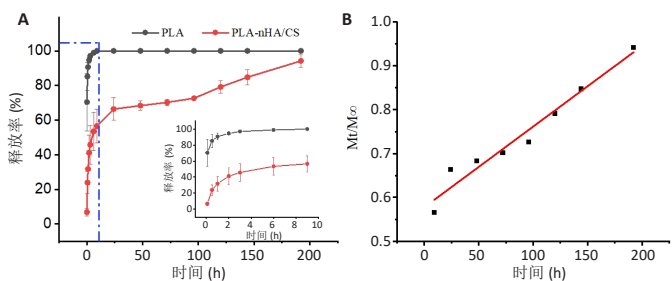
图注: DA 为多巴胺, PLA 为聚乳酸, CS 为壳聚糖, nHA 为纳米羟基磷灰石。A 为各材料的傅里叶变换红外光谱图, PLA-nHA/CS 支架中出现 nHA 的 O-P-O 弯曲和 P-O 伸缩振动吸收峰以及 CS 的 C-N 特征吸收峰; B 为各材料的 X 射线衍射图, 修饰 DA 和 nHA/CS 后, PLA-nHA/CS 宽峰向较高的 2θ 值移动。

图 3 | 各组支架的傅里叶变换红外光谱及 X 射线衍射图谱

Figure 3 | Fourier transform infrared spectrum and X-ray diffraction of scaffolds of each group

### 3 讨论 Discussion

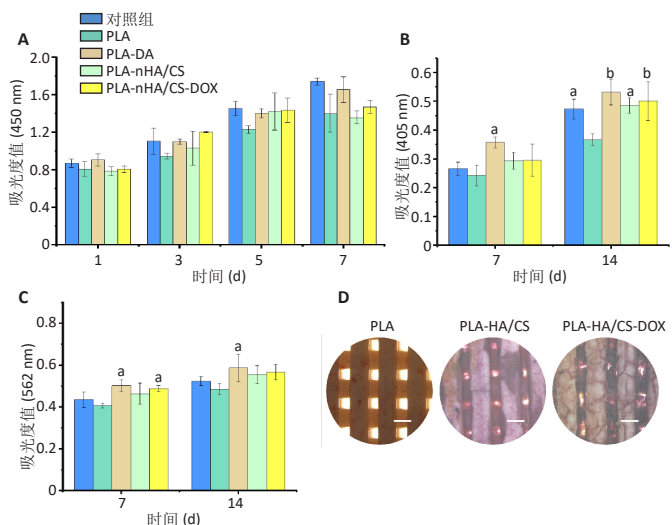
根据国家动态医疗调查, 全球每年有超过 220 万人次的植骨手术, 这极大地刺激了骨再生的相关研究<sup>[37]</sup>。自体骨在骨诱导、骨整合及骨再生方面具有优异特性, 是骨修复的黄金标准<sup>[38]</sup>, 然而自体骨来源受限且存在二次手术风险。同种



图注: A 为多西环素从聚乳酸 (PLA) 支架和聚乳酸-纳米羟基磷灰石/壳聚糖 (PLA-nHA/CS) 支架中释放的曲线, 9 h 内 PLA 支架中的药物基本完全释放, PLA-nHA/CS 支架可使药物释放长达 8 d, 小图为药物突释阶段的释放曲线; B 为多西环素从 PLA-nHA/CS 支架缓释阶段的零级释放曲线。

图 4 | 多西环素在两种支架中的释放

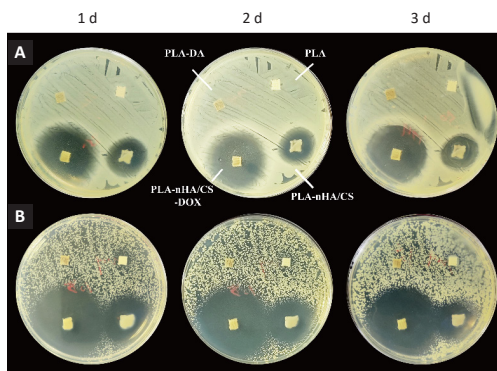
Figure 4 | Release of doxycycline in two kinds of scaffolds



图注: DA 为多巴胺, PLA 为聚乳酸, CS 为壳聚糖, nHA 为纳米羟基磷灰石, DOX 为多西环素。A 为 MC3T3-E1 细胞在不同支架上的增殖; B 为 MC3T3-E1 细胞在不同支架上的碱性磷酸酶活性; C 为 MC3T3-E1 细胞在不同支架上的蛋白分泌量; D 为 MC3T3-E1 细胞在不同支架上培养 21 d 的茜素红染色, 比例尺 = 300 μm, <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01。

图 5 | 各组支架的生物相容性及促成骨性能

Figure 5 | Biocompatibility and osteogenic properties of scaffolds of each group



图注: DA 为多巴胺, PLA 为聚乳酸, CS 为壳聚糖, nHA 为纳米羟基磷灰石, DOX 为多西环素。A 为金黄色葡萄球菌含量为 1×10<sup>8</sup> CFU 时的平板涂布图片, PLA-nHA/CS、PLA-nHA/CS-DOX 支架周围清楚地观察到细菌抑制区; B 为金黄色葡萄球菌含量为 1×10<sup>5</sup> CFU 时的平板涂布图片, PLA-nHA/CS、PLA-nHA/CS-DOX 支架周围清楚地观察到细菌抑制区。

图 6 | 各组支架对金黄色葡萄球菌的抗菌性能

Figure 6 | Antibacterial status of scaffold materials against *S. aureus* in each group

异体骨同样存在二次手术风险。因此,合成具有骨相似力学性能、骨传导和成骨能力的骨材料成为研究热点。3D 打印凭借材料和几何上的高度灵活性被用于制造多种形状及功能的固体<sup>[39]</sup>。已有研究利用不同的 3D 打印技术来制备生物相容性材料的合成支架,如聚己内酯、羟基磷灰石、聚乳酸、磷酸三钙、金属 Ti/Ta 等,在骨修复支架领域具有很高的应用前景,有助于解决目前支架制备方法中存在的问题。

聚乳酸是一种被美国食品和药品管理局 (FDA) 批准可以直接接触生物液体的生物聚合物,是一种新型的骨科固定材料<sup>[40]</sup>,然而聚乳酸是相对疏水的,不利于细胞的黏附,但有利于细菌黏附和生物膜的形成<sup>[41]</sup>。为解决此问题研究者进行了大量研究,如在聚合物中掺杂纳米羟基磷灰石来调节成骨细胞分化<sup>[42]</sup>,ZHANG 等<sup>[43]</sup>通过 3D 打印技术制备高纳米羟基磷灰石含量的聚乳酸/纳米羟基磷灰石复合支架,在体内显示出良好的骨再生能力。另一种方式是在表面涂上生物活性化合物,如胶原蛋白、壳聚糖等<sup>[20]</sup>。因此,此次实验选择 PLA-nHA/CS 作为骨组织工程支架材料,通过浸涂法避免了纳米羟基磷灰石在喷嘴中积聚、堵塞和降低打印质量。实验采用浸涂法在 PLA 支架表面涂覆纳米羟基磷灰石/壳聚糖涂层,利用多巴胺的螯合作用使涂层稳定沉积在支架表面,水接触角显示多巴胺和纳米羟基磷灰石/壳聚糖的修饰改变了聚乳酸的湿润性,向亲水方向转变。傅里叶变化红外光谱和 X 射线能谱分析结果显示,多巴胺和纳米羟基磷灰石/壳聚糖成功修饰到 PLA 支架表面。纳米羟基磷灰石/壳聚糖涂覆后优化了 PLA 支架的力学性能,抗压强度约为 38.98 MPa。

目前使用骨科植入物的患者数量一直在迅速上升,然而持续的感染导致植入失败、骨整合不良,尽管采用了适当的灭菌技术但仍会发生细菌感染。骨科植入物相关感染的最重要致病因素之一是金黄色葡萄球菌<sup>[44]</sup>,其可在植入物上黏附形成生物膜。已有研究采用局部给药系统治疗骨感染,此方式可以增加感染部位药物剂量,尽量减少全身不良反应。多西环素 ( $C_{22}H_{24}N_2O_8$ ) 临床上属于四环类抗生素,作为半合成类抗菌药其抗菌活性和组织穿透力表现强。此次实验通过冷冻干燥技术将多西环素负载到支架内,防止了抗生素与聚乳酸共同打印过程中由于高温导致的抗生素降解或失活<sup>[45]</sup>。体外药物释放结果表明,在纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合膜的作用下支架中多西环素可释放长达 8 d,达到长时间抑菌效果。抗菌实验结果显示,PLA 支架与 PLA-DA 支架均不具有抗菌性,当涂覆了纳米羟基磷灰石/壳聚糖后支架显示出弱抗菌效果,这是由于壳聚糖带正电可以与细菌细胞膜上的负电荷作用破坏细胞膜,载药后支架显示出更强的抗菌活性。除抗菌能力外,还对所研制的三维支架的生物响应进行了评价,体外细胞实验证明,多巴胺及纳米羟基磷灰石/壳聚糖的修饰进一步促进支架表面细胞增殖及成骨分化,证明改性后的复合支架具有良好的生物相容性及促成骨性能,无细胞毒性,但是支架对成骨基因表达的影响仍需进一步研究。考虑到上述结果,熔融沉积 3D 打印技术与简单的涂覆工艺结合

可以获得力学性能和生物性能优良的复合支架,为个性化生物材料的开发和应用提供了理论依据。

**作者贡献:** 第一作者/通讯作者刘岩设计方案、实验实施、数据整理分析、查阅文献并撰写文章,提供基金支持。郑雪新协助实验实施。

**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。

**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。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 该文章撰写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。

#### 4 参考文献 References

- [1] WUBNEH A, TSEKOURA EK, AYRANCI C, et al. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2018;80:1-30.
- [2] KOONS GL, DIBA M, MIKOS AG. Materials design for bone-tissue engineering. *Nat Rev Mater.* 2020;5(8):584-603.
- [3] TETIK H, FENG D, OXANDALE SW, et al. Bioinspired manufacturing of aerogels with precisely manipulated surface microstructure through controlled local temperature gradients. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2021;13(1):924-931.
- [4] ALDEMIR DIKICI BL, REILLY GC, CLAEYSSENS F. Boosting the osteogenic and angiogenic performance of multiscale porous polycaprolactone scaffolds by in vitro generated extracellular matrix decoration. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020;12(11):12510-12524.
- [5] XING H, ZOU B, LIU X, et al. Fabrication strategy of complicated Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> functionally graded materials by stereolithography 3D printing. *J Eur Ceram Soc.* 2020;40(15):5797-5809.
- [6] BOULAALA M, ELMESSAOUDI D, BUJ-CORRAL I, et al. Towards design of mechanical part and electronic control of multi-material/multicolor fused deposition modeling 3D printing. *Int J Adv Manuf Tech.* 2020; 110:45-55.
- [7] ZHANG W, FENG C, YANG G, et al. 3D-printed scaffolds with synergistic effect of hollow-pipe structure and bioactive ions for vascularized bone regeneration. *Biomaterials.* 2017;135:85-95.
- [8] LIM SH, CHIA SMY, KANG L, et al. Three-Dimensional Printing of Carbamazepine Sustained-Release Scaffold. *J Pharm Sci.* 2016;105(7): 2155-2163.
- [9] YANG Y, QIAO X, HUANG R, et al. E-jet 3D printed drug delivery implants to inhibit growth and metastasis of orthotopic breast cancer. *Biomaterials.* 2020;230:119618.
- [10] GAO C, PENG S, FENG P, et al. Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Res.* 2017;5(1):1-33.
- [11] BAE EB, PARK KH, SHIM JH, et al. Efficacy of rhBMP-2 loaded PCL/ $\beta$ -TCP/bdECM scaffold fabricated by 3D printing technology on bone regeneration. *Biomed Res Int.* 2018;2018:1-12.
- [12] TERTULIANO OA, GREER JR. The nanocomposite nature of bone drives its strength and damage resistance. *Nat Mater.* 2016;15(11):1195-1202.
- [13] CROSS LM, THAKUR A, JALILI NA, et al. Nanoengineered biomaterials for repair and regeneration of orthopedic tissue interfaces. *Acta Biomater.* 2016;42:2-17.

- [14] QUAN H, HE Y, SUN J, et al. Chemical self-assembly of multifunctional hydroxyapatite with a coral-like nanostructure for osteoporotic bone reconstruction. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(30):25547-25560.
- [15] REZWAN K, CHEN Q, BLAKER JJ, et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27(18):3413-3431.
- [16] GHORBANI F, ZAMANIAN A, BEHNAMGHADER A, et al. A facile method to synthesize mussel-inspired polydopamine nanospheres as an active template for in situ formation of biomimetic hydroxyapatite. *Mat Sci Eng C Mater*. 2019;94:729-739.
- [17] LÓPEZ-IGLESIAS C, BARROS J, ARDAO I, et al. Vancomycin-loaded chitosan aerogel particles for chronic wound applications. *Carbohydr Polym*. 2019;204:223-231.
- [18] FERREIRA M, RZHEPISHEVSKA O, GRENHO L, et al. Levofloxacin-loaded bone cement delivery system: Highly effective against intracellular bacteria and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Int J Pharm*. 2017;532(1):241-248.
- [19] BAUMANN B, JUNGST T, STICHLER S, et al. Control of nanoparticle release kinetics from 3D printed hydrogel scaffolds. *Angew Chem Int Ed*. 2017;56(16):4623-4628.
- [20] MARTIN V, RIBEIRO IA, ALVES MM, et al. Engineering a multifunctional 3D-printed PLA-collagen-minocycline-nanoHydroxyapatite scaffold with combined antimicrobial and osteogenic effects for bone regeneration. *Mat Sci Eng C Mater*. 2019;101:15-26.
- [21] HUANG Y, ZHAO X, ZHANG Z, et al. Degradable gelatin-based IPN cryogel hemostat for rapidly stopping deep noncompressible hemorrhage and simultaneously improving wound healing. *Chem Mater*. 2020;32(15):6595-6610.
- [22] XIE C, LI P, LIU Y, et al. Preparation of TiO<sub>2</sub> nanotubes/mesoporous calcium silicate composites with controllable drug release. *Mat Sci Eng C-Mater*. 2016;67:433-439.
- [23] GOUDARZI A, SADRNEZHAAD SK, JOHARI N. The prominent role of fully-controlled surface co-modification procedure using titanium nanotubes and silk fibroin nanofibers in the performance enhancement of Ti6Al4V implants- ScienceDirect. *Surf Coat Technol*. 2021;412:127001.
- [24] MATSUMOTO T, TASHIRO Y, KOMASA S, et al. Effects of surface modification on adsorption behavior of cell and protein on titanium surface by using quartz crystal microbalance system. *Materials*. 2020;14(1):97.
- [25] JIA Z, SHI Y, XIONG P, et al. From solution to biointerface: graphene self-assemblies of varying lateral sizes and surface properties for biofilm control and osteodifferentiation. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(27):17151-17165.
- [26] GITTENS RA, SCHEIDELER L, RUPP F, et al. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta Biomater*. 2014;10(7):2907-2918.
- [27] GOMES FILHO MS, OLIVEIRA FA, BARBOSA MAA. A statistical mechanical model for drug release: Investigations on size and porosity dependence. *Physica A*. 2016;460:29-37.
- [28] WANG Y, SHI X, REN L, et al. Poly (lactide-co-glycolide)/titania composite microsphere-sintered scaffolds for bone tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res B*. 2010;93(1):84-92.
- [29] SUN H, ZHANG C, ZHANG B, et al. 3D printed calcium phosphate scaffolds with controlled release of osteogenic drugs for bone regeneration. *Chem Eng J*. 2022;427:130961.
- [30] OLIVEIRA JE, MATTOSO LH, ORTS WJ, et al. Structural and morphological characterization of micro and nanofibers produced by electrospinning and solution blow spinning: a comparative study. *Adv Mater Sci Eng*. 2013;2013:1-14.
- [31] NAZEER MA, YILGOR E, YAGCI MB, et al. Effect of reaction solvent on hydroxyapatite synthesis in sol-gel process. *R Soc Open Sci*. 2017;4(12):171098.
- [32] WU C, ZHANG Y, ZHOU Y, et al. A comparative study of mesoporous glass/silk and non-mesoporous glass/silk scaffolds: physicochemistry and in vivo osteogenesis. *Acta Biomater*. 2011;7(5):2229-2236.
- [33] VIMALRAJ S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020;754:144855.
- [34] SHI X, LI L, OSTROVIDOV S, et al. Stretchable and micropatterned membrane for osteogenic differentiation of stem cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(15):11915-11923.
- [35] YU Y, LI X, LI J, et al. Dopamine-assisted co-deposition of hydroxyapatite-functionalised nanoparticles of polydopamine on implant surfaces to promote osteogenesis in environments with high ROS levels. *Mat Sci Eng C Mater*. 2021;131:112473.
- [36] FITZPATRICK V, MARTÍN-MOLDES Z, DECK A, et al. Functionalized 3D-printed silk-hydroxyapatite scaffolds for enhanced bone regeneration with innervation and vascularization. *Biomaterials*. 2021;276:120995.
- [37] CAMPANA V, MILANO G, PAGANO E, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25:2445-2461.
- [38] BAUER T, MUSCHLER G. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat R*. 2000;371:10-27.
- [39] INZANA JA, OLVERA D, FULLER SM, et al. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials*. 2014;35(13):4026-4034.
- [40] GAO C, PENG S, FENG P, et al. Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Res*. 2017;5(4):17059.
- [41] KRASOWSKA A, SIGLER K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:112.
- [42] QUAN H, HE Y, SUN J, et al. Chemical Self-Assembly of Multifunctional Hydroxyapatite with a Coral-like Nanostructure for Osteoporotic Bone Reconstruction. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(30):25547-25560.
- [43] ZHANG B, WANG L, SONG P, et al. 3D printed bone tissue regenerative PLA/HA scaffolds with comprehensive performance optimizations. *Mater Des*. 2021;201:109490.
- [44] CAMPOCCIA D, MONTANARO L, ARCIOLA CR. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials*. 2006;27(11):2331-2339.
- [45] VISSCHER L, DANG HP, KNACKSTEDT M, et al. 3D printed Polycaprolactone scaffolds with dual macro-microporosity for applications in local delivery of antibiotics. *Mat Sci Eng C Mater*. 2018;87:78-89.

(责任编辑: QY, GW, ZN, YJ)