

http://www.journals.zju.edu.cn/med

PLGA/Ⅰ型胶原复合支架用于组织工程化骨再造的研究

朱慧勇¹,王慧明¹,吴求亮¹,胡应乾²,刘建华¹,朱康杰²

(1. 浙江大学医学院 附属第一医院口腔科,浙江 杭州 310003; 2. 浙江大学高分子科学研究所,浙江 杭州 310027)

[摘要] 目的:采用PLGA/Ⅰ型胶原复合改良生物支架,构建组织工程化骨组织。方法:采用Ⅰ型胶原和聚乳酸-聚乙醇酸共聚物(PLGA)复合,制作改良的生物支架,将原代培养的成骨细胞接种于复合支架上,培养1周,扫描电镜观察成骨细胞在支架上的生长及黏附情况;同时,将细胞-支架复合体自体异位植入,并取材观察其成骨情况。结果:经鉴定,原代培养的细胞符合成骨细胞的特征;扫描电镜:在生物支架上大量成骨细胞呈簇状生长,并形成多个细胞突起;大体标本:4个月时可见骨块形成;自体异位植入后1个月可见新生骨组织形成,周围有多个活性成骨细胞和骨母细胞,至4个月时骨组织渐趋成熟。结论:Ⅰ型胶原和PLGA复合支架是一种理想的生物可降解支架,可用于组织工程化骨再造的研究。

[关键词] 骨; 生物医学工程; 聚合物; 胶原; 复合树脂类; 聚羟基乙酸; 支架; 成骨细胞/细胞学; 细胞,培养的
[中图分类号] R 318 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2005)03-0233-04

Tissue engineered bone reconstruction with modified PLGA/Type-Ⅰ collagen compound scaffold
ZHU Hui-yong, WANG Hui-ming, WU Qiu-liang, et al (Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

[Abstract] **Objective:** To fabricate bone grafts by bone marrow stromal cell combined with modified PLGA/Type-Ⅰ collagen compound scaffold using tissue engineering method. **Methods:** The modified PLGA/Type-Ⅰ collagen compound scaffold was fabricated. The rabbit primary cultured osteoblasts were identified and seeded onto the modified compound scaffold for one week *in vitro*. The adhesion and growth of cells were observed with scanning electron microscope. The complex of cells and scaffold was implanted into the subcutaneous region of rabbits and new bone formation was evaluated. **Results:** The rabbit bone marrow stromal cells were induced and differentiated into osteoblasts. The adhesion and growth of osteoblasts in cluster were observed on the surface of scaffolds. New bone formation was observed at one month postoperatively and active osteoblasts were found on the surface of the newly formed bone *in vivo*. **Conclusion:** The complex of PLGA and type-Ⅰ collagen is an appropriate biodegradable scaffold and can be applied in bone tissue engineering.

[Key words] Bone; Biomedical engineering; Polymers; Collagen; Composite resins; Polyglycolic acid; Braces; Osteoblasts/cytol; Cells, cultured

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2005, 34(3): 233-236.]

骨缺损的修复一直是口腔颌面外科、骨科界的棘手问题,目前常用的修复方法均存在一定的缺点,难以满足临床需要。组织工程骨再造被认为是最有前景的骨缺损治疗修复方法。然而较多的实验研究表明^[1~3],目前所使用的生物可降解支架材料存在着一定的缺点,如疏水性强,与细胞的亲和性差,不利于种子细胞在支架上的黏附等,从而影响组织工程化骨组织构

建的成功率。本研究旨在生物可降解支架材料的改良,即Ⅰ型胶原和聚乳酸-聚乙醇酸共聚物(PLGA)复合,将原代培养的成骨细胞接种于改良复合支架上,观察细胞在体外支架上的生

收稿日期: 2004-05-10 修回日期: 2005-03-12
基金项目: 浙江省医药卫生科学研究基金(2002A042)项目。
作者简介: 朱慧勇(1971—),男,博士,讲师,从事口腔颌面外科临床和基础研究工作; E-mail: zhuhuiyong@sina.com

长及植入体内后的成骨情况。

1 材料和方法

1.1 材料 日本大耳白兔6只(浙江大学医学院实验动物中心),DMEM培养基(GIBCO公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所),胰蛋白酶(上海生物工程有限公司), β 甘油磷酸钠(Sigma公司),维生素C(Sigma公司),地塞米松(Sigma公司),PLGA(PLA:PGA=75:25,数均分子量为815 712,多分散系数为1.56,浙江大学高分子科学研究所合成),I型胶原(Sigma公司),二氧化碳培养箱(Forma公司),Olympus倒置相差显微镜,扫描电镜Stereoscan 260(英国Cambridge公司),冷冻干燥机(宁波新芝生物科技有限公司)。

1.2 兔成骨细胞的原代培养 日本大耳白兔经1%戊巴比妥钠耳缘静脉注射麻醉,在两侧股骨粗隆处抽取骨髓液约2 ml。将抽取的骨髓液调整至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞密度,接种于25 ml的培养瓶中,加入足量的DMEM培养基(内含15%灭活胎牛血清,100 U/ml青、链霉素,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 维生素C,10 mmol/L β 甘油磷酸钠, $10^{-8}\text{mol}/\text{L}$ 地塞米松),在5% CO_2 、37℃孵箱内培养5~7 d后,换液去除未贴壁的细胞。当原代细胞融合形成单层后,用0.25%胰酶消化后传代。成骨细胞鉴定包括活体细胞倒置相差显微镜观察、HE染色、Von-Kossa染色。

1.3 PLGA/I型胶原复合支架的制作及处理

1.3.1 PLGA支架的制作:取0.5 g的PLGA溶解于2.5 ml的二氯甲烷中,加入2 g粒径为150~200 μm 的NaCl晶体,用磁力搅拌均匀后倒入模具中,等溶剂自然挥发干净后将所得支架脱模,在搅拌作用下用双蒸水浸泡支架脱去其中的NaCl,直至恒重,扫描电镜观察其孔径和孔隙率。

1.3.2 PLGA/I型胶原复合支架的制作:将上述所得PLGA支架浸入适量适当浓度的I型胶原的醋酸水溶液中,在-53℃下真空干燥12 h,使胶原包裹在支架的表面。材料制成大小约10 mm×6 mm×2 mm,紫外线消毒1 h,在无菌PBS液中洗1 h,换3次液后再浸泡在培养基中3 h,吸去一部分水分,使材料含水量适当减少,再分别放置于24孔培养板中。

1.4 细胞接种及细胞与复合支架体外培养生长情况的观察 消化培养的第3代成骨细胞,制备高密度细胞悬液约 $1 \times 10^6/\text{ml}$,用吸管将细胞悬液缓慢逐滴加于PLGA/I型胶原复合支架材料上,不使细胞从材料上溢出,放置培养箱中2~4 h,待细胞充分黏附于材料后,缓慢加入培养液约1 ml进行复合培养。培养1周后,部分细胞支架复合体制成扫描电镜标本。

1.5 体内成骨能力的观察 成骨细胞与PLGA/I型胶原复合支架培养1周后植入兔自体皮下,分别于术后1个月、4个月取标本。采用大体、组织学观察成骨情况。

2 结果

2.1 原代培养的兔成骨细胞的鉴定 相差显微镜形态观察可见原代培养的兔成骨细胞贴壁生长,呈现多种形态,有三角形、星形、多角形及长梭形等,细胞胞体膨大,伸出长短不一、粗细不均的多种胞浆突起,细胞呈集落生长(图1-a)。在HE染色光镜下,细胞呈长梭形、三角形及多角形,有多个树状突起,胞核形圆、浅蓝色,胞浆呈细网状,并见较多胞浆颗粒(图1-b)。细胞经30~60 d培养后,钙化点处可见棕褐色沉着物,Von-Kossa染色阳性(图1-c)。

2.2 PLGA支架扫描电镜观察 PLGA材料表面呈多孔状,孔的形态为喇叭口样,孔径约100~300 μm ,孔隙率约90%(图2)。

2.3 扫描电镜观察细胞与复合支架的黏附和生长情况 培养1周后,可见大量成骨细胞牢固地黏附于复合支架上,形成多个胞体突起,并可见多个细胞聚集成球状结构,成簇状生长(图3)。

2.4 体内新生组织工程化骨组织观察

2.4.1 大体观察:植入后4个月,成骨细胞-PLGA/I型胶原复合支架植入体标本表现为骨组织块,呈类圆形,表面有一薄层膜形成(图4-a)。

2.4.2 组织学观察:植入后1个月,除有新生骨组织形成外,还有明显的成骨活动,表现为在新骨形成区域,有较多的骨母细胞排列或聚集在新骨周围,材料部分降解(图4-b)。植入后4个月,可见新骨形成趋向成熟,有小梁状或岛状结构,骨陷窝清晰,骨髓腔形成(图4-c)。

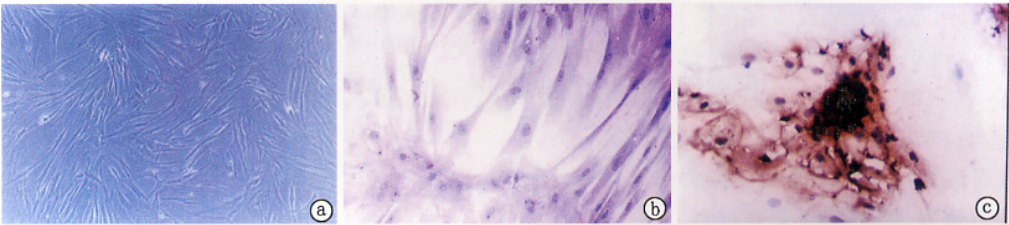


图1 原代培养的兔成骨细胞

Fig. 1 The primary cultured rabbit osteoblasts

a; Inverted phase contrast microscopy observation; osteoblasts appeared in various kinds of shapes (×100); b; Osteoblasts appeared in various shapes and had a few cell prominency (HE ×200); c; Von-Kossa stain was positive with brown deposit (HE ×200)

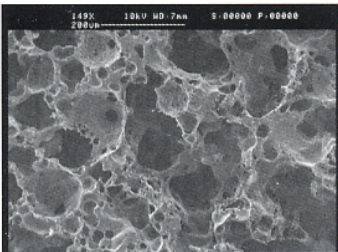


图2 PLGA 支架表面呈多孔状结构
Fig. 2 The PLGA scaffold surface was highly porous (SEM ×149)

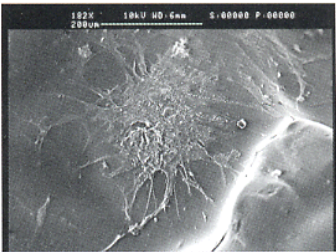


图3 成骨细胞在支架表面呈簇状生长
Fig. 3 Osteoblast adhesion and growth on the surface of scaffold in cluster (SEM ×182)

3 讨论

3.1 骨组织工程学中的种子细胞

种子细胞主要来源于骨髓、骨膜及松质骨,其中,骨髓来源培养的成骨细胞较适合于骨组织工程的要求。骨髓具有取材方便,对供体损伤小,可反复抽吸,细胞易贴壁培养,操作较为简单,细胞培养效率较高等优点。在一定的培养条件下

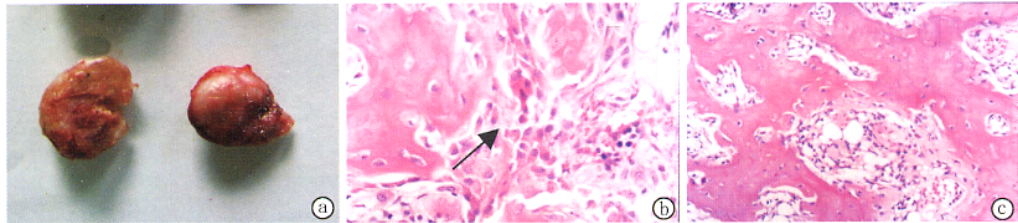


图4 新生组织工程化骨组织观察

Fig. 4 New tissue engineered bone formation

a; The cell-scaffold complex was transformed into bone tissue block at 4 months after implantation (gross observation); b; Many preosteoblasts (↑) located in the new bone matrix region at 1 month after implantation (HE ×400); c; The new mature bone and ply bone formation at 4 months after implantation (HE ×200)

(如含有维生素C、地塞米松、β 甘油磷酸钠),其可诱导分化为成骨细胞^[4]。本研究采用诱导分化骨髓基质细胞,经鉴定符合成骨细胞的特征。本研究结果表明,将培养的成骨细胞接种于改良的复合生物支架上,能在体外成活,细胞黏附在材料表面,并形成多个突起;将细胞与支架材料体外培养复合体异位植入体内后,可见新生骨组织形成,其周围可见有活性的骨母细胞和成骨细胞。这说明培养的成骨细胞具有成骨能力,可作为骨组织工程的种子细胞。

3.2 生物可降解支架的选择与改良 理想的骨组织工程支架材料必须有良好的生物相容性和生物降解性^[5,6]。过去应用的如羟基磷灰石类因不可降解,新生组织也不可能替代支架材料,限制了其在骨组织工程和临床上的应用^[7]。本研究考虑到单纯应用生物可降解的PLGA 存在疏水性、材料表面缺乏细胞识别信号、与细胞的黏附较差等缺点,故采用亲水性、细胞黏附性较好的I 型胶原与PLGA 复合,以增强材料与细胞的黏附性和亲和性。I 型胶原是骨组织的主要细胞

外基质成分,成骨细胞表面存在特异性受体整合素亚单位,可识别 I 型胶原的 α_1 链的天冬氨酸-甘氨酸-谷氨酸-丙氨酸(DGEA)序列^[8,9],从而使细胞与支架材料紧密结合。采用 PLGA-I 型胶原复合改良支架与成骨细胞混合体外培养,扫描电镜观察发现,细胞在复合材料表面生长和黏附的数量较多,细胞在支架表面的伸展和形态均较好,这表明 I 型胶原除有良好的亲水性外,还有良好的细胞黏附性和亲水性。

3.3 体内成骨的评价 本研究采用组织工程方法,先将成骨细胞接种于改良复合支架材料上,在体外进行三维立体培养,然后再植入体内,结果显示在材料降解的同时,伴随着新骨组织的形成。在新骨组织周围还可见较多的骨母细胞和成骨细胞,这说明在体外混合培养时的成骨细胞活性和功能均较好,植入体内后成骨细胞又从周围组织吸取了营养物质,使其进一步增殖分化,分泌细胞外基质,进而形成骨组织。我们认为,细胞-支架材料复合体在植入体内前须先进行体外观察,否则较难保证细胞在支架上的黏附和生长情况是否良好^[10,11]。另外,体内植入后具有良好的成骨能力和较多的新骨组织形成,与以下原因有关:首先,材料本身的可降解性为成骨细胞的活动和新骨的形成提供了良好的环境;其次, I 型胶原可促进成骨细胞的分化。有学者^[12]用外源性 I 型胶原对人胚骨膜细胞的生物学特性影响进行研究,结果表明 I 型胶原除可促进成骨细胞在支架材料表面黏附外,还可增加成骨细胞骨钙素的合成和碱性磷酸酶的活性,促进成骨细胞的分化。结合本实验结果作者认为,支架材料上复合 I 型胶原可增加骨髓基质细胞的成骨能力。

骨组织工程研究成果有望应用于临床。骨髓来源的骨髓基质细胞作为种子细胞,前景较好,改良的复合生物可降解支架的研制可推动组织工程再造骨的可行性。

References:

- [1] ZHENG Lei, WANG Qian, PEI Guo-xian(郑磊,王前,裴国献). Development of biodegradable polymer scaffolds for bone tissue engineering [J]. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*(中国修复重建外科杂志), 2000, 14(3): 175-180. (in Chinese)
- [2] YAO Hui(姚晖). Assembly and evaluation of tissue

engineered human cellular alveolar bony implanting materials in vitro [J]. *Chinese Journal of Stomatology* (中华口腔医学杂志), 2001, 36(3): 170-173. (in Chinese)

- [3] LIU Jing-long, YU Bin, GAO Cheng-jie(刘竞龙,余斌,高成杰). Observation on growth of rat osteoblast cultured with PLGA scaffolds [J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*(中国临床康复), 2002, 6(16): 2371. (in Chinese)
- [4] PETER S J, LIANG C R, KIM D J, et al. Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone, β -glycerolphosphate, and L-ascorbic acid [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1998, 71(1): 55-62.
- [5] FREED C E, VUN JAK-NOVAKOVIC G, IRON K J. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering [J]. *Biotechnology NY*, 1994, 12(7): 689.
- [6] KIM B S, MOONEY D J. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 1998, 16(5): 224.
- [7] RUARDY T G, SCHAKENRAAD J M, VAN DER MEI HC, et al. Adhesion and spreading of human skin fibroblasts on physicochemically characterized gradient surface [J]. *Journal of Biomed Mater Res*, 1995, 29(11): 1415-1423.
- [8] WILLIAN D, FOR F, ZUTTER M, et al. Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the $\alpha 2 \beta 1$ integrin in collagen [J]. *Journal of Biol Chem*, 1991, 266(12): 7363.
- [9] YANG Zhi-ming, YU Xi-jie, QU Yi, et al(杨志明, 余希杰, 屈艺, 等). The modulation of type I collagen and its receptor system on biological characteristics of osteoblasts [J]. *Journal of West China University of Medical Sciences*(华西医科大学学报), 2000, 31(3): 281-284. (in Chinese)
- [10] CHEN Fu-ling, MAO Tian-qiu, DING Gui-cong, et al(陈富林, 毛天球, 丁桂聪, 等). Experimental research on new bone restoration in predetermined shape employing the method of tissue engineering [J]. *Chinese Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*(口腔颌面外科杂志), 2002, 12(2): 101-103. (in Chinese)
- [11] CAO Jun-kai, WANG Chang-yong, ZHAO Qiang, et al(曹军凯, 王常勇, 赵强, 等). Experimental study on repairing calvarial bone defect with tissue engineered artificial bone using polymer substrates and osteoblasts [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*(中华实验外科杂志), 2001, 18(5): 445-447. (in Chinese)
- [12] YANG Zhi-ming, YU Xi-jie, HUANG Fu-guo, et al(杨志明, 余希杰, 黄富国, 等). The influence of type I collagen on the cell behavior of human embryonic periosteal osteoblasts [J]. *Journal of West China University of Medical Sciences*(华西医科大学学报), 2001, 32(1): 1-4. (in Chinese)