

• 论著 •

电纺 PLGA/HA 复合支架的细胞相容性研究

张华林¹, 陈治清², 李咏梅¹, 冯佳¹

(1. 宁夏医科大学口腔医学院, 宁夏 银川 750004; 2. 四川大学华西口腔医学院, 四川 成都 610041)

摘要 目的 通过静电纺丝的方法制备 PLGA/HA 复合支架并对其细胞相容性进行表征。方法 先通过高压静电纺丝的方法制备 PLGA/HA 复合生物支架, 再将大鼠的骨髓间充质干细胞接种于复合支架上培养, 采用 SEM 观察细胞在支架上的形貌, MTT 法分析细胞的增殖情况。结果 PLGA/HA 复合支架是由超细纤维构成的三维多孔结构, 与天然的细胞外基质结构相似, 骨髓间充质干细胞在其表面附着、铺展良好, HA 纳米颗粒的加入明显提高了细胞的粘附率。结论 静电纺丝法制得的 PLGA/HA 复合支架有可能作为骨组织再生的支架在组织工程领域发挥作用。

关键词 PLGA; HA; 静电纺丝; 细胞相容性

[中图分类号] R318.6

[文献标识码] A

学科分类代码: 310.99

文章编号: 1001-8131(2011)05-0321-02

Study on Cell Compatibility of Electrospun PLGA/HA Composite Scaffolds

ZHANG Hualin¹, CHEN Zhiqing², LI Yongmei¹, FENG Jia¹

(1. College of Stomatology, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

2. West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Objective To prepare PLGA/HA composite scaffolds by electrospinning and characterize their cell compatibility. **Methods** PLGA/HA composite scaffolds were prepared by electrospinning. Subsequently, rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells were cultured, expanded and seeded on the PLGA/HA scaffolds. The attachment and proliferation of cells on the scaffolds were investigated by SEM, MTT assay. **Results** The composite scaffolds had a three-dimensional structure, which mimicked the structure of the natural extracellular matrix. The bone-marrow-derived mesenchymal stem cells grown well on the scaffolds; the addition of HA nanoparticle could obviously improve the cell adhere rate. **Conclusion** The electrospun PLGA/HA composite scaffolds could serve as an excellent scaffold for bone tissue regeneration in tissue engineering.

Key words PLGA; HA; Electrospinning; Cell compatibility

随着纳米技术的兴起, 静电纺丝技术近年来备受关注。通过静电纺丝工艺, 可以连续制备直径为微米、纳米级的超细纤维, 这种超细纤维形成的电纺膜具有极大的比表面积和孔隙率, 与天然的细胞外基质结构相似, 因此, 电纺的支架可以最大程度的仿生生物体内支持组织的微观结构和几何尺寸, 有利于细胞的粘附、分化和增殖。因此, 利用静电纺丝的方法制备组织工程支架受到国内外学者的广泛重视。

聚乳酸乙醇酸共聚物 (PLGA) 和羟基磷灰石 (HA) 是目前组织工程领域常用的两种生物材料。PLGA 是由聚乳酸 (PLA) 和聚乙醇酸 (PGA) 形成的共聚物, PLGA 具有很好的组织相容性和力学性能, 它可以在体液环境中通过酯键水解而降解, 其最终代谢产物为 CO₂ 和 H₂O, 中间产物乳酸和羟基乙酸也是人体内正常糖代谢的产物, 因此被美国 FDA 批准用于临床, 是迄今研究最广泛、应用最多的可降解生物材料^[1]。但 PLGA 表面亲水性差, 分子链中缺乏活性功能基团, 使其与特定细胞相互作用变得比较困难^[2-3]。而天然骨组织中的主要无机成分—HA, 具有良好的亲水性和生物活性, 然而它的力学性能不理想, 强度低、韧性差、脆性大, 在生理环境中易疲劳、破坏。因此, 如能采用合适的方法将 PLGA 与 HA 二者复合制备形成复合材料, 取长补短, 可能会形成比较理想的骨组织工程支架。

本研究将采用高压静电纺丝的方法制备 PLGA/HA 复合支架, 并研究其细胞相容性, 可望得到一种较理想的骨组织工程支架, 为骨组织工程支架的开发提供基础研究。

1 材料与与方法

1.1 材料: PLGA (分子量 10 万, PLA: PGA = 75: 25, 山东岱盟

生物技术有限公司), 水热合成的 HA 纳米颗粒 (平均直径 20~40 nm) 由四川大学材料与工程学院提供, 三氯甲烷 (分析纯), N,N-二甲基甲酰胺 (分析纯) 等购于天津化学试剂厂。

1.2 设备: 扫描电子显微镜 (JSM-5900LV, JEOL, Japan)。

1.3 电纺 PLGA/HA 复合支架的制备: 将 PLGA 溶于三氯甲烷和 N,N-二甲基甲酰胺的混合溶剂中, 浓度为 20% wt, 待 PLGA 充分溶解后再加入 5% w/v 的 HA, 室温下搅拌 30 min 后将该溶液用 90% 的功率超声震荡 1 h, 备用。将制备好的纺丝液倒入 10 mL 注射器中, 将注射器与电纺设备相连接进行静电纺丝。电纺的工艺参数设置如下: 喷嘴头为已磨钝的 7 号不锈钢针头 (内径 0.27 mm), 电压为 20 kv, 接收距离为 13 cm, 电纺丝溶液流量为 0.2 mL/min。将电纺后收集到接收屏上的 PLGA/HA 复合支架置于干燥器中过夜。

1.4 PLGA/HA 复合支架的表征: 取复合支架样本, 将其表面经离子溅射仪喷金镀膜后, 用扫描电镜观察其表面形貌。

1.5 骨髓间充质干细胞的分离、培养、接种: 骨髓间充质干细胞取自 SD 大鼠的股骨骨髓。骨髓间充质干细胞被置于含 5 mL 的 α -MEM 培养基 (含 15% 小牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100 U/mL 链霉素) 的培养瓶中, 然后, 将培养瓶置于 37 °C 含 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中恒温培养。将消毒后的支架放入六孔板中, 二次传代后的细胞经 0.25% 胰蛋白酶溶液消化后, 将浓度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液常规接种于支架表面, 进行 SEM 观察。

1.6 细胞增殖情况测定—MTT 法: 将实验组 (PLGA/HA 支架) 和对照组 (纯 PLGA 支架) 的样品置于 6 孔板内, 加入 α -MEM 培养基, 然后将培养的细胞以 5×10^4 个/mL 的密度接种于放有试样的培养板内, 分别在第 1、3、5、7 d 取每组试样加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 40 μ L, 37 °C 下继续培养 4 h, 终

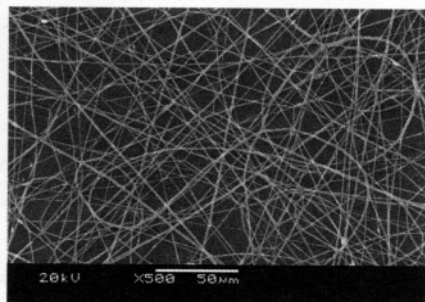
基金项目: 教育部科学技术研究重点项目 (211196); 宁夏自然科学基金项目 (NZ11124); 宁夏医科大学特殊人才科研启动项目 (XT201006)。

止培养,小心吸弃孔内的上清液,每孔加入 420 μ L 的 DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解。吸取每孔中液体 100 μ L 到 96 孔板内,492 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值,记录结果^[4]。

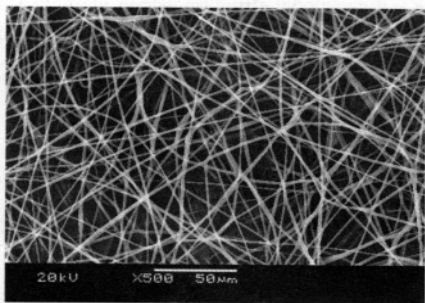
1.7 统计分析:所有数据表达为均值 \pm 标准方差(SD)。以 *t* 检验来衡量实验组和对照组的差异,取 $P < 0.05$ 为统计差异性标准。

2 结果

2.1 PLGA/HA 复合支架的 SEM 观察:PLGA/HA 复合支架及纯 PLGA 支架的微观形貌如图 1 的 SEM 图像所示。从 SEM 图像中可以看出,两个组都通过静电纺丝的方法成功制备了长而连续的电纺纤维。复合支架是由超细纤维构成的三维多孔结构,与天然的细胞外基质结构相似。



(a) PLGA/HA 复合支架

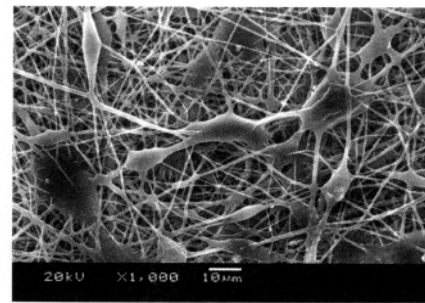


(b) PLGA 支架

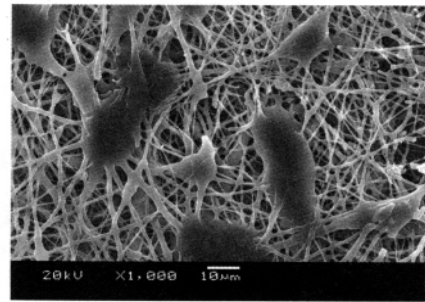
图 1 PLGA/HA 复合支架及纯 PLGA 支架的 SEM 图像

2.2 SEM 细胞形态观察:图 2 是 SD 大鼠骨髓间充质干细胞在电纺支架上培养 8 h 的 SEM 图片。培养 8 h 后,在纯 PLGA 支架表面粘附细胞数量较少,胞体呈细长梭形,面积较小,表明细胞尚未发生铺展。而在 PLGA/HA 支架表面,细胞数量明显较 PLGA 组多,细胞分布均匀,细胞已经开始铺展,部分呈多突起状伪足附着于支架表面。这些结果说明加入 HA 纳米颗粒的支架更有利于细胞与材料间初始的相互粘附作用。

2.3 细胞在支架表面的增殖活性:图 3 为骨髓间充质干细胞接种在两组支架表面培养不同时间以后,用 MTT 法检测细胞活性,比较细胞增殖的情况。如图所示,从培养的第一天到第七天,两组细胞的数量都随培养时间的增加而增加。培养第一天时,实验组的数量比对照组高,但彼此之间差异不大,两组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。培养第三天、第五天和第七天时,PLGA/HA 支架细胞的数量与对照组相比有了显著的增加,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。这也意味着培养在实验组支架上的细胞增殖的速度和活性明显高于对照组。这可能是由于加入的 HA 纳米颗粒增加了支架表面的亲水性,因此,也促进了骨髓间充质干细胞早期的粘附和增殖。



(a) PLGA 支架



(b) PLGA/HA 复合支架

图 2 SD 大鼠骨髓间充质干细胞在电纺支架上培养 8 小时的 SEM 图片

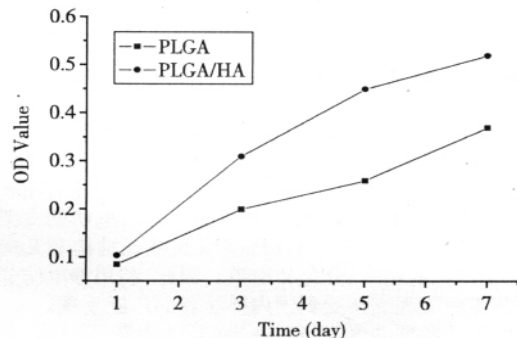


图 3 骨髓间充质干细胞在两组电纺支架表面培养 MTT 测试

3 结论

本研究中通过静电纺丝法制备了 PLGA/HA 复合生物支架。由超细纤维构成的三维多孔的复合生物支架其结构与天然的细胞外基质结构相似。细胞相容性研究结果显示,复合支架对骨髓间充质干细胞的粘附和增殖具有良好的作用。PLGA/HA 复合支架的可能是很具有潜力的可用于骨组织再生的支架。

参考文献

[1] Zhang HL, Liu JS, Yao ZW, et al. Biomimetic mineralization of electrospun poly (lactic-co-glycolic acid) /multi-walled carbon nanotubes composite scaffolds in vitro [J]. Mater Lett 2009, 63: 2313 - 2316.

[2] Jeonga SI, Kimb SY, Choa SK, et al. Tissue-engineered vascular grafts composed of marine collagen and PLGA fibers using pulsatile perfusion bioreactors [J]. Biomaterials 2007 28: 1115 - 1122.

[3] Wan YQ, Qu X, Lu J, et al. Characterization of surface property of poly (lactide-co-glycolide) after oxygen plasma treatment [J]. Bio-materials 2004, 25: 4777 - 4783.

[4] 牛林. 仿生合成丝素蛋白/羟基磷灰石类骨质复合生物材料的研究[D]. 四川大学博士学位论文, 2007.

收稿日期: 2011 - 06 - 01