

# 聚乳酸乙醇酸共聚物与纳米羟基磷灰石共混制备组织工程纤维环支架的实验研究\*

陈 竹, 刘 康, 冯 刚, 白亦光, 杨泽龙

(南充市中心医院·川北医学院第二临床医学院组织工程与干细胞研究所, 四川 南充 637000)

**【摘要】** 目的 探讨以聚乳酸乙醇酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)与纳米羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)为原料,利用静电纺丝的技术制备出的三维多孔支架构建组织工程纤维环的可行性。方法 将 PLGA 与 HA 溶解于丙酮中,配制 20% (w/v)的溶液,磁力搅拌均匀后,进行静电纺丝,制备三维多孔支架。支架通过扫描电镜和磷酸盐缓冲液降解(phosphate buffered saline, PBS)的方式,观察支架的形貌和降解性能;利用 CCK-8 和伊红染色的方法观察支架的生物相容性。结果 支架具有良好的纤维形貌,直径均匀,扫描电镜下可见 HA 结晶。支架在磷酸盐缓冲液中降解速度较快,8 周时支架失重可达 40%,表现出良好的降解性能。细胞毒性试验和伊红染色均表明细胞在支架上的生长情况较好,支架具有良好的生物相容性。结论 PLGA 与 HA 共混制备的纳米纤维支架具有良好的空间结构和生物相容性,因此该支架是一种良好的组织工程纤维环支架材料。

**【关键词】** 聚乳酸乙醇酸共聚物; 纳米羟基磷灰石; 静电纺丝; 组织工程纤维环

**【中图分类号】** R 394.2 **【文献标识码】** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-3511.2013.08.002

## Experiment study on tissue-engineered annulus fibrosus scaffold prepared with PLGA and HA

CHEN Zhu, LIU Kang, FENG Gang, et al

(Research Institute of Tissue Engineering and Stem Cells, Nanchong Central Hospital, The Second Clinical College of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the feasibility of tissue-engineered annulus fibrosus scaffold prepared with PLGA and HA through the electrostatic spinning method. **Methods** PLGA and HA were dissolved in the acetone to form 20% (w/v) solution and stirred to homogeneous. The scaffold was prepared through the electrostatic spinning method. The morphology and degradation of scaffold were observed by scanning electron microscopy and degradation in phosphate buffered saline. The biocompatibility of the scaffold was observed by CCK-8 and eosin staining. **Results** The morphology of scaffold were fibers with uniform diameter, and the crystal HA on the nanofibers could be observed by scanning electron microscopy. The fibers degraded quickly in phosphate buffered saline. At 8 week, the mass loss could be up to 40%. This result showed that the degradation of the scaffold is well. The CCK-8 and eosin staining proved that the annulus fibrosus cells grew well on the scaffold. This suggested that the scaffold is biocompatibility. **Conclusion** The nanofiber scaffold is advantaged on its well spatial structure and excellent biocompatibility. The nanofiber scaffold is a promising tissue-engineered annulus fibrosus scaffold.

**【Key words】** Poly(lactic-co-glycolic acid); Hydroxyapatite; Electrospun; Tissue-engineered annulus fibrosus

椎间盘退行性变疾病(Disc Degeneration Disease, DDD)是一类高发病率及高致残率的疾病,是引起下腰痛(Low Back Pain, LBP)的主要病因。目前临床上对椎间盘退行性变疾病的治疗主要分为非手术保守治疗和外科手术治疗。但保守治疗措施只能

缓解临床症状,并不能逆转已经发生退行性变的椎间盘细胞和组织的生物学功能,而且只在椎间盘发生退行性变的早期有效。同样现有的外科手术治疗手段已被证明只能在手术后短期内缓解症状和维持脊柱运动功能和稳定性。并且长期随访发现大部分外科手术患者手术邻近椎间盘会相继出现退行性变和生物力学特性改变<sup>[1]</sup>。近年来,利用组织工程技术体外构建后在体移植具有生物学活性和功能的组织来置

基金项目:国家自然科学基金(81201407、81171472、81071270、30872614)

通讯作者:冯 刚,教授,硕士生导师,Email:lssmd18@gmail.com

换或修复发生退行性变椎间盘的研究,让椎间盘退行性变的治疗出现了新的希望。

PLGA 是一种常用的合成类生物材料,近年来被广泛应用于构建组织工程<sup>[2,3]</sup>;HA 是钙磷灰石的自然矿物,是脊椎动物骨骼和牙齿的主要成分,具有良好的生物相容性和力学性能,被广泛的用作骨科和齿科填充剂、修补剂和组织工程支架材料<sup>[4,5]</sup>。本研究拟以这两种材料为原料,以静电纺丝的方式构建一种新型的组织工程纤维环支架。

## 1 材料与方法

1.1 主要试剂 PLGA( $M_w = 32.3\text{KDa}$ ,  $M_w/M_n = 1.17$ , LA:GA = 85/15, 山东岱罡), HA(中国阿拉丁),水溶性伊红 Y(北京 Solarbio), CCK-8 试剂盒(日本同仁), DMEM 高糖培养基(美国 HyClone), 胎牛血清(美国 HyClone), 胰蛋白酶(美国 Invitrogen), II 型胶原酶(美国 Invitrogen)。其他各种试剂均为市售分析纯试剂。

1.2 主要仪器 高压电源(DW-P503-1AC, 天津东文), 恒流注射泵(LSP01-1A, 保定兰格), 扫描电子显微镜(JSM-7500F, 荷兰 FEI), 荧光倒置显微镜(TS100, 日本 Nikon)。

## 1.3 实验方法

1.3.1 支架材料的制备 称取一定量的 PLGA 与 HA 溶解于丙酮中,磁力搅拌 24 小时,制备成 20% (w/v) 的均匀溶液,其中 PLGA 与 HA 的质量比为 10:1。高压静电纺丝制备纳米纤维支架,铝箔接收。纺丝方式条件为:温度 30℃,湿度 50%,电压 20Kv,速度 15ml/h,接收距离 15cm。收集纳米纤维,真空干燥箱室温下干燥,备用。

1.3.2 支架的物理性能检测 ①扫描电镜检测支架形貌和直径 纳米支架剪成 0.5cm×0.5cm 的小块,利用导电胶将其固定在铜托上,表面喷金后用扫描电镜观察支架的形貌与直径,扫描电压为 5Kv。所得图片经软件 IMAGE 6.0 处理,测量不少于 200 处纤维的直径,计算平均直径及偏差。②体外降解实验 称取一定量的样品置于 10ml 的 PBS(pH 7.4) 中,37℃,100rpm,空气浴振荡,每隔一周更换一次缓冲液。在预定的时间点取样,倾去缓冲液,去离子水清洗 3 次,真空干燥箱室温干燥至恒重,记录支架的剩余重量,计算支架的失重率。

1.3.3 支架的生物学性能检测 ①兔原代纤维环细胞的分离与培养:取 2 周龄乳兔(雌雄不限),空气注射致死。75%酒精消毒 3 次后,取新鲜椎间盘,分离髓核和纤维环。生理盐水反复冲洗纤维环,并剪碎为 0.1cm×0.1cm 的碎块。0.25% 的胰酶消化 1 小时,

1500rpm 离心 5min 分离,弃去上清液;0.2% 的 II 型胶原酶消化 4 小时,1500rpm,5min 离心分离,装瓶,含 20% FBS 的高糖 DMEM 培养,备用。②CCK-8 毒性实验:纳米支架剪成 0.5cm×0.5cm 的小块,紫外辐射过夜灭菌。灭菌后的支架置于 24 孔板中,加入浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml 的纤维环细胞悬液 100 $\mu$ l,培养箱培养 4 小时后,补加 1ml 培养液继续培养。在预定时间点取出样品,弃去培养液,加入 CCK-8 的工作液,培养箱中孵化 4 小时后,450nm 处测吸收,计算细胞的存活率。CCK-8 的工作液为储存液 DMEM 培养液稀释 10 倍。③伊红染色实验:按照细胞毒性实验所述方式进行种植,培养 7 天后,4% 福尔马林固定 2 小时,去离子水清洗 3 次。0.25% 的伊红染色 5min,弃去多余染料,去离子水清洗 3 次,倒置显微镜下观察细胞的生长情况。

## 2 结果

2.1 纳米支架的物理性能 扫描电镜观察支架结构,可见纳米支架的纤维形貌良好,具有多孔结构。纤维直径均匀,约为(826±30)nm。纤维上可见 HA 结晶,结晶分布较为均匀,证明 HA 颗粒被成功的加入到纤维中,且与 PLGA 混合均匀(图 1)。为了观察支架的降解性能,研究者将纳米支架浸泡于 PBS 缓冲液中(pH 7.4)观察支架的失重情况。图 2 可见支架在缓冲液中降解速度较快。降解 1 周,支架剩余重量为 69.7%;2 周后,支架剩余重量为 61.2%。2 周后支架降解速度减缓趋于稳定,此后 6 周内支架失重率仅 4%。研究者认为,这是因为 HA 与 PLGA 是以共混的方式制备纤维支架,HA 与 PLGA 之间没有形成有效的共价键,因此 HA 是以颗粒的形式分布在以 PLGA 为基质的纤维中。降解发生时,HA 颗粒溶出,在纤维表面形成空洞,造成纤维断裂,从而加速了支架的降解<sup>[6]</sup>。



图 1 扫描电镜下支架的形貌与直径(×5000)

Fig 1 The morphology and diameter of scaffold (×5000)

2.2 纳米支架的生物学特征 利用 CCK-8 检测支架的细胞毒性,图 3 表明细胞在支架上的存活率较高,支架没有明显的细胞毒性。从图 3 中可知,细胞种植 3 天后,细胞在支架上的存活率接近 80%;培养 7 天后,细胞存活率约为 90%;14 天时细胞存活率约为 100%。这表明细胞不仅可以在支架上粘附,还可以进一步的生长增殖,纳米纤维支架没有明显的细胞毒

性。为了进一步观察细胞在支架上的生长情况,研究者利用伊红染色方法,观察支架上细胞的分布情况。图 4 表明,细胞在支架上生长 7 天后,细胞呈多角形,偶见圆形,成片生长,并铺满支架。结果表明,细胞在支架上粘附增殖情况良好,具有生长为组织工程纤维环的潜力。

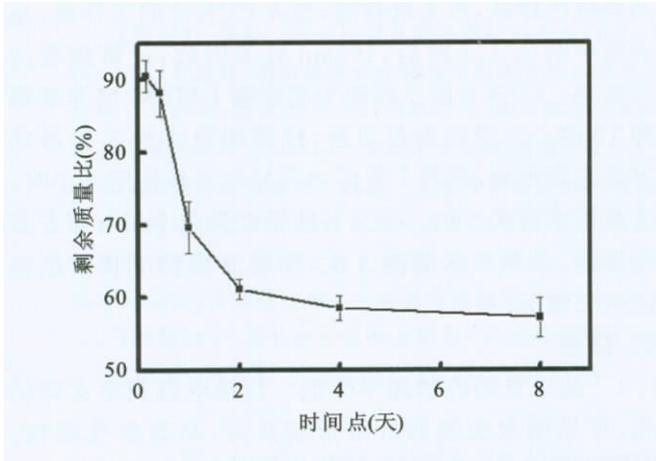


图 2 支架在磷酸盐缓冲液中的降解曲线

Fig 2 The degradation curve of scaffold in phosphate buffered saline

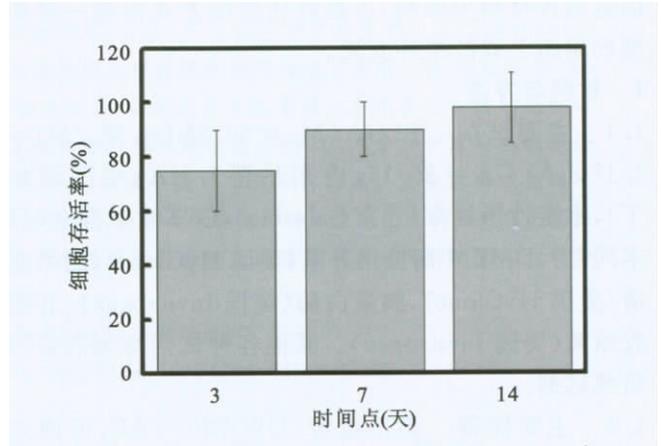


图 3 支架的细胞毒性试验

Fig 3 Cytotoxicity of scaffold

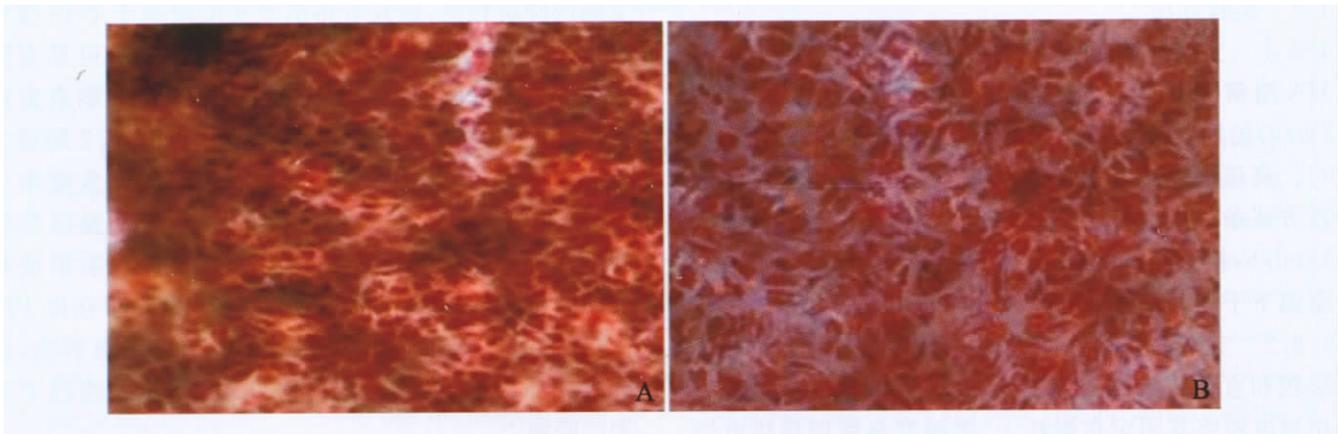


图 4 细胞在支架上的生长情况。A: ×100; B: ×200

Fig 4 Chondrocytes cultured on the scaffold. A: ×100; B: ×200

### 3 讨论

组织工程纤维环的构建难度来自于纤维环本身的特殊组织结构和细胞分布差别。纤维环组织呈片层状环绕髓核,从组织结构上纤维环分为外纤维环和较疏松的内纤维环两部分。外纤维环主要分布的是成纤维细胞样的纤维环细胞,主要合成和分泌大量的 I 型胶原等细胞外基质;而内纤维环主要分布的是软骨细胞样的纤维环细胞,主要合成和分泌 II 型胶原和蛋白聚糖等细胞外基质蛋白。目前有几类生物材料

曾被尝试用于纤维环的组织工程构建,如有机高分子聚己内酯 PCL<sup>[7]</sup>,聚乳酸 PLA<sup>[8]</sup>,也有天然高分子材料丝素蛋白结合硫酸软骨素构建的定向支架<sup>[9]</sup>。但是这些材料都未能完全的模拟纤维环的片层结构和径向分布的不同致密性的特性。

本研究利用静电纺丝技术将成分上与自然骨组织钙盐一致,且具有良好的生物相容性和骨传导性的 HA 与 PLGA 材料结合,制备出新型的纳米三维支架材料用于构建组织工程纤维环。从扫描电镜的结果可见支架具有良好的纤维形貌和较为均匀的直径,纤

维的直径和孔隙率可以通过改变纺丝参数实现。因此,该支架可以较好地模拟纤维环致密或疏松的片层结构。PLGA 合成工艺简单,可塑性好,是组织工程支架材料的研究热点。但单纯的 PLGA 构建的支架表现出较强的疏水性,细胞在其上不易粘附,且支架降解性能较差,在体内降解时间可达数年,有效地改善了单纯 PLGA 支架的降解性能和生物相容性。

#### 4 结论

将具有骨诱导性的 HA 与 PLGA 共混,通过静电纺丝方式构建的纳米纤维支架,可以较好地模拟纤维环致密或疏松的片层结构,同时具有良好地降解性能和生物相容性,具有构建组织工程纤维环的潜力。

#### 【参考文献】

- [1] 冯 刚. 椎间盘组织工程研究的挑战与对策[J]. 西部医学, 2010, 22(8):1377-1379.
- [2] Horst M, Madduri S, Milleret V, *et al.* A bilayered hybrid microfibrillar PLGA-acellular matrix scaffold for hollow organ tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(5):1537-1545.
- [3] Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. Fabrication characterization and in vitro evaluation of aligned PLGA-PCL

nanofibers for neural regeneration [J]. *Ann Biomed Eng*, 2012, 40(10):2098-2110.

- [4] Shalumon KT, Sowmya S, Sathish D, *et al.* Effect of incorporation of nanoscale bioactive glass and hydroxyapatite in PCL/chitosan nanofibers for bone and periodontal tissue engineering [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2013, 9(3):430-440.
- [5] Fu S, Yang L, Fan J, *et al.* In vitro mineralization of hydroxyapatite on electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) fibrous scaffolds for tissue engineering application [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 107: 167.
- [6] 张厚安, 张翠娟, 易继勇. PLGA/HA 骨支架材料的降解特性 [J]. *材料导报*, 2010, 24(7):45-47.
- [7] Koepsell L, Zhang L, Neufeld D. Electrospun nanofibrous poly-caprolactone scaffolds for tissue engineering of annulus fibrosus [J]. *Macromol Biosci*, 2011, 11(3): 391-399.
- [8] Vadala G, Mozetic P, Rainer A. Bioactive electrospun scaffold for annulus fibrosus repair and regeneration [J]. *Eur Spine J*, 2012, 21(1): 20-26.
- [9] Bhattacharjee M, Miot S, Gorecka A. Oriented lamellar silk fibrous scaffolds to drive cartilage matrix orientation: towards annulus fibrosus tissue engineering [J]. *Acta Biomater*, 2012, 8(9): 3313-3325.

(收稿日期: 2013-03-15; 编辑: 张文秀)

(上接第 1123 页)

于比较初级的阶段,离最终的临床应用还有比较远的距离,但随着现代生物技术的发展,这些治疗手段仍然是极具希望的。基因治疗的研究重点应继续寻找一种或几种能显著改善髓核细胞功能的关键基因;细胞治疗的方向应主要集中在进一步明确髓核细胞的特性,干细胞定向分化为髓核细胞的诱导方案以及能真实模拟髓核细胞外基质的可注射生物支架材料的研究。完整的组织工程椎间盘构建应重点研发仿生学纤维环、髓核和软骨终板的支架材料。由同一干细胞诱导分化为纤维环细胞、髓核细胞核软骨细胞的技术,以及完整组织工程椎间盘体外培养条件和移植到体内的固定等等。

#### 【参考文献】

- [1] Chan WC, Sze KL, Samartzis D, *et al.* Structure and biology of the intervertebral disk in health and disease [J]. *Orthop Clin North Am*, 2011, 42(4):447-464.
- [2] Thompson JP, Pearce RH, Schechter MT, *et al.* Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc [J]. *Spine*, 1990, 15(5): 411-415.
- [3] Pfirrmann CW, Metzendorf A, Zanetti M, *et al.* Magnetic Resonance Classification of Lumbar Intervertebral Disc Degeneration [J]. *Spine*, 2001, 26(17): 1873 - 1878.

- [4] 冯 刚. 椎间盘组织工程研究的挑战与对策[J]. 西部医学, 2010, 22(8):1377-1379.
- [5] Choi YS. Pathophysiology of degenerative disc disease [J]. *Asian Spine J*, 2009, 3(1): 39-44.
- [6] Tristan M, Harry H, Baker K. Molecular and genetic advances in the regeneration of the intervertebral disc [J]. *Surg Neurol Int*, 2013, 4(2): 94-105.
- [7] Liang HX, Ma SY, Feng G, *et al.* Therapeutic effects of adenovirus-mediated growth and differentiation factor-5 in a mice disc degeneration model induced by annulus needle puncture [J]. *Spine J*, 2010, 10(1): 32-41.
- [8] Nishida K, Suzuki T, Kakutani K, *et al.* Gene therapy approach for disc degeneration and associated spinal disorders [J]. *Eur Spine J*, 2008, 17(4):459-466.
- [9] Lewis G. Nucleus pulposus replacement and regeneration/repair technologies: present status and future prospects [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2012, 100(6): 1702-1720.
- [10] Hiyama A, Mochida J, Sakai D. Stem cell applications in intervertebral disc repair [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2008, 54(1): 24-32.
- [11] Yang X, Li X. Nucleus pulposus tissue engineering: a brief review [J]. *Eur Spine J*, 2009, 18(11): 1564-1572.
- [12] Arai K, Iwanaga S, Toda H, *et al.* Three-dimensional inkjet biofabrication based on designed images [J]. *Biofabrication*, 2011, 3(3): 034113.

(收稿日期: 2013-06-26; 编辑: 张文秀)