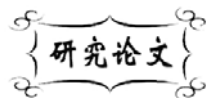


中图分类号: TQ174
文献标识码: A

文献编号: 1005-1198 (2017) 04-0299-12
DOI: 10.16253/j.cnki.37-1226/tq.2017.05.005



三维打印珍珠粉-硫酸钙/聚己内酯 复合支架及性能研究

杜晓宇¹, 俞 斌², 丁惠锋², 朱钰方¹

¹ 上海理工大学 材料科学与工程学院, 上海 200093

² 复旦大学 附属浦东医院骨科, 上海 201399

摘 要: 具有生物相容性的支架可以作为可控的细胞外环境, 供细胞附着、增殖、分化以及组织生成, 在组织工程中有着重要的作用。本研究运用三维打印技术制备了珍珠粉-硫酸钙/聚己内酯 (Pearl-CaSO₄/PCL) 复合支架, 详细研究了珍珠粉含量对复合支架的理化性能和生物学性能的影响。结果表明, 复合支架具有 350 μm 左右的三维连通大孔, 其孔隙率约 60%, 支架强度可达 8 MPa。珍珠粉的复合能够有效调节复合支架的降解速率并稳定支架周围的体液环境。细胞实验结果表明, Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架能够促进骨髓间充质干细胞的增殖与分化, 且与珍珠粉的含量呈正相关。因此, Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架在骨缺损修复领域具有应用前景。

关键词: 三维打印; 骨修复; 支架; 珍珠粉; 硫酸钙

因交通事故、感染、肿瘤、先天性畸形等因素造成的临床骨缺损现象非常常见。治疗的方式也由最初的自体骨移植、异体骨移植逐步优化为人工合成材料移植等^[1]。人工合成材料的优点在于容易制备及标准化、产品质量稳定且价格低廉以及来源广泛可以克服供体不足等问题, 能避免传播疾病等潜在危险^[2]。目前临床上主要使用传统的医用金属材料如钛合金、不锈钢等^[3-6], 但其在应用过程中暴露出一些问题, 如骨折内固定物在骨愈合后需要二次手术取出, 不能形成与机体牢固的骨性组织以及产生应力屏蔽效应从而引起植入物周围骨吸收、萎缩等^[7]。传统的医用金属材料缺乏必要的生物降解性、生物活性以及弹性模量远高于人骨等^[8], 因而限制了它们在更高层次和更广范围内的使用。

目前, 骨组织工程已被认为是修复大面积骨缺损最有前景的方法之一。骨组织工程的基本方法

收稿日期: 2017-05-14

收到修改稿日期: 2017-05-27

基金项目: 上海理工大学科技发展项目 (2017KJFZ010)。

第一作者: 杜晓宇 (1992 -), 女, 河北廊坊人, 硕士研究生。E-mail: xiaoyudu817@126.com。

通讯作者: 朱钰方 (1976 -), 男, 浙江桐乡人, 教授。E-mail: yfzhu@usst.edu.cn。

是将分离的高浓度成骨细胞、骨髓间充质干细胞或骨髓基质细胞等经体外培养扩增后种植于天然的或人工合成的、并且具有优异生物相容性及可被人体逐步降解吸收的支架上^[9,10]。其中支架材料的选择与设计是骨组织工程的重点。理想的支架材料应该具备良好的生物相容性、优异的力学性能、一定的生物活性、合适的降解性能、三维多孔的结构且易于制备、消毒及储存等特点^[11]。因此, 支架可以作为可控的细胞外环境, 供成骨细胞附着、增殖、分化以及新骨生成, 在骨组织工程中发挥重要的作用。

要满足组织工程支架的特点, 溶液浇注/颗粒滤取法、气体发泡法、纤维编织法等传统制备方法差强人意^[12], 难以对支架孔隙的形状、大小、连通状态、空间分布等进行有效的精确控制等是这些方法的共同问题^[13]。三维打印技术由于其便捷、快速、操控性强等突出优点及构建复杂形状的能力, 在组织工程支架制备领域表现出无可比拟的优势^[14]。三维打印制备的支架外形可控, 其内部孔隙结构、大小、分布简单易调, 支架材料的组合也可以自由多样^[15-17]。

在过去的几十年中, 研究者们已经采用三维打印技术制备出多种多样的骨组织工程支架。主要使用的生物材料分为两类, 一类是具有生物相容性的合成高分子材料及天然水凝胶材料, 如聚己内酯 (PCL)、聚乳酸 (PLA)、海藻酸钠、壳聚糖等^[18-22]。这类材料的优势在于生物相容性好、可降解以及具备一定的延展性, 但是缺乏生物活性, 不能诱导新生骨形成^[23]。另一类材料是无机生物陶瓷材料, 主要包括羟基磷灰石、生物玻璃、磷酸钙等^[24-26]。它们不仅具备优异的承重性能, 更重要的是具有生物活性, 能够诱导成骨细胞分化进而促进新骨再生, 但是脆性大, 成型能力较弱^[27]。研究表明, 有机无机复合材料不仅能提高打印性能, 而且支架材料的力学、生物学等综合性能也大大提高, 可以弥补单一材料的不足^[28]。

硫酸钙是一类重要的骨水泥材料, 由于其出色的力学强度、良好的生物相容性以及较低的价格优势而受到了广泛的关注^[29]。Pei 等人^[30]将硫酸钙添加到介孔硅酸钙中制备骨组织工程支架, 结果显示添加 20% 硫酸钙的复合支架强度增加了一倍。然而, 硫酸钙生物活性较差, 降解过快且副产物呈酸性, 这对成骨细胞的增殖及分化是极其不利的^[31]。因此, 许多研究人员尝试将具有良好生物活性及成骨能力的材料与硫酸钙复合, 期望能够调节硫酸钙基复合支架的降解性能及生物学性能。Huan 等人^[32]将硅酸三钙与硫酸钙骨水泥复合, 提高其生物活性。Petruskevicius 等人^[33]发现将磷酸钙与硫酸钙骨水泥混合, 可使其在体液环境中更加稳定。Qi 等人^[34]将介孔生物玻璃与硫酸钙混合制备三维多孔的复合支架, 以大鼠颅骨缺损为模型的动物实验结果显示, 与纯粹的硫酸钙支架相比, 添加生物玻璃的复合支架具有显著增强的成骨能力。因此, 研究探索新的复合组分以提高硫酸钙骨水泥的生物学性能, 对硫酸钙骨水泥的进一步骨修复应用具有重要意义。

珍珠粉的主要成分是蛋白质 (水解后可得到 18 种氨基酸, 其中 7 种是人体必需氨基酸)、文石结构的碳酸钙, 20 多种微量元素及维生素 B 等^[35]。珍珠粉在日常生活中, 除了作为美容护肤的保养品, 还可以口服以补充钙质^[36,37]。在近代医学研究中, 由于珍珠粉的理化性质和生物学特性与人体骨组织很接近, 且其来源丰富、加工简易、成本低廉, 因此作为骨修复材料的研究也日益增多。珍珠粉的成骨作用体现在两个方面: 一方面珍珠粉中水溶性基质能够刺激成骨细胞, 进而刺激新生骨组织生成以及生物矿化; 另一方面, 珍珠粉能够抑制组织蛋白酶 K 的活性, 进而抑制破骨细胞对骨组织的溶解和吸收作用^[38-40]。当文石结构的珍珠粉移植到动物体内, 会有部分溶解, 并转变为方解石结构, 最终完全降解^[41]。Yang 等人^[42]制备出珍珠粉/聚乳酸-羟基乙酸共聚物复合支架, 结果显示与聚乳酸支架相比, 小鼠胚胎成骨细胞在复合支架的表面能更加有效地增殖和分化, 表明珍珠粉具备优异的成骨活性。Liu 等人^[43]考察了大鼠骨髓间充质干细胞在珍珠粉/聚乳酸复合支架培养的情况, 结果显示复合支架相较于聚乳酸支架的碱性磷酸酶活性更高, 能很好地诱导成骨细胞分化。

聚己内酯 (Polycaprolactone, PCL) 是一种脂肪族聚酯, 能够溶解于多种有机溶剂中, 具有优良

的可加工性,易于和其他材料进行共混或者形成共聚物,具有良好的生物相容性,已经被美国FDA批准临床应用^[44,45]。因此,本研究选用珍珠粉部分替代硫酸钙并与PCL复合来3D打印制备Pearl-CaSO₄/PCL复合支架,详细研究了Pearl-CaSO₄/PCL复合支架中珍珠粉含量对复合支架的理化性能、生物学性能的影响,以期获得具有骨缺损修复潜力的复合支架。

1 实验

1.1 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架的制备

本研究使用第四代3D Bioplotter™ (德国EnvisionTEC GmbH公司)打印制备三维多孔复合支架。首先,将聚己内酯(PCL,分子量70000~90000,美国Sigma-Aldrich公司)溶解于二氯甲烷(纯度99%,国药集团上海化学试剂有限公司)中,配置成20%的PCL溶液。接着,将半水硫酸钙(纯度99%,美国Sigma-Aldrich公司)与珍珠粉(纯度99%,浙江长生鸟生物科技有限公司)利用行星磨研磨并通过400目分样筛,使粉体粒径均小于37 μm。随后,将珍珠粉与半水硫酸钙分别按质量比0:100、10:90、30:70、50:50混合均匀,并将混合粉体加入PCL溶液中(其中混合粉体与聚己内酯的质量比为85:15),快速搅拌混合均匀得到打印浆料。

将制备好的可注射性打印浆料转移到打印仓中并且固定在3D Bioplotter™机器上。通过Bioplotter CAD/CAM软件根据不同实验需要,建立不同的支架模型,如10 mm×10 mm×10 mm的立方块,φ8 mm×10 mm的圆柱体等。然后通过三维打印机将浆料挤出成纤维,逐层打印,层层叠加制备成支架。其中针头打印角度为90°,注射泵的气体压力为2.0 bar~3.0 bar,打印速度为4 mm/s~6 mm/s,针头尺寸为0.4 mm。将打印制备的Pearl-CaSO₄/PCL复合支架在37℃的烘箱中干燥两天,使有机溶剂完全挥发。最后,将复合支架置于37℃和100%相对湿度环境下养护3 d~7 d后清洗干燥备用。

四组不同组分的复合支架分别命名为PCP00、PCP10、PCP30和PCP50。

1.2 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架的理化性能表征

采用美国FEI公司的Quanta 450型场发射电子扫描显微镜(SEM)观察了Pearl-CaSO₄/PCL复合支架的表面形貌变化,观察前将样品彻底烘干并喷金镀膜。采用德国Bruker公司的D8 Advance型X射线衍射仪(XRD)测试了样品的广角XRD衍射图谱,扫描角度为10°~90°,扫描速度为8°/min。在2.5kN的Zwick静态材料试验机上测试了复合支架(10 mm×10 mm×10 mm)的机械强度,测试速度为0.5 mm/min。支架的孔隙率运用阿基米德方法测试,孔隙率计算公式如下:

$$P = \frac{W_{\text{sat}} - W_{\text{dry}}}{W_{\text{sat}} - W_{\text{sus}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中, W_{dry} 为支架材料完全干燥时的重量, W_{sat} 为支架材料浸满液体时的重量, W_{sus} 为支架材料在液体中悬浮的重量。为避免Pearl-CaSO₄/PCL复合支架与水发生反应,采取无水乙醇为填充液体。

1.3 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架的体外矿化及降解能力

将四组支架材料在无水乙醇介质中超声清洗、烘干,然后将支架置于装有模拟体液(SBF)的聚丙烯瓶中(其中SBF体积和支架质量比为200 ml/g)。再将聚丙烯瓶加盖密封,置于37℃的烘箱内,整个过程中不更换SBF(即静态SBF浸泡)。在预定时间取出支架材料,用去离子水和无水乙醇轻轻

洗涤 3 遍, 然后在 37°C 烘箱中干燥。通过扫描电镜 (SEM) 观察支架表面羟基磷灰石的沉积情况, 并通过能谱仪 (EDS) 分析支架表面 Ca/P 比。

同样地将四组支架分别置于 SBF 中, 测定 SBF 在浸泡 2 d、4 d、6 d、8 d、10 d、12 d 和 14 d 后的 pH 值。此外, 通过测定支架在 SBF 中浸泡 1 d、3 d、5 d、7 d、14 d、21 d 和 28 d 后的残余质量, 计算支架的降解速率。其中, 在相应的时间点取出支架烘干称重后按支架现有质量计算所需 SBF 用量, 并将支架置于新鲜的 SBF 溶液中。

1.4 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架的细胞实验

大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 在支架上的增殖通过细胞计数 Kit-8 试验法 (CCK-8) 测试。首先将 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架放在紫外灯下照射 24 h 灭菌, 接着在 24 孔板的每个孔中放置一个支架, 每个支架上接种 1×10^4 个 BMSCs 细胞, 在 37°C、5% CO₂ 气氛的 CO₂ 培养箱中分别培养 1 d、3 d 和 7 d。然后, 在相应的时间节点上, 每个孔分别加入 360 μ l 培养基和 40 μ l CCK-8 溶液, 继续培养 4 h。最后, 从每个孔内取出 100 μ l 溶液转移到 96 孔板, 通过酶标仪 (BioRad 680, 美国) 测试在 450 nm 处的吸光度。

为了评价骨髓间充质干细胞在 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架上的碱性磷酸酶 (ALP) 表达情况, 首先将 1×10^5 个细胞分别种植到每个支架上, 加入诱导剂 (含 10^{-8} M 地塞米松, 10^{-2} M β -甘油磷酸钠和 50 μ g/ml 维生素 C) 在 24 孔板上共培养 7 d 和 14 d; 然后去除培养基, 用磷酸盐缓冲溶液轻轻清洗 3 次, 用 200 μ l 细胞裂解液将细胞溶解, 转移至 EP 管, 4°C 下以 14000 g 离心 15 min, 将上清液转移至新的 EP 管, 取上层 50 μ l 清液按试剂盒进行实验 (Cat. No. P0321, Beyotime), 在酶标仪的 405 nm 处读取 OD 值, 同时按照 BCA 法蛋白定量检测试剂盒说明, 进行蛋白定量检测, 最后 ALP 活性以 μ M/min/mg protein 表示。

1.5 统计学分析

实验所得数据均由三组独立实验获得, 数值以“平均值 $\pm$ 标准偏差”表示。实验组为 PCP10、PCP30 和 PCP50 复合支架, 对照组为 PCP00 支架。实验数据分析采用单因素方差分析, 使用 Origin 8.1

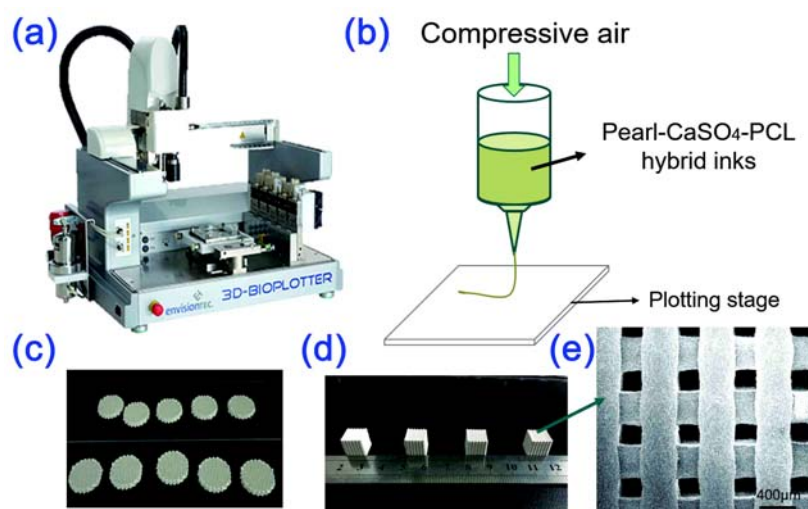


图 1 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架的三维打印制备过程示意图及打印模型

Figure 1 Schematic illustration of 3D printing of Pearl-CaSO₄/PCL composite scaffolds and the printed scaffolds with difficult morphology and structure: (a) The 4th 3D BioplotterTM (EnvisionTEC GmbH, Germany). (b) Schematics depicting 3D printing technique. (c-d) the printed CaSO₄-Pearl/PCL composite scaffolds

Professional SR1 进行计算, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。根据 P 值大小, 所得的数据图分别标记为: $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)。

2 结果与讨论

2.1 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架的理化性能

图 1 为 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架的三维打印制备过程示意图及打印模型。通过配制不同比例的 Pearl-CaSO₄/PCL 打印浆料, 运用 3D Bioplotter™ 进行 3D 打印, 可以根据不同的三维模型设计要求制备出特定形状、结构的支架材料。设定的打印参数能够始终如一地执行, 打印的 Pearl-CaSO₄/PCL

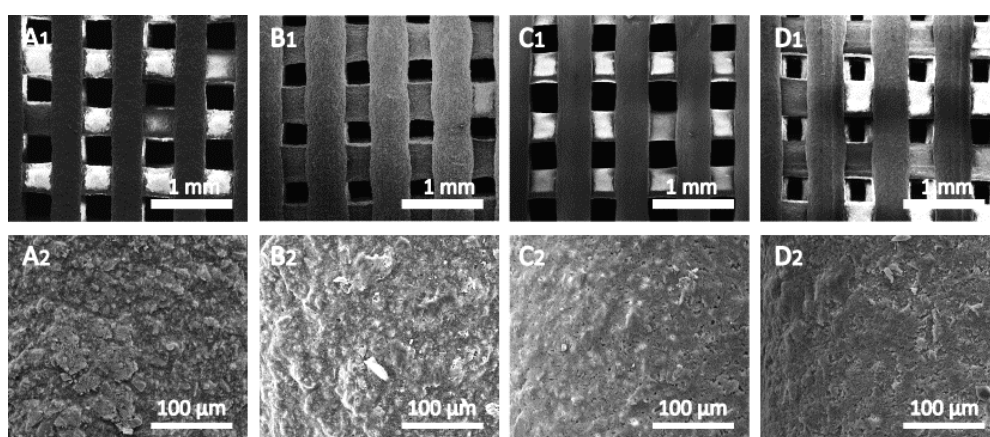


图 2 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架的 SEM 照片: (A) PCP00; (B) PCP10; (C) PCP30; (D) PCP50
Figure 2 SEM images of the Pearl-CaSO₄/PCL composite scaffolds:
(A) PCP00; (B) PCP10; (C) PCP30; (D) PCP50

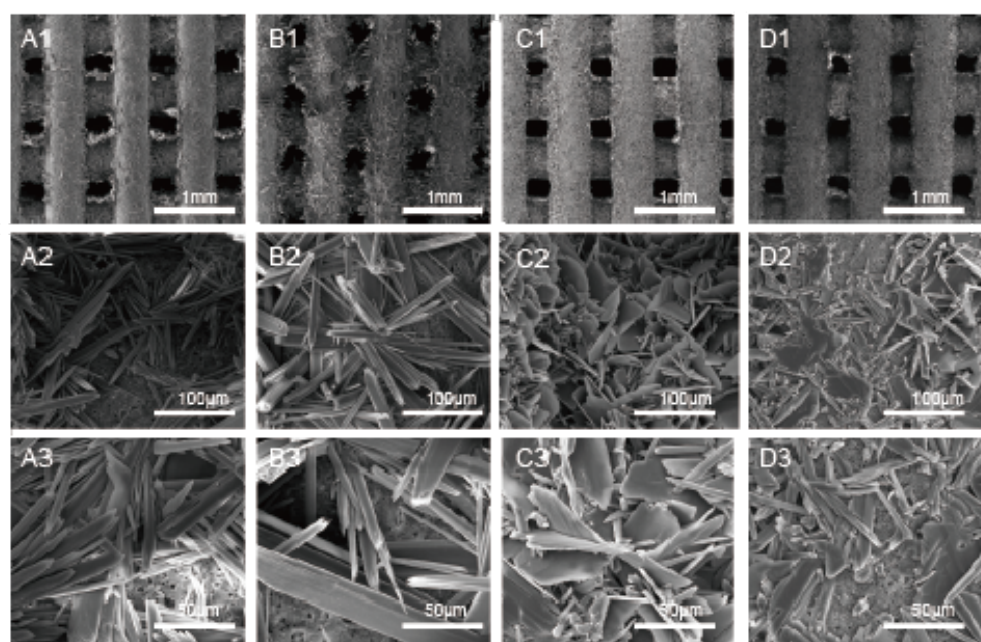


图 3 养护 3 d 的 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架的 SEM 照片: (A) PCP00; (B) PCP10; (C) PCP30; (D) PCP50
Figure 3 SEM images of the Pearl-CaSO₄/PCL composite scaffolds after cured for 3 days at 37°C and 100% humidity: (A) PCP00; (B) PCP10; (C) PCP30; (D) PCP50

复合支架具有互相连通且有序排列的三维多孔结构。

由于半水硫酸钙与水反应会转变为二水硫酸钙 ($\text{CaSO}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 因此 Pearl- CaSO_4/PCL 复合支架在养护前后的表面形貌和力学性能都会发生一定变化。图 2 和图 3 是养护 3 d 前后 Pearl- CaSO_4/PCL 复合支架表面形貌的 SEM 照片。从图中可以看出, 复合支架养护后, 硫酸钙由颗粒状变为棍条状, 支架结构也变得更为致密。图 4 为 Pearl- CaSO_4/PCL 复合支架在 37°C 和 100% 湿润环境中养护 3 d 前后的 XRD 图谱。养护前复合支架出现了半水硫酸钙 ($\text{CaSO}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$) 和文石结构碳酸钙 (Aragonite) 的衍射峰, 表明珍珠粉的无机成分是文石结构的碳酸钙。在养护过程中, 半水硫酸钙和水反应生成二水硫酸钙 ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 导致四组复合支架的 XRD 图谱中均出现二水硫酸钙衍射峰; 但由于复合支架中的半水硫酸钙和水的反应受水分在支架中的渗透和扩散速率影响, 所以复合支架在养护 3 d 后还依然有半水硫酸钙的衍射峰存在 [如图 4 (b)]。

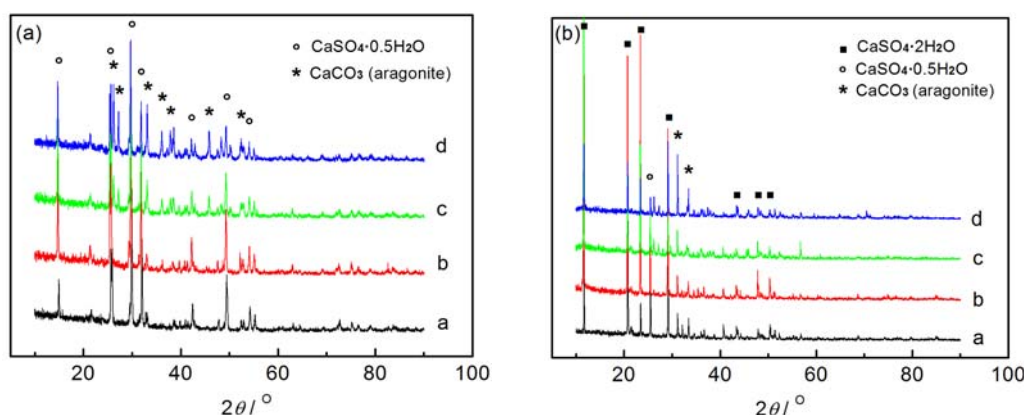


图 4 (a) 养护前和 (b) 养护 3 d 后 Pearl- CaSO_4/PCL 复合支架的 XRD 衍射图谱
Figure 4 XRD patterns of Pearl- CaSO_4/PCL composite scaffolds before (a) and after cured for 3 days (b)
(a) PCP00; (b) PCP10; (c) PCP30; (d) PCP50

支架的孔隙结构为细胞迁移、生长, 血管长入, 营养物质供应以及代谢物排出等提供重要作用。应用阿基米德方法测得 PCP00、PCP10、PCP30 和 PCP50 复合支架的孔隙率分别为 $58.6\% \pm 5.7\%$ 、 $57.5\% \pm 5.7\%$ 、 $57.0\% \pm 2.8\%$ 和 $59.1\% \pm 3.9\%$ (图 5)。从图 2 中的 SEM 照片也可以看出支架具有规则有序且内部连通的大孔结构, 孔径在 $350 \mu\text{m}$ 左右。对于理想的骨组织工程支架而言, 孔径、孔隙率以及孔的内部连通性是决定新骨长入方式和数量的关键因素^[46]。孔径大于 $200 \mu\text{m}$ 是骨传导的基本要求, 孔径为 $200 \mu\text{m} \sim 400 \mu\text{m}$ 最有利于新骨生长^[47,48]。由图 6 可以看出, 养护前四组复合支架的机械强度分别为 $2.9 \text{ MPa} \pm 0.1 \text{ MPa}$ 、 $5.2 \text{ MPa} \pm 0.2 \text{ MPa}$ 、 $6.5 \text{ MPa} \pm 0.3 \text{ MPa}$ 和 $7.5 \text{ MPa} \pm 0.3 \text{ MPa}$ 。随着珍珠粉含量的增加, Pearl- CaSO_4/PCL 复合支架的力学强度得到了改善。其中三组 Pearl- CaSO_4/PCL 复合支架和不含珍珠粉的硫酸钙支架对比, 均存在显著性差异 ($P < 0.05$), 表明珍珠粉能够显著增强复合支架的强度。养护 3 d 的四组复合支架的抗压强度分别为 $5.4 \text{ MPa} \pm 0.3 \text{ MPa}$ 、 $6.5 \text{ MPa} \pm 0.2 \text{ MPa}$ 、

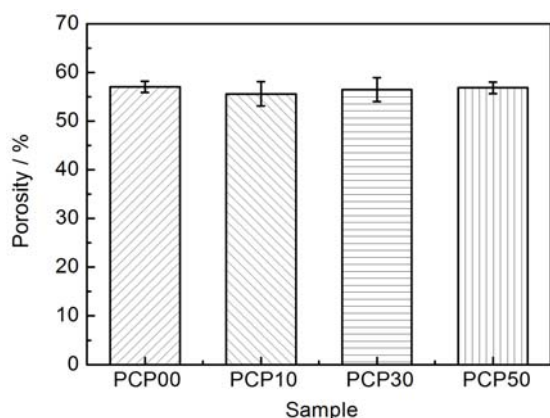


图 5 Pearl- CaSO_4/PCL 复合支架的孔隙率
Figure 5 Porosities of Pearl- CaSO_4/PCL composite scaffolds

6.9 MPa $\pm$ 0.6 MPa 和 7.8 MPa $\pm$ 0.2 MPa。由此可见, 养护能提高 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架的抗压强度, 这是由于半水硫酸钙与水反应后的水硬化作用所致。另外, 3D 打印制备的支架材料具有更为均匀的孔结构, 也有利于其机械性能的提高。因此, 3D 打印制备的 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架的抗压强度基本可以满足人体松质骨 2 MPa ~ 12 MPa 抗压强度的要求。从孔隙结构和力学强度考虑, Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架材料具有骨组织修复的潜力。

2.2 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架的体外生物活性和降解性能

图 7 为 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架在 SBF 中浸泡 5 d 后的 SEM 照片和 EDS 图谱。四组复合支架在 SBF 中浸泡 5 d 后, 先前复合支架表面棍条状的二水硫酸钙被花瓣状纳米颗粒沉积物所覆盖, 其纳米颗粒沉积物显示出羟基磷灰石的形貌特征^[49]。经 EDS 能谱分析, 各能谱图中均存在明显的 Ca、P 特征峰, 并且 PCP00、PCP10、PCP30 和 PCP50 复合支架的 Ca/P 值分别为 1.53, 1.67, 1.67 和 1.63, 这与羟基磷灰石 1.67 的 Ca/P 值非常接近, 进一步表明 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架浸泡 SBF 溶液 5 d 后表面有羟基磷灰石沉积。另一方面, 随着珍珠粉含量的增加, 沉积的羟基磷灰石厚度明显增加, 表明引入珍珠粉可以改善复合支架的生物

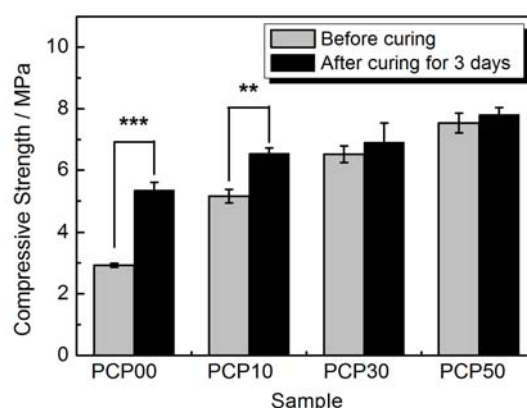


图 6 养护前和养护 3 d 后 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架的抗压强度

Figure 6 Compressive strength of Pearl-CaSO₄/PCL composite scaffolds before and after cured for 3 days

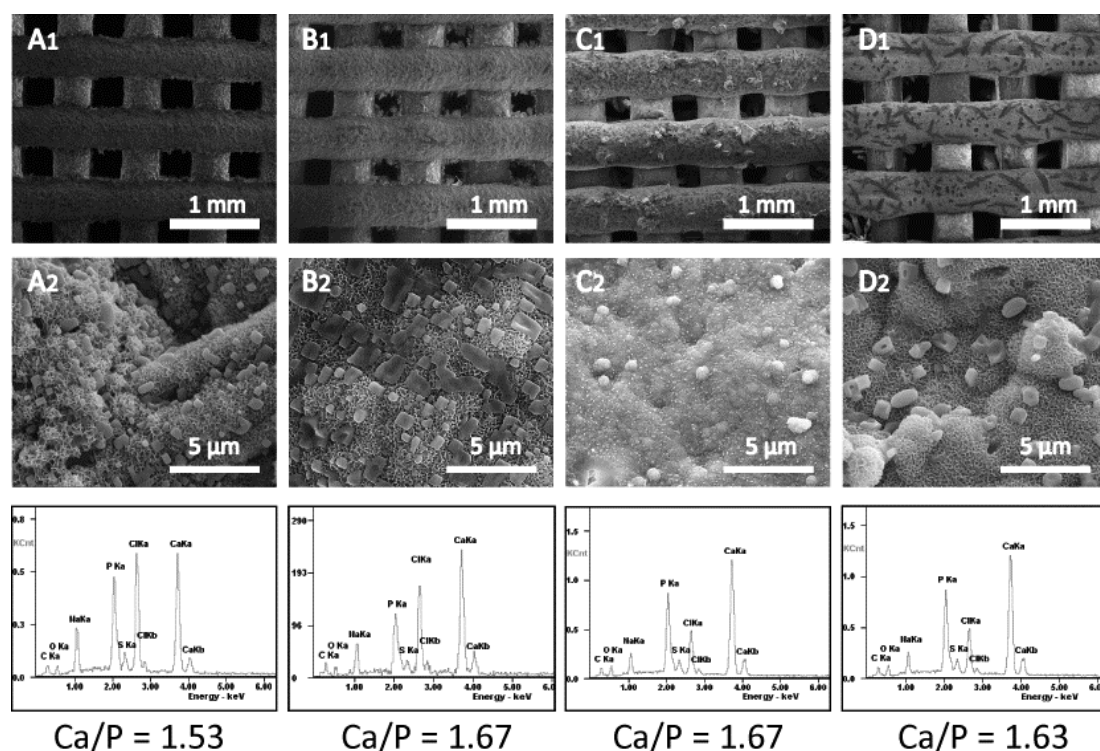


图 7 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架在模拟体液中浸泡 5 d 后的 SEM 照片和 EDS 图谱
Figure 7 SEM images and EDS spectra of Pearl-CaSO₄/PCL composite scaffolds after soaking in SBF for 5 days: (A) PCP00; (B) PCP10; (C) PCP30; (D) PCP50

活性。

理想的骨组织工程支架材料, 其降解速率应该和新骨再生的速率相匹配。支架降解过慢, 新骨没有足够的空间生长; 相反, 降解过快则不能为新骨提供支撑作用^[50]。此外, 支架的降解产物应该呈弱碱性, 不应与人体体液的 pH 值相差过大^[51]。图 8 为支架浸泡 SBF 后的 pH 值变化。从图中可以看出, Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架中珍珠粉含量的增加有助于稳定 SBF 的 pH 值; PCP00、PCP10、PCP30 和 PCP50 四组支架浸泡 14 d 后的 SBF pH 值分别为 7.37 ± 0.01 、 7.40 ± 0.01 、 7.46 ± 0.02 和 7.43 ± 0.04 。研究表明, 支架周围稳定的 pH 值环境有助于成骨细胞生长。如图 9 所示, 珍珠粉的引入可以调节支架的降解速率, 即支架的降解速率随着珍珠粉含量的增加而减慢。浸泡 8 周后, PCP00、PCP10、PCP30 和 PCP50 四组支架的残余量分别为 $21.44\% \pm 1.24\%$ 、 $22.96\% \pm 0.99\%$ 、 $35.86\% \pm 1.54\%$ 和 $50.52\% \pm 1.07\%$ 。由此可见, 珍珠粉的引入可以调节 CaSO₄/PCL 支架的降解速率和支架周围环境的 pH 变化, 从而可调控 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架的骨缺损修复能力。

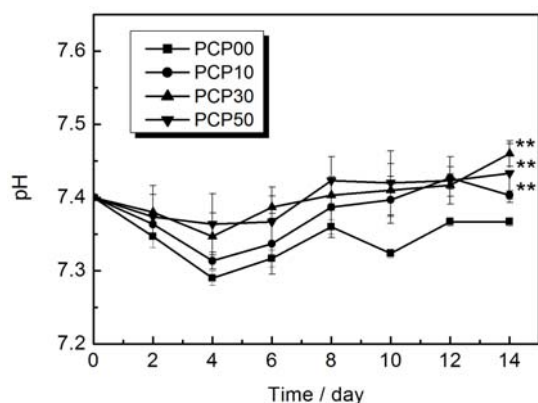


图 8 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架浸泡的模拟体液 pH 值变化

Figure 8 pH values of SBF after soaking Pearl-CaSO₄/PCL composite scaffolds for various time periods

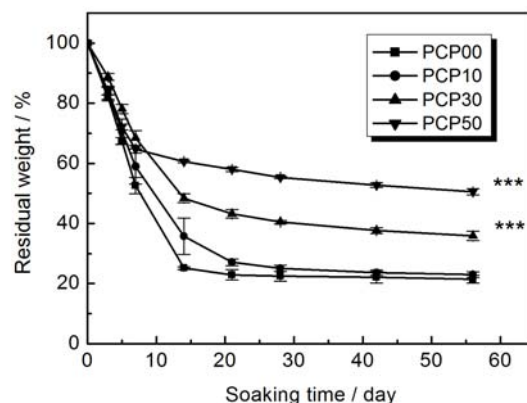


图 9 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架体外降解情况

Figure 9 In vitro degradation of Pearl-CaSO₄/PCL composite scaffolds in SBF for various time periods

2.3 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架的细胞实验结果分析

骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 的增殖和分化是骨矿化发生前非常重要的阶段, 而 BMSCs 的增殖和分化的基本过程又受到材料和细胞相互作用的控制。因此, 本研究进一步考察了 BMSCs 在各组复合支架表面上的增殖和碱性磷酸酶 (ALP) 活性。图 10 为 BMSCs 在 PCP00、PCP10、PCP30 和 PCP50 四组支架上培养 1 d、3 d 和 7 d 后的细胞增殖情况。CCK-8 方法测定细胞增殖的结果表明, 四组支架材料都能够支持细胞增殖, 但是与 PCP00 支架相比, 引入珍珠粉的复合支架的细胞增长率有显著增加; 而且随着珍珠粉含量的增加, BMSCs 在支架表面的增长率也增加。这可能与支架材料的降解情况有

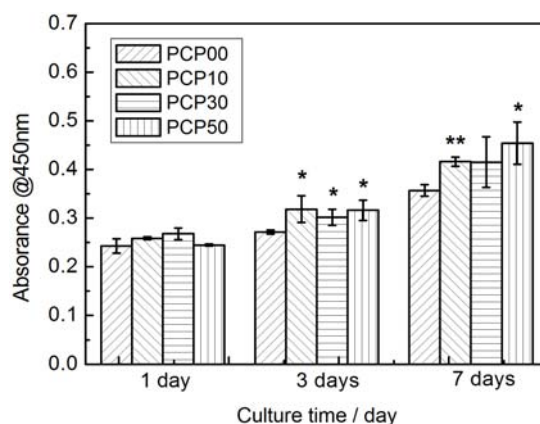


图 10 BMSCs 细胞在 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架上的增殖情况

Figure 10 Proliferation of BMSCs on the Pearl-CaSO₄/PCL composite scaffolds

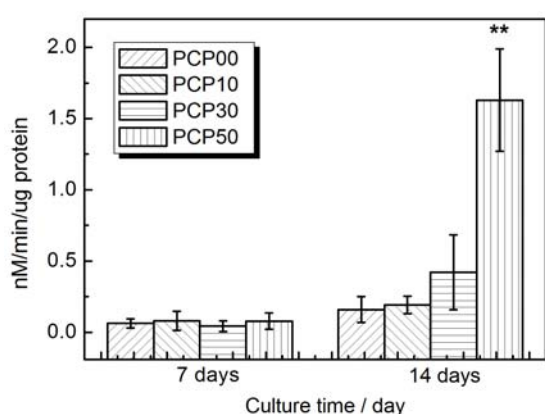


图 11 BMSCs 细胞在 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架上的碱性磷酸酶活性情况

Figure 11 ALP activities of BMSCs on the Pearl-CaSO₄/PCL composite scaffolds

关。由于硫酸钙降解速率快,使得支架表面贴附的细胞周围的局部 pH 环境偏弱酸性,对细胞的生长不利;珍珠粉的主要成分为文石结构的碳酸钙,降解较慢,并且碳酸钙降解后成弱碱性。因此,珍珠粉部分替代硫酸钙能够有效地调节复合支架的降解速率以及稳定细胞周围的局部 pH 环境,进而促进细胞的生长与增殖。

ALP 活性是成骨细胞分化成熟的早期标志。通过分解基质中的磷酸酯使局部磷酸化,促进羟基磷灰石的形成及沉积,使基质钙化,同时能够水解焦磷酸,解除对骨形成的抑制^[52]。图 11 为骨髓间充质干细胞在四组支架上培养 7 d 和 14 d 后的细胞 ALP 活性结果。从图中可以看出,随着培养时间的增加,四组支架的 ALP 活

性也相应增加。四组支架的 ALP 活性在培养 7 d 后没有明显差异,但是在培养 14 d 后,ALP 活性随复合支架中珍珠粉含量的增加而增强。硫酸钙的骨传导性主要来源于降解后释放的钙离子,局部高浓度的钙离子与 BMSCs 钙敏感受体结合后,能够促进骨细胞增殖、分化,调节类骨质形成,参与骨基质的重塑。但其过快的降解速率,酸性的降解产物导致细胞增殖效果不好,进而影响到后续分化过程^[53]。珍珠粉的含钙量高,与硫酸钙成骨机理类似,但珍珠粉的骨诱导作用除了来源于含有的钙质释放外,其含有的包括蛋白质和多糖等少量有机基质以及微量元素也发挥作用,它们可以作为特殊的生长因子促进成骨细胞分化。因此,珍珠粉部分替代硫酸钙可以改善复合支架的生物学性能以促进骨缺损修复。

3 结 论

本文将珍珠粉部分替代硫酸钙并与聚己内酯复合,运用三维打印技术制备得到 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架。复合支架具有三维多孔且相互连通的规则大孔结构,其大孔尺寸 350 μm 左右,孔隙率约 60%,满足细胞和血管的长入以及细胞营养供应与代谢废物的排出等要求。复合支架的抗压强度达到 8 MPa 左右,满足人体松质骨 2 MPa ~ 12 MPa 的要求。珍珠粉部分替代硫酸钙能有效地调节了复合支架的降解速率,稳定复合支架周围环境的 pH 值。细胞实验结果表明, Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架能够有效地促进骨髓间充质干细胞的增殖与分化,且其促进作用随珍珠粉含量的增加而逐步增强。因此,通过调节珍珠粉含量可以调控 Pearl-CaSO₄/PCL 复合支架的理化性能和生物学性能,在骨缺损修复应用方面具有应用前景。

参考文献

- [1] WEI GB, MA PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2004, 25 (19): 4749–4757.
- [2] LU T, WEN J, QIAN S, et al. Enhanced osteointegration on tantalum-implanted polyetheretherketone surface with bone-like elastic modulus [J]. *Biomaterials*, 2015, 51: 173–183.
- [3] STAIGER MP, PIETAK AM, HUADMAI J, et al. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review [J]. *Biomaterials*, 2006, 27 (9): 1728–1734.

- [4] NAM PT, THOM N T, PHUONG NT, et al. Electrodeposition of sustainable fluoridated hydroxyapatite coatings on 316L stainless steel for application in bone implant [J]. *Green Processing and Synthesis*, 2016, 5 (5): 499–510.
- [5] EL-HAJJE A, KOLOS EC, WANG JK, et al. Physical and mechanical characterisation of 3D-printed porous titanium for biomedical applications [J]. *Journal of Materials Science - Materials in Medicine*, 2014, 25 (11): 2471–2480.
- [6] 梅荣成, 杨述华, 杨操, 等. 钛合金支撑架结合自体骨和 DBM 治疗股骨头坏死[J]. *中国矫形外科杂志*, 2006, 14 (7): 509–511.
- [7] HE MF, HUA XY, FAN X, et al. In vitro corrosion behavior and biocompatibility of biodegradable magnesium-pearl powder metal matrix composite [J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2016, 663: 156–165.
- [8] CHEN XB, NISBET DR, LI RW, et al. Controlling initial biodegradation of magnesium by a biocompatible strontium phosphate conversion coating [J]. *Acta Biomaterialia*, 2014, 10 (3): 1463–1474.
- [9] LANGER R, VACANTI JP. Tissue engineering [J]. *Science*, 1993, 260 (5110): 920–926.
- [10] 石静, 钟玉敏. 组织工程中 3D 生物打印技术的应用[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18 (2): 271–276.
- [11] ZHANG JH, ZHAO SC, ZHU YF, et al. Three-dimensional printing of strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds for bone regeneration [J]. *Acta Biomaterialia*, 2014, 10 (5): 2269–2281.
- [12] 赵瑾, 袁晓燕, 姚康德. 组织工程多孔支架制备技术进展[J]. *化工进展*, 2002, 21 (9): 644–649.
- [13] ZHU M, ZHANG J, ZHAO S, et al. Three-dimensional printing of cerium-incorporated mesoporous calcium-silicate scaffolds for bone repair [J]. *Journal of Materials Science*, 2015, 51 (2): 836–844.
- [14] JANG J, YI HG, CHO DW. 3D printed tissue models: present and future [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2016, 2 (10) 1722–1731.
- [15] CHIA HN, WU BM. Recent advances in 3D printing of biomaterials [J]. *Journal of Biological Engineering*, 2015, 9: doi: 10.1186/s13036-015-0001-4.
- [16] ZHAO Y, YAO R, OUYANG LL, et al. Three-dimensional printing of hela cells for cervical tumor model in vitro [J]. *Biofabrication*, 2014, 6 (3): 035001.
- [17] 王璐, 胡为杰, 聂昊, 等. 3D 打印与组织工程心肌、心脏瓣膜、大血管及血管网的构建[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19 (43): 7029–7034.
- [18] YOU F, WU X, CHEN XB. 3D printing of porous alginate/gelatin hydrogel scaffolds and their mechanical property characterization [J]. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2017, 66 (6): 299–306.
- [19] VISSER J, MELCHELS FPW, JEON JE, et al. Reinforcement of hydrogels using three-dimensionally printed microfibrils [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: doi:10.1038/ncomms7933.
- [20] VISSCHER DO, BOS EJ, PEETERS M, et al. Cartilage tissue engineering: preventing tissue scaffold contraction using a 3D-printed polymeric cage [J]. *Tissue Engineering C*, 2016, 22 (6): 573–584.
- [21] SERRA T, PLANELL JA, NAVAIRIO M. High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology [J]. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9 (3): 5521–5530.
- [22] ALMEIDA CR, SERRA T, OLIVEIRA MI, et al. Impact of 3-D printed PLA- and chitosan-based scaffolds on human monocyte/macrophage responses: unraveling the effect of 3-D structures on inflammation [J]. *Acta Biomaterialia*, 2014, 10 (2): 613–622.
- [23] CUI XF, BREITENKAMP K, FINN MG, et al. Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology [J]. *Tissue Engineering A*, 2012, 18 (11–12): 1304–1312.
- [24] ZHAO S, ZHU M, ZHANG J, et al. Three dimensionally printed mesoporous bioactive glass and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) composite scaffolds for bone regeneration [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2 (36): 6106–6118.
- [25] SHAO HF, HE Y, FU JZ, et al. 3D printing magnesium-doped wollastonite/beta-TCP bioceramics scaffolds with high strength and adjustable degradation [J]. *Journal of the European Ceramic Society*, 2016, 36 (6): 1495–1503.
- [26] COX SC, THORNBY JA, GIBBONS GJ, et al. 3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended

- for use in bone tissue engineering applications [J]. *Materials Science & Engineering C*, 2015, 47: 237–247.
- [27] DO AV, KHORSAND B, GEARY SM, et al. 3D printing of scaffolds for tissue regeneration applications [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2015, 4 (12): 1742–1762.
- [28] GUVENDIREN M, MOLDE J, SOARES RMD, et al. Designing biomaterials for 3D printing [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2016, 2 (10) 1679–1693.
- [29] MISTRY S, ROY S, MAITRA NJ, et al. A novel, multi-barrier, drug eluting calcium sulfate/biphasic calcium phosphate biodegradable composite bone cement for treatment of experimental MRSA osteomyelitis in rabbit model [J]. *Journal of Controlled Release*, 2016, 239: 169–181.
- [30] PEI P, WEI D, ZHU M, et al. The effect of calcium sulfate incorporation on physiochemical and biological properties of 3D-printed mesoporous calcium silicate cement scaffolds [J]. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2017, 241: 11–20.
- [31] GUO H, WEI J, LIU CS. Development of a degradable cement of calcium phosphate and calcium sulfate composite for bone reconstruction [J]. *Biomedical Materials*, 2006, 1 (4): 193–197.
- [32] HUAN Z, CHANG J. Self-setting properties and in vitro bioactivity of calcium sulfate hemihydrate-tricalcium silicate composite bone cements [J]. *Acta Biomaterialia*, 2007, 3 (6): 952–960.
- [33] PETRUSKEVICIUS J, NIELSEN S, KAALUND S, et al. No effect of osteoset((R)), a bone graft substitute, on bone healing in humans: a prospective randomized double-blind study [J]. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 2002, 73 (5): 575–578.
- [34] QI X, PEI P, ZHU M, et al. Three dimensional printing of calcium sulfate and mesoporous bioactive glass scaffolds for improving bone regeneration in vitro and in vivo [J]. *Science Reports*, 2017, 7: No.42556.
- [35] ZHANG J, LI S, YAO S, et al. Ultra-performance liquid chromatography of amino acids for the quality assessment of pearl powder [J]. *Journal of Separation Science*, 2015, 38 (9): 1552–1560.
- [36] CHEN HS, CHANG JH, WU JS. Calcium bioavailability of nanonized pearl powder for adults [J]. *Journal of Food Science*, 2008, 73 (9): H246–H251.
- [37] 于震宇, 等. 纳米珍珠粉中钙的吸收和利用研究[J]. *营养学报*, 2006, 28 (2): 135–139.
- [38] SHEN Y, ZHU J, ZHANG H, et al. In vitro osteogenetic activity of pearl [J]. *Biomaterials*, 2006, 27 (2): 281–287.
- [39] DUPLAT D, GALLET M, BERLAND S, et al. The effect of molecules in mother-of-pearl on the decrease in bone resorption through the inhibition of osteoclast cathepsin K [J]. *Biomaterials*, 2007, 28 (32): 4769–4778.
- [40] 廖军, 徐普. 珍珠层成骨作用的研究进展[J]. *海南医学*, 2013, 24 (21): 3197–3202.
- [41] MA YF, GAO YH, FENG QL. Characterization of organic matrix extracted from fresh water pearls [J]. *Materials Science & Engineering C*, 2011, 31 (7): 1338–1342.
- [42] YANG YL, CHANG CH, HUANG CC, et al. Osteogenic activity of nanonized pearl powder/poly (lactide-co-glycolide) composite scaffolds for bone tissue engineering [J]. *Biomedical Materials and Engineering* 2014, 24 (1): 979–985.
- [43] LIU Y, HUANG Q, FENG Q. 3D scaffold of PLLA/pearl and PLLA/nacre powder for bone regeneration [J]. *Biomedical Materials*, 2013, 8 (6): 065001.
- [44] PATRICIO T, DOMINGOS M, GLORIA A, et al. Fabrication and characterisation of PCL and PCL/PLA scaffolds for tissue engineering [J]. *Rapid Prototyping Journal*, 2014, 20 (2): 145–156.
- [45] WONG R, BOSWORTH L, O'BRIEN M, et al. Comparable long term healing with PCL scaffolds in a murine tendon injury model [J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2014, 8: 463–463.
- [46] LOH QL, CHOONE C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size [J]. *Tissue Engineering B*, 2013, 19 (6): 485–502.
- [47] ANNABI N, NICHOL JW, ZHONG X, et al. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering [J]. *Tissue Engineering B*, 2010, 16 (4): 371–383.
- [48] ARRIAGA MA, LEYNES C, CHEW S. A study of PLGA scaffolds with different porosity for bone tissue engineering applications [J]. *Tissue Engineering A*, 2016, 22: S105–S105.

- [49] KOKUBO T, TAKADAMA H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? [J]. *Biomaterials*, 2006, 27 (15): 2907–2915.
- [50] WU LB, DING JD. In vitro degradation of three-dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2004, 25 (27): 5821–5830.
- [51] SUNG H J, MEREDITH C, JOHNSON C, et al. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis [J]. *Biomaterials*, 2004, 25 (26): 5735–5742.
- [52] KIM YJ, LEE MH, WOZNEY JM, et al. Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by *Dlx5* and repressed by *Msx2* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (49): 50773–50780.
- [53] CARINCI F, PIATTELLI A, STABELLINI G, et al. Calcium sulfate: analysis of MG63 osteoblast-like cell response by means of a microarray technology [J]. *Journal of Biomedical Materials Research B*, 2004, 71B (2): 260–267.

※ ※

3D Printing of Pearl-CaSO₄/PCL Composite Scaffolds and Their Properties

DU Xiao-Yu¹, YU Bin², Ding Hui-Feng², ZHU Yu-Fang¹

¹ School of Materials Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

² Department of Orthopedics, Shanghai Pudong Hospital, Fudan University, Shanghai 201399, China

Abstract: Three-dimensional porous scaffolds, acting as temporary support for cell adhesion, proliferation and differentiation, play a very important role in bone tissue engineering. In this study, pearl-CaSO₄/PCL composite scaffolds were successfully fabricated by 3D printing. The structure, bioactivity, cell proliferation and alkaline phosphatase (ALP) activity of the pearl-CaSO₄/PCL scaffolds were investigated. The results showed that pearl-CaSO₄/PCL composite scaffolds with different pearl amounts had a regular and uniform square macroporous structure (~350 μm) and high porosity (~60%), which was beneficial for tissue growth and nutrition transportation. The compressive strength of pearl-CaSO₄/PCL composite scaffolds was up to 8 MPa after curing for 3 days. Furthermore, the pearl addition tailored the degradation rates of scaffolds and stabilized pH environment. Importantly, the pearl-CaSO₄/PCL scaffolds stimulated the proliferation and ALP activity of BMSCs with increasing pearl component. Therefore, 3D printed pearl-CaSO₄/PCL composite scaffolds would be promising candidates for bone repair.

Key words: 3D printing; Bone repair; Scaffolds; Pearl; Calcium sulfate