

羟基磷灰石-聚二甲基硅氧烷弹性多孔细胞 支架的制备*

杨 杨¹ 蓝 鼎¹ 黄 艳² 李延明¹
王育人^{1△} 孙联文² 樊瑜波²

1 (中国科学院力学研究所微重力重点实验室, 北京 100190)

2 (北京航空航天大学生物与医学工程学院生物力学与力生物学教育部重点实验室, 北京 100191)

摘要: 采用造孔剂方法, 制备羟基磷灰石-聚二甲基硅氧烷(HA-PDMS)弹性多孔细胞支架, 并将大鼠骨髓间充质干细胞(rBMSCs)接种到材料上, 研究细胞的黏附状态。制备的弹性材料孔隙率可调, 调节范围为62%~76%。采用不同造孔剂(NaCl、石蜡), 可制备出不同孔型(方形、圆形)的材料。三维支架孔内壁在SBF溶液中能够长出羟基磷灰石(HA)晶体, 表明其具有良好的生物相容性, 且支持rBMSCs的黏附铺展。

关键词: 弹性; 细胞支架; 孔隙率; 生物相容性; 大鼠骨髓间充质干细胞

中图分类号 R318.08 **文献标志码** A

DOI:10.7507/1001-5515.20140117

Preparation of Elastic Porous Cell Scaffold Fabricated with Combined Polydimethylsiloxane (PDMS) and Hydroxyapatite (HA)

YANG Yang¹ LAN Ding¹ HUANG Yan² LI Yanming¹
WANG Yuren¹ SUN Lianwen² FAN Yubo²

1 (National Microgravity Laboratory, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Science, Beijing 100190, China)

2 (School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China)

Abstract: Polydimethylsiloxane (PDMS) and hydroxyapatite (HA) were combined in our laboratory to fabricate an elastic porous cell scaffold with pore-forming agent, and then the scaffold was used as culture media for rat bone marrow derived mesenchymal stem cells (rBMSCs). Different porous materials (square and circular in shape) were prepared by different pore-forming agents (NaCl or paraffin spheres) with adjustable porosity (62%-76%). The HA crystals grew on the wall of hole when the material was exposed to SBF solutions, showing its biocompatibility and ability to support the cells to attach on the materials.

Key words: elastic; cell scaffold; porosity; biocompatibility; rat bone marrow derived mesenchymal stem cell

引言

生物支架作为组织工程中的重要组成部分,一方面提供细胞成长的支撑环境,另一方面提供细胞新陈代谢的物质交换通道,同时为新生组织提供立足空间。因此,通常要求支架材料具有生物相容性、生物可降解性、可控的孔隙率以及一定的力学性能等。在细胞生物力学领域,目前的研究多是关注细

胞在二维基质表面,由于表面特殊拓扑结构或者在外加力学刺激下的生长分化问题^[1-6]。而真实的生物体内部,细胞位于一个三维的多孔组织内,其受力环境和组织受力后的物质运输变化与二维基质有较大的差别。因此,营造一个细胞三维受力环境需要对材料进行特别的制作。这一材料需要满足如下条件:具有良好的生物相容性和一定的强度,在外力作用下能进行一定范围的形变,同时物质运输保持顺畅。

目前,制备支架所用的材料包括高分子材料(多

* 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2011CB710901)

△通信作者。E-mail: yurenwang@imech.ac.cn

糖、水凝胶、热塑性橡胶等)以及无机活性材料(磷酸钙、生物玻璃等)^[7-12]。为了改善支架材料的力学性能,研究者将高分子材料和无机材料复合,制备力学性能优异的支架材料^[13-14]。

羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)是人体骨组织的主要无机成分。人工合成的 HA 作为一种重要的生物材料在很多方面都有重要的应用,例如与高分子材料复合制备成骨水泥来对骨损伤部位进行修复,也可以制备成多孔支架。聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)膜是常用的研究细胞二维受力的基质,具有良好的生物惰性、较大的弹性形变以及良好的可加工性^[15-16]。本实验研究中将 PDMS 与 HA 按一定比例复合,通过造孔剂法制备成孔径均一的弹性多孔细胞支架材料。通过生理溶液灌流实验研究其生物相容性,并在支架材料中进行了大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone marrow derived mesenchymal stem cells, rBMSCs)培养实验。

1 材料和方法

1.1 材料

PDMS(道康宁 184),预聚体与固化剂按照 10:1 的质量比混合使用;乙酸乙酯(北京化工厂);HA(国药集团化学试剂有限公司);NaCl(中盐工业食盐);石蜡(河南东洋蜡业有限公司)。不锈钢模具:模具内径为 6 mm。

1.2 制备

PDMS/HA 浆料制备:乙酸乙酯与 PDMS 混合,PDMS:乙酸乙酯=3:1(质量比)。加入一定量 HA 后球磨混合 5 h。

多孔材料制备:将筛分后的 NaCl 与 PDMS/HA 浆料灌入模具中,在 80 °C 施加一定压力(约 1.77 MPa)以保证孔的连通性,2 h 后固化。将固化后的材料从模具中取出,浸泡于超纯水中,超声处理,每 2 h 换水一次,NaCl 完全溶解后(1~2 d)得到所需的弹性多孔材料。

1.3 支架力学性能表征

压缩试样是长度为 6 mm、直径为 6 mm 的圆柱体,造孔剂为 NaCl,在力学性能测试仪上测试其压缩力学曲线。试样中 HA 的含量分别为 0%、40% 和 45%。

1.4 支架孔隙率的测定

测定了支架材料的孔隙率,造孔剂为 NaCl,将材料烘干后称重 W_0 ,再放入超纯水中浸泡,抽真空,支架内部充满水后将样品取出,用滤纸吸干表面水

分,称重 W_1 , V 为测量得到的样品的体积,孔隙率按以下公式计算:

$$p = \frac{W_1 - W_0}{V} \times 100\%$$

1.5 孔型控制

球型造孔剂制备:将 40 g 固体石蜡和 200 mL 一定浓度(1%或 2%)的明胶溶液置于锥形瓶中,水浴加热至 80 °C,石蜡变为液态。加热的过程中搅拌,将液态的石蜡分散为小液滴。等悬浮液稳定以后,快速倒入 0 °C 的冰水中淬冷。过滤,烘干,得到固体的石蜡微球。

球形孔材料的制备:将石蜡球置于模具中,堆积加压,成型后,边抽真空边灌入浆料,60 °C 固化 3 h。将固化后的材料从模具中取出,浸泡于甲苯溶液中,超声处理,并定时更换溶液,将石蜡球去除,得到连通孔的多孔弹性材料。

1.6 生理溶液灌流培养实验

将弹性多孔材料(NaCl 造孔剂)放置在灌流器中,进行生理溶液灌流培养。SBF 溶液置于 37 °C 的恒温水槽中,在蠕动泵的作用下,溶液在支架材料的连通孔内流动,灌流 3 d。图 1 为灌流培养器的装置图及样品放置情况,生理溶液配比^[17]按照顺序在 1 L 超纯水中依次加入下列物质:NaCl(8.035 g)、NaHCO₃(8.035 g)、KCl(0.225 g)、K₂HPO₄·3H₂O(0.231 g)、MgCl₂·6H₂O(0.311 g)、1.0 mol/L HCl(39 mL)、CaCl₂(0.292 g)、Na₂SO₄(0.072 g)、Tris(6.118 g)、1.0 mol/L HCl(0~5 mL)。



图 1 灌流培养器装置

Fig. 1 The perfusion culture device

1.7 rBMSCs 的分离培养

rBMSCs 原代培养方法与之前工作类似^[18],本实验把 2~4 代的 rBMSCs 接种到上述材料中(造孔

剂为 NaCl,用含 10%血清的 DMEM 培养基培养,培养时间为 3 d,然后用 2.5%的戊二醛固定 30 min 后,梯度脱水,喷金,进行扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察。

2 实验结果

2.1 造孔剂

图 2 为分筛前后造孔剂 NaCl 的光学显微图像。NaCl 为晶体结构,分筛前 NaCl 的粒径为 50~600 μm 不等,经分筛后,造孔剂的粒径较为均一。

2.2 支架外观及力学性能

图 3 为制备的支架材料的外观及切片,支架的结构完整,直径为 6 mm,支架长度可调,且支架材料为弹性材料,可进行弯曲、拉伸、压缩等,便于力的施加。

图 4 为支架材料压缩时的应力应变曲线,三条线对应的支架材料中 HA 的含量分别为 0%、40% 和 45%。初始的线性阶段对应材料的弹性变形,在

弹性极限的范围内,应力与支架的应变成正比。

2.3 多孔材料 SEM 图

图 5 为以 NaCl 为造孔剂制得的多孔材料的剖面 SEM 扫描图,孔的形貌取决于造孔剂的形貌。

2.4 材料孔隙率

根据造孔剂量的不同,制备所得的多孔支架的孔隙率可达到 60%~80%。混合浆料与造孔剂(NaCl)的质量比分别为 1:2、1:2.5、1:3、1:3.5、1:4 时,对应的孔隙率分别为 62.30%、66.79%、68.02%、71.04%、76.27%。孔隙的形状取决于造孔剂的形状,而孔隙率与造孔剂的含量有关。

2.5 孔型控制

为了改善孔型及连通性,我们利用球型造孔剂石蜡制备了支架材料。

图 6 为经分筛后几种不同粒径的石蜡球的光学显微图像。制得的石蜡球为规则的球型,且经分筛后,粒径较为均一。

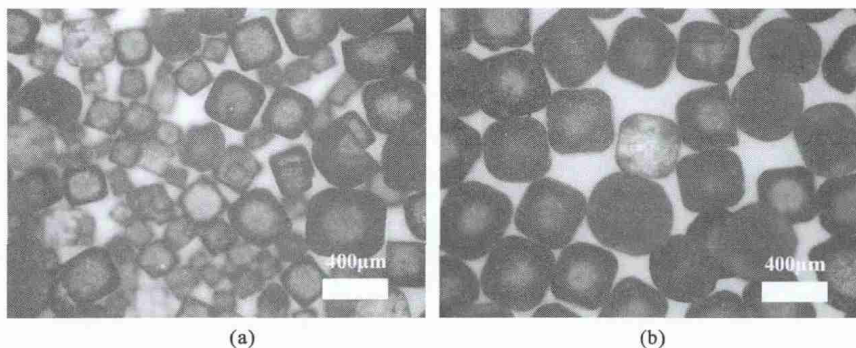


图 2 分筛前后造孔剂 NaCl 光学显微图像
(a)分筛前;(b)分筛后

Fig. 2 Optical microscopy images of pore-forming agent NaCl before and after subsieve
(a) before subsieve; (b) after subsieve

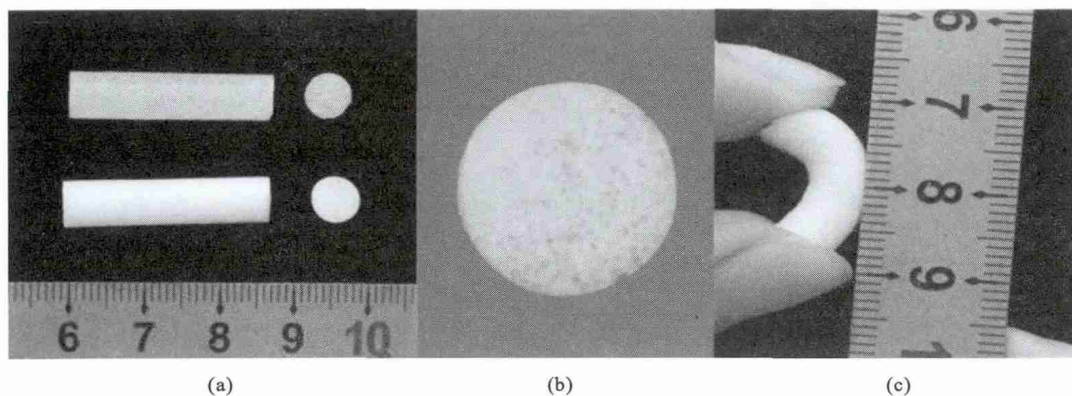


图 3 支架材料的外观及切片形貌图
(a)支架外观;(b)切片外观;(c)支架大挠度变形

Fig. 3 Appearance of the scaffold and the slice

(a) appearance of the scaffold; (b) appearance of the slice; (c) scaffold in large deflection deformation

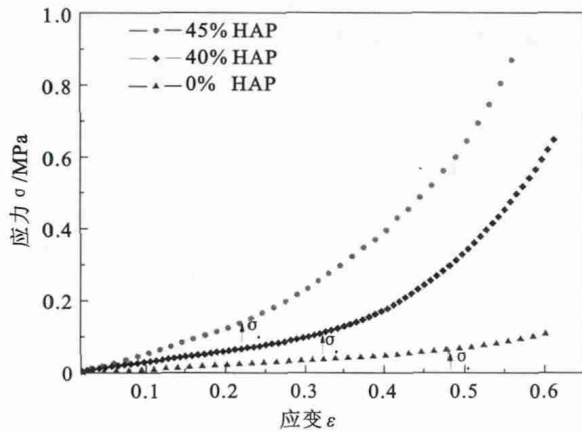


图 4 支架材料的应力应变曲线

Fig. 4 Stress-strain curve of the scaffold

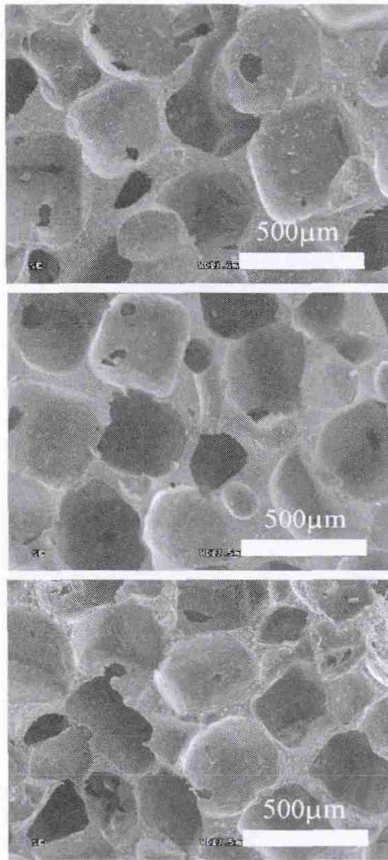


图 5 多孔材料 SEM 扫描图(造孔剂为不同尺寸 NaCl 晶体)

Fig. 5 Scanning electron microscope (SEM) images of the scaffold cross-section (pore-forming agent: v NaCl crystal)

图 7 为采用石蜡造孔剂制备的多孔支架材料。孔为规则的球型,且孔的连通性较好,连通孔为圆形。

2.6 生理溶液灌流培养

按照上述生理溶液灌流培养的方法,灌流 3 d 后,孔内壁长满了岛状晶体,如图 8 所示。图 9 为材

料的 XRD 结果,支架材料的各衍射峰的晶面间距、强度等与 HA 的标准图谱一致。图 10 为生长的晶体的 EDS 图谱,结果显示 Ca/P 为 1.53。

2.7 rBMSCs 的分离培养

图 11 为三维弹性材料内部细胞状态。材料为 PDMS-HA 复合材料,孔径为 300 μm。

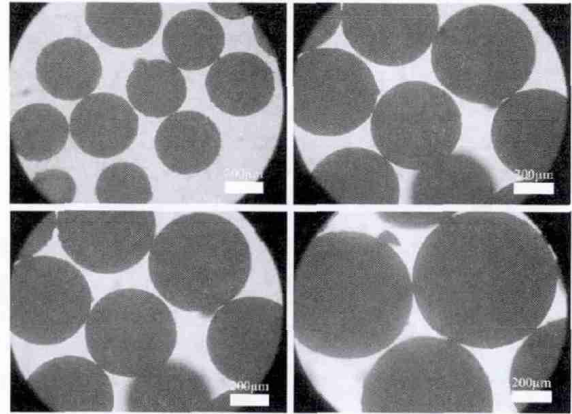


图 6 自制石蜡球分筛后的光学显微图像

Fig. 6 Optical microscopy images of the paraffin spheres

3 讨论

细胞与细胞支架之间的相互作用力是影响细胞增殖、分化的重要因素。为研究细胞在各种力学刺激下增殖分化等生物行为,力学性能优异的细胞支架显得尤为重要。在本文中,所制备的支架材料结构完整,长度可调,具备良好的力学性能,可以进行压缩、弯曲、拉伸等力学刺激下的细胞培养实验。如图 3(c) 所示,所制备的支架材料在大挠度变形下仍能恢复,证明其具备良好弹性。为进一步定量研究该类型支架材料在不同 HA 含量时的力学行为,利用力学性能测试仪进行压缩实验予以表征,如图 4 所示。实验所得三条应力应变曲线对应的支架材料中 HA 的含量分别为 0%、40% 和 45%。三条应力应变曲线都表现出两个变形阶段:弹性变形段和密实强化段。在弹性极限的范围内,应力与支架的应变成正比,应力除去时无残余应变,在应力应变曲线上表现为直线段,该直线斜率代表了材料弹性模量。通过计算弹性段的斜率,可以得到三个试样的弹性模量分别为 0.128、0.336 和 0.556 MPa,其数量级和高分子材料接近,证明所制备生物支架具有优异的柔度。同时可以看出,所制备支架材料在不含 HA 时,弹性段应变约为 0.5,加入 45% HA 时,弹性段变形仍可维持在 0.2 左右,证明该支架材料优异的弹性变形能力。在第二阶段变形过程中,由于

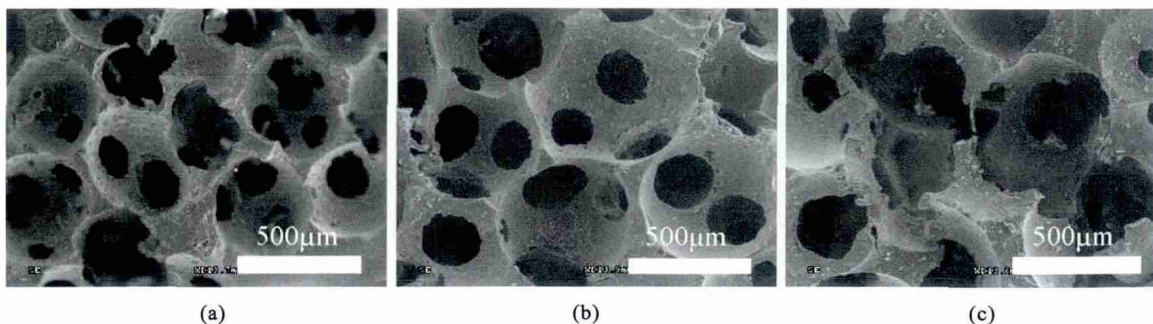


图 7 多孔材料 SEM 扫描图(造孔剂为不同粒径石蜡球)

(a) 粒径 450~500 μm; (b) 粒径 500~550 μm; (c) 粒径 550~600 μm

Fig. 7 SEM images of the scaffold cross-section (pore-forming agent: paraffin spheres)

(a) 450-500 μm; (b) 500-550 μm; (c) 550-600 μm

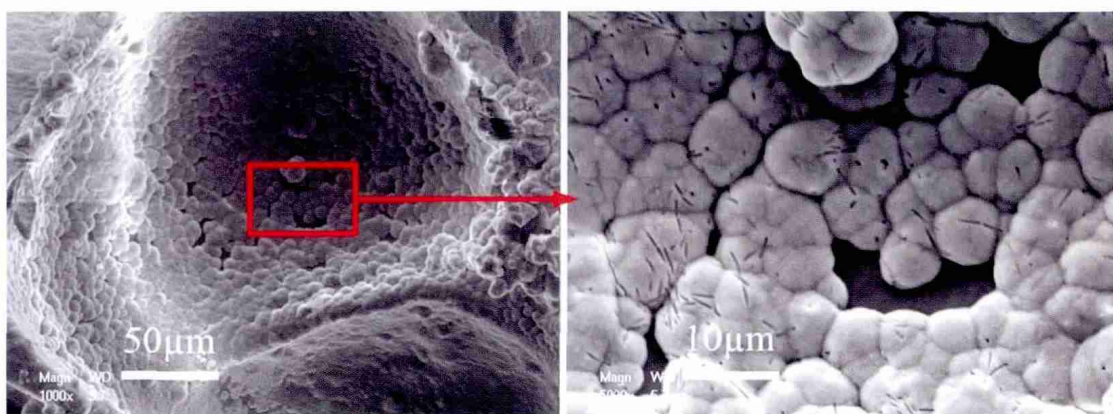


图 8 孔内壁 HA 生长 SEM 图

Fig. 8 SEM images of the HA crystals growing on the wall of the hole

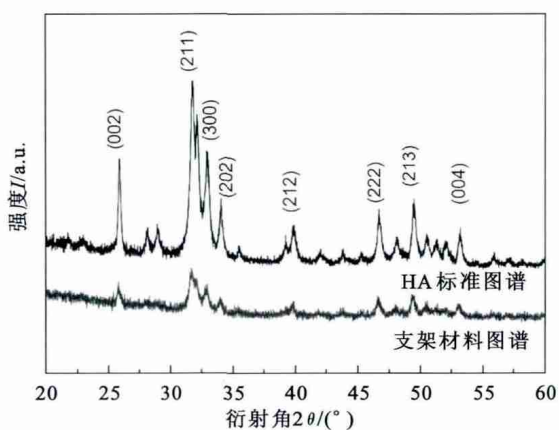


图 9 支架材料 XRD 图谱

Fig. 9 XRD pattern of the scaffold

孔隙被压缩,材料变得密实,从曲线上表现不再是直线段,出现密实强化。HA 含量为 45% 的弹性支架拥有最大的弹性模量和弹性极限,而不含 HA 的弹性支架拥有最大的弹性变形范围。HA 对支架材料有强化作用,随着 HA 含量的增多,支架材料强度上

升同时丧失了一部分的弹性变形能力,调控支架材料中 HA 含量,可以得到不同力学性能的支架材料。通过力学性能表征可以看出,本文中所制备的生物支架材料具有优异的弹性变形能力,且可以通过调节 HA 含量来制备不同力学性能的支架材料,为研究细胞在大变形环境中的生物学行为提供可能。

孔的形态会影响细胞的黏附生长状态,好的连通性能够保证在细胞培养过程中生理溶液运输及细胞代谢废物的排放等,因此孔隙形态、孔隙率和连通性对于生物支架材料是非常重要的参数。所制备生物支架 SEM 扫描如图 5 所示,当造孔剂采用 NaCl 时,由于其结晶结构为方形,孔型取决于造孔剂形状故为方形。同时由于 NaCl 变形能力较差,造孔剂堆积多为点接触,连通性相对较差。为了改进该类型弹性支架材料的孔型及连通性,我们利用球型造孔剂石蜡制备了具有优良连通性和球形孔隙的支架材料(见图 7)。经实验发现,孔的连通性取决于粒子间相互作用力,当石蜡球堆积后施加的压力较大时,

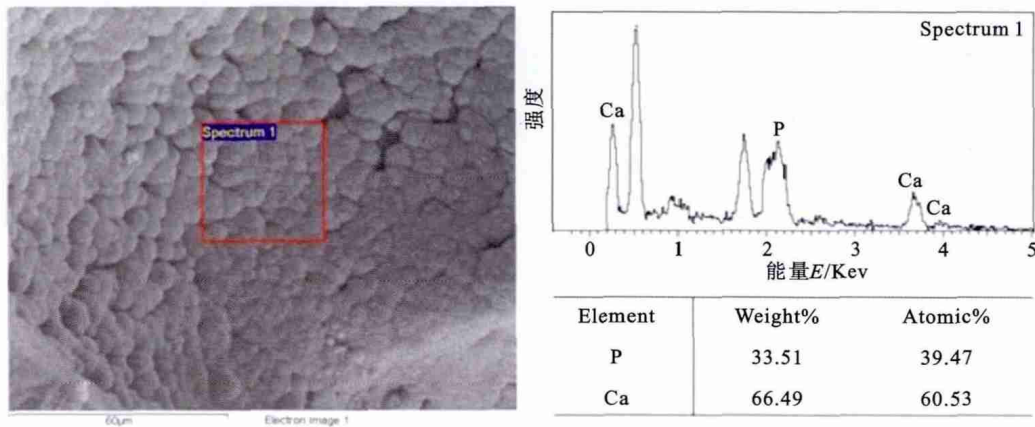


图 10 支架材料孔内壁 EDS 图谱

Fig. 10 Energy Dispersive Spectroscopy of apatite formed on pore inner wall

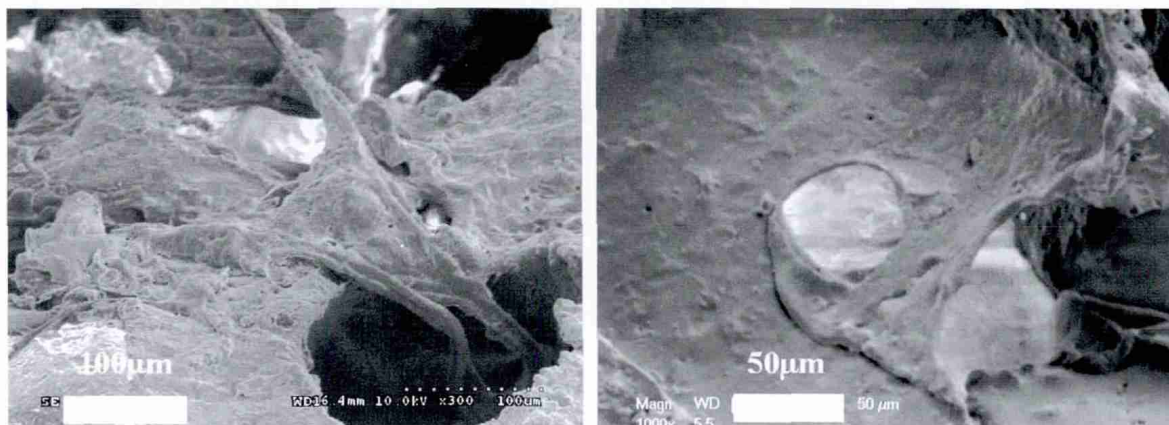


图 11 细胞在支架中培养的 SEM 图

Fig. 11 SEM images of the cell adhesion on the porous scaffold

连通孔较大。而不施加外力时,孔间的连通性会较差,甚至出现闭孔。因此在制备球形孔三维支架材料过程中,首先要将球形造孔剂石蜡微球放置模具中外加震动,使得粒子之间保持充分接触;再通过施加外力使得粒子发生变形,粒子间形成面接触;最后利用负压进行浆料灌注。对比图 5 和图 7 可以看出,通过改进,利用球形造孔剂石蜡微球制备的生物支架材料具有更好的连通性。

生物相容性是生物支架材料的基本要求之一。为验证所制备生物支架材料的生物相容性,本文分别进行了生理溶液灌流培养实验和细胞培养实验,对形貌和成分分别进行了分析和观察。XRD 结果显示(见图 9),支架材料的各衍射峰的晶面间距、强度等与 HA 的标准图谱一致,证明支架材料中含有 HA。因为生长的晶体较薄,衍射峰的强度并不强,并且包含了复合 HA 信息。生长晶体的 EDS 结果

(见图 10)表明 Ca/P 为 1.53,接近 HA 完整晶体的 Ca/P=1.67,从而证明经过培养孔内壁生成的晶体为磷灰石^[17]。Ca/P 小于 1.67 也说明生理溶液灌流生长的磷灰石结晶并不完善。支架材料中的成分之一 HA 为 HA 晶体的生长提供成核位点,SBF 溶液中的 Ca^{2+} 与 PO_4^{3-} 在孔内壁表面沉积,形成 HA,表明制备的多孔材料具有良好的生物相容性。在 SBF 灌流处理以后,孔内壁形成的岛状 HA 为细胞提供了立足点,利于细胞的黏附生长。

细胞培养实验结果如图 11 所示,可以看出电镜下细胞以点状接触的模式黏附在支架材料内壁上,形成了具有三维立体结构的生物复合体。细胞在三维支架中的黏附状态与在二维平面上的黏附明显不同。二维基质培养时,细胞铺展在二维平面上。在三维的孔隙里,细胞可以黏附在不同面上,可以呈现一定的立体构型,这表明细胞能够在此三维弹性支

架材料内部较好地黏附,证明了该支架具有良好的生物相容性。PDMS具有高弹性和生物惰性,对细胞无毒害,在细胞生物力学研究中常用作培养基底^[15]。在该生物支架制备过程中,采用PDMS与HA等生物活性材料复合的制备工艺,生物活性材料可以改善材料的表面浸润性,使细胞很好地黏附生长,有利于排除这些表面修饰物质对细胞分化的影响。可以看出,HA的加入在改善材料强度的同时也提高了所制备支架材料的生物相容性。

4 结论

本文将PDMS与HA复合,分别以NaCl与石蜡球为造孔剂制备了不同孔型的三维弹性细胞支架材料。通过压缩试验证明该种类支架材料具有优异的弹性变形能力,且可以通过调节HA含量来制备不同力学性能的支架材料。同时,该类生物支架材料孔隙率可调,调节范围为62%~76%。经SBF溶液灌流,孔内壁HA晶体生长表明材料具有良好的生物相容性。rBMSCs经培养贴附在支架材料三维孔内壁中,未经修饰的支架内壁,细胞仍然可以很好地黏附在三维孔腔内的不同面上,形成了具有三维立体结构的生物复合体,表明细胞能够在此三维弹性支架材料内部较好地黏附。实验证明该类生物支架材料具有良好的弹性和生物相容性,同时有利于细胞进行表面黏附等,可以作为研究力学刺激对细胞生物行为影响的三维支架材料。

参 考 文 献

- [1] SONG G, JU Y, SHEN X, et al. Mechanical stretch promotes proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2007, 58(2): 271-277.
- [2] TANG L L, WANG Y L, PAN J, et al. The effect of stepwise increased stretching on rat calvarial osteoblast collagen production [J]. *J Biomech*, 2004, 37(1): 157-161.
- [3] YANG Y, MAGNAY J, COOLING L, et al. Effects of substrate characteristics on bone cell response to the mechanical environment [J]. *Med Biol Eng Comput*, 2004, 42(1): 22-29.
- [4] JANSEN J H, WEYTS F A, WESTBROEK I, et al. Stretch-induced phosphorylation of ERK1/2 depends on differentiation stage of osteoblasts [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 93(3): 542-551.
- [5] 吕守芹,杨帆,龙勉. 细胞-分子生物力学研究进展[J]. *医用生物力学*, 2009, 24(2): 79-84.
- [6] 黄艳,樊瑜波. 力学因素影响骨髓间充质干细胞活性的研究进展[J]. *生物医学工程学杂志*, 2010, 27(4): 920-923.
- [7] DROTLEFF S, LUNGWITZ U, BREUNIG M, et al. Biometric polymers in pharmaceutical and biomedical sciences [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58(2): 385-407.
- [8] TIRELLI N, LUTOLF M P, NAPOLI A, et al. Poly(ethylene glycol) block copolymers [J]. *J Biotechnol*, 2002, 90(1): 3-15.
- [9] BERGER J, REIST M, MAYER J M, et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 57(1): 19-34.
- [10] 崔福斋,郭牧遥. 生物陶瓷材料的应用及其发展前景[J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(7): 1343-1347.
- [11] 包崇云,张兴栋. 磷酸钙生物材料固有骨诱导性的研究现状与展望[J]. *生物医学工程学杂志*, 2006, 23(2): 442-445, 454.
- [12] 冯庆玲,崔福斋,张伟. 纳米羟基磷灰石/胶原骨修复材料[J]. *中国医学科学院学报*, 2002, 24(2): 124-128.
- [13] ZHANG K, WANG Y, HILLMYER M A, et al. Processing and properties of porous poly(L-lactide)/bioactive glass composites [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(13): 2489-2500.
- [14] YAO J, RADIN S, LEBOY P S, et al. The effect of bioactive glass content on synthesis and bioactivity of composite poly(lactic-co-glycolic acid)/bioactive glass substrate for tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(14): 1935-1943.
- [15] KATANOSAKA Y, BAO J H, KOMATSU T, et al. Analysis of cyclic-stretching responses using cell-adhesion-patterned cells [J]. *J Biotechnol*, 2008, 133(1): 82-89.
- [16] WANG J G, MIYAZU M, XIANG P, et al. Stretch-induced cell proliferation is mediated by FAK-MAPK pathway [J]. *Life Sci*, 2005, 76(24): 2817-2825.
- [17] KOKUBO T, TAKADAMA H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(15): 2907-2915.
- [18] HUANG Y, JIA X, BAI K, et al. Effect of fluid shear stress on cardiomyogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Arch Med Res*, 2010, 41(7): 497-505.

(收稿:2012-10-17 修回:2013-04-02)