

[文章编号] 1671-587X(2024)06-1519-07

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240605

3D打印PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 复合支架制备及其对兔骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

刘鑫钢, 陈旭, 刘亚东, 苗锦虎, 邵国喜
(吉林大学第二医院创伤外科, 吉林 长春 130022)

[摘要] **目的:** 探讨通过3D打印技术制备的聚乳酸(PLA)/聚三亚甲基碳酸酯(PTMC)和PLA/PTMC-磷酸三钙 $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ 复合多孔支架对兔骨髓间充质干细胞(BMSCs)的影响, 阐明其在骨缺损修复中的应用价值。**方法:** 混合材料后使用桌面挤丝机制备PLA/PTMC和PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 线材, 使用CATIA V5-6R2019建模软件设计支架, 并使用CreatBot F430 3D打印机进行支架制作。红外光谱检测PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 支架化学结构, 体外降解实验检测2种支架降解失重率和pH值, 角接触测量仪检测2种支架亲水性。取3只出生2~5 d的白色新西兰乳兔, 提取BMSCs, CCK-8法检测2种支架共培养细胞增殖活性, 茜素红染色观察2种支架共培养细胞成骨分化情况。**结果:** 红外光谱检测证实成功制备出含有PLA、PTMC和 $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 3种物质的复合支架。降解6~14周, 与PLA/PTMC支架比较, PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 支架在脂肪酶溶液和磷酸盐缓冲液(PBS)中的降解速率均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 降解8~14周, 与PLA/PTMC支架比较, PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 支架在脂肪酶溶液中的pH值明显升高($P<0.01$)。与PLA/PTMC支架比较, PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 支架接触角明显减小($P<0.01$)。细胞共培养第5和7天时, 与PLA/PTMC支架比较, PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 支架共培养细胞增殖活性均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。共培养21 d后, 2种支架与BMSCs重叠生长, 局部均形成钙化结节, 茜素红将其局部染成橘红色; 与PLA/PTMC支架比较, PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 支架共培养细胞矿化钙结节数量增多, 密度增大, 颜色加深。**结论:** 通过3D打印技术成功制备出含有PLA、PTMC和 $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 复合多孔支架, 其降解性能良好, 在生物相容性、亲水性和成骨诱导性等方面均表现出优势, 是一种性能优良的骨缺损修复材料。

[关键词] 骨缺损; 骨再生; 3D打印; 聚乳酸; 聚三亚甲基碳酸酯

[中图分类号] R331 **[文献标志码]** A

Preparation of 3D-printed PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ composite scaffolds and their effects on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells of rabbits

LIU Xingang, CHEN Xu, LIU Yadong, MIAO Jinhu, SHAO Guoxi

(Department of Trauma Surgery, Second Hospital, Jilin University, Changchun 130022, China)

ABSTRACT **Objective:** To discuss their effects of PLA (polylactic acid)/PTMC (polytrimethylene carbonate) and PLA/PTMC-calcium phosphate $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ composite porous scaffolds prepared by 3D

[收稿日期] 2023-12-26

[基金项目] 吉林省科技厅科技发展计划项目(20210204113YY)

[作者简介] 刘鑫钢(1998-), 男, 山东省临沂市人, 在读硕士研究生, 主要从事骨缺损修复材料方面的研究。

[通信作者] 邵国喜, 副教授, 主任医师, 硕士研究生导师(E-mail: sgx@jlu.edu.cn)

printing technology on bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) of the rabbits, and to clarify their application values in bone defect repairment. **Methods:** After mixing the materials, PLA/PTMC and PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ filaments were prepared by desktop filament extruder. The scaffolds were designed by CATIA V5-6R2019 modeling software and fabricated using CreatBot F430 3D printer. The chemical structure of the PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ scaffold was detected by infrared spectroscopy. *In vitro* degradation experiments were used to detect the degradation weight loss rates and pH values of the two scaffolds. A contact angle measuring instrument was used to detect the hydrophilicities of the two scaffolds. The BMSCs were extracted from three newborn New Zealand white rabbits (2–5-day-old); CCK-8 method was used to detect the proliferation activities of the cells co-cultured with two scaffolds, and Alizarin red staining was used to observe the osteogenic differentiation of the cells co-cultured with two scaffolds. **Results:** Infrared spectroscopy confirmed the successful preparation of composite scaffolds containing PLA, PTMC, and $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. During degradation for 6–14 weeks, compared with PLA/PTMC scaffold, the degradation rates of the PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ scaffold in lipase solution and phosphate-buffered saline (PBS) were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). During degradation for 8–14 weeks, compared with PLA/PTMC scaffold, the pH value of the PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ scaffold in lipase solution was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with PLA/PTMC scaffold, the contact angle of the PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ scaffold was significantly decreased ($P < 0.01$). On days 5 and 7 of cell co-culture, compared with PLA/PTMC scaffold, the proliferation activity of the cells co-cultured with PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ scaffold was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After 21 d of co-culture, both scaffolds overlapped with BMSCs and locally formed calcified nodules, which were stained orange by Alizarin red. Compared with PLA/PTMC scaffold, the number of mineralized calcium nodules in the cells co-cultured with PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ scaffold was increased, with greater density and deeper color. **Conclusion:** The PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ composite porous scaffolds containing PLA, PTMC, and $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ are successfully prepared by 3D printing technology. These scaffolds exhibit good degradation properties and show advantages in biocompatibility, hydrophilicity, and osteogenic induction; they are excellent materials for the bone defect repairment.

KEYWORDS Bone defect; Bone regeneration; 3D printing; Polylactic acid; Polytrimethylene carbonate

骨缺损多由高能量损伤,如车祸和高空坠落等引起,因治疗周期长、疗效欠佳且花费巨大,给患者造成巨大痛苦和经济压力,也是临床可能面对的难题。自体骨移植具有植骨区吸收且供区骨量不足的缺点,同时存在供区受创、疼痛、感染、感觉异常和神经功能受损等弊端^[1-3]。异体骨移植可提供的骨量较大,但经灭活后仍然存在免疫排斥的可能,目前应用较多的磷酸钙骨水泥虽具有良好的生物相容性且有利于促进成骨,但骨水泥内部缺乏孔隙结构,不利于骨组织长入。传统制备骨缺损支架的方法存在气泡大小与支架孔隙之间的连接难控制和材料力学性能差等缺点,而3D打印技术在一定程度上克服了这一系列问题,使得精确调控骨缺损修复材料的孔隙成为可能^[4-5]。聚乳酸(poly lactic acid, PLA)是以有机酸乳酸为原料聚合并通过酯键连接的新型聚酯材料,可以在自然环境中被完全

分解为 CO_2 和水,具有优异的生物降解性能和良好的力学性能^[6]。目前PLA已经成为生物医药制造领域中重要的高分子材料,可提高药物效果,促进组织修复和辅助医学缝合^[7]。聚三亚甲基碳酸酯(poly trimethylene carbonate, PTMC)是一种质地柔韧且生物相容性良好的聚合物,可以在体内通过表面侵蚀作用降解,而不会形成酸性化合物,因此可以避免因材料周围pH值过低导致的自动加速降解,并且可避免材料周围产生无菌性炎症,且具有良好的可塑性,已被应用于外科手术和组织工程等医疗领域^[8-9]。磷酸钙是骨骼的重要组成元素,与机体具有良好的生物相容性,被证实具有成骨诱导活性,可作为很好的人工骨支架材料^[10-12]。研究^[13-15]显示:PLA-PTMC聚合物具有良好的降解性能,使用负载神经胶质细胞生长因子PLA-PTMC导管对大鼠脊髓损伤修复有良好的神经再生效果。PLA-

PTMC共混膜可以防止术后粘连, PLA-PTMC共混物除对止血具有积极作用和无致敏原性^[16], 还可以作为医用胶粘剂有效预防感染^[17]。目前研究^[10-17]大多以PLA、PTMC和磷酸三钙[Ca₃(PO₄)₂]中的1种或2种作为研究对象, 尚缺乏骨缺损修复应用方面的研究。本研究以PLA和PTMC为基础材料, 采用3D打印技术制备PLA/PTMC和PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂多孔支架, 评价其降解性能、力学性能和力学强度等指标, 并开展体外实验检测支架相关生物性能, 为3D打印PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂复合多孔支架体内研究和临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器

新西兰白色乳兔3只, 2~5 d龄, 雌雄不限, 由吉林大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK-(吉)2008-0005。PLA和PTMC(山东济南岱罡生物科技有限公司), β-Ca₃(PO₄)₂(昆山华侨科技新材料有限公司), 1, 4-二恶烷(上海阿拉丁生化科技股份有限公司), CCK-8试剂盒(BA00208, 北京博奥森生物技术有限公司), 成骨细胞矿化结节染色试剂盒茜素红(C0148S, 上海碧云天生物技术有限公司), DMEM低糖培养基(C11885500BT, 美国赛默飞公司)。桌面挤丝机(型号: Wellzoom-E, 深圳米斯达科技有限公司), 3D打印机(型号: CreatBot F430, 河南速维电子科技有限公司), 标准型角接触测量仪(型号: SDC100, 东莞鼎盛精密仪器有限公司), 傅里叶变换红外光谱仪(型号: Nicolet 6700, 无锡哈斯德瑞科技有限公司)。

1.2 PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂复合多孔支架的制备

将PTMC剪成碎片, 与PLA颗粒按照质量比1:1混合后, 将混合颗粒溶解于1, 4-二恶烷(W/V=1 g·10 mL⁻¹)中, 用40℃恒温磁性搅拌器磁搅拌2 h, 分成2份备用。取50%PLA质量的β-Ca₃(PO₄)₂粉末, 加入1份PLA-PTMC/1, 4-二恶烷溶液中, 搅拌至完全混合。采用40℃超声波清洗机超声分散溶液30 min, 将PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂/1, 4-二恶烷溶液磁力搅拌15 min, 倒入不锈钢托盘, 并置于通风柜中蒸发溶剂。干燥后的薄膜被切成约3 mm×3 mm的碎块, 置于电热恒温干燥箱中干燥24 h。将脱水的碎块送入桌面挤丝机料斗中分别生产PLA/PTMC和PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂丝线。设置预热段温度保持于180℃, 挤压段温度设置为175℃。弃去头部浑浊的线材, 经过水冷设备冷却

得到透明的PLA/PTMC混合材料, 最终制作出适合FDM打印机的直径为(1.75±0.10) mm的线材。使用CATIA V5-6R2019软件建模, 数据模型保存为STL文件。将STL文件导入CreatWare V7.0.2切片软件, 设计合适的打印路径, 对设计的支架模型进行分层切片, 并导出Gcode文件, 将Gcode导入CreatBot F430 3D打印机进行支架制作。主要打印参数为: 层高0.20 mm, 打印速度20 mm·s⁻¹, 喷头温度210℃, 热床温度55℃, 填充密度20%。打印支架分别标记PLA/PTMC和PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂, 各制备100个支架留存备用。

1.3 红外光谱检测PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架化学结构

将PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架加入溴化钾研磨, 混合均匀后压片, 在4 cm⁻¹的分辨率下, 于4 000 cm⁻¹~400 cm⁻¹的范围进行32次扫描, 以获取PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架的傅里叶红外光谱图, 进一步分析其内部化学结构。

1.4 体外降解实验检测2种支架降解失重率和pH值

另取PLA/PTMC和PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架各18个, 平均分成6组, 每组3个, 分别测量每组PLA/PTMC和PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架的初始质量, 取平均值(m₀)。将PLA/PTMC和PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架各取3组浸于磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中, 另各取3组浸于脂肪酶溶液中, 密封后置于37.5℃的空气振动浴中, 每天震动8 h, 于第2、4、6、8、10、12和14周取出支架, 测量脂肪酶溶液的pH值并更换相同容量的PBS缓冲液, 用蒸馏水充分冲洗支架, 滤纸吸干表面水分, 放入37℃干燥箱中干燥至质量恒定, 分别测量每组质量, 计算平均值(m_r)和降解样品的降解失重率, 降解液的pH值取每种材料的3组溶液平均值。降解失重率=(m₀-m_r)/m₀×100%。

1.5 角接触测量仪检测2种支架亲水性

亲水性是评估骨缺损修复材料的重要部分。将待测的PLA/PTMC和PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架各3个分别放置于角接触测量仪升降台上, 调整针管液体量和升降台高度, 控制微量注射器分别将蒸馏水滴于PLA/PTMC和PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架表面, 调整样品与液体接触的位置使其与测量基线重合, 拍照获得静态照片, 采用θ/2法计算各组支架的接触角, 以接触角代表支架的亲水性。

1.6 实验动物处理和细胞培养

将3只出生2~5 d

的白色新西兰乳兔麻醉处死后消毒,于无菌操作台上使用消毒的手术工具取乳兔四肢长管状骨,用针管沿长轴穿刺后,应用加入抗生素的生理盐水吹打出骨髓液,梯度离心法处理后加入少许红细胞裂解液,获得包含造血干细胞和间充质干细胞等在内的骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells, BM-MNCs)的细胞群。将细胞群转移至预先加入5 mL DMEM完全低糖培养基的T25培养瓶中,移入CO₂培养箱培养。在进行传代扩增时,弃去原培养基,并加入1 mL胰蛋白酶消化液,将培养箱置于培养室中消化1 min。显微镜下观察,贴壁细胞呈现回缩、变圆和脱落的特征。加入5 mL培养基以终止消化,经过离心和去除上清液后,将细胞重新悬浮,并转移至新的培养瓶中。每3 d更换完全低糖培养基,经过4次传代后获得较为纯净的骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs),以供后续实验使用。

1.7 细胞接种 将打印好的支架采用环氧乙烷灭菌法处理,放置于无菌操作台上,紫外线辐照灭菌30 min,用无菌镊放入48孔细胞培养板中,加入0.2 mL培养基孵育10 min,将第4代BMSCs以每孔 3×10^4 个细胞的密度接种于细胞培养孔板上,每孔完全培养基补至0.4 mL。

1.8 CCK-8法检测2种支架共培养细胞增殖活性

在细胞支架复合体中,分别于细胞培养第1、3、5和7天采用CCK-8试剂盒检测2种支架中细胞增殖活性。将BMSCs培养基与CCK-8试剂按照9:1的体积比混合。洗净48孔细胞培养板中原细胞培养基,每孔加入400 μ L混合液。置于细胞培养箱中孵育2 h后,每孔中吸取100 μ L混合液加入96孔细胞培养板中,每组设置3个复孔,于波长450 nm处测定吸光度(A)值,以A值代表细胞增殖活性。

1.9 茜素红染色观察2种支架共培养细胞成骨分化情况

将PLA/PTMC支架和PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架分别与BMSCs共培养21 d后,吸净培养基,PBS缓冲液冲洗后,95%乙醇溶液固定15 min,再用PBS缓冲液洗涤3次,加入适量的茜素红染色液,覆盖支架后室温染色30 min,蒸馏水充分洗涤,用镊子轻轻取出支架,正置体视显微镜下观察细胞或骨分化情况并拍照。

1.10 统计学分析 采用SPSS 26.0统计软件进行统计学分析,GraphPad Prism 10软件绘制图像。2种支架降解失重率、pH值、接触角度数和细胞增殖

活性均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组支架降解失重率、接触角度数和细胞增殖活性比较采用两独立样本t检验,pH值比较采用双因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架化学结构

PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架的红外光谱图显示:远红外处出现的振动峰主要归属于样品中的有机物,其中在2 923 cm⁻¹、2 851 cm⁻¹、1 391 cm⁻¹和1 353 cm⁻¹的峰主要归属于PTMC和PLA中CH₂反对称伸缩振动和对称伸缩振动及C-H弯曲振动/羧酸根COO⁻对称伸缩振动,而在2 383 cm⁻¹和1 592 cm⁻¹位置处出现的信号归属于PTMC中CO₂反对称伸缩振动和C-O键的振动。同时,在506 cm⁻¹出现的峰归属于PLA中羧酸根(COO⁻)面外摇摆振动。此外,在近红外出现的其他峰主要归属于无机物Ca₃(PO₄)₂中PO₄³⁻的振动,峰主要出现在1 121 cm⁻¹、1 062 cm⁻¹、910 cm⁻¹、565 cm⁻¹和471 cm⁻¹归属于PO₄³⁻的P=O伸缩振动、PO₄³⁻的PO₄反对称伸缩振动、PO₄³⁻中P-(OH)³的对称振动、PO₄³⁻的PO₄不对称变角振动和PO₄³⁻的PO₄对称变角振动。红外光谱检测证实成功制备出含有PLA、PTMC和 β -Ca₃(PO₄)₂3种物质的复合支架。见图1。

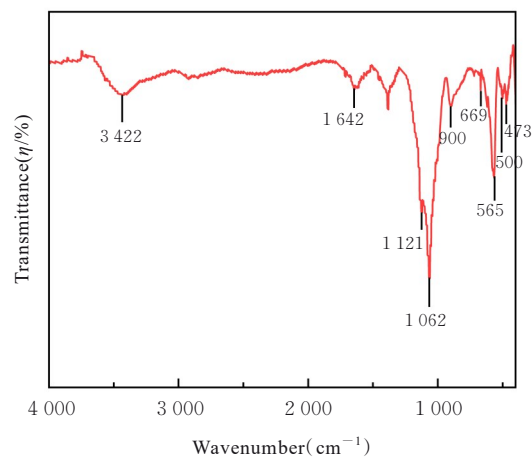


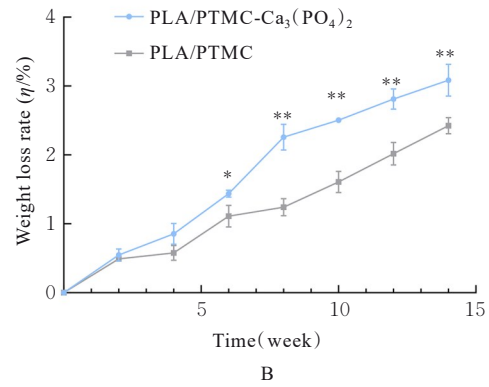
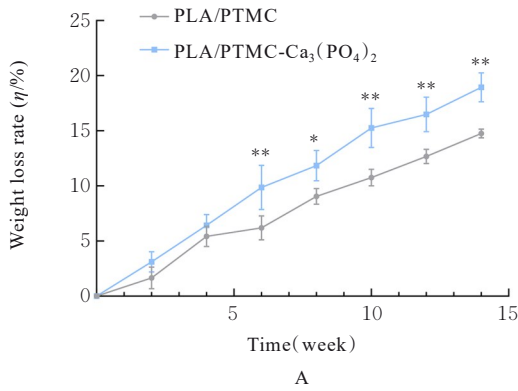
图1 PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂红外光谱图

Fig. 1 Infrared spectrum of PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂

2.2 2种支架降解情况 降解实验持续14周,2种支架在PBS和脂肪酶中的降解失重率均较为平稳,且在PBS缓冲液中的降解失重率较脂肪酶溶液中更低。降解6~14周,与PLA/PTMC支架比较,

PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 支架在脂肪酶溶液和PBS缓冲液中的降解失重率均明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。降解8~14周, 与PLA/PTMC支架比

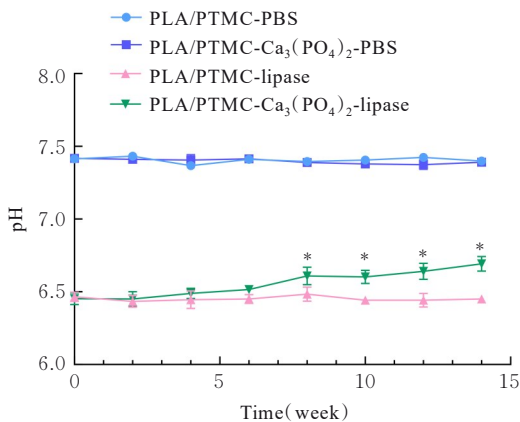
较, PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 支架在脂肪酶溶液中的pH值明显升高 ($P<0.01$)。见图2和3。



A: Lipase solution; B: PBS. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with PLA/PTMC scaffold.

图2 降解过程中2种支架在脂肪酶溶液(A)和PBS缓冲液(B)中的降解失重率

Fig. 2 Weight loss rates of two scaffolds in lipase solution(A) and PBS(B) during degradation process



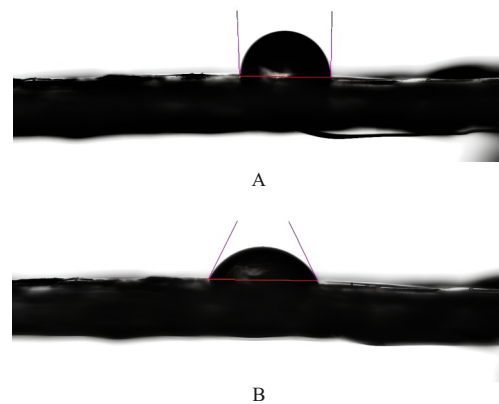
* $P<0.01$ compared with PLA/PTMC scaffold.

图3 降解过程中2种支架在脂肪酶溶液和PBS缓冲液中的pH值

Fig. 3 pH values of two scaffolds in lipase solution and PBS during degradation process

2.3 2种支架亲水性 与PLA/PTMC支架 ($91.6^\circ \pm 0.2^\circ$) 比较, PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 支架接触角 ($63.5^\circ \pm 0.3^\circ$) 明显减小 ($P<0.01$), 提示与PLA/PTMC支架比较, PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 支架表现出明显的亲水性。见图4。

2.4 2种支架共培养细胞的增殖活性 随着共培养时间的延长, 2种支架共培养细胞均有不同程度的增殖, 细胞共培养3d后细胞增殖较明显。细胞共培养第1和3天时, 2种支架共培养细胞增殖活性差异无统计学意义 ($P>0.05$); 细胞共培养第5和



A: PLA/PTMC scaffold; B: PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ scaffold.

图4 2种支架的接触角

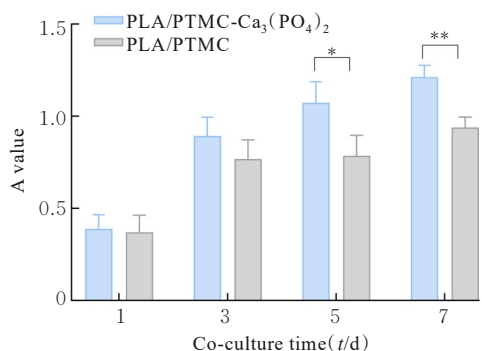
Fig. 4 Contact angles of two scaffolds

7天时, 与PLA/PTMC支架比较, PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 支架共培养细胞增殖活性均明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见图5。

2.5 2种支架共培养细胞成骨分化情况 共培养21d后, 2种支架与BMSCs重叠生长, 局部均形成钙化结节, 茜素红将其局部染成橘红色, 提示与2种支架共培养的细胞均向骨细胞分化。与PLA/PTMC支架比较, PLA/PTMC- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 支架共培养细胞矿化钙结节数量增多, 密度增大, 颜色加深。见图6。

3 讨论

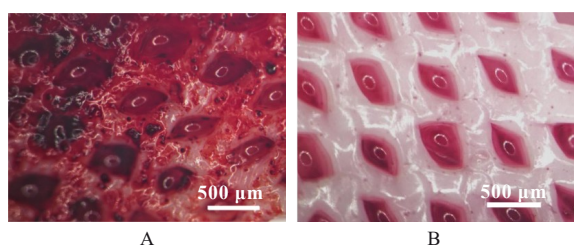
近年来3D打印技术在医疗卫生领域蓬勃发展,



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with PLA/PTMC scaffold.

图5 共培养不同时间2种支架细胞增殖活性

Fig. 5 Proliferation activities of cells of two scaffolds after co-cultured for different time



A: PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂ scaffold; B: PLA/PTMC scaffold.

图6 茜素红染色观察2组支架与BMSCs共培养后细胞成骨分化情况

Fig. 6 Osteogenesis of cells after two scaffolds co-cultured with BMSCs detected by Alizarin red staining

具有可个性化定制和能实现多种材料混合等特点,已经应用于颅骨修复、人工关节假体定制及医学模型制作等领域^[18]。利用3D打印技术,临床医生基于影像数据精确打印出个性化的骨骼结构,为手术提供精准的三维规划。3D打印技术制造的个性化骨科植入物具备高度精准性,有效提升了手术的成功率并缩短了患者康复期。在骨缺损的治疗方面,由于其具有可精确调节孔隙率、孔隙模式和孔隙大小,且制作流程固定及可重复性的优点,相较于传统骨缺损治疗方法也展现出独特的优势^[19-22]。

本研究结果显示:PLA、PTMC和 β -Ca₃(PO₄)₂被成功负载,PLA/PTMC支架和PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架在PBS缓冲液中总体呈现惰性,质量变化较小,但二者在脂肪酶溶液中明显失重,提示脂肪酶参与了2种支架的降解反应。脂肪酶可以作用于酯键,加速共聚物分子链的断裂,导致共聚物的分子量降低。同时,脂肪酶具有表面活性作用,能够与降解产物充分接触并将其分散于液体中,促进PTMC的表面侵蚀作用^[23-24]。 β -Ca₃(PO₄)₂

材料与人体骨骼的成分较为相似,在降解过程中可以释放成骨所必需的钙离子和磷酸根离子,具有良好的促成骨特性,同时由于其良好的生物相容性和安全性、易于灭菌及保质期较长的特性, β -Ca₃(PO₄)₂材料可以作为较好的骨缺损修复材料^[25]。本研究结果显示:与PLA/PTMC支架比较,PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架在脂肪酶溶液中pH值明显升高。PLA在中性溶液中降解缓慢,PTMC在降解过程中不会释放对溶液pH值有显著影响的酸性物质,可能是由于PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂微粒在弱酸性溶液中与氢离子发生反应,导致溶液pH值升高。2种支架在降解过程中释放的物质对溶液pH值的影响有限,理论上可以避免材料附近因pH值降低所致的无菌性炎症发生。未来可以通过增加PTMC单体的密度和各部分比例进一步调控降解速率,使其更符合临床需要^[7]。

成骨细胞对接触角变化敏感,其在水接触角为64°的中等亲水性表面黏附效果更好^[26]。PLA/PTMC支架接触角为91.6°±0.2°,而PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架的接触角为63.5°±0.3°,更接近于64°。与PLA/PTMC支架比较, β -Ca₃(PO₄)₂增加了材料的亲水性,使支架更有利于成骨细胞黏附和骨组织长入。

本研究结果显示:细胞共培养第5和7天时,与PLA/PTMC支架比较,PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架细胞增殖活性均明显升高,可能是由于负载 β -Ca₃(PO₄)₂颗粒的支架表面较为粗糙。与表面光滑和结构致密的支架比较,具有适当润湿性和多孔表面结构的支架有利于细胞附着和细胞浸润^[27]。成骨分化实验结果显示:与PLA/PTMC支架比较,PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架矿化钙结节数量更多,密度更大,颜色加深,提示PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架在促进BMSCs向骨细胞分化方面具有更好的效果,较PLA/PTMC支架的促成骨能力明显增加。提示PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂支架释放的钙离子可能有助于骨组织的形成,提高了支架的成骨诱导活性^[10-11]。

本研究通过3D打印技术成功制备了PLA/PTMC-Ca₃(PO₄)₂复合多孔支架,充分发挥了各材料的优势,展现了良好的生物相容性、细胞黏附性和促成骨性能,证实该支架具有潜在的应用前景,是一种性能优良的骨缺损修复材料。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

刘鑫钢参与文献检索、实验设计和操作及论文撰写, 陈旭、刘亚东和苗锦虎参与数据收集及分析讨论, 邵国喜参与论文写作指导和审校。

[参考文献]

- [1] 万东东, 胡茂忠, 许东浩. 髂骨取骨术后并发症的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2016, 24(12): 1096-1100.
- [2] KURODA S, KATAYAMA A, TAKANO-YAMAMOTO T. Severe anterior open-bite case treated using titanium screw anchorage [J]. Angle Orthod, 2004, 74(4): 558-567.
- [3] VAN DE WALL B J M, BEERES F J P, ROMPEN I F, et al. RIA versus iliac crest bone graft harvesting: a meta-analysis and systematic review[J]. Injury, 2022, 53(2): 286-293.
- [4] WU C T, LUO Y X, CUNIBERTI G, et al. Three-dimensional printing of hierarchical and tough mesoporous bioactive glass scaffolds with a controllable pore architecture, excellent mechanical strength and mineralization ability [J]. Acta Biomater, 2011, 7(6): 2644-2650.
- [5] 张震, 徐云莹, 李开南. 3D打印技术下磷酸三钙人工骨研究进展 [J]. 国外医药 (抗生素分册), 2022, 43(2): 80-6.
- [6] PLATEL R, HODGSON L, WILLIAMS C. Biocompatible initiators for lactide polymerization [J]. Polymer Revs, 2008, 48(1): 11-63.
- [7] 李淑慧, 杨树荣, 徐栋. 生物可降解材料聚乳酸的制备及应用[J]. 化工管理, 2023(5): 69-71.
- [8] RONGEN J J, VAN BOCHOVE B, HANNINK G, et al. Degradation behavior of, and tissue response to photo-crosslinked poly (trimethylene carbonate) networks [J]. J Biomed Mater Res A, 2016, 104(11): 2823-2832.
- [9] 王茜. 金属-酚表面化学应用于可降解聚三甲基碳酸酯改性构建一氧化氮催化释放涂层[D]. 成都: 西南交通大学, 2021.
- [10] 卢陈佩, 王旭东, 沈国芳. 生物陶瓷在骨组织工程中的应用进展[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(22): 3576-3582.
- [11] DOROZHKIN S V. Biphasic, triphasic and Multiphasic calcium orthophosphates [J]. Acta Biomater, 2012, 8(3): 963-977.
- [12] 段钢, 陈宏亮, 郭开今, 等. 3D打印β-磷酸三钙仿生骨支架修复兔股骨髁骨缺损[J]. 骨科临床与研究杂志, 2020, 5(4): 243-250.
- [13] 刘钦毅, 程兆华, 邵国喜, 等. 聚乳酸-聚三甲基碳酸酯/GDNF 导管对大鼠脊髓损伤区 GAP-43蛋白表达的影响[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(8): 1219-1221.
- [14] 邵国喜, 焦晶雪, 刘钦毅, 等. 聚乳酸-聚三甲基碳酸酯/GDNF导管对大鼠脊髓损伤区GAP-43 mRNA表达的影响[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(2): 198-201.
- [15] 裴香玲, 余四九, 岳海宁. 生物可降解聚合物聚乳酸-聚三甲基碳酸酯的体内外降解和释药试验研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2007, 42(5): 39-42.
- [16] QIN Y Y, YUAN M L, LI L, et al. Use of polylactic acid/polytrimethylene carbonate blends membrane to prevent postoperative adhesions [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2006, 79(2): 312-319.
- [17] ZHANG S, LI H L, YUAN M W, et al. Poly (lactic acid) blends with poly (trimethylene carbonate) as biodegradable medical adhesive material [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(10): 2041.
- [18] WILLSON K, ATALA A. Medical 3D printing: tools and techniques, today and tomorrow [J]. Annu Rev Chem Biomol Eng, 2022, 13: 481-499.
- [19] 徐延, 于晴, 房睿, 等. 微弧氧化涂层促进3D打印个性化钛种植体骨愈合的体内实验研究[J]. 中国医科大学学报, 2023, 52(10): 950-954.
- [20] 蔡兴博, 董艳, 王斌, 等. 金属基3D打印支架的构建与功能化研究进展[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2022, 19(6): 82-87.
- [21] GRAYSON W L, FRÖHLICH M, YEAGER K, et al. Engineering anatomically shaped human bone grafts [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(8): 3299-3304.
- [22] 妥文婷, 张健, 王艳颖. 3D打印个性化钛网在口腔种植骨增量中的研究进展[J]. 口腔颌面修复学杂志, 2023, 24(6): 455-459.
- [23] ZHANG Z, KUIJER R, BULSTRA S K, et al. The *in vivo* and *in vitro* degradation behavior of poly (trimethylene carbonate) [J]. Biomaterials, 2006, 27(9): 1741-1748.
- [24] 张大平, 段晓冉, 薄亚聪, 等. 铁代谢标志物与血脂水平的关系: 基于中国健康与营养调查的横断面研究[J]. 郑州大学学报(医学版), 2023, 58(2): 158-162.
- [25] GAO P, ZHANG H Q, LIU Y, et al. Beta-tricalcium phosphate granules improve osteogenesis *in vitro* and establish innovative osteo-regenerators for bone tissue engineering *in vivo* [J]. Sci Rep, 2016, 6: 23367.
- [26] ARDHAOU M, NACIRI M, MULLEN T, et al. Evaluation of cell behaviour on atmospheric plasma deposited siloxane and fluorosiloxane coatings [J]. J Adhes Sci Technol, 2010, 24(5): 889-903.
- [27] LIU Y, LUO D, WANG T. Hierarchical structures of bone and bioinspired bone tissue engineering [J]. Small, 2016, 12(34): 4611-4632.