

天冬氨酸修饰纳米羟基磷灰石/聚乳酸复合物制备软骨组织工程支架及其生物性能研究

黄术, 吴江怡, 杨君君, 周益昭, 刘宝荣, 夏铎, 刘仁峰
湖南师范大学第一附属医院(湖南省人民医院)骨科医学中心, 湖南长沙 410005

【摘要】目的:通过天冬氨酸修饰的纳米羟基磷灰石(Asp-nHA)和左旋聚乳酸(PLLA)复合,制备软骨组织工程支架,并进行体外实验研究,探索其作为软骨组织工程支架的可行性。**方法:**以碳二亚胺盐酸盐/N-羧基琥珀酰亚胺偶联法制备Asp-nHA,并与PLLA复合,获得新型Asp-nHA/PLLA纳米复合支架。比较成骨细胞在该新型材料表面的粘附、生长和增殖的情况。**结果:**加入nHA后,Asp-nHA/PLLA复合材料可显著增强细胞的粘附、生长、增殖;Asp-nHA/PLLA的生物性能明显优于PLLA及HA/PLLA,且Asp-nHA/PLLA具有最强的体外诱导成骨细胞分化能力。**结论:**Asp-nHA/PLLA制备简单,具有良好的生物相容性和成骨活性,是一种性能良好的骨组织工程支架材料。

【关键词】纳米羟基磷灰石;左旋聚乳酸;天冬氨酸;复合材料;生物相容性

【中图分类号】R318

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2018)05-0616-05

Preparation of bone tissue engineering scaffold with aspartic acid-modified nano-hydroxyapatite/poly L-lactic acid and its bio-characterizations

HUANG Shu, WU Jiangyi, YANG Junjun, ZHOU Yizhao, LIU Baorong, XIA Duo, LIU Renfeng

Department of Orthopedics, Hunan Provincial People's Hospital (the First Affiliated Hospital of Hunan Normal University), Changsha 410005, China

Abstract: Objective To design and prepare surface modified cartilage tissue scaffolds with the use of aspartic acid-modified nano-hydroxyapatite (Asp-nHA) and poly L-lactic acid (PLLA), and evaluate its feasibility as a scaffold for cartilage tissue engineering through *in vitro* experiment. **Methods** Asp-nHA was synthesized with the standard EDC/NHS coupling method, and the resultant Asp-nHA was conjugated to PLLA to form Asp-nHA/PLLA composite scaffold. The osteoblast adhesion, expansion and proliferation on Asp-nHA/PLLA composite scaffold were evaluated. **Results** Osteoblast adhesion, expansion and proliferation on Asp-nHA/PLLA composite scaffold were significantly increased due to the addition of nHA. The *in vitro* analysis illustrated that Asp-nHA/PLLA composite was superior to PLLA and HA/PLLA in bio-characterizations and had the strongest ability to induce osteogenic differentiation *in vitro*. **Conclusion** Asp-nHA/PLLA is simple to be prepared and its good biocompatibility and osteogenic activity make it become a good kind of scaffold for cartilage tissue engineering.

Keywords: nano-hydroxyapatite; poly L-lactic acid; aspartic acid; composite; biocompatibility

【收稿日期】2017-11-14

【基金项目】长沙市科技计划项目基础研究项目(kq1701058);重庆市博士后科研项目特别资助项目(Xm2016052);湖南师范大学临床医学院仁术科研发基金资助项目(2015-15);湖南省科技厅社会发展支撑计划项目(2015SK20471)

【作者简介】黄术,博士,主治医师,研究方向:膝关节镜微创治疗、髌、膝人工关节置换,膝关节运动损伤基础及临床研究, E-mail: 9258024@qq.com

【通信作者】刘宝荣,教授,主任医师,研究方向:髌膝关节置换术、关节镜微创技术及肩关节外科等各类骨科疾病的治疗, E-mail: lbr9391@163.com

前言

羟基磷灰石(HA)是人体硬组织的主要无机成分,如骨骼和牙齿等,为组织结构提供良好刚性。人工合成的纳米级羟基磷灰石(nHA)具有良好的生物传导性能与生物相容性,埋入骨组织内可直接与骨结合,且易吸收、可被骨替代,因而在骨组织工程领域得到深入的研究和应用^[1-3]。然而,nHA脆度大、柔韧性差,为此,有研究者将nHA与高分子聚合物材料复合,从而改善nHA的柔韧性,获得具有良好力学性能和传导性能的纳米复合材料^[4-8]。

左旋聚乳酸(PLLA)是美国FDA批准可应用于临床的可降解高分子材料,是以乳酸为单体聚合形成的直链型脂肪族聚酯。PLLA以其优良的力学性能、生物相容性、生物可降解性等,广泛应用于药物缓释、新型药物载体研制、组织修复工程等领域^[9-12]。例如,将PLLA与nHA复合,可将PLLA的生物相容性及柔韧性与nHA的成骨性能结合,获得性能优异的可用于组织工程的复合材料。然而,nHA的分散性及与PLLA的界面相容性差,易聚集,增加了该复合材料的制备难度。

有研究证实,通过在nHA表面修饰有机高分子材料,可有效改善其与聚合物的界面相容性,有利于其与聚合物材料的复合^[13-15]。为此,本研究通过对nHA表面修饰天冬氨酸构建Asp-nHA,根本上改变nHA的亲水性,并改善nHA与PLLA的界面相容性,提高二者的相互作用,实现nHA在聚乳酸材料中的均匀分散,制备Asp-nHA/PLLA复合材料,为其应用于骨组织工程提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

PLLA、天冬氨酸(山东岱罡生物材料有限公司);磷酸氢二铵、硝酸钙、氨水、KH-550、L-谷氨酸、苯甲醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、石油醚(北京化工厂);DMEM培养液、胎牛血清、胰蛋白酶、青链霉素(美国Hyclone公司);FITC(异硫氰酸荧光素,Sigma公司);噻唑蓝(MTT)、细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(美国Gibco公司);流式细胞检测试剂盒(美国Sigma公司)。CO₂培养箱(德国SANYO公司),超净工作台(苏州净化设备厂),荧光倒置显微镜(Nikon公司)。

1.2 Asp-nHA的合成与表征

依据参考文献^[15]合成nHA,产物以冷冻干燥法纯化,并进一步氨基化,用于天冬氨酸的键合,具体过程如下:磁力搅拌下,将乙醇(90 mL)、水(10 mL)及 γ -氨丙基三乙氧基硅烷混合,进一步搅拌30 min。室温下,nHA(1 g)加入至混合溶剂中,超声使分散。室温反应3 h后,加入氨水调节pH值至10,继续反应3 h,过滤后收集产物沉淀,晾干后于130℃烘箱中完全干燥。乙醇对干燥物进一步洗涤5次,除去nHA中的残余硅烷偶联剂,真空干燥,获得表面含有氨基的HA。

以碳二亚胺盐酸盐(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)交联法将天冬氨酸通过其羧基末端键合于氨基修饰的HA,具体过程如下:取40 mg天冬氨酸,加入40 μ L 500

mmol/L MES缓冲液(pH 6.0)、40 μ L 25 mmol/L EDC、40 μ L 25 mmol/L NHS于35℃下反应过夜,即得活化酯Asp-NHS。加入1 g nHA室温反应12 h,冷冻干燥,得Asp-nHA。以傅里叶变换红外,X射线光电子能谱及扫描电镜对产物进行表征。

1.3 Asp-nHA/PLLA的制备与表征

以超声分散法将Asp-nHA分散于1,4-二氧六环中,分散均匀后加入PLLA,形成悬浊液,室温下继续搅拌至PLLA完全溶解。超声20 min后,将样品置入液氮中冷冻,在冷冻干燥机中进行冷冻干燥,即得介孔Asp-nHA/PLLA。以场发射扫描电镜观察孔隙结构和微观形貌。

1.4 成骨细胞接种于支架材料

取4代以内处于对数生长期的成骨细胞,胰蛋白酶消化后于1 000 rpm离心收集细胞,将细胞重悬于培养基中,调整浓度至 1×10^5 个/mL。取1 mL上述细胞置于6孔细胞培养板内,加入Asp-nHA/PLLA复合物,加入2 mL的培养液,于37℃、5% CO₂培养箱中分别培养24和48 h。

1.5 细胞活性测定

将Asp-nHA/PLLA复合物与成骨细胞混合培养于24孔板内,在24、48 h使用两种细胞(活/死)对细胞行双染,使用倒置荧光显微镜观察细胞活力。活细胞中钙绿黄素染色后在494 nm下呈现绿光荧光,通过观察该荧光强度,定性研究细胞活性。

1.6 细胞黏附及形态分析

将Asp-nHA/PLLA复合物与成骨细胞混合培养于24孔板内,分别培养24、48 h后,弃上清,PBS洗涤3次后,加入3%戊二醛溶液固定细胞,30 min后弃去戊二醛,加入FITC溶液对细胞染色。30 min后,移去剩余FITC,以倒置荧光显微镜观察细胞形态。

1.7 细胞形态和细胞增殖

将Asp-nHA/PLLA复合物放入96孔板内,加入DMEM培养基孵育过夜。吸出培养液后,加入50 μ L成骨细胞悬液(1×10^5 个),同时加入150 μ L新鲜培养液,于37℃、5% CO₂条件下培养。3 d换液一次,以PBS冲洗2次,除去未粘附的细胞。加入预先配制的MTT 80 μ L,同时加入400 μ L无血清培养液继续培养4 h后,弃上清并加入700 μ L DMSO,振荡12 min,取溶液150 μ L至96孔板中。吸光光度值以酶标仪在490 nm处测定。

扫描电镜及荧光显微镜观察间细胞形态。接种方法同上,上述细胞在Asp-nHA/PLLA复合物上培养7 d后,以2.5%戊二醛固定,扫描电镜及荧光显微镜观察。

1.8 统计学处理

实验结果均采用计量数据,用均数±标准差表示,均数间比较采用*t*检验和方差分析,所有数据均由SPSS 17.0统计软件分析数据。*P*>0.05表示差异无统计学意义。

2 结果

2.1 Asp-nHA 结构表征

以红外光谱法表征 Asp-nHA(图 1a)。nHA 在 1 034、960、604、565 cm^{-1} 均有 PO_4^{3-} 的振动吸收峰。与 nHA 相比,Asp-nHA 在 1 736 和 1 650 cm^{-1} 处出现两个吸收峰,表示酰胺键的和苯氧基团相连的羰基伸缩振动,从而证实 Asp 已成功连接于 nHA 上。

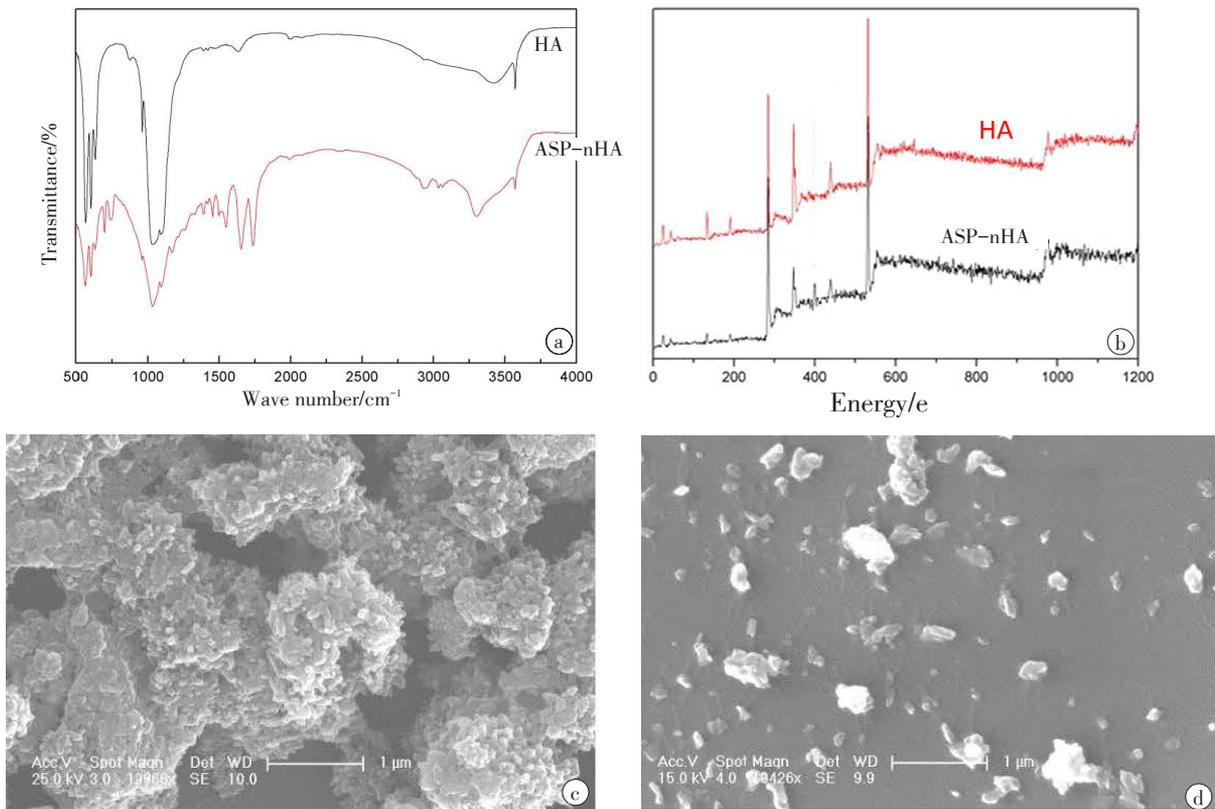


图1 HA与Asp-nHA的(a)傅里叶变换红外光谱图及(b)X射线光电子能谱;(c)nHA与(d)Asp-nHA的扫描电镜图

Fig.1 (a) Fourier transform infrared spectrogram and (b) X-ray photoelectron spectroscopy of HA and Asp-nHA; scanning electron micrographs of (c) nHA and (d) Asp-nHA

HA: Hydroxyapatite; nHA: Nano-hydroxyapatite; Asp-nHA: Aspartic acid-modified nano-hydroxyapatite

以X射线光电子能谱进一步对 Asp-nHA 进行表征(图 1a~b)。HA 结构中不含氮元素,而 Asp-nHA 的 XPS 谱中具有明显的氮元素峰,证实了 Asp 已成功地接枝在 nHA 表面。

以扫描电镜观察 Asp-nHA 的微观结构,以及 Asp 的改性对 nHA 的表面性质的影响。颗粒聚集成团(图 1c),而 Asp-nHA 成分成均匀分散状(图 1d),与单纯成分对比,其粒子未见明显聚集效应产生。以上结果证实,天冬氨酸的修饰可有效改善粒子的聚集特性。

2.2. 复合物材料的结构表征

以扫描电镜分别对 PLLA、nHA/PLLA 及 Asp-nHA/PLLA 进行表征(图 2)。结果表明,三者形态

上有不同,且都形成了孔隙均匀的多孔支架,约为 30~200 μm 。孔隙结构完整,且相互之间的孔壁较薄,孔隙之间串通小孔交错相连。相对而言,PLLA 材料的内壁比较光滑,而 Asp-nHA/PLLA 复合物内壁包含微孔和粗糙结构,确保在其内壁的无机微粒可有效暴露。其中,PLLA、nHA/PLLA 及 Asp-nHA/PLLA 的孔隙率分别为 $88\% \pm 3\%$, $86\% \pm 2\%$ 以及 $87\% \pm 3\%$ 。因此,在相同条件下,材料组成对孔隙率无显著影响。

2.3 成骨细胞在 nHA/PLLA 复合物中的生长

分别将成骨细胞接种于 PLLA、nHA/PLLA 及 Asp-nHA/PLLA 材料表面,持续培养 48 h 后,经 FITC

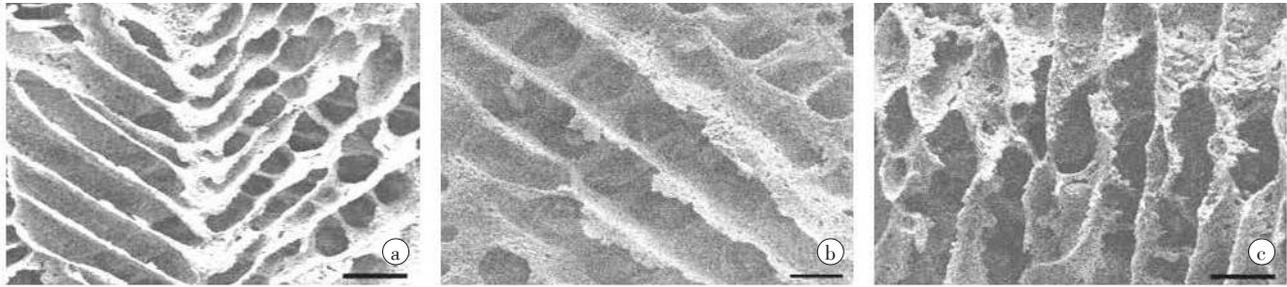


图2 扫描电镜法分别表征(a)PLLA、(b)nHA/PLLA及(c)Asp-nHA/PLLA的表面结构

Fig.2 Surface structure of (a) poly L-lactic acid (PLLA), (b) nHA/PLLA and (c) Asp-nHA /PLLA characterized with scanning electron microscopy

特殊染色 30 min, 使用倒置荧光显微镜观察表面细胞的粘附(图3)。结果表明, 细胞生长状态均较为良

好。Asp-nHA/PLLA 材料的表面成骨细胞数量明显高于 PLLA、nHA/PLLA 的表面成骨细胞数量。

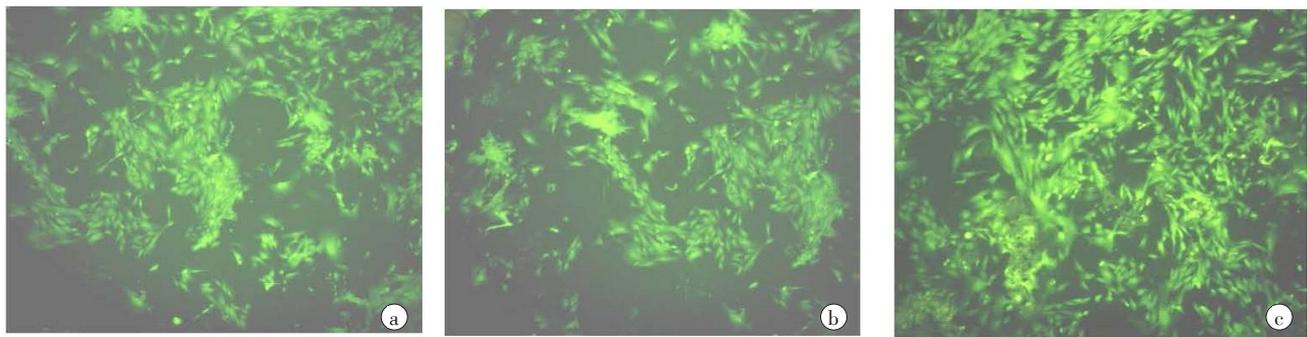


图3 成骨细胞在(a)PLLA、(b)nHA/PLLA及(c)Asp-nHA/PLLA材料的生长情况

Fig.3 Growth of osteoblasts on (a) PLLA, (b) nHA/PLLA and (c) Asp-nHA/PLLA materials

2.4 细胞增殖研究

以 CCK8 法检测测定成骨细胞在 PLLA、nHA/PLLA 及 Asp-nHA/PLLA 材料中的增殖活性(图4)。结果表明, 接种 1 d 后, 各实验组的细胞增殖无统计学差异; 随着孵育时间的延长, 在接种 3、7 d 后, 细胞在 Asp-nHA/PLLA 材料中的增殖数目明显多于 PLLA 及 nHA/PLLA 组, 证实 Asp-nHA/PLLA 能促进细胞的粘附和增殖($P < 0.05$)。

3 讨论

与 HA 比较, n-HA 具有良好的生物传导性能与生物相容性等。与此同时, n-HA 与聚合物材料具有更好的界面间相互作用, 且可增强复合材料的力学性能^[16-17]。然而, nHA 表面积大、表面自由能高, 导致其易于团聚, 使制备稳定的单分散纳米粒子成为困难。本研究对 nHA 进行多肽修饰, 以 EDC/NHS 偶联法制备 Asp-nHA, 根本上改变 nHA 的亲水性, 增强胶体稳定性。本研究进一步将合成的 Asp-nHA 与 PLLA 进行复合, 制备 Asp-nHA/PLLA, 方法操作简单, 可用于获得不同形貌的组织工程支架材料。

在体外水平研究骨细胞与材料的作用, 可在排

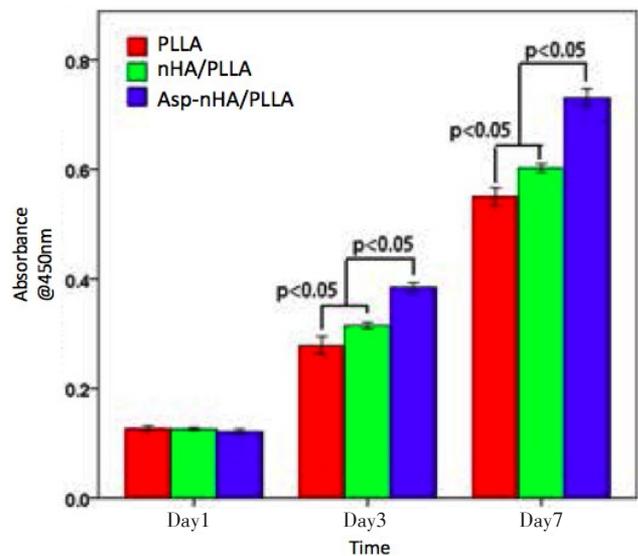


图4 CCK8 法检测测定成骨细胞在 PLLA、nHA/PLLA 及 Asp-nHA/PLLA 材料的增殖情况

Fig.4 Osteoblasts proliferation on PLLA, nHA/PLLA and Asp-nHA/PLLA detected by CCK8 method

除体内多种生物因素的影响下单纯专注研究其生物性能, 为下一阶段的体内研究提供预实验和理论基础。支架材料具备活性高、易相容及毒性低等特

点^[18-20],体现为易粘附、快速生长繁殖。体外水平研究表明可将细胞直接接种于材料其表面,观察生长与粘附情况,分析细胞与材料之间的相互影响作用,从而直观地表征材料的生物学性能。本研究结果表明,Asp-nHA/PLLA具有最高的细胞粘附效率,nHA/PLLA略高于PLLA,其原因是nHA可改善PLLA的疏水性,有利于细胞在材料上的粘附^[21-22]。

影响细胞粘附与分化的另一重要参数是材料表面的粗糙度。nHA通过形成三维多孔结构,可显著增加PLLA的表面粗糙程度,促进细胞的粘附、繁殖和分化。Asp-nHA均匀分散于PLLA基质,不仅提高了材料的机械性能,还增加了比表面积,有利于细胞粘附其上。本研究显示,细胞在PLLA材料中的增殖速度明显低于在Asp-nHA/PLLA和nHA/PLLA材料中,其中,Asp-nHA/PLLA材料的增殖效果最优。这一结果表明,Asp-nHA不仅利于成骨细胞的粘附与铺展,还具有显著的促增殖作用。本研究通过对Asp-nHA的系统性表征包括成骨活性和生物相容性,为该材料下一阶段体内实验和成批制备,以及最终临床应用提供了理论和预实验依据,证实了Asp-nHA/PLLA复合物材料具有良好的成骨性能,有望应用于骨组织工程。

【参考文献】

- [1] MCCONNELL D, FRAJOLA W J, DEAMER D W, et al. Relation between the inorganic chemistry and biochemistry of bone mineralization[J]. Science, 1961, 133(3448): 281-282.
- [2] HARTGERINK J D, BENIASH E, STUPP S I, et al. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers[J]. Science, 2001, 294(5547): 1684-1688.
- [3] LOO S, MOORE T, BANIK B, et al. Biomedical applications of hydroxyapatite nanoparticles[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2010, 11(4): 333-342.
- [4] 杜江华,李丹,韩凤兰,等.亚微米羟基磷灰石/聚乳酸复合材料的制备及形貌分析[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(29): 5395-5398.
DU J H, LI D, HAN F L, et al. Preparation and surface morphology analysis of submicron-hydroxyapatite/poly L-lactic acid composites [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010, 14(29): 5395-5398.
- [5] 陈磊,王大平,朱伟民,等. nHA-PLGA 支架材料与兔软骨细胞体外培养的生物相容性研究[J]. 国际骨科学杂志, 2013, 34(4): 283-286.
CHEN L, WANG D P, ZHU W M, et al. Biocompatibility of nHA/PLGA composite scaffolds with rabbit chondrocytes cultured *in vitro* [J]. International Journal of Orthopaedics, 2013, 34(4): 283-286.
- [6] LEE J B, LEE S H, YU S M, et al. PLGA scaffold incorporated with hydroxyapatite for cartilage regeneration[J]. Surf Coat Technol, 2008, 202(22-23): 5757-5761.
- [7] HAIMI S, SUURINIEMI N, HAAPARANTA A M, et al. Growth and osteogenic differentiation of adipose stem cells on PLA/bioactiveglass and PLA/beta-TCP scaffolds[J]. Tissue Eng A, 2009, 15(7): 1473-1480.
- [8] SCHNEIDER O D, WEBER F, BRUNNER T J, et al. *In vivo* and *in vitro* evaluation of flexible, cottonwool-like nanocomposites as bone substitutes material for complex defects[J]. Acta Biomater, 2009, 5(5): 1775-1784.
- [9] 黄术,杨君君,吴江怡,等.细胞骨架结构改变对软骨细胞表型的影响[J].中国医学物理学杂志,2017,34(12): 1287-1291.
HUANG S, YANG J J, WU J Y, et al. Effects of cytoskeleton changes on chondrocyte phenotype[J]. Chinese Journal of Medical Physics, 2017, 34(12): 1287-1291.
- [10] GUPTA A, KUMAR V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers-poly(lactide): a critique[J]. Eur Polym J, 2007, 43(10): 4053-4074.
- [11] WILDEMANN B, KANDZIORA F. Local and controlled release of growth factors (combination of IGF-I and TGF-beta I, and BMP-2 alone) from a poly(lactide) coating of titanium implants does not lead to ectopic bone formation in sheep muscle[J]. J Control Release, 2004, 95(2): 249-256.
- [12] CAI Q, YANG J A. A novel porous cells scaffold made of poly(lactide-dextran) blend by combining phase-separation and particle-leaching techniques[J]. Biomaterials, 2002, 23(23): 4483-4492.
- [13] PLACE E S, GEORGE J H, WILLIAMS C K, et al. Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering[J]. Chem Soc Rev, 2009, 38(4): 1139-1151.
- [14] KIM S, JANG J E, LEE J H, et al. Composite scaffold of micronized porcine cartilage/poly (lactic-co-glycolic acid) enhances anti-inflammatory effect[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2018, 88(7): 46-52.
- [15] JEEVITHA D, AMARNATH K. Chitosan/PLA nanoparticles as a novel carrier for the delivery of anthraquinone: synthesis, characterization and *in vitro* cytotoxicity evaluation[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2012, 101C(101C): 126.
- [16] SENGUPTA P, SURWASE S S, PRASAD B L, et al. Modification of porous polyethylene scaffolds for cell attachment and proliferation[J]. Int J Nanomedicine, 2018, 13(3): 87-90.
- [17] ZHANG P B, HONG Z K, YU T, et al. *In vivo* mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly (lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly (L-lactide) [J] . Biomaterials, 2009, 30(1): 58-70.
- [18] WEI J C, LIU A X, CHEN L, et al. The surface modification of hydroxyapatite nanoparticles by the ring opening polymerization of gamma-Benzyl-L- glutamate N-carboxyanhydride [J] . Macromol Biosci, 2009, 9(7): 631-638.
- [19] DUAN W, CHEN C, HAQUE M, et al. Polymer-mineral scaffold augments *in vivo* equine multipotent stromal cell osteogenesis[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 60.
- [20] BIGI A, BOANINI E, GAZZANO M, et al. Microstructural investigation of hydroxyapatite-polyelectrolyte composites[J]. J Mater Chem, 2004, 14(2): 274-279.
- [21] DOROZHKIN S V. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials[J]. J Mater Sci, 2009, 44(9): 2343-2387.
- [22] MIAO S, CASTRO N, NOWICKI M, et al. 4D printing of polymeric materials for tissue and organ regeneration[J]. Mater Today, 2017, 20(10): 577-591.

(编辑:谭斯允)