骨科学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000788

骨修复用左旋聚乳酸-β-磷酸三钙复合多孔支架的制备及性能研究

岑超德[1]，罗　聪[1]，张　鑫[2]，惠　慧[3]，毕　杨[3]，李　明[2]，李廷玉[4]，何通川[3]

（1. 重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所骨科生物材料实验室、儿科研究所干细胞实验室；
2. 重庆医科大学附属儿童医院骨科；3. 儿科研究所干细胞实验室；
4. 儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室，重庆 400014）

【摘　要】目的：通过调节左旋聚乳酸（Poly(L-lactic acid)，PLLA）/β-磷酸三钙（beta-tricalcium phosphate，β-TCP）复合多孔支架中 β-TCP 的比例，制备出一种可生物降解、具有一定强度及骨引导性、细胞相容性及生物相容性良好的支架。**方法**：采用溶剂自扩散-模压成型——盐沥滤、冷冻干燥法制备了 β-TCP 含量分别为 0、10%、20%、30%、40%、50%的 PLLA/β-TCP 复合多孔支架。用扫面电镜观测不同 β-TCP 含量的复合多孔支架的微观形貌，用量重法测量其孔隙率，用动静态疲劳试验机检测各组复合多孔支架的力学强度。各组复合多孔支架接种相同量的骨髓间充质干细胞培养 3 d 后固定，用扫描电镜观察多孔支架爬行细胞的数量以评价骨支架的细胞相容性。用各组骨支架浸提液培养骨髓间充质干细胞，分别于细胞培养第 1 天、第 3 天、第 5 天及第 7 天规定时间点用 CCK8 测试盒检测各组细胞的吸光度以评价骨支架的生物相容性。**结果**：纯左旋聚乳酸为疏水性材料，不利于细胞的粘附生长；PLLA/β-TCP 复合多孔支架表面粗糙，β-TCP 的引入可以改善支架材料的亲水性及骨引导性，有利于细胞的爬行生长，其中 β-TCP 含量为 30%(P/T30)组支架细胞接种面扫描电镜下观察细胞爬行生长的数量最多；β-TCP 的掺入可使复合支架的 X 线显影良好，可为支架植入体内降解的体外摄片评估提供方便；PLLA/β-TCP 复合支架具备良好的细胞相容性及生物相容性。**结论**：通过溶剂自扩散-模压成型--盐沥滤、冷冻干燥法制备的 PLLA/β-TCP 复合支架孔隙较丰富、具备一定的强度，细胞相容性及生物相容性良好，有望通过调节其组分而得到一种降解可调的理想的组织工程骨支架。

【关键词】骨缺损；骨组织工程；左旋聚乳酸；β-磷酸三钙；骨诱导

【中图分类号】R487.3+4　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2015-05-09

Preparation and characterization of PLLA-β-TCP composited porous scaffold for bone repair

Cen Chaode[1], Luo Cong[1], Zhang Xin[2], Hui Hui[2], Bi Yang[3], Li Ming[2], Li Tingyu[4], He Tongchuan[3]

(1. Laboratory of Orthopaedic Biomaterials, Laboratory of Stem Cells, the Children's Hospital of Chongqing Medical University; 2. Department of Orthopaedic, the Children's Hospital of Chongqing Medical University; 3. Laboratory of Stem Cells, the Children's Hospital of Chongqing Medical University; 4. Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics)

【Abstract】*Objective*: To develop a biodegradable scaffold with a certain mechanical strength, osteoconduction and good cytocompatibility and biocompatibility by adjusting the proportion of beta-tricalcium phosphate(β-TCP) in Poly(L-lactic acid)(PLLA)/β-TCP composited porous scaffolds. ***Methods***: The PLLA/β-TCP composited porous scaffolds, in which the content of β-TCP was respectively 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, was synthesized by Solvent self diffusion-molding-salt leaching and freeze-drying method. Its microstructure, porosity, mechanical properties, cytocompati-bility and biocompatibility were studied. ***Results***: PLLA is hydrophobic material and its scaffold is bad for cell adhesion. PLLA/β-TCP composited porous scaffold has rough surface; the addition of β-TCP can improve the hydrophilicity and osteoconduction of scaffold, which is good for cell crawl. In all groups, the P/T30 group scaffold had the largest number of crawling cells. The composite scaffold mixing β-TCP has good X-ray imaging, which can provide convenience for *in vitro* X ray assessing the degradation of scaffold *in vivo*. PLLA/β-TCP composited porous scaffolds have reliable cytocompatibility and biocompatibility. ***Conclusion***: The PLLA/β-TCP composited scaffolds fabricated by Solvent self diffusion-molding-salt leaching and freeze-drying method have rich porosity, certain mechanical strength, osteoconduction and good cytoco-

作者介绍：岑超德，Email：cenchaode907@sohu.com，
研究方向：骨修复材料及磁性药物靶向研究。

通信作者：罗　聪，Email：luocong919@sohu.com。

基金项目：重庆市科技攻关计划资助项目（编号：CSTC2011ggB1004）；国家临床重点专科建设经费项目资助（编号：国卫办医函【2013】544）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20151022.2102.008.html（2015-10-22）

mpatibility and biocompatibility. It is hopeful to obtain an ideal tissue engineered bone scaffold with adjustable degradation rate by adjusting the composition proportion.

【Key words】bone defect; bone tissue engineering; Poly(L-lactic acid); β-tricalcium phosphate; osteoinduction

骨组织缺损因创伤、肿瘤、畸形及感染等原因引起，目前发生率较高。由于传统骨移植等治疗方法增加创伤且组织来源不足，骨植入材料的需求较大。运用生物材料与组织工程等再生医学方法修复骨组织缺损具有明显的社会和经济效益。因此，研究、开发新型医用修复材料成为生物医学材料科学领域的重中之重。左旋聚乳酸（Poly(L-lactic acid)，PLLA）材料是目前少数被美国 FDA 批准的可降解性生物医用材料，而 β-磷酸三钙（beta-tricalcium phosphate，β-TCP）由于具备优良的性能在研究中得到广泛的应用[1-3]。PLLA 类材料具有良好的机械性能和生物降解性，但其亲水性差，缺乏骨引导性，降解产物呈酸性，可导致降解过程的“自加速效应”与生物体无菌性炎症反应[4-5]。本课题根据人体骨组织无机/有机骨板的构成，制备了 PLLA/β-TCP 复合材料。β-TCP 具备骨引导性，其降解后释放出的钙和磷离子可转化为植入区新骨基质中的无机成分或成为机体钙磷库的一部分[6-7]，且其降解产物呈碱性这一特性可以降低 PLLA 降解产生的酸性，从而消除或减轻由 PLLA 引起的无菌性炎症。β-TCP 材料的脆性较大，可塑性较差，PLLA 的加入可使 β-TCP 材料的韧性得到提高，改善了材料的加工性能。本文通过溶剂自扩散-模压成型-盐沥滤、冷冻干燥法制备 PLLA/β-TCP 复合多孔支架，通过调节复合多孔支架中 β-TCP 的比例，对复合支架的性能进行研究，拟制备一种可生物降解、孔隙率丰富、具有一定强度及骨引导性、细胞相容性及生物相容性良好的复合支架。

1 材料与方法

1.1 实验材料

左旋聚乳酸（PLLA，Mw=100000，济南姝远生物科技有限公司）、β-磷酸三钙（β-TCP，d50=0.2~5 μm，99%，南京埃普瑞纳米材料有限公司）、二氯甲烷（分析纯，成都市科龙化工试剂厂）、NaCl 颗粒（100-400um，自制）。

1.2 实验仪器

动静态疲劳试验机（美国 BOSE 公司，型号 3330，重庆大学生工材料室）、扫描电镜（日本日立公司，型号 S-3000N，重庆医科大学生科院）。

1.3 复合多孔支架的制备

采用溶剂自扩散——模压成型——盐沥滤、冷冻干燥法制备 PLLA/β-TCP 复合多孔支架，具体方法：取一定量的 PLLA 溶于适量的二氯甲烷，直至 PLLA 完全溶解，按在复合材料中占 0%、10%、20%、30%、40%、50%的比例（以下简称纯 PLLA、P/T10、P/T20、P/T30、P/T40、P/T50）加入 β-TCP 和 70%（质量分数）制孔剂 NaCl 颗粒，搅拌直至形成以二氯甲烷为液相的均匀混合体系。待体系展开半干燥成膜，将膜注入压力数显模具中，以 3 MPa 的压力保压成型直至复合支架完全干燥后取出。然后经过充分盐沥滤、冷冻干燥 24 h 得到外径为 6 mm，厚度为 1.5 mm，高为 2 cm 的白色空心圆柱状多孔复合支架。

1.4 复合支架的大体观和微观形貌

复合支架试样喷金后，用扫描电子显微镜观察其微观形貌。

1.5 不同配方复合多孔支架孔隙率测定

采用量重法[8]测量 PLLA/β-TCP 支架的孔隙率，每组测试样品数 7 个，计算公式如下（恒温 25 ℃时测定）：$Vs=W1+Ws-W2$；$Vp=W2-W3-Ws$；$\varepsilon=Vp/(Vs+Vp)=(W2-W3-Ws)/(W1-W3)$；式中：Vs 为支架本身体积；Vp 为支架孔体积；ε 为支架孔隙率；Ws 为支架质量；W1 为小瓶装满乙醇后的总重；W2 为支架浸泡于乙醇中完全润湿，排除多余乙醇后，样品、小瓶与乙醇的总重；W3 为把支架从乙醇中取出后，剩余乙醇和小瓶的质量；ρ 为 25 ℃时乙醇的密度。

1.6 弹性模量、抗弯强度测定

弹性模量及抗弯强度是骨支架材料力学性能检测中极其重要的指标，由动静态疲劳试验机测定。弹性模量检测样品外径为 3 mm，内径为 1.5 mm，长 0.9 cm。弹性模量=应力/应变（$Eapp=Kh/A$，$K=F/d$，其中 F 为应力，d 为压缩长度，A 为材料横切面积，h 为材料长度）。将压缩过程的应力作为纵轴、应变作为横轴，通过 Matlab 软件（The MathWorks）编程生成应力应变关系曲线，较为固定的一段直线区域的斜率即为材料弹性模量[9]。三点抗弯强度样品材料外径为 3 mm，内径为 1.5 mm、长 2 cm，抗弯强度为在样品的两支点之间施加载荷，至试件破坏时的单位面积载荷值，由公式 $\delta fmax=8FmaxL/\pi d^3$ 计算出样品的抗弯强度（其中 Fmax 为最大载荷，L 为两支点跨度，d 为样品直径）[10]。其中试验机加载速度为 0.1 mm/s，每组测试样品 7 个。

1.7 复合多孔支架 X 线片检测

将支架充分盐沥滤，冷冻干燥后，X 线摄片观察复合支架的显影情况。

1.8 复合支架的骨髓间充质干细胞培养

支架经紫外光照射 1 h，75%消毒酒精消毒（3 次，每次 1 h）及 PBS 清洗（3 次，每次 30 min）后，将部分 MSCs 细胞悬液（6×10^6 个/ml）滴入支架的横截面（以细胞悬液刚刚溢出支架为宜），1 h 后翻转，再滴入剩余的细胞悬液，37 ℃、5%CO_2 培养 3 h 后加入血清培养基。继续培养 3 d 后将支架取出，0.9%的生理盐水冲洗支架，4%的戊二醛固定过夜，叔丁醇干

燥、喷金行扫描电镜检测，每组支架检测 3 个样品。

1.9　复合支架浸提液细胞毒性检测

将支架紫外光照射 1 h，用 75%酒精消毒（3 次，每次 1 h）及 PBS 清洗（3 次，每次 30 min）后，将 2 g 支架装入已消毒的瓶子中，加入 15 ml 的血清培养基，37 ℃、5% CO_2 条件下孵育 7 d 后离心取上清液，经 0.22 μm 过滤器过滤得到浸提液[11]，将支架浸提液培养细胞行 CCK8 试剂盒检测支架浸提液的细胞毒性。具体方法：将骨髓间充质干细胞以每孔 5×10^3 个培养于 96 孔板中，每孔 100 μl。待细胞贴壁生长后，将培养基吸走，换成骨支架浸提液。分别于浸出液培养细胞的 1、3、5、7 d，每孔加入 1/10 体积的 CCK8，轻轻振荡，继续培养 2 h 后用酶联免疫检测仪 450 nm 波长测光吸收值。每组各个时间点分别设立 5 个复孔，同时以正常血清培养基培养细胞作为对照组，在设立时间点进行检测。

1.10　统计学分析

采用 IBM SPSS Statistics 19 统计软件包进行分析，所得各组结果以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，其两两比较采用 LSD-t 法，检验水准 α=0.05。

2　结　果

2.1　骨支架制备模具

骨支架制备模具（如图 1）内部配有压力数显仪，可检测每个骨支架样品制作过程的压力，保证支架制作工艺的统一性。

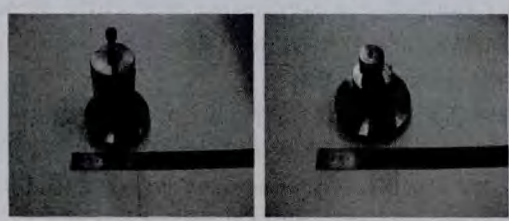
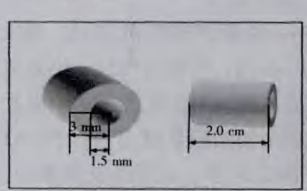


图 1　骨支架制备模具

Fig.1　Mould for the preparation of bone scaffolds

2.2　PLLA/β-TCP 复合多孔支架的大体观及微观结构图

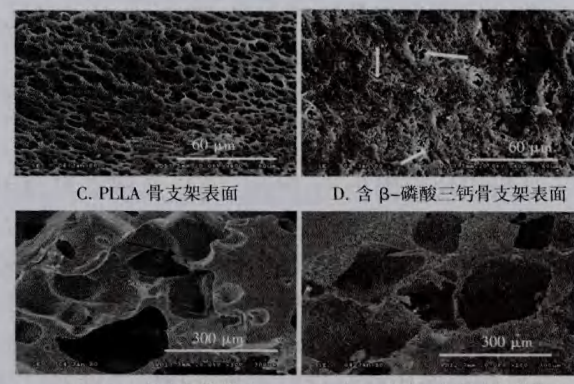
一般认为长骨临界骨缺损为其长度的 10%或者骨干直径的 1.5-2.5 倍[12]，根据 6 月龄新西兰大白兔桡骨的尺寸参数[13]，得以下数据（图 2A）。仿生复合多孔支架长约 2 cm，直径为 6 mm，呈白色中空状，质均匀（图 2B）；纯 PLLA 支架和含磷酸钙组支架表面扫描电镜可见支架表面粗糙，布满丰富的微孔，有利于细胞的黏附生长（图 2C、D）；纯 PLLA 支架和含磷酸钙组支架横切面扫描电镜可见复合骨支架孔隙丰富，孔径为 100~400 μm，并可见一定的孔隙交通率，如箭头所示（图 2E、F）。



A. 骨支架尺寸图



B. 骨支架大体观



C. PLLA 骨支架表面　　D. 含 β-磷酸三钙骨支架表面

E. PLLA 骨支架横截面　　F. 含 β-磷酸三钙骨支架横截面

图 2　PLLA/β-TCP 复合多孔支架的大体图及微观结构图

Fig.2　General graphs and the microcosmic structure of PLLA/β-TCP composited porous scaffolds

2.3　PLLA/β-TCP 复合多孔支架孔隙率

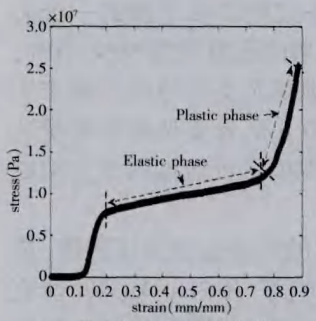
孔隙率是骨支架的重要参数之一，孔隙可为细胞的黏附生长及钙盐沉积提供空间。本研究中纯 PLLA、P/T10、P/T20、P/T30、P/T40 及 P/T50 骨支架孔隙率检测结果分别为（65.54±2.03）%、（63.87 ± 2.63）%、（61.53 ± 1.88）%、（59.77 ± 2.52）%、（54.82 ± 0.92）%与（56.58 ± 1.63）%。复合多孔支架孔隙率随 β-TCP 含量的增加基本呈逐渐降低的趋势，各组骨支架孔隙率组间比较结果差异具有统计学意义（F=29.544，P=0.000）。而 P/T40 组支架孔隙所有组分中最低，其原因可能为支架盐沥滤过程不充分以及材料填注过程 NaCl 颗粒的丢失导致的，此过程有待进一步改善。

2.4　PLLA/β-TCP 复合多孔支架的应力/应变曲线、弹性模量及抗弯强度

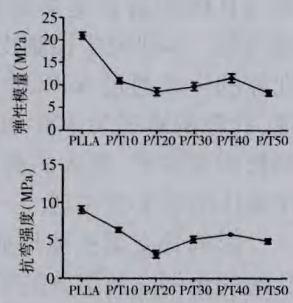
骨支架的弹性模量在应力应变曲线上表现为一段直线区域的斜率，Elastic region 为试件的弹性变形阶段，在该阶段，形变随载荷增加而线性增加，去除载荷后试件形状可基本复原。Plastic region 为塑性变形阶段，在该阶段，试件已压紧变形，形变增量减小（图 3A）。纯 PLLA 支架强度最大（这是由 PLLA 分子间的紧密结合产生的），加入 β-磷酸三钙后支架强度有所下降，P/T20 强度最低。这可能是由于 β-磷酸三钙的加入打破了 PLLA 分子颗粒间的紧密联系而使强度下降，且含钙组骨支架在孔隙率较大（孔隙率是影响支架强度的主要因素之一）的情况下其机械性能会受到影响。而 P/T40 支架强度在含钙组中最强，是因为此比例的复合支架孔隙率最低导致的。骨支架抗弯强度变化趋势与弹性模量基本一致（图 3B）。数据见表 1。

2.5　复合多孔支架 X 线摄片

X 线摄片结果显示：随着复合多孔支架中 β-磷酸三钙比例的增加，其显影效果越明显。P/T10 组骨支架含 β-磷酸三钙量较少，而 PLLA 组骨支架未加入 β-磷酸三钙，其显影效果均不明显，其余组骨支架显影效果与兔子桡骨显影效果相当，这可为支架植入体内后降解的体外摄片评估提供方便（如图 4）。



A. 骨支架应力/应变曲线



B. 不同组分骨支架弹性模量及抗弯强度

注：B 图各组复合多孔支架样本量为 7 个，所得结果以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，各组复合多孔支架弹性模量结果比较 $P=0.000<0.05$，各组复合多孔支架抗弯强度比较 $P=0.000$

图 3　含不同 β-TCP 比例复合骨支架力学性能

Fig.3　Mechanical properties of PLLA/β-TCP composited porous scaffolds with different proportions of β-TCP

表 1　含不同 β-TCP 比例复合多孔支架的力学强度（$n=7, \bar{x} \pm s$）

Tab.2　Mechanical strength of composited porous scaffolds with different proportions of β-TCP（$n=7, \bar{x} \pm s$）

组别	弹性模量	抗弯强度
PLLA	21.014 ± 0.754	9.129 ± 0.585
P/T10	10.900 ± 0.643	6.429 ± 0.373
P/T20	8.457 ± 0.840	3.029 ± 0.499
P/T30	9.629 ± 0.901	5.100 ± 0.327
P/T40	11.600 ± 0.959	5.786 ± 0.234
P/T50	8.186 ± 0.623	4.929 ± 0.382
F 值	252.643	164.971
P 值	0.000	0.000

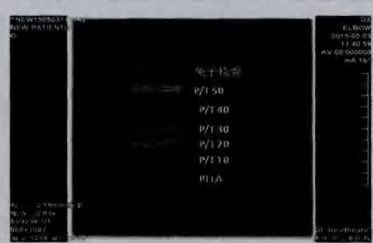
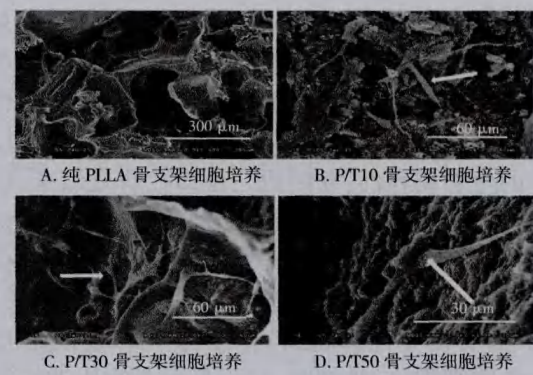


图 4　含不同 β-TCP 比例复合骨支架 X 线显影

Fig.4　X-ray imaging of PLLA/β-TCP composited porous scaffolds with different proportions of β-TCP

2.6　复合多孔支架细胞培养

骨支架细胞培养是评价支架细胞相容性及亲水性的重要指标，纯 PLLA 支架细胞培养几乎未发现细胞的爬行生长，这可能与材料本身的疏水性有关（图 5A）。支架细胞接种面扫描电镜观察发现 P/T10、P/T30 与 P/T50 组复合支架均可见不同程度的细胞爬行生长，其中 P/T30 组支架细胞爬行较其他组丰富，原因为其具备较好的亲水性及相对较高的孔隙率（图 5B、C、D）。β-TCP 的引入可以改善复合支架的亲水性及骨引导性，这些因素是影响细胞能否黏附生长的关键，而骨支架内部丰富的孔隙率更能为细胞提供广阔的黏附空间，便于钙盐的沉积，为骨缺损的修复提供良好的结构及性能基础。此处 P/T20 与 P/T40 组复合骨支架细胞培养图片未展示。



A. 纯 PLLA 骨支架细胞培养　B. P/T10 骨支架细胞培养

C. P/T30 骨支架细胞培养　D. P/T50 骨支架细胞培养

图 5　含不同 β-TCP 比例复合骨支架的骨髓间充质干细胞培养

Fig.5　MSCs culture of PLLA/β-TCP composited porous scaffolds with different proportions of β-TCP

2.7　复合多孔支架浸提液的细胞毒性检测结果

复合骨支架的组织相容性可通过体外支架浸提液细胞培养的毒性影响来评价，组织相容性较差的骨支架表现为对细胞的毒性作用较明显，细胞的平均吸光度因此降低。骨支架浸提液对 MSCs 的细胞毒性用 CCK8 测试盒检测，Control 组为用新鲜培养基培养细胞。含不同 β-TCP 比例的骨支架浸提液及不同细胞培养时间对吸光度的影响结果采用析因设计方差分析，分组因素主效应 $F=3.344$，$P=0.014$，说明含不同 β-TCP 比例的骨支架浸提液的平均吸光度不同或不全相同，含不同 β-磷酸三钙比例的复合支架的组织相容性不同或不全相同。时间因素主效应 $F=5359.105$，$P=0.000$，说明不同时间点测得的平均吸光度不同或不全相同，各组细胞测得的平均吸光度随时间推移而增加（如表 2 所示），表明含不同 β-磷酸三钙比例的复合支架浸提液与培养基近似，骨支架浸提液无毒性成分，对 MSCs 细胞无毒性抑制作用，骨支架组织相容性良好。分组与时间交互效应 $F=0.259$，$P=0.994$，说明分组因素与时间因素对平均吸光度的影响不存在交互效应。因组间 β- 磷酸三钙比例差异不明显，本实验未将 P/T20 与 P/T40 组支架浸提液列入研究内容。

表 2　各组骨支架浸提液细胞培养平均吸光度值（$n=5, \bar{x} \pm s$）

Tab.2　Average positive absorbance of leaching solution for cell culture in each groups（$n=5, \bar{x} \pm s$）

组别	1 d	3 d	5 d	7 d
PLLA	0.84 ± 0.05	1.35 ± 0.07	2.54 ± 0.10	3.23 ± 0.07
P/T10	0.85 ± 0.04	1.38 ± 0.07	2.51 ± 0.08	3.24 ± 0.09
P/T30	0.80 ± 0.10	1.32 ± 0.08	2.49 ± 0.05	3.26 ± 0.07
P/T50	0.82 ± 0.07	1.33 ± 0.13	2.50 ± 0.08	3.22 ± 0.04
Control	0.90 ± 0.07	1.40 ± 0.06	2.58 ± 0.07	3.30 ± 0.06

注：control 组为用正常完全培养基培养 MSCs；其中分组因素主效应 $F=3.344$，$P=0.014$；时间因素主效应 $F=5359.105$，$P=0.000$；分组与时间交互效应 $F=0.259$，$P=0.994$

3 讨 论

自 1995 年 Crane[14]提出骨组织工程概念以来，骨组织工程技术已成为国内外治疗骨缺损的热点。理想的组织工程骨材料应具备以下几个条件[15]：材料表面结构及性质有利于细胞吸附、增殖和分化；具有良好的生物相容性；易制成三维多孔状及加工成不同的几何形态以满足临床的应用；能保持对细胞的分化，不会使细胞产生变异；具备生物活性，即支架材料能与活体骨化学键合产生生物性羟基磷灰石层；具备骨诱导性，即材料直接诱导间充质细胞分化为骨原细胞、成骨细胞，进而形成骨组织的性能；降解速度与新组织的产生相匹配，降解产物无毒、易被人体吸收或排出体外。

早期的人工骨支架材料属于非生物降解型的，这些材料的特点是机械强度高，生物惰性，但存在二次手术问题，因此人们开始研究使用可生物降解并具有生物活性的材料。PLA 类材料与多孔的 3-D-β-TCP 支架可生物降解，降解产物无毒，已通过美国 FDA 认证作为药物辅料和医用材料上市。目前 PLA 类材料已被制成缝线、螺钉、胶囊等广泛用于临床，而 β-磷酸三钙更多的是用于制备骨水泥及复合支架材料。研究证实纳米羟基磷灰石与 β-磷酸三钙复合的双相磷酸钙陶瓷具备骨诱导性，β-磷酸三钙支架具有骨引导性，但对其是否具有骨诱导性的观点目前还不统一。Tsukanaka 等[16]认为酸性磷酸酶阳性细胞的募集是高纯 β-磷酸三钙骨支架具有骨诱导性的关键所在。Polini 等[17]在未加成骨生长因子的条件下研究发现 PCL/β-TCP 支架组较单纯 PCL 支架组的成骨指标变化更明显，并认为复合材料中添加无机相比支架本身的三维微环境更能诱导骨髓间充质干细胞向成骨分化。

自然骨是无机纳米羟基磷灰石与有机胶原纤维有规律结合的产物，X 线显影佳，具有典型的骨小梁结构，孔隙构造极为丰富，其孔隙率为 50%~90%，允许骨母细胞、间充质干细胞在孔隙内部的增殖分化以及血管的生成[18]。Bai 等[19]研究证实多孔材料促进血管化和成骨细胞黏附、增殖、分化的最佳孔径是 400 μm，大于该尺度的孔径对血管新生无显著影响。在孔径 90~120 μm 的羟基磷灰石中先诱导软骨形成然后再骨化，而在大于 350 μm 的羟基磷灰石中可以直接诱导骨组织形成。所以，组织工程骨应该尽量仿生自然骨，其孔径、孔隙率及强度可通过调节制作工艺来实现。然而，三维骨支架的机械性能与孔隙构造是支架制备过程需要平衡的一个关键问题。本研究中控制支架的孔隙率为 50%~70%，孔隙的生成通过 NaCl 的沥滤及支架冷冻干燥来实现，孔隙的直径为 100~400 μm，骨支架弹性模量达到松质骨水平，更大的弹性模量可通过调节支架成型加压的强度来实现。

影响骨支架孔隙形成的因素包括加压强度，造孔剂的比例以及组分的影响等。Kucharska 等[20]研究发现 β-磷酸三钙的加入可增加壳聚糖/磷酸三钙复合支架的致密度而使支架的孔隙率随着 β-磷酸三钙的比例增加而降低，本研究于加压强度与造孔剂比例固定的条件下研究 β-TCP 对孔隙率的影响，研究结果与之报道基本相符。在一定范围内，支架的机械性能与孔隙率成反比。然而，本研究 P/T50 的骨支架孔隙率是所有组分中较低的，但其强度并未随之增大，是因为 β-磷酸三钙本身脆性较大，β-磷酸三钙的加入可影响复合支架的可塑性，当 β-磷酸三钙比例达到 50%时，复合支架可塑性减小，复合支架的强度自然减小。

骨支架细胞培养是检测支架细胞相容性的重要方法，支架的细胞相容性决定细胞能否于支架表面攀附生长并向支架内部迁徙增殖，为骨缺损的修复奠定基础。本研究中纯 PLLA 骨支架未观察到骨髓间充质干细胞的黏附，这可能是由 PLLA 材料本身的疏水性导致的，疏水性材料不利于细胞的定植。而含钙组骨支架扫描电镜下均可见不同程度的细胞粘附生长，这是由 β-磷酸三钙良好的亲水性及骨引导性决定的，复合支架的亲水性及骨引导性由于 β-磷酸三钙的加入而得到改善。其中 P/T30 组复合支架细胞接种面扫描电镜下观察细胞爬行数量最多，是因为此比例的复合支架在较好的亲水性的前提下具有较高的孔隙率。P/T20 组复合支架亲水性较弱，而 P/T50 组复合支架亲水性理论上最佳，但其孔隙率随着 β-磷酸三钙比例的增加而降低，与 P/T30 组复合支架比较，缺乏细胞定植的空间。因此，这些比例的复合支架都较 P/T30 组复合支架细胞爬行数量少。

具备生物相容性是生物材料用于体内的首要前提，目前对生物材料的生物相容性评价方法主要有两类[21-22]：(1)体外实验：即采取细胞毒性实验来评价医疗器械或其浸提液可滤出成分中急性细胞毒性的潜在性。(2)动物体内实验：即将材料置入体内，分阶段将置入体与周围组织取出，做组织学检查，观察材料及周围组织的病理变迁；本实验采取第一种方法对材料进行了生物相容性的评价，本组

的实验结果提示制备的多孔支架无细胞毒性，具备良好的生物相容性。尽管在细胞毒性方面，本研究制备的支架生物相容性表现良好，然而全面的安全性评价还需进行肝肾毒性、溶血实验、生殖和发育毒性等方面的评价，仍需要后续实验进一步完善。

目前研究支架材料的降解情况主要通过体外模拟体液降解以及体内动物实验来观察[23-24]。支架体外降解实验简单、直观，但不能很好的反映体内降解方式。支架体内负载降解更符合生理，但降解情况不易观察。β-磷酸三钙与羟基磷灰石具有相似的成分，如本研究所示，左旋聚乳酸/β-磷酸三钙复合支架 X 线显影良好，与兔子桡骨显影效果相当，可通过体外 X 线摄片初步评估支架的体内降解情况。支架的降解性与支架材料本身的分子量、体积、支架结构以及配方等有关系，其中配方是影响支架降解的重要因素之一[25-26]。骨支架体内降解速率与新骨生成速率是否相匹配以及骨支架降解过程机械强度的变化是支架研究的难点。纯左旋聚乳酸支架在体内呈现早期降解缓慢，晚期降解加速的特点，而β-磷酸三钙降解速度相对较快。本文将二者按不同的比例混合，制备复合多孔支架，有望得到一个降解速率与新骨生成速率相匹配的复合支架的比例，下一步将进行支架体内降解时间及规律的研究。

参 考 文 献

[1] Balaji Raqhavendran HR, Puvaneswary S, Talebian S, et al.A comparative study on in vitro osteogenic priming potential of electron spun scaffold PLLA/HA/Col, PLLA/HA, and PLLA/Col for tissue engineering application[J].PloS One, 2014, 9(8): e104389

[2] Shuai C, Zhuang J, Hu H, et al.In vitro bioactivity and degradability of beta-tricalcium phosphate porous scaffold fabricated via selective laser sintering[J].Biotechnol Appl Biochem, 2013, 60(2): 266-273.

[3] Kucharska M, Walenko K, Lewandowska-Szumiel M, et al.Chitosan and composite microsphere-based scaffold for bone tissue engineering: evaluation of tricalcium phosphate content influence on physical and biological properties[J].J Mater Sci Mater Med , 2015, 26(3): 143.

[4] Lu L, Zhu X, Valenzuela RG, et al.Biodegradable polymer scaffolds for cartilage tissue engineering[J].Clin Orthop Relat Res, 2001(391s): 251-270.

[5] Cai Q, Yang J, Bei J, et al.A novel porous cells scaffold made of polylactide-dextran blend by combining phase-separation and particle-leaching techniques[J].Biomaterials, 2002, 23(23): 4483-4492

[6] Barber FA, Dockery WD, Hrnack SA.Long-term degradation of a poly-lactide co-glycolide/beta-tricalcium phosphate biocomposite interference screw[J].Arthroscopy, 2011, 27(5): 637-643.

[7] Anker CJ, Holdridge SP, Baird B, et al.Ultraporous beta-tricalcium phosphate is well incorporated in small cavitary defects[J].Clin Orthop Relat Res, 2005(434): 251-257.

[8] Yang J, Shi Q, Bei J, et al.Fabrication and surface modification of macroporous poly(L-lactic acid) and poly(L-lactic-co-glycolic acid) (70/30) cell scaffolds for human skin fibroblast cell culture[J].J Biomed Mater Res, 2002, 62(3): 438-446.

[9] Vivanco J, Garcia S, Ploeg HL, et al.Apparent elastic modulus of ex vivo trabecular bovine bone increases with dynamic loading[J].Proc Inst Mech Eng H, 2013, 227(8): 904-912.

[10] Nishizuka T, Kurahashi T, Hara T, et al.Novel intramedullary-fixation technique for long bone fragility fractures using bioresorbable materials[J].PLoS One, 2014, 9(8): e104603.

[11] 刘 越，赵艳梅，田学忠，等.明胶/纳米羟基磷灰石三维多孔骨支架的制备及其生物安全性评价[J].中国矫形外科杂志，2013，21(16)：1634-1640.

[12] Schmitz JP, Hollinger JO.The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions[J].Clin Orthop Relat Res, 1986(205): 299-308

[13] 周 芳，李 静，余 磊，等.兔桡骨临界骨缺损模型的制备[J].中国组织工程研究与临床康复，2011，15(50)：9385-9388.

[14] Crane GM, Ishaug SL, Mikos AG.Bone tissue engineering[J].Nat Med, 1995, 1(12): 1322-1324.

[15] Rahaman MN, Day DE, Bal BS, et al.Bioactive glass in tissue engineering[J].Acta biomaterialia, 2011, 7(6): 2355-2373.

[16] Tsukanaka M, Fujibayashi S, Otsuki B, et al.Osteoinductive potential of highly purified porous β-TCP in mice[J].Mater Sci Mater Med, 2015(26): 132.

[17] Polini A, Pisignano D, Parodi M, et al.Osteoinduction of human mesenchymal stem cells by bioactive composite scaffolds without supplemental osteogenic growth factors[J].PloS one, 2011, 6(10): e26211

[18] Syahrom A, Abdul KMR, Abdullah J, et al.Permeability studies of artificial and natural cancellous bone structures[J].Med Eng Phys, 2013, 35(6): 792-799.

[19] Bai F, Wang Z, Lu J, et al.The correlation between the internal structure and vascularizati0n of controllable porous bioceramic materials in vivo: a quantitative study[J].Tissue Eng Patr A, 2010, 16(12): 3791-3803.

[20] Kucharska M, Walenko K, Lewandowska-Szumiel M, et al.Chitosan and composite microsphere-based scaffold for bone tissue engineering: evaluation of tricalcium phosphate content influence on physical and biological properties[J].Mater Sci Mater Med, 2015, 26(3): 143.

[21] Zhang HX, Xiao GY, Wang X, et al.Biocompatibility and osteogenesis of calcium phosphate composite scaffolds containing simvastatin-loaded PLGA microspheres for bone tissue engineering[J].Biomed Mater Res A, 2015, 103(10): 3250-3258.

[22] Gabbai-Armelin PR, Souza MT, Kido HW, et al.Characterization and biocompatibility of a fibrous glassy scaffold[J].Tissue Eng Regen Med, 2015.doi: 10.1002/term.2017.Epub ahead of print.

[23] Shuai C, Zhuang J, Hu H, et al.In vitro bioactivity and degradability of beta-tricalcium phosphate porous scaffold fabricated via selective laser sintering[J].Biotechnol Appl Biochem, 2013, 60(2): 266-273.

[24] Cai Z, Zhang T, Di L, et al.Morphological and histological analysis on the in vivo degradation of poly(propylene fumarate)/(calcium sulfate/β-tricalcium phosphate)[J].Biomedical microdevices, 2011, 13(4): 623-631.

[25] Lin L, Zhang Q, Wootton D, et al.Biocompatibility and biodegradation studies of PCL/β-TCP bone tissue scaffold fabricated by structural porogen method[J].Mater Sci Mater Med, 2012(23): 2217-2226.

[26] Zhu W, Huang J, Lu W, et al.Performance test of Nano-HA/PLLA composites for interface fixation[J].Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2014, 42(5): 331-335.

（责任编辑：冉明会）