DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.002
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
502 2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)05-0502-04

新型骨与软骨组织工程支架材料制备及其性能研究

戴 刚[1],石宗利[2],李起鸿[1],李重庵[2] ([1]第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038;[2]兰州铁道学院复合材料研究所,兰州 730070)

提 要:目的 研制符合骨与软骨组织工程制备技术要求的新型支架复合材料;并确定其性能与结构优化设计的主要参数指标。方法 按不同CPPf(聚磷酸钙纤维)/PLLA(L-聚乳酸)重量比及相同CPPf+PLLA/NaCl颗粒重量比,采用溶铸颗粒沥取(Solvent-casting particulte-leaching)法制备系列CPPf/PLLA支架复合材料;液体置换法、压缩性能测试及扫描电子显微镜观测其密度、孔隙度、压缩模量及微结构特征;材料样品体外人工降解液直接浸渍法判定其生物降解性能,并观测其生物降解率、压缩模量及微结构改变。结果 系列支架材料密度为0.108~0.165 g/cm^3,孔隙度87.17%~93.24%,压缩模量为5.19~7.89 MP,横截面微结构由微孔海绵状过渡为纤维网状。随着支架材料在人工降解液中降解时间的延长,其降解率以0%~13.2%线性递增;压缩模量呈线性降低至1.10~2.78 MP;材料横截面微结构则发生相应改变。结论 CPPf/PLLA支架复合材料具有高孔隙度的三维立体结构,良好的抗压缩性能和生物降解性能,经进一步优化设计后,可成为结构和性能符合各项要求的新型骨与软骨组织工程支架材料。

关键词:聚磷酸钙纤维/L聚乳酸;支架材料;骨与软骨;组织工程
中图法分类号:R318;R322.71 文献标识码:A

Preparation and properties of novel scaffold composites for bone and cartilage tissue engineering

DAI Gang, SHI Zong-li, LI Qi-hong, LI Chong-an (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To prepare novel scaffold composites for bone and cartilage tissue engineering and to study the effects of its component contents on the mechanical properties and microstructure of the scaffold. **Methods** The scaffold composites of calcium polyphosphate fiber/poly-L-lactic acid (CPPf/PLLA) with different weight ratio were prepared by using solvent-casting particulate-leaching method with CPPf+PLLA/NaCl particulates at same weight ratio. Density, porosity, compressive modulus and microstructure of the scaffold composites were tested and analyzed with liquid replacement, mechanical testing and scaning electron microscopy. The biodegradability was evaluated by samples being soaked into artificial degradation solusion at 37 ℃ *in vitro*. **Results** The scaffold composites CPPf/PLLA had the density of 0.108—0.165 g/cm^3, porosity of 87.17%—93.24%, compressive modulus of 5.19—7.89 MP and microporous sponge structure to fibrous network in microstructure of cross sections. The re-enforcement fiber CPPf in the scaffold composites significantly enhanced the beginning of biodegradation and increased the biodegradation rate by 0%—13.2% in a content-dependent manner. The compressive modulus of CPPf/PLLA showed a linear reduce to 1.10—2.78 MP along with the degradation time. And the changes of microstructure were consistent with the changes of biodegradation rate and compressive modulus. **Conclusion** The scaffold composites CPPf/PLLA have a 3—D network structure with high porosity, sound compressive modulus and good biodegradability. After further optimization in their structure and properties, they may be regarded as novel scaffold composites to satisfy the bone and cartilage tissue engineering.

Key words: calcium polyphosphate fiber/poly-L-lactic acid; scaffold composite; bone and cartilage; tissue engineering

生物降解性三维支架材料在组织工程制备技术中起着十分重要的作用,它与种子细胞共同构成组织工程的核心-三维空间复合体[1,2]。目前取得较好效果的骨与软骨组织工程支架材料,主要是由L-聚乳酸(Poly-L-lactic acid, PLLA)、聚乙醇酸(Polyglycolic acid, PGA)及其共聚物等加工而成的纤维网状或微孔海绵状材料[3~5]。然而,这些支架材料的力学性能脆弱,受力时易变形从而导致种植细胞损伤[6,7],而且难以承载工程化组织体外熟化时的应力。

应用复合材料的技术原理,将具有良好生物相容性的高强度可控生物降解性聚磷酸钙纤维(Calcium polyphosphate fibers, CPPf)[8]与生物降解性PLLA复合,采用熔铸颗粒沥取法(Solvent-casting particulate-leaching)制备出具有高压缩模量与高孔隙度的新型生物降解性骨与软骨组织工程支架复合材料,同时探讨了支架材料中CPPf含量变化对其主要物理与力学性能及微结构的影响,并进行了新型支架复合材料体外生物降解性能及其力学性能与微结构变化的研究。

1 材料和方法

1.1 三维支架材料制备

以0/100、30/70、50/50、70/30 CPPf/PLLA重量比,并按1∶9 CPPf+PLLA/NaCl相同重量比,参照Freed[9]氏熔铸颗粒沥取法

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39830100)与面上项目(30070224);全军"十五"医药卫生科研基金资助重点项目(01Z072)
作者简介:戴 刚(1960—),男,甘肃省秦安县人,博士,副主任医师,主要从事脊柱外科及骨科组织工程研究,发表论文39篇,现在北京军区总医院骨科,北京 100700。电话:(010)64029345
通信作者:李起鸿,电话:(023)68754483
收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-04-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

制备系列 CPPf/ PLLA 支架复合材料。

1.2　三维支架材料性能测试

1.2.1　密度和孔隙度测试　　参照 Zhan[7] 氏液体置换法。支架材料样品的体积 $V=(V_2-V_1)+(V_1-V_3)=V_2-V_3$; 密度 $d=W/(V_2-V_3)$; 孔隙度 $\varepsilon=V_1-V_3/(V_2-V_3)\times 100\%$。

1.2.2　力学性能测试　　取直径 5 mm、高 10 mm 圆柱状材料样品, 在 MTS 材料实验机上, 以 1.0 mm/ min 加载, 完成其压缩试验。通过其应力/ 应变关系曲线得出压缩弹性模量。

1.2.3　微结构观察　　将材料样品锐刀横切, 真空干燥, 横截面喷金, 扫描电子显微镜观察其横截面超微结构, 并随机选择不同区域, 游标卡尺测量材料样品孔径范围。

1.2.4　体外生物降解性能及其力学性能与微结构变化观测

材料样品于人工降解液(磷酸缓冲液, pH= 7.4)中生理条件下降解。定期检测其体外生物降解率[=(降解前重量－降解后重量)/降解前重量× 100%]; 并观测其力学性能与微结构变化。

1.3　统计学方法

应用 SPSS 医用统计软件包行 ANOVA 方差分析及方差齐性检验; 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 并计算 P 值。行直线回归与相关分析, 结果以直线回归方程表示, 并计算 r 值和 P 值。

2　结果

2.1　新型三维支架材料主要物理与力学性能检测结果, 见表 1

表 1　新型骨与软骨组织工程支架材料主要物理与力学性能及相关参数(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Physical and mechanical parameters of novel scaffold composites for bone and cartilage tissue engineering(%, $\bar{x}\pm s$)

Groups	CPPf+PLLA: NaCl (weight)	CPPf: PLLA (weight)	n	Density (g/cm^3)		Porosity (%)		Compressive modulus(MPa)
				Calculated value	measeared value	Calculated value	measeared value	
PLLA	1∶9	0/100	5	0.202	0.095±0.013	83.94	87.00±1.36	1.07±0.23
30%CPPf	1∶9	30/70	5	0.207	0.108±0.016	85.89	87.17±1.68	5.19±0.38△
50%CPPf	1∶9	50/50	5	0.210	0.132±0.015△	87.24	91.34±1.53△	6.58±0.34△
70%CPPf	1∶9	70/30	5	0.214	0.165±0.019△	88.60	93.24±1.89△	7.89±0.42△

△: $P<0.01$ *vs* PLLA;　*: $P<0.05$ *vs* 30%CPPf

表 1 结果显示, 系列 CPPf/ PLLA 复合支架材料的密度、孔隙度及压缩模量, 随其骨架基质中 CPPf 含量的增加及 PLLA 含量的减少而增高; 其中 50%CPPf 组和 70%CPPf 组上述 3 项指标与 PLLA 对照组比较有显著性差异($P<0.01$); 30%CPPf 组压缩模量与 PLLA 对照组比较有统计学显著性差异($P<0.01$)。上述结果表明, PLLA 支架材料中复合 CPPf 能够明显增加或增强相同方法制备的单纯 PLLA 支架材料的密度、孔隙度及压缩刚度, 而且随着支架材料骨架基质中 CPPf 含量的增加, 其作用更加显著。

2.2　支架材料微结构扫描电子显微镜观察

单纯 PLLA 支架材料微结构呈较低孔隙度的微孔海绵状, 见图 1; 30% 和 50%CPPf 两种支架材料微结构呈中等孔隙度的微孔海绵状与纤维网状过渡型; 70% CPPf 支架材料微结构呈高孔隙度的纤维网状, 见图 2。上述结果表明, PLLA 支架材料复合 CPPf 可使其微结构发生改变; 随着 CPPf 含量的增加, 其微结构由较低孔隙度的微孔海绵状过渡为高孔隙度的纤维网状。

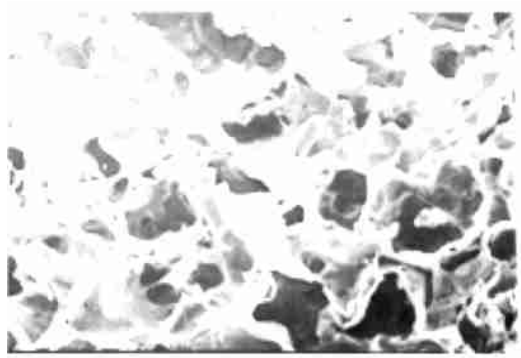


图 1　单纯 **PLLA** 微孔海绵状支架材料横截面　(SME× 100)

Fig 1　Cross section of simple PLLA microporous sponge scaffold　(SME× 100)

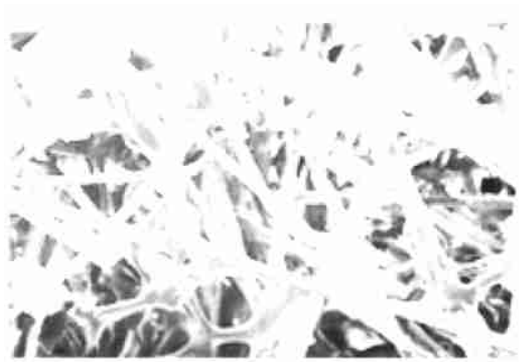


图 2　**70%CPPf/ PLLA** 纤维网状支架材料横截面　(SME× 100)

Fig 2　Cross section of 70%CPPf/ PLLA fibrous-network scaffold composites　(SME× 100)

2.3　支架材料体外生物降解性能及其力学性能与微结构变化

2.3.1　支架材料体外生物降解性能　　系列支架材料在人工降解液中生理条件下降解时, 其降解率与降解时间的关系曲线见图 3。

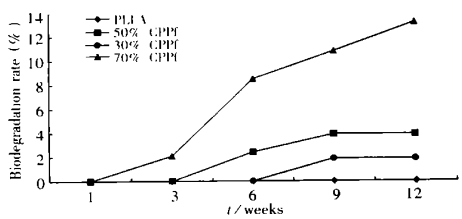


图 3　系列支架材料在人工降解液中生理条件下降解时降解率的变化

Fig 3　Biodegradation rates of the scaffold composites soaked in artificial degradation solusion at 37℃ *in vitro*

图 3 结果显示单纯 PLLA 支架材料在人工降解液中生理条件下降解 12 周几乎无重量缺失; 30%、50%、70%CPPf/ PLLA 支架材料在相同条件下降解 9、6、3 周时, 即出现重量缺失, 且降解率随着降解时间的延长而增加, 其生物降解率增幅依次为: 70% CPPf 组> 50% CPPf 组> 30% CPPf 组。上述结果表明, PLLA 支架材料复合 CPPf 能够明显增加其生物降解率, 而且随

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

着CPPf含量的增加，其开始重量缺失的时间提前，生物降解率明显提高。

2.3.2 支架材料体外生物降解时力学性能的变化 系列支架材料于体外人工降解液中生理条件下降解时，其压缩弹性模量变化与降解时间的关系曲线见图4。

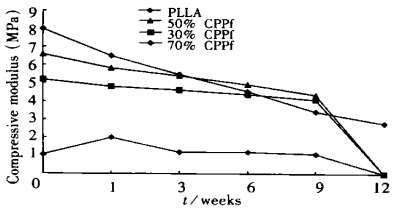


图4 系列支架材料体外人工降解液中生理条件下降解时力学性能变化

Fig 4 Compressive modulus of the scaffold composites soaked in artificial degradation solusion at 37 ℃ *in vitro*

图4结果显示，单纯PLLA支架材料在体外人降解液中生理条件下降解时，其压缩模量于降解第1周时略有增高，第3周后开始缓慢降低，第9周时整体碎裂。而复合CPPf的3组支架材料的压缩模量，于降解第1周时即开始降低，直至整体碎裂前，其压缩模量的变化与降解时间呈线性负相关($r=-0.999\sim-0.996$，$P<0.01$)；但始终显著大于单纯PLLA支架材料开始降解时的压缩模量($P<0.01$)。上述结果表明，PLLA复合CPPf支架材料在体外人工降解液中生理条件下降解时，其压缩模量随着降解时间延长而呈线性降低；单纯PLLA支架材料的压缩模量在降解早期稍有增高，第3周开始缓慢降低；而在体外生物降解过程中，复合PPf的支架材料压缩模量始终明显大于PLLA支架材料的压缩模量。

2.3.3 支架材料体外生物降解时微结构扫描电子显微镜观察 单纯PLLA支架材料微结构与降解前比较，除微孔壁变粗糙外无明显变化，见图5；含30%和50% CPPf两种支架材料内部均可见CPPf降解后残留的直径不等、表面粗糙、交错排列的PLLA中空条索，且部分发生断裂；含70% CPPf支架材料内部仍呈网状结构，可见CPPf降解后残留的直径相近、表面毛糙、交错排列、相互连接的PLLA中空条索，其中部分发生断裂，见图6。上述结果表明，四种支架材料体外生物降解过程中的微结构改变与其生物降解率和压缩模量的变化规律相一致。

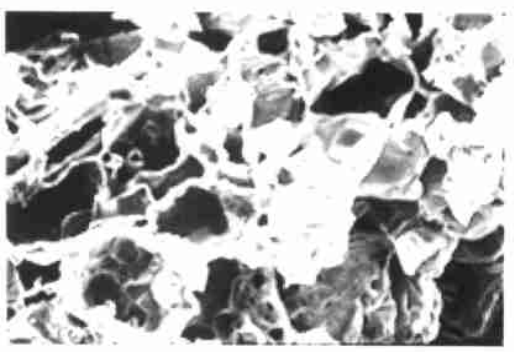


图5 单纯**PLLA**支架材料体外生物降解**9**周横截面 (SME×100)

Fig 5 Cross section of simple PLLA scaffold after 9 weeks biodegradation in vitro (SME×100)

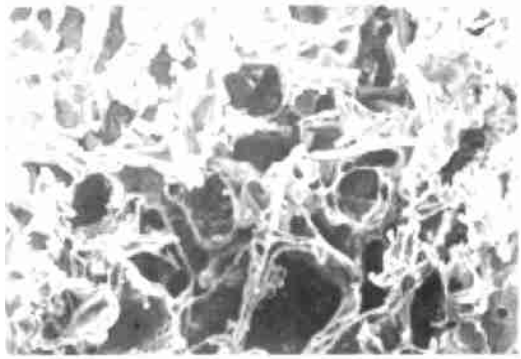


图6 **70%CPPf/PLLA**支架材料体外生物降解**12**周横截面 (SME×100)

Fig 6 70% CPPf/PLLA scaffold after biodegradation for 12 weeks *in vitro* (SME×100)

3 讨论

三维支架材料作为组织工程制备技术中细胞种植的场所和组织再生的模板，应具有良好的生物相容性、高孔隙度的三维立体结构、良好的表面活性、可控生物降解性及可塑性与适宜的力学性能[4,5]。单一成分构成的三维支架材料难以完全满足某一组织器官组织工程制备技术对支架材料的基本要求和特殊要求。应用复合材料的原理和方法，将两种或两种以上具有互补特性的生物相容性可降解材料，按一定比例和方式组合，并选择适宜的制备工艺，可以设计构造出能够满足不同组织器官组织工程制备技术所需的结构与性能优化的三维支架复合材料[6,7]。

将具有良好生物相容性的高强度高模量生物降解性CPPf[8]与生物降解性PLLA按一定比例组合，采用熔铸颗粒沥取法制备的新型支架复合材料，经检测其具有高孔隙度的三维网状结构、良好的生物降解性能及抗压缩刚度。通过进一步优化设计可成为骨与软骨组织工程制备技术所需要的支架材料。

CPPf/PLLA支架复合材料的主要物理与力学性能和微结构特征，主要是由其两种不同构成成分的理化特性与含量比例所决定。实验结果显示，采用相同设备条件和制备工艺，以相同CPPf+PLLA与NaCl重量比制备出的不同CPPf/PLLA重量比支架复合材料，随着CPPf/PLLA重量比增加，其密度和压缩模量增大，这是因为CPPf的密度和刚度明显高于PLLA的结果；而其孔隙度的增加，则是由于支架材料随着CPPf/PLLA重量比增加，其内部微结构由微孔海绵状逐渐变为纤维网状结构所致。

CPPf/PLLA支架复合材料的生物降解性能及其力学性能的变化，是由其两种不同构成成分的生物降解特性的差异及材料内部微结构的改变而共同影响的结果。已有研究表明，PLLA的生物降解过程分为四个阶

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

段,即:①水化;②强度降低;③重量缺失和分子量降低;④最后自然解体[4,10]。影响 PLLA 生物降解的主要因素包括:降解环境的温度和 pH 值、PLLA 的平均分子量大小及其分布、晶体化程度及材料样品的总表面积等[4,10,11]。PLLA 的降解机制是其在各种因素影响下,聚合物本体和表面的不断水解(于体内外)和酶解(于体内)作用[11];而 CPPf 在弱酸(缓慢降解)或弱碱(较快降解)性缓冲介质中 37 ℃下均能逐渐表面侵蚀降解[8]。

实验结果显示,单纯 PLLA 支架材料在体外人工降解液中生理条件下降解 12 周时,材料本体碎裂而其重量几乎无缺失,生物降解率近乎于零;而 CPPf/PLLA 支架复合材料在同样条件下降解时,其重量缺失出现的时间,随其 CPPf 含量的增加而提前,其生物降解率随降解时间的延长而逐渐依次增加。上述研究表明,CPPf/PLLA 支架复合材料的生物降解特性是由 PLLA 和 CPPf 的生物降解性能及其降解机制所决定。

参考文献:

[1] Langer R, Vacanti J P. Tissue engineering[J]. Science, 1993, 260(4): 920—926.
[2] Nerem R M, Sambanis A. Tissue engineering: from biology to biological substitutes[J]. Tissue Eng, 1995, 1(1): 3—13.
[3] Thomson R C, Wake M C, Yaszemski M J, *et al*. Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs[J]. Adv Polym Sci, 1995, 122(3): 245—274.
[4] Freed L E, Vanjak-Novokovic L, Biron R J, *et al*. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering[J]. Biotechnology, 1994, 12(7): 689—693.
[5] Kim B S, Mooney D J. Developent of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(3): 224—230.
[6] Duo, Cui F Z, Zhu X D, *et al*. Three-dimensional nano-Hap/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture[J]. J Biomed Mater Res, 1999, 44(3): 407—415.
[7] Zhang R Y, Ma P X. Porous poly (L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process[J]. J Biomed Mater Res, 1999, 45(2): 285—293.
[8] 常 青,石宗利,李重庵. 聚磷酸钙可降解纤维研究[J]. 环境科学, 1997, 18(1): 52—53.
[9] Freed L E, Marquis J C, Nohria A, *et al*. Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultured on synthetic biodegradable polymers[J]. J Biomed Mater Res, 1993, 27(1): 11—23.
[10] Zhang X, Goosen M F A, Wyss U P, *et al*. Biodegradable polymers for orthopedic applications[J]. J Macromol Sci Rev Macromol Chem Phys, 1993, 33(1): 81—102.
[11] Jamshidi K. Resorbable polymers as structural supports[J]. IEEE Eng Med Biol, 1989, 8(2): 46—50.

(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2002)05-0505-01

个案与短篇

骨外 Ewing 肉瘤 1 例

Report of one case of extraskeletal Ewing sarcoma

杨 兰,叶世刚,张崇兰 (解放军 324 医院肿瘤科,重庆 400041)

患者女性,18 岁,未婚,学生。缘于 2001 年 4 月发现右上臂中段外侧有一约 2.5 cm×2.0 cm 大小肿块,不痛,无红肿。5 月肿块迅速增大,并出现疼痛,右上肢肿胀,活动受限。于 2001-07-12 入我院肿瘤科,无肿瘤家族史。查体:一般情况尚好,外周淋巴结无肿大,右上肢活动障碍,皮肤正常,右上臂,前臂及手背软组织明显肿胀,右上臂中段可扪及一 7.0 cm×6.0 cm×4.0 cm 大小肿块,质硬,固定,边界清楚,压痛明显。右上臂 X 线片示:右上臂软组织明显肿胀,可见 7.0 cm×5.2 cm 软组织块影。中间可见液化区,右肱骨未见骨质破坏。胸片示双肺未见转移性病灶。病理检查:肉眼见肿块切面呈暗红色,质韧,镜下见弥漫一致性小圆形肿瘤细胞,核染色比较深,核分裂像易见,胞质少,细胞界线分不清。免疫组化:CK(-),CD99(++),Vimentin(+++),S-100(-),Desmin(-),组织化学:PAS(+++),病理诊断:右上臂骨外 Ewing 肉瘤。

讨论

骨外 Ewing 肉瘤较少见,多发生于 10~30 岁的男性。肿瘤细胞分化差,生长迅速,疼痛,形成肿块。常以脊柱旁及胸壁肋间部位多见,上肢少见。据 Enzinger 统计的 72 例骨外 Ewing 肉瘤的部位分布,上肢仅 2 例(占 3%)。Ewing 肉瘤系高度恶性肿瘤,在早期可发生肺和骨转移[1],很少有淋巴结转移。在常见的软组织肿瘤中,Ewing 肉瘤对化疗比较敏感[2]。治疗应施行局部广泛手术切除,并辅以放化疗。本病预后差,生存率低。

关键词:骨外 Ewing 肉瘤/诊断;骨外 Ewing 肉瘤/病理学
中图法分类号:R738.6 文献标识码:B

参考文献:

[1] 张天泽,徐光伟 主编. 肿瘤学[M]. 天津:天津科学技术出版社, 1996. 2 096.
[2] 周际昌 主编. 实用肿瘤内科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1999. 591—593.

作者简介:杨 兰(1970—),女,四川省乐至县人,主治医师,主要从事肿瘤方面的研究,发表论文 5 篇。电话:(023)68632706

收稿日期:2002-01-10;修回日期:2002-04-04

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net