

骨组织工程多孔支架材料性质及支架制备

吴景梅* 吴若峰*

上海大学材料科学与工程学院高分子化学与物理系 (201800)

email:wujingmei@126.com

摘要: 多孔性生物可降解支架的选择和制备是组织工程技术成功运用的关键, 本文从骨架的材料要求、常用的骨架材料、骨架的制备技术等几个方面对组织工程和生物降解支架的工作进行了综述, 并对该研究的前景进行了展望

关键词: 组织工程 多孔支架 生物降解性 制备方法

1. 引言

组织工程是应用生命科学和工程学的原理和方法, 在正确认识哺乳动物的正常和病理两种状态下组织结构与功能关系的基础上, 研究、开发用于修复、维护、促进人体各种组织或器官损伤后的功能和形态的生物替代物的一门新兴学科^[1-3]。组织工程学的基本方法是首先分离培养相关的细胞, 然后将一定量的细胞种植到具有一定空间结构的三维支架上, 再将此细胞支架复合物植入体内或在体外培养, 通过细胞之间的粘附、生长繁殖分泌细胞外基质, 从而形成具有一定结构和功能的组织或器官^[4-6]。

近年来, 随着细胞生物学、分子生物学及生物材料学研究的突飞猛进, 组织工程作为一门新兴的交叉学科在其研究和应用方面也取得了很大的进展。目前组织工程研究的领域主要有皮肤组织工程, 骨、软骨组织工程, 神经、肌腱组织工程等, 其中骨组织工程的研究是最活跃的领域之一。骨组织工程的研究和应用将会克服现有骨缺损修复中自体骨移植来源少、异体骨移植存在排斥反应的问题和不足, 预期它将为骨缺损修复带来美好的前景。但是骨组织工程研究中还存在许多困难, 其中理想的细胞外支架材料的选择和制备是骨组织工程研究中急需解决的困难。

2. 组织工程对支架材料的要求

理想的骨组织工程支架材料的要求有^[7-8]: (1)良好的生物相容性: 除满足生物材料的一般要求, 如无毒、不致畸之外, 还要有利于种子细胞的粘附、增殖, 降解产物对细胞无毒害作用, 不引起炎症反应, 有利于细胞的生长和分化。(2)良好的生物降解性: 支架材料在完成支撑功能后应能降解, 降解速率应与骨组织细胞生长速率相适应。(3)具有三维立体多孔结构: 支架材料可加工成三维立体结构, 孔隙率高, 最好达 90%以上, 具有高的比表面积。这种结构可提供宽大空间, 利于细胞粘附生长、细胞外基质沉淀、营养和氧气进入、代谢产物的排出, 也有利于血管和神经长入。(4)可塑性和一定的机械强度: 支架材料具有良好的可塑性, 可预先制作成一定形状, 并具有一定的机械强度, 为新生组织提供支撑, 并保

持一定时间直至新生组织具有适当力学特性。(5) 良好的材料-细胞界面: 材料应提供良好的材料细胞作用界面, 利于细胞粘附、生长, 更重要的是能激活细胞特异基因表达, 维持正常细胞的表型表达。

3. 目前常用的骨组织工程支架材料

目前用于组织工程支架的材料很多, 按来源主要分为两大类: 一类是天然生物材料; 另一类是人工合成材料, 其中包括无机材料和有机高分子材料。

3.1 天然生物材料

天然生物材料主要有胶原(collagen)、珊瑚(coral)、藻酸盐(alginate)、几丁质(chitin)、硫酸软骨素(chondroitin sulfate)、纤维蛋白凝胶(fibrin)、骨基质明胶(bone matrix gelatin)以及经物理、化学或高温处理的动物骨等。现在研究主要集中于采用脱细胞技术制造的天然细胞外基质(extracellular matrix, ECM)。天然 ECM 内往往包含细胞表面受体的特异识别位点, 不易引发受体的免疫排斥反应, 还可能存在着某些复合生长因子, 可诱导调节细胞的生长和分化等, 解决了人工合成材料在孔隙、孔径等方面的制作难题。但也存在来源不足、传播某些传染病隐患、抗原性消除不确定以及力学强度不足、降解过快等缺陷^[9]。

3.2 人工合成材料

3.2.1 无机生物材料

人工合成无机生物材料主要指生物活性陶瓷, 它被认为是生物相容性最好的骨组织替代材料之一。包括生物活性玻璃(bioactive glass, BG)、羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)、磷酸三钙(tricalcium phosphate, TCP)等。其中 HA 和 TCP 应用最为广泛。目前人们又研制出一种自固化磷酸钙(self-curing calcium phosphate, CPC), 它具有生物相容性好、操作方便、塑形容易、性能稳定的特点, 在人体环境下可自行硬化, 结晶为 HA。Yoshikawa^[10]CPC-BMSC 复合体有较好的成骨作用。但磷酸钙陶瓷主要不足有: (1) 力学性能差、脆性大、抗折强度低、不能承重, 只能用于不承重的骨缺损; (2) 缺乏诱导活性, 材料植入骨缺损区只能靠骨传导作用使骨组织生长, 骨生长量少, 需时长, 骨深入深度有限, 不适合修复长段骨的缺损; (3) 降解速度难以控制, 不能与新生骨生长速度匹配。

3.2.2 有机高分子材料

人工合成有机高分子材料主要有聚乳酸(polylactic acid, PLA)、聚乙醇酸(polyglycolic, PGA)、聚偶磷氮(polyphosphazenes)、聚原酸酯(polyorthoester, POE)、聚氧乙烯/聚氧丙烯共聚物(Pluronic)等。其中 PLA、PGA 及其共聚物 PLGA, 应用最为广泛, 可通过调节共聚物中两种单体的比例, 制备出具有高内表面张力和不同机械性能和降解速率的组织工程支架, 用做软骨组织工程支架的共聚物中单体比例以接近 50: 50 较佳^[11]。但 PGA、PLA 也有一些问题: (1) 亲水性不足, 细胞粘附力较弱; (2) 引起无菌性炎症: 临床上 PLA、PGA

的应用过程中发现患者出现非特异性无菌性炎症反应率较高, 约为 8%^[12-13]。目前认为无菌性炎症的原因可能与聚合物降解过程中酸性降解产物引起局部 PH 值下降有关^[14]。(3) 机械强度不足;(4) 其它: 如聚合物中残留的有机溶剂对细胞有毒害作用, 和可能引起的纤维化与周围组织的免疫反应等问题^[15]。

从以上介绍可以看出单一的材料难以满足骨组织工程细胞外支架材料的要求, 通过合适的方法将几种材料组合, 在性能上互相取长补短, 形成复合材料可取得良好效果。将碳酸钙、碳酸氢钙、羟基磷灰石引入聚乳酸、聚乙醇酸及其共聚物中以防止无菌性炎症的发生^[16]。为了弥补聚乳酸、聚乙醇酸共聚物抗压强度不足的缺陷, 将羟基磷灰石加入其中得以提高材料的抗压强度^[17]。李立华^[18]等在聚乳酸中共混壳聚糖改变了聚乳酸的疏水性和降解速度, 同时降低无菌性炎症的发生率。针对多孔 β -磷酸三钙陶瓷缺乏骨诱导能力, 将其复合骨形成蛋白, 使之具有骨诱导特性^[19]。胶原与羟基磷灰石复合可改善胶原的机械性能^[20]。总之, 复合材料用于骨组织工程支架材料方面显出巨大潜力。

4. 骨组织工程支架的制备方法:

在组织工程重建修复组织的研究中, 支架材料是先导。研究表明支架中孔的形状、大小和孔隙率直接影响着种植细胞的迁移、分化和繁殖^[21], 而这些因素则随制备方法的不同而有很大的变化, 加工质量直接关系到新组织功能的优劣。制备支架的方法多种多样, 各有优点, 但没有一种方法能同时满足所有组织的要求, 需根据不同的病损部位进行选择^[22]。下面简要介绍一下常用的制备方法:

4.1 纤维粘结法:

以 PGA 纤维作为支架材料是组织工程中最先采用的一种方法。以 PGA 或 PLGA 纤维构成的骨架的优点是表面积大, 有利于细胞的粘附和养分的扩散, 故对细胞存活和生长有利; 缺点是内部结构稳定性不好, 对此可加以改进。一种方法是纤维固定技术, Mikos 等早期是将 PGA 纤维浸入到 PLLA 的氯仿溶液中, 待溶剂挥发后, PGA 纤维网嵌入到 PLLA 中。将混合物加热到两种聚合物的熔点以上, PLLA 首先熔融, 充满 PGA 纤维网络的所有空洞。PLLA 的作用是稳定 PGA 纤维和防止 PGA 开始熔融时纤维网络结构塌陷。经一定的热处理, 交叉点的 PGA 纤维经熔融物理结合在一起, 选定一种只能溶解 PLLA 的溶剂将其溶解, 即可得到高度多孔网状结构。采用这种技术制得的多孔网状结构孔隙率和孔直径分别高达 81% 和 500 μ m。第二种方法是通过雾化和喷雾对纤维表面进行涂层^[23]。PLLA 或 PLGA 溶解于氯仿中, 将溶液以雾状喷涂到 PGA 纤维网表面。由于 PGA 在氯仿中的溶解性较差, 在这一过程中纤维形态基本保持不变。溶剂挥发后形成一涂层。这种复合结构综合了纤维的力学性能和 PLA 的表面特性。尽管对孔隙率的大小没有报道, 但孔尺寸与前一种方法制备的粘结纤维的孔尺寸相近。尽管纤维粘结技术能够产生相互连通并适用于组织再生的高度多孔支

架,但以上两种方法都需用到有机溶剂,支架必须真空干燥数小时,这对临床的随时应用造成一定的困难;并且第一种方法还包括将纤维网高温加热。有机溶剂的存在和高温对加工过程中引入生长因子类的生物活性因子和细胞是非常不利的。

4.2 溶液浇铸/粒子沥滤

溶液浇铸/粒子沥滤技术的优点是可形成孔径和孔隙率可控的聚合物骨架。该技术使用水溶性的致孔剂,例如氯化钠。其方法是将聚合物(PLLA 或 PLGA)溶解在 CH_3Cl 或 CH_2Cl_2 中,然后将溶液浇铸到充满致孔剂的培养皿上。待溶剂挥发后,将聚合物/盐混合物在水中沥滤两天以去掉致孔剂,从而得到不含粒子的聚合物骨架。骨架的孔隙率由所加盐的用量来控制,孔的直径由盐晶粒的大小决定。当盐的重量百分比达到或超过 70%时,孔与孔之间高度相互连通。将采用这一技术制备的泡沫材料应用于不同类细胞的培养,并未观察到材料对新组织的形成有任何不良的影响^[24—25]。然而泡沫暴露在空气中外侧部分比浸润在培养皿中的部分粗糙,即两部分具有不同的形态,故采用该技术不能制备太厚的骨架,一般在 2mm 以下。对此的改进是将块状的聚合物/盐混合物在高于 PLLA 的熔点或 PLGA 的玻璃化温度上模压成圆柱体形状,在混合物用水沥滤之前,将圆柱体切成所需厚度的片状,片状的聚合物/盐复合体经水沥滤后,采用层叠技术将片状骨架叠在一起,从而可更为精确的控制支架的厚度和提高泡沫表面的规整性。然而需要考虑模压过程中聚合物的热降解问题。Shastri^[26]等最近报导了溶液浇铸/粒子沥滤的另一种形式,用含碳的碳氢化合物做致孔剂制备的 PLLA 和 PGA 泡沫孔隙率高达 87%,孔直径远超过 100 μm 。采用溶液浇铸/粒子沥滤技术需要用到有机溶剂,这在许多情况下排除了在支架形成过程中添加药物试剂的可能性并且滤出水溶性粒子会明显增加制备支架的时间。尽管这样,在实际应用中,仍可采取比较适当的方法预制细胞—聚合物复合体,并且采用这种泡沫材料进行各种细胞的体外培养,已获得大量有意思的结果,因此该方法越来越引起人们的重视。

4.3 熔融成型

该技术与粒子滤出类似,但不使用有机溶剂,故所制备的骨架可用于生物活性分子的控制释放;并且可以构造结构复杂的三维骨架^[27]。如将 PLGA 粉末与明胶粒子混合物放在四氟乙烯模具中,将模具加热到超过 PLGA 的玻璃化温度,加压使 PLGA 和明胶粒子结合在一起。冷却后将复合物放入水中,明胶粒子溶解后得到 PLGA 骨架。可通过改变明胶粒子的大小和明胶/PLGA 的比例对孔结构加以控制。

4.4 气体发泡

气体发泡技术采用气体作为致孔剂,在致孔过程中不使用有机溶剂^[28]。方法是:在加热模具中通过模压成型制备 PGA、PLLA 或 PLGA 固体片材。将这些固体片材置于高压 CO_2 (5.5Mpa) 室内三天,然后使压力快速下降到大气压强,使聚合物中形成气穴。所得支架的孔隙率高达 93%,孔直径达 100 μm 。该技术的优点是不需滤除过程,也避免了使用有机

溶剂,但形成的泡沫中的孔与孔之间大多数是非连通的。固体片材形成过程中所需高温妨碍了细胞或生物活性分子的引入,非连接性的孔结构使得细胞在泡沫中的种植和移动变得困难。最近 Nam 等^[29]报道了采用气体作为致孔剂的另一种途径。这一技术同时包括气体发泡和粒子滤出两步。将碳酸氢铵加入到聚合物 CH_2Cl_2 或 CHCl_3 溶液中,得到的聚合物十分粘稠,可通过手工或模具成型。待溶剂挥发后,将混合物真空干燥或浸入到热水中。真空干燥使碳酸氢铵升华,而浸入温水中可使气体放出和粒子滤出同时进行。采用第二种方法因不会出现泡沫表面无孔的结果而优于第一种方法。采用该技术制备的支架材料的孔隙率达 90%,孔直径在 200—500 μm 范围内。然而有机溶剂的使用和残余碳酸氢铵对细胞的长期影响,妨碍了这类支架在组织工程临床中的尽快应用。

4.5 相分离/乳化

另一种制备多孔聚合物支架的技术是引入相分离的概念,而不是引入致孔剂。它包括乳化/冷冻干燥和液—液相分离^[30—32]。第一种方法是 PLGA 溶于二氯甲烷后,加入蒸馏水形成乳状液,将聚合物/水混合物浇铸到模具中,置于液氮中骤冷。然后将支架于零下 55℃ 下冷冻干燥,真空蒸发掉分散的水和聚合物溶剂,采用该技术制备的支架孔隙率高达 95%,但形成孔的直径较小(13—35 μm)。孔隙率和直径的大小主要决定于聚合物溶液/水的比例及乳状液的粘度,因为这些参数在骤冷之前可影响乳状液的稳定性。因此,对这些参数进行调控,可望提高孔的尺寸。该技术有许多优点,但有机溶剂的使用限制了细胞和生物活性分子的引入。同时考虑到该技术所得到的孔尺寸较小,表明这一技术目前在组织工程领域中的应用还存在局限性。液—液相分离运用热力学的原理,在聚合物溶液中形成聚合物富相和聚合物贫相,除去聚合物贫相,可得到高度多孔的聚合物网络。采用热致相分离技术已制得了 PLLA 和 PGA 支架。

4.6 三维印刷法

这是一种利用计算机辅助设计生产技术制备组织工程支架的方法。将组织或器官损伤部位的解剖外形扫描进入计算机,再在计算机辅助下制备具有特定外形的支架。以 PLLA 为原料,将一层 PLLA 与 NaCl 的混合粉末铺于粉末床上,并滴氯仿溶剂于其上,完毕后,将另一层粉末铺于第一层上,这两层间由于氯仿的关系而粘连起来。如此层层叠盖,直达到达所需的尺寸。溶剂挥发,盐粒用水洗出。孔的尺寸可由氯化钠颗粒大小调控。合成聚合物必须溶解在其溶剂中才可使用这种方法,这限制了支架对生物活性物质的加载。

纵观以上所介绍的制备支架的方法,它们都存在着各自的不足,如何能将各种方法的优势结合在一起,制备出既能释放生物活性物质,又符合理想支架基本要求的组织工程支架是现在人们集中研究的热点。

5. 结论

本文对骨组织工程细胞外支架材料和支架的制备技术进行了综述,预示了在组织工程中采用这些技术构建支架细胞-复合体具有广阔的应用前景,然而本文所提到的一些方法都存在这一些不足,故组织工程多孔支架材料构建技术还有待于进一步改进和完善。只有达到了临床设计所要求的标准,采用组织工程技术构建的组织才有望广泛地应用于器官和组织缺损的病人。相信随着各相关学科的不断发展,必能克服前进中存在的问题,为该技术的临床应用提供广阔的前景。

参考文献

- (1) Nerem R.M., Cellular Engineering, Ann. Biomed. Eng., 1991.19:529
- (2) Nerem R.M., Tissue Engineering in the USA, MED. Biol. Eng. Comput., 1992.30:81
- (3) Langer R., Tissue Engineering. Science, 1993.26(5110):920
- (4) Cima L.G., Tissue Engineering by Cell Transplantation Using Degradable Polymer Substrates. J. Biomech. Eng., 1991.113:143
- (5) Matsuda T., Development of Hybrid Compliant Graft: Rapid Preparation Method for Reconstruction of Avascular Wall. ASA 10 Trans., 1989.25:553
- (6) Mow V.C., Experimental Studies on Repair of Large Osteochondral Defect at a High Weight Bearing Area Other Knee Jointing, a Tissue Engineering Study. J. Biomech. Eng., 1991.113:198
- (7) Freed CE, Vunjak-Novakovic G, Iron KJ. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering N.Y. 1994.12(7):689-693
- (8) Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. Trend Biotechnol 1998,16(5):224-231
- (9) 颜晓慧. 骨组织工程应用可降解聚合物的可能性探讨. 国外医学生物医学工程分册, 2000.23(1):11—17
- (10) Yoshikawa T, Suwa Y, Ohgashi H et al. Selfsetting hydroxyapatite cement as a carrier for bone-forming cells. Biomed Mater Eng, 1996.6(5):345—351
- (11) Agrawal CM, Athanasiou KA. Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA—PGA implants. J Biomed Mater Res, 1997.38(2):105—114
- (12) 郭昭庆, 党耕町, 王志国等, 种植骨髓基质细胞的骨组织工程学研究. 中华外科杂志, 1999, 37(7): 395—397
- (13) Boyde A, Corsi A, Quarto R, et al. Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: Evidence for a complementary integration and desintegration mechanism. Bone, 1999,24:579-589
- (14) Kirker-Head CA, Gerhart TN, Armstrong R, et al. Healing bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2 and copolymer. Clin Orthop 1998,349:205-217
- (15) Sittlinger M, Reitzel D, Devner M, et al. Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. J Biomed Mater Res, 1996,33:57-62
- (16) Agrawal E, Athanasiou KA. Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants. J Biomed Mater Res 1997,38(2):105-114
- (17) Sims CD, Butler PE, Cao YL, et al. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer Substrates and chondrocytes. Plast Reconstr Surg 1998,101(6):1580-1585

- (18) 李立华. 聚乳酸/甲壳素类复合材料的制备及应用研究. 李立华硕士学位论文
- (19) 王士斌等. 骨形成发生蛋白/多孔 β -磷酸三钙陶瓷复合人工骨. 中国陶瓷 1999, 35 (6)
- (20) K.Hirota, K. Nishihara, H. Tanaka. Biomed Mater Engin 1993,33:147
- (21) Li Y, Ma T, Yang S T, et al. [J]. Biomaterials, 2001,22: 609---618
- (22) 俞耀庭, 王身国, 宋存先, 等, 生物医用材料[M]. 第一版, 天津: 天津大学出版社, 2000. 48—98
- (23) Moony DJ, Mazzoni CL, Breuer C, et al. Stabilized polyglycolic acid fiber-based tubes for tissue engineering [J]. Biomaterials, 1996, 17: 115—124
- (24) Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, et al. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds [J]. J Biomed Mater Res, 1997,36: 17-28
- (25) Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ, et al. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers [J]. Biomaterials,1998,1405—1412
- (26) Shastri VP, Martin I, Langer R. Macroporous polymer foams by hydrocarbon templating [M]. Proceedings of the National Academy of science, USA. 2000,97:1970—1975
- (27) 高建平, 马朋高, 于九皋, 等. 组织工程与生物可降解高分子骨架[J]. 高分子通报, 2000, 4: 89—95
- (28) Mooney DJ, Baldwin DF, Suh NP, et al. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents [J]. Biomaterials,1996,17: 1417—1422
- (29) Nam YS, Yoon JJ, Park TG. A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive [J]. J Biomed Mater Res,2000,53: 1---7
- (30) Nam YS, Park TG. Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally phase separation [J]. J Biomed Mater Res, 1999, 47: 8---17
- (31) Schugens C, Maquet V, Grandfils C, et al. Polylactide macroporous biodegradable implants for cell transplantation II. Preparation of poly-lactide foam for liquid-liquid phase separation [J]. J Biomed Mater Res,1996, 30: 449—461
- (32) Nam YS, Park TG. Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation methods [J]. Biomaterials, 1999, 20: 1783—1790

Fabrication and Characterization of the Porous Scaffolds for Tissue Engineering

Wu Jingmei Wu Ruofeng

Department of Polymer Materials,
School of Material Science and Engineering,
Shanghai University, Shanghai, PRC, 201800

Abstract:

The selection and fabrication of the degradation porous scaffolds is the key factors in the application of the tissue engineering technique. The paper summarized the study of the tissue engineering and the biodegradation scaffolds from the materials requirement、the favorite used materials and the fabrication of the scaffold and previewed the prospect of this study.

Keywords: tissue engineering porous scaffolds biodegradation fabrication