

聚羟基酯与骨组织工程

毛津淑 姚康德*

(天津大学材料科学与工程学院 天津 300072)

摘 要 组织工程的发展,对作为人工细胞外基质(ECM)的生物材料提出了挑战。本文阐述了理想骨再生组织工程用生物可降解支架的研制要求,重点介绍了聚羟基酯类聚合物作为生物可降解支架原材料的优缺点和加工方法,强调了在其表面进行相应的仿生修饰,从而实现人工 ECM 智能化。因此,以聚乳酸类可降解生物材料为主要成分且,有利于成骨细胞粘附、生长和分化的生物支架材料,在组织工程研究领域具有诱人的应用前景。

关键词 聚羟基酯 骨组织工程 可降解生物支架 表面修饰

Poly(α -hydroxy ester) and Bone Tissue Engineering

MAO Jinshu, YAO Kangde

(Institute of Materials Science and Engineering, Tianjin University Tianjin 300072)

Abstract With the development of tissue engineering, there is an urgent challenge to improve the property of biomaterials for artificial extracellular matrix materials. In this paper, the requirements of ideal materials for biodegradable scaffolds were introduced. Poly(α -hydroxy ester) can meet these requirements. Their advantages and disadvantages, methods of production, especially surface bionic modification of these materials were described. Therefore the new biodegradable scaffolds, consisting mainly of polylactic acid which can promote osteoblasts adhesion, development and differentiation, will play a bright prospect in the future study.

Key words Poly(α -hydroxy ester), Bone tissue engineering, Biodegradable scaffold, Surface modification

骨折和骨组织损伤是一项重大的医学健康问题,在美国每年这样的外科手术有 130 万次^[1]。现行的骨修复技术包括自体 and 异体骨移植技术,但由于数量和价格的限制,大多数人得不到应有的治疗,如表 1^[2]列出了美国骨移植的状况。随着生命科学以及物理、化学、材料科学的发展,人们采用组织工程学技术,开发和研究了用于修复和改善人体组织及器官的功能和形态的方法,其基本方法是将体外培养的高浓度的组织细胞吸附在可生物降解的三维支架上,这种生物支架的作用是作为细胞支架和引导组织再生。三维多孔合成结构物质可作为细胞生长和增殖的基质,将细胞-支架复合物植入体内,通过细胞间的相互粘附、细胞的增殖和分化,细胞将分泌细胞外基质(ECMs),并最终形成新的组织,在其形成过程中,支架逐步降解吸收并被新的组织代替^[3];

毛津淑 女, 29 岁, 博士生, 现从事生物医学工程的研究。 * 联系人
国家重点发展规划项目资助(G1999054305)
2000-06-09 收稿

另一种方法为引导细胞再生 (GTR) 是将聚合物支架直接植入人体, 使周边组织的细胞沿基体表面迁移, 进入支架内部, 从而形成新的组织^[4]。这两种组织工程方法的成功一定程度上依赖于人工 ECMs 的性能。骨组织工程需要的 ECM 材料, 具有以下有利于骨再生的特殊性能: (1) 具有良好的材料-细胞界面, 必须有利于成骨细胞的粘附、生长, 激活细胞特异基因表达, 由于成骨细胞是锚基依赖细胞即其生存需要支持基质, 作为基质材料必须提供适当的环境以维持正常的细胞功能, 同时要有利于血管组织的向内生长以保证移植细胞的存活; (2) 良好的生物相容性, 要求降解产物对细胞无毒害作用, 不引起炎症反应, 并防止其肿瘤化趋势; (3) 可控的生物可降解性, 材料的降解速度应与组织细胞的生长率相适应, 降解时间能根据组织生长特性调控; (4) 具有三维多孔结构, 材料孔隙率要达到 90% 以上, 而孔隙大小分布 ($\mu\text{m}\sim\text{nm}$) 适宜, 有利于细胞进入, 营养物和代谢物传输及细胞的基因表达; (5) 适宜的表面化学拓扑结构, 可促进细胞稳定; (6) 具有可塑性和一定的力学强度, 可预先制造成一定形状, 且可为新生组织提供支撑, 并保持一定时间直至新生组织具有自身生物力学性能^[5]。胶原海绵、生物陶瓷等均可用做生物支架。但胶原海绵缺乏一定的力学强度且其降解速度与酶有关; 而陶瓷支架的降解速度较慢, 脆性大且对新生骨的性能有影响。比较而言, 聚羟基酯类聚合物, 包括聚乳酸 (PLLA, PDLA)、聚乙醇酸 (PGA)、聚乳酸与聚乙醇酸共聚物 (PLGA) 的组成、分子量、表面微结构、微孔特性、力学性能、降解时间均可被预先设计, 可用作骨组织工程的支架。

表 1 美国骨移植状况表

美国年骨折发生量/人次	6,200,000
美国年骨移植量/人次	大约 500,000
自体移植量/人次	大约 350,000
异体移植量/人次	大约 150,000
平均移植费用/\$	5,000
总医疗费用/\$	2,500,000,000

1 聚羟基酯类聚合物

聚羟基酯类聚合物, 都具有良好的生物相容性, 并可以可控速度降解, 进入新陈代谢。PLLA 在体内经水解脱脂后生成乳酸, 经乳酸脱氢酶的作用氧化成丙酮酸, 丙酮酸可合成葡萄糖, 参加基体新陈代谢, 最后成为 CO_2 和 O_2 , 经皮肤等处排出体外。PGA 由其自身的环己交酯制成, 在体内降解后生成羟基乙酸, 也可参加体内代谢排出。这些材料的降解速度, 可以从几周到几年^[6]。这种材料的支架具有很高的细胞种植密度, 植入体内后不影响周边组织与移植细胞间的因子传递, 同时促进新组织的血管形成。

2 聚羟基酯类支架

应用于组织工程的多孔三维聚羟基酯海绵支架的制造方法如表 2:

表 2 多孔三维聚羟基酯海绵支架的制造方法

	溶剂浇铸法 ^[6]	CO ₂ 气体法 ^[7]	热致相分离法 ^[8]	编织成型法 ^[9]
加工方法	在聚合物溶液中加入盐晶体后, 置于模具中并加热, 冷却后将盐份滤除, 形成三维支架	采用高压 CO ₂ (5.5MPa) 在室温下经 72h 达溶解饱和后, 将气压降至大气压水平, 聚合物中 CO ₂ 溶解度迅速下降, 形成气腔, 最终形成多孔结构。	在沸点将聚合物制成均匀的溶液后, 于液氮中骤冷, 形成相分离。	将聚合物通过挤压成 10~15 μm 的纤维, 再通过编织加工技术形成编织状或无纺状结构。
孔隙率/%	94	93	93	97
孔径/μm	150	100	1~30	160~270
特点	应用最广, 加工容易	无溶剂残留, 有利于负载生长因子, 促进细胞生长。	孔径小, 力学性能好。	可制造成各种形状, 特别适于制造肌腱和韧带。

Mikos 等^[10]将 PLLA 海绵支架在酒精中浸泡, 然后将软骨细胞种植于其中, 以获得一个均匀分布的细胞种植体。这种新材料具有更强的吸水性, 可以吸附细胞生长繁殖, 并有利于产生血管化的新生组织, 使之向三维方向发展。

3 聚羟基酯支架改性

聚羟基酯生物支架的改性主要集中在三方面: (1) 材料表面仿生修饰以解决聚羟基酯缺乏生物信号的缺点; (2) 通过表面处理或共混改性调节聚羟基酯的降解速度; (3) 制备增强型复合材料以提高聚羟基酯的力学性能。

3.1 表面仿生修饰

将聚羟基酯生物支架植入体内往往由于免疫反应引起噬菌作用, 会形成纤维性胶囊, 出现无菌性炎症。当生物材料进入人体, 其表面最先与肌体环境接触, 所以表面性能决定了肌体对植入物的反应。

细胞是粘连在生物分子构成的 ECM 上发挥其粘附、迁移、分化和增殖功能, ECM 作为组织空间促使营养物质和代谢物扩散和通透, 亦是细胞因子和生长因子的存储器, 并能将其向相邻细胞释放。与天然生物材料相比, 聚羟基酯作为人工 ECMs 材料最大的缺点是缺乏细胞识别信号, 不利于细胞特异性粘附及特异基因的激活。将功能集团、糖、蛋白质和寡肽结合在聚羟基酯基材表面, 可促进其与细胞间的特异响应。聚合物表面改性的方法有很多种, 如: 化学氧化蚀刻技术、等离子体放电、辐射和紫外接枝氧化技术。这些方法为进一步在材料表面的修饰创造了条件。通过配体-受体间的识别反应, 可使人工 ECMs 对目标细胞具有识别和特异性, 从而实现人工 ECMs 智能化。

3.1.1 蛋白吸附^[11] 为增强聚羟基酯表面粘附细胞的迁移性能, 可连接基质粘附蛋白(胶原或明胶)和加入第二衍生蛋白粘连蛋白, 以促进细胞向支架内长入和迁移。但细胞衍生胶原蛋白和基质粘附粘连蛋白并不能促进细胞迁移。

3.1.2 寡肽改性^[12] 在材料表面通过共价键连接含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸的促进细胞粘附的寡肽(RGD), 可有效提高细胞在材料表面的粘附, 促进其繁殖代谢。PLLA 和 PLGA 的缺点在于没有化学功能团与其它分子发生反应。将 PLLA 与赖氨酸共聚(PLAL), 使支架表面具有可与寡肽反应的氨基。牛主动脉内皮细胞在连有寡肽的 PLAL 表面的生物行为, 与在血清涂层的

聚苯乙烯表面相似, 这证明了 RGD 可模拟血清蛋白。因此, PLLA 可制造能与细胞通过化学信号结合且具有生物降解性的支架。

3.1.3 用 NaOH 处理 PLLA 表面^[13] 用 NaOH 简单处理无纺 PGA 布表面, 可增强光滑肌细胞的粘附和迁移。用 NaOH 处理 PLLA 表面可提高基体表面湿润性。通过聚羟基酯链上酯键的水解, 可使羟基和羧基化酸末端富集于基体表面。已证实, 细胞粘附量随基体表面组成中功能基团中氧原子的含量的增加而增加。随着 NaOH 处理时间的延长, PLLA 表面变得更加亲水。经 NaOH 处理的 PLLA 表面比未经处理的表面可粘附更多的细胞。此方法克服了等离子体放电和紫外技术在处理多孔材料内孔时的局限, 但其缺点在于处理表面的均匀性尚待改善。

3.1.4 生物矿化层 生物活性陶瓷如烧结羟基磷灰石 (HA) 和磷灰石-钙硅石 (A-W) 可用于骨临床修复。这些生物活性陶瓷, 在体内通过陶瓷表面形成的一层似骨的磷灰石层与骨键合。这层磷灰石的特征是含有碳酸盐, 结晶细小且有缺陷。在生物惰性材料与骨之间无此磷灰石层。所以, 似骨磷灰石层可能是骨与生物活性陶瓷键合的关键。多孔聚羟基酯/磷灰石共混物可通过相分离法制备。Ma 等^[14]第一次成功地在多孔材料内孔表面形成了磷灰石粒, 所形成的磷灰石与似骨磷灰石相似。它与骨的键合性能良好, 使造骨细胞和骨祖细胞有良好的粘附和生长环境。

Murphy 等^[15] 利用 PLGA 多孔支架内孔构建了具有良好生物相容性和力学性能的似骨矿化层 (BLM)。它在体内可传导骨生长, 且可被吸收, 这与羟基磷灰石不同, 因为羟基磷灰石不能被充分吸收。由于 PLGA 是线性聚酯, 便于水解, 形成荷负电表面, 通过负电荷与矿物生长溶液中钙离子的螯合作用, 使其表面钙化, 逐步形成连续的 BLM 层, 此矿化过程可一步完成, 有利于增强材料的生物和力学性能。由于可降解材料支架为多孔结构, 缺乏与骨相同的力学性能, 因此在聚合物结构内孔表面形成连续的 BLM 层可赋予支架刚韧性, 从而提高材料抗压模量达到 $3.2 \pm 0.6 \text{ MPa}$, 同时材料的孔隙率变化不大, 这利于细胞长入和血管形成。

3.1.5 表面平行微沟槽结构 聚合物材料的表面拓扑结构对于控制细胞的生长和取向有重要作用。Jansen 等^[16]采用光-蚀刻技术在 PLLA 表面构建平行微沟槽微结构, 其深度为 $0.5 \sim 1.5 \mu\text{m}$, 宽度为 $1 \sim 10 \mu\text{m}$ 。实验证明此拓扑结构可有效地促进骨再生, 因此显微结构利于矿化基质的沉积和成骨细胞的分化。

3.1.6 生长因子 Leong 等^[17]合成的 PLLA 三维多孔结构, 可模拟 ECM, 并释放生长因子。实验中 PLLA 海绵由相分离法制备, 利用疏水性有机溶剂萘升华的特点, 在泡沫中包入生长因子并释放, 以利于细胞保持良好的功能。例如, 包入血管紧缩素缩氨酸并释放, 将促进血管的形成, 而骨形态蛋白 (BMP) 的释放可促进骨的生成。Hollinger 等^[18]研究表明 BMP 对骨再生有重大的影响。BMP 是一类形态控制分子, 目前对其研究发展迅速, 现已开发了从 BMP-1 到 BMP-15 共 15 种。BMP 提供基因促进骨形成和重建, 制备负载 BMP 的聚羟基酯生物支架, 有助于骨组织的再生。

3.1.7 细胞特异表面 鉴于含有 PEO 聚合物表面可有效地减少细胞与疏水表面的吸附作用, 因此可通过 PEO 水弥散层构建细胞特异性表面。由于 PEO 具有水溶性和液相活动性, 如在 PEO 末端连接上特定的活性配体, 可通过配体与细胞的特异结合, 从而达到支架的特定区域对目标细胞的特异性粘附。Griffith 等^[19]采用一种三维印迹技术 (3DPTM), 用 PEO-PPO-PEO 改性 PLLA

表面, 达到细胞特异性粘附的目的。

3.2 共混改性调节聚羟基酯的降解速度^[20]

磷酸三钙 (TCP) 是一种可与 PLLA 有效共混的生物陶瓷, TCP 作为 PLLA 的降解控制剂, 可中和 PLLA 降解产生的乳酸。将其与 PLLA 共混可抑制 PLLA 的降解, 提高复合物植入初期的力学性能, 随 TCP 含量增加, 降解时间加长; 但 TCP 含量过高聚合物将变脆, 因此其含量要适当。通过 TCP 调控 PLLA 的降解速度, 使长骨生成速率与生物体对材料的吸收速率相匹配, 从而提高植入物的生物相容性。

3.3 共混改性提高聚羟基酯复合材料的力学性能^[21]

保持骨的生物力学性能是骨组织工程的重要研究方向。采用多孔生物可降解支架可提供早期力学支撑并引导成骨细胞在移植部位生长, 促进新骨形成。然而, PLLA 由于抗压强度较低, 其支架不能用于承载硬骨组织重建。将具有生物活性的磷酸钙与 PLLA 共混会有效地提高支架的力学性能和生物活性。羟基磷灰石 (HA) 可被生物吸收且可促进骨生成提高骨整合性。早期研究表明, 采用纤维代替粒子增强聚合物可得到力学性能良好的无孔复合材料。Thomson 使用羟基磷灰石短纤维增强, 制造孔隙率较大 (65%) 且力学性能好 (抗压强度 2.83Mpa) 的支架。

近期, Furukawa 等^[22]采用 HA-PLLA 复合材料制备高强度骨折固定材料, 其弯曲强度达 280MPa, 弹性模量为 12GPa, 且其弯曲强度可保持 200MPa 以上 25 周, 植入物周围无炎症细胞存在, 说明此材料生物相容性良好。

4 结束语

组织工程的发展促使生物材料向智能化方向发展。通过表面仿生技术可使人工 ECMs 模拟细胞外基质的微环境, 有利于成骨细胞粘附、生长和分化。通过配体-受体间的特异性反应可达到对目标细胞的特异性粘附。通过调节不同层面的聚羟基酯的降解速度, 可制备梯度降解复合材料。由此可见以聚羟基酯类可降解生物材料为主要成分的生物支架材料, 在组织工程研究领域具有诱人的应用前景。

参考文献

- [1] Langer R, Vacanti J. Science, 1993, 260(5110):920~926.
- [2] Laurencin C T. Proceeding of "The Crocher Advanced Study Institute on Engineering of Musculoskeletal Tissues.", Hong Kong, 2000:75~88.
- [3] Crane G, Ishaug S, Mikos A. Nature Med., 1995, 1:1322~1324.
- [4] Cottlow J, Nyman S, Karring T. J. Clin. Periodontol., 1992, 19:315~317.
- [5] Kim B S, Mooney D J. Trends Biotechnol., 1998, 16(5):224~230.
- [6] Huttmacher D, Hurzeler M B, Schliephake H. Int. J. Oral. Maxillofac. Implants, 1996, 11:667~678.
- [7] Mooney D J, Baldwin D F, Sah N P et al. Biomaterials, 1996, 17:1417~1422.
- [8] Nam Y S, Park T G. Biomaterials, 1999, 20:1783~1790.
- [9] Laurencin F K. Proceeding of "The Crocher Advanced Study Institute On Engineering of Musculoskeletal Tissues.", Hong Kong, 2000:13~18.
- [10] Mikos A G, Lyman D, Freed L E et al. Biomaterials, 1994, 15:55~58.
- [11] Jjia J S, Aneskievich B J, Mogle P V. Biomaterials. 1999, 20:2223~2233.
- [12] Cook A D, Hrkach J S, Gao N N et al. J. Biomed. Mater. Res., 1997, 35:513~523.
- [13] Nam Y S, Yoon J J, Lee J G et al. J. Biomater. Sci. Polymer. Edn., 1999, 10(11):1145~1158.
- [14] Zhang R, Ma P X. J. Biomed. Mater. Res., 1999:285~293.
- [15] Murphy W L, Kohn D H, Mooney D J. J. Biomed. Mater. Res., 2000, 50:50~59.
- [16] Matsuzake K, Walboomers X F, Ruijter J E de. Biomaterials, 1999, 20:1293~1301.

- [17] Lo H, Kadiyala S, Guggino S E et al. J. Biomed. Mater. Res.,1996,30:475~484.
- [18] Hollinger J O, Leong K. Biomaterials, 1996,17:187~194.
- [19] Park A, Wu B, Griffith L G. J. Biomater. Sci. Polymer. Edn., 1998,9(2):89~110.
- [20] Fukuzawa Aya, Imai Yohji, Nagai Megumi et al. J. Biomater. Sci. Polymer. Edn., 1999,10(4):421~432.
- [21] Thomson Robert C, Yaszemski Michael J, Mikos Antonios G et al. Biomaterials, 1998,19:1935~1943.
- [22] Furukawa T, Matsusue Y, Nakamura T. Biomaterials, 2000,21:889~898.