

仿生骨组织工程材料的微纳制造与性能研究

杨高洁^{1,2}, 陈俊孚², 吴苏州², 李丽坤³, 刘昱⁴

(1. 华中科技大学材料科学与工程学院, 湖北 武汉 430074)

(2. 深圳晶莱新材料科技有限公司, 广东 深圳 518000)

(3. 广东省焊接技术研究所, 广东 广州 510650)

(4. 华中科技大学生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074)

摘要: 通过在植入材料表面构建仿生微纳结构, 可以为机体细胞提供有利的微环境, 从而提高细胞活性并促进组织修复。然而, 到目前为止仍没有一种有效的骨组织工程材料能在成分和结构上同时模拟天然骨。因此, 采用仿生矿化法复合微纳制造技术在仿生骨修复材料中构建了大规模可控的微纳结构, 并且首次在体内证明了该材料的成分和可控有序的微纳结构能够长效促进血管化骨再生。研究结果表明: 首先, 通过复合高分子模板实现对仿生矿化羟基磷灰石纳米颗粒(HANPs)形貌的调控, 而且微接触法将有序的微米图案大规模地整合入骨组织工程材料中; 其次, 大鼠间充质干细胞(rMSCs)在该仿生骨组织工程材料表面表现出高度取向生长, 其成血管分化和成骨分化表达增加; 同时, 构建的大鼠颅骨缺损模型也证明了该仿生骨组织工程材料能促进血管化膜内成骨。这为控制干细胞定向分化提供了一种先进的研究平台, 并为构建基于仿生微纳结构的新型仿生骨组织工程材料提供了有力的理论基础和实际依据, 具有潜在的临床应用价值。

关键词: 仿生; 微纳制造; 成骨分化; 血管化; 骨再生

中图分类号: R318.08; TN305.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2020)09-0691-10

Micro/Nano-Fabrication and Properties of Biomimetic Bone Tissue Engineering Materials

YANG Gaojie^{1,2}, CHEN Junfu², WU Suzhou², LI Likun³, LIU Yu⁴

(1. Department of Materials Science and Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

(2. Shenzhen Jinglai New Material Technology Co., Ltd., Shenzhen 518000, China)

(3. Guangdong Welding Institute, Guangzhou 510650, China)

(4. Department of Biomedical Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Integrating biomimetic micro-nano structure on implants surface can provide a favorable microenvironment for organism cell, so as to effectively increase the cellular activity and improve tissue repairing. However, there are few appropriate bone tissue engineering materials which could simultaneously simulate native bone in the aspect of composition and structure at present. Therefore, biomimetic bone tissue engineering materials with large-scale controllable micro-nano structures were prepared by combining biomineralization and micro/nano-fabrication in this work. Moreover, it was the first time to prove that their composition and controllable ordered micro-nano structure could facilitate the regeneration of vascularized bone. The results have shown that, firstly, mineralized hydroxyapatite nanoparticles (HANPs) with different microstructures were synthesized by different composite polymer templates. And, large-scale ordered micropatterns were integrated on the biomimetic bone tissue engineering materials by micro-contact method. Secondly, rat mesenchymal stem cells (rMSCs) cultured on the surface of biomimetic bone tissue engineering materials present highly orientated alignment. The angiogenesis and osteogenesis expressions of rMSCs increase. Meanwhile, we also found the biomimetic bone tissue engineering materials

promoting vascularized intramembranous ossification via a rat skull defect model. This work provides an advanced platform for manipulating directional differentiation of stem cells, as well as gives a theoretical and practical foundation for preparing novel biomimetic bone tissue engineering materials with micro-nano structures. It is a potential application for this materials in clinic.
Key words: biomimetic; micro/nano-fabrication; osteogenesis; angiogenesis; bone regeneration

收稿日期: 2019-06-01 修回日期: 2019-11-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81471792)

第一作者: 杨高洁, 女, 1984 年生, 博士,

Email: gaojiey1128@gmail.com

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.201906002

1 前言

天然骨是由以胶原蛋白为主的有机相和以低结晶度羟基磷灰石为主的无机相构成的复合矿物质,具有精妙的多层次有序结构。通过仿生矿化法合成的钙磷纳米粒子,不但可以在成分上接近天然骨,还能在纳米尺度上模拟天然骨的拓扑结构^[1-3]。近年来,许多研究通过微图案化法在生物材料表面构建微米尺度的拓扑结构^[4]。因此,通过模板诱导矿化自组装和微图案化相结合的制造技术,有望制备模拟天然骨的仿生微纳结构,为获得非生长因子依赖的复合骨组织工程材料提供有利条件,是具有较大意义的制备策略。

目前,有许多研究利用复合模板诱导仿生矿化和协同自组装,调节生物材料的微观结构与形貌,从而获得仿生纳米结构。这种可控的仿生纳米结构能够有效调控机体干细胞行为。现已有多种高分子材料可被用作钙磷晶体生长调控的矿化模板,促进磷酸钙的成核、生长,实现结晶产物尺寸和形貌的可控合成。从宏观上讲,促进矿化的分子模板,例如胶原蛋白、丝素蛋白、硫酸软骨素、海藻酸盐、合成多肽等^[5],其分子链段上的酰胺基团、侧链上的氨基和羟基对 Ca^{2+} 具有一定的吸附结合能力,可以促进磷酸钙成核结晶。然而,一些抑制矿化的酸性蛋白分子模板,例如牙釉质蛋白 1、多聚天冬氨酸^[6]等,其分子侧链上带有的大量羧基会竞争性结合并屏蔽 Ca^{2+} ,阻止其与 PO_4^{3-} 有效结合,进而抑制磷酸钙的成核。因此,可以通过选择促进或抑制矿化的高分子模板调控矿化钙磷纳米粒子的形貌。

有序的微米拓扑结构,可以调控细胞独特或有序的生长形态,以模拟原生机体组织中的细胞排列,从而潜在性地激发细胞定向分化^[7,8]。随着现代生物材料种植体的发展,基于微图案化的可控表面设计被认为可实现对机体细胞行为的调控,并对植入体在机体环境中的骨整合起着至关重要的作用^[9-12]。体外研究表明,微图案结构(如微米或纳米的槽、脊、壁龛或柱阵列)可调节细胞的粘着、肌动蛋白聚合和进一步分化^[9,10,13,14]。此外,在基底材料表面整合微图案化的颗粒或分子(如细胞外基质蛋白),也被认作是指导细胞行为的有效方法^[15,16]。细胞与材料基质的相互作用会影响黏着斑的分布和肌动蛋白的聚合,从而细胞骨架动力学途径刺激细胞活性,最终实现定向分化。例如,在线性或矩形微图案上生长的具有细长形态的干细胞,可以分化为成骨细胞或心肌细胞^[17,18];在方形微图案上生长的干细胞由于牵引力的减小从而分化成脂肪细胞;而在网格状微图案上生长的干细胞由于细胞间特殊的相互接触和作用,可被诱导分化成神经元细胞^[19,20]。

鉴于微纳拓扑结构在指导细胞行为,特别是细胞分化中的重要作用,构建基于仿生杂化纳米颗粒的组合微图案结构主要通过以下几个方面诱导机体细胞的生物学响应:①通过设计的微图案结构调节细胞的空间形态和排列^[21];②通过仿生杂化纳米颗粒的组成及其高表面能改善细胞外基质的粘附和分泌^[22];③通过细胞与基底材料微纳仿生结构的相互作用,模拟机体内的骨再生环境刺激干细胞分化^[23]。结合以上复合策略,将有可能改善骨修复材料的生物相容性和诱导生物活性,从而加速骨再生。

本研究介绍了一种矿化羟基磷灰石纳米颗粒(hydroxyapatite nanoparticles, HANPs)从纳米尺度到微米尺度拓扑形貌的可控制备方法,即利用复合仿生模板作为介导,通过模拟生物矿化过程获得形貌可控的 HANPs,再以微图案形式排列、整合在水凝胶膜中,制得一种在成分、微米结构、纳米形貌上高度仿生的骨修复材料。随后,以大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone mesenchymal stem cells, rMSCs)作为研究对象,对合成的骨修复材料进行一系列体外细胞生物学评价。首次在体内评价这种大尺度仿生矿化 HANPs 微图案的促进骨修复能力。基于复合仿生模板矿化法,并结合微图案化制备具有微纳拓扑结构的仿生骨组织工程材料,是一种很有前景的干细胞培养平台,可为发展新型基于表面拓扑结构诱导干细胞分化的骨组织工程材料奠定理论基础和实践依据。

2 实验

2.1 仿生骨组织工程材料的制备

2.1.1 复合矿化模板的构建

分别制备质量浓度为 1 mg/mL 的 I 型胶原蛋白(col-lagen I,简称 Col I,由美国 Sigma 公司提供)、硫酸软骨素(chondroitin sulfate,简称 CS,由美国 Sigma 公司提供)、海藻酸钠(sodium alginate,简称 SA,由国药集团提供)和聚丙烯酸钠(sodium polyacrylate,简称 PAA,由中国阿拉丁试剂公司提供)溶液,以及同样浓度的 Col-CS、Col-SA、Col-PAA 高分子复合溶液(按浓度 1:1 混合)。随后利用 J-810 型圆二色谱仪(日本 Jasco 公司)对各组高分子溶液进行检测,分析高分子模板的二级结构和模板间的相互作用。

2.1.2 矿化 HANPs 的制备

为了模拟天然矿化过程中钙磷盐在有机-无机界面聚集成核结晶,以及有机-无机组分协同共组装过程,采用水-油-固相法和仿生矿化法相结合的方法获得 HANPs。具体过程为:取 0.25 g 十八胺(由国药集团提供)、2 mL 亚油酸(由美国 Sigma 公司提供)和 8 mL 无水乙醇(由国药集团提供)共混并充分溶解,再将 2 mL、0.5 mol/L 的

Col I 与 1 mL、5 mol/L 的硝酸钙溶液共混后, 将这两种混合溶液共混并搅拌 30 min; 随后, 分别将 50 g/L 的 CS、SA、PAA 溶液与 1 mL、3 mol/L 的磷酸氢二铵溶液充分混合, 缓慢滴入之前搅拌的混合体系中, 同时用 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节该体系的 pH 值至 7~8, 在 37 °C 的恒温水浴中充分搅拌 2 h 后, 静置于该温度的水浴中陈化 3 d; 将得到的沉淀用去离子水清洗数次以获得纯化的 HANPs, 分别命名为 Col-CS/HA、Col-SA/HA 和 Col-PAA/HA, 对他们进行冻干后保存在 -4 °C 的冰箱内。

2.1.3 仿生微图案的构建

首先, 设计了宽度、间距均为 50 μm 的条纹状和宽度为 50 μm 、间距为 100 μm 网格状微图案掩模版, 通过光刻技术在涂有负性光刻胶的硅片上形成与掩模版相对应的微图案结构, 再利用聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 胶倒模形成具有反向微图案结构的二级印章; 其次, 在 PDMS 胶二级印章上覆盖 100 g/L 的琼脂糖 (由国药集团提供), 冷凝倒模后形成亲水的琼脂糖微图案印章; 最后, 将经过超声预处理的 10 g/L 的矿化 HANPs 悬液滴加在琼脂糖微图案印章表面, 形成均匀薄层并晾干后, 通过微接触法将矿化 HANPs 微图案影印在光滑的 PDMS 胶表面。

2.1.4 仿生骨组织工程材料的制备

将先前制备的 Col-CS/HA、Col-SA/HA、Col-PAA/HA 3 组矿化 HANPs 以 50 mg/mL 的质量浓度分别分散于 5% (体积分数, 下同) 的明胶 (由国药集团提供) 水溶液中, 并设置不添加 HANPs 的空白组, 在 4 °C 固化后进行冻干处理。将冻干后的支架浸入预冷的 1% 戊二醛溶液 (由国药集团提供) 中, 反应交联 1 h; 多次水洗后, 加入 10 g/L 牛血清白蛋白 (由中国 Biosharp 公司提供) 溶液封闭残余醛基, 再经数次水洗后获得矿化 HANPs 多孔支架。

将含有 10 g/L 羟基聚乙二醇活性酯 (NHS-PEG-OH, 由美国 Sigma 公司提供) 和 100 g/L 明胶 (由武汉申试公司提供) 的混合溶液覆盖在 PDMS 胶表面的矿化 HANPs 微图案上, 并置于 4 °C 的冰箱内; 待凝固后, 将其加入预冷的 1% 戊二醛溶液中, 反应交联 1 h; 经多次水洗后, 加入 10 g/L 牛血清白蛋白溶液封闭残余醛基, 再经数次水洗后, 获得整合了矿化 HANPs 微图案的仿生骨组织工程材料。此外, 以同样的方法将矿化 HANPs 微图案整合在透明质酸 (hyaluronic acid, 简称 HA, 由美国 Sigma 公司提供) 水凝胶和聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (poly (lactic-co-glycolic acid), 简称 PLGA, 由美国 Sigma 公司提供) 上。

2.2 成分与显微组织的表征与分析

使用 Tecnai G2 20 型透射电镜 (TEM, 荷兰 FEI 公

司) 和 Sirion 200 型扫描电镜 (SEM, 荷兰 FEI 公司) 观察矿化 HANPs 混合溶液的纳米形貌, 并通过 X'Pert PRO 型 X 射线衍射仪 (XRD, 荷兰 PANalytical 公司) 和能量色散光谱 (EDX) 分析其成分。利用场发射扫描电镜 (FSEM, 荷兰 FEI 公司) 和 IX71 型共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM, 日本 Olympus 公司) 对微图案结构进行观察。

通过荧光显微镜、FSEM 观察仿生骨组织工程材料的表面形貌。此外, 为了强化仿生骨组织工程材料上微图案的调控能力, 将其置于含有 0.14 g/L CaCl_2 的 DPBS 缓冲溶液中, 在 36.5 °C 下矿化沉积 24 h 后, 用去离子水清洗去除残留, 并通过 FSEM 观察其表面 Ca、P 沉积情况。

2.3 生物学性能的表征与评价

2.3.1 体外细胞学评价

将接有罗丹明的具有矿化 HANPs 微图案的骨组织工程材料作用于细胞, 观察其对细胞的限定作用。为了研究该仿生骨组织工程材料高效调控细胞行为的能力, 先将样品经过体外矿化沉积获得强化的磷酸钙微图案层; 随后, 将所有样品都置于 24 孔细胞培养板内, 并进行伽马辐射灭菌; 最后, 将 rMSCs (由赛业生物科技有限公司提供) 以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的浓度种于材料表面, 并用 DMEM 完全培养基 (10% 的胎牛血清 (FBS) 和双抗 (由 Gibco 提供)) 在 CO_2 培养箱内培养 3~7 d。

为了研究 rMSCs 的形貌, 将经 4% 多聚甲醛 (由谷歌生物提供) 固定的样品, 通过磷酸缓冲盐溶液 (PBS, 由 Gibco 提供) 清洗后, 使用 0.3% 的聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100, 由美国赛默飞世尔科技公司提供) 通透, 随后用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的鬼笔环肽 (由美国 Cytoskeleton 提供) 和 DAPI (由上海碧云天生物科技有限公司提供) 分别对细胞骨架和细胞核进行染色, 并使用 CLSM 对其进行观察。

为了研究材料对细胞分化的影响, 采用实时聚合酶链反应 (real time-polymerase chain reaction, RT-PCR) 和免疫荧光 (immunofluorescence, IF) 检测血管的生成和成骨标志物的表达。将 rMSCs 在 DMEM 完全培养基中培养 7 d 后, 用 Trizol 试剂 (由美国赛默飞世尔科技公司提供) 提取其总 RNA, 随后用 sensifast cDNA 合成试剂盒 (由美国 Bioline 公司提供) 从 1 g 总 RNA 中合成互补 DNA, 并利用 SYBR Green qPCR 主混合物 (由美国赛默飞世尔科技公司提供) 在 ABI Prism 7500 型热循环仪 (美国应用生物系统公司) 上对 RUNX-2、OCN、VEGFR-2、CD144 进行 RT-PCR 基因表达分析。通过 IF 染色对培养 14 d 的 rMSCs 进行成骨和成血管相关蛋白的标记和分析, 即将用兔抗大鼠 IgG 标记 RUNX-2、OCN、VEGFR-2、CD144

的 rMSCs 在 4 °C 下孵育过夜, 之后再用罗丹明-山羊抗兔二级抗体标记。将用荧光标记细胞肌动蛋白和细胞核的 rMSCs 放在荧光显微镜下观察, 并用 FC500 型流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司)进一步定量测定成骨和血管生成相关蛋白的表达, 即对细胞进行胰蛋白酶消化。经 PBS 洗涤后, 用 40 g/L 多聚甲醛固定, 再进行如上的 IF 染色操作, 然后用流式细胞仪对其进行分类。

2.3.2 体内细胞学评价

雄性 SD 大鼠(约 300 g)的皮下植入: 首先, 在 3 只大鼠背部皮肤上分别划出约 1 cm 的切口, 将 Col-CS/HA、Col-SA/HA、Col-PAA/HA 多孔支架和空白对照组(纯明胶), 以及具有条纹状、网格状和随机分布状微图案结构的仿生骨膜材料植入每只大鼠皮下。保存 2 周后, 将样品取出, 用 PBS 清洗并固定在 40 g/L 多聚甲醛中, 使用标准方案进行切片处理后, 通过苏木精-伊红(H&E)和 Masson's 组织学染色进行分析。其次, 通过对大鼠颅骨建立临界尺寸缺损模型评估仿生骨组织工程材料促进骨修复的能力。具体步骤为: 将所有大鼠随机分成 4 组, 每个实验组 3 只。将大鼠麻醉后, 在其头皮上做一个切口以露出头骨, 用钻孔机构建一个直径为 5 mm 的颅骨缺损, 分别填充上条纹状、网格状和无规则图案组的材料后缝合伤口, 并在术后立即对大鼠肌肉注射 20 000 国际单位的青霉素。术后 4 周时取出大鼠颅骨, 对取出的颅骨样品进行显微计算机断层扫描(Micro CT)分析, 并对感兴趣区域进行 3D 重建, 定量

计算缺损区域的成骨体积、骨密度、骨小梁数目和骨厚度。此外, 对获得的样本切片并进行 H&E 和 Masson's 染色, 分析其组织形态; 通过 IF 双染, 对成骨相关的 RUNX-2 蛋白和成血管相关的 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)进行标记, 并在荧光显微镜下对这两种蛋白进行观察。

2.3.3 统计学分析

所有数据均以平均值 \pm 标准误差($\bar{x}\pm s$)表示, * $P<0.05$ 被认为是显著性差异。

3 结果与讨论

3.1 复合模板的结构分析

通过圆二色图谱表征分析(图 1), Col 的 β 转角和无规卷曲结构被引入调控模板, 通过氢键作用使这两种结构被诱导转变成了 β 折叠结构。进一步分析可知, CS、SA、PAA 3 种调控分子作为单一模板与 Col 分子组成复合模板后, 其 β 折叠结构的含量减少了。这是因为以调控分子作为单一模板时, 其分子重复链段结构简单, 功能基团(羧基)排列规整, 故在水溶液中有利于通过氢键形成稳定的 β 折叠结构。当体系中加入 Col 分子后, 两种分子模板之间会形成分子间氢键, 扰乱了调控分子内规整氢键形成的 β 折叠结构, 故降低了复合体系中 β 折叠结构的含量。因此, 利用 Col 分子为主模板, 通过引入不同的第二元分子模板(CS、SA、PAA), 从而调控矿化纳米颗粒在复合模板上诱导生成的形貌。

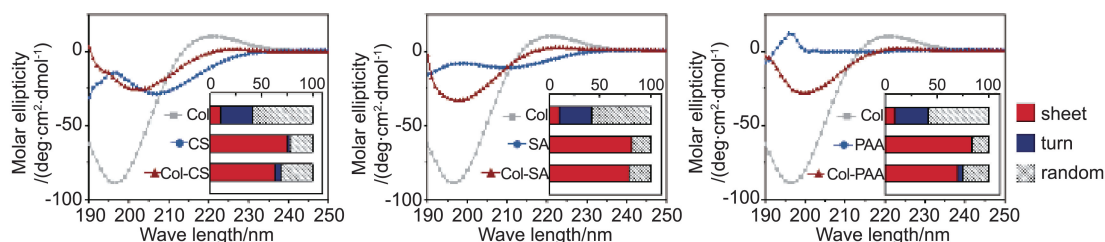


图 1 复合模板的圆二色图谱和二级结构分析

Fig. 1 Circular dichroism spectra and secondary structure analysis of bi-templates

3.2 矿化 HANPs 的形貌调控

在不同模板的诱导调控下, 矿化颗粒的形貌各有不同, 如图 2 所示。其中, 在 Col 模板下形成了棒状晶体, 沿 Col 长轴方向排列; 在 CS 模板下形成了针状晶体, 呈现束状排布; 在 SA 模板介导下合成的矿化颗粒具有小的片状结构; 在 PAA 模板介导下合成的矿化颗粒为球形串珠状; 在 Col-CS、Col-SA、Col-PAA 3 种复合模板的诱导调控下, 矿化颗粒的形貌分别呈现长棒状、长而宽的片状和相互连接的串珠状。

根据 XRD 分析结果(图 3a), 合成的纳米颗粒显示出羟基磷灰石的特征衍射峰, 且都呈现出一定程度的宽化现象。此外, EDX 图谱也同样表明, 纳米颗粒均为缺钙型羟基磷灰石(图 3b)。Col-CS 复合模板由于具有较弱的 Ca^{2+} 结合能力, 导致生成的矿化颗粒缺钙程度较低; 而 Col-PAA 复合模板大量夺取了溶液中用于晶体生长的 Ca^{2+} , 故最终生成产物的缺钙程度较高。以不同模板为介导的矿化 HANPs 均具有可控形貌, 都能在最大程度上模拟新生天然骨的纳米级精细结构和成分。

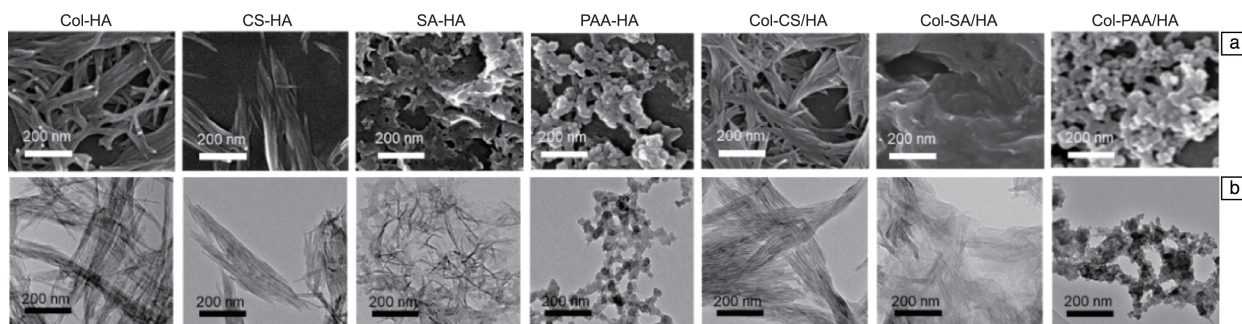


图2 不同模板诱导下的矿化颗粒微观形貌的 SEM(a) 和 TEM(b) 照片

Fig. 2 SEM (a) and TEM (b) images showing the microstructures of mineralized particles induced by different templates

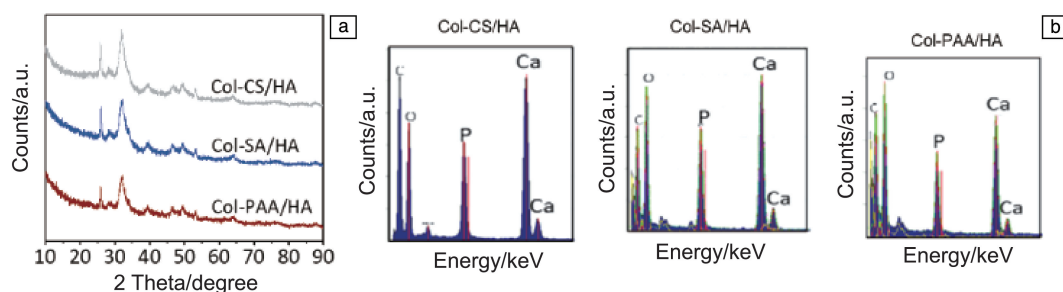


图3 以不同模板为介导的矿化 HANPs 的 XRD(a) 和 EDX(b) 图谱

Fig. 3 XRD (a) and EDX (b) patterns of mineralized HANPs induced by different templates

3.3 仿生微拓扑结构的构建

为了模拟机体天然骨的多层级结构, 达到更好地诱导干细胞行为的效果, 本研究设计了条纹状和网格状阵列微图案。通过光刻技术和微接触法, 将设计的微图案加载到 PDMS 胶基底上, 从而获得具有微图案的 HANPs 阵列结构。微接触法是一种有效制备大面积微图案结构的方法, 被广泛用于蛋白分子、生物大分子和纳米粒子的拓扑阵列分布^[24]。如图4所示, 通过该方法获得的矿化 HANPs 微图案结构完整、效果稳定、可大范围制备, 是一种有效构建二维微拓扑结构的方法。通过将形貌可

控的矿化 HANPs 构建成二维仿生微拓扑结构, 使该材料在大尺度上表现出可润湿性和高表面能, 从而更有利于细胞的募集、粘附。此外, 矿化 HANPs 也被证实可以显著刺激干细胞行为, 特别是在促进细胞的成骨和成血管分化上具有很好表现^[25]。

3.4 仿生骨组织工程材料的构建

考虑到 PDMS 胶不可降解且几乎没有生物活性, 不利于体内骨组织修复, 故将 PDMS 胶基底上的微图案转移到明胶水凝胶膜表面, 形成具有矿化 HANPs 微图案层膜结构的仿生骨膜材料^[26, 27]。通过荧光显微镜观察发现,

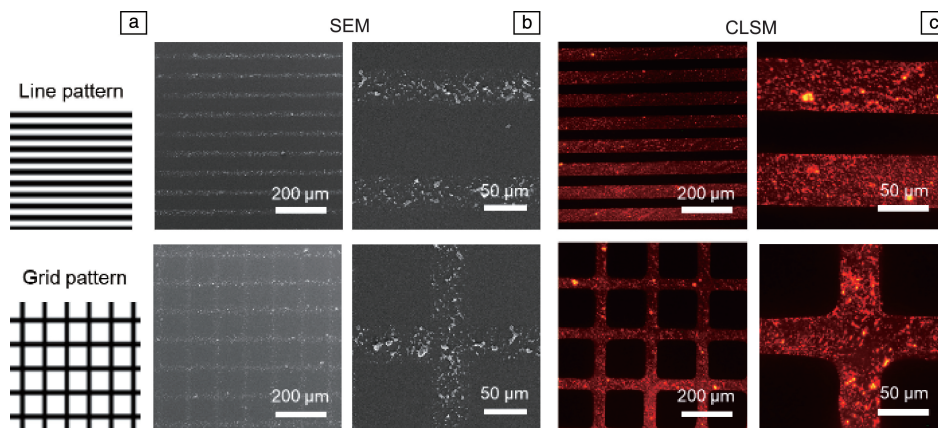


图4 矿化 HANPs 的条纹状和网格状微图案结构: (a)微图案设计, (b)SEM 照片, (c)激光共聚焦扫描显微镜照片

Fig. 4 Microstructures of line and grid patterns for mineralized HANPs: (a) designed micropatterns, (b) SEM images, (c) CLSM images

矿化 HANPs 微图案被很好地固定在明胶水凝胶膜表面(图 5a)。纯明胶基质表面光滑,可以透过其表面观察到矿化 HANPs 的微图案结构(图 5b)。此外,矿化 HANPs 微图案也被成功整合到了 PLGA 和 HA 材料表面,这意味着该工艺可以扩展到其他类型的组织工程有机材料上。

通过在仿生骨膜材料表面进行体外矿化,选择性地沉积磷酸钙(图 5c),显著增强了材料上的矿化 HANPs 微图案结构。通过强化 HANPs 微图案结构,可以将这种有序的二维薄层结构构建成具有一定厚度的三维结构,以促进后期蛋白质的吸收和干细胞的粘附,进一步增强仿生骨组织工程材料对干细胞的调节能力和其在骨科的

潜在应用。

3.5 形貌调控细胞行为的研究

大量研究证明,特定尺寸的条纹状和网格状微图案可以控制细胞的形态和排列,从而指导干细胞的分化^[28, 29]。本研究对仿生骨组织工程材料进行了 NHS-PEG-OH 修饰,以防止细胞粘附在没有矿化 HANPs 的区域,从而更好地调控 rMSCs 行为。根据图 6 的荧光显微镜照片可知,矿化 HANPs 微图案结构对细胞的限定和取向生长具有良好的调控能力。将 rMSCs 在这两种图案中培养 14 d 后,矿化 HANPs 微图案对细胞限定和生长取向的调控效果依旧明显, rMSCs 仍表现出持久且大范围的取向分布。

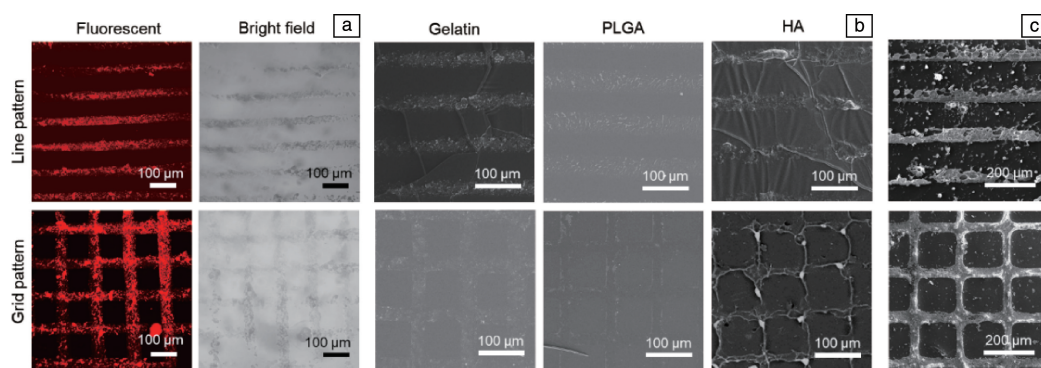


图 5 具有矿化 HANPs 微图案的仿生骨膜材料的微观形貌: (a) 以明胶为基底的骨膜材料的荧光和明场显微照片; (b) 不同基底的骨膜材料的 FSEM 照片; (c) 经体外矿化的骨膜材料的 FSEM 照片

Fig. 5 Morphologies of biomimetic bone periosteum based on mineralized HANPs with micropatterns: (a) fluorescent and bright field microscope images of bone periosteum using gelatin membrane as substrate; (b) FSEM images of bone periosteum using different substrates; (c) FSEM images of bone periosteum after being mineralized *in vitro*

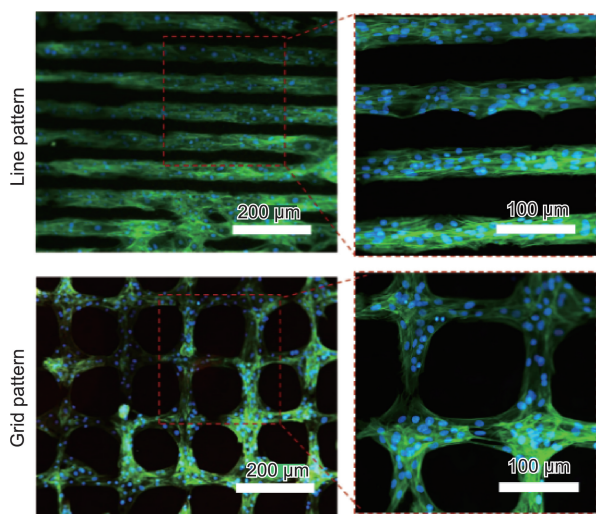


图 6 具有矿化 HANPs 微图案的仿生骨组织修复材料上粘附的 rMSCs 的荧光显微照片

Fig. 6 Fluorescent microscope images of rMSCs adhered to the biomimetic bone tissue engineering materials with different micropatterns of mineralized HANPs

利用 RT-PCR 定量分析了 rMSCs 在仿生骨组织工程材料上 RUNX-2、OCN、VEGFR-2 和 CD144 的表达,如图 7a 和 7b 所示。具有矿化 HANPs 微图案的材料上的 rMSCs 均有 RUNX-2、OCN、VEGFR-2 和 CD144 的强表达,进一步证实了该材料具有显著促进成骨和血管生成的能力。与随机分布的矿化 HANPs 组相比,微图案组中表达的钙结节更明显(图 7c),这说明定向排列的 rMSCs 钙化水平更高,这也是微图案结构促进成骨的积极标志。

由此可知,这种具有矿化 HANPs 微图案的仿生骨组织工程材料,可以显著促进细胞在体外成骨和血管生成,且条纹组表现出更加显著的分化相关基因表达。这可能归因于:首先,通过细胞形态依赖的方式使细胞的排列和生长长期受到微图案结构的限定和调控,从而诱导其定向分化;其次,细胞粘附于外基质的 HANPs 上,矿化 HANPs 的成分激活了血管生成的 Ca^{2+} 依赖通道和成骨的 p-AMPK 途径;最后,前期分化的细胞分泌的成骨或成血管相关蛋白,如 BMP-2 或 VEGF,可以与磷灰石共沉积,进一步刺激周围受到限制的其他细胞从而强化细胞

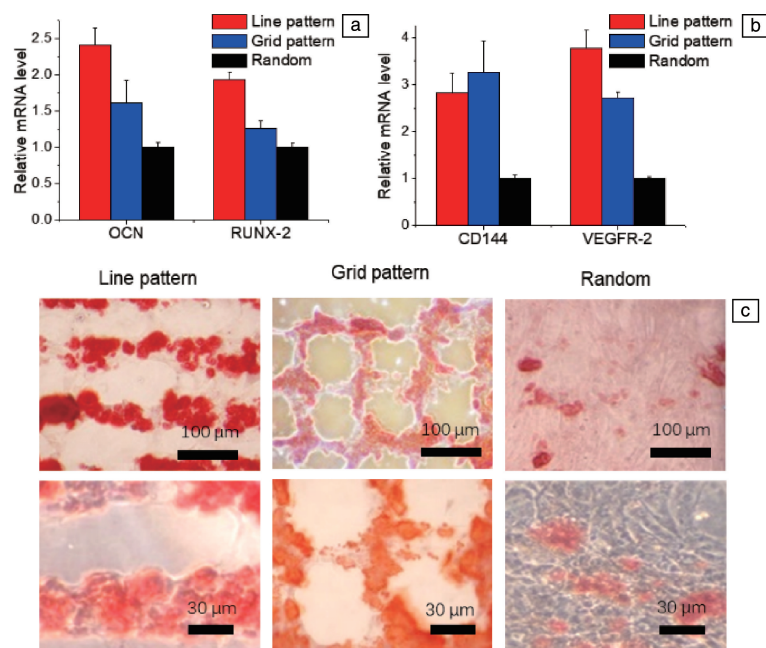


图7 rMSCs的成骨(a)和成血管(b)相关基因表达情况, 以及其经茜素红染色后的显微照片(c)

Fig. 7 Osteogenesis (a) and angiogenesis (b) gene expression of rMSCs and micrographs after they being stained by alizarin red (c)

分化水平。矿化 HANPs 微图案结构在调节细胞分化的同时, 避免了对多种生长因子的需求, 从而大大优化了干细胞培养和研究平台。

3.6 仿生骨组织工程材料的体内评价

3.6.1 矿化 HANPs 的体内生物活性

为了评价不同形貌的矿化 HANPs 的组织相容性, 将纳米颗粒分散于明胶水凝胶中, 冻干交联形成多孔支架。矿化 HANPs 均可分散在多孔支架表面, 有利于细胞粘附、生长于颗粒表面并行使细胞功能。支架皮下植入大鼠体内 2 周后, 经 H&E 和 Masson's 染色后的显微照片如图 8 所示。不同形貌的矿化 HANPs 均表现出良好的组织相容性, 软组织长入明显, 并分泌了大量胶原纤维, 显著提高了细胞活性。其中 Col-SA/HA 组支架的降解程度最高, 大部分支架已经被降解成岛状并被巨噬细胞和纤维细胞所环绕, 其间还存在更多的血管结构。这说明弱晶态的 Col-SA/HA 更易在体内被组织降解、代谢吸收。

3.6.2 微纳结构的分化诱导

将具有矿化 HANPs 微图案的仿生骨组织工程材料(图 9a)进行体外矿化处理, 通过选择性钙磷富集, 从而强化矿化 HANPs 微图案结构, 避免其在复杂体内环境中降解。通过大鼠皮下植入, 评价了具有不同矿化 HANPs 微图案的仿生骨组织工程材料的生物相容性, 以及其促进体内血管生成和异位成骨的能力。通过 RT-PCR 定量分析了仿生骨膜在体内促进血管生成和成骨的能力。与随机分布组相比(图 9b), 条纹组和网格组中 CD144 和 VEGFR-2 因子的表达显著增加, 且条纹组最高。OCN 作为成骨分化

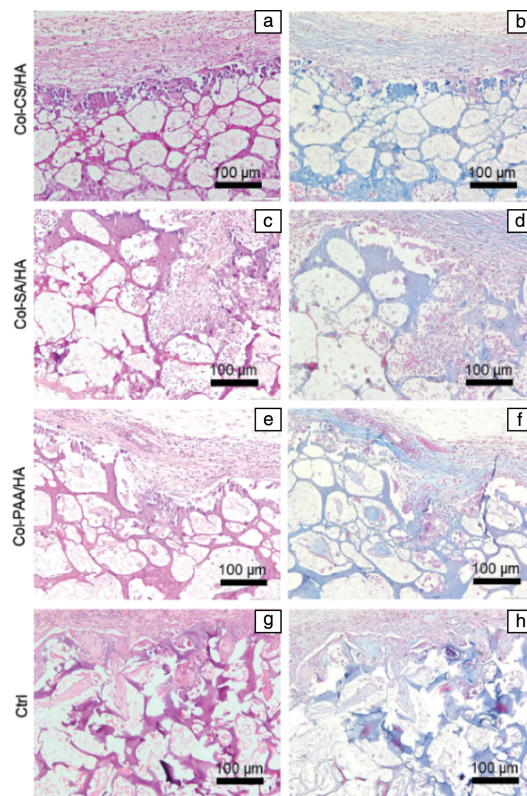


图8 不同形貌的矿化 HANPs 支架经 H&E(a, c, e, g) 和 Masson's (b, d, f, h) 染色后的显微照片: (a, b) Col-CS/HA, (c, d) Col-SA/HA, (e, f) Col-PAA/HA, (g, h) 空白对照组

Fig. 8 Micrographs of mineralized HANPs with different microstructures deposited scaffold after H&E (a, c, e, g) and Masson's (b, d, f, h) staining: (a, b) Col-CS/HA, (c, d) Col-SA/HA, (e, f) Col-PAA/HA, (g, h) control group

晚期的标志性因子,相较于随机分布组,在条纹组和网格组具有更高的 mRNA 转录水平。此外, RUNX-2 的 mRNA 含量太小未被检测到。组织学染色分析证实(图 9c),这些仿生材料均表现出良好的组织相容性和低的免疫原性。微图案组的成纤维组织生长良好,并伴随大量血管生成,且新生血管的数量和面积明显大于随机分布组。

综上,具有微图案结构的仿生骨膜可能有一定的促进异位成骨的能力,本研究将进一步通过骨修复实验加以验证。

3.6.3 促血管化骨再生

采用大鼠颅骨临界尺寸缺损模型评价不同形貌的矿化 HANPs 诱导骨再生的能力。在整个骨修复过程中,仿生多孔骨组织支架与机体骨及周围组织具有良好的柔性和机械相容性,基本保持在原始缺损位置。植入 4 周后取出颅骨,由 Micro CT 评估骨修复情况可知,不同形貌的矿化 HANPs 表现出不同的促骨愈合能力。其中,片状的 Col-SA/HA 组的矿化基质体积增大,新骨覆盖率最高,缺损区域几乎完全长合(图 10)。

随后,在大鼠颅骨缺损区域植入具有矿化 HANPs 微图案的仿生骨膜材料,4 周后,对样品进行组织学染色。结果显示,与其他组相比,条纹组和网格组材料促进成纤维组织生长、胶原分泌、血管生成更明显。观察组织与种植体之间的界面可见,空白对照组的颅骨缺损部位主要由纤维结缔组织桥接,骨修复仅限于原生骨边缘;而条纹组和网格组中有更多的类骨组织,并形成了大量新生血管,如图 11 所示。其中,条纹组新形成的骨化组

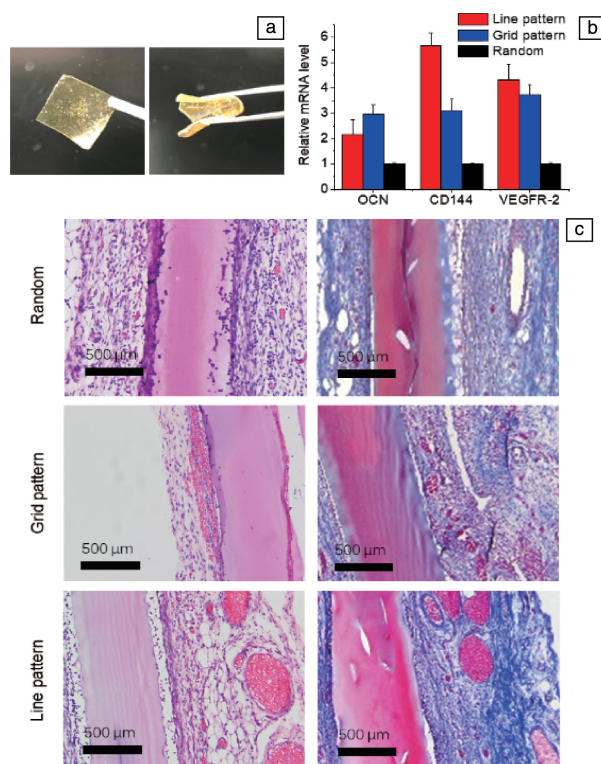


图 9 仿生骨组织工程材料的皮下植入: (a) 植入材料照片; (b) 成骨和成血管相关基因表达情况; (c) 经 H&E (左) 和 Masson's (右) 染色后的植入材料的显微照片

Fig. 9 Subcutaneous implantation of biomimetic bone tissue engineering materials; (a) photos of implant materials; (b) osteogenesis and angiogenesis gene expression; (c) micrographs of implant materials after H&E (left) and Masson's (right) staining

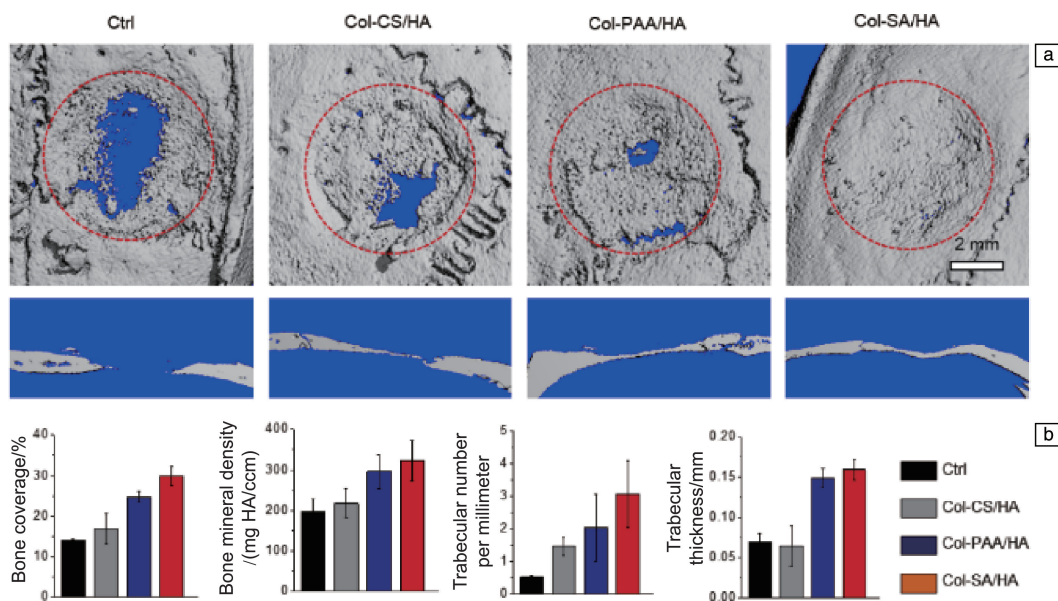


图 10 不同形貌的矿化 HANPs 的颅骨修复评价: (a) 基于 Micro CT 的大鼠颅骨缺损部位的 3D 构建俯视图(上)和截面图(下); (b) 缺损部位成骨量的定量分析

Fig. 10 Evaluation on skull defect repair of mineralized HANPs with different microstructures; (a) 3D reconstruction vertical (upper) and transverse (lower) section views based on Micro-CT; (b) quantitative evaluation of bone formation content in defect sites

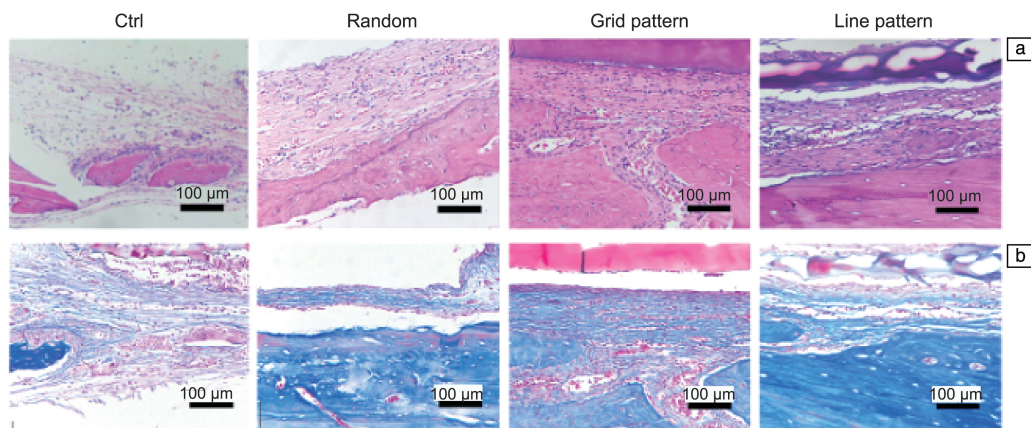


图 11 基于组织学染色的仿生骨膜材料的血管化成骨体内评价：(a) H&E 染色，(b) Masson's 染色

Fig. 11 Evaluation on vascularized osteogenesis of biomimetic bone periosteal *in vivo* based on histological staining: (a) H&E staining, (b) Masson's staining

织明显厚于其他组，缺损部位完全愈合，骨结构平坦连续且呈现逐渐成熟趋势。同时，随机分布组也呈现出良好的新骨形成状态，由此说明明胶作为矿化 HANPs 的载体膜材料，具有良好的骨传导性。

通过 IF 染色进一步评价了仿生骨膜材料促进血管化骨再生的能力，IF 标记的 α -SMA 代表血管的生成。与其他组相比，条纹组新生血管的量和面积明显最大；同时，荧光标记的成骨 RUNX-2 蛋白也显示，微图案组的成骨率高于随机分布组和空白组，且条纹组的成骨表达水平最高，如图 12 所示。此外，仿生骨组织工程材料的结构也具有有良好的骨传导性。因此，在仿生骨组织工程材料成分、形貌和结构的共同作用下，可诱导生成更多的胶原和骨样组织，从而形成骨小梁，最终促进新骨组织的再生。

4 结 论

本研究开发了一个有效的组织工程平台来调控干细胞行为和诱导新骨再生。将形貌可控的矿化 HANPs 高度有序地排列成几何微图案，并大规模地整合在仿生骨组织工程材料内，以模拟天然骨的组成和微纳米拓扑结构。通过体外矿化促进钙磷在微图案表面的选择性沉积和富集，从而增强其微纳结构的调控作用。矿化 HANPs 微图案可大范围地限制 rMSCs 的形态和取向分布，诱导其成骨和成血管分化。

更重要的是，本研究首次证明了矿化 HANPs 微图案可用于大规模调节体内血管生成和骨形成，而且具有条纹状微图案结构的仿生骨组织工程材料表现出更显著的促血管化骨再生能力。此外，该材料具有很强的制作可行性，在现有和新兴的生物医学领域将具有突出的临床应用价值。

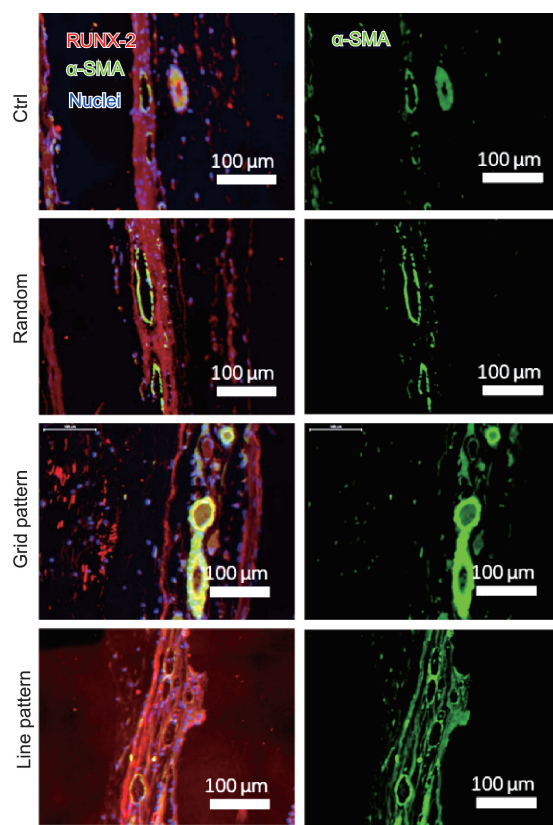


图 12 基于免疫荧光标记的仿生骨膜材料的成骨和成血管能力评价

Fig. 12 Evolution on the ability of osteogenesis and angiogenesis gene expression of biomimetic bone periosteal based on immunofluorescence labeling

参考文献 References

- [1] GREEN K, BEN-NISSAN B, YOON S, *et al.* Trends in Biotechnology [J], 2017, 35(1): 43–54.
- [2] LIU Y, LUO D, WANG T. Small [J], 2016, 12(34): 4611–4632.
- [3] YAO S S, JIN B, LIU Z M, *et al.* Advanced Materials [J], 2017, 29

- (14): 1605903.
- [4] ZHAO C C, WANG X Y, GAO L, *et al.* Acta Biomaterialia[J], 2018, 73: 509–521.
- [5] MA J, WANG J L, AI X, *et al.* Biotechnology Advances[J], 2014, 32(4): 744–760.
- [6] TARTAI P, DOULAVERAKIS M, GEPRGE A, *et al.* Journal of Biological Chemistry[J], 2004, 279: 18115–18120.
- [7] CROWDER S W, LEONARDO V, WHITTAKER T, *et al.* Cell Stem Cell[J], 2016, 18(1): 39–52.
- [8] LI S S, KUDDANNAYA S, CHUAH Y J, *et al.* Biomaterials Science[J], 2017, 5(10): 2056–2067.
- [9] KIM C S, KIM J H, KIM B, *et al.* Advanced Functional Materials[J], 2017, 27(44): 1703569.
- [10] HUANG J, CHEN Y, TANG C, *et al.* Cellular and Molecular Life Sciences[J], 2019, 76: 505–521.
- [11] GUI N, XU W, MYERS D E, *et al.* Biomaterials Science[J], 2018, 6(2): 250–264.
- [12] ABADI P P S S, GARBERN J C, BEHZADI S, *et al.* Advanced Functional Materials[J], 2018, 28(19): 1707378.
- [13] BAO M, XIE J, PIRUSK A, *et al.* Nature Communications[J], 2017, 8(1): 1962.
- [14] YAO X, PENG R, DING J D. Advanced Materials[J], 2013, 25(37): 5257–5286.
- [15] ANTMAN-PASSIG M, SHEFI O. Nano Letters[J], 2016, 16(4): 2567–2573.
- [16] YE K, WANG X, CAO L, *et al.* Nano Letters[J], 2015, 15(7): 4720–4729.
- [17] WANG X L, SONG W, KAWAZOE N, *et al.* Journal of Biomedical Materials Research A[J], 2013, 101(12): 3388–3395.
- [18] TAY C Y, YU H, PALA M, *et al.* Experimental Cell Research[J], 2010, 316(7): 1159–1168.
- [19] PARK S Y, CHOI D S, JIN H J, *et al.* ACS Nano[J], 2011, 5(6): 4704–4711.
- [20] KIM T H, SHAH S, YANG L, *et al.* ACS Nano[J], 2015, 9(4): 3780–3790.
- [21] SHI X T, FUJIE T, SAITO A, *et al.* Advanced Materials[J], 2014, 26(20): 3290–3296.
- [22] KIM J H, BAE W G, CHOUNG H W, *et al.* Biomaterials[J], 2014, 35(33): 9058–9067.
- [23] HE Y, WANG X, CHEN L, *et al.* Journal of Materials Chemistry B[J], 2014, 2(16): 2220–2227.
- [24] ZHAO C C, XIA L G, ZHAI D, *et al.* Journal of Materials Chemistry B[J], 2015, 3(6): 968–976.
- [25] HAMON C, HENRIKSEN-LACEY M, LA PORTA A, *et al.* Advanced Functional Materials[J], 2016, 26(44): 8053–8061.
- [26] XU B, ZHENG P B, GAO F, *et al.* Advanced Functional Materials[J], 2017, 27(4): 1604327.
- [27] LOHMANN P, WILLUWEIT A, NEFFE A T, *et al.* Biomaterials[J], 2017, 113: 158–169.
- [28] LU J, CHENG C, HE Y S, *et al.* Advanced Materials[J], 2016, 28(21): 4025–4031.
- [29] YANG G J, LIU H M, HU X X, *et al.* Nanoscale[J], 2017, 9(18): 5794–5805.

(编辑 王 瑶)



最高的打印效率

SP100

www.amproinnovations.com.cn

- 科研、教育、医疗行业首选
- 结构紧凑,易于维护
- 成形尺寸(直径×高) Φ100×80mm
- 激光系统 IPG 200W连续激光器



使用倍丰打印机, 制造钨合金 CT仪防散射栅格:

- 开发专用钨合金粉末(打印无裂纹)
- 壁厚<0.1mm, 精度<0.02mm, 致密度≥99%
- 通过使用认证, 帮客户拿到新合同
- 长期技术支持

使用倍丰打印机, 制造出高性能发动机叶片:

- 服役温度>800°C
- 满足全部力学性能指标

金属3D打印系统, 可制造航空质量标准的构件

- SP260 - 250x250mm
- SP400 - 400x400mm
- SP500 - 500x250mm
- SP800 - 800x600mm

打印材料: 钛合金、镍基合金、铝合金、钨合金、不锈钢及其他金属粉末。

最安全的金属粉末处理系统






DU40 粉末填充系统 SU40 粉末筛分系统 VU40 粉末回收系统 G4 粉末清理手套箱