

[文章编号] 1671-587 (2008)03-0405-06

聚乳酸/丝素蛋白复合组织工程支架的制备 及生物学性能的评价

邢 帅, 夏亚一, 袁凌伟, 鲁茂森
(兰州大学临床医学院骨外科, 甘肃 兰州 730030)

[摘要] 目的: 研究聚乳酸(PLA)/丝素蛋白复合组织工程支架(简称 PLA/丝素蛋白复合支架)的制备方法, 评价其生物学性能。方法: 将 PLA 多孔支架材料放在丝素蛋白的水溶液中浸泡, 经干燥后制备成 PLA/丝素蛋白复合支架。实验分为 PLA 支架组(单纯聚乳酸支架组)与 PLA/丝素蛋白复合支架。按 ISO-10993 标准, 两组分别做溶血实验、动态凝血时间实验、细胞毒性实验、刺激实验和热原实验, 对其结果逐项进行比较。结果: 刺激实验显示两种支架材料均未引起动物皮肤明显刺激, 符合标准; 热原实验显示两种支架材料引起动物体温升高均 < 0.2 , 并且体温升高总度数 < 1.0 , 两组比较差异均无显著性; 溶血实验显示两种支架材料样品的溶血率均 $< 5\%$ ($P=0.000$), 且 PLA/丝素蛋白复合支架抗溶血性优于 PLA 支架; 动态凝血时间实验显示, PLA/丝素蛋白复合支架 (37 min) 长于 PLA 支架的动态凝血时间 (26 min), 即 PLA/丝素蛋白复合支架的抗凝血性能明显优于 PLA 支架; 细胞毒性实验中, PLA/丝素蛋白复合支架组的细胞生长情况明显优于 PLA 支架组, 即 PLA/丝素蛋白复合支架的细胞毒性明显小于 PLA 支架。结论: PLA/丝素蛋白复合支架材料具有比单纯 PLA 支架材料更优良的生物相容性, 可以作为支架材料植入体内。

[关键词] PLA/丝素蛋白; 生物学评价; 组织工程

[中图分类号] R318 **[文献标识码]** A

Preparation of compound tissue-engineering scaffolds of PLA/silk fibroin and evaluation of its biological features

XING Shuai, XIA Ya-yi, YUAN Ling-wei, LU Mao-shen

(Department of Orthopedics, Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou 730030 China)

Abstract: Objective To study the preparation method of compound tissue-engineering scaffolds of the PLA/silk fibroin and evaluate its biological features. Methods The PLA scaffolds matrix were dipped into the silk fibroin solution, then dried, and PLA/silk fibroin scaffolds were prepared. There were two groups in the experiment, one group was PLA group, and the other one was compound scaffolds group. According to ISO-10993 standard, hemolysis test, dynamic coagulation time test, cell toxicity test, stimulation test and pyrogen test were performed in two groups, and the results were compared between two groups. Results In the stimulation test, the two kinds of materials had equally not aroused the obvious animal skin stimulation, it showed that the experiment was in accordance with the standard. In the pyrogen test, the two scaffolds material aroused the animal temperature rising without exception under 0.2 and the total number of degree was under 1.0 , therefore there was no obvious difference between two groups. In the hemolysis test, the hemolysis rates of the two scaffolds samples were smaller than 5% equally ($P=0.000$), which indicated that the hemolysis of the compound scaffolds was better than that of the PLA scaffolds. In the dynamic coagulation time test, the coagulation time of the compound

[收稿日期] 2008-01-08

[基金项目] 甘肃省科技厅自然科学基金资助课题 (ZS011-A25-076-Y)

[作者简介] 邢 帅 (1980-), 男, 吉林省长春市人, 在读医学硕士, 主要从事组织工程软骨支架修复软骨损伤研究。

[通讯作者] 夏亚一 (Tel: 0931-8942579, E-mail: Xiayayi@yahoo.com.cn)

scaffolds (37 min) was longer than that of the PLA scaffolds (26 min). The anti-coagulation ability of the compound scaffolds was better than that of the PLA scaffolds. In the cell toxicity test, the cell growth situation of the compound scaffolds group was obviously better than that of the PLA group, and at the meantime the cell toxicity of the compound scaffolds was obviously smaller than that of the PLA scaffolds. Conclusion The material of PLA/silk fibroin compound scaffolds has the advanced biological consistent compared with the simplex scaffolds. Accordingly, the PLA/silk fibroin can be used as a scaffolds matrix to be transplanted into the body.

Key words: PLA/silk fibroin; biological evaluation; tissue engineering

关节软骨缺损的修复一直是临床医师面临的难题, 因为软骨细胞几乎无迁徙能力, 不能迅速地聚集到创伤部位。目前, 采用组织工程多孔支架修复软骨缺损已成为热点^[1], 有文献报道, 以聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 为代表的聚酯类生物降解材料是目前组织工程研究中最常用的移植细胞的支架材料之一^[2]。但单纯 PLA 支架存在很多缺点, 如 PLA 的疏水特性, 其生物及细胞的相容性在许多条件下都不能满足组织工程支架材料的要求^[3]。近年来采用 PLA 与天然材料复合制备支架又成为新的热点。国内外的学者对 PLA 与天然材料复合支架进行了大量研究, 王觅格等^[4]采用骨髓间充质干细胞复合消旋 PLA/明胶修复兔膝关节全层软骨缺损, 修复组织细胞为透明软骨样细胞; 李立华等^[5]采用 PLA 与壳聚糖复合制备多孔支架实验证实其具有良好的生物相容性, 可以作为细胞支架植入体内; Lazzeri 等^[6]采用明胶/PLLA 多孔海绵状结构作为修复材料, 其生物活性降解时间、孔径大小和材料硬度均较之单纯 PLA 支架更符合软骨细胞的生长要求。随着组织工程研究的深入, 对于天然材料的研究也逐渐深入, 蚕丝经过脱胶制得的丝素蛋白具有无毒、无刺激、良好的生物相容性等优点, 在生物医学领域有着广阔的应用前景^[7]。Unger 等^[8]以丝素纤维为细胞培养支架观察了人的内皮细胞、上皮细胞、成纤维细胞、角质细胞、神经胶质细胞、成骨细胞的附着和生长情况。除内皮细胞外, 其他细胞均能沿三维空间扩散, 当细胞覆盖纤维表面后, 其余细胞开始向纤维间隙伸展; 细胞之间形成组织样的结构, 连接紧密。本研究采用了新兴的天然材料——丝素蛋白与 PLA 复合制备支架的新方法, 从体内外两方面研究 PLA/丝素蛋白复合支架材料对机体的生物相容性和安全性, 依据 ISO 10993 标准, 对 PLA/丝素蛋白复合组织工程支架 (简称 PLA/丝素蛋白复合支架) 进行了生物学安全性评价, 为该材料的临床应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4~6月龄青紫兰兔24只, 体重2.5~3.5 kg, 雌雄不限 (由卫生部兰州生物制品研究所动物中心提供, 普通级, 合格证书: 医动字第14-004号, 编号: 2007-059)。

1.2 实验材料及仪器

PLA 多孔支架 (济南岱罡生物科技有限公司生产, 孔径150~200 μm, 孔隙率90%); 丝素蛋白粉末 (湖州新天丝生物技术有限公司); 兔真皮干细胞 (兰医二院骨研所袁凌伟惠赠); DMEM/F12 培养基 (Gibco); 胰蛋白酶 (Sigma); 胎牛血清 (杭州四级青生物公司); 万分之一天平 (TN 托盘式扭力天平, 上海第二天平仪器厂), CO₂ 恒温培养箱; 倒置相差光学显微镜 (BH-2 Olympus 显微镜, 日本); 细胞计数板。

1.3 PLA/丝素蛋白复合支架的制备

丝素蛋白水溶液的制备: 称取一定量的无水氯化钙 (CaCl₂), 制备成浓度为40%的CaCl₂溶液, 取0.5g的丝素蛋白粉末加入 (CaCl₂) 溶液中 (丝素蛋白粉末与CaCl₂溶液的质量分数为1:10), 将该溶液放在沸水水浴中加热搅拌60 min, 待丝素完全溶解, 即成为丝素蛋白的CaCl₂溶液, 将丝素蛋白的CaCl₂溶液倒入透析袋, 将透析袋放在水槽中透析72 h, 透析袋中即为丝素蛋白的水溶液^[9]。

复合支架的制备: 将 PLA 支架材料放在丝素蛋白水溶液中浸泡72 h, 待支架被溶液充分渗透, 取出支架材料放在干燥箱中干燥, 即为 PLA/丝素蛋白复合支架。将复合支架经钴⁶⁰Co 照射消毒后备用。

1.4 两种支架材料浸提液的制备

将 PLA 多孔支架和 PLA/丝素蛋白复合支架材料分别制成厚0.1 cm、直径0.5 cm的圆片, 双面表面积为每片0.56 cm²。按照 ISO-10993 标准

要求, 试样表面积/浸体介质 = $3 \text{ cm}^2 \cdot \text{L}^{-1}$, 试样消毒灭菌后, 70 °C 无菌条件下在真空干燥箱中用生理盐水浸提 24 h, 分别得到两种材料的浸提液。

1.5 两种支架生物相容性体外评价

1.5.1 溶血实验 将两种材料分为 PLA 支架组和 PLA/丝素蛋白复合支架组, 分别将两组支架材料剪成 $5 \text{ mm} \times 25 \sim 30 \text{ mm}$ 的小条, 各 10 条, 取新鲜抗凝兔血 8 mL, 加生理盐水 10 mL 稀释, 蒸馏水 10 mL 加稀释兔血 0.2 mL 作为阳性对照, 生理盐水 10 mL 加稀释兔血 0.2 mL 作为阴性对照。分别将洁净的两种支架材料用适量蒸馏水摇洗 2 次后置于试管内, 各加入 10 mL 蒸馏水, 在 37 °C 恒温箱中 30 min, 加入 0.2 mL 稀释兔血, 轻轻混匀, 继续保温 60 min, 离心 5 min (750g), 吸取上清液至比色皿中, 用分光光度计在 545nm 波长处测吸光度 A 值。阳性对照和阴性对照 (不加入支架材料) 操作同上。溶血率 = $(\text{样品 } A \text{ 值} - \text{阴性对照 } A \text{ 值}) / (\text{阳性对照 } A \text{ 值} - \text{阴性对照 } A \text{ 值}) \times 100\%$ 。若支架材料溶血率 $< 5\%$, 则支架材料符合溶血实验要求; $> 5\%$ 则显示支架材料有溶血作用。

1.5.2 动态凝血时间实验 将两种支架材料分别均匀、光滑地涂于烧杯底部中心, 直径 $> 2 \text{ cm}$, 涂后干燥保存, 玻璃皿表面先用 10% 甲基硅油硅化。将涂有支架材料的烧杯 37 °C 恒温 5 min 后, 用微量针筒向材料中心注入 0.2 mL 柠檬酸葡萄糖抗凝兔血 (ACD 全血), 恒温 5 min 后, 向血液中注入 0.025 mL CaCl_2 水溶液 ($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 开动秒表计时, 摇晃小烧杯 1 min, 使 CaCl_2 与血液混合均匀, 盖好烧杯再恒温 5 min, 向烧杯中加 100 mL 蒸馏水, 摇晃烧杯 10 min, 取上清液, 用分光光度计测量在 540 nm 波长的 A 值, 即烧杯中所剩余游离血红蛋白的 A 值, 在 10、20、30、40、50、60 和 70 min 分别记录 A 值, 将测得数值绘制动态凝血时间曲线, 取 A 值为 0.100 时所对应的接触时间为材料的动态凝血时间。曲线呈缓慢向下倾斜且经历时间长, 表明抗凝血性能优, 否则表示抗凝血性能劣。

1.5.3 细胞毒性实验 两种材料各取 5 块试样, 分为 PLA/丝素蛋白复合材料组和 PLA 组, 取密度为 $6 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的兔真皮干细胞悬液移注于培养皿, 转动培养皿使细胞均匀分散到表面, 培养至单层近汇合。弃去培养基, 加入新鲜培养基, 在培养皿中央放置试样, 第 1、2、3、4 和 8 天将酶滴入培养基中, 使黏附到培养皿壁的细胞脱落至培养

基中, 取定量的培养基滴到细胞计数板上, 计数评价细胞生长情况。

1.6 两种支架生物相容性体内评价

1.6.1 刺激实验 两种支架材料各称取 0.5 g 磨成粉末, 3%~5% 的甲醛溶液作为阳性对照, 生理盐水作为阴性对照, 再挑选 18 只体重 2.5~3.5 kg 的青紫蓝兔, 9 只分为 1 大组, 再分成 3 小组, 每组 3 只, 一大组使用单纯 PLA 支架材料, 一大组使用 PLA/丝素蛋白复合支架材料, 在兔脊柱两侧各选 3 个 $2 \sim 3 \text{ cm}^2$ 面积的去毛区将试验样品斑贴, 用 4 层 $25 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$ 的纱布覆盖, 包扎固定 4 h 后, 除去斑贴物, 标记斑贴部位, 用 70% 乙醇清洁后吸干。

评定标准中评分主要根据两方面: 红斑和焦痂。无红斑 0 分, 极轻微的红斑 1 分, 边界清晰红斑 (淡红色) 2 分, 中等红斑 (红色, 界限分明) 3 分, 严重红斑 (紫红色) 有轻微焦痂 4 分。水肿。无水腫 0 分, 极轻微水肿 1 分, 轻度水肿 (边缘明显高出周围皮面) 2 分, 中度水肿 (水肿高于周围皮面约 1 mm) 3 分, 严重水肿 (水肿高于周围 $> 1 \text{ mm}$, 面积超出斑贴区) 4 分。两项评分 0~0.4 分为无刺激, 0.5~1.9 分为轻度刺激, 2.0~4.9 分为中度刺激, 5.0 以上为强刺激。按记分标准, 在移去斑贴物后 24、48 和 72 h 后分别对实验部位的红斑和水肿反应评分。

1.6.2 热原实验 两组分别选用 3 只青紫蓝兔 (体重 2.5~3.5 kg, 雌兔应无孕, 测量 7 d 体温均在 $38.3 \sim 38.6$), 避免兔躁动并停止给食 2 h 以上, 选用肛温计测量直肠温度, 各兔每次插入深度应相同 (一般约 6 cm), 每隔 60 min 测量体温 1 次, 一般测 2~3 次, 2 次体温差 < 0.2 , 以此 2 次的平均值作为该兔的正常体温。测量其正常体温后 15 min 内, PLA/丝素蛋白复合支架组 3 只兔子自耳缘静脉缓慢注入 PLA/丝素蛋白复合支架材料浸提液, PLA 支架组 3 只兔子注入单纯 PLA 支架材料浸提液, 剂量均为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 液体温度为 37 °C。注射后每隔 1 h 测体温 1 次, 共测 3 次, 以 3 次中体温最高的一次减去正常体温为该兔的体温升高度数。体温升高 < 0.2 , 且升温累计总数 < 1 为符合标准。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 10.0 统计软件, 两独立样本计量资料组间比较采用秩和检验。

2 结果

2.1 PLA 与 PLA/丝素蛋白复合支架材料扫描电

镜结果

单纯 PLA 支架孔径约为 $150\ \mu\text{m}$, 孔隙率 $>90\%$, 孔壁较光滑; PLA/丝素蛋白复合支架的孔径及孔隙率与单纯 PLA 支架比较差异无显著性, 已达到组织工程支架的要求, 且孔壁黏附有丝素蛋白颗粒, 孔壁较粗糙, 更有利于细胞的黏附及生长, 见图 1。

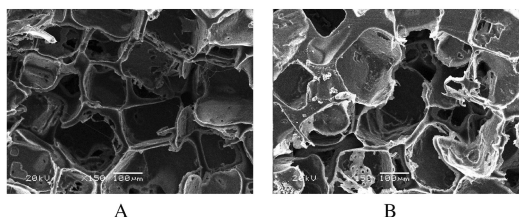


图 1 PLA 及 PLA/丝素蛋白复合支架材料扫描电镜图 ($\times 150$)
Fig. 1 Stereoscan photograph of PLA scaffolds (A) and PLA/silk fibroin compound scaffolds (B) ($\times 150$)

2.2 溶血实验

两种支架材料样品的溶血率均 $<5\%$, 均符合

表 1 PLA 与 PLA/丝素蛋白复合支架材料对兔溶血率的影响

Tab. 1 Effects of PLA and PLA/silk fibroin compound scaffolds on hemolysis rate in rabbits

Group	Hemolysis rate (/ %)										
	No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PLA scaffolds	3.3	4.4	4.0	3.5	2.9	3.1	4.0	3.2	3.0	3.6	
Compound scaffolds	2.2	2.5	2.7	2.3	2.1	2.3	2.5	2.6	1.9	2.4	

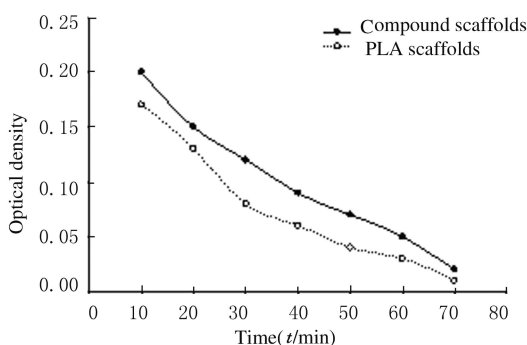


图 2 PLA 及 PLA/丝素蛋白复合支架材料兔全血动态凝血时间的影响

Fig. 2 Effects of PLA and PLA/silk fibroin compound scaffolds on dynamic coagulation time in whole blood of rabbits

2.4 细胞毒性实验

细胞毒性实验至第 8 天时, 将放入两组材料的

标准, 见表 1。对两组溶血率数据进行两独立样本计量资料秩和检验。单纯 PLA 支架组平均秩和 = 15.50, 秩和 $T_1 = 155.00$; PLA/丝素蛋白复合支架组平均秩和 = 5.50, 秩和 $T_1 = 55.00$ 。统计量 $U = 155.00$, 统计量 $W = 55.000$, 统计量 $Z = -3.784$, 双侧渐近概率 $P < 0.0005$, 无需矫正相同秩和, 计算精确概率 $P = 2 \times$ 单侧概率 < 0.0005 , 故可认为两种材料的溶血率间有统计意义, 所以 PLA/丝素蛋白复合支架材料的溶血率要比 PLA 支架的低, 其抗溶血性能要比 PLA 支架好。阳性对照 A 值 = 0.500, 阴性对照 A 值 = 0.000。

2.3 动态凝血时间实验

分别记录两组材料在 10、20、30、40、50、60 和 70 min 等指定时间的 A 值, 绘制出动态凝血时间曲线, 见图 2, PLA/丝素蛋白复合支架的动态凝血时间为 37 min, PLA 支架的动态凝血时间为 26 min, 表明 PLA/丝素蛋白复合支架的抗凝血性能明显优于 PLA 支架。

培养皿在倒置显微镜下观察兔真皮干细胞生长情况, PLA/丝素蛋白复合支架组的细胞在材料边缘的培养基中生长良好, 且比 PLA 支架组的培养基中的细胞数量明显增多, 经细胞计数板计数 PLA 支架组细胞浓度为 $8.6 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$, PLA/丝素蛋白复合支架组细胞浓度为 $9.5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$, 见图 3

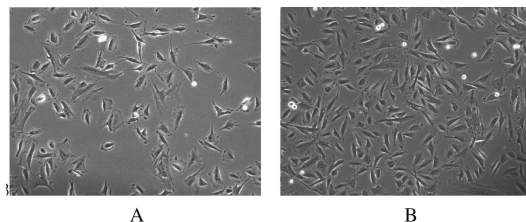


图 3 PLA 及 PLA/丝素蛋白复合支架材料对兔真皮干细胞的影响

Fig. 3 Effects of PLA (A) and PLA/silk scaffolds fibroin compound scaffolds (B) on rabbit dermal stem cells

将第 1、2、3、4 及 8 天培养皿中的细胞计数, 绘制成细胞生长曲线, 见图 4。由细胞生长曲线可以看出, PLA/丝素蛋白复合支架组的细胞生长情况要优于 PLA 支架组, 即 PLA/丝素蛋白复合支架对兔真皮干细胞的毒性小于 PLA 支架。

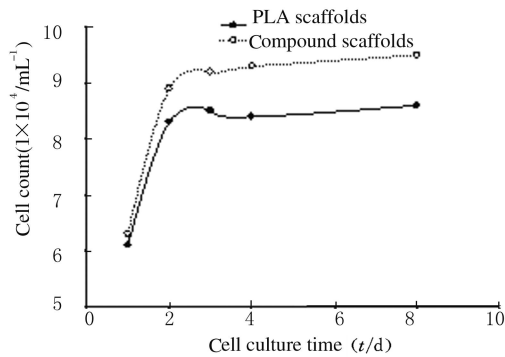


图 4 PLA 及 PLA/丝素蛋白复合支架材料对兔真皮干细胞生长曲线的影响

Fig. 4 Effects of PLA and PLA/silk fibroin compound scaffolds on the curve of dermal stem cells in rabbits

2.5 刺激实验

除去斑贴物后阳性对照的标记点两大组, 24h 后 6 只出现轻微红斑和水肿; 48 h 后有 10 只出现中度水肿和红斑; 72 h 后 4 只出现严重水肿和严重红斑, 10 只出现中度水肿和红斑。PLA/丝素蛋白组, 青紫蓝兔 24 h 后有 1 只的 1 个支架材料标记点有很轻微的红斑, 1 只的 1 个支架材料标记点有很轻微的红斑和水肿, 其余的支架材料标记点与阴性对照无明显区别; 48 h 后红斑和水肿消失, 各支架材料标记点与阴性对照标记点无区别; 72 h 后, 支架材料标记点和正常部位皮肤一样。单纯 PLA 组青紫蓝兔 24 h 后 2 只的 2 个支架材料标记点有很轻微的红斑, 1 只的 1 个标记点有很轻微的红斑和水肿, 其余的支架材料标记点与阴性对照无明显区别; 48 h 后红斑和水肿均消失, 与阴性对照标记点无区别; 72 h 后支架材料标记点和正常部位无明显区别。由此可见, 72 h 后两种支架材料的刺激性无明显差别, 均符合标准。

2.6 热原实验

在两种材料初试的 6 只青紫蓝兔中, 体温升高均 <0.2 , 并且体温升高总度数均 <1.0 , 符合热原实验的评价标准。而且兔子在注射两种支架材料的浸提液后, 没有任何不安、焦躁等表现, 所以

单纯 PLA 支架及 PLA/丝素蛋白支架材料热原均符合生物体的要求, 见表 2。

表 2 PLA 与 PLA/丝素蛋白复合支架材料对兔体温的影响

Tab. 2 Effects of PLA and PLA/silk fibroin compound scaffolds on the temperature in rabbits (/ /)

Group	T(Before injection)	T(after injection)		
		(t/h)1	2	3
PLA				
1	38.4	38.6	38.5	38.5
2	38.4	38.5	38.5	38.4
3	38.5	38.5	38.6	38.5
Compound scaffolds				
1	38.4	38.6	38.5	38.5
2	38.5	38.5	38.5	38.6
3	38.4	38.4	38.5	38.4

3 讨论

近年来, 采用组织工程学方法构建软骨复合组织成为软骨修复方面新的研究领域。在组织工程中, 种子细胞、可降解的支架材料以及细胞生长调节因子并称为组织工程的三大基本要素, 其中支架材料在软骨修复过程中所起的作用至关重要。PLA 是一种可降解且具有良好的生物相容性和可加工性的高分子材料, 与天然材料相比, 不仅有良好的物理机械性能而且有成熟的加工技术, PLA 是继 PGA 后第二类经美国 FDA 批准可用于人体的可降解聚合物材料, 但其细胞亲和性差、降解速度慢、在体内长期存在易引发炎症和肿胀等, 须对其进行改性或采用与其他材料复合的方法改善其性能。蚕丝蛋白是从蚕丝中提取的天然高分子纤维蛋白, Altman 等^[10]认为, 丝蛋白具有以下特点: 有独特的力学特性; 可通过不同方法获得膜或其他形态, 且工艺相对简单; 可通过某些氨基酸的氨基和侧链的化学修饰较容易地改变表面性能; 在体内外可缓慢降解; 对生物体无危险性。Inoue 等^[11]检测了动物贴壁细胞在蚕丝蛋白、胶原、聚苯乙烯等 3 种材料包被的培养皿中的生长情况, 发现蚕丝蛋白和胶原包被的培养皿中生长的细胞生长情况基本一致, 均较在聚苯乙烯包被的培养皿中的细胞高出 30%~50%。蚕丝蛋白使细胞很容易吸附, 并促进细胞的增殖和分化, 有良好的表面活性和很好的组织相容性, 且价格低、来源广泛^[10]。组织工程软骨支架的研究重点是改进现有材料和制

备工艺,采用人工材料与天然材料或者天然材料与天然材料复合制备软骨支架。周长忍等^[12]将甲壳素与PLA复合制备了支架材料,并对其生物相容性和安全性进行了评价,表明该材料具有较好的生物相容性和生物可降解性,可用作组织工程支架的基质材料。Yamane等^[13]用几丁质和硫酸软骨素混合制成水凝胶后接种软骨细胞,细胞能很好地黏附并保持软骨细胞特殊的表型。透明质酸与藻酸盐、胶原蛋白或者几丁质包埋,可促进细胞的黏附、增殖及分化^[14]。本研究将丝素蛋白和PLA复合,主要目的是使支架更有利于细胞的黏附、生长及增殖,提高支架的生物相容性。

由扫描电镜照片中可以看到,PLA/丝素蛋白复合支架在表面上黏附了丝素蛋白。在溶血实验中,两种材料的溶血率均 $<5\%$,且PLA/丝素蛋白复合支架的溶血率明显低于单纯PLA支架,表明PLA/丝素蛋白复合支架的体外抗溶血性能优于单纯PLA支架。动态凝血实验中,PLA/丝素蛋白复合支架的动态凝血时间为37 min,PLA支架的动态凝血时间为26 min,表明PLA/丝素蛋白复合支架的抗凝血性能优于单纯PLA。细胞毒性实验中,放入PLA/丝素蛋白复合支架组的培养基中的细胞在培养的第1、2、3、4和8天的数量明显多于单纯PLA支架组,且细胞生长情况良好,表明PLA/丝素蛋白复合支架的细胞毒性较单纯PLA支架材料小,更有利于细胞在材料中的黏附、生长和增殖。在刺激实验中,两种材料的实验组在72 h后与阴性对照无区别,分级都属于无刺激。在热原实验中,分别注入两种材料浸提液的青紫蓝兔在1、2及3 h时测得的体温升高度数均 <0.2 ,PLA/丝素蛋白复合材料和PLA材料无明显差别,均符合标准的结果表明,PLA/丝素蛋白复合支架材料不存在潜在致敏性物质,所含热原量符合生物体的要求。

PLA/丝素蛋白复合支架材料的抗溶血性、抗凝血性、细胞毒性、刺激性和致热性均符合ISO-10993标准,而且有着比PLA支架更好的生物相容性。但如何控制丝素蛋白水溶液的浓度,使其与PLA支架复合更有利于细胞的黏附、生长和增殖,更好地修复缺损组织,还有待于进一步研究。

综上所述,溶血实验、动态凝血时间实验、刺激实验、热原实验均表明,PLA/丝素蛋白复合支架材料不存在潜在致敏性物质,所含热原量符合生

物体的要求,且在溶血实验和动态凝血时间实验的结果均优于单纯PLA支架材料;细胞毒性实验表明,细胞能在材料表面很好地生长,优于单纯PLA支架材料。所以PLA/丝素蛋白复合支架材料具有比单纯PLA支架材料更优良的生物相容性,可以作为支架材料植入体内。

[参考文献]

- [1] 方丽茹,翁文剑,沈 鸽. 骨组织工程支架及生物材料研究[J]. 生物医学工程杂志, 2003, 20 (1) 2: 148-152.
- [2] Anita W, Shum T, Artuhur F. Morphological and biomechanical characterization of poly (glycolic acid) scaffolds after in vitro degradation [J]. Polymer Degradat Stability, 2003, 81 (1): 141-149.
- [3] 陈 蕾,戴红莲,闫玉华. PLA及其复合材料的研究进展[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2005, 2 (4): 45-48.
- [4] 王觅格,夏亚一,王栓科,等. 骨髓间充质干细胞复合消旋聚乳酸/明胶修复兔关节软骨缺损的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21 (7): 753-758.
- [5] 李立华,丁 珊,周长忍. 聚乳酸/壳聚糖多孔支架材料的生物学性能评价[J]. 生物医学工程杂志, 2003, 20 (3): 398-400.
- [6] Lazzeri L, Cascone MG, Danti S, et al. Gelatine/ PLLA spongelike scaffolds: morphological and biological characterization [J]. Mater Sci Mater Med, 2006, 17 (12): 1211-1217.
- [7] 孔祥东,朱良均,闵思佳. 丝素蛋白在生物材料上的研究和应用[J]. 功能材料, 2001, 32 (6): 583-585.
- [8] Unger RE, Michael W, Kirsten P, et al. Growth of human cells on a non-woven silk fibroin net: a potential for use in tissue engineering [J]. Biomaterials, 2004, 25 (6): 1069.
- [9] 傅师申,陈铁楼,阳道允,等. CaCl₂法丝素溶解工艺的研究[J]. 丝绸, 1999, 8 (1): 31-33.
- [10] Altman GH, Diaz F, Jakuba C, et al. Silk-based biomaterials [J]. Biomaterials, 2003, 24 (3): 401-405.
- [11] Inoue S, Tanaka K, Arisaka F, et al. Silk fibroin of Bombyx mori is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6: 6: 1 molar ratio [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (51): 40517-40528.
- [12] 周长忍,丁 珊,李立华. 可降解材料的制备及用研究进展[J]. 中国创伤骨科杂志, 2000, 12 (4): 317-319.
- [13] Yamane S, Iwasaki N, Majima T, et al. Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue engineering [J]. Biomaterials, 2005, 26 (6): 611-619.
- [14] Hsu SH, Whu SW, Hsieh SC, et al. Evaluation of chitosan alginate-hyaluronate complexes modified by an RGD-containing protein as tissue-engineering scaffolds for cartilage regeneration [J]. Artif Organs, 2004, 28 (8): 693-703.