

## 中文摘要

### 3D 打印负载柚皮苷的骨组织工程支架的制备与成骨性能研究

临床上因肿瘤、创伤、感染等原因常造成大面积的颅面骨缺损，其临床治疗仍面临巨大的挑战。骨组织工程的发展给骨缺损的修复治疗带来了希望。 $\beta$ -磷酸三钙 ( $\beta$ -Tricalcium phosphate,  $\beta$ -TCP) 由于其成分与正常骨骼相似，且具有良好的骨传导性、生物降解性而广泛用于骨科重建手术，并成为 3D 打印常用基本材料之一，但其成骨诱导能力有限。传统的生长因子虽然具有良好的成骨诱导性能，但可能会有一些副作用，如可造成异位成骨等，因此寻找具有良好的成骨诱导性且副作用小的药物成为医学研究热点。柚皮苷 (Naringin, NG) 是中药骨碎补的主要活性单体成分，属于双氢黄酮类化合物，主要存在于柑橘物种中，具有抗炎、抗肿瘤及防治骨质疏松等多种作用。已有研究表明，柚皮苷可以通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路，诱导骨髓间充质干细胞 (Bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 向成骨细胞分化。因此，本研究拟通过 3D 打印技术制备出  $\beta$ -TCP 支架，在聚多巴胺 (Polydopamine, PDA) 涂层的辅助下，将柚皮苷负载在  $\beta$ -TCP 支架上，通过对支架进行一系列的物理表征、药物释放、细胞相容性检测，探讨其成为骨组织工程支架的潜力。

1、首先通过 3D 打印技术制备  $\beta$ -TCP 支架 (T 组)，进行 PDA 涂层后 (D 组)，分别浸泡于浓度为 0.1 mg/ml、1 mg/ml、5 mg/ml 的柚皮苷乙醇溶液中，得到三种含不同浓度柚皮苷的 NG/PDA/ $\beta$ -TCP 复合支架 (浓度从低到高分别为 L 组、M 组、H 组)。使用扫描电镜、能谱分析仪、X 射线衍射分析仪分别检测支架的微观形貌、元素分布、物相；然后分别测量支架的孔径、孔隙率、力学性能、亲水性及药物释放规律。结果显示五组支架均具有相互连通的大孔及微孔结构，且孔径大小均匀，T 组、D 组、L 组、M 组、H 组的孔径分别为 ( $432.14 \pm 11.27$ )  $\mu\text{m}$ 、( $431.92 \pm 10.22$ )  $\mu\text{m}$ 、( $430.36 \pm 10.17$ )  $\mu\text{m}$ 、( $432.16 \pm 10.01$ )  $\mu\text{m}$ 、( $431.98 \pm 10.14$ )  $\mu\text{m}$ ，差异无统计学意义 ( $p > 0.05$ )。孔隙率分别为 ( $50.17 \pm 0.95$ )%、( $50.47 \pm 0.12$ )%、

(49.94±0.72)%、(50.15±0.91)%、(50.09±0.28)%，差异无统计学意义( $p>0.05$ )。压缩模量分别为(25.5±5.3)、(25.2±2.19)、(25.6±3.48)、(25.6±4.14)、(25.3±6.19) MPa，差异无统计学意义( $p>0.05$ )；五组支架均具有良好的亲水性。经 PDA 涂层后的四组支架均含有 N 元素、且基底材料物相未发生改变，表面较 T 组支架表面明显粗糙，可见大量细小颗粒结构；三组载药支架所负载的柚皮苷在前 3 天释放较快，随后释放缓慢，至 30 天时，L 组、M 组、H 组释放总量分别为 0.217 mg、0.251 mg、0.410 mg。

2、使用 CCK8 实验、细胞活死染色实验、细胞黏附实验、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP) 染色检测了支架对 MC3T3-E1 细胞增殖、毒性、黏附及 ALP 活性的影响。结果显示各组支架均无细胞毒性，其中 H 组支架促进细胞增殖的能力最强 ( $p<0.001$ )、细胞黏附性能最佳、ALP 活性最强。这一系列实验证实了负载高浓度柚皮苷的 3D 打印 NG/PDA/ $\beta$ -TCP 复合支架生物相容性较好，并可促进 MC3T3-E1 细胞的增殖、黏附及 ALP 活性，有望在骨组织工程中使用。

**关键词：**

3D 打印； $\beta$ -磷酸三钙；柚皮苷；骨组织工程；支架

## 关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解吉林大学有关保留、使用学位论文的规定，同意吉林大学保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权吉林大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。


（保密论文在解密后应遵守此规定）

论文级别：  硕士  博士

学科专业： 口腔临床医学

论文题目： 3D 打印负载柚皮苷的骨组织工程支架的制备  
与成骨性能研究

作者签名： 

指导教师签名： 

2023 年 6 月 2 日

## Abstract

### **Preparation and osteogenic properties study of 3D printed naringin loaded bone tissue engineering scaffolds**

Clinical treatment of craniofacial bone defects, which are often caused by tumor, trauma and infection, is still a huge challenge. The development of bone tissue engineering brings hope for the repair and treatment of bone defects. Due to its similar composition to normal bone, good bone conductivity and biodegradability,  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) has been widely used in orthopedic reconstructive surgery, and has become one of the basic materials commonly used in 3D printing, but its osteogenic induction ability is limited. Although traditional growth factors have good osteogenic induction performance, they may have some side effects, such as ectopic osteogenesis. Therefore, it has become a hot topic of medical research to find drugs with good osteogenic induction and few side effects. naringin (NG) is the main active monomer component of the traditional Chinese medicine *Rhizoma Drynariae*, belonging to dihydroflavonoids, mainly exists in citrus species, has anti-inflammatory, anti-tumor and prevention of osteoporosis and other effects. Previous studies have shown that naringin can induce bone mesenchymal stem cells (BMSCs) to differentiate into osteoblasts through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. Therefore, in this study, a  $\beta$ -TCP scaffold was prepared by 3D printing technology. Naringin was loaded to the  $\beta$ -TCP scaffold assisted by polydopamine (PDA) coating. A series of physical characterization, drug release, and cytocompatibility tests were conducted to explore its potential to become a bone tissue engineering scaffold.

1.  $\beta$ -TCP scaffold (group T) was prepared by 3D printing technology. After PDA coating (group D), the scaffolds were immersed in naringin ethanol solution with concentrations of 0.1 mg/ml, 1 mg/ml and 5 mg/ml, respectively. Three NG/PDA/ $\beta$ -TCP composite stents containing naringin in different concentrations were obtained (group L, group M and group H, respectively, from low to high concentration). Scanning electron microscopy, energy spectrum analyzer and X-ray diffraction analyzer were used to detect the microstructure, element distribution and phase of the scaffold. Then the pore size, porosity, mechanical properties, hydrophilicity and drug release

were measured. The results showed that the five groups of scaffolds had interconnected macroporous and microporous structures with uniform pore size. The apertures of T, D, L, M and H groups were  $(432.14 \pm 11.27) \mu\text{m}$ ,  $(431.92 \pm 10.22) \mu\text{m}$ ,  $(430.36 \pm 10.17) \mu\text{m}$ ,  $(432.16 \pm 10.01) \mu\text{m}$ ,  $(431.98 \pm 10.14) \mu\text{m}$ , respectively, with no significant difference ( $p > 0.05$ ). The porosity was  $(50.17 \pm 0.95) \%$ ,  $(50.47 \pm 0.12) \%$ ,  $(49.94 \pm 0.72) \%$ ,  $(50.15 \pm 0.91) \%$ ,  $(50.09 \pm 0.28) \%$ , with no significant difference ( $p > 0.05$ ). The compression moduli were  $(25.5 \pm 5.3)$ ,  $(25.2 \pm 2.19)$ ,  $(25.6 \pm 3.48)$ ,  $(25.6 \pm 4.14)$ ,  $(25.3 \pm 6.19)$  MPa, respectively, with no significant difference ( $p > 0.05$ ); All the five groups of scaffolds had good hydrophilicity. The four groups of scaffolds coated by PDA all contain N element, and the substrate phase does not change, the surface of the scaffolds is rougher than that of the T group, and a large number of fine particle structure can be seen. Naringin in the three groups was released quickly in the first 3 days, and then slowly. At 30 days, the total release of naringin in group L, Group M and group H was 0.217 mg, 0.251 mg and 0.410 mg, respectively.

2. The effects of the scaffold on the proliferation, toxicity, adhesion and ALP activity of MC3T3-E1 cells were detected by CCK8 assay, cell survival and death staining assay, cell adhesion assay, and alkaline phosphatase (ALP) staining. The results showed that there was no cytotoxicity in all groups, among which group H had the strongest ability to promote cell proliferation ( $p < 0.001$ ), the best cell adhesion performance and the strongest ALP activity. This series of experiments confirmed that the 3D-printed NG/PDA/ $\beta$ -TCP composite scaffold loaded with high concentration (5mg/ml) naringin has good biocompatibility, and can promote the proliferation, adhesion and ALP activity of MC3T3-E1 cells, which is expected to be used in bone tissue engineering.

**Key words:**

3D printing; Naringin;  $\beta$ -Tricalcium phosphate; Bone tissue engineering; Scaffold

# 目 录

中文摘要 .....	I
<b>Abstract.....</b>	<b>III</b>
英文缩略词表.....	VII
<b>第 1 章 绪 论.....</b>	<b>1</b>
1.1 骨缺损的修复治疗 .....	1
1.2 骨组织工程支架 .....	2
1.2.1 理想支架的特点.....	2
1.2.2 支架的分类.....	2
1.3 骨组织工程支架常用涂层——聚多巴胺.....	5
1.4 柚皮苷 .....	6
1.5 3D 打印技术 .....	8
1.6 本课题研究思路 .....	10
<b>第 2 章 实验材料和方法.....</b>	<b>11</b>
2.1 主要实验材料 .....	11
2.2 主要实验仪器 .....	12
2.3 支架制备过程 .....	12
2.3.1 支架的制备.....	12
2.3.2 支架表面改性.....	13
2.3.3 负载柚皮苷.....	13
2.4 实验方法 .....	14
2.4.1 支架表面形貌观察及元素测定.....	14
2.4.2 支架孔隙的测量.....	14
2.4.3 支架力学性能检测.....	14
2.4.4 支架亲水性检测.....	14
2.4.5 支架的药物缓释测定.....	14

2.4.6	MC3T3-E1 细胞的培养 .....	15
2.4.7	支架的细胞增殖检测 .....	15
2.4.8	细胞活死染色实验 .....	15
2.4.9	支架的细胞黏附测试 .....	16
2.4.10	支架的细胞成骨分化检测 .....	17
2.4.11	统计学分析 .....	17
<b>第 3 章</b>	<b>实验结果.....</b>	<b>18</b>
3.1	支架表面形貌及结构特征 .....	18
3.2	X 射线能谱分析(EDS)及 X 射线衍射分析 (XRD) .....	19
3.3	支架孔隙的测量 .....	21
3.4	支架力学性能检测 .....	21
3.5	支架亲水性检测 .....	21
3.6	支架的药物释放 .....	22
3.7	MC3T3-E1 细胞.....	22
3.8	支架的细胞增殖 .....	23
3.9	细胞活死染色 .....	24
3.10	支架的细胞黏附 .....	24
3.11	支架对细胞成骨分化的影响 .....	25
<b>第 4 章</b>	<b>讨 论.....</b>	<b>26</b>
<b>第 5 章</b>	<b>结 论.....</b>	<b>29</b>
	<b>参考文献.....</b>	<b>30</b>
	<b>作者简介及在学期间所得的科研成果 .....</b>	<b>39</b>
	<b>致 谢.....</b>	<b>40</b>

## 英文缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
$\beta$ -TCP	$\beta$ -Tricalcium phosphate	$\beta$ -磷酸三钙
PDA	Polydopamine	聚多巴胺
ALP	Alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
CCK8	Cell counting kit 8	细胞计数试剂盒 8
Ctrl	Control	阳性对照组
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	细胞培养基
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
NG	Naringin	柚皮苷
OD	Optical density	光密度值
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PVA	Polyvinyl alcohol	聚乙烯醇
BGs	Bioactive glasses	生物活性玻璃
HA	Hydroxyapatite	羟基磷灰石
PCL	Polycaprolactone	聚己内酯
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)	聚乳酸-羟基乙酸共聚物
SEM	Scanning electron microscope	扫描电子显微镜
EDS	Electronic differential system	能谱分析
XRD	X-ray diffraction	X 射线衍射分析



## 续表

缩略词	英文全称	中文全称
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylpropionic acid	3, 4-二羟基苯丙氨酸
FDA	Food and Drug Administration	美国食品和药物管理局
BMP2	Bone morphogenetic protein-2	骨形态发生蛋白-2

# 第1章 绪论

## 1.1 骨缺损的修复治疗

骨是一种矿化的致密结缔组织，主要由水、骨盐及有机基质组成<sup>[1]</sup>。骨在人体内发挥着多种作用：运动，支撑体重，保护脏器，储备钙磷离子，感觉功能以及造血功能。而肿瘤、创伤、感染、先天畸形、退行性病变、失败的关节成形术等各种原因常造成超过临界尺寸的骨缺损<sup>[2]</sup>，因自身无法愈合，严重影响患者的生活质量。据统计，我国每年约 600 万人因各种原因导致骨损伤甚至骨缺失，其中 400 万人需要进行植骨手术治疗<sup>[3]</sup>。

目前在临床上，自体骨移植仍然是骨缺损修复的“金标准”。取骨部位多数为髂骨、肋骨、腓骨。新鲜自体骨含有大量活的细胞和骨诱导蛋白。因为来源于患者自身，所以没有免疫排斥反应。在植入体内后，新鲜自体骨可以与周围组织快速整合，提高存活率并且修复速度快<sup>[4]</sup>。但自体骨移植仍有很多缺点，例如骨来源有限，不能用于骨需求量大或是形状特殊的骨缺损位置<sup>[5]</sup>；常常伴有附加切口，对骨供应区造成严重损伤，可能伴随局部麻木、慢性疼痛、炎症、感染等手术风险，给患者带来二次痛苦<sup>[6]</sup>；自体骨移植手术时间一般较长，对于患者身体健康状况要求较高。由于自体骨移植的局限性，异体骨移植的应用受到广泛关注<sup>[7]</sup>。它分为同种异体骨移植和异种异体骨移植两种。同种异体骨移植多为尸体来源，优点是可以获取与患者缺损部位相同的骨组织。然而，同种异体移植物的骨诱导功效受到储存和灭菌技术的限制<sup>[6]</sup>，有传播疾病的风险。异种异体骨移植的来源为动物骨骼，虽然具有来源广泛的优点，但是它有免疫排斥反应的风险，患者术后可能需要终生使用免疫抑制剂，给家庭带来额外的经济负担。随着医疗技术的发展，牵张成骨走进人们的视线，尤其在治疗牙颌面畸形，需要正畸和手术治疗相结合的病例上，牵张成骨展现出了极佳的治疗效果<sup>[8]</sup>。但是，此种方法治疗过程时间长，干扰因素多，导致其在临床上的应用受到了限制。目前，具有良好生物相容性的钛板在临床得到了广泛的应用。根据患者病情需求，可制定个性化的金属重建板。然而金属重建板的弹性模量远高于皮质骨，会造成周围骨组织和软组织的磨损，甚至出现金属板的暴露、脱落、折断，需要二次手术将其取出。上

述骨缺损修复的治疗方法都存在各种弊端。因此，寻找新的骨组织替代物成为当今热点。随着医疗的进步和科技的发展，相关领域的科学家们在骨组织工程领域取得了巨大的进步，骨组织工程支架有望成为一种理想骨的替代物<sup>[9]</sup>。

## 1.2 骨组织工程支架

骨组织工程的核心三要素是种子细胞、生物活性分子和支架。骨组织工程支架从本质上说，是一个可支持三维组织形成的人工结构。将成骨细胞、软骨细胞或骨髓间充质干细胞等种子细胞，通过体外培养扩增，载入到有利于细胞黏附和保持其功能的骨组织工程支架上，然后植入缺损部位，承担细胞外基质作用，为骨再生提供良好的环境，进一步使宿主细胞在上方黏附、增殖、分化成骨<sup>[10]</sup>。生物相容性是一切组织工程支架的首要标准，即允许细胞粘附、迁移和增殖而不会引起阳性免疫反应和严重的炎症反应。

### 1.2.1 理想支架的特点

作为植入人体内修复骨缺损的支架，首要合格因素就是良好的生物相容性，安全、无毒，在体内不会引起炎症反应，可促进细胞黏附和增殖。其次，良好的生物降解性也是必不可少的。支架作为骨组织临时替代物，其降解速率需要和骨形成速率匹配，促进骨组织重塑过程。随着支架的降解，其力学性能也会减弱，所以具有一定的机械强度、可临时为缺损区提供支撑也是支架需要具备的特点之一。理想的支架应具有可塑性，能够根据临床各种形状的骨缺损制备个性化支架。良好的三维互联结构及孔隙率有利于宿主细胞迁移和物质交换<sup>[13,33,34]</sup>。支架表面较大的粗糙度有利于体内植入后体液中的蛋白质以及细胞的黏附<sup>[35]</sup>。由于临床上受骨缺损困扰的患者众多，支架应易于制造，可批量生产。堪称优良的骨组织工程支架必须具备骨整合性、骨传导性和骨诱导性<sup>[36]</sup>。

### 1.2.2 支架的分类

根据材料性质的不同，骨组织工程支架主要分为以下4类：

#### (1) 可降解金属

目前临床上的金属材料主要有钛、钛合金、不锈钢及钴合金<sup>[11]</sup>。此类型支架拥有良好的机械强度、生物相容性和耐腐蚀性，多用于制作关节假体、钢板和钢

钉。研究者还制备出金属多孔支架来支持骨组织的再生<sup>[12,13]</sup>。但是由于此类金属缺乏生物降解性,临床投入应用受到较大影响。可降解金属打开了骨组织工程支架的另一扇大门。作为身体正常运作所必需的元素,镁参与细胞中的许多代谢途径<sup>[14]</sup>。该元素激活 300 多种参与碳水化合物、核酸和蛋白质代谢的酶<sup>[15]</sup>。镁对骨骼发育和矿化至关重要<sup>[1]</sup>。镁及镁合金可在体内降解并释放镁离子,待机体骨组织完成修复后,其可全部被机体代谢。研究显示,多孔镁支架的抗压强度与松质骨相近,能减少应力屏蔽效应<sup>[16]</sup>。镁支架与羟基磷灰石相比,随着镁的降解可见更多新骨生成<sup>[17]</sup>;锌、铁作为可降解金属在骨组织工程中同样发挥了巨大的作用。但是可降解金属美中不足之处在于材料降解速度快,释放的氢气会阻碍骨再生过程。

## (2) 高分子聚合物

高分子聚合物主要分为天然聚合物和人工聚合物。因其具有良好的延展性、生物相容性和可降解性,在医学领域发挥很大的作用<sup>[18]</sup>。常见的天然聚合物包括胶原、壳聚糖、蚕丝、明胶、海藻酸钠。这些材料表面有特殊的细胞识别信号,能够引导细胞生长的结构,进而让它们的细胞亲和力更高,并且可刺激免疫反应。有学者表明壳聚糖胶原支架促进人间充质干细胞粘附、增殖和分化<sup>[19]</sup>;还有学者研制出交联纤维素纳米晶体气凝胶,作为骨组织支架,它具有柔韧性、多孔性,植入大鼠体内的骨缺损后有效促进骨骼生长<sup>[20]</sup>。但是天然高分子聚合物通常具有潜在的毒性以及较差的力学强度,又因其生物降解速率的不可控,目前认为天然高分子聚合物在骨组织工程中发挥的作用有限。

常见的人工合成聚合物有聚乙烯醇 (Polyvinyl alcohol, PVA)、聚己内酯 (Polycaprolactone, PCL)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (Poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA) 等。这类材料虽然有部分缺点,如亲水性能较差,细胞黏附性能弱,酸性降解产物可引起无菌性炎症,但是它们存在更多的优点,比如产量大、生产成本低、保存期限长等。而且人工聚合物还可以调控材料降解速度、改变材料力学强度,降解产物也能被机体完全水解代谢。研究人员可以使人工合成聚合物形成水溶性超分子聚合物,可以用作具有独特物理化学性质的水凝胶剂。它还可以构建各种纳米结构,其亲水和疏水链段的纳米结构可成为稳定的超分子水凝胶药物递送系统<sup>[21]</sup>,可将生长因子和治疗药物包封起来,在骨组织工程发挥重要的作用。

### (3) 生物陶瓷

生物陶瓷是无机非金属材料,分为生物惰性、生物活性和生物可降解性陶瓷<sup>[22]</sup>。因为具有良好的生物相容性,生物陶瓷已经普遍用于骨科、牙科、整形外科及心血管外科等临床治疗中<sup>[23]</sup>。

氧化铝、氧化锆等生物惰性陶瓷在骨科中主要应用于全髋关节和膝关节置换术。自1990年以来,全球植入了350多万个氧化铝组件和60多万个氧化锆股骨头,因为其固有的脆性,临床出现许多关于陶瓷断裂的报告<sup>[24]</sup>。白色半透明的氧化锆更多应用在牙科修复中,其特有的理化性质满足对牙齿外观修复和高机械强度的需求。

生物活性陶瓷主要有羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA)和生物活性玻璃(Bioactive glasses, BGs)。它们都具有较高的抗压强度,并且可以持续向骨缺损处提供无机离子,在骨再生和生物矿化领域中得到广泛的应用。HA与骨组织中钙、磷等无机盐成分相似,具有良好的骨整合及骨传导能力<sup>[25]</sup>。它的化学性质稳定,还具有诱导新生毛细血管形成的优点。但HA降解吸收过于缓慢,单纯的HA材料难以为新骨形成提供适宜的钙磷环境。作为HA的替代品,人们对BGs产生了兴趣。它是以合成的硅酸盐为主的一种材料,具有良好的生物相容性,还表现出与骨骼的早期强界面结合。当BGs植入体内时,它的表面形成带有负电的碳酸羟基磷灰石层,该结构不仅高度类似于骨骼的矿物质部分,还能吸附大量生物因子诱导骨再生。这就是它具备生物活性的原因<sup>[24]</sup>。与其他陶瓷类材料相同,BGs的脆性较大,不适合单独应用。

$\beta$ -磷酸三钙( $\beta$ -Tricalcium phosphate, $\beta$ -TCP)具有良好的可降解性<sup>[26]</sup>。作为磷酸钙化合物的一种,它拥有出色的生物相容性和骨传导性<sup>[27]</sup>。与HA相比, $\beta$ -TCP的降解率提高十倍,与新骨形成速度相接近,可以加速骨组织的重塑过程。人骨正常的钙磷比为1.1~2.1,而 $\beta$ -TCP的钙磷比是1.5,这一点与人骨质非常接近。虽然它的机械性能高于BGs,但仍然远低于皮质骨,无法满足临床骨缺损修复的治疗要求。研究者们对 $\beta$ -TCP进行多年的研究,发现可以通过改变诸如孔隙率、烧结温度以及形状等条件来优化支架的多种性能<sup>[26,28]</sup>。有学者发现蜂窝状TCP的几何结构可以诱导血管生成和改变孔内氧分压,进而分别促进软骨和骨组织的形成<sup>[29]</sup>。还有学者通过微波烧结技术成功增强了3D打印互连大孔 $\beta$ -TCP支架的

机械强度<sup>[30]</sup>，使  $\beta$ -TCP 材料在骨组织工程中的应用得到了进一步的发展。

#### (4) 复合材料

无论是可降解金属材料，或是高分子聚合物材料，亦或是生物陶瓷材料，它们都不具备完美的性能。为弥补各种材料的劣势，复合材料应运而生。例如将生物陶瓷材料载入到细胞黏附性较差的高分子聚合物内，可提高支架的生物活性<sup>[31]</sup>。通过混合 HA 和  $\beta$ -TCP 形成新型生物陶瓷材料 BCP，支架表面再用聚多巴胺涂层，如此既解决了 HA 降解速率慢的问题，又提高了生物陶瓷支架的亲水性<sup>[32]</sup>。

### 1.3 骨组织工程支架常用涂层——聚多巴胺

在纳米尺度的医疗领域中，无论是在生物植入体还是药物负载方面，聚合物涂层发挥重大作用。研究者们热衷寻找各种涂层材料以控制蛋白或细胞黏附性以及药物负载和释放。海贻贝排泄的贻贝黏附蛋白是一种透明的凝胶状蛋白质，随着时间的推移硬化成坚固的粘合线，并逐渐变黑。贻贝黏附蛋白因其可在潮湿环境中与各种基体表面形成强大黏附作用而备受关注。上个世纪已经确定 3, 4-二羟基苯丙氨酸 (3,4-Dihydroxyphenylalanine, DOPA) 是贻贝黏附蛋白强大黏附特性所需的关键功能元素<sup>[37]</sup>。而多巴胺 (3, 4-二羟基苯乙胺) 作为 DOPA 的衍生物有着相同的性能。多巴胺是儿茶酚类化合物的一种，一方面，它是一种反应性物质，能够充当弱酸，同时作为易氧化的还原剂；另一方面，两个羟基在邻近位置的存在使该部分成为双齿配位和氢键的理想选择<sup>[38]</sup>。Xi 等人发现多巴胺通过自氧化聚合沉积形成聚多巴胺膜层，引起了生物医药领域的关注<sup>[39]</sup>。

多巴胺通过氧化自聚作用形成聚多巴胺 (Polydopamine, PDA)，在反应过程中，可牢固黏附于任何材料表面。由于富含多种活性基团 (如酚羟基、胺基、醌基及亚胺基等)，使其具有极佳的黏附性和化学反应活性，不仅可以涂在骨组织工程支架以提高生物活性，还可以为骨修复材料和生长因子的结合提供二次反应平台<sup>[40]</sup>。

Yang 等人将 PDA 涂层沉积在碳/碳 (C/C) 复合材料上，然后与精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸共价偶联，增强了复合材料生物活性和亲水性<sup>[41]</sup>。Xu 等人将不同浓度的 PDA 涂层于 PLGA/ $\beta$ -TCP 支架上，检测了支架的理化特性和生物相容性，结果显示可以通过增加 PDA 浓度来促进细胞黏附和增殖并改善成骨<sup>[42]</sup>。Liu 等

人借助 PDA 涂层，成功将淫羊藿苷和去铁胺两种生物活性分子负载到聚 L-丙交酯复合纤维膜上<sup>[43]</sup>。

目前合成 PDA 多使用溶液氧化法。多巴胺可以在碱性环境下，于空气中进行氧化聚合反应。随着时间的延长，反应液由无色逐渐变为棕色直至黑色。其方法简单，反应变化肉眼可见，广泛应用于实验研究中。

## 1.4 柚皮苷

骨移植材料通常没有成骨诱导能力，所以研究者们一般会将生长因子添加到材料上，以此提高骨移植材料的成骨诱导性能。作为骨组织工程核心三要素之一的生长因子，如骨形态发生蛋白-2 (Bone morphogenetic protein-2, BMP-2)，通常是一类蛋白质多肽，在骨愈合和成骨过程中调节细胞行为（包括募集、迁移、粘附、增殖和分化）方面具有巨大的应用潜力。BMP 在 2002 年经美国食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准后被许多外科医生采用作为自体骨移植物的替代品。然而，临床安全性问题逐渐暴露出来，术后部分患者出现了几种严重的并发症，包括水肿导致的吞咽困难和呼吸困难、骨移植物的吸收和骨质溶解<sup>[44-46]</sup>。除了上述副作用，生长因子在骨再生中的使用还存在其他安全问题，包括骨过度生长、异位成骨、免疫反应、炎症反应、神经损伤、呼吸问题、癌症<sup>[47-50]</sup>。并且生长因子会快速降解和失活，在生理条件下生物寿命过短，制作成本过高，这些均使其在临床应用上受到极大限制。因此寻找具有良好的成骨诱导性且副作用小、生物活性稳定、成本低廉的药物迫在眉睫。

传统中药常被认为是良好的骨再生药物<sup>[51,52]</sup>。中药骨碎补是水龙骨科植物槲蕨的根茎，具有补肾强骨、续伤止痛等功效<sup>[53]</sup>。根据《中华人民共和国药典》记录，骨碎补可消风祛斑，治疗牙齿松动、耳聋耳鸣、肾虚腰酸、斑秃白癫的功效<sup>[54]</sup>。而柚皮苷 (Naringin, NG) 是骨碎补的主要活性单体成分，属于双氢黄酮类化合物，具有促进骨缺损修复的作用。作为一种天然来源的骨诱导小分子药物，它的分子质量为 580.53 Da。和传统生长因子相比，柚皮苷分子质量较低，具有更加安全稳定、可降低免疫反应的优点。近年来，柚皮苷因其具有抗炎、抗肿瘤以及防治骨质疏松等多种作用而受到广泛的关注<sup>[55-58]</sup>。已有研究表明，柚皮苷控制病程中产生炎症反应的主要调节通路是核因子- $\kappa$ b (NF- $\kappa$ b) 与丝裂原活化蛋白

激酶 (MAPK); 经实验证实柚皮苷可通过抑制细胞外调节蛋白激酶 (ERK1/2)、应激活化蛋白激酶 (JNK) 和 p38 MAPK 的磷酸化来减弱丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 的活化。通过抑制 I $\kappa$ B- $\alpha$  的降解和 p65 的易位来有效抑制 NF- $\kappa$ b 的活化<sup>[59]</sup>。研究人员发现柚皮苷通过调控细胞增殖和凋亡相关基因的表达以及 PI3K/AKT 通路的活化, 抑制甲状腺癌细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 起到抗肿瘤作用<sup>[60]</sup>。Ge 等学者发现柚皮苷可通过 PI3K/AKT/mTOR 通路对骨质疏松症发挥保护作用<sup>[61]</sup>。

已有研究表明, 柚皮苷可以促进大鼠成骨细胞、兔骨髓基质细胞、小鼠 MC3T3-E1 细胞等多种细胞成骨分化<sup>[57,62-64]</sup>。有学者研究发现柚皮苷可降低骨质疏松小鼠模型的骨矿物质密度和骨矿物质含量的损失, 并证实了柚皮苷通过 PI3K/AKT、c-Fos/c-Jun 和 AP-3 依赖性信号通路增加 BMP-1 表达, 从而促进骨组织的形成<sup>[65]</sup>。骨髓间充质干细胞 (Bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 是骨基质中发现的能分化为成骨细胞的多能干细胞, 在骨形成过程中发挥重大作用。Zhang 等人研究了柚皮苷对人 BMSCs 增殖和成骨分化的影响, 结果发现柚皮苷不仅可以促进 BMSCs 的增殖, 还可以促进成骨分化标志物 (碱性磷酸酶, 胶原蛋白 I, 骨桥蛋白, 骨钙素) 的表达, 促进 BMSCs 的成骨分化<sup>[66]</sup>。同时柚皮苷还可以通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路诱导, 使 BMSCs 向成骨细胞分化。Guo 等人发现柚皮苷处理的牙髓干细胞具有较高的碱性磷酸酶活性和骨化水平, Runx2、OPN、DSPP 和 DMP1 的表达也较高; 并且通过蛋白质印迹实验, Guo 等人发现柚皮苷通过上调 Wnt3a、 $\beta$ -catenin、CyclinD 1 等的表达来诱导成骨分化<sup>[67]</sup>。可以认为柚皮苷能够通过多种信号通路来促进成骨细胞的增殖和分化, 从而达到促进骨组织生成的目的。

在骨骼不断重塑的过程中, 破骨细胞在维持表面形态稳定方面起到重要作用。但是, 对于骨缺损部位而言, 破骨细胞的活跃阻碍了骨的修复。二十年前, 学者们证实了核因子- $\kappa$ b (NF- $\kappa$ B) (RANK) 配体 (RANKL) 的受体激活剂是破骨细胞形成、活化和存活所必需的关键细胞因子<sup>[68,69]</sup>。RANKL 与 RANK 的相互作用导致一系列细胞内信号激活, 包括 NF- $\kappa$ B、AKT, MAPK, NFAT, 离子钙和钙/钙调蛋白依赖性激酶。在这些途径中, NF- $\kappa$ B 信号传导已被证明在破骨形成中起着至关重要的作用<sup>[70,71]</sup>。有学者通过实验发现柚皮苷抑制了 RANKL 介导的 I $\kappa$ B- $\alpha$



降解,进而导致了 RANKL 诱导的 NF- $\kappa$ B 活化的抑制;此外,柚皮苷还能够抑制 RANKL 诱导的 ERK 磷酸化<sup>[72]</sup>,证实了柚皮苷抑制破骨细胞的形成和骨吸收<sup>[72]</sup>。

从目前的研究来看,柚皮苷促进骨形成的机制已经开始趋于完善,它不仅可以促进 BMSCs 和成骨细胞的增殖分化,还能够抑制破骨细胞的形成和骨吸收。这些作用表明柚皮苷拥有修复骨缺损和治疗骨质疏松症的能力。

此外,从原料来源上来讲,柚皮苷主要存在于柑橘物种中,尤其在葡萄柚、苦橙和柚子中的浓度特别高,其成本低廉,原料来源广泛。从制造工艺上来讲,Yan 等人通过使用超声辅助双水相萃取技术(UA-ATPE)从柑橘类果实中提取柚皮苷,结果显示此技术提高了柚皮苷提取率和纯度<sup>[73]</sup>。综上,柚皮苷因其成本低廉、提取方法环保简便<sup>[74]</sup>、安全无毒以及具有骨诱导潜能为之后的临床应用奠定了良好的基础。

## 1.5 3D 打印技术

在过去的十年中,许多材料加工技术,如静电纺丝、相分离、冷冻干燥和气体发泡等,在基于临床前测试的各种组织支架的制造方面有着巨大的前景。但是,上述这种传统支架的加工方法在控制支架的孔径、互连性和形状等方面有着较大的局限性;此外,力学强度和细胞在支架上的扩散能力也存在不足。而 3D 打印技术打破这一局限。它是将打印机和计算机连接起来,将装入机身的原料通过计算机的控制自下而上的一层一层堆积起来,最后将计算机上设计的支架变成实物。

3D 打印技术已经成为一种创新的支架材料加工方法,用于开发具有良好生物相容性及骨诱导性的支架,从而修复临床患者大面积的骨缺损。计算机辅助设计软件和 3D 打印材料的进步,极大的提高了支架的可重复性和支架孔径、形状的精确度,可为患者制作复杂的具有 3D 结构的个性化支架。目前 3D 打印的主要方法有以下几种:

### (1) 立体光刻技术

立体光刻(SLA)技术是骨组织工程中最先使用的 3D 打印技术之一。它使用激光在 3D 打印工作槽中将树脂逐层固化。一层完成后,打印板再次下降,进行下一层铺料和打印,以此往复,得到支架。SLA 能够创建具有内部架构和极高

特征分辨率的复杂形状<sup>[75]</sup>。但是目前发现 SLA 在支架准备过程中有几点限制。首先，对于微米级的骨组织工程支架来讲，通过 SLA 这项技术是很难完成的，因为光敏树脂在底层可能发生聚合<sup>[75]</sup>。其次，骨组织工程材料受到黏度、稳定性和折射率的限制，所以可用的 SLA 材料种类较少。光敏树脂含引发剂，且需要紫外线照射，这对于包裹的细胞来讲，可能导致一定程度潜在的细胞毒性作用<sup>[75]</sup>。

### （2）熔融沉积建模技术

熔融沉积建模（FDM）技术的工作原理是从小喷嘴挤出熔融热塑性塑料形式的小珠子或聚合物长丝，然后在印刷后硬化，形成固体结构，由此一层层构建得到支架。它有助于基于连续长丝挤出方法制造复杂的三维几何形状。FDM 可以控制光栅的角度、厚度及间隙宽度，进而可以生产出不同孔径、互联性和几何形态 zhi 的支架<sup>[76]</sup>。因此，FDM 工艺可以创建出其他传统制造方法无法创建的复杂的 3D 结构支架。但 FDM 的主要限制是只能生产形状和结构相对规则的支架<sup>[77]</sup>。整合细胞或温度敏感的生物制剂时，FDM 过高的温度会影响细胞及生物分子的活性。

### （3）选择性激光烧结技术

选择性激光烧结（SLS）技术原理是激光烧结粉被激光逐层烧结后而形成固体支架。SLS 能够生产金属支架，在治疗承重区的骨缺损方面发挥作用<sup>[78]</sup>。SLS 还可以在没有任何有机溶剂的条件下加工聚合物，生产的支架可用于非承重骨部位<sup>[79]</sup>。然而，SLS 的主要缺点是需要加热使材料熔化，导致温度过高，无法将细胞和生物活性材料包含在 SLS 支架中。

### （4）喷墨生物打印技术

喷墨生物打印技术是在电压作用下将“生物墨水”液滴从打印头喷嘴喷射在平台上。一般来说，喷墨生物打印具有高通量且价格低廉的优点，并且实现了和低黏度生物材料的兼容性<sup>[80]</sup>。但是，打印头喷嘴经常堵塞，不仅耗时耗力耗材，而且生物墨水中细胞的活力也会受到剪切和热应力的影响<sup>[81]</sup>。

### （5）激光辅助生物打印技术

激光辅助生物打印技术是借助激光作用产生热量，然后将热量传递到水凝胶溶液，使其蒸发并与空气中的界面变形从而产生气泡，然后气泡逐层推动到平台上从而得到支架。该方法突出的优点是它具有与一系列生物材料黏度的相容性。

它还具有高分辨率，可以适应高细胞密度，从而更好地控制细胞间的相互作用和细胞的高清图案化<sup>[82]</sup>。但是这种方法的缺点不容忽视：低速度、高成本以及加工过程的复杂性<sup>[83]</sup>。

#### (6) 挤压生物打印技术

挤压生物打印技术是使用泵或螺杆等工具将压力施加到含浆料的注射器上，通过喷嘴将生物浆料挤出。与立体光刻技术相比，它不需要引发剂和紫外线照射，没有潜在的细胞毒性作用。与其他技术相比，挤出生物打印具有广泛的材料来源，且操作简单，还能够制造解剖学上的多孔结构<sup>[84]</sup>。该技术不涉及加热过程，因此可以将生物活性因子加入浆料内制造具有良好骨诱导性的支架，在骨组织工程中应用十分广泛。

### 1.6 本课题研究思路

骨修复材料成骨诱导能力有限，传统的生长因子虽然具有良好的成骨诱导性能，但其可能会有一些副作用，因此选择具有良好成骨诱导性且副作用小的药物并将其与骨修复材料相结合以增强骨缺损修复效果具有重要意义。本研究通过采用具有操作简单优势的挤压生物打印技术制备出  $\beta$ -TCP 支架，然后通过马弗炉烧结，在 PDA 涂层的辅助下，将柚皮苷负载在  $\beta$ -TCP 支架上，最后通过对支架进行一系列的物理表征、药物释放、细胞相容性检测，探讨其成为骨组织工程支架的潜力。

## 第 2 章 实验材料和方法

### 2.1 主要实验材料

表 2.1 实验材料

名称	公司	国家
$\beta$ -磷酸三钙	上海阿拉丁生化	中国
聚乙烯醇	上海阿拉丁生化	中国
盐酸多巴胺	上海阿拉丁生化	中国
柚皮苷	宝鸡市辰光生物	中国
DMEM 高糖培养基	Hyclone	美国
胎牛血清	杭州四季青生物	中国
FBS 磷酸盐缓冲液	Hyclone	美国
青链霉素混合液	北京索莱宝生化	中国
胰蛋白酶消化液	北京索莱宝生化	中国
CCK8 试剂盒	Invigentech	美国
活死细胞染色试剂盒	上海碧云天生物	中国
Actin-Tracker Green-488 鬼笔环肽	上海碧云天生物	中国
DAPI 溶液	上海碧云天生物	中国
碱性磷酸酶试剂盒	上海碧云天生物	中国

## 2.2 主要实验仪器

表 2.2 实验仪器

名称	公司	国家
3D 打印机	中国科学院长春应用化学研究所	中国
马弗炉	Carbolite	英国
恒温水浴箱	上海一恒科技仪器有限公司	中国
烘干箱	科尔美仪器	中国
水接触角仪	Kruss	德国
扫描电子显微镜	Hitachi	日本
X 射线衍射分析仪	Bruker	德国
X 射线能谱仪	Bruker	德国
酶标仪	Thermo Fisher	美国
电子万能试验机	SHIMADZU	日本
激光共聚焦显微镜	Olympus	日本
细胞 3D 培养器	Ubbiotech	中国

## 2.3 支架制备过程

### 2.3.1 支架的制备

1) 将称量好的 4 g PVA 颗粒加入 46 ml 蒸馏水中，搅拌均匀后密封，放入恒温水浴箱，95 °C 水浴加热 5 h，得 8% (w/w) PVA 胶水；

2)  $\beta$ -TCP 用 300 目金属筛网过筛收集，置入小烧杯内。粉末容易吸潮而结块，要现用现筛；

3) 称量 5 g  $\beta$ -TCP 与 5 g PVA 溶液, 将二者充分搅拌混合均匀, 得到呈有一定黏度及流动性的浆料;

4) 将浆料转移到喷嘴直径为 0.4 mm 的注射器内, 根据预设程序 3D 打印机进行逐层打印, 直至完成整个支架;

5) 支架放入通风橱内干燥 24 h 后, 在马弗炉内烧结, 升温速率为 5 °C/min, 1050 °C 保温 5 小时, 去除支架材料中的 PVA, 自然降至室温, 得到  $\beta$ -TCP 支架 (T 支架)。

### 2.3.2 支架表面改性

1) 称量 1.21 g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris(Hydroxymethyl)aminomethane, Tris) 放入 1000 ml 烧杯内, 加入 800 ml 去离子水, 混合均匀后调节 PH 值至 8.5, 去离子水定容, 制备得到 10 mM、PH=8.5 的 Tris-HCl 缓冲液, 室温密封保存, 备用;

2) 取 400 mg 盐酸多巴胺粉末, 溶解于 200 ml Tris-HCl 缓冲液中, 将烧结后的 T 支架浸泡在上述溶液内, 置于磁力搅拌器上, 升温至 60 °C, 30 min 后取出, 用去离子水冲洗三遍, 60 °C 烘箱内烘干 3 h, 得到表面被 PDA 改性的  $\beta$ -TCP 支架 (D 支架)。

### 2.3.3 负载柚皮苷

1) 将称量后的柚皮苷溶解于无水乙醇中, 制备浓度分别为 0.1 mg/ml、1 mg/ml、5 mg/ml 的柚皮苷乙醇溶液;

2) 将 PDA 改性的 D 支架分成质量相等的三组, 放入上述三种浓度的柚皮苷乙醇溶液中, 置于恒温摇床上 (80 r/min、37 °C);

3) 12 h 后取出支架, 去离子水冲洗三遍, 60 °C 烘箱内烘干 3 h, 得到三种不同浓度的负载柚皮苷的支架。低、中、高三种浓度中制备的支架分别记为 L 组、M 组、H 组;

4) 在进行生物学实验之前, 将所得到的五组支架均用紫外线照射灭菌。

## 2.4 实验方法

### 2.4.1 支架表面形貌观察及元素测定

在各组支架的表面喷金处理后，采用扫描电子显微镜（Scanning electron microscope, SEM）观察各组支架的表面微观结构，加速电压为 3.0 kV。同时采用能谱仪(Energy dispersive spectrometer, EDS)分析各组支架的表面元素组成及含量。将支架用 X 射线衍射分析仪（X-ray diffraction, XRD）测定其广角 X 射线衍射图谱,  $2\theta$  扫描范围为  $6^\circ\sim 80^\circ$ ，扫描速率为  $7^\circ/\text{min}$ 。每个样本选取三个位点进行观察拍照。

### 2.4.2 支架孔隙的测量

1) 各组选取三个支架放在显微镜下拍照，然后使用 ImageJ 软件对孔径进行测量；

2) 支架的孔隙率 ( $\Phi$ ) 采用液体置换法测算， $W_{ps}$  是将支架放入比重瓶后的总重量， $W_{pse}$  是将乙醇完全填充比重瓶后的总重量， $W_{pr}$  是去除支架后测量剩下的乙醇及比重瓶的总重量， $W_p$  是干燥比重瓶的重量， $V_p$  是比重瓶的容积， $\rho_e$  是测量时室温下的乙醇密度<sup>[85]</sup>。

$$\text{孔隙率}(\Phi, \%) = [(W_{pse} - W_{ps}) - (W_{pr} - W_p)] / \rho_e / [V_p - (W_{pr} - W_p) / \rho_e] \times 100\%$$

### 2.4.3 支架力学性能检测

每组选取 3 个直径均为 7 mm，高度为 5 mm 的支架，用万能试验机检测力学性能。

### 2.4.4 支架亲水性检测

使用水接触角仪测量支架表面的水接触角。室温下，仪器上的注射器将一滴超纯水自支架上方 2 cm 处滴下，水滴接触支架表面瞬时拍照并测量水滴与支架表面接触点的切线与支架表面所形成的夹角，即水接触角。

### 2.4.5 支架的药物缓释测定

(1) L、M、H 三组支架各取 0.5 g，分别置于离心管中，加入 2 ml PBS 缓

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/756022112004010052>