

聚酯多孔支架降解液对骨髓基质干细胞活力和成骨分化的影响^{*}

何 珏 潘 震 丁建东^{**}

(聚合物分子工程国家重点实验室 复旦大学高分子科学系 上海 200433)

摘 要 通过室温模压/粒子浸出方法制备得到聚乙交酯丙交酯 (PLGA) 多孔支架, 每个质量 50 mg、孔径 200 ~ 300 μm 、孔隙率略大于 90% 的 PLGA85/15 多孔支架在 10 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中 37 $^{\circ}\text{C}$ 体外降解 24 周. 降解液每周换一次, 不同时间点的降解液被收集、并加入骨髓基质干细胞 (MSC) 的培养液或者成骨诱导液中, 利用胞外乳酸脱氢酶含量检测、细胞死活染色、四唑盐检测、碱性磷酸酶染色和定量检测的方法考察降解液对 MSC 的活力和成骨分化能力的影响. 实验结果表明, PLGA 多孔支架材料在 PBS 中逐渐降解, 其质量、尺寸、孔径、孔与孔的连通性、分子量有不同程度的降低; 其降解液在本研究的实验条件下未发现对 MSC 有明显的细胞毒性, 对 MSC 的活力、增殖以及成骨分化均无显著的负面影响.

关键词 聚酯, 降解, 干细胞, 生物相容性

多孔支架在组织工程中起到了临时性模拟细胞外基质的作用, 给种子细胞提供了生长的微环境^[1]. 以聚乙交酯丙交酯 (PLGA) 为代表的聚酯由于其良好的加工性能和可调的降解性能得到了特别的关注^[2]. PLGA 以及聚羟基乙酸 (PGA)、聚乳酸 (PLA) 等脂肪族聚酯在体液环境中可以水解、且终产物能够被体内代谢. 已有大量文献报道了以其为主体基质的多孔支架、平膜等材料的制备方法^[3~7]、降解行为^[8~14]、体外体内的生物学评价^[15~18]以及聚酯多孔支架对于体内不同组织的成功修复^[19~21]. 关于实心的聚酯类骨钉材料少量长时间修复失败的报道^[22,23]还是引起了人们对于可降解聚酯作为生物材料的担心, 因此聚酯类多孔支架降解过程中是否也存在不利影响是一个值得探讨的问题.

聚酯的降解产物是一个复杂的混合组分, 除了其降解终产物以外, 还必然包括部分低聚物等中间产物, 甚至降解颗粒也可能导致细胞毒性和炎症反应. 因此, 直接考察其降解液的影响是一种重要的评价方法, 而医疗器械浸提液的细胞毒性也是各国审批机构对于生物材料相关产品的标准检测手段之一. 聚酯材料短期降解产物的细胞毒

性已有部分报道, 例如, Ignatius 等^[24]考察了 PLA、PLGA90/10 (这里的数字指 LA 与 GA 的共聚比例) 膜分别在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 10 天的降解产物对 L929 鼠成纤维细胞的影响; Huhtala 等^[25]研究了 PLGA50/50、PLGA85/15 膜在 70 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 中降解 24 h 的降解产物对人角膜上皮细胞系、兔基质成纤维细胞系等多种不同类型细胞生长行为的影响; 章培标等^[21]研究了 PLA 与羟基磷灰石复合材料多孔支架在细胞培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下浸提 48 h 的浸提产物对兔成骨细胞的影响. 他们的结果基本都指出短期降解产物对细胞生长没有显著的负面影响, 从一个方面证实了聚酯类材料是生物相容性良好的材料. 这些报道工作中的聚酯材料降解时间都较短, 并且较多考察了对细胞系生长行为的影响. 聚酯类材料的降解是一个很长的过程, 因此在聚酯类多孔支架长期的降解过程中, 其降解产物或浸提液对细胞是否有影响、尤其是对作为理想的种子细胞——直接取自哺乳动物的骨髓基质干细胞 (MSC) 的体外生长和分化行为是否有不利影响, 在组织工程领域仍然是个重要的基础问题.

^{*} 庆祝王佛松院士 80 华诞专稿; 2012-12-31 收稿, 2013-01-26 修稿; 国家重点基础研究发展计划 (973 计划, 项目号 2009CB930000, 2011CB606203) 和国家自然科学基金 (基金号 21034002, 51273046) 资助项目.

^{**} 通讯联系人, E-mail: jddingl@fudan.edu.cn

doi: 10.3724/SP.J.1105.2013.12439

体内环境中体液是不断交换更新的,因此聚酯类多孔支架在体内的降解是个持续动态的过程.有鉴于此,本文工作在体外构建了 37 ℃ 的 PBS 降解环境,将 PLGA 多孔支架置于其中,通过每周更换新鲜 PBS,以期模拟体内具有大量体液、并存在体液交换的降解环境,整个降解时间为 24 周.将经过不同降解时间的 PLGA 多孔支架的降解液加入细胞培养液中,考察其对 MSC 活力和成骨方向分化的影响,如图 1 所示.

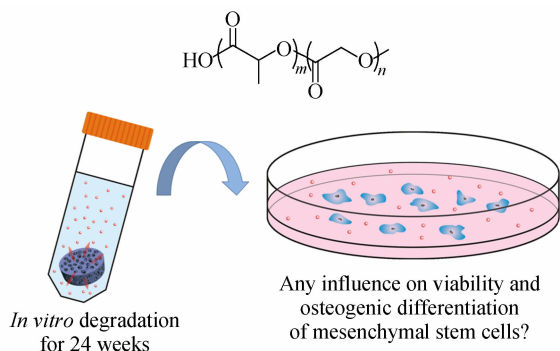


Fig. 1 Chemical formula of PLGA and schematic presentation of this study on effects of degradation products of PLGA porous scaffolds on mesenchymal stem cells (MSCs)

The degradation media were replaced by fresh ones weekly, and part of degradation media were added into culture media of MSCs in a volume ratio 1:4, and then *in vitro* cell viability and osteogenic differentiation were examined.

1 实验部分

1.1 实验试剂

聚乙交酯丙交酯 (PLGA85/15, 丙交酯与乙交酯的摩尔比为 85:15, 丙交酯 LA 为 L-型), 荷兰 Purac 公司;氯化钠, 上海大合化学有限公司, 分析纯;氯化钾、十二水磷酸氢二钠和磷酸二氢钾, 上海强顺化学试剂有限公司, 分析纯;二氯甲烷, 上海禾汽化工科技有限公司, 分析纯;四氢呋喃, Tedia 公司, 色谱纯; PBS, 自配 (氯化钠 8.5 g、氯化钾 0.2 g、十二水磷酸氢二钠 2.85 g 和磷酸二氢钾 0.27 g 溶于 1 L 去离子水中, pH = 7.3 ~ 7.4); 低糖 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 细胞培养基、高糖 DMEM 细胞培养基、胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (trypsin-EDTA) 溶液和青霉素-链霉素 (penicillin-streptomycin) 溶液, Gibco®, Life Technologies 公司;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT)、地塞米松、β-甘油磷酸酯、抗坏血酸-2-

磷酸盐、固蓝 (Fast Blue RR) 染色试剂盒和二甲亚砜 (DMSO), Sigma-Aldrich 公司;细胞死活试剂盒 (Live/Dead®), Molecular Probes®, Life Technologies 公司;CytoTox 96® 非放射性细胞毒性检测试剂盒, Promega 公司.

1.2 PLGA 多孔支架的制备

利用室温模压/粒子浸出法制备 PLGA 多孔支架^[26-28]. 氯化钠粒子通过标准筛筛分, 收集 200 ~ 300 μm 粒径范围的粒子作为致孔剂. 将 PLGA 溶于二氯甲烷中, 加入氯化钠致孔剂, 搅拌均匀成糊状混合物. 将混合物 (2 g PLGA, 25 g NaCl) 填入自制模具 (内径 10 mm、高度 15 mm) 中, 常温模压 24 h. 支架样品脱模, 置于通风橱中 24 h 待残余溶剂挥发. 后将支架置于去离子水中, 在磁力搅拌的条件下浸出氯化钠粒子, 2 h 换一次去离子水; 经过 6 ~ 7 轮换水后, 利用硝酸银溶液检测浸出液中是否残留氯离子, 若无沉淀, 则将得到的多孔支架转移至真空烘箱中干燥待用.

1.3 PLGA 多孔支架的降解

首先削去圆柱形多孔支架两头, 并得到若干直径 10 mm、高度 6 mm 的多孔支架, 质量约 50 mg. 对多孔支架进行提高表面亲水性和消毒的预处理: 将多孔支架置于 75% 乙醇中, 利用真空负压的方法, 使得 75% 乙醇充满支架内部的孔, 浸泡 30 min; 用无菌的 PBS 溶液置换乙醇 6 次, 每次 30 min. 以上步骤均在水平层流操作台中无菌环境下操作. 上述“预润湿”的处理是正确进行带有一定疏水性的多孔支架的体外降解实验的前提; 否则, 不能保证降解液充分进入支架内部的孔中.

然后将预处理好的支架转移到 15 mL 离心管 (Costar, Corning 公司) 中, 加入 10 mL 含有 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的无菌 PBS 溶液, 置于 37 ℃ 条件下的恒温箱中进行降解实验. 每周取出 4 个平行样品, 收集 PBS 降解溶液测量 pH 值后冻存; 更换所有剩余样品的 PBS 溶液, 降解时间达 24 周.

取出的支架样品经过去离子水清洗后, 在真空烘箱中干燥保存. 待降解实验全部结束时, 测量支架的质量、直径和高度的变化; 利用液体置换法测量孔隙率^[26]; 用扫描电镜 (SEM, TS 5136MM, Tescan 公司) 观察降解支架的横切面. 取少量样品溶于四氢呋喃中, 用凝胶渗透色谱仪 (GPC, Agilent 1100, Agilent 公司) 测量残余聚合物的分子量和分子量分布.

1.4 骨髓基质干细胞的分离和培养

骨髓基质干细胞取自新生 7 天 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (第二军医大学, 上海) 的股骨段骨髓腔。通过颈椎脱臼方法处死 SD 大鼠, 浸没于 75% 乙醇进行表皮消毒, 然后在超净台中操作。剪下股骨段, 小心地剥除外皮和肌肉, 露出股骨。剪掉股骨两端关节部分, 暴露骨髓腔, 用低糖 DMEM 冲洗骨髓腔。将含有骨髓的培养基转移到 15 mL 离心管 (Costar, Corning 公司) 中, 800 r/min 离心 8 min, 弃掉培养基, 用加入 10% FBS 的低糖 DMEM 再悬浮离心得到的细胞块。以每两只大鼠取得的细胞接种至一个 25 cm² 培养瓶 (Costar, Corning 公司) 中, 在 37 ℃、95% 湿度、5% CO₂ 含量条件的细胞培养箱中静置培养。2 天后, 用吸管轻轻冲洗培养瓶底部去掉未黏附细胞, 这样, 血细胞等悬浮细胞被除去, 骨髓间充质干细胞则贴壁生长; 吸走旧培养液加入新的细胞培养液。以后每 3 天换一次新鲜培养液, 当细胞铺满瓶底的 90% 时, 利用 Trypsin-EDTA 溶液消化细胞并传代。第二代的细胞用于后续的所有细胞实验。

1.5 实验组设置

取用第 0 周 (原始 PBS 溶液, 作为对照实验组)、第 4 周、第 8 周、第 16 周和第 24 周的 PBS 降解液, 分别以 20% 的体积分数加入培养液中 (依据 GB/T 16886.5-2003 和 ISO 10993-5: 2009 (E)), 配置得到最终的细胞培养液和成骨诱导液。原始细胞培养液由 70% 低糖 DMEM、20% PBS 降解液、10% FBS 组成; 原始成骨诱导液由 70% 高糖 DMEM、20% PBS 降解液、10% FBS、100 nmol/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸酯和 50 μ mol/L 抗坏血酸-2-磷酸盐组成。

1.6 乳酸脱氢酶检测

乳酸脱氢酶 (LDH) 存在于细胞质中, 仅当细胞膜发生严重损伤或死亡时才会分泌至胞外, 通过测量细胞外的 LDH 含量评价细胞膜的损伤程度是用于细胞毒性评价的一种广泛使用的方法^[29]。取用二代 MSC, 以每平方厘米 5000 个细胞的密度种到 96 孔板中 (Costar, Corning 公司); 贴壁 6 h 后换液, 加入含有 20% PBS 降解液的细胞培养液 200 μ L 培养 1 天, 然后利用 CytoTox 96 试剂盒检测各组细胞培养液中存在的 LDH 含量。其中设置 0 周 PBS 降解液的细胞培养组为阴性对照, 设置另外一 0 周组在检测 4 h 前每孔加入 20 μ L 裂解液为阳性对照。小心地吸出上层培养液

50 μ L 转移到另外一块 96 孔板中, 加入新鲜配置的 50 μ L 底物混合物, 室温下避光孵育 30 min; 后向每孔加入 50 μ L 终止液, 利用酶标仪 (Multiskan, Thermo Labsystems) 测量溶液在 492 nm 的吸光度, 以阳性对照组的吸光度作为 100%。

1.7 细胞死活 (Live/Dead) 染色

取二代 MSC, 以每平方厘米 5000 细胞的密度种到 12 孔板中 (Costar, Corning 公司), 贴壁 6 h 后换液, 加入含有 20% PBS 降解液的细胞培养液 1 mL 培养 3 天。吸去培养基, 用 PBS 冲洗 2 次; 随后每孔加入 400 μ L 新鲜配置的 Live/Dead 的 PBS 溶液, 在培养箱中孵育 30 min。用倒置显微镜 (Axiovert 200, Zeiss) 对染色样品进行明场相差和荧光观察。

1.8 MTT 检测

取二代 MSC, 以每平方厘米 5000 细胞的密度种到 96 孔板中 (Costar, Corning 公司), 贴壁 6 h 后换液, 加入含有 20% PBS 降解液的细胞培养液 200 μ L 分别培养 1 天和 3 天, 然后每孔加入 20 μ L MTT 的 PBS 溶液 (5 mg/mL) 在细胞培养箱中孵育 4 h。小心地全部吸出培养基, 每孔加入 200 μ L DMSO 溶解 MTT 被活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶作用下的还原产物——紫色结晶物甲臞。利用酶标仪测量溶液在 492 nm 的吸光度, 将 0 周组 1 天后的吸光度值作为 100%。

1.9 碱性磷酸酶染色和定量

碱性磷酸酶 (ALP) 是 MSC 向成骨细胞分化早期的一个重要标志。取用二代 MSC, 以每平方厘米 5000 个细胞的密度种到 12 孔板中 (Costar, Corning 公司), 贴壁 6 h 后换液; 加入含有 20% PBS 降解液的成骨诱导液 1 mL 对 MSC 进行成骨分化诱导, 诱导时间为 7 天, 每 3 天换液。参照试剂盒说明利用固蓝对 ALP 进行染色, 利用倒置显微镜在明场下观察。拍照结束后, 每孔加入 1 mL 四氢呋喃溶解染色得到的蓝色物质, 吸取 200 μ L 溶液转移到新的 96 孔板, 利用酶标仪测量溶液在 570 nm 的吸光度表征 ALP 的含量。

2 结果与讨论

2.1 PLGA 多孔支架的降解

利用室温模压/粒子浸出法制备得到了 PLGA 多孔支架, 这是一种十分有效的方法, 方法本身已经发表和多次运用^[26-28]。本文侧重支架降

解、尤其是降解液的体外细胞毒性的研究. 在 37 ℃ 的 PBS 中使得经过“预润湿”处理的支架体外降解 24 周,每周取出 4 个样品,剩余样品更换为新鲜的 PBS. 支架呈圆柱形,初始尺寸大致为直径 10 mm、高度 6 mm;随着降解的进行,支架的外观大小没有显著变化(图 2 和图 3(a)). 降解至第 24 周的支架质量比初始质量降低了 2%(图 3

(a)). 通过对降解支架样品喷金处理,利用 SEM 观察内部形貌,可以发现 PLGA 多孔支架未降解前(图 2 中的 0 周),孔径大小在 200 ~ 300 μm 之间,孔与孔之间有较好的连通性. 随着降解的进行,孔径有逐渐变小的趋势,且孔与孔之间的连通性逐渐变差(图 2),孔隙率到第 24 周降低了 1% 左右(图 3(b)).

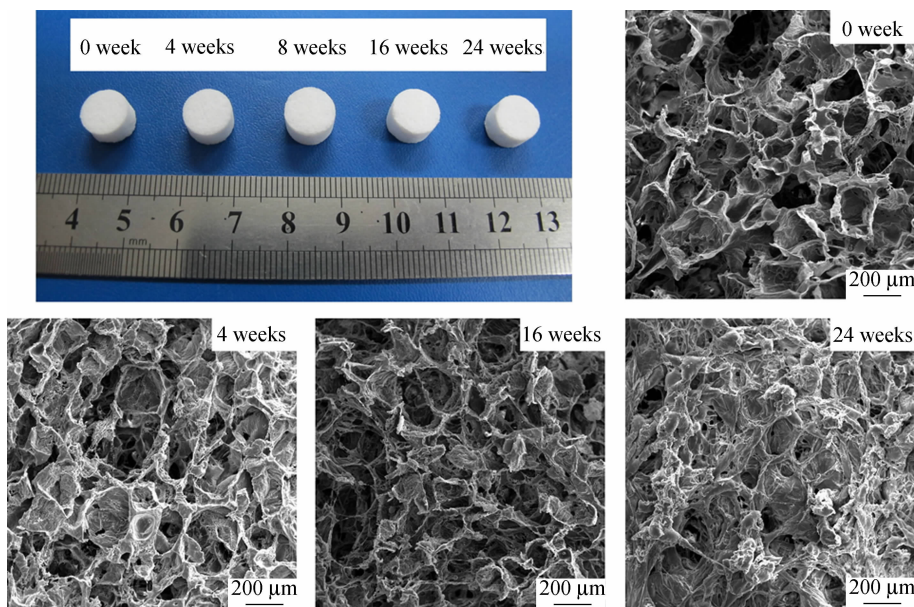


Fig. 2 Gross view of scaffolds and cross-sectional SEM images of porous PLGA scaffolds after *in vitro* degradation for different times

使用 GPC 测量了支架中残余聚合物的分子量. 结果显示,随着降解的进行,数均分子量 M_n 逐渐降低(由初始的 1.8×10^5 降至 24 周的 6.0×10^4),分子量分布(重均分子量与数均分子量的比例) M_w/M_n 逐渐增大(由初始的 1.5 上升到 24 周的 2.3)(图 3(c)和图 3(d)). 支架分子量的下降表明,虽然 PLGA 为疏水性聚合物,降解还是内外一起发生,而不是从表面一层一层剥离的,即, PLGA 的降解遵循本体降解的机理,而非表面溶蚀.

同时测量了降解液的 pH 值变化. 为了更加明确地表示因降解的进行导致 PBS 降解液 pH 值的降低,采用每周换液前测得的降解液 pH 值与新鲜 PBS 降解液 pH 值两者的差值 $pH - pH_0$ 予以显示(图 4). 可以看出,由于样品的降解, PBS 降解液的 pH 值降低;随着支架降解时间的延长, pH 值的降低变大,不过最终的 pH 值仍然都在 pH 7.0 附近.

2.2 降解液对 MSC 活力和成骨分化的影响

在加有降解液的培养液中培养细胞 1 天后,通过检测培养基中 LDH 含量的方法对降解液的细胞毒性进行评价,其中把经过裂解液处理的实验组设为阳性对照组(细胞全部死亡,细胞质中存在的大量 LDH 泄漏到培养液中,设为 100%). 结果显示,不同降解时间点的降解液造成的 LDH 泄漏均不高于 5%(图 5). 排除少量未贴壁细胞死亡/凋亡泄漏的 LDH 以及实验误差的影响,可以认为降解液的细胞毒性是微弱的.

利用 Live/Dead 试剂盒对加有降解液的培养液中培养 3 天的 MSC 细胞进行染色,通过倒置显微镜观察,不同降解时间点的降解液相比 0 周对照组而言,对细胞的生长没有显著影响,鲜见死亡细胞. 图 6 中,第 4、8、16 周降解液的情况与第 0 周和 24 周无明显差异,因此相应图片未予以展示. 利用 MTT 方法检测培养 1 天和 3 天的细胞活力,生长和增殖状况良好,无显著细胞毒性(图 7).

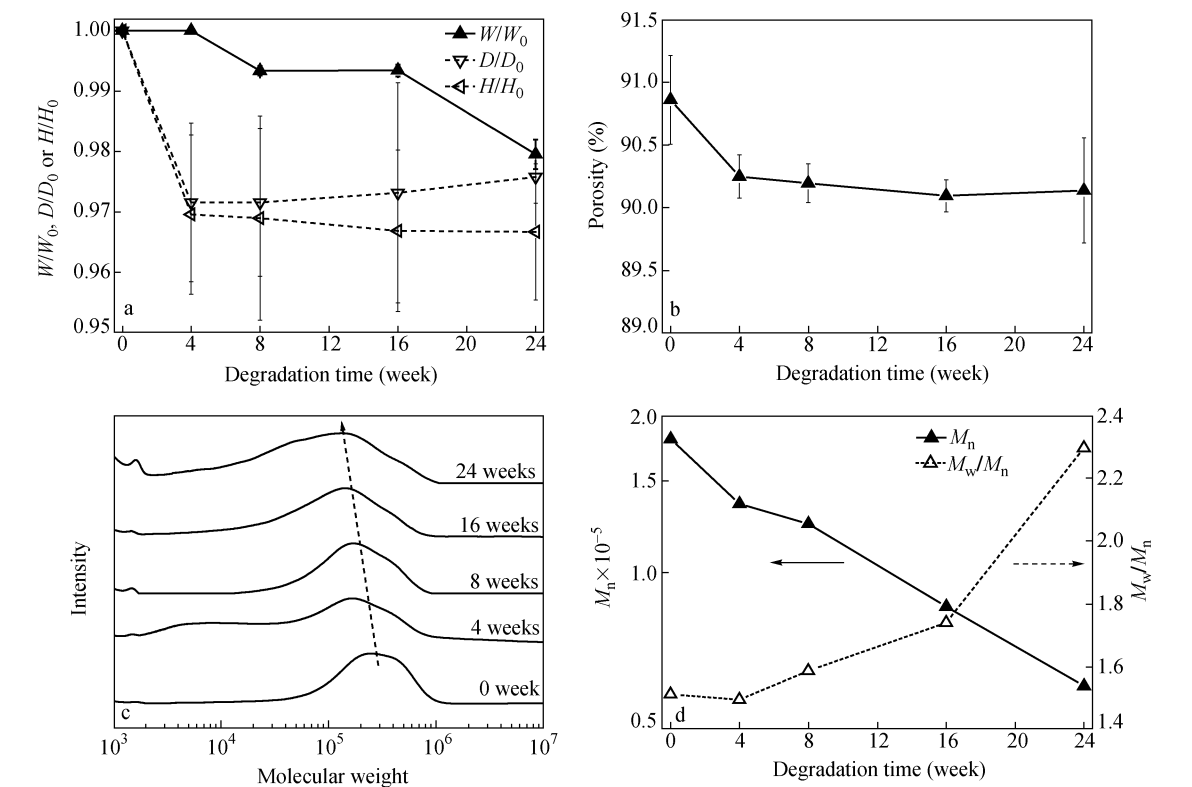


Fig. 3 *In vitro* degradation of PLGA porous scaffolds as a function of degradation time: (a) relative weight (W/W_0), diameter (D/D_0) and height (H/H_0) of scaffolds, (b) porosity of scaffolds, (c) GPC profiles of the residue polymers in scaffolds and (d) corresponding M_n and M_w/M_n

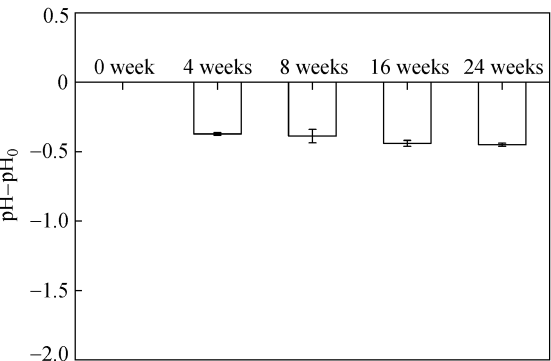


Fig. 4 pH - pH_0 after indicated degradation times
Media were replaced by fresh ones weekly; pH_0 indicates the initial pH of the fresh PBS medium, and pH was measured after one week.

将加有降解液的成骨诱导液对 MSC 进行成骨诱导培养. 7 天后, 利用固蓝染色的方法显示 ALP 的活力. 固蓝与 ALP 反应形成蓝色产物, 形成的蓝色产物越多则表明 ALP 的活力越高, 通过观察细胞形态和染色深浅可以评价 MSC 成骨分化程度. 在倒置显微镜的明场观察条件下, 发现与 0 周组相比, 不同降解时间点的 ALP 染色均能看

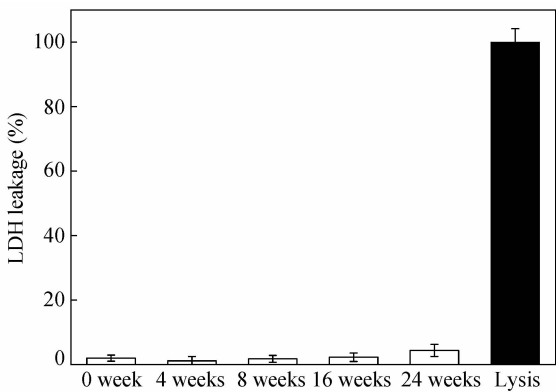


Fig. 5 Cytotoxicity evaluation of degradation media of porous PLGA scaffolds at indicated degradation times on MSCs tested by LDH leakage ($n = 4$)

The culture medium with addition of only PBS (0 week) was set as the negative control, and the culture medium with addition of the cell lysis solution (lysis) was set as the positive control (100% LDH leakage).

到干细胞铺展良好紧密排布, 并且均有产物沉积, 如图 8 所示. 该图中, 第 4、8、16 周降解液的情况与第 0 周和 24 周无明显差异, 因此相应图片未予以展示.

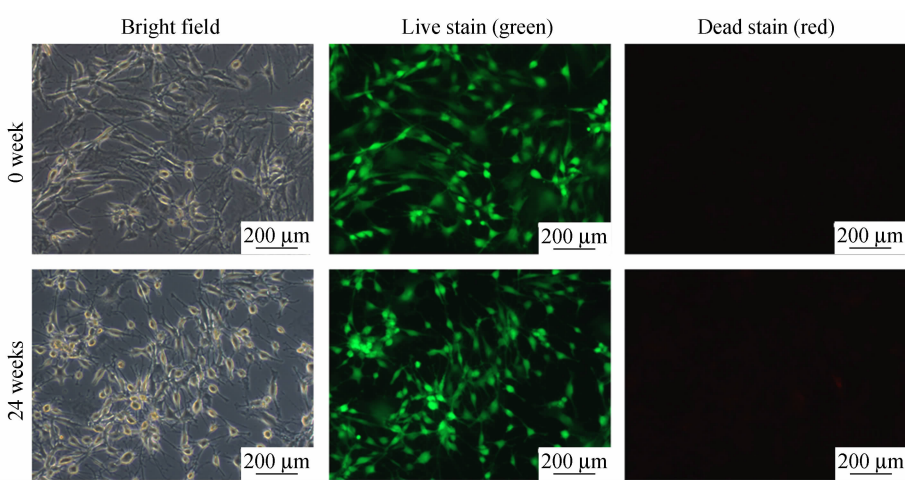


Fig. 6 Live/Dead staining results of cell culture for 3 days in the culture medium with addition of degradation media of porous PLGA scaffolds at indicated degradation times

Left column: phase-contrast microscopic photographs observed in a bright-field mode; middle and right columns: corresponding fluorescence micrographs with live cells stained by calcein AM and dead cells stained by ethidium homodimer.

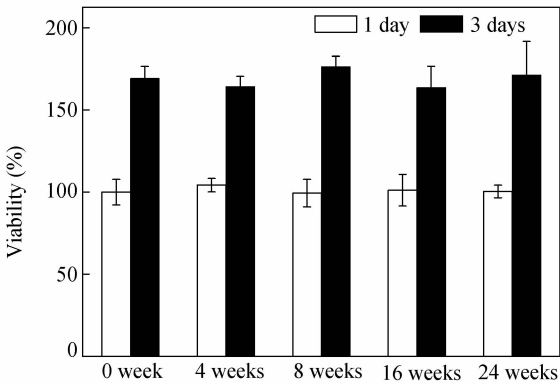


Fig. 7 Viability of MSCs cultured for 1 day and 3 days in the culture medium with 20% degradation media of porous PLGA scaffolds

In MTT assay ($n = 4$ for each group), the blank control was culture medium added with only PBS (0 week), and the corresponding optical density (OD) value of 1 day culture was set as 100% viability.

为了进一步定量地表征 ALP 活力多少,利用四氢呋喃溶解蓝色产物,转移到 96 孔板中在酶标仪下测量 570 nm 的吸光度,均有较高的 ALP 活力,如图 9 所示. 以上结果说明,不同降解时间点的降解液对于细胞的成骨分化没有显著影响.

2.3 关于 PLGA 多孔支架降解对 MSC 影响的讨论

PLGA 类的聚酯材料在组织工程等生物医用领域中得到了普遍应用和长足发展,对它们可能的负面影响也引发了大家的关注. 尽管体外降解行为有较多的研究,但是其长时间的降解产物对

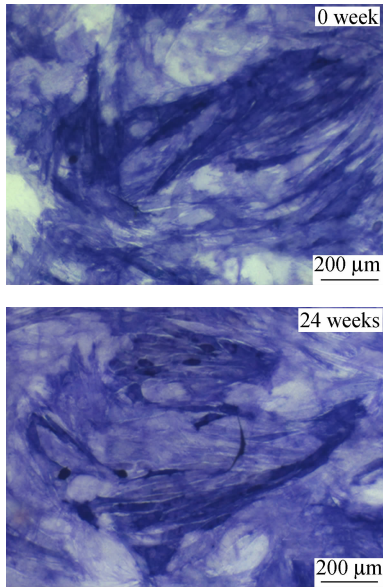


Fig. 8 Bright-field micrographs of ALP-stained cells after 7 days of osteogenic induction of mesenchymal stem cells

The induction medium in the group of “24 weeks” was obtained by mixing, in a volume ratio of 4:1, the virgin induction medium and the degradation medium at week 24 in the process of *in vitro* degradation of porous PLGA scaffolds in PBS at 37 °C. The group of “0 week” refers to mixing merely with PBS.

细胞是否有影响却鲜有报道. 本文利用 PLGA 多孔支架材料在体外 24 周降解过程中的降解液,考察其体外对 MSC 的影响. MSC 有多向分化能力因而应用于多种不同组织的修复. 本文仅着重考察了对 MSC 活力和成骨方向分化的影响.

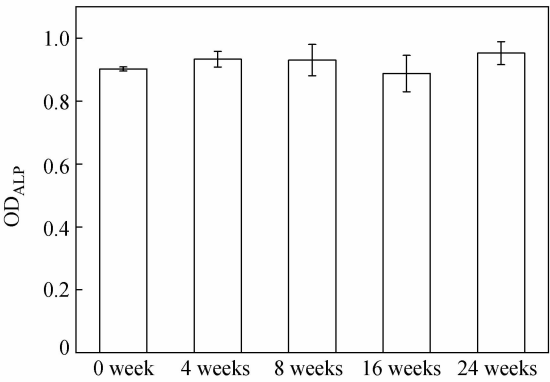


Fig. 9 ALP activity of MSCs after 7 days of osteogenic differentiation in the induction medium added with degradation media of porous PLGA scaffolds at indicated degradation times ($n = 4$ for each group)

实验中选用了约 90% 孔隙率(实测的初始孔隙率接近 91%, 见图 3(a))、孔径为 200 ~ 300 μm 的常见的 PLGA 多孔支架, 每 50 mg 多孔支架静止浸没于 10 mL PBS 中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下降解 24 周, 每周换液一次. 随着降解的进行, PLGA85/15 支架的质量、形状、孔径大小、孔与孔之间的连通性、孔隙率、分子量均有不同程度的降低(图 2 和图 3). 尽管支架质量尺寸没有大的变化, 但是 GPC 结果显示聚合物分子量却有了明显的下降(图 3(c)和图 3(d)). 这种本体降解的结果与之前的论文报道的结果相吻合^[10,11]. 这是由于 PLGA 大分子降解过程是个水解随机断开酯键的过程, 较高分子量的大分子随着酯键的断裂降解, 得到的小分子或低聚物可以溶解扩散到 PBS 溶液中, 而分子量依然较高的降解产物还不能溶解在 PBS 溶液中, 从而维持了样品质量. 从分子量与降解时间的半对数图基本呈线性(图 3(d))可以看出, 残余聚合物分子量随时间指数下降, 表明多孔支架的降解产物被即时扩散出去, 使得残余聚合物的降解满足标准的端羧基对于酯键的自催化反应动力学^[30]. 而与此对应, 我们组以往的研究表明, 致密的聚酯膜由于降解产物不容易即时扩散出去, 加速了其降解^[31]. 这也是孔径和孔隙率影响 PLGA 多孔支架降解速率的原因^[11].

PLGA 多孔支架在 PBS 中的降解, 除了引起降解液 pH 值的降低, 还有降解得到的单体(例如乳酸)和较低分子量的低聚物溶解在降解液中, 因此降解液对 MSC 的影响是由多方面因素所导致的. 支架经过不同降解时间的降解液, 其 pH 值有不同程度的降低(图 4), 但以 20% 的体积分数

与有一定缓冲能力的 DMEM、FBS 混合(模拟体内大量体液交换的情况)后配置得到的培养液 pH 值并没有显著的下降, 均在 7.2 ~ 7.4 适合细胞生长的 pH 值区间, 并且低糖(细胞培养液)和高糖(成骨诱导液)的不同对 pH 值也无实质性的影响, 因而我们基本排除了由于培养液 pH 值显著差异对细胞行为产生不同程度影响的因素. 而对于溶解在降解液中的单体和低聚物, 我们曾尝试利用萃取等方法希望能够从降解液中分离这些产物从而单独考察它们对 MSC 的影响, 但因为其本身的量很少、加之降解液中盐的干扰而需要多步分离操作等诸多方面的因素, 使得最终很难准确地大量地获取并用于后续的细胞实验. 我们将另文单独探讨在细胞培养液中加入市购不同构型乳酸对 MSC 细胞毒性的影响, 本文则主要考察不同降解时间溶解在 PBS 降解液中的所有的降解产物对 MSC 的影响. 在本实验中, 通过 LDH 检测(图 5)、Live/Dead 染色(图 6)、MTT 检测(图 7)、ALP 染色(图 8)以及定量测量(图 9)等一系列体外细胞实验结果的证实, 在长达 24 周的降解期间内, PLGA 多孔支架的降解液无显著的细胞毒性, 没有影响 MSC 的正常活力和成骨分化.

之前关于短期降解产物对细胞影响的研究报道中, Ignatius 等^[24]指出 37 $^{\circ}\text{C}$ 或 70 $^{\circ}\text{C}$ 不同温度条件下的 PLA 和 PLGA90/10 膜的降解产物本身对细胞活力没有显著影响, 当然他们也指出了高浓度的降解产物本身对细胞的增殖是有一定抑制作用的(具体浓度和降解产物组成未知), 例如 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的降解产物以体积比 1:1 和 1:2 加入培养液时对细胞增殖有一定程度的毒性. 不过, 他们工作中模拟聚酯降解的条件过分苛刻, 12.5 mg 聚酯膜在 1 mL PBS 溶液中降解 10 天, 并且期间没有进行换液, 这个降解明显快于有体液交换存在下的降解过程. Huhtala 等^[25]则指出, PLGA85/15 膜的降解产物被中和后对细胞活力没有影响. 章培标等^[21]则证实了 48 h 的 PLA 复合材料支架浸提液没有显著细胞毒性. 基于他们的研究和我们实验的结果, 进一步确认了 PLGA 等聚酯材料具有良好生物相容性.

针对聚酯类骨钉体内修复失败的结果, 我们分析认为, 骨钉的实心结构、大量的聚酯含量、有较强免疫反应的体内植入位置、相对材料总量而言较少的体液环境以及较慢的体液交换速度是导致最终修复失败的原因. 而对于聚酯多孔支架而

言,首先,由于孔隙率很高,使得聚酯的实际含量显著降低,这是我们在类比时需要有所考虑的;其次,具有高孔隙率的多孔结构以及良好的孔与孔之间的连通性,十分利于体液的充分渗透和置换不易导致植入材料的周围和局部有大量的酸性聚集;再次,人们往往在动物实验时先进行皮下埋植,观察不到炎症反应后再进行组织修复实验,这时忽略了一个问题,即,皮下的体液环境比起软骨等部位有明显不同,并且有着更强的免疫排斥反应^[16],因此,不能因为皮下实验的结果对于后续组织修复实验简单做出否定性预测. 毕竟,即使聚酯骨钉也只是出现少量的不可接受的炎症反应^[22,23],否则不会得到权威部门的批准并且使用至今. 可见,不必过分担心 PLGA 多孔支架在长期降解过程中对组织修复的不利影响. 随着近年对材料与细胞相互作用理解的深入^[32~39],依靠多孔支架材料本身和材料不同结构诱导组织修复是未来的发展趋势,这不仅凸显了多孔支架在组织工程的重要作用,同时也表明进一步研究多孔材料与细胞相互作用的关系是十分必要的. 尤其需要根据实际情况,用体外模拟实验和体内动物实验的客观结果数据来说明问题.

本文工作也存在局限性. 首先,未考虑体内可能引发的免疫炎症反应,只研究了降解液的体外细胞毒性. 此外,本实验中 24 周后 PLGA85/15 多孔支架尚未明显失重,导致这个历时一年多的实验(包括支架准备、降解和后期表征)依然不能排除聚酯多孔支架在明显失重情况下产生的大量降解产物引发细胞毒性的可能性. PLGA 降解是个长期的过程,受到样品材料的化学组成(LA 与 GA 的比例、分子量等)和有序程度、降解温度和初始 pH、实验体系是否摇晃、对样品是否施加应

力等多方面因素的影响^[8~14];对于多孔支架,甚至孔径与孔隙率也会影响降解速率^[11]. 此外,材料的质量、降解介质的体积和换液频率等体外实验参数也在很大程度上对应材料的体内植入量和体液交换速率. 因此,在外推实验结论时应注意上述综合实验条件.

3 结论

利用室温模压/粒子浸出法制备得到了 PLGA 多孔支架,将净重 50 mg、孔径 200 ~ 300 μm 、孔隙率约 90% 的 PLGA85/15 多孔支架事先经过预润湿处理后静置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 溶液(10 mL)中进行了体外降解实验,每周换液一次,收集降解液考察其对骨髓基质干细胞的活力和成骨分化的影响(细胞实验时,降解液与原始培养液以 1:4 的体积比混合),从而在体外条件下模拟在具有大量体液和较为充分体液交换的条件下,PLGA 多孔支架的降解是否会对干细胞的行为产生影响. 实验结果表明,在长达 24 周的降解实验中,聚合物分子量与多孔支架尺寸、孔隙率、介质 pH 等呈现不同的随时间下降的程度. 通过胞外 LDH 检测、Live/Dead 染色、MTT 检测、ALP 染色和定量测量的实验证实,在 24 周考察期间内,降解液没有显著的细胞毒性,对 MSC 的活力和成骨分化没有显著的负面影响. 我们推断,PLGA 多孔支架在植入具有大量体液和体液交换的体内环境时,对细胞和组织修复产生明显的毒性和负面影响的可能性并不如想象的那么大. 支架降解以及相应的细胞响应受到多种因素的影响,实际情况仍然需要依靠实验结果来确定,其更长时间降解后浸提液的细胞毒性问题仍待考察.

REFERENCES

- 1 Langer R, Vacanti J P. *Science*, 1993, 260(5110): 920 ~ 926
- 2 Pan Z, Ding J D. *Interface Focus*, 2012, 2(3): 366 ~ 377
- 3 Ma P X, Choi J W. *Tissue Eng*, 2001, 7(1): 23 ~ 33
- 4 He L M, Zhang Y Q, Zeng X, Quan D P, Liao S, Zeng Y S, Lu J, Ramakrishna S. *Polymer*, 2009, 50(16): 4128 ~ 4138
- 5 Tian Ye(田冶), Wang Yingjun(王迎军), Zhou Changren(周长忍), Zeng Qinghui(曾庆慧), Tan Guoxin(谭帼馨). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2010, (10): 1170 ~ 1174
- 6 Liu Ruilai(刘瑞来), Han Jing(韩静), Chen Xiujuan(陈秀娟), Lei Shenghong(雷声宏), Liu Haiqing(刘海清). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2012, (3): 291 ~ 298
- 7 Qu Z H, Ding J D. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2013, 24(4): 447 ~ 459
- 8 Li S M. *J Biomed Mater Res*, 1999, 48(3): 342 ~ 353
- 9 Cai Q, Shi G X, Bei J Z, Wang S G. *Biomaterials*, 2003, 24(4): 629 ~ 638

10 Wu L B, Ding J D. *Biomaterials*, 2004, 25 (27) : 5821 ~ 5830

11 Wu L B, Ding J D. *J Biomed Mater Res A*, 2005, 75 A (4) : 767 ~ 777

12 Xie S J, Zhu Q, Wang B, Gu H J, Liu W, Cui L, Cen L, Cao Y L. *Biomaterials*, 2010, 31 (19) : 5100 ~ 5109

13 Yang Y F, Tang G W, Zhao Y H, Yuan X Y, Fan Y B. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2010, 21 (1) : 53 ~ 66

14 Yang Y F, Tang G W, Zhao Y H, Zhang Y, Li X L, Yuan X Y. *Chin Sci Bull*, 2011, 56 (10) : 982 ~ 986

15 Chen J W, Wang C Y, Lu S H, Wu J Z, Guo X M, Duan C M, Dong L Z, Song Y, Zhang J C, Jing D Y, Wu L B, Ding J D, Li D X. *Cell Tissue Res*, 2005, 319 (3) : 429 ~ 438

16 Liu W, Cao Y L. *Biomaterials*, 2007, 28 (34) : 5078 ~ 5086

17 Wang Z, Zhang Z, Zhang J C, She Z J, Ding J D. *Chin Sci Bull*, 2009, 54 (17) : 2968 ~ 2975

18 Zhang Y Y, Yang F, Liu K, Shen H, Zhu Y D, Zhang W J, Liu W, Wang S G, Cao Y L, Zhou G D. *Biomaterials*, 2012, 33 (10) : 2926 ~ 2935

19 Wang W, Li B, Yang J Z, Xin L, Li Y L, Yin H P, Qi Y Y, Jiang Y Z, Ouyang H W, Gao C Y. *Biomaterials*, 2010, 31 (34) : 8964 ~ 8973

20 Liu X H, Jin X B, Ma P X. *Nat Mater*, 2011, 10 (5) : 398 ~ 406

21 Zhang P B, Wu H T, Wu H, Lu Z W, Deng C, Hong Z K, Jing X B, Chen X S. *Biomacromolecules*, 2011, 12 (7) : 2667 ~ 2680

22 Bostman O, Hirvensalo E, Makinen J, Rokkanen P. *J Bone Joint Surg Br*, 1990, 72 (4) : 592 ~ 596

23 Bergsma J E, de Bruijn W C, Rozema F R, Bos R R M, Boering G. *Biomaterials*, 1995, 16 (1) : 25 ~ 31

24 Ignatius A A, Claes L E. *Biomaterials*, 1996, 17 (8) : 831 ~ 839

25 Huhtala A, Pohjonen T, Salminen L, Salminen A, Kaarniranta K, Uusitalo H. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19 (2) : 645 ~ 649

26 Wu L B, Zhang H, Zhang J C, Ding J D. *Tissue Eng*, 2005, 11 (7-8) : 1105 ~ 1114

27 Wu L B, Jing D Y, Ding J D. *Biomaterials*, 2006, 27 (2) : 185 ~ 191

28 Wu L B, Zhang J C, Jing D Y, Ding J D. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 76 A (2) : 264 ~ 271

29 Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. *Int J Pharm*, 2005, 288 (2) : 369 ~ 376

30 Ding Jiandong (丁建东). *Organic Polymeric Biomaterials (有机高分子材料)*. In: Gu Qisheng (顾其胜), Hou Chunlin (侯春林), Xu Zheng (徐政), eds. *Practical Biomedical Materials (实用生物医用材料学)*. 1st ed (第一版). Shanghai (上海) : Press of Shanghai Science and Technology (上海科学技术出版社), 2005. 41 ~ 89

31 Jing D Y, Zhang J C, Wu L B, Ding J D. *Polym Mater Sci Eng*, 2005, 21 (6) : 162 ~ 164

32 Chen Y M, Yang J J, Osada Y, Gong J P. *Chinese J Polym Sci*, 2011, 29 (1) : 23 ~ 41

33 Yan C, Sun J G, Ding J D. *Biomaterials*, 2011, 32 (16) : 3931 ~ 3938

34 Peng R, Yao X, Ding J D. *Biomaterials*, 2011, 32 (32) : 8048 ~ 8057

35 Pan Z, Yan C, Peng R, Zhao Y C, He Y, Ding J D. *Biomaterials*, 2012, 33 (6) : 1730 ~ 1735

36 Peng R, Yao X, Cao B, Tang J, Ding J D. *Biomaterials*, 2012, 33 (26) : 6008 ~ 6019

37 Wang Yazhuo (王雅卓), Ma Dewang (马德旺), Zhao Yingchun (赵迎春), Ming Ming (明明), Wu Jia (吴佳), Ding Jiandong (丁建东). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2012, (7) : 698 ~ 713

38 Yao X, Peng R, Ding J D. *Biomaterials*, 2013, 34 (4) : 930 ~ 939

39 Wang X, Yan C, Ye K, He Y, Li Z H, Ding J D. *Biomaterials*, 2013, 34 (12) : 2865 ~ 2874

EFFECTS OF DEGRADATION MEDIA OF POLYESTER POROUS SCAFFOLDS ON VIABILITY AND OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS

Yao He, Zhen Pan, Jian-dong Ding

(State Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers, Department of Macromolecular Science,
Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) porous scaffolds were prepared *via* room-temperature molding/particle leaching method, and *in vitro* degradations of those porous scaffolds were examined in phosphate buffer saline (PBS) solution at 37 °C for 24 weeks. Each PLGA85/15 scaffold of porosity a bit above 90% and weight about 50 mg was immersed in 10 mL PBS. The degradation media were replaced by fresh ones weekly. Part of degradation media were collected at series of degradation time points, and then added into the culture medium of mesenchymal stem cells (MSCs). Cell viability and osteogenic differentiation were detected *via* lactate dehydrogenase assay, Live/Dead staining, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide assay, alkaline phosphatase staining and quantification. The results indicated that molecular weight of remaining PLGA, and weight, dimension, pore size, and interpore connectivity of scaffolds changed with different degrees. The degradation media at all of degradation times up to 24 weeks exhibited no severe cytotoxicity, and no significant negative influences on viability, proliferation and osteogenic differentiation of MSC were observed under the present conditions and examined period.

Keywords Polyester, Degradation, Mesenchymal stem cells, Biocompatibility