

## 羟基磷灰石/壳聚糖复合微球的制备及其生物学作用的体外研究

沈丽丽<sup>1,2,3</sup>, 何家才<sup>1,2,3</sup>

**摘要** 目的 通过探究羟基磷灰石 (HAp) 壳聚糖 (CS) 复合微球支架对骨髓间充质干细胞体外生物学行为的影响, 评估其作为骨组织工程支架的可行性。方法 纳米 HAp 和 CS 复合物通过微流体技术自组装成微球支架, 显微镜下形态学观察。将 P2 代骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 与微球行体外共培养, 计算前 6 h 黏附率。培养 1、3、6、9 d, 计算增殖率并用 GraphPad Prism 6 软件对数据进行处理; 行扫描电镜及共聚焦扫描式显微镜检测, 观察细胞黏附及分布。将细胞微球复合物填入自制模具中培养 14~21 d, 进行形态观察。结果 显微镜下微球为完整的圆形, 大小一致。BMSCs 与微球体外培养 6 h, 黏附率达 90% 以上。6 d 时, BMSCs 的增殖率达到最高。扫描电镜结果显示微球上有大量 BMSCs 黏附定植并分泌大量胞外基质将微球连接成整体; 共聚焦扫描式显微镜结果可见明显的细胞骨架微丝蛋白。细胞微球体外模具培养 18 d 后, 形成了结构完整的组织块。结论 HAp-CS 微球是一种良好的促 BMSCs 种子细胞黏附定植的支架材料, 是促进细胞生长的有效支撑载体, 与共培养细胞形成的复合组织块有望应用于体内动物实验修复标准缺损。关键词 羟基磷灰石-壳聚糖微球; 仿生支架; 骨髓间充质干细胞; 黏附; 增殖

中图分类号 R 783.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)11-1552-04

运用组织工程骨进行骨组织再生修复已成为当下研究的热点之一。而生物支架在骨缺损的修复过程中起到关键性作用, 被誉为组织工程的“基石”。复合类仿生支架 (有机物与无机物结合) 可以模拟天然成熟骨组织的结构, 在促进干细胞增殖、骨向分化等方面具有显著优势<sup>[1]</sup>。羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HAp) 作为人体骨骼和牙齿的主要组成, 生物相容性良好, 并有足够的机械强度可承受体内压力; 纳米级 HAp 利于成骨细胞黏附, 具有骨

诱导性, 常被作为仿生支架的制备原料<sup>[2]</sup>。壳聚糖 (chitosan, CS) 作为一种天然的再生来源聚合物, 生物性能佳, 易于化学改性并对体内大分子有高度亲和性, 是一类颇有前景的组织工程支架材料<sup>[3]</sup>。该研究采用微流体技术将纳米 HAp 和 CS 制备成微米级微球支架, 并通过一系列细胞学实验评估其作为组织工程支架的生物学作用。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料及设备

**1.1.1 实验动物与试剂** SPF 级雄性 4 周龄 SD 大鼠 20 只, 由安徽医科大学实验动物中心提供。微球制备相关试剂 (国药集团化学试剂有限公司), 高糖型 DMEM (美国 Invitrogen 公司), 胎牛血清 (FBS) (中国四季青公司), 异硫氰酸标记的鬼笔环肽 (FITC-Phalloidin)、DAPI (美国 Sigma 公司), 琼脂糖 (美国 Solarbio 公司)。

**1.1.2 主要仪器** 微量进样泵 (中国兰格恒流泵有限公司), pH 计 (PHS-3B, 中国上海虹益公司), Countstar 自动细胞计数仪 (IC 1000, 中国上海睿钰生物科技有限公司), 荧光倒置显微镜 (DMI3000B, 德国 Leica 公司), 场发射扫描电子显微镜 (JSM-6700F, 日本 JEOL 电子公司), 共聚焦扫描式显微镜 (SP5-DMI6000-DIC, 德国 Leica 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 HAp 纳米颗粒合成** 5 mmol 尿素溶于 20 ml 乙醇与水 (3:1) 混合溶液中, 加入 CaCl<sub>2</sub> (0.1 mol/L, 8.35 ml) 与 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.1 mol/L, 5 ml), pH 值调至 11.9。搅拌 30 min, 置于 80 °C 烘箱 24 h。产物洗涤冻干备用。

**1.2.2 复合微球制备及显微镜下形态学观察** CS 及 HAp 各 40 mg 加入 19.6 ml 蒸馏水中, 超声破碎 20 min, 所得 HAp-CS 混合溶液作为内相, 环己烷溶液 (含 3% 司班 80) 作为挤出相。利用微量进样泵控制两相挤出速度, 外向 1 ml/min, 内相 0.05 ml/min, 进行微球制备, NaOH 乙醇溶液 (0.4 mol/L) 进行收集固化, 所得 HAp-CS 复合微球蒸馏水反复清洗, 显微镜下观察微球形态。

**1.2.4 细胞黏附率及增殖率** 微球高温高压灭菌

2015-06-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81371114); 安徽省自然科学基金 (编号: 1408085MKL29); 安徽高校省级自然科学基金重点项目 (编号: KJ2013A154)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学口腔医学院, <sup>2</sup>安徽医科大学附属口腔医院, <sup>3</sup>安徽省口腔疾病研究中心实验室, 合肥 230032

作者简介: 沈丽丽, 女, 硕士研究生;

何家才, 男, 教授, 博士生导师, 主任医师, 责任作者, E-mail: hejiacai@163.com

了,与P2代骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)体外共培养。黏附率:细胞与微球复合之比为50:1(细胞初始浓度为 $C_0 = 5 \times 10^4 / \text{ml}$ )。设置3个复管,置于培养摇床上,先动态培养5 min,后静置30 min,交替进行6 h。1、2、3、4、5、6 h等6个时间点,分别吸取1 ml细胞微球混合溶液,静置1 min,上清液中的游离细胞计数为 $C_t$ ,黏附率为 $(C_0 - C_t) / C_0 \times 100\%$ 。取3个复管平均值。增殖率:前6 h动静态交替培养操作同上,设置3个复管。1、3、6、9 d时,取1 ml细胞微球混悬液,静置后吸除上清液,PBS清洗3次,胰酶消化,定容至1 ml,细胞和微球均计数,细胞浓度为 $C$ ,每毫升微球数为 $N$ ,二者之比为 $C/N$ ,该数值随时间的增长体现了细胞在微球上的增殖。3个复管所得值求平均数。

**1.2.5 扫描电镜观察 BMSCs 与微球支架的复合状态** 细胞材料复合1、3、6、9 d后,每种材料各取1 ml细胞材料混悬液,PBS清洗3次,2.5%戊二醛室温固定30 min,冷冻干燥后进行扫描电镜观察。

**1.2.6 细胞骨架染色及共聚焦扫描式显微镜观察** 细胞材料复合后6 d,取1 ml细胞材料混悬液,PBS轻缓清洗3次,4%多聚甲醛室温固定20 min,PBS清洗(5 min  $\times$  3)。FITC-Phalloidin (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )避光染色40 min。PBS清洗10 min,清洗3次。DAPI (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )避光染5 min。PBS洗3次。共聚焦扫描式显微镜观察。

**1.2.7 体外模具实验** 6 cm培养皿中加入5 ml高温高压灭菌的2%琼脂糖后,其厚度为2 mm。待其凝固后,使用直径为5 mm的打孔器,琼脂糖上便形成直径为5 mm、厚度为2 mm的圆形缺损,与标准骨缺损尺寸吻合。将细胞和微球共培养1 d后填充至上述模具中,表面盖筛网,加入5 ml培养液,每2~3 d换一次液,培养14~21 d,观察组织块形成情况。

## 2 结果

**2.1 显微镜下微球形态观察** 将所制备的HAp-CS复合微球分散在水中,显微镜下可见其表面光滑,粒径均匀,大小为300  $\mu\text{m}$ 左右,见图1。

**2.2 BMSCs 黏附率和增殖率** BMSCs与细胞复合前6 h的黏附率一直处于上升趋势,2 h时已高达70%以上,6 h时,黏附率超过90%,说明HAp-CS微球具有良好的促细胞黏附作用,见图2A。细胞与微球复合前3 d,增殖幅度较平缓,6 d时,达增殖高

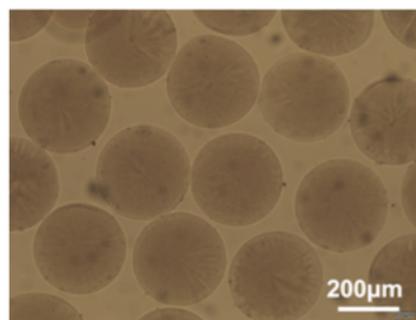


图1 HAp-CS微球形态图

峰,与初始细胞微球复合之比(50:1)相比,增长了10倍,第9天时,细胞处于凋亡期,见图2B。

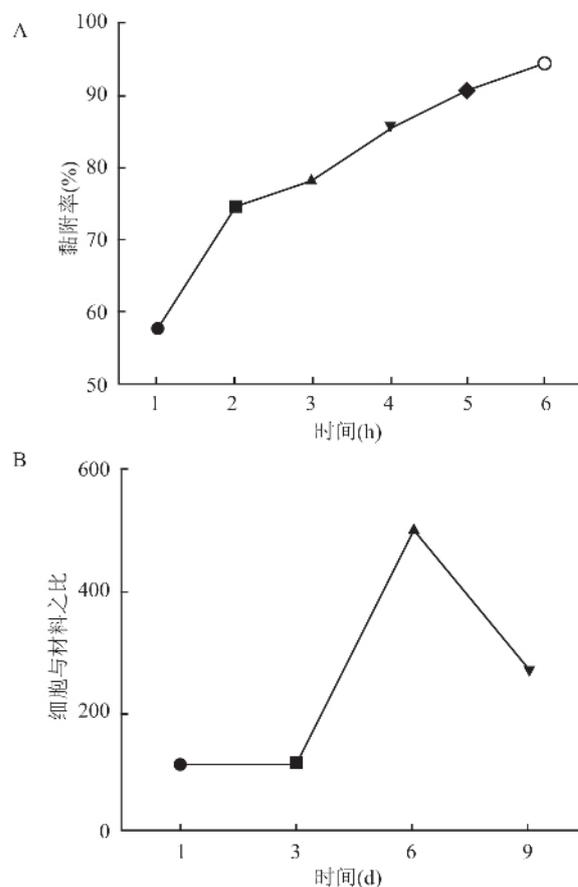


图2 细胞与微球复合后黏附率和增殖率

**2.3 BMSCs 与细胞复合后扫描电子显微镜观察** 细胞材料复合1 d后,少量BMSCs定植于微球表面,细胞紧密黏附于球体表面,长梭形似成纤维细胞,形态舒展,细胞之间有相互接触融合的趋势,见图4A。细胞材料复合6 d后,大量细胞分布于微球上,微球间胞外基质相互交织呈拉丝状,并将微球缠绕包裹成一个团块。微球借细胞及胞外基质凝聚成

3D 块状结构, 见图 3B。

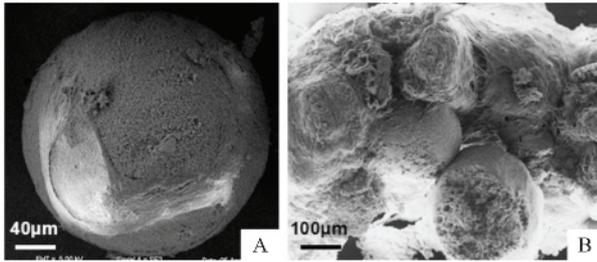


图3 细胞微球复合 SEM 结果图

A: 细胞材料复合 1 d, BMSCs 呈长梭形定植于微球表面; B: 细胞材料复合 6 d, 微球借细胞及胞外基质连接成团块状

### 2.4 BMSCs 骨架染色后荧光倒置显微镜及共聚焦扫描式显微镜观察

FTTC 荧光素标记的鬼笔环肽与微丝结合后被荧光激发呈绿色, DAPI 复染可将细胞核染成蓝色, 见图 4。荧光倒置显微镜下, BMSCs 的胞核染成蓝色, 大量细胞黏附定植于微球表面。部分微球之间有大量细胞聚集, 并借细胞连接在一起, 见图 4A。共聚焦扫描显微镜下, 微丝骨架呈绿色, 细胞核呈蓝色, 大量 BMSCs 定植并沿微球表面分布, 骨架结构和细胞核清晰可见, 见图 4B。放大可见微丝呈长梭形放射状包绕在胞核周围, 见图 4C。HAp-CS 支架维持了细胞的特征性骨架结构, 细胞的生长状态良好。

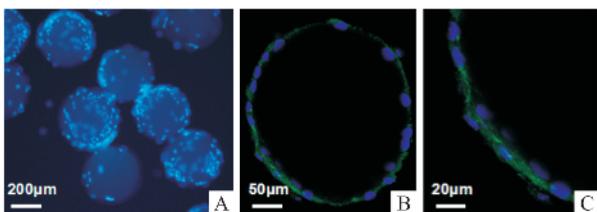


图4 BMSCs 与微球体外共培养 6 d 时细胞骨架染色结果图

A: 荧光倒置显微镜观察结果; B、C: 共聚焦扫描显微镜观察结果

### 2.5 体外模具实验 BMSCs 和微球支架体外培养

18 d 形成了复合组织块。该块状结构形态较规则完整, 直径约为 5 mm, 厚度约为 2 mm, 见图 5A。用镊子夹起后, 并无明显挤压变形或破裂, 组织块有一定凝聚力和抗重力作用, 见图 5B。

## 3 讨论

3.1 微球制备工艺 传统块状陶瓷支架存在的最大问题是内部细胞的营养供应不足以及代谢废物不能有效排出, 严重影响骨修复的效果<sup>[4-5]</sup>。为此, 研究者设计了一种新的思路, 即利用微球支架作为靶

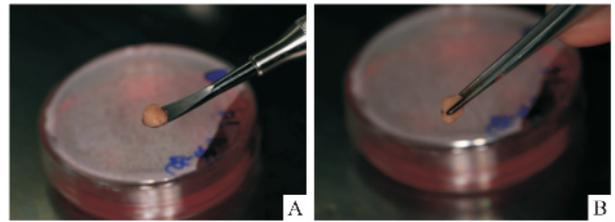


图5 体外模具实验结果图

A: 细胞材料共培养后形成了块状结构; B: 用镊子夹起, 无明显破碎现象

细胞的黏附载体, 直接复合细胞填补到组织缺损区或与靶细胞体外共培养成组织块后移植于缺损区用于体内修复<sup>[6]</sup>。微球材料的传统制备方法主要有 4 种: 乳化交联法、沉淀凝聚法、溶剂蒸发法、喷雾干燥法<sup>[7-10]</sup>。但这类微球并不适于组织修复: 乳化交联法制备的微球粒径不均匀, 其所用化学交联剂还具有一定生物毒性; 喷雾干燥法所得微球粒径较小且结构过于致密, 不适于细胞的黏附生长。本研究中采用的微流控制备技术, 凭借其高通量、低消耗、精确的粒径及结构可控性等技术优势, 在生命科学领域显示出了巨大的应用价值<sup>[11-12]</sup>。

3.2 支架对细胞的生物学作用 一个理想的骨组织工程支架, 必定能与细胞产生充分的生物学作用。支架材料已经从简单的机械支持成为能够为诱导细胞分化、调控细胞生长增殖的生物学界面<sup>[1]</sup>。在仿生支架中引入纳米级元素, 可对成骨细胞和 BMSCs 产生多层次的调控, 如黏附、存活、增殖以及信号基因的表达<sup>[2, 13]</sup>。而本研究中 HAp-CS 支架的主要原料之一便是纳米级 HAp, 黏附增殖实验结果证实, 其在 BMSCs 的初期定植和增殖生长方面具有明显的优势。

微球支架与种子细胞间的相互作用在体外长期培养过程中得到了充分体现。一方面, HAp-CS 球体间无额外作用力, 无法自动凝聚成块状结构, 故球体间的连接需依靠 BMSCs 分泌的大量胞外基质, 这种天然“粘接剂”加强了细胞与微球间以及微球自身间的紧密联系, 并形成能抵御一定外力的工程化组织块。另一方面, BMSCs 的生理活动如长期存活和分泌胞外基质等, 又有赖于微球提供的结构和生理支持。在体外长期培养的过程中, HAp-CS 微球和 BMSCs 成为了相互作用的整体, 这种 3D 块状结构有望用于体内骨再生的实验研究。

### 参考文献

[1] Fernandez-Yague M A, Abbah S A, McNamara L, et al. Biomimet-

- ic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physico-mechanical strategies [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 84:1–29.
- [2] Hu J, Zhou Y, Huang L, et al. Effect of nano-hydroxyapatite coating on the osteoinductivity of porous biphasic calcium phosphate ceramics [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2014, 15: 114.
- [3] Kim I Y, Seo S J, Moon H S, et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering application [J]. *Biotechnol Adv*, 2008, 26 (1): 1–21.
- [4] Singh M K, Gracio J, LeDuc P, et al. Integrated biomimetic carbon nanotube composites for *in vivo* systems [J]. *Nanoscale*, 2010, 2 (12): 2855–63.
- [5] Li M, Liu W, Sun J, et al. Culturing primary human osteoblasts on electrospun poly(lactic-co-glycolic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid)/nanohydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, 5 (13): 5921–6.
- [6] Wang W, Zhang M J, Chu L Y. Functional polymeric microparticles engineered from controllable microfluidic emulsions [J]. *Acc Chem Res*, 2014, 47 (2): 373–84.
- [7] Zhang W, Wang L, Liu Y, et al. Immune responses to vaccines involving a combined antigen particle mixture and nanoparticle-encapsulated antigen formulation [J]. *Biomaterials*, 2014, 35 (23): 6086–97.
- [8] Zhao Y, Gu H, Xie Z, et al. Bioinspired multifunctional Janus particles for droplet manipulation [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135 (1): 54–7.
- [9] Xu J H, Li S W, Tostado C, et al. Preparation of monodispersed chitosan microspheres and in situ encapsulation of BSA in a coaxial microfluidic device [J]. *Biomed Microdevices*, 2009, 11 (1): 243–9.
- [10] Kim S H, Park J G, Choi T M, et al. Osmotic-pressure-controlled concentration of colloidal particles in thinshelled capsules [J]. *Nat Commun* 2014, 5: 3068.
- [11] Valencia P M, Farokhzad O C, Karnik R, et al. Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles [J]. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7 (10): 623–9.
- [12] Sun G, Qi F, Wu J, et al. Preparation of uniform particle-stabilized emulsions using SPG membrane emulsification [J]. *Langmuir* 2014, 30 (24): 7052–6.
- [13] Pant H R, Risal P, Park C H, et al. Synthesis, characterization, and mineralization of polyamide-6/calcium lactate composite nanofibers for bone tissue engineering [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013, 102: 152–7.

## Fabrication of hydroxyapatite-chitosan composite microspheres and their biological effect study *in vitro*

Shen Lili, He Jiakai

(<sup>1</sup>Stomatological Hospital & College, <sup>2</sup>Anhui Medical University, <sup>3</sup>Key Lab. of Oral Diseases Research of Anhui Province Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the influence of HAp-CS composite microsphere scaffold on the *in vitro* cell behaviors of mesenchymal cells and evaluate its potential application for bone tissue engineering. **Methods** Nano-hydroxyapatite (HAp) and chitosan (CS) composites solution were assembled into microsphere scaffold through microfluidic and observed by inverted microscope. Rat bone marrow mesenchymal stem cells were co-cultured *in vitro* with the microspheres for calculating the adhesion rate for the first 6h. Proliferation rate was measured by cell counting in the next 1, 3, 6, 9 d, respectively, and GraphPad Prism 6 software was used for statistical analysis. The morphology of BMSCs on the surface of HAp-CS composite microsphere was observed by scanning electron microscopy (SEM) and confocal scanning microscopy. The cells and HAp-CS microspheres were filled into a disc mold and co-cultured for 14 ~ 21 d to observe the morphology. **Results** HAp-CS microspheres were observed to be round and with uniform size by microscope. The adhesion rate of BMSCs reached 80% after cultured for 6 h, and proliferation rate reached the highest value when cultured for 6 d. SEM observations showed that BMSCs adhered compactly to the surface of the microspheres and the microspheres could be connected together through BMSCs. After co-culturing BMSCs with microspheres for 14 ~ 21 d, a complete tissue constructs could be formed. **Conclusion** HAp-CS microspheres are proved to be good scaffolds for promoting BMSCs adhesion and proliferation. Large amount of extracellular matrix can be formed to connect microspheres after co-cultured for a certain time, which paves the way for HAp-CS microspheres to be applied for bone regeneration in animal experiments.

**Key words** hydroxyapatite/chitosan microsphere; biomimetic scaffolds; bone mesenchymal stem cells; adhesion; proliferation