

# 超临界流体发泡技术制备 BMP-2-PLLAmS/ FGF-2-nHA/PLGA 复合支架及 体外成骨诱导效应研究\*

白燕\*\* 白丽娟 陈华黎 周静

(重庆医科大学药学院, 重庆 400016)

**摘要** 本研究将左旋聚乳酸微球(PLLAmS)与纳米羟基磷灰石/聚乳酸-羟基乙醇酸(nHA/PLGA)多孔支架复合, 构建可次第释放不同生长因子的骨组织工程支架. 首先, 制备载骨形态发生蛋白 2 的左旋聚乳酸微球(BMP-2-PLLAmS), 然后将微球与 nHA/PLGA 及碱性成纤维细胞生长因子 2(FGF-2)按照一定的比例混合, 通过超临界流体发泡制备 BMP-2-PLLAmS/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架. 制备的 BMP-2-PLLA 载药微球呈规则球形, 粒径分布在 6~10  $\mu\text{m}$  之间, BMP-2 载药量为  $1.45 \times 10^{-3}\%$ , 封装率为 61.9%, 制备的 BMP-2-PLLAmS/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架孔径为 100~200  $\mu\text{m}$ , 孔隙率为 75.8%, 抗压强度为 6.8 MPa, 8 周降解率为 19.9%. 7 天时, FGF-2 和 BMP-2 的累计释放率分别为 77.1%和 44.2%; 14 天时, FGF-2 和 BMP-2 的累计释放率分别为 84.9%和 61.5%. 大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)的成骨诱导实验证明复合支架中释放的 BMP-2 和 FGF-2 能够持续有效地刺激 BMSCs 的增殖和分化, 具有良好的生物活性. BMP-2-PLLAmS/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架有效实现了 FGF-2 和 BMP-2 的次第释放, 且能够显著地促进 BMSCs 的成骨分化.

**关键词** 左旋聚乳酸, 聚乳酸-羟基乙醇酸, 超临界流体发泡技术, 复合支架, 次第释放, 成骨诱导

**学科分类号** R318, Q813

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2016.0384

骨组织的再生和修复是一个涉及到多种细胞增殖和分化的复杂过程<sup>[1]</sup>. 研究证明<sup>[2]</sup>, 在骨修复的过程中, 骨髓间充质干细胞经过各种生长因子和转化因子的诱导后分化形为成骨细胞, 成骨细胞能够分泌非矿化的骨基质, 即类骨质, 然后发生矿化形成成熟的骨骼. 因此, 骨髓间充质干细胞(BMSCs)向成骨细胞分化的程度和速度是骨再生修复的关键之一. 骨髓间充质干细胞的成骨分化受到多种生长因子的调控, 其中骨形态发生蛋白 2(BMP-2)和成纤维细胞生长因子 2(FGF-2)的作用至关重要. BMP-2 是目前已知效应最强、应用最广泛的骨生长因子, BMP 的表达水平直接影响间充质干细胞分化和骨量产生的水平<sup>[3]</sup>. FGF-2 是多种细胞的主要有丝分裂原和形态发生因子, 在伤口愈合与组织修复中发挥着重要作用, 它通过促血管生成、促进软组织和骨组织中各种与修复重建有关的细胞分裂增殖等途径, 促进肉芽组织的生成, 从而促进组织

的损伤修复<sup>[4]</sup>. 研究证明, 在众多生长因子中 FGF-2 对 BMSCs 的促增殖作用最强, 它不但能够提高 BMSCs 的增殖速度和存活时间, 而且能在增殖过程中保持其多分化潜能<sup>[5]</sup>. FGF-2 作用于 BMSCs 分化增殖的早期, 应与其他多种因素联合或序贯使用, 才能达到促进 BMSCs 向成骨细胞分化的目的. 研究证明<sup>[6]</sup>, BMP-2 和 FGF-2 对 BMSCs 的成骨分化具有协同促进效应, 且具有时间依赖性, 即在成骨分化的前期(增殖期)应用 FGF-2, 成骨分化的后期应用 BMP-2, 能够最大程

\* 国家自然科学基金资助项目(81401535), 重庆市教委基础科学与前沿技术研究一般项目(cstc2017jcyjAX0029), 重庆市教委科技项目(KJ1702035)和福建省生物化工技术重点实验室开放研究课题资助项目(z17x0003).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 023-68485161, E-mail: baiyan1226@163.com

收稿日期: 2016-12-15, 接受日期: 2017-04-24

度地发挥两者对 BMSCs 成骨分化的协同诱导作用。因此, 需要构建一种能够次第释放不同生长因子的控释载体, 达到释放初期以 FGF-2 为主, 中后期以 BMP-2 为主的控释目的。但目前常采用单一的微球或支架为缓释载体, 未考虑生长因子应用的时间依赖性。如将微球和支架结合应用, 分别将不同生长因子载入微球和支架, 达到次第释放的目的, 有望更好地实现骨修复。

传统制备多孔支架材料的方法, 如纤维黏接、相分离法及溶液浇铸-粒子沥滤法、冷冻干燥等<sup>[7]</sup>, 需要使用大量的有机溶剂、高温等苛刻条件, 制备过程复杂, 无法保持蛋白质类细胞生长因子完整的生物活性。超临界流体技术是一种相对于传统方法

干净又有效的技术, 具有无污染、无高温、产品无有机溶剂残留、绿色环保等显著性特点, 在多孔支架材料制备领域更显独特优势。这种方法没有高温、能将生长因子载入支架材料内而不失去生物活性、对支架材料力学性能和内部孔型有良好控制<sup>[8]</sup>。

如图 1 所示, 本研究先采用乳化法将 BMP-2 载入聚乳酸微球中制备得到 BMP-2-PLLA 载药微球, 再采用超临界 CO<sub>2</sub> 发泡技术将 BMP-2-PLLA 载药微球和 FGF-2-nHA/PLGA 按照一定的比例复合制备 BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架。考察其 FGF-2 和 BMP-2 的缓释行为及对 BMSCs 成骨分化的诱导效应, 拟构建一种能够以不同速率释放生长因子的载体系统。

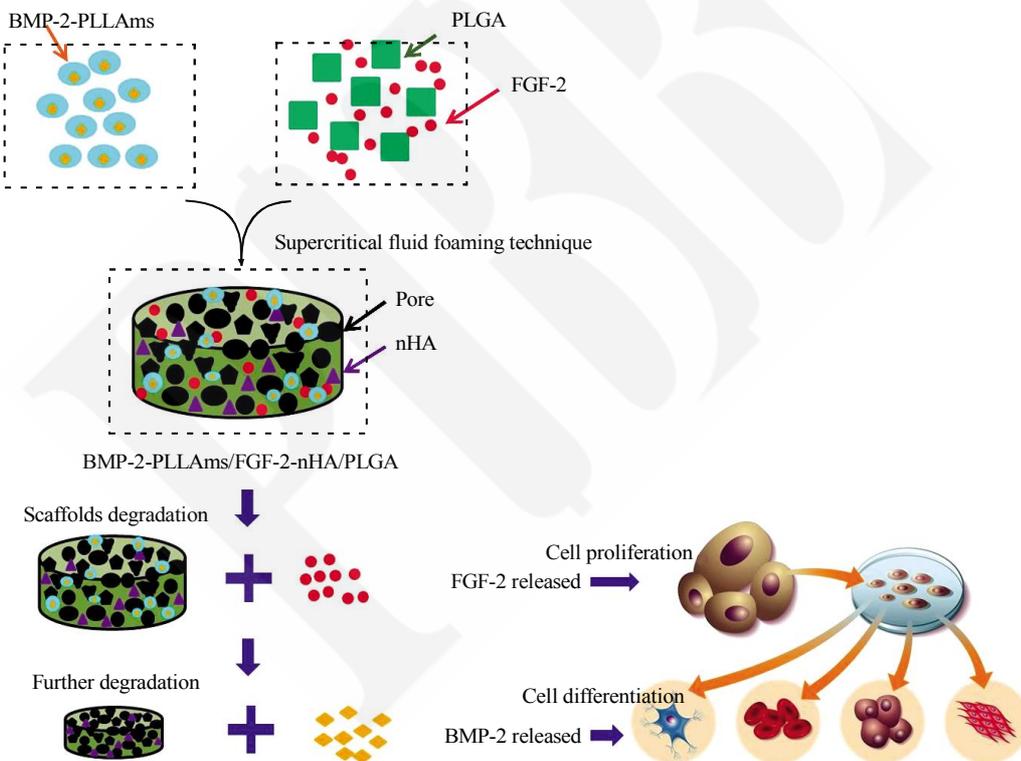


Fig. 1 Study schematic of the preparation of BMP-2-PLLAs/ FGF-2-nHA/PLGA and osteogenic induction

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

PLLA(poly-L-lactic acid, 左旋聚乳酸,  $m=10$  ku) 和 PLGA(poly lactic-co-glycolic acid, 聚乳酸-羟基乙醇酸, 50:50,  $m=100$  ku), 购于济南岱罡生物工程公司。nHA(粒径 < 100 nm, 阿拉丁 H106378)。BMP-2(peprotech)、FGF-2(peprotech)、FGF-2-ELISA 检测试剂盒和 BMP-2-ELISA 检测试

剂盒(RD 进口分装)。

### 1.2 BMP-2-PLLA 载药微球的制备

称取 10  $\mu$ g BMP-2 溶于 250  $\mu$ l PBS 中作为内水相。称取 250 mg PLLA 溶于 5 ml 二氯甲烷中作为油相(内水相与油相体积比为 1:20)。将内水相缓缓倒入油相中, 高速搅拌 2 min, 形成初乳(W/O)。将初乳缓缓滴入 10 ml 1% 的 PVA 中, 高速搅拌 5 min, 形成复乳(WO/W)。将复乳缓慢滴入 250 ml 0.1% 的 PVA 中, 冰浴 500 r/min 搅拌 4 h,

用于挥发有机溶剂。4 000 r/min 低温离心 10 min, 收集微球, 去离子水洗涤 3 次, 冷冻干燥收集。

### 1.3 BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架的制备

将 PLGA 与 HA 按一定的比例研磨 4 h, 分别加入 10%、20%、30%、40% 的 BMP-2-PLLA 载药微球, 以及 20  $\mu\text{g}$  FGF-2 冻干粉(FGF-2 冻干粉先用 10 000 r/min 或 12 000 r/min, 离心 30 s, 重悬于 pH 7.6, 5 mmol/L Tris 至 0.1 g/L, 加入事先混合好的 PLGA、HA 和 BMP-2-PLLAs 粉末中轻轻混匀后冻干), 将混合粉末放入直径为 5 mm 的圆柱形模具中室温下进行压制, 压片的压力为 10 MPa, 时间为 2 min, 得到直径为 5 mm, 高约为 3 mm 的小圆片, 取出。然后置于聚四氟乙烯圆柱体模具内并将模具放入容积为 500 ml 的超临界 CO<sub>2</sub> 不锈钢反应釜中, 密封后用液泵将冷凝至 0°C 以下的 CO<sub>2</sub> 压入反应釜内, 当反应釜内压力达到 8 MPa 时开始升温, 使反应釜内温度达到 35°C, 通过仪器内置的热电偶和放空阀调节釜内的压力和温度, 保持温度变化不超过  $\pm 0.5^\circ\text{C}$ , 压力变化为  $\pm 0.1$  MPa。反应 8 h 后, 以一定的速率放气, 打开反应釜, 取出样品。

### 1.4 BMP-2-PLLA 载药微球和复合支架形态观察

将 BMP-2-PLLA 载药微球分散到导电胶上, 喷金, 采用扫描电镜(JSM-5900LV, Japan)观察微球的表面形貌。微球的粒径及粒径分布采用激光粒度仪测定(ZS90 型激光粒度仪, 英国 Malvern nano zetasizer)。将一定量的样品加入样品池, 经超声分散后启动仪器循环泵, 自动分析软件即可获得微粒粒径大小及粒径分布。 $D_{10}$ ,  $D_{50}$  和  $D_{90}$  代表累积体积在 10%, 50% 和 90% 时的直径大小。复合支架形貌的观察: 取数块制备的复合支架, 将支架放入  $-20^\circ\text{C}$  的冰箱冷冻过夜, 使用手术刀片进行切割为 2 mm 左右的薄片, 喷金, 扫描电镜观察支架断面的孔径分布、孔的形貌以及孔之间的贯通性。

### 1.5 微球载药量和包封率测定

精确称量 10 mg 的 BMP-2-PLLA 载药微球, 加入 1 ml 二氯甲烷, 磁力搅拌至 PLLA 完全溶解, 待微球完全溶解后, 再加入 1 ml PBS, 充分搅拌, 待二氯甲烷挥发完全, 静置, 溶液经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 收集水相, 采用 BMP-2-ELISA 试剂盒测定游离的 BMP-2 的含量。根据 2010 年版《中华人民共和国国家药典》规定, 载药量和包封率分别按以下公式计算:

载药量 = 微粒中所含的药重量 / 微粒的总重量  $\times$  100%

包封率 = 微粒中包封的药量 / 微粒中包封与未包封的总药量  $\times$  100%

### 1.6 支架机械强度测定

将样品制备成为直径 5 mm, 高度 10 mm 左右的圆柱体, 即长径比为约 2 : 1 的标准复合材料试样, 在万能测试机(日本 SHIMADZU AUTOGRAPH)上进行抗压强度的测试。以 3 个样品为一组, 设定压缩的行程为 25%, 下降速率控制在 1 mm/min, 在 25% 之前断裂的样品, 断裂强度记为样品的强度; 如没有断裂则在压缩 25% 过程中最大的强度即为样品的强度。3 个样品的强度取平均值作为样品的抗压强度。

### 1.7 支架孔隙率测定

称量样品的干重记为  $G_1$ , 测量样品的长度  $L$  及半径  $R$ , 将样品放入二次蒸馏水中抽真空, 等水完全渗入到材料中时, 即材料表面没有气泡冒出。取出样品, 用滤纸吸干表面的水分, 称重, 称重记为  $G_2$ , 根据公式计算孔隙率:

$$\varepsilon = (G_2 - G_1) / \rho_{\text{水}} \pi R^2 L \times 100\%$$

### 1.8 支架降解测定

将样品制备成直径为 5 mm, 高度为 10 mm 左右的圆柱体, 称重记为  $M_0$ , 浸泡于 pH 7.4 的 PBS 中, 抽真空, 使样品充分润湿, 放入 50 ml 磨口瓶中, 加入一定量的 PBS 溶液, 放入 37°C 恒温水浴摇床内。分别于时间点 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 周取样, 去离子水冲洗, 冻干后称重记为  $M_T$ , 根据公式计算质量损失:

$$L = (M_0 - M_T) / M_0 \times 100\%$$

### 1.9 FGF-2 和 BMP-2 体外释放实验

精密称取一定量的 BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架, 以 pH 7.4 的 PBS 10 ml 为释放介质, 置于 37°C 恒温摇床中摇动。每隔一定的时间取出 20  $\mu\text{l}$  上清液, 并补充等量的 PBS, 分别用 FGF-2-ELISA 检测试剂盒和 BMP-2-ELISA 检测试剂盒检测 FGF-2 和 BMP-2 含量, 计算累积释放率。

### 1.10 FGF-2 和 BMP-2 对 BMSCs 增殖的诱导

支架中释放的 FGF-2 和 BMP-2 对 BMSCs 增殖的诱导作用采用 CCK-8 法进行考察。将细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养 24 h, 于培养第 1、7 天进行检测。实验分组: (1) 对照组, 仅加入培养基; (2) Free-

FGF-2/BMP-2 组, 培养基中直接加入 FGF-2 (20  $\mu\text{g/L}$ ) 和 BMP-2 (100  $\mu\text{g/L}$ ); (3) BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 组, 培养基中加入 BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架. 培养基中直接加入 20  $\mu\text{g/L}$  FGF-2 和 100  $\mu\text{g/L}$  BMP-2 的依据: 前期研究证明<sup>[6]</sup>, 在一定浓度范围内 FGF-2 和 BMP-2 对 BMSCs 增殖和分化的诱导作用呈现出一种剂量依赖性的趋势. 当 FGF-2 浓度为 20  $\mu\text{g/L}$ , BMP-2 浓度为 100  $\mu\text{g/L}$  时, BMSCs 增殖和成骨分化达到高峰, 大于该浓度时, FGF-2 和 BMP-2 对 BMSCs 成骨分化的诱导作用不再呈现出剂量依赖性.

### 1.11 FGF-2 和 BMP-2 对 BMSCs 合成碱性磷酸酶(ALP)的诱导

ALP 染色和定量检测按照试剂盒说明进行. 按照上述分组方法分别培养各组细胞 7 和 14 天, 于各处理不同时间点实验结束后将 96 孔板取出, 分别进行染色和定量分析. 显微镜下观察拍照, 酶标仪检测 520 nm 吸光值, 空白孔调零.

### 1.12 FGF-2 和 BMP-2 对 BMSCs 合成 I 型胶原 (I-COL) 的诱导

BMSCs 合成 I-COL 的检测按照 I-COL ELISA 试剂盒说明书进行. 分别于培养的第 7、14 天, 取培养上清液进行实验. 以空白孔调零, 450 nm 波长测定各孔吸光度.

### 1.13 FGF-2 和 BMP-2 对 BMSCs 钙结节形成的诱导

采用茜素红 S (ARS) 定量评价方法考察各组 BMSCs 发生矿化形成钙结节的情况. 取对数生长期的第 3 代 BMSCs, 接种于 96 孔培养板, 于 14、21 天将 96 孔板取出, 弃去培养液, PBS 漂洗,

多聚甲醛固定. 每孔加入 100  $\mu\text{l}$  茜素红 S 染色液, 室温染色 30~45 min, 于倒置显微镜下拍照观察, 随后在各孔中加入茜素红 S 抽提液, 抽提 30~45 min, 酶标仪检测 450 nm 吸光度值.

## 2 实验结果

### 2.1 微球和复合支架的形态

BMP-2-PLLA 载药微球形态呈规则的球形, 表面光滑(图 2a). 微球粒径分布较集中, 在 6~10  $\mu\text{m}$  之间, 平均粒径约为 8  $\mu\text{m}$ , 见图 3 和表 1. 由图 2b 可观察到三维的网状结构 BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架断面粗糙多孔、孔径主要分布在 100~200  $\mu\text{m}$ 、孔呈圆形或椭圆形、大部分的孔洞之间相互贯通、具有较高的孔隙率. 将支架截面的扫描电镜图放大, 可以观察到一些颗粒, 如图 2c 所示, 这些细小的颗粒是包裹在支架之中, 可能是 nHA 或者微球颗粒的存在形式, nHA 在发泡过程中被包裹在 PLGA 聚合物的基质之中, 只有在切割的时候暴露出部分. 在复合支架照片的视野范围内未观察到独立的“微球”结构, 原因可能是超临界  $\text{CO}_2$  是 PLLA 的溶胀剂, BMP-2-PLLA 载药微球在与 PLGA/nHA 共混进行发泡时, PLLA 在超临界  $\text{CO}_2$  中部分被溶解, 导致 BMP-2-PLLAs 在经历超临界发泡过程后部分与支架的融合, 难以较好地保持其原来的形态, 从而失去完整而规则的“微球”结构. 但根据复合支架中生长因子的释放结果(图 4)可以看出, 虽然 BMP-2-PLLAs 失去完整规则的“微球”结构, 但能够实现不同生长因子的次第释放, 达到二次缓释的目的.

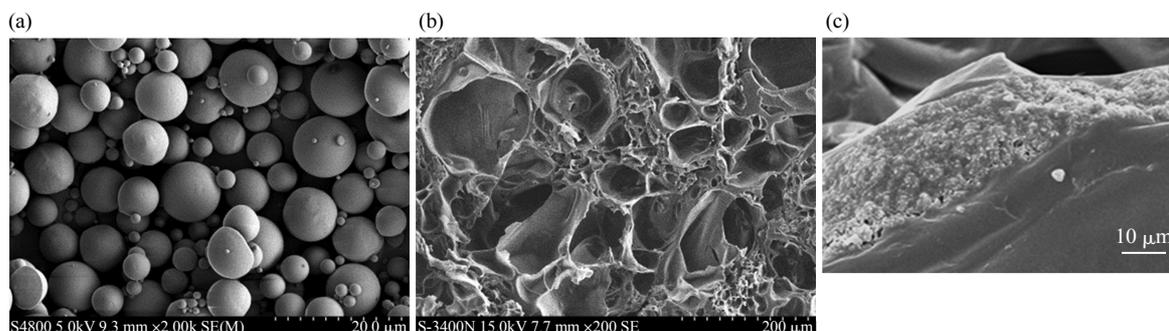


Fig. 2 SEM micrographs

(a) BMP-2-PLLA microspheres prepared by solvent extraction/evaporation method. (b,c) BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA scaffolds prepared by supercritical fluid foaming technique.

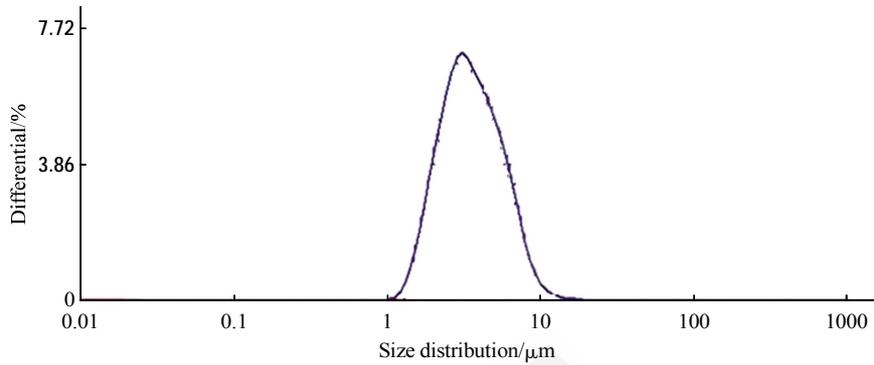


Fig. 3 Size distribution of BMP-2-PLLA microspheres

Table 1 Particle size distribution and mean size of microspheres

					μm
D10	D50	D90	D3	D97	Dav
2.241	6.122	8.301	1.806	10.916	7.817

Table 2 Effect of BMP-2-PLLA microspheres weight on nHA/PLGA scaffold properties

BMP-2-PLLAs weight/%	Porosity ε/%	Compressive strength/MPa
10	88.5±3.4	4.2±0.12
20	75.8±0.9	6.8±0.05
30	68.1±3.5	7.7±0.21
40	59.6±2.7	8.2±0.18

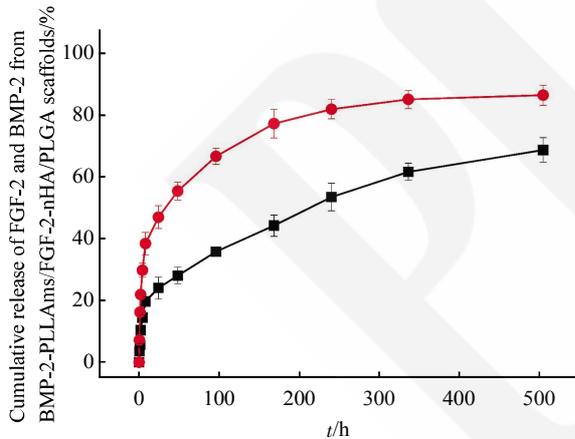


Fig. 4 Cumulative release of FGF-2 and BMP-2 from BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA scaffolds

■—■: BMP-2; ●—●: FGF-2.

### 2.2 复合支架孔隙率和抗压强度

不同含量的微球对复合支架的抗压强度和孔隙率的影响, 见表 2. 随着 BMP-2-PLLA 载药微球的含量逐渐增大, 复合支架的孔隙率随之逐渐减小, 抗压强度随之逐渐增大. 当 BMP-2-PLLAs 的含量为 10% 时, 复合支架的孔隙率最大为 88.5%, 而抗压强度最小为 4.2 MPa; 当 BMP-2-PLLAs 的含量达到 40% 时, 复合支架孔隙率为 59.6%, 抗压强度为 8.2 MPa. 综合考虑骨修复支架材料对孔隙率和抗压强度的影响, 最终选用 BMP-2-PLLAs 含量为 20%.

在制备支架过程中加入定量的 BMP-2-PLLA 载药微球(即 20%), 而改变加入的 HA 的含量(5%、10%、15%、20%), 考察不同含量 HA 对支架抗压强度的影响. 当 BMP-2-PLLA 载药微球含量为 20% 时, 不同含量的 HA 对复合支架的抗压强度和孔隙率的影响, 见表 3. 随着 HA 的含量逐渐增大, 复合支架的孔隙率随之逐渐减小, 抗压强度随之逐渐增大. 当 HA 的含量为 5% 时, 复合支架的孔隙率最大为 75.8%, 而抗压强度最小为 6.8 MPa; 当 HA 的含量达到 20% 时, 复合支架孔隙率为 44.8%, 抗压强度为 8.3 MPa. 综合考虑骨修复支架材料对孔隙率和抗压强度的影响, 最终选用 HA 含量为 5%, 制备的 BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架孔隙率为 75.8%, 抗压强度为 6.8 MPa.

Table 3 Effect of HA weight on nHA/PLGA scaffolds properties

HA 含量 /%	Porosity ε/%	Compressive strength/MPa
5	75.8±0.9	6.8±0.05
10	64.9±0.8	6.8±0.10
15	53.7±1.6	7.7±0.3
20	44.8±0.5	8.3±0.1

### 2.3 聚乳酸微球载药量和包封率测定

BMP-2 与 PLLA 的原始投入分别为 10  $\mu\text{g}$  和 250 mg, 质量比为  $1 \times 10^{-2} : 250$ , 理论载药量为  $3.99 \times 10^{-3}\%$ . BMP-2-PLLA 载药微球的实际载药量为  $1.45 \times 10^{-3}\%$ , 包封率为 61.9%, 表明所制备的微球具有良好的载药性能.

### 2.4 复合支架的降解和生长因子的释放

随着降解时间的延长, 支架材料的质量逐渐减小. 降解到第 2, 4, 6, 8, 10 周时, 复合支架的质量分别减少 3.4%, 6.8%, 14.1%, 19.9%, 28.9%. 随着支架的降解其抗压强度逐渐降低, 在骨修复初期新生骨不能对抗应力时, 支架暂时起支撑作用. 随着新生骨发育成熟, 支架逐渐降解抗压强度不断降低, 不再起主要支撑作用, 且不会对新生骨的生长发育产生应力遮挡. BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架中释放的 FGF-2 和 BMP-2 存在一定的突释现象. BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架中 FGF-2 的释放速率明显快于 BMP-2 的释放速率(图 4). 48 h 时, 复合支架中 FGF-2 的累计释放率为 55.3%, BMP-2 的累计释放率为 28.1%. 7 天时, FGF-2 的累计释放率为 77.1%, BMP-2 的累计释放率为 44.2%. 14 天时, FGF-2 的累计释放率为 84.9%, BMP-2 的累计释放率为 61.5%. 21 天时, FGF-2 的累计释放率为 86.2%, BMP-2 的累计释放率为 68.6%. 从图 4 中可以观察到, BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架的释放曲线呈现了两相的释放机制, 即释放初期的蛋白突释现象和延续 21 天的持续释放现象. 产生突释现象的原因可能是: 小部分生长因子仅仅是吸附在微球和支架的表面, 遇水很容易解离下来; 释放初期, 由于释放介质中生长因子含量接近于零, 巨大的浓度差异使得生长因子解离的驱动力非常大, 导致了释放初期两种生长因子的快速释放. 延续 21 天差速释放的原因可能是: FGF-2 松散地包裹在支架的微孔之中, 随着 PLGA 不断地降解使 FGF-2 逐渐暴露在释放介质中, 很容易从支架中逐步地解离出来. 而 BMP-2 是先包裹在 PLLA 微球中, 再载入 PLGA 多孔支架中, 随着 PLLA 和 PLGA 的降解和溶蚀, BMP-2 从 PLLA 微球的孔道中释放出来, 微球和支架对 BMP-2 起到二次缓释的作用. 载体系统的构成和材料的选择对不同药物的差速释放具有重要意义. 以往采用单纯的多孔支架材料或微球缓释系统都难以达到既能长期缓释又能差速释放的要求. 有研究表明采用两者的复合来

获得单一或两种生长因子的释放是可行的. 而不同的载体材料, 如不同分子质量和嵌段比的 PLGA 和 PLLA, 制备出微球的粒径和支架的孔径、孔隙率、降解速率均不同, 而载体的这些特性对于控制药物的释放速率均有较大影响.

### 2.5 FGF-2 和 BMP-2 对 BMSCs 增殖的诱导

BMSCs 细胞增殖的检测结果如图 5. 培养 1 天后, 从 BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架中释放的生长因子和直接加入培养基中的生长因子都能够明显促进 BMSCs 的增殖, 且支架中释放的生长因子对细胞增殖促进作用更加显著 ( $P < 0.01$ ). 培养 7 天后, 从复合支架中释放的生长因子和直接加入培养基中的生长因子对 BMSCs 增殖的促进作用较空白对照组有显著差异. BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架中释放的生长因子对细胞增殖的诱导作用明显优于空白对照组 ( $P < 0.01$ ) 和培养液中直接加入生长因子组 ( $P < 0.05$ ).

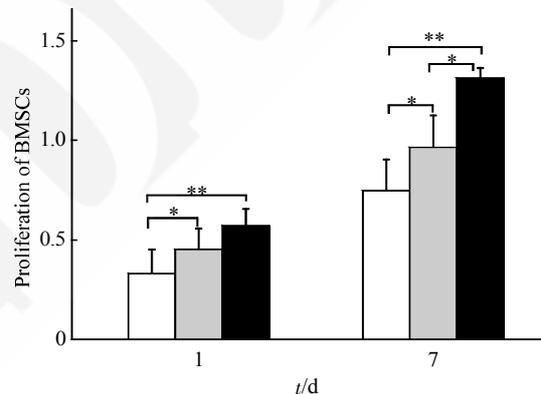


Fig. 5 Proliferation of BMSCs

□: Control; ▨: Free FGF-2/BMP-2; ■: BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

### 2.6 FGF-2 和 BMP-2 对 BMSCs 合成碱性磷酸酶 (ALP) 的诱导

ALP 的活性是 BMSCs 早期成骨分化的主要特征之一. 本实验以 ALP 活性来评价各组不同培养液对 BMSCs 向成骨方向分化的诱导作用. BMP-2 和 FGF-2 对 BMSCs 细胞 ALP 合成的诱导结果如图 6 和图 7. 培养 1 天后, 3 个实验组对 BMSCs 细胞 ALP 合成的诱导作用没有显著差异. 培养 7 天时, 从 BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架中释放的生长因子能够显著地促进细胞中 ALP 的合成 ( $P < 0.01$ ), 但直接加入培养基中的生

长因子对 ALP 合成的促进作用不明显. 培养 14 天后, 从复合支架中释放的生长因子和直接加入培养基中的生长因子对 ALP 合成的促进作用较空白对

照组均有显著差异, 且复合支架中释放的生长因子的诱导作用更显著( $P < 0.01$ ).

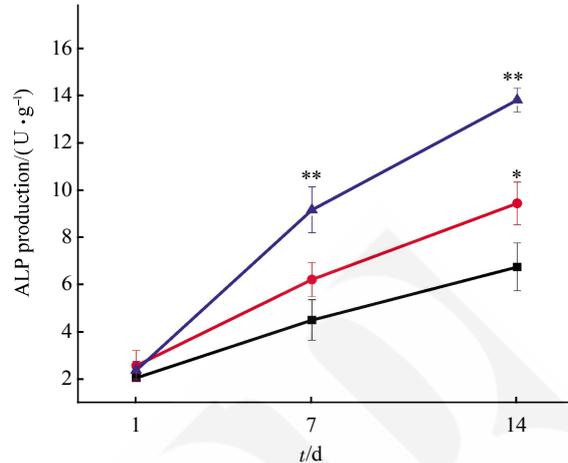


Fig. 6 ALP production of BMSCs

■—■: Control; ●—●: Free FGF-2/BMP-2; ▲—▲: BMP-2-PLLAm/FGF-2-nHA/PLGA. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

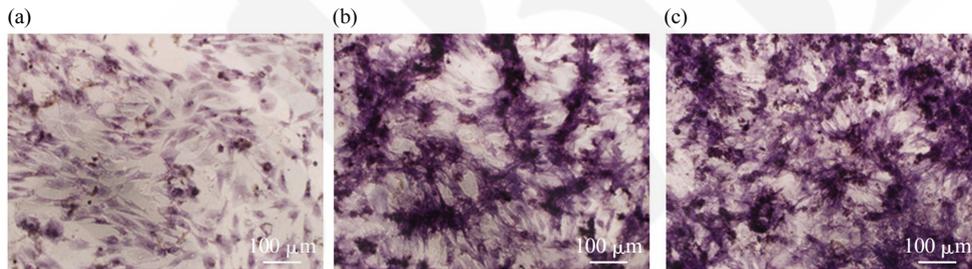


Fig. 7 ALP staining photographs of BMSCs on the 14th day

(a) Control. (b) Free FGF-2 and BMP-2. (c) BMP-2-PLLAm/FGF-2-nHA/PLGA scaffolds.

### 2.7 FGF-2 和 BMP-2 对 BMSCs 合成 I-COL 的诱导

I-COL 在 BMSCs 分化为成骨细胞的增殖早期就已经开始合成, 并随着细胞外基质的成熟而逐渐增加, 其表达与骨形成活性密切相关, 是 BMSCs 成骨分化的又一特征<sup>[9]</sup>. 从图 8 可以看出, 培养 1 天后, 3 个实验组对 BMSCs 细胞 ALP 合成的诱导作用没有显著差异. 3 个实验组 BMSCs 细胞 I-COL 合成量在培养第 7 天就大量增加. 培养 7 天后, 从 BMP-2-PLLAm/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架中释放的生长因子和直接加入培养基中的生长因子都能够明显促进 I-COL 合成( $P < 0.05$ ). 培养 7 天时, 从复合支架中释放的生长因子和直接加入培养基中的生长因子对 I-COL 合成的促进作用较空白对照组均有显著差异, 且复合支架中释放的

生长因子的诱导作用更显著( $P < 0.01$ ).

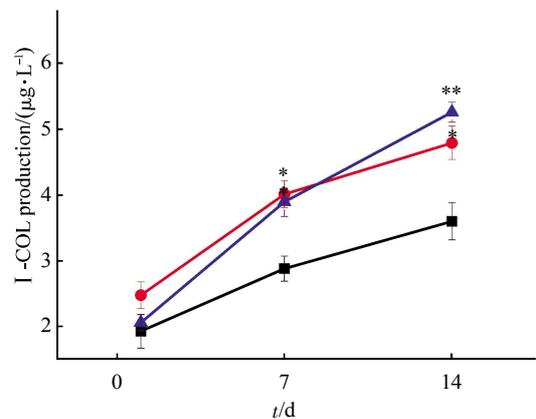


Fig. 8 I-COL production of BMSCs

■—■: Control; ●—●: Free FGF-2/BMP-2; ▲—▲: BMP-2-PLLAm/FGF-2-nHA/PLGA. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

### 2.8 FGF-2 和 BMP-2 对 BMSCs 钙结节形成的诱导

BMSCs 分化的最终特征就是分化为成熟的成骨细胞, 继而分泌细胞外基质形成钙结节<sup>[10]</sup>. 因此进一步以钙结节的形成量来评价各个实验组不同培养液对 BMSCs 成骨分化程度的影响. 各实验组 BMSCs 不同时间的茜素红定量检测如图 9 和 10 所示, 培养 14 天时, 仅从 BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架中释放的生长因子显著促进 BMSCs 钙结节的形成( $P < 0.05$ ). 培养 21 天时, 复合支架中释放的生长因子和直接加入培养基中的生长因子对钙结节形成的诱导作用较空白对照组均有显著差异( $P < 0.01$ ), 且复合支架中释放的生长因子较直接加入培养基中的生长因子对钙结节形成的诱导也有显著差异( $P < 0.01$ ).

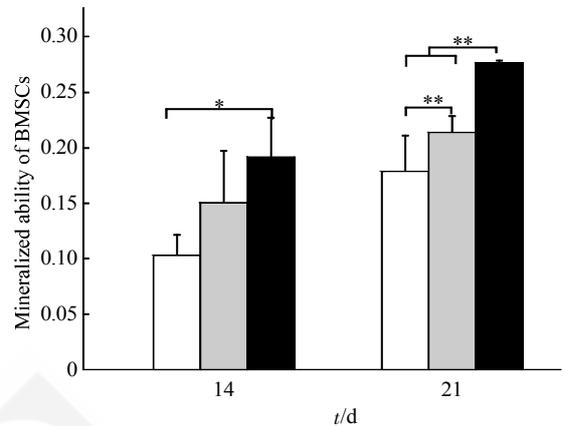


Fig. 9 Mineralized ability of BMSCs

□: Control; ▨: Free FGF-2/BMP-2; ■: BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

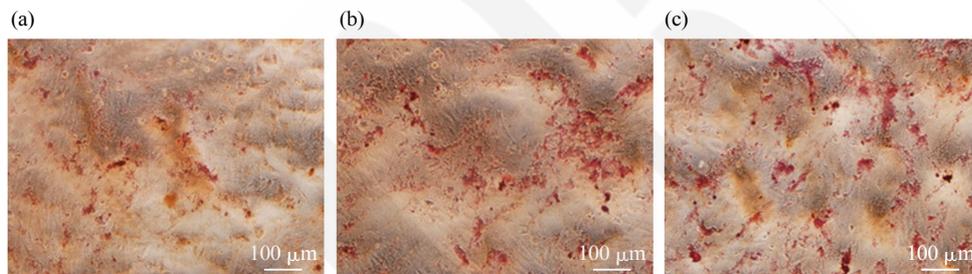


Fig. 10 Alizarin red S staining of BMSCs on the 21st day

(a) Control. (b) Free FGF-2 and BMP-2. (c) BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA scaffolds.

## 3 讨 论

骨髓间充质干细胞的成骨分化受到多种生长因子的调控, 而且生长因子的作用效应具有时间依赖性、剂量依赖性和协同作用. 早期研究中生长因子输送均是采用和细胞一起注射或者与支架材料物理混合, 这种系统的输送或注射难以获得预期效果<sup>[11]</sup>. 为了充分发挥不同生长因子的生物效应, 本研究拟构建一种按照一定的时间和顺序释放生长因子到靶细胞的控释系统, 从而诱导细胞的生长和分化, 有效促进骨组织再生修复.

研究制备复合载体所采用的 3 种基本材料 PLLA、HA 和 PLGA 都是使用较广泛、生物相容性优良的载体材料<sup>[12-13]</sup>. 将 HA 与 PLGA 进行复合, 既可增加骨传导性, 又能提高支架材料的机械强度, 且能够调节 PLGA 的降解速率, 以保证材料的降解速度与骨组织的再生速度一致<sup>[14]</sup>. 制备的 BMP-2-PLLA 载药微球形态规则、光滑完整、无黏

连、微球粒径分布较集中且具有较高的载药量和封装率、利用率. 利用超临界发泡技术制备的 BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架, 孔隙率较高、绿色环保、较好地保持生长因子的构象和生物活性. 超临界流体发泡技术的原理是超临界状态的  $\text{CO}_2$  对聚合物具有较高的溶解性, 在保温保压阶段聚合物被超临界  $\text{CO}_2$  所饱和, 形成聚合物 / 超临界  $\text{CO}_2$  饱和溶液, 此时, 聚合物的玻璃化转变温度降低, 弹性增加. 当压力突然降低时, 聚合物基质内的气体从热力学稳定状态变为热力学不稳定状态, 导致大量气泡核的产生, 气泡核增长变大从而产生孔, 随着体系压强的降低, 聚合物的玻璃化转变温度升高, 弹性减小, 从而生成多孔的结构. 支架的孔隙率及结构受到气体的饱和量、减压速率(与温度和压强有关)以及气体扩散速率(与温度和减压速率有关)的影响. 前期研究对超临界  $\text{CO}_2$  发泡过程的反应条件进行了优化, 主要考察了温度、压强、时间、减压速率等对支架表面形貌和性

质的影响. 根据研究结果最终选择的反应条件如下: 压力为 8 MPa, 温度为 35°C, 反应时间为 8 h, 减压速率为 0.1 MPa/s. Mooney 等<sup>[15]</sup>采用超临界 CO<sub>2</sub> 发泡技术制备了 PLGA(50:50) 支架, 制备的条件为: 压力 5500 kPa, 温度 20~23°C, 保温时间为 48~72 h, 虽然在此发泡条件下 CO<sub>2</sub> 没有处在超临界的状态, 但经过长时间的浸润后, 聚合物仍能够被 CO<sub>2</sub> 所饱和, 所制备的支架平均孔径为 100 μm, 孔隙率为 93%, 但孔之间的连通性较差. Watson 等<sup>[16]</sup>将蛋白质与聚合物的混合物放入磨具中进行超临界发泡, 结果表明, 放气速率对孔径的大小有明显的影响, 放气速率(≈2 min)越快, 孔径越小. Rouholamin 等<sup>[17]</sup>采用超临界 CO<sub>2</sub> 对聚合物基质进行发泡(发泡条件为: 170~230 Pa, 保温时间为 0.5~2 h, 放气时间为 2 min 到 2 h), 制备出孔隙率较高、连通性较好的多孔支架(平均孔径为 200~500 μm).

研究证明<sup>[18]</sup>, 骨支架材料除需具备无毒、生物相容性好、具有多孔性、生物活性等普遍性特点外, 还有特殊要求: a. 一定的机械强度, 一般以小梁骨为参照, 其抗压强度应大于 5 MPa. b. 降解速度的可调控性, 随着支架的降解其抗压强度逐渐降低, 且支架的降解速度和抗压强度需与再生骨的速率相匹配. 在新生骨不能对抗应力时, 支架能充当暂时的支撑作用. 新生骨发育成熟时支架材料应当逐渐消失, 不发生应力遮挡. c. 支架孔除结构的特殊性, 骨组织工程支架要求孔隙率要达 60%~80%以上, 孔径以 90~200 μm 为最好, 在此条件下骨形成量多且不影响其力学强度. 本研究制备的复合支架孔隙率为 75.8%, 孔径主要分布在 100~200 μm, 孔的连通性较好, 抗压强度为 6.8 MPa, 基本符合本骨组织工程支架材料的要求. 此外, 研究证明不同 BMP-2-PLLA 载药微球和 HA 含量 BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架孔隙率和抗压强度的影响较大. 随着微球和 HA 含量的增大, 制备的支架孔隙率减小而抗压逐渐增大. 原因可能是当微球和 HA 含量的增大至一定比例之后, 不利于超临界 CO<sub>2</sub> 的溶胀和气泡核的生长, 无法及时形成更多的孔洞结构, 因而孔隙率也随之减小. 而 HA 本身就可提高支架材料的机械强度, 其含量增多必然会使支架的抗压强度提高. 为了使复合支架复合骨组织修复的要求, 兼顾孔隙率和抗压强度, 研究最终选择了 BMP-2-PLLA 载药微球含量为 20%, HA 的含量为 5% 制备支架.

骨修复是一个复杂的过程, 其中涉及到多种生长因子和细胞的参与, 不同的生长因子在特定的时间作用于特定的靶细胞, 协同地实现骨组织的修复. 目前应用最多的生长因子有<sup>[14-6]</sup>: BMPs、PDGF、IGF、VEGF、FGF 等. BMP 是骨再生过程中最重要的一类细胞因子, 在骨再生过程中扮演着重要的角色. 大量的研究表明, BMP 超家族的蛋白质能够起始骨修复的级联反应, 即间质干细胞的迁移及向成骨方向的分化, 在 BMP 超家族中, BMP-2 是应用最多的一种生长因子<sup>[19]</sup>. BMP-2 可明显增加细胞中 ALP 的活性, 促进成骨标记蛋白 I 型胶原、骨钙素、骨桥素等稳态 mRNA 水平, 能诱导未分化的 MSC 不可逆地分化为成骨细胞, 从而表现强烈而稳定诱导成骨的作用. FGFs 能够调节多种细胞的增殖及分化, 在体内作用时能够促进血管的生成及成骨基因的表达, 在 FGFs 超家族中, FGF-2 在骨修复的刺激效果最为明显, 对 MSCs 具有最强的促增殖作用, 并能够促进钙化胶原基质形成及成骨的作用<sup>[20]</sup>. 虽然生长因子的使用对骨修复极为重要, 但直接使用可溶性生长因子存在着半衰期短、价格昂贵、缺乏长期稳定性和组织选择性问题<sup>[8]</sup>. 将生长因子载入支架载体中对于解决生长因子实际应用的问题至关重要. 长期有效地维持药物的缓释, 使其最大程度地发挥生物效应是组织工程支架的主要作用之一. 目前常采用的方法是将生长因子载入到微球、纳米颗粒、纤维、多孔支架中, 虽然这些载体中能够维持其生物活性, 但突释现象较为严重, 难以实现持续次第控释<sup>[21]</sup>. 为了最大程度地发挥 BMP-2 和 FGF-2 对 BMSCs 成骨分化的协同诱导作用, 本文将微球与支架进行复合, 构建一种能够次第释放不同生长因子的控释载体, 对生长因子进行二次包裹, 既可降低突释效应, 又可达到不同生长因子次第释放的目的. 从复合支架中释放出来的生长因子能够持续有效地刺激细胞的增殖和分化, 而游离的生长因子在细胞生长环境下很快就被降解和稀释, 其有效活性仅能维持在 2~4 h<sup>[22]</sup>, 对细胞增殖和分化的刺激是波动性的. 因此, 支架中释放出来的 FGF-2 和 BMP-2 较游离的生长因子对 BMSCs 的增殖和分化均具有显著的促进作用, 而且促进效应随着培养时间的延长愈来愈显著. 保持蛋白质药物活性是研究的关键问题, 采用乳化法将 BMP-2 载入 PLLA 微球中制备 BMP-2-PLLAs, 搅拌、离心和干燥等过程均在低温条件下进行, 不仅有利于二氯甲烷的充分挥发, 且不易引起蛋白质

类药物变性, 使其对药物活性的影响降到最小. BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架的制备采用超临界发泡技术也是为了最大程度地保持生长因子的活性, 该制备过程涉及的反应压力和温度均较温和, 未对生长因子的生物活性产生显著的影响. 本研究采用超临界二氧化碳发泡技术制备的包载不同生长因子的复合支架达到了长期有效维持蛋白质药物生物活性的目的, 并对 BMSCs 的增殖分化起到明显的促进作用. 国外相关研究也证实了该方法的可行性, Janos 等<sup>[23]</sup>采用超临界二氧化碳流体技术分别制备了复合 BMP-2、VEGF-海藻酸钠纤维及 PLLA 颗粒的支架 alginate-VEGF/PLLA-BMP-2, 经过超临界过程后 BMP-2 和 VEGF 的生物活性无显著变化, 并能够显著诱导大鼠骨缺损再生修复和新血管的生成. Luis Diaz-Gomez 研究组<sup>[24]</sup>采用超临界流体发泡技术制备了复合生长因子的 PCL 支架, 并证明支架中释放的生长因子对间充质干细胞具有显著的成骨诱导作用.

本研究所构建的 BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA 复合支架能够实现不同生长因子的次第释放, 并有效地诱导 BMSCs 的增殖和成骨分化. 为进一步促进体内骨组织的修复奠定了基础, 该支架有望作为其他药物次第控释的载体来满足不同组织生长修复的需要.

### 参 考 文 献

- [1] Bai Y, Yin G F, Huang Z B, *et al.* Localized delivery of growth factors for angiogenesis and osteogenesis in tissue engineering. *International Immunopharmacology*, 2013, **2**(16): 214-223
- [2] Allori A C, Sailon A M, Warren S M. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair part I: biochemical signaling molecules. *Tissue Engineering Part B*, 2008, **14**(3): 259-273
- [3] Seo B B, Choi H, Koh J T, *et al.* Sustained BMP-2 delivery and injectable bone regeneration using thermosensitive polymeric nanoparticle hydrogel bearing dual interactions with BMP-2. *Journal of Controlled Release*, 2015, **209**(2): 67-76
- [4] Lei L, Wang S, Wu H, *et al.* Optimization of release pattern of FGF-2 and BMP-2 for osteogenic differentiation of low-population density hMSCs. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2015, **103**(1): 252-261
- [5] Bindi R, Brieger D, Ishii H, *et al.* Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **228**(2): 413-419
- [6] Bai Y, Li P, Yin G F, *et al.* BMP-2, VEGF and bFGF synergistically promote the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biotechnology Letters*, 2013, **35**(3): 301-308
- [7] Nie H, Lai Y L, Tong H, *et al.* PLGA/chitosan composites from a combination of spray drying and supercritical fluid foaming techniques: New carriers for DNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 2008, **129**(3): 207-214
- [8] Ernesto R, Stefano C. Supercritical fluids in 3-D tissue engineering. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2012, **69**(9): 97-107
- [9] Camozzi V, Tossi A, Simoni E, *et al.* Role of biochemical markers of bone remodeling in clinical practice. *J Endocrinol Invest*, 2007, **30**(6): 13-17
- [10] Nishimura R, Hata K, Ikeda F, *et al.* Signal transduction and transcriptional regulation during mesenchymal cell differentiation. *J Bone Miner Metab*, 2008, **26**(3): 203-212
- [11] Giannoni P, Hunziker E. Release kinetics of transforming growth factor-beta1 from fibrin clots. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **83**(1): 121-123
- [12] Sun B, Xu J, Zhang Q K, *et al.* Preparation and properties of polyglycolide, poly(L-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Acta Polymerica Sinica*, 2014, **63**(9): 1274-1280
- [13] Ambrosio A M, Sahota J S, Khan Y. A novel amorphous calcium phosphate polymer ceramic for bone repair: I. Synthesis and characterization. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, **58**(3): 295-301
- [14] Liao C J, Chen C F, Chen J H. Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/ particulate leaching method. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, **59**(4): 676-681
- [15] Mooney D J, Baldwin D F, Suh N P, *et al.* Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials*, 1996, **17**(17): 1417-1422
- [16] Watson M S, Whitaker M J, Howdle S M, *et al.* Incorporation of proteins into polymer materials by a novel supercritical fluid processing method. *Adv Mater*, 2002, **12**(24): 1802-1804
- [17] Rouholamin D, Smith P J, Ghassemieh E. Control of morphological properties of porous biodegradable scaffolds processed by supercritical CO<sub>2</sub> foaming. *Journal of Materials Science*, 2013, **48**(8): 3254-3263
- [18] Lu L, Zhu X, Valenzuela R C, *et al.* Biodegradable polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Clin & Related Res*, 2001, **391**(Supple): S251-270
- [19] Neumann, Alexander J, Alini M, *et al.* Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells is modulated by complex mechanical stimulation and adenoviral-mediated overexpression of bone morphogenetic protein 2. *Tissue Engineering Part A*, 2013, **19**(11-12): 1285-1294
- [20] Itkin T, Kaufmann, Kerstin B, *et al.* Fibroblast growth factor signaling promotes physiological bone remodeling and stem cell self-renewal. *Current Opinion in Hematology*, 2013, **20**(3): 237-244
- [21] Sun L, Hu Y Y, Xiong Z, *et al.* Repair of the radial defect of rabbit with polyester/tricalcium phosphate scaffolds prepared by rapid prototyping technology. *Chin J Traumatol*, 2006, **43**(5): 298-302

- [22] Sagrario Ortega, Marie-Therese Schaeffer, Denis Soderman, *et al.* Conversion of cysteine to serine residues alters the activity, stability, and heparin dependence of acidic fibroblast growth factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, **266**(9): 5842–5846
- [23] Janos M K, Patrick J G, Lisa W, *et al.* The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials*, 2010, **31**(6): 1242–1250
- [24] Diaz G L, Concheiro A, Alvarez L C, *et al.* Growth factors delivery from hybrid PCL-starch scaffolds processed using supercritical fluid technology. *Carbohydrate Polymers*, 2016, **142**(1): 282–292

## Study of BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA Scaffolds Prepared by Supercritical Fluid Foaming Technique and The Osteogenic Induction Effects in vitro\*

BAI Yan\*\*, BAI Li-Juan, CHEN Hua-Li, ZHOU Jing

(College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** In order to construct a bone tissue engineering scaffold that could sequentially release multiple growth factors, the released system combining of PLLA microspheres and nHA/PLGA porous scaffolds was prepared in this study. Firstly, BMP-2 was encapsulated into PLLA microspheres to prepare the BMP-2-PLLA microspheres, then BMP-2-PLLA microspheres, nHA/PLGA and FGF-2 freeze-dried powder were mixed according to a certain proportion to prepare the BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA scaffolds by supercritical fluid foaming technique. The results indicated that the BMP-2-PLLA microspheres were spherical, and the particle size of BMP-2-PLLA microspheres ranged from 6 to 10  $\mu\text{m}$ . The drug loading and encapsulation efficiency of BMP-2-PLLA microspheres was  $1.45 \times 10^{-3}\%$  and 61.9%, respectively. BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA composite scaffolds were obtained with the pore size of 100–200  $\mu\text{m}$ , the porosity of 75.8%, the compressive strength of 6.8 MPa, and the degradation rate of 19.9% at 8 weeks. The cumulative releases of FGF-2 and BMP-2 from the scaffolds were respectively about 77.1% and 44.2% after 7 days, 84.9% and 61.5% after 14 days. The results of BMSCs proliferation and differentiation showed that FGF-2 and BMP-2 released from the composite scaffolds could significantly promote cell proliferation and differentiation, and present a high bioactivity. BMP-2-PLLAs/FGF-2-nHA/PLGA scaffolds realized the sequential delivery of BMP-2 and FGF-2, and could induce BMSCs proliferation and differentiation effectively.

**Key words** poly-L-lactic acid, poly lactic-co-glycolic acid, supercritical fluid foaming technique, composite scaffolds, sequential release, osteogenic induction

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2016.0384

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81401535), Fundamental and Advanced Research Projects of Chongqing City (cstc2017jcyjAX0029), Science and Technology Research Project of Chongqing Education Commission (KJ1702035), Research Project of Fujian Provincial Key Laboratory of Biochemical Technology (z17x0003).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-23-68485161, E-mail: baiyan1226@163.com

Received: December 15, 2016 Accepted: April 24, 2017