

可控多孔结构支架制备及灌注式体外培养 Fabrication of Scaffold with Controlled Porous Structure and Flow Perfusion Culture *in vitro*

李 祥¹, 李涤尘^{1*}, 王 林², 卢秉恒¹, 王 臻²

LI Xiang¹, LI Di-Chen^{1*}, WANG Lin², LU Bing-Heng¹ and WANG Zhen²

1. 西安交通大学机械制造系统工程国家重点实验室, 西安 710049

2. 第四军医大学西京医院骨科研究所, 西安 710032

1. State Key Lab for Manufacturing Systems Engineering, Xi'an Jiao Tong University, Xi'an 710049, China

2. Orthopaedics Institute, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

摘 要 利用 CAD 和快速成形技术设计制造具有可控多孔结构的支架。构建灌注式生物反应器系统, 实现氧气和营养物质的大量输送, 同时产生一定流体剪应力, 调节细胞功能的发挥。根据支架负型结构制造出相应的树脂原型, 用磷酸钙骨水泥进行填充烧结, 得到与设计相符的多孔支架。接种兔成骨细胞, 分别采用静态和灌注式三维动态培养方法, 观察不同培养条件下细胞在支架表面以及所构造微管道内的生长情况。试验结果表明, 灌注式体外培养方法更有利于细胞在支架微管道内的存活和功能的发挥, 此灌注式系统能够改善支架微管道内细胞生存的微环境, 增强黏附在支架微管道内细胞的活性, 促进细胞进一步的增殖和矿化基质的产生。

关键词 快速成形, 立体光固化, 支架, 生物反应器, 体外培养

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0579-05

Abstract 3D Scaffolds with controlled porous structure were designed and fabricated by utilizing CAD and rapid prototyping techniques. A flow perfusion bioreactor, which allowed exposure of the culture cells to low levels of mechanical stimulation by fluid flow-induced shear stress, was developed in our lab. The scaffolds were pre-designed and the negative images of the designs were used to build the molds on a stereolithography (SL) apparatus with epoxy resins. Calcium phosphate cement paste was cast into the molds. And after pyrolysis, the 3D scaffolds with controlled internal pore architectures were obtained. Rabbit osteoblasts were seeded in 3D porous scaffolds, cultured in the flow perfusion bioreactor with media flow rate set at 2 mL/min and 6-well plates. At 3, 7, and 14 days, scanning microscopic evaluation showed excellent growth on the surface of scaffolds and poor viability of cells within microchannels in static cultures. In flow perfusion bioreactor, there was greater cellularity throughout the scaffolds and abundant deposition of extracellular matrix. Cells were also seen throughout the internal microchannels of scaffolds. These results represent that better mass transport of oxygen and nutrient occurred in the flow perfusion bioreactor and cells distribution in 3D porous scaffolds was improved.

Key words rapid prototyping, stereolithography, scaffold, bioreactor, culture *in vitro*

Received: January 7, 2005; Accepted: April 4, 2005.

This work was supported by a grant from The National Sciences Foundation of China (No. 50235020).

* Corresponding author. Tel: 86-29-82665575. E-mail: Dcli@mail.xjtu.edu.cn

国家自然科学基金资助项目 (No. 50235020).

理想的骨组织工程支架不但要具备良好的生物相容性和可降解性,而且还要具备合理的三维空间结构,主要包括内部微孔或微管道的尺寸、形状、空间走向、分支、分布以及相互连通性。因为支架内部三维空间结构不但会影响细胞的生存、生长、增殖和重组^[1],而且还会影响细胞在内部的空间分布以及新骨的形成^[2,3]。应用 CAD 和快速成形技术可以预先设计和精确控制制造出具有复杂形状的三维空间结构,而且这两项技术在骨组织工程支架构造方面的应用也越来越广泛^[4,5]。在体外构建工程骨组织时,体外培养环境不仅要为细胞提供充足的氧气和营养,而且还要能够给细胞一定机械应力刺激,调节细胞的活性和基因表达的发挥^[6]。特别是当支架的尺寸比较大时,就需要利用生物反应器使在相互连通的孔或微管道中产生一个动态的微环境,促进黏附在支架内部细胞的功能发挥和新组织的形成。本研究的目的是应用立体光固化快速成形间接制造技术,制备可控多孔结构支架,比较静态培养与自行开发的一种灌注式培养,这两种体外培养环境下,成骨细胞在支架表面及微管道内部生长情况。

1 材料和方法

1.1 材料

自固化磷酸钙骨水泥(Calcium Phosphate Cement, CPC)为瑞邦生物材料有限公司产品,phosphate-buffered saline(PBS)溶液、高糖二甲氨基乙醇(Dulbecco Modified Eagle's Medium, DMEM)为 GIBCO/BRL 公司产品, β -甘油磷酸钠、地塞米松、L-抗坏血酸为 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 可控多孔支架制备:应用 CAD 软件 Unigraphics 设计骨组织工程支架及其负型结构,通过立体光固化快速成形机制制造相应的支架负型树脂原型。将 CPC 材料填充到支架负型中,经过热分解去除树脂材料,获得可控多孔支架。

1.2.2 兔成骨细胞的获取及培养:无菌条件下取 2 只出生 3~5d 的新西兰大耳白兔(第四军医大学实验动物中心)颅盖骨,去除骨膜及结缔组织,PBS 液冲洗 3 次,剪碎至体积约为 1 mm^3 大小的骨块,0.25%胰蛋白酶 37°C 消化 15min,基础培养液(高糖 DMEM 含 10%新生牛血清,青霉素 100u/mL,链霉素 100u/mL)冲洗 2 遍,贴附于 100mL 玻璃培养瓶底壁,倒置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中 4h 后小心翻转并添加基础培养液,以后隔 2d 换液,倒置显微镜(Nikon)

观察细胞生长情况,细胞生长 7~10 d 后长满瓶底,用 0.25% 胰蛋白酶、0.2g/L 的乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)消化细胞间连接,加入 DMEA 液稀释至细胞密度为 10^6 个/mL 时,接种到新的培养瓶中进行传代培养,传代后细胞换用条件培养液(基础培养液 + 10mL/L β -甘油磷酸钠 + 10^{-8} mL/L 地塞米松 + 50 μg /L 的 L-抗坏血酸)。

1.2.3 细胞接种:把制备好的支架浸入 DMEM 培养液,放入 37°C 培养箱 4 h 后取出,置入 6 孔培养板,每孔一个。将第 10 代成骨细胞制成 2×10^6 个/mL 细胞悬液,用滴管将细胞悬液滴在支架表面,然后放回到培养箱中 2 h 后取出,并向 6 孔培养板的每个孔加 10 mL 培养液,在 37°C 、5% CO_2 培养箱中放置 24 h。然后分组进行体外静态培养和灌注式三维动态培养。

1.2.4 培养系统:选择两种不同的培养方式:静态培养和灌注式三维动态培养。静态培养条件下的支架放置在 6 孔培养板中,每孔一个,隔天换液。灌注式生物反应器系统为自行研制,其结构示意图如图 1 所示。该生物反应器容器是由有机玻璃材料制成。存储罐内的培养液在蠕动泵作用下,从反应器的一端进入,流过支架内部微管道,从另一端流出,返回到培养液存储罐,形成循环流动,灌注速率设定为 2 mL/min。存储罐的容积为 500 mL,每隔 3 d 换一次液。支架镶嵌在硅橡胶密封圈内,培养液只能从支架内部微管道中流过,从而实现氧气和营养物质大量输送的同时,使黏附在微管道内的细胞受到一定流体剪应力刺激,达到调节细胞功能发挥的作用,因此,改善了细胞生存的微环境,使其保持良好的活性。反应器系统使用前经环氧乙烷熏蒸消毒。反应器系统的装配在超净工作台内完成,所用泵管是可透气的,装配完毕后,将系统放置到 37°C 、

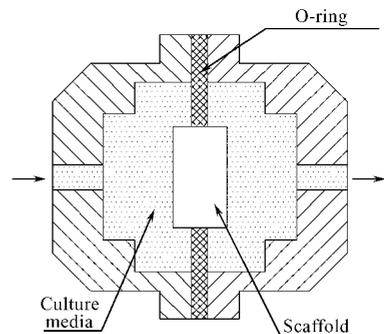


图 1 灌注式生物反应器示意图

Fig. 1 Sketch of flow perfusion bioreactor

100%湿度、5% CO₂ 培养箱。

1.2.5 扫描电镜观察 培养 7 d 后,分别取出两种不同培养条件下的支架,将其剖开,2%(V/V)戊二醛固定 4℃固定 2 h,用 PBS 清洗 3 次,1% 锇酸(V/V)固定 2 h,4℃条件下系列丙酮中脱水,乙酸异戊酯置换 1 h,经六甲基二硅胺烷干燥样品,用 JFC21100 型离子溅射仪喷金处理,扫描电镜(HITACHI S-3000N)观察支架表面和微管道内部所黏附的细胞。

2 结果

2.1 可控多孔支架制备

支架外形为圆柱体,直径 14.5mm,高 11.2mm,其内部微管道的尺寸分别设计为 $\phi 500 \mu\text{m}$ 和 $\phi 300 \mu\text{m}$



图 2 多孔支架设计制造

Fig.2 Design and fabrication of porous scaffold

(a) negative CAD model ;(b) resin mold ;(c) 3D scaffold with controlled internal pore architectures.

2.2 扫描电镜观察

分别在培养 3 d、7 d 和 14 d 后取出静态培养条件和灌注式三维动态培养条件下的支架,扫描电镜观察支架表面以及所构造微管道内部细胞贴附和分布情况。静态培养条件下,培养 3 d 后,成骨细胞贴附于 CPC 支架表面,并开始增殖分化,细胞多呈梭型,大小约为 $10 \sim 30 \mu\text{m}$,分布均匀,胞间有多个突起相互连接,细胞表面有少量基质分泌,培养 7 d 后

μm 在支架内部均匀规则分布, $x-y$ 平面内结构为轮辐型,微管道由支架中心向外延伸,贯穿至外表面;这样的结构在支架内沿 z 方向均匀分布着 5 层,每层相距 1.5mm,而且沿 z 方向有直径为 $500 \mu\text{m}$ 的微管道从顶至底部贯穿着支架,并将每层的轮辐型结构连通。相应的负型 CAD 模型如图 2a 所示,以 STL 数据格式存储,经过分层切片处理后输入到快速成形设备,制造出的负型树脂原型,如图 2b 所示。将 CPC 粉末与固化液(Na_2HPO_4 , 浓度 4%)充分混合,调制成浆体后填充到备用的支架负型树脂原型中。待其充分固化后放入到电阻炉进行烧结,去除掉树脂材料,得到与设计相符合的生物活性三维多孔支架,如图 2c 所示。测得支架孔隙率为 35.6%。

细胞排列紧密,呈梭型,已基本汇合,呈现重叠生长,细胞分泌较多基质,少量细胞向所构造微管道内爬行生长的同时,部分细胞跨越微管道口试图覆盖微管道,如图 3a 所示,培养 14 d 后细胞生长密集,多呈复层生长,如图 3b 所示,部分微管孔口被细胞基本覆盖,向微管道内部爬行生长的细胞数量明显增多,如图 3c 所示,但是微管道深处未发现细胞。

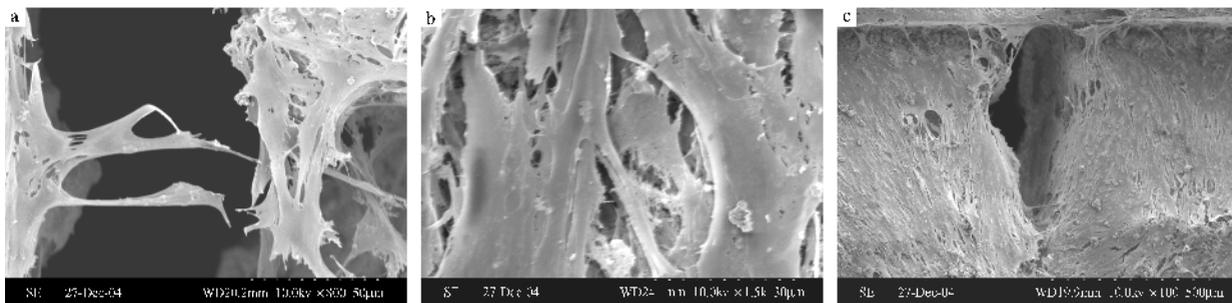


图 3 静态培养条件下细胞在多孔支架上的生长状况

Fig.3 Growth and differentiation of cells attached on porous scaffolds under static culture

(a) cells adhered to the entrance of microchannels($\times 800$);(b) multilayers of cells on scaffold surface cultured for 14d($\times 1500$);

(c) lots of cells ingrowth into microchannels($\times 100$).

灌注培养 7d 后,黏附在支架表面的成骨细胞排列紧密,呈梭型,已基本汇合,汇合后呈重叠生长,细胞分泌较多基质,如图 4a 所示,而且微管道口附近的细胞已经开始向微管道内部爬行生长,黏附在支架微管道内部的成骨细胞也已基本汇合,且生长旺盛,保持着良好的增殖功能,培养 14d 后,黏附在支架表面的细胞生长密集,多呈复层生长,分泌大量基

质,并且已将支架表面的微管道基本覆盖,微管道口附近的细胞大量汇合后,继续向微管道深处爬行生长,如图 4b、c 所示,并且部分细胞已穿越微管道,到达另一侧面。

剖开支架,观察支架中心部位微管道中的细胞,发现黏附在支架微管道内部的细胞排列紧密,呈重叠生长,并有大量基质分泌,如图 5a、b 所示。

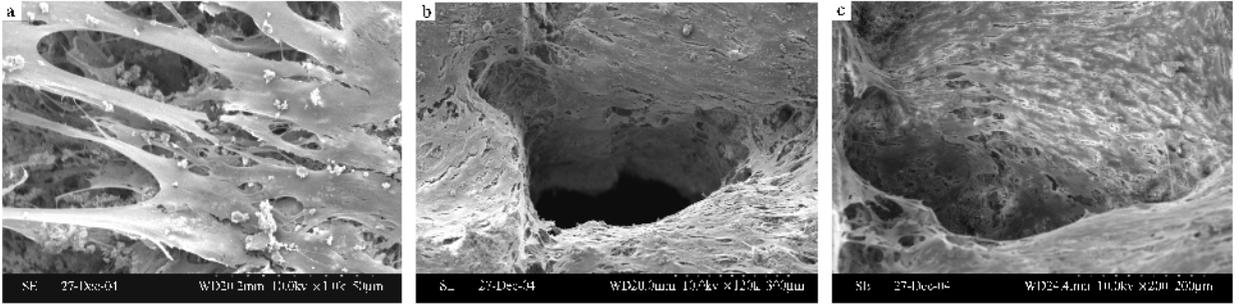


图 4 灌注式三维动态培养条件下,细胞在多孔支架上的生长、增殖和分化

Fig.4 Growth and differentiation of cells attached on porous scaffolds in perfusion bioreactor

a : cells adhered to the external surface ($\times 1000$); b : cells congregated the entrance of macropores ($\times 120$); c : cells continued to ingrowth into the interior of scaffolds ($\times 200$).

3 讨论

以 CAD 和快速成形技术为基础,完成支架三维空间结构的预先设计,实现制造过程的精确控制,得到与设计结构相符合的骨组织工程支架。构建了灌

注式生物反应器系统,降低大尺寸支架体外培养时氧气和营养物质供给不足的缺陷,改善细胞生存的微环境,使细胞受到一定的机械应力刺激,调节细胞功能的发挥。

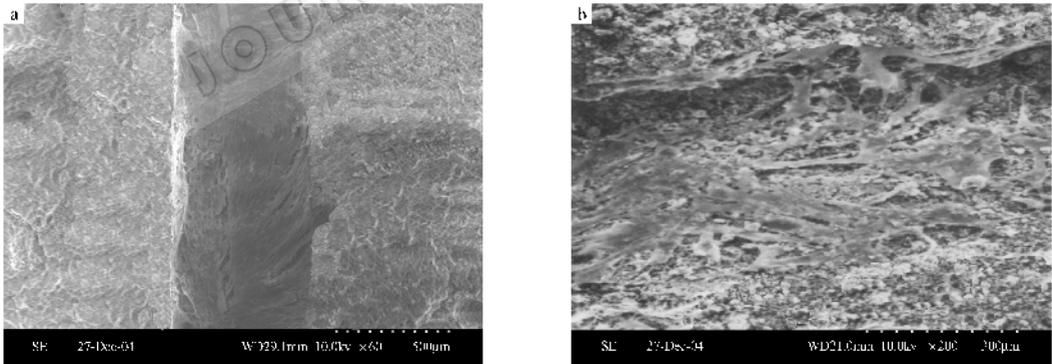


图 5 灌注培养条件下,支架中心部位微管道内黏附的细胞

Fig.5 Cells adhered to internal pores of scaffolds in perfusion bioreactor

(a) cells adhered to internal microchannels in z direction ($\times 60$); (b) cells adhered to internal microchannels in radial direction ($\times 200$).

理论上讲,支架的孔隙率越高越好,但是,孔隙率与支架强度是一对矛盾体,支架孔隙率升高,其强度必然降低,本文综合考虑这一因素,将支架的孔隙率设定为 30% 左右,使其机械强度可以达到 7MPa。因为支架内部孔的尺寸、结构和连通性等特征对细胞有着重要的影响,众多研究结果表明,孔的尺寸一般为 200 ~ 600 μm 对细胞的生长比较有利^[2-4,7-8]。因此,本文将支架微管道尺寸设计为 300 ~ 500 μm 。

对于支架内部微孔结构的预先设计与制造过程的控制,快速成形技术可以实现。Zein^[9]等利用 CAD 和 FDM 方法设计制造具有相互连通微管道的 PCL 支架,微管道尺寸为 160 ~ 700 μm ,支架孔隙率为 48% ~ 77%。由于该方法要求材料具有良好的热塑性,因此,比较适合聚合物支架的构造。还可以利用快速成形技术来间接制造具有复杂微管道结构的支架,即先利用快速成形技术制造支架负型,即模具,

并在模具中填充生物材料,然后去除模具,得到具有预先设计结构的支架。这种方法无论对于有机材料(如胶原)还是无机材料(如羟基磷灰石)都适合^[10]。最大的不足就是模具自身的误差会复制到最终的支架上。

在体外培养尺寸较大的支架时,将培养液灌注到三维多孔支架内部,不但能够增强细胞的活性和功能^[11],而且还能够促进细胞的生长、分化以及钙化基质的沉积^[12-16]。但是,对于不同空间结构的三维多孔支架,必然需要不同的灌注速率,什么样的速率是最优的、最有利于细胞生长的,有必要使用专业的流体力学分析软件(如 FLUENT)来对不同结构的支架进行预先分析和模拟。得到一些比较有价值的数据,如:氧气和营养物质的输送情况,支架微管道内的流场分布,细胞所受剪应力的大小等。

因此,在设计制造骨组织工程支架时,不但要考虑支架的生物相容性、可降解特性和机械特性,而且还要重视支架内部微管道的结构特征,以便在各种三维动态培养条件下促进其活化和新组织的形成。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Chen CS, Mrksich M, Huang S *et al.* Geometric control of cell life and death. *Science*, 1997, **12**(267): 1425 - 1428
- [2] Gauthier O, Bouler JM, Aguado E *et al.* Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials*, 1998, **19**: 133 - 139
- [3] Chang BS, Lee CK, Hong KS *et al.* Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials*, 2000, **21**: 1291 - 1298
- [4] Leong KF, Cheah CM, Chua CK. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*, 2003, **24**: 2363 - 2378
- [5] Huttmacher DW, Sittinger M, Risbud MV. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *TRENDS in Biotechnology*, 2004, **22**(7): 354 - 362
- [6] Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *TRENDS in Biotechnology*, 2004, **22**(2): 80 - 86
- [7] Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S. Intermediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res*, 1996, **32**(3): 481 - 492
- [8] Gauthier O, Bouler JM, Aguado E *et al.* Macropore biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials*, 1998; **19**(1 - 3): 133 - 139
- [9] Zein I, Huttmacher DW, Tan KC *et al.* Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 2002, **23**: 1169 - 1185
- [10] Wilson CE, de Bruijn JD, van Blitterswijk CA *et al.* Design and fabrication of standardized hydroxyapatite scaffolds with a defined macro-architecture by rapid prototyping for bone-tissue-engineering research. *J Biomed Mater Res*, 2004, **68A**: 123 - 132
- [11] Glowacki J, Mizuno S, Greenberger JS. Perfusion enhances functions of bone marrow stromal cells in three-dimensional culture. *Cell Transplantation*, 1998, **7**(3): 319 - 326
- [12] Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD *et al.* Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials*, 2001, **22**: 1279 - 1288
- [13] Gomes ME, Sikavitsas VI, Behravesh E *et al.* Effect of flow perfusion on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured on starch-based three-dimensional scaffolds. *J Biomed Mater Res*, 2003, **67A**: 87 - 95
- [14] Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den Dolder J *et al.* Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, **99**(20): 12600 - 12605
- [15] Sikavitsas VI, Bancroft GN, Holtorf HL *et al.* Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, **100**(25): 14683 - 14688
- [16] van den Dolder J, Bancroft GN, Sikavitsas VI *et al.* Flow perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in titanium fiber mesh. *J Biomed Mater Res*, 2003, **64A**: 235 - 241