

[文章编号] 1674-8603(2012)01-0005-04

PLGA/胶原双层引导骨再生膜对成骨样细胞增殖的体外研究

陈刚,夏阳,章非敏*

(南京医科大学口腔医学研究所·附属口腔医院修复科,江苏南京 210029)

[摘要] 目的:制备一种新型结构的聚乳酸-聚乙醇酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)/胶原复合引导骨组织再生膜,对其进行表征,并探索其对成骨样细胞体外增殖的影响。方法:使用 PLGA 及 I 型胶原制备一种双层结构的引导骨组织再生膜,通过傅里叶变换红外光谱仪、场发射扫描电镜、接触角仪对其表面基团、形貌及亲水性进行测试。将 MC3T3-E1 成骨细胞系接种到复合膜上,通过流式细胞术、甲基噻唑基四唑(MTT)法检测其细胞增殖,并与对照组进行比较。结果:红外光谱显示胶原被成功结合到 PLGA 表面,并且在扫描电镜下呈现出特有的纤维网状特征性微结构,同时其表面亲水性大大改善。MTT 及细胞周期检测也表明胶原改性后的复合膜上生长的细胞活力及增殖指数明显高于纯 PLGA 组。结论:本方法制备的 PLGA/胶原复合膜很好地组合成了一个功能整体,结合了高分子合成材料和天然材料的优势。

[关键词] 引导骨组织再生;复合膜;聚乳酸-聚乙醇酸共聚物;胶原;细胞增殖

[中图分类号] R318 **[文献标识码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1674-8603.2012.01.002

In vitro study of the effect of two-layered PLGA/collagen composite membrane for guided bone regeneration on proliferation of osteoblastic cells

CHEN Gang, XIA Yang, ZHANG Fei-min. (Institute of Stomatology, Department of Prosthodontics, School of Stomatology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Corresponding author: ZHANG Fei-min, Email: fmzhang@njmu.edu.cn, Tel: 0086-25-85031831

[Abstract] **Objective:** To prepare a novel poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)/collagen composite membrane for guided bone regeneration, characterize the membrane, and evaluate the effect on proliferation of osteoblastic cells. **Methods:** PLGA and type I collagen were combined together to prepare a two-layered membrane. The functional groups, surface topography and contact angle of the composite membranes were characterized by attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectrometer (ATR-FTIR), field emission scanning electron microscopy (FESEM) and contact angle meter. Osteoblastic cell line MC3T3-E1 was chosen to seed on the membranes. MTT and flow cytometry (FCM) were used to value the cell proliferation. **Results:** The spectrum of ATR-FTIR showed that collagen layer was successfully grafted onto the PLGA surface. The characteristic microstructure of interlaced fibers of collagen was observed by FESEM. The contact angle of composite membrane was significantly lower than pure PLGA. The results of MTT and FCM demonstrate the cell viability and proliferation index of cells cultured on PLGA/collagen membrane were significantly higher than PLGA. **Conclusions:** The PLGA/collagen composite membrane prepared in this study combined synthetic and natural polymers into a versatile entirety and adopted the advantages of the both.

[Key words] Guided bone regeneration; Composite membrane; Poly(lactic-co-glycolic acid); Collagen; Cell proliferation

膜引导骨组织再生技术自 1982 年形成雏形,当时 Nymand 等^[1]用一种半透性滤膜治疗牙周病,即引导组织再生,后扩展应用于骨缺损的治疗。最初的设计理念是在骨缺损区放置一物理屏障,以阻挡生长速度较快的软组织先长入骨缺损区,影响骨修复效果,从而允许成骨性细胞优先迁移、定殖、生长,达到骨再生、修复的目的。经过近 30 年的发展,引导组织再生膜材料经历了从不可降解到可降解,

从最初的以屏障作用为主,到现在的越来越重视生物相容性甚至组织再生引导性,临床对于膜引导组织再生材料的要求也在不断提高。引导组织再生膜材料虽然在不断进步发展,但是目前仍然没有一种材料能很好的满足所有临床要求。

不可降解材料已基本淘汰,可降解材料种类较多,一般分为人工合成高分子材料和天然高分子材料,比如应用较多的聚乳酸(poly(lactic acid), PLA)、聚乙醇酸(polyglycolic acid, PGA)、聚乳酸-聚乙醇酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)、胶原、壳聚糖等^[2-3]。不同来源的可降解材料都存在其固有的优缺点。正因为尚不存在一种完美性能的材

基金项目:江苏高校优势学科建设工程资助项目;苏州市国际科技合作项目(SH201114)

* 通信作者:章非敏 Tel: (025) 85031831

Email: fmzhang@njmu.edu.cn

料,引导骨组织再生膜材料的研究和改性一直是研究的热点。本实验中制备的 PLGA/胶原复合膜正是基于这样的思路,综合了人工合成高分子材料高强度和较佳的降解性能及胶原令人满意的生物相容性。双层结构的膜中 PLGA 层行使屏障功能,并维持骨缺损的愈合空间;胶原层面向组织缺损区,诱导骨组织再生,并经紫外线照射,在不降低其生物活性的前提下,达到一定的交联度,避免了加入目前广泛运用的化学交联剂带来的潜在的细胞毒性^[4]。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

PLGA(济南岱罡生物工程有限公司),改良型 α -MEM 培养基、胎牛血清(Hyclone,美国),磷酸盐缓冲液(PBS)、0.25%胰酶(Gbico,美国),甲基噻唑基四唑(MTT,Sigma,美国),二甲基亚砜(DMSO,广州化学试剂厂)。Nicolet 6700 FT-IR 衰减全反射傅里叶红外光谱仪(Thermo Scientific,美国),LEO 1530VP 场发射扫描电镜(Zeiss,德国),SL200B 接触角仪(上海梭伦科技有限公司),ELX800 酶标仪(BioTek,美国),FACSCalibur 流式细胞仪(BD,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 提取鼠尾 I 型胶原 全程无菌操作,步骤如下:取新鲜 SD 大鼠鼠尾,洗净于 75%乙醇中浸泡 10 min,去皮抽出尾腱,剪碎生理盐水清洗 3 遍,溶于 0.5 mol/L 的醋酸溶液中,4℃放置 48 h,不时振荡;4℃离心,取上清,NaCl 细粉盐析,然后再次离心弃上清,得胶原沉淀重溶于 0.5 mol/L 醋酸中,并于 0.5 mol/L 醋酸溶液中透析 48 h,每 12 h 换液 1 次;以上盐析与透析步骤重复 3 次,最终得澄清胶原溶液,冻干法测得浓度为 4.5 mg/ml。

1.2.2 双层膜的制备 称取一定量 PLGA 溶于二氯甲烷,浓度为 1g/10ml,振荡溶解,4℃静置片刻,使其中因振荡产生的气泡消失。吸取适量 PLGA 溶液滴于直径 3.5 cm 玻璃皿中,轻轻摇晃使其均匀铺满皿底,随二氯甲烷挥发,PLGA 膜便形成于皿底。皿与膜一起高温高压消毒,然后将胶原醋酸溶液滴加于皿中,轻晃使之均匀铺满,在无菌超净台中使其干燥,于 PLGA 膜上成膜,紫外照射 2 h,无菌 PBS 漂洗至中性,无菌条件下干燥并保存。

1.2.3 功能基团测试 使用衰减全反射傅里叶红外光谱仪测试制备好的纯 PLGA 膜及 PLGA/胶原复合膜表面功能基团。

1.2.4 表面形貌观察 将以上两种膜彻底干燥,喷

金,然后在场发射扫描电子显微镜下观察其表面形貌。为同时观察 PLGA/胶原复合膜表面及内部的微结构,胶原层的表面有部分在电镜观察前已被探针及镊子剥离。

1.2.5 接触角测试 PLGA 经胶原改性前后利用接触角仪检测其亲水性,并进行比较。同一张膜上随机选取 4 个点以蒸馏水静滴法进行测试,并对结果进行统计分析。

1.2.6 细胞增殖性能检测 选用小鼠颅骨成骨细胞系 MC3T3-E1(上海中科院细胞研究所),接种于空白玻璃皿、纯 PLGA 及复合膜上。接种前各种膜预先在完全培养液中预培养 2 h。细胞培养于 37℃、5% CO₂、100% 湿度条件下进行。所有检测均在同步化 24 h 再培养 3 d 后进行。(1) MTT 检测:细胞培养 3 d 后,每皿加 MTT 150 μ l,培养箱内孵育 4 h,细针吸尽皿中液体,并加入 1125 μ l DMSO,摇床上轻摇 15 min,从各皿中吸取 200 μ l 液体加入 96 孔板中,于酶标仪上测试光密度(optical density, OD)值。(2) 细胞周期检测:取对数生长期细胞(3 d),胰酶消化,预冷无菌 PBS 洗涤 2 遍,75%乙醇重悬,-20℃保存过夜,流式细胞仪检测细胞周期。MTT 检测以 OD 值反映细胞活力,流式细胞仪检测以处于 S 期和 G₂/M 期的细胞百分数表示增殖指数。

1.3 统计学分析

所有定量数据均采用统计分析软件 SPSS13.0 进行独立样本 *t* 检验,结果以均数 \pm 标准差的形式表示。

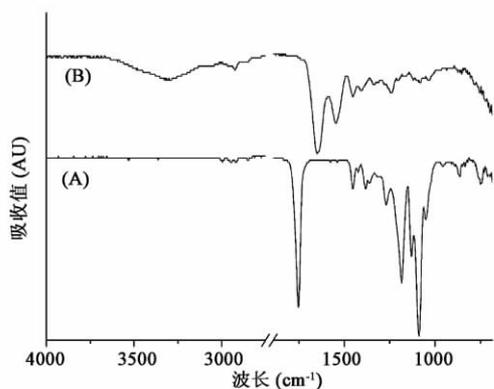
2 结果

2.1 功能基团

衰减全反射傅里叶红外光谱仪检测结果如图 1 所示。纯 PLGA 膜红外光谱(A)中,1756 cm⁻¹处为 C=O 的伸缩振动峰,1465 ~ 1400 cm⁻¹处为 O—H 的弯曲振动峰,1276 cm⁻¹处为 C—O 的伸缩振动峰,1171 ~ 1038 cm⁻¹为醚键的伸缩振动。胶原改性后复合膜红外光谱(B)中两个主要峰由 amide I (C=O 在 1630 cm⁻¹的伸缩振动)和 amide II (N—H 在 1550 cm⁻¹的弯曲振动)引起,其特征与其他学者^[5]得出的 I 型胶原的典型红外图谱一致。

2.2 表面形貌

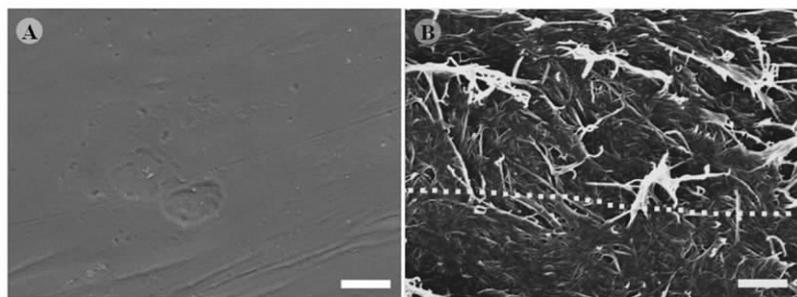
纯 PLGA 膜及胶原改性后复合膜扫描电镜下表面形貌如图 2 所示。纯 PLGA 膜表面呈现较为平整和光滑的特点,在本实验制备条件下并不显示明显的微观形貌(图 2A)。经过胶原改性后,平整的 PLGA



A: PLGA 膜; B: PLGA/胶原膜

图 1 PLGA 膜与 PLGA/胶原膜的衰减全反射红外图谱
Fig. 1 The ATR-FTIR spectra of PLGA and PLGA/collagen membranes

表面被具有胶原特征性的纳米级纤维网结构覆盖;胶原纤维交织堆叠形成大小不一的纳米级互相连通的纳米级孔洞;由探针及镊子剥离的部分暴露出胶



A: PLGA 膜; B: PLGA/胶原膜(虚线以上为剥离区,以下为胶原膜表面)

图 2 PLGA 膜与 PLGA/胶原膜扫描电镜图(SEM ×4 800)
Fig. 2 The SEM images of PLGA and PLGA/collagen membranes

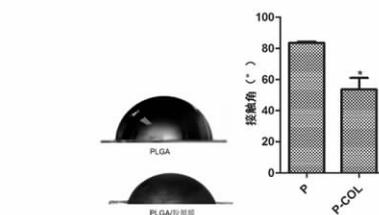
原表层下的结构,其呈现出与表面基本一致的结构(图 2B)。胶原自聚合成的纤维状结构与其他文献报道的一致^[6],但由于许多学者为研究胶原纤维自组装过程所用胶原量较少或者多采用冻干法处理,最终电镜观察下的胶原呈现单层或稀疏的纤维结构,而本实验制备所得的胶原纤维较为致密,电镜下可见纤维多融合成束,片状,多层堆叠。

2.3 接触角

经胶原改性后膜表面接触角明显下降,由纯 PLGA 的(83.54 ± 0.85)°降至改性后的(53.75 ± 7.42)°,差异具有统计学意义(P < 0.05,图 3),亲水性得到改善。

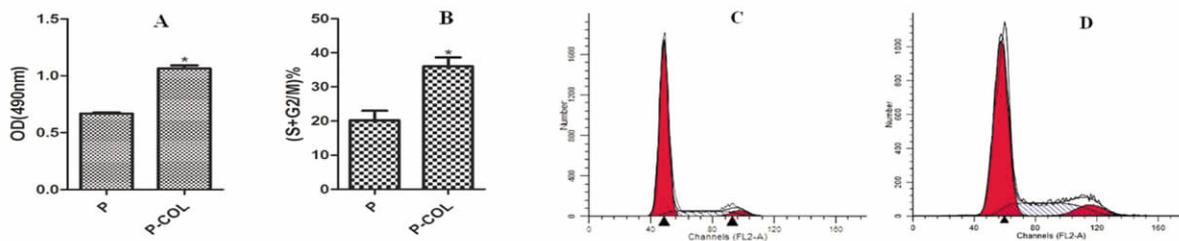
2.4 细胞增殖

MTT 与流式细胞仪检测的结果一致,即经胶原改性后复合膜上生长的细胞的 OD 值高于纯 PLGA 组,增殖指数由(20.17 ± 2.86)% 升至(36.01 ± 2.66)% ,差异具有统计学意义(P < 0.05,图 4)。



P: PLGA 膜; P-COL: PLGA/胶原膜; * : 与 PLGA 膜比较 P < 0.05

图 3 亲水性测试图片及统计分析结果
Fig. 3 The images and statistical analysis of contact angle test



A: MTT 结果; B: 流式细胞仪检测结果; C、D: 分别为 PLGA 膜组及 PLGA/胶原膜组流式分析图; P: PLGA 膜; P-COL: PLGA/胶原膜; * : 与 PLGA 膜比较 P < 0.05

图 4 PLGA 膜与 PLGA/胶原膜对细胞增殖性能的影响

Fig. 4 The effect of PLGA and PLGA/collagen membranes on cell proliferation

3 讨论

在膜引导骨再生领域,人工高分子的材料的特点是强度较高,体内降解时间可控,但生物活性一般

不够理想。而天然高分子材料,如胶原在体内本就是胞外基质的主要组成部分,是骨组织的主要有机成分,占全身蛋白的 30% 左右,被广泛用于促进细胞体外培养时的贴壁,有利于细胞的增殖与粘附。

而以胶原为原料制备的胶原膜是膜引导骨组织再生术中研究和应用最多的^[7-9]。天然材料虽然具有很好的生物活性,但也存在一些如力学性能较差、降解过快等有待克服的缺点。比如,胶原材料湿强度差,若未经交联,只需极短时间就可降解^[10]。目前,研究的重点主要集中在对单一材料的改性和将不同优势性能的材料制备成复合膜材料两个方面。以改性为主要手段的研究一般都是以某种材料为主,加入改性材料或改变其结构,目的是弥补主要材料某方面的不足或引入某个新的性能。然而改性往往需要复杂的技术、设备,或者引入其他材料^[11]。比如,胶原的化学交联改性即是靠引入外源性的化学交联剂达到目的,但是这些化学交联剂往往具有细胞毒性,即便有些在体外试验中取得了较好的结果,也还是缺乏更多体内试验的佐证。在这种情况下,将一些材料的优势性能有机地结合以弥补单一材料的缺陷,得到单一材料即便经过改性也无法令人满意的综合性能,而且这个过程不需要过于复杂的额外的设备和技术。

本实验利用 I 型胶原体外自组装的特点,在 PLGA 膜表面直接覆盖胶原溶液并聚合成膜,以此对 PLGA 膜进行生物学性能的改性,同时克服了胶原蛋白力学性能较差的缺陷。在不同来源的高分子聚合物组合的过程中,并没有引入额外的化学试剂,较好地保持了各组分原有的优良性质。因本实验多采用全反射红外表征,检测深度为材料表面以下约 1 μm 左右,故胶原下方的 PLGA 的化学键震动无法检测到,所以 PLGA/胶原复合膜红外光谱中,PLGA 的特征峰经过胶原改性后基本消失,证明 PLGA 膜表面已成功覆盖一层胶原膜且具有一定厚度。而且,改性后的红外光谱显示的 amide I 和 amide II 引起的特征峰位置与其他文献中胶原蛋白红外光谱一致^[5]。扫描电镜图从表面形貌角度进一步证实了 PLGA 膜的表面已覆盖一层胶原。平整而没有明显微观形貌的 PLGA 表面经胶原覆盖后呈现出纳米级的互相交织的纤维结构,大小不等的纳米级孔洞分布其间。而且与大多数制备胶原膜使用的冷冻干燥法不同,本实验条件制备的胶原堆叠极为致密,电镜下可见较多蛋白纤维融合成较粗的束,甚至融合成片,即胶原的交联度得到增加,这对胶原的抗降解稳定性及强度有利。由于表面成分及微形貌的改变,材料的亲水性发生了明显变化。PLGA 虽然具有良好的生物相容性,但其固有的疏水性可能会影响细胞的粘附。经过胶原改性后其接触角显著下降,这

跟胶原蛋白中富含的亲水性官能基团及表面微形貌的改变有密切关系。MTT 及流式细胞术验证了胶原改性对成骨细胞的增殖促进作用,在相同的培养条件和时间下,复合膜的细胞活力和增殖指数高于纯 PLGA 和空白组。

本实验将天然和合成高分子聚合物有机组合,保留各自优势性能,克服各自固有缺陷,制备了一种复合的引导骨组织再生膜。虽然各组间的结合及体内效果还有待进一步的研究,但其复合材料的设计思路依然有继续探索的价值。

参 考 文 献

- [1] Nyman S, Lindhe J, Karring T, et al. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease [J]. *J Clin Periodontol*, 1982, 9(4): 290-296.
- [2] Wang L, Stegemann JP. Glyoxal crosslinking of cell-seeded chitosan/collagen hydrogels for bone regeneration [J]. *Acta Biomater* 2011, 7(6): 2410-2417.
- [3] Liao S, Wang W, Uo M, et al. A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration [J]. *Biomaterials* 2005, 26(36): 7564-7571.
- [4] Jorge-Herrero E, Fernández P, Turnay J, et al. Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen [J]. *Biomaterials*, 1999, 20(6): 539-545.
- [5] Madhavan K, Belchenko D, Motta A, et al. Evaluation of composition and crosslinking effects on collagen-based composite constructs [J]. *Acta Biomater* 2010, 6(4): 1413-1422.
- [6] Wang X, Sang L, Luo D, et al. From collagen-chitosan blends to three-dimensional scaffolds: the influences of chitosan on collagen nanofibrillar structure and mechanical property [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011, 82(1): 233-240.
- [7] Behring J, Junker R, Walboomers XF, et al. Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review [J]. *Odontology* 2008, 96(1): 1-11.
- [8] Song JH, Kim HE, Kim HW. Collagen-apatite nanocomposite membranes for guided bone regeneration [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007, 83(1): 248-257.
- [9] 刘泉, 覃燕玲, 熊颖铭, 等. 纳米羟基磷灰石/胶原膜植入治疗根分叉病变疗效分析 [J]. *口腔医学* 2008, 28(2): 109-110.
- [10] Marinucci L, Lilli C, Guerra M, et al. Biocompatibility of collagen membranes crosslinked with glutaraldehyde or diphenylphosphoryl azide: an in vitro study [J]. *J Biomed Mater Res A* 2003, 67(2): 504-509.
- [11] Goddard JM, Hotchkiss JH. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds [J]. *Prog Polym Sci*, 2007, 32(7): 698-725.

(收稿日期: 2012-01-19)

(本文编辑: 曹 灵)