

·论著·

新型三维复合骨修复支架的制备工艺及其生物学性能

杨城¹ 李祖儿¹ 刘青² 赵渊³ 徐崇燕³ 苏军² 张文云²¹中国人民解放军联勤保障部队第九二二医院,衡阳 421000; ²中国人民解放军联勤保障部队第九二〇医院,昆明 650000; ³昆明医科大学,昆明 650000

通信作者:张文云,Email:drwenyun@qq.com

【摘要】 目的 探讨3D打印技术制备聚乳酸-羟基乙酸共聚物珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌(PLGA/CHA/n-ZnO)新型骨修复支架的工艺参数,并研究其对牙周膜干细胞(PDLSC)的生物相容性。**方法** 将PLGA与CHA/n-ZnO粉末按4:1质量比混合,通过生物挤出3D打印技术制备PLGA/CHA/n-ZnO复合骨修复支架,通过X射线衍射仪、扫描电镜(SEM)、电子万能试验机、压汞仪和接触角测量仪对支架样件的相关理化性能进行检测分析,并通过体外细胞黏附实验观察PDLSC在支架表面黏附情况与生长状态。**结果** 成功制备出3种不同形态PLGA/CHA/n-ZnO三维复合骨修复支架。X射线衍射仪检测支架可见碳酸钙、羟基磷灰石与氧化锌吸收峰;SEM观察支架表面粗糙,可见不同尺寸孔径结构;电子万能试验机分析计算得出支架压缩强度为 (12.31 ± 4.80) MPa,弹性模量为 (31.18 ± 12.30) MPa;压汞仪测得支架孔径分布为5 nm ~ 350 μ m;静态接触角测量仪测试得出支架接触角为 $(75.73 \pm 5.54)^\circ$;体外实验可见PDLSC黏附于支架表面,生长状态良好。**结论** 本研究为PLGA/CHA/n-ZnO三维复合骨修复支架负载PDLSC新型组织工程骨的研制奠定了实验基础。

【关键词】 骨修复支架; 牙周韧带; 干细胞; 珊瑚羟基磷灰石

基金项目: 云南省科学技术厅昆明医科大学应用基础研究联合专项资金(202101AY070001-028)

引用著录格式: 杨城,李祖儿,刘青,等. 新型三维复合骨修复支架的制备工艺及其生物学性能[J/OL]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2024, 18(4): 219-229.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2024.04.002

Preparation process and biological properties of a new three-dimensional composite bone repair scaffold

Yang Cheng¹, Li Zuer¹, Liu Qing², Zhao Yuan³, Xu Chongyan³, Su Jun², Zhang Wenyun²¹The 922 Hospital of the PLA Joint Logistic Support Force, Hengyang 421000, China; ²The 920 Hospital of the PLA Joint Logistic Support Force, Kunming 650000, China; ³Kunming Medical University, Kunming 650000, China

Corresponding author: Zhang Wenyun, Email: drwenyun@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the process parameters of polylactate-hydroxyacetate copolymer coral hydroxyapatite nano zinc oxide [poly (lactic-co-glycolic acid)/coralline hydroxyapatite/nano zinc oxide, PLGA/CHA/n-ZnO] by 3D printing technology and evaluate its biocompatibility with periodontal ligament stem cells (PDLSCs). **Methods** PLGA and CHA/n-ZnO powder were mixed at 4:1 mass ratio. PLGA/CHA/n-ZnO composite bone repair scaffold was prepared by biological extrusion 3D printing technology. Its physicochemical properties were examined by using X-ray diffraction, scanning electron microscopy, electron universal test, mercury press and contact angle test. The adhesion and growth status of PDLSCs on the surface of the scaffold was evaluated *in vitro*. **Results** Three different forms of PLGA/CHA/n-ZnO 3D composite bone repair scaffolds were successfully prepared. The peaks of calcium carbonate, hydroxyapatite and zinc oxide were detected. The stent had a rough surface and a porous

structure with different pore sizes. Its compression strength and elastic modulus were (12.31 ± 4.80) MPa and (31.18 ± 12.30) MPa, respectively. The pore diameter was 5 nm-350 μm . The stent contact angle was (75.73 ± 5.54)°. PDLSCs showed great adhesion and growth onto the surface of the scaffold. **Conclusion** This study laid the experimental foundation for the development of PDLSCs loaded PLGA/CHA/n-ZnO as a new tissue engineering bone substitute.

【Key words】 Bone repair stent; Periodontal ligament; Stem cells; Coralline hydroxyapatite

Fund program: Joint special funds for applied basic research of Yunnan Provincial Department of Science and Technology and Kunming Medical University (202101AY070001-028)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2024.04.002

牙周病是一种主要由细菌感染导致的牙周支持组织破坏的免疫相关炎症性疾病,晚期牙周病会造成大量牙槽骨吸收,严重影响患者的口腔乃至全身系统的健康稳定。牙周炎的治疗繁琐且复杂,特别是对牙槽骨破坏吸收形成的骨质缺损进行重建再生,更是充满了困难和挑战^[1-2]。过去几十年,涌现了大量针对牙周炎各种治疗方法的相关研究,包括翻瓣清创、引导组织再生(guided tissue regeneration, GTR)、引导骨再生(guided bone regeneration, GBR)及各种生物制剂,但这些研究中存在的技术敏感性高、清创不彻底、感染持续存在及扩散等问题,使得治疗效果不确切,导致牙周炎迁延不愈,牙槽骨持续吸收,无法得到有效的重建再生^[3-5]。

种植修复因其具有良好的固位稳定作用、优异的咀嚼功能与美学效果,成为当前缺牙修复的首选方式^[6]。种植位点的骨质、骨量对口腔种植手术的成功起到决定性作用,影响着种植体的骨结合、周围骨弓轮廓的维持、修复体的功能美学效果及种植体的远期稳定性^[7-8]。由于炎症、外伤和肿瘤等不良因素均可造成种植位点不同程度骨缺损,无法将种植体植入理想的三维位置^[9]。牙槽嵴增量术是解决种植位点骨量不足的有效办法^[10-11]。据统计,在种植体植入前或者种植体植入过程中需额外进行骨增量手术的患者比例超过50%^[12]。骨修复材料是影响骨增量手术成功的关键因素。骨缺损修复重建依赖于血液、生物因子和细胞三者的协同作用,骨修复材料可以稳定血凝块,同时作为生物因子贮存释放的载体及细胞黏附增殖分化的支架^[13]。骨修复材料分为自体骨、同种异体骨、异种骨与人工骨,自体骨由于具有丰富的生长因子及成骨活性细胞,成骨效果理想,因此被视为骨修复材料的“金标准”,但由于存在开辟二次术区、取骨量有限和并发症多等问题导致其应用受限,同种异体骨及异种骨相比较人工骨存在免疫原性及传播疾病等缺陷^[14-15]。因

此,对人工骨修复材料的深入研究,是解决安全、有效和可持续的骨修复材料来源问题的关键。随着骨组织工程技术的发展,基于人工骨修复支架材料、种子细胞和生长因子整体构建的组织工程骨给牙周骨缺损的再生重建开辟了新的途径^[16-17]。

牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cell, PDLSC)具有显著的免疫调节作用,它可以通过前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)途径,导致PGE2诱导的T细胞表达活性减弱^[18],同时经程序性细胞死亡蛋白1(programmed death-1, PD-1)/PD-1配体介导抑制B细胞活化^[19],实现抑制机体免疫过激,控制牙槽骨的炎性吸收。新生血管对牙周骨缺损的再生起着十分重要的作用。体外炎性条件下,PDLSC可上调促进血管生成的细胞因子的表达,增加了血管的新生^[20]。大量研究同时证明,PDLSC在特定的体外培养条件下,具备较强的增殖分化成骨细胞的能力,并能在体内介导牙周组织的再生^[21-23]。PDLSC相较于其他来源的干细胞在牙周组织再生方面具有显著优势,是当前牙周骨组织工程领域极具应用价值的种子细胞^[24]。

牙周骨组织工程的支架材料对于干细胞的黏附、存储尤为重要。具有良好的生物相容性是支架材料的基本要求,以支持包括细胞定植、迁移、生长和分化等各种细胞过程和功能^[25]。珊瑚羟基磷灰石(coralline hydroxyapatite, CHA)是利用天然滨珊瑚通过“水热合成”转换而来,其主要成分为碳酸钙及羟基磷灰石,具有良好的生物相容性,其本身的多孔结构相比其他人工骨修复材料具有显著优势^[26]。感染是临床上骨再生手术失败的主要原因^[27-28],当前并无有效的抗菌型骨修复材料应用于临床。研究证明,纳米氧化锌(nano zinc oxide, n-ZnO)对口腔常见细菌具有良好的抗菌性能^[29]。本课题组前期通过溶胶凝胶法制备出珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌新型多孔抗菌骨修复材料^[30],但经过烧结后的

CHA/n-ZnO 材料质地较脆,无法满足骨修复材料的机械性能要求,同时由于其形态为颗粒粉末状,无法根据骨缺损部位的形态制备出与其相匹配的个性化骨材料,导致成骨空间维持能力不足,骨修复效果不佳。

3D 打印技术通过将材料逐层堆积构造物质实体的特殊制造工艺,可以对骨修复材料的内部结构及外部形态进行个性化定制,从而有效解决上述问题^[31-32]。聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]具有良好的生物相容性、生物降解性和表面亲水性,且其高温熔融后材料具备良好的流动性及黏稠度,这些特性使其拥有优异的可打印性能。因此,以 PLGA 材料为基础,与各种生物陶瓷材料或者天然/合成高分子材料构建的复合骨修复材料,基于 3D 打印技术制备三维骨修复支架在骨修复材料领域被广泛研究^[33-35]。

本研究将首次结合 PLGA 与 CHA/n-ZnO 两种材料,初步探索 3D 打印聚乳酸-羟基乙酸共聚物珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌(PLGA/CHA/n-ZnO)新型个性化复合骨修复支架的制备工艺,同时研究新型三维复合骨修复支架对 PDLSC 的生物相容性,旨在为后续研制具有良好的力学性能、理想孔径结构的新型组织工程骨材料奠定实验基础。

材料与方法

一、聚乳酸-羟基乙酸共聚物珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌三维复合骨修复支架的制备

称取 4 g PLGA 颗粒(杭州捷诺飞生物科技股份有限公司),添加 40 mL 二氯甲烷(天津市风船化学试剂科技有限公司)浸溶,室温下磁力搅拌器(杭州富华仪器公司)搅拌溶解,加入 1 g CHA/n-ZnO 粉末(昆明理工大学生物工程材料实验室自制),涡旋振荡器(常州越新仪器制造有限公司)分散 1 min,磁力搅拌至均匀,将该混合液倒入大量乙醇中沉淀,得

到的沉淀样品置于通风橱(广州赛福斯实验设备科技有限公司)中干燥过夜,随后置于鼓风干燥箱(上海市实验仪器总厂),在 40 ℃ 条件下直至完全干燥后剪碎备用。建立 3 种不同形态的支架模型(图 1)。

1. 矩形骨块模型:3D Builder 软件设计尺寸为 10 mm × 10 mm × 3 mm 的矩形骨块模型。

2. 牙根样模型:将患者拔除后的上颌第三磨牙于 30% 过氧化氢溶液中浸泡洁净 1 d 后,利用 3shape 口内扫描仪对其牙根部分进行扫描成像后建立牙根模型。

3. 利用牙槽窝模拟的骨缺损模型:将患者易位的右上第一前磨牙拔除后即刻拍摄锥形束 CT(cone-beam computed tomography, CBCT),CBCT 数据导入 GuideMia Master Series 5.0 软件,提取右上第一前磨牙牙槽窝三维重建模型,拟合右上第一前磨牙牙槽窝内部空间形态,对其内部空间形态成像建模,模拟不规则形态牙槽嵴骨缺损。将按比例配制好的 PLGA/CHA/n-ZnO 复合材料装载于生物 3D 打印机,模型数据导入 3D 打印机切片软件进行分层数据处理,安装 0.8 mm 直径喷嘴,设置各项打印参数:层高 0.45 mm、打印间距 1.45 mm、喷头温度 180 ℃、平台温度为室温、出丝速度 0.02 mm/s、打印速度 5.00 mm/s;采取线性填充方式,线间距 0.5 mm,初始角度 0°,旋转角度 90°,旋转 2 次,打印制备三维复合骨修复支架。

二、3D 打印聚乳酸-羟基乙酸共聚物珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌复合骨修复支架的表征

1. X 射线衍射仪分析:支架样件贴于样品台上,设置测试范围为 10° ~ 80°,扫速 2°/min,铜靶,管电压 40 kV,电流 40 mA。

2. 扫描电镜仪分析:选取牙槽窝模拟的骨缺损支架样品黏到导电胶上,使用溅射镀膜仪(Quorum SC7620,英国)喷金时间 120 s、电流 10 mA;使用扫描电子显微镜(ZEISS GeminiSEM 300,德国)拍摄样

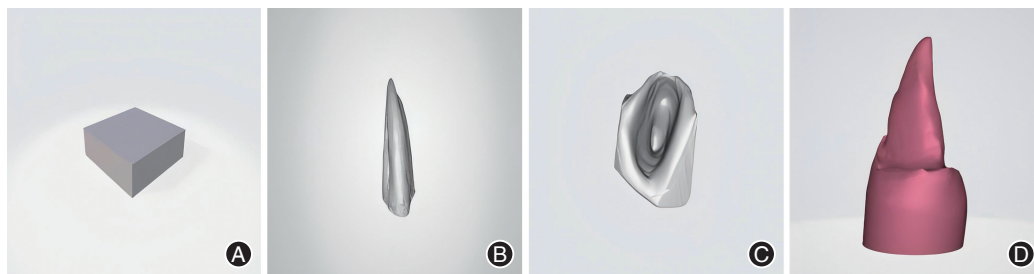


图1 计算机设计出的 3 种不同形态 3D 模型 A:矩形骨块 3D 模型;B:牙根样 3D 模型;C:牙拔除后牙槽窝的 3D 模型;D:通过模拟牙槽窝 3D 模型内部空间形态反向建立骨缺损模型。

品形貌,形貌拍摄时加速电压为3 kV。

3. 电子万能测试仪检测:设置加载速度0.5 mm/min,压缩量程为材料高度的50%。综合测试数据,计算支架样品的压缩强度和弹性模量。

4. 静态接触角测量仪测试:将支架置于接触角测试平台,自动滴定设备系统采取座滴法向样品测试面滴上蒸馏水,拍摄测试照片,用量角法量取接触角角度。

5. 压汞仪分析:测试环境温度为24.5℃,压力范围为3~227 500 kPa。测试数据经计算后得出支架材料的孔径分布。

三、牙周膜干细胞的分离及传代培养

收集临床无牙体、根尖周及牙周疾患的青少年需正畸拔除的前磨牙或垂直阻生第三磨牙(取自中国人民解放军联勤保障部队第九二〇医院口腔科),即刻放入装有预冷的双抗磷酸盐缓冲液(PBS)的离心管中,随即转移至超净工作台(苏州佳宝净化工程设备有限公司),将含有双抗的PBS缓冲溶液(Beyotime,上海碧云天生物技术有限公司)清洗牙齿表面直至无明显的血性液体后,用医用手术器械刮取牙根根中1/3表面牙周膜组织,收集牙周膜组织,放入装有含双抗PBS的EP管中反复冲洗2次,使用眼科剪将牙周膜组织剪碎成约2 mm×2 mm×2 mm的碎块,PBS清洗1遍后放入离心管,加入0.3% I型胶原酶(Sigma,德国),37℃水浴摇床(常州市国立试验设备研究所)消化60 min,弃上清,再加入0.25%胰蛋白酶(Gibco,美国)消化10 min,加入胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)终止反应,移液枪轻轻吹打至液体浑浊,400×g离心5 min,弃上清,保留细胞及组织沉淀。用DMEM/F12完全培养基(Biological Industrise,以色列)重悬组织碎块,接种于多聚赖氨酸(普诺赛,武汉普诺赛生命科技有限)预先包被的培养皿中,于37℃,5% CO₂恒温培养箱(Sanyo,日本)中静置培养,3 d后半量换液,以后每3 d换液1次,待细胞汇合度达80%时,0.25%胰蛋白酶消化,按照1:2的比例进行传代,每3 d更换1次完全培养基。

四、牙周膜干细胞鉴定分析

1. 免疫荧光染色:将PDLSC以1×10⁵个/孔接种于放有玻片的24孔板中常规培养行细胞爬片,待玻片上细胞汇合度达80%,从恒温培养箱中取出放置细胞爬片的24孔板,用移液枪吸去培养基,PBS浸洗,4%多聚甲醛溶液(国药集团化学试剂有限公司)

固定爬片15 min。0.5% TritonX-100(上海碧云天生物技术有限公司)室温通透20 min,5% BSA(北京索莱宝科技有限公司)室温封闭30 min。滴加稀释好的CD44(1:100, Proteintech, 美国)、Vimentin(1:100, 杭州华安检测技术有限公司)一抗,以PBS作为阴性对照,4℃孵育过夜。加入荧光二抗(武汉博士德生物工程有限公司)于37℃湿盒中孵育,DAPI(上海碧云天生物技术有限公司)复染核。用含抗荧光淬灭剂(Southern Biotech, 美国)的封片液封片,置于荧光显微镜(Zeiss, 德国)下观察采集图像。

2. 流式细胞仪分析:取生长良好的PDLSC经0.25%胰酶常规消化,含FBS的PBS洗涤,以500×g,离心6 min,收集细胞,PBS重悬细胞,进行细胞计数,调整细胞密度为5×10⁵个/EP管。向EP管内加入相应抗体试剂[CD29(Biolegend, 美国)、CD34、CD45、CD90、CD105(北京四正柏生物科技有限公司)、CD146(Proteintech, 美国)],以PBS作为阴性对照,室温避光孵育30 min。PBS洗涤,重悬细胞,上机检测。

3. 成骨分化能力检测:将PDLSC经0.25%胰蛋白酶消化后进行细胞计数,调整细胞密度后按1×10⁶个/孔接种于六孔板上,每孔加入2 mL完全培养基,放入CO₂恒温培养箱中培养,每3 d更换1次完全培养基。待细胞融合至70%~80%时,更换为成骨诱导培养基(武汉普诺赛生命科技有限),每孔加入2 mL成骨诱导培养基。每3 d换1次液,视细胞形态及矿化结节形成情况,诱导2~4周后终止,进行茜素红染色确定诱导效果。轻柔吸去六孔板内成骨诱导培养液,用PBS轻柔反复冲洗2遍后吸净,向孔板内加入适量4%中性甲醛溶液,对细胞固定30 min,加入适量茜素红染色液染色5 min,PBS反复清洗孔板3~5次,于倒置显微镜下观察矿化结节形成情况。

4. 成脂分化能力检测:将PDLSC以0.25%胰蛋白酶消化后进行细胞计数,调整细胞密度后按1×10⁶个/孔接种于六孔板上,放入CO₂恒温培养箱中培养,每3 d更换1次完全培养基,待细胞融合至100%时,更换为成脂诱导培养基(武汉普诺赛生命科技有限)。每3 d换1次液,视细胞形态及脂滴形成情况,诱导2~4周后终止,进行油红O染色确定诱导效果。轻柔吸去六孔板内成脂诱导培养液,用PBS轻柔反复冲洗2遍后吸净,向孔板内加入适量4%中性甲醛溶液,对细胞固定30 min,加入适量油红O染色液染色5 min,PBS反复清洗孔板3~5次,于倒置显微镜(Olympus, 日本)下观察脂滴形成情况。

五、聚乳酸-羟基乙酸共聚物珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌三维复合骨修复支架与牙周膜干细胞黏附实验

将辐照灭菌后的PLGA/CHA/n-ZnO支架置于12孔板中,经DMEM/F12完全培养基润湿过夜。取生长状态良好的第三代(P3)PDLSC常规消化后进行细胞计数,调整细胞密度后按 5×10^6 个/孔接种于支架表面,放入细胞培养箱中培养2 h后,补足培养液与支架平齐,继续恒温培养至第3天。吸去孔板中培养基,PBS轻柔清洗支架表面2次,2.5%戊二醛溶液4℃固定支架24 h。支架经无水乙醇(50%、65%、80%、95%、100%)梯度脱水,每级15 min,冷冻干燥后,表面喷金处理,生物扫描电镜下观察支架表面细胞形态及黏附情况。

结 果

一、3D打印聚乳酸-羟基乙酸共聚物珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌复合骨修复支架的制备

PLGA与CHA/n-ZnO质量比为4:1时,在设定打印参数下,复合材料(图2)熔融后流变性较好,呈“丝状”从打印喷嘴稳定持续挤出,打印过程流畅(图3)。复合材料中CHA/n-ZnO固相含量过高时,打印过程易出现喷嘴堵塞、出丝不连续等现象影响复合材料可打印性能(图4)。



图2 制备出的聚乳酸-羟基乙酸共聚物珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌(PLGA/CHA/n-ZnO)复合材料样品 图3 三维支架的打印制备

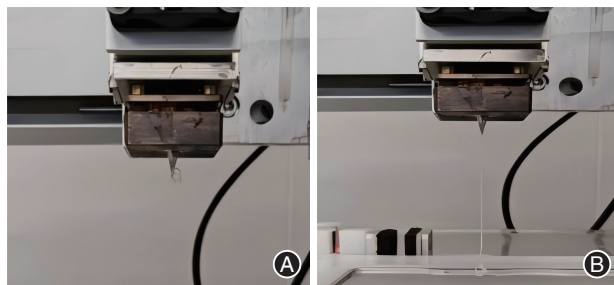


图4 3D打印过程中复合材料出丝不连续、不顺畅现象 A:喷嘴堵塞;B:丝材卷叠。

打印制备出的矩形骨块支架(图5A)可见支架形态完整,结构连续,相互贯通的宏观孔径分布均匀、孔径大小一致,尺寸形态与设计基本一致;牙根支架(图5B)及牙槽窝“骨缺损”形态支架(图5C)的尺寸形态与原始牙根及牙槽窝内部形态基本一致,并可见相互贯通宏观孔径结构。



图5 打印完成的3种形态支架样件 A:矩形骨块支架样件;B:牙根样支架样件;C:牙槽窝模拟骨缺损支架样件。

二、3D打印聚乳酸-羟基乙酸共聚物珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌复合骨修复支架的表征

1. X射线衍射分析结果:支架通过X射线衍射仪检测,数据结果经Jade 6.5软件分析,分析结果通过Origin8.0软件绘图后,得出支架材料的XRD图谱(图6),支架存在羟基磷灰石、碳酸钙和氧化锌3种特征峰。

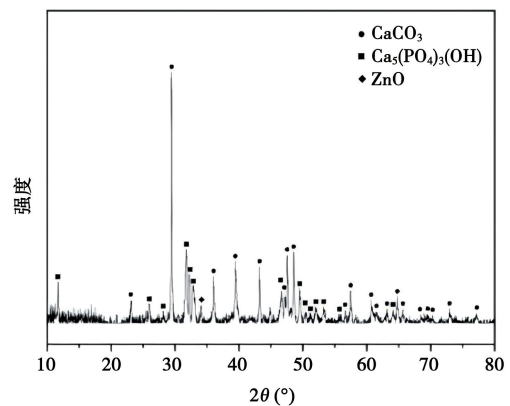


图6 聚乳酸-羟基乙酸共聚物珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌(PLGA/CHA/n-ZnO)支架X射线衍射图谱

2. 扫描电镜检测结果:PLGA/CHA/n-ZnO支架镜下观(图7)可见不同尺寸孔径结构,支架表面粗糙。

3. 支架力学性能:经电子万能试验机检测,测试数据见表1,计算得出支架弹性模量为 (31.18 ± 12.30) MPa,压缩强度为 (12.31 ± 4.80) MPa。

4. 支架亲水性能:支架样品经接触角测量仪检测后,结果如图8所示,支架对蒸馏水的平均接触角角度为 $(75.73 \pm 5.54)^\circ$ 。

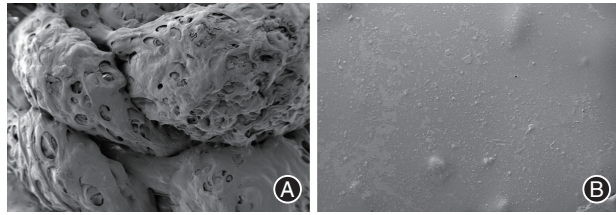


图7 聚乳酸-羟基乙酸共聚物珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌(PLGA/CHA/n-ZnO)支架扫描电镜结果 A:可见支架不同尺寸孔结构(低倍放大);B:可见支架呈现颗粒状粗糙表面(高倍放大)

表1 电子万能试验机测试支架力学性能数据结果

打印支架	压缩强度 (N/mm ²)	压缩屈服应变 (%)	压缩屈服应力 (MPa)	压缩模量 (MPa)
样件1	7.97	27.99	3.74	24.57
样件2	10.06	34.93	5.74	20.55
样件3	18.91	32.18	9.23	48.42
平均值	12.31	31.70	6.24	31.18

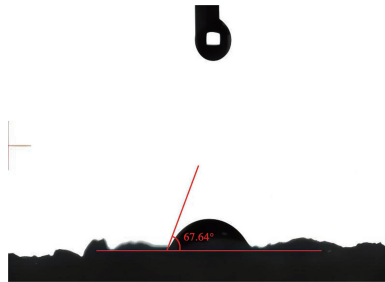


图8 聚乳酸-羟基乙酸共聚物珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌(PLGA/CHA/n-ZnO)支架静态接触角

5. 支架孔径分布:压汞仪测量支架孔径分布如图9所示,支架孔径呈现2个峰值,第1个峰值出现在5 nm附近,第2个峰值出现在350 μm附近,表明支架孔径分布为5 nm ~ 350 μm。

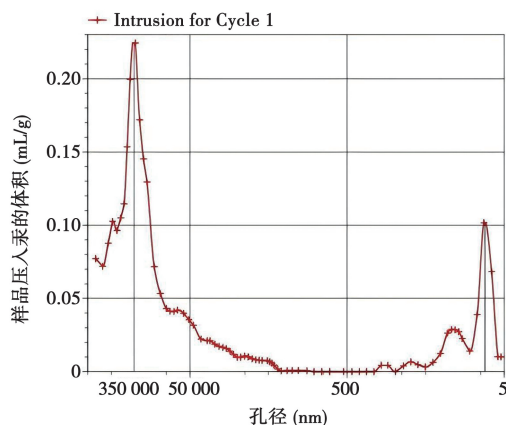


图9 聚乳酸-羟基乙酸共聚物珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌(PLGA/CHA/n-ZnO)支架孔径分布

三、分离培养的牙周膜干细胞形态 组织块联合酶消化法培养传代后的PDLSC贴

壁生长,为典型的成纤维细胞样,呈长梭形或三角形(图10)。

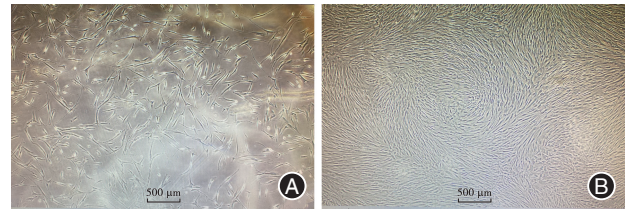


图10 组织块联合酶消化法培养传代后牙周膜干细胞(PDLSC)镜下形态特点 A:P3;B:P5。

四、免疫荧光染色结果

免疫荧光染色可见PDLSC阳性表达间充质干细胞表面标志物CD44(图11)及Vimentin(图12)。

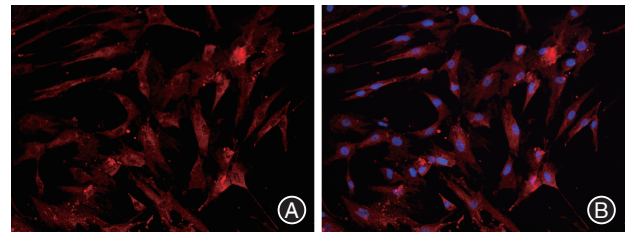


图11 牙周膜干细胞(PDLSC)CD44免疫荧光染色(高倍放大) A:PDLSC阳性表达CD44,胞质红染;B:细胞核经DAPI复染呈蓝色。

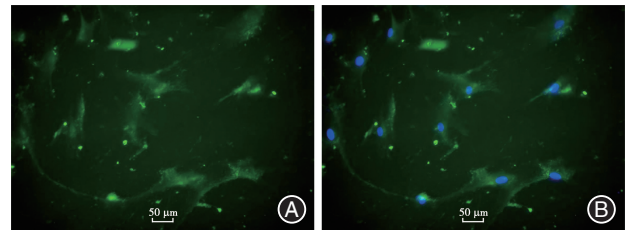


图12 牙周膜干细胞(PDLSC)Vimentin免疫荧光染色 A:PDLSC阳性表达Vimentin,胞质绿染;B:细胞核经DAPI复染呈蓝色。

五、流式细胞仪分析结果

流式细胞仪分析结果可见,PDLSC阳性表达CD29、CD90、CD105、CD146,表达量大于95%;阴性表达CD45、CD34,表达量小于5%(图13)。

六、成骨/成脂分化能力检测

经成骨诱导培养14 d后,镜下可见PDLSC形成明显的矿化结节(图14)。PDLSC成脂诱导21 d后,观察可见大量脂滴的形成(图15)。

七、聚乳酸-羟基乙酸共聚物珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌三维抗菌支架与牙周膜干细胞黏附实验

PLGA/CHA/n-ZnO 三维复合骨修复支架与PDLSC体外共培养3 d后,生物扫描电镜下可见PDLSC黏附于支架表面,伪足铺展,生长状态良好(图16)。

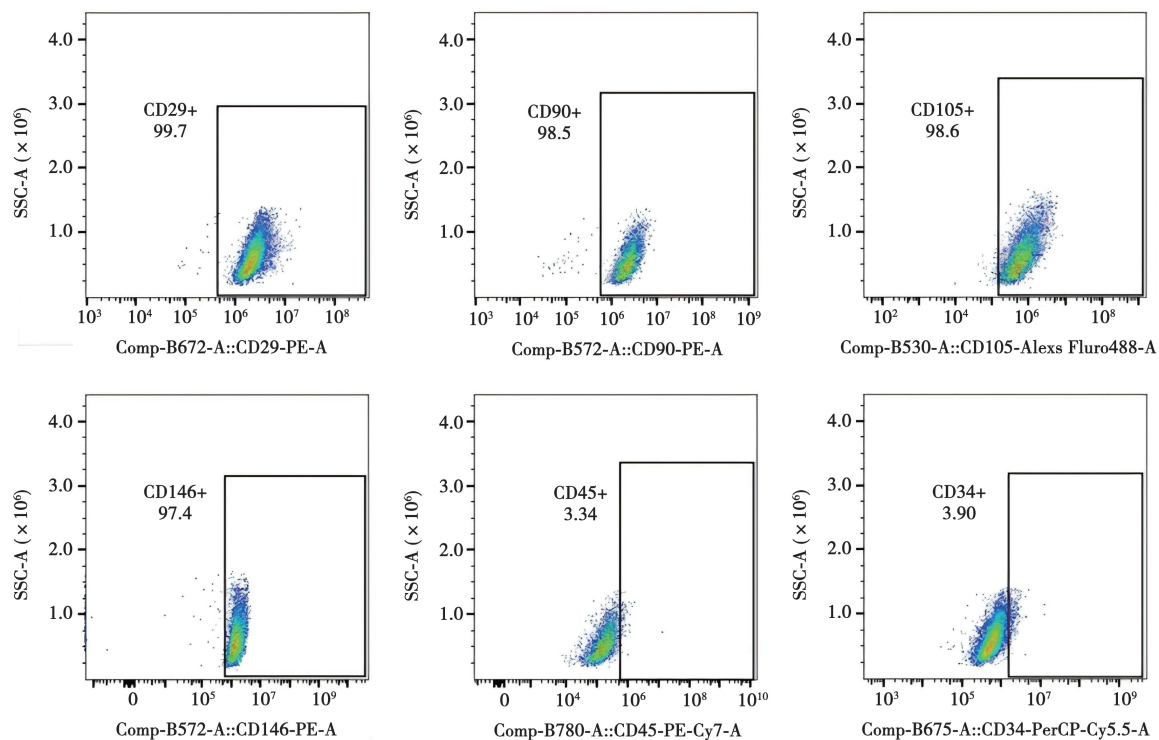


图13 流式细胞仪分析牙周膜干细胞(PDLSC)表面标志物

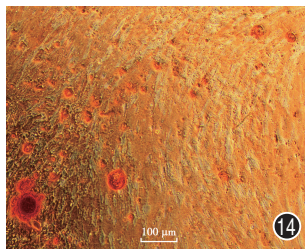


图14 牙周膜干细胞(PDLSC)成骨诱导分化

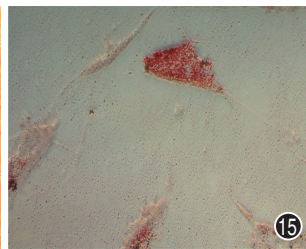


图15 牙周膜干细胞(PDLSC)成脂诱导分化(低倍放大)

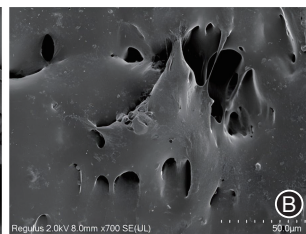
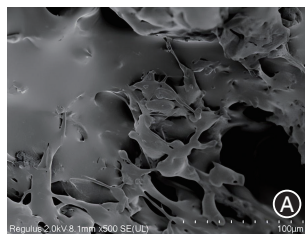


图16 聚乳酸-羟基乙酸共聚物珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌(PLGA/CHA/n-ZnO)三维复合骨修复支架与牙周膜干细胞(PDLSC)体外共培养3 d后扫描电镜观 A:细胞黏附于支架表面;B:细胞铺展出伪足。

讨论

一、聚乳酸-羟基乙酸共聚物珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌复合材料具备良好的打印性能,可基于挤出成型技术制备一定复杂结构的骨缺损支架

CHA/n-ZnO 因其硬度大、质地脆,通过3D打印

技术制备三维支架难以成型。参考HA、 β -TCP等生物陶瓷类材料利用3D打印技术制备三维骨修复支架^[36-39],本实验通过加入可塑性良好的PLGA生物高分子材料,组成PLGA/CHA/n-ZnO复合材料,PLGA随着温度升高逐渐熔融,使得复合材料具有一定的黏稠度和流动性,并利用基于挤压的3D打印成型技术可以打印不同孔隙度和孔径结构的特点^[40-41],在压力驱动下,复合材料以“细丝”的形式从打印机喷嘴中连续稳定地挤出,即为复合材料的剪切稀释特性,这是成功打印支架的先决条件^[42-44]。这些结构完整的“细丝”构成了打印原型的结构单元,并采用逐层堆叠的形式生产打印支架原型。最终本研究通过生物挤出3D打印技术实现了三维支架的打印制备。在PLGA与CHA/n-ZnO质量比为4:1时,成功打印出3种不同形态的复合支架,包括形态规则的矩形骨块支架及2种异形支架,分别为牙根样支架与牙槽窝模拟的骨缺损支架,3种支架的打印制备难度由浅入深,其基本结构均以矩形骨块支架为基础,相较以往研究中通常设计的正方形、圆柱形和其他形状支架模型^[45-48]。本研究中的支架设计与打印制备过程更加模拟临床实际,打印的复合支架样件外形也更为复杂。实验中根据观察,随着CHA/n-ZnO比例升高,PLGA/CHA/n-ZnO复合材料熔融后

黏度将显著增加,而材料黏度的增加需要更高的挤出压力和更慢的打印速度^[49-50]。当CHA/n-ZnO比值增加到一定水平时,它不再均匀地分散在PLGA中,而是沉积在料管的底部,材料的黏度进一步增加,导致挤压过程中“细丝断裂”,打印喷嘴堵塞。为了克服这一现象,需要用较大的孔径代替挤压喷嘴,但是,喷嘴的直径与印刷样品的结构单元“细丝直径”直接相关,而较大直径的喷嘴会影响打印样品的尺寸精度和孔径结构^[51]。打印参数的设计和样品的结构特性与打印材料的剪切稀释能力直接相关,这使得打印具有高固相含量的CHA/n-ZnO的3D支架变得困难。因此,本研究将PLGA与CHA/n-ZnO质量比控制在4:1,以实现复合材料中CHA/n-ZnO成分比例与打印效果的平衡。如何在保证打印效果的同时增加复合材料中CHA/n-ZnO的比重值得进一步探索。

二、聚乳酸-羟基乙酸共聚物珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌三维复合支架具备良好的理化性能,可满足骨修复支架的基本要求

经实验检测,打印出的支架具有良好的精度及相互贯通的孔隙结构,孔径分布范围为5 nm ~ 350 μm ,适宜的孔径结构是骨修复支架的基本要求,其有助于细胞的黏附与新生血管的形成,能为骨缺损修复重建提供良好的成骨微环境^[52]。复合支架的弹性模量(31.18 ± 12.30) MPa,压缩强度为(12.31 ± 4.80) N/mm²,与人体松质骨力学强度接近,有利于支撑成骨空间,同时该支架的机械强度有利于应力合理分布,避免应力屏蔽,刺激周围新骨的生长,促进骨缺损的修复重建^[53]。复合支架的静态接触角角度为(75.73 ± 5.5)°,说明其具有良好的表面润湿性,有利于血凝块和纤维蛋白的沉积,促进成骨细胞的早期黏附,增强成骨性能^[54]。本研究仅对PLGA/CHA/n-ZnO三维骨修复支架的部分表征及理化性能进行了相关分析,未对支架进行抗菌性能的相关检测,对于其抗菌性只通过课题组前期研究证明纳米氧化锌具有良好的抗菌性能^[55-56],XRD分析显示通过生物挤出3D打印制备的三维复合骨修复支架并未破坏珊瑚羟基磷灰石与氧化锌两组材料的成分。因此,本研究认为复合支架材料具备一定的抗菌作用,然而对于其抗菌性是否会因为制作工艺的改变而较大程度影响纳米氧化锌的抗菌性能还需通过后续研究进一步分析。同时,3D打印PLGA/CHA/n-ZnO复合骨修复支架的成骨性能有待

相关体外实验及体内动物实验进一步验证。

三、组织块联合0.3% I型胶原酶消化法可成功分离培养牙周膜干细胞

本实验通过组织块联合0.3% I型胶原酶消化法成功分离培养出PDLSC,细胞贴壁生长,呈成纤维细胞样,为典型的梭形或三角形形态。组织块联合酶消化法结合了组织块和酶消化法两种细胞培养方法的特点,减少单独使用组织块培养法,剪切牙周组织造成的机械损伤,细胞游出少甚至无细胞游出现象,也降低了单独使用酶消化法操作复杂、时间长极易导致实验中细胞污染的可能以及高浓度酶消化液对细胞的不良影响^[57-58]。本实验条件下培养的PDLSC经免疫荧光分析阳性表达CD44、Vimentin;流式细胞仪检测下阳性表达CD29、CD90、CD105、CD146,表达量>95%;阴性表达CD45、CD34,表达量<5%,具备间充质干细胞表面表达标志物的特征^[59-60]。14 d的体外成骨诱导分化,可见典型的矿化结节;21 d的体外成脂诱导分化,可见大量的脂滴形成,均说明本实验条件下培养的PDLSC具备间充质干细胞多向分化能力的特点。因此,对于PDLSC的分离培养,本实验方法具备一定的参考价值。

四、聚乳酸-羟基乙酸共聚物珊瑚羟基磷灰石纳米氧化锌复合支架对牙周膜干细胞具备良好的生物相容性

该研究中应用体外细胞黏附实验直观观察PLGA/CHA/n-ZnO三维支架对PDLSC的生物相容性。本实验条件下,PLGA/CHA/n-ZnO三维抗菌支架与PDLSC体外共培养3 d后,生物扫描电镜观察可见细胞黏附于支架材料表面、伪足铺展,生长状态良好,初步体现出PLGA/CHA/n-ZnO三维复合支架对PDLSC具备良好的生物相容性。这也许得益于三维支架材料所创造的多孔结构以及支架材料的粗糙表面。然而,本实验观察时间较短未能充分体现出PDLSC在PLGA/CHA/n-ZnO三维支架上的增殖特性,后续需进一步验证PLGA/CHA/n-ZnO三维复合支架对PDLSC的增殖及成骨分化的作用影响。

综上所述,基于生物挤出3D打印技术制备的PLGA/CHA/n-ZnO复合骨修复支架,制作工艺简单、经济,具有作为牙周骨缺损修复支架材料的潜能。本实验条件下,将PLGA/CHA/n-ZnO三维复合支架与PDLSC共培养3 d,初步显示出PLGA/CHA/n-ZnO三维支架对PDLSC具备良好的生物相容性,为后续

进一步研制 PLGA/CHA/n-ZnO 三维复合支架负载 PDLSC 的组织工程骨奠定了良好的实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 杨城:实施研究、实验操作、论文撰写;李祖儿、刘青:数据分析;赵渊、徐崇燕:采集数据;苏军、张文云:研究指导、论文修改

参 考 文 献

- [1] Liu Y, Guo L, Li X, et al. Challenges and tissue engineering strategies of periodontal-guided tissue regeneration [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2022, 28(8): 405-419. DOI: 10.1089/ten.TEC.2022.0106.
- [2] Aimaijiang M, Liu Y, Zhang Z, et al. LIPUS as a potential strategy for periodontitis treatment: A review of the mechanisms [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11: 1018012. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1018012.
- [3] de Ry SP, Pagnamenta M, Ramseier CA, et al. Five-year results following regenerative periodontal surgery with an enamel matrix derivative in patients with different smoking status [J]. *Quintessence Int*, 2022, 53(10): 832-838. DOI: 10.3290/j.qi.b3418233.
- [4] Liang Y, Luan X, Liu X. Recent advances in periodontal regeneration: A biomaterial perspective [J]. *Bioact Mater*, 2020, 5(2): 297-308. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2020.02.012.
- [5] Vaquette C, Pilipchuk SP, Bartold PM, et al. Tissue engineered constructs for periodontal regeneration: current status and future perspectives [J]. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7(21): e1800457. DOI: 10.1002/adhm.201800457.
- [6] Pjetursson BE, Heimisdottir K. Dental implants—Are they better than natural teeth? [J]. *Eur J Oral Sci*, 2018, 126(Suppl 1): 81-87. DOI: 10.1111/eos.12543.
- [7] Testori T, Weinstein T, Scutellà F, et al. Implant placement in the esthetic area: Criteria for positioning single and multiple implants [J]. *Periodontol 2000*, 2018, 77(1): 176-196. DOI: 10.1111/prd.12211.
- [8] Tettamanti L, Andrisani C, Bassi MA, et al. Post extractive implant: Evaluation of the critical aspects [J]. *Oral Implantol (Rome)*, 2017, 10(2): 119-128. DOI: 10.11138/orl/2017.10.2.119.
- [9] Hämmerle CHF, Tarnow D. The etiology of hard- and soft-tissue deficiencies at dental implants: A narrative review [J]. *J Periodontol*, 2018, 89(Suppl 1): S291-S303. DOI: 10.1002/JPER.16-0810.
- [10] Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, et al. The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: A Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials [J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2006, 21(5): 696-710. DOI: 10.1016/j.ijom.2006.03.021.
- [11] Misch CM. The future of bone augmentation [J]. *Int J Oral Implantol (Berl)*, 2022, 15(2): 103-104.
- [12] Cha HS, Kim JW, Hwang JH, et al. Frequency of bone graft in implant surgery [J]. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*, 2016, 38(1): 19-28. DOI: 10.1186/s40902-016-0064-2.
- [13] Antonio Barone, Ulf Nannmark. 引导骨再生策略与方法 [M]. 张健, 王艳颖, 韩静, 译. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2021: 5-11.
- [14] 林野. 口腔种植学 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2014: 79-80.
- [15] 唐国柯, 文根, 刘彦斌, 等. 骨缺损修复生物材料的研究进展 [J]. *中华骨与关节外科杂志*, 2023, 16(2): 185-192. DOI: 10.3969/j.issn.2095-9958.2023.02.15.
- [16] Deng R, Xie Y, Chan U, et al. Biomaterials and biotechnology for periodontal tissue regeneration: Recent advances and perspectives [J]. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*, 2022, 16(1): 1-10. DOI: 10.34172/joddd.2022.001.
- [17] Bartold PM, Gronthos S, Ivanovski S, et al. Tissue engineered periodontal products [J]. *J Periodontol Res*, 2016, 51(1): 1-15. DOI: 10.1111/jre.12275.
- [18] Ding G, Liu Y, Wang W, et al. Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(10): 1829-1838. DOI: 10.1002/stem.512.
- [19] Liu O, Xu J, Ding G, et al. Periodontal ligament stem cells regulate B lymphocyte function via programmed cell death protein 1 [J]. *Stem Cells*, 2013, 31(7): 1371-1382. DOI: 10.1002/stem.1387.
- [20] Wei W, An Y, An Y, et al. Activation of autophagy in periodontal ligament mesenchymal stem cells promotes angiogenesis in periodontitis [J]. *J Periodontol*, 2018, 89(6): 718-727. DOI: 10.1002/JPER.17-0341.
- [21] Ulmer FL, Winkel A, Kohorst P, et al. Stem cells--prospects in dentistry [J]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 2010, 120(10): 860-872.
- [22] Daghrery A, Bottino MC. Advanced biomaterials for periodontal tissue regeneration [J]. *Genesis*, 2022, 60(8-9): e23501. DOI: 10.1002/dvg.23501.
- [23] Bousnaki M, Beketova A, Kontonasaki E. A review of *in vivo* and clinical studies applying scaffolds and cell sheet technology for periodontal ligament regeneration [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(3): 435. DOI: 10.3390/biom12030435.
- [24] Tsumanuma Y, Iwata T, Washio K, et al. Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(25): 5819-5825. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.071.
- [25] 康坤龙, 王新涛. 生物支架材料促进骨髓间充质干细胞成骨分化的研究热点 [J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(4): 597-603.
- [26] Boden SD, Martin GJ Jr, Morone M, et al. The use of coralline hydroxyapatite with bone marrow, autogenous bone graft, or osteoinductive bone protein extract for posterolateral lumbar spine fusion [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1999, 24(4): 320-327. DOI: 10.1097/00007632-199902150-00003.
- [27] 张富贵, 宿玉成, 邱立新, 等. 牙槽骨缺损增量手术方案的专

- 家共识[J]. 口腔疾病防治, 2022, 30(4): 229-236. DOI: 10.12016/j.issn.2096-1456.2022.04.001.
- [28] Vallet - Regí M, Lozano D, González B, et al. Biomaterials against bone infection[J]. Adv Healthc Mater, 2020, 9(13): e2000310. DOI:10.1002/adhm.202000310.
- [29] Ahrari F, Eslami N, Rajabi O, et al. The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutans and Streptococcus sanguis to colloidal solutions of different nanoparticles applied as mouthwashes[J]. Dent Res J (Isfahan), 2015, 12(1): 44-49. DOI:10.4103/1735-3327.150330.
- [30] Chang JH, Su J, Zhang WY. Process study on surface modification of coral hydroxyapatite[J]. Am J Clin Exp Med, 2021, 9(5): 157-162. DOI:10.11648/J.AJCEM.20210905.15.
- [31] Feng Y, Zhu S, Mei D, et al. Application of 3D printing technology in bone tissue engineering: A review[J]. Curr Drug Deliv, 2021, 18(7): 847-861. DOI: 10.2174/156720181799920113100322.
- [32] Distefano F, Pasta S, Epasto G. Titanium lattice structures produced via additive manufacturing for a bone scaffold: A review[J]. J Funct Biomater, 2023, 14(3): 125. DOI:10.3390/jfb14030125.
- [33] Gögele C, Müller S, Belov S, et al. Biodegradable poly (D-L-lactide - co - glycolide) (PLGA) - infiltrated bioactive glass (CAR12N) scaffolds maintain mesenchymal stem cell chondrogenesis for cartilage tissue engineering[J]. Cells, 2022, 11(9): 1577. DOI:10.3390/cells11091577.
- [34] Rocha CV, Gonçalves V, da Silva MC, et al. PLGA - based composites for various biomedical applications[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(4): 2034. DOI:10.3390/ijms23042034.
- [35] Lai Y, Li Y, Cao H, et al. Osteogenic magnesium incorporated into PLGA/TCP porous scaffold by 3D printing for repairing challenging bone defect[J]. Biomaterials, 2019, 197: 207-219. DOI:10.1016/j.biomaterials.2019.01.013.
- [36] Wei J, Yan Y, Gao J, et al. 3D - printed hydroxyapatite microspheres reinforced PLGA scaffolds for bone regeneration[J]. Biomater Adv, 2022, 133: 112618. DOI: 10.1016/j.msec.2021.112618.
- [37] Babilotte J, Martin B, Guduric V, et al. Development and characterization of a PLGA - HA composite material to fabricate 3D - printed scaffolds for bone tissue engineering[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2021, 118: 111334. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111334.
- [38] Hatt LP, Wirth S, Ristaniemi A, et al. Micro-porous PLGA/ β -TCP/TPU scaffolds prepared by solvent - based 3D printing for bone tissue engineering purposes[J]. Regen Biomater, 2023, 10: rbad084. DOI:10.1093/rb/rbad084.
- [39] Li C, Sun F, Tian J, et al. Continuously released Zn²⁺ in 3D-printed PLGA/ β -TCP/Zn scaffolds for bone defect repair by improving osteoinductive and anti - inflammatory properties[J]. Bioact Mater, 2022, 24: 361-375. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.12.015.
- [40] Baniasadi H, Kimiaei E, Polez RT, et al. High - resolution 3D printing of xanthan gum/nanocellulose bio - inks[J]. Int J Biol Macromol, 2022, 209 (Pt B): 2020 - 2031. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.04.183.
- [41] Hu X, Man Y, Li W, et al. 3D bio - printing of CS/Gel/HA/Gr hybrid osteochondral scaffolds[J]. Polymers (Basel), 2019, 11(10): 1601. DOI:10.3390/polym11101601.
- [42] Smith PT, Basu A, Saha A, et al. Chemical modification and printability of shear - thinning hydrogel inks for direct - write 3D printing[J]. Polymer, 2018, 12(125): 42-50. DOI: 10.1016/j.polymer.2018.01.070.
- [43] Shahzad A, Lazoglu I. Direct ink writing (DIW) of structural and functional ceramics: Recent achievements and future challenges[J]. Compos Part B: Eng, 2021, 15(225): 109249. DOI: 10.1016/j.compositesb.2021.109249.
- [44] Ravichandran D, Xu W, Kakarla M, et al. Multiphase direct ink writing(MDIW) for multilayered polymer/nanoparticle composites[J]. Addit Manuf, 2021, 47: 102322. DOI: 10.1016/j.addma.2021.102322.
- [45] Prasopthum A, Cooper M, Shakesheff KM, et al. Three - dimensional printed scaffolds with controlled micro -/nanoporous surface topography direct chondrogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11(21): 18896-18906. DOI: 10.1021/acsami.9b01472.
- [46] Zou F, Jiang J, Lv F, et al. Preparation of antibacterial and osteoconductive 3D-printed PLGA/Cu(I)@ZIF-8 nanocomposite scaffolds for infected bone repair[J]. J Nanobiotechnology, 2020, 18(1): 39. DOI: 10.1186/s12951-020-00594-6.
- [47] Fu S, Du X, Zhu M, et al. 3D printing of layered mesoporous bioactive glass/sodium alginate - sodium alginate scaffolds with controllable dual - drug release behaviors[J]. Biomed Mater, 2019, 14(6): 065011. DOI: 10.1088/1748-605X/ab4166.
- [48] Luo Y, Chen B, Zhang X, et al. 3D printed concentrated alginate/ GelMA hollow-fibers-packed scaffolds with nano apatite coatings for bone tissue engineering[J]. Int J Biol Macromol, 2022, 202: 366-374. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2022.01.096.
- [49] Rau DA, Williams CB, Bortner MJ. Rheology and printability: A survey of critical relationships for direct ink write materials design[J]. Prog Mater Sci, 2023, 140: 101188. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2023.101188.
- [50] Rau DA, Bortner MJ, Williams CB. A rheology roadmap for evaluating the printability of material extrusion inks[J]. Additive Manufacturing, 2023, 75: 103745.
- [51] Suntornnond R, Tan EYS, An J, et al. A mathematical model on the resolution of extrusion bioprinting for the development of new bioinks[J]. Materials (Basel), 2016, 9(9): 756. DOI: 10.3390/ma9090756.
- [52] Collins MN, Guang R, Young K, et al. Scaffold fabrication technologies and structure/function properties in bone tissue engineering[J]. Adv Funct Mater, 2021, 31(21): 2010609. DOI:

- 10.1002/adfm.202010609.
- [53] Qu H, Fu H, Han Z, et al. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review [J]. RSC Adv, 2019, 9 (45): 26252-26262. DOI:10.1039/c9ra05214c.
- [54] Kodama J, Harumningtyas AA, Ito T, et al. Amine modification of calcium phosphate by low-pressure plasma for bone regeneration [J]. Sci Rep, 2021, 11 (1): 17870. DOI: 10.1038/s41598-021-97460-8.
- [55] Yu J, Zhang WY, Li Y, et al. Synthesis, characterization, antimicrobial activity and mechanism of a novel hydroxyapatite whisker/nano zinc oxide biomaterial [J]. Biomed Mater, 2014, 10 (1):015001. DOI:10.1088/1748-6041/10/1/015001.
- [56] Jin J, Liu W, Zhang WY, et al. Nano-ZnO/ZnO-HAPw prepared via sol-gel method and antibacterial activities of inorganic agents on six bacteria associated with oral infections [J]. J Nanopart Res, 2014, 16:2658. DOI:10.1007/s11051-014-2658-x.
- [57] 刘娟,孟波,赵华,等. 人牙周膜细胞不同分离培养方法的比较研究[J]. 广东牙病防治, 2011,19(12):631-634.
- [58] 马佳音,胥春,郝轶,等. 三种组织块法培养人牙周膜细胞的比较研究[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2010,6(3):136-140. DOI:10.3969/j.issn.1673-0364.2010.03.004.
- [59] Subba TA, Varma S, Thomas B, et al. Comparison of cellular and differentiation characteristics of mesenchymal stem cells derived from human gingiva and periodontal ligament [J]. J Int Soc Prev Community Dent, 2022, 12(2):235-244. DOI:10.4103/jispcd.JISPCD_259_21.
- [60] Couto de Carvalho LA, Tosta Dos Santos SL, Sacramento LV, et al. Mesenchymal stem cell markers in periodontal tissues and periapical lesions [J]. Acta Histochem, 2020, 122 (8): 151636. DOI:10.1016/j.acthis.2020.151636.
- (收稿日期:2024-03-01)
(本文编辑:王嫚)