文章编号:1001-9731(2014)14-14001-07

壳聚糖季铵盐基杂化支架的制备及其作为 rhBMP-2 载体的研究*

胡园园,王 靖,刘昌胜

(华东理工大学 教育部医用生物材料工程研究中心,上海 200237)

摘 要: 采用环氧衍生物开环法制备壳聚糖季铵盐,通过其与甘油磷酸钠的分子间作用力交联成凝胶,冻干后得多孔支架,用于装载骨形态发生蛋白-2 应用于骨修复领域;同时引入 β -TCP 作为物理交联点,在提高支架力学强度的同时,更好地调控支架的溶胀行为,延长 rhBMP-2 的释放时间,并且在异位诱导成骨的动物实验中取得良好效果。

关键词: 骨修复;壳聚糖;骨形态发生蛋白;磷酸钙中图分类号: R318.08 文献标识码:A DOI:10.3969/j.issn.1001-9731.2014.14.001

1 引 言

骨组织损伤是常见疾病,为满足临床大量骨修复材料的需求,安全有效的人工骨成为研究热点。特别是将骨修复材料与生长因子结合,可以得到兼具骨传导性和成骨活性的活性修复材料。壳聚糖因其来源广泛以及良好的生物相容性,已被广泛应用于骨修复布药物载体研究[1-4]。Chenite等首次报道了利用壳聚糖/β-甘油磷酸钠间的静电力、分子间力以及氢键作用力制备了一种壳聚糖水凝胶支架[5-6],该体系制备药物及生长因子,因而受到关注。但由于壳聚糖水溶性差,需溶解于稀酸中,不仅对组织有一定的刺激性,而且酸的存在会削弱壳聚糖与甘油磷酸钠间的静电作用力而导致难以形成凝胶;另外,壳聚糖与甘油磷酸钠间的相互作用力弱,导致凝胶力学强度差,也使其应用受到限制。

本文通过对壳聚糖改性,制备正电性更强的水溶性壳聚糖季铵盐(HTCC),可避免稀酸溶液的使用。与壳聚糖相比,壳聚糖季铵盐与甘油磷酸钠间的静电作用力更强,因而形成的凝胶强度提高。同时,本文还在 HTCC/GP 体系中引入无机 β -磷酸三钙(β -TCP),一方面提高成骨活性,另一方面借助无机颗粒与季铵盐的相互作用力,加快凝胶化进程,并进一步提高凝胶的强度。在此基础上,将其装载促进成骨的生长因子骨形态发生蛋白-2(rhBMP-2),在异位成骨动物实验中考察壳聚糖季铵盐基杂化支架作为成骨生长因子载体应用于骨修复的可行性。

2 实 验

2.1 壳聚糖季铵盐(HTCC)的制备及表征

2.1.1 试剂

壳聚糖(CS, M_w =5.05×10 5 ,上海卡博工贸有限公司),2,3-环氧丙基三甲基氯化铵(GTMAC,山东东营国丰精细化工有限责任公司),β-甘油磷酸二钠盐,五水(β-GP,国药集团化学试剂有限公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所),重组人骨形态蛋白(rhBMP-2,上海瑞邦生物材料有限公司),β-TCP 粉末由本实验室采用液相沉淀法自行制备。

2.1.2 HTCC 的制备及表征

称取 2 g 壳聚糖置于烧杯中,倒入 99 mL 去离子水,磁力搅拌下滴加 1 mL 冰醋酸,待壳聚糖完全溶解,用 1 mol/L NaOH 溶液沉淀,调节 pH 值至 10,静置 4 h 后,抽滤,去离子水洗至中性,用纱布将处理后的壳聚糖滤干备用。

参照文献[7-9]称取一定量的 2,3-环氧丙基三甲基氯化铵,置于烧杯中,加入异丙醇,搅拌至溶解完全后,倒入滴定管备用。将经过预处理的壳聚糖分散在 80 mL 异丙醇中,油浴加热至 80 ℃。搅拌下缓慢滴加 2,3-环氧丙基三甲基氯化铵溶液,当溶液加至一半时停止滴加,直至反应 3.5 h 后开始滴加剩余溶液,继续反应 3.5 h 后,停止反应,静置待反应装置冷却至至温,抽滤,得到淡黄色沉淀,无水乙醇洗 3 遍,烘干备用。将干燥的淡黄色沉淀置于烧杯中,加适量去离子水,磁力搅拌 12 h 后,用砂芯漏斗进行抽滤,除去不溶于水的杂质,得到澄清的淡黄色壳聚糖季铵盐水溶液。将壳聚糖季铵盐水溶液缓慢倒入丙酮中,抽滤得到淡黄色絮状沉淀,无水乙醇洗 3 遍后,索氏提取 24 h,抽滤,烘干备用。

采用 KBr 压片法,测定壳聚糖和 HTCC 红外光谱 图,测量范围为 $4~000\sim500~\mathrm{cm}^{-1}$ 。

- 2.2 壳聚糖季铵盐杂化支架的制备及性能研究
- 2.2.1 HTCC/β-GP/β-TCP 支架的制备及表征

将 HTCC 粉末溶于去离子水配制成一定浓度的 HTCC 水溶液。配制 β -GP 水溶液 (1.2~g/mL),并称 取一定量的 β -TCP 分散在 β -GP 水溶液中,超声分散 均匀,取适量 HTCC 水溶液于小烧杯中,磁力搅拌下

^{*} 基金项目:科技部国家重大科学研究计划资助项目(2012CB933600) 收到初稿日期:2014-06-10 收到修改稿日期:2014-07-15 通讯作者:刘昌胜,E-mail; liucs@ecust.edu.cn 作者简介:胡园园 (1987-),女,江苏人,硕士生,师承刘昌胜教授,从事生物材料研究。

加入配制好的 β -TCP/ β -GP 混合液,待 HTCC 粘度增大即停止搅拌。静置即可得 HTCC/ β -GP/ β -TCP 凝胶。将该水凝胶置于-20 °C 预冻 12 h 后,冻干机中冻干 48 h 得到 HTCC/ β -GP/ β -TCP 多孔支架。

将冻干支架放入液氮中淬冷急断,取新鲜断面喷 金后在扫描电镜下观察形貌。

2.2.2 HTCC/β-GP/β-TCP 支架的力学性能

将凝胶填入圆柱形模具中冻干,制备出 $\emptyset = 10 \text{ mm}, L = 20 \text{ mm}$ 的小圆柱体,采用万能试验机进行压缩试验,压缩速度为 2 mm/min。每组测试 3 个样品, 绘制压缩应力-应变曲线, 计算压缩模量。

2.2.3 HTCC/β-GP/β-TCP 支架的溶胀度

配制磷酸缓冲溶液(PBS),将冻干支架切成厚度约为1 mm,直径约为10 mm 小圆片,称量并记录小圆片初始质量,浸泡于 PBS 缓冲溶液中,在相同时间点,将小圆片捞出,用滤纸吸取圆片周围多余水分后称量并记录圆片吸水后质量。按照下式计算冻干凝胶支架的溶胀度。

$$SD = W_{\rm t} / W_{\rm 0}$$

式中, W_{t} 为不同浸泡时间点,凝胶的质量; W_{0} 为未浸泡前,冻干凝胶支架的初始质量。

2.2.4 HTCC/β-GP/β-TCP 支架的细胞相容性

采用 MTS 法考察凝胶的细胞相容性,操作步骤如下:(1) 将不同组分的杂化凝胶按样品表面积每3 cm² 加1 mL 含牛血清的细胞培养液,置于 37 °C,培养 24 h,制得凝胶浸提液;(2) 将 MC3T3-E1 单细胞悬液接种于 96 孔板内,每孔 10 000 个细胞。将浸提液 150 μ L 加入到孔板内与细胞共培养,置于 37 °C含有 5% CO₂ 的培养箱中分别培养 24 和 72 h;(3) 在测定时间点,每孔加入 20 μ L 的 MTS 溶液,置入培养箱中 37 °C下继续培养 5 h;(4) 采用酶标仪以 490 nm 波长测定吸光度(OD 值)。

根据相对增值率(relative growth rate, RGR)来评价细胞毒性。相对增值率 RGR = $OD_{h_{\rm d}(\rm gghh)}$ / $OD_{h_{\rm d}(\rm fffh)}$ ×100%。按照我国医疗器械生物学评价标准,根据以下评分标准来衡量材料的细胞毒性:RGR \geqslant 100为0级,RGR=75 \sim 99为1级,RGR=50 \sim 74为2级,RGR=25 \sim 49为3级,RGR=1 \sim 24为4级,RGR=0为5级,其中,0 \sim 1级为合格,2级需要结合细胞形态分析来综合评价,3 \sim 5级表示不合格。

携载 rhBMP-2 的 $HTCC/\beta$ - GP/β -TCP 采用同上方法获得: 按上述步骤制备 $HTCC/\beta$ - GP/β -TCP 支架,按需求切取适当尺寸,环氧乙烷灭菌。在无菌条件下量取一定量 $rhBMP-2(0.5\ mg/mL)$ 水溶液,滴加到支架表面,静置 $10\ min$,再置于无菌的冷冻干燥机中冻干 $24\ h$,取出备用。

2.3.2 体外缓释

材料分为 3 组:(1) β-TCP 浓度为 0;(2) β-TCP

2.3.3 异位成骨实验

- (1) 制样及分组:将不同组分的冻干支架切割成等重小颗粒,环氧乙烷灭菌备用,无菌环境下,按 2. 2. 1 所述的方法,每一颗粒准确复合 40 μ L rhBMP-2 (0.5 mg/mL)溶液;12 只昆明种小鼠,随机分为 3 组,每组 4 只动物。分组情况如下:① HTCC/β-GP+rh-BMP-2;② HTCC/β-GP/β-TCP(c(β-TCP)=20 mg/mL)+rhBMP-2;③ HTCC/β-GP/β-TCP(c(β-TCP)=40 mg/mL)+rhBMP-2。
- (2) 肌袋植入手术:动物实验在无菌环境中进行,实验中所用器具均事先进行灭菌处理。将昆明种小白鼠(23~25 g)按体重的 3%进行戊巴比妥钠腹腔注射麻醉。将小鼠的右后腿部内侧毛发剃除,固定小鼠四肢,用酒精擦拭消毒。然后用手术小剪纵向切口约 3 mm,分离肌袋内软组织,植入样品后,用手术线逐层缝合肌膜和皮肤。在无菌环境中按标准进行日常饲养。

2.3.4 新骨湿重和骨灰含量测定

采用新骨湿重和骨灰分量来评价异位形成的新骨。在术后第4周处死小鼠,解剖小鼠的右后腿取出诱导成骨组织。其中一个带周围软组织样品浸泡在4%的福尔马林溶液中固定,用于组织学检测。其余3个去除周围软组织后拍照并测定新骨鲜重和灰分含量。准确称量新鲜骨重量,然后将其置于马弗炉中在600℃下煅烧6h,随炉冷却后,取出称量煅烧后骨灰质量,骨灰量可以表示新生骨中无机盐矿物的含量。

2.3.5 组织学评价

将术后 4 周取出的新骨标本分别浸入 4%的中性甲醛溶液中固定 24 h 以上;随后在 30%甲酸-福尔马林脱钙液脱钙 72 h;脱钙后的标本进行洗涤、乙醇梯度脱水、二甲苯透明处理、浸蜡、包埋、切片与粘片,然后石蜡切片进行 H-E 染色和三色染色。在倒置显微镜下观察新骨形成情况及材料与周围组织的相容性。

3 结果与讨论

3.1 壳聚糖季铵盐及其凝胶的制备与表征

采用傅里叶红外光谱对 HTCC 进行结构表征。图 1 为壳聚糖和 HTCC 的红外谱图,从图 1 可以观察到,壳聚糖的 FT-IR 图谱中 1 596.78 $\rm cm^{-1}$ 处存在 N—H 变形振动峰,在 HTCC 的 FT-IR 图谱中,

1 596.78 cm⁻¹ 处的 N—H 变形振动峰消失,而在 1 482.61 cm⁻¹ 处出现了新的振动吸收峰,为—CH₃ 变形振动峰。HTCC 红外图谱未改变壳聚糖图谱中 1 103.23 cm⁻¹ 处伯醇羟基特征吸收峰及 1 089.14 cm⁻¹ 处仲醇羟基特征吸收峰。红外图谱分析表明,HTCC 只在壳聚糖分子链的—NH₂ 处引入了羟丙基三甲基氯化铵。

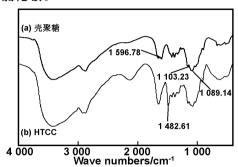


图 1 壳聚糖与 HTCC 红外光谱图 Fig 1 FT-IR spectra for chitosan and HTCC HTCC/β-GP 体系凝胶化转变机理主要是由于壳

聚糖分子链中引入了带正电的季铵根,与 β -GP 分子中带负电的磷酸根发生静电吸引,HTCC 分子链以 β -GP 为中心发生物理交联形成三维网络结构的凝胶。图 2 为 HTCC 水溶液和 HTCC/ β -GP 凝胶化示意图。

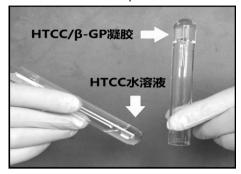


图 2 HTCC 水溶液与 HTCC/β-GP 凝胶图 Fig 2 The photo of HTCC solution and HTCC/β-GP hydrogel

3.2 β -TCP 含量对支架断面形貌的影响 采用扫描电镜考察 β -TCP 含量对 HTCC/ β -GP/ β -TCP 支架断面微观形貌的影响,如图 3 所示。

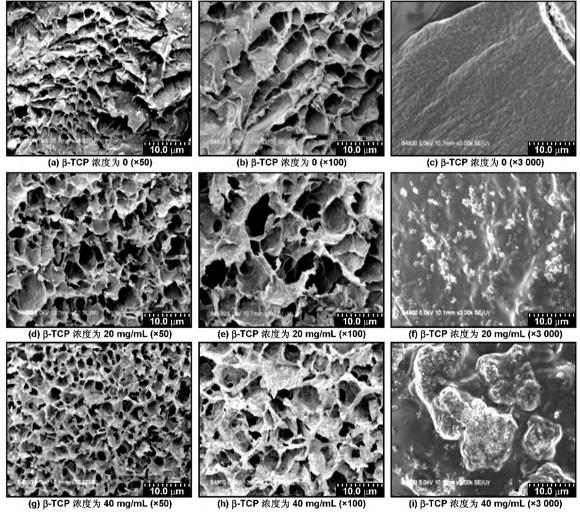


图 3 不同 β-TCP 浓度的 HTCC/β-GP/β-TCP 支架断面扫描电镜图

Fig 3 The SEM graphs of HTCC/β-GP/β-TCP hydrogel containing different amounts of β-TCP

从图 3 可以看出,凝胶断面形貌均为多孔结构,不 含 β-TCP 的支架孔壁单薄,孔径不均匀,孔的连通性 差,在放大倍数为 3 000 倍时,可见孔壁光滑细致均

一。比较不同 β -TCP 含量下的支架表面形貌,可以看出,随着 β -TCP 浓度的增大,支架孔径略有减小,多孔结构分布更加均匀,并且孔壁变厚,孔的连通性增强。

在放大倍数为 3 000 倍时,可以看到随着 β-TCP 浓度 的增大,孔壁上的磷酸三钙颗粒逐渐增多,孔壁粗糙度增加;当 β-TCP 浓度为 20 mg/mL 时,孔壁上的 β-TCP 均匀分布;当 β-TCP 浓度达到 40 mg/mL 时,β-TCP 轻微团聚。由此可见,β-TCP 的引入使凝胶孔结构均匀分布,连通性增强,孔壁变厚变粗糙,有利于细胞粘附生长。

3.3 β-TCP 浓度对支架力学性能的影响

图 4 为 $HTCC/\beta$ - GP/β -TCP 支架的压缩应力-应变曲线,在相同应力下,随着 β -TCP 浓度的增加,支架的压缩应变减小,说明支架的抗压强度增加。

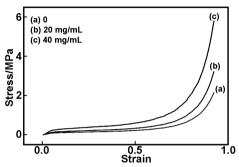


图 4 β-TCP 浓度为 0, 20, 40 mg/mL 时 HTCC/ β-GP/β-TCP 凝胶压缩应力-应变曲线

Fig 4 The compression stress–strain curves of HTCC/ β -GP/ β -TCP containing different amount of β -TCP

随着 β-TCP 浓度的增大,凝胶的压缩模量增大, 当 β-TCP = 40 mg/mL 时,压缩模量从 1.25 MPa 增强到 3.36 MPa。由此可见,β-TCP 的引入增强了 HTCC/β-GP 凝胶的力学强度。

3.4 支架的溶胀度

图 5 为 HTCC/ β -GP/ β -TCP 凝胶分别在酸性(pH 值=6.0)、中性(pH 值=7.0)、碱性(pH 值=8.0)溶液中的溶胀度曲线。由图 5(a)可知,在酸性 PBS 中,凝胶首先快速吸水溶胀,纯 HTCC/ β -GP 凝胶瞬时溶胀度达到 15.8;随着 β -TCP 浓度增加,凝胶的瞬时溶胀度有所降低;当 β -TCP 浓度为 20 mg/mL 时,凝胶瞬时溶胀度下降到 13.9;当 β -TCP 浓度为 40 mg/mL 时,瞬时溶胀度下降到 11.2。在保持溶胀度不变一段时间后,3 组凝胶均逐渐崩解, β -TCP 粒子从凝胶体系中溃散出,随着 β -TCP 浓度的增加,凝胶崩解速度减慢,纯 HTCC/ β -GP 凝胶大约 90 min 时崩解完全,随着 β -TCP 浓度的增加,凝胶完全崩解的时间增加, β -TCP 浓度为 20 mg/mL 时崩解时间为 130 min, β -TCP 浓度为 40 mg/mL 时崩解时间为 220 min。

由图 5(b)可知在中性 PBS 中,3 组凝胶瞬时吸水溶胀达到饱和后,溶胀度不随时间延长而改变,随着 β -TCP 浓度的增加,凝胶的溶胀度降低, β -TCP 浓度为0,20,40 mg/mL 时,凝胶在 β -TCP 放 的中性 PBS中的溶胀度分别为 β -13.4,11.9 和 9.3。

由图 5(c)可知,在碱性 PBS(pH 值=8.0)中,3 组 凝胶的溶胀行为与在中性溶液中的溶胀情况相似,首先是瞬时吸水溶胀达到饱和,然后保持不变,但是总体溶胀度有所下降, β -TCP 浓度为 0.20.40 mg/mL 时,凝胶在 pH 值=8.0 的碱性 PBS 中的溶胀度分别为 11.3,10.1 和 7.2。

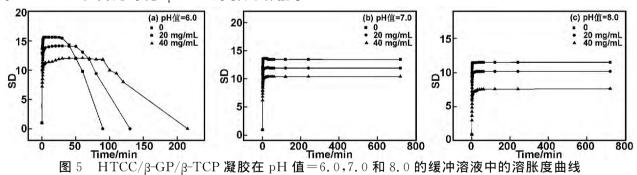


Fig 5 Swelling degree (SD) of HTCC/ β -GP/ β -TCP lyophilized hydrogel scaffolds containing different content of β -TCP (0, 20, 40 mg/mL) at different pH: pH=6.0, 7.0, and 8.0

HTCC/β-GP/β-TCP 凝胶在酸性环境中溶胀迅速,允许更多的酸溶液进入凝胶内部,与 β -GP 相中和使物理交联网络溃散,所以凝胶在酸性溶液中会迅速溶解。随着 β -TCP 浓度的增加,凝胶的溶胀度降低,可能是由于 β -TCP 带负电的磷酸根与带正电的HTCC 分子链间也存在静电吸引力,所以 β -TCP 的引入也起到了物理交联点的作用,HTCC 分子链在 β -GP 和 β -TCP 两种物理交联剂的作用下凝胶化更完全,得到的三维网状结构也更加紧密,结合扫描电镜分析得出结论: β -TCP 的引入使凝胶孔径降低,孔壁增厚,结构更为规整,所以随着 β -TCP 浓度的增加,杂化凝胶的溶胀度降低。由此可见,HTCC/ β -GP/ β -TCP 凝胶

具有 pH 值响应性,并且随着 β-TCP 浓度的增加,凝胶的溶胀度降低。

3.5 rhBMP-2 体外缓释曲线

由图 6(a)可以看出,不同 β -TCP 浓度的 3 组材料对 rhBMP-2 的体外缓释趋势相似。但是随着 β -TCP 含量的增大,材料对 rhBMP-2 缓释速度有所降低,第 7 d 时, β -TCP 浓度为 0,20,40 mg/mL 的 3 组支架对 rhBMP-2 的累计缓释量分别为 93%,82%,74%;图 6 (b)解释了产生这种结果的原因:当 HTCC 与 β -GP 交联成凝胶的过程中, β -TCP 粒子也充当了物理交联点的角色,HTCC 分子链一方面与 β -GP 发生物理交联,形成网络结构,一方面以 β -TCP 粒子为中心,分子链

之间发生互相缠结,使得凝胶的三维网状结构更为致密,对 rhBMP-2 的结合也就更牢固,并且 β -TCP 降低了凝胶支架的溶胀度。当装载了 rhBMP-2 的凝胶支架浸泡到缓冲溶液中时,未添加 β -TCP 的支架迅速吸水溶胀,大量的缓冲溶液进入到凝胶内部,松散的结构使得 rhBMP-2 很快扩散出来,这也是水凝胶通常存在

很高的突释的原因。而添加了 β -TCP 后,相对较紧密的网络结构和狭窄的扩散孔道能够比较有效地束缚 rhBMP-2,所以 β -TCP 的添加可以让 $HTCC/\beta$ -GP/ β -TCP 杂化凝胶支架对 rhBMP-2 有更好的缓释作用。

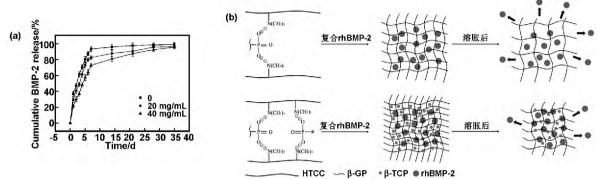


图 6 HTCC/β-GP/β-TCP 支架对 rhBMP-2 的缓释曲线及机理示意图

Fig 6 Release profiles of rhBMP-2 for HTCC/ β -GP/ β -TCP scaffolds and its schematic illustration

3.6 支架的细胞相容性

采用 MTS 比色法考察凝胶的细胞相容性。由图 7(a) 可知,培养 24 h 后,β-TCP 浓度为 0, 20, 40 mg/mL 的 3 组凝胶支架浸提液 RGR 值分别为 78%, 82%,95%,均在 75% \sim 100% 之间,毒性等级为 1 级。

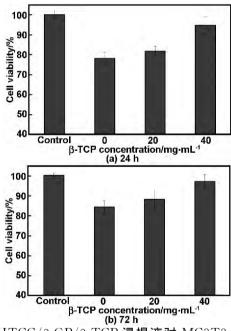


图 7 HTCC/β-GP/β-TCP 浸提液对 MC3T3-E1 的体 外细胞毒性

Fig 7 Cytotoxicity of HTCC/ β -GP/ β -TCP scaffolds by MTS analysis after incubation for 24 and 72 h

由图 7(b) 可知,培养 72h 后, β -TCP 浓度为 0, 20,40 mg/mL 的 3 组凝胶支架浸提液 RGR 值分别为 85%,88%,97%,毒性等级仍然为 1 级,说明材料具有良好的细胞相容性,同时,比较 3 组材料,可以看出随着 β -TCP 浓度的增加,支架的体外细胞毒性降低,这主要是因为 β -TCP 与人体骨骼中的无机成分相近,具

有良好的生物相容性,从而提高了 $HACC/\beta$ -GP 支架的生物相容性。

3.8 异位成骨量

由图 8 可知,3 组材料载 rhBMP-2 植入小鼠大腿肌袋后 4 周,均诱导了新骨的生成,且随着 β-TCP 浓度的增加,新骨尺寸增大。实验中采用新骨和骨灰重量来进一步评价携载 rhBMP-2 的 HTCC/β-GP/β-TCP 支架在动物体内异位诱导成骨的能力。

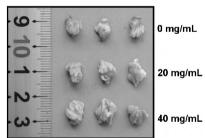


图 8 HTCC/β-GP/β-TCP 载 rhBMP-2 异位诱导新骨 照片

Fig 8 Ectopic bone formation of rhBMP-2-loaded-HTCC/ β -GP/ β -TCP scaffold

图 9 为术后 4 周新骨湿重和灰分重,可知含有 β -TCP 的两组材料载 rhBMP-2 后诱导的新骨质量明显 大于纯的 $HTCC/\beta$ -GP 支架,而含 β -TCP 的两组支架间 没有显著性差异。骨灰重是骨头被灼烧或被完全氧化后剩余的无机残留物,这些残留物多为含有 K、Na、Ca、Mg 等元素的氧化物。骨灰含量可以代表骨矿含量的多少。随着 β -TCP 含量的增加,新骨灰重明显增加,其中含有 β -TCP 的两组要明显高于未添加 β -TCP 的 θ -GP 组,含有 θ -TCP 的两组间无显著性差异。

3.9 组织学分析

采用组织切片观察 HTCC/β-GP/β-TCP/rhBMP-2 复合支架的异位成骨效果,如图 10 和 11 所示。

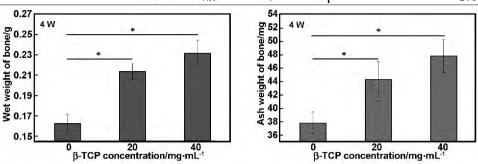


图 9 材料植入 4 周后 rhBMP-2 诱导生成的新骨湿重和骨灰重(*P < 0.05) Fig 9 Wet and ash weight of new bone for 4weeks (*P < 0.05)

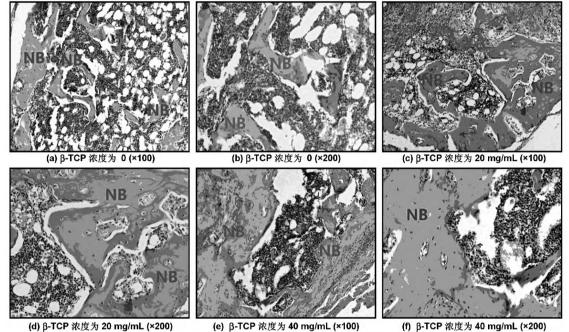


图 10 HTCC/β-GP/β-TCP/rhBMP-2 复合支架异位成骨(术后 4 周)HE,其中 NB 为新生骨,F 为纤维组织 Fig 10 HE of HTCC/β-GP/β-TCP/rhBMP-2 scaffolds containing different content of β-TCP (0,20,40 mg/mL) implanted into rat hind limb muscle for 4 weeks

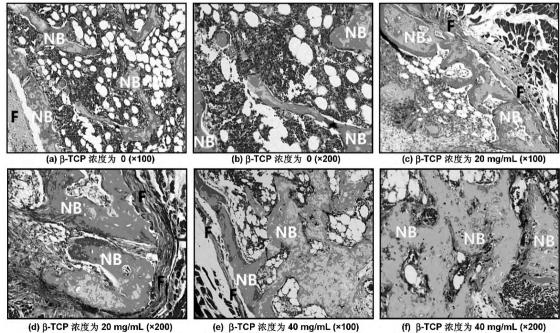


图 $11 \quad HTCC/\beta$ - GP/β -TCP/rhBMP-2 复合支架异位成骨(术后 4 周)三色染色组织切片图,其中 NB 为新生骨,F 为纤维组织

Fig 11 Masson's trichrome staining of HTCC/ β -GP/ β -TCP/rhBMP-2 scaffolds containing different content of β -TCP (0,20,40 mg/mL) implanted into rat hind limb muscle for 4 weeks

由图 10 和 11 的 HE 和三色染色切片中可以看 出,3组材料植入小鼠腿部肌袋4周后均有新生骨组 织生成,而且周围没有发现炎症和不良免疫反应,说明 3组支架材料的组织相容性好。且4周时3组材料均 降解完全,新生骨组织出现大量骨陷窝,并且新生骨组 织之间可见丰富的黄骨髓和红骨髓,说明了骨组织趋 于成熟。对比 3 组材料,未添加 β -TCP 的实验组新生 骨小梁稀少,随着 β-TCP 的引入,新生骨面积有明显 增加,说明β-TCP的引入增强了材料的生物相容性并 促进了新骨的形成。在异位成骨中, B-TCP 含量对新 生骨量的影响有两方面的原因,一方面是由于 β-TCP 是一种具有良好生物相容性并且可降解的无机盐,它 与正常骨的无机成分相近,所以 β-TCP 的添加可以增 强凝胶的生物相容性和骨传导性;另一方面,结合体外 缓释的结果,β-TCP的添加可以对装载在凝胶支架上 的 rhBMP-2 起到更好的缓释作用,使 rhBMP-2 更好 地发挥效用,所以两方面原因促进了 HTCC/β-GP/β-TCP/rhBMP-2 复合支架能够异位诱导更多的新生骨 生成。

4 结 论

通过对壳聚糖进行季铵化改性以及引入 β -TCP,可有效提高 $HTCC/\beta$ - GP/β -TCP 支架的力学强度,降低其溶胀性,延长对 rhBMP-2 的缓释时间,并且在异位成骨的实验中取得良好的效果,提示其在骨修复领域具有应用前景。同时 HTCC 具有抗菌特性,进一步研究 $HTCC/\beta$ - GP/β -TCP 复合材料的抗菌性能,以及骨修复过程中骨诱导与抗菌的协同作用,不仅将为设计新型抗菌型骨修复材料提供思路借鉴,而且具有更大的临床应用价值。

参考文献:

[1] Upadhyaya L, Singh J, Agarwal V, et al. The implica-

- tions of recent advances in carboxymethyl chitosan based targeted drug delivery and tissue engineering applications [J]. Journal of Controlled Release, 2014, 186: 54-87.
- [2] Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering [J]. European Polymer Journal, 2013, 49: 780-792.
- [3] Bhardwaj N, David Q T, Kaplan L, et al. Potential of 3-D tissue constructs engineeringed form bovine chondrocytes/silk fibroin-chitosan for in vitro cartilage tissue engineering [J]. Biomaterials, 2011,32:5773-5781.
- [4] Tian Meng, Yang Zhi, Wan Changxiu, et al. Delivery of demineralized bone matrix powder using a thermogelling chitosan carrier [J]. Acta biomaterialia, 2012, 8:753-762.
- [5] Berger J, Reist A, Chenite A, et al. Pseudo-thermosetting chitosan hydrogels for biomedical application [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2005, 288: 197-206.
- [6] Chenite A, Buschmann M, Kandani N, et al. Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions [J]. Carbohydrate Polymers, 2001, 46: 39-47.
- [7] Xu chen, Lu Canhui. Hydroscopicity and moisture retentiveness of 2-hydroxyl-3-trimethyl (ammonia) propyl chitosan chloride [J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 1996,13: 94-96.
- [8] Viviane A S, Mauro C M L. Preparation and characterization of quaternary chitosan salt: adsorption equilibrium of chromium(VI) ion [J]. Reactive & Functional Polymers, 2004, 61 (6): 347-352.
- [9] Wu Jie, Zhao Zhiguo, Ma Guanghui. A thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2006, 315; 1-11.

Research of quaternized chitosan based hybrid scaffold as a delivery system for rhBMP-2

HU Yuan-yuan, WANG Jing, LIU Chang-sheng

(Engineering Research Center for Biomedical Materials of Ministry of Education,

East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Quaternized chitosan was synthesized by the reaction of chitosan and glycidyltrimethylammonium chloride (GTMAC) and named as N-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium) propyl] chitosan chloride (HTCC). A hydrogel system composed of HTCC and β -glycerophosphate (β -GP) was obtained by intermolecular forces. Introduction of β -TCP granules improved the mechanical strength and controlled the swelling behavior and prolonged the releasing period for rhBMP-2 of the hydrogel scaffold. Moreover, rhBMP-2 loaded scaffolds were assessed in ectopic bone formation. The results indicate that porous HTCC/ β -GP/ β -TCP/rhBMP-2 scaffolds are promising candidates for application in tissue engineering of bone.

Key words: bone regeneration; chitosan; bone morphogenetic protein; calcium phosphate