

分类号：R318.08

单位代码：10183

研究生学号：2012731084

密 级：公 开



# 吉 林 大 学

## 博 士 学 位 论 文

采用相转化法制备的可降解生物多孔 3D 和 4D 支架修复骨缺损

The biodegradable and biological porous 3D and 4D scaffolds  
fabricated by phase separation for bone defect repair

作者姓名：张 宁

专 业：外科学

研究方向：关节外科，生物材料

指导教师：刘建国 教授

陈学思 研究员

章培标 研究员

培养单位：白求恩第一医院

2015 年 3 月



---

相转化法制备可降解生物多孔 3D 和 4D 支架修复骨缺损

The biodegradable and biological porous 3D and 4D scaffolds  
fabricated by phase separation for bone defect repair

作者姓名：张 宁

专业名称：外科学

指导教师：刘建国

学位类别：医学博士

论文答辩日期： 年 月 日

授予学位日期： 年 月 日

答辩委员会主席：

论文评阅人：



---

未经本论文作者的书面授权依法收存和保管本论文书面版本、电子版本的任何单位和个人均不得对本论文的全部或部分内容进行任何形式的复制、修改、发行、出租、改编等有碍作者著作权的商业性使用（但纯学术性使用不在此限）。否则应承担侵权的法律责任。

### 吉林大学博士学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交学位论文是本人在指导教师的指导下独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日



---

## 《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》投稿声明

研究生院：

本人同意《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》出版章程的内容愿意将本人的学位论文委托研究生院向中国学术期刊（光盘版）电子杂志社的《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》投稿希望《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》给予出版并同意在《中国博硕士学位论文评价数据库》和CNKI 系列数据库中使用同意按章程规定享受相关权益。

论文级别： 硕士  博士

学科专业：外科学

论文题目：相转化法制备可降解生物多孔 3D 和 4D 支架修复骨缺损

作者签名：

指导教师签名：

年 月 日

作者联系地址（邮编）：长春市新民大街71号（130021）

作者联系电话：13596403289





# 前 言

使用生物材料修复受损组织的历史要追溯到史前，距今已经 30,000 年了。2000 年前智慧的中国和罗马人民已经会使用金子修复受损的牙齿。随着当今社会创伤，肿瘤，畸形，退化和老龄化的急剧增加，外科重建手术材料的需求亦是与日俱增。根据国际骨质疏松基金会（International Osteoporosis Foundation, IOF）发布的 2009 年亚洲审计报告，中国大陆超过 50 岁的人群中有 694 万人患有骨质疏松，每年由骨质疏松导致的髌部骨折约 687,000 例，脊柱骨折 18 万例。在过去四十年，中国香港髌部骨折增长了 300%，新加坡增长了 500%。日本的骨质疏松人群大约 120 万，髌部骨折发生率在老年人群（大于 75 岁）中显著增加。全球权威调研机构 Technavio 分析师预测 2012 年到 2016 年之间矫形合同制造市场的复合年增长率（Compound Annual Growth Rate, CAGR）将增长 11.05%。“新材料在线网站”（<http://www.xincailliao.com/>）提供的数据显示目前全球生物材料以骨科和心血管两类应用产品的需求量最大，分别占全球生物材料市场的 37.5%和 36.1%；其次以伤口护理和整形外科为主，约占全球生物材料市场的 9.6%和 8.4%；到 2015 年全球骨科市场规模达 472 亿美元，中国达到 166 亿人民币，成为全球第二大骨科市场。

矫形重建术的增多直接刺激了骨替代材料的发展。多孔支架材料在骨重建领域受到广泛关注，究其原因就是为骨组织的长入提供了足够的空间和时间。然而目前的支架材料仍然存在一些缺陷，a. 目前市售的很多骨替代多孔支架材料很多是“多孔闭塞支架”，使用这样的支架修复骨缺损时，常常会出现这种情况：新鲜营养物质到达支架内部之前原来的营养物质已经消耗殆尽，而且产生了大量的新陈代谢废物。这种情况使得刚刚长入到内部的细胞死亡，实验中常常发现细胞仅仅集中在支架材料的周围；b. 目前预成型的支架材料在使用过程中也遇到了一些问题：初始机械强度不高，手术操作性差，与不规则骨缺损不匹配等。本研究针对目前材料存在的缺陷对材料进行改进。1. 设计带有“微通道”的 3D 骨替代材料，增强支架内外的“交流”；2. 设计可注射的 3D 骨修复材料，实现材料与宿主不规则骨缺损的形态匹配；3. 设计可注射 4D 骨修复支架材料，实现早期高强度，后期高孔隙率，与宿主骨缺损高拟合度等目的。总之，本研究为进一步提高生物可降解组织工程支架的性能提供了思路与方法。



## 中文摘要

### 采用相转化法制备的可降解生物多孔 3D 和 4D 支架修复骨缺损

使用生物材料修复受损组织的历史要追溯到史前，距今已经 30,000 年了。2000 年前智慧的中国和罗马人民已经会使用金子修复受损的牙齿。随着当今社会创伤，肿瘤，畸形，退化和老龄化的急剧增加，外科重建手术材料的需求亦是与日俱增。根据国际骨质疏松基金会 (International Osteoporosis Foundation, IOF) 发布的 2009 年亚洲审计报告，中国大陆超过 50 岁的人群中有 694 万人患有骨质疏松，每年由骨质疏松导致的髌部骨折约 687,000 例，脊柱骨折 18 万例。在过去四十年，中国香港髌部骨折增长了 300%，新加坡增长了 500%。日本的骨质疏松人群大约 120 万，髌部骨折发生率在老年人群（大于 75 岁）中显著增加。全球权威调研机构 Technavio 分析师预测 2012 年到 2016 年之间矫形合同制造市场的复合年增长率 (Compound Annual Growth Rate, CAGR) 将增长 11.05%。“新材料在线网站” (<http://www.xincailliao.com/>) 提供的数据显示目前全球生物材料以骨科和心血管两类应用产品的需求量最大，分别占全球生物材料市场的 37.5% 和 36.1%；其次以伤口护理和整形外科为主，约占全球生物材料市场的 9.6% 和 8.4%；到 2015 年全球骨科市场规模达 472 亿美元，中国达到 166 亿人民币，成为全球第二大骨科市场。

矫形重建术的增多直接刺激了骨替代材料的发展。多孔支架材料在骨重建领域受到广泛关注，究其原因就是为骨组织的长入提供了足够的空间和时间。然而目前的支架材料仍然存在一些缺陷，a. 目前市售的很多骨替代多孔支架材料很多是“多孔闭塞支架”，使用这样的支架修复骨缺损时，常常会出现这种情况：新鲜营养物质到达支架内部之前原来的营养物质已经消耗殆尽，而且产生了大量的新陈代谢废物。这种情况使得刚刚长入到内部的细胞死亡，实验中常常发现细胞仅仅集中在支架材料的周围；b. 目前预成型的支架材料在使用过程中也遇到了一些问题：初始机械强度不高，手术操作性差，与不规则骨缺损不匹配等。本研究针对目前材料存在的缺陷对材料进行改进。

第一部分：带有微通道的生物多孔支架修复兔桡骨骨缺损。为了解决以往 3D 组织工程支架存在的物质交换障碍的问题，本部分采用相转化方法制备了一种新型的带有微通道的可降解生物多孔支架材料。将一定量的 PLGA (MW=7.5 万或 14.7 万) 溶于 NMP 中，

---

然后加入一定量的HA后使用乳化机充分分散均匀。选择直径为200-450 $\mu\text{m}$ 的盐粒子作为致孔剂加入到上述混合物，将复合材料加入到自制的模具后放入一次水中浸泡3天即可得到多孔材料（PS支架）。通过扫描电镜观察到孔隙表面和断层表面观察到相互连通的微通道（直径1 $\mu\text{m}$ 左右），这些微通道非常有利于孔隙内外离子，小分子物质和大分子物质的交换。通过压缩试验我们可以得到压缩强度在1 MPa-4MPa范围内的支架材料，可以根据使用部位进行选择。体内外实验我们选择强度较大的支架材料进行。细胞实验中通过与模压成型方法制备的材料（MM支架）进行比较观察材料的细胞增殖能力和诱导成骨能力，结果发现细胞培养5d和10d后细胞增殖量明显高于MM支架，这说明由于PS支架良好的通透性，支架内部的细胞获得了必要的营养物质，而MM支架由于物质交换障碍而影响了细胞的增殖。培养10d时碱性磷酸酶含量明显高于MM支架，14d和21d钙沉积量明显高于MM支架。原因可能是材料表面的HA暴露较多，起到了诱导成骨分化的作用。PS支架体内骨修复能力也同样优于MM支架，通过X片可以观察到PS支架内部矿化骨质，而MM支架仅集中在支架周围。

第二部分：可注射聚乙酯-丙交酯/纳米羟基磷灰石/可降解明胶微球复合支架（PLGA/HA/MGs）修复小鼠颅骨缺损。为了解决以往预成型支架拟合度欠佳，操作性差，以及可注射水凝胶机械强度差的问题。我们制备了可注射的PLGA/HA/MGs复合支架，其中未交联明胶微球（MGs）作为体内致孔剂和担载rhBMP-2。方法是将一定量的PLGA溶于NMP中，然后加入HA，制得的混合物用乳化器乳化3分钟。然后在混合物中加入未交联的明胶微球（MGs）或载rhBMP-2的MGs作为致孔剂。选择2mL的注射器（出口直径约2.7mm，相当于16号穿刺针的直径）将材料分装到注射器管内。最终得到的是可注射的骨修复替代材料。通过调节复合材料中PLGA分子量，浓度，HA含量以及MGs的量得到满意的可注射材料，既能够顺利注射，又能够得到较高的机械强度。同时我们对材料的细胞毒性进行评估，发现材料在0-2h细胞毒性明显，2h后无细胞毒性。同时将材料和载rhBMP-2的材料用于小鼠颅骨修复，发现两组骨修复效果优于空白组，其中载rhBMP-2组最佳。同时我们通过小鼠的心，肝，脾，肺，肾组织切片观察发现材料未造成小鼠体内脏器损伤。

第三部分：可注射4D支架修复兔桡骨骨缺损。预成型支架材料在动物实验和临床使用中存在诸多缺陷，例如机械性能较差，手术操作性差，与不规则骨缺损拟合度差等。可注射水凝胶因其可原位塑性，并可微创操作，与缺损拟合度好而应用增加。但是水凝

胶不具有足够的机械性能用于负重区域，甚至在非负重区域材料的机械强度也不能够维持空隙的空间结构。4D支架是在3D空间支架的基础上加上时间的概念。今天，4D概念经常出现在之前的文章中。例如，4D CT现已经用于临床诊断和导航；下肢4D数字模型用于研究全髋关节置换术并发症；4D打印用于制备形状记忆型器件。这些技术激发我们设计一种支架材料，这种支架材料在早期是一种无空隙设计，可提供足够的机械强度；随着时间材料空隙从外而内逐渐形成，周围骨组织逐渐长入。本研究中，我们将明胶微球加入到PLGA，HA和NMP的混合物中制备4D支架。这种支架材料可以实现原位成形，并可出现时间依赖性孔形成。原因是明胶材料可被明胶酶如组织金属蛋白酶-2/9 (MMP-2/9)降解，而MMP-2/9可在正常生理和病理状态下的骨组织中检测到。通过其修复骨缺损的结果可见，材料移植入骨缺损处后观察期间未见断裂，支架早期出现矿化，后期骨组织逐渐长入，最后完成骨缺损部位的修复。而载有rhBMP-2的支架骨修复能力更佳。

通过上述研究我们在以下方面改善了目前支架材料存在的问题：1. 设计和制备了带有“微通道”的3D骨替代材料，增强支架内外的“交流”，在体内促进了骨组织的修复；2. 设计和制备了可注射的3D骨修复材料，实现材料与宿主不规则骨缺损的形态匹配，并且材料具有较高的机械强度；3. 设计和制备了可注射4D骨修复支架材料，实现早期高强度，后期高孔隙率，与宿主骨缺损高拟合度等目的。

#### 关键词：

四维PLGA支架，时间依赖性孔形成，原位孔形成，高机械强度，可注射



## **Abstract**

### **The biodegradable and biological porous 3D and 4D scaffolds fabricated by phase separation for bone defect repair**

The history of the restoration of injured tissues using biomaterials can be traced back to the prehistoric period, dating back 30,000 years. There is evidence revealing that the Chinese and the Romans used gold for false teeth as long as 2000 years ago. Currently, orthopedic reconstruction procedures stemming from trauma, tumor, deformity, degeneration and an aging population have dramatically increased, triggering a high demand on the advancement of bone implant technology. According to the 2009 Asia Audit report released by the International Osteoporosis Foundation (IOF), there are almost 69.4 million people over the age of 50 suffering from osteoporosis in the mainland of China, resulting in some 687,000 hip fractures and 1.8 million new vertebral fractures occurring per year. Over the past four decades, the number of hip fractures increased by 300% in Hong Kong and by about 500% in Singapore. In Japan, the prevalence of osteoporosis is around 12 million and the hip fracture incidence rate in the oldest population (over 75) is increasing dramatically in both men and women. TechNavio's analysts have forecasted that the global orthopedic contract manufacturing market will grow by 11.05% of CAGR between the years 2012 and 2016.

Increased use of reconstruction procedures in orthopedics, due to trauma, tumor, deformity, degeneration and an aging population, has caused a blossom, not only in surgical advancement, but also in the development of bone implants. However, there are some drawbacks in the current scaffolds. a). Due to the more complex structure required for thicker, three-dimensional tissues, science is some way off generating a definitive clinical product for tissues such as bone. This is largely due to the non-homogeneous growth of cells on the traditional "porous block" scaffolds, which prevents the formation of a functional construct from surface to core. This in turn is due to the mass transfer limitations of the porous structures into which cells are expected to migrate and populate. The movement of nutrients to, and waste products from the cells in the pores relies on molecular diffusion; nutrients are used up before reaching the inner core of the construct and waste products build up. Cells that do migrate into the core become necrotic and so the cell population are commonly found to be concentrated at the periphery of the scaffold. b). Preformed polymeric scaffolds have received

---

attention in the area of bone reconstruction because they provide a temporal and spatial environment for new bone tissue ingrowth. However, these preformed scaffolds have their drawbacks, as demonstrated in animal tests and clinical applications. Issues such as: reduced mechanical properties, poor surgical performance, and morphological mismatch with irregularly-shaped defects, have been observed. In this study, we have tried to overcome these problems.

Section 1. The 3D porous scaffold with micro channels fabricated by phase separation was used in rabbit radius bone defect repair. In order to overcome the block of material exchange of the traditional scaffold, a novel kind of porous scaffold with micro channels was designed and fabricated by the method of phase separation. In detail, a certain amount of the PLGA and HA (Nanjing Emperor Nano Material Co.,Ltd, China) (HA: PLGA (w/w) = 1:9) were added to NMP (Aladdin Industrial Co., Ltd, China). After being sealed in conical flask, the composite (PLGA/HA/NMP) was heated to 70 °C for 3 h to promote PLGA dissolution. Then, the composite was fabricated by blending sodium chloride as a porogen (200-300 μm). Then the composite was laid in homemade molds and immersed in water for 72 h. Finally the scaffold was obtained after frozen-dried. SEM showed that microchannels were distributed in the pore surface and cross-section. The size of the micro channels is approximately 1μm, which is in favor of materials' exchange. The compression testing showed that the mechanical strength can reach to 1-4 MPa. The scaffold improved cell proliferation which was much higher than the scaffold fabricated by mould molding method. Furthermore, the PS scaffold has better ability to induce cell differentiation because of much more HA exploration. The animal test showed that PS scaffold possessed better capacity of mineralization than MM scaffold because of more quantity of new bone formation in PS scaffold.

Section 2: The injectable PLGA/HA/GMs composites were fabricated and applied on calvarial bone defect. In order to figure out the issues that reduced mechanical properties, poor surgical performance, and morphological mismatch with irregularly-shaped defects, we fabricated injectable PLGA/HA/MGs composite with uncross-linked GMs as porogen and rhBMP-2 delivery system. In detail, a certain amount of the PLGA and HA mixtures were added to NMP. After being sealed in conical flask, the composite (PLGA/HA/NMP) was heated to 70 °C for 3 h to promote PLGA dissolution. Then, the injectable scaffold was fabricated by blending GMs and GMs/rhBMP-2 as a porogen (200-300 μm). The mechanical strength of the hardened scaffolds can be regulated to fit the application. The animal test showed that the injectable scaffold possessed good capacity of mineralization and



osteogenesis, especially after carrying rhBMP-2. Although the NMP was involved in the injectable scaffolds, no tissue damage appeared in heart, lung, liver, spleen and kidney.

Section 3: The injectable 4D scaffold was fabricated and applied on rabbit bone defect repair. The preformed scaffolds have their drawbacks, as demonstrated in animal tests and clinical applications. Issues such as: reduced mechanical properties, poor surgical performance, and morphological mismatch with irregularly-shaped defects, have been observed. It motivated the development of novel injectable systems that can fill defects well, allowing in situ solidification within the host while retaining high initial mechanical strength and appropriate porosity. In this study, a four-dimensional (4D) scaffold was fabricated by incorporating gelatin microspheres (GMs) into a PLGA-based injectable implant. This was done to create an in situ morphological match and to accomplish time-dependent pore formation as GMs degradation. The special scaffold displayed a nonporous design in its baseline configuration to provide high strength early in the application period; a gradual, time-dependent, pore-forming process follows this initial stage to provide space for cell invasion. We expect our work can lay the foundation for the production of a 4D injectable implant that aids the healing process by maintaining mechanical support during active bone tissue ingrowth.

In the studies, we have developed the traditional 3D scaffold successfully. 1. We have designed and prepared the porous scaffold with micro channels which were favorable for material exchange and further improved bone regeneration; 2. We have designed injectable 3D scaffold to fit the undesired irregular bone defects; 3. We designed and fabricated injectable 4D bone tissue engineering scaffold. The special scaffold displayed a nonporous design in its baseline configuration to provide high strength early in the application period; a gradual, time-dependent, pore-forming process follows this initial stage to provide space for cell invasion.

**Keywords:**

Four-dimensional PLGA-based scaffolds, time-dependant pore forming, pore formation *in situ*, high mechanical strength, injectable



# 目 录

前 言	I
中文摘要	III
Abstract	VII
中英文缩略词对照表	XIII
第 1 章 绪 论	1
1.1 天然骨特点	2
1.1.1 组成成分	2
1.1.2 天然骨结构	2
1.1.3 骨的生物力学	4
1.2 骨移植物分类	6
1.2.1 自体移植物	7
1.2.2 同种异体移植	8
1.2.3 异种骨移植	9
1.2.4 已塑性组织工程材料	12
1.2.4.2 高分子与羟基磷灰石复合支架	14
1.2.5 可注射生物材料	16
1.3 展 望	25
第 2 章 相分离法制备微通道多孔聚合物支架修复骨缺损	27
2.1 前言	27
2.2 实验部分	27
2.2.1 实验材料	28
2.2.2 仪器设备	28
2.2.3 支架制备	28
2.2.4 材料表征	29
2.2.5 细胞增殖及分化实验	30
2.2.6 体内修复兔桡骨缺损实验	31
2.2.7 统计学处理	31
2.3 结果和讨论	32
2.3.1 支架材料的微观结构	32
2.3.2 机械强度	36
2.3.3 细胞的增殖分化	38
2.3.4 体内修复兔桡骨缺损	38
2.4 结 论	40
第 3 章 可注射聚乙酯-丙交酯/纳米羟基磷灰石/可降解明胶微球复合支架修复小鼠颅骨缺损	43
3.1 前言	43
3.2 材料与方法	45
3.2.1 原料和试剂	45
3.2.2 材料制备	45
3.2.3 理化性质表征	45
3.2.4 材料的细胞毒性检测	46

3.2.5	小鼠颅骨修复实验.....	46
3.3	结果与讨论.....	48
3.3.1	材料可注射性.....	48
3.3.2	材料的机械强度.....	50
3.3.3	细胞毒性.....	50
3.3.4	颅骨缺损修复.....	51
3.3.5	材料体内安全性评价.....	54
3.4	结论.....	54
第4章	可注射4D支架修复兔桡骨骨缺损.....	57
4.1	前言.....	57
4.2	材料与方法.....	59
4.2.1	原料和试剂.....	59
4.2.2	交联明胶微球(MGs)及含有rhBMP-2的MGs的(MGs/ rhBMP-2)制备.....	59
4.2.3	可注射4D支架的制备.....	59
4.2.4	可注射3D支架的制备.....	60
4.2.5	材料降解行为.....	60
4.2.6	注射性和原位固化能力.....	60
4.2.7	机械强度.....	61
4.2.8	孔隙率.....	61
4.2.9	兔桡骨缺损修复.....	61
4.3	结果与讨论.....	61
4.3.1	溶剂溶解能力.....	61
4.3.2	支架稳定性.....	63
4.3.3	时间依赖性降解.....	65
3.3	兔桡骨缺损修复.....	71
3.4	展望.....	71
3.5	结论.....	72
第5章	结    论.....	75
	参考文献.....	77
	作者简介及在学期间所取得的科研成果.....	95
	致    谢.....	97