

分类号: R214, R689, 063

单位代码: 10183

研究生学号: 2006721020

吉林大學
博士学位論文

于 婷

2009年5月



新型电活性可降解纳米复合骨修复材料的制备
及生物活性研究

A novel electroactive biodegradable polymeric nano-composite
for bone repair: preparation and study on the
biological activity

作者姓名：于 婷

专业名称：卫生毒理学

研究方向：食品毒理学

指导教师：刘 娅 教授

学位类别：医学博士

培养单位：公共卫生学院

论文答辩日期：2009 年 5 月 29 日

授予学位日期：2009 年 月 日

答辩委员会主席：迟宝荣

论文评阅人：金宇一 吴坤 李百祥 黄宇彬 杨军

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：所呈交博士学位论文，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表明。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：于婷

日期：2009年5月29日

内容提要

羟基磷灰石 (HA) 是人体骨组织和牙齿的主要无机成分, 人工合成的HA由于其成分和结构与骨骼相似, 且与骨组织具有很强的结合能力, 在骨科具有广泛的应用前景。聚(乳酸-乙醇酸) (PLGA) 是已被FDA许可应用于临床的生物可降解高分子材料, 将纳米化HA (n-HA) 与PLGA复合可以显著提高PLGA的力学强度和成骨性能, 因而成为近年来的研究热点。为改善纳米粒子的分散性, 本研究采用低聚乳酸表面接枝改性的n-HA (op-HA), 与PLGA共混制成新型纳米复合材料op-HA/PLGA, 并采用熔体模压/颗粒浸出法制备出不同孔隙率的三维组织工程支架。分析支架材料的孔隙结构特征和力学强度。通过细胞培养、流式细胞仪、Realtime-PCR评价成骨细胞在材料表面的粘附、扩展、增殖和成骨相关基因的表达情况; 通过动物实验, 研究支架材料对兔桡骨缺损的修复效果。探讨op-HA/PLGA的生物活性和支架材料的最佳致孔剂比例。

在上述工作基础上, 为进一步提高材料的生物活性和智能性, 将可生物降解的导电高分子聚苯胺(PA)和聚乳酸(PLA)的嵌段共聚物(PAP)与op-HA/PLGA以一定比例复合, 制备电活性可降解纳米复合骨修复材料(PAP/op-HA/PLGA)。通过细胞毒性实验、全身急性毒性实验和热原实验来评价材料的生物安全性; 同时, 在一定的脉冲电刺激作用下, 研究该电活性材料对成骨细胞的粘附、生长和增殖能力以及成骨相关基因表达的影响; 通过动物植入实验, 评价支架材料对兔桡骨缺损的再生修复功能。

研究表明, op-HA/PLGA复合材料由于掺入了HA纳米粒子, 其细胞粘附、扩展和增殖能力, 以及I型胶原等成骨相关基因的表达水平均明显提高; 三维支架材料的力学性能和动物骨骼修复效果以85%致孔剂为最佳。电活性纳米复合材料PAP/op-HA/PLGA具有良好的生物相容性, 在脉冲电刺激的作用下, 明显增强成骨细胞的粘附、生长和增殖能力, 促进成骨活性基因的表达; 将该材料与op-HA/PLGA结合应用, 在脉冲电刺激作用下, 可显著提高骨骼的愈合速度和愈合质量。该新型智能材料显示了良好的骨科临床应用前景。

本研究通过对op-HA/PLGA纳米复合材料和电活性PAP/op-HA/PLGA纳米复合材料的生物相容性、成骨活性和骨修复能力进行详细深入研究, 为新材料的制备和临床应用提供了实验依据。

目 录

内容提要.....	1
中英文缩略语.....	1
第 1 章 绪论.....	2
1.1 骨组织工程概述.....	2
1.1.1 骨的生物学特性.....	2
1.1.2 骨组织工程的基本原理.....	2
1.2 骨组织工程材料.....	4
1.2.1 医用高分子材料.....	5
1.2.2 生物陶瓷材料.....	8
1.2.3 复合材料.....	10
1.3 组织工程支架的制备技术.....	12
1.3.1 组织工程支架的基本性能.....	12
1.3.2 组织工程支架的制备方法.....	12
1.4 导电高分子材料.....	14
1.4.1 聚苯胺.....	15
1.4.2 聚吡咯.....	16
1.5 电信号刺激在骨组织工程中的应用.....	16
1.5.1 常用的电刺激仪.....	17
1.5.2 电刺激促进骨修复的动物实验研究.....	17
1.5.3 电刺激在临床骨修复中的应用.....	17
1.5.4 电刺激对骨组织工程种子细胞的作用.....	18
1.6 研究内容、目标及创新.....	18
1.6.1 研究内容.....	18
1.6.2 研究目标.....	19
1.6.3 本研究创新点.....	19
第 2 章 新型可降解高分子纳米复合骨修复材料 OP-ITGA/PLGA 的制备及性能表	

征.....	20
引言.....	20
2.1 材料和方法.....	20
2.1.1 实验仪器和试剂.....	20
2.1.2 新型可降解高分子纳米复合骨修复材料 op-HA/PLGA 的制备.....	21
2.1.3 op-HA/PLGA 的性能检测.....	22
2.1.4 op-HA/PLGA 多孔材料生物力学测试.....	23
2.2 结果.....	23
2.2.1 新型骨修复材料 op-HA/PLGA 的制备.....	23
2.2.2 新型骨修复材料 op-HA/PLGA 的性能.....	24
2.3 讨论.....	28
2.3.1 op-HA/PLGA 纳米复合材料的制备.....	28
2.3.2 支架材料的制备.....	29
2.4 小结.....	30
第 3 章 新型可降解高分子纳米复合骨修复材料 OP-HA/PLGA 的粘附、增殖和成骨活性的评价.....	31
引言.....	31
3.1 材料和方法.....	31
3.1.1 实验材料.....	31
3.1.2 成骨细胞的分离培养.....	32
3.1.3 op-HA/PLGA 对兔成骨细胞粘附性的影响.....	33
3.1.4 op-HA/PLGA 对兔成骨细胞增殖的影响.....	34
3.1.5 逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测材料对成骨细胞基因表达的影响.....	34
3.1.6 材料的生物矿化能力分析.....	36
3.1.7 统计学处理.....	36
3.2 结果.....	36
3.2.1 成骨细胞培养.....	36

3.2.2 细胞粘附实验.....	37
3.2.3 细胞增殖实验.....	38
3.2.4 RT-PCR 检测结果.....	39
3.2.5 材料的生物矿化能力分析.....	41
3.3 讨论.....	43
3.3.1 成骨细胞的原代培养.....	43
3.3.2 材料对细胞粘附、增殖能力的影响.....	43
3.3.3 材料对成骨活性的影响.....	44
3.3.4 材料的生物矿化能力分析.....	45
3.4 小结.....	45
第4章 不同孔隙率的新型可降解高分子纳米复合骨修复材料 OP-HA/PLGA 的兔桡骨缺损修复实验研究.....	46
引言.....	46
4.1 材料方法.....	46
4.1.1 主要药品、仪器和实验动物.....	46
4.1.2 实验方法.....	47
4.2 结果.....	48
4.2.1 大体观察.....	48
4.2.2 X 光片评价.....	48
4.3 讨论.....	51
4.3.1 兔桡骨缺损模型的建立.....	51
4.3.2 多孔支架材料对骨组织代谢的影响.....	51
4.3.3 不同孔隙率支架材料对骨修复的影响.....	52
4.4 小结.....	52
第5章 新型电活性可降解高分子纳米复合骨修复材料 PAP/OP-HA/PLGA 的制备.....	54
引言.....	54
5.1 材料和方法.....	55

5.1.1	主要试剂与仪器.....	55
5.1.2	PAP 嵌段共聚物的制备.....	55
5.1.3	新型骨修复材料 op-HA/PLGA 的制备.....	55
5.1.4	PAP/op-HA/PLGA 的制备.....	56
5.1.5	PAP/op-HA/PLGA 膜的制备.....	56
5.1.6	PAP/op-HA/PLGA 多孔膜的制备.....	56
5.1.7	PAP/op-HA/PLGA 的表征.....	57
5.2	结果.....	57
5.2.1	紫外可见光谱 (UV-vis) 分析.....	57
5.2.2	循环伏安 (CV) 扫描.....	58
5.2.3	电导率测量.....	59
5.2.4	膜表面形貌.....	59
5.3	讨论.....	60
5.3.1	支架材料制备方法与材料的性能.....	60
5.3.2	PAP/op-HA/PLGA 的电化学活性.....	61
5.3.3	PAP/op-HA/PLGA 膜表面形貌.....	61
5.4	小结.....	62
第6章 新型电活性可降解高分子纳米复合骨修复材料 PAP/OP-HA/PLGA 的生物相容性评价.....		63
引言.....		63
6.1	材料和方法.....	63
6.1.1	实验材料.....	63
6.1.2	成骨细胞的分离培养.....	65
6.1.3	细胞毒性试验 ^[96]	65
6.1.4	全身急性毒性实验.....	66
6.1.5	热原实验 ^[98]	66
6.1.6	统计学处理.....	67
6.2	结果.....	67

6.2.1 细胞毒性实验结果.....	67
6.2.2 全身急性毒性实验.....	68
6.2.3 热原实验.....	69
6.3 讨论.....	69
6.3.1 体外细胞毒性实验.....	69
6.3.2 急性毒性实验.....	70
6.3.3 热原实验.....	70
6.4 小结.....	71
第7章 新型电活性可降解高分子纳米复合骨修复材料 PAP/OP-HA/PLGA 的成骨活性实验.....	72
引言.....	72
7.1 材料和方法.....	72
7.1.1 试剂和仪器.....	72
7.1.2 实验材料.....	73
7.1.3 电刺激装置的制备.....	73
7.1.4 实验分组.....	74
7.1.5 细胞接种.....	74
7.1.6 细胞粘附实验.....	74
7.1.7 细胞周期检测.....	74
7.1.8 成骨活性相关基因的表达.....	75
7.2 结果.....	75
7.2.1 细胞粘附实验.....	75
7.2.2 细胞周期检测.....	77
7.2.3 成骨活性相关基因的表达.....	78
7.3 讨论.....	81
7.3.1 细胞粘附实验.....	81
7.3.2 细胞周期检测.....	82
7.3.3 成骨活性相关基因的表达.....	82

7.4 小结.....	83
第 8 章 电刺激对兔骨缺损修复的实验研究.....	84
引言.....	84
8.1 材料和方法.....	84
8.1.1 主要仪器和试剂.....	84
8.1.2 实验动物.....	85
8.1.3 骨修复材料的制备.....	85
8.1.4 兔桡骨缺损模型的制备及动物分组.....	85
8.1.5 电刺激骨修复部位.....	85
8.1.6 术后观察.....	86
8.1.7 成骨活性相关基因检测.....	86
8.2 结果.....	86
8.2.1 大体观察.....	86
8.2.2 X 光片评价.....	86
8.2.3 骨修复部位的成骨活性.....	88
8.3 讨论.....	90
8.3.1 电刺激在骨修复中的应用.....	90
8.3.2 成骨活性相关基因的表达.....	91
8.4 小结.....	92
参考文献.....	93
攻读博士期间发表的论文.....	115
致 谢.....	117
中文摘要	
ABSTRACT	