

· 基础研究 ·

3D打印PLGA支架修复大鼠上颌骨缺损的实验研究

杨祖坤, 贾璐, 韩利萍, 孙柳絮, 郭宇, 夏阳*

南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 江苏 南京 210029

[摘要] **目的:**探讨3D打印聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)支架修复大鼠上颌骨缺损的效果。**方法:**将PLGA溶解于丙酮中,利用3D打印机打印出间距为100 μm、单层厚度为60 μm的圆盘形网格状支架材料。将12只大鼠随机分为2组($n=6$),制备直径为3 mm的上颌圆形骨缺损,实验组在骨缺损中植入3D打印的PLGA支架后缝合关闭缺损,对照组术后仅缝合关闭缺损。术后8周处死大鼠,行micro-CT及组织学检测观察缺损处骨组织修复情况。**结果:**成功制备3D打印PLGA支架。大鼠上颌骨缺损造模后8周,植入3D打印PLGA支架的实验组骨体积分数(bone volume/total volume, BV/TV)大于对照组($P < 0.05$),骨缺损未愈合面积小于对照组($P < 0.05$)。通过上颌骨组织HE染色,发现实验组骨缺损边缘有大量新生骨质,而对照组只有少量新生骨质。**结论:**3D打印PLGA支架能够促进大鼠上颌骨缺损的骨再生。

[关键词] 3D打印;PLGA支架;骨缺损;骨再生

[中图分类号] R783

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)08-1125-05

doi:10.7655/NYDXBNS20200808

Effects of PLGA scaffold fabricated by 3D printing on the repair of rat palate bone defect

YANG Zukun, JIA Lu, HAN Liping, SUN Liuxu, GUO Yu, XIA Yang*

Jiangsu Key Laboratory of Oral Disease, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of 3D-printed poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) scaffold on the repair of rat palate bone defect. **Methods:** The PLGA was dissolved in acetone, and disc-shaped mesh scaffolds having pores with diameters of 100 μm and a single layer thickness of 60 μm were printed using a 3D printer. Twelve rats were randomly divided into two groups ($n=6$) to create round palate bone defects with a diameter of 3 mm. The bone defect in the experimental group was implanted with a 3D-printed PLGA scaffold and sutured to close the defect, while in the control group the defect was sutured to close only. The rats were sacrificed after 8 weeks, and the bone defect repair was evaluated by using micro-CT and histological analysis. **Results:** 3D-printed PLGA scaffolds were successfully fabricated. Eight weeks after the establishment of the palate defects model in rats, the bone volume/total volume (BV/TV) of the experimental group implanted with the 3D-printed PLGA scaffold was significantly higher than the control group ($P < 0.05$), and the unhealed area of the bone defect was also smaller than that of the control group ($P < 0.05$). HE staining of the palate bone tissue showed that a large amount of new bone was formed at the edge of the defect in the experimental group, while the control group had only a small amount of new bone. **Conclusion:** 3D-printed PLGA scaffold can promote the bone regeneration in palate bone defect.

[Key words] 3D printing; PLGA scaffold; bone defect; bone regeneration

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(08): 1125-1129]

骨缺损在口腔医学中常见,如牙周炎的牙槽骨

吸收,拔牙后的牙槽窝,新生儿腭裂中的骨缺损。目前,针对口腔颌面部的骨缺损治疗方法是自体骨移植、同种异体骨移植和人工代用品,但是这些方法都很少在上颌骨缺损中使用。上颌骨缺损治疗使用最多的方法是外科成型修复和赝复体修复。但是外科手术操作复杂,赝复体修复后难以清洁导致维护困难,以及赝复体沉重,余留牙及周围组织

[基金项目] 国家自然科学基金(81771044);东南大学-南京医科大学合作研究项目(2242018K3DN16);江苏省青蓝工程项目,江苏省青年医学人才(QNRC2016853);江苏高校优势学科建设工程资助项目(2018-87)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xiayang@njmu.edu.cn

有限导致其固位不足等问题^[1],临床急需一种更有效的修复方法。骨组织工程技术近些年来蓬勃发展,在骨缺损部位植入生物材料,在其降解的同时能够诱导成骨细胞等不断增殖,从而达到修复骨组织缺损的目的。能否利用骨组织工程,在上颌骨缺损中植入支架材料促进其骨缺损的修复?

聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)是一种可降解的功能高分子有机化合物,具有良好的生物相容性、无毒、良好的成囊和成膜的性能,被广泛应用于制药、医用工程材料和现代化工业领域。3D打印技术的发展使得PLGA的应用得以推广。3D打印支架就是在电脑上设计一个完整的三维立体的支架模型,再利用3D打印机与电脑相连,通过印刷头输出,最终将计算机上的模型变成实物。3D打印技术在临床上已有较多应用^[2-3]。本研究设计并制备3D打印PLGA支架,研究其对大鼠上颌骨缺损的修复作用,在植入支架后的8周利用micro-CT及组织学检查等方法,评价其对骨缺损的修复情况,期望3D打印的PLGA支架在大鼠体内能够起到促进上颌骨缺损修复的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

SD雄性大鼠12只,6周龄,约180 g,SPF级(南京医科大学动物实验中心,饲养于南京医科大学峨嵋岭动物房)。3D打印机(深圳Adventure公司),PLGA(济南岱罡生物科技有限公司),扫描电子显微镜(Ultra Plus公司,德国),HE染色试剂盒(上海碧云天),micro-CT(SkyScan 1176, Bruker公司,德国),正置荧光显微镜(DM4000B, Leica公司,德国),全自动半薄轮转切片机(RM2265, Leica公司,德国),全封闭组织脱水机(Histocore Pearl公司,德国),模块化组织包埋系统(Histocore Arcadia公司,德国),EDTA脱钙液(北京雷根),丙酮,75%酒精,10%水合氯醛,10%中性福尔马林。本研究经本院动物伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 3D打印PLGA支架的制备

称取10 g PLGA溶解于40 mL丙酮中,65℃搅拌3 h,将溶液装到针筒中待打印。打印机为Adventure 3D-LB-Printer(深圳奇遇科技有限公司)。打印方法简述如下:在室温下用直径为50 μm左右的玻璃针头进行打印,速率为600 mm/min,压力为50 PSI(1 PSI=6.895 kPa),打印出间距为100 μm、单层高

度为60 μm、直径为3 mm的支架材料。并对支架进行电子扫描显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察。

1.2.2 动物体内植入实验

将12只SD大鼠随机分为2组,每组6只。用10%的水合氯醛(每100 g体重0.3 mL)通过腹腔注射麻醉后,参考Korn等^[4]的研究,在紧邻上前牙舌侧上颌正中切开黏膜软组织,利用圆柱状金刚砂车针和牙科慢速手机制备一个直径约为3 mm的圆形骨缺损,穿透上颌骨板。实验组放置与骨缺损同等大小的3D打印PLGA支架,对照组不放。缝合软组织关闭创口,术后3 d进软食。

1.2.3 一般情况和大体观察

造模后8周内对大鼠的基本情况进行观察,观察其软组织修复情况,伤口愈合情况,以及体重变化。

1.2.4 micro-CT检测

对大鼠造模后即刻和术后8周处死后用micro-CT(SkyScan 1176,德国Bruker公司)扫描缺损区域,利用CT vox软件对扫描数据进行重建,对比数据后用Image J软件勾画出缺损区域,并进行定量分析,检测骨缺损修复的效果。

1.2.5 组织学检测

造模后第8周处死大鼠,对上颌组织进行固定、脱钙、脱水、包埋、切片等处理,并进行HE染色。从组织学方面检查缺损部位,在正置显微镜下观察切片,研究骨缺损的修复情况。

1.3 统计学方法

所有定量数据均采用统计分析软件SPSS21.0进行独立样本 t 检验,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

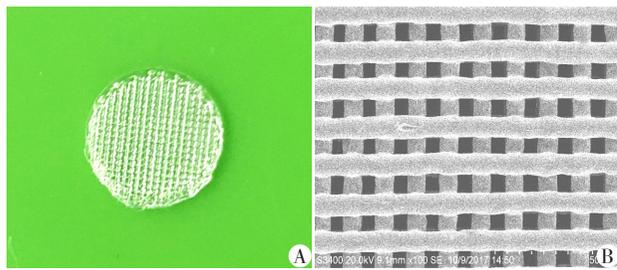
2 结果

2.1 3D打印PLGA支架

3D打印的PLGA支架为直径约30 mm、厚度0.36 mm的圆盘状多孔支架,纤维纵横规则排列,空隙肉眼可见(图1A)。对支架进行SEM检测,支架材料的纤维排列整齐,垂直交错,间距约为100 μm,纤维直径约为60 μm(图1B),表明成功制备了3D打印PLGA支架。

2.2 一般情况和大体观察

所有大鼠术后均存活,在愈合期间内没有出现明显的伤口感染炎症表现,摄食和饮水没有受到明显影响,肉眼可见术后1周骨缺损处软组织完全愈合。在实验期间,大鼠的体重都正常增加。



A: 支架大体图; B: 支架SEM图($\times 100$)。

图1 3D打印支架

Figure 1 3D printing scaffold

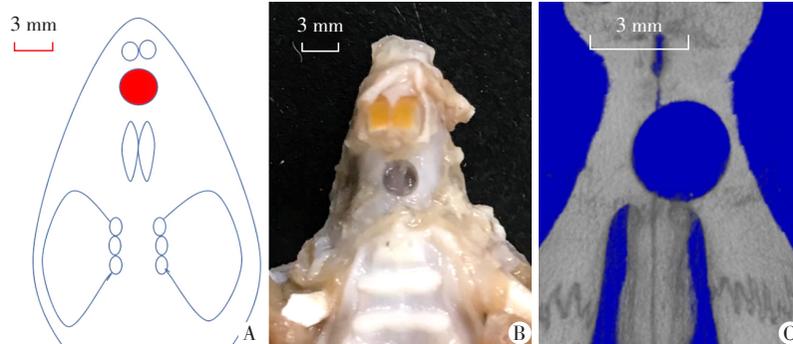
2.3 上颌骨缺损模型表征

本实验所制备的上颌骨缺损在上颌正中,紧邻

大鼠上前牙舌侧,为直径约3 mm的圆形骨缺损(图2A)。在离体骨上制备的上颌骨缺损(图2B)以及用micro-CT扫描离体骨后重建得到的三维骨缺损(图2C),这些图像的一致性均表明造模成功。

2.4 micro-CT检测结果

进行micro-CT三维重建,观察骨缺损修复情况。三维重建结果表明,术后8周各组骨缺损都有不同程度的修复(图3A、B)。二维截图可以更清晰地观察骨缺损的修复情况,对照组骨缺损边缘可见少量新生骨,缺损大小基本没有改变(图3C),而实验组新生骨明显多于对照组,特别是缺损边缘,可见大量新生骨形成(图3D)。用CT-an软件进行定



A: 上颌骨缺损示意图; B: 离体骨上的上颌骨缺损; C: 上颌骨缺损micro-CT图($\times 3$)。

图2 上颌骨缺损模型

Figure 2 Maxillary defect model

量分析(图3E),对照组的骨体积分数(bone volume/total volume, BV/TV)为 $(5.82 \pm 0.9)\%$,而实验组的BV/TV为 $(15.1 \pm 4.95)\%$,两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。用Image J软件对剩余缺损面积进行计算(图3F),对照组的剩余缺损面积为 $(88.7 \pm 4.85)\%$,而实验组的剩余缺损面积为 $(69.23 \pm 10.85)\%$,两组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),说明实验组的修复面积明显大于对照组。

2.5 组织学染色分析

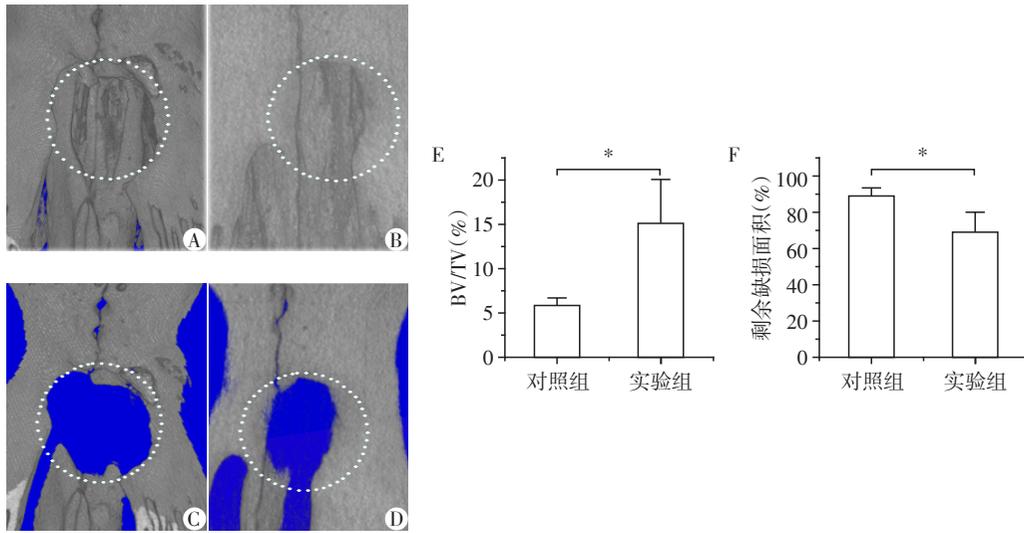
通过Masson染色辅助辨别新骨和旧骨边界,在HE染色切片上发现对照组边界线靠缺损侧有极少量的新生骨生成,它突向骨缺损中央,但是其缺损区域没有明显缩小;而实验组新生的骨量显著多于对照组,尤其是缺损边缘,可见骨小梁生成,并且分散较为均匀,新生骨由骨缺损边缘向缺损中心生长,越接近缺损边缘的新生骨钙化程度越高。高倍镜下观察对照组骨缺损,仅在靠近缺损处见少量新生骨组织;观察实验组骨缺损,可见染色均一的新生骨组织,骨小梁形成良好,新生骨内可见骨细胞,

新生骨边缘可见梭型的成骨细胞,新生骨内及周围可见散在新生血管,并且缺损处有大量结缔组织连接新生骨岛屿(图4)。

3 讨论

本实验将3D打印的PLGA支架植入大鼠上颌骨缺损中,与不植入支架的空白对照组进行了比较,在术后8周,对所有样本进行micro-CT和组织学检测分析剩余的骨缺损面积。根据实验的结果可以得出结论,3D打印的PLGA支架能够促进大鼠上颌骨缺损的骨再生。

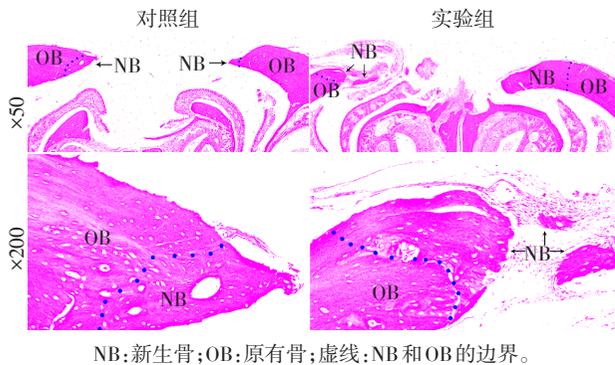
在骨缺损修复评判中,micro-CT检测是一个非常重要的指标。在本实验中,PLGA实验组的BV/TV明显高于对照组,实验组缺损区较对照组新骨形成明显,缺损区域有明显缩小,并且差异具有统计学意义,表明3D打印的PLGA支架促进了成骨。这些观察结果得到了组织学检测结果的支持,即在实验组骨缺损区有明显的骨形成。但是在micro-CT上缺损中心的一些散在细小的成骨没有很好展现出



A: 对照组3D图像; B: 实验组3D图像; C: 对照组2D图像; D: 实验组2D图像; E: 两组BV/TV比较; F: 两组剩余缺损面积比较。A~D: ×4, 白色虚线为缺损边界。两组比较, $P < 0.05 (n=6)$ 。

图3 术后8周的micro-CT图和定量分析结果

Figure 3 Micro-CT image and quantitative analysis at 8 weeks after surgery



NB: 新生骨; OB: 原有骨; 虚线: NB和OB的边界。

图4 HE染色观察骨缺损修复情况

Figure 4 Repair of bone defects by HE staining

来,可能是由于micro-CT拍摄分辨率不够高。这些细节在组织图中依然没有显示,可能是由于制样过程中组织脱钙时长时间剧烈震荡,缺损中心部分组织连同残留支架一同脱落。

骨的生物力学系统是复杂的,因此对理想支架的要求是多种多样的。理想的支架材料必须有以下特点:①能彻底降解;②良好的生物相容性;③能够形成孔隙率为90%以上的三维立体结构,并且能够承受一定的压力^[5]。3D打印支架与传统支架相比有其独到的优势。3D打印技术不仅可以按照缺损的形状来精准设计支架的大小和外形,也能够根据缺损区的力学要求来设计和调整参数,以保证其机械强度及临床需要^[6]。PLGA材料植入体内后,逐渐被降解为乳酸和羟基乙酸,最终被完全降解为二氧化碳和水,对生物体无害,所以PLGA材料被应用于各个方面,如手术缝合线、药物控制释放体系和

骨科固定等,并被美国食品药品监督管理局作为药用辅料收入药典^[6]。在对成骨细胞的作用和骨组织的修复方面,PLGA也得到了广泛应用。杨文峰等^[7]将大鼠骨髓间充质干细胞在PLGA表面培养,发现PLGA可以促进细胞的成骨分化。Penk等^[8]将PLGA植入大鼠胫骨缺损处,4周后发现对缺损的再生有良好的促进作用。

大多数骨缺损修复实验选取大鼠颅顶骨、下颌骨和牙周骨建立缺损模型,而在本实验中将缺损的部位定于上颌。这是因为与颅顶骨缺损相比,上颌骨缺损处于口腔环境中,在愈合过程中更容易受到口腔复杂环境的影响,因此更适合用于口腔复杂环境的研究,比如口腔微生物环境对骨修复的影响,这也是本课题组将来的研究目标。下颌骨缺损和牙周骨缺损模型虽然也在口腔中,但是下颌骨缺损受到骨缺损两侧肥厚的肌肉和黏膜的包裹,因而不易受到口腔环境的影响。牙周骨缺损同时会受到牙和牙周环境两种特殊的口腔环境的影响。上颌骨缺损本身在人群中就有较高的发病率,且其治疗和修复方法一直是临床治疗中的难点。因此,本研究制备了一种可用的上颌骨缺损模型,探索在复杂口腔环境中3D打印的PLGA支架材料对骨缺损修复的影响。

本实验将空白组作为对照,而不是传统的支架材料作为对照,因为不同工艺制备的不同结构的支架之间很难评判究竟孰优孰劣。本研究的目的是并不是要证明3D打印的支架一定优于其他制备工艺,

只是提出3D支架也是一种可行的组织工程支架制备方法。本课题组后期将对3D打印工艺参数进行调整,制备一系列不同孔径和孔隙率的3D支架并进行比较,探索最佳的3D打印支架的制备参数。

由于支架植入体内后有细胞黏附、增殖和分化的作用,所以支架必须要有合适的内部结构。多孔连通的结构不仅有利于细胞的生长,而且有助于营养物质和氧气的流通^[9],而这些都是成骨过程中所必需的。通过SEM检测结果显示,实验中3D打印的PLGA支架是规则的网状结构,这使其具有良好的内部连通性,这对新骨的形成创造了有利的条件。连通孔的大小也是骨生长的关键因素之一,本实验支架纤维的间距约为100 μm,尽管有不同的观点,但是100~400 μm可能是较适宜的孔隙大小^[10]。另外,这种纵横交错的排列方式形成了方形的结构可能也对成骨有促进作用,如Aliabouzar等^[11]发现这种方形的孔隙结构在细胞生长和软骨形成方面比六边形的结构有更好的表现。有研究报道,支架的孔隙率会影响细胞的行为^[12]。本实验中3D打印的PLGA支架纤维具有中空的内部结构,这样的结构使其具有极高的孔隙率。Paulius等^[10]制作了孔隙率为70%、82%、86%和90%的支架,发现植入低孔隙率(70%)的支架后不能很好地支持细胞的生长,而对于其他高孔隙率的支架,前成骨细胞在支架植入后的早期就有很强的黏附,随后发生显著的细胞增殖。这是因为孔隙率增大时,材料与细胞的接触面积就会增大,从而促进成骨细胞在支架材料中的黏附与定植。这种多孔的结构和较大的表面积,使其吸附红细胞和血小板的能力增强,从而形成更稳定的血凝块^[13]。血凝块的质量对早期骨缺损的成功愈合至关重要,因为纤维蛋白凝块的结构会显著影响从邻近组织进入纤维蛋白网络的骨再生所必需的细胞的浸润^[14]。

本实验结果表明,3D打印PLGA支架可以促进大鼠上颌骨缺损的骨再生,但仍存在一定局限性,如选取的检测时间点只有一个,没有对多个时间点进行比较,没有设置商业骨粉材料作为对照组等,这些均有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 罗恒,冯云枝. 上颌骨缺损的分类及其修复方式的选择[J]. 广东解剖学通报, 2013, 35(6): 454-457

- [2] 倪磊,唐凯,张志群,等. 3D打印技术在儿童复杂性Pilon骨折手术治疗中的应用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2016, 36(8): 1005-1008
- [3] 黄丽娟,景双林,聂蓉蓉,等. 3D打印技术制作可摘局部义齿支架的应用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2016, 36(10): 1259-1262
- [4] KORN P, SCHULZ M C, RANGE U, et al. Efficacy of tissue engineered bone grafts containing mesenchymal stromal cells for cleft alveolar osteoplasty in a rat model[J]. J Craniomaxillofac Surg, 2014, 42(7): 1277-1285
- [5] BOSE S, ROY M, BANDYOPADHYAY A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds [J]. Trends Biotechnol, 2012, 30(10): 546-554
- [6] 折胜利,罗兰,宋兴华. PLA/PLGA共聚物在组织工程中的应用[J]. 组织工程与重建外科, 2011, 7(4): 235-237
- [7] 杨文峰,任远飞,梁武,等. PLGA电纺丝对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 现代医学, 2017, 45(5): 623-627
- [8] PENK A, FÖRSTER Y, SCHEIDT H A, et al. The pore size of PLGA bone implants determines the de novo formation of bone tissue in tibial head defects in rats[J]. Magn Reson Med, 2013, 70(4): 925-935
- [9] 田银平,刘湘宁,姚洁,等. 3D生物打印支架的微孔结构与孔隙率的研究进展[J]. 分子影像学杂志, 2019, 42(1): 81-86
- [10] PAULIUS D, LEONI G, CHRISTOPHER J P, et al. The effect of porosity on cell ingrowth into accurately defined, laser-made, polylactide-based 3D scaffolds [J]. Applied Surface Science, 2015, 336: 2-10
- [11] ALIABOUZAR M, LEE S J, ZHOU X, et al. Effects of scaffold microstructure and low intensity pulsed ultrasound on chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Biotechnol Bioeng, 2018, 115(2): 495-506
- [12] LI J, CHEN M, FAN X, et al. Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects[J]. J Transl Med, 2016, 14: 271
- [13] 许零,马晓春,曾莉君,等. 复合大孔聚多糖止血材料的制备及其体外性能研究[J]. 中国医药导报, 2018, 15(11): 17-20
- [14] WANG X, FRIIS T E, MASCI P P, et al. Alteration of blood clot structures by interleukin-1 beta in association with bone defects healing[J]. Sci Rep, 2016, 6: 35645

[收稿日期] 2019-11-10