

# 材料与方 法

## 1. 材料和方法

### 1.1. 主要材料、试剂及仪器:

猪膝关节软骨(太原市屠宰场)

磷酸盐缓冲溶液(PBS,pH=7.40 , 自己配制并消毒)

胰蛋白酶(Gibico , 美国)

PLGA(PLA:PGA=75:25 粘均分子量 20 万 , 山东济南岱罡生物科技有限公司)

氯化钾(哈尔滨化学化工制剂厂)

1,4 一二氧六环溶剂(天津外环化工有限公司)

MIAS-2000 型图像分析系统(四川川大智胜软件股份有限公司)

FD-1 真空冷冻干燥机 ( 北京博医康技术公司 )

Instron 5544 型材料性能测试机(北京英斯特朗公司)

### 1.2. 实验分组 :

根据 PLGA 与脱细胞软骨基质的构成比进行实验分组 , 即不加入脱细胞软骨基质组为对照组(PLGA 组) , 构成比为 1.5:1 组为实验 1 组(1.5:1 组) , 构成比为 3:1 组为实验 2 组(3:1 组) 。 每组又按 3 种不同的实验温度(5 , -10 , -20 )分为 3 组。 各组样本量均为 30 份。

### 1.3. 脱细胞软骨基质的制备

获取新鲜猪关节软骨 , 然后用磷酸盐缓冲液 ( PBS 缓冲液 ) 冲洗 , 去净表面组织 , 放于 0 ℃ 冷冻、过夜。将软骨切成 1\*1cm 大小 , 厚度为 2mm 左右的软骨片 , 然后放入 1.5mmol/L KCL 溶液中 , 浸泡四小时。 随后将浸泡于 KCL 溶液中的新鲜软骨片取出 , PBS 液冲洗 12 小时 , 后放入 PH 值调为 7.76 的胰酶 ( 已消毒 ) 溶液中 , 盖上容器的盖。 将胰酶软骨混合液放入 37 ℃ 、体积分数为 0.05 的 CO<sub>2</sub> 水浴箱中振荡 , 在水浴箱中使胰酶和软骨充分作用 , 每隔 24 小时更换一次胰酶 , 72 小时后取出软骨片 , 用 PBS 液冲洗 12 小时。 最终制得脱细胞软骨基质。 并对软骨脱细胞前后进行 HE 染色和 Masson 染色 , 以确认软骨基质已完全脱细胞并且脱细胞后软骨基质的主要成分 Ⅰ 型胶原依然存在。 本实验方法在王克学<sup>[9]</sup>胰蛋白酶脱细胞方法的基础上进行了改进 , 将脱细胞的时间延长为 72 小时 , 并且每 24 小时更

换一次胰酶，并设对照组进行观察，评价本方法脱细胞的效果。见图 3 图 8

#### 1.4. PLGA 支架及 PLGA/脱细胞软骨基质支架制备:

将经环氧乙烷消毒的 PLGA 置于纯 1,4-二氧六环溶剂中，在磁力搅拌机上搅拌 24 小时，直至溶液变成透明，显示 PLGA 已均匀的分布于 1,4-二氧六环溶液中，制备浓度为 10% PLGA 溶液。分装该溶液至直径为 2cm 的 Teflon 试管并迅速放入 5℃, -10℃, -20℃ 的恒温冰箱中凝固、结晶。同上述步骤，按 PLGA 与脱细胞软骨基质质量构成比为 1.5:1 和 3:1 来配制 PLGA 浓度为 10% 的 PLGA/脱细胞软骨基质溶液，然后迅速倒入试管后放入 5℃, -10℃, -20℃ 的恒温冰箱中过夜保存。24 小时后将得到的凝固体在冷冻干燥机中干燥 48 小时，此时就制得温度比例不同的 PLGA 和 PLGA/脱细胞软骨支架。

## 2. 支架各种性能的测定：

### 2.1. 支架降解性能测定:

将试样真空干燥至恒重( $W_0$ )后放入盛有人工降解液(Hank 溶液，pH=7.4)的试管中(固液比为 1:20),置于 37℃ 中密闭降解，经一定时间后取出，蒸馏水清洗并干燥至恒重( $W_t$ )，然后测试降解试样的降解率(d)。计算公式： $d = (W_0 - W_t) / W_0 \times 100\%$ 。将制备的各支架材料放入 Hank 溶液，分别于第 1 周、第 2 周、第 3 周、第 4 周取出并计算降解率<sup>[10]</sup>。

### 2.2. 亲水性测定：

将 10mg 支架材料置于 3ml 的 PBS(pH=7.2)中并在 20℃ 下孵育 1 小时，测量支架的湿重。计算水结合力:水结合力=(湿重-干重)/干重<sup>[11]</sup>。

### 2.3. 支架孔径测定:

取制成的支架材料并切成薄片，应用图像分析仪计算每个薄片中的平均孔径，从而算得不同实验条件下制备的不同支架材料的孔径大小，并进行统计学分析。<sup>[12]</sup>

### 2.4. 支架孔隙率测定:

应用排液法测定样品的孔隙率，即用分析天平称重后放入盛有一定容积( $V_1$ )无水乙醇的量筒中，然后密封量筒，静置 5~10 分钟，使试样被无水乙醇完全浸透且试样表面无明显气泡，此时的总体积为  $V_2$ ；取出试样，量筒中无水乙醇的容积为  $V_3$ 。试样的体积( $V$ )、孔隙率( $K$ )，按下列公式<sup>[10]</sup>计算： $V=(V_2-V_1)+(V_1-V_3)=V_2-V_3$ ； $K=(V_2-V_1)/(V_2-V_3)$ 。

## 2.5. 生物力学性能的测定：

将不同质量百分比所制成的 PLGA 混合支架裁减为  $2\text{cm}\times 2\text{cm}\times 0.5\text{cm}$  的模块，采用 Instron5544 型材料性能测试机在室温下对其弹性模量进行测定<sup>[11]</sup>。

## 2.6. 统计分析：

数据结果以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，采用 SPSS 13.0 统计学软件包进行统计分析。各支架材料的孔径、孔隙率、亲水性、生物力学强度及降解率选用析因设计方差分析，采用最小显著差数法(LSD)作各组间两两比较。取 0.05 为检验水准。

# 结果

## 1. 结果

### 1.1 不同的实验条件对支架孔径、孔隙率、亲水性、弹性模量的影响

在实验温度不同和聚合物组成比例不同的条件下支架的孔径、孔隙率、亲水性、弹性模量见表 1 表 2。统计学结果示：1.不同的温度对支架的孔径大小有影响 ( $P < 0.05$ ), 随着温度的降低, 支架的孔径在减小。温度对支架的孔隙率、亲水性、弹性模量没有显著影响 ( $P > 0.05$ ) 2.聚合物支架组成比例不同, 对支架的孔径大小、弹性模量没有显著影响 ( $P > 0.05$ ), 但是对支架的孔隙率、亲水性有影响 ( $P < 0.05$ ), 随着聚合物支架中脱细胞基质的增多, 支架的亲水性在增加, 支架的孔隙率在降低。

### 1.2 不同混合比例、不同温度下的聚合物支架降解性能的比较结果

由

图 1 图 2 可见, 材料与温度对支架的降解有明显影响, 在 PLGA 与脱细胞软骨基质比例不变的情况下, 随着在降解时间的延长, 温度较高支架降解率高于温度低的支架。在温度不变的情况下, 脱细胞软骨基质含量多的支架降解的比含量低的支架要快。