

文章编号:1004-7220(2010)01-0004-10

· 专栏论著 ·

方形孔结构细胞支架非线性流固耦合数值计算

翟雅斌, 崔玉红, 李文娇

(天津大学 力学系, 天津 300072)

摘要: 目的 讨论三维方形孔细胞支架不同孔隙率和不同孔半径的对细胞表面固体场和流体场的影响, 以及将多孔支架视为刚性体和非线性变形体对计算结果的影响。方法 采用一种直接耦合解法和两种间接耦合解法, 两种间接耦合解法分别是有限原法(固体模型)与有限差分法(流体模型)耦合、有限原法(固体模型)与有限体积法(流体模型)耦合。对3种流固耦合计算方法的可靠性进行验证。结果 通过对构建的12种模型的计算(50、100和150 μm 三种边长和61%、65%、77%和84%四种孔隙率), 获得了固体模型的应力场、应变场和位移场和流体模型的静压、速度、壁面剪应力和切变率, 并对结果进行了比较分析。结论 将多孔支架视为刚性体和非线性变形体计算结果有一定差别; 孔隙率一定时不同孔半径以及孔半径一定时不同孔隙率条件下对固体场和流体场都有不同程度的影响。

关键词: 数值计算; 流固耦合; 支架; 非线性; 空隙率; 应力

中图分类号: R318.01 **文献标志码:** A

Numerical computation on the scaffolds models with regular square holes using nonlinear fluid-solid-coupling approaches

ZHAI Ya-bin, CUI Yu-hong, LI Wen-jiao (Department of Mechanics, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Objective The influencing parameters of solid and fluid computing fields for the scaffolds models with regular square holes were discussed by nonlinear fluid-solid-coupling approaches. The numerical computational results of which the models were regarded as both rigid body and non-linear elasticity were compared as well. **Method** One direct fluid-solid-coupling approach and two indirect fluid-solid-coupling approaches were adopted, and the calculating reliability of three kinds of fluid-solid coupling methods was verified. **Results** The solid-fluid-coupling computational results are obtained in light of 12 kinds of scaffolds models which are constructed by 3 groups of square side length(50, 100 and 150 μm) and 4 groups of porosity(61%, 65%, 77% and 84%). The field parameters of those solid models including stress, strain and displacement and those fluid models including static pressure, velocity, wall shear stress and strain rate are achieved and compared. **Conclusion** There appear some difference between the results of porous scaffold models as a rigid body and as non-linear elasticity. The different porosity with the same pore radius or the different pore radius with the same porosity would affect the field parameters of solid models and fluid models in varying degrees.

Key words : Numerical computation; Fluid-solid-coupling method; Scaffolds; Nonlinear; Porosity; Stress

目前应力环境下细胞的三维培养方法是将细胞 与三维基质支架的复合物放入铸模里或者加以限

收稿日期:2009-11-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(308706060)。

作者简介:翟雅斌(1986-),男,研究方向:计算力学。

通讯作者:崔玉红, Tel:(022)81774927, E-mail:yhcui@tju.edu.cn。

制,使它们承受剪切应力、张应力,或在其生长过程中受到的已知力,在离体条件下促进细胞生长。在细胞生长的适合时机,施加应力或应变作用是形成组织和推动基因活动的重要因素,这是因为细胞利用自分泌、旁分泌作用来满足自己和细胞相互间的需要。但是至今细胞与支架材料的复合培养在方法学、细胞与材料的相互作用及其机制、应力应变与组织构建的关系及其作用机制、体外构建组织的最适条件等都尚不清晰,是一个值得深入研究的领域。

在活体实验中,Flaherty 等^[1]在犬动脉中研究了内皮细胞核定向与血液流动状态的关系,在血管直域部分,细胞核呈现拉伸状态,取向平行于血流方向,而在入口处细胞核很少呈现有序列的定向和被拉伸状态。Nerem 等^[2]利用兔子动脉血管量化地研究了内皮细胞的大小和形状,得出在血管分支处内皮细胞的形态和取向标识了血液流动的细微特征,他们的结果证实了内皮细胞的形态和动脉粥样硬化存在着关系;而离体实验主要是在可控流的条件下进行的。Dewey 等^[3]通过加载单向稳定剪切流论述了牛上皮细胞取向问题。Levesque 和 Nerem^[4]得出在流体作用下细胞的延伸和取向的变化取决于流体作用的时间和剪应力的大小。Ookawa 等^[5]得出在流场的作用下肌动蛋白微丝的分布变化先于细胞取向变化的发生。在多孔细胞支架与培养液流动的关系方面,Freed 和 Vunjak-Novakovic^[6]利用实验的方法得出许多因素都对软骨的发展起着至关重要的作用,其中机械应力通过增加软骨细胞细胞外基质的产量(ECM)而影响细胞的生长,是细胞生理学的一个重要调控因素。Martin^[7]通过实验得出,在有软骨细胞生长的多孔细胞支架上,流体的流动加速了 ECM 的合成,流体剪切应力拉伸了细胞膜,加速了细胞营养物质的对流传输和分解代谢产物的排出。Hutmacher^[8]得出在直接灌注法培养的生物反应器中,作用于多孔细胞支架的剪应力不仅取决于通过支架孔培养液的流量而且与多孔细胞支架的多孔构型有关。Altman^[9]在 2002 年将更多的精力集中于利用微感应器在线监控生物反应器的新陈代谢参数(例如 pH 值,温度,氧含量)。Davisson^[10]利用生物反应器通过将多孔细胞支架置于培养液的直接灌注中加速了组织工程软骨基质的沉积。O'Brien^[11]于 2005 年通过实验得出孔大小在 95.9 ~ 150.5 μm 之

间,细胞黏附的比率与三维多孔细胞支架的表面积呈线性关系。Raimondi^[12]在生物反应器中通过控制相同的入口流量(0.5 mL/min)通过 4 种不同面积的入口从而得到 4 种不同的作用于多孔细胞支架的壁面剪应力,并利用计算流体动力学的方法模拟出这种情况下多孔细胞支架的壁面剪应力场,利用生物化学的方法分析了这 4 种情况下 DNA 和 sGAG 的含量,发现当壁面剪应力从 4.6 mPa 变化到 56 mPa 时,12 倍壁面剪应力的增加导致了 1.7 倍 DNA 含量的增加和 2.9 倍 sGAG 含量的增加,但是 sGAG 与 DNA 含量的比率却呈现递减的趋势。此外,国内一些学者也进行了相关的实验研究工作,得到了一些比较有意义的结果。

对三维多孔细胞支架从不同孔构型、不同孔隙率和不同孔半径的角度来探讨作用于细胞表面的应力场与应变场的实验研究不是很多,通过实验设备监控和测量出流体作用于三维多孔细胞支架细胞表面的应力值分布的研究比较困难。因此,通过流固耦合数值计算细胞支架中不同孔结构对实验研究有一定的指导意义。本文计算模拟的多孔细胞支架模型是方形孔结构支架模型。

1 计算模型、边界条件和计算参数的选取

基于 Raimondi 等实验模型^[12]和 Boschetti 等^[13]数值计算模型,选取如图 1 所示的方形孔支架的计算模型,它是由 27 个这样的子单元构成多孔细胞支架的微结构。构建过程如下:将多孔细胞支架子结构抽象为从一个边长为 A 的正方体中剪去一个边长为 C 正方体,再分别在六个面上挖去一个和中心空心部分连通边长为 B 的正方孔。建立 1/2 边长(孔半径)分别为 25、50 和 75 μm 的三组模型,每组模型又分别由 61%、65%、77% 和 84% 4 种孔隙率的模型所构成,其各组尺寸及入口平均速度见表 1 所示。

采用 27 个子单元构成(3 组 \times 3 组 \times 3 组)的立方体微结构来表示含正方体孔的三维多孔细胞支架。根据对称边界条件,将 27 个子单元构成的微结构简化,只取 1/4 的模型作为真实的计算模型,如图 1。流体模型在对称面上可以采用两个对称边界条件;入口处为均匀速度入口;出口为自由出流。同时,根据细胞培养时的设计条件,可以将固体模型底

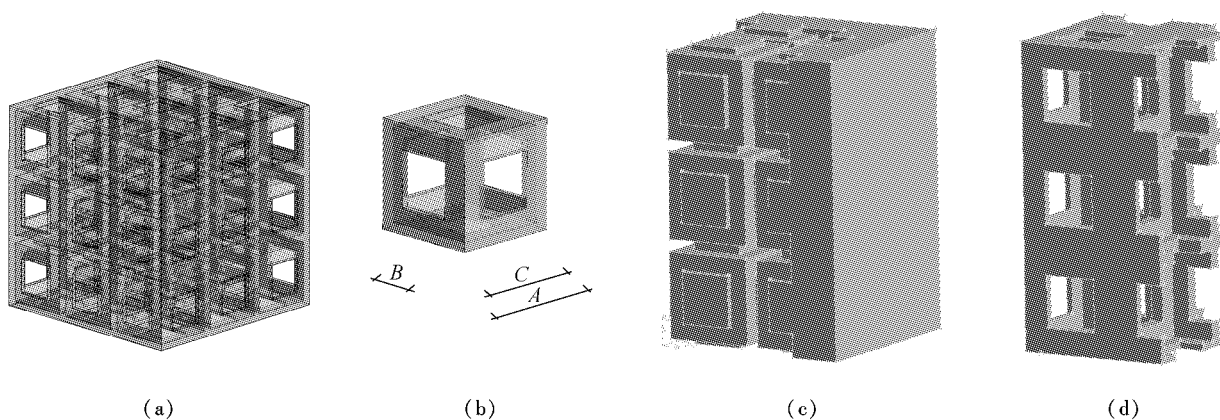


图1 含方体孔多孔细胞支架模型计算模型 (a)方体孔细胞支架模型示意图(b)单个孔模型示意图(c)1/4 流体域模型示意图(d)1/4 固体域模型示意图

Fig.1 The computing model of the scaffolds with regular square holes. (a) the schematic figure of the whole model, (b) the schematic figure of the model with only one hole, (c) the fluid model of 1/4 symmetric figure, (d) the solid model of 1/4 symmetric figure

表1 方形孔细胞支架模型尺寸

Tab.1 The magnitudes of the scaffold models with regular square holes

入口速度 $v/(\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1})$	孔隙率 $P_v/\%$	1/2 边长(孔半径)		
		25 μm	50 μm	75 μm
445	61	$A = 47.2$	$A = 94.2$	$A = 141.4$
		$B = 14.6$	$B = 29.7$	$B = 44.4$
		$C = 38.9$	$C = 77.5$	$C = 116.4$
338	65	$A = 46$	$A = 92.6$	$A = 138.8$
		$B = 17.4$	$B = 33.5$	$B = 50.4$
		$C = 38.3$	$C = 77.5$	$C = 116.1$
163	77	$A = 43.2$	$A = 86.2$	$A = 129.4$
		$B = 22.3$	$B = 44.9$	$B = 67.2$
		$C = 37.8$	$C = 75.3$	$C = 113.1$
105	84	$A = 40.4$	$A = 80.6$	$A = 121$
		$B = 26.1$	$B = 52.5$	$B = 78.6$
		$C = 35.9$	$C = 71.4$	$C = 107.2$

部设为固支边界条件,对称面上采用对称边界条件。在流固交界面上,所有节点的位移 U 和力 σ 相等,即

$$U^S = U^F \quad (1)$$

$$\sigma^S = \sigma^F \quad (2)$$

计算过程中,流场模型孔壁面假设为绝热固壁,采用无滑移边界条件。流体模型未知量计算采用三维变量双精度、二阶迎风差分格式和隐型求解。求解过程时间步长为 1 ms,以速度、连续性方程和出口质量流量 3 个量都作为收敛判据,速度和连续性

方程残差值收敛精度控制在 10^{-8} 量级。流场计算参数以培养液参数为基础,选取密度 $\rho = 1\,000\text{ kg/m}^3$,黏度 $\mu = 8.2 \times 10^{-4}\text{ kg/ms}$ 。上述含正方体孔的多孔细胞支架,雷诺数 $Re = 0.027 \sim 0.126$,属于层流范围。

固体模型采用非线性有限变形几何方程和线行本构方程。固体模型计算参数以 PLLA 支架材料为基础,选取弹性模量 $E = 10^4\text{ KPa}$,泊松比 $\nu = 0.3$,在计算固体模型时均考虑有限变形的影响。

2 3 种流固耦合计算方法的可靠性验证

方形孔细胞支架可以看作固体,支架中的培养液看作流体,支架和培养液的相互作用认为是固体和流体的相互耦合作用。目前,流固耦合计算方法主要包括直接耦合解法和间接耦合解法。直接耦合解法采用描述流体场的变量和描述固体场的变量联立方程进行求解,得出耦合场分析结果。间接耦合解法采用固体场和流体场分别进行独立计算,两种场的计算交叉进行,并将前一个场分析的耦合结构结果作为荷载施加到后一个场耦合结构,得出耦合场分析结果。本文采用了一种直接耦合解法和和两种间接耦合解法分别对耦合方法的计算可靠性进行了验证,其中,间接耦合解法中固体模型均采用有限元法,流体模型分别采用有限差分法和有限体积法。

流固耦合验证模型选取管长为 L 的弹性管的层流流动,示意图见图 2。这里假设:① 介质为牛顿流

体, 雷诺数较低时做定常层流运动; ② 管道为薄壁弹性直圆管, 且有足够的长度, 以致进出口的影响可以不计。

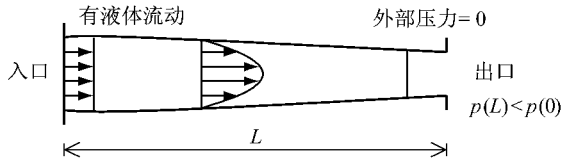


图2 管长为L的弹性管内的层流流动示意图
 Fig.2 The schematic figure of an elastic flow tube

选取该模型的主要原因是在几何方程为小变形假设和有限变形 (Almansi 应变张量) 假设下, 耦合场都存在理论解。其中小变形情况下压力 p 和流量 Q 关系为

$$\frac{24c_2\mu L}{\pi a_0^4} Q = \frac{1}{[1 - c_2 p(0)]^3} - \frac{1}{[1 - c_2 p(L)]^3} \quad (3)$$

有限变形情况下压力 p 和流量 Q 关系为

$$\begin{aligned} & \frac{8}{5} a_0^8 [p^5(L) - p^5(0)] + \frac{8}{3} a_0^6 E^2 h^2 [p^3(L) - p^3(0)] + \\ & a_0^4 E^4 h^4 [p(L) - p(0)] + \frac{8}{5} a_0^3 \{ [p^2(L) a_0^2 + \\ & E^2 h^2]^{5/2} - [p^2(0) a_0^2 + E^2 h^2]^{5/2} \} - \\ & \frac{4}{3} a_0^3 E^2 h^2 \{ [p^2(L) a_0^2 + E^2 h^2]^{3/2} - \\ & [p^2(0) a_0^2 + E^2 h^2]^{3/2} \} = - \frac{8\mu E^4 h^4 L Q}{\pi} \quad (4) \end{aligned}$$

式(3)和式(4)中: Q 表示弹性管的入口流量; E 为管的弹性模量; a_0 为管内壁半径; h 为管壁厚度; $p(0)$ 为弹性管入口压力, $p(L)$ 为弹性管出口压力, L 为管长。通过式(3)和(4)可以看出, 小变形和有限变形两种假设下流量 Q 与降压 $p(0) - p(L)$ 的关系都是非线性的。

3种耦合方法数值计算结果分别与式(3)和(4)结果进行了比较, 见表2和表3。

表2 $Re=0.02$ 计算结果与理论值比较

Tab.2 The comparison of the calculating results and theoretic results for $Re=0.02$

耦合方法	直接耦合法	间接耦合法	
		有限元法(固体模型) + 有限差分法(流体模型)	有限元法(固体模型) + 有限体积法(流体模型)
与理论公式误差(%)	1.05 (固体 0.8 万单元 + 流体 8.0 万单元)	1.21 (固体 5.0 万单元 + 流体 10.0 万单元)	0.74 (固体 0.4 万单元 + 流体 4.0 万单元)
	有限变形 —	1.66 (固体 5.0 万单元 + 流体 10.0 万单元)	1.16 (固体 0.4 万单元 + 流体 4.0 万单元)

表3 $Re=20$ 计算结果与理论值比较

Tab.3 The comparison of the calculating results and theoretic results for $Re=20$

耦合方法	直接耦合法	间接耦合法	
		有限元法(固体模型) + 有限差分法(流体模型)	有限元法(固体模型) + 有限体积法(流体模型)
与理论公式误差(%)	4.40 (固体 0.8 万单元 + 流体 8.0 万单元)	6.89 (固体 10.0 万单元 + 流体 15.0 万单元)	6.09 (固体 20.0 万单元 + 流体 40.0 万单元)
	有限变形 —	7.59 (固体 10.0 万单元 + 流体 15.0 万单元)	6.34 (固体 20.0 万单元 + 流体 40.0 万单元)

可以看出, 在雷诺数比较小时(0.02 左右), 小变形和有限变形两种情况下, 3种方法与理论值相

差很小, 最大相差为 1.21%。当雷诺数逐渐增大, 3种方法与理论值逐渐增大。当 $Re=20$ 左右的时, 小

变形假设下直接耦合法的精度(4.40%)要好于两种间接耦合法(最大相差分别为8.89%);有限变形假设时,两种间接耦合法中第2种略好与第1种。当雷诺数进一步增大到几百时,3种方法都会逐渐出现不收敛情况。总之,网格类型、划分的质量及网格的数量对计算结果有一定的影响,采用高收敛精度时耗费时间比较长。

3 结果

3.1 固体模型计算结果

固体模型计算结果如图3所示,结果是:

(1) 6个应力分量在培养液入口处比出口处大;最大值一般出现在多孔细胞支架两个方形孔相交处比较薄的位置。

(2) 当孔隙率确定时,孔半径改变对固体模型位移的影响最大相差3.1%,因此当孔隙率相同时,孔半径对固体模型位移的最大值影响不大。当孔半

径相同时,孔隙率由61%、65%、77%到84%,位移绝对值的最大值在逐渐减小,减小率平均值为35.83%,说明孔隙率对固体模型的位移场有很大影响。

(3) 孔隙率相同时随着孔半径的增加,应力场和应变场分布均在减小。在孔隙率一定的情况下,孔半径为25 μm 与50 μm 在固体场参数上的减小率平均值为45.96%,孔半径为25 μm 与75 μm 在固体场参数上的减小率平均值为32.26%,孔半径为25 μm 与50 μm 模型的差别要大于孔半径为50 μm 与75 μm 模型。

(4) 当孔半径一定的情况下,孔隙率从61%到65%,应力场和应变场分布减小率平均约为50.85%;孔隙率从65%到77%,减小率平均约为45.73%;从77%到84%,减小率平均约为63.05%。也就是说,孔隙率为65%的模型与孔隙率为77%的模型在应力场和应变场分布的差异最大。

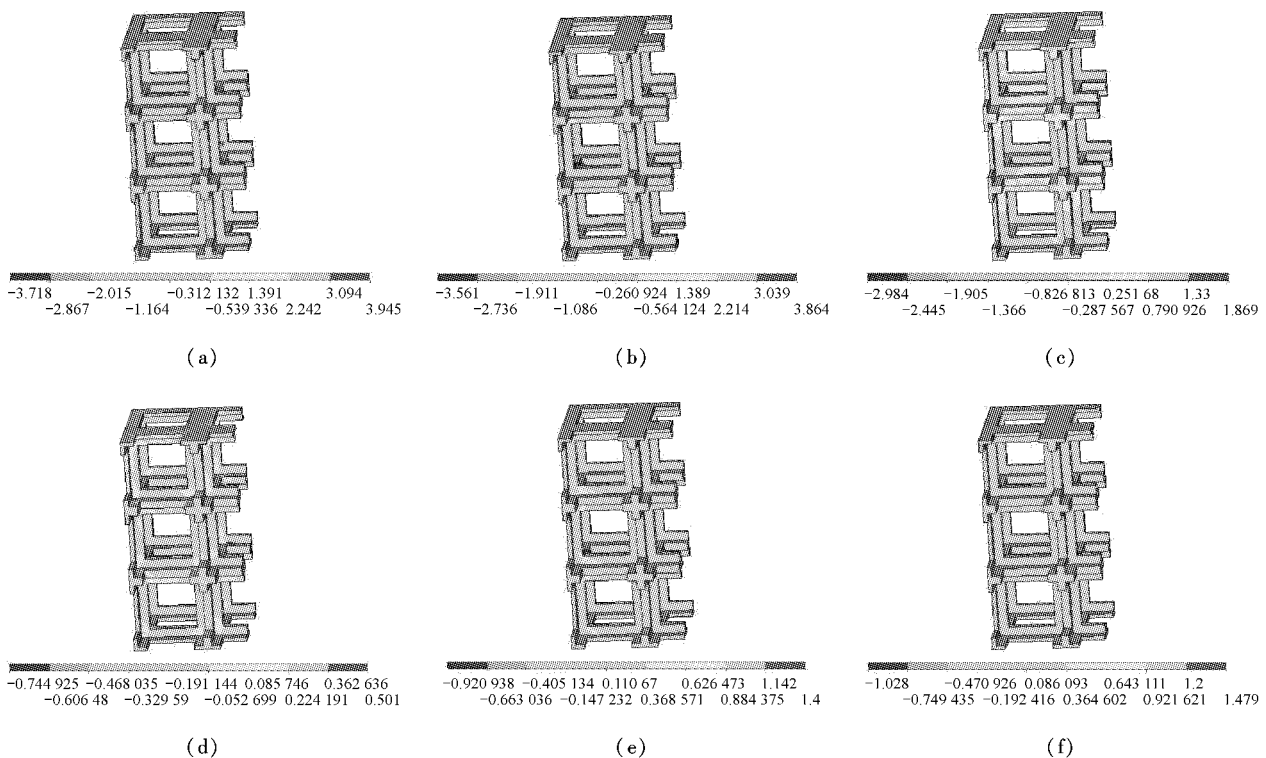


图3 含方形孔固体模型计算结果分布图 (a)x方向应力分布图,(b)y方向应力分布图,(c)z方向应力分布图,(d)xy方向剪应力分布图,(e)yz方向剪应力分布图,(f)xz方向剪应力分布图(单位:Pa)

Fig.3 The stress distributions of the calculating solid model (a) x-directional stress distribution, (b) y-directional stress distribution, (c) z-directional stress distribution, (d) xy-directional stress distribution, (e) yz-directional stress distribution, (f) xz-directional stress distribution(unit: Pa)

3.2 流体模型计算结果

流体模型计算结果如图4所示,结果是:

(1) 壁面静压从支架入口到支架出口在均匀减小,壁面剪应力、切变率和速度最大值均出现在入口和出口处;速度呈现对称分布。

(2) 通过将多孔支架视为刚性体和非线性变形体两种结果进行比较发现,两种方法计算结果相差很大。即非线性流固耦合结果的静压场、速度场、剪应力场和切变率场的最大值、平均值和中值均比刚性假设结果有所减小,但是相应最小值却有所增大。因此,需要考虑非线性流固耦合结果,结果对细胞表面应力应变场的预测会产生比较大的影响。

(3) 孔隙率对非线性流固耦合的结果有比较大的影响。当孔隙率为61%时,静压、速度、壁面剪应力和切变率在刚性假设和非线性流固耦合假设结果平均相差44.75%,29.10%,30.40%,30.16%;当孔隙率为65%时,静压、速度、壁面剪应力和切变率在刚性假设和非线性流固耦合假设结果平均相差

33.38%,24.13%,26.94%,26.79%;当孔隙率为77%时,静压、速度、壁面剪应力和切变率在刚性假设和非线性流固耦合假设结果平均相差27.26%,20.87%,26.15%,24.83%;当孔隙率为84%时,静压、速度、壁面剪应力和切变率在刚性假设和非线性流固耦合假设结果平均相差12.17%,16.80%,23.29%,22.92%。可以看出,孔隙率越小,将多孔支架考虑成刚性假设与柔性假设两种情况下静压场、速度场、壁面剪应力场和切变率场相差越大。

(4) 孔半径对非线性流固耦合结果的影响。孔半径从25 μm 变化到50 μm 时,四种孔隙率的静压、剪应力、切变率平均减小率分别为46.82%,50.12%,55.675%,而速度平均相差2.32%;孔半径从50 μm 变化到75 μm 时,静压、速度、剪应力、切变率平均减小率分别为32.69%,32.21%,36.68%,而速度平均相差2.72%。可以看出随着半径的增加,静压、速度、剪应力、切变率平均减小率逐渐减小。在同一孔隙率时,半径越大,静压、速度、

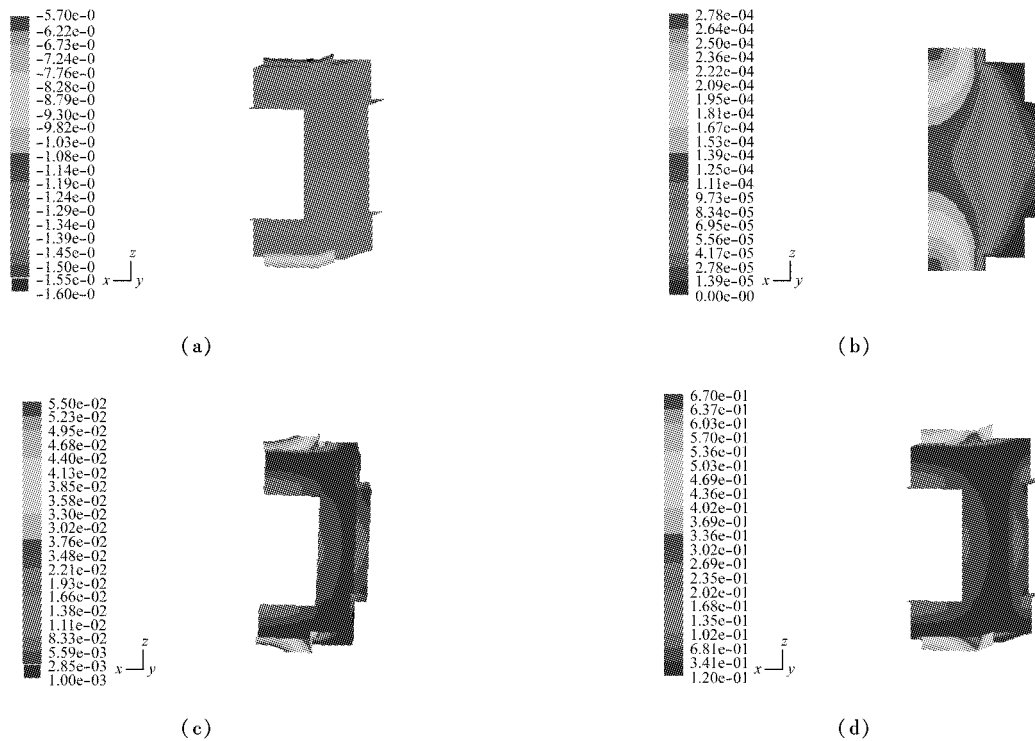


图4 含方形孔流体模型计算结果分布图 (a)壁面静压分布图(单位:Pa),(b)速度分布图(单位: $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$),(c)壁面剪应力(单位:Pa),(d)切变率分布图(单位: s^{-1})

Fig.4 The stress distributions of the calculating fluid model (a) static pressure distribution(unit: Pa), (b) velocity distribution(unit: $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), (c) wall shear distribution(unit: Pa), (d) strain rate distribution(unit: s^{-1})

壁面剪应力、切变率减小率越小,而速度变化不大,即孔隙率一定时,孔半径对静压、壁面剪应力、切应变产生很大的影响,而对速度影响不大。

参考文献:

- [1] Flaherty JT, Pierce JE, Ferrans VJ, *et al.* Endothelial nuclear patterns in the canine arterial tree with *p* reference to hemodynamic events[J]. *Circulation Research*, 1972, 30: 23-33.
- [2] Nerem RM, Levesque MJ, Cornhill JF. Vascular endothelial morphology as an indicator of the pattern of blood flow [J]. *Journal of Biomechanical Engineering*, 1981, 103: 172-176.
- [3] Dewey CF, Bussolari SR, Gimbrone MA, *et al.* The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress[J]. *Journal of Biomechanical Engineering*, 1981, 103: 177-185.
- [4] Levesque MJ, Nerem RM. The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress [J]. *Journal of Biomechanical Engineering*, 1985, 107: 341-347.
- [5] Ookawa K, Sato M, Ohshima N. Changes in microstructure of cultured porcine aortic endothelial cells in the early stage after applying fluid-imposed shear stress[J]. *Journal of Biomechanics*, 1992, 25:1321-1328.
- [6] Freed LE, Vunjak-Novakovic X. *Tissue engineering bioreactors. Principles of tissue engineering*[M]. 2nd edn. San Diego: Academic Press. 2000.
- [7] Martin I, Obradovic B, Treppo S, *et al.* Modulation of the mechanical properties of tissue engineered cartilage [J]. *Biorheology*, 2000, 37:141-147.
- [8] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage[J]. *Biomaterials*, 2000, 21:2529-2543.
- [9] Altman GH, Lu HH, Horan RL, *et al.* Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering [J]. *Journal of Biomechanical Engineering*, 2002, 124:742-749.
- [10] Davisson T, Sah RL, Ratcliffe A. Perfusion increases cell content and matrix synthesis in chondrocyte three-dimensional cultures[J]. *Tissue Engineering*, 2002, 8(5):807-816.
- [11] O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, *et al.* The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2005, 26:433-441.
- [12] Raimondi MT, Moretti M, Cioffi M, *et al.* The effect of hydrodynamic shear on 3D engineered chondrocyte systems subject to direct perfusion[J]. *Biorheology*, 2006, 43:215-222.
- [13] Boschetti F, Raimondi MT, Migliavacca F, *et al.* Prediction of the micro-fluid dynamic environment imposed to three-dimensional engineered cell systems in bioreactors [J]. *Journal of Biomechanics*, 2006, 39: 418-425.

文章编号:1004-7220(2010)01-0011-05

壳聚糖-脱细胞真皮三维材料作为骨组织 工程支架材料的研究

张燕, 李瑞欣, 张西正, 郭勇

(军事医学科学院 卫生装备研究所, 天津 300161)

摘要: **目的** 观察 MC3T3-E1 成骨前体细胞在壳聚糖-脱细胞真皮三维支架材料上的黏附情况, 并评价其细胞相容性。**方法** 通过冷冻干燥制备壳聚糖-脱细胞真皮三维支架材料, 并测试其孔隙率、密度和吸水率, 通过扫描电镜分析支架的微观形貌。采用体外培养细胞的方法, 将 MC3T3-E1 细胞直接接种到壳聚糖-脱细胞真皮三维支架材料上, 培养 2, 3, 4, 5 h, 各时间点各取 3 个样品, 测定细胞在支架上的黏附率, 确定最佳的细胞贴壁时间。将细胞接种到支架上, 共培养 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 d, 采用 MTS 方法绘制细胞增殖曲线, 组织化学染色观察细胞形态, 并利用材料试验机测试不同时间材料细胞复合物的压缩弹性模量。**结果** 壳聚糖-脱细胞真皮材料具有连通的多孔结构, 孔隙率为 92.8%, 密度为 97.96 g/L, 吸水率为 $(2169 \pm 100)\%$ 。细胞相容性实验显示, 成骨细胞易于在支架材料上黏附、增殖。**结论** 壳聚糖-脱细胞真皮材料具有连通的孔隙, 孔径较均匀, MC3T3-E1 成骨前体细胞易在壳聚糖-脱细胞真皮三维支架材料上黏附、增殖, 表明该支架材料具有良好的细胞相容性。

关键词: 壳聚糖; 脱细胞真皮; 孔隙率; 扫描电镜; 骨组织工程; 支架

中图分类号: R318.01 **文献标志码:** A

Study on the three-dimensional chitosan-decellularised-derma scaffolds for bone tissue engineering

ZHANG Yan, LI Rui-xin, ZHANG Xi-zheng, GUO Yong (*Institute of Medical Equipment, Academy of Military Medical Science, Tianjin, 300161, China*)

Abstract; Objective To observe the adhesion of MC3T3-E1 osteoblastic progenitor cells to the three-dimensional chitosan-decellularised-derma scaffolds, and evaluate the cytocompatibility of the scaffolds. **Method** The three-dimensional chitosan-decellularised-derma scaffolds were prepared by the freeze-drying method, the porosity, density and water absorption of which were measured. The microscopic morphology of the composite scaffolds was analyzed by the scanning electron microscopy (SEM). The MC3T3-E1 cells cultivated in vitro were seeded onto the composite scaffolds, and then co-cultured for 2, 3, 4 and 5 hours. At each time point, three specimens from each matrix were taken to determine the cell-adhesion rate and the best time of the cell-adhesion. The cells were seeded onto the composite scaffolds, and then co-cultured for 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13 days. The MC3T3-E1 cells inside were evaluated with MTS test. The cell morphology was observed by the histological staining. The compression tests were performed using a Universal Testing Machine, at room temperature, as compared with no-cell-scaffolds. **Results** The three-dimensional chitosan-decellularised-derma scaffolds have high interval porosity with the porosity (92.8%), the density (0.09796 g/ml) and the water absorption $(2169 \pm 100)\%$. The cytocompatibility test shows that the seeded MC3T3-E1 cells can adhere to the scaffolds and proliferate. **Conclusions** The three-dimensional chitosan-decellularised-derma scaffolds have high interval porosity with the well-

收稿日期:2010-01-13

基金项目:国家自然科学基金重点项目(10832012)。

作者简介:张燕(1978-),女,研究方向:生物力学。

通讯作者:张西正, E-mail: z56787@sohu.com。

distributed diameter. The MC3T3-E1 cells are easy to adhere the scaffolds and proliferate which shows that the scaffolds have a good cytocompatibility.

Key words : Chitosan; Decellularised-derma; Porosity; Scanning electron microscopy; Bone tissue engineering; Scaffolds

通过将分离的细胞种在生物相容性及生物可降解性好的支架材料上可实现组织再生。大量研究表明合适的支架材料对于细胞黏附、扩增具有重要的作用^[1-3]。体外细胞培养法是研究骨移植材料生物相容性有用的方法之一,而且材料与细胞体外复合培养可直接观察细胞与生物材料复合生长的情况,利于了解细胞与材料相互作用的生物学反应,有助于组织工程支架材料的挑选^[4]。本实验通过冷冻干燥方法制备壳聚糖/脱细胞真皮复合支架材料,将体外培养的 MC3T3-E1 成骨前体细胞接种到支架上,考察细胞在支架上的黏附和增殖情况,评价该材料的细胞相容性,探讨将其用于骨组织工程支架的可能性。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

α -MEM 培养基(Gibco 公司,美国),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),MTS (Promega 公司),扫描电镜(Hitachi S-3400N),TECAN 酶标仪,Instron5865 材料试验机(美国,Instron 公司)

1.2 壳聚糖-脱细胞真皮支架制备

将新鲜猪皮经过脱脂、脱细胞处理制备成脱细胞真皮,粉碎后与壳聚糖溶解在 1% 的乙酸水溶液中(壳聚糖和脱细胞真皮的质量比为 4:6),4℃ 预冷冻,-20℃ 冷冻,再通过冷冻干燥法制备脱细胞真皮/壳聚糖复合海绵状材料。

1.3 壳聚糖-脱细胞真皮支架材料的物理化学性能表征

1.3.1 支架形态学观察

HE 染色观察支架脱细胞是否完全;支架喷金镀膜后在 Hitachi S-3400N 型扫描电镜下观察其微观形貌。

1.3.2 支架孔隙率和密度测定

采用液体置换法测定^[5],用量筒量取 V_1 体积的无水乙醇,取一定质量(W)的支架浸入其中,反复抽真空至无气泡逸出,量筒读数为 V_2 ,将含乙醇的支

架材料移出后,量筒读数为 V_3 ,支架孔隙率(P)为:

$$P = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3}, \text{ 支架密度 } d = \frac{W}{V_2 - V_3}, \text{ 测 6 个样品。}$$

1.3 吸水率

室温下,将干重为 W_{dry} 的材料浸入含有 5 mL, pH 为 7.4,0.1 M PBS 的六孔板中。24 h 后样品($n = 12$)从六孔板中移出,称重,记为 W_{wet} 。用以下方程来评估材料的吸水率:吸水率 = $\frac{W_{\text{wet}} - W_{\text{dry}}}{W_{\text{dry}}} \times 100\%$ 。

1.4 细胞相容性实验

1.4.1 MC3T3-E1 细胞在支架上的黏附率检测

取大小为 4 mm × 4 mm × 3 mm 的壳聚糖/脱细胞真皮支架材料酒精消毒后备用。将培养瓶内的 MC3T3-E1 细胞经胰酶消化,取细胞悬液均匀接种于支架上,不加培养液培养 2,3,4,5 h,分别在各时间点取出复合支架 3 个样品,1 mL PBS 液冲洗,用细胞计数板计算洗脱细胞数,从而得出黏附细胞的百分率^[3]。

1.4.2 细胞-支架共培养

将培养瓶内的 MC3T3-E1 细胞经胰酶消化、培养液稀释成密度为 $7.5 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞悬液。取细胞悬液均匀接种于支架上,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养,每 2 d 更换一次培养液。

1.4.3 绘制细胞增殖曲线

细胞增殖用 MTS 试验来测定。细胞-支架复合物共培养 1、3、5、7、9、11、13 d 各时间点取 3 块细胞-支架复合物进行 MTS 实验。在进行实验前,将原培养液移除,按试剂盒说明加入 MTS/PMS 和新鲜培养液。经过 4 h 的培养,振荡 10 min,每孔吸出 150 μL 培养液至 96 孔培养皿中,用 TECAN 酶标仪在波长为 490 nm 情况下测量 A。所测量到的数据用 Excel 图表进行处理。

1.4.4 细胞形态观察

分别取细胞-支架复合物共培养 3、5、9、13 d 时的样品,经过固定、脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色后,在光镜下观察。

1.4.5 材料力学性能测定

利用 Instron5865 材料试验机对培养 3、7、13 d 的细胞-支架复合物样品进行力学性能测定,并与无细胞支架材料进行比较。

1.5 统计学方法

采用 SAS8.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 支架形态

HE 染色观察到支架脱细胞完全(见图 1),扫描电镜观察复合支架具有连通的多孔结构,孔隙大小约为 50-350 μm (见图 2)。

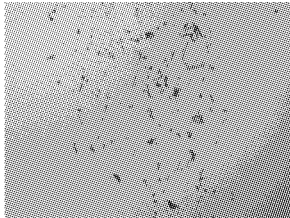


图 1 无细胞支架 HE 染色($\times 100$)
Fig.1 HE staining of the acellular scaffold ($\times 100$)

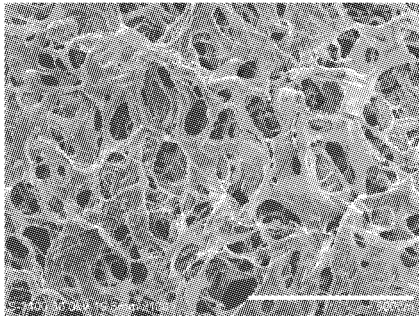


图 2 支架材料,SEM($\times 100$)
Fig.2 Scanning electron micrographs of the acellular scaffold ($\times 100$)

2.2 支架孔隙率、密度

支架孔隙率为 92.8%,密度为 97.96 g/L。

2.3 支架吸水率

支架吸水率为 $(2169 \pm 100)\%$ 。

2.4 细胞相容性实验

2.4.1 MC3T3-E1 细胞在支架上的黏附率检测

细胞-支架复合物共培养 2,3,4,5 h,MC3T3-E1 细胞在壳聚糖-脱细胞真皮材料上的黏附率分别为

10%,40%,95%,95%,因此 4 h 时即可加入培养液进行培养。

2.4.2 绘制细胞增殖曲线

细胞-支架复合物共培养 1,3,5,7,9,11,13 d,MTS 方法绘制细胞增殖曲线(图 3)。其中 7、9、11、13 d 数据利用 SAS 软件分析 $P > 0.001$,说明无统计学差异。

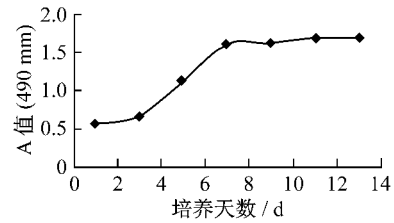


图 3 细胞增殖曲线
Fig.3 The curve of the MC3T3-E1 cells proliferation

2.4.3 细胞形态观察

将标本制片 HE 染色,第 3 天时细胞少量(图 4a),第 5 天时已开始增殖(图 4b),第 9 天时细胞发生粘连并开始形成长梭形(图 4c),第 13 天时长梭形细胞连接更加紧密(图 4d)。但材料内部细胞数量不多,出现支架材料内部"空化"现象(图 5)。

2.4.4 材料力学性能测定

对培养 3、7、13 d 的细胞-支架复合物进行力学测试,并与无细胞材料(测试前 1 d 将无细胞材料浸入培养液中)进行比较。将材料浸在 α -MEM 培养液中进行测试,采用 0.5 Hz 锯齿波形,预载荷为 0.1 N,以每分钟起始高度 15% 的速率进行压缩位移为起始高度 30% 的压缩应变。表 1 为所得细胞-支架的弹性模量,细胞支架复合物各组力学性能无显著差异,与纯支架材料力学性能相比也无显著差异(SAS 软件单因素 K($K \geq 3$)水平设计定量资料的方差分析)。

表 1 细胞-支架的弹性模量

Tab.1 Compressive Young's modulus of the cell-seeded scaffolds

细胞-支架共培养/d	弹性模量/kPa
纯支架(无细胞)	4.62 \pm 1.20
3	4.99 \pm 0.34
7	5.01 \pm 0.18
13	4.97 \pm 0.22