

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)

D-Hank' s 液 (实验室自行配制)

Triton X-100, Tris-HCL 液(pH 7. 4), 苯甲基黄酰氟 (PMSF, 蛋白酶抑制剂, 浓度 0.35ml/L), (购自 Sigma 公司)

DNase 酶, RNase 酶, (购自 Sigma 公司)

摇床 (北京博医康技术公司)

医用聚氨酯(PU) (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 PU 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(PU 组), 构成比为 2:1 组为实验 1 组(2:1 组), 构成比为 4:1 组为实验 2 组(4:1 组)。每组又按 3 种不同的实验温度(0℃, -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

1 取新鲜猪关节软骨制备成 3.5mm*3.5mm, 厚度 0.2-2.0mm 的小块, 然后将其放入加注庆大霉素的生理盐水中, 以防止感染的发生, 之后再用生理盐水冲洗三遍, 用磷酸盐缓冲液漂洗三遍。

2 将关节软骨组织块放入含有蛋白酶阻断剂(苯甲基黄酰氟 0.35ml/L)的 Tris -HCl(pH 7.4)缓冲液中, 置于摇床 4 ℃持续震荡 24 h。

3 在 1%的 Triton X-100 的 Tris -Hcl (v/v) 缓冲液内加入蛋白酶抑制剂-- 苯甲基黄酰

氟,将上步反应后的软骨组织块放入其中, 置于摇床上 4 °C, 200 转持续振荡 48 h, 标本以双蒸馏水超声波连续冲洗 24 h。

4 将组织块置于 DNase 酶和 RNase 酶混合液 (含有 ca 离子和 mg 离子, ph7.4) 中, 37 °C 消化 12 h。

5 再次将组织块置于 1% 的 Triton X-100 的 Tris -Hcl(v/v) 缓冲液中, 4 °C 洗脱 24 h。

6 标本以双蒸馏水连续冲洗 24 h, 之后再以 D-Hank' s 液 4 °C 连续冲洗 24 h。

7 标本置于磷酸盐缓冲液中保存。

8. 脱细胞后的软骨见图 1——图 5

1.4. PU 支架及 PU /脱细胞软骨基质支架制备:

将经环氧乙烷消毒的 PU 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 PU 已均匀的分布于 1, 4 二氧六环溶液中, 制备浓度为 7.5% PU 溶液。分装该溶液至直径为 2cm 的 Teflon 试管并迅速放入 0°C, -10°C, -20°C 的恒温冰箱中凝固、结晶。同上述步骤, 按 PU 与脱细胞软骨基质质量构成比为 2:1 和 4:1 来配制 PU 浓度为 7.5% 的 PU /脱细胞软骨基质溶液, 然后迅速倒入试管后放入 0°C, -10°C, -20°C 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 PU 和 PU/脱细胞软骨支架。

2. 支架各种性能的测定:

2.1. 亲水性测定:

将 10mg 支架材料置于 3ml 的 PBS(pH=7.2) 中并在 20°C 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^[9]。

2.2. 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^[10]。

2.3. 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^[11]计算： $V=(V_2-V_1) + (V_1-V_3)=V_2-V_3$ ； $K=(V_2-V_1)/(V_2-V_3)$ 。

2.4. 生物力学性能的测定：

将不同质量百分比所制成的 PU 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^[9]。

2.5. 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 $P=0.05$ 为检验水准。

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。