

doi: 10.3969/j.issn.1007-9289.2013.04.015

# 携载壳聚糖/rhBMP-2 缓释微球的 NiTi 合金的 制备及体外检测\*

徐立虎<sup>1</sup>, 韵向东<sup>1</sup>, 陈元哲<sup>2</sup>, 安丽萍<sup>1</sup>, 夏亚一<sup>1</sup>

(1. 兰州大学第二医院 a. 骨科病研究所 b. 甘肃省骨关节疾病研究重点实验室 兰州 730030; 2. 兰州大学 化工学院 兰州 730030)

**摘要:** 采用层层自组合法联合溶解法在 NiTi 合金表面制作疏松多孔的聚丙烯酸(PAA)和聚丙烯胺盐酸盐(PAH)复合有机层,在该有机层表面进行壳聚糖/骨形态蛋白 2(BMP-2)涂层处理。利用扫描电镜观察逐层处理后合金表面结构变化;用接触角检测仪检测材料表面亲水性;利用 BMP-2 ELASA 试剂盒检测在模拟体液中 rhBMP-2 的释放情况;经过修饰的材料分别与小鼠成骨细胞共培养,检测不同时期培养液中碱性磷酸酶活性。结果表明:经盐酸溶蚀后 PAA/PAH 涂层广泛形成纳米至微米级的孔洞结构,经壳聚糖/rhBMP-2 溶液浸泡后孔洞被填充覆盖。改性后 NiTi 合金表面亲水角明显降低,在模拟体液中 rhBMP-2 释放的时间逐渐延长。改性后 NiTi 合金与小鼠成骨细胞共培养后碱性磷酸酶较对照组显著增加。说明改性后的合金亲水性显著改善,在模拟体液环境中 rhBMP-2 能够缓慢释放,具有促进小鼠成骨细胞增殖的能力。

**关键词:** NiTi 合金; 骨形态蛋白; 缓释

**中图分类号:** TG174.46

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1007-9289(2013)04-0094-05

## Preparation and Properties in Vitro of RhBMP-2 Loaded Chitosan Microsphere Coated by Nitinol

XU Li-hu<sup>1</sup>, YUN Xiang-dong<sup>1</sup>, CHEN Yuan-zhe<sup>2</sup>, AN Li-ping<sup>1</sup>, XIA Ya-yi<sup>1</sup>

(1a. Institute of Orthopaedics, 1b. Orthopaedics Key Laboratory of Gansu Province, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030; 2. The Institute of Chemical Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730030)

**Abstract:** Chitosan/rhBMP-2 was coated on the nitinol alloy surface that had been fabricated with PAA/PAH through self-assembly and dissolution methods. The alloy surface structure was observed under the scanning electronic microscope after every fabricated procedure. The contact-angle was measured to characterize the nitinol alloy surface hydrophilicity. The protein release rate was detected by enzyme-linked immunosorbent assays after alloy steeped into simulated body fluid. Alkaline phosphatase (ALP) activity was detected to evaluate the effect of alloy on mouse osteoblast growth. Results showed that after being coated with the solution of chitosan/rhBMP-2, hydrophilic character of the alloy surface increases. With the increase of the soaking time, rhBMP-2 gradually increases, and the activity of ALP in cell-culture medium obviously increases. A nitinol alloy with new surface characteristic was successfully made.

**Key words:** nitinol alloy; bone morphogenetic protein (BMP); sustained-release

收稿日期: 2013-04-18; 修回日期: 2013-05-25; 基金项目: \* 甘肃省卫生行业计划(GSWST2011-072); 甘肃省自然科学基金(1208KJZA273)

作者简介: 徐立虎(1983-), 男(汉), 甘肃会宁人, 硕士生; 研究方向: 骨生物材料、关节外科学

网络出版日期: 2013-07-01 13:22; 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3905.TG.20130701.1322.009.html>

引文格式: 徐立虎, 韵向东, 陈元哲, 等. 携载壳聚糖/rhBMP-2 缓释微球的 NiTi 合金的制备及体外检测 [J]. 中国表面工程, 2013, 26(4): 94-98.

## 0 引言

NiTi 合金因具有形状记忆性、超弹性及良好的生物相容性等性能而被广泛应用于体内植入材料,近些年学者们主要通过各种方法使合金表面脱镍以改善  $\text{Ni}^{2+}$  离子在体内溶出对机体产生的毒害作用<sup>[1-2]</sup>,而一些学者们通过聚合、偶联、吸附等手段在其表面加入某种具有特殊生物学性能的有机集团或分子链,以增加或改善合金的生物学性能<sup>[3-4]</sup>。骨形态蛋白 2(BMP-2),为 BMP 家族中的一员,具有促进成骨细胞分化诱导成骨的作用,但在体内其含量是有限的,单纯注入则很快被稀释降解,不能在骨折愈合中发挥很好作用,因此需要一种载体将其带人体内以控制其释放,从而维持有效剂量。

现研究的载体材料主要有有机高分子类<sup>[5-6]</sup>、无机盐类<sup>[7-8]</sup>及天然聚合物类<sup>[9-10]</sup>,其中壳聚糖是一种天然的高分子聚合物,在一定条件下分子间可通过相互作用形成纳米微球,且壳聚糖有良好的生物可降解性、生物相容性,因此被认为是一种新的给药途径<sup>[11]</sup>,有学者已应用壳聚糖作为 BMP 的载体材料且已取得了一定成果<sup>[12-13]</sup>。

文中是在普通的 NiTi 合金片表面进行壳聚糖/BMP 涂层处理,以使其在进行骨折的植入内固定的同时,BMP 能够缓慢释放从而促进骨的愈合。难点在于如何将壳聚糖载药微球吸附于 NiTi 合金表面。层层自组装技术是近些年材料学领域中较为活跃的研究手段之一,Kang Ping Xiao<sup>[14]</sup>应用该技术使用聚丙烯酸(poly(acrylic acid)(PAA))和聚丙烯胺(poly(allylamine hydrochloride)(PAH))成功制作出了多孔渗水的生物膜,有学者<sup>[15]</sup>应用层层自组装法在 NiTi 合金表面组装聚丙烯亚胺/肝素复合层以增加 NiTi 合金的抗凝效果。

文中试验同样将通过层层自组装法在 NiTi 合金表面构建疏松多孔的 PAA/PAH 有机高分子层,以利于吸附和交联壳聚糖从而制备具有 BMP 缓释功能的 NiTi 接骨合金。

## 1 试验方法

### 1.1 试验材料

NiTi 等比合金尺寸为  $10\text{ mm} \times 10\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ ,其成分为(质量分数):50% Ni、50% Ti。PAA( $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$ )<sub>n</sub> 和 PAH( $\text{C}_3\text{H}_8\text{ClN}$ )<sub>n</sub> 分子量分

别为 120 000 ~ 200 000 和 100 000,壳聚糖( $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4$ )<sub>n</sub> 分子量为 200 000。人类重组骨形态蛋白 2(rhBMP-2)、模拟体液(SBF)、小鼠成骨细胞、胎牛血清、DMEM 培养基、rhBMP-2 ELISA 试剂盒、碱性磷酸酶试剂盒等。

### 1.2 携壳聚糖/rhBMP-2 的 NiTi 合金的制备

将 NiTi 合金片物理抛光后经过丙酮、乙醇(70%)、去离子水依次超声清洗两次,5 min/次,后经  $\text{H}_2\text{O}$ 、HF、 $\text{HNO}_3$  比例为 5 : 1 : 4 的溶液抛光处理 5 min,超声波清洗 10 min<sup>[16]</sup>,PAA、PAH 用去离子水分别配成 10 mg/mL 的溶液于 2 个小烧杯内,将经以上处理的 NiTi 合金片依次通过 PAA、PAH 溶液交替浸泡 10 次,15 min/次,后置于 0.01 mol/L 的盐酸溶液中浸泡 2~3 min 后拿出,去离子水冲洗, $\text{C}_60$  照射消毒备用。

在超净工作台上,100 mg 壳聚糖溶于 4 mL 体积比为 20 mol/L 的醋酸溶液中,200  $\mu\text{g}$  rhBMP-2 溶于 4 mmol/L HCl 溶液 1 mL 混合,混合液缓慢加入含 8 mL span-80 的辛醇溶液 40 mL 中,磁力搅拌器搅拌 2 h,加入 1 mL 三聚磷酸钠水溶液交联,继续搅拌 40 min,制作壳聚糖/rhBMP-2 微球溶液<sup>[12]</sup>,并将上述处理后的 NiTi 合金浸泡其中,12 h 后拿出,无菌超纯水洗漱后放入无菌小瓶内密封,-20  $^\circ\text{C}$  冻存备用。

### 1.3 材料表征

JSM-6701F 型冷场发射扫描电子显微镜观察未处理合金、自组装后、盐酸浸蚀后及吸附了壳聚糖/rhBMP-2 后的逐层表面结构,并对比观察结构变化。修饰前、后样品各随机抽取 6 个光学接触角测量仪 DSA100 检测表面亲水角,取平均数,对比表面亲水角变化。

按 rhBMP-2 ELISA 试剂盒说明所述将该试剂盒提供的 rhBMP-2 样品进行梯度稀释,PW-960 型酶标仪 545 nm 处依次检测稀释液吸光度值,制作浓度、吸光度标准曲线,并求得回归方程。将组装完成的 NiTi 合金片置于 24 孔板内,分别加入 1 mL SBF 液,密封后置于 37  $^\circ\text{C}$  下孵育,于 3、6、9、12、15、18 和 21 天每个时间点设 6 个重复测量孔,545 nm 处检测吸光度值,并根据吸光度值,计算出对应的浓度,试验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,绘制 rhBMP-2 浓度变化图。

取 2 代培养的小鼠成骨细胞  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于 24 孔板内,按以下分组培养:A 组:未加入

任何材料;B组:未处理的 NiTi 合金;C组:未加入 BMP 的壳聚糖/PAH/PAA/NiTi 合金;D组:壳聚糖/rhBMP-2/PAH/PAA/NiTi 合金。于 2、4、6 和 8 天每个时间点设 4 个重复测量孔,碱性磷酸酶试剂盒检测碱性磷酸酶浓度(酶标仪检测波长为 405 nm,方法与 rhBMP-2 浓度检测类同),绘制柱状图,试验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用重复测量资料的方差分析,应用 SPSS17.0 统计软件进行处理。

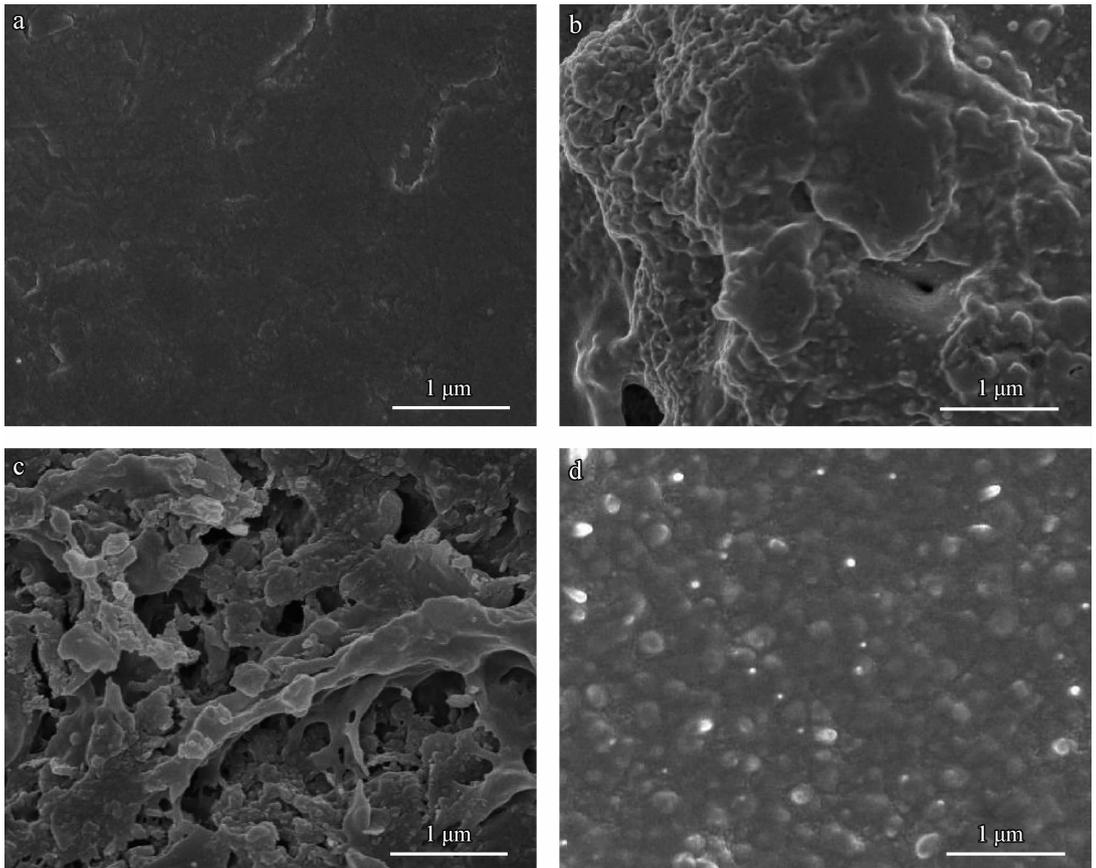
## 2 结果与讨论

### 2.1 改性前后合金涂层的表面形貌

图 1 分别为未处理 NiTi 合金、PAH/PAA 层层自组装后、盐酸溶蚀后及壳聚糖/BMP 涂层

后放大 10 000 倍的形貌。由图 1(b)可见经 PAH/PAA 表面组装后形成薄厚不均的粘附物并有裂隙存在,HCl 浸蚀后粘附层表面形成大小不等(微米级)的孔洞(图 1(c)),而经壳聚糖/rhBMP-2 涂层处理后,表面覆盖有大量几百纳米级别的微球体,即壳聚糖分子间相互粘附交联形成的载药微球(图 1(d))。

PAA 分子含有大量的羧基,而 PAH 分子含有大量氨基,二者互为酸碱性,因此在溶液中可以相互吸附叠加成膜(图 1(b)),而盐酸的作用使分子链发生断裂从而形成粗糙多孔的表面结构(图 1(c))。另外,壳聚糖表面含有大量羟基和氨基,这些基团的存在保证了壳聚糖能够粘附于 PAA/PAH 多分子层表面(图 1(d))。



(a) NiTi alloy (b) PAH/PAA (c) After HCl immersion (d) Chitosan/BMP-2

图 1 NiTi 合金及逐层处理后表面形貌

Fig. 1 Surface morphologies of NiTi alloy and the materials after coating step by step

### 2.2 改性前后 NiTi 合金的亲水角

体内植入材料与体液的亲和度与材料表面的亲水性有很大关系,亲水角越低,组织相容性评价

越好。图 2 为改性前后 NiTi 合金材料表面亲水角检测结果图,取平均数,得改性前亲水角为  $81.94^\circ \pm 2.37^\circ$ ,改性后亲水角为  $65.79^\circ \pm 3.93^\circ$ ,

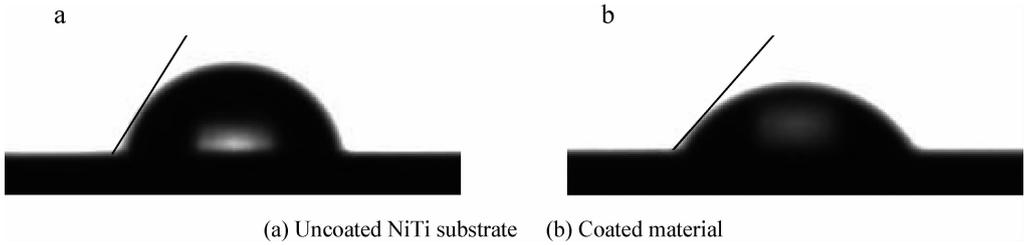


图 2 修饰前后的 NiTi 合金亲水角

Fig. 2 Contact angle of uncoated NiTi substrate and coated material

改性后亲水角有所降低,亲水性得到提高,但改性后的不同样品或同一样品亲水性有较大波动(分布范围在  $54.7^{\circ}\sim 71.4^{\circ}$  之间),考虑主要原因为不可控性的涂层结构不均匀所致。

### 2.3 改性后材料在 SBF 液中释放 rhBMP-2

图 3 为 rhBMP-2 释放曲线图。如图所示,1~6 天,SBF 液中蛋白浓度急剧增加,6 天后蛋白浓度增加趋势平缓。主要原因考虑为粘附于材料表面的壳聚糖/rhBMP-2 及未包被的 rhBMP-2 释出有关,约 6 天后,随着壳聚糖/rhBMP-2 微球的释放降解,及粘附于孔洞内的 rhBMP-2 的释放,释药进入平缓期。另外,rhBMP-2 本身存在一定的半衰期,在 SBF 液中,随着时间的推移,部分 rhBMP-2 逐渐降解。因此,rhBMP-2 的释放量应大于检测量,当释放量接近于降解量时,药物浓度进入相对平缓期,所以,释药总量应大于最高浓度时溶液中的药量。

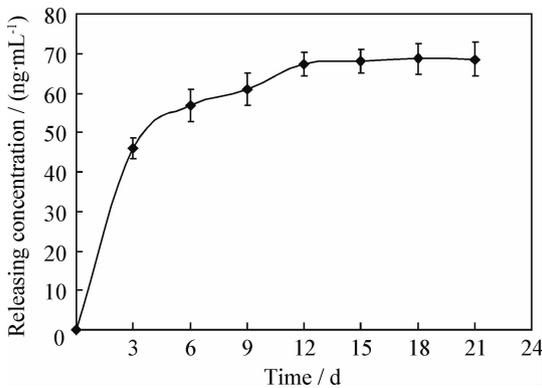


图 3 RhBMP-2 释药曲线

Fig. 3 Curve of the releasing speed of rhBMP-2

### 2.4 修饰前后 NiTi 合金材料所起的作用

骨碱性磷酸酶是成骨细胞的一种细胞外酶,这种酶的浓度变化与骨的生长代谢状况具有相关性。图 4 为改性后合金及各对照组与小鼠成骨细

胞共培养 2、4、6 和 8 天后碱性磷酸酶活性对比,于 2 天前 A、B、C、D 组碱性磷酸酶活性无显著差异( $P>0.05$ );4~8 天,D 组碱性磷酸酶活性相对 A、B、C 组有所增加( $P<0.05$ ),即相比 A、B 和 C、D 组的成骨细胞增值活性增加。并且,这种趋势随时间推移而逐渐增加,与对照组相比较,产生的原因是 rhBMP-2 在起作用。

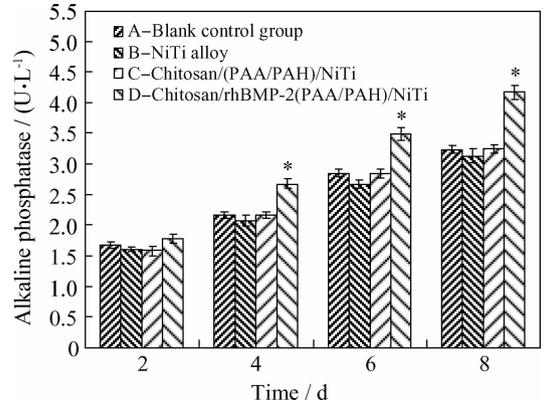


图 4 不同材料对成骨细胞碱性磷酸酶合成影响

Fig. 4 Effect of the different materials on alkaline phosphatase activity in the osteoblast

## 3 结论

通过层层自助装联合溶解法 NiTi 合金表面制作出了具有疏松多孔 PAA/PAH 涂层,并在该涂层内吸附壳聚糖/rhBMP-2,经试验检测得到如下结论:

(1) 应用层层自组合法、溶解法、表面吸附等方法成功制作了 BMP 涂层的 NiTi 合金。

(2) 修饰后的 NiTi 合金浸泡于 SBF 液中,rhBMP-2 能够缓慢释放;表面亲水性得到了改善,能够促进小鼠成骨细胞增殖活性。

NiTi 合金在骨科学领域应用广泛的内固定材料,而 BMP 对于促进骨的生长愈合有积极作用,该试验成功将 BMP 涂于 NiTi 合金表面,修

饰后的 NiTi 合金将有可能作为一种新的骨内固定材料,该材料可用于发挥骨的支撑固定作用改善传统内固定材料和机体组织的亲和力,而 BMP 的释放能对骨的生长愈合具有促进作用。

## 参考文献

- [1] Yeung K, Poon R, Liu X, et al. Investigation of nickel suppression and cytocompatibility of surface-treated nickel-titanium shape memory alloys by using plasma immersion ion implantation [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2005, 72(3): 238-245.
- [2] Hang R, Zhang M, Ma S, et al. Biological response of endothelial cells to diamond-like carbon-coated NiTi alloy [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2012, 100(2): 496-506.
- [3] Sun F, Sask K, Brash J, et al. Surface modifications of Nitinol for biomedical applications [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, 67(1): 132-139.
- [4] Sargeant T D, Rao M S, Koh C Y, et al. Covalent functionalization of NiTi surfaces with bioactive peptide amphiphile nanofibers [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(8): 1085-98.
- [5] Saito N, Okada T, Horiuchi H, et al. Local bone formation by injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 contained in polymer carriers [J]. *Bone*, 2003, 32(4): 381-386.
- [6] Saitoh H, Takata T, Nikai H, et al. Effect of polylactic acid on osteoinduction of demineralized bone: Preliminary study of the usefulness of polylactic acid as a carrier of bone morphogenetic protein [J]. *Journal of Oral Rehabilitation*, 2007, 21(4): 431-438.
- [7] 张森林, 孟昭业, 毛天球. 珊瑚复合人工骨骨诱导活性的实验研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 1999, 13(3): 141-144.
- [8] 孙明林, 胡蕴玉. 骨形态发生蛋白载体材料的研究和应用现状 [J]. *国外医学: 生物医学工程分册*, 2001, 24(3): 128-133.
- [9] Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, et al. Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites [J]. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 2000, 29(1): 62-66.
- [10] Lim H J, Ghim H D, Choi J H, et al. Controlled release of BMP-2 from alginate nanohydrogels enhanced osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells [J]. *Macromolecular Research*, 2010, 18(8): 787-792.
- [11] Sinha V, Singla A, Wadhawan S, et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 274(1/2): 1-33.
- [12] 黄鑫, 孟国林, 刘建, 等. RhBMP-2 壳聚糖微球的制备及体外检测 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2009, 17(15): 1172-4.
- [13] Shi S, Cheng X, Wang J, et al. RhBMP-2 microspheres-loaded chitosan/collagen scaffold enhanced osseointegration: an experiment in dog [J]. *Journal of Biomaterials Applications*, 2009, 23(4): 331-346.
- [14] Xiao K P, Harris J J, Park A, et al. Formation of ultrathin, defect-free membranes by grafting of poly(acrylic acid) onto layered polyelectrolyte films [J]. *Langmuir*, 2001, 17(26): 8236-41.
- [15] Dong P, Hao W, Wang X, et al. Fabrication and biocompatibility of polyethylenimine/heparin self-assembly coating on NiTi alloy [J]. *Thin Solid Films*, 2008, 516(16): 5168-71.
- [16] Chu C, Hu T, Wu S L, et al. Surface structure and properties of biomedical NiTi shape memory alloy after Fenton's oxidation [J]. *Acta Biomaterialia*, 2007, 3(5): 795-806.

---

**作者地址:** 甘肃省兰州市城关区萃英路 82 号 730030  
 兰州大学第二医院骨科病研究所, 科研楼 2 楼  
 Tel: (0931) 8942 479 (夏亚一)  
 E-mail: xiayayi@126.com