

研究简报

PCL/HA 骨组织工程多孔支架的制备及其理化性能研究

栗可心,钟聚婧,郭华超,李 潘,蒋志敏,颜廷亭*

(昆明理工大学材料科学与工程学院,昆明 650000)

摘要:以聚己内酯和羟基磷灰石粉体为原料,通过溶剂浇铸/真空挥发/粒子沥滤法(SC/VV/PL)成功制备出复合多孔 PCL/HA 支架,并通过 X 射线衍射仪(XRD)、扫描电镜(SEM)、红外分析仪(FT-IR)等对制备所得的支架物相成分、微观形貌等进行表征,研究了支架的相关理化性能,成功制备出具有较高孔隙率且力学性能良好的 PCL/HA 复合多孔支架,孔径大小在 $100\sim 300\mu\text{m}$ 之间,孔隙率达到 $83\%\sim 89\%$,满足骨组织工程支架对多孔结构的要求;研究同时表明,HA 的复合可提高了支架的结晶度及其力学强度,抗压强度达到 $3.6\sim 5.1\text{MPa}$ 。

关键词:聚己内酯;羟基磷灰石;多孔陶瓷材料;力学性能

近些年来,随着人们对健康生活的向往度和医疗水平的不断提升,骨植入材料的研究吸引着越来越多研究者的关注。其中,羟基磷灰石作为人体骨和动物骨骼中的重要组成部分,成为骨修复材料研究的热点^[1]。羟基磷灰石是人体硬骨组织重要的无机成分,具有良好的生物相容性、生物活性、骨诱导性和骨传导性,可以与骨形成较强的键合,产生骨基质胶原^[2]。另外,在机体溶液作用下,羟基磷灰石分解出的钙离子和磷离子会被人体组织吸收和利用,促进骨组织的生长^[3,4]。但羟基磷灰石同时存在机械性能低,容易脆性断裂的问题,很难满足临床上不同修复区域的要求^[5,6]。为了提高支架可塑性,模仿天然骨组成结构,可用韧性的医用高分子材料与其复合。

聚己内酯(PCL),化学式为 $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2)_n$,分子量从 40000 到 120000,熔点为 60°C 左右, T_g 为 -60°C 左右,是一种可降解的聚酯高分子材料^[7],因其碳链延性良好,分子链中的 C—C 键和 C—O 键可自由旋转,聚己内酯可低温成型,具有良好的柔韧性、可塑性和力学性能^[8~10]。聚己内酯的生物相容性表现良好,在人体中能够很好地与生物细胞相容,且在聚己内酯的基架上细胞的生物活性没有影响^[11]。在体内可缓慢降解成水和 CO_2 这两种物质,对身体无害^[12]。但聚己内酯作为高分子材料,亲水性较差,细胞粘附作用较无机物材料和天然衍生物材料差^[13~15]。羟基磷灰石和聚己内酯复合,可以发挥两种材料的特性,以符合临床生物医学的要求。有研究指出,PCL/HA 复合支架抗压强度相对于 HA 支架得到了提高,同时也表现出更好的生物相容性^[16,17]。

此外,研究同时表明作为骨修复及骨组织工程支架用的生物陶瓷材料除了要具有一定的机械强度外,其孔隙结构必须适应骨细胞附着、迁移和生长^[18]。这是材料能够促进成骨的必要性能。有文献指出陶瓷材料中的微孔可加速新骨的形成,促进细胞的黏附和生物代谢物的吸收,以及在与组织修复相匹配的控制速率下的再吸收^[19,20]。孔径大小作为影响纤维血管组织内生的重要参数,研究认为,合适的孔径为 $100\sim 600\mu\text{m}$ ^[21]。孔隙率及孔内部的连通性也是骨长入方式和数量的决定性因素。当孔隙率超过 30% 后,孔隙之间能相互连通,新生骨组织可以从人工骨表面长入内部贯通性孔隙。连通的孔隙有利于

10.14028/j.cnki.1003-3726.2021.05.009

收稿:2020-03-16;修回:2020-12-00;

基金项目:“抗菌改性羟基磷灰石晶须的制备研究(201910674006)”和“PCL/PVA 复合人造皮肤修复用材料的制备及应用基础研究(201810674002)”;

作者简介:栗可心(1995-),女,河北省人,硕士研究生。E-mail:1935268240@qq.com;

* 通讯联系人:颜廷亭,博士,副教授。E-mail:itty@foxmail.com.

细胞的迁移、营养的输送和代谢产物的排出等。孔隙率越高,越有利于新骨长入。

羟基磷灰石与人体骨骼的无机成分相似,具有良好的生物相容性及骨传导性能,聚己内酯具有良好的生物相容性,基于以上内容,本研究以羟基磷灰石(HA)和聚己内酯(PCL)作为原料,采用溶剂浇铸/真空挥发/粒子沥滤法(SC/VV/PL)制备聚合物三维多孔支架。并对所制备的支架的结构、形貌、力学性能、降解性能进行检测分析,为其用作骨组织工程支架材料提供理论依据。

1 实验

1.1 实验药品与设备

药品:聚己内酯(深圳光华伟业股份有限公司)、三氯甲烷(广东省化学试剂研发中心)、实验室自制过 200 目筛羟基磷灰石粉体、氯化钠(广东省化学试剂研发中心)、去离子水(实验室自制)、模拟体液(实验室自制)。

仪器:采用 FA2004 电子天平(上海舜宇恒平仪器有限公司)称量样品;采用 78HW-1 数显恒温磁力搅拌器(杭州仪表电机有限公司)机械搅拌;采用布氏漏斗抽滤机(上海双鹅制冷设备有限公司)进行抽滤;采用 303A-2 电热恒温鼓风干燥箱(上海市崇明实验仪器厂)干燥样品;采用 HY-0230 型力学性能测试仪(上海衡翼精密仪器有限公司)对样品进行力学测试;采用 EQUINOX55 型红外光谱仪对样品的化学组成进行分析;采用 Quanta 2000 型扫描电子显微镜进行样品形貌分析;采用 D/Max-Y 型 X 射线衍射仪对样品进行物相分析。

1.2 实验制备

本实验制备复合 PCL/HA 多孔支架的具体步骤为:称取聚己内酯 3g,加入到 23.2mL 的三氯甲烷中,置于磁力搅拌器上机械搅拌 1h,混合均匀,得到粘稠透明的高分子溶液,将过 200 目筛羟基磷灰石粉体(0%、1%(wt)、5%(wt)、20%(wt))加入到高分子溶液后继续搅拌,待混合均匀后,加入 23g 研磨并过 50 目的筛的氯化钠颗粒,继续搅拌,直至溶液再次混合均匀,静置一段时间,得到糊状混合物。将得到的糊状混合物倒入装有润湿滤纸的布氏漏斗中,并用保鲜膜密封,静置 20min 后,抽滤瓶连接到真空泵,对混合物进行真空抽滤。将抽滤后得到的样品置于 37℃烘干箱中干燥 12h,得到固体样品。将得到的固体样品浸泡到蒸馏水中清洗,每 2h 换一次水,以完全除去样品中的氯化钠颗粒。待氯化钠去除干净后,将样品置于烘干箱中继续干燥 24h,直到得到完全干燥的圆盘状样品,并对其进行切割,得到 10mm×10mm×10mm 的立方块最终样品。本研究的工艺流程图如图 1 所示。

1.3 性能表征

1.3.1 微观形貌及物相成分分析 采用 X 射线衍射仪(XRD)分析支架相成分组成并计算其结晶度;采用扫描电子显微镜(SEM)观察支架的微观形貌和孔隙结构;使用红外光谱(FTIR)对样品进行定性分析,确定样品分子结构及纯度。

1.3.2 孔隙率测量 材料植入后需要高孔隙率来为细胞提供附着场所及细胞代谢活动所需的养分的运输和代谢产物的排放通道。本实验采用阿基米德原理对实验制备得到的四种支架进行孔隙率测定。孔隙率可以用公式计算。

$$q = \frac{m_2 - m_1}{m_2 - m_3} \times 100\%$$

(1)

式中, m_1 表示支架置于烘箱中干燥后的质量(干重); m_2 表示将支架浸入酒精中,饱和后取出,拭去表面酒精后的质量(湿重); m_3 表示支架悬浮在酒精中的质量(悬重)。

1.3.3 力学性能检测 力学性能是骨组织工程对于支架材料的一项重要要求,本实验采用上海上海衡翼精密仪器有限公司制造的多功能力学测试机对制备得到的四种支架进行了力学性能测试。选取每种支架材料各三个,样品尺寸为 10mm×10mm×10mm,对材料进行挤压测试,压缩速度为 5mm/min,直到材料断裂,记录得到的最大值,把三个最大值加和后,取其平均值,并记录在表。

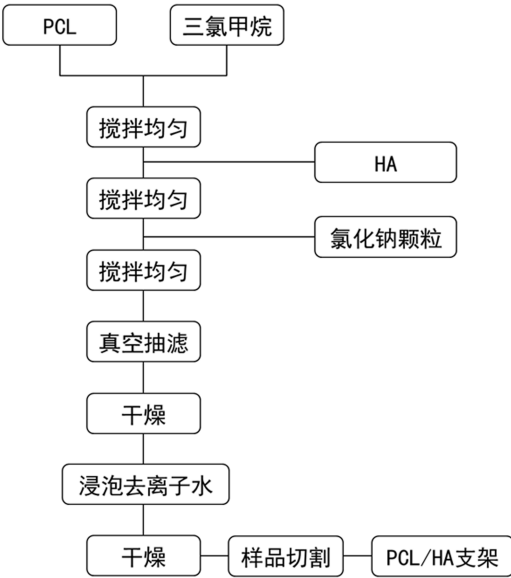


图 1 试验工艺流程图

Figure 1 Flow of the experiment

1.3.4 体外生物降解实验 采用人体模拟体液(Simulated Body Fluid, SBF)作为体外降解实验的体外降解溶液,检测样品生物活性。SBF 是日本学者 Kokubo^[22]等以人体血浆的各离子浓度为模板设计的模拟体液。近年来,经过不断调整,SBF 离子浓度如表 1 所示^[23]。具体方法为:测量原始样品的质量 M_0 ,不同降解时间点样品质量 M_n ,通过公式

$$D = \frac{m_0 - m_n}{m_0} \times 100\% \tag{2}$$

测量出失重率 D 来观察样品的体外降解情况。本实验所采用的人体模拟体液的成分与血浆相似,如表 1 所示。

表 1 SBF 无机离子浓度与人体血浆对比

	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻
SBF	142.0	5.0	2.5	1.5	4.2	1.0	147.8	0.5
人体血浆	142.0	5.0	2.5	1.5	27.0	1.0	103.0	0.5

2 结果与讨论

2.1 PCL/HA 复合多孔支架物相分析

采用 X 射线对 PCL/HA 复合多孔支架进行物相分析,从而更清晰地了解其成分结构。PCL/HA 复合多孔支架的 XRD 衍射图谱如图 2 所示,从中可以看出,未添加 HA 的聚己内酯图谱,在 2θ 为 21.53° 和 23.83° 处有两个明显的强峰,分析出相为聚己内酯(PCL);添加羟基磷灰石(HA)后,出现了 HA 的衍射峰,说明采用的制备方法得到了 PCL/HA 的复合支架。同时,通过观察峰,发现随着 HA 含量的增加,HA 峰逐渐变强。PCL/HA 复合多孔支架的结晶度如表 2 所示,通过计算结晶度可知,羟基磷灰石含量为 0 时的 PCL 结晶度是 61.77%,而后,随着羟基磷灰石含量的增加,支架整体的结晶度逐渐变大,这是因为出现羟基磷灰石 XRD 衍射峰的缘故。其结晶度的变化,与图 1PCL/HA 复合多孔支架的 XRD 衍射

图谱中峰强的变化一致。

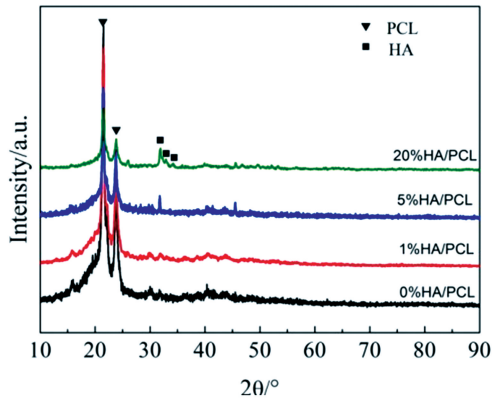


图 2 PCL/HA 复合多孔支架的 XRD 衍射图

Figure 2 XRD diffraction pattern of PCL/HA composite porous scaffolds

表 2 四种不同 HA 量支架的结晶度

Table 2 The crystallinity of four different HA content scaffolds

样品编号	1 (0%HA)	2 (1%HA)	3 (5%HA)	4 (20%HA)
结晶度	61.77%	65.20%	81.42%	96.64%

2.2 PCL/HA 复合多孔支架微观形貌分析

图 3 是复合支架扫描电镜显微形貌图,从图中,可看出支架存在大量的孔洞结构,说明采用溶剂浇铸/真空挥发/粒子沥滤法(SC/VV/PL)成功制备出多孔的复合支架。(a)、(b)、(c)、(d)分别为 PCL、1% HA/PCL、5% HA/PCL、20% HA/PCL 支架放大 500 倍后的扫描图片,观察(a)~(d),可发现大部分孔呈现出扁圆形,这是用氯化钠做造孔剂的缘故,氯化钠颗粒的形状和大小决定了支架孔洞的形状和大小。骨组织工程中,合适的孔径为 $100\sim600\mu\text{m}$ ^[24],Jones^[25] 研究指出:孔径过小,不利于组织向内生长,同时血管化的最小孔径不低 $100\mu\text{m}$ 。当支架孔洞过大时,材料的力学性能会受到影响。本实验得到的孔洞大小在 $100\sim300\mu\text{m}$ 之间,符合骨组织工程支架对多孔结构的要求。仔细观察,发现支架存在大量的细小微孔,大大增加了支架材料的贯通性,有利于细胞黏附生长营养成分渗入和代谢产物排除,同时促进材料降解。(e)、(f)、(g)分别是 PCL、1% HA/PCL、5% HA/PCL 的 1000 倍下的扫描图片,可以看到,当不含有 HA,或者添加 HA 含量很少时,支架材料表面还是比较光滑的,细小微孔也能清晰可见。(h)是 20% HA/PCL 放大 1000 倍后的 SEM 图片,可以看出,支架表面附着着羟基磷灰石的小颗粒,一些细小孔洞被羟基磷灰石颗粒占据,支架材料表面凹凸不平,有利于细胞粘附和增殖。附着在支架表面的羟基磷灰石,直接影响材料的生物学性能,材料表面磷灰石越多,就越容易在材料表面形成新骨。

2.3 PCL/HA 复合多孔支架红外光谱分析

使用傅里叶红外光谱检测样品的化学成分和物理结构,得到 PCL/HA 复合支架的 FTIR 图谱如图 4 所示,分析可知, 3440cm^{-1} 处是羟基的吸收峰,这是多孔材料中普遍存在的一处峰。在 HAP 添加量为 0 的纯 PCL 红外光谱图中,分析纯聚己内酯的红外光谱可知, 2928cm^{-1} 、 2849cm^{-1} 处为 C—H 的伸缩振动峰,且 1642cm^{-1} 处出现 C=O 的伸缩振动峰,因实验中并未引入其他物质,断定了聚己内酯的存在。对于实验室自制羟基磷灰石粉体的红外光谱分析发现,羟基磷灰石的峰值一般存在于 $500\sim1700\text{cm}^{-1}$ 之间。观察加入 HAP 后的 PCL/HA 复合支架的 FTIR 图谱,在 1734cm^{-1} 、 1041cm^{-1} 、 732cm^{-1} 、 537cm^{-1} 处出现了明显的峰,其中 1734cm^{-1} 处为 O—H 生物弯曲振动峰, 1041cm^{-1} 处是 PO_4^{3-} 的特征吸收峰, 732cm^{-1} 、 537cm^{-1} 是 P—O 峰,与羟基磷灰石的红外图谱峰位相吻合,说明存在羟基磷灰石,而在纯 PCL 红外图谱中不存在这些峰,说明 HAP 成功地加入到 PCL 中了,并且没有对 PCL 的峰产生影响,说

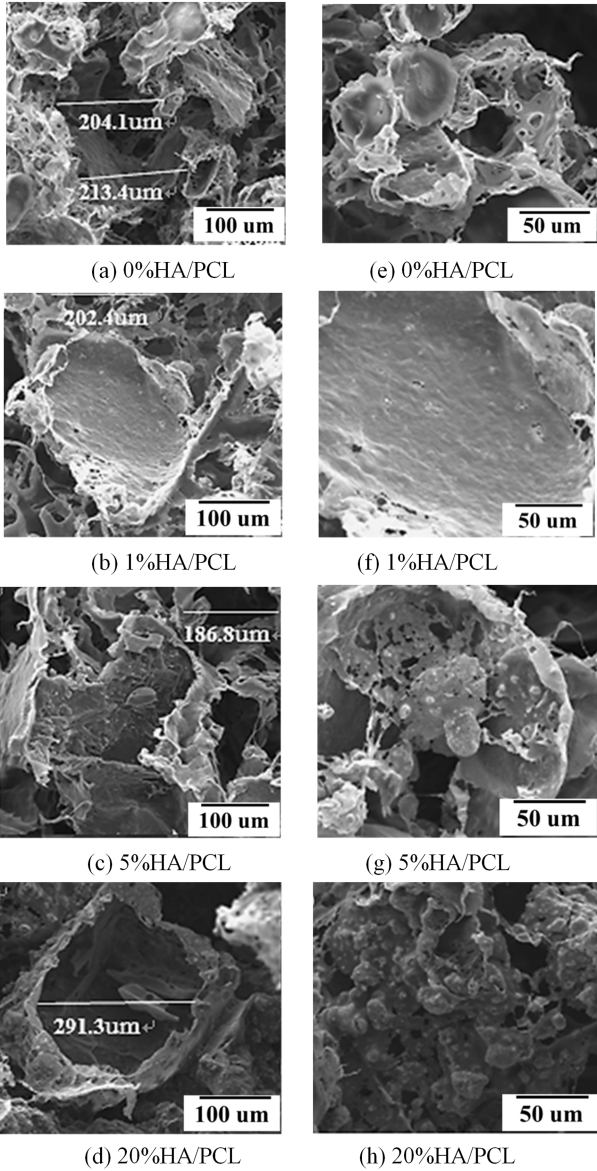


图 3 复合支架 SEM 图
(a, e)0% HA/PCL;(b, f)1% HA/PCL;(c, g)5% HA/PCL;(d, h)20% HA/PCL
Figure 3 Composite scaffold SEM pictures
(a, e)0% HA/PCL;(b, f)1% HA/PCL;(c, g)5% HA/PCL;(d, h)20% HA/PCL

明聚己内酯和羟基磷灰石之间没有发生化学反应生成新的物质。这与 XRD 分析结果相吻合。

2.4 孔隙率

通过公式(1)测量得到的四种不同 HA 量支架的平均孔隙率结果如表 3 所示。

表 3 四种不同 HA 量支架的平均孔隙率表
Table 3 The average porosity form of four different HA content scaffolds

样品编号	1(0% HAp)	2(1% HAp)	3(5% HAp)	5(20% HAp)
平均孔隙率(%)	88.3%±2.25%	86.9%±2.02%	87.8%±1.86%	84.4%±1.96%

观察表 3 四种不同 HA 量支架的平均孔隙率发现四种支架具有良好的孔隙率,基本都保持在 80%

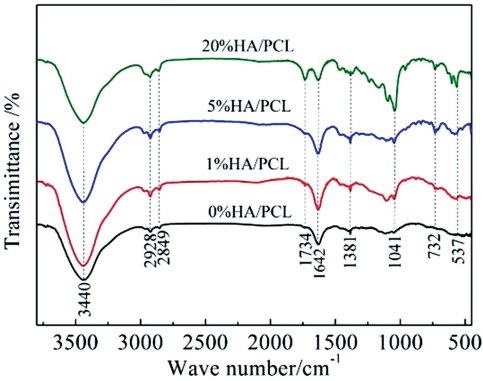


图 4 PCL/HA 复合支架的 FTIR 图谱

Figure 4 FTIR spectra of PCL/HA composite scaffold

以上,这是造孔剂存在的缘故。苏佳灿等^[26]的研究表明,当氯化钠造孔剂与聚己内酯的质量比接近或大于 8 时,HA/PCL 复合支架的孔隙率会大于 80%,本研究使用 NaCl/PCL 质量比接近于 8,结果与相关研究一致。同时发现添加 1%和 5%HA 后的支架的孔隙率分别为 86.9%和 87.8%,与纯 PCL 支架材料的孔隙率相比,变化不大。这是因为添加羟基磷灰石含量比较少的缘故。当添加的 HA 含量达到 20%后,其复合支架的孔隙率有所下降,到达 84.4%,说明随着羟基磷灰石含量的增加,羟基磷灰石的细小颗粒占据了 PCL/HA 复合多孔支架的孔洞位置,致使孔通道变窄,孔容积变小。但其孔隙率仍达到 80%以上,符合骨组织工程对支架材料的孔隙要求。

2.5 力学性能分析

图 5 为几种支架的平均抗压强度,可以看出,当不添加 HA 时,纯 PCL 支架的平均抗压强度为 3.588MPa,添加 HA 后的支架,其抗压强度有所提高,当羟基磷灰石的添加量为 1%时,虽然抗压强度提升不明显,但也有所提高,羟基磷灰石的添加量为 5%和 20%时,支架的平均抗压强度分别达到了 4.345MPa 和 5.079MPa,随着 HA 含量增加,支架抗压强度越来越大,说明了 HA 可以提高支架的力学性能。结合样品的孔隙率分析,可知孔隙率对于样品的力学性能有一定的影响。随着羟基磷灰石含量的增加,细小的羟基磷灰石颗粒占据了支架材料的部分孔洞位置,使其孔隙率降低,材料开始变得致密,从而致使支架材料的力学性能得到了改善。

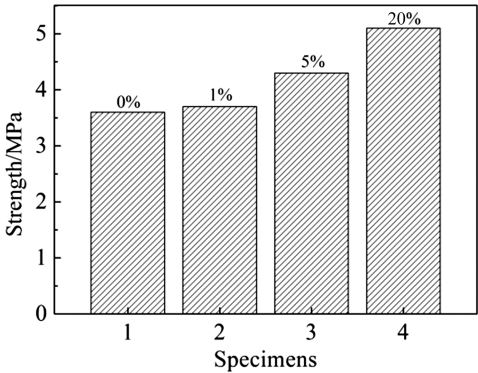


图 5 四种不同 HA 量支架的平均抗压强度

Figure 5 The average compressive strength of four different HA content scaffolds

2.6 体外降解性能分析

采用实验室自制的 SBF 溶液对制备得到的支架材料进行降解实验。对四种支架进行编号,分别为 1~4 号,每种支架各选取 3 个进行降解实验。在分别标号后放入可封闭的降解管中,每隔 48 小时换一

次液,观察样品降解情况,并做好记录。图 6 为 PCL/HA 复合支架的降解曲线图,降解天数为横坐标,失重率为纵坐标,可以看出,样品的降解主要分为两个阶段。第一阶段,样品降解 7 天左右,几种支架的降解率呈现负数变化,即样品表现增重现象。前一周时间左右,样品失重率快速下降,这是因为开始的时候,SBF 溶液中的磷酸钙盐迅速沉积在支架表面及孔洞内部,逐渐生成类羟基磷灰石,此时支架发生降解,但降解的速率小于钙磷盐的沉积速率,因而表现出增重现象。第二阶段,一周后,样品失重率开始升高,是因为样品本身发生降解,且材料的降解速率开始大于溶液中钙磷盐的沉积速率,材料表现出失重现象。未添加羟基磷灰石的样品,在第九天后,样品失重率为正,说明支架前期降解速率比较快。在降解过程中,由于称量时 SBF 降解液被吸干的程度不同,所以数据会存在偶然性误差。

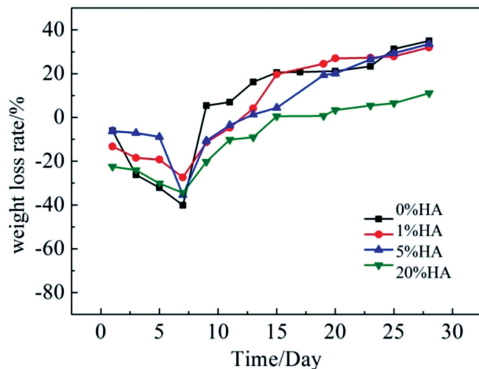


图 6 PCL/HA 复合支架的降解曲线图

Figure 6 Degradation curve of PCL/HA composite scaffold

3 结论

(1)实验通过溶剂浇铸/真空挥发/粒子沥滤法(SC/VV/PL)成功制备了具有较高孔隙率且力学性能良好的不同比例的 PCL/HA 复合多孔支架;

(2)实验制备得到的 PCL/HA 复合多孔支架具有良好的孔隙率,达到 83%~89%,且支架孔径大小在 100~300 μm 之间,符合骨组织工程支架对多孔结构的要求;

(3)羟基磷灰石的加入,提高了 PCL/HA 复合多孔支架的结晶度及其力学强度,抗压强度达到 3.6~5.1MPa,满足骨组织工程支架力学要求。

参考文献:

- [1] 张永祥,廖建国,李艳群,路善行,段星泽. 材料导报,2017,31(17):53~60.
- [2] 赵宏霞. 功能材料,2017,48(1):1047~1055.
- [3] 高黎,王书岩,王蕊,许永华,高静静,张丽,刘文涛. 中国组织工程研究,2019(22):2095~4344.
- [4] 刘晓南,张道海,何敏,秦舒浩,彭红英. 现代塑料加工应用,2019(2):1004~3055.
- [5] 傅婷,谷子芽,李颖,洪艳. 医学研究杂志,2016,45(2):153~155.
- [6] Suwanprateeb J, Thammarakcharoen F, Hobang N. Journal of Materials Science Materials in Medicine, 2016,27(11):171.
- [7] Labet M, Thielemans W. Chemical Society Reviews, 2009,38(12):3484~3504.
- [8] Kweon H Y, Mi K Y, Park I K, Kim T H, Lee H C, Lee H S, Oh J S, Akaike T, Cho C S. Biomaterials, 2003,24(5):801~808.
- [9] 戴炜枫,茹敏良,何月英,郎美东. 高分子通报,2008(9):10~19.
- [10] 张俊,肖艳,徐衡,郎美东. 高分子通报,2016(5):13~26.
- [11] 潘福勤,刘建辉,庞胤,邱严力,周静,李琦,蔡春意. 中国组织工程研究,2018,22(14):2168~2173.
- [12] 王培,周晓霞,牛丽丽,李静宇,刘彦彬,王焕英. 塑料科技,2016,44(6):92~95.
- [13] Sanni O, Chang C Y, Anderson D G, Langer R, Davies M C, Williams P M, Williams P, Alexander M R, Hook A L. Advanced Healthcare Materials, 2015,4(5):695.

[14] 黄琼瑜,余厚德,肖秀峰,刘榕芳. 复合材料学报,2009,26(1):24~30.

[15] 王志伟,苏佳灿,马玉海,张欣,曹烈虎,李明. 无机材料学报,2010,25(5):500~506.

[16] Salerno A,Zeppetelli S,Maio E D, Iannace S,Netti P A. Composites Science & Technology,2010,70(13):1838~1846.

[17] 贾治彬,智伟,李金雨,李金雨,卢晓英,刘剑阳,盛露瑶,许韬韬,段可,屈树新. 功能材料,2014,45(18):18129~18134.

[18] Badylak S F, Freytes D O, Gilbert T W. Acta Biomaterialia,2015,23:S17-S26.

[19] Han Q F,Wang Z W,Tang C Y,W Li,Wei Q,Wen S,Liu J,Shiet Y. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials,2017,71:262~270.

[20] 陈建洪,唐倩,田词,梁焕友,陈晓,吴刚. 中国组织工程研究,2009,29(29):629~632.

[21] Dabrowski B, Swieszkowski W, Godlinski D, Kurzydowski K J. Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials,2010,95B(1):53~61.

[22] Kokubo T,Takadama H. Biomaterials,2006,27(15):2907~2915.

[23] 孙圣淋,吕宇鹏. 材料导报,2011,25(19):96~99.

[24] Wei J. European Polymer Journal,2004,40(3):509~515.

[25] Jones J R,Ehrenfried L M,Hench L L. Biomaterials,2006,27(7):964~9f73.

[26] 苏佳灿,李明,禹宝庆,张春才. 无机材料学报,2009,24(3):485~490.

Preparation and Physicochemical Properties of PCL/HA Bone Tissue Engineering Porous Scaffold

LI Ke-xin, ZHONG Ju-jing, GUO Hua-chao, LI Pan, JIANG Zhi-min, YAN Ting-ting*
(Faculty of Materials Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology,
Kunming 650000, China)

Abstract: Polycaprolactone and hydroxyapatite powders were used as raw materials to prepare polymer three-dimensional porous scaffolds by solvent casting/vacuum evaporation/particle leaching (SC/VV/PL). X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and infrared analyzer (FT-IR) characterized the composition and microstructure of the scaffold. The related physical and chemical properties of the scaffold were studied. The results show that PCL/HA composite scaffolds with high porosity and good mechanical properties are successfully prepared. The pore size of PCL/HA composite scaffolds is between 100~300μm, the porosity has reached to 83%~89%, which is in line with the requirements of porous scaffolds. The requirements also show that the composite of HA can improve the crystallinity and mechanical strength of the scaffold, and the compressive strength reaches 3.6~5.1MPa.

Key words: Polycaprolactone; Hydroxyapatite; Porous ceramic material; Mechanical strength