

文章编号:1004-7220(2010)01-0016-05

溶胶-凝胶生物活性玻璃/胶原复合 多孔支架的力学性能研究

张娟娟^{1,2}, 孟永春^{1,2}, 陈晓峰^{1,2}, 李玉莉^{1,2}, 罗小刚^{1,2}, 林才^{1,3}

(1. 华南理工大学 生物医学工程研究院, 广州 510640; 2. 华南理工大学 特种功能材料教育部重点实验室, 广州 510640;

3. 温州医学院 附属第一医院)

摘要: 目的 研究溶胶-凝胶生物活性玻璃/胶原组织工程支架的力学性能及降解性能,为胶原基复合支架的进一步应用,提供理论基础。**方法** 以纳米溶胶-凝胶生物活性玻璃为添加相,利用冷冻干燥法制备了4种溶胶-凝胶生物活性玻璃/胶原基复合多孔组织工程支架。**结果** (1) 溶液中胶原纤维的聚集状态,制备出具有直径约为400~600 nm的粗胶原纤维束支架材料,这种粗胶原纤维束对改善胶原基组织工程支架的力学强度和减慢其降解速度具有重要作用,其中胶原与生物活性玻璃质量比为40:60时,具有最高的抗压强度(1.5469±0.0995)MPa。(2) 利用FTIR和Raman等技术综合分析研究了溶胶-凝胶生物活性玻璃对胶原蛋白的二级结构的影响,当复合材料中胶原含量小于20%时,胶原蛋白二级结构破坏严重。**结论** 当胶原与生物活性玻璃质量比为40:60时,所制备的复合支架具有最好的抗压性能和降解性能,为进一步应用提供了研究基础。

关键词: 胶原; 生物活性玻璃; 支架; 力学性能; 降解**中图分类号:** R318.01 **文献标志码:** A

Investigation on mechanical property of the compound scaffold of Sol-Gel bioactive glass/collegan

ZHANG Juan-juan^{1,2}, MENG Yong-chun^{1,2}, CHEN Xiao-feng^{1,2}, LI Yu-li^{1,2}, LUO Xiao-gang^{1,2}, LIN Cai^{1,3} (1. *Biomaterials Research Institute, College of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China*; 2. *The Key Laboratory of Specially Functional Materials, Ministry of Education, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China*; 3. *The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China*)

Abstract: Objective To investigate the mechanical prosperity and degradation rate of the scaffolds with compounding collagen and the nano sol-gel derived bioactive glass were studied, and provide the theoretical basis for the further application of collagen based scaffolds. **Method** The scaffold with compounding collagen and the nano sol-gel derived bioactive glass (58S) were prepared using the freeze-drying techniques with the bioactive glass as phase addition. By affecting the aggregation state of the collagen fibers with adjusting the supplementation of bioactive glass to change the microstructures of the compound scaffolds and finally the compound scaffolds with different mechanical properties were prepared. **Results** (1) As the aggregation state of the collagen fibers changes, the scaffolds with the coarser collagen fibers is prepared with the diameters 400-600 nm approximately. The coarser collagen fibers will play an important role in improving the mechanical property and slowing down the degradation rate of the collagen based scaffolds. (2) The interactions between bioactive glass and collagen are

收稿日期: 2010-01-04**基金项目:** 国家自然科学基金(50672028), 国家自然科学基金重点项目(50830101, 50732003), 浙江省自然科学基金(Y407241)。**作者简介:** 张娟娟(1984-), 研究方向: 生物活性玻璃及其生物相容性。**通讯作者:** 陈晓峰, 教授, E-mail: chenxf@scut.edu.cn。

studied by FTIR and Raman technologies. When the quality of content of collagen in the compound scaffolds is lower than 20%, the secondary structure of collagen is damaged severely. **Conclusion** The composite scaffolds with the mass ratio of collagen to bioactive glass 40: 60 has the best performance in mechanical property and degradation, which will be helpful for further applications.

Key words : Collagen; Bioactive glass; Scaffolds; Mechanical properties; Degradation

生物医用复合材料 (biomedical composite) 是由两种或两种以上不同材料复合而成的生物医学材料,主要用于修复患病或缺损的人体组织和器官,也用于制作多孔组织工程支架。不同于一般的复合材料,生物医用复合材料除应具有预期的物理和化学性质之外,还必须满足生物相容性的要求^[1-3]。医用高分子材料、医用金属和合金以及生物陶瓷均可既作为生物医学复合材料的基材,又可作为其增强体或填料,生物医学复合材料从单一的成分仿生,走向成分、结构和功能的仿生。

根据 Hench^[4] 的表述,溶胶-凝胶生物活性玻璃具有第 3 代生物医学材料的某些特征。具有良好的生物活性,能与骨组织形成化学键合,同时具有细胞基因激活作用的新型生物医学材料^[5]。他能够在植入部位与人体生理溶液迅速发生一系列化学反应,在材料表面形成类骨的碳酸羟基磷灰石 (HCA) 层,此 HCA 层对于材料与骨组织形成骨性结合具有重要作用。最新的研究表明,生物活性玻璃中释放的 Si、Ca 等物质对于调节诱发骨祖细胞周期开始和进程的基因具有激活作用,从而促进了细胞的分化和增殖,促进了新骨形成。

I 型胶原是天然骨基质的主要有机成分,具有良好的生物相容性和生物降解性^[6]。但将胶原作为组织工程材料,其力学强度低和降解速度过快等特性,目前始终难以解决。本研究采用化学交联及溶胶-凝胶生物活性玻璃复合技术,增大了胶原支架中的胶原纤维束的直径,从而显著改善了支架力学强度,并减慢了其降解速度。这种新型的复合支架材料可在骨组织修复以及骨组织工程支架制作方面具有重要的应用前景。

1 材料与方法

1.1 实验材料

溶胶-凝胶法生物活性玻璃粉体 58S (本实验室制备, SiO₂ 58%, CaO 33%, P₂O₅ 9%, 质量分数)^[7],

粒度 10 μm 以下; 胶原蛋白购自创尔 (广州) 有限公司; 水溶性盐酸碳二亚胺, N-羟基琥珀酰亚胺, 乙磺酸均购自上海伯奥生物科技有限公司; PBS 实验伴侣购自中山大学达安基因股份有限公司。

1.2 溶胶-凝胶生物活性玻璃 (58S)/胶原 (Col) 复合支架的制备

1.2.1 首先制备纳米生物活性玻璃 NBG (58S), 化学组分为: 60% SiO₂, 36% CaO, 4% P₂O₅ (mol%)。制备过程主要分 3 个步骤:

(1) 溶胶液 (A) 的配制: 将一定量的正硅酸乙酯 (Si(O₂C₅H)₄, TEOS), 四水硝酸钙 (Ca(NO₃)₂ · 4H₂O) 按顺序加至水与乙醇的溶液中, 用盐酸将溶液的 PH 值调至 1-2。充分搅拌均匀一段时间后获得透明均一稳定的溶胶。

(2) PEG-磷酸氢二氨溶液 (B) 的配制: 将一定量的磷酸氢二氨 ((NH)₂HPO₄) 溶于去离子水中, 待其完全溶解后, 加入一定量的 PEG (相对分子质量 10 000), 分别配成 PEG 的浓度为 0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 15% 的溶液, 充分搅拌均匀, 待其溶解完全。

(3) 溶胶-凝胶生物活性玻璃纳米粉体制备: 将已经配好的 A 溶液缓慢滴加至 B 溶液中, 待其搅拌均匀后, 向其中缓慢滴加氨水, 这时溶液出现白色沉淀, 继续滴加氨水, 将 pH 值调为 10-11, 之后离心, 用去离子水洗涤, 得白色沉淀, 置于冷冻干燥机中将其冷冻干燥, 得到白色粉体。再放入箱式电炉中, 经过 600 °C 热处理, 无需研磨, 最终得到白色纳米生物玻璃粉末。

1.2.2 制备溶胶-凝胶生物活性玻璃 (58S)/胶原 (Col) 复合支架。在机械搅拌下, 按照胶原与纳米生物活性玻璃的比例, 往胶原溶液中加入前面制备得的纳米生物活性玻璃, 制备出 4 种样品, 分别为样品 1 (Col: BG = 80: 20), 样品 2 (Col: BG = 60: 40), 样品 3 (Col: BG = 40: 60), 样品 4 (Col: BG = 20: 80), 上述混合液搅拌均匀后乙磺酸作为缓冲剂调节混合

液的 pH 值到 9.0, 再加入水溶性盐酸碳二亚胺和 N 羟基琥珀酰亚胺进行交联, 然后加入模具成型, 再放入超低温冰箱 (VXE380, Jouran, France) 中 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 12 h, 最后经冷冻干燥机 (ALPHA2-4, Christ, Germany) 冻干处理, 得到支架材料。

1.3 支架的结构、性能表征

采用 FTIR 技术 (Nexus, 美国 Thermo 公司)、Raman 光谱分析技术 (LabRAM Aramis, 法国 HJY 公司) 以及 SEM 分析技术 (30XLFEG, 荷兰 Philips 公司) 对复合支架的结构、性能进行表征, 并研究溶胶-凝胶生物活性玻璃对胶原结构的影响。

1.4 支架力学性能研究

每种样品各制备出直径 10 mm, 高 10 mm 的圆柱体 5 个, 然后用 ElectroForece3200 材料生物力学性能测试仪 (BOSE 公司, 美国), 抗压速度为 0.01 mm/s , 压缩距离为样品高度的 50%, 然后用 SPSS11.0 统计测量结果。

1.5 支架体外降解性能研究

将制备的复合支架, 称重好后放入配制好的 PBS 溶液中, 溶液 pH 值为 7.2, 支架质量与 PBS 体积的比为 $75\text{ mg}/50\text{ mL}$, 分别浸泡 1, 3, 5, 7, 14 和 28

d, 每个时间点同时有 5 个平行样, 然后经冷冻干燥后, 称取干燥后的质量, 用样品浸泡的质量与原质量的比来表征样品在 PBS 中的降解情况, 同时利用 FTIR (Nexus, 美国 Nicolet 公司) 来研究样品中胶原官能团的变化。

2 结果与讨论

2.1 复合支架的显微结构形貌

图 1 为 4 种样品的 SEM 放大 10 000 倍的照片, 主要研究 4 种样品显微结构的变化。同时也测定了 4 种样品的孔隙率, 按照顾其胜介绍的方法^[8] 测定为 79% 左右, 无大的差别。样品 3 中可以清楚地观察到有直径 $400\sim 600\text{ nm}$ 左右的纤维的分布, 相比较其他样品, 只有样品 4 也分布很多纤维, 但与样品 1 相比, 比较杂乱无章。胶原纤维束直径由一般为 64 nm 左右, 本实验中制备的样品中的胶原纤维束的直径已增加到 $400\sim 600\text{ nm}$, 在制备过程中, 通过调节 I 型胶原与生物玻璃之间的比例, 来改变溶液中生物活性玻璃溶出离子的浓度, 进而影响溶液中的 pH 值和电荷, 从而破坏了原有胶原纤维之间的平衡, 增强胶原纤维束之间的相互吸引作用, 增强其

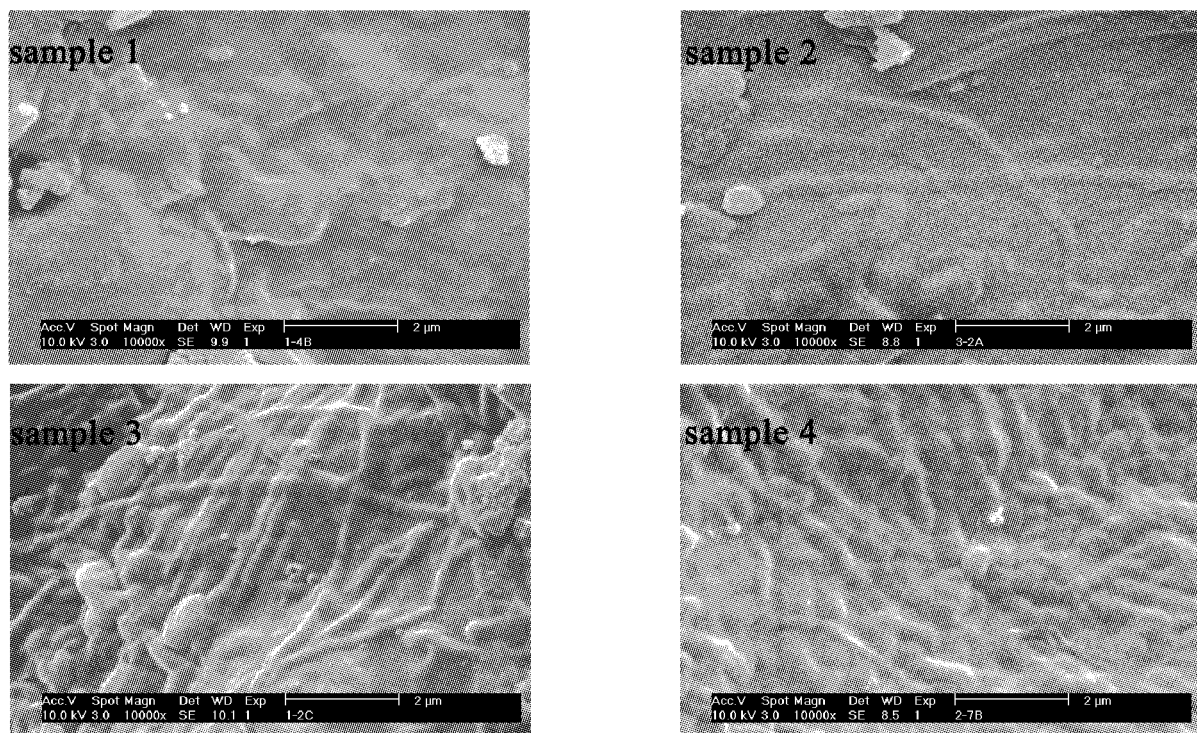


图 1 4 种样品的 SEM (10 000 ×) 照片: 样品 1, 样品 2, 样品 3, 样品 4

Fig.1 SEM micrographs (10 000 ×) of the four kinds of scaffolds: sample 1, sample 2, sample 3 and sample 4

聚集状态,从而使得构成复合材料网络结构的胶原纤维束的直径增大,通过粗纤维间相互交织形成网络结构,将使材料的力学强度和降解性能得到有效的改善。

2.2 生物活性玻璃对胶原结构的影响

图2为I型胶原与所制备样品的红外图谱图。在I型胶原中,1 650 cm^{-1} 、1 550 cm^{-1} 分别对应酰胺I带和酰胺II带的特征峰^[9, 10],通过4种样品的红外图谱与I型胶原的红外图谱对比,可以证明本实验中样品1、样品2和样品3在制备过程中,很大程度上保持了I型胶原原有的结构,可以预测同时也保持了胶原原有的活性。相比较样品4,胶原的特征峰已有较大的削弱,可以说明在样品4中,胶原的结构已被破坏,生物活性玻璃的加入量对胶原的结构具有一定的影响。

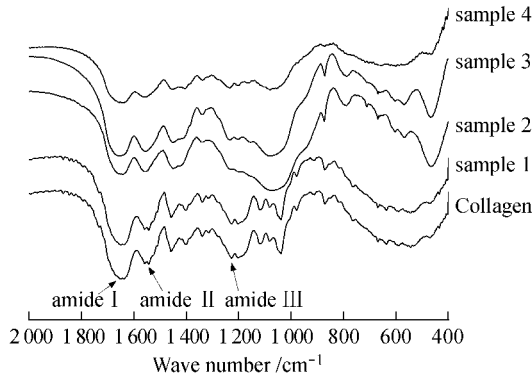


图2 制备的4种样品的红外图谱与I型胶原的红外图谱
Fig.2 FTIR spectrums of the four kinds of scaffolds and type I collagen

从拉曼图谱中可以看出(见图3),1 670 cm^{-1} 、1 455 cm^{-1} 分别对应酰胺I带和酰胺III带的特征峰,说明4种样品都较好的保持了胶原的特征结构。900~970 cm^{-1} 是蛋白骨架上的C-C键的拉曼峰,如果蛋白质在890~945 cm^{-1} 区域出现强峰,说明蛋白质含有大量的 α -螺旋;如果蛋白质在945~960 cm^{-1} 出现峰,则表明蛋白的二级结构含有无规卷曲;如果蛋白位于890~945 cm^{-1} 的峰降低,而且在900~970 cm^{-1} 区域无明显的拉曼峰,则表明蛋白的二级结构由 α -螺旋变为 β -折叠;如果蛋白的峰只是从890~945 cm^{-1} 红移到945~970 cm^{-1} ,强度并没有降低,则说明蛋白的二级结构由 α -螺旋变为无规

卷曲^[11]。可以看出在I型胶原中,含有大量的 α -螺旋,随着生物活性玻璃加入量的增加,二级结构中无规卷曲的含量,先增加后减少,其中样品3中无规卷曲结构含量最高,到样品4时,又恢复了部分 α -螺旋结构。

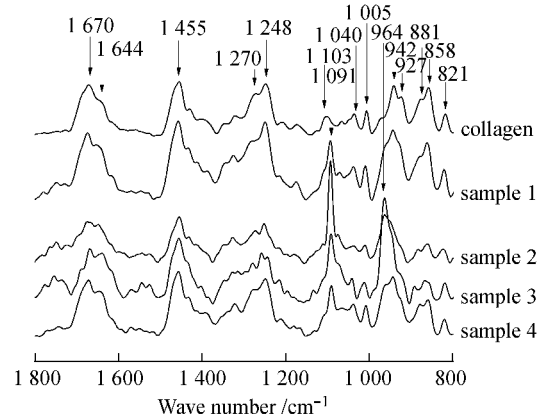


图3 制备的4种样品的I型胶原的激光拉曼图谱
Fig.3 Raman spectrums of the four kinds of scaffolds and type I collagen

2.3 复合支架材料的力学性能测试

通过在ElectroForece3200材料生物力学性能测试仪(BOSE公司,美国)上进行的抗压测试的结果分析(图4),样品3具有最高的抗压强度为(1.5469 \pm 0.0995) MPa,其次为样品4为(0.5667 \pm 0.0472) MPa,2号样品的抗压强度为(0.3020 \pm 0.0638) MPa,1号样品的抗压强度为(0.0856 \pm 0.0134) MPa。从样品1到样品3,随着生物活性玻璃粉体量的增加,抗压强度增加明显,这是由于生物活性粉体作为增强相加入到胶原纤维网络中。其次,由于生物活性粉体的加入对胶原纤维的聚集状态产生了影响,增强了胶原纤维之间的相互作用,使得构成支架网络显微结构的纤维直径增大。同时在电镜照片中可知,样品3中的胶原纤维的排列有一定的规则,从而支架测抗压强度增大。当生物活性玻璃在支架中的比例80%时,抗压强度又降低,因为生物活性玻璃粉体的加入量已过量,不能有效的起到增强的效果,同时从电镜照片中可以看到,样品4中的胶原纤维与样品3中的相比,显得杂乱无序,这些都导致了其强度的降低。所以生物活性玻璃粉体不仅对胶原的结构及其聚集状态有一定的作用,同时对支架网络结构也起到增强相的作用。结合样品的形貌和结

构,通过结果分析,可以得出,通过直径增粗的胶原纤维对复合支架材料的力学性能的增强具有很大的贡献。

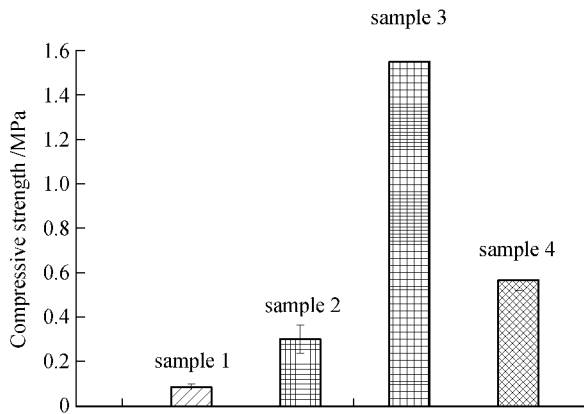


图4 4种样品的抗压强度测试

Fig.4 The compressive strengths of the four kinds of scaffolds

2.4 复合支架材料在 PBS 中的降解实验

在降解实验中,本文选择力学强度较好、胶原结构保持较完整的样品2和样品3。图5显示了I型胶原、样品2、溶胶凝胶生物活性玻璃和样品3在PBS中的降解的情况,说明了在PBS中浸泡28d后,它们的质量分别是原质量的(30.85 ± 10.55)%、(57.31 ± 7.48)%、(104.30 ± 2.06)%和(106.30 ± 1.34)%。溶胶凝胶生物活性玻璃和样品3质量的增加,可以认为是PBS中磷酸盐在其上有沉积,同时可以看出样品3在降解性能上有了很大的提高。

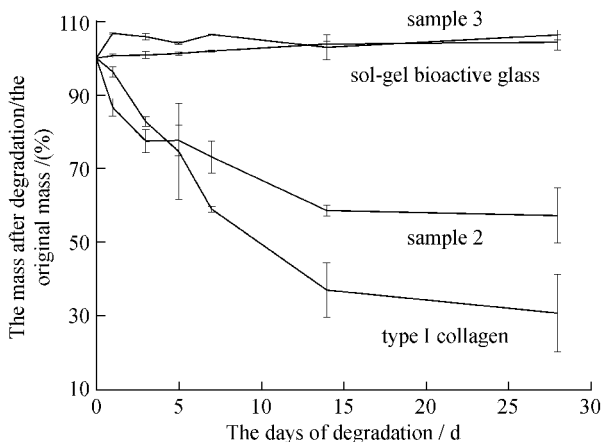


图5 样品在 PBS 中的降解

Fig.5 The degradation rate of the four kinds of scaffolds in PBS

在一定 pH 值下胶原溶液中,胶原纤维相互之间有一定的范德华力、氢键等相互作用,稳定存在。当加入生物活性玻璃后,生物活性玻璃在溶液中会释放出大量的 Ca^{2+} 离子,使得溶液 pH 值升高,这样就破坏了胶原纤维之间原有的平衡,使得纤维与纤维之间的斥力减小,引力增加,增强了胶原纤维的聚集状态,同时 Ca^{2+} 离子也可以和胶原纤维上的羧基产生一定的电场作用,也进一步增强了聚集状态,从而可以得到由粗化的胶原纤维构成的复合支架,这样粗化的胶原纤维不仅对力学强度的提高起到了作用,同时也显著的提高了支架的抗降解能力。

3 结论

(1) 本研究使用冷冻干燥和纤维增强技术,以生物活性玻璃粉体和胶原复合制备仿生骨组织工程支架。通过调整生物活性玻璃的加入量,引发制备过程中溶液里 Ca^{2+} 和 pH 值的变化,从而改变了胶原纤维之间的相互作用力,增强了相互之间的吸引力,引起了溶液中胶原纤维之间聚集状态的变化,使得构成复合支架结构的胶原纤维束的直径的变化,进而影响了复合支架整体机械性能,最终制备出了力学性能和降解性能显著改善的复合支架材料。

(2) 本实验利用水溶性盐酸碳二亚胺和 N 羧基琥珀酰亚胺对复合支架材料进行交联,制备出胶原/生物活性玻璃复合支架材料。结果表明,样品3显微结构具有 400 ~ 600 nm 的胶原纤维束,且有一定的分布规律,从而对抗压强度和降解性能具有很大的贡献。样品3的抗压强度为 (1.5469 ± 0.0995) MPa,在 PBS 中降解 28 天质量为原质量的 $(106.30 \pm 1.34)\%$ 。

参考文献:

- [1] 李世普. 生物医学材料导论 [M]. 武汉: 武汉工业大学出版社, 2000: 201.
- [2] Wang RZ, Cui FZ, Lu HB. Synthesis of nanophase hydroxyapatite/collagen composite [J]. J Mater Sci Lett, 1995, 14: 490-492.
- [3] Almirall A, Larrecq G, Delgado JA, et al. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an α -TCP paste [J]. Biomaterials, 2004, 25: 3671-3680.

(下转第 25 页)