

文章编号:1004-7220(2011)05-0408-05

基于纳米压痕法的关节软骨保湿测量技术

刘志远, 杨庆生

(北京工业大学 机电学院, 北京 100124)

摘要: 目的 在保持关节软骨表面湿润的情况下,进行纳米压痕实验,研究具有一定生物活性的关节软骨微结构的力学性能。**方法** 通过实验的方法,评估冷镶嵌法和保湿法对保持软骨在体力学性能的优劣,并应用保湿法得到不同保护液下软骨微结构的力学性能。**结果** 冷镶嵌法测得的软骨表层的弹性模量远大于保湿法测得的数值,蒸馏水保护下的软骨表层和深层的弹性模量明显高于壳多糖溶液和生理盐水保护下的软骨的弹性模量。**结论** 保湿法更有利于保持生物材料在体时的力学性能和保持生物材料的生物活性,通过保湿法也可以证明壳多糖溶液及生理盐水均可有效保持软骨的力学性能。

关键词: 纳米压痕; 关节软骨; 保湿法; 力学性能; 微结构; 弹性模量; 生物材料

中图分类号: R 318.01 **文献标志码:** A

Measurement of articular cartilage in water based on nanoindentation method

LIU Zhi-yuan, YANG Qing-sheng (Department of Engineering Mechanics, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract: Objective To study mechanical properties of the microstructure of the articular cartilage with biological activity by nanoindentation tests under the condition of keeping the articular cartilage in water. **Methods** The different abilities to keep *in situ* mechanical properties of the articular cartilage with cold mosaic method or with moisturizing method were evaluated by experiments, and the mechanical properties of the microstructure of the articular cartilage in different kinds of solution used in moisturizing method were also obtained. **Results** The experiment showed that the elastic modulus on the cartilage surface layer with cold mosaic method was much higher than that with moisturizing method, and the elastic modulus on the cartilage surface and deep layer in chitosan and saline were much lower than that in distilled water. **Conclusions** The moisturizing method is better at preserving *in situ* mechanical properties and biological activity of the biological materials, and chitosan and saline are proved to have the effect of keeping mechanical properties of the cartilage used in moisturizing method.

Key words: Nanoindentation; Articular cartilage; Moisturizing method; Mechanical properties; Microstructure; Elastic modulus; Biological materials

生物材料力学性能测试一直是一个热点问题,然而对于尺度在 100 μm 量级以下的样品,会给常规的拉伸和压缩试验带来一系列的问题。纳米压痕仪作为一种基于纳米硬度技术来检测材料微小区域力学性能的有效实验手段,其操作方便、测量和定位

分辨力高、测试内容丰富、适用范围广泛,已经被大量地运用于多种材料的微尺度力学性能测试^[1]。应用纳米压痕仪来测试生物材料的微尺度力学性能,有着样品制备简单、对样品的大小和形状无特殊要求、不损伤样品等优点,近年来已经成为生物材料

收稿日期:2011-09-01; 修回日期:2011-09-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10872011,11172012),北京市自然科学基金项目(3092006),教育部博士点基金(20101103110005)。

通讯作者:杨庆生,教授, Tel: (010)67396333; E-mail: qsyang@bjut.edu.cn。

微结构力学性能检测的有力工具。这种技术特别适用于研究分层结构的生物材料,也使得人们可以在微尺度上更好地了解材料的力学行为。应用纳米压痕测量骨的微结构力学性能已有很多年^[2-4],而应用纳米压痕仪对软骨的不同层进行定位,并研究软骨的各向异性性能还很少^[5-7]。通过选择合适的尖端几何形状和测试方法,可以测量多种软骨微结构的力学性能,也使得纳米压痕技术变得更加强大,能够改善生物材料现有的分析方法。

然而应用纳米压痕仪测试软骨的力学性能还存在着很多的难题亟待解决,如何在试样处理过程中不破坏其表面的微结构,如何保持实验过程中软骨的生物活性,如何防止软骨在实验过程中失水,这些问题使得该方法测量得到的弹性模量偏离真值,降低了实验的可信度。上述问题构成了当前应用纳米压痕仪进行软骨微尺度力学性能测试重要且基础性的关键问题,解决这些问题对于促进纳米压痕技术在生物软组织中的应用无疑具有重要的理论和应用价值。

1 材料与方 法

1.1 实验分组

实验选取普通级雌性新西兰大白兔 5 只,雄性, 2~3 月龄,体重 2.0~2.5 kg(来源于北京医科大学实验中心,许可证号:SCXK(京)2006-0005)。实验过程中对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。实验材料设 5 组,分别为冷镶嵌组(A 组),冷镶嵌保湿对照组(B 组),生理盐水组(C 组),壳多糖组(D 组),蒸馏水组(E 组)。手术在动物实验室施行,维持室温 22℃,相对湿度 70%,3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 静脉麻醉,空气针注射处死。将兔后腿用剪刀剪下,放入冰箱冷冻备用。

实验共分两组,一组为冷镶嵌法与保湿法对比组,另一组为使用保湿的实验方法测定关节保护剂对关节微尺度力学性能的影响。

1.2 试样制备

将冷冻的兔后腿放置于阴凉处,进行常温解冻。将解冻好的兔腿脱皮后,用手术刀仔细切开其上的结缔组织,屈曲膝关节,切断两侧韧带后,将股骨分离出来。术中小心操作,勿伤及软骨表面。

将股骨用手术钳剪断,包括前端软骨在内共余下约 3 cm,正面向下放于镶嵌用皮碗中。滴入少量去离子水后,将皮碗中冲入适量搅拌好的环氧树脂,放于阴凉处等待固化。由于实验材料放于碗底,冲入的环氧树脂可以阻断空气的进入,防止试样的腐败和干燥。0.5 h 后,环氧树脂固化,强度可以达到最终强度的 80%,选用 1 500 目砂纸对试样预磨后,再用抛光绒抛光,即可得到镶嵌法制备的试样,如图 1 所示。

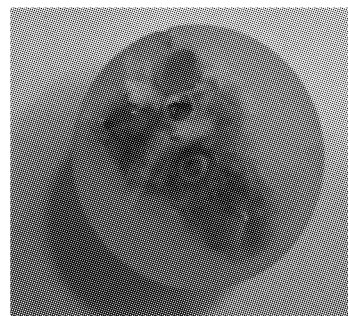


图 1 镶嵌法试样
Fig.1 Sample treated with mosaic method

使用同样的方法分离出股骨,用 3 个手指捏住股骨上端,对关节软骨进行预磨、抛光处理,将抛光好的股骨,固定在切割机上,将关节面切下 3 mm,抛光面向上放于自制的保湿测试台中,选用圆孔盖片,向下旋入将被测材料压实,即完成保湿法试样制备,如图 2 所示。

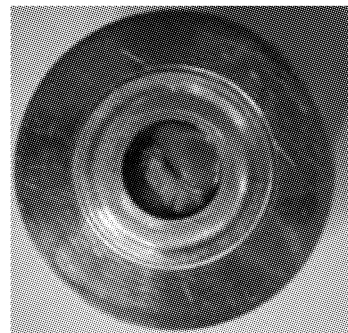


图 2 保湿法试样
Fig.2 Sample treated with moisturizing method

2 实验结果

2.1 冷镶嵌法与保湿法对照试验

为得到冷镶嵌法与保湿法对兔关节软骨力学性

能测试的影响,分别对兔关节软骨冷镶嵌组(A组)和冷镶嵌保湿对照组(B组)进行纳米压痕实验。

实验设置最大加载力为5 mN,加载位置分别为软骨表层、深层、钙化层和软骨下的骨质,可以清晰地定位在骨各结构层上进行纳米压痕实验(见图3~4)。从图3、4可以看到,不镶嵌直接抛光得到的表层比镶嵌后抛光要略厚。加载分5次循环,加载值分别为5/16,5/8,5/4,5/2,5 mN,加载时间15 s。使用的压头为安捷伦公司生产的Flat tip,即底面直径为50 μm 的圆柱状压头,这种压头的特点是能够以较大的面积接触被测试样,获得压入位置的微尺度力学性能,所以特别适合生物组织的力学性能测试。

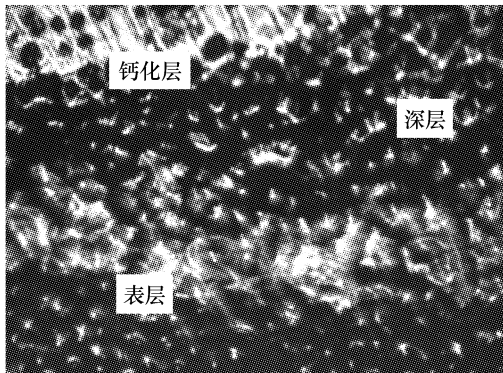


图3 保湿法制备关节软骨的光学显微镜下形貌

Fig. 3 Optical microscopy of articular cartilage morphology by moisturizing method

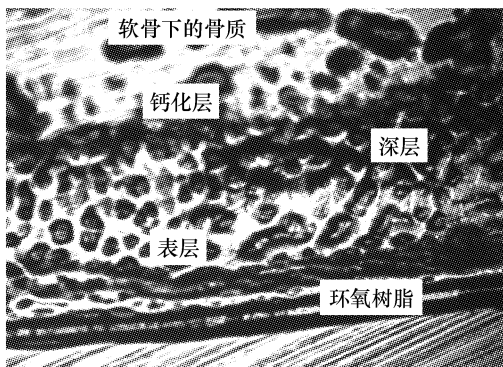


图4 冷镶嵌法关节软骨的光学显微镜下形貌

Fig. 4 Optical microscopy of articular cartilage morphology by cold mosaic method

试样在抛光后应尽快进行安装,并选择合适的热漂移控制系数及压头向表面的接近速度,来确保

实验的迅速进行。测试结果如图5~6所示,方块表示的曲线为表层载荷-压入深度曲线,在同样加载力下表层的压入深度大于深层的压入深度。对比图5、6可以发现,同样加载力下保湿法的表层压入深度是镶嵌法的2倍,深层的压入深度略大于镶嵌法;说明在镶嵌过程中,环氧树脂会对被镶嵌的生物材料进行脱水,进而导致硬度和弹性模量的升高,使得被测结果偏大,影响材料的力学性能测量。

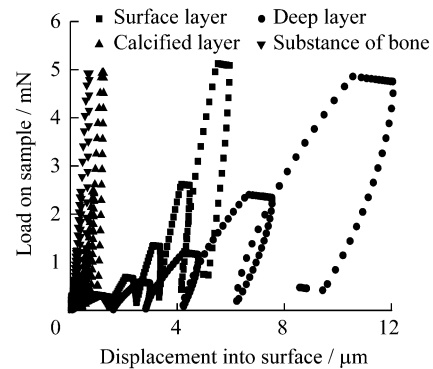


图5 保湿法测得载荷-压入深度曲线

Fig. 5 Load-displacement into surface curves by moisturizing method

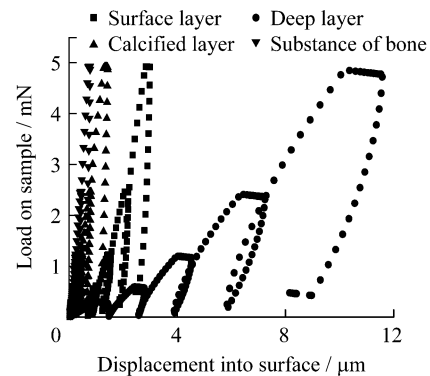


图6 冷镶嵌测得载荷-压入深度曲线

Fig. 6 Load-displacement into surface curves by cold mosaic method

2.2 关节软骨保护剂对其微尺度力学性能的影响

关节软骨作为人体一种不可再生的组织具有重要功能。临床中关节软骨的损伤特别是钝性损伤并不少见。软骨的损伤可引起胶原网状结构变性,蛋白多糖丢失,最终产生组织水平的退变和软骨结构和功能的破坏^[8]。临床中关节的损伤很多需要开放手术治疗。开放手术中,关节软骨暴露于空气中可发生干燥,造成关节软骨的进一步损伤。干

干燥可使软骨基质中水份蒸发, 软骨中蛋白多糖含量减少, 蛋白多糖合成受阻, 胶原纤维断裂, 正常框架结构破坏, 软骨无法完全自愈^[9]。术中对已经损伤的关节软骨采取保护措施非常必要, 能够避免关节软骨的进一步破坏, 促进关节软骨修复, 具有重要意义。

关节手术中软骨在空气中的暴露和干燥可引起关节软骨表面的损伤与退变。在手术操作中最常用的保护软骨方法是以生理盐水作关节面湿敷, 而关节镜手术中所使用的关节腔灌注液也多为生理盐水^[10], 但对生理盐水作为关节灌注液是否合理持不同意见^[11-12]。为了进一步研究关节外科手术中的软骨保护, 筛选更符合关节生理状态的关节保护液。本研究选择了已证实有软骨保护作用的氨基多糖类物质——壳多糖 (chitosan) 并配制成 1% 壳多糖-林格溶液, 通过动物实验观察其对关节软骨超微结构的影响。据报道“生理盐水及生理盐水的磷酸缓冲液对关节软骨并不生理”, 并且抑制软骨细胞合成蛋白多糖, 而林格液则可以较好地支持离体软骨的代谢。

本实验旨在通过纳米压痕实验测定保护剂润湿的软骨各层力学性能的变化, 对关节开放性手术中可能用到软骨保护剂生理盐水 (试样 C 组)、壳多糖 (试样 D 组) 保持软骨力学性能的效果进行评估, 并用蒸馏水组 (试样 E 组) 进行对比, 来评估保护液保持软骨力学性能的效果。

为方便比较, 将股骨从兔后退中取下后, 将其放

入对应的保护液中浸泡 1 h, 取出后进行预磨和抛光, 将抛光好的软骨切割下 3 mm, 抛光面向上放于生物软组织测试台中, 选用圆孔盖片, 向下旋入将被测材料压实, 即可将其安装入纳米压痕仪的卡台上。

从图 5、6 可以看出, 在加载力为 1.5 mN 以下时, 软骨表层与深层载荷-压入深度曲线卸载段斜率容易出现负数, 即受到生物组织表面黏性的影响, 为最大化的避开黏性的影响, 选择加载力为 3 mN。为减少热漂移对实验的影响, 加载速度与实验进行速度可以设置大些。调节显微镜进行聚焦, 这时生物组织表面的水膜较薄, 多可通过光学显微镜直接观察到其显微形貌, 定位好所需压入位置后, 冲入对应的保护液, 使组织完全浸没在保护液中。

测试所得 C、D、E 组的载荷-压入深度数据如图 7~9 所示。从图 7~9 中可见, 对于同类软骨层在同样加载力下, 壳多糖中的压入深度略大于在生理盐水中的压入深度, 而远大于蒸馏水中的压入深度, 说明壳多糖同生理盐水都具有一定保持软骨力学性能的特点。而由于实验本身具有 20% 的误差, 很难断定壳多糖对软骨的保护效果一定优于生理盐水的保护效果。

在卸载过程中, 弹性模量可从最大压力 P_{max} 、最大压入深度 h_{max} 、卸载后的残余深度 h_f 和卸载曲线的顶部斜率中获得。通常用如下函数拟合载荷-深度曲线的卸载部分:

$$P = \alpha(h - h_f)^m \quad (1)$$

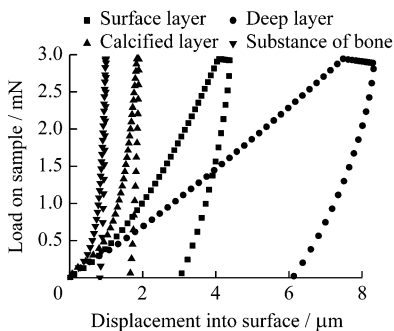


图 7 生理盐水保护组载荷-压入深度曲线
 Fig. 7 Load-displacement into surface curves of saline-protection group

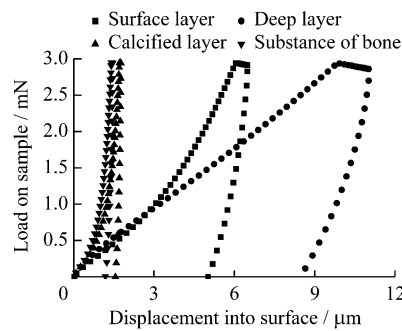


图 8 壳多糖保护组载荷-压入深度曲线
 Fig. 8 Load-displacement into surface curves of chitosan-protection group

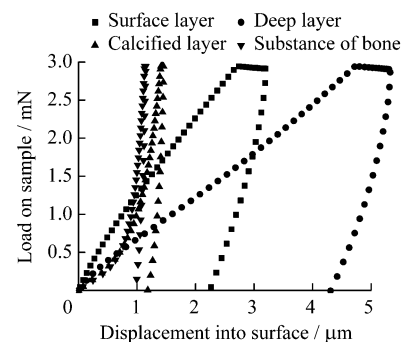


图 9 蒸馏水保护组载荷-压入深度曲线
 Fig. 9 Load-displacement into surface curves of distilled water-protection group

其中:参数 α 和 m 可以通过拟合获得,本文采用的是最小二乘法拟合。

表1为3组样品由加卸载曲线计算得到的弹性模量。测量时由于钙化骨和软骨下骨质的弹性模量较高,达到GPa,所以需要应用 Berkovich 压头测量钙化骨和软骨下骨质;而 Flat 压头测量的范围在MPa内,所以需要应用 Flat 压头测量软骨表层、深层的力学性能。

表1 冲入不同保护剂测得的软骨各层弹性模量 (单位:MPa)

Tab.1 Elastic modulus of the cartilage on each surface in different solution

	表层	深层	钙化层	骨质
生理盐水组	55	36	1 988	7 056
壳多糖组	42	28	1 858	6 789
蒸馏水组	133	108	2 344	7 149

3 讨论

本文通过定性的实验验证了环氧树脂冷镶嵌会对被镶嵌的生物材料进行脱水,进而导致硬度和弹性模量的升高,被测结果偏大,影响材料的力学性能测量。结果发现,加载力为1.5 mN以下时,软骨表层与深层载荷-压入深度曲线卸载段斜率容易出现负数,即受到生物组织表面黏性的影响;为最大化地避开黏性的影响,应选择加载力为3 mN。

通过测试C、D、E组试样,得到了生理盐水、壳多糖溶液及蒸馏水保护情况下软骨各层的载荷-压入深度曲线,并进一步计算得到了各层软骨的力学性能。根据数据推断两种保护剂均可保持软骨原有的力学性能,减少软骨开放性试验空气暴露带来的损伤。

本文基于纳米压痕法技术在理论和实验方面研究了软骨微结构的力学性能。关于本文设计的研究方法还有以下几个方面可以深化。(1)生物材料纳米压痕实验试样制备技术是实验的先决条件,如何在破坏生物材料表面微结构前提下得到生物材料微尺度的力学性能,依然是一个具有挑战性的话题,需要进一步开发生物试样制备技术。(2)需要结合

原子力显微镜、扫描电镜等观测技术,共同对生物材料微尺度力学性能进行实验研究,并同数值模拟及理论推导相结合,使得相关工作可以互相验证,工作进展更加快速和高效。

参考文献:

- [1] 张泰华,杨业敏. 纳米硬度技术的发展和应[J]. 力学进展, 2002,32(3): 349-363.
- [2] Rho JY, Zioupos P, Currey JD, *et al.* Variations in the individual thick lamellar properties within Osteons by Nanoindentation [J]. Bone, 1999, 25(3): 295-300.
- [3] Hoffer CE, Moore KE, Kozloff K, *et al.* Heterogeneity of bone lamellar-level elastic moduli [J]. Bone, 2000, 26(6): 603-609.
- [4] Wang XM, Cui FZ, Ge J, *et al.* Variation of nanomechanical properties of bone by gene mutation in the zebrafish [J]. Biomaterials, 2002, 23(23): 4557-4563.
- [5] Zysset PK, Guo XE, Hoffer CE. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur [J]. J Biomech, 1999, 32(10): 1005-1012.
- [6] Ebenstein DM, Pruitt LA. Nanoindentation of soft hydrated materials for application to vascular tissues [J]. J Biomed Mater Res, 2004, 69: 273-294.
- [7] Simha NK, Carlson CS, Lewis JL. Evaluation of fracture toughness of cartilage by micropenetration [J]. J Mater Sci, 2003, 15(5): 631-639.
- [8] Pun SY, Teng MS, Kim HT. Periodic rewetting enhances the viability of chondrocytes in human articular cartilage exposed to air [J]. J Bone Joint Surg Br, 2006, 88(11): 1528-1532.
- [9] 吴海山,钱其荣. 空气暴露,生理盐水及壳多糖溶液对兔关节软骨超微结构的影响[J]. 解放军医学杂志,1995, 20(6): 405-407.
- [10] 殷胜春. 三种软骨保护剂在关节开放性手术中对兔关节软骨中蛋白多糖含量的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(2): 276-279.
- [11] 王泓,马信龙,张园. 新鲜人关节软骨试件在体外不同环境下退变的组织学观察[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(15): 2701-2704.
- [12] Reagan BF, McInerney VK, Treadwell BV, *et al.* Irrigating solutions for arthroscopy. A metabolic study [J]. J Bone Joint Surg Am, 1983, 65(5): 629-631.