

# 介孔生物玻璃/磷酸钙骨水泥多级孔复合支架的制备及其载药特性研究

丁 峰<sup>1</sup>, 李 楠<sup>1</sup>, 李永生<sup>1</sup>, 施剑林<sup>1,2</sup>

(1. 华东理工大学 材料科学与工程学院, 上海 200237; 2. 中国科学院 上海硅酸盐研究所, 上海 200050)

**摘 要:** 采用离心法将介孔生物活性玻璃(MBG)和磷酸钙骨水泥(CPC)高效复合制备出介孔/大孔多级孔复合支架材料, 评价了其对抗癌药物阿霉素的装载及释放性能。实验结果表明, 采用离心法能在大孔支架 CPC 内有效负载大量的介孔生物活性玻璃, 使其比表面积高达 100.1 m<sup>2</sup>/g, 负载量达 47.2%, 而采用传统浸渍法则不能将 MBG 粉体材料负载于 CPC 支架上。载药实验发现离心法制备的介孔/大孔复合支架对阿霉素的装载量达到了 46 mg/g, 是普通大孔 CPC 支架的 11.5 倍, 且在体外具有药物缓释的特性。

**关 键 词:** 离心法; 介孔/大孔; 复合支架; 药物装载; 缓释

中图分类号: TQ174 文献标识码: A

## Preparation of Hierarchically Porous MBG/CPC Scaffold and Its Performance on Drug Loading and Release

DING Feng<sup>1</sup>, LI Nan<sup>1</sup>, LI Yong-Sheng<sup>1</sup>, SHI Jian-Lin<sup>1,2</sup>

(1. School of Materials Science and Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China)

**Abstract:** Hierarchically composite scaffold (MBG/CPC) was successfully prepared by loading of mesoporous bio-active glasses (MBG) into macroporous calcium phosphate cement (CPC) with simply centrifuging method. It is revealed that MBG loading capacity on CPC and the BET surface area of MBG/CPC can reach 47.2% and 100.1 m<sup>2</sup>/g, respectively. In contrast, almost no MBG loading is detected by using traditional impregnation route. Drug loading and releasing tests show that DOX loading capacity on hierarchically composite scaffold MBG/CPC is 46 mg/g, which is 11.5 times of that on pure CPC. Importantly, a sustained drug release *in vitro* performance is presented on MBG/CPC.

**Key words:** centrifuging; mesoporous/macroporous; composite scaffold; drug loading; sustained release

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的重大疾病<sup>[1-2]</sup>。骨癌是骨骼系统中的恶性肿瘤, 常常造成患者肢体残疾甚至危及生命<sup>[3-5]</sup>。目前治疗骨癌大多先手术切除, 再采用生物材料填充帮助骨再生, 但是若手术部位残存癌细胞, 则可能导致癌症复发, 使病人存活率降低<sup>[3,6-9]</sup>。

自 1971 年 Hench<sup>[10-11]</sup>发明生物活性玻璃(BG)以来, 对其研究越来越引起人们的重视<sup>[12-13]</sup>。有文

献报道, 在骨肿瘤去除之后, 可采用将 BG 填充到缺损部位以快速修复缺损骨组织<sup>[14-15]</sup>。当将 BG 植入到人体后, 在其表面会形成一层具有生物活性的碳酸型羟基磷灰石(HCA)。随后, 这层 HCA 会自发与活体骨键合成一体。与普通 BG 相比, 具有高比表面积和大孔容的高度有序介孔生物活性玻璃(MBG)生物活性更高<sup>[16]</sup>, 且具有优良的药物装载及缓释特性<sup>[17-18]</sup>。但是粉体状的 MBG 机械强度差, 不

适于用作骨组织修复支架材料<sup>[19]</sup>。

磷酸钙骨水泥(calcium phosphate cement, CPC)又叫羟基磷灰石骨水泥,是80年代中期由Brown和Chow研制出来的一种新型自固化型人工骨替代材料,具有良好的生物活性、生物安全性、可降解性、骨传导性、可与硬组织紧密连接以及可在应用时随意塑型等优点,已受到国际材料界和医学界的高度重视,成为当今生物材料的研究热点之一<sup>[20]</sup>。但是由于大孔CPC支架比表面积低、孔容小,因此在药物装载和缓释领域的应用受到了很大的限制。

据文献报道,将介孔二氧化硅小球(MSNs)通过浸渍超声的方法负载于 $\beta$ -TCP支架上,可制备出多级孔支架,使其具有药物装载及缓释能力<sup>[21]</sup>。但是其介孔材料装载量不高,而且纯硅基介孔材料的引入可能会影响复合支架的生物活性性能。所以发展一种新的负载方法将介孔生物活性材料与大孔生物活性支架相复合是非常重要及有意义的工作。本研究选取MBG及力学强度较高且具有良好生物活性的CPC支架,采用离心法复合制备了MBG/CPC多级孔复合支架,并对其进行表征。选择可以有效治疗骨癌的盐酸阿霉素(doxorubicin, DOX)<sup>[22]</sup>作为药物模型考察复合支架的药物装载及释放性能。

## 1 实验部分

### 1.1 MBG/CPC 多级孔复合支架的制备

#### 1.1.1 MBG 的制备

首先,将4 g P123溶于乙醇中,25℃下剧烈搅拌,待P123完全溶解后,滴加6.7 g TEOS(正硅酸乙酯)、0.73 g TEP(磷酸三乙酯)和1.40 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,25℃下剧烈搅拌30 min后再滴加1 g、0.5 mol/L的HCl,调节其pH值在2~3之间。继续搅拌24 h后,于20℃的恒温箱中凝胶2~3 d,再放入100℃的干燥箱中干燥3~4 h,最后700℃下煅烧5 h(升温速率2℃/min)去除表面活性剂,制得MBG粉体。

#### 1.1.2 离心法制备 MBG/CPC 多级孔复合支架

取0.8 g上述制备的MBG粉体,加入一定量的乙醇搅拌30 min,然后和CPC支架一起放入离心管中,先超声20 min,再用7000 r/min的转速离心30 min,再重复超声和离心一次。最后取出支架放入20℃的恒温箱中干燥1 d,即得到MBG与CPC复合支架,样品命名为MBG/CPC-C。为了比较,采用传统的浸渍法同样制备了MBG/CPC复合支架,命名为MBG/CPC-I。

### 1.2 DOX 的装载与释放

DOX的装载:取100 mg MBG/CPC多级孔复合支架材料加入到10 mL DOX浓度为2 mg/mL的PBS溶液(pH=7.4)中,将容器封闭后避光静置24 h,然后取出支架,用pH=7.4的PBS溶液清洗2~3次,最后放入真空干燥箱中室温干燥12 h。通过测试装载前后溶液的浓度来计算DOX的装载量。计算公式如式(1)所示:

$$M = \frac{(C_0 - C) \cdot V}{m} \times 100\% \quad (1)$$

其中, $M$ : 药物装载量(mg/g);  $C_0$ : 初时药物浓度(mg/mL);  $C$ : 最终药物浓度(mg/mL);  $V$ : DOX溶液的体积(mL);  $m$ : 载体的质量(g)。

DOX的释放: DOX的释放在不同pH值的PBS溶液中进行,将支架放入10 mL PBS中,并放入37℃的恒温振荡器中以100 r/min的速度振荡。在规定时间内取出4 mL释放介质利用UV-Vis检测DOX浓度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 MBG 及 MBG/CPC 复合支架的表征

图1给出了MBG的TEM(a)和SEM(b)照片,

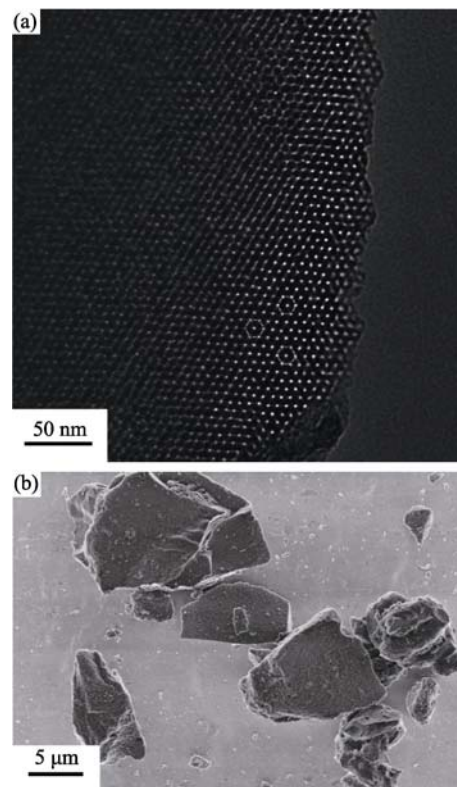


图1 MBG的透射电镜照片(a)和扫描电镜照片(b)  
Fig. 1 TEM images of the MBG (a) and SEM images (b) of the MBG

从TEM照片中可以看出MBG具有有序的二维六方孔道结构(图1(a)中灰色标记处),孔径大约为5 nm左右。从扫描照片中可以看出MBG是粒径大约为10~20  $\mu\text{m}$ 的无定型大块颗粒。

图2为CPC、MBG及不同负载方法制备的MBG/CPC多级孔复合支架材料的小角XRD图谱,从图中可以看出,CPC支架在小角区域没有衍射峰,MBG出现一个衍射峰,对应于P6 mm介孔材料的(100)晶面特征衍射峰;采用浸渍法制备的样品MBG/CPC-I在小角区域没有出现衍射峰,说明CPC支架上几乎没有负载上MBG;而通过离心法制备的样品MBG/CPC-C则出现了比较尖锐的(100)晶面衍射峰,说明CPC支架的大孔孔道中负载上了大量的MBG。

图3为CPC、MBG、MBG/CPC-I及MBG/CPC-C的氮气吸附/脱附等温线和相应的孔径分布图。可以

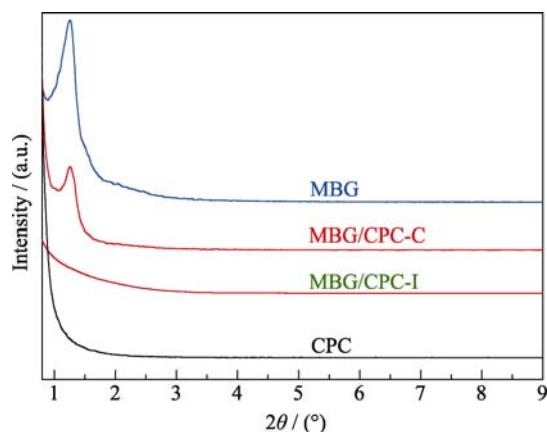


图2 MBG、CPC、MBG/CPC-I以及MBG/CPC-C的小角XRD图谱

Fig. 2 Small-angle XRD patterns of MBG, CPC, MBG/CPC-I and MBG/CPC-C

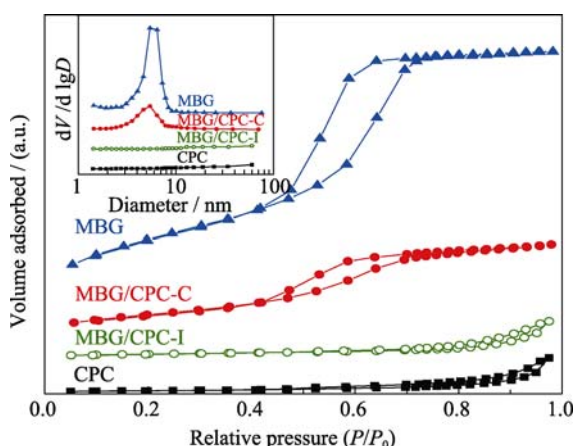


图3 MBG、CPC、MBG/CPC-I以及MBG/CPC-C的氮气吸附-脱附等温线及BJH孔径分布图(插图)

Fig.3 Nitrogen adsorption-desorption isotherms and pore size distribution curves (inset) of MBG, CPC, MBG/CPC-I and MBG/CPC-C

看出,MBG的 $\text{N}_2$ 吸附/脱附等温线属于典型的Langmuir IV型,说明MBG具有完好的介孔孔道结构。CPC和MBG/CPC-I支架的 $\text{N}_2$ 吸附/脱附等温线均属于典型的III型曲线,说明MBG并没有负载到CPC支架中。而MBG/CPC-C的 $\text{N}_2$ 吸附/脱附等温线则为IV型曲线,在相对压力0.4左右出现了明显的突跳,说明有大量的MBG负载于大孔支架CPC的孔内。从孔径分布图也可看出本来没有介孔孔径分布的大孔CPC支架在负载了MBG后,有了均一的孔径分布,最可几孔径为5.4 nm,与MBG相对应,这说明通过离心的方法可以有效地将MBG负载于CPC上,且该方法不会破坏MBG材料的介孔结构。表1为各个材料的具体孔结构参数,可以看出,MBG/CPC-I相对于CPC,比表面积及孔容基本没有变化,而MBG/CPC-C则有了非常大的提高,比表面积从 $9.1 \text{ m}^2/\text{g}$ 提高到 $100.1 \text{ m}^2/\text{g}$ ,孔容从 $0.05 \text{ cm}^3/\text{g}$ 提高到了 $0.14 \text{ cm}^3/\text{g}$ 。通过计算可知1 g MBG/CPC-C中MBG的含量为320.7 mg,CPC的含量为679.3 mg,负载量达到了47.2%,进一步说明离心法是一种高效负载MBG的方法。

## 2.2 MBG/CPC-C复合支架上DOX的装载性能研究

鉴于传统浸渍法不能将MBG负载于CPC上,本研究只选取用离心法制备的介孔/大孔复合支架MBG/CPC-C以及普通CPC支架作为载体装载DOX,研究其装载及释放性能,装载后的样品分别命名为DOX@MBG/CPC-C及DOX@CPC。图4(a)为CPC和MBG/CPC-C两个样品装载前后的DOX溶液在同时稀释20倍后,用UV-Vis测得的紫外吸收光谱对比图。可以看出,两个样品装载DOX后剩余溶液的UV-Vis吸收光谱的特征峰位置与储存前溶液光谱一致,没有出现新的吸收峰,这说明样品在装载过程中没有对DOX药物分子的结构产生破坏。从图中还可以看出,CPC装载后DOX溶液的紫外吸收强度有略微下降,说明有少量的DOX通过表面作用吸附于CPC的表面,而MBG/CPC-C装载后DOX溶液的紫外吸收强度下降明显,说明有大量的DOX被装入MBG的介孔孔道中。通过DOX标准曲线计算(图5),CPC的装载量约为4 mg DOX/g CPC,装载效率约为2.1%;MBG/CPC-C的装载量约为46 mg DOX/g MBG/CPC-C,装载效率约为24.5%(表2)。图4(b)为CPC,DOX@CPC以及DOX@MBG/CPC-C的光学数码照片,很明显,CPC为纯白色,DOX@CPC呈浅红色(DOX为红色),而DOX@MBG/CPC-C则呈深红色,说明MBG/CPC



表 1 不同材料的孔结构参数  
Table 1 The pore structure parameters of different samples

Sample	BET surface area/( $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ )	Pore volume /( $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ )	BJH pore size/nm
CPC	9.1	0.05	—
MBG	292.9	0.38	5.4
MBG/CPC-I	14.6	0.05	—
MBG/CPC-C	100.1	0.14	5.4

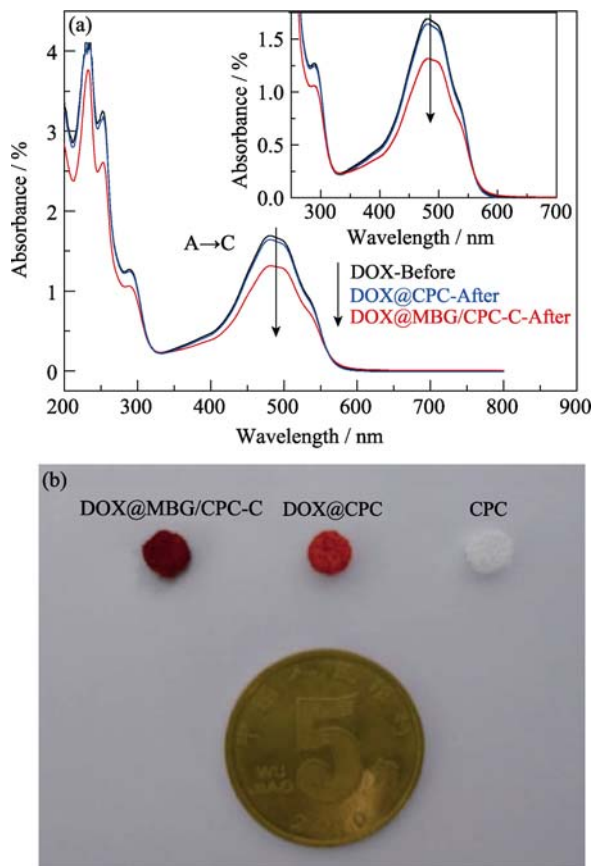


图 4 DOX@MBG/CPC-C 及 DOX@CPC 样品装载前后的 DOX 浸渍溶液的 UV-Vis 图谱(a)以及 DOX@MBG/CPC-C, DOX@CPC 和 CPC 的数码照片(b)

Fig. 4 UV-Vis absorbance spectra of DOX solutions before and after loading for 24 h with MBG/CPC-C and CPC (a); and digital image of DOX@MBG/CPC-C, DOX@CPC and CPC in day-light (b)

A. DOX-Before; B. DOX@CPC-After; C. DOX@MBG/CPC-C-After

较 CPC 装载了更多的 DOX。这也表明通过离心法将 MBG 负载于 CPC 中后, 由于引入介孔使得其对 DOX 的装载能力大大提高。

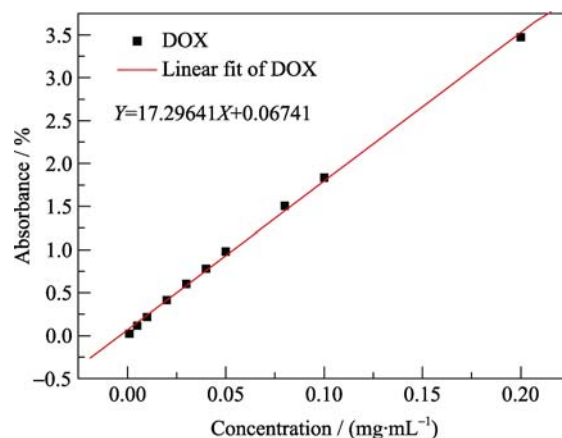


图 5 不同浓度 DOX 溶解于 PBS 中的标准曲线

Fig. 5 Calibration curve of the DOX-PBS solutions with different concentrations

## 2.3 DOX@CPC 及 DOX@MBG/CPC-C 的 DOX 释放性能研究

作为癌症药物的载体, 材料必须具备好的缓释特性。由于癌细胞周围的介质是酸性的<sup>[23]</sup>, 所以本研究选取 pH 为 7.4、6 及 4.4 的 PBS 溶液分别作为释放介质来研究材料的释放特性。图 6(a)为 DOX@CPC 的释放曲线, 从图中可以看出在 pH 为 7.4、6.0 及 4.4 的环境下材料都显示出突释特性, 在 18 h 后药物释放达到平衡, 释放总量分别为装载量的 20%、40%及 53%。图 6(b)为 DOX@MBG/CPC-C 的释放曲线, 从图中可以看出材料在 pH 为 7.4 的环境下药物基本不释放, 而在 pH 为 6 和 4.4 的环境下, 在最初的 18 h 经历了快速释放后, 进入缓慢释放阶段, 药物缓释持续 100 h 左右, 在 pH=7.4、6 及 4.4 的 PBS 中, 释放总量分别为装载量的 3%、42%及 54%。比较可知, 该系统可以延长药物的释放时间和药物效用时间, 而且这种释放特性, 使得药物在正常组织中(环境 pH 约为 7.4)基本不释放, 而当在癌变组织环境中(pH 为 5 左右)却能较快较多地释放, 从而在提高药物的利用率的同时减少对正常组织的毒副作用。这是由于药物是通过表面作用吸附于 CPC 上, 所以表现出很快的释放特性, 而当 CPC 中引入了 MBG 后, 药物主要是存储于 MBG 的介孔中, 所以表现出了很好的药物缓释特性。

## 2.4 支架的体外生物活性测试

利用傅立叶变换红外图谱可以表征生物活性玻

表 2 不同材料的 DOX 装载量  
Table 2 The DOX loading of different samples

Sample	$C_0 / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	$C / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	$V / \text{mL}$	$m / \text{g}$	$M / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$
CPC	1.88	1.84	10	0.1	4.0
MBG/CPC-C	1.88	1.42	10	0.1	46.0

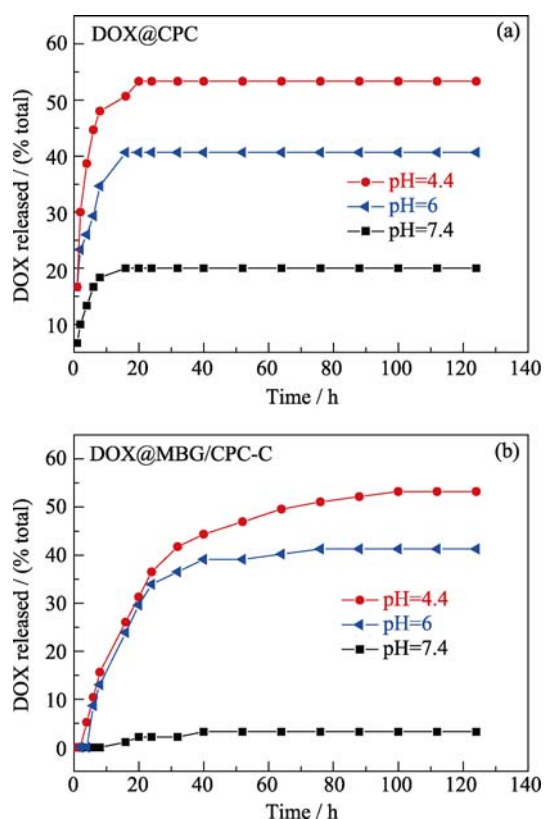


图 6 不同 pH 环境下 DOX@CPC (a) 和 DOX@MBG/CPC-C (b) 的释放曲线

Fig. 6 pH dependent DOX release from DOX@CPC (a) and DOX@MBG/CPC-C (b) in PBS buffer

璃的降解和羟基磷灰石的形成过程。图 7 给出了 MBG、CPC 以及 MBG/CPC-C 在模拟体液中浸泡后的傅立叶变换红外图谱。可以看出, 样品在模拟体液中浸泡 1 d 后, MBG 以及 CPC 都在 960、604 和 566  $\text{cm}^{-1}$  处出现了强烈 P-O 键的特征振动峰, 证明了样品表面形成了大量晶化的磷酸盐, 说明 MBG

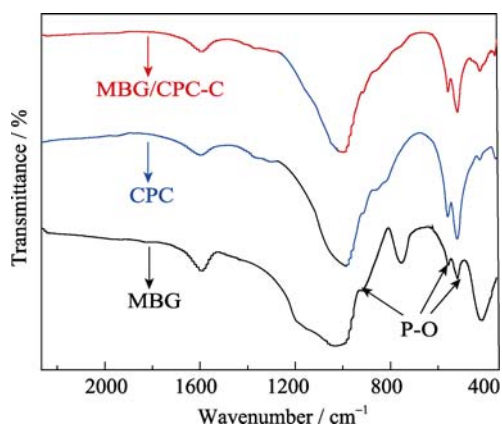


图 7 MBG、CPC 及 MBG/CPC-C 在 SBF 中浸泡 1 d 后的傅里叶变化红外光谱

Fig. 7 FT-IR spectra of MBG, CPC and MBG/CPC-C after soaking in SBF for 1 d

与 CPC 都具有良好的生物活性性能。而 MBG/CPC-C 也在 960、604 和 566  $\text{cm}^{-1}$  处分别出现了 P-O 键的强烈特征振动峰, 说明其同样具有良好的生物活性, 即 MBG 的引入, 没有影响 CPC 支架生物活性。

### 3 结论

利用离心法, 成功地将介孔生物活性玻璃 (MBG) 负载于磷酸钙骨水泥 (CPC) 上, 制备出介孔/大孔复合支架材料。该复合支架具有较大的比表面积和孔容; 其药物装载量是普通支架的 11.5 倍, 达到了 46  $\text{mg/g}$ ; 在 PBS 溶液中展现出良好的药物缓释性能, 在 pH 为 7.4 的环境中药物基本不释放, 在 pH 为 4.4 的环境中能较多较快地释放; 而且由于 MBG 具有良好的生物活性, 所以引入 MBG 后并不会影响支架的生物活性性能。

### 参考文献:

- [1] Wang T W, Wu H C, Wang W R, *et al.* The development of magnetic degradable DP-bioglass for hyperthermia cancer therapy. *J Biomed Mater Res. A*, 2007, **83A**(3): 828–837.
- [2] Geraci M, Birch J M, Alston R D, *et al.* Cancer mortality in 13 to 29-year-olds in England and Wales. *Br. J. Cancer*, 2007, **97**(11): 1588–1594.
- [3] Wang J, Chen P, Liu C. The occurrence, inducement and therapy development of bone cancer. *World Journal of Traditional Chinese Orthopedics*, 2009, **10**(2): 120–121.
- [4] Schulman K L, Kohles J. Economic burden of metastatic bone disease in the US. *Cancer*, 2007, **109**(11): 2334–2342.
- [5] Anderson P, Salazar-Abshire M. Improving outcomes in difficult bone cancers using multimodality therapy, including radiation: Physician and nursing perspectives. *Curr. Oncol. Rep.*, 2006, **8**(6): 415–422.
- [6] Nagarajan R, Clohisy D R, Neglia J P, *et al.* Function and quality-of-life of survivors of pelvic and lower extremity osteosarcoma and Ewing's sarcoma: the childhood cancer survivor study. *Br. J. Cancer*, 2004, **91**(11): 1858–1865.
- [7] Meyer J S, Mackenzie W. Malignant bone tumors and limb-salvage surgery in children. *Pediatr. Radiol.*, 2004, **34**(8): 606–613.
- [8] Felder-Puig R, Formann A K, Mildner A, *et al.* Quality of life and psychosocial adjustment of young patients after treatment of bone cancer. *Cancer*, 1998, **83**(1): 69–75.
- [9] Serrano M C, Portoles M T, Pagani R, *et al.* *In vitro* positive bio-

- compatibility evaluation of glass-glass ceramic thermoseeds for hyperthermic treatment of bone tumors. *Tissue Eng. A*, 2008, **14**(5): 617–627.
- [10] Hench L L. Bioceramics: from concept to clinic. *J. AM. Ceram. Soc.*, 1991, **74**(7): 1487–1510.
- [11] Hench L L. Bioceramics. *J. AM. Ceram. Soc.*, 1998, **81**(7): 1705–1728.
- [12] Arcos D, Greenspan D C, Vallet-Regi M. Influence of the stabilization temperature on textural and structural features and ion release in  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  Sol-Gel glasses. *Chem. Mater.*, 2002, **14**(4): 1515–1522.
- [13] Jokinen M, Rahiala H, Rosenholm J B, *et al.* Relation between aggregation and heterogeneity of obtained structure in Sol-Gel derived  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ . *J. Sol-Gel. Sci. Technol.*, 1998, **12**(3): 159–167.
- [14] Lindfors N C, Heikkilä J T, Aho A J. Long-term evaluation of blood silicon and osteocalcin in operatively treated patients with benign bone tumors using bioactive glass and autogenous bone. *J. Biomed. Mater. Res. B*, 2008, **87B**(1): 73–76.
- [15] Takegami K, Sano T, Wakabayashi H, *et al.* New ferromagnetic bone cement for local hyperthermia. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998, **43**(2): 210–214.
- [16] Yan X X, Yu C Z, Zhou X F, *et al.* Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior *in vitro* bone-forming bioactivities. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**(44): 5980–5984.
- [17] Xia W, Chang J. Well-ordered mesoporous bioactive glasses (MBG): a promising bioactive drug delivery system. *J. Control. Release*, 2006, **110**(3): 522–530.
- [18] Zhao L Z, Yan X X, Zhou X F, *et al.* Mesoporous bioactive glasses for controlled drug release. *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2008, **109**(1/2/3): 210–215.
- [19] Lopez-Noriega A, Arcos D, Izquierdo-Barba I, *et al.* Ordered mesoporous bioactive glasses for bone tissue regeneration. *Chem. Mater.*, 2006, **18**(13): 3137–3144.
- [20] Fang L R, Weng W J, Shen G, *et al.* Research for bone tissue engineering scaffolds and biomaterials. *Journal of Biomedical Engineering*, 2003, **20**(1): 148–152.
- [21] Zhu M, Wang H X, Liu J Y, *et al.* A mesoporous silica nanoparticulate/b-TCP/BG composite drug delivery system for osteoarticular tuberculosis therapy. *Biomaterials*, 2011, **32**(7): 1986–1995.
- [22] Nielsen O S, Dombernowsky P, Mouridsen H, *et al.* High-dose epirubicin is not an alternative to standard-dose doxorubicin in the treatment of advanced soft tissue sarcomas. a study of the EORTC soft tissue and bone sarcoma group. *Br. J. Cancer*, 1998, **78**(12): 1634–1639.
- [23] Guo M, Yan Y, Zhang H K, *et al.* Magnetic and pH-responsive nanocarriers with multilayer core-shell architecture of anticancer drug delivery. *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**(42): 5104–5112.