

文章编号: 1000-324X(2005)01-0112-07

不同表面特征的多孔钛与皮下软组织间生物力学性质的研究

吴尧, 李虎, 邓春林, 杨帮成, 张兴栋

(四川大学生物材料工程研究中心, 成都 10064)

摘 要: 为解决经皮器械长期生物密封问题, 选择具有三维支架结构和合适的表面微孔多孔钛作为其皮下固定材料, 表面预沉积一层类骨磷灰石, 空白样品作为对照, 皮下植入兔子的背部. 术后 40 天和 70 天对样品与周围软组织间的结合强度进行测定, 并对断口处组织与材料间的结合形貌和区域成分进行分析. 结果表明, 随着时间的延长, 不同表面特征的材料与组织的结合强度都不断增大; 表面具有类骨磷灰石层的样品无论是结合强度还是结合形态都优于空白样品, 涂层样品 40 天时与组织的结合强度几乎与对照样品 70 天时与组织的结合强度相当. 说明类骨磷灰石层在体内有利于较早形成活跃的细胞材料表面, 有助于皮下结缔组织的长入以及与材料表面的牢固结合.

关键词: 多孔钛; 类骨磷灰石; 拉脱强度; 皮下固定

中图分类号: Q 819 **文献标识码:** A

1 引言

上皮移行、细菌感染以及外力的机械破坏是造成经皮器械失效的主要原因, 当经皮器械经皮植入体内后, 它将接触不同的组织: 皮肤、疏松的皮下结缔组织等. 所以要想实现经皮生物密封, 对皮下组织的牢固固定将是一个非常有效的方法, 这样既可以阻止上皮移行, 又可以抵抗外力的破坏和防止细菌的深入入侵^[1,2]. 因此, 有人提出皮下固定件的孔隙可以让皮下的结缔组织和血管等长入并与材料形成一定的结合, 从而阻碍上皮的向下移行^[3,4]. 近年来大量的研究证明, 多孔材料在临床应用中可以为组织的长入提供一个理想的支架, 对组织的生物学固定起到非常重要的作用^[5]. 常用的固定经皮器械皮下软组织的材料, 多为多孔高分子材料如达克龙、维尼龙以及多孔高温烧结钛网、多孔热解碳上气相沉积金属钽等^[6,7], 但这些材料都存在一些难以克服的问题, 比如: 生物相容性差, 制备工艺复杂等, 所以较难在临床中推广应用. 近年来, 钛及其合金因其优良的生物相容性和机械性能成为一种较为理想的植入材料, 多孔钛既综合了多孔三维支架的结构优势, 同时又兼备了钛金属优良的机械性能和生物相容性, 三维贯通的孔隙和合适的表面微孔结构为周围组织的长入提供了支架, 使组织与材料的结合具有一定的强度^[8]. 作者的前期工作表明, 不同表面特征的材料与皮下组织的组织学反应以及结合情况是不同的, 表面钙磷层的沉积更有利于组

收稿日期: 2003-12-01, 收到修改稿日期: 2004-01-12

基金项目: 国家高技术发展计划“863”(2001AA326010)

作者简介: 吴尧(1970-), 女, 博士研究生. E-mail: yaowu_amanda@126.com

织的定向长入, 从而进一步优化材料与组织界面^[9]. 本研究的目的是对比考察表面预沉积一层类骨磷灰石的多孔钛与空白样品皮下植入体内时周围纤维组织的长入情况, 以及纤维组织与多孔材料的结合情况, 从而为经皮器械生物密封的达成提供一个有效的解决途径.

2 实验

2.1 多孔钛的制备

选择粒径为 $\phi 360\mu\text{m}$ 的纯钛珠, 分别在丙酮、无水乙醇和去离子水中进行超声彻底清洗, 烘干后再用较稀的氢氟酸和硝酸的混合酸去除表面较厚的惰性氧化层后再烘干, 然后将钛珠在自然紧密堆积的状态下于真空 1300°C 下烧制出具有贯通孔隙和合适表面微孔的多孔钛材料.

2.2 动物实验材料的准备

从已烧制好的多孔钛块体上共切割出 24 个尺寸为 $14\text{mm}\times 6\text{mm}\times 3\text{mm}$ 的长条形植入体, 所有棱边均被仔细打磨成小圆弧状, 以尽量减小应力集中和避免样品植入体内后周围组织被棱边割伤. 所有样品超声清洗 15min, 其中 12 个样品烘干后放置备用, 标记为 SE. 另外 12 个烘干后先进行表面生物活化处理: 在浓度为 18% 的盐酸和 48% 的硫酸的混合酸中于 70°C 下保持 0.5~1h 后取出清洗烘干, 再于 6mol/L 氢氧化钠溶液中 70°C 条件下放置 6h 后取出清洗烘干; 然后将酸碱活化处理的样品于 37°C 条件下放入快速钙化溶液 (fast calcification solution, FCS) 中浸泡 3 天, (具体离子浓度为: Na^+ : 137.0, K^+ : 3.71, Ca^{2+} : 3.10, Cl^- : 146, HPO_4^{2-} : 1.86, 单位: mmol/L)^[10], 使多孔钛表面及内部钛珠表面沉积一层类骨磷灰石, 取出用去离子水冲洗后置室温下干燥备用, 标记为 SCA.

2.3 皮下植入实验

实验动物选用四川大学华西实验动物中心提供的成熟健康的日本大耳白兔 4 只, 重量为每只 2.5~3.5kg, 雌雄各半. 实验材料进行常规高压灭菌, 动物麻醉采用 2% 的戊巴比妥钠静脉注射 (1mL/kg). 将背部的毛发刮干净并碘伏消毒后, 用手术刀片沿脊柱两侧并距脊柱 4cm 处小心各划开三个独立的长条形切口, 每个切口长约 2.5cm, 单侧的三个切口在动物背部的中间位置平行于脊柱排开并两两相距 4cm, 脊柱每侧各 3 个样品, 每只动物共种植 6 个样品. 在每一个切口位置用尖锐刀片在疏松的皮下组织间小心掏出一个软组织袋后放入样品, 用较细的缝合线将样品捆在下面的肌肉组织上防止在体内的滑动, 在缝合皮肤以前用少量生理盐水轻微冲洗伤口. SE 和 SCA 各 12 个分别植入 4 只动物背部, 术后前 3 天每天每只动物注射 40 万单位青霉素以防感染, 并用碘伏清理伤口.

在整个种植时间内, 所有的动物均保持正常饮食和健康的状况. 40 天和 70 天后, 实验动物被分别处死, 样品连同周围的软组织被剥离下来进行即时的生物力学测试以及断口组织形貌观察.

2.4 样品的生物力学测试

软组织与样品表面的结合强度通过测定靠皮肤的样品接触面 ($14\text{mm}\times 6\text{mm}$) 与贴附的软组织间的拉脱强度来进行表征. 为避免数据误差, 将样品检测面 ($14\text{mm}\times 6\text{mm}$) 周围四个面 (两个 $6\text{mm}\times 3\text{mm}$, 两个 $14\text{mm}\times 3\text{mm}$) 上的与被检测面相联结的软组织完全剥离开, 被检测面上的软组织留下约 2cm 的长度用作夹持. 将样品的两个长侧面 ($14\text{mm}\times 3\text{mm}$) 垂直固定在材料拉伸实验机的下夹口中使被检测面水平放置, 软组织固定在上夹口中, 实验在万能材

料实验机上进行. 拉伸速度为 5mm/min, 传感器为 100N. 以导致界面完全被撕裂时的最大力 F_{\max} (N) 作为比较标准来计算组织与材料在该结合面上的结合强度 σ (MPa). 计算公式为: $\sigma = F_{\max}/S, S=(14 \times 6)\text{mm}^2$. 在整个测试过程中, 应用生理盐水浸润样品以保持组织湿润. 测试过程如图 1 所示.

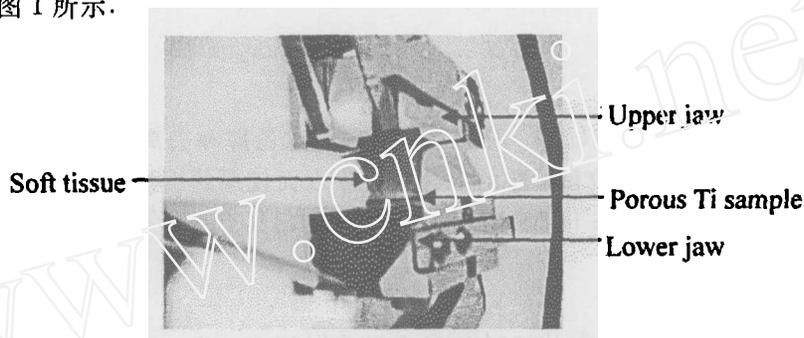


图 1 样品拉脱强度的测试过程

Fig. 1 Illustration of tensile strength testing of the samples

2.5 样品的表征

多孔钛的表面形貌、样品表面类骨磷灰石层的形貌以及拉伸断口上组织的形貌用扫描电子显微镜 (SEM) 来进行观察, 断口上的区域成分定性分析结合扫描电镜的 X 射线能谱仪 (SEM-EDX) 进行. 类骨磷灰石层的化学成分由 X 射线衍射仪 (XRD) 和傅立叶反射红外光谱仪 (FT-IR) 来检测.

3 结果和讨论

3.1 多孔钛及表面类骨磷灰石的表征

根据结晶学的密堆积原理, 紧密堆积的钛珠间形成的间隙近于四面体和八面体两种状态, 相应线度分别为 $0.225D/2$ 和 $0.414D/2$, 其中 D 为球体的直径^[11]. 因此烧结出的多孔钛相应的间隙尺寸为 $44 \sim 81 \mu\text{m}$. 钛珠紧密牢固堆积, 钛珠间的孔隙相互贯通如图 2(a) 所示. 经

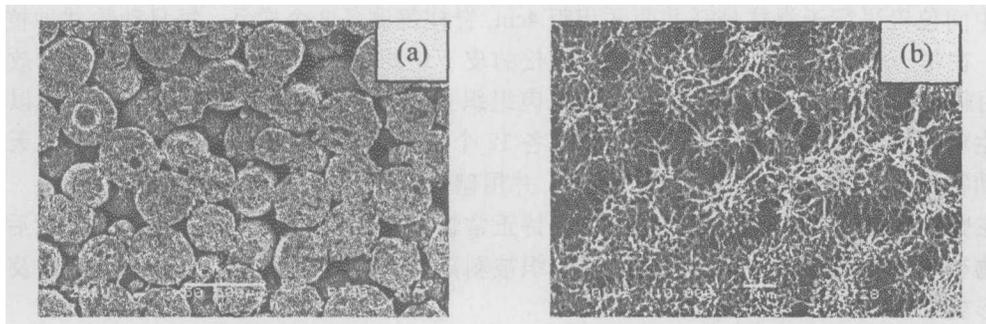


图 2 均匀紧密堆积的多孔钛 (a) 以及表面沉积的类骨磷灰石 (b) 的扫描电镜形貌图

Fig. 2 SEM micrographs of the porous titanium with uniformly close-packed beads(a) and bone-like apatite coating(b)

酸碱活化处理后的部分样品浸泡于快速钙化溶液后, 表面沉积一层钙磷层如图 2(b) 所示, 该钙磷层牢固沉积于活化多孔钛表面, 呈微观粗糙状态, 簇状生长成微球并相互连接成网状. 对表面涂层进行 FT-IR 红外光谱分析 (图 3(a)), 发现在 1453 、 1420 和 875cm^{-1} 处出现

了碳酸根的特征峰位, 结合 XRD 物相分析 (图 3(b)) 可以看出, 该涂层是碳酸化羟基磷灰石即类骨磷灰石, 结晶度较低, 成分与骨的无机成分相似.

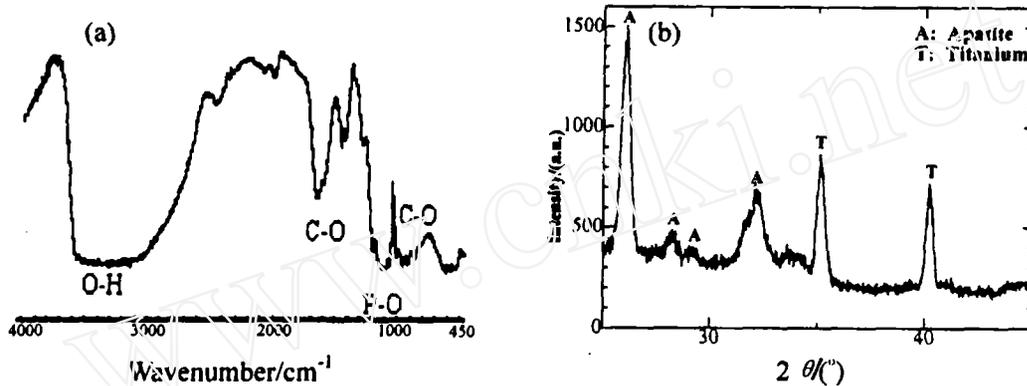


图 3 体外预沉积的钙磷涂层的 FT-IR 红外光谱图 (a) 及 X 射线衍射图谱 (b)

Fig. 3 FT-IR spectrum (a) and XRD pattern (b) of the precipitated CaP coating

3.2 体外大体组织学观察

样品植入体内 3 天后, 皮肤基本愈合, 几乎无任何炎性反应. 40 天以及 70 天后取材发现样品与软组织间紧密贴附, 可以看见在组织与材料的结合面上有明显的毛细血管存在, 特别是对于表面有类骨磷灰石涂层的样品尤为明显. 无明显包囊形成, 也没有任何炎性反应的表现, 软组织与样品各表面的结合在整个种植时间内都是紧密而均匀的. 实验结果反映出材料与皮下软组织间有较好的结合, 而且材料在体内与纤维组织具有较好的生物相容性 (图 4).

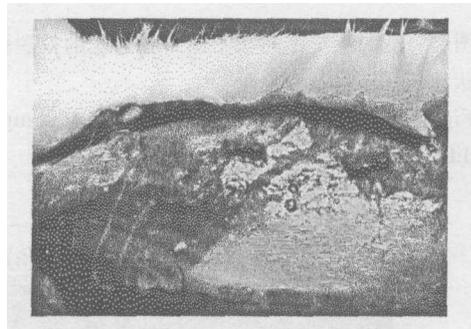


图 4 样品皮下植入 40 天后的情况

Fig. 4 Status of the samples implanted *in vivo* for 40d

表 1 样品在不同植入时间的拉脱实验结果

Table 1 Results of mechanical tensile tests for each implant at 40d and 70d implantation periods

| SCA | | | | | | | |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------------------|---------------------------------|
| | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 | Sample 4 | Sample 5 | F_{\max} average/N | Tensile strength, σ /MPa |
| 40 day | 6.358 | 6.124 | 6.376 | 6.762 | 5.549 | 6.234 | 0.074 |
| 70 day | 12.424 | 14.48 | 10.74 | 8.87 | 8.948 | 11.092 | 0.132 |
| SE | | | | | | | |
| | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 | Sample 4 | Sample 5 | F_{\max} average/N | Tensile strength, σ /MPa |
| 40 day | 4.526 | 4.542 | 5.116 | 4.804 | 4.542 | 4.706 | 0.056 |
| 70 day | 7.34 | 7.504 | 5.444 | 5.722 | 6.864 | 6.575 | 0.078 |

3.3 样品的生物力学性质及断口组织分析

表 1 列出了 SCA 和 SE 样品在两个植入时间内与软组织的最大拉脱应力及其平均值以及相应的结合强度。

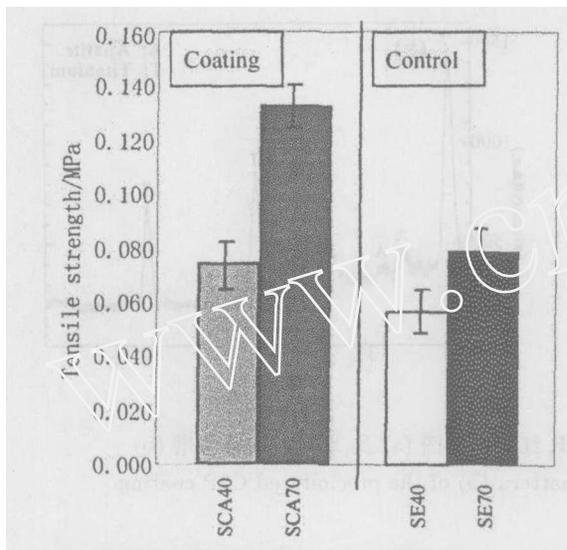


图 5 不同特征样品在不同种植时间的拉脱强度柱状比较图

Fig. 5 Tensile strengths of different samples at different implantation time

从表 1 及相应的柱状图 5 中可以直观看出, 随着时间的增长, 组织与所有样品间的结合强度都有所增强, 表面有类骨磷灰石涂层的样品结合强度远远大于空白对照样品, 40 天时涂层样品与组织的结合强度几乎与 70 天时空白样品与组织的结合强度相当, 70 天时结合强度几乎达到空白对照样品的 2 倍左右。

大量文献报道^[1,12], 当植入体的表面为光滑状态或表面孔径 $<40\mu\text{m}$ 时, 皮下结缔组织不能较深入地在孔内形成成熟的、相互交叉的连接, 会因此形成纤维包裹 (capsule); Winter^[13] 在实验中也发现当材料表面孔隙直径为 $40\mu\text{m}$ 以上时, 表面允许结缔组织和毛细血管的长入, 而孔隙尺寸在 $10\sim40\mu\text{m}$ 之间时则只允许单条胶原、成纤维细胞和异物细胞的长入。所以

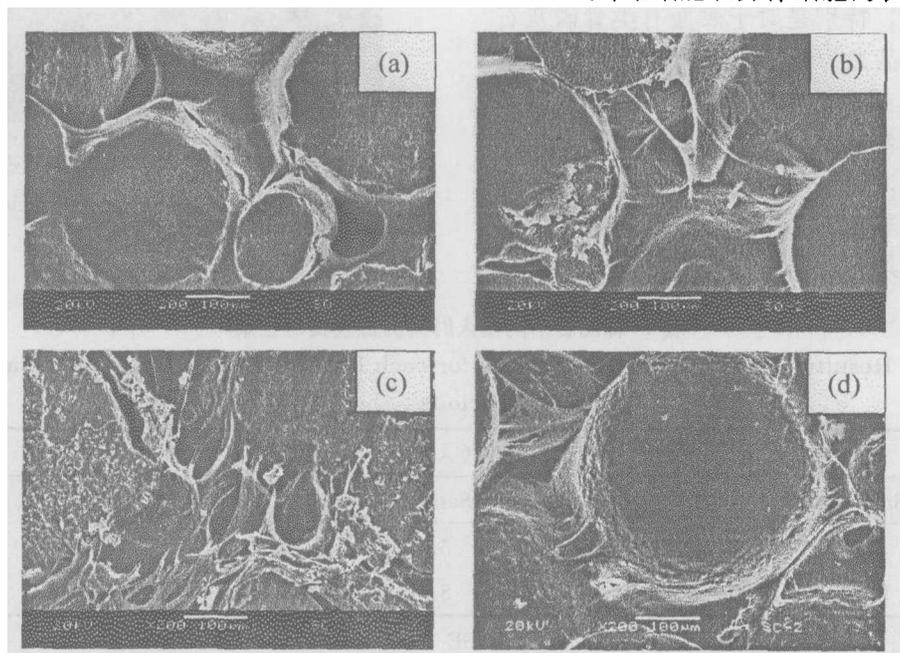


图 6 涂层组和对照组在不同植入时间的拉脱断口上材料与组织相互关系的形貌照片

Fig. 6 Situations of the tensile sections of the coated and controlled materials at different implantation time

(a) SE40; (b) SE70; (c) SCA40; (d) SCA70

我们选择钛珠粒径为 $360\mu\text{m}$ 制备出的多孔材料, 其孔隙尺寸都 $>40\mu\text{m}$, 成纤维细胞和毛细血管均可以长入材料的孔隙中. 随着时间的延长, 成熟的成纤维细胞和毛细血管越来越多地充满材料内部的孔隙, 形成了较为稳定和成熟的连接, 所以随着时间的延长, 材料与组织的结合强度不断增大. 然而, 结合断口的扫描电镜形貌图, 可以看出涂层组材料与组织的结合明显比对照组紧密, 经活化的钛珠表面覆盖有一层较为粗糙的物质将长入的组织与材料牢固地连接起来, 断口处材料与组织间没有出现因拉力作用而产生的组织在材料表面的撕裂纹, 说明在拉力的作用下, 涂层组检测面在拉力作用下的破坏产生于成熟的成纤维组织内部, 而没有破坏组织与活化材料表面的结合. 而对于对照组, 虽然也长入大量的纤维组织甚至胶原纤维, 但组织与材料表面只是简单的贴附, 所以在拉力的作用下, 易产生撕裂纹, 而不能起到加固的作用. 断口形貌如图 6(a)~(d) 所示.

从 SEM-EDX 图谱 (图 7) 中可以看到, 对于 SCA 在 40 天和 70 天时断口处都有很强的钙、磷峰的存在, 而在 SE 的断口处始终都没有这些峰的出现. 根据我们的前期研究工作^[9], 表面经生物活化处理后的钛金属在皮下植入时会在组织与材料的界面上诱导沉积一薄层钙磷层, 该钙磷层会诱使周围的纤维组织以及胶原长入其结构中, 从而增大活性材料与组织间的结合力. 同时也有大量的研究工作表明, 材料在体外预沉积一层类骨磷灰石后植入体内, 类骨磷灰石层中的 CO_3^{2-} , PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} 等活性离子, 可以使细胞黏附在材料表面, 并形成细胞材料界面, 同时高表面积 of 类骨磷灰石层为细胞提供了大量的结合位点, 更有利于蛋白质的吸附以及细胞的黏附、增殖和分化, 而且蛋白吸附以后, 更有利于离子的交换. 同时高表面积 of 类骨磷灰石层也为细胞的分化和蛋白质的沉积提供了合适的微环境^[14,15]. 类骨磷灰石的微观多孔结构有利于早期血管的长入, 血液中含有各种生长蛋白, 更有助于纤维组织的生长以及与材料表面的化学性结合. 实验结果表明, 类骨磷灰石的存在的确有促进细胞活性的作用, 使材料与组织的接触界面更活跃, 结合更牢固.

4 结论

多孔钛因其合适的孔径和表面结构, 有利于组织的长入, 有效提高材料与组织间的结合力; 预先在体外沉积的类骨磷灰石层在体内有利于较早形成活跃的细胞材料表面, 促进材料表面细胞的活性, 更有助于皮下结缔组织的长入以及与材料表面的牢固结合. 因此, 钛珠烧结的多孔结构结合化学沉积的类骨磷灰石涂层将是一个固定皮下软组织的有效方法.

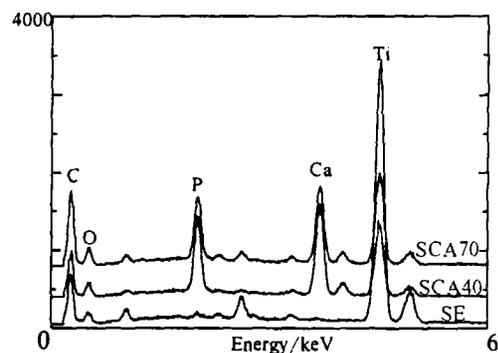


图 7 SEM-EDX 显示 40 天和 70 天时在预沉积类骨磷灰石涂层的样品 SCA 表面有明显的 Ca、P 峰的存在, 而在对照组表面上却没有
Fig. 7 There were obvious Ca, P peaks appeared on the SCA at 40d or 70d, while no any peaks appeared on controlled group (SEM-EDX)

参考文献

- [1] von Recum A F, Park J B. CRC Critical Reviews in Bioengineering, published by CRC Press, 1981. 37-77.
- [2] Chehroudi B, Gould T R L, Brunette D M. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1992, **26**: 493-515.
- [3] Jansen J A, van der Waerden J P, de Groot K, et al. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1991, **25**: 1535-1545.
- [4] van Blitterswijk C A, Grote J J, de Groot K, et al. *Biomaterials*, 1986, **7**: 137-143.
- [5] Pilliar R M. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1987, **21**: 1-33.
- [6] Yan J Y, Cooke F W, von Recum A F, et al. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1989, **23**: 171-189.
- [7] Hacking S A, Boby J D, krygier J J, et al. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000, **52**: 631-638.
- [8] Zhang Q, Liu X, Zhang X, et al. *Bioceramics*, 2003, **240**: 89-92.
- [9] Wu Y, Yang B C, Zhang X L, et al. *Key Eng. Mater.*, 2004, **254-256**: 725-728.
- [10] 段友容. 博士论文. 成都: 四川大学, 2002. 34-35.
- [11] Zhang X D, Feng J Q, Chen A Y, et al. *Clin. Mater.*, 1989, **4**: 319-327.
- [12] Daly B D, Ezycher M, Lewis M B, et al. In Devices and Technology Branch Contractors Meeting Proc., National Institute of Health, Bethesda, Md., 1979.
- [13] Winter G D. *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, 1974, **5**: 99-112.
- [14] Daculsi G, Legeros R Z, Heughebaert M. *Calif. Tiss. Int.*, 1990, **46**: 20-27.
- [15] Lampin M, Waroquwaier-Clerout R, Legris C. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997, **36**: 99-108.

Biomechanical Properties of Porous Titanium with Different Surface Characteristics Used for Soft-tissue Anchorage

WU Yao, LI Hu, DENG Chun-Lin, YANG Bang-Cheng, ZHANG Xing-Dong

(Engineering Research Center in Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In order to resolve the biological sealing of the percutaneous devices for a long time, porous titanium with three-dimensioned scaffold and suitable surface micropores were chosen for fixation the subcutaneous soft tissues. Bone-like apatite was firstly precipitated on the surface of the porous Ti *in vitro*, and the bare surface as control. All of the samples were implanted into the back of the rabbits subcutaneously. At 40 days and 70 days postoperation, the samples with the surrounding soft tissues were harvested and experienced biomechanical tensile testing. After that, the tensile testing sections were observed by SEM-EDX to analyze the situations of the tissues contacted with the different surface of the materials. The results demonstrate that all of tensile strength of the bone-like apatite coated porous titanium is bigger than that of the control group, and the bonding state at the interface of the materials/tissue is firmer than that of the control. When the samples implanted *in vivo*, the bone-like apatite coating precipitated in advance *in vitro* is efficient to the formation of the active cell/materials interface, which is beneficial for the ingrowth of the fibrous tissue and formation of the tight bonding between the tissues and materials.

Key words porous titanium; bone-like apatite; tensile strength; subcutaneous fixation