

# 纳米羟基磷灰石/聚己内酯复合生物活性多孔支架研究

苏佳灿, 李明, 禹宝庆, 张春才

(上海市第二军医大学附属长海医院 骨科, 上海 200433)

**摘要:** 采用水热法制备了纳米羟基磷灰石(n-HA)及其与聚己内酯(PCL)的复合材料. 用熔融浇铸/食盐微粒浸出法制备了孔径在200~400 $\mu\text{m}$ 、大孔互相贯通的复合材料支架. 通过细胞培养和体内动物实验研究了该支架的生物学性能. 结果表明,复合支架的孔隙率随致孔剂用量的增加而增加,而抗压强度随之而减小;支架的最大孔隙率可达86%,相应的抗压强度为2.4MPa. 成骨细胞在支架上的细胞粘附率和增殖随磷灰石含量增加而提高,复合材料明显高于单纯的PCL支架. 组织学观察显示,新生骨长入多孔支架和复合材料形成了直接的骨性结合. n-HA/PCL复合材料支架有很好的生物相容性和生物活性.

**关键词:** 纳米羟基磷灰石; 聚己内酯; 复合材料; 组织工程支架; 生物活性

**中图分类号:** TB383

**文献标识码:** A

## Study on Porous Scaffold of Nano Hydroxyapatite/poly( $\epsilon$ -caprolactone) Bioactive Composite

SU Jia-Can, LI Ming, YU Bao-Qing, ZHANG Chun-Cai

(Department of Orthopaedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** Nano hydroxyapatite (n-HA) and its composite with poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) were fabricated by hydrothermally synthesized method, and the well interconnected macroporous nano-composite scaffolds with pore diameter from 200 $\mu\text{m}$  to 400 $\mu\text{m}$  were prepared by melt-cast/salt particle-leaching technique. The biological properties of the composite scaffolds were investigated through cell culture and animal implanted experimentation. The results show that porosity of the composite scaffolds increases with the increase of the quantity of the porogens used while the compressive strength decrease. The maximal porosity of the composite scaffold can reach 86% while its compressive strength is only 2.4MPa. The attachment ratio and proliferation of MG<sub>63</sub> cells on the composite scaffolds increase with the increase of HA content in the composite, which are significantly higher than those of PCL alone. Histological examinations confirm that the new bony tissue could grow easily into the composite scaffold and directly integrate with the composite by bone-bonding. The results indicate that the n-HA/PCL composite scaffolds have excellent biocompatibility and bioactivity.

**Key words:** nano hydroxyapatite; poly( $\epsilon$ -caprolactone); composite; tissue engineering scaffold; bioactivity

羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)生物陶瓷曾以块状和颗粒形式在临床广泛地用于骨骼系统修复和重建,然而块状陶瓷脆性大、加工难、易断裂;颗粒陶瓷有游走、移位的缺点,限制了其作为硬组织修复材料的应用<sup>[1]</sup>. 为了克服羟基HA的脆性和提高其可塑性,模仿天然骨的组成结构,把它和有韧性的医用高分子材料复合,制备生物活性无机/有机纳米复合材

料,近年来受到了人们的广泛关注,尤其是可生物降解的羟基磷灰石/聚合物复合生物材料<sup>[2,3]</sup>. 一般而言,在不影响复合材料力学性能情况下,HA颗粒在聚合物中的分散越均匀,在复合材料中的含量越高,材料的生物活性就越好<sup>[4]</sup>. 因此,由纳米HA和高分子材料制备复合材料近年来一直是骨组织工程支架材料的研究热点.

自20世纪90年代以来,聚己内酯(PCL)以其优越的可生物降解性,良好的生物相容性得到广泛的关注. 结合n-HA和PCL各自的优点,一些学者研究了它们的复合材料,如Paola等报道了多孔聚己内酯/磷酸灰石复合骨组织工程支架的物理化学性能<sup>[5]</sup>;Shor等采用精密挤出沉积方法直接制备聚己酸内酯/羟基磷酸灰石的复合组织工程支架,HA的加入将孔隙率60%的支架压缩模量从59MPa增加至84MPa,孔隙率70%的支架压缩模量从30MPa增加至76MPa<sup>[6]</sup>;刘晓荣等研究了纳米HA-PCL复合生物材料的结晶行为<sup>[7]</sup>. 多孔支架在组织再生和修复工程中是非常重要的,多孔支架可增加材料的表面积,有利于材料和体液充分接触,加快材料降解,多孔材料也可为种植细胞提供较大的粘附面,有利于细胞粘附,并允许血管组织向内生长;同时为大量细胞种植和生长提供足够空间<sup>[8,9]</sup>. 因此,本研究将采用一种简单方法—熔融浇铸/微粒过滤法制备n-HA/PCL复合支架,并在体内研究支架的生物力学性能.

## 1 材料和方法

### 1.1 纳米羟基磷酸灰石(n-HA)的制备

n-HA的制备采用反应式(1):



为了合成终产物是化学计量比的HA,调整反应物的钙磷原子摩尔比为1.67. 将2.2mol (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶于1000mL去离子水中,加NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O调节pH值,使之大于10,为1号液. 把3.7mol Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O溶于1500mL去离子水中,为2号液. 将1000mL二甲基乙酰胺(N,N-dimethyl acetamide, DMAC,分散剂)加入到2号溶液中. 在加热(70℃)和搅拌条件下,将1号液缓缓滴入到2号液中,滴完后,温度上升到100℃保温4h,后自然冷却,在常温下放置24h,试样分别用水和乙醇离心洗去DMAC,试样用透射电子显微镜(TEM)观察.

### 1.2 复合材料及其支架的制备和表征

将100g n-HA浆液(5wt%)加入带有分水装置、搅拌装置和冷凝装置的三颈瓶中,同时加入150mL溶剂DMAC和5g聚乙二醇(PEG6000,分散剂). 温度逐步升至100℃,在100~120℃脱水,然后加入11.7g的聚己内酯(PCL,美国Sigma公司, Mn=80000),在120~130℃条件下,搅拌复合4h,取出试样,用热去离子水洗涤4次,乙醇洗涤2次,并于50~60℃干燥48h获得复合材料(30wt% HA),60wt% HA含量复合材料也采用同样方法制备.

将食盐筛分成200~300μm和300~400μm的颗粒备用. 将食盐颗粒和n-HA/PCL复合材料按一定质

量比例混合(9:1,8:1,7:1,6:1),放入不锈钢模具,模具置于100℃烘箱中熔融加压固化1h后取出,冷却后放入去离子水中24h,换水3~4次,烘箱50℃干燥,最后可得到常温下固态的三维多孔的复合材料支架. 采用转靶X射线衍射仪(XRD)测试复合材料的物相,用扫描电子显微镜(SEM)观察支架的表面形貌和微结构,用EDX测试支架表面的化学成分,排水法测定支架的孔隙率,用万能材料试验机测试支架的抗压强度.

### 1.3 复合材料的细胞粘附和细胞增殖

将氧乙烷消毒后的n-HA/PCL复合材料(HA含量分别为30wt%和60wt%)的致密样品(5mm×5mm×1mm)用于细胞粘附测定,以纯PCL同样大小样品为对照. 取96孔培养板,在孔培养板内放入备用的样品(n=5). 调整MG<sub>63</sub>成骨细胞浓度为4×10<sup>4</sup>/mL,将细胞悬液0.5mL滴加到样品上. 置于37℃,5%CO<sub>2</sub>的培养箱中复合培养4h后,PBS冲洗,去除未粘附的细胞. 用0.25%胰蛋白酶进行消化,收集细胞并记数,计算细胞粘附率. 细胞粘附率计算公式为:粘附率(%) = 粘附细胞数/总细胞数×100%.

将n-HA/PCL复合多孔支架(HA含量分别为30wt%和60wt%)样品(5mm×5mm×1mm)用氧乙烷消毒备用. MG<sub>63</sub>成骨细胞悬液以4×10<sup>4</sup>个/mL密度接种于含有支架样品培养板中,每孔加入细胞悬液100μL,对照组PCL加入相同数量的细胞悬液和培养液. 然后置于培养箱中孵育,常规培养. 分别于接种后1,4,7d进行MTT检测. 将支架从培养孔中取出,在PBS液中轻轻清洗3次,置于新的培养板中,每孔加入培养液100μL以及MTT 20μL,培养箱中继续培养4h,然后弃去培养液,每孔加入二甲基亚砷150μL,摇床上振荡30min,选择490nm波长用分光光度计测定各孔光密度值(OD),每组测量5孔.

### 1.4 动物体内植入实验

将n-HA/PCL复合多孔材料(HA含量为60wt%)支架样品(6mm×6mm×6mm)用氧乙烷消毒备用. 按常规方法麻醉动物后,将样品植入新西兰白兔的股骨缺损处内,术后在第四周和第八周分别处死动物取样,实验样品置于4%的福尔马林液中固定3~4d,脱钙21d,中途更换脱钙液一次,充分脱钙后,再次修整标本,装盒后清水充分冲洗,酒精梯度脱水、浸蜡、包埋,石蜡切片厚度约为5μm,H&E染色,显微镜组织学观察.

## 2 结果和讨论

### 2.1 纳米磷酸灰石的TEM分析

从图1可以看出,70℃合成的纳米磷酸灰石的尺寸约为10nm×50nm,形貌为细针状,大多数似为无定

形;水热处理后纳米磷灰石的尺寸变成约为 20nm × 80nm,形貌为棒状. 水热处理影响合成的纳米磷灰石的尺寸和形貌,水热处理使纳米磷灰石的尺寸变大,结晶度提高. 自然骨的无机矿物质主要是由纳米磷灰石构成,基于仿生的概念,本实验希望制备一种与人骨矿物有相似成分和结构的纳米羟基磷灰石.

2.2 支架的物相、孔隙率和力学性能

图 2 是 n-HA/PCL 复合材料的 XRD 图谱,可以看出,复合材料包含 n-HA 和 PCL 两种材料,相对于羟基磷灰石生物陶瓷而言,n-HA 具有较低的结晶度,这种纳米级羟基磷灰石与人骨的矿物相具有相似的成分、结构和结晶度.

表 1 显示了致孔剂用量对支架的孔隙率及抗压强度影响. 可以看出,随着 NaCl/PCL 比率的增大,支架孔隙率逐渐增大,即随着致孔剂用量的增加,支架的孔隙率增加,当 NaCl/PCL 比率用量质量比为 9:1 时,支架孔隙率可达到 86%. 因此,可以通过控制致孔剂用量来控制支架的孔隙率,使支架达到所需要的孔隙率. 从表 1 也可看出,随着支架孔隙率的增大,其抗压强度不断降低,当支架孔隙率为 60% 时,其抗压强度为 11MPa;当支架孔隙率为 86% 时,其抗压强度下降得较快,仅为 2.4MPa. 结果表明,随着支架的孔隙率的提高其抗压强度降低.

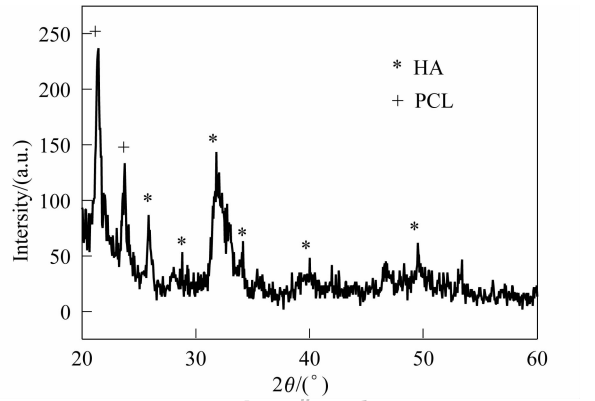


图 2 n-HA/PCL 复合材料的 XRD 图谱  
Fig. 2 XRD pattern of n-HA/PCL composite

表 1 致孔剂用量 (NaCl) 对 n-HA/PCL 复合材料  
支架的孔隙率及抗压强度影响  
Table 1 Effects of quantity of porogen (NaCl) used on  
porosity and compressive strength of composite  
scaffolds (mean ± standard deviation, n = 4)

Samples	NaCl/PCL (w/w)	Porosity /%	Compressive strength /MPa
1	9:1	86 + 4	2.4 ± 1.7
2	8:1	80 + 3	3.6 ± 1.5
3	7:1	71 + 3	8 ± 2
4	6:1	60 + 2	11.0 ± 2.3

2.3 支架形貌和表面微观分析

图 3 是不同孔隙率 n-HA/PCL 复合材料支架的 SEM 照片,(a) 和 (b) 是孔隙率为 80% 左右的样品,(c) 和 (d) 是孔隙率为 60% 和 86% 的样品,可以看出,孔隙率为 60% 的样品,大孔的相互贯通性不是很好,而孔隙率为 80% 和 86% 的样品,大孔相互贯通. 可根据所用的食盐颗粒用量来调控支架孔隙率,使之达到所需要的孔隙率. 从图 4 也可看出,支架的孔径在 400 ~ 500μm 之间,可根据所用的食盐颗粒大小控制孔径. 结果显示,孔隙率越高,多孔材料的孔与孔之间就越连通.

支架材料的孔越贯通,其内比表面积就越大,越有利于细胞粘附生长、血管和神经长入,又有利于营养成分的渗入和代谢产物排出. 孔径大小已被证明是影响纤维血管组织内生的重要参数,以及对于新生骨长入有着重要影响,合适的孔径为 100 ~ 600μm,过小或过大,均不利于细胞/组织的长入<sup>[10,11]</sup>. 高孔隙率支架具有大的比表面积,不仅有利于材料降解,也能为大量细胞种植、生长以及分泌细胞外基质提供足够的空间.

图 4 是 (a) PCL、(b)30wt% 和 (c)60wt% 磷灰石含量的复合材料支架表面的 SEM 照片,从图可见,复合材料表面存在大量的纳米磷灰石颗粒. 30wt% HA

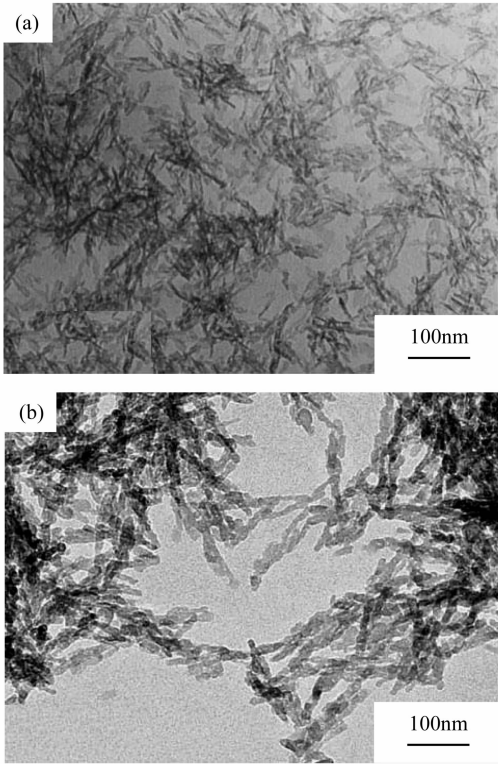


图 1 70℃ 合成的 n-HA (a) 和 70℃ 合成、100℃ 水热处理 4h (b) 的 n-HA TEM 照片  
Fig. 1 TEM photographs of nanoapatites synthesized at 70℃ (a) and after hydrothermally treated at 100℃ for 4 h (b)

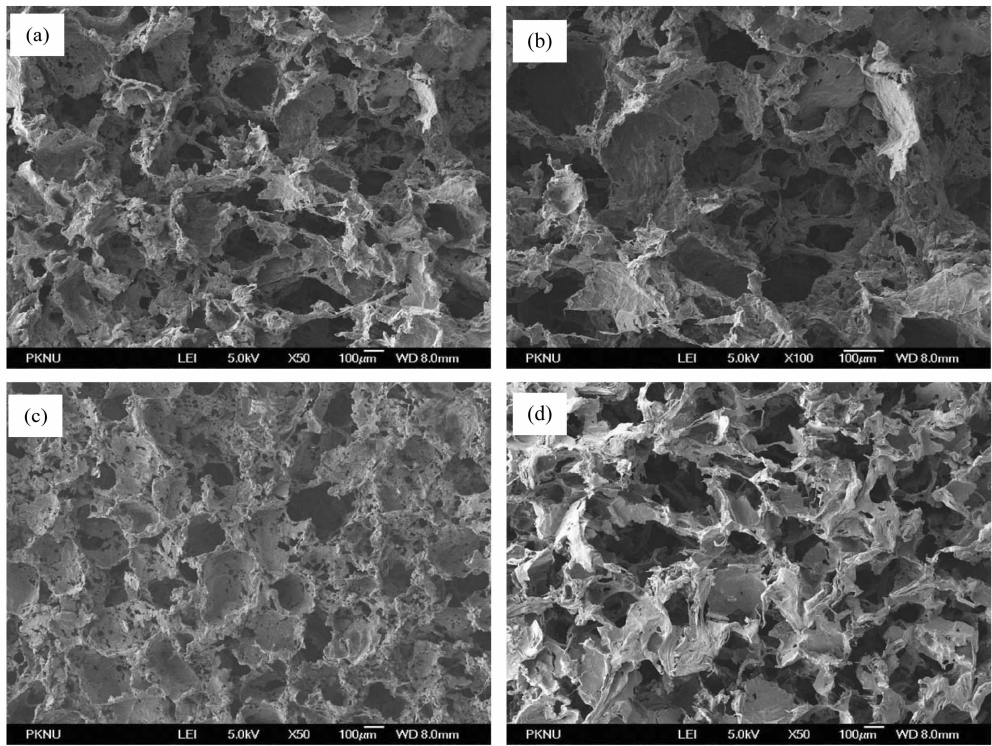


图3 复合材料的SEM照片

Fig.3 SEM photos of composite scaffolds

(a) and (b) Porosity of 80%, (c) (d) Porosity of 60% and 86%, respectively

复合材料虽然有大量的磷灰石,但这些颗粒大都将被PCL基体所包埋,暴露在材料表面的颗粒很少;相反,60wt% HA 复合材料表面的磷灰石颗粒,除少量被PCL包埋,大都暴露在表面.从60wt% HA 含量复合材料表面EDX图谱(d)可见,表面存在着明显的钙磷成分,而这些暴露在复合材料表面的磷灰石颗粒将直接关系到材料的生物学性能,材料表面的磷灰石越多,植入体内细胞的反应就明显,新骨在材料表面就越容易形成,如在钛合金表面喷涂羟基磷灰石生物活性涂层<sup>[12]</sup>.

2.4 支架的生物学性能

2.4.1 细胞粘附和增殖

细胞在材料表面的粘附和铺展是评价材料生物相容性的重要指标之一.本实验通过接种成骨细胞于n-HA/PCL复合材料表面,考察细胞在复合材料表面的粘附情况,从而研究材料的生物相容性.从图5可看出,随着n-HA在复合材料中含量的增加,材料的细胞粘附率提高.加入30wt%和60wt%的n-HA于复合材料中,相比较纯PCL(粘附率为22.5%)而言,材料的细胞粘附率提高明显,而且60wt%(粘附率为54.7%)磷灰石含量的复合材料的细胞粘附率明显高于30wt%(粘附率为36.7%).这是由于有大量的磷灰石暴露于复合材料支架材料的表面,这些磷灰石由

于与人骨磷灰石具有相似的组成结构,因而有利于细胞粘附.

用MTT处理细胞所得的OD值与细胞活力和数量之和成正比.图6显示了成骨细胞在(a)PCL、(b)30wt%和(c)60wt% n-HA含量复合材料支架上的增殖情况.4d时,它们的OD值分别是0.221、0.275和0.349;7d时,它们的OD值分别是0.324、0.415和0.546.可以看出,PCL和复合材料的细胞活力和数目随时间的推移而增加,支架材料的OD值随磷灰石含量增加而明显增长,60wt% n-HA含量复合材料的细胞增殖明显高于30wt%.结果表明,加入磷灰石于PCL基体中能够促进成骨细胞增殖,且细胞增殖随着磷灰石含量增加而提高.

细胞在材料表面的分裂和增殖是评价生物材料性能的一个重要方面,其实质上是材料与细胞相互作用的过程.材料表面成分的不同,可能使材料的微观结构有所不同,进而最终影响细胞/材料相互作用<sup>[13]</sup>.本实验中由于有大量的磷灰石暴露于复合材料支架的表面,这些磷灰石由于与人骨磷灰石具有相似的组成结构,因而有利于细胞粘附和增殖.这些结果与材料表面的SEM分析和细胞在材料表面的粘附分析结果是一致的.

2.4.2 体内植入实验

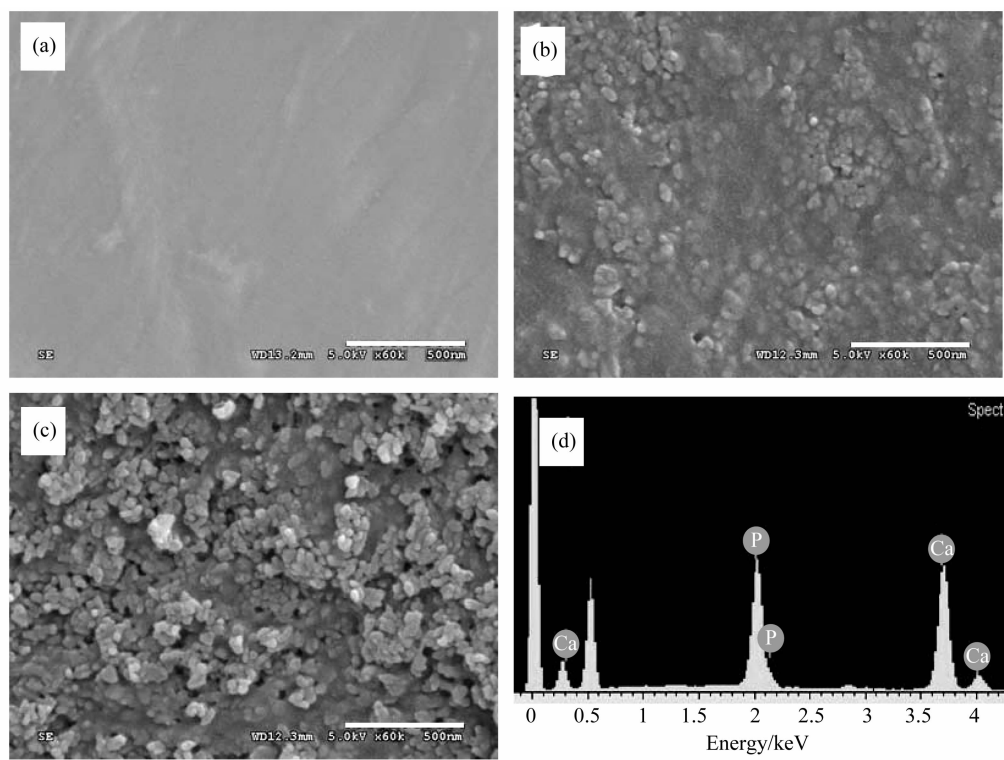


图 4 (a) PCL、(b)30wt% HA 和(c)60wt% HA 含量的复合材料表面 SEM 照片，  
(d)是 60wt% HA 含量的复合材料表面 EDS 分析结果  
Fig. 4 SEM photographs of surface morphology of composite scaffold. (a) PCL, (b) composite with 30wt% HA, (c) composite with 60wt% HA, and (d) EDS pattern of composite with 60wt% HA

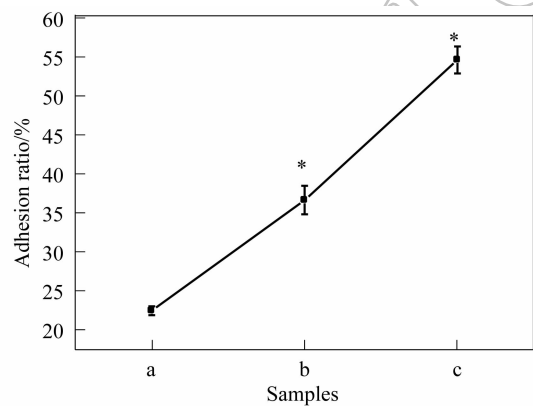


图 5 (a)PCL、(b)30wt% HA 和(c)60wt% HA 含量的复合材料表面的细胞粘附率  
Fig. 5 Cell adhesion rate on (a) PCL and composite with (b) 30wt% HA, (c) 60wt% HA

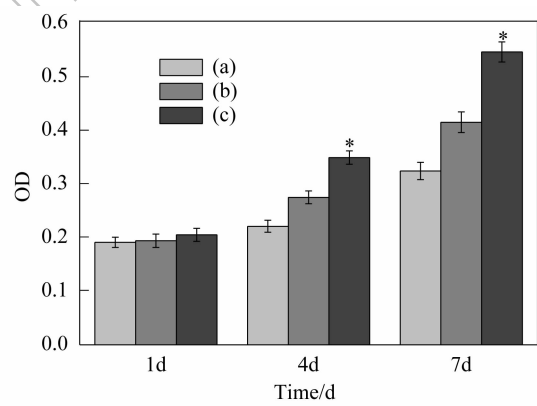


图 6 成骨细胞在(a) PCL、(b) 30wt% 和(c) 60wt% n-HA 含量复合材料支架上的增殖  
Fig. 6 Proliferation of osteoblast on (a) PCL and composite scaffolds with (b) 30wt% HA and (c) 60wt% n-HA ( $n=5$ , \*  $P<0.05$ )

图 7 显示了复合材料支架植入兔股骨缺损(a) 4w 和(b)8w 的组织学切片照片,结果显示,4w 时,新生骨样基质在支架中形成,并且均匀分配,新生骨样基质周围有大量的成骨细胞,植入体周围没有明显的炎症反应发生. 支架植入 8w 时,较多新骨组织长入支架材料的孔隙内,新骨中含有许多骨细胞和造骨细胞. 支架和宿主骨之间也形成了许多新骨,一些新骨

形成一个环形包围着支架,材料-骨组织之间无结缔组织间隔,形成直接的骨性结合.  
结果表明,复合材料有良好的生物活性和生物相容性. 相互贯通的多孔支架和复合材料的表面生物学特性有利于新骨形成,促进新骨长入多孔支架. 由于纳米磷灰石具有与人骨矿物质类似的组成结构,因而材料能促进新骨快速地形成.

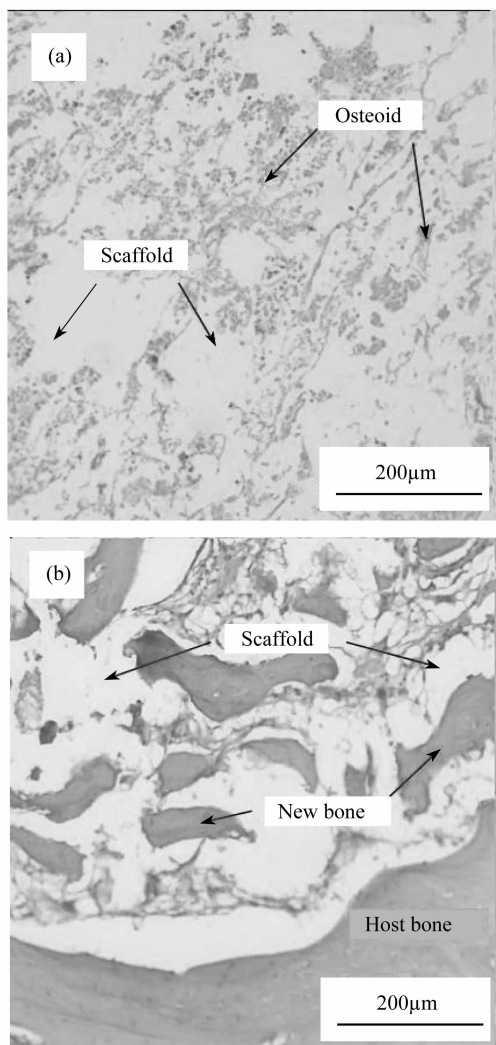


图7 复合材料支架(60wt% n-HA)植入兔股骨缺损(a) 4w和(b) 8w的组织学切片(H&E染色)

Fig. 7 Histological appearances of rabbit thighbone defect implanted with n-HA/PCL composite scaffolds with 60wt% n-HA for (a) 4w and (b) 8w. (H&E)

### 3 结论

采用水热法制备了纳米羟基磷灰石及其与聚己内酯的复合材料,用熔融浇铸/微粒浸出法制备了孔径在200~400μm、大孔互相贯通的纳米复合材料多孔支架。支架的孔径、孔隙率和孔连通性等参数可以

通过调控加入的致孔剂的颗粒大小和用量来控制;致孔剂的用量越多,支架的孔隙率越高,相应支架的力学性能就越低。当支架孔隙率为60%时,其抗压强度为11MPa;当支架孔隙率为86%时,仅为2.4MPa。相对于纯PCL材料,加入n-HA于PCL基体中,明显提高了复合材料的细胞粘附率和细胞的增殖,磷灰石的含量越高,细胞的粘附率和增殖就越高;纯PCL的细胞粘附率为22.5%,而相应30wt%和60wt%磷灰石含量的复合材料分别为36.7%和54.7%;细胞增殖,纯PCL在4d和7d的OD值分别是0.221和0.324,而相应30wt%和60wt% n-HA含量复合材料的OD值分别是0.275、0.349和0.415、0.546。动物体内植入实验显示,细胞/组织很容易长入支架内部,在支架内较快地形成了新骨,新骨和材料形成了直接的骨性结合。

### 参考文献:

- [1] Kim Hyunbin, Camata Renato P, Lee Sukbin, *et al.* *Acta Materialia*, 2007, **55**(1):131-139.
- [2] Liao Su-San, Watari Fumio, ZHU Yu-He, *et al.* *Dental Materials*, 2007, **23**(9):1120-1128.
- [3] Wei Jie, Li Yu-Bao, He Yi. *J. Mater. Sci. Lett.*, 2005, **40**(3): 793-797.
- [4] Wei Jie, Li Yu-Bao, Lau Kin-Tak. *Composites Part B: Engineering*, 2007, **38**(3):301-305.
- [5] Paola Taddei, Anna Tinti, Matteo Reggiani, *et al.* *Journal of Molecular Structure*, 2005, **744-747**:135-143.
- [6] Shor Lauren, Guceri Selcuk, Wen Xuejun, *et al.* *Biomaterials*, 2007, **28**(35):5291-5297.
- [7] 刘晓荣,曹阳,陈蕾,等. 合肥工业大学学报-自然科学版,2007, **30**(11): 1462-1466.
- [8] Hollister Scott J. *Nature Materials*, 2005, **4**(7): 518-524.
- [9] 魏杰,刘昌胜,洪华,等(WEI Jie, *et al.*). 无机材料学报(Journal of Inorganic Materials), 2006, **21**(4): 958-964.
- [10] Jones Julian R, Ehrenfried Lisa M, Hench Larry L. *Biomaterials*, 2006, **27**(7):964-973.
- [11] Wei Jie, Li Yu-Bao. *European Polymer Journal*, 2004, **40**(3): 509-515.
- [12] Liu Xuan-Yong, Fu Ricky K Y, Poon Ray W Y, *et al.* *Biomaterials*, 2004, **25**(25): 5575-81.
- [13] Liu Hai-Feng, Fan Hong-Bin, Wang Yue, *et al.* *Biomaterials*, 2008, **29**(6):662-674.