

文章编号: 1000-324X(2007)02-0333-06

HA/PDLLA 复合材料的制备及其降解性能研究

黄福龙, 戴红莲, 方 园, 单学智, 李世普

(武汉理工大学 生物材料与工程研究中心, 武汉 430070)

摘 要: 首先采用开环聚合合成了 PDLLA, 液相 - 沉淀法合成了 HA 超微粉, 然后采用液相吸附法制备了 HA/PDLLA 复合材料. 以纯 PDLLA 进行对照, 对 HA/PDLLA 复合材料进行体外降解实验和体内植入实验, 并进行扫描电镜观察. 结果表明 HA/PDLLA 复合材料较单纯 PDLLA 材料的降解速度减慢, 机械强度升高, 避免了过早的丧失力学强度. HA 颗粒从材料表面脱落后, 成纤维细胞向组织内长入, 并伴有少量新生骨痂的形成, 显示 HA/PDLLA 复合材料具有良好的降解性能, 一定的成骨性和骨连接性. 24 周时, HA/PDLLA 材料被组织分隔包裹, 新生骨组织长入材料, 骨愈合情况良好, 具有足够的强度保证实验性松质骨骨折正常愈合.

关 键 词: 羟基磷灰石; 聚 DL- 乳酸; 液相吸附法; 生物降解; 界面

中图分类号: R318 **文献标识码:** A

Preparation and Biodegradability of HA/PDLLA Composites

HUANG Fu-Long, DAI Hong-Lian, FANG Yuan, SHAN Xue-Zhi, LI Shi-Pu

(Biomedical Materials and Engineering Research Center, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

Abstract: PDLLA and HA ultra-fine powders were synthesized by the ring opening polymerization and the liquid phase deposition, respectively. HA/PDLLA composites were prepared by using the liquid phase absorption method. The degradation processes of HA/PDLLA and PDLLA were investigated *in vitro* and *in vivo*. The results show that HA/PDLLA composites have higher mechanical strength and slower degradation rate than pure PDLLA, and avoid losing mechanical strength at the initial implantation stage. The HA granules break off from the surface; fibroblast starts growing and fresh callus come into being. This indicates that HA/PDLIA composites have good biodegradability, certain bioactivity and osteoconductibility. A favorable biocompatibility can be seen on the material/bone interface. At 24th week, the materials are separated and enwrapped by tissue, and the fracture healed up successfully. Consequently, HA/PDLLA composites have sufficient mechanical strength for the fixation of fractures and osteotomies in cancellous bone.

Key words hydroxyapatite; poly DL-lactide; liquid phase absorption method; biodegradability; interface

1 引言

可吸收骨折内固定材料可避免二次手术取出而受到人们广泛重视, 聚乳酸 (Polylactide, PLA) 具有良好生物相容性和生物降解特性, 在体内代谢的产物是乳酸、CO₂ 和 H₂O, 不会在体内重要器官聚集, 对生物体没有不良影响, 具有较好的机械强度、弹性模量和热成型性, 在骨组织和软骨组织的

再生与修复等骨组织工程领域中基本能满足作为细胞生长载体材料的要求^[1,2]. PLA 的两种异构体中由于聚左旋乳酸 (PLLA) 的降解速度比聚右旋乳酸 (PDLLA) 慢, 生物相容性方面比 PDLLA 差, 因此 PDLLA 成了研究热点. PLA 材料的不足之处是不具有骨传导性, 在普通 X 线下不能显影, 且强度较低, 不能很好地用于松质骨骨折的内固定; 由于降

收稿日期: 2006-07-05, 收到修改稿日期: 2006-09-17

基金项目: 湖北省科技攻关项目 (2004AA303B03)

作者简介: 黄福龙 (1969-), 男, 博士研究生. E-mail: daihl9@yahoo.com.cn

解速度与组织再生速度不能很好地匹配,材料降解形成的酸性产物会对周围组织有不良刺激而导致无菌性炎症^[3-5]. 羟基磷灰石 (Hydroxylapatite, HA) 作为一种碱性化合物,具有良好的生物相容性和骨传导性能^[6-8]. 因此将 PLA 和 HA 复合制成生物降解复合材料,一方面对聚乳酸作为内固定材料使用时的初始力学强度及强度衰减速度进行调控满足骨折内固定材料的机械强度要求;另一方面使聚合物材料具有生物活性和骨结合能力符合骨组织工程的生物学要求^[9,10]. 因此, HA/PLA 复合材料可兼具了两种组分的优点,其研制具有现实应用价值. 本工作旨在研制综合性能优良的 HA/PDLLA 复合材料,并以单纯 PDLLA 为对照,探讨 HA/PDLLA 复合材料在体内的降解过程,评价其在骨科中的应用前景.

2 材料与方法

2.1 材料制备

以国产 D,L- 乳酸为原料、氧化锌为催化剂合成丙交酯,将提纯的丙交酯和一定比例的辛酸亚锡溶液混合在 140℃ 的真空条件下聚合 48h 合成重均分子量为 4.92×10^5 的 PDLLA. 利用 H_3PO_4 溶液和 $Ca(OH)_2$ 的悬浮液采用液相 - 沉淀法制备 HA 超微粉,平均粒径为 280nm. 10wt%HA 与 PDLLA 采用液相吸附法混合后,混炼复合制备成 HA/PDLLA 复合材料, 150℃ 下模压加工成 $\phi 5\text{mm} \times 8\text{mm}$ 的圆柱形试样,环氧乙烷消毒后备用.

2.2 性能测试

将 $\phi 3.5\text{mm}$ 的 HA/PDLLA 复合材料和 PDLLA 棒材制成长度为 30mm 的样条,使用 MTS-858 Mini bionix 生物力学测试机,测定其拉伸强度、弯曲强度和弯曲模量. 采用日本 JSM-5600LV 型号扫描电镜观察复合材料的断面形貌.

2.3 体外降解实验

将 HA 质量含量为 10% 的 HA/PDLLA 复合材料、纯的 PDLLA 材料各 6 块,每块大小为 $3\text{mm} \times 3\text{mm} \times 10\text{mm}$,分别置于装有 pH 为 7.4 的 10mL SBF 液的容器中,在电热恒温水浴箱中于 37℃ 条

件下降解,用 pH 计每周测 pH 值一次. 分别将 36 个已知重量的 HA/PDLLA 复合材料和纯 PDLLA 样品放入 pH=7.4 的 10mL SBF 液中,在 37℃ 下观察其降解. 7 天更换液一次,不同时期取三个样品,滤纸除去表面水分,真空干燥 72h,然后在电子天平上称重,计算失重百分率,并对断面进行扫描电镜观察.

2.4 植入实验

健康的日本大耳白兔 40 只 (湖北省动物实验中心提供),体重 2.0~2.5kg,雌雄各半. 随机分成 HA/PDLLA 组和 PDLLA 组. 实验时,肌注氯胺酮 (1mL/kg) 加异丙嗪 (1mL/kg) 麻醉,无菌条件下在兔股骨髁间凹钻 $\phi 5\text{mm} \times 8\text{mm}$ 的骨腔洞,分别将材料植入骨腔洞内. 术后动物分笼喂养,自由活动,不用外固定. 各组 3、6、12 及 24 周时各处死 5 只动物. 将植入材料及周围骨组织完整取出,2.5% 戊二醛磷酸缓冲液固定 24h,液氮淬冷分块,0.1mol/L PBS 溶液清洗 3~4 次,1% 锇酸后固定,磷酸盐缓冲溶液清洗 3~4 次,然后经 50%、60%、70%、80%、90%、95%、100% 丙酮逐级脱水. 脱水后的样品,临界点干燥,镀金,扫描电镜进行观察.

3 结果

3.1 材料的机械力学强度

由表达式可见含 10%HA 的 HA/PDLLA 复合材料弯曲强度和弯曲模量较纯 PDLLA 有所提高. 图 1 表明 HA 微粒均匀地分布在 PDLLA 基体中,HA 的颗粒大小为 280nm 左右.

3.2 材料降解介质的 pH 值变化

纯 PDLLA 降解介质的 pH 值在 1~3 周内轻度下降,而后下降明显,8 周后, pH 变化不再明显,维持在 3.9 附近. HA/PDLLA 降解介质的 pH 值在第 1~4 周时变化不大,第 4 周为 6.7,在 4~8 周下降较快,但下降程度不及纯 PDLLA,在 8 周时为 4.8,此后下降缓慢,最后维持在 4.4 附近. 在相同的时间点, HA/PDLLA 降解介质的 pH 值始终高于纯 PDLLA (图 2).

表 1 材料机械力学强度测试结果

Table 1 Mechanical strength of PDLLA and HA/PDLLA

HA content/wt%	Tensile strength/MPa	Bending strength/MPa	Bending modulus/GPa
0	43.6±0.7	136.8±0.3	2.3±0.1
10	39.8±0.4	146.2±0.8	2.5±0.2

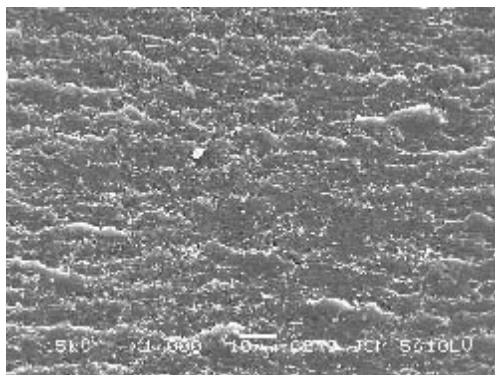


图 1 HA/PDLLA 复合材料的断面 SEM 照片

Fig. 1 SEM image of the cross-section of HA/PDLLA composites

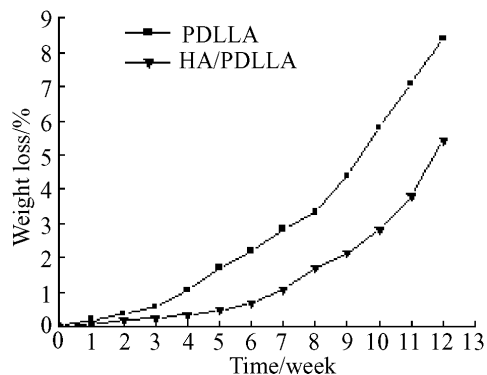


图 3 材料浸泡后的重量变化

Fig. 3 Weight loss rate changes of the materials after soaking in SBF

3.3 材料在体外的降解

纯 PDLLA 在最初 4 周里的失重率为逐渐增大, 第 4 周时重量损失为 1%, 而后加速降解, 失重率进入快速增加阶段, 第 8 周时重量损失为 3.3%, 第 12 周时降解损失为 8.4%. HA/PDLLA 在前 5 周失重率较低, 降解缓慢, 第 7 周时才出现加速降解趋势, 在第 8 周时的重量损失为 1.72%, 明显小于纯 PDLLA; 同期 HA/PDLLA 的重量损失总比纯 PDLLA 少, HA/PDLLA 在 12 周时降解损失为 5.4%(图 3). 降解后的 HA/PDLLA 复合材料表面凹凸不平, 表面的 PDLLA 已被降解, 复合材料中的一部分 HA 微粒裹覆在基体中, 另一部分已从表面脱落, 材料出现了一些裂隙(图 4).

3.4 材料在体内的降解

HA/PDLLA 复合材料植入体内 3 周后, 材料与骨组织之间结合良好, 属于自然过渡, 但两者的界限还比较清楚, 两者之间有纤维组织连结, 有成纤维细胞向材料方面长入, 材料上可看到完整的羟基磷灰石粒子(图 5(a)); 体内植入 6 周后, HA/PDLLA 复合材料组材料与骨组织之间结合紧

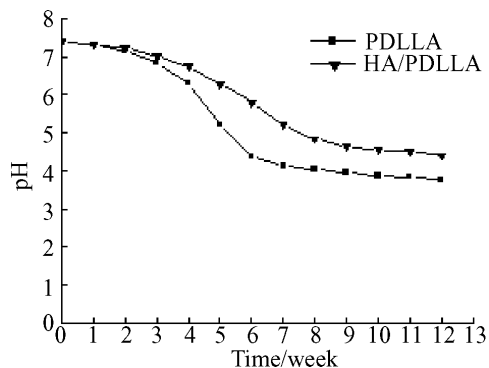


图 2 材料浸泡后模拟体液 pH 值的变化

Fig. 2 pH value changes of SBF after the materials soaking

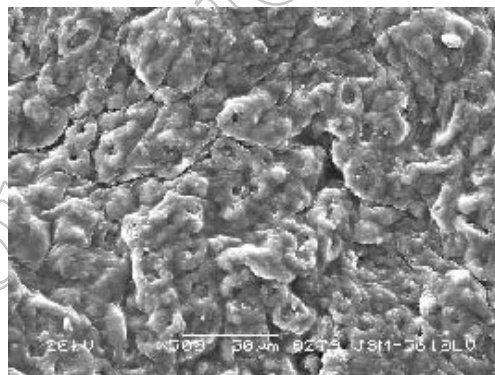


图 4 HA/PDLLA 浸泡 12 周后断面的 SEM 照片

Fig. 4 SEM image of cross-section of HA/PDLLA soaked for 12weeks

密, 界限变得模糊, 两者之间有纤维组织相连, 组织部分表面有细胞出现, 同时有 HA 粒子在表面附着(图 5(b)); 12 周时可以看到植入的 HA/PDLLA 复合材料与骨组织进一步结合, 两者已没有清晰的分界线(图 5(c)); 植入 24 周后, HA/PDLLA 复合材料与组织之间已经没有界限, 骨组织与材料直接联结(图 5(d)).

植入 3 周时, 纯 PDLLA 材料与组织之间连接不如 HA/PDLLA 复合材料组结合紧密, 界面明显, 几乎没有纤维连接(图 6(a)); 6 周后, PDLLA 与组织之间界限也变得模糊, 组织表面可以看到大量的纤维结缔组织, 对材料进行包裹(图 6(b)); 12 周时, PDLLA 与组织间结合较为紧密, 但是仍可以看到界限, 靠近组织的材料也出现了大量大小不一的孔隙(图 6(c)); 24 周后, PDLLA 界面出现断裂, 可能是由于内部材料降解过快, 导致材料形成了壳状结构, 膨胀时受组织的反作用力而塌陷, 从而导致界面的断裂(图 6(d)).

HA/PDLLA 复合材料植入体内 3 周后, HA 颗粒均匀分布, 材料表面比较粗糙, 有大小不等的孔

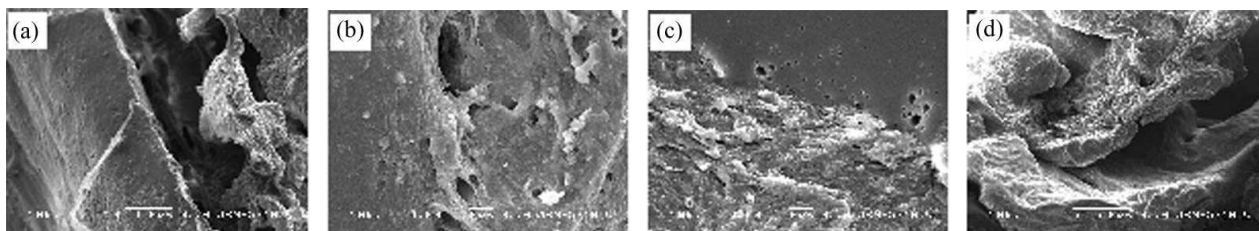


图 5 HA/PDLLA 复合材料植入体内后与骨组织间界面的 SEM 观察

Fig. 5 SEM images of the interface between bone and HA/PDLLA implanted for various time

(a) 3w; (b) 6w; (c) 12w; (d) 24w

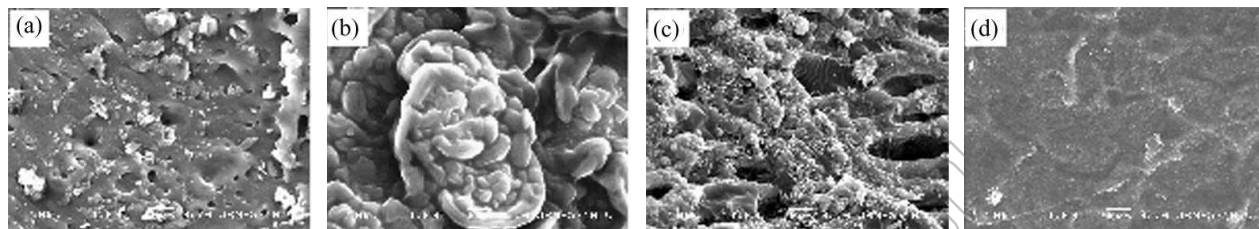


图 6 纯 PDLLA 植入体内后与骨组织间界面的 SEM 观察

Fig. 6 SEM images of the interface between bone and PDLLA implanted for various time

(a) 3w; (b) 6w; (c) 12w; (d) 24w

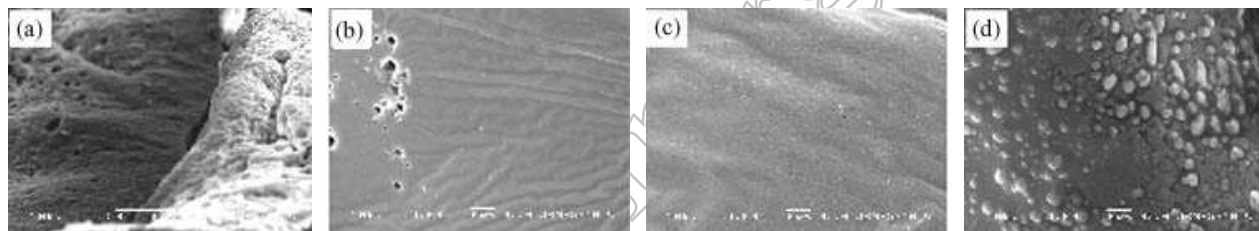


图 7 HA/PDLLA 复合材料植入体内后截面的 SEM 观察

Fig. 7 SEM images of cross-section of HA/PDLLA implanted for various time

(a) 3w; (b) 6w; (c) 12w; (d) 24w

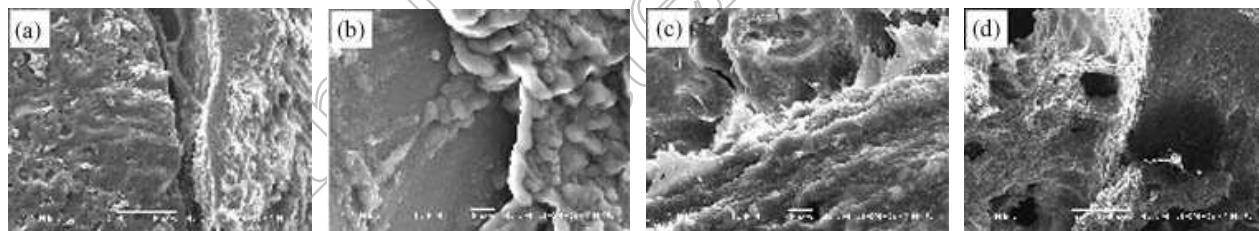


图 8 纯 PDLLA 植入体内后截面的 SEM 观察

Fig. 8 SEM images of cross-section of PDLLA implanted for various time

(a) 3w; (b) 6w; (c) 12w; (d) 24w

隙出现 (图 7(a)); 6 周后, 材料有明显的形变, 表面粗糙, 有不同程度的孔隙和空隙出现 (图 7(b)); 12 周时, HA/PDLLA 表面出现许多较大的空洞, 有大量的 HA 粒子位于空洞之间的材料上 (图 7(c)); 24 周后, HA/PDLLA 复合材料开始断裂, 骨组织向材料内部长入, 靠近材料的组织被降解的低聚物包绕 (图 7(d)). 纯 PDLLA 植入体内 3 周后, 材料上可见大量较小的孔隙 (图 8(a)); 6 周时, PDLLA 远离界面的部位, 内部可以看到大量大小不等的孔隙 (图 8(b)); 12 周时, PDLLA 材料内部降解明显, 存在大量小孔 (图 8(c)); 24 周后, 纯 PDLLA 材料

出现了大量的空隙, 呈明显的不规则形 (图 8(d)).

4 讨论

目前制备致密型 HA/PLA 复合材料主要有熔融共混法、溶剂挥发法、原位聚合法等. 这些方法有着各自的优点, 但容易混入其他化学杂质, 复合不均匀, 复合后 PLA 的分子量不高, 无法批量生产等, 限制了 HA/PLA 的应用^[11]. 为了克服以上方法的缺点, 本文采用液相吸附复合法制备了具有优良力学性能的 HA/PDLLA 复合材料, 避免了 PDLLA

在高温下进行热处理而导致分子量的明显下降, 保证了 HA 超微粉在基体中均匀分散, 这样的超细颗粒有着较大的比表面, 对 PDLLA 的降解性能和力学性能的改善无疑是有利的。

聚乳酸是一种聚酯, 其降解可分为简单水解 (酸碱催化) 降解和酶催化水解降解。从化学角度看, 主要有 3 种方式: ①主链降解生成低聚体和单体; ②侧链水解生成可溶性主链高分子; ③交链点裂解生成可溶性线性高分子。本体侵蚀机理认为聚乳酸降解的主要方式为本体侵蚀, 根本原因是聚乳酸分子链上酯键的水解^[12]。聚乳酸在聚合或降解引入的端羧基对其水解起催化作用, 随着降解的进行, 端羧基量增加, 降解速率加快, 从而产生自催化现象^[13]。

在模拟体液中浸泡时, 前 3 周, 水通过亲水基团或其他分子间作用力靠近聚乳酸。在这一阶段, 聚乳酸的化学结构并不发生变化, 只是聚乳酸链松弛, 其玻璃化转变温度降低, 故在这一阶段, 介质中 pH 值和对应的材料失重率变化不大。在第 3 周至第 7 周阶段, PDLLA 的水化区开始发生酯的水解作用, 链发生断裂, 释放出端 $-COOH$ 和端 $-OH$ 。随着水化部位的增多, 酯水解的部位也在增多, 且随着降解体系中 H^+ 浓度的增大, 酸催化的酯水解速率也在增大, 释放出的 $-COOH$ 也更多。这两种效应共同导致聚乳酸降解过程出现了 pH 值陡降这一过程, 同时材料的失重率也有很大的提高。第 7 周之后随着 PDLLA 链断裂趋势的下降, 释放出的端 $-COOH$ 和端 $-OH$ 浓度变化不大, 使得 pH 降幅减缓。然而由于 PDLLA 断裂后的低分子量线性高分子仍不断溶于降解介质中, 使得材料的失重率继续大幅增加。

对于 HA/PDLLA 复合材料来说, 早期其料表面及表层壳状结构中均匀分布的 HA 颗粒类似一道物理屏障, 可部分阻挡水分子向材料本体的扩散和减慢降解产物的释放速度^[14], 从而使得 HA/PDLLA 的降解速度要慢于纯 PDLLA。随着聚合物的进一步降解, pH 值下降, HA 颗粒在酸性环境中溶解度逐渐增加, Ca^{2+} 的游离与链端羧基形成离子键, 自由链端羧基浓度减少^[15], 降低了材料内部酸性降解产物的自催化效应及其产生的速度, 使得 HA/PDLLA 浸泡介质的 pH 值明显高于纯 PDLLA。HA/PDLLA 的失重率一直低于纯 PDLLA, PDLLA 在第四周就发生了明显的重量损失, 而 HA 含量为 10% 的复合材料在第 7 周才出现明显的重量损失。这说明 HA 不仅对 PDLLA 周围 pH 值下降有一定的缓冲作用, 而且可使材料的降解速度减慢;

其一方面可以提高材料的强度维持时间, 另一方面也可避免短期内大量降解产物的释放, 提高了材料的生物相容性。调节 HA 含量, 有可能获得不同降解性能的 HA/PDLLA 复合材料。

一般来说, 材料在体内的降解有两个途径: 一方面是体液的水解作用; 另一方面是由于细胞的介导作用。对于 PDLLA 来说, 水解是在体内最主要的降解机制, 此外体内细胞、酶、机械应力等因素对材料降解过程也有明显影响, 因此降解快于体外。由于 HA 颗粒与 PDLLA 基体之间无化学键连接, 因此表面基质的降解, 必然伴有表面 HA 颗粒的脱落。反之, HA 颗粒脱落后在材料表面遗留的孔隙, 可以使水分子进入材料的内部, 继续进行水解作用。SEM 实验结果可以看到, HA 颗粒从材料表面脱落后, 成纤维细胞向组织内长入, 并伴有少量新生骨痂的形成, 显示 HA/PDLLA 复合材料具有一定的成骨性和骨连接性。由于 PDLLA 这类高分子材料的降解特性, 所以通常先吸收大量的水, 然后进行膨胀, 自内部进行降解, 表面虽然也有降解, 但数量较少, 所以不能按照常规的生物降解材料的降解规律进行评价, 而主要需要观察其界面的变化情况和对组织的影响。在 HA/PDLLA 组中早期时, 界面很清楚, 随着时间的推移, 界面逐渐变得模糊, 直到 24 周时完全看不清楚界限。虽然 PDLLA 体内降解较快, 但由于与 HA 复合, 加强了其力学强度, 延缓了降解速度。在 24 周时, 可以看到有组织长入材料, 与 PDLLA 组相比较, 复合材料组几乎没有炎性渗出液, 材料仍然可以维持棒状的形状, 但材料中心已经发生了降解, 因为受到骨组织的反作用力, 还没有降解的壳状外壳向中心塌陷, 仍有一定的强度。由此可见, HA/PDLLA 可以保证在体内一定时期内力学性能的保持, 并被机体持续吸收利用。PDLLA 组降解较快, 6 周时材料就出现了较大程度的降解, 导致材料上出现了大量的空洞; 24 周时, PDLLA 已经坍塌, 呈胶状覆盖于材料上, 已经不能维持结构形态, 即已经完全不具备力学性能, 但未降解完全的产物仍然堆积在骨缺损处, 产生的酸性代谢物质使得组织产生无菌性炎症, 表现大量的炎性渗出液。由此可知, 由于过快降解导致酸性代谢产物的沉积, 使得组织中存在着较多的炎症细胞, 从而延缓了骨组织的正常代谢, 使得骨组织的愈合延缓。因此, HA/PDLLA 复合材料可以减少或避免无菌性炎症的发生, 避免早期过多的力学损失, 这对于骨折患者早期的愈合是有益的。

5 结论

采用液相吸附法可以使 HA 在 PDLA 基体中均匀分散. 制备的 HA/PDLA 复合材料具有一定的成骨性和骨连接性, 其表面均匀分布的 HA 颗粒类似一种物理屏障, 可减慢水分子等降解介质的进入和降解产物的释放速度, 减少或避免无菌性炎症的发生, 并提高材料的力学性能. 复合材料的降解速度减慢, 一方面可以提高材料的强度维持时间及生物相容性, 另一方面也可避免短期内大量降解产物的释放引起的骨愈合的延迟. 就比较而言, HA/PDLA 复合材料更适合应用于临床的可吸收内固定材料, 可保证松质骨骨折正常愈合, 是一种有发展前途的可吸收内固定材料.

参考文献

- [1] Kumar N, Majeti N V, Domb A J. *Advance Drug Delivery Reviews*, 2001, **53**: 23–44.
- [2] Jacobsen S, Fritz H G, Degee P. *Industrial Crops and Products*. 2000, **11**: 265–275.
- [3] Kricheldorf H R. *Chemosphere*, 2001, **43**: 49–54.
- [4] Pistner H, Stallforth H, Gutwald R, *et al.* *Biomaterials*, 1994, **15** (6): 439–450.
- [5] 周大利, 杨为中, 尹光福, 等 (ZHOU Da-Li, *et al.*). 无机材料学报 (Journal of Inorganic Materials), 2005, **20** (1): 105–111.
- [6] Yuan H, Li Y, Yang Z, *et al.* *Biomed. Eng. Appli. Basis. Com.*, 1997, **9**: 274–278.
- [7] Suchanek W, Yoshimur A M. *J. Mater. Res.*, 1998, **13** (1): 94–117.
- [8] 郑学斌, 季琦, 黄静琪, 等 (ZHENG Xue-Bin, *et al.*). 无机材料学报 (Journal of Inorganic Materials), 2006, **21** (3): 764–768.
- [9] Hile D D, Doherty S A, Trantolo D J. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2004, **71** (1): 201–205.
- [10] McManus A J, Doremus R H, Siegel R W, *et al.* *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 2005, **72** (1): 98–106.
- [11] Gogolewski S, Maini-Varlet P. *Biomaterials*, 1997, **18** (3): 251–255.
- [12] Schwach G, Vert M. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999, **25**: 283–291.
- [13] Heidemann W, Jeschkeit-Schubbert S, Ruffieux K, *et al.* *Biomaterials*, 2002, **23** (17): 3567–3574.
- [14] Furukawa T, Matsusue Y, Yasunaga T, *et al.* *Biomaterials*, 2000, **21** (9): 889–898.
- [15] Cai K, Yao K, Lin S, *et al.* *Biomaterials*, 2002, **23** (4): 1153–1160.