

基于 Micro-CT 不同多孔结构陶瓷支架的建模 及其贯通性与液流分布分析

罗品风^{1,2}, 智伟¹, 张静微¹, 匙峰¹, 段可^{1,2}, 汪建新¹, 鲁雄¹, 翁杰¹

(1. 西南交通大学, 材料先进技术教育部重点实验室, 材料科学与工程学院, 成都 610031; 2. 淮阴工学院, 江苏省介入医疗器械研究重点实验室, 淮阴 223003)

摘要: 贯通性是骨组织工程支架的重要参数, 决定包含蛋白和细胞的体液渗入和组织生长。本研究采用 Micro-CT 技术对三种不同工艺(球粒堆积、蜡球造孔、纤维堆积)构建的羟基磷灰石多孔支架进行断层扫描, 并从三方面研究支架的贯通性: (1)通过影像重建定量分析支架孔隙的三维贯通结构; (2)统计分析比较三种支架在贯通方向上的孔隙率变化; (3)有限元模拟支架的内部液流分布情况。结果表明, 球粒堆积支架与蜡球造孔支架孔隙率分布较均匀, 而纤维堆积支架孔隙分布较杂乱。液流模拟(流速分布)发现, 球粒堆积支架与蜡球造孔支架中液体流动均匀, 但是蜡球造孔支架孔壁近表面区域存在大量“漩涡流”, 不利于支架内细胞与液流之间的物质交换, 该结果有可能解释球粒堆积支架体内成骨性优于蜡球造孔支架的动物体内实验结果。

关键词: 组织工程支架; 结构图像重建; 孔隙贯通性; 计算机建模; 流速分布

中图分类号: R318 文献标识码: A

Interconnectivity of Bioceramic Scaffolds with Different Porous Structures and Their Fluid Velocity Distribution Analyzed by Micro-CT Computer Modeling

LUO Pin-Feng^{1,2}, ZHI Wei¹, ZHANG Jing-Wei¹, SHI Feng¹, DUAN Ke^{1,2},
WANG Jian-xin¹, LU Xiong¹, WENG Jie¹

(1. Key Laboratory of Advanced Technologies of Materials, Ministry of Education, School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 2. Jiangsu Provincial Key Laboratory for Interventional Medical Devices, Huaiyin Institute of Technology Huaiyin 223003, China)

Abstract: Pore interconnectivity is a key parameter for bone tissue engineering scaffolds, which controls penetration of body fluid with proteins and cells, and tissue ingrowth. The present study investigated the porous characteristics of hydroxyapatite (HA) scaffolds prepared *via* three processes (HA sphere packing, wax sphere-leaching and HA fiber aggregation) by micro-computed tomography (μ CT) from following three procedures: (1) modeling of the porous structure by image reconstruction; (2) analysis of porosity along longitudinal direction; and (3) simulation of fluid flow across the scaffold by finite element analysis (FEA). Image analyses revealed that, the scaffolds prepared by the above two methods featured relatively regular porosity distributions, whereas that by HA fiber aggregation had an irregular distribution. Fluid velocity distribution by FEA suggested that scaffolds prepared by HA sphere packing and wax

收稿日期: 2014-04-16; 收到修改稿日期: 2014-06-03

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划, 2012CB933600); 国家自然科学基金(51172188); 四川省科技支撑计划(2010FZ0048)

National Basic Research Program of China (973 Program, 2012CB933600); National Nature Science Foundation of China (51172188); Science and Technology Pillar Project of Sichuan (2010FZ0048)

作者简介: 罗品风(1986-), 男, 硕士研究生. E-mail: hack1024@163.com

通讯作者: 翁杰, 教授. E-mail: jweng@swjtu.edu.cn

sphere leaching readily allowed penetration of fluid due to their favorable pore interconnectivity. The fluid velocity vector distribution predicted that circular flows dominated near the pore wall in the scaffold prepared by wax sphere leaching. These circular flows may impede the material exchange between cells attached to the pore wall and the body fluid, which may illustrate that the inferior *in vivo* osteogenic activity of scaffolds prepared by wax sphere leaching when compared with those produced by HA sphere packing.

Key words: tissue engineering scaffolds; structure image reconstruction; interconnectivity; computer modeling; fluid velocity distribution

支架作为骨组织工程三要素之一, 不仅为骨缺损修复提供力学支撑, 而且为细胞迁移和生长提供适宜的微环境。支架的孔隙参数如孔隙率、孔径大小及分布、比表面积和贯通性等决定了骨支架的生物学及力学性能^[1-3], 不仅反映了支架的制备工艺, 而且会影响细胞在其中粘附及生长。高孔隙和高比表面积的结构, 利于种植过程中细胞的粘附和铺展^[4], 而过高的孔隙率又会导致支架的力学强度不足, 影响材料的力学性能及降解速率与组织再生间的平衡^[5-6]。此外, 流体流经不同贯通结构时流场分布各异, 从而影响支架内氧气、养料的供给和废物的排出, 并最终影响新生组织的形成^[7]。

目前对支架内部孔隙结构分析的方法主要有: 理论计算法、扫描电镜(SEM)分析、压汞法、气体吸附法等^[8]。理论计算法常用于快速成型支架^[9], 其他支架孔隙结构复杂且外围线性尺寸不规则而较少采用此方法。SEM方法在一定程度上弥补了理论计算法的不足, 但该方法表征内部孔隙时必须先对材料进行切割, 容易造成孔隙边缘的破损影响结果的精度^[8], 同时, 也难于进行孔隙结构的深度分布剖析。压汞法和气体吸附可以测得孔径大小以及其分布, 但无法获取截面信息、支架壁厚和表面形貌等^[8], 从安全及环保角度, 压汞法也不是首选的检测手段。而且, 以上方法都是基于孔隙及其形貌的研究, 还没有一种方法能够有效地评价多孔支架的贯通性。

Micro-CT 是一种精确且高效的无损检测方法, 通过 X 射线对样品的断层透射扫描获取一系列断面点阵图像, 点阵像素的灰度值对应材料的密度值^[10-11]。本研究选取三种不同结构的支架, 借助计算机重建支架材料及孔隙的三维结构, 分析孔隙形貌、孔隙率随高度方向的变化以及孔隙间的流动样式, 从而实现对骨支架内部孔隙贯通性的评价及流场分布分析。

1 骨支架及其孔隙三维模型的重建

1.1 材料的准备与 Micro-CT 扫描

选取的三种羟基磷灰石支架(球粒堆积支架、蜡

球造孔支架、纤维堆积支架)在前期实验中已经取得了良好的生物学评价^[12-17], 采用标本型 Micro-CT (μ CT80; Scanco Medical, Zürich, Switzerland)对三个样本包埋体进行薄层扫描, 其中球粒堆积支架: 232 层; 蜡球造孔支架: 318 层; 纤维堆积支架: 232 层, 分辨率均为 10 μ m, 层距均为 10 μ m。

1.2 三维贯通结构重建与宏孔表面形貌分析

Micro-CT 扫描原图数据量较大, 直接建模不仅增加计算机负荷, 而且大量噪点还会影响模型重建的精度。借助 Photoshop CS4 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA)中灰度值识别的方法区分材料部分与宏孔孔隙部分。处理过程如图 1 所示。

在软件 Mimics 10.0 (Materialise Inc, Plymouth, MI, USA)中导入处理后的图片, 设置软件参数并叠加二维图像, 经过圆滑过度处理后完成三维贯通结构的重建, 可直观地观察贯通结构的特点与表面形貌(图 2)。观察放大后各支架的表面形貌, 球粒堆积支架表面具有大量凹凸不平的点, 蜡球造孔支架表面较为光滑, 纤维堆积支架具有沿轴向的线性条纹。

1.3 支架三维孔隙结构构建

支架内部孔隙及其多孔结构错综复杂, 建立孔隙三维模型以观察支架宏孔的形状、贯通性及孔隙空间分布情况等。如图 3 所示, 为避免边缘破损对孔隙模型的影响, 在 Photoshop CS4 中选取略小于材料的圆形区域进行反相运算, 使得孔隙部分变为

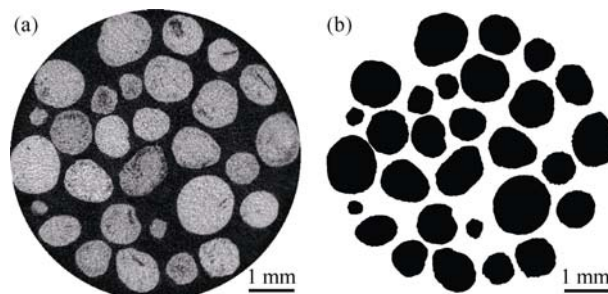


图 1 Micro-CT 断层图像边缘查找与填充处理: Micro-CT 原始图像(a)和处理后图像(b)

Fig. 1 Illustration of edge detection and region filling in image analysis for scaffold structure reconstruction: original image by micro-CT (a), image after region filling (b)

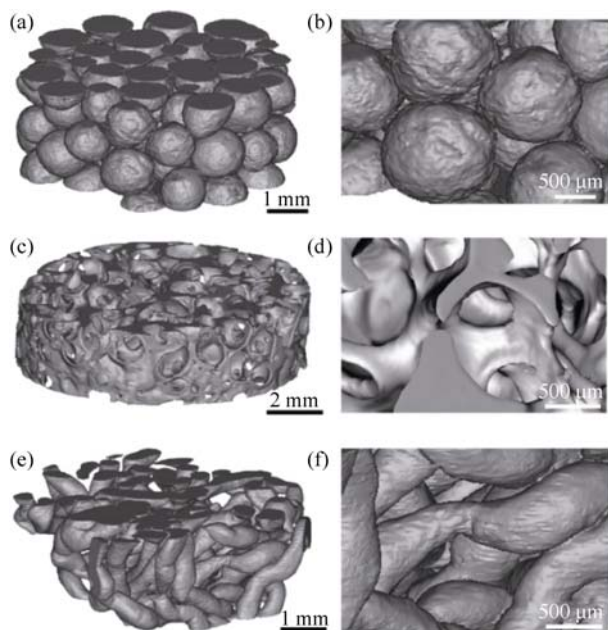


图 2 球粒堆积支架(a、b)、蜡球造孔支架(c、d)及纤维堆积支架(e、f)的三维重建模型(左)及其表面形貌(右)

Fig. 2 Reconstructed 3D models (left) revealing interconnected structures and surface morphologies (right) of scaffolds prepared by HA sphere packing (a, b), wax sphere leaching (c, d) and HA fiber aggregation (e, f)

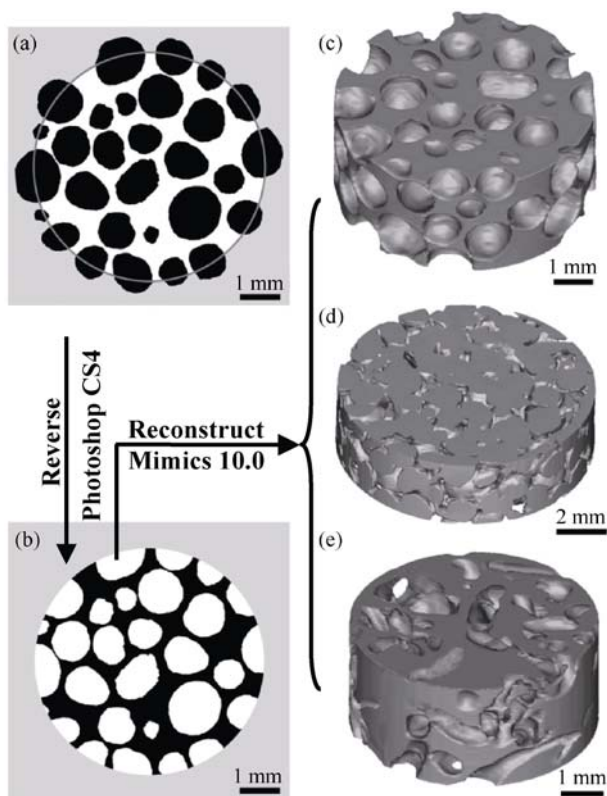


图 3 灰度反相处理断层图像分离支架内孔隙区域(a、b); 反相处理后重建三维模型显示球粒堆积支架(c)、蜡球造孔支架(d)和纤维堆积支架(e)的内部孔隙结构

Fig. 3 Illustration of grayscale reverse processing for recognition of pore space in a scaffold (a, b), and visualization of pore spaces in scaffolds prepared by HA sphere packing (c), wax sphere leaching (d) and HA fiber aggregation (e)

黑色, 在 Mimics 10.0 中识别黑色像素重建即可获得孔隙结构的三维模型。图中, 球粒堆积支架与蜡球造孔支架孔径大小均匀, 球形度高, 孔隙分布较为均匀, 且形成互补结构。我们前期动物体内植入实验曾研究过这两种互补结构体内异位成骨的差异性^[17]。纤维堆积支架形成的孔隙比较杂乱, 在纤维堆积过程中存在局部分布过密与过疏现象。从模型孔隙结构初步判断, 球粒堆积支架与蜡球造孔支架孔隙形态及其空间分布沿纵向规则变化, 贯通性更佳。

2 多孔支架宏孔孔隙评价

对支架各层面的宏孔孔隙率的计算统计, 不仅能评估支架的宏孔孔隙率, 更能获取孔隙率随特定方向的变化曲线, 为研究支架孔隙分布规律及贯通实验提供理论依据。

区分原始扫描图片的材料区域与孔隙区域(图 1), 导入 ImageTool 3.0 (University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA)中二值化处理, 统计孔隙像素 S_{pi} , 支架外圆截面总像素数量 S_{ti} , 如公式(1)计算高度为第 i 层时的截面孔隙率 P_i , 如公式(2)对各个截面宏孔孔隙率取算术平均值, 可以得到支架的平均宏孔孔隙率 P_{ma} (表 1)。

$$P_i = S_{pi} / S_{ti} \quad (1)$$

$$P_{ma} = \sum_{i=1}^n P_i / n \quad (i=1, 2, 3 \dots) \quad (2)$$

将 P_i 导入到 Origin 9.0 (Microcal Software, Northampton, MA, USA)中绘制曲线, 可获得截面层孔隙率沿高度方向的变化曲线, 以球粒堆积最大截面为起始面。如图 4 中, 球粒堆积支架孔隙率变化曲线(a)从最小开始, 增加到球粒堆积截面积最小而孔隙率最大, 孔隙率再随球粒堆积截面积增大而减小, 变化幅度在 35.9%~45.2%区间, 呈现出类正弦变化趋势; 蜡球造孔支架孔隙率变化曲线(b)正好与球粒堆积支架的曲线相反, 呈现余弦变化趋势, 变化幅度在 60.4%~64.3%之间。蜡球制孔支架孔隙率变化幅度小于球粒堆积支架是由于前者在制孔过程中施加应力, 以增大蜡球间接触面提高支架的贯通性。

表 1 三种不同工艺制备的 HA 支架的平均宏孔孔隙率
Table 1 The average macro-porosity of three different HA scaffolds

Scaffold	Average macro-porosity
HA sphere packing	40.17%
Wax sphere leaching	62.23%
HA fiber aggregation	30.34%

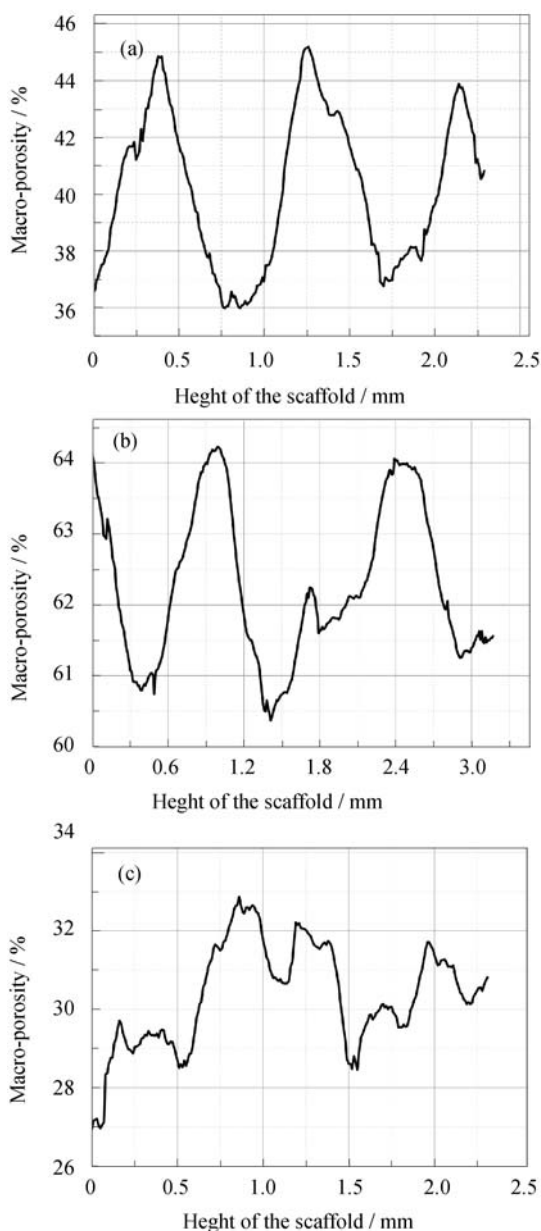


图 4 球粒堆积支架(a)、蜡球造孔支架(b)和纤维堆积支架(c)沿高度方向(轴向)的宏孔孔隙率变化趋势

Fig. 4 Variation along with the height direction (longitudinal) of scaffolds prepared by HA sphere packing (a), wax sphere leaching (b), and HA fiber aggregation (c)

纤维堆积支架孔隙率变化曲线(c)呈现无序分布, 其孔隙率较低(26.8%~32.8%), 表明纤维堆积过程的无规律性。

通过对孔隙率定向分布的分析, 可以获取孔隙率在该方向的极值, 极小值过低时会导致贯通性能不足^[19], 当支架植入体内, 生理环境将会影响支架内体液的流动性, 从而影响细胞粘附和组织生长等生命过程。

3 骨支架流动仿真

如图 3 中所示, 球粒堆积支架(c)与蜡球造孔支

架(d)形成的孔隙呈现近似互补结构: 球粒堆积孔隙由外周为球形“凸面”组成, 球粒之间的点接触保证其良好的连通性; 蜡球造孔孔隙由外周为球形“凹面”组成, 凹面间通过贯通孔连接, 支架制备过程中蜡球与蜡球之间的粘连数量和接触面积决定其连通性^[15]。由各截面层中平均宏孔孔隙率结果(表 1)可知, 蜡球造孔支架的平均宏孔孔隙率比球粒堆积支架高 22.06%, 但二者孔隙空间分布都比较均匀, 贯通性也较好。

为了研究这种互补结构对于成骨作用影响, 王灏等^[17]采用两种支架进行动物体内植入实验, 经过 1、3 及 6 个月后, 组织学分析表明, 前期蜡球造孔支架内蛋白以及细胞数量较多, 而球粒堆积支架在培养后期成骨性能优于蜡球造孔支架, 并指出这是由于球粒堆积支架的流动性能优于蜡球造孔支架, 但未对这种流动优越性做定量分析。采用商用有限元流体分析软件 Fluent 6.3 (ANSYS, Canonsburg, PA, USA)模拟液流在支架内的贯流, 分析其内流场分布, 为研究支架内贯通性提供参考, 也是对于前期动物实验的补充。鉴于纤维堆积支架中孔隙的分布较杂乱(图 3), 单层的孔隙模型不具有代表性, 因此未进行液流分析比较。

3.1 流体模型的建立

Micro-CT 数据为高度方向的法向平面, 根据图 4 选取最接近平均宏孔孔隙率的两组截面为蓝本。将 Photoshop CS4 提取的支架边缘并导入 AutoCAD 2007 (AutoDesk, Sausalito, CA, USA)中, 如图 5 所示建立二维流动模型, 在边缘上方 1 mm 和下方 1 mm 处设立流体入口和出口, 贴近边缘(< 0.001 mm)的左右两侧设立壁面, 这样既能保证入口和出口的缓冲, 也能防止液体从侧面的流失, 以提高计算结果的准确性。应用 Gambit 2.4 (ANSYS, Canonsburg, PA, USA), 对两组模型划分网格并定义边界类型, 入口: velocity-inlet, 出口: pressure-outlet, 其余: wall^[18]。

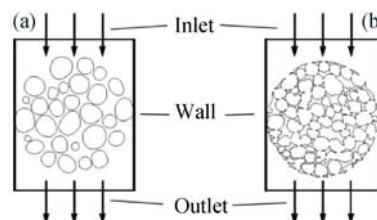


图 5 有限元模拟液流流经球粒堆积支架(a)蜡球造孔支架(b)的模型

Fig. 5 Schematic showing model used in finite-element simulation of fluid flow across scaffolds prepared by HA sphere packing (a) and wax sphere leaching (b)

3.2 模型流动仿真

将两组网格导入到 Fluent 6.3 中检查网格质量后进行液流模拟, 定义液流的物理性质为血液(粘度为 $0.033 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, 密度为 1050 kg/m^3), 设置支架入口速度为 0.01 m/s ^[18]。

由于网格划分比较细, 选取分离形求解器进行隐式求解, 得到支架内部流动的速度分布云图(图 6), 图中白色部分为支架材料部分, 液流贯穿区域中根据灰度值划分了 20 个速度区间, 灰度值越高(颜色越淡)代表速度越高。从液流流速分布情况可知, 这两种支架的贯通性都较好, 液体能很好的贯穿流经整个支架内部, 两者最高流速十分接近: $V_{\text{堆积}} = 0.126$; $V_{\text{造孔}} = 0.128$ 。从高速流相对支架材料壁面的分布上可分析两者间的区别: 球粒堆积支架中, 高速流动从球与球之间的狭缝延伸到材料“凸面”两侧, 整个支架中的流场分布中出现的低速流场(颜色较暗)较少; 而蜡球造孔支架中高速流主要集中在两个贯通孔之间, 高速流两侧靠近材料“凹面”区域有大量低速流场。为了研究这种低速流场的本质, 图 7 为局部速度矢量图, 白色流动区域内箭头方向代表速度方向, 箭头大小代表速度大小(同一幅图内箭头越大速度越快), 灰色填充区域为支架材料。由图可知, 这种低速流场并非流动静止, 而是低速自循环的“漩涡流”, 且流速由“漩涡”外圈向中心递减, 中心速度接近 0 m/s 。这两种支架“漩涡流”所处的区域也不同: 球粒堆积支架“漩涡流”一般位于“Y”型合流区域上方, 大部分的材料壁面被高速流所环绕; 而蜡球造孔支架中“漩涡流”分布在高速

速流两侧, 使得高速流与材料表面相互隔离。

这种“漩涡流”的存在一方面耗散了流动的动力^[19], 增加了流体流入支架中心的阻力; 另一方面贴近壁面的自循环流动, 在承载养料的高速流体和材料表面细胞之间树立了一道障碍, 不利于代谢物质的交换。因此, 前期动物实验中^[17], 具有更高的孔隙率及比表面积的蜡球造孔支架, 虽然在前期更利于蛋白以及细胞的粘附与生长, 但当材料内细胞增殖到某一临界值时, 细胞日益增长的物质交换需求被“漩涡流”所阻碍, 致使其新骨成形的速度会减缓甚至停止。综上, 评价支架孔隙结构时, 还应考虑不同孔隙结构中高低速流场及“漩涡流”的分布。

4 结论

1) 利用像素区分的方法可以快速、精确的建立支架材料及其孔隙的三维模型。通过观察模型可获知宏孔的形貌及孔隙分布的均匀等。

2) 利用分层像素统计的方法可以计算并绘制支架孔隙率定向分布曲线。通过曲线识别孔隙率高或过低区域, 获取整体材料的平均宏孔孔隙率。

3) 利用有限元的方法可以分析孔隙内流场的分布。通过速度云图判断整个区域内高速流场与低速流场的位置分布, 从速度矢量图发现“漩涡流”的存在不仅会耗散流体动能, 影响流体贯流效应, 贴近壁面的“漩涡流”还会阻止细胞的物质交换, 从而影响支架最终的成骨表达。

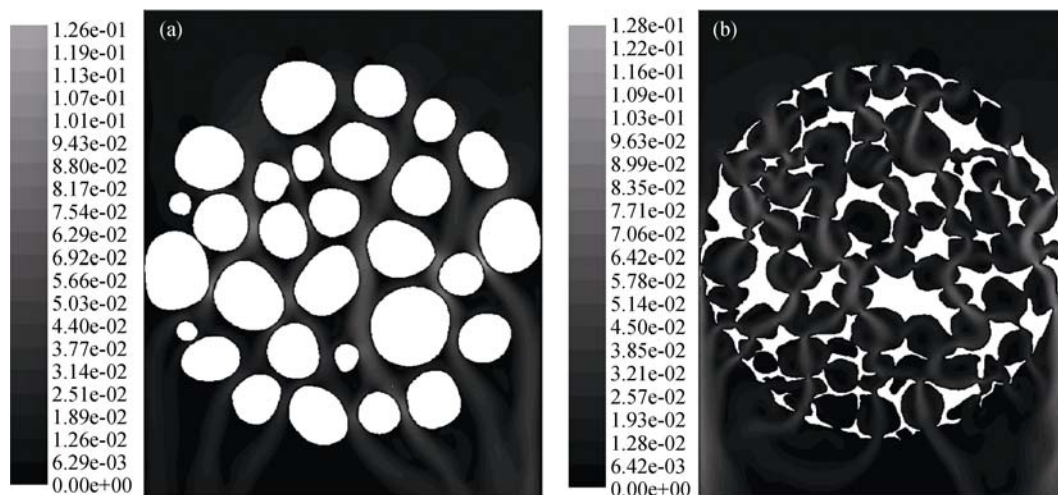


图 6 有限元模拟液流流经球粒堆积支架(a)及蜡球造孔支架(b)孔隙的速度分布云图

Fig. 6 Velocity contours of fluid flow across scaffolds prepared by HA sphere packing (a) and wax sphere leaching (b) calculated by finite-element simulation

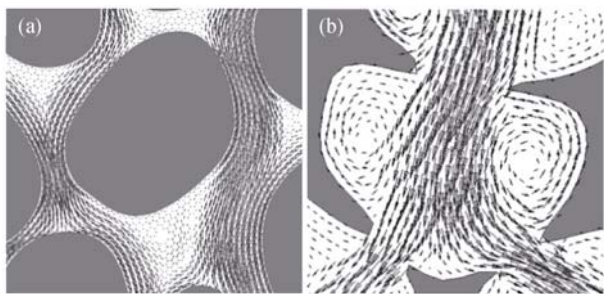


图7 有限元模拟血液流经球粒堆积支架(a)及蜡球造孔支架(b)孔隙的局部速度矢量图

Fig. 7 Velocity vector graphs of fluid flow across scaffolds prepared by HA sphere packing (a) and wax sphere leaching (b) calculated by finite-element simulation; (b: notice circular flows near pore wall)

参考文献:

- [1] HABIBOVIC P, YUAN H, VANDER VALK C M, *et al.* 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*, 2005, **26**(17): 3565–3575.
- [2] CORDELL J M, VOGL M L, WAGONER J A J. The influence of micropore size on the mechanical properties of bulk hydroxyapatite and hydroxyapatite scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2009, **2**(5): 560–570.
- [3] SOBRAL J M, CARIDADE S G, SOUSA R A, *et al.* Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency. *Acta Biomaterialia*, 2011, **7**(3): 1009–1018.
- [4] DAR A, SHACHAR M, LEOR J, *et al.* Optimization of cardiac cell seeding and distribution in 3D porous alginate scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, **80**(3): 305–312.
- [5] ANG K C, LEONG K F, CHUA C K, *et al.* Investigation of the mechanical properties and porosity relationships in fused deposition modelling-fabricated porous structures. *Rapid Prototyping Journal*, 2006, **12**(2): 100–105.
- [6] SUNG H J, MEREDITH C, JOHNSON C, *et al.* The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials*, 2004, **25**(26): 5735–5742.
- [7] BJERRE L, BÜNGER C, BAATRUP A, *et al.* Flow perfusion culture of human mesenchymal stem cells on coralline hydroxyapatite scaffolds with various pore sizes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2011, **97**(3): 251–263.
- [8] HO S T, HUTMACHER D W. A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials*, 2006, **27**(8): 1362–1376.
- [9] PELTOLA S M, MELCHELS F P, GRIJPMAN D W, *et al.* A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Annals of Medicine*, 2008, **40**(4): 268–280.
- [10] RENGHINI C, KOMLEV V, FIORI F, *et al.* Micro-CT studies on 3-D bioactive glass–ceramic scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 2009, **5**(4): 1328–1337.
- [11] PEYRIN F. Evaluation of bone scaffolds by micro-CT. *Osteoporosis International*, 2011, **22**(6): 2043–2048.
- [12] LIANG L F, WENG J. Artificially controlling of inner structure to porous hydroxyapatite ceramic by using solidified coated fibers. *Materials Letters*, 2006, **60**(29): 3569–3572.
- [13] PENG Q, LIANG L F, HUANG P, *et al.* A novel porous bioceramics scaffold by accumulating hydroxyapatite spherules for large bone tissue engineering *in vivo*. I. Preparation and characterization of scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010, **93**(3): 920–929.
- [14] GUO LAI-YANG, ZHANG JING-WEI, ZHAO JING, *et al.* Preparation and characterization of porous scaffolds with favourable interconnectivity. *Journal of Inorganic Materials*, 2011, **26**(1): 17–21.
- [15] ZHAO JING, LI JIN-YU, ZHI W, *et al.* Preparation and optimization of porous hA ceramic scaffolds by wax spheres leaching method. *Journal of Inorganic Materials*, 2013, **28**(1): 74–78.
- [16] ZHI W, ZHANG C, DUAN K, *et al.* A novel porous bioceramics scaffold by accumulating hydroxyapatite spherulites for large bone tissue engineering *in vivo*. II. Construct large volume of bone grafts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, in press (DOI: 10.1002/jbm.a.34919)
- [17] WANG H, ZHI W, LU X, *et al.* Comparative studies on ectopic bone formation in porous hydroxyapatite scaffolds with complementary pore structures. *Acta Biomaterialia*, 2013, **9**(9): 8413–8421.
- [18] DENG PING-PING. Numerical Analysis of Microfluid State and Deformation of Bone Tissue Engineering Scaffolds. Qinghuangdao, Hebei, 2011: 5.
- [19] 孔祥. 粘性流体力学. 北京: 高等教育出版社, 1983: 59–120.