

文章编号: 1000-324X(2006)02-0427-06

## 磷灰石 - 硅灰石 / $\beta$ - 磷酸三钙复合多孔支架材料的 制备和表征

肖 斌<sup>1</sup>, 周大利<sup>1</sup>, 杨为中<sup>1</sup>, 欧 俊<sup>1</sup>, 唐艳娟<sup>2</sup>, 陈槐卿<sup>2</sup>

(1. 四川大学材料科学与工程学院, 成都 610064; 2. 四川大学生物医学工程研究室, 成都 610041)

**摘 要:** 以磷灰石 - 硅灰石玻璃陶瓷 (AW) 粉和  $\beta$ - 磷酸三钙 ( $\beta$ -TCP) 粉为原料, 以硬脂酸为致孔剂. 经模压成型、1170°C 烧结制备磷灰石 - 硅灰石 / $\beta$ - 磷酸三钙复合多孔支架材料 (AW/ $\beta$ -TCP). 采用 X 射线衍射 (XRD)、扫描电镜 (SEM)、能谱 (EDS)、诱导耦合等离子体原子发射光谱 (ICP-AES) 等方法分析支架的晶相组成、显微结构、物理性能、生物活性和降解性. 将大鼠骨髓间充质干细胞 (rMSCs) 与支架体外复合培养评价支架的生物相容性. 结果表明: 所制备的 AW/ $\beta$ -TCP 支架材料的抗压强度达 14.3MPa. 孔隙率达 66.9%. 孔径为 100~700 $\mu$ m. 具有良好的生物相容性、生物活性和降解性. 可作为骨组织工程支架的候选材料.

**关 键 词:** 磷灰石 - 硅灰石;  $\beta$ - 磷酸三钙; 支架材料; 骨组织工程

**中图分类号:** R 318, TB 332 **文献标识码:** A

### 1 引言

生物玻璃和生物玻璃陶瓷由于具有骨结合能力, 作为生物活性材料已经应用于临床. 这些材料的一个共同点是当被浸泡在模拟体液中, 有一羟基磷灰石 (HA) 层在其表面形成, 而材料的内部没有变化. 当材料被植入体内, 材料与骨的结合也只发生在材料表面. 为了促进新骨长入材料, 材料应具有合适的多孔结构, 但是, 多孔材料的力学性能较低. 解决这个问题就是设计致密的生物活性材料, 当其被植入后, 能原位形成多孔结构. 这就需要材料至少含有两相, 一为生物活性相, 一为可降解吸收相<sup>[1]</sup>.

基于此想法, De Aza<sup>[1,2]</sup> 等开发了一种名为 Bioeutectic<sup>®</sup> 的复合陶瓷, 该材料是硅灰石 - 磷酸三钙体系的共熔组分在共熔温度区 (1402 $\pm$ 3°C, 40h) 经过慢固化制备的. 固化后, Bioeutectic<sup>®</sup> 由假硅灰石和  $\alpha$ - 磷酸三钙 ( $\alpha$ -TCP) 两相组成. 当 Bioeutectic<sup>®</sup> 浸泡在 37°C 模拟体液 (SBF) 或人的唾液后, 能在其原位形成多孔结构. 为了使制备更简单可行, 降低能源消耗, Huang<sup>[3]</sup> 等提出了制备硅灰石 / 磷酸三钙复合陶瓷的新方法. 先合成硅酸钙的水化物, 并在原位与  $\beta$ -TCP 混合, 再将反应混合物加热使硅灰石晶化, 经过模压成型、烧结 (1310°C, 2h) 制得. 模拟体液实验表明, 该材料具有高生物活性和原位多孔结构. De Aza 和 Huang 制备的复合陶瓷在原位形成的孔主要由可吸收相 TCP 的降解造成. 孔径 <10 $\mu$ m.

在我们以前的研究<sup>[4]</sup>中, 用溶胶 - 凝胶法制备前驱体粉末, 经高温煅烧 (1250°C) 制备了 AW 生物活性玻璃陶瓷, 用硬脂酸为致孔剂制备了多孔材料, 硬脂酸含量为 30wt% 时,

收稿日期: 2005-04-28, 收到修改稿日期: 2005-09-19

基金项目: 国家 863 高技术计划 (2002AA326080); 教育部教学科研奖励基金 (2002123)

作者简介: 肖 斌 (1980-), 硕士研究生. 通讯联系人: 周大利. E-mail: scuzdl@sohu.com

孔隙率达 48%, 孔径为 300~400 $\mu\text{m}$ , 且孔道相互贯通, 100nm 左右的细晶分布在基体中. 材料基体 AW 玻璃陶瓷含有磷灰石和硅灰石相, 引入磷灰石能提高材料的生物活性<sup>[5]</sup>. 理想的骨组织工程支架材料应该具有三维多孔结构, 具有合适的孔径 (100~500 $\mu\text{m}$ ) 和高的孔隙率<sup>[6]</sup>. 但孔隙率达 75% 以上的 AW 玻璃陶瓷难以满足支架材料的力学性能.

本研究的目的在于在 AW 玻璃陶瓷中引入可降解吸收相  $\beta$ -TCP, 制备磷灰石-硅灰石/ $\beta$ -磷酸三钙 (AW/ $\beta$ -TCP) 复合多孔支架材料, 使支架具有合适的初始力学强度, 随着  $\beta$ -TCP 的降解吸收, 在原位形成孔, 实现支架孔隙率的增加.

## 2 实验

### 2.1 AW/ $\beta$ -TCP 支架的制备

AW 玻璃陶瓷粉体, 按本课题组开发的 sol-gel 法自行制得<sup>[4]</sup>,  $\beta$ -TCP 粉体采用反向包裹沉淀法自行制得<sup>[7]</sup>. 将 AW 和  $\beta$ -TCP 粉体按质量分数 70%:30% 的比例超声搅拌混合制备 AW/ $\beta$ -TCP 复合粉体. 以聚乙烯醇溶液为粘结剂, 以硬脂酸颗粒为致孔剂, 将 AW/ $\beta$ -TCP 复合粉体在 5MPa 下模压成型, 制得直径 5mm、高度 10mm 的圆柱坯体, 经中低温缓慢升温致孔, 1170 $^{\circ}\text{C}$  煅烧 2h 制得 AW/ $\beta$ -TCP 支架材料.

### 2.2 AW/ $\beta$ -TCP 支架的表征

用 X 射线衍射 (XRD) 技术分析 AW/ $\beta$ -TCP 支架的晶相组成; 用扫描电镜 (SEM) 观察支架的显微结构、孔分布; 用万能材料试验机测量支架的抗压强度; 用排水法测量支架的孔隙率和体积密度.

### 2.3 模拟体液浸泡实验

支架经丙酮超声清洗、去离子水淋洗, 干燥后用尼龙线悬挂在 SBF 中. SBF<sup>[8]</sup> 的主要成分与人体血浆的无机成分基本相同. SBF 用三羟甲基氨基甲烷 / 盐酸缓冲溶液调其 pH 值为 7.4. 试样在 36.5 $^{\circ}\text{C}$  的 SBF 溶液中恒温静态浸泡. 在不同的时间点, 用诱导耦合等离子体原子发射光谱 (ICP-AES) 测量 SBF 的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度, 用排水法测量了支架的孔隙率. 浸泡 21d 后, 将支架从 SBF 中取出, 用丙酮和去离子水淋洗, 然后在室温下晾干. 用带能谱 (EDS) 的 SEM 分析浸泡后支架的孔内表面产物的形貌和组成.

### 2.4 体外细胞培养实验

采用 SD 大鼠骨髓间充质干细胞 (rat mesenchymal stem cells, rMSCs) 作种子细胞. rMSCs 按文献<sup>[9]</sup> 方法进行体外培养, 用第 4 代 rMSCs 以  $4 \times 10^6 / \text{cm}^2$  的密度接种于 24 孔板 (内含已高压消毒的硬脂酸含量为 30wt% 的 AW/ $\beta$ -TCP 支架), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度条件下的孵育箱中联合培养. 取出体外培养 7d 的支架, 用戊二醛固定 24h, 酒精系列脱水, 临界点干燥, 表面喷金, 进行 SEM 分析.

## 3 结果

### 3.1 AW/ $\beta$ -TCP 支架的晶相组成

图 1 是 AW/ $\beta$ -TCP 支架的 XRD 谱图, 可以看出, 支架的晶相包括磷灰石、硅灰石和  $\beta$ -磷酸三钙, 表明 AW 粉与  $\beta$ -TCP 粉混合压坯后经 1170 $^{\circ}\text{C}$  煅烧没有发生新的固相反应.

### 3.2 AW/ $\beta$ -TCP 支架的显微结构

图 2 是 AW/ $\beta$ -TCP 支架截面的 SEM 照片, 可以看出支架具有多孔结构, 而且孔之间是相互连通的, 孔径为 100~700 $\mu\text{m}$ .

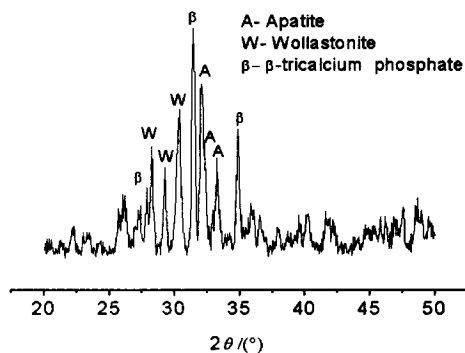
图 1 AW/ $\beta$ -TCP 支架的 XRD 图谱

Fig. 1 XRD pattern of AW/ $\beta$ -TCP composite scaffolds

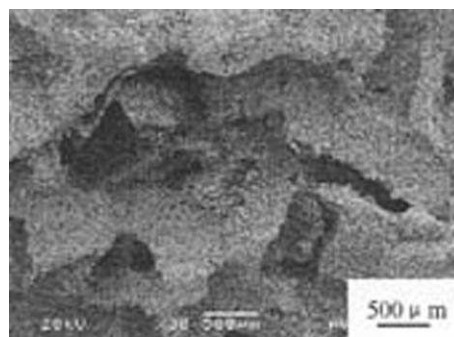
图 2 AW/ $\beta$ -TCP 支架的 SEM 照片

Fig. 2 SEM photograph of AW/ $\beta$ -TCP composite scaffolds

### 3.3 AW/ $\beta$ -TCP 支架的物理性能

表 1 列出了 AW/ $\beta$ -TCP 支架的物理性能, 随着致孔剂硬脂酸含量的增加, 支架的抗压强度下降, 体积密度下降, 而孔隙率增加。

表 1 AW/ $\beta$ -TCP 支架的物理性能Table 1 Physical properties of AW- $\beta$ -TCP composite scaffolds

| $w$ (Stearic acid)/% | Compressive strength/MPa | Density/ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ | Porosity/% |
|----------------------|--------------------------|--|------------|
| 10                   | 43.6                     | 1.52                                   | 55.4       |
| 20                   | 28.0                     | 1.40                                   | 62.0       |
| 30                   | 14.3                     | 1.05                                   | 66.9       |
| 40                   | 9.4                      | 0.86                                   | 76.7       |

### 3.4 AW/ $\beta$ -TCP 支架的生物活性和降解性能

图 3 是 AW/ $\beta$ -TCP 支架在 SBF 中浸泡 21d 后, 从截面观察其孔表面形貌的 SEM 照片. 可以看到有短径为纳米尺寸的蠕虫状白色晶体生成, 对其 (B 处) 进行 EDS 分析, 发现其钙磷摩尔比为 1.684, 与 HA(Ca/P=1.667) 的理论值接近, 表明生成了 HA 晶体.

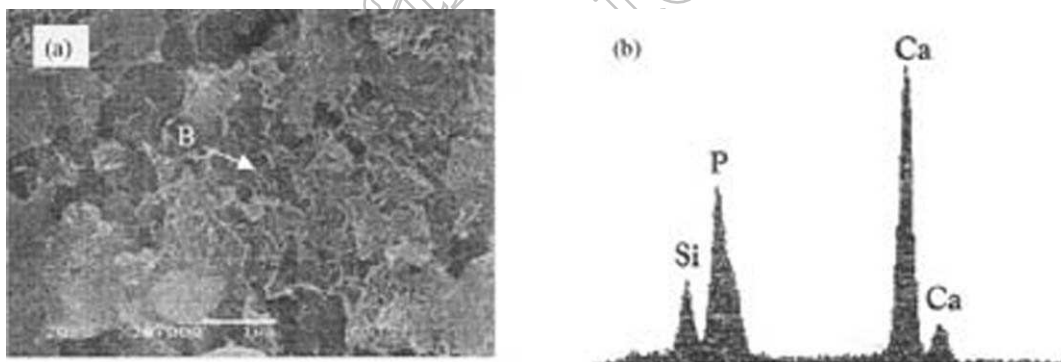
图 3 经 SBF 浸泡 21 天后 AW/ $\beta$ -TCP 支架的孔表面的 SEM 照片 (a) 和 EDS 图谱 (b)

Fig. 3 (a) SEM photograph and (b) EDS spectra of pore surface of AW/ $\beta$ -TCP composite scaffolds after soaking in SBF for 21 days

图 4 显示了 AW/ $\beta$ -TCP 支架在 SBF 中浸泡一定时间, SBF 中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化. 在浸泡的前 2d,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度迅速增加, 然后缓慢增加, 趋于平衡. 在相同的时间点,  $w$ (硬脂酸)-30%

的支架(孔隙率为 66.9%)比不含未经致孔的支架释放更高浓度的  $\text{Ca}^{2+}$ .

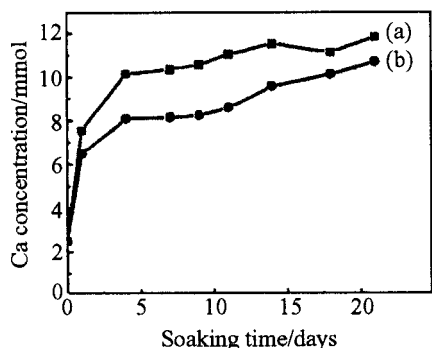


图 4 浸泡 AW/ $\beta$ -TCP 支架后 SBF 中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化

Fig. 4 Changes of Ca ion concentration of the SBF solution after soaking AW/ $\beta$ -TCP composite scaffolds for various periods

(a)  $w$  (stearic acid)-30%; (b)  $w$  (stearic acid)-0%

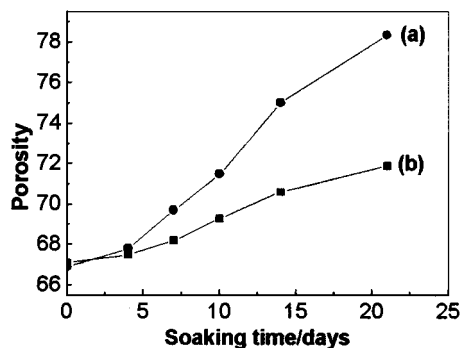


图 5 支架材料在 SBF 浸泡过程中孔隙率的变化

Fig. 5 Changes of porosity of scaffolds after soaking in SBF for various periods

(a) AW/ $\beta$ -TCP composite scaffolds; (b) AW scaffolds

图 5 显示了 AW/ 支架在 SBF 中孔隙率的变化. 随着浸泡时间的延长, 孔隙率逐渐增加. 在相同的时间点, AW/ $\beta$ -TCP 支架的孔隙率高于对比组纯 AW 支架的孔隙率, 表明随着  $\beta$ -TCP 的降解, 原位成孔, 实现了支架材料孔隙率的增加.

### 3.5 AW/ $\beta$ -TCP 支架与细胞的生物相容性

图 6 是 AW/ $\beta$ -TCP 支架与 rMSCs 体外复合培养 7d 的 SEM 照片. 可见, rMSCs 紧密粘附在粗糙的支架表面, 铺展生长, 多呈三角形或者多角形, 细胞伸出多个细长的伪足与材料相连, 而且伪足相互连接(图 6(a)). 图 6(b) 显示的是细胞向孔内生长, 粘附在孔壁上, 还可以看到孔壁上有  $\beta$ -TCP 溶解留下的微孔 ( $<10\mu\text{m}$ ).

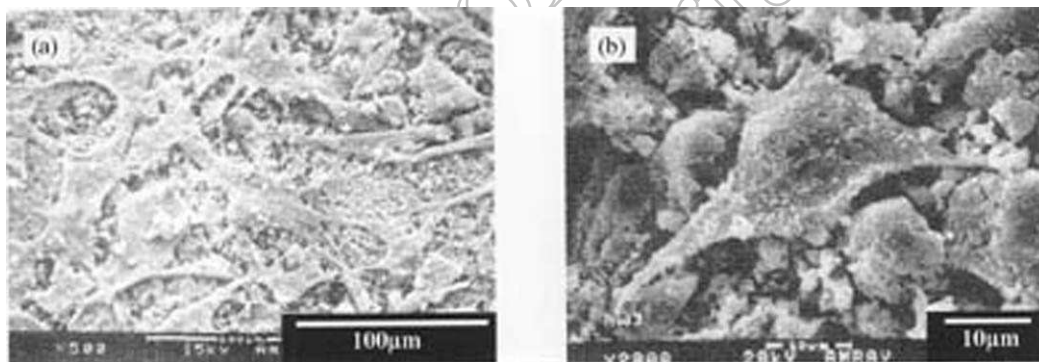


图 6 rMSCs 与 AW/ $\beta$ -TCP 支架复合培养 7 天后的 SEM 照片

Fig. 6 SEM photographs of rMSCs cultured on AW/ $\beta$ -TCP composite scaffolds for 7 days

## 4 讨论

在骨组织工程中, 支架材料的选择是关键. 理想的骨组织工程支架材料应满足以下几个要求 [6]:

(1) 具有良好的生物相容性, 在体外培养时无细胞毒性, 植入体内不会引起机体炎症和

排斥反应. AW 玻璃陶瓷已经被广泛用作骨增生、骨修复、矫形、牙科和上颌面手术的替代品以及组织工程的支架材料<sup>[10]</sup>.  $\beta$ -TCP 也具有较好的生物相容性, 被普遍认为是一种比较理想的骨组织工程支架材料<sup>[7]</sup>. 本研究将 AW 与  $\beta$ -TCP 复合后, 经 1170°C 烧结没有发生新的固相反应(图 1), 将 AW/ $\beta$ -TCP 支架与 rMSCs 体外复合培养 7d, rMSCs 能在支架表面粘附, 而且细胞形态正常(图 6), 表明 AW/ $\beta$ -TCP 支架具有良好的生物相容性.

(2) 具有三维立体的多孔结构, 要有合适的孔径 (100~500 $\mu$ m), 高孔隙率, 并具有很大的内表面积. 本研究所制备的 AW/ $\beta$ -TCP 支架的孔隙率为 55%~76%(图 2 和表 2), 随着  $\beta$ -TCP 的降解吸收, 原位成孔, 支架的孔隙率逐渐增加. 此外, 由硬脂酸造成的大孔的孔径为 100~700 $\mu$ m, 孔与孔之间是相互贯通的(图 2), 大孔壁上有由于烧结和  $\beta$ -TCP 溶解而留下的微孔(图 6(b)), 这种大孔 / 微孔的结构使材料的内表面积增大. 这些均有利于细胞的植入、粘附, 有利于细胞营养成分的渗入和代谢产物的排出.

(3) 具有良好的表面活性, 能促进细胞的粘附并为细胞在其表面增殖提供良好的微环境. AW 玻璃陶瓷有很好的表面反应能力, 在 SBF 中能形成碳酸羟基磷灰石层<sup>[11]</sup>. 图 3 显示 AW/ $\beta$ -TCP 支架的孔表面也生成了 HA. 图 6 表明 rMSCs 能在 AW/ $\beta$ -TCP 支架上粘附、增殖. 而且, Matsuoka H 等<sup>[11]</sup> 在体外评价高活性的 AW 玻璃陶瓷促进骨生成时发现, 培养介质中高的  $[Ca^{2+}]$  促进 ROS17/2.8 细胞的成骨分化: 它通过剂量依赖方式增加碱性磷酸酶 (AP) 活性至 1.6 倍, 通过计量依赖和时间依赖方式前端调控 AP、骨钙素 (OC) 和转录生长因子  $\beta 1$  mRNAs 的表达. 因此, 复合  $\beta$ -TCP 后, 释放更高浓度的  $Ca^{2+}$  能促进 rMSCs 的粘附、增殖和分化. 这些表明 AW/ $\beta$ -TCP 支架具有良好的表面活性.

(4) 具有可生物降解性, 支架在组织形成过程中应该逐渐被降解, 并且不影响新生成组织的结构和功能.  $\beta$ -TCP 具有良好的生物降解性, 植入体内后发生溶解, 溶解下来的 Ca、P(指全部游离的无机磷酸根离子, 如  $HPO_4^{2-}$ 、 $H_2PO_4^-$ 、 $PO_4^{3-}$ ) 进入活体循环系统然后形成新生骨, 一定时间后非生命的植入体逐渐溶解消失, 为有生命的新生骨所取代<sup>[7]</sup>. AW 玻璃陶瓷一般被认为体内溶解缓慢. 但是, 最近研究表明 AW 玻璃陶瓷是可再吸收的. Fujita 等将多孔的 AW 玻璃陶瓷植入到成年猎狗的股骨槽里, AW 几乎被全部再吸收<sup>[12]</sup>. Abiraman 等<sup>[10]</sup> 将由溶胶 - 凝胶法制备的 AW 玻璃陶瓷颗粒植入到兔胫骨缺损, 发现具有再吸收性. Teramoto H 等<sup>[13]</sup> 对 AW 玻璃陶瓷的体内吸收进行了定量分析, 发现到了第 24 周, 孔壁变得越来越薄, 几乎全部被吸收和被新生成的骨代替. 研究发现多孔 AW 玻璃陶瓷是被破骨细胞再吸收的, 然后在体内大量生成新骨. AW 和  $\beta$ -TCP 的降解速率不同, 另外本研究中体外 SBF 浸泡实验表明支架的孔隙率对  $Ca^{2+}$  等离子的释放也有影响(图 4), 因此可以通过调整 AW 和  $\beta$ -TCP 的比例、致孔剂的含量来控制 AW/ $\beta$ -TCP 支架的降解. AW/ $\beta$ -TCP 支架的体内降解性有待于进一步研究.

(5) 具有一定的可塑性, 可被加工成所需要的形状, 具有足够的机械强度, 一般以小梁骨为参照, 其抗压强度应大于 5MPa, 抗压模量在 45~100MPa 之间, 在植入体内后的一定时间内仍可保持其形状, 并使新形成的组织具有符合设计的外形. 本研究所制备的 AW/ $\beta$ -TCP 支架可进行加工, 其抗压强度符合强度要求. 综合考虑强度和孔隙率的要求, 认为硬脂酸的质量分数为 30% 的支架材料更合适.

## 5 结论

以 AW 玻璃陶瓷粉和  $\beta$ - 磷酸三钙粉为原料, 以硬脂酸为致孔剂, 经模压成型、1170°C 烧结所制备的 AW/ $\beta$ -TCP 复合多孔支架材料, 含磷灰石、硅灰石和  $\beta$ - 磷酸三钙相. 硬脂

酸质量分数为 30% 的 AW/ $\beta$ -TCP 支架材料的抗压强度达 14.3MPa。孔隙率达 66.9%，孔径为 100~700 $\mu$ m，而且孔相互贯通。模拟体液浸泡实验表明，HA 能在支架的表面生成，支架具有表面活性。AW/ $\beta$ -TCP 支架具有生物降解性，可以通过调整 AW 和  $\beta$ -TCP 的比例、致孔剂的含量来控制 AW/ $\beta$ -TCP 支架的降解。AW/ $\beta$ -TCP 支架与 rMSCs 体外复合培养实验表明支架具有良好的生物相容性。AW/ $\beta$ -TCP 支架可作为骨组织工程支架的候选材料。

## 参考文献

- [1] De Aza P N, Gutian F, De Aza S. *Biomaterials*, 1997, **18** (19): 1285–1291.
- [2] De Aza P N, Z. Lukinska B, Anseu M R, *et al.* *Biomaterials*, 2000, **21** (17): 1735–1741.
- [3] Huang X, Jiang D L, Tan S H. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2004, **69B** (1): 70–72.
- [4] 杨为中, 周大利, 尹光福, 等 (Yang W Z, *et al.*). 硅酸盐学报 (Journal of the Chinese Ceramic Society), 2004, **32** (2): 171–176.
- [5] Ohtsuki C, Kokubo T, Yamamuro T. *J Non Cryst Solids*, 1992, **143**: 84–92.
- [6] Kim B S, Mooney D J. *Trends Biotechnol*, 1998, **16** (5): 224–230.
- [7] 周大利, 郑昌琼, 尹光福, 等 (Zhou DL, *et al.*). 生物医学工程学杂志 (Journal of Biomedical Engineering), 1999, **16** (增刊): 52–55.
- [8] Kokubo T. *J Non Cryst Solids*, 1990, **120** (1-2): 138–151.
- [9] Han J, Chen R, Chen H Q, *et al.* *J WCUMS*, 2001, **32** (2): 235.
- [10] Abiraman S, Varma H K, Kumari T V, *et al.* *Bull. Mater. Sci.*, 2002, **25** (5): 419–429.
- [11] Matsuoka H, Akiyama H, Okada Y, *et al.* *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999, **47** (2): 176–188.
- [12] Hiroshi Fujita, Kazuhiro Ido, Yasutaka Matsuda, *et al.* Porous AW Glass Ceramic as a Femoral Intramedullary Plug. In: 11th International Symposium on Ceramics in Medicine New York City, New York, USA, 1998. 645–648.
- [13] Teramoto H, Kawai A, Sugihara S, *et al.* *Key Engineering Materials*, 2003, **240-242**: 269–272.

## Preparation and Characterization of Porous Apatite-Wollastonite/ $\beta$ -Tricalcium Phosphate Composite Scaffolds

XIAO Bin<sup>1</sup>, ZHOU Da-Li<sup>1</sup>, YANG Wei-Zhong<sup>1</sup>, OU Jun<sup>1</sup>, TANG Yan-Juan<sup>2</sup>, CHEN Huai-Qing<sup>2</sup>

(1. College of Materials Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. Institute of Biomedical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** Porous apatite-wollastonite/ $\beta$ -tricalcium phosphate composite scaffolds (AW/ $\beta$ -TCP) were prepared from apatite-wollastonite (AW) glass-ceramic powders and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) bioceramic powders, using stearic acid as porogen. The mixture powders were allowing compression molding and firing at 1170°C to obtain porous composite scaffolds. Characteristics of the scaffolds were determined by X-ray diffraction (XRD), scan electron microscope (SEM), energy dispersive spectrum (EDS), inductively couple plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) and so on. Rat mesenchymal stem cells (rMSCs) were co-cultured with AW/ $\beta$ -TCP *in vitro* to evaluate the biocompatibility of the composite. Results show that: AW/ $\beta$ -TCP composite scaffolds with 30wt% of stearic acid reach the compressive strength of 14.3MPa, with the porosity as high as 66.9% and pore diameter ranging from 100 to 700 $\mu$ m. *In vitro* experiments reveal that AW/ $\beta$ -TCP scaffolds are biocompatible, bioactive and biodegradable. The porous AW/ $\beta$ -TCP composite is expected to be a candidate scaffold for bone tissue engineering.

**Key words** apatite-wollastonite;  $\beta$ -tricalcium phosphate; scaffolds; bone tissue engineering