文章编号: 1000-324X(2006)04-0958-07

新型可降解钙磷骨水泥多孔支架研究

魏 杰, 刘昌胜, 洪 华, 袁 媛, 陈芳萍
(华东理工大学生物材料研究所教育部生物材料工程研究中心, 上海 200237)

摘 要: 采用一种特殊的方法制备了孔径、孔隙率和孔形状可控的多孔羟基磷灰石骨水泥支架. 材料的抗压强度可达 4MPa, 孔隙率可达 70%, 孔与孔之间互相贯通, 大孔壁富含微孔. 细胞在材料表面黏附铺展且增殖良好, 体外模拟实验显示材料的降解速度随孔隙率的增加和 Ca/P 比的降低而加快, 多孔支架有优良的生物降解性和生物相容性. 该材料可用于修复骨组织缺损和作为支架材料用于组织工程.

关 键 词: 多孔支架; 磷酸钙骨水泥; 生物降解性; 生物相容性
中图分类号: TB383 **文献标识码**: A

1 引言

在骨组织工程领域, 如何按自然骨的组成结构, 制备与之类似的材料和微细结构的支架, 使之具有良好骨传导和骨诱导性能, 在理论和临床实践上都有十分重要的意义. 磷酸钙骨水泥 (Calcium phosphate cement, CPC) 或叫羟基磷灰石 (hydroxyapatite,HA) 骨水泥, 是一类在生理条件下可自行固化并最终转变成 HA 的一类非陶瓷型人工骨材料, 这种由 HA 骨水泥转变而成的 HA, 与天然骨磷灰石有类似的组成结构, 植入人体后可参与新陈代谢, 促进骨组织生长 [1,2]; 与其他骨缺损修复材料 (特别是 HA 陶瓷) 相比, HA 骨水泥除具有高度的生物相容性外, 这种非烧结的磷酸钙材料还具有生物降解性, 在人体环境中逐步被吸收并被新生骨组织所替代, 从而克服了自体骨和磷酸三钙陶瓷因吸收降解过快造成的局部缺陷以及陶瓷型 HA 长期无法吸收的缺点, 因此受到了更广泛的重视 [3,4]. 虽然非陶瓷 HA 具有很好的生物相容性、骨传导性和生物可降解性. 但是目前所用的 HA 骨水泥固化后仅形成一些微孔, 多为致密材料, 因而影响其降解和吸收速度, 且经过转化而形成的具有化学计量 HA(Ca/P 比为 1.67), 其在体内本身的降解和吸收速度也较慢 [5]. 致密骨修复体在体内不利于血管的早期形成和细胞、组织长入, 不易吸附生长因子、药物和基因等活性成分.

一般来说, 自然骨矿物主要是非化学计量 (也叫钙缺失磷灰石) 的羟基磷灰石, 钙磷比 (Ca/P) 介于 1.50~1.67 之间. 基于仿生的概念, 近年来, 一些研究者开始注意一种新的骨修复材料 — 钙缺失羟基磷灰石, 这种磷灰石材料与化学计量羟基磷灰石相比, 同骨矿物相更加类似, 具有更高的降解率, 在体内更容易被吸收 [6]. 作为骨修复体, 材料的多孔性是非常重要的, 多孔结构可增加材料的表面积, 有利于和体液充分接触, 加快材料降解, 多孔性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

收稿日期: 2005–07–04, **收到修改稿日期**: 2005–10–26
基金项目: 上海市重点项目 (02DZ11013)
作者简介: 魏 杰 (1968–), 男, 博士, 讲师. 通讯联系人: 刘昌胜. E-mail: changsheng liu@163.com

Journal of Inorganic Materials

量细胞种植、生长以及分泌细胞外基质提供足够空间，也有助于种植细胞营养交换和废物排出 [7,8].

一般来说，磷酸钙骨水泥是等摩尔磷酸四钙 (Tetracalcium phosphate,TECP) 和无水磷酸氢钙 (Dicalcium phosphateanhydrous,DCPA) 反应生成化学计量羟基磷灰石 ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, Ca/P 比为 1.67), 对于类羟基磷灰石结构的磷灰石，Ca/P 摩尔比越低，材料的溶解性越好. 调整 TECP 和 DCPA 的摩尔比可以通过反应生成不同 Ca/P 比的类羟基磷灰石 (非化学计量， Ca/P 比低于 1.67) 的磷酸钙盐 [9]. 为了提高 CPC 的生物降解和吸收性及有利细胞长入，本研究通过调整 CPC 固化产物的 Ca/P 比，同时加入一定量的致孔剂，使其能在模拟人体的环境和温度下自行硬化，并最终转化为不同 Ca/P 比的非化学计量羟基磷灰石，并把它制备成多孔型修复体，同时通过细胞培养研究其生物学性能.

2 材料和方法

$Ca(NO_3)$ 溶液和 $(NH_4)_2HPO_4$ 溶液在碱性条件下通过液相沉淀生成低结晶度的 HA, 将该种 HA 粉末与超细 $CaCO_3$ 按 Ca/P=2 的比例充分混合，然后于 1500°C 下反应 10h, 得到 TECP. $Ca(NO_3)_2$ 溶液和 $(NH_4)_2HPO_4$ 溶液在酸性条件下通过液相沉淀生成二水磷酸氢钙 (DCPD), 将 DCPD 在 120°C 下处理 10h 得 DCPA. 将 TECP 和 DCPA 粉碎、分级，可获得不同粒度的粉末， TECP 和 DCPA 不同摩尔比混合均匀，即为本实验要研究的新型 CPC 粉.

石蜡按不同要求将其造粒筛分分别制成 200～ 300μm 、 300～ 400μm 、 400～ 500μm 、 500～ 600μm 的颗粒备用. 将 CPC 粉末、石蜡和固化液体按一定比例放入玛瑙研钵中调和，调和后的浆体放入不锈钢模具，模具在置于 37°C 、 100% 湿度环境中固化 48h 取出，放入乙醇中 12h, 换乙醇后再于 60°C 加热 2h, 取出放在 100°C 烘箱中加热 12h, 冷却后放入蒸馏水中放 2～5h, 烘箱 50°C 干燥最后得到多孔支架材料.

测试手段：(1) 抗压强度,岛津万能材料试验机 (AG–2000A 型), 施加荷载速度为 2mm/min, 每组数据至少有 5 个平行实验；(2) 微观结构，用 Cambridge, S-250 MK Ⅱ型扫描电镜观察；(3) 采用煮沸法测定多孔材料的孔隙率； (4) 固化产物的 Ca/P 比用等离子发射光谱 (ICP) 分析.

将多孔支架材料浸入模拟体 (Simulated Body Fluids,SBF) 溶液中，分别在 1 、 3 、 5 、 7 、 9 周取出用去离子水清洗， 120°C 左右加热 2h, 冷却后称重，通过失重来研究材料的降解. 孔径 500μm 、孔隙率 60% 、 Ca/P 比为 1.60 的多孔缺钙支架材料进行细胞培养. 将 CPC 按 6 孔细胞培养板的底部大小制备成圆形模片 (直径 7mm, 厚 1mm), 超声清洗、高温高压消毒备用. 然后在无菌条件下将 CPC 模片放于 6 孔板底部，以超声清洁、消毒后的玻片为对照，每孔加入细胞悬液 (5×10^4 个 / 孔). 培养一定时间后取出用于观察及检测，逐日用相差显微镜观察细胞生长及与材料附着情况；模片及玻片取出后 PBS 冲洗，经 3% 戊二醛固定 4h, 50%～100% 乙醇梯度脱水，醋酸异戊酯浸泡，干燥镀金后扫描电镜观察.

3 结果和讨论

3.1 致孔剂用量与孔隙率的关系

从图 1 可以看出，随着 CPC 粉末 / 致孔剂用量比率的降低， CPC 固化体孔隙率逐渐增大，也就是说，致孔剂的用量影响固化体的孔隙率，随着致孔剂用量的增加，固化体的孔

Journal of Inorganic Materials

隙率增加，当 CPC 粉末 / 致孔剂用量质量比为 0.7 时， CPC 固化体孔隙率可达到 70%. 因此，可以通过控制致孔剂用量来控制固化体的孔隙率，使多孔 CPC 固化体达到所需要的孔隙率.

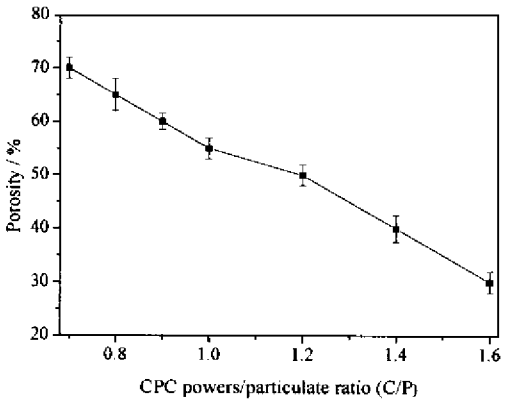

图 1 致孔剂 /CPC 粉末用量比与固化体孔隙率的关系

Fig. 1 Relationship between CPC powers/ particulate ratio (C/P) and porosity of hardened CPC

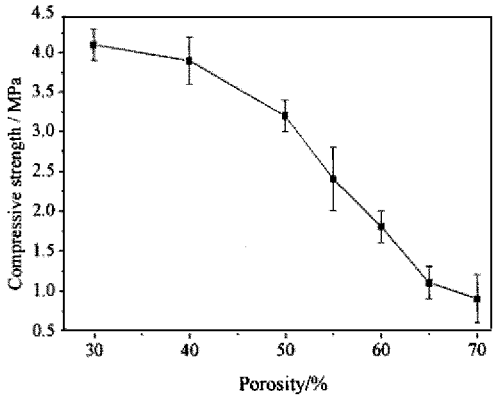

图 2 CPC 固化体的抗压强度与其孔隙率的关系

Fig. 2 Relationship between porosity and compressive strength of CPC

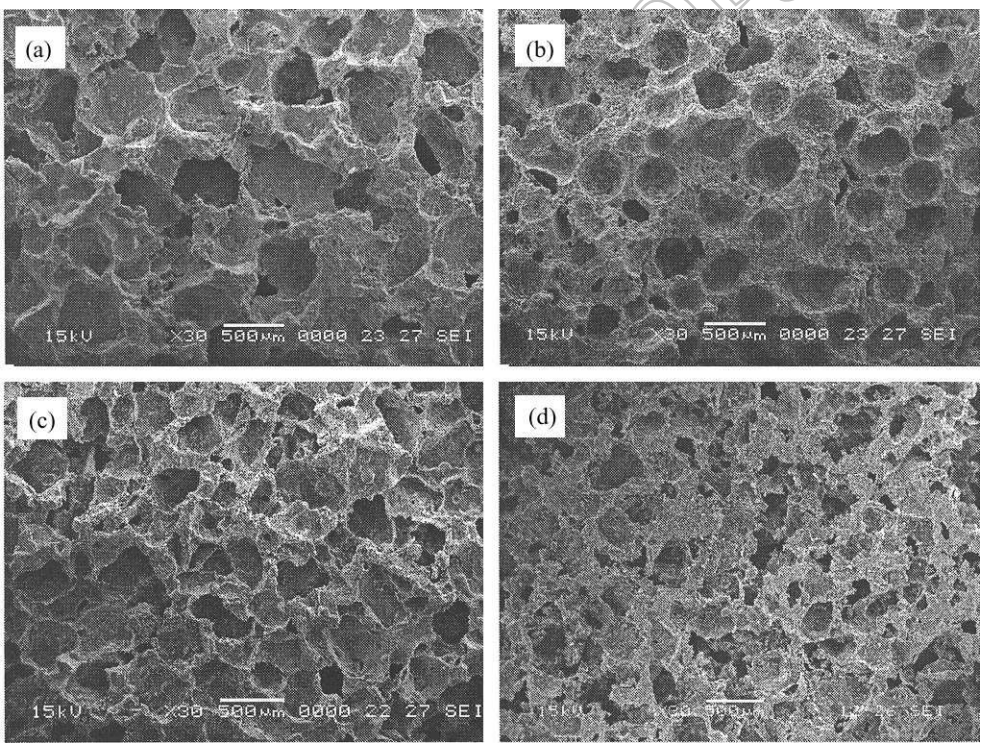

图 3 不同孔径多孔材料的 SEM 照片

Fig. 3 SEM photographs of porous CPC with different porous diameter

(a) 200～ 300μm; (b) 300～ 400μm; (c) 400～ 500μm; (d) 500～ 600μm

3.2 孔隙率与抗压强度的关系

从图 2 可以看出，随着多孔 CPC 固化体孔隙率的增大， CPC 固化体的抗压强度不断降低，当 CPC 固化体孔隙率为 30% 时，其抗压强度 >4MPa, 当 CPC 固化体孔隙率 >50% 时，其抗压强度下降得较快. 结果表明，多孔 CPC 固化体的孔隙率明显影响其强度.

支架材料是组织工程的关键技术之一，它不仅起支撑作用，保持原有组织的形状，而且还起到模板作用，为细胞提供赖以寄宿、生长、分化和增殖的场所，从而引导受损组织的再生和控制再生组织的结构. 支架还可作为活性因子的载体，如生长因子 BMP-2 等 [10].

3.3 不同孔径的多孔 CPC 支架材料的 SEM 照片

图 3 是不同孔径的 CPC 多孔支架的 SEM 照片，控制致孔剂的直径可调控孔径，使之达到所需要的孔径，孔径大小影响细胞的长入，孔径大小已被证明是影响纤维血管组织内生长的重要参数及对新生骨组织长入载体有着重要影响，合适的孔径为 100~ 600μm, 直径过小过大者，均不利于细胞 / 组织的长入.

传统工艺制备多孔支架很难形成 200μm 以上的可控孔隙结构，难以保证孔隙之间的完全贯通 [11]. 本研究制造的复杂形状三维实体，能够很好地解决各种传统工艺在成形多孔细胞载体框架结构方面存在的问题，可根据使用的致孔剂直径来调控多孔 CPC 孔径，使之达到所需要的孔径. 支架材料孔隙呈均匀分布且相互贯通，有利于组织长入和营养物质运输，是细胞生长的良好载体.

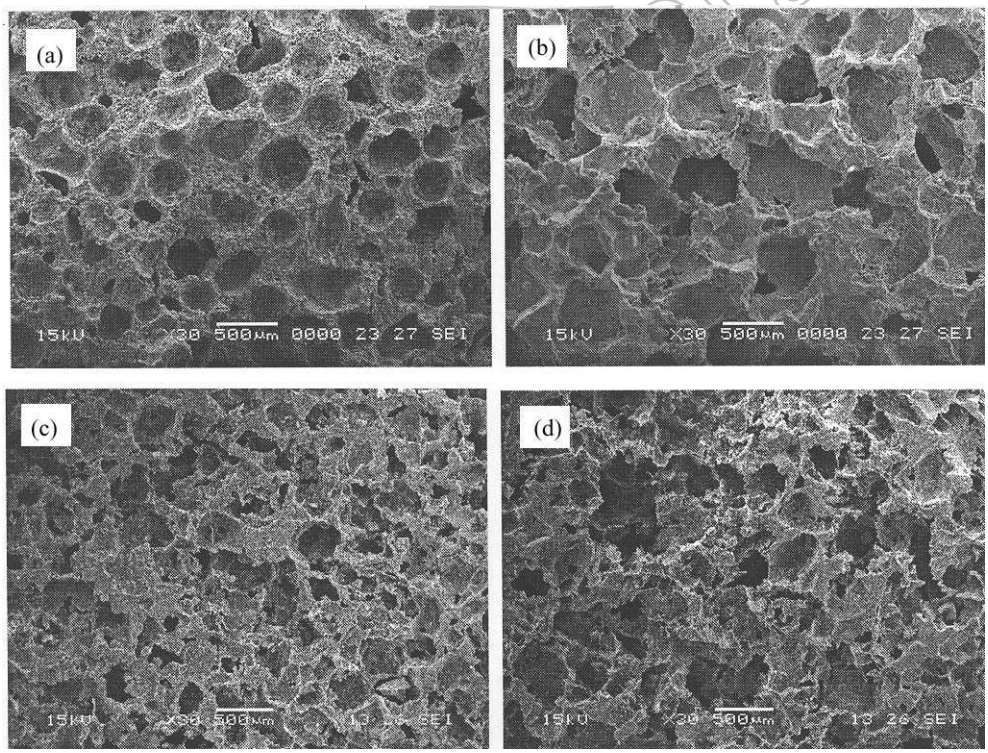

图 4　不同孔隙率的多孔 CPC 的 SEM 照片

Fig. 4　SEM photographs of porous CPC with different porosities

(a) 40%; (b) 50%; (c) 60%; (d) 70%

3.4 不同孔隙率的 CPC 支架材料的 SEM 照片

图 4 是不同孔隙率的多孔 CPC 支架的 SEM 照片. 控制致孔剂的用量可调控孔隙率高低, 使之达到所需要的孔隙率, 从图 3 、 4 可以看出, 孔隙率越高, 多孔材料的孔与孔之间就越连通, 材料孔越贯通, 其内比表面积就越大, 越有利于细胞粘附生长、血管和神经长人, 又有利于营养成分的渗入和代谢产物排出. 对于制备磷酸钙骨水泥多孔支架, 其中的关键是致孔剂的选择, 要求不溶解于水, 不影响骨水泥的固化, 最后要很容易从固化体中浸溶出来, 溶剂又不能有酸性 (酸性溶剂对磷酸钙骨水泥固化体不利).

3.5 孔隙率对材料降解的影响

图 5 是 CPC 支架的孔隙率和降解性能的关系, 其中 CPC 是固化后钙磷比为 1.67 和孔径为 450μm 的多孔材料. 从图 5 可看出 (第一组为致密), 随着 CPC 孔隙率的增大 (制孔剂 / CPC 质量比为 2.7 、 3.0 、 3.5 、 4.0 、 4.5), 材料的降解速度 (失重) 明显加快.

孔径和孔隙率对材料的降解都有很大的影响, 一方面材料随着孔径和孔隙率的增大, 其与模拟体液接触的表面积也随着增大, 这是有利于材料降解的, 另一方面, 伴随着材料孔径和孔隙率的增大, 孔和孔之间的连通性好, 有利于模拟体液进入, 从而提高其降解性. 常规制作的 CPC 微孔率为 10%~30%, 缺少促骨内生的大孔, 吸收过程是逐层进行的, 因此吸收率很低. Ooms 等 [12] 发现 CPC 植入后 24 周才吸收了 10%. 一般认为大孔隙有利于细胞长入、骨内生和移植物的固定, 因此增加孔隙率有利于促进 CPC 吸收. 钙磷材料在体液中溶解使材料周围的钙、磷离子浓度升高, 也有利于新骨的生长和形成.

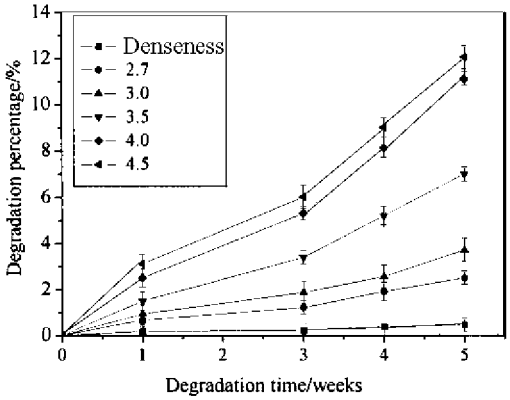

图 5 不同孔隙率的 CPC 的降解率 (Ca/P=1.67)

Fig. 5 Relationship between porosity and degradation ratio of CPC(Ca/P=1.67)

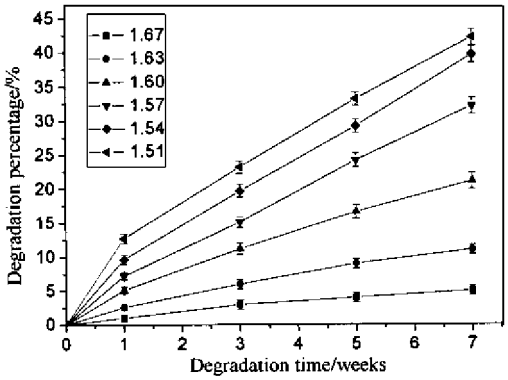

图 6 不同钙磷比的多孔 CPC 的降解率

Fig. 6 Relationship between Ca/P ratio and degradation ratio of CPC

3.6 钙磷比对材料降解的影响

图 6 是不同 Ca/P 的多孔 CPC 对其降解性的影响关系, 其中材料的孔径为 500μm 、孔隙率为 60%, 结果表明: 随着支架 Ca/P 的降低, 材料降解速度明显加快. 一般而言, CPC 在模拟体液中有一定的溶解性, 但钙磷比为 1.67 的 HA 骨水泥材料的降解并不十分理想, 因此通过改变钙磷比来提高其溶解性, 在体内的生物降解性. CPC 骨水泥在浸入模拟体液后, 受模拟体液的侵蚀、溶解作用, Ca 、 P 发生溶解, 溶解的 Ca 、 P 被周围组织吸收, 结果使磷酸钙富集区域形成.

磷酸钙具有不同的成分和结构, 对应着不同钙磷比 (Ca/P), 具有 $Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}$-$(OH)_{2-x}$ ($0< x <1$) 的化学式. 当 x=0, 对应的化学式为 $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, 即化学计量的羟基磷灰石 (HA), Ca/P=1.67; 当 x=1, 对应的化学式为 $Ca_3(PO_4)_2{\cdot}H_2O$ 即化学计量的磷酸三钙

(TCP), Ca/P=1.50; 当 $0< x <1$, 对应的化学式为 $Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$, 即非化学计量的 HA, 1.50<Ca/P<1.67 之间． HA 降解太慢，而磷酸三钙降解太快，均不利于作为骨修复材料 [13,14]. 因此，通过可控制材料的 Ca/P 来调控钙磷材料的降解性，非化学计量的 HA 具备更好的降解性，在人体内可以较快的降解，这样材料周围会聚集较多的钙磷离子，有利于在材料表面和孔隙中形成新骨.

3.7 SEM和相差倒置显微镜观察

图 7(a) 和 (b) 分别是多孔 CPC 上的成骨细胞培养的电镜 (SEM) 和倒置显微镜图照片，从 SEM 形貌可以看出：成骨细胞与 CPC 材料表面粘附，成骨细胞形态正常，成骨细胞伸出伪足与材料紧密相贴，成骨细胞生长良好；相差倒置显微镜观察说明成骨细胞成长梭形，形态正常．结果表明材料具有优异的生物相容性.

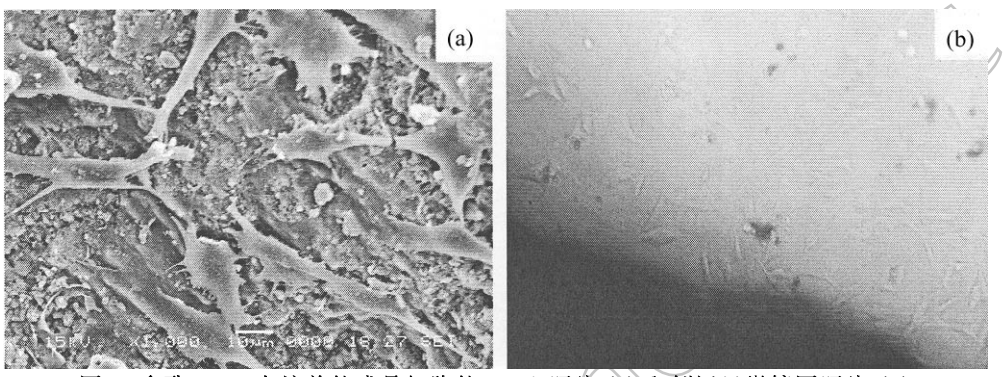

图 7　多孔 CPC 上培养的成骨细胞的 SEM 照片 (a) 和倒置显微镜图照片 (b)

Fig. 7　SEM photo (a) and optical microscope photo (b) of cultural cells

4　结论

以非水溶性有机材料颗粒作致孔剂，采用粒子浸溶的方法可制备孔径、孔隙率和形状可控的多孔 HA 骨水泥支架．材料的强度可达 4MPa, 孔隙率可达 70%, 大孔之间是互相贯通的，而且大孔壁还有 1∼ 5μm 的微孔．随着 CPC 材料最终转化产物 HA 的孔隙率的增加和 Ca/P 比的降低，材料的降解性越好．这种生物相容性优良的多孔材料可吸附生长因子、药物和基因等活性成分，用于修复和重建骨组织缺损，也可作为支架材料用于组织工程.

参考文献

[1] Liu Changsheng, Cai Wei, Pan Songhua, *et al. Biomaterials,* 2003, **24:** 2995–3003.
[2] Liu Changsheng, Shen Wei. *Materials Chemistry and Physics,* 1999, **58:** 78–82.
[3] Patrick Frayssinet, Laurent Gineste, Philippe Conte. *Biomaterials,* 1998, **19:** 971–977.
[4] Grover L M, Knowles J C, Fleming G J P, *et al. Biomaterials,* 2003, **24:** 4133–4141.
[5] Theiss Felix, Apelt Detlef, Brand Bastian. *Biomaterials,* 2005, **26:** 4383–4394.
[6] Szchian Liou, Sanyuan Chen, Hsinyi Lee, *et al. Biomaterials,* 2004, **25:** 189–196.
[7] Madihally, Sundararajan V Mattew, *et al. Biomaterials,* 1999, **20:** 1133–1142.
[8] Yao Jun, Radin Shula, S Leboy Phoebe, *et al. Biomaterials,* 2005, **26:** 1935–1943.
[9] Li Yubao K de Groot. *J. Mater Sci.: Mater. Med,* 1994, **5:** 326.
[10] Wei Jie, Li Yubao. *European Polymer Journal,* 2004, **40:** 509.
[11] Wei Jie, Li Yubao, He Yi. *J. Mater. Sci. Let.,* 2005, **40:** 793.

Journal of Inorganic Materials

[12] Ooms Y, Shibutani T, Moriwaki Y, *et al. J. Biomed. Mater. Res.,* 1998, **39:** 603–610.
[13] Wang Xiaohong, Ma Jianbao, Wang Yinong, *et al. Biomaterials,* 2002, **23:** 4167–4176.
[14] Benahmed M, Bouler J M, Heymann D, *et al. Biomaterials,* 1996, **17:** 2173–2178.

Novel Biodegradable Scaffold of Calcium Phosphate Cement

WEI Jie, LIU Chang-Sheng, HONG Hua, YUAN Yuan, CHEN Fang-Ping

(Engineering Research Center for Biomedical Materials of Ministry of Education Institute of Biomaterials, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: A novel porous scaffold of calcium phosphate cement with porosity-controllable, pore size-controllable and morphology-controllable was prepared and cell culture with scaffold was studied, also, the biodegradation of the porous scaffold in SBF was investigated. The results reveal that the compressive strength of the porous bone cement can reach 4MPa, the porosity of the scaffold can reach 70%, abundant micropores are on the wall of the macroposes and the pores are interconnected with each other, the cultural cell are attached, dispersed and preferentially proliferated on the surface of the scaffolds materials. The biodegradation ratio increases with the increasing of porosity and decreasing of Ca/P ratio of the calcium phosphate cement. The scaffolds not only have good biocompatibility but also biodegradation. The novel new type of biodegradable Ca-P materials can be used as scaffolds for bone defect repair and tissue engineering.

Key words porous scaffold; calcium phosphate cement; biodegradation; biocompatibility

Journal of Inorganic Materials