

# SC-CO<sub>2</sub>纤维粘接法制备 PLA/TCP/Collagen 组织工程支架材料\*

丁 珊 邢禹彬 李立华 周长忍

(暨南大学材料科学与工程系 广州 510630)

**摘 要** 在超临界 CO<sub>2</sub>(SC-CO<sub>2</sub>) 循环萃取条件下制备 PLA/TCP/Collagen(PTC) 多孔组织工程支架材料, 研究了胶原含量对支架材料的总孔隙率、开孔率、孔洞形态和力学性能的影响, 以及胶原纤维在支架材料中的分布. 结果表明: 用 SC-CO<sub>2</sub> 反复循环萃取法制备的 PTC 支架材料开孔率可达 82.81%, 比不加胶原的 PLA/TCP 支架高约 25%; 孔径为 200–500 μm, 孔洞之间出现重要的“隧道”结构; 胶原纤维在 SC-CO<sub>2</sub> 反复循环萃取法处理后保持着网络形态, 在支架中分布均匀; 胶原纤维加入使支架材料的压缩模量和压缩强度明显下降.

**关键词** 有机高分子材料, 生物医学工程, 组织工程支架材料, 超临界 CO<sub>2</sub> 纤维粘接法

**分类号** TB324

**文章编号** 1005-3093(2007)04-0348-06

## Preparation of tissue engineering scaffold materials PLA/TCP/Collagen(PTC) by supercritical CO<sub>2</sub> fiber bonding

DING Shan XING Yubin LI Lihua ZHOU Changren\*\*

(Department of Materials Science & Engineering, Jí'nan University, Guangzhou 510630)

\* Supported by National Natural Science Foundation of China No.32204056 and the Major Programs of Guangdong Province during the 10th Five-Year Plan Period No.A302020104.

Manuscript received December 4, 2006; in revised form April 9, 2007.

\*\* To whom correspondence should be addressed, Tel:(020)85226663, E-mail:tcz9@jnu.edu.cn

**ABSTRACT** The influences of the component proportion of collagen on the total porosity, open porosity, shape of the pore and mechanical capacity of engineer scaffold materials PLA/TCP/Collagen(PTC), prepared with supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) fiber bonding technique, were investigated. The open porosity of the PLA/TCP/Collagen scaffolds can achieve 82.81% which was 25% higher than that of the PLA/TCP scaffolds; The diameter of the pores was 200–500 μm and there were many tunnels among the pores. Collagen fiber can maintain the network shape after SC-CO<sub>2</sub> processing and can be evenly compounded into the scaffolds. The compressure modulus and compressure strength of the scaffolds decline to 1.17 MPa and 0.17 MPa respectively when containing 6% collagen.

**KEY WORDS** organic polymer material, biomedical engineering, tissue engineer scaffold materials, supercritical CO<sub>2</sub> fibre bonding

临床上对多孔支架材料的要求越来越细致, 包括强度、孔径和孔率, 特别是开孔率成为一个必不可少的条件. 目前比较成熟的多孔支架材料的制备方法中, 比较典型的有溶剂浇注/颗粒滤沥<sup>[1,2]</sup>、相分离/冷冻干燥法<sup>[3,4]</sup>、纤维粘接法<sup>[5,6]</sup>、三维印刷法<sup>[7]</sup>、熔

融成型法<sup>[8,9]</sup>、气体发泡法(包括传统的超临界-CO<sub>2</sub>一次升压法)<sup>[10,11]</sup>以及超临界-CO<sub>2</sub>一次升压法+颗粒滤沥法<sup>[3]</sup>等. 对于一些水不溶的高分子材料, 前四种方法必须使用有机溶剂, 在第五种方法中高温对高分子材料相对分子量和复合的生物活性物质有不利的影 响; 虽然用气体发泡法制备的支架材料气孔率高, 试样强度高, 但是孔洞彼此不连通, 不适合于制备生物多孔支架, 而用颗粒滤沥则可能损失药物或活性因子. 避开有机溶剂且可低温操作制备支架, 是组织工程学界的一个关键问题. 本文作者所在的课题组

\* 国家自然科学基金 N32204056 和广东省“十五”重大专项 A302020104 资助项目.

2006 年 12 月 4 日收到初稿; 2007 年 4 月 9 日收到修改稿.

本文联系人: 周长忍, 教授

深入研究了在超临界 CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>) 条件下制备三维多孔支架材料的方法 [12,13]。用此法制备非水溶性可降解支架材料, 具有传统方法无法比拟的优点, 孔隙率和连通率都比较高, 且同时避免有机溶剂和高温环境。但是, 前期研究的支架材料连通率尚不能完全满足临床的要求 [13], 与传统的一次性升压法相比超临界二氧化碳反复循环萃取法没有显著提高支架材料的开孔率 [12]。而高孔隙率和开孔率是组织工程支架材料的关键要求, 有助于细胞在支架内的黏附、迁移和增殖 [14]。

胶原具有很低的免疫原性、生物相容性和可降解性, 与多种宿主细胞和组织有良好的相互作用 [15], 胶原中大量的极性亲水基团在 SC-CO<sub>2</sub> 中既不溶解也不溶胀。因此, 本文以胶原为纤维网络, 用 SC-CO<sub>2</sub> 反复循环萃取法制备组织工程支架材料, 研究胶原纤维含量对支架材料总孔隙率、开孔率、空洞形态以及支架力学性能的影响, 以及胶原纤维在支架材料中的分布。

## 1 实验方法

将质量比为 8:2 的 DL-PLA(Mn=1×10<sup>5</sup>, 过筛 80 目) 粉末材料和 TCP 粉末 (过筛, 150 目, 分析纯) 分别与质量分数为 2%、4% 和 6% 的胶原蛋白纤维 (I 型胶原, 300kD) 混合, 用强力研磨机 (IKA 公司) 高速研磨搅拌。将混合均匀的粉末置于一圆筒形反应瓶中, 再将反应瓶固定于 0.5 L 的超临界 CO<sub>2</sub> 不锈钢反应釜中密封。用制冷设备将 CO<sub>2</sub> 冷凝到零度以下, 用液泵使压力达到 20 MPa, 并温度升至 36 °C 保持 30 min [13]。然后反复循环萃取 3 次, 每次循环为“降压 - 升压 - 降压”, 释放出的 CO<sub>2</sub> 通过几个分离釜后再重新进入反应釜中。每次降压和升压的间隔时间为 1-2 min。3 次循环后, 封锁进气口, 打开放空阀门, 2 min 排尽所有气体, 取出支架材料 [12]。

将支架材料喷金处理后在扫描电镜 (日本日电 JC60X 型) 下观察其表面形态和“隧道”结构。将支架用环氧树脂包埋, 切片, V.G 染色后在光学显微镜 (蔡司 Carl Zeiss Axioskop 40) 下观察胶原在支架材料中的分布情况。用氦气真密度法测定支架材料的总孔隙率和开孔闭孔率。将支架材料切成统一规则立方体 ( $n=3$ ), 用氦气真密度仪 (美国麦克全自动真密度分析仪 ACCUPYC1330) 测定孔隙率 [16,17] (包括总孔隙率、开孔率和闭孔率), 以氦气为介质气体时 [18] 用“半个大气压”测定法。实心材料密度则以 TCP 密度为 3.14 g/cm<sup>3</sup> [19], PLA 密度为 1.26 g/cm<sup>3</sup> [20] 计算得出 (不计相对分子质量)。总孔隙率  $P_{total}$ 、开孔率  $P_{open}$  和闭孔率  $P_{closed}$  分别为

$$P_{total} = (1 - \rho_{apparent}/\rho_{material}) \times 100\%$$

$$P_{closed} = (1 - \rho_{real}/\rho_{material}) \times 100\%$$

$$P_{open} = P_{total} - P_{closed}$$

式中

$$\rho_{apparent} = M_{material\ geometric}/V_{geometric}$$

$$\rho_{materials} = M_{material}/V$$

$\rho_{real}$  由氦气真密度仪 (ACCUPYC1330, US) 测得, 质量  $M$  由分析天平称得, 体积  $V$  由游标卡尺测量后计算得出。

将复合不同含量胶原 PLA/TCP/Collagen 的支架材料切割成统一大小的立方体 (10 mm × 5 mm × 4 mm,  $n=5$ ), 按照国家标准 GB/T 1041-1992 方法使用万能拉力机 (日本岛津 SHIMADZU AG-I 型) 中测试压缩模量和压缩强度。测试温度为 12 °C, 湿度约 70%, 试验速率为 5 mm/min。若材料在变形小于 25% 之前破坏, 此时强度即为压缩强度; 若材料在变形 25% 还没有破坏, 则变形 25% 时的强度即为压缩强度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PLA/TCP/Collagen 支架宏观形态和微观组织

没有添加胶原 PLA/TCP 支架材料具有圆形气孔, 孔径大小为 200-500 μm, 并且很多气孔为闭合孔 (图 1a)。PLA/TCP/Collagen 支架材料的孔径为 200-500 μm, 而且随着胶原含量的增加, 孔洞数量增多 (图 1b-1g), 这一点与宏观形貌观察结果相吻合。但是孔洞形状呈不均匀、不规则状态, 在 PTC 材料孔洞之间出现特有的“隧道”结构 (图 1b、1d、1f 中箭头), 连通了原本可能封闭的孔洞。“隧道”的形成有赖于 SC-CO<sub>2</sub> 环境下反复的循环打气与放气, 和在升压与放压过程中 PLA 的反复溶胀和定型 [12]。同时, 胶原纤维在 SC-CO<sub>2</sub> 中不溶解也不溶胀, 具有网络支架的作用, 有助于“隧道”的形成。这种“隧道”效应有助于提高整个支架材料的贯通性, 提高开孔率, 因此有利于细胞的粘附、迁移和营养物质的交换及代谢产物的排出。但是, 胶原的低机械强度和支架材料的高开孔率降低了支架材料的压缩模量和强度。

在外观上, 含 2% 胶原的材料比较致密 (图 2)。随着支架材料中胶原含量的增加, 材料孔洞增加, 孔洞的通透性增加, 含 6% 胶原的材料具有明显的海绵结构。这种变化是由 PTC 三元复合材料中的 PLA 粘结作用、TCP 增强作用及胶原的纤维网络作用共同决定的。在超临界 CO<sub>2</sub> 中, PLA 能够充分溶胀, 将本来分布均匀的 TCP 和胶原紧密的粘结在一起, 待气体排出后得到致密的多孔结构。但是, 由于胶原蛋白含有大量的亲水极性基团, 在 SC-CO<sub>2</sub> 中既不溶解也

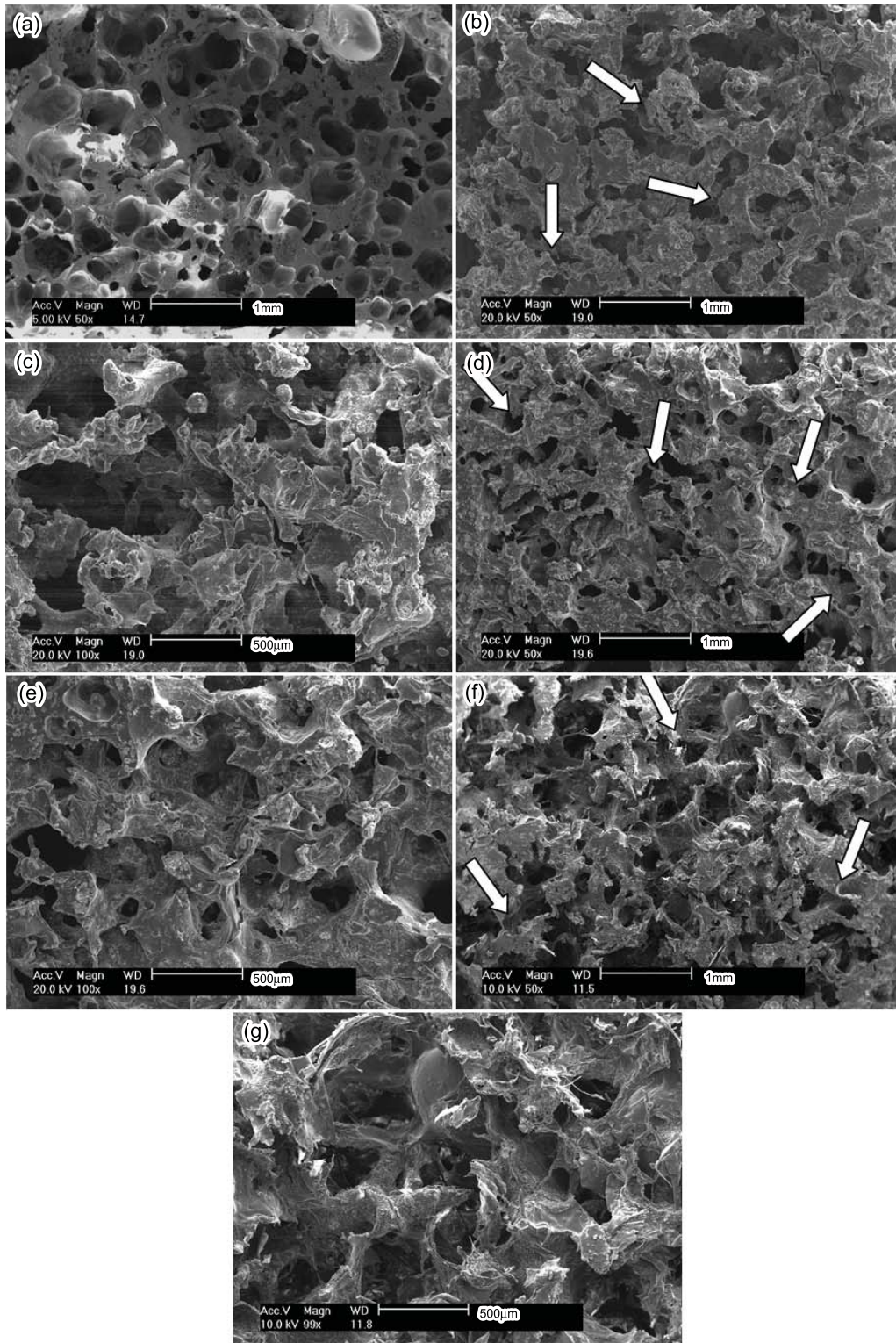


图 1 胶原含量不同的 PLA/TCP/Collagen 支架材料的 SEM 照片

Fig.1 SEM photos of the PLA/TCP/Collagen scaffolds with different contents of collagen (arrow heads indicate the tunnels structure) (a)0% collagen, (b) (c)2% collagen, (d) (e)4% collagen, (f) (g)6% collagen

不溶胀, 在 PTC 的支架中胶原起到一个纤维网络作用. 所以随着胶原含量的增加, 网络纤维增多, TCP 与 PLA 相应减少, 使 PTC 支架的孔洞越来越明显

和通透.

## 2.2 支架材料中胶原的分布

支架材料中深色分散的为胶原纤维, 胶原纤维分



图 2 胶原含量不同的 PLA/TCP/Collagen 支架的宏观形态

Fig.2 PLA/TCP/Collagen scaffolds with different percentage of collagen. (a)2%, (b)4%, (c)6%

布在支架的孔壁面上, 胶原包围的空白部分为孔洞, 已经被树脂所填充 (图 3). 胶原纤维经过 SC-CO<sub>2</sub> 处理后仍保持着纤维网络形态, 在 PLA/TCP/Collagen 支架中分布较为均匀. 这表明用 SC-CO<sub>2</sub> 溶胀制备多孔混杂材料有较好的复合效果. 由于进入反应釜之前就用研磨机对混合物进行强烈的切割、搅拌, TCP 和 PLA 粉末均匀地分散在胶原纤维的网络中, 有利于材料成形后各组分在支架材料中的均匀分布与孔洞在支架材料中的均匀分布, 使支架材料的力学性能均匀分布. PLA 在 SC-CO<sub>2</sub> 中溶胀, 将松散的胶原纤维“粘接”起来, 也将 TCP 固定在三维支架中, 从而避开了传统纤维粘接法所需的有机溶剂, 且不会出现

湿法复合时出现的沉淀和团聚现象.

### 2.3 PLA/TCP/Collagen 支架材料的开孔率和力学性能

表 1 和图 4 给出了含 0%, 2%, 4%, 6% 胶原的 PLA/TCP/Collagen 支架材料的开孔闭孔率. 以胶原为网络, TCP 增强, PLA 粘接而形成 PLA/TCP/Collagen 支架材料. 胶原网络的加入有助于孔洞间的贯通, 提高了总孔隙率和开孔率. 加入 2% 胶原, 总孔隙率和开孔率并没有明显的提高; 但是 4% 以上的胶原时, 总孔隙率和开孔率都有较大的提高, 而闭孔率有所下降. 加入 6% 胶原时, 总孔隙率达到了 88.38%, 其中开孔率高达 82.81%, 比没加胶原的

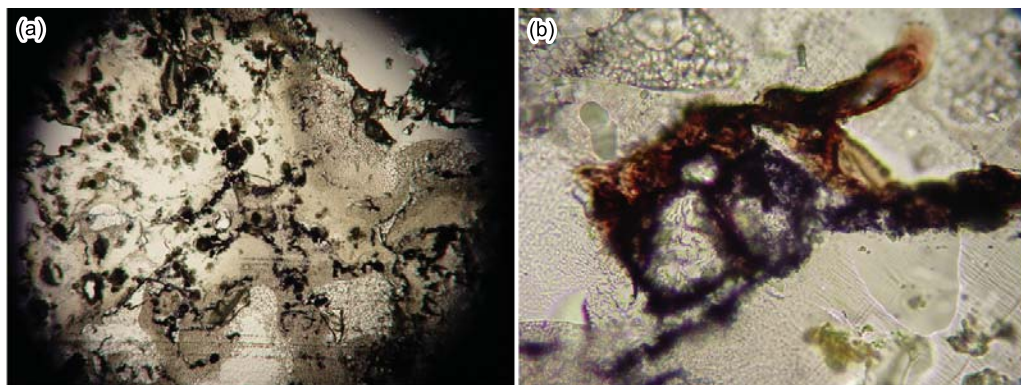


图 3 PLA/TCP/Collagen(含 6% 胶原) 支架的切片染色相片

Fig.3 Photos of dyed slice of the PLA/TCP/Collagen scaffold containing 6% collagen. (a) ×50, (b) ×500

表 1 不同胶原含量的 PLA/TCP/Collagen 支架材料的孔率 (总孔隙率、闭孔率和开孔率)

Table 1 Porosity of the PLA/TCP/Collagen scaffold containing different percentage of collagen

Percentage of collagen/%	$P_{total}/\%$	$P_{closed}/\%$	$P_{open}/\%$
0%	70.50%±2.31%	13.00%±3.33%	57.50%±5.34%
2%	73.30%±1.98%	11.18%±3.65%	62.12%±5.08%
4%	82.43%±2.17%	9.51%±4.13%	72.92%±4.79%
6%	88.38%±2.26%	5.57%±4.23%	82.81%±4.87%

PLA/TCP 支架开孔率高近 25%。其原因是胶原纤维在 SC-CO<sub>2</sub> 中不溶解也不溶胀, 随着胶原含量的增加, 不溶纤维成分增多, 作为网络的基本“支架”增多, 而作为粘接成分的 PLA 相应减少, 使孔洞成分增多, 从而提高了孔隙率与开孔率。

用反复循环萃取法制备添加有胶原纤维的 PLA/TCP/Collagen 支架材料, 可有效提高支架的总孔隙率和开孔率。但是, 随着胶原含量的增加, 架材料的压缩模量和压缩强度明显降低(表 2, 图 5)。当胶原含量为 6% 的时, 压缩强度下降到 0.17 MPa。其主要原因有: 胶原的力学性能较差<sup>[21]</sup>; 随着胶原纤维含量的增多, 支架材料的总孔隙率和开孔率有较大的提高, 使整个支架材料的应力点大量减少, 导致压缩强度降低。同时, 胶原纤维的加入和孔隙率的提高,

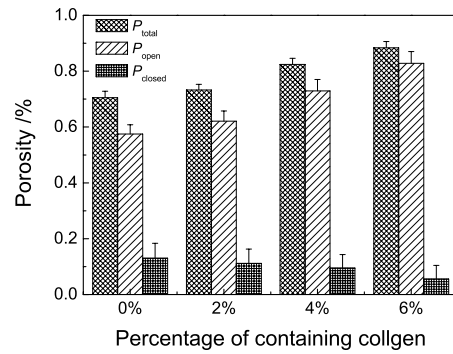


图 4 不同胶原含量的 PLA/TCP/Collagen 支架材料的孔隙率

Fig.4 Porosity of the PLA/TCP/Collagen scaffold containing different percentage of collagen

表 2 不同胶原含量对 PLA/TCP/Collagen 支架的压缩模量和压缩强度的影响

Table 2 Influence of the proportion of collagen to the compressure modulus and compressure strength of the PLA/TCP/Collagen scaffolds

Percentage of collagen/%	2%	4%	6%
Compressure modulua/MPa	38.17±1.65	7.53±0.92	1.17±0.61
Compressure strength/MPa	3.59±0.25	0.96±0.09	0.17±0.08

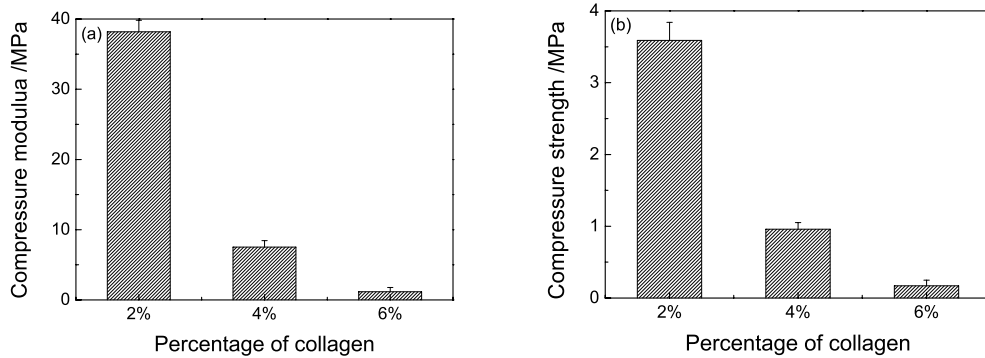


图 5 胶原含量对 PLA/TCP/Collagen 支架材料的压缩模量及压缩强度的影响

Fig.5 Influence of the proportion of collagen to the compressure modulus and compressure strength of the PLA/TCP/Collagen scaffolds. (a) compressure modulus of scaffolds, (b) compressure strength of scaffolds

使材料的柔性提高硬度下降, 因此压缩强度随之降低。

### 3 结 论

用 SC-CO<sub>2</sub> 制备以胶原纤维为网络的 PTC 支架材料, 孔洞之间的“隧道”结构有助于细胞的粘附与迁移以及营养物质的交换和代谢产物的排出。当胶原纤维的添加量为 6% 时, 支架材料的开孔率比不加

胶原时大约高 25%。添加胶原纤维使 PTC 支架材料的压缩模量和压缩强度显著下降。均匀分布于 PTC 支架材料中的胶原纤维网络显著地提高了支架材料的开孔率。

### 参 考 文 献

- 1 L.E.Freed, G.Vunjak-Novakovic, R.J.Biron, D.B.Eagles, D.C.Lesnoy, S.K. Barlow, Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering, *Biotechnology*, **12**, 689(1994)

- 2 CHEN Jida, CUI Lei, LIU Wei, CAO Yilin, The development on solvent casting/particulate leaching, China Biotechnology, **23**(4), 32(2003)  
(陈际达, 崔磊, 刘伟, 曹谊林, 溶剂浇铸/颗粒沥滤技术制备组织工程支架材料, 中国生物工程杂志, **23**(4), 32(2003))
- 3 K.Whang, T.K.Goldstick, K.E.Healy, A biodegradable polymer scaffold for delivery of osteotropic factors, Biomaterials, **21**, 2545(2000)
- 4 M.Honda, T.Yada, M.Ueda, K.Kimata, Cartilage formation by cultured chondrocytes in a new scaffold made of poly(L-lactide-caprolactone) sponge, J. Oral Maxillofac. Surg., **58**, 767(2000)
- 5 C.J.Chuong, Y.C.Fung, Three-dimensional stress distribution in arteries, J. Biomech. Eng., **105**, 268(1983)
- 6 K.Takamizawa, K.Hayashi, Strain energy density function and uniform strain hypothesis for arterial mechanics, J Biomechanics, **20**, 7(1987)
- 7 A.Park, B.Wu, L.G.Griffith, Integration of surface modification and 3D fabrication techniques to prepare patterned poly(L-lactide) substrates allowing regionally selective cell adhesion, J. Biomater. Sci. Polym. Ed., **9**, 89(1998)
- 8 GAO Jianping, MA Penggao, YU Jiugao, YAO Kangde, Tissue engineering and biodegradable macromolecular scaffold, Polymer Bulletin, **4**, 89(2000)  
(高建平, 马朋高, 于九皋, 姚康德, 组织工程与生物可降解高分子骨架, 高分子通报, **4**, 89(2000))
- 9 G.R.D.Evans, K.Brandt, M.S.Widmer, L.Lu, R.K.Meszlenyi, P.K.Gupta, In vivo evaluation of poly(L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. Biomaterials, **20**, 1109(1999)
- 10 D.J.Mooney, D.F.Baldwin, Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents, Biomaterials, **17**(14), 1417(1996)
- 11 M.H.Sheridan, L.D.Shea, D.J.Mooney, Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery, Journal of Controlled Release, **64**, 91(2000)
- 12 XING Yubin, LI Lihua, ZHOU Changren, PLA/TCP porous scaffolds for tissue engineering fabricated by repeatedly cycling extraction with supercritical CO<sub>2</sub>, Journal of Functional Materials Contents, **36**(12), 1909(2005)  
(邢禹彬, 李立华, 周长忍, 超临界 CO<sub>2</sub> 反复循环萃取法制备 PLA/TCP 多孔组织工程支架材料, 功能材料, **36**(12), 1909(2005))
- 13 ZHANG Run, DENG Zhengxing, LI Lihua, ZHOU Changren, Preparation of porous PLA scaffold materials by supercritical CO<sub>2</sub> fluid technique, Chinese Journal of Materials Research, **17**(6), 665(2003)  
(张润, 邓政兴, 李立华, 周长忍, 用超临界 CO<sub>2</sub> 法制备聚乳酸三维多孔支架材料, 材料研究学报, **17**(6), 665(2003))
- 14 Robin A.Quirk, Supercritical fluid technologies and tissue engineering scaffolds, Current Opinion in Solid State and Materials Science, **8**, 313(2004)
- 15 ZHU Meixiang, MU Changdao, LIN Wei, SHI Zongjie, Advantage of collagen as biomaterials and its application, Chemical World, **3**, 161(2003)  
(朱梅湘, 穆畅道, 林炜, 史宗洁, 胶原作为生物医学材料的优势与应用, 化学世界, **3**, 161(2003))
- 16 L.D.Harris, B.S.Kim, D.J.Mooney, Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming, Biomed. Mater. Res., **42**(3), 396(1998)
- 17 A.Tampieri, G.Celotti, S.Sprio, A.Delcogliano, S.Franzese, Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone, Biomaterials, **22**, 1365(2001)
- 18 S.Lowell, J.E.Shields, Powder Surface Area and Porosity, (New York, Chapman and Hall, 1984) p.72
- 19 John A. Dean, *Lange's handbook of chemistry* (13th ed.) (迪安 J.A. 主编, 尚久方, 操时杰, 辛无名, 郑飞勇译, 兰氏化学手册, 第十三版中文版 (北京, 科学出版社, 1991))
- 20 XING Yuqing, WU Guiguo, XING Jun, Chemosynthesis of perfectly degradable plastics polyactic acid, Engineering Plastics Application, **30**(12), 57(2002)  
(邢玉清, 吴贵国, 邢军, 化学合成全降解塑料 - 聚乳酸, 工程塑料应用, **30**(12), 57(2002))
- 21 V.Charulatha, A.Rajaram, Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes, Biomaterials, **24**, 759(2003)