

文章编号: 1000-3851(2011)06-0098-06

胶原改性的生物活性玻璃/聚己内酯 多孔骨修复材料的制备

罗小刚^{1,2}, 陈晓峰^{*1,2}, 李玉莉^{1,2}, 沈德勇^{1,2}, 胡庆^{1,2}, 林才^{1,2,3}

(1. 国家人体组织功能重建工程技术研究中心, 广州 510640; 2. 华南理工大学材料科学与工程学院, 广州 510640;
3. 温州医学院附属第一医院, 温州 325000)

摘要: 结合粒子沥滤-溶剂挥发法, 制备以胶原作为孔壁修饰体的生物活性玻璃(BG)/聚己内酯(PCL)多孔骨修复复合材料。用 SEM、FTIR、XRD、等离子体原子发射光谱仪和 pH 计等对材料的多孔及孔壁形貌、矿化活性、矿化溶液中离子浓度、pH 值变化等进行了分析, 采用比重法和称重法研究了胶原对多孔材料的孔隙率和吸水倍率的影响。结果表明: 胶原蛋白成功的黏附到了多孔材料的孔壁, 有效改善了 BG/PCL 复合材料的亲水性、矿化活性和降解性能, 其孔隙率和吸水倍率分别高达 $96.400\% \pm 0.018\%$ 和 13.65 ± 1.65 。

关键词: 胶原; 生物活性玻璃; 聚己内酯; 修饰; 矿化; 降解

中图分类号: TB332 文献标志码: A

Preparation of collagen modified bioactive glass/poly(ϵ -caprolactone) porous composites for bone tissue repairing

LUO Xiaogang^{1,2}, CHEN Xiaofeng^{*1,2}, LI Yuli^{1,2}, SHEN Deyong^{1,2}, HU Qing^{1,2}, LIN Cai^{1,2,3}

(1. National Engineering Research Center for Tissue Restoration and Reconstruction, Guangzhou 510640, China;
2. School of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;
3. The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

Abstract: Bioactive glass(BG)/poly(ϵ -caprolactone)(PCL) porous composites modified by collagen for bone repairing were prepared by combining particulates-leaching and solvent-evaporation methods. The morphology of the porous materials and pore-wall, mineralization activity, ionic concentration and variation of pH values were characterized by SEM, FTIR, XRD, plasma atomic emission spectroscopy and pH meter. The effects of collagen on the porosity and water absorption rate were characterized by traditional specific-gravity and weighing methods. The results indicate that collagen can be successfully adhered onto the pore wall and the mineralization activity and degradability of BG/PCL are effectively improved. Porosity and water absorption rate are as high as $96.400\% \pm 0.018\%$ and 13.65 ± 1.65 , respectively.

Keywords: collagen; bioactive glass; poly(ϵ -caprolactone); modified; mineralization; degradability

在过去几十年中, 无机/有机复合材料在生物学领域得到了长足发展。由于其综合了无机相组分的高生物活性和有机相组分优良的加工特性, 有效克服了单纯无机相或有机相作为组织修复材料存在的缺陷^[1-2]。如壳聚糖(CS)/聚己内酯(PCL)-聚乳酸(PLA)三维多孔复合支架^[3]、羟基磷灰石(HA)/PCL-CS 复合材料^[4]、经 CS 颗粒改性的

PCL 多孔复合支架^[5]等。生物活性玻璃(BG)/PCL 复合材料因其同时具有良好的骨修复特性及优良的塑性加工性能而在骨修复材料领域备受关注^[6-9]。PCL 多孔复合支架的制备已经得到广泛研究, 然而, BG/PCL 复合支架材料在应用于骨修复及骨组织工程支架时也表现出明显的不足。Rich 等^[6]的研究表明, 在 BG/PCL 多孔支架的制备过程

收到初稿日期: 2010-11-24; 收到修改稿日期: 2011-03-01; 网络出版时间: 2011-07-20 14:23:00

网络出版地址: www.cnki.net/kcms/detail/11.1801.TB.20110720.1423.031.html

DOI: CNKI:11-1801/TB.20110720.1423.031

基金项目: 国家自然科学基金(51072055; 50830101; 50732003); 浙江省自然科学基金(Y407241)

通讯作者: 陈晓峰, 教授, 主要从事骨修复用生物医学材料的结构设计和开发方面的研究 E-mail: chenxf@scut.edu.cn

中, 基体中的 BG 颗粒被高疏水性、低降解速度的 PCL 包裹(包括材料孔壁表面的 BG 颗粒), 厚度达 $1 \mu\text{m}$ 。此包裹层严重限制了复合材料中具有高生物活性和矿化特性的 BG 颗粒在模拟体液(SBF)中或生物体内钙、硅等生物活性离子的释放, 削弱了该复合材料的成骨活性。同时, 孔隙率和吸水倍率作为组织修复材料或组织工程支架材料的两项重要参数, 对材料在生物体内的生物学和力学性能有重要影响^[10-11]。因此, 改善 BG/PCL 多孔材料孔壁的亲水性, 削弱 BG 颗粒表面的 PCL 层厚度或加速 PCL 基相的降解速度, 将有望提高 BG/PCL 复合材料的成骨活性。

本文作者根据胶原和 PCL 在有机溶液中的黏度差异性, 结合粒子沥滤-溶液浇铸法制备了胶原改性的 BG/PCL 高孔隙率复合材料。讨论了胶原含量对多孔材料的矿化活性、孔隙率及吸水倍率的影响, 以期克服传统的 PCL 多孔材料亲水性差、矿化活性差等缺点, 这种新型的复合材料作为骨组织修复材料和骨组织工程支架材料具有重要的应用前景。

1 实验部分

1.1 试剂

I 型胶原(12 g/L), 上海其胜生物技术有限公司; 聚己内酯($M_r = 8.0 \times 10^4$), 济南岱罡生物科技有限公司; 溶胶-凝胶法生物活性玻璃粉体 58S (SiO_2 质量分数 58%, CaO 质量分数 33%, P_2O_5 质量分数 9%)^[12], 平均粒度 $10 \mu\text{m}$; 模拟体液(SBF), 本实验室制备^[13]; 六氟异丙醇(HFIP), 杜邦化工。

1.2 BG/PCL 多孔支架材料的制备

BG/PCL 多孔复合材料是通过溶液浇铸-粒子沥滤法制备^[14-15]。将 PCL 溶于 HFIP 中搅拌 24 h 至均匀, 然后将设计量的 BG 粉体倒入溶液中超声处理 2 h, 待搅拌至均匀, 将 9 倍于溶液中溶质(PCL、BG、胶原)质量的氯化钠颗粒($355 \sim 600 \mu\text{m}$)加入到溶液中, 搅拌 1 天后, 将已经配制好的胶原溶液(HFIP 为溶剂)加入到该溶液中, 进一步搅拌至均匀。然后将浆料迅速倒入聚四氟乙烯模具中成型为柱状体, 并置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱(Jouan 850, 法国)中存放, 将其置于冷冻干燥机(LGJ0 5-II, 北京)中冻干, 再置于蒸馏水中将氯化钠颗粒溶解完全, 待氯化钠溶解后将多孔体置于低温冰箱中经二次冷冻干燥后得 PCL/BG 多孔材料成品。

样品根据胶原、PCL 质量含量不同共分为 4 组, 如表 1 所示, 其中 BG 质量分数恒定在 20%, 总的溶液浓度为 0.1 g/mL 。

表 1 不同胶原与 PCL 质量比的 BG/PCL 支架配方

Table 1 Formula of BG/PCL scaffolds with different mass ratios of collagen to PCL

Sample	G(a)	G(b)	G(c)	G(d)
Collagen : PCL (mass ratio)	0 : 1	0.1 : 1	0.3 : 1	0.5 : 1

1.3 体外模拟矿化实验

模拟体液(SBF)配制: NaCl 、 NaHCO_3 、 KCl 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、无水 CaCl_2 、 Na_2SO_4 、三羟基氨基甲烷(TRIS)等溶解于去离子水中配制, 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 用 1 mol/L 的 HCl 调节 pH 值到 7.25。将制备的多孔材料在酒精中超声清洗 5 min, 晾干后浸泡于盛有 SBF 的塑料瓶中, 材料质量与 SBF 体积比为 $3 \text{ mg}/2\text{mL}$, 分别浸泡 12 h、1 天、3 天、5 天、10 天, 取出后用去离子水反复清洗材料再冷冻干燥。

1.4 结构表征与性能测试

用 SEM(Quanta 200, 荷兰 FEI)对多孔复合材料的孔截面和孔壁等进行形貌分析。用 FTIR(Nexus, 美国 Nicolet)和 XRD(D/max III A, 日本)对其矿化活性进行分析。用电感耦合等离子体原子发射光谱仪(美国利曼)分析矿化过程中硅、钙、磷等离子浓度变化。用精密 pH 计(雷磁 PHS-3C, 上海)测定矿化液的 pH 值变化。

结合称量法和比重法测量多孔材料的孔隙率^[16], 单个样品重复测量 4 次: 在称量瓶中加入一定量的乙醇, 放入干重为 W_s 的样品, 待乙醇充分浸入孔中称量瓶重 W_a , 将湿样取出称瓶重 W_b ; 将充满乙醇的比重瓶称重为 W_1 , 将称量瓶中的湿样加入到比重瓶, 称重得 W_2 ; 由下式计算多孔材料孔隙率:

$$\varepsilon = (W_a - W_b - W_s) / [(W_a - W_b) - (W_2 - W_1)]$$

样品的吸水倍率, 单个样品重复测量 3 次, 按文献^[17]方法计算吸水倍率:

$$M = (m_2 - m_1) / m_1$$

式中: m_1 为冻干后材料的质量; m_2 为材料浸入去离子水中 24 h 后, 表面水分被滤纸吸干后的质量。

2 结果与讨论

2.1 BG/PCL 多孔材料孔壁形貌

图 1 为 G(a)~G(d)多孔材料的孔壁结构的

SEM 图(G(a)中插图)为多孔形貌图)。可以明显看出,随着样品中胶原含量的增加,多孔材料的孔壁上雪片状物质逐渐增加,经能谱测定,表面是胶原蛋白黏附在支架的孔壁上,即胶原蛋白被成功地内衬到了材料的孔壁。可能原因是:在 PCL、胶原的共溶体系中,胶原的黏度远大于 PCL 相的黏度,当造孔剂加入之后,胶原相更倾向于黏附于造孔剂和 BG 颗粒的表面,并将造孔剂颗粒和 BG 颗粒包裹,在材料浸入去离子水中后,胶原包裹的造孔剂逐渐溶解,胶原作为支架的孔壁内衬留于材料的孔壁之中。

2.2 BG/PCL 多孔材料矿化后的红外光谱

图 2 为不同胶原含量的多孔复合材料在 SBF 中矿化 10 天后的红外谱图。可以明显看出,在 1040、962、603、562 cm^{-1} 处有明显的吸收峰,此为 PO_4^{3-} 的特征吸收峰^[18],说明胶原改性的 PCL/

BG 复合材料在 SBF 中浸泡后材料表面有磷灰石生成。G(a)、G(b)、G(c)样品的 PO_4^{3-} 峰很明显,其中 G(b)样品峰最强,而 G(d)样品磷酸根峰较弱,这是由红外样品宏观制备过程中,矿化样品的选取区域和选取质量不均所致。

2.3 BG/PCL 多孔材料矿化后的 XRD 分析

图 3 为胶原改性的 BG/PCL 复合材料在 SBF 中浸泡 10 天后的 XRD 谱图。可以看出,21.323°、23.694°为 PCL 材料的结晶衍射峰^[19],25.921°、31.630°、40.556°、45.371°为 HA 晶体的特征衍射峰,这与之前红外分析的结果相一致。从 G(a)~G(d)样品可以看出,随着胶原含量的增加,羟基磷灰石的特征衍射峰越来越明显,且峰强逐渐增加,表明在 BG/PCL 复合材料中随着胶原含量的增加,材料表面沉积的磷灰石量越多,即胶原蛋白的引

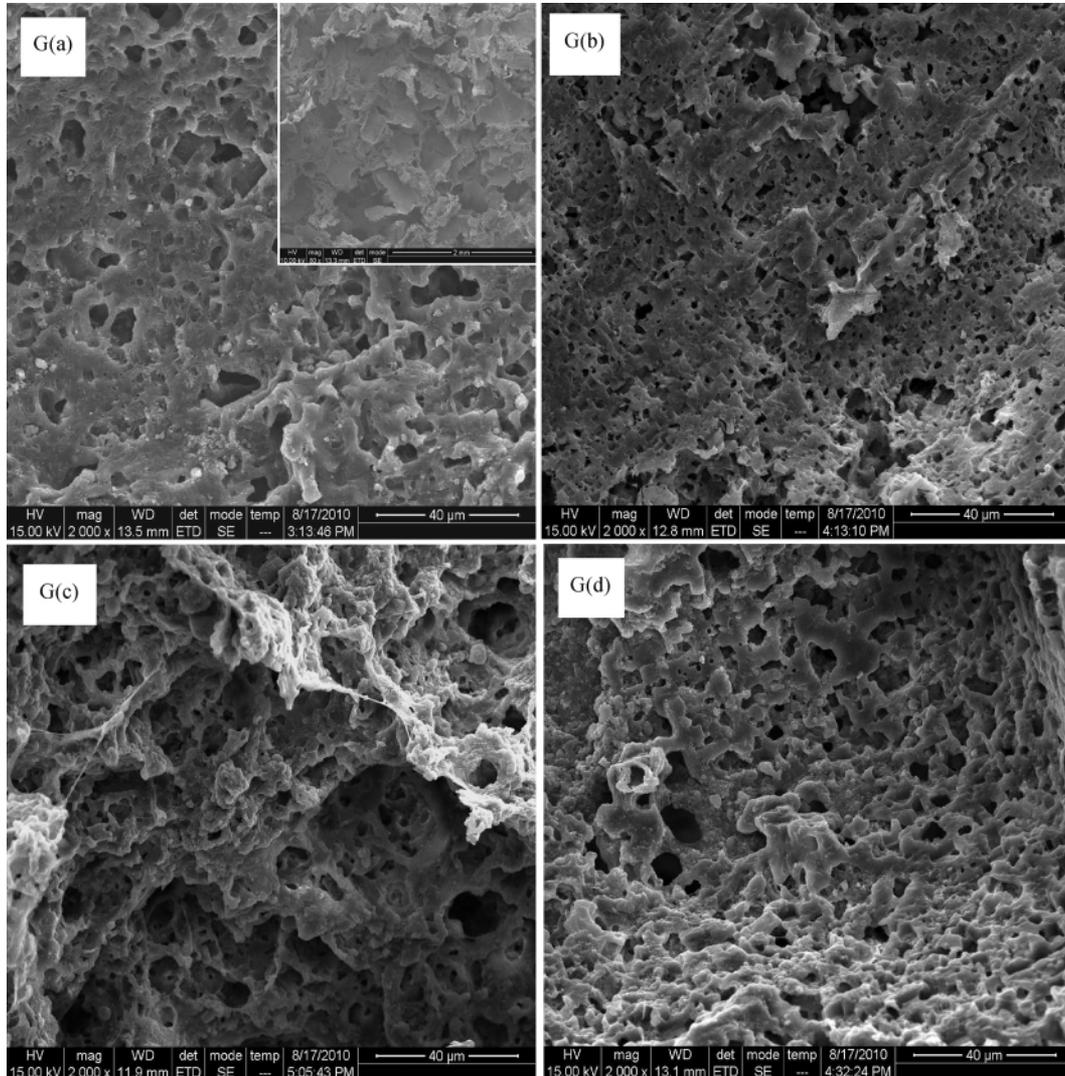


图 1 胶原改性的 BG/PCL 复合材料的扫描电镜图
Fig. 1 SEM images of collagen-modified BG/PCL composites

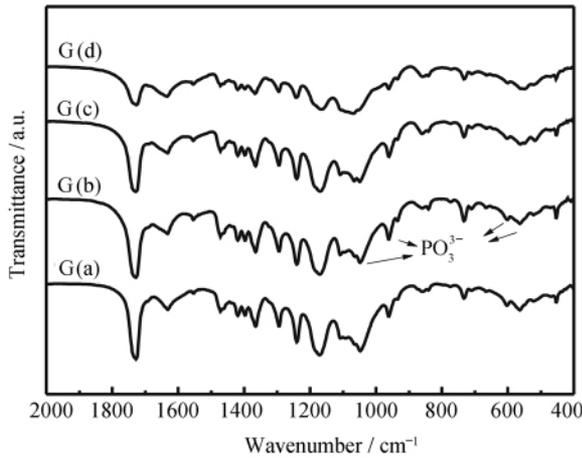


图2 胶原改性的PCL/BG多孔复合材料在SBF溶液中浸泡10天的红外光谱分析

Fig. 2 FTIR spectra of collagen-modified PCL/BG composites after soaking in SBF for 10 days

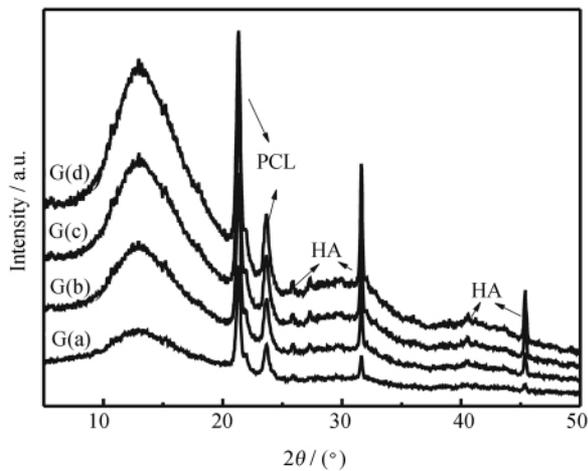


图3 胶原改性的BG/PCL多孔复合材料在SBF中浸泡10天的XRD谱图分析

Fig. 3 XRD spectra of collagen-modified BG/PCL porous composites after soaking in SBF for 10 days

入, 可以成功改善多孔材料在模拟体液中的矿化活性, 为BG/PCL材料在骨修复领域的应用提供了新的途径。

2.4 BG/PCL多孔材料的孔隙率和吸水倍率

图4为样品的孔隙率和吸水倍率测定结果。通过SPSS17.0统计测量孔隙率结果($p < 0.05$), G(b)号样品的孔隙率有所增加, 高达 $96.400\% \pm 0.018\%$, 但并不显著($p = 0.599$), 表明胶原的加入并不能显著影响材料的孔隙率。随着胶原含量的引入, 材料的吸水倍率明显增加($p < 0.05$), G(b)号样品的吸水倍率增加最为显著($p < 0.001$), 高达

13.65 ± 1.65 , 高于G(c)、G(d)号样品, 这可能有以下几方面原因: (1) 胶原作为亲水性良好的蛋白质, 它的引入有效增加了材料亲水能力; (2) 胶原改性的BG/PCL复合材料孔隙率高, 更有助于亲水性的提高; (3) 随着胶原含量增加到如G(c)、G(d)样品时, BG颗粒和PCL颗粒表面黏附的胶原达到饱和, 多余的胶原混合在PCL基体相中, 致使PCL支架力学性能下降, 从水溶液中吸取大量水后无法承担水分质量, 支架本身挤压变形, 当用滤纸吸取支架表面的水分测量吸水倍率时, 支架外表面及内部被挤压的水分被吸取出来, 造成测试值的下降。

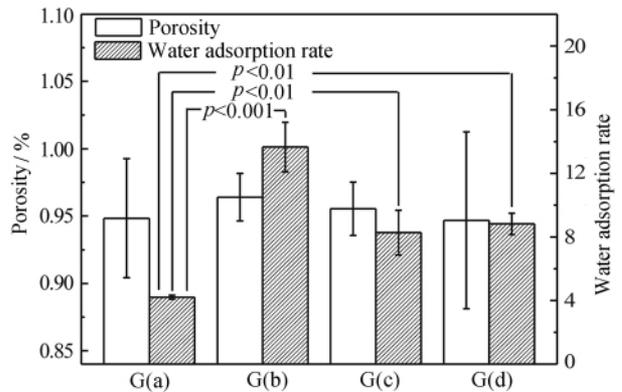


图4 胶原改性的BG/PCL多孔复合材料的孔隙率和吸水倍率分析($n = 3$)

Fig. 4 Porosity and water absorption rate of collagen-modified BG/PCL porous composites($n = 3$)

2.5 BG/PCL矿化后溶液的离子浓度和pH值变化

据Hench的报道^[20-21], 生物玻璃在SBF溶液中的矿化过程与溶液中的钙、硅、磷等离子有密切关联。钙、硅离子的浓度变化不仅会影响材料表面的矿化行为, 而且在植入人体后, 离子的释放会影响人体基因的表达。此外, 矿化过程亦会导致SBF溶液pH值的变化, pH值的变化会影响材料的降解吸收性能, 同时对人体体液平衡也会产生一定影响。

图5为胶原改性的BG/PCL多孔复合材料矿化后的离子浓度和pH值。从图5(a)和5(c)可以看出, G(a)、G(b)、G(c)样品的钙、磷元素等的离子浓度一直呈下降趋势, 其中磷元素变化趋势与Meretoja等^[22]的研究结果基本一致, 但钙离子含量变化趋势相反。这是因为复合材料基体中的BG含量(质量分数20%)太低(相对于Meretoja的60%)以及基体中的BG颗粒被难降解的PCL包

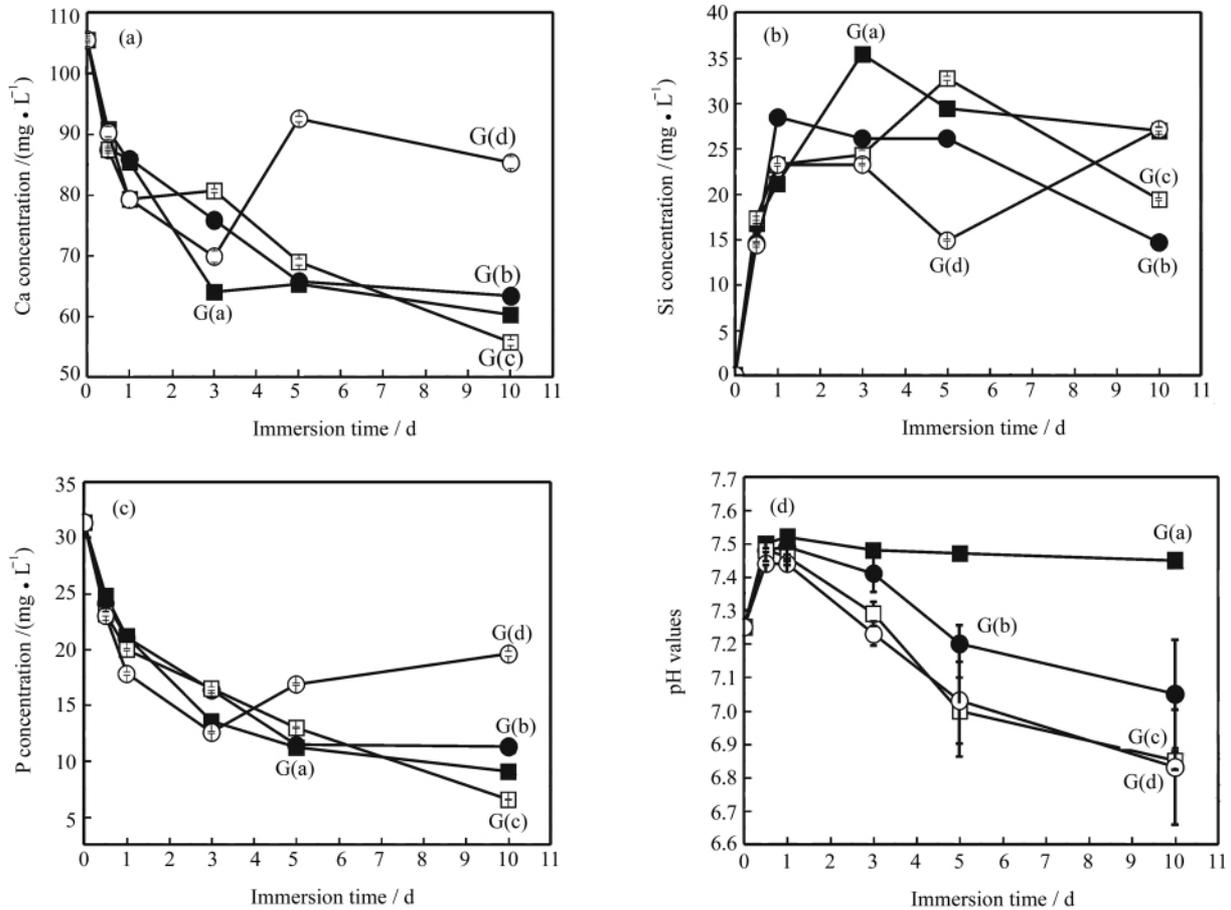


图 5 胶原改性的 BG/PCL 多孔复合材料矿化后的离子浓度和 pH 值分析
Fig. 5 Ionic concentrations and pH analysis of collagen-modified BG/PCL porous composites

裹，以致钙离子溶出的速度一直低于材料表面矿化所需的钙离子浓度，使溶液中钙离子浓度一直呈下降趋势；对于 G(d) 样品，钙、磷元素的离子浓度均呈先下降后上升趋势，这是由于当基体中胶原：PCL(质量比)=0.5：1 时，基体中较多量的 BG 颗粒被胶原包裹，因胶原降解速度快且对 BG 颗粒的包裹相对松散，以致释放的钙、磷离子可以补充材料表面矿化所需的离子浓度。从图 5(b) 可以看出，随矿化时间的延长，硅离子浓度迅速上升，到达一定水平后稳定再呈下降趋势。这可能是由于 PCL 降解后，其产生的—COOH 基团与硅离子进行络合作用^[22]，使溶液中的硅、钙等离子再吸附到材料表面，导致溶液中该离子浓度降低。从图 5(d) 明显看出，随胶原含量的增加，溶液 pH 值下降，这是由胶原和 PCL 降解所致，表明胶原的引入促进了 PCL 的降解，克服了 PCL 材料在骨修复过程中降解速度慢影响骨修复的缺点。

3 结 论

(1) 结合溶液浇注-溶剂挥发法、粒子沥滤法制备了胶原改性的 BG/PCL 多孔骨修复复合材料。根据胶原和 PCL 在 HFIP 溶剂中的黏度差异，使胶原更易黏附于造孔剂颗粒表面，当造孔剂溶出后，胶原成功黏附到了多孔材料的孔壁，改善了多孔材料的亲水性、降解性及矿化性能等。

(2) 多孔复合材料的孔壁被胶原修饰后，其吸水倍率高达 13.65 ± 1.65 ，多孔材料的降解性也提高，胶原的引入破坏了 PCL 的结晶，促进了 PCL 的降解，其产生的羧基使矿化溶液 pH 值下降；随着胶原含量的增加，矿化后磷灰石的 XRD 衍射峰明显增强，表明胶原修饰对复合材料矿化活性产生的积极影响。因此，胶原作为孔壁修饰体的引入，为改善 BG/PCL 多孔复合材料在骨修复、骨组织工程支架材料领域的应用提供了更有利的途径。

参考文献:

- [1] Choi J Y, Lee H H, Kim H W. Bioactive sol-gel glass added ionomer cement for the regeneration of tooth structure [J]. *J Mater Sci-Mater M*, 2008, 19(10): 3287-3294.
- [2] Ye L, Zeng X C, Li H J, et al. Fabrication and biocompatibility of porous bioactive scaffold of nonstoichiometric apatite and poly-(epsilon-caprolactone) nanocomposite [J]. *J Appl Polym Sci*, 2010, 116(2): 762-770.
- [3] 肖秀峰, 丁晓红, 刘淑琼, 等. 壳聚糖/聚己内酯-聚乳酸多孔支架制备和表征 [J]. *复合材料学报*, 2010, 27(6): 100-105.
Xiao Xiufeng, Ding Xiaohong, Liu Shuqiong, et al. Fabrication and characterization of chitosan/poly (epsilon-caprolactone)-poly (lactide) porous scaffolds [J]. *Acta Materiae Compositae Sinica*, 2010, 27(6): 100-105.
- [4] 黄琼瑜, 余厚德, 肖秀峰, 等. 羟基磷灰石/聚己内酯-壳聚糖复合材料的制备与表征 [J]. *复合材料学报*, 2009, 26(1): 24-30.
Huang Qiongyu, She Houde, Xiao Xiufeng, et al. Preparation and characterization of hydroxyapatite/polycaprolactone-chitosan composites [J]. *Acta Materiae Compositae Sinica*, 2009, 26(1): 24-30.
- [5] 丁晓红, 刘榕芳, 肖秀峰, 等. 浸没凝胶相分离法制备聚己内酯多孔支架 [J]. *复合材料学报*, 2010, 27(2): 43-49.
Ding Xiaohong, Liu Rongfang, Xiao Xiufeng, et al. Fabrication of poly (epsilon-caprolactone) porous scaffolds by immersion precipitation method [J]. *Acta Materiae Compositae Sinica*, 2010, 27(2): 43-49.
- [6] Rich J, Jaakkola T, Tirri T, et al. In vitro evaluation of poly (epsilon-caprolactone-co-dl-lactide)/bioactive glass composites [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(10): 2143-2150.
- [7] Li X, Shi J, Dong X, et al. A mesoporous bioactive glass/polycaprolactone composite scaffold and its bioactivity behavior [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 84(1): 84-91.
- [8] Lee J, Yu H, Hong S, et al. Nanofibrous membrane of collagen-polycaprolactone for cell growth and tissue regeneration [J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2009, 20(9): 1927-1935.
- [9] Jo J H, Lee E J, Shin D S, et al. In vitro/in vivo biocompatibility and mechanical properties of bioactive glass nanofiber and poly(epsilon-caprolactone) composite materials [J]. *J Biomed Mater Res B*, 2009, 91(1): 213-220.
- [10] Liu W, Deng C, McLaughlin C R, et al. Collagen-phosphorylcholine interpenetrating network hydrogels as corneal substitutes [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(8): 1551-1559.
- [11] Vennat E, Bogicevic C, Fleureau J M, et al. Demineralized dentin 3D porosity and pore size distribution using mercury porosimetry [J]. *Dent Mater*, 2009, 25(6): 729-735.
- [12] Chen X, Meng Y, Li Y, et al. Investigation on bio-mineralization of melt and sol-gel derived bioactive glasses [J]. *Appl Surf Sci*, 2008, 255(2): 562-564.
- [13] Bohner M, Lemaitre J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(12): 2175-2179.
- [14] Yu H, Matthew H W, Wooley P H, et al. Effect of porosity and pore size on microstructures and mechanical properties of poly-epsilon-caprolactone-hydroxyapatite composites [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2008, 86(2): 541-547.
- [15] Yu H Y, Vandevord P J, Mao L, et al. Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(4): 508-517.
- [16] 顾其胜, 侯春林, 徐政主. *实用生物医学材料* [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 67.
- [17] Niemela T, Niiranen H, Kellomaki M. Self-reinforced composites of bioabsorbable polymer and bioactive glass with different bioactive glass contents; Part II—In vitro degradation [J]. *Acta Biomater*, 2008, 4(1): 156-164.
- [18] Jaakkola T, Rich J, Tirri T, et al. In vitro Ca-P precipitation on biodegradable thermoplastic composite of poly (epsilon-caprolactone-co-dl-lactide) and bioactive glass (S53P4) [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(4): 575-581.
- [19] Wang K, Li W W, Gao C. Poly (epsilon-caprolactone) -functionalized carbon nanofibers by surface-initiated ring-opening polymerization [J]. *J Appl Polym Sci*, 2007, 105(2): 629-640.
- [20] Hench L L, Polak J M. Third-generation biomedical materials [J]. *Science*, 2002, 295(5557): 1014-1017.
- [21] Hench L L. Genetic design of bioactive glass [J]. *Journal of the European Ceramic Society*, 2009, 29(7): 1257-1265.
- [22] Meretoja V V, Helminen A O, Korventausta J J, et al. Crosslinked poly(epsilon-caprolactone/dl-lactide)/bioactive glass composite scaffolds for bone tissue engineering [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 77A(2): 261-268.