

文章编号:1004-7220(2015)04-0350-05

3D 生物描绘孔结构可控钙磷硅基骨 修复支架的生物力学性能

李翠笛^{1a,c}, 陈芳萍^{1a,b}, 王金武², 戴尅戎², 刘昌胜^{1a,b}

(1. 华东理工大学 a. 生物反应器工程国家重点实验室, b. 教育部超细材料重点实验室, c. 教育部生物医学材料工程技术研究中心, 上海 200237; 2. 上海交通大学医学院 附属第九人民医院 骨科, 上海市骨科内植物重点实验室, 上海 200011)

摘要: **目的** 设计和制备新型钙磷硅基骨修复支架,研究其在不同外力作用下体外生物力学性能。**方法** 以自固化磷酸钙骨水泥(calcium phosphate cement, CPC)、介孔硅酸钙(mesoporous calcium silicate, MCS)为原料,通过 3D 生物描绘技术构建孔径分别为 350、500 μm 的 MCS/CPC 复合支架。采用扫描电镜观察支架表面形貌;分别通过万能力学试验机和动态力学分析仪,考察具有不同孔道结构 MCS/CPC 支架的抗压力学性能和不同频率动态周期性载荷作用下的力学性能。**结果** 通过 3D 生物描绘技术能够实现对钙磷硅基骨修复支架内部孔道结构的可控制备。孔径为 350 μm 的 MCS/CPC 支架具有较高的抗压力学强度 [(9.80 ± 0.39) MPa] 和抗压模量 [(132.50 ± 4.30) MPa];此外,载荷频率在 1 ~ 100 Hz 范围内,孔径为 350 μm 的支架具有较高的储能模量。**结论** 通过 3D 生物描绘技术制备的孔径为 350 μm 的 MCS/CPC 复合支架不仅具有规则的连通孔道,还具有较高的抗压力学性能,能在动态载荷作用下保持结构稳定,适合作为一种新型的骨缺损修复材料。

关键词: 骨修复; 介孔材料; 硅酸钙; 3D 生物描绘; 力学性能

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2015.04.350

Biomechanical properties of calcium silicate/calcium phosphate cement scaffolds with controllable porous structure for bone repair by 3D bioplotting

LI Cui-di^{1a,c}, CHEN Fang-ping^{1a,b}, WANG Jin-wu², DAI Ke-rong², LIU Chang-sheng^{1a,c}(1. a. *The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering*, b. *Key Laboratory for Ultrafine Materials of Ministry of Education*, c. *Engineering Research Center for Biomedical Materials of Ministry of Education*, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. *Shanghai Key Laboratory of Orthopaedic Implants*, Department of Orthopaedic Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

Abstract: Objective To design and fabricate novel mesoporous calcium silicate/calcium phosphate cement (MCS/CPC) scaffolds for bone repair and investigate their *in vitro* biomechanical properties under different external forces. **Methods** MCS and CPC in certain proportion were mixed to form plotting material, and the composite MCS/CPC scaffolds with pore size of 350 μm and 500 μm were fabricated by 3D bioplotting technique, respectively. Surface topographies of the scaffolds were observed by scanning electron microscope (SEM). The compressive strength and mechanical properties of the scaffolds under dynamic cyclic loads at different frequencies were

收稿日期:2015-03-02; 修回日期:2015-04-09

基金项目:国家重大科学研究计划(2011CB013300,2012CB933604),国家自然科学基金项目(81171707),上海市卫生系统重要疾病联合攻关项目(2013ZYJB0501),上海市教委重点学科建设基金(J50206)。

通信作者:王金武,教授, E-mail: jinwu_wang@163.com; 刘昌胜,教授, E-mail: csliu@sh163.net。

studied through universal mechanical testing machine and dynamic mechanical analysis instrument. **Results** MCS/CPC scaffolds with controllable macroporous structures could be fabricated by 3D bioplotting technique. Scaffolds with pore size of 350 μm had higher compressive strength [(9.8 ± 0.39) MPa] and compressive modulus [(132.5 ± 4.3) MPa]. In addition, at the loading frequency of 1-100 Hz, scaffolds with pore size of 350 μm had a higher storage modulus. **Conclusions** MCS/CPC scaffolds with pore size of 350 μm fabricated by 3D bioplotting technique possess not only regular pore connectivity and high compressive strength, but also structural stability under dynamic loads, which are promising as novel biomaterials for bone repair.

Key words: Bone repair; Mesoporous material; Calcium silicate; 3D bioplotting; Mechanical properties

近年来研究证明,多孔材料中的孔结构在材料成骨作用方面扮演着非常重要的角色,较高的孔隙率和较好的连通性不仅利于骨细胞的长入和代谢以及血管的长入,还对新生骨组织的形成有着重要影响^[1-3]。然而,较高的孔隙率、较大的孔径结构将会显著降低材料的力学强度。力学环境是骨组织所处的重要微环境之一,力学作用将引起与骨生成有关的成骨、软骨及骨细胞反应,与骨重建过程有着密切联系^[4-8]。只有材料的多孔结构与力学强度相匹配,才会使骨组织工程支架发挥最大的作用。目前,制备多孔骨组织工程支架的方法有颗粒滤除法、熔融成型法、乳液冷冻干燥法、高压气体膨胀法、纤维立体交织法、相分离法等^[9-12]。这些传统的成型方法虽能获得不同孔结构的支架,但其性能并不理想,主要表现为缺乏力学强度、孔隙的相互贯通程度低、孔隙率与孔分布的可控性差,这将影响到细胞的长入和组织的血管化。因此,如何制作具有均衡微观结构的三维支架成为骨组织工程的关键。

3D 生物描绘技术在定制化制造具有复杂表面和内腔、受损部位外形不规则的人体骨骼方面具有独特的优越性^[13]。它能在计算机辅助下,通过调整加工参数实现结构的多变和机械强度的可控,特别是对孔结构进行设计^[14-15]。本文以兼具任意塑形、骨传导能力强和快速固化特性的磷酸钙骨水泥(calcium phosphate cement, CPC)以及具有良好生物活性和降解性的介孔硅酸钙(mesoporous calcium silicate, MCS)为原料,通过 3D 生物描绘技术制备孔道结构可控的 MCS/CPC 多孔复合支架,分别从抗压力学强度和不同频率动态周期性载荷作用下的力学性能两方面研究支架的体外生物力学特性。

1 材料与方法

1.1 支架多样化孔道的设计及制备

1.1.1 MCS 合成 采用改进的溶胶凝胶法,在酸

性条件下,以聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯三嵌段共聚物 P123(EO20PO70EO20,相对分子质量 5 800,美国 Aldrich 公司)为模板剂,正硅酸乙酯为硅源,硝酸钙为钙源,合成 MCS 材料。

1.1.2 MCS/CPC 支架制备 钙磷硅基多孔支架主要由 CPC(上海瑞邦生物材料有限公司提供)和 MCS 组成。CPC 在粉碎机(上海众康有限公司)中间歇粉碎 60 min。CPC 和 MCS 分别过 500 目筛,取筛下粉备用。将质量分数为 5% 的 MCS 粉末与 CPC 混合均匀,得到复合粉末 MCS/CPC。以质量分数为 6% 的聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA, 美国 Sigma 公司)和质量分数为 4% 的海藻酸钠(北京化学试剂公司)混合溶液为固化粘结液。将固化粘结液与复合粉末按一定液固比混合,调和均匀浆料后,转移至微喷射成型系统(上海富奇凡机电科技有限公司)的料腔内,设计构建大小为 10 mm \times 10 mm \times 4 mm、孔径分别为 350 和 500 μm 的多孔复合支架。将多孔支架试样置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、100% 湿度环境中固化 72 h,收集备用。

1.2 MCS 形貌表征

采用全自动物理吸附仪(Tristar 3000 analyzer, 美国 Micromeritics 公司)测定材料在 -196 $^{\circ}\text{C}$ 液氮温度下的介孔结构。

1.3 支架形貌观察

检测支架孔道结构的连通性,并通过扫描电镜(JSM-6360LV, 日本电子株式会社)观察支架的表面形貌。

1.4 力学性能分析

用万能材料试验机(AG-2000A, 日本岛津公司)测量压缩强度。载荷速度为 0.5 mm/min,最大压力为 2 kN,每组样品设 3 个平行样。

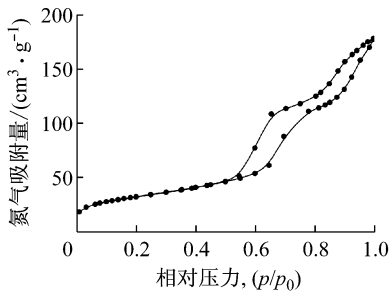
在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温环境中,采用动态力学分析仪(DMA Q800, 美国 TA 公司)考察支架在恒定 5 N 非

破坏力作用下,随受力频率变化时的力学性能。频率点分别设置为1.0、17.5、34.0、50.5、67.0、83.5和100 Hz,频率变化循环设为3个。样品设3个平行样。

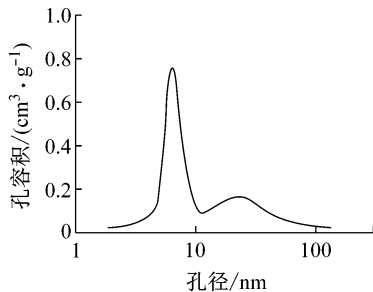
2 结果

2.1 MCS 形貌和结构

图1所示为MCS的低温氮气吸附-脱附等温线和孔径分布曲线。氮气吸附-脱附等温曲线是表征介孔材料孔结构的有效手段,通过该表征可以获得材料的比表面积、孔容、孔径分布以及孔道结构类型等重要信息。观察MCS的氮气吸附-脱附等温线可以发现,材料的吸附等温线是第IV类等温曲线,滞后环兼具H1与H4形的特征,表明材料同时具有有序介孔结构和狭缝孔。由孔径分布曲线可见,材料内介孔结构呈现均一的孔径分布,孔径约为9.4 nm。



(a) 低温氮气吸附-脱附等温线



(b) 孔径分布曲线

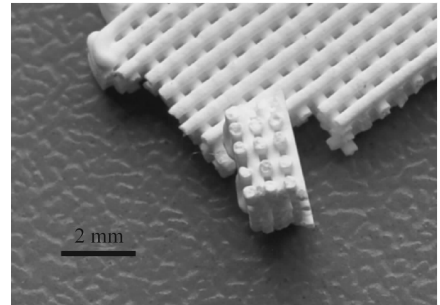
图1 MCS的介孔结构

Fig.1 Mesoporous structure of MCS (a) N_2 adsorption-desorption isotherms, (b) Pore size distributions

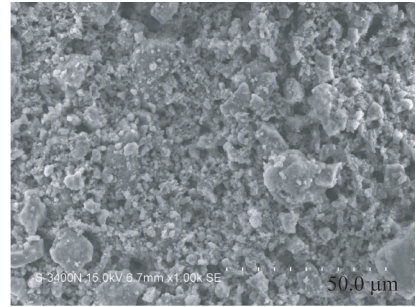
2.2 支架的形貌和结构

制备得到的支架沿垂直方向均匀分布着层层堆积形成的矩形孔道,沿水平方向均匀分布着大小可控且形貌规则的连通孔道〔见图2(a)〕。通过扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察支

架表面可以看到,经粉碎后的CPC和MCS粉末颗粒均小于 $50\ \mu\text{m}$,在材料中均匀分布,材料表面有一定粗糙度,有利于细胞黏附^[16]〔见图2(b)〕。



(a) 数码照片



(b) 扫描电镜照片

图2 MCS/CPC 支架形貌

Fig.2 Morphology of the MCS/CPC scaffolds

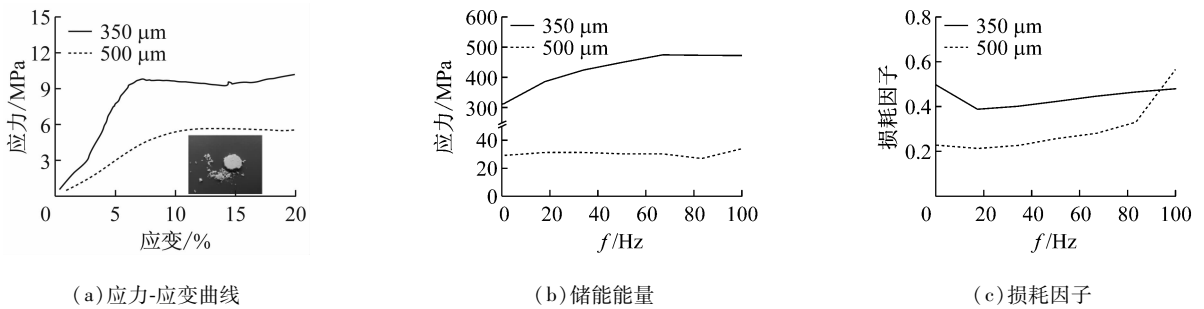
(a) Digital photo, (b) SEM photo

2.3 支架孔道结构与力学性能

图3(a)所示为具有不同孔道结构MCS/CPC支架的应力-应变曲线。在破坏之前,各组支架的应变随着所受压力的增加呈线性增加。由支架达到抗压强度破坏后状态的照片所示,在压力作用下,支架边缘开始破碎,而支架主体被逐渐压成密实的块状。

图3(b)所示为具有不同孔道结构MCS/CPC支架在恒定外力作用下储能模量随频率的变化曲线。受力频率为1 Hz时,孔径为 $350\ \mu\text{m}$ 支架的储能模量为315 MPa。随着受力频率的增加,支架的储能模量增加;受力频率为70 Hz以上时,储能模量保持稳定于470 MPa。而孔径为 $500\ \mu\text{m}$ 支架的储能模量均远低于孔径为 $350\ \mu\text{m}$ 支架,约为30 MPa。

图3(c)所示为具有不同孔道结构MCS/CPC支架在恒定外力作用下损耗因子随频率的变化曲线。频率在1~100 Hz变化过程中,孔径为 $350\ \mu\text{m}$ 支架的损耗因子稳定在0.38~0.48,受力频率为17.5 Hz



(a) 应力-应变曲线

(b) 储能能量

(c) 损耗因子

图3 复合支架孔径对支架力学性能的影响

Fig.3 Effects of pore sizes on mechanical properties of MCS/CPC scaffolds (a) Strain-stress curve, (b) Storage modulus, (c) Mechanical loss factor

时,支架材料的内耗最小;而孔径为 500 μm 支架在低频作用下损耗因子约为 0.22,随着施加频率的增加而增加。

表 1 列出了各组支架的抗压力学测试数据。实验结果表明,孔径增大将导致支架抗压力学性能显著下降;在达到抗压强度后,支架在应变持续变化的过程中,应力保持不变而并未下降。

表 1 不同孔道结构支架的力学性能

Tab.1 Mechanical property of scaffolds with different pore structures

力学性能	孔径/ μm	
	350	500
抗压强度/MPa	9.80 \pm 0.39	5.20 \pm 0.23
抗压模量/MPa	132.50 \pm 4.30	58.40 \pm 3.20

3 讨论

支架结构是骨重建中骨组织工程材料重要的形态学性质,对于材料的最优结构,目前观点不一,但普遍认为较高的孔隙率和大孔径可以加快生物材料内的骨形成,增加骨传导作用。Kuboli 等^[17]通过多种不同孔径结构生物材料植入 Wistar 大鼠皮下实验发现,骨组织工程支架材料的理想孔径为 300 ~ 400 μm ,有利于血管化及细胞迁移,而孔径过大 (> 500 μm)或过小均不利于诱导成骨。Karageorinou 等^[1]则研究认为,孔隙直径大于 300 μm 利于骨组织及毛细血管形成,这与 Mehdizadeh 等^[18]的研究结果(孔隙直径为 275 ~ 400 μm 支架利于组织血管化的形成)相似。多孔结构能促进新生骨形成,却将会降低材料的力学强度,这是一个矛盾,应根据实际

需要而改变材料的结构。可以预见,结构可控性将是材料加工研究的一个趋势。

基于上述分析,本研究通过计算机辅助 3D 生物描绘技术设计制备孔径分别为 350、500 μm 的 MCS/CPC 多孔支架,并考察该支架的体外生物力学性能。抗压力学实验结果表明,孔径为 500 μm 的多孔支架抗压力学性能较低,不适宜用于承重部位的修复。活体骨组织承受的载荷复杂,主要原因是骨骼的几何形状不规则和外在环境的变化,且始终受到多种不定的载荷的作用。通过动态应变研究发现,体内骨组织的生长是被连续的振幅较宽但频率大小范围一致的载荷所驱动^[19]。因此,体外研究多孔支架在不同频率动态周期性载荷作用下的力学性能,对优化设计支架结构以促进骨组织再生有着重要作用。在受力频率变化过程中,孔径为 350 μm 支架的储能模量和损耗因子均明显高于孔径为 500 μm 支架。这一结果表明在非破坏力的作用下,孔径对支架的力学性能也有较大影响。储能模量反映材料储存能量的能力,孔径为 350 μm 支架的储能模量更大,表明该材料抵抗变形能力更强,不容易变形。损耗因子是表征黏弹性的重要参数,反映了材料在动态载荷作用下损耗模量和储能模量变化快慢的程度,体现了材料的阻尼特性。孔径为 350 μm 支架的损耗因子较大,说明在动态载荷作用下,其损耗模量相对储能模量的变化更快,具有更强的阻尼本领、抗冲击能力和缓冲能力。

MCS/CPC 复合支架具有较好的力学强度,这不仅由于 CPC 优异的自固化性,还得益于固化粘结液中 PVA 的增韧作用。PVA 是由聚醋酸乙烯酯水解

而成的一种水溶性聚合物,具有良好的水溶性和黏结性。作为细胞生长载体的PVA,其以优异的理化性能及良好的组织相容性在组织再生和修复领域得到广泛应用^[20-23]。实验发现,PVA作为3D打印MCS/CPC支架固化粘结液的主体原料,不仅能够使无机粉末紧密连接,还能以自身的高弹性提高支架的韧性。

综上所述,计算机辅助3D生物描绘技术能够制备孔道结构精确可控的MCS/CPC支架。孔径为350 μm的MCS/CPC支架具有适宜的连通孔道结构和优异的体外生物力学性能,适合作为一种新型的骨缺损修复材料。

参考文献:

- [1] Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis [J]. *Biomaterials*, 2005, 26 (27): 5474-5491.
- [2] Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, *et al.* Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(17): 3230-3237.
- [3] Jones AC, Arns CH, Hutmacher DW, *et al.* The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth [J]. *Biomaterials*, 2009, 30 (7): 1440-1451.
- [4] Rubin C, Turner AS, Bain S, *et al.* Anabolism: Low mechanical signals strengthen long bones [J]. *Nature*, 2001, 412 (6847): 603-604.
- [5] 戴冠戎. 力学生物学在骨与软骨研究中的应用[J]. *中华骨科杂志*, 2006, 26(6): 429-431.
- [6] 李彬,张西正,张永亮. 骨组织工程中的应力与生长[J]. *国外医学生物医学工程分册*, 2003, 26(3): 129-133.
- [7] 李刚,夏和桃. 应力与骨组织再生的生物学和生物力学基础[J]. *中国创伤骨科杂志*, 2013, 15(10): 871-874.
- [8] Ruff C, Holt B, Trinkaus E. Who's afraid of the big bad Wolff? "Wolff's law" and bone functional adaptation [J]. *Am J Phys Anthropol*, 2006, 129 (4): 484-498.
- [9] Barralet JE, Grover L, Gaunt T, *et al.* Preparation of macroporous calcium phosphate cement tissue engineering scaffold [J]. *Biomaterials*, 2002, 23 (15): 3063-3072.
- [10] Deville S. Freeze-casting of porous ceramics: A review of current achievements and issues [J]. *Adv Eng Mater*, 2008, 10 (3): 155-169.
- [11] Hesarak SI, Zamanian A, Moztarzadeh F. The influence of the acidic component of the gas-foaming porogen used in preparing an injectable porous calcium phosphate cement on its properties: Acetic acid versus citric acid [J]. *J Biomed Mater Res B*, 2008, 86B(1): 208-216.
- [12] Miao X, Hu Y, Liu J, *et al.* Porous calcium phosphate ceramics prepared by coating polyurethane foams with calcium phosphate cements [J]. *Mater Lett*, 2004, 58(3-4): 397-402.
- [13] Landers R, Mülhaupt R. Desktop manufacturing of complex objects, prototypes and biomedical scaffolds by means of computer-assisted design combined with computer-guided 3D plotting of polymers and reactive oligomers [J]. *Macromol Mater Eng*, 2000, 282 (1): 17-21.
- [14] Lode A, Meissner K, Luo Y, *et al.* Fabrication of porous scaffolds by three-dimensional plotting of a pasty calcium phosphate bone cement under mild conditions [J]. *J Tissue Eng Regen M*, 2014, 8 (9): 682-693.
- [15] Luo YX, Anja L, Frank S, *et al.* Well-ordered biphasic calcium phosphate-alginate scaffolds fabricated by multi-channel 3D plotting under mild conditions [J]. *J Mater Chem B*, 2013, 33(1): 4088-4098.
- [16] Hing KA, Annaz B, Saeed S, *et al.* Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2005, 16(5): 467-475.
- [17] Kuboki Y, Jin Q, Kikuchi M, *et al.* Geometry of artificial ECM: Sizes of pores controlling phenotype expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis [J]. *Connect Tissue Res*, 2002, 43(2-3): 529-534.
- [18] Mehdizadeh H, Sumo S, Bayrak ES, *et al.* Three-dimensional modeling of angiogenesis in porous biomaterial scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(12): 2875-2887.
- [19] Fritton SP, MeLeod KJ, Rubin CT. Quantifying the strain history of bone: Spatial uniformity and self-similarity of low magnitude strains [J]. *J Biomech*, 2000, 33(3): 317-325.
- [20] Mathews DT, Birney YA, Cahill PA, *et al.* Vascular cell viability on polyvinyl alcohol hydrogels modified with water-soluble and insoluble chitosan [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2008, 84 (2): 531-540.
- [21] Asakura F, Yilmaz H, Abdo G, *et al.* Preclinical testing of a new clot retrieving wire device using polyvinyl alcohol hydrogel vascular models [J]. *Neuroradiology*, 2007, 49 (3): 243-251.
- [22] Lao LL, Ramanujan RV. Magnetic and hydrogel composite materials for hyperthermia applications [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2004, 15(10): 1061-1064.
- [23] Maruoka S, Matsuu T, Kawasaki K, *et al.* Biocompatibility of polyvinyl alcohol gel as a vitreous substitute [J]. *Curr Eye Res*, 2006, 31(7-8): 599-606.