

复合明胶涂层对钙磷陶瓷多孔支架的增强作用

刘斌¹, 林萍华^{1,2}, 郭超¹, 盛晓波¹, 储成林¹, 董寅生^{*1}

(1. 东南大学 材料科学与工程学院, 南京 211189; 2. 河海大学 材料科学与工程系, 南京 210098)

摘要: 采用有机泡沫浸渍工艺制备了高孔隙率的钙磷多孔陶瓷支架, 将多孔陶瓷样品浸于明胶溶液中渗涂得到陶瓷/明胶复合支架; 采用复合明胶涂层的方法对钙磷多孔陶瓷支架进行增强处理, 在不破坏多孔支架孔隙特征的情况下, 成功地在样品的孔壁上复合了明胶涂层。复合明胶涂层提高了样品的压缩强度和压缩模量, 与未涂覆样品相比, 涂敷样品受压时的应变特性发生了明显变化。尤其是渗涂5%明胶溶液的多孔样品, 在保持高孔隙率(82.8%)的条件下其压缩强度和压缩模量分别由原来的1.04 MPa和0.105 GPa增加到5.17 MPa和0.325 GPa。研究结果表明, 孔壁上复合明胶涂层可以有效地增强多孔陶瓷支架。

关键词: 多孔陶瓷支架; 复合明胶涂层; 压缩强度; 压缩模量; 孔隙率

中图分类号: TB332 文献标识码: A

Calcium phosphate porous ceramic scaffolds reinforced by composite gelatin coating

LIU Bin¹, LIN Pinghua^{1,2}, GUO Chao¹, SHENG Xiaobo¹, CHU Chenglin¹, DONG Yinseng^{*1}

(1. School of Materials Science and Engineering, Southeast University, Nanjing 211189, China;

2. Department of Materials Science and Engineering, Hehai University, Nanjing 210098, China)

Abstract: The calcium phosphate porous ceramic scaffolds with high porosity for the bone tissue engineering were fabricated by the foam impregnation technology, and the composite scaffolds composed of ceramic and gelatin were gained by coating the porous ceramic samples with gelatin solution. It was found that gelatin coatings were formed on the pore walls of porous scaffold samples successfully without destroying their porous characteristic, but these coatings improved the compressive strength and compressive modulus of the samples. The scaffolds, coated with gelatin, were characterized by their nonlinear fractural behavior under compressive loading. Especially, the compressive strength value and the compressive modulus value of porous samples coated with 5% gelatin solution were improved from ~1.04 MPa and ~0.105 GPa to 5.17 MPa and 0.325 GPa respectively with the high porosity (82.8%) maintained. The results indicate that the gelatin coatings on the surface of pores reinforce the porous ceramic scaffolds effectively.

Keywords: porous ceramic scaffold; composite gelatin coating; compressive strength; compressive modulus; porosity

骨组织工程应用的多孔支架材料必须具有一定孔隙结构, 以促进细胞的黏附、增殖和分化, 而且高孔隙率、相互连通的孔隙结构更有利于组织的再生^[1]。但是高度的孔隙结构容易导致陶瓷支架的低机械强度, 而且孔隙率越高, 强度越低。Barral et al^[2] 在研究中发现, 当多孔磷酸钙骨水泥(Calcium phosphate cements, CPCs)陶瓷的孔隙率从22%增加到31%时, 其压缩强度从2.93 MPa降低到0.6 MPa; 根据 Almirall^[3] 等的研究, 由磷酸三钙

(Tricalcium phosphate, TCP)水解得到的多孔羟基磷灰石, 在孔隙率从36%降低到27%时, 其压缩强度从1.4 MPa增加到了2.7 MPa。高孔隙率的多孔陶瓷支架虽然具有很好的生物性能, 但较低的机械强度严重制约它们在临床上的应用^[4,5], 因此对多孔陶瓷支架的增强改性成为许多材料研究者研究的热点。目前多孔陶瓷支架材料常用的增强方法主要有纤维增强、纳米颗粒强化、层状复合增强等^[6-9]。其中层状复合是一种较为常用的增强方式, 通常的

做法是在多孔陶瓷网架结构上涂敷有机物涂层, 从而提高陶瓷材料的力学性能。如 Myazaki 等^[10] 在多孔 - 磷酸三钙(- TCP) 表面涂敷一种丝状蛋白质, 提高了其压缩强度; Mao 等^[11] 在多孔羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA) / 磷酸钙(TCP) 双相陶瓷表面涂敷聚乳酸-乙醇酸共聚物(Polylactide-co-glycolide, PLGA) 以后, 其压缩强度提高到原来的 4 倍。

明胶是一种具有良好生物相容性的聚合物, 是胶原热变性或物理和化学分解的产物, 在体内可以被完全吸收。前期的研究中, 已采用有机泡沫浸渍法制备了高孔隙率的钙磷陶瓷多孔支架^[12,13]; 本研究中将采用渗涂工艺, 在多孔陶瓷网架结构上复合明胶涂层进行增强处理, 并对其增强效果和增强机理进行分析。

1 实验方法

1.1 钙磷陶瓷多孔支架的制备

用一定量的 MgO 和 Al_2O_3 分别与一定浓度的 H_3PO_4 反应得到 $Mg(H_2PO_4)_2$ 和 $Al(H_2PO_4)_3$ 溶液; 再与自制的 HA 和 - TCP 粉末混合, 两种粉体的质量比为 1:1, 加入适量的蒸馏水, 搅拌均匀, 配成浆料。将经过预处理的开孔网状聚氨酯软泡沫在浆料中浸渍, 充分吸附后取出, 去除多余浆料后得到多孔陶瓷坯体。坯体自然干燥后经 1150 高温烧结 2 h, 制得钙磷陶瓷多孔支架。

1.2 多孔陶瓷渗涂明胶涂层

在 50 下将明胶溶于去离子水中, 分别配制质量分数为 2%、5% 和 10% 的明胶溶液。将钙磷陶瓷支架分别浸泡于 3 种明胶溶液中, 真空处理 10 min, 使明胶溶液充分渗入陶瓷体内部。取出后将样品置于真空干燥箱, 50 下干燥 24 h。用质量分数为 2.5% 的戊二醛溶液浸泡干燥后的支架, 对明胶层进行交联, 时间为 20 min。然后采用乙醇浸泡样品 3 次, 每次 10 min, 以去除样品中残留的戊二醛溶液。最后用蒸馏水多次清洗, 干燥。

1.3 性能表征

采用 FEI SIRION 场发射扫描电子显微镜(SEM) 观察样品的孔隙结构、表面形貌以及涂层断面形貌。以水为介质, 用阿基米德法测量样品的孔隙率, 详细操作见文献[8, 14]。采用 WD-10A 型电子万能材料试验机测试样品的抗压强度, 由应力-应变曲线计算压缩模量, 用来表征样品的机械性

能, 试验时加载速率为 0.5 mm/min。将待测样品加工成直径为 8.5 mm、长度为 15 mm 的圆柱^[6]。每组样品测试 5 个试样。

2 结果与讨论

2.1 样品的孔隙结构

首先采用有机泡沫浸渍法制备了钙磷多孔陶瓷, 其孔隙结构如图 1(a) 所示。该多孔陶瓷具有均匀分布的开孔结构, 孔径大约在 200 ~ 500 μm 。阿基米德法测得它们的平均孔隙率为 85.9% \pm 0.6%。图 1(b)、1(c) 和 1(d) 是分别渗涂质量浓度为 2%、5% 和 10% 的明胶溶液后样品的 SEM 照片。对比图 1(a) 可以看出, 复合明胶后样品孔隙结构没有明显的变化, 只是在多孔陶瓷的孔壁上和少数孔隙内出现了一层光滑的明胶膜。当明胶浓度增加到 10% 时, 由于明胶层与陶瓷间线膨胀系数的不匹配而使层间存在较大的应变差, 导致陶瓷表面的明胶膜上出现微小裂纹, 如图 1(d) 所示。图 2 给出了渗涂明胶后样品的孔隙率与明胶浓度的关系。随着明胶浓度的增加, 明胶在样品上的涂敷量增加, 孔隙率呈下降趋势。不过由于多孔陶瓷基体的孔隙率较高, 渗涂后样品仍能保持较高的孔隙率, 即使渗涂 10% 的明胶溶液, 样品的孔隙率仍大于 80%。

在骨组织工程研究中, 支架材料作为种植细胞的载体, 为了便于高密度的细胞长入以及血管的形成, 通常要求具有高的孔隙率、合适的孔径和较高连通度的孔结构特征。虽然对支架所应具有的理想孔结构的看法还不一致, 但大多数研究者认为, 高孔隙率和孔径大于 150 μm 的孔结构更有利于细胞的增殖, 血管的长入以及矿化骨的形成^[4,5,15,16]。经过明胶渗涂处理后, 陶瓷支架样品的孔壁上复合了明胶涂层, 支架表面形貌发生了一定的变化, 但没有破坏它们的大孔结构和高孔隙率的特征, 仍能满足骨组织工程支架孔隙结构的要求。

2.2 明胶涂层对支架强度的影响

机械强度是骨组织工程支架的又一个重要性能指标。多孔支架的高孔隙率有利于细胞的生长和繁殖, 但是以牺牲支架的机械强度为代价的。目前骨组织工程要求的机械强度还没有既定的标准, 通常认为支架材料应尽可能达到被修复或替代部位的松质骨的强度(压缩强度和压缩模量分别为 2 ~ 12 MPa 和 0.3 GPa)^[6,7,11,17]。

图 3 是样品的压缩强度和压缩模量与明胶浓度

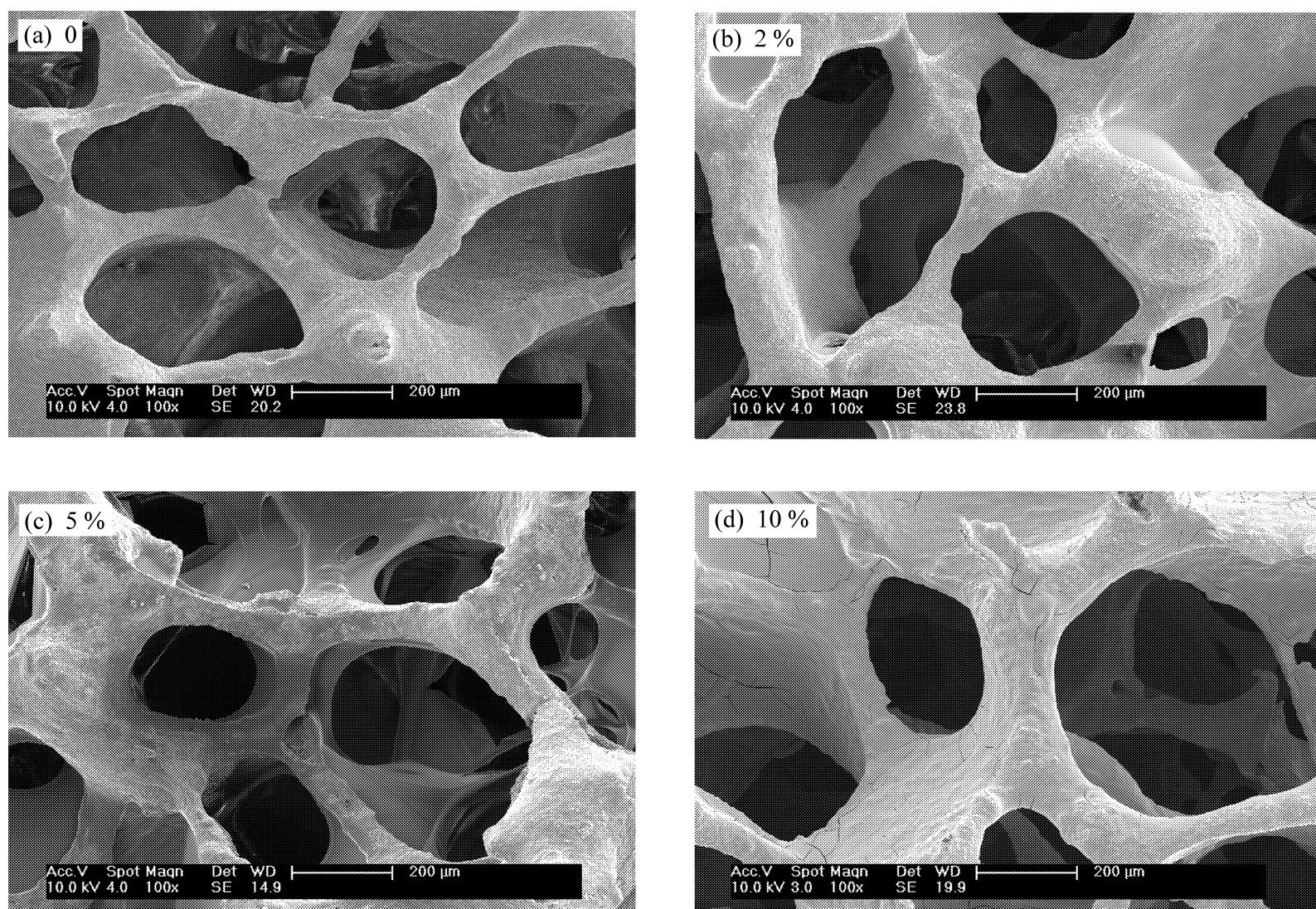


图1 渗涂不同浓度的明胶后多孔支架样品的孔隙结构

Fig.1 The porous structure of porous scaffold samples after coating with different mass fractions of gelatin

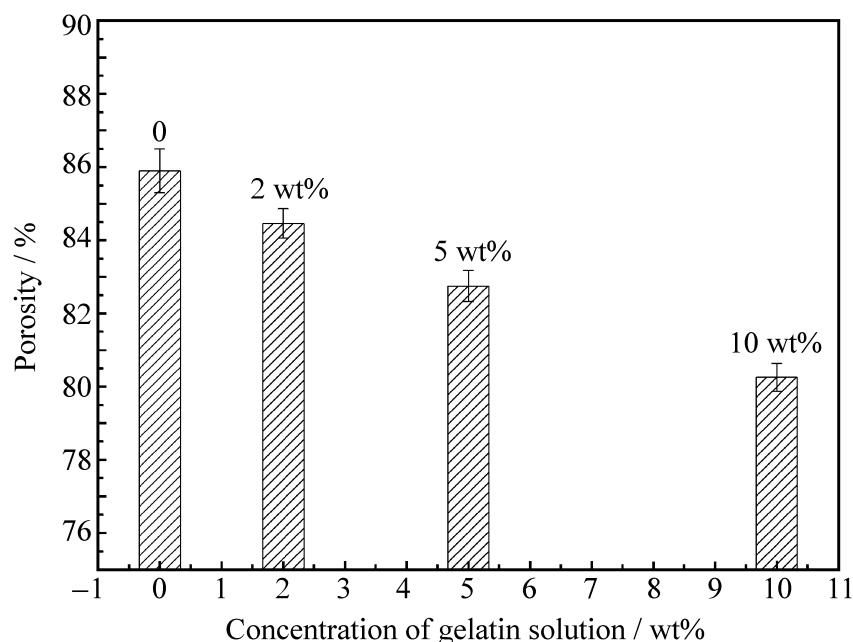


图2 多孔支架样品孔隙率与明胶浓度的关系

Fig.2 Porosity of porous scaffold samples as a function of concentration of gelatin solution

的关系曲线。未经过明胶渗涂的多孔陶瓷其压缩强度和压缩模量分别为 $1.04 \text{ MPa} \pm 0.15 \text{ MPa}$ 和 $0.105 \text{ GPa} \pm 0.006 \text{ GPa}$ 。如果考虑到孔隙率的因素,与其他研究者的结果^[5,6]相比,这些强度值是可以接受的,但它们还远低于人体松质骨的强度^[11,15]。渗涂明胶后,样品的压缩强度和压缩模量

随着明胶浓度的变化呈现不同程度的增加,并且都在明胶浓度为 5 % 时达到了最大值,其数值分别为 $5.17 \text{ MPa} \pm 0.17 \text{ MPa}$ 和 $0.325 \text{ GPa} \pm 0.009 \text{ GPa}$ 。此时样品的压缩强度接近松质骨的中间值,而压缩模量也与松质骨相近。然而,进一步增加明胶浓度并没有使样品的压缩强度和压缩模量继续增加,用 10 % 的明胶溶液渗涂处理后,样品的压缩强度和压缩模量反而降低。

图4 是渗涂明胶前后多孔支架样品压缩试验的典型应力-应变曲线,它表明了样品的应变特性。多孔陶瓷在外力作用下容易发生整体的脆断。渗涂明胶后,特别是明胶浓度达到或高于 5 % 时,样品在外力作用下的失效形式不再是整体的断裂,而是逐层渐变的。应力-应变曲线上表现为当应力在达到最大值后,继续加压,应力发生明显的下降;随后在一个稍低的值上出现应力平台;其后,随着应变的增加,应力还会进一步向上攀升。因此,明胶层不仅对多孔陶瓷起到了增强作用,而且改善了陶瓷受力时的破坏方式。尤其是渗涂 5 % 的明胶后,在保持高孔隙率的前提下,样品的强度增加到了原来的 5 倍。

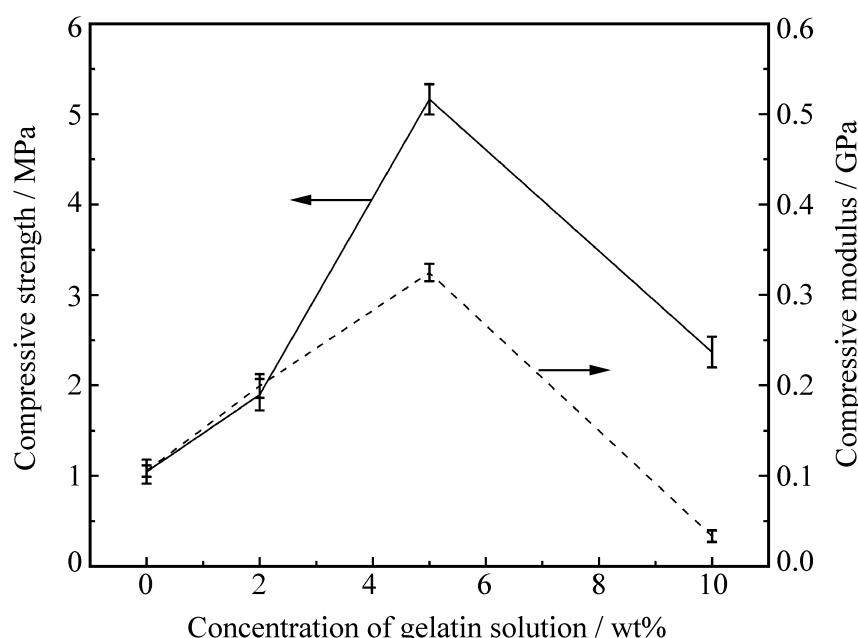


图3 多孔支架样品的压缩强度和压缩模量与明胶浓度的关系

Fig. 3 Compressive strength and modulus of porous scaffold samples as a function of concentration of gelatin solution

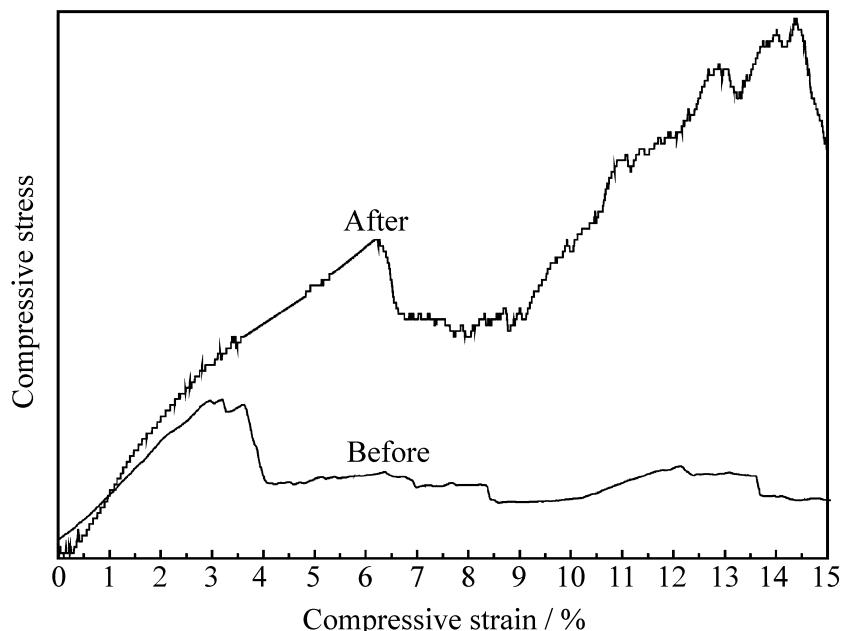


图4 多孔支架样品压缩试验的应力-应变曲线

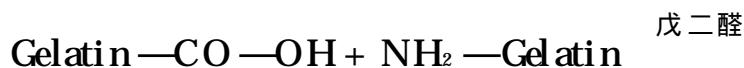
Fig. 4 Compressive stress-strain curves from compression testing, showing different strain characteristics of porous scaffold samples before and after coating with gelatin

2.3 增强机理和增强效果分析

图5是渗涂明胶后多孔支架样品的断面形貌。陶瓷一般具有亲水性, 渗涂过程中明胶溶液由于与

陶瓷之间有较好的润湿性而吸附在陶瓷体上, 甚至浸入到陶瓷表面的微孔内, 形成明胶涂层并与陶瓷紧密结合。由图5可以看出, 渗涂后明胶涂层紧密贴附在多孔陶瓷的孔壁上, 形成明胶/陶瓷的层状复合结构。而且随着明胶浓度的增大, 涂层厚度增加。明胶浓度为2%时, 涂层厚度大约为1 μm; 明胶浓度为5%时, 涂层厚度大约为2 μm; 而当明胶浓度增加到10%时, 涂层厚度大于5 μm。

在交联过程中, 明胶中的羟基(—COOH)和氨基(—NH₂)在戊二醛的作用下相互反应^[18]:



形成了多个蛋白质分子交联的网络结构, 从而使分子链间的作用力加强, 在陶瓷网架表面形成具有一定强度的明胶膜, 如图1和图5所示。在受到外力作用时, 这些明胶膜首先发生一定程度的塑性变形, 吸收一大部分外力作用的能量, 钝化应力集中, 从而使增强单元(陶瓷)避免因变形超过其极限而破坏。再者, 明胶膜对陶瓷体内裂纹的扩展起到了部分偏转作用, 其机理如图6所示。裂纹的偏转不仅造成了裂纹扩展路径的延长, 而且裂纹从一个应力状态有利的方向转向另一个应力状态不利的方向扩展时, 将导致扩展阻力的明显增大, 陶瓷因而得到了强化^[17]。明胶层越厚, 这种增强效果越明显。

不过由于明胶层与陶瓷间线膨胀系数、收缩率不匹配, 明胶/陶瓷层间容易产生残余应力场, 过大的这种层间残余应力将导致明胶层或者陶瓷层的裂纹。根据层状复合材料不同层之间的残余应力公式^[19], 明胶与陶瓷层之间的残余应力为

$$\sigma_r = \frac{E_c}{1 - \nu_c} \left(1 + \frac{hE_c}{1 - \nu_c} \right) \frac{wE_g}{1 - \nu_g}^{-1}$$

式中: E_c 、 E_g 分别表示陶瓷层和明胶层的弹性模量; ν_c 、 ν_g 分别表示陶瓷层和明胶层的线膨胀系数;

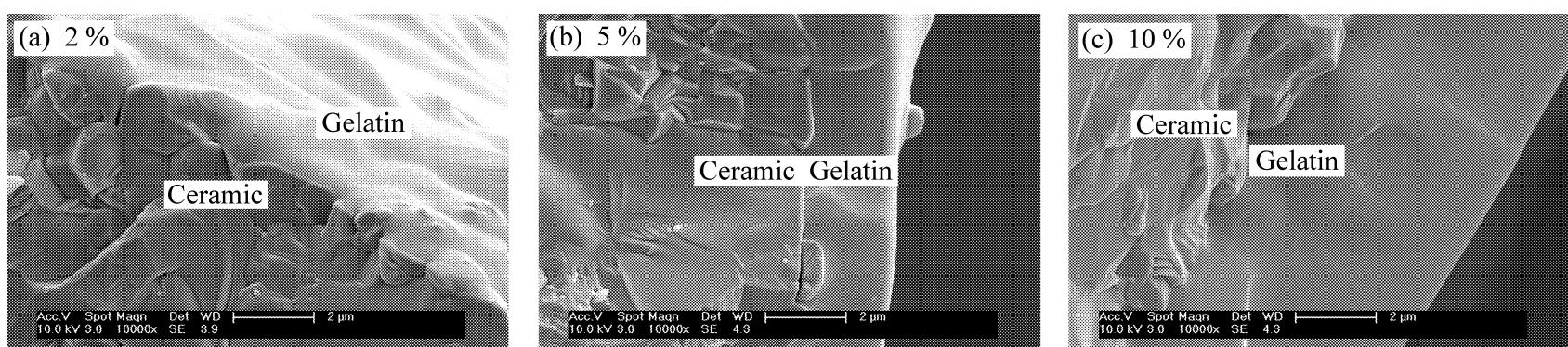
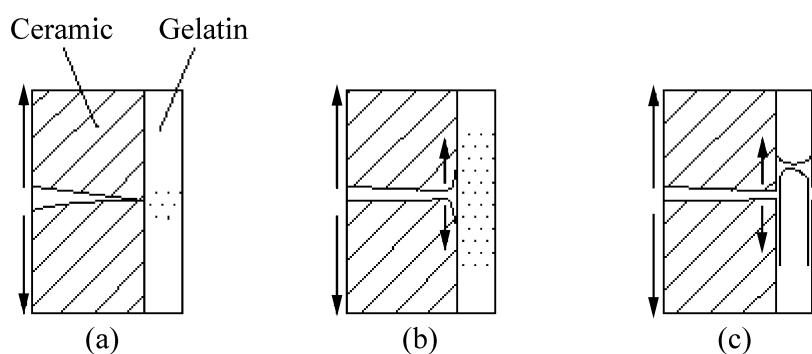


图5 渗涂明胶后多孔支架样品的断面形貌

Fig. 5 The cross-section morphology of porous scaffold samples after coating with different mass fractions of gelatin



((a) Crack propagating through the ceramic and blocked by the gelatin coating; (b) The gelatin/ceramic interface separated due to shearing stress and the crack propagating along the interface; (c) Crack across the gelatin coating and causing rupture)

图6 渗涂明胶后多孔支架样品中的裂纹扩展模式

Fig. 6 Crack- propagating mode in the porous scaffold samples after coating with gelatin

h 、 w 分别表示陶瓷层和明胶层的厚度; ϵ_r 为由于线膨胀失配引起的应变; ν 为泊松比。

由上式可知, 在一定的陶瓷基体上, E_c 、 E_g 、 ν 、 ϵ_g 、 h 和 ν 都为常数, 层间残余应力(σ_r) 随明胶层厚度(w) 的增加而增加。当渗透 10% 明胶溶液后, 孔壁上明胶涂层的厚度明显增加(图5(c)), 这时层间产生了过大的残余应力, 其结果是明胶复合涂层产生了大量的裂纹(图1(d)), 正是这些裂纹的存在导致了高浓度明胶处理后样品压缩强度和压缩模量的降低。

在骨组织支架的研究中, 也有研究者采用其它有机物或其它方法来增强多孔陶瓷支架并取得了一定的效果, 不过这些研究中样品的孔隙率通常比较低, 甚至很少提到样品的孔隙率。例如前面提到的 Mao 等^[11] 采用渗透 PLGA 的方法将 HA/TCP 多孔支架的压缩强度从 8.4 MPa 提高到了 32 MPa, 但文献并未提及样品的孔隙率; 而 Bgi 等^[20] 在陶瓷浆料中加入一定的明胶溶液将 CPC 多孔陶瓷的压缩强度从 2.8 MPa 增加到了 10.7 MPa, 样品的孔隙率却从 59% ~ 60% 降低到了 36% ~ 47%。相比之下, 本研究对多孔陶瓷支架进行渗透明胶处理取得了较好的增强效果, 尤其是渗透 5% 的明胶溶液后, 在保证样品高孔隙率(大于 80%) 的条件下, 将样品的压缩强度从 1.04 MPa ± 0.15 MPa 提高到了 5.17 MPa ± 0.17 MPa。

前期研究中, 我们已经通过体外细胞培养实验证明多孔钙磷陶瓷支架具有良好的生物相容性^[12,13]。明胶是胶原的部分变性衍生物, 含有大量有利于细胞黏附生长的功能侧基团。与多孔钙磷陶

瓷支架复合后, 仍能保持多孔支架良好的生物相容性。当然, 明胶也是一种水溶性聚合物, 即使是经过戊二醛交联后, 在体液环境下还可能发生轻微的溶胀^[21]。因此明胶涂层对多孔钙磷陶瓷的增强效果还需要通过体外浸泡或体内植入实验进一步研究。

3 结 论

采用有机泡沫浸渍法制备了具有高孔隙率和大孔结构的钙磷陶瓷多孔支架, 并通过渗透明胶处理在多孔陶瓷的孔壁表面成功地复合了与陶瓷基体紧密结合的明胶层。研究结果表明, 这种明胶陶瓷层状复合结构不会显著影响孔结构特征, 但是可以钝化应力集中和偏转裂纹扩展方向, 对多孔陶瓷支架起到很好的增强效果, 而且可以使样品的受力破坏方式由原来的整体脆断变为逐层断裂。在本研究中, 渗透 5% 明胶溶液后样品的孔隙率为 82.8 ± 0.4%, 压缩强度和压缩模量分别由处理前的 1.04 MPa ± 0.15 MPa 和 0.105 GPa ± 0.006 GPa 增加到 5.17 MPa ± 0.17 MPa 和 0.325 GPa ± 0.009 GPa。选择合适的聚合物在多孔陶瓷表面进行涂覆复合处理, 应是对多孔陶瓷支架进行增强处理的一种有效方法。

参考文献:

- [1] 左 奕, 李玉宝, 张 翔, 等. 纳米复合支架结构与生物学性能 [J]. 复合材料学报, 2005, 22(6): 32~36.
Zuo Yi, Li Yubao, Zhang Xiang, et al. Structure and biologic properties of nano - composite scaffold [J]. Acta Materiae Compositae Sinica, 2004, 22(6): 32~36.
- [2] Barlalet J E, Grover L, Gaunt T, et al. Preparation of macro-porous calcium phosphate cement tissue engineering scaffold [J]. Biomaterials, 2002, 23(15): 3063~3072.
- [3] Almiralla A, Larrecqa G, Delgado J A. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an - TCP paste [J]. Biomaterials, 2004, 25(17): 3671~3680.
- [4] Hing K A, Best S M, Bonefield D W. Characterization of porous hydroxyapatite [J]. J Mater Sci Mater Med, 1999, 10(3): 135~145.
- [5] De Oliveira J F, De Aguiar P F, Rossi A M, et al. Effect of process parameters on the characteristics of porous calcium phosphate ceramics for bone tissue scaffolds [J]. Int Soc Art Org, 2003, 27(3): 406~411.
- [6] Zhang Yu, Hockin H K X. Effects of synergistic reinforcement and absorbable fiber strength on hydroxyapatite bone

- cement [J]. *J Biomed Mater Res*, 2005, 75A(4): 832-840.
- [7] 石宗利, 王彦平, 戴刚, 等. CPP/PLLA 软骨组织工程支架复合材料初步研究 [J]. 复合材料学报, 2002, 19(6): 97-100.
Shi Zongli, Wang Yanping, Dai Gang, et al. CPP/PLLA composites of scaffolds for tissue engineering [J]. *Acta Materiae Compositae Sinica*, 2002, 19(6): 97-100.
- [8] Ramay H R R, Zhang M. Biphasic calcium phosphate nano-composite porous scaffolds for load bearing bone tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(21): 5171-5180.
- [9] Suya ma S, Kamada T, Itoh Y. Effect of structure of interfacial coating layer on mechanical properties of continuous fiber reinforced reaction sintered silicon carbide matrix composite [J]. *Journal of Materials Science*, 2002, 37(6): 1101-1106.
- [10] Miyazaki T, Ohtsuki C, Iwasaki H, et al. Organic modification of porous α -tricalcium phosphate to improve chemical durability [J]. *Materials Science Forum*, 2003, 426(4): 3201-3206.
- [11] Jiao X, Lim W K, Huang X, et al. Preparation and characterization of interpenetrating phased TCP/HA/PLGA composites [J]. *Materials Letters*, 2005, 59(29/30): 4000-4005.
- [12] 董寅生, 章庆国, 刘斌, 等. 磷酸盐粘结羟基磷灰石多孔支架及其生物相容性的研究 [J]. 生物医学工程杂志, 2005, 22(5): 985-989.
Dong Yinsheng, Zhang Qingguo, Liu Bin, et al. Study on hydroxyapatite porous scaffold bonded by phosphates and its biocompatibility [J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2005, 22(5): 985-989.
- [13] 刘朝红, 董寅生, 刘斌, 等. β -磷酸钙多孔生物陶瓷支架的制备及生物相容性 [J]. 东南大学学报, 2003, 34(5): 665-668.
Liu Chaohong, Dong Yinsheng, Liu Bin, et al. Preparation and biocompatibility of porous β -Ca₃(PO₄)₂ scaffold [J]. *Journal of Southeast University*, 2003, 34(5): 665-668.
- [14] Ergin N Ozgür, Tas A Cüneyt. Manufacture of macroporous calcium hydroxyapatite bioceramics [J]. *Journal of the European Ceramic Society*, 1999, 19(13/14): 2569-2572.
- [15] Inter mantel E, Mayer J, Blum J, et al. Tissue engineering scaffolds using superstructures [J]. *Biomaterials*, 1996, 17(2): 83-91.
- [16] Li Syu, Chang Jiang, Chou Lee. A novel bioactive porous CaSiO₃ scaffold for bone tissue engineering [J]. *J Biomed Mater Res*, 2006, 76A(1): 196-205.
- [17] Ujishiro Y, Takahashi K, Sato T. Preparation and compressive strength of α -tricalcium phosphate/gelatin gel composite cement [J]. *J Biomed Mater Res*, 2001, 54(4): 525-530.
- [18] 姚康德, 伊玉姬. 组织工程相关生物材料 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 49-83.
- [19] 张玉军, 张伟儒. 结构陶瓷材料及其应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 76-109.
- [20] Igi A, Bracci B, Panzavolta S. Effect of added gelatin on the properties of calcium phosphate cement [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(14): 2893-2899.
- [21] 蒋挺大. 胶原与胶原蛋白 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 28-30.