

改性羟基磷灰石/聚乳酸复合材料制备 及其生物相容性评价

杨春瑜¹, 杨春莉², 田晓红³, 柏树令³, 王淑静⁴, 赫美¹, 佟浩³

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 150076, 哈尔滨; 2. 哈尔滨商业大学轻工学院, 150028, 哈尔滨;
3. 中国医科大学基础医学, 110001, 沈阳; 4. 哈尔滨商业大学药学院, 150076, 哈尔滨)

摘要: 针对聚乳酸(PLLA)和羟基磷灰石(HA)两者复合时界面相容性差的问题,采用硅烷偶联剂十八烷基三氯硅烷(OTS)对 HA 颗粒进行了表面改性,通过热诱导相分离法制备了 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料. 扫描电镜结果表明,OTS-HA/PLLA 多孔复合材料中改性 HA 颗粒的分布较均匀,PLLA 和改性 HA 颗粒之间的界面相容性得到了改善. 孔隙率测试表明,OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的孔隙率均大于 90%,适合骨修复材料对孔隙率的要求. 细胞培养结果表明,复合材料对骨髓间充质干细胞的生长无抑制作用,细胞在材料表面能正常黏附、生长、增殖,具有良好的细胞附着形态和细胞增殖率,表现出了良好的生物相容性.

关键词: 表面改性;羟基磷灰石;骨修复材料;生物相容性

中图分类号: Q813.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2010)12-0114-05

Preparation and Biocompatibility Evaluation of Modified Hydroxyapatite/Poly L-Lactic Acid Composites

YANG Chunyu¹, YANG Chunli², TIAN Xiaohong³, BAI Shuling³,
WANG Shujing⁴, HE Mei¹, TONG Hao³

(1. College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. College of Light Industry,
Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China; 3. College of Basic Medicine, Chinese Medical University,
Shenyang 110001, China; 4. College of Medicine, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: In order to improve the interface compatibility between poly L-lactic acid(PLLA) and Hydroxyapatite (HA), octadecyltrichlorosilane (OTS) is used as a coupling agent to modify the surface of HA by a silanization reaction, and corresponding OTS-HA/PLLA porous composites are prepared by thermally induced phase separation method. Results from scanning electron microscopy show that OTS modification improves both the distribution of HA particles, and the interface compatibility between HA and PLLA. The porosities of OTS-HA/PLLA porous composite are greater than 90%, which well meets the requirement of bone regeneration materials. Also, results of in vitro cells cultivation show no negative effects on the growth of BMSCs(bone mesenchymal stem cells). The cells can well adhere and grow on the surface, and excellent cell spreading and proliferation are observed. The OTS-HA/PLLA porous composites show good biocompatibility.

Keywords: surface modification; hydroxyapatite; bone regeneration material; biocompatibility

近几十年来,大量研究已经证明,无机生物陶瓷材料羟基磷灰石(HA)的化学成分与人体骨组织的矿物质相似,可与自然骨化学键合,具有良好的生物性能,因而成为生物材料研究领域的热点之一^[1]. HA 通常以涂层材料^[2-4]或与壳聚糖^[5]、硅橡胶^[6]、聚乙烯^[7]等复合使用.

但是,HA 颗粒表面亲水而憎油,这与聚合物基质的特性恰恰相反,这种差异易引起 HA 颗粒与聚合物的界面相容性差、结合界面不稳定、颗粒分散均匀性差且易团聚,而界面结合状态与颗粒分散的均匀度恰恰是决定复合材料性能的最重要的因素之一.因此,对 HA 颗粒表面进行有机化改性,改善其与有机聚合物基材的界面相容性是提高复合材料使用性能的关键.近年来,有大量的研究报导了 HA 颗粒的表面改性工作^[8],采用的方法包括焦磷酸改性^[9]、柠檬酸改性^[10]、电子沉积^[11]等,这些工作虽然获得了表面改性的 HA,但是对改性后的 HA 与可降解聚合物所形成的复合材料的研究却较为缺乏,经过改性后的 HA 能否改进复合材料的性能还需进一步的研究.

针对聚乳酸(PLLA)和 HA 两者复合时界面相容性差的问题,本文采用硅烷偶联剂十八烷基三氯硅烷(OTS)对 HA 颗粒进行了表面改性,通过热诱导相分离法制备了 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料,并采用扫描电镜(SEM)、孔隙率测试和细胞培养等方法,进一步对 OTS 改性 HA 颗粒和聚合物基材的界面相容性和 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的生物学性能进行了表征.

1 实验方法

1.1 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的制备

OTS 改性 HA 颗粒的制备参见文献^[12]. OTS-HA/PLLA 多孔复合材料制备的具体步骤如下:首先用移液管移取 30 mL 二氧六环到锥形瓶里,再称量 0.3 g PF127 放入盛有二氧六环的锥形瓶中,至 PF127 完全溶解;然后称取 0.3 g 的 OTS 改性 HA 颗粒放入锥形瓶中,通过搅拌将改性颗粒充分地分散在溶液中;将上述溶液用水浴加热到 80 ℃,称取 PLLA 粉末 1 g,加入到溶液中保持回流并充分搅拌约 30 min;待上述溶液混合均匀后,将烧杯置入冰箱中保持-12 ℃约 12 h,再将锥形瓶取出放入真空冷冻干燥机中干燥 3~4 d,即得 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料.

各试样制备时,OTS 改性 HA 颗粒中 OTS 的

质量分数见表 1.

表 1 OTS 改性 HA 颗粒中 OTS 的质量分数

样品编号	SF1	SF2	SF3	SF4
OTS 的质量分数/%	0	4.8	9.1	13.1

1.2 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的 SEM 表征

通过 SEM 观察 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的微观结构,多孔复合材料经液氮脆断、断口喷金处理后,采用场发射电子显微镜(FEI SIRION)观察材料表面形貌、HA 的分布以及孔径大小.

1.3 PLLA/OTS-HA 多孔复合材料的孔隙率

以 W_1 代表多孔复合材料干燥时的质量.将多孔复合材料样品放入容器中,在抽真空负压条件下浸泡在乙醇或水介质中,多次抽真空使得多孔复合材料样品的孔隙中完全浸满乙醇或水.用 W_2 代表浸满乙醇或水的多孔复合材料样品的质量, W_3 代表浸满乙醇或水的多孔复合材料样品在介质中的悬浮质量.多孔复合材料样品的孔隙率为

$$P = (W_2 - W_1) / (W_2 - W_3) \quad (1)$$

1.4 MTT 法测定 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的细胞增殖能力

将改性前、后的 OTS-HA/PLLA 材料切成相同尺寸的 9 块,用环氧己烷消毒.在无菌缓冲间内将样品放进 24 孔培养板,用微量移液器在每孔里接种 400 μ l 的细胞悬液(细胞悬液浓度为 10^5 个/ml),置于无菌室 CO₂ 培养箱中培养.再在 3 个空白孔中接种相同量的细胞悬液作为阴性对照,并定期换液.培养 1 d 和 3 d 后分别取材料样品观察,每天取 3 个平行样,将样品移至另一 24 孔培养板中,加 3-甲基-2-噻唑硫酮(MTT)孵育液(培养基 360 μ l,MTT40 μ l),继续在 CO₂ 箱培养中培养 4 h 后,将样品移至另一 24 孔培养板中,用微量移液器在材料上加入二甲基亚砷(DMSO)200 μ l,室温静止 0.5 h,移取反应后的液体 100 μ l 在酶标仪中分别测定吸光值(OD 值),结果取平均值.

1.5 PLLA/OTS-HA 多孔复合材料的细胞形态

将改性前、后的 OTS-HA/PLLA 材料分别切成相同尺寸的 9 块,用环氧己烷消毒.在无菌缓冲间内将样品放进 24 孔培养板,用微量移液器在每孔里接种 400 μ l 的细胞悬液(细胞悬液浓度为 10^5 个/ml),置于无菌室 CO₂ 培养箱培养中培养.在培养 2 d 和 5 d 后将样品取出观察,每天取 3 个平行样,用 PBS 清洗 3 次后,用 25 g/L 戊二醛固定,梯度乙醇

脱水,临界点干燥,横断面表面喷金,用 SEM 观察细胞形态.

2 实验结果与讨论

2.1 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的 SEM 表征

为了对 OTS 改性 HA 颗粒在 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料中的分散性进行研究,采用 SEM 观察了 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的微观结构,OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的表面形貌如图 1 所示,从图 1 中可以看到,用 OTS 改性后的 HA 颗粒制备的多孔复合材料中,改性 HA 颗粒在聚合物基体 PLLA 中都是均匀分布的,OTS 的质量分数越大,复合材料表面越致密.

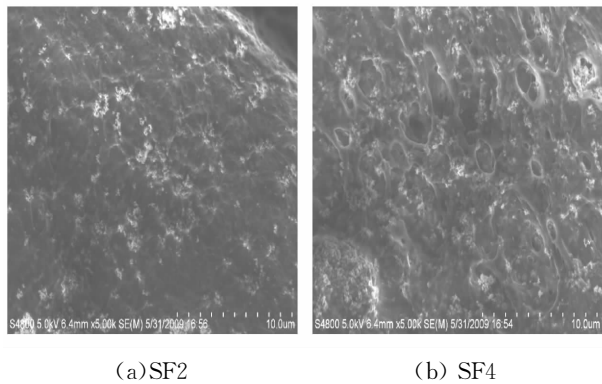


图 1 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的 SEM 图

为了表征 OTS 改性 HA 颗粒和聚合物基材的界面相容性,采用 SEM 电镜观察纯 HA/PLLA 多孔复合材料和 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的微观结构上的区别.图 2 是聚合物基体 PLLA 与无机 HA 颗粒在质量比为 1 : 0.3(复合工艺完全相同)时的复合材料的 SEM 图.从图 2a 可以看出,在纯 HA/PLLA 样品中,HA 颗粒与 PLLA 之间的界面非常清晰,表示界面相容性不好,而图 2b 经过硅烷偶联剂 OTS 改性的 HA 颗粒制备的 OTS-HA/PLLA 样品中,改性 HA 颗粒与 PLLA 的界面不明显,说明结合紧密,改性 HA 颗粒和 PLLA 的界面相容性良好.

改性后的试样能保持良好界面结合的可能原因有:①纳米级的 HA 颗粒的表面能极高,因此与 PLLA 的相容性不好,而经过 OTS 改性,可以有效降低 HA 颗粒的表面能,从而使 PLLA 和改性 HA 颗粒的界面相容性变好;②HA 颗粒经 OTS 改性后,因 OTS 的端基为十八烷基,长链的柔顺性良好,因此可以和 PLLA 的链段发生相互缠绕,从而可以形成紧密的结合,使改性 HA 颗粒和 PLLA 之间的亲

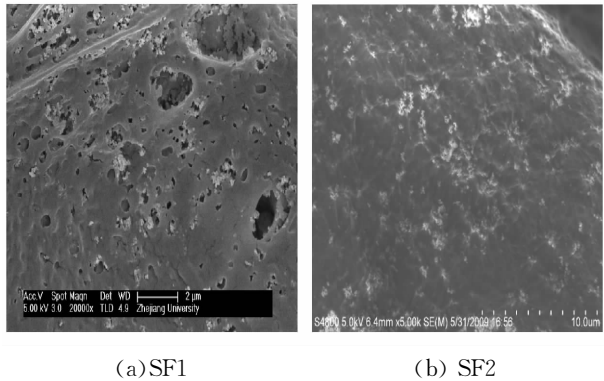


图 2 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的 SEM 图

和力得以提高,进而有效地改善 HA/PLLA 的界面相容性.

OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的力学性能测试结果表明:与未改性前相比,弹性模量可以提高到 3 倍之多,抗压强度可以提高到近 2 倍^[12].力学性能的测试结果与 SEM 图的测试结果相吻合,这表明 HA 颗粒经 OTS 改性后,与 PLLA 的界面相容性变得良好,因而可以有效地提高复合材料的力学性能.

2.2 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的孔隙率测试

不同 OTS 含量改性 HA 颗粒的 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的孔隙率如表 2 所示.从表 2 中可以看到,OTS 的质量分数对制备的多孔复合材料的孔隙率的影响不明显,同时复合材料的孔隙率大于 90%,意味着对新生骨的长入非常有利.

表 2 OTS 质量分数对 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料孔隙率的影响

样品编号	SF1	SF2	SF3	SF4
孔隙率/%	92.3	92.1	92.5	91.9

2.3 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的生物相容性评价

2.3.1 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的 MTT 值测试 采用 MTT 法测定了 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的细胞增殖能力.MTT 法的原理是活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能将四唑盐还原成不溶于水的紫蓝色结晶物甲瓚,并沉淀在细胞中,而死细胞没有这种功能.二甲基亚砜(DMSO)能溶解沉积在细胞中的紫蓝色结晶物甲瓚,溶液颜色的深浅与所含的甲瓚量成正比,因此可以通过用酶标仪测定的吸光值来间接反映活细胞的数量.OTS 改性 HA 颗粒对多孔复合材料增值能力的影响如图 3 所示.由图 3 可以看出,OTS 改性前、后的多孔复合材料

的活细胞增殖能力基本上保持不变,而且两者的活细胞增殖能力都是随着时间的增加而增长,这说明本文研究的 OTS 的接枝技术是合理可行的,OTS 改性 HA 颗粒在形成 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料后,对骨髓间充质干细胞(BMSCs)的生长没有产生不良影响,复合材料的生物相容性良好.

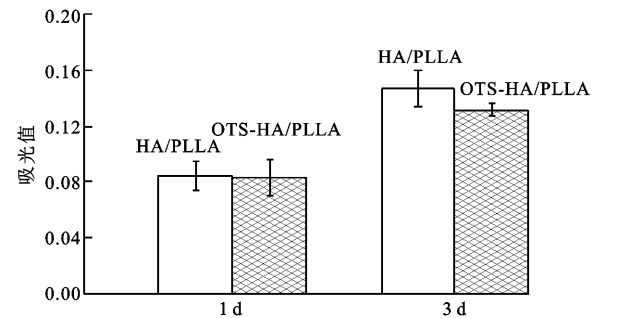


图 3 OTS 改性 HA 颗粒对多孔复合材料增殖能力的影响

2.3.2 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料细胞形态观测 通过对 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料表面细胞生长状态进行 SEM 观察,以辅助评价该复合材料的生物相容性.图 4 为种植 BMSCs 后的 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的 SEM 图.从图 4 可以看出,OTS-HA/PLLA 复合材料对 BMSCs 的生长

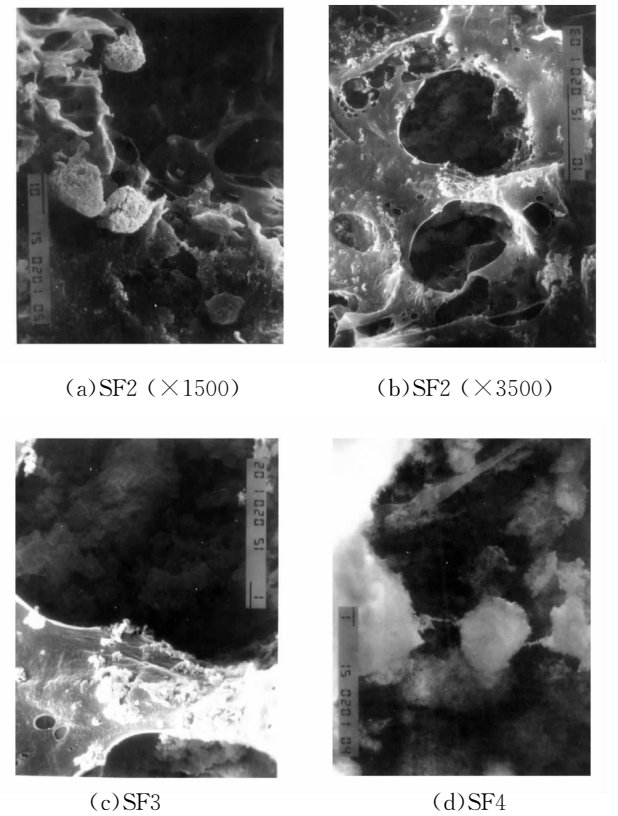


图 4 种植 BMSCs 后的 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的 SEM 图

无抑制作用,未发生细胞毒性反应,细胞在材料表面能够正常黏附、生长、增殖,具有良好的细胞附着形态和细胞增殖率.实验结果进一步证明,OTS 改性 HA 颗粒与 PLLA 复合形成的多孔复合材料的力学性能有所提高,而对多孔材料的生物特性没有不良影响.

3 结 论

本文通过热诱导相分离法制备了 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料.采用 SEM 对 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的微观结构的观察结果表明,OTS 改性 HA 颗粒和聚合物基材的界面相容性良好.采用 MTT 法测定了 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的细胞增殖能力,同时通过对 OTS-HA/PLLA 多孔复合材料表面细胞生长状态进行 SEM 观察,结果证明所制备的复合材料的生物相容性良好.

(1)SEM 结果表明:OTS-HA/PLLA 多孔复合材料中改性 HA 颗粒是均匀分布的,PLLA 和改性 HA 颗粒之间的界面相容性得到了改善.

(2)孔隙率测试表明:OTS-HA/PLLA 多孔复合材料的孔隙率均大于 90%,适合骨再生材料对孔隙率的要求.

(3)体外细胞培养结果表明:复合材料对 BMSCs 的生长无抑制作用,细胞在材料表面能正常黏附、生长、增殖,均具有良好的细胞附着形态和细胞增殖率,OTS-HA/PLLA 多孔复合材料表现出良好的生物相容性.

参考文献:

[1] SILVA R V, CAMILLI J A, BERTRAN C A, et al. The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats [J]. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2005, 34(2): 178-184.

[2] YUAN Qinhu, SAHU L K, NANDIKA A, et al. Synthesis of hydroxyapatite coatings on metal substrates using a spincasting technique [J]. Materials Chemistry and Physics, 2009, 116(2/3): 523-526.

[3] TROMMER R M, SANTOS L A, BERGMANN C P. Alternative technique for hydroxyapatite coatings [J] Surface and Coatings Technology, 2007, 201 (24): 9587-9593.

[4] LU Yupeng, CHEN Yanmei, LI Shitong, et al. Surface nanocrystallization of hydroxyapatite coating [J]. Acta Biomaterialia, 2008, 4(6): 1865-1872.

- [5] MADHUMATHI K, BINULAL N S, NAGAHAMA H, et al. Preparation and characterization of novel β -chitin-hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2009, 44(1):1-5.
- [6] WEN Jiqu, LI Yubao, ZUO Yi, et al. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/silicone rubber composite[J]. Materials Letters, 2008, 62(19): 3307-3309.
- [7] GUILD F J, BONFIELD W. Predictive modeling of hydroxyapatite-polyethylene composite [J]. Biomaterials, 1993, 14(13): 985-993.
- [8] BORUM-NICHOLAS L, WILSON J O C. Surface modification of hydroxyapatite: part I dodecyl alcohol [J]. Biomaterials, 2003, 24(21): 3671-3679.
- [9] TANAKA H, FUTAKA M, HINO R, et al. Structure of synthetic calcium hydroxyapatite particles modified with pyrophosphoric acid [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2005, 283(2): 609-612.
- [10] QIU Hongjin, YANG Jian, KODALI P, et al. A citric acid-based hydroxyapatite composite for orthopedic implants [J]. Biomaterials, 2006, 27(34): 5845-5854.
- [11] PANG Xin, ZHITOMIRSKY I. Electrophoretic deposition of composite hydroxyapatite-chitosan coatings [J]. Materials Characterization, 2007, 58(4): 339-348.
- [12] YANG Chunli, CHENG Kui, WENG Wenjian, et al. OTS-modified HA and its toughening effect on PLLA/HA porous composite [J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2009, 20(3): 667-672.

(编辑 刘杨 赵大良)