

微振动应力环境影响羟基磷灰石陶瓷生物活性 及力学稳定性的体外评价

吴金结, 李艳, 魏仁初, 汪建新, 屈树新, 翁杰, 智伟

(西南交通大学 材料科学与工程学院, 材料先进技术教育部重点实验室, 成都 610031)

摘要: 本研究考察微振动应力环境(MVS)下羟基磷灰石(HA)陶瓷的生物活性及力学稳定性, 探讨体内生理应力环境对 HA 陶瓷骨诱导性的影响。扫描电子显微镜(SEM)和钙离子释放结果均显示, MVS 有利于具有较高微孔隙率(($29\pm 1.2\%$), ($26.4\pm 0.3\%$))HA 材料的钙离子再沉积和类骨磷灰石层形成, 而对于微孔隙率较低(($10.6\pm 0.8\%$))的 HA 材料则促进其钙离子释放。蛋白吸附结果显示 40 Hz 的 MVS 促进了 HA 的蛋白吸附, 60 Hz 的 MVS 则显著抑制 HA 的蛋白吸附行为。抗压试验表明 MVS 应力环境并未影响 HA 多孔支架的力学稳定性。研究表明应力环境是影响 HA 陶瓷生物活性和骨诱导性的重要因素。

关键词: 微振动; 羟基磷灰石; 生物活性; 力学稳定性

中图分类号: R318; TQ174 文献标识码: A

Bioactivity and Mechanical Stability of Hydroxyapatite Ceramics under Micro-vibration Environment

WU Jin-Jie, LI Yan, WEI Ren-Chu, WANG Jian-Xin, QU Shu-Xin, WENG Jie, ZHI Wei

(Key Laboratory of Advanced Technologies of Materials (Ministry of Education), School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

Abstract: This study investigated the bioactivity and mechanical stability of hydroxyapatite (HA) ceramics under micro-vibration stress environment (MVS), and explored influence of physiological stress environment on osteoinductivity of HA ceramics. Results of scanning electron microscopy (SEM) and calcium ion release showed that MVS was beneficial for calcium ion re-deposition and bone-like apatite layer formation in HA with high micro-porosity (($29\pm 1.2\%$), ($26.4\pm 0.3\%$), respectively), while calcium ion release of HA materials with a lower micro-porosity (($10.6\pm 0.8\%$)) was promoted. Protein adsorption results displayed that 40 Hz MVS promoted while 60 Hz MVS significantly inhibited HA protein adsorption behavior. The compression tests demonstrated that stress environment of MVS did not affect the mechanical stability of the HA scaffolds. Our results suggested that stress environment is an important factor affecting the bioactivity and osteoinductivity of HA ceramics.

Key words: micro-vibration; hydroxyapatite; bioactivity; mechanical properties

羟基磷灰石(HA)陶瓷作为骨骼的主要无机成分, 具有良好的生物相容性、骨传导性以及潜在的

骨诱导能力^[1-3], 作为骨修复替代材料和组织工程骨的支架材料被广泛应用于临床骨缺损治疗中^[4-5]。

收稿日期: 2018-05-21; 收到修改稿日期: 2018-07-21

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC1102000, 2016YFB0700800); 国家自然科学基金(31400809); 国家大学生创新训练计划(201810613060)

National Key Research and Development Program of China (2016YFC110200, 2016YFB0700800); National Natural Science Foundation of China (31400809); National College Student Innovation Training Program (201810613060)

作者简介: 吴金结(1997-), 男, 本科生. E-mail: wujinjie1218@163.com

通讯作者: 智伟, 工程师. E-mail: zhiwei@home.swjtu.edu.cn

由于材料的生物活性以及力学稳定性在植入初期对骨组织再生过程起着至关重要的作用^[6-8],因此有必要对其生物活性及力学稳定性进行体外评价。

研究证实骨原位环境中磷酸钙陶瓷具有骨诱导活性,其诱导触发机制是从磷酸钙陶瓷中释放出的 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 、 HPO_4^{2-} 导致材料周围体液环境出现离子局部过饱和状态,继而在材料表面形成包含钙离子、磷酸根和其他离子(Mg^{2+} , Na^+ , CO_3^{2-})的类骨磷灰石层,同时也使蛋白质和其它有机物沉积其中^[3,9]。因此磷酸钙陶瓷生物活性体外评价通常考察材料的化学成分、宏观和微观几何结构以及孔隙率等材料因素对钙离子释放、蛋白吸附、钙磷矿化沉积和体外降解性能的影响。但研究同时也发现,生物陶瓷骨诱导性的体外评价结果与体内评价结果之间常出现较大差异^[10]。

目前对生物陶瓷骨诱导性的体外评价方式通常在静态环境中进行^[11],而如果考虑到材料植入后所处的生理应力环境,在体外考察应力环境作用下材料的生物活性行为就可能更具真实性和准确性^[12-13]。此外,骨作为承力组织始终处于持续的应力负荷状态,研究应力环境下对材料力学性能的影响非常必要^[14]。

微振动(Micro Vibration Stress, MVS)是振幅 $\leq 50 \mu\text{m}$ 、强度 $< 1 \text{ g}$ 、频率范围在 $1\sim 100 \text{ Hz}$ 的极低幅度、低强度、低频率的应力刺激^[15-16],被认为是一种生理适宜性的力学刺激,具有良好的促进骨形成和骨重建效应^[17-18]。研究表明,微振动所引起的流体双向流动可以模拟生理运动状态下骨组织中组织液的双向流动方式,能促进基质细胞向成骨分化,是一种能真实模拟生理应力环境的体外加力方式^[10,19]。但迄今为止,针对微振动应力环境与材料生物活性及力学性能之间相关性的研究尚未见报道。

基于此,本研究采用前期工作中建立的溶胶-凝胶法制备了HA材料^[20-22],考察了MVS对HA材料钙离子释放^[23]、蛋白吸附^[24-25]、生物矿化^[26-28]和抗压性能^[29]的影响,并初步探讨了力学因素对磷酸钙陶瓷骨诱导行为的调控作用。

1 实验方法

1.1 原料及试剂

氯化钠、碳酸氢钠、氯化钾、磷酸氢二钾、氯化镁、*N,N*-二甲基乙酰胺(Dimethylacetamide, DMAC),盐酸、氯化钙、硫酸钠、Tris均为分析纯,由成都科龙化工试剂厂出品。直径 $20 \mu\text{m}$ 的球状HA粉体由四川大学国家生物医学材料工程技术研究中

心制备。血清白蛋白(BSA)由美国BI公司生产;无钙镁离子的PBS缓冲液由美国GIBCO公司生产;钙离子试剂盒、BCA法蛋白定量测试盒由南京建成生物制剂有限公司生产。

1.2 微振动参数

采用自主设计制备的微振动培养一体装置(中国发明专利申请号:201610900515.6;实用新型专利授权号:ZL 201621126644.6)。目前的研究显示振幅为 $50 \mu\text{m}$,强度 0.3 g 的微振动应力刺激最有利于诱导细胞的成骨分化^[15],振动频率在 $25\sim 50 \text{ Hz}$ 范围内上调成骨细胞的成骨基因表达和促进骨形成,而 60 Hz 以上则倾向于抑制细胞增殖^[16],因此在本研究中将样品分为 40 Hz 组、 60 Hz 组、静态组。将微振动组样品牢固固定于振动台台面上。振动参数设置为:振幅 $50 \mu\text{m}$,强度 0.3 g ,频率分别为 40 Hz 、 60 Hz ,振动方向及波形:垂直正弦振动。

1.3 HA陶瓷材料制备

1.3.1 制备具有不同表面微孔隙率的HA片

将 5 g 无水氯化锂加入 100 mL DMAC中,加入 0.7 g 甲壳素,溶解后形成溶胶。按照HA/Chitin质量比 $10:1$ 、 $20:1$ 和 $35:1$ 分别向溶胶体系中加入HA粉末,搅拌均匀,密封静置 24 h 后倒入 24 孔板内,每孔加入 4 mL 浆料,静置 2 h 后加入去离子水得到凝胶化的HA片。用去离子水将三组样品充分洗涤后干燥,常压烧结至 $1200 \text{ }^\circ\text{C}$ (升温速率为 $2.5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$)即得到具有不同微孔隙率的HA片,分别用HA₁₀、HA₂₀、HA₃₅表示。

1.3.2 模板法制备HA多孔支架

按照本课题组前期发明的方法^[26],即将 5 g 无水氯化锂加入 100 mL DMAC中,加入 0.7 g 甲壳素,溶解后形成溶胶。按照HA/Chitin质量比 $20/1$ 向溶胶体系中加入HA粉末,搅拌均匀,密封静置 24 h 后将浆料注入石蜡球粒堆积的模具中,推入去离子水中得到凝胶化的多孔HA支架粗坯。用去离子水充分洗涤样品使材料粗坯中绝大部分 Li^{2+} 溶出,以保证余下痕量 Li^{2+} 不会对材料的生物学性能产生影响^[30]。 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥,常压烧结至 $1200 \text{ }^\circ\text{C}$ (升温速率为 $2.5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$)即得到HA多孔支架。

1.4 材料表征

利用密度法测定HA片的微孔隙率;采用液体置换法测定HA多孔支架的总孔隙率。Brunauer-Emmett-Teller (BET)法计算HA片的比表面积;扫描电子显微镜(FEI Quanta 200)观察分析材料的表面微形貌;X-射线衍射仪(XRD, XD1000)分析材料相组成。密度法测定孔隙率的公式如下:

$$P = 1 - \frac{V_0}{V_1} = 1 - \frac{m / \rho_0}{\frac{4}{3}\pi R^3} = 1 - \frac{6m}{\pi\rho_0 D^3} \quad (1)$$

ρ_0 为 HA 理论密度(3.16 g/cm³); m 为单颗 HA 球形颗粒的质量; V_0 为致密的 HA 球形颗粒的体积; V_1 为实测 HA 球形颗粒的体积。

液体置换法测定总孔隙率的公式如下:

$$P = \frac{V_2 - V_1}{V_3} \quad (2)$$

1.5 MVS 对 HA 陶瓷生物活性的影响

取三组 HA(HA₁₀、HA₂₀、HA₃₅)片按 5 g/100 mL 的比例浸泡在不含钙镁的 PBS 中,置于 37 °C,分为 40 Hz 组、60 Hz 组和静态组,在浸泡 3、7、14 d 后,取样品上清液,在碱性环境中与甲基百里香酚蓝(MTB)结合,生成蓝色络合物,通过比色与同样处理的钙标准进行比较,计算样本中钙离子的含量,再计算样品单位质量钙离子释放浓度。

取三组 HA(HA₁₀、HA₂₀、HA₃₅)片按 5 g/100 mL 的比例加入 2 mg/mL 的 BSA 溶液,置于 37 °C,分为 40 Hz 组、60 Hz 组和静态组,浸泡 1、3 d 后,用 BCA 试剂盒测定上清液中蛋白质含量,再根据质量守恒原则计算单位样品蛋白吸附量。

取三组 HA(HA₁₀、HA₂₀、HA₃₅)片按 5 g/100 mL 的比例浸泡在仿生矿化液 SBF 中,置于 37 °C,分为 40 Hz 组、60 Hz 组和静态组,进行仿生矿化实验,每 24 h 更换一次,共矿化 3、7 d。纯净水和乙醇轻柔冲洗样品,80 °C 干燥 24 h,用扫描电镜观察矿化沉积物形貌,EDS 能谱分析钙磷比。

1.6 力学稳定性测试

将多孔 HA 支架分为 40 Hz 组、60 Hz 组和静态组,按照 5 g/100 mL 的比例浸入无钙镁 PBS 缓冲液中,置于 37 °C,在 0、7、14 d 取样,用纯净水和无水乙醇轻柔冲洗样品,150 °C 干燥 24 h,用电子万能力学测试机(INSTRON, 美国)测试(载荷速率为 0.5 mm/min, 载荷测量精度为 1 N, 变形测量精度为 0.005 mm)函数记录仪记录载荷-变形曲线。

2 结果与讨论

2.1 成分分析及表面微形貌观察

烧结后三组 HA 片和 HA 多孔支架的 XRD 结果(图 1)显示,各组样品经过 1200 °C 高温烧结后,在约 26°、32°、40°、47°、50°的位置均出现了明显的 HA 特征峰,与标准图谱完全吻合(JCPDS09-0432),且未见其他杂相,说明本研究所制备的 HA 材料在制备和烧结过程中没有引入其他物质。

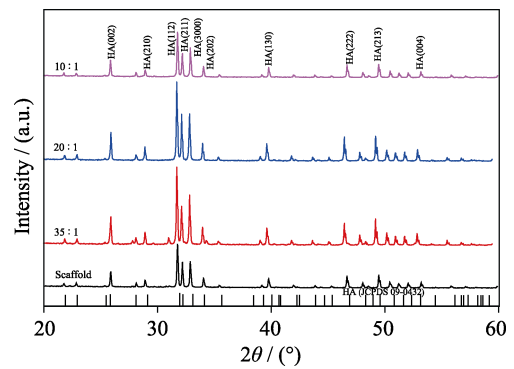


图 1 HA₁₀、HA₂₀、HA₃₅ 和 HA 多孔支架烧结后 XRD 图谱
Fig. 1 XRD patterns of HA₁₀, HA₂₀, HA₃₅ and porous HA scaffolds

扫描电镜观察结果显示(图 2), HA₁₀ 表面存在大量微孔,且尺寸分布在 10 μm 以下,部分微孔尺寸小于 1 μm, HA₂₀ 微孔数量少于 HA₁₀, HA₃₅ 表面光滑、致密,仅存在少数微孔。多孔 HA 支架的总孔隙率为(87.7±2.2)%,其表面形貌与 HA₂₀ 相似,这是因为两者的浆料配制比例相同。

2.2 MVS 应力环境下 HA 材料的钙离子释放

微孔隙率检测及 BET 测试结果显示,随着 HA 粉体比例的提高,HA 片微孔隙率呈显著下降趋势,HA₁₀ 微孔隙率为(29±1.2)%,比表面积为 121.97 m²/g; HA₂₀ 微孔隙率为(26.4±0.3)%,比表面积为 87.41 m²/g; HA₃₅ 微孔隙率为(10.6±0.8)%,比表面积为 16.53 m²/g。

钙离子释放结果显示(图 3),三组 HA 片在静态和微振动环境下其单位质量钙离子释放浓度均随时间延长而增加,这说明钙离子释放具有时间累积效应。静态组中随着 HA 材料微孔隙率的降低, Ca²⁺ 释放浓度随之显著下降,这是因为比表面积的降低

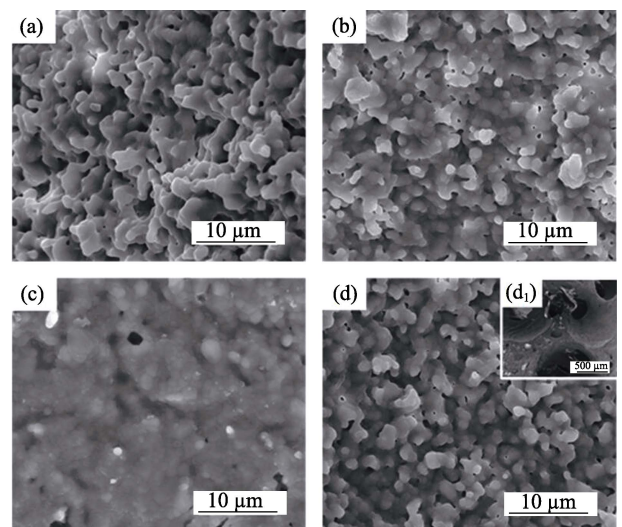


图 2 HA 材料的 SEM 照片
Fig. 2 SEM images of HA materials
(a) HA₁₀; (b) HA₂₀; (c) HA₃₅; (d) HA porous scaffold; (d₁) Partial magnification of porous scaffolds

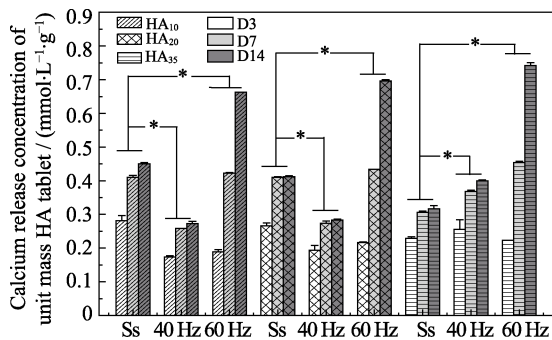


图 3 微振动对不同微孔隙率 HA 陶瓷片钙离子释放的影响
Fig. 3 Calcium release concentration of HA slices with different mass fraction (HA₁₀, HA₂₀, HA₃₅) under 40 Hz and 60 Hz frequency and static state incubation environment at d3, d7 and d14 (* represents statistical difference, $P < 0.05$)

使得钙磷溶解度减小;而振动组(40 Hz 组和 60 Hz 组)的结果却呈相反趋势,随着微孔隙率的降低, Ca^{2+} 释放浓度呈显著上升趋势。此外,对于具有较高微孔隙率(10%)的 HA 材料,在 40 Hz 的 MVS 应力环境下 Ca^{2+} 释放浓度显著低于静态环境,而在 60 Hz 时 Ca^{2+} 释放浓度在初期降低,随后显著增高;对于微孔隙率较低(35%)的 HA₃₅ 组,随着频率的增加, Ca^{2+} 释放浓度相较于静态环境则始终呈现显著上升的趋势。这说明 40 Hz 应力环境能促进具有较高微孔隙率 HA 材料的钙离子再沉积,同时有利于具有低微孔隙率 HA 材料的钙磷溶解;而 60 Hz 应力环境则能促进全部 HA 材料的钙磷溶解。这可能是由于对于微孔隙率较高的 HA 材料来说,其本身较大的比表面积有利于钙离子的释放,局部钙离子浓度已经接近饱和浓度,中低频(40 Hz)的 MVS 所引起的流体双向流动使材料局部钙离子浓度很快达到过饱和,从而引起了钙磷的再沉积,因此溶液中钙离子浓度较静态组显著降低;而高频(60 Hz)MVS 尽管在早期也引起了钙磷的再沉积,但高频所致的流场流体行为最终更利于钙离子释放。对于低微孔隙率 HA 材料,其比表面积较小,钙离子释放少,因此 MVS 对其的影响以促进钙离子释放为主,频率越高,钙离子释放越多。此外,材料在静态环境和中低频 MVS 应力环境中的钙离子释放在沉积到第 14 d 时已经趋于平衡状态,而在高频 MVS 应力环境中则明显仍以钙离子释放为主。Zhi 等^[10]的研究证实微孔隙率通过对磷酸钙生物陶瓷比表面积的影响来调控蛋白吸附和钙离子的释放/再沉积过程,从而影响磷酸钙陶瓷的生物活性。本研究的结果则进一步表明应力环境和材料结构因素对于材料钙离子释放/再沉积过程具有共同调控作用。

2.3 MVS 应力环境下 HA 材料的蛋白吸附研究

蛋白吸附结果(图 4)显示,三组 HA 片在静态环

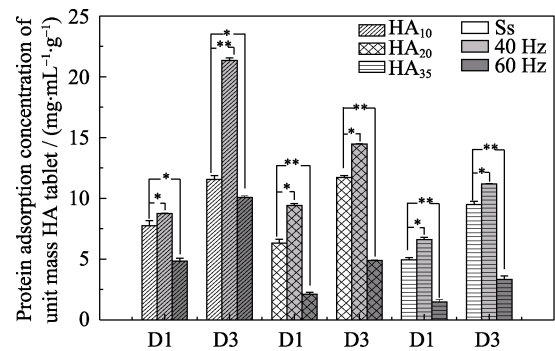


图 4 微振动对不同微孔隙率 HA 片蛋白吸附的影响
Fig. 4 Protein adsorption concentration of HA discs with different mass fraction (HA₁₀, HA₂₀, HA₃₅) under 40 Hz and 60 Hz frequency and static state incubation environment at d1 and d3 (* represents statistical difference, $P < 0.05$)

境和 MVS 应力环境下单位质量吸附量均随时间增加,并随着微孔隙率的降低而呈现下降趋势,这说明 HA₁₀ 在表面具有最多吸附位点,这应该与其具有最大比表面积相关。40 Hz 的 MVS 应力环境下三组 HA 片的蛋白吸附量均显著高于静态环境,而 60 Hz 的 MVS 应力环境下三组 HA 片的蛋白吸附量又显著低于静态组。这可能与 MVS 环境下流体在材料表面流动带来的剪切应力有关^[10],不同频率的 MVS 明显影响了流体的剪切应力,从而对材料的蛋白吸附行为造成了显著的影响。表面吸附蛋白质是生物材料植入体内后在体液环境下的初始行为,这一行为对于随后发生的细胞行为及最终植入物的使用效果起着重要的作用^[24]。一般认为,材料对蛋白的吸附量与其比表面积呈正性相关^[31-32]。本实验结果与该结论一致,并进一步揭示了应力环境在磷酸钙陶瓷蛋白吸附行为中所起到的重要调控作用。

2.4 MVS 应力环境下 HA 材料的仿生矿化研究

三组 HA 片在静态和 MVS 应力环境中置于 SBF 溶液中分别浸泡 3 和 7 d 后,表面矿化情况如图 5 所示。在静态环境中,矿化 3 d 后,HA₁₀ 组和 HA₂₀ 组均在表面观察到大量片状矿化物沉积,HA₃₅ 组则为散开的片状和颗粒状矿化物混合沉积,且矿化沉积物分布为 HA₁₀ 组 > HA₂₀ 组 > HA₃₅ 组(图 5(a₁)、(a₃)、(a₅))。7 d 后在 HA₁₀ 组和 HA₂₀ 组表面的片状矿化层覆盖更为密集,而在 HA₃₅ 组表面沉积的矿化物较 3 d 时明显增多,主要以颗粒状和絮状为主(图 5(a₂)、(a₄)、(a₆))。在 40 Hz 的 MVS 应力环境下,HA₁₀ 组和 HA₂₀ 组在矿化 3 d 时即观察到材料表面有均匀致密的颗粒状矿化层的覆盖,并在矿化层上观察到絮状矿化沉积物,HA₃₅ 组表面颗粒状矿化沉积物零散分布(图 5(b₁)、(b₃)、(b₅)); 7 d 时 HA₁₀ 组和 HA₂₀ 组矿化层明显增厚,矿化层上的絮状矿化

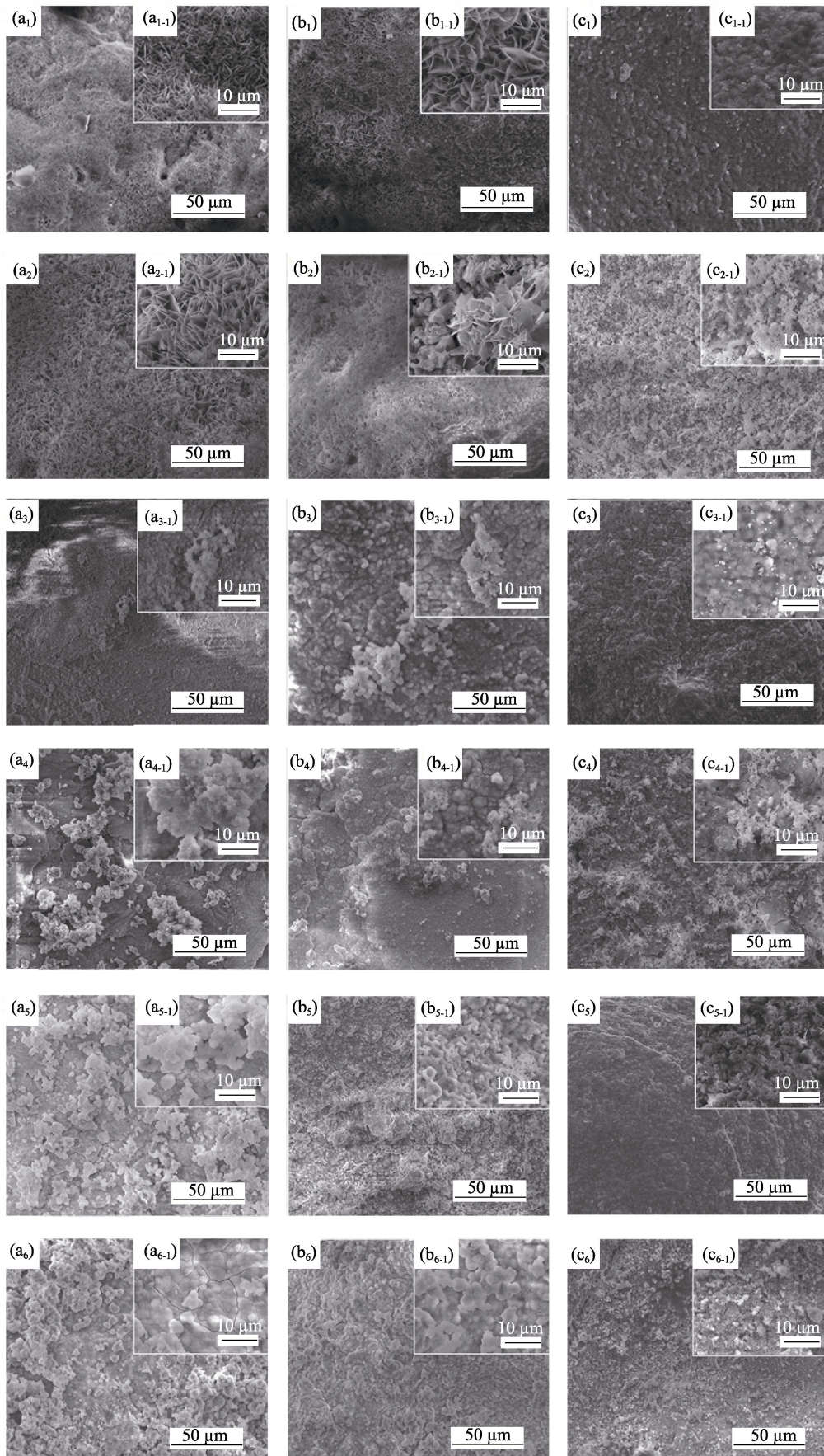


图 5 HA 在 SBF 溶液中 3, 7 d 后的 SEM 照片

Fig. 5 SEM results of HA ceramic discs with different mass fraction soaked in SBF solution for 3 and 7 d
 (a) Static state; (b) 40 Hz; (c) 60 Hz; 1: HA₁₀-at d 3; 2: HA₁₀- at d 7; 3: HA₂₀- at d 3; 4: HA₂₀- at d 7; 5: HA₃₅- at d 3; 6: HA₃₅- at d 7

物增多、增大, HA₃₅组表面颗粒状矿化物增多, 但与静态组相比矿化沉积量较少(图 5(b₂)、(b₄)、(b₆))。在 60 Hz 的 MVS 应力环境下, 三组 HA 材料在矿化 3 d 时表面矿化沉积情况均与 40 Hz 时相似(图 5(c₁)、(c₃)、(c₅)), 但在矿化 7 d 时 HA₁₀组和 HA₂₀组表面矿化沉积物并未见明显增多; 而 HA₃₅组表面矿化沉积物则更为疏松(图 5(c₂)、(c₄)、(c₆))。EDS 能谱分析结果(图 6)显示, 矿化 7 d 的三组样品在静态组、40 Hz 组和 60 Hz 组的钙磷比均在 1.62~1.73 的范围内。研究发现在仿生矿化过程中, Ca/P 摩尔比在 1.5~1.67 范围内, 产物为 HA+ β -TCP(β -Ca₃(PO₄)₂), 当 Ca/P 摩尔比在 1.68~1.7 范围内时, 产物为 HA, 当 Ca/P 摩尔比大于或等于 1.7 时, 产物为 HA + CaO^[33]。该结果证实了沉积产物是类骨磷灰石。

磷酸钙陶瓷的仿生矿化过程包括两个阶段: 晶核形成和晶核长大^[11]。材料表面的局域钙磷浓度被认为是成核的关键^[12]。具有较大比表面积的磷酸钙陶瓷能提供更多的磷灰石晶体的成核位点, 更容易促进钙磷矿化层的成核生长, 并且更高的微孔隙率

使得更多的来自于材料的 Ca²⁺、PO₄³⁻、HPO₄²⁻扩散到周围, 从而使得钙磷再沉积更容易发生。磷酸钙源的存在是发生异位骨形成的前提条件之一^[34-35]。而本研究的结果表明, 中低频的 MVS 应力环境能够更好地促进具有较高微孔隙率的 HA 钙磷离子的矿化沉积, 而对具有较低微孔隙率的 HA 矿化沉积则显示出抑制作用; 高频的 MVS 应力环境从最终结果来看并不利于 HA 的矿化沉积。这可能是由于中低频的微振动环境使得模拟体液处于往复流动状态, 这种流动状态加速了表面钙磷离子溶出。由于粗糙表面具有较多的微孔, 这些区域会阻碍液体的流动和离子的扩散, 因而较快地达到成核阈值, 一旦晶核形成, 流动状态更有利于离子的交换, 晶核很快长大并均匀分布。而光滑致密表面由于缺少这些“阻碍区域”, 因此离子容易扩散, 不利于材料表面的离子浓度达到成核阈值。对于高频的微振动环境, 模拟体液流速过快以致材料表面的钙磷离子扩散较快, 不利于离子浓度达到成核阈值, 因此抑制了 HA 材料表面类骨磷灰石的形成^[12,14,36]。

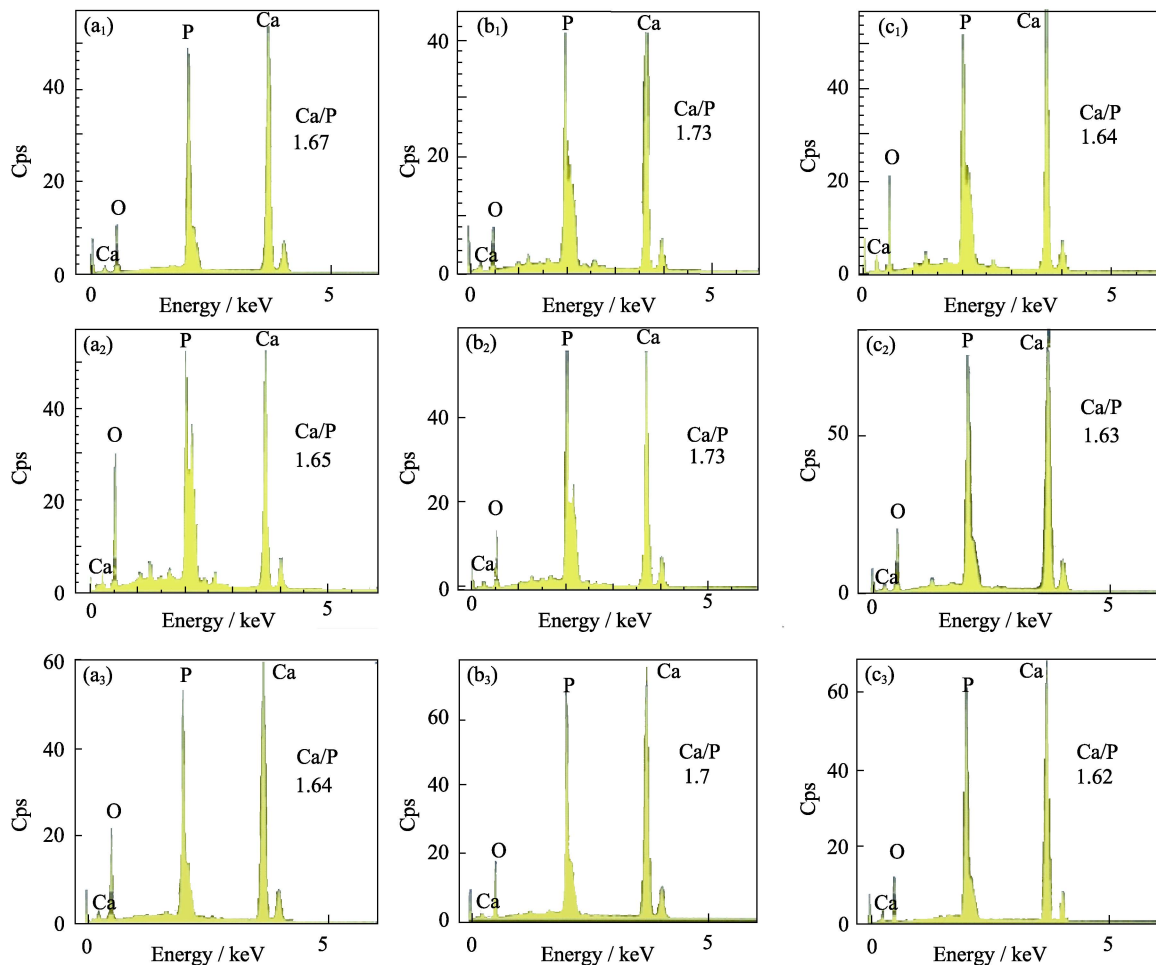


图 6 HA 材料浸泡在 SBF 溶液中 7 d 后的 EDS 能谱分析

Fig. 6 EDS spectra of HA materials after 7 d in SBF solution

(a) Static state; (b) 40 Hz; (c) 60 Hz; 1: HA₁₀-at d 7; 2: HA₂₀-at d 7; 3: HA₃₅-at d 7

过去的研究显示,尽管致密 HA 的体外仿生矿化结果显示其通常能在矿化 7 d 后形成类骨磷灰石层^[10],但体内实验中从未有过致密 HA 异位骨形成的报道^[37],而类骨磷灰石层的形成通常被认为是诱导骨形成的起始^[10],这就使得体内外实验结果发生了矛盾。而本研究结果则提示体内生理应力环境很可能不利于微孔隙率较低的 HA 材料植入后的矿化沉积,从而抑制了随后的一系列细胞分化和组织形成过程,最终影响了骨形成的发生。此外,不同频率的 MVS 应力环境对 HA 矿化沉积的不同影响也可以用于解释材料植入体内不同应力部位后骨诱导行为的差异性。

2.5 MVS 应力环境下 HA 多孔支架的抗压性能

抗压试验结果显示(图 7),MVS 应力环境对 HA 多孔支架力学稳定性没有明显影响。在 40 和 60 Hz 的 MVS 环境中浸泡 7 和 14 d 后,HA 多孔支架的抗压强度仍与初始强度相仿。这意味着微振动不会显著影响 HA 多孔支架的抗压强度。这可能是因为 HA 具有极低的体外降解速度,即使在 MVS 应力环境促进其钙离子释放的情况下,材料的降解也是极其有限的。骨生物支架的降解行为对细胞长入、宿主反应和组织再生有重要作用^[10]。理想的支架降解速度应与新生骨组织再生的速度相匹配。而骨形成是一个缓慢的过程,尤其是在支架植入初期,因此支架的力学稳定性就成为再生修复成功的前期要素之一。虽然理论上植入物能发生更快的改建过程是一个优点,但从临床角度来看对改善修复失败或是并发症的发生并无明显效果^[10]。前述 HA 陶瓷生物活性体外评价实验的结果已经显示在 MVS 应力环境下得到的评价结果可能更真实可靠,因此实验证明 MVS 应力环境不至于造成 HA 多孔支架的力学性能破坏,具有重要的临床应用指导意义。

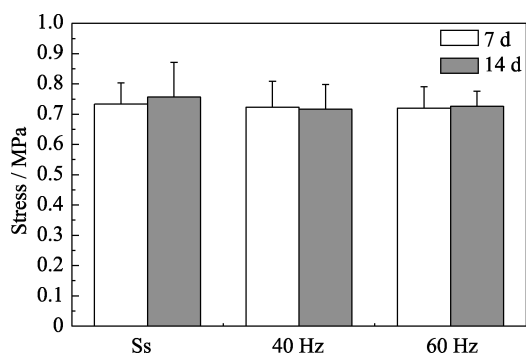


图 7 微振动对 HA 多孔支架抗压强度的影响

Fig. 7 Compressive strength of HA porous scaffold under static state, 40 and 60 Hz vibration frequency incubated for 7 and 14 d

3 结论

本研究首次尝试在体外构建 MVS 应力环境来模拟体内生理应力环境,从而得到更真实准确的 HA 生物活性和力学稳定性评价结果,这将有助于骨诱导性磷酸钙陶瓷的设计和优选,并为深入理解磷酸钙陶瓷骨诱导机制提供理论依据和实验基础。

研究证实应力环境是影响 HA 陶瓷生物活性和骨诱导性的重要因素,并且这种力学因素与材料本身的理化因素共同作用于 HA 陶瓷的生物活性。在没有影响 HA 支架抗压性能的前提下,具有较高孔隙率 HA 材料的生物活性在中低频 MVS 应力环境中得到了明显增强;但对于较低孔隙率的 HA 材料,其在 MVS 应力环境中生物活性有所降低。

参考文献:

- [1] ROY D M, LINNEHAN S K. Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. *Nature*, 1974, **247(438)**: 220–222.
- [2] LI YAN-BAO, TJANDRA WILLANA, TAM KAM C. Synthesis and characterization of nanoporous hydroxyapatite using cationic surfactants as templates. *Materials Research Bulletin*, 2008, **43(8/9)**: 2318–2326.
- [3] LEGEROS RACQUEL ZAPANTA. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chemical Reviews*, 2008, **108(11)**: 4742–4753.
- [4] ZHAO HONG-XIA, LI LI-HUA, DING SHAN, *et al.* Effect of porous structure and pore size on mechanical strength of 3D-printed comby scaffolds. *Materials Letters*, 2018, **223**: 21–24.
- [5] ALEHOSSEINI MORTEZA, GOLAFSHAN NASIM, KHARAZIHA MAHSHID, *et al.* Hemocompatible and bioactive heparin-loaded PCL—TCP fibrous membranes for bone tissue engineering. *Macromolecular Bioscience*, 2018, **18(6)**: 1800020–1–14.
- [6] ALI ENDER OFLUOGLU, UZAY ERDOGAN, MEHMET AYDOGAN, *et al.* Anterior cervical fusion with interbody cage containing beta-tricalcium phosphate: clinical and radiological results. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*, 2017, **51**: 197–200.
- [7] YANG YONG-ZHU, ZHANG LEI, YANG GUO-JING, *et al.* Preparation and characterization of multi-shell hollow biphasic bioceramic microsphere composite. *Journal of Inorganic Materials*, 2014, **29(6)**: 650–656.
- [8] GERVASO FRANCESCA, PADMANABHAN SANOSH KUNJALUKKAL, SCALERA FRANCESCA, *et al.* Mechanical stability of highly porous hydroxyapatite scaffolds during different stages of *in vitro* studies. *Materials Letters*, 2016, **185**: 239–242.
- [9] HABIBOVIC PAMELA, YUAN HUI-PIN, VAN DER VALK C M, *et al.* 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*, 2005, **26(17)**: 3565–3575.
- [10] 智伟. 材料及力学因素对磷酸钙陶瓷骨诱导性的影响. 成都: 西南交通大学博士学位论文, 2017.
- [11] TADSHI KOKUBO, HIROAKI TAKADAMA. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? *Biomaterials*, 2006, **27**: 2907–2915.

- [12] DUAN YOU-RONG, WANG CHAO-YUAN, CHEN JI-YONG, *et al.* Bone-like apatite formation on calcium phosphate dense ceramics in dynamic SBF. *Journal of Inorganic Materials*, 2002, **17(3)**: 552–558.
- [13] AGRAWAL C M, MCKINNEY J S, LANCTOT D, *et al.* Effect of fluid flow on the *in vitro* degradation kinetics of biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 2000, **21**: 2443–2452.
- [14] KANG YUN-QING, YAO YA-DONG, YIN GUANG-FU, *et al.* A study on the *in vitro* degradation properties of poly(L-lactic acid)/ β -tricalcium phosphate (PLLA/ β -TCP) scaffold under dynamic loading. *Medical Engineering & Physics*, 2009, **31**: 589–594.
- [15] ZHOU YI, GUAN XIAO-XU, ZHU ZHUO-LI, *et al.* Osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on bone-derived scaffolds: effect of microvibration and role of ERK1/2 activation. *European Cells & Materials*, 2011, **22**: 12–25.
- [16] ZHA DING-SHENG, CHEN JIAN-TING, DENG XUAN-GENG, *et al.* Effects of different frequency of vibration strain on proliferation and differentiation potency in osteoblast *in vitro*. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2008, **14(5)**: 303–307.
- [17] CHEN JIAN-HUNG, LIU CHAO, YOU LI-DAN, *et al.* Boning up on Wolff's law: mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. *Journal of Biomechanics*, 2010, **43**: 108–118.
- [18] WEIHS ANNA M, FUCHS CHRISTIANE, TEUSCHL ANDREAS H, *et al.* Shock wave treatment enhances cell proliferation and improves wound healing by ATP release-coupled extracellular signal-regulation kinase(ERK) activation. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, **289(39)**: 27090–27104.
- [19] CHEN XU-YI, ZHANG XI-ZHNEG. A review on mechanobiology mechanism of bone formation and remodeling. *Advances in Mechanics*, 2007, **37(4)**: 601–610.
- [20] JIA ZHI-BIN, ZHI WEI, LI JIN-YU, *et al.* Preparation and characterization of hydroxyapatite based porous composite scaffolds. *Journal of Functional Materials*, 2014, **45(18)**: 18129–18134.
- [21] ZHI WEI, SHI FENG, LI JING-YU, *et al.* Surface microstructure on hydroxyapatite spherules and its regulation on stem cells. *Journal of Inorganic Materials*, 2017, **32(3)**: 319–325.
- [22] LUO HUI-TAO, GUO TAI-LIN, ZHU DE-GUI, *et al.* Fabrication of translucent hydroxyapatite ceramics with different forms by Sol-Gel method. *Journal of Inorganic Materials*, 2013, **28(8)**: 804–810.
- [23] ZHOU SI-GUI, YUAN XI, LIU QING-HUA, *et al.* BAPTA-AM, an intracellular calcium chelator, inhibits RANKL-induced bone marrow macrophages differentiation through MEK/ERK, p38 MAPK and Akt, but not JNK pathways. *Cytokine*, 2010, **52**: 210–214.
- [24] WANG JING, CHEN YING, ZHU XIANG-DONG, *et al.* Study on the elution of the adsorbed serum proteins on biphasic calcium phosphate ceramics. *Journal of Inorganic Materials*, 2013, **28(10)**: 1143–1147.
- [25] LEE WING-HIN, LOO CHING-YEE, ROHANIZADEH RAMIN. A review of chemical surface modification of bioceramics: effects on protein adsorption and cellular response. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, **122**: 823–834.
- [26] REY C, COMBES C, DROUTE C, *et al.* Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporosis International*, 2009, **20(12)**: 2155–2155.
- [27] LU DAO-HUAN, LUO XUE-SHI, LI HONG, *et al.* Progress in biomineralization of collagen fibers *in vitro*. *Materials Review*, 2016, **30(9)**: 72–77.
- [28] MARTIN R I, BROWN P W. The effect of magnesium on hydroxyapatite formation *in vitro* from CaHPO_4 and $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ at 37.4 °C. *Calcified Tissue International*, 1997, **60(6)**: 538–546.
- [29] TURNBULL GARETH, CLARKE JON, PICARD FREDERIC, *et al.* 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*, 2018, **3(3)**: 278–214.
- [30] GUO LAI-YANG, ZHANG JING-WEI, ZHAO JING, *et al.* Preparation and characterization of porous scaffolds with favourable inter-pore connectivity. *Journal of Inorganic Materials*, 2011, **26(1)**: 17–21.
- [31] YOU CHANGKOOK, LEE MOON-HWAN, LEE HYO-JIN, *et al.* The effect of macro/micro combination pore structure of biphasic calcium phosphate scaffold on bioactivity. *Ceramics International*, 2017, **43(4)**: 3540–3546.
- [32] RUSTOM L E, BOUDOU T, LOU S, *et al.* Micropore-induced capillarity enhances bone distribution *in vivo* in biphasic calcium phosphate scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 2016, **44(1)**: 144–54.
- [33] SLOSARCZYK A, STOBIEKSKA E, PASZKIEWICZ Z, *et al.* Calcium phosphate materials prepared from precipitates with various calcium: phosphorus molar ratios. *J Am. Ceram. Soc.*, 1996, **79(10)**: 2539–2544.
- [34] ANA M C BARRADAS, YUAN HUI-PIN, CLEMENS A, *et al.* Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *European Cells and Materials*, 2011, **21**: 407–429.
- [35] KURASHINA K, KURITA H, WU Q, *et al.* Ectopic osteogenesis with biphasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits. *Biomaterials*, 2002, **23(2)**: 407–412.
- [36] DENG CHUN-LIN. Effect of flowing speed on bone-like apatite information in porous calcium phosphate in dynamic RSBF. *Journal of Materials Science Letters*, 2005, **40**: 1809–1812.
- [37] YAMASAKI HIROSHI, SAKAI HIDETAKA. Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs. *Biomaterials*, 1992, **15(5)**: 308–312.