

聚乙二醇作造孔剂制备大孔溶胶凝胶生物活性玻璃

李 娜* 王 超 朱苏敏 王若钉

(中国科学院上海硅酸盐研究所, 上海 200050)

关键词: 大孔; 生物活性; 溶胶凝胶; 玻璃

中图分类号: O613.72; O614.23+1; O612.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2005)01-0095-06

Preparation of Macroporous Sol-gel Bioactive Glass Using Polyethylene Glycol as Pore Formers

LI Na* WANG Chao ZHU Su-Min WANG Ruo-Ding

(Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050)

Abstract: Two kinds of macroporous bioglasses were prepared via sol suspension and precipitate using Polyethylene Glycol particles as pore former. The samples were characterized using scanning electron microscopy (SEM), BET, X-ray diffraction (XRD), Intrusion Mercury Porosimetry, mechanical strength test and in vitro bioactivity test. These glasses exhibited a hierarchical structure with interconnected macropores (10~300 μm) and mesopores (2~50 nm) framework. *In vitro* tests showed that the samples had excellent bioactivity. The samples derived from precipitate showed better macroporous structure and much higher mechanical strength.

Key words: macroporous; bioactive; sol-gel; glass

0 引 言

当创伤或者疾病导致严重的骨组织缺损时,剩余组织很难恢复它以前的功能。传统的治疗方案包括骨移植和种植,但是他们都有自身的缺陷^[1-5]。近年来,组织工程作为一种革命性的新方法而受到广泛关注,其中细胞支架的构建是限制组织工程发展的瓶颈^[5,6]。理想的支架材料应具有良好的生物相容性、生物降解性和生物活性;应具有三维立体通孔结构,孔径大于 100~150 μm ;具有高的比表面积,这种结构可提供宽大的表面积和空间,利于细胞黏附生长,营养和氧气进入,代谢产物排出,也利于血管和神经长入^[2,7,8]。还应具有一定的力学强度,为新生组织提供支撑,并保持一定时间直至新生组织具有自身生物力学与功能特性^[9,10]。

人们研究了很多合成的生物材料作为细胞支架来提高身体的自我修复能力。其中聚合物缺少生物活性,而且它释放的酸性降解产物容易导致炎症反应^[11,12]。而生物活性陶瓷由于优越的生物活性受到重视。其中生物玻璃是最早发现的生物活性材料,组成为 45S5 的生物活性玻璃(Bioglass®),作为骨修复材料临床使用已十多年,目前它已被成功应用于中耳听小骨的置换、牙槽骨的增宽和维护^[13,14]、牙周疾病或填充治疗小型骨骼缺损的治疗^[15]。生物玻璃临床应用的成功不仅来源于它有骨引导性,而且有促进骨组织生长的生物活性。研究表明,生物活性玻璃是目前唯一能促进生长因子的生成、促进细胞繁衍、活化细胞基因表达的人工合成的无机材料^[16]。

与传统熔融方法制备的生物玻璃相比,溶胶凝

收稿日期:2004-04-12。收修改稿日期:2004-06-19。

*通讯联系人。E-mail: lina2004mail@hotmail.com

第一作者:李 娜,女,24 岁,硕士研究生;研究方向:生物材料

胶方法制备的生物玻璃有很多的优点,如较低的处理温度和更好的均匀度^[1-5]。而且溶胶凝胶玻璃表现出典型的介孔结构和较高的比表面积,可以提高生物活性,促进细胞黏附和生物代谢物的吸附,控制降解速率,使之与组织修复速率相匹配^[17]。因此通过溶胶凝胶方法制备的大孔玻璃将是一种理想的支架材料。

但是由于干燥过程中凝胶的大量收缩容易造成开裂,制备大孔溶胶凝胶玻璃有一定难度。近来 Sepulveda 用发泡法制备出了大孔溶胶凝胶生物玻璃,其最大孔径可达 500 μm ,但是用这种方法制备的材料孔径分布太宽,孔结构无法很好地控制,而且强度极差^[2]。

本文采用聚乙二醇作造孔剂,通过生成悬浮液和沉淀两种途径制备大孔溶胶凝胶生物玻璃,样品具有高的比表面积和良好的生物活性。实验证明沉淀法可以获得更好的大孔结构,而且力学强度也更高。

1 实验部分

1.1 样品制备

选用的生物玻璃组分为 58S:58% SiO_2 -33% CaO -9% P_2O_5 。原料是蒸馏水,正硅酸乙酯(TEOS),磷酸三乙酯(TEP)和四水硝酸钙,用硝酸作催化剂。 H_2O 的物质的量/醇盐物质的量(R 值)=8。溶胶配制时先将 30 mL 蒸馏水和 5 mL 硝酸($2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相混合,然后缓缓加入 41 mL TEOS。搅拌 30 min 后,加入 4.2 mL TEP,继续搅拌 20 min。最后加入 26 g 硝酸钙,再搅拌 1 h,让硝酸钙充分溶解,同时也让金属醇盐水解得更充分。

水解完成后将溶胶置于聚丙烯塑料瓶中,在室温下放置 12 h。溶胶在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下放置一段时间,使其达到一定粘度。然后加入造孔剂,磁力搅拌约 10 min,将溶胶和造孔剂的混合物注入模具,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 下固化 1 d。样品出模后放入聚四氟乙烯盒中,采用准平衡干燥。干燥容器在 50%乙醇和 50%水的环境下保持 60 $^{\circ}\text{C}$ 12 h,然后缓慢升温至 120 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 48 h。最后干凝胶经热处理使结构稳定化,热处理制度为:先以 1 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度由室温升至 100 $^{\circ}\text{C}$,然后以 0.25 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的升温速度从 100 $^{\circ}\text{C}$ 升至 700 $^{\circ}\text{C}$,保温 2 h,最后随炉冷却。

样品制备分为悬浮法和沉淀法。悬浮法是指溶胶在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下放置约 2 h,使其粘度达到 16 $\text{mPa}\cdot\text{s}$ 。

此时造孔剂粒子均匀分散在溶胶中,形成有一定粘度的悬浮液,然后将悬浮液注入模具。沉淀法是指当溶胶在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 2.5 h,使其达到 30 $\text{mPa}\cdot\text{s}$,接近胶凝点的高粘度。加入造孔剂后,高粘度的溶胶中产生絮状沉淀,上层清液为水和醇,取用沉淀注入模具。

实验中,采用颗粒状的聚乙二醇(PEG1000)作造孔剂。过筛取用两种粒径范围:150~200 μm 和 200~315 μm 。对每一种粒径范围的造孔剂,都采用了两种加入比例。样品编号为 P/PS-X-Y,其中 P 代表悬浮液法制备,PS 代表沉淀法制备;X 代表加入的造孔剂颗粒的大小,其中 S 指 150~200 μm ,M 指 200~315 μm ;Y 代表 20 mL 溶胶加入的造孔剂的质量(单位为 g)。(见表 1)

1.2 样品表征

测量各种样品烧成后的直径,比较其直径方向上的线收缩率。用扫描电镜 EPMA-8705QH2(Shimadzu, Japan) 观察大孔生物玻璃样品的断口形貌。用美国 Micromeritics 公司的 Poresizer 9320 型压汞仪测定了试样的大孔孔径分布,并用阿基米德法测定了样品的开口气孔率。用 Instron 1195 系列材料试验机测试样品的抗压强度,压头加载速率为 0.5 $\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$ 。测试前样品表面磨平,尺寸约为 $\Phi 10 \times 4 \text{ mm}$,每组 5 个样品,取其平均值为样品的抗压强度。用 BET(美国 Micromeritics 公司 Tristar 3000 型比表面仪)法对样品的比表面积和介孔尺度以下的孔径分布进行测定,用 BJH 方法根据解吸曲线计算样品的孔径分布。

1.3 生物活性表征

以静态体外模拟体液(SBF)浸泡实验来测定样品的生物活性。样品用蒸馏水和无水酒精分别淋洗一次,干燥后进行浸泡。考虑大孔的内表面也参与溶解和物质交换过程,根据压汞法测得的各样品相应的总孔面积计算样品的总面积。按 SBF 的体积与样品的总面积之比为 $15.2 \times 10^{-6} \text{ m}$ 取用 SBF。模拟体液的离子浓度与人体血液的离子浓度相近,pH 值调整为 7.25。样品在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下浸泡 7 d,浸泡后用蒸馏水轻微冲洗样品,干燥后用日本理学(RAX-10)全自动 X 射线($\text{Cu K}\alpha$)衍射仪对浸泡前后样品的相组成进行分析,工作电压为 40 kV,电流 100 mA,扫描范围(2θ)10 $^{\circ}$ ~60 $^{\circ}$,步长,0.02 $^{\circ}$;用场发射扫描电镜 FES-EM JSM 6700F (JEOL, Japan) 对其表面形貌进行观察,加速电压为 15 kV。

2 结果与讨论

扫描电镜对不同工艺制备样品断面的观察结果如图 1 所示。样品断面为接近圆形的开气孔结构。图中(a)为悬浮液法制备样品,由于加入造孔剂颗粒较

大,孔径高达 300 μm ,大孔分布局部相对集中,骨架结构则明显疏松;而图中(b)(c)为沉淀法制备样品,孔相对较小,孔分布更均匀清晰,孔壁致密平整,断面和孔壁上还均匀分布着 1~20 μm 的孔,这些孔可能是部分溶解的 PEG 烧蚀后留下的。

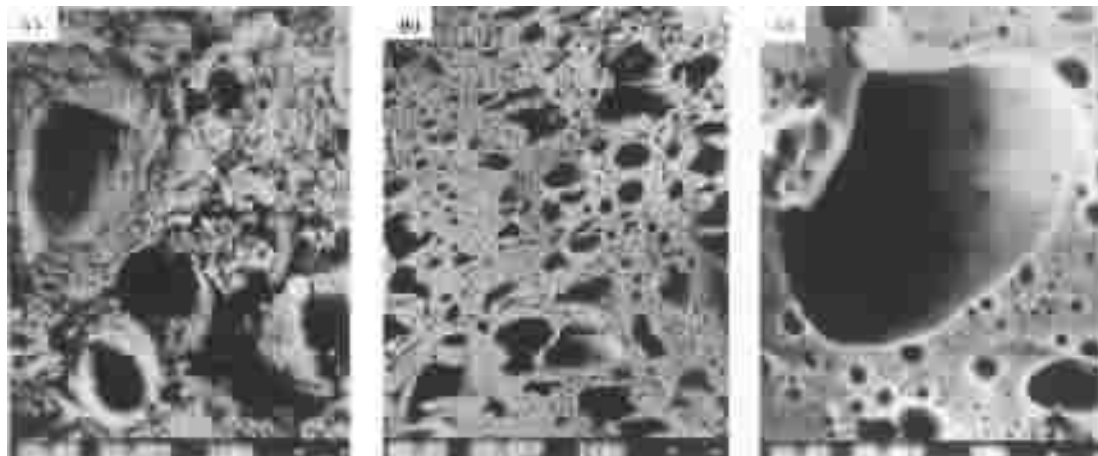


图 1 扫描电镜观察大孔样品孔结构(a)P-M-0.8, (b), (c) PS-S-1.0

Fig.1 Pore structure of macroporous samples observed by SEM

表 1 列出了实验中所制备的各种样品的压汞法所测平均孔径、孔体积、显气孔率以及样品直径方向上的线收缩。虽然压汞法测的仅仅是孔与孔连接部(即颈部)或大孔开口处的尺寸,不能精确反应大孔孔径的大小,但还是能在一定程度上反应孔径分布和孔体积变化的规律^[7]。使用的造孔剂越小,样品平均孔径越小;造孔剂含量越高孔体积越大,显气孔率

越高。这说明,用造孔剂制备大孔溶胶凝胶生物玻璃,样品的孔隙率和孔径的大小都能通过改变所加的 PEG 颗粒的大小和比例加以控制。此外,沉淀法制备样品(PS)比悬浮液法制备样品(P)孔隙率小,因为部分造孔剂溶解到水和醇的混合液中,没有参与造孔。

表 1 大孔生物玻璃样品压汞结果、阿基米德法测得的显气孔率以及样品线收缩率

Table 1 Data of Mercury Intrusion Porosimetry, Apparent Porosity and Linear Shrinkage Determined Using the Archimedes' Principle

Designation	Average pore diameter / μm	Pore volume / ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Apparent porosity / %	Linear shrinkage / %
P-S-0.6	36.0	0.75	58.4	33.0
P-S-0.8	15.6	0.89	62.4	32.4
P-M-0.8	28.7	0.95	64.9	32.0
P-M-1.0	28.9	1.26	69.7	31.9
PS-S-0.8	23.2	0.25	44.0	39.9
PS-S-1.0	22.7	0.45	50.5	38.7
PS-M-0.8	24.2	0.24	48.4	39.3
PS-M-1.0	35.3	0.45	56.6	37.0

在凝胶中添加 PEG 颗粒作造孔剂,造孔剂占据了部分空间,对凝胶的收缩有一定的阻碍作用。BG00 直径大约收缩了 50%,而添加了造孔剂的 PS 样品平均收缩率为 39%,P 样品收缩率更小,只有 32%。而且在实验所用的粒径范围内,样品的收缩与单位体积溶胶中添加造孔剂的质量直接相关,而与

添加的造孔剂的颗粒大小关系不大。造孔剂含量越高,气孔率越高,样品的收缩量就越小。造孔剂含量相同粒径不同的样品收缩大致相同。

图 2 比较了各种大孔生物玻璃样品的抗压强度。从图中可以看出,随着造孔剂粒径的增大和含量的增加,样品的抗压强度明显降低,其中造孔剂含量

的影响尤其突出。这证实了孔结构分析结果,因为多孔材料强度的决定因素主要是气孔率与孔的大小、形状、分布。气孔率越高,孔越大分布越不均匀,机械强度越小。值得注意的是 PS 样品比相应的 P 样品抗压强度提高了几十倍,一方面原因是 PS 样品气孔率较低,但更重要的是骨架结构致密。

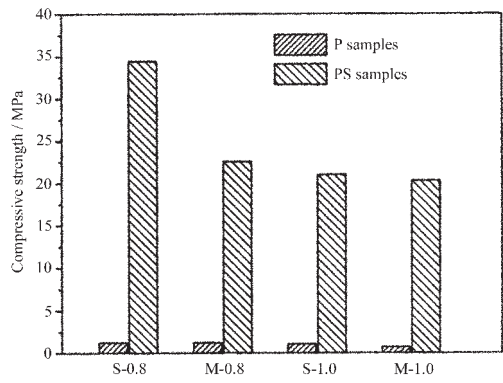


图 2 大孔生物玻璃的抗压强度

Fig.2 Compressive strength of the macroporous samples

在中等粘度溶胶中加入 PEG 颗粒形成悬浮液,由于造孔剂性质与溶胶比较适合避免了干燥过程中

经常发生的开裂现象,但是造孔剂阻碍了凝胶的自由收缩,胶粒之间结合不牢造成了凝胶骨架疏松,强度不高。接近凝胶点时加入 PEG 颗粒,此时溶胶体系缩聚和交连反应进一步发生,PEG 溶解较多,胶体粒子的-OH 基团与溶解的 PEG 分子形成氢键,构成三维骨架,这种作用可归结为与孔道相匹配的链的定位作用^[19]。然后此高聚物继续成核聚集并析出大量水和醇,生成絮状沉淀,造成骨架致密强度大大提高。干燥过程中较少的液体蒸发,也是原因之一。

样品的织构特征通过氮气吸附-解吸评价,图 3 对比了几种样品的 BET 等温回线和孔径分布,它们的吸附行为明显不同。根据 BDDT 分类,BG00 表现典型的 H2 型吸附回线,具有细颈广体的毛细孔;P 样品则属于 H3 型吸附回线,具有狭缝状毛细孔,表现出介孔材料特征;而 PS 样品的吸附分支与脱附分支基本重合,近似 H4 型吸附回线,呈现明显的微孔特征^[20]。从孔径分布图可以看出 BG00 孔体积较大,而且孔径基本分布在介孔(2~5 nm)尺度内;而 P 和 PS 样品孔体积减小,而且出现微孔。

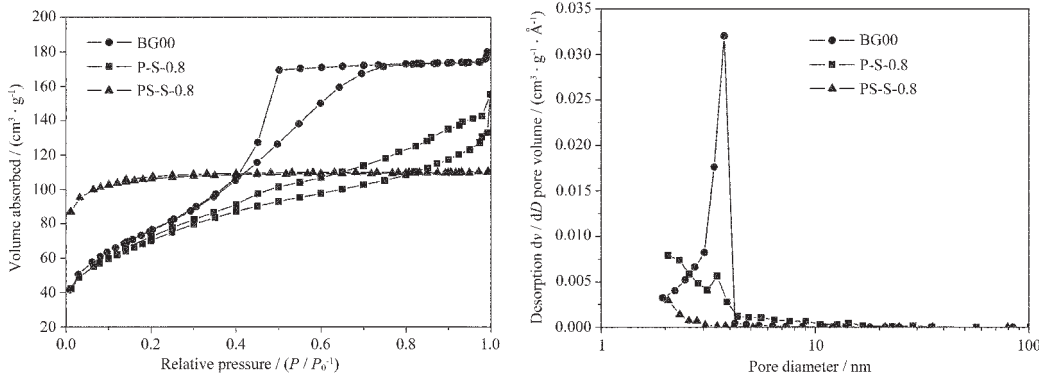


图 3 BET 法测得样品的等温回线和孔径分布

Fig.3 Nitrogen adsorption-desorption isotherms and the corresponding poresize distributions

相应的 BET 测试结果见表 2,样品的比表面积很高,在 245~360 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 之间。高的比表面积对组织工程应用相当有利,因为它可以提高材料的生物活性,而且利于细胞在支架内的黏附和迁移。BG00 与

P 样品都具有典型的介孔结构特征,而 PS 样品则含有大量的微孔。可见悬浮法基本保持了 BG00 的介孔结构,而沉淀法则很大程度上破坏了溶胶凝胶工艺产生的介孔结构。PS 样品制备时,胶粒与溶解的

表 2 氮气吸附-解吸法测得的生物玻璃的组织性质

Table 2 Textural properties of bioglasses obtained by nitrogen adsorption technique

Sample	Specific surface area / ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Micropore area / ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Pore volume / ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Micropore volume / ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Pore diameter / nm
BG00	276	—	0.28	—	3.4
P-S-0.8	325	17	0.20	0.01	4.2
PS-S-0.8	360	282	0.17	0.13	2.4

PEG分子形成强的相互作用,高分子量的 PEG 碳链支撑骨架,当高分子除去时,在其填充位置留下一个个相互连通的孔穴和孔道,从而形成大量微孔,增加了比表面积,减小了介孔体积^[19]。

样品 SBF 浸泡前后的 XRD 图谱示于图 4。浸泡

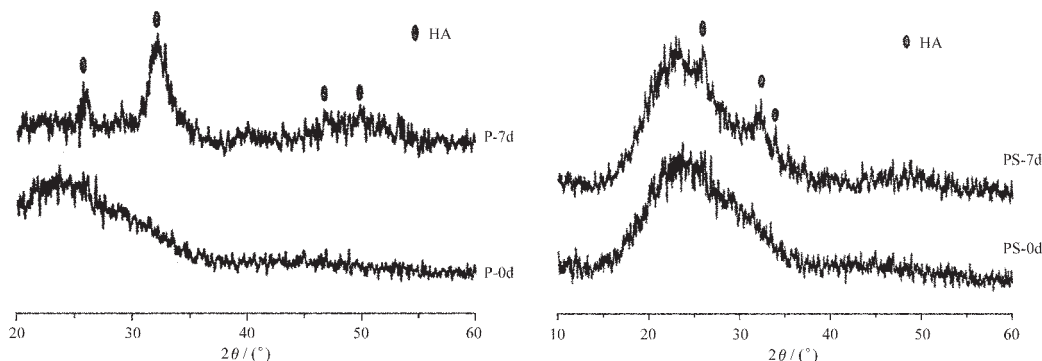


图4 模拟体液浸泡前及浸泡 7 d 后 P 和 PS 样品XRD 图谱

Fig.4 XRD patterns of P and PS samples before and after immersion in SBF for 7 days

扫描电镜对浸泡 7 d 后样品表面形貌的观察结果示于图 5。浸泡 7 d 之后,样品表面已经完全覆盖了一层新形成的羟基磷灰石(HA)。HA 呈典型的球

前样品呈无定形态,反应了材料的内部无序的玻璃特征。浸泡 7 d 后,P 样品在 2θ 为 $26^\circ, 32^\circ, 40^\circ, 46^\circ, 49^\circ$ 出现 HA 的特征峰;PS 样品在 2θ 为 $26^\circ, 32^\circ, 34^\circ$ 出现 HA 的特征峰。

状团簇,而这些球状团簇是由蠕虫状的细小晶粒组成的。HA 的形成表明本文两种方案制备的大孔溶胶凝胶玻璃都具有良好的生物活性。

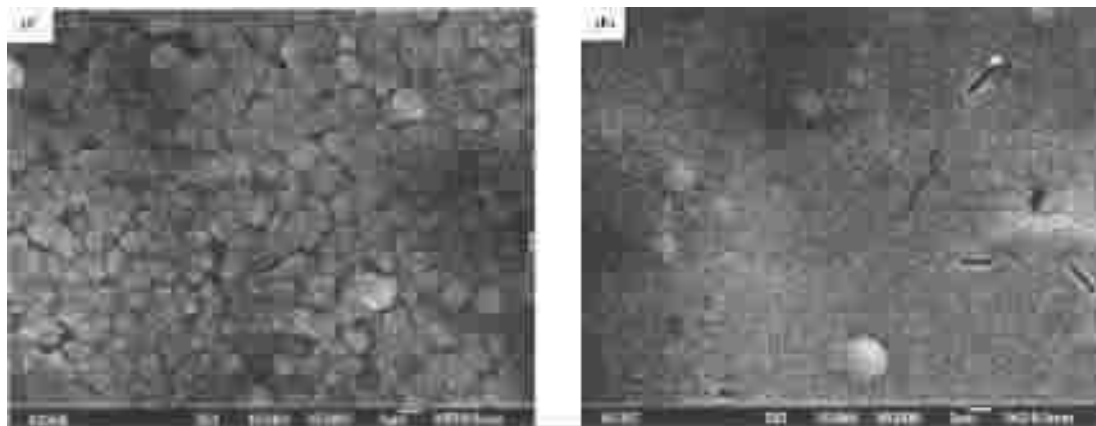


图5 模拟体液浸泡 7 d 之后样品表面(a) P-S-0.6 (b) PS-S-1.0

Fig.5 Surface of samples after immersion in SBF for 7 days (a) P-S-0.6 (b) PS-S-1.0

3 结 论

本文选用 PEG 作造孔剂,结合溶胶凝胶工艺,通过生成悬浮液和沉淀两种方案分别制备了大孔($10\sim 300\ \mu\text{m}$)溶胶凝胶玻璃。大孔结构的孔径和孔隙率可通过改变造孔剂颗粒大小和含量控制。悬浮液法保持了溶胶凝胶玻璃的介孔特征,而沉淀法则生成大量微孔,两种样品都具有相当高的比表面积和优良的生物活性。机械性能测试表明沉淀法制备的大孔玻璃抗压强度高达 $34.4\ \text{MPa}$,是悬浮液法得到样品的几十倍,远远高于文献报道水平。综上所述,

用 PEG 做造孔剂的沉淀法是一种更为理想的制备大孔溶胶凝胶生物活性玻璃的途径,很有潜力作为骨组织工程细胞支架。

参考文献:

- [1] Borden M, El-Amin S F, Attawia M, et al. *Biomaterials*, **2003**, **24**:597~609
- [2] Sepulveda P, Jones J R, Hench L L. *J. Biomed. Mater. Res.*, **2002**, **59**:340~348
- [3] Hench L L, Polak J M. *Science*, **2002**, **295**:1014~1017
- [4] Cao W, Hench L L. *Ceram. Inter.*, **1996**, **22**:493~507

- [5] Jones J R., Hench L L. *Mater. Sci. Tech.*, **2001**,**17**:891~900
- [6] ZHENG Lei(郑磊), WANG Qian(王前), PEI Guo-Xian(裴国献), et al. *Zhonghua Yixue Zazhi(Chinese J. Chin. Med.)*, **2001**,**81**(18):1128~1129
- [7] Jones J R, Hench L L. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, **2004**,**68B**,36~44
- [8] Yoshimoto H, Shin Y M, Terai H, et al. *Biomaterials*, **2003**,**24**:2077~2082
- [9] Karp J M, Dalton P D, Shoichet M S. *Mater. Res. Soc. Bull.*, **2003**,**4**:301~305
- [10] Xu H H K, Quinn J B, Takagi S, et al. *Biomaterials*, **2004**,**25**:1029~1037
- [11] Agrawal C M, Athanasiou K A, Heckman J D. *Mater. Sci. Forum*, **1997**,**250**:115~129
- [12] Agrawal C M, Ray R B. *J. Biomed Mater. Res.*, **2001**,**55**:141~150
- [13] Lobel K. *Clinical Performenc of Skeletal Prostheses*, Hench L L, Wilson J, Ed., Chapman and Hall: London, **1996**:214~236
- [14] Stanley H R, Clark A E, Hench L L. *Clinical Performenc of Skeletal Prostheses*, Hench L L, Wilson J., Ed., Chapman and Hall: London, **1996**:255~270
- [15] Wilson J, Clark A E, Douek E, et al. *Bioceramics Vol.7*, Andersson D. H., Happonen R. P., Urpo A.Y., Ed., Butterworth-Heinemann: Oxford, **1994**:415~422
- [16] Xynos I D, Edgar A J, Buttery L D K, et al. *J. Biomed. Mater. Res.*, **2001**,**55**:151~157
- [17] Lenza R F S, Vasconcelos W L, Jones J R, et al. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **2002**,**13**:837~842
- [18] Zhong J P, Greenspan D C. *Bioceramics Vol.10*, Sedel, Rey, Ed., Elsevier Science: New York, **1997**:265~268
- [19] WANG Li-Wei(王莉玮), WANG Zi-Chen(王子忱), ZHAO Jing-Zhe(赵敬哲) et al. *Gongneng Cailiao(Chinese Func. Mater.)*, **1998**,**29**(4):397~399
- [20] YAN Ji-Min(严继民), ZHANG Qi-Yuan(张启元), GaoJing-Cong(高敬琮). *Absorption and Coacervation—The Solid Surface and Pore* (吸附与凝聚——固体的表面与孔). Beijing: Science Press, **1986**.118~122