



生物活性骨组织工程支架的研究及  
介孔羟基磷灰石的初步探讨

The bioactive bone tissue engineering research and the  
preliminary study of the mesoporous hydroxyapatite

作者姓名：吴晓东

专业名称：外科学

研究方向：组织工程材料在骨科中的应用

指导教师：刘建国 教 授

陈学思 研究员

章培标 副研究员

学位类别：医学博士

培养单位：白求恩第一医院

中科院长春应用化学研究所

论文答辩日期：2012年六月一日

授予学位日期： 年 月 日

答辩委员会主席：路来金

论文评阅人：陶树清、邵卫、翁习生、吴建国、王昆

未经本论文作者的书面授权，依法收存和保管本论文学术版本、电子版本的任何单位和个人，均不得对本论文的全部或部分内容进行任何形式的复制、修改、发行、出租、改编等有碍作者著作权的商业性使用（但纯学术性使用不在此限）。否则，应承担侵权的法律责任。

#### 吉林大学博士（或硕士）学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交学位论文，是本人在指导教师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：吴晓东

2012年 6月 8日

## 前　　言

骨组织工程成为治疗大段骨缺损的一种具有巨大潜在应用价值的方式。骨组织工程的三要素：种子细胞、支架材料和组织工程构建技术。核心是建立由细胞和生物材料所构成的三维复合体。而其中的生物工程支架材料是骨组织工程的关键性因素。天然骨基质是一种无机/有机结合的复合材料，包括天然形成的聚合物（胶原蛋白）和生物矿物质（磷灰石）。并且天然骨基质中羟基磷灰石以小于 100nm 的晶体与胶原纤维紧密结合构成纳米羟基磷灰石/胶原复合材料。因此，构建无机/有机结合的纳米复合材料能够模拟天然骨基质，能更好的促进骨组织的修复。而且，制备的复合材料能调整复合材料的机械性能和降解速率。并能结合两组分的优点克服两组分的缺陷，如生物陶瓷材料和高分子材料组成的复合材料，可以提高高分子材料的生物相容性和生物活性，并能改善生物陶瓷的机械性能。同时，介孔材料具有较大比表面积，可调的孔径尺寸和易于修饰的表面，用于药物载体和组织工程支架材料已引起了极大关注。

纳米羟基磷灰石/聚乙交酯-丙交酯（n-HA/PLGA）复合材料用作骨组织工程支架材料，由于具有良好的生物相容性，可调的生物降解性，良好的骨诱导性，骨传导性，和较高的机械强度。近年来得到了广泛的关注。

一方面本研究利用冷冻干燥法制备了不同 n-HA 含量的 n-HA/PLGA 多孔复合材料支架，并从孔隙率，力学强度，扫描电镜，接触角对其进行了表征，并探讨了不同的 n-HA 对多孔复合材料支架结构的影响，及对成骨细胞增殖的影响。另一方面 PLGA 与 n-HA 的复合，在一定程度上可以提高 PLGA 的生物活性和骨引导、诱导能力，但仍然不能满足修复大面积骨缺损的需要，本研究利用冷冻干燥法制备了多孔复合材料支架，并引入了具有生物活性的廉价易获得小分子化合物，二甲基砜。探讨了二甲基砜含量的不同对多孔复合材料支架结构功能和生物学行为的影响。此外，近年来介孔材料由于独特的性能引起了学者相当大的关注，本研究还合成了介孔纳米羟基磷灰石，并初步探讨了表面活性剂比率的不同对其结构和介孔结构对蛋白担载性能的影响。为组织工程支架在临床的应用提供实验依据，并开发具有生物活性的廉价的组织工程支架材料。

## 中文摘要

### 生物活性骨组织工程支架的研究及介孔羟基磷灰石的初步探讨

近来，工程学和材料学的众多进展，推动了骨组织工程学的发展。支架材料由天然材料向人工合成高分子材料发展，由单一支架材料向复合材料及表面修饰材料发展。天然骨基质是一种无机/有机结合的复合材料，包括天然形成的聚合物（胶原蛋白）和生物矿物质（磷灰石）。并且天然骨基质中羟基磷灰石以小于 100nm 的晶体与胶原纤维紧密结合构成纳米羟基磷灰石/胶原复合材料。因此，构建无机/有机结合的纳米复合材料能够模拟天然骨基质，能更好的促进骨组织的修复。

由此，制备了纳米复合材料模拟天然骨基质，一方面本研究利用冷冻干燥法制备了不同 n-HA 含量的 n-HA/PLGA 多孔复合材料支架，并从孔隙率，力学强度，扫描电镜，接触角对其进行了表征，并探讨了不同的 n-HA 对多孔复合材料支架结构的影响，及对成骨细胞增殖的影响。另一方面 PLGA 与 n-HA 的复合，在一定程度上可以提高 PLGA 的生物活性和骨引导、诱导能力，但仍然不能满足修复大面积骨缺损的需要，本研究利用冷冻干燥法制备了多孔复合材料支架，并引入了具有生物活性的廉价易获得小分子化合物，二甲基砜（MSM）。探讨了 MSM 含量的不同对多孔复合材料支架结构功能和生物学行为的影响。本研究还合成了介孔纳米羟基磷灰石，并初步探讨了表面活性剂比率的不同对其结构和介孔结构对蛋白担载性能的影响。为组织工程支架在临床的应用提供实验依据，并开发具有生物活性的廉价的组织工程支架材料。

第一部分 HA/PLGA 多孔复合材料支架冷冻干燥法制备及表征和细胞增殖的研究。课题组前期工作中了，研究了不同的冷冻速率对多孔支架材料的影响。结果显示 4℃冻存制备的多孔支架，具有更大的孔径，更高的孔隙率。本研究选用 4℃作为冻存温度，探讨 n-HA 含量的不同对多孔复合材料支架结构性能和细胞增殖的影响。利用冷冻干燥法制备了不同 n-HA 含量的 n-HA/PLGA 多孔复合材料支架，n-HA 含量分别为 0 wt.%、5 wt.%、10 wt.%、20 wt.% 和 40 wt.%。利用扫描电镜观察多孔支架材料的表面形貌，乙醇溶液置换法测试复合材料的孔隙率，电子式万能试验机测试复合材料的力学强度。n-HA 与 PLGA 铺膜接触角测试仪测量接触角。小鼠成骨前体细胞（MC3T3-E1）种植到多孔支架上，MTT 法检测不同材料在 3d、7d 和 14d 对成骨细胞增殖的影响。结果显示：支架孔隙分布均匀，且孔隙保持连通。当 n-HA 含量为 10 wt.% 和 20 wt.% 时，显示了较好孔隙率，润湿性和较高的力学强度，能有效的促进成骨细胞的增殖。

第二部分 生物活性 MSM/HA/PLGA 多孔复合材料支架的制备及表征。前期工作

中发现 n-HA/PLGA 复合材料,在一定程度上虽然可以提高 PLGA 的生物活性和骨引导、诱导能力,但仍然不能满足修复大面积骨缺损的需要。因此,本研究利用冷冻干燥法引入了具有生物活性并且廉价易获得小分子化合物二甲基砜 (MSM),探讨了 MSM 含量的不同对多孔复合材料的影响。利用扫描电镜观察多孔支架材料的表面形貌,乙醇溶液置换法测试复合材料的孔隙率,MSM、n-HA 与 PLGA 铺膜接触角测试仪测量接触角。电子式万能试验机测试复合材料的力学强度。利用电感耦合等离子光谱发生仪测试了多孔支架中 MSM 的实际含量和累积释放量。结果显示:制备的支架具有均匀的孔隙分布,及良好的贯通性。MSM 含量为 0.1%时孔隙率和力学强度较高,冷冻干燥法能有效的将 MSM 引入组织工程支架,未造成 MSM 的明显丢失,并能延长 MSM 的释放时间。

第三部分 MSM/HA/PLGA 多孔复合材料支架的细胞增殖、黏附和成骨研究。前期工作中,制备了 MSM/HA/PLGA 多孔复合材料支架,本研究探讨多孔复合材料支架对成骨细胞增殖、黏附和骨修复的影响。利用 MTT 法,DAPI 染色和碱性磷酸酶活性测定,观察多孔支架材料对成骨细胞增殖和黏附渗透的影响,将支架材料植入兔桡骨缺损部位,术后 4w 和 12w 采用 X 光片检测骨形成量,以评价材料的骨修复能力。结果显示:MSM 含量为 0.1%时显示了较好的成骨增殖和黏附能力,能有效的促进骨修复。

第四部分 介孔纳米羟基磷灰石的制备表征及蛋白担载的研究。揭示表面活性剂的比率介孔 n-HA 结构的影响,以及介孔结构对 HA 吸附和释放牛血清白蛋白 (BSA) 的影响。利用湿沉淀法,用 CTAB 作为模板在室温下成功合成了介孔 n-HA,用 X 射线衍射仪对合成的 n-HA 相位和晶体结构进行了表征。用傅里叶红外变换光谱对合成纳米粒子的化学结构基团进行测定。用场发射扫描电镜进行表面形貌分析。用透射电镜观察纳米粒子的尺寸和形状。用多角度光散射仪测试粒径。用氮气吸附测试合成粒子的孔隙结构参数。用 BSA 测试样品对蛋白担载释放性能的影响。结果显示:合成的样品均为纯相纳米低结晶度的介孔材料,当 CTAB 比率为 0.5%时,显示了良好的介孔结构,较大的蛋白吸附和较长的释放时间。

#### 关键词:

纳米羟基磷灰石,聚丙交酯-乙交酯,复合材料,组织工程支架,高温模压/粒子沥滤,冷冻干燥,二甲基砜,介孔材料

## 目 录

第 1 章 绪 论 .....	1
1.1 前 言 .....	1
1.2 骨组织工程支架材料 .....	2
1.2.1 生物医用陶瓷材料 .....	2
1.2.2 介孔材料 .....	4
1.2.3 高分子材料 .....	5
1.2.4 复合材料 .....	10
1.3 生物活性化合物-二甲基砜 .....	12
1.4 组织工程支架的制备工艺 .....	13
1.4.1 溶剂/溶液浇铸法 .....	14
1.4.2 热致相分离法（冷冻干燥法） .....	15
1.4.3 静电纺丝法 .....	16
1.4.4 气体发泡法 .....	17
1.4.5 纤维粘接法 .....	18
1.4.6 快速成形技术 .....	18
1.5 研究内容、目标及创新 .....	19
1.5.1 研究内容 .....	19
1.5.2 课题的研究目标 .....	20
第 2 章 HA/PLGA 多孔复合材料支架制备表征和细胞增殖的研究 .....	21
2.1 实验仪器和材料 .....	21
2.1.1 主要仪器及试剂 .....	21
2.1.2 实验细胞 .....	22
2.1.3 主要溶液的配制 .....	22
2.1.4 HA/PLGA 多孔支架材料的制备过程 .....	22
2.1.5 扫描电镜的检测 .....	23
2.1.6 孔隙率检测 .....	23

2.1.7 力学性能（压缩强度和弯曲强度） .....	23
2.1.8 测试不同含量的 n-HA/PLGA 接触角 .....	23
2.1.9 细胞增殖实验 .....	24
2.1.10 统计与分析 .....	24
2.2 结果 .....	24
2.2.1 场发射扫描电镜（ESEM）分析 .....	24
2.2.2 孔隙率 .....	25
2.2.3 支架材料的力学强度 .....	26
2.2.4 接触角的测试分析 .....	27
2.2.5 n-HA/PLGA 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响.....	27
2.3 讨论 .....	28
2.3.1 n-HA/PLGA 纳米复合材料的制备 .....	28
2.3.2 不同 n-HA 含量对多孔材料支架孔隙影响 .....	28
2.3.3 不同 n-HA 含量对复合材料支架力学性能的影响， .....	29
2.3.4 不同 n-HA 含量对复合材料的接触角的影响 .....	29
2.3.5 不同 n-HA 含量对成骨细胞增殖的影响 .....	30
2.4 小结 .....	30
第 3 章 生物活性 MSM/HA/PLGA 多孔复合材料支架的制备及表征 ....	33
3.1 材料与方法 .....	33
3.1.1 主要药品、仪器 .....	34
3.1.2 MSM/HA/PLGA 三维多孔支架制备 .....	34
3.1.3 场发射扫描电镜观察 .....	34
3.1.4 孔隙率检测 .....	34
3.1.5 接触角测试 .....	35
3.1.6 力学性能（压缩强度） .....	35
3.1.7 ICP 测量实际 MSM 含量 .....	35
3.1.8 释放率监测 .....	35
3.1.9 统计学分析 .....	35

3.2 结果 .....	35
3.2.1 场发射扫描电镜 (ESEM) 观察 .....	35
3.2.2 孔隙率检测 .....	37
3.2.3 MSM/HA/PLGA 复合材料的接触角 .....	37
3.2.4 力学性能 .....	38
3.2.5 MSM 实际含量 .....	38
3.2.6 释放测试累积释放量 ( $\mu\text{g}$ ) .....	39
3.3 讨论 .....	39
3.3.1 MSM/HA/PLGA 复合材料支架的制备 .....	39
3.3.2 MSM 含量对支架孔隙的影响 .....	40
3.3.3 MSM 含量对接触角的影响 .....	40
3.3.4 MSM 含量对支架力学的影响 .....	41
3.3.5 MSM 实际含量及释放量 .....	41
3.4 本章小结 .....	41
<b>第 4 章 MSM/HA/PLGA 多孔复合材料支架的细胞增殖、黏附和成骨研究</b>	
.....	43
4.1 材料和方法 .....	43
4.1.1 实验材料 .....	43
4.1.2 细胞分离细胞种植 .....	44
4.1.3 多孔支架材料对兔成骨细胞黏附渗透能力的影响 .....	45
4.1.4 MSM/HA/PLGA 对成骨细胞增殖的影响 .....	45
4.1.5 多孔复合材料对碱性磷酸酶 (ALP) 活性的影响 .....	46
4.1.6 动物实验 .....	47
4.1.7 统计学处理 .....	48
4.2 结果 .....	48
4.2.1 细胞粘附渗透实验 .....	48
4.2.2 细胞增殖实验 .....	50
4.2.3 碱性磷酸酶活性的测定 .....	50

4.2.4 动物体内植入实验 .....	51
4.3 讨论 .....	53
4.3.1 外成骨细胞在 MSM/HA/PLGA 渗透观察 .....	53
4.3.2 MSM/HA/PLGA 多孔复合材料对成骨细胞增殖的影响 .....	54
4.3.3 MSM/HA/PLGA 多孔复合材料对碱性磷酸酶活性的影响 .....	54
4.3.4 动物体内实验 .....	55
4.4 小结 .....	55
第 5 章 介孔纳米羟基磷灰石的制备表征及蛋白担载的研究 .....	57
5.1 实验材料、仪器和方法 .....	58
5.1.1 实验材料和仪器 .....	58
5.1.2 合成介孔 n-HA .....	58
5.1.3 合成样品的表征 .....	59
5.1.4 蛋白担载和释放 .....	59
5.1.5 统计学分析 .....	59
5.2 结果和讨论 .....	59
5.3 结论 .....	67
第 6 章 课题的特色与创新 .....	69
参考文献 .....	71
作者在学期间所取得的科研成果 .....	71
致    谢 .....	93