

doi:10.3969/j.issn.1672-4348.2018.03.003

透明质酸-胶原-生物玻璃支架材料的 制备及矿化性能研究

杨春蓉

(福建工程学院 材料科学与工程学院, 福建 福州 350118)

摘要:以透明质酸、胶原和生物玻璃为原料制备复合支架材料,并对其矿化性能进行研究。实验将透明质酸、胶原和生物玻璃按比例混合,再进行交联处理,冷冻干燥得到支架材料,最后将其浸入模拟体液进行矿化,分析生物分子在矿化过程中的作用机制。研究发现,该复合支架材料具有三维多孔的微观结构;在模拟体液中的矿化产物为羟基磷灰石。胶原蛋白和透明质酸对溶液中钙、磷离子的亲和力构成了矿化机制的基础。且两种生物分子可相互键合,促进钙化。该支架具有良好的矿化性能,可用于骨缺损的修复。

关键词:支架;复合;矿化

中图分类号: TB34

文献标志码: A

文章编号: 1672-4348(2018)03-0215-04

Preparation and mineralization evaluation of hyaluronic acid-collagen-bioglass scaffolds

YANG Chunrong

(School of Materials Science and Engineering, Fujian University of Technology, Fuzhou 350118, China)

Abstract: Composite scaffolds were prepared using hyaluronic acid, collagen and bioglass and the mineralization characteristics were evaluated. Hyaluronic acid, collagen and bioactive glass were mixed in proportion, and then cross-linked and freeze dried. The obtained scaffolds were immersed in the simulated body fluid for mineralization, and the mechanism of biomolecules in the mineralization process was analyzed. It is found that the composite scaffold material has a three-dimensional porous microstructure. The mineralized product in the simulated body fluid is hydroxyapatite. The affinity of collagen and hyaluronic acid to calcium and phosphorus ions in the solution constitutes the basis of the mineralization mechanism. The two biological molecules can bond with each other to promote calcification. The scaffolds have good mineralization properties and can be used to repair bone defects.

Keywords: scaffolds; composite; mineralization

生物活性玻璃(Bioglass, BG)是一类广泛用于骨修复的无机活性材料,可与自然组织形成骨键合。但它的脆性大、弯曲强度低,在生理环境中的疲劳破坏强度不高^[1]。胶原(Collagen, COL)是天然骨基质的主要有机成分,具有较好的刚性和

抗张能力^[2]。因此,将生物活性玻璃与胶原复合,有望提高支架材料整体的力学性能。此外,透明质酸(Hyaluronic acid, HYA)是一种多阴离子化合物,存在于脊椎动物的连接组织、关节的滑液和软骨中,对于细胞外液中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 、 Na^{+} 等阳离

收稿日期: 2017-09-06; 修回日期: 2018-01-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(51702052); 福建工程学院科研发展基金项目(GY-Z15093); 福建工程学院科研启动基金项目(GY-Z0854)

作者简介: 杨春蓉(1977-),女,湖北枝江人,副教授,博士,研究方向:生物医用材料。

子有较大亲和力。因此,透明质酸与钙化有密切的关系。多种方法证明钙化的比尚未钙化的组织中透明质酸的含量明显降低^[3]。

本实验将生物活性玻璃、胶原、透明质酸三者结合,综合各自的优势,制备具有较好矿化性能的复合骨支架材料,并探讨生物分子在矿化过程中的作用机制。

1 实验

1.1 材料

58S 生物活性玻璃采用溶胶-凝胶法自制; I 型牛胶原溶液浓度为 5.8 mg/mL, pH 5.0; 透明质酸。

1.2 BG-COL-HYA 复合支架的制备

准确称量 I 型胶原蛋白溶液和透明质酸, 将其按 8:1 的质量比混合, 在搅拌状态下将自制的生物活性玻璃粉体缓慢加入上述溶液中, 搅拌均匀, 生物活性玻璃与胶原蛋白的质量比为 65:35; 待上述混合物搅拌均匀后, 加入交联剂 (1.25 mg/mL 的 N-羟基琥珀酰亚胺碳二亚胺和 5 mg/mL 的 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)); 随后, 将装有混合物的烧杯冷冻干燥得最终样品。

1.3 BG-COL-HYA 复合支架在模拟体液中的矿化实验

实验配制的模拟体液 (SBF) 离子浓度如下: $[Na^+] = 142.0 \text{ mmol/dm}^3$, $[K^+] = 5.0 \text{ mmol/dm}^3$, $[Mg^{2+}] = 1.5 \text{ mmol/dm}^3$, $[Ca^{2+}] = 2.5 \text{ mmol/dm}^3$, $[Cl^-] = 147.8 \text{ mmol/dm}^3$, $[HCO_3^-] = 42.0 \text{ mmol/dm}^3$, $[HPO_4^{2-}] = 1.0 \text{ mmol/dm}^3$, $[SO_4^{2-}] = 0.5 \text{ mmol/dm}^3$ 。在室温下调节溶液 pH 至 7.4。将支架材料浸入装有 SBF 溶液的烧杯, 再将其置入 37 °C 恒温箱, 每 24 h 更换一次模拟体液。一段时间后取出样品并用去离子水冲洗干净, 室温干燥 24 h 后, 置于恒温干燥箱中进行干燥、称重, 并采用 SEM 观察试样在 SBF 浸置矿化后的表面形貌, 采用 XRD 分析矿化物的物相组成。

2 结果与讨论

2.1 支架的显微结构

图 1 为 BG-COL-HYA 支架的 SEM 显微形貌图。从图中可看出, 生物活性玻璃颗粒包裹在胶原蛋白-透明质酸复合物中。颗粒间通过纤维状的有机大分子相连。支架具有相互交错、连续

的不规则多孔结构, 孔径大小在几微米到 400 μm 间分布。这种结构可为细胞生长及细胞外基质的产生提供充分的空间。

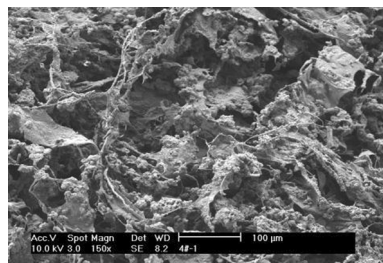
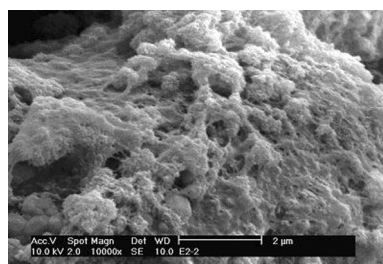


图 1 BG-COL-HYA 支架的显微形貌图

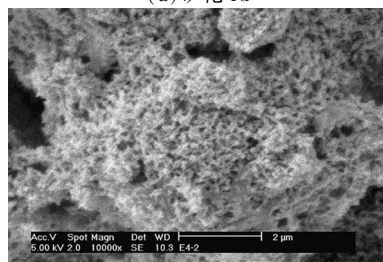
Fig.1 Microtopography of BG-COL-HYA scaffolds

2.2 支架的矿化性能

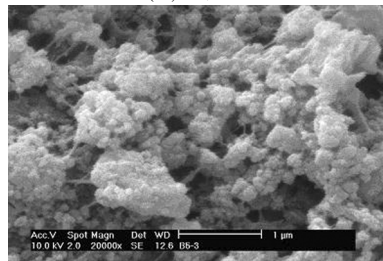
图 2 为支架在 SBF 溶液中分别矿化 1、2、3d 的 SEM 显微形貌图。从图中可见, 在矿化初期, 支架表面首先形成小的矿物晶体, 随后这些晶体进一步聚集长大; 且当长到一定程度时与邻近的晶体融合, 生成尺寸更大的球状晶体。



(a) 矿化 1d



(b) 矿化 2d



(c) 矿化 3d

图 2 BG-COL-HYA 支架在 SBF 溶液中矿化不同时间的显微形貌图

Fig.2 Microtopography of BG-COL-HYA scaffolds at different time during mineralization in SBF solution

图 3 为 BG-COL-HYA 支架在 SBF 中浸泡不同时间的 XRD 图,从图谱分析可以看出,支架材料矿化前无晶相的特征峰,仅在 32°衍射角附近出现了较宽的生物玻璃衍射峰。随着浸泡时间延长,逐渐出现了羟基磷灰石的特征峰,且强度逐渐增大。在 SBF 溶液中浸泡 3d 后,支架出现典型的羟基磷灰石特征峰。表明支架材料在 SBF 溶液中逐渐矿化形成的球状物为羟基磷灰石晶体。

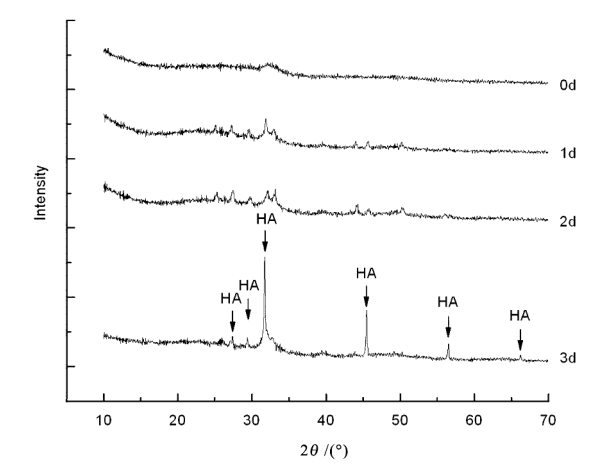


图 3 BG-COL-HYA 支架在 SBF 中矿化不同时间的 XRD 图谱

Fig.3 XRD spectra of BG-COL-HYA scaffolds at different time during mineralization in SBF solution

图 4 是 BG-COL 和 BG-COL-HYA 支架在 SBF 溶液中的质量变化情况。从图中可看出,两种支架在 SBF 溶液中既有矿化过程也有降解过程。在初始阶段,降解速率远大于矿化速率,支架的质量急剧降低。随着时间延长,矿化与降解处于相对平衡状态,支架的质量稳定。相比之下, BG-COL-HYA 支架处于平衡状态时的质量高于 BG-COL 支架。这表明 BG-COL-HYA 支架的矿化量高于 BG-COL 支架。

从材料学角度看,自然骨组织是包含有机材料和无机材料的复合体,且具有精巧而复杂的分级结构。骨形成过程中,首先由细胞分泌胶原蛋白分子,之后,胶原蛋白分子在细胞外组装成模板,紧接着体液中的矿物分子或离子沉积在胶原模板上形成以羟基磷灰石为主的矿物。胶原蛋白在矿化的初始阶段起着重要作用。天然骨中的羟基磷灰石晶体呈片状或针状,并在胶原纤维组装成的凹槽内规整排列,因而可以认为在无机物沉

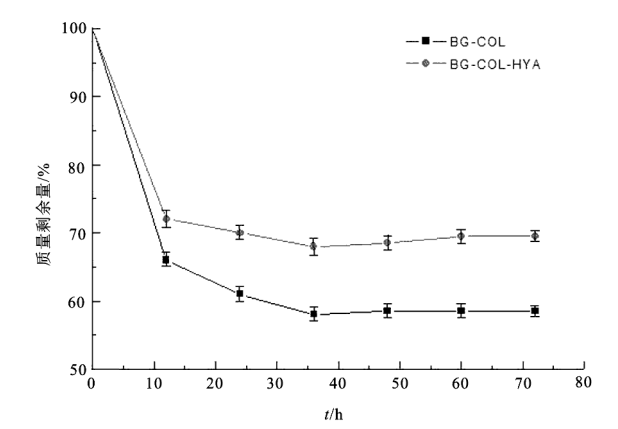


图 4 BG-COL 和 BG-COL-HYA 支架在 SBF 溶液中的质量变化

Fig.4 Mass changes of BG-COL and BG-COL-HYA scaffolds in SBF solution

积过程中胶原起着晶核的作用,而晶核是启动结晶的位点。首先是磷酸根然后是钙离子结合到成核点上^[4]。胶原纤维的这种活性功能可能来自于两方面:胶原分子独特的规则排列结构,以及因其侧链的特定集合而引起的电化学和立体化学影响^[5-6]。

但胶原蛋白本身不能完成基质的全部功能。天然骨中胶原纤维的周期性规整孔区仅是沉积磷酸钙晶体的模板,孔区或附近结合的某些非胶原蛋白,如糖蛋白、磷蛋白及富含羧基谷氨酸或羟基脯氨酸才是指导和促发矿化的物质,它们提供晶核形成的位点并调控晶体生长的取向,既可与胶原蛋白静电匹配,又能与钙离子强配位结合,因此起着桥接胶原与矿物的作用^[7]。

透明质酸是糖蛋白的一种,也是多阴离子化合物,其所带的负电荷官能团羧基可与胶原的羧基形成共价键。羟基磷灰石晶体的矿化过程是一种异相成核过程。此过程要求大分子上成核部位的原子排列与所形成的固相晶格匹配。透明质酸与胶原的共价结合有助于提高该复合分子与固相晶格的匹配,降低成核活化能。实验中发现,在 BG-COL 生物活性骨组织工程支架中添加透明质酸后,其矿化量也有所上升,其原因就在于透明质酸所带的负电荷官能团羧基不仅可以静电结合大量的钙离子,而且可以共价结合胶原,促进钙化。

3 结论

以透明质酸、胶原和生物玻璃制备了一种复

合支架材料,并研究了其体外矿化性能。研究表明,支架在矿化过程中可形成羟基磷灰石晶体;胶原蛋白和透明质酸对溶液中钙、磷离子的亲和力

构成了矿化机制的基础;且两种生物分子可相互键合,促进钙化。

参考文献:

[1] YANG C, WU H, WANG J. Fabrication of multiple layered scaffolds with controlled porous micro-architecture[J]. Mater Res,2017,20(2):349-355.

[2] ZHU Y, WAN Y, ZHANG J, et, al. Manufacture of layered collagen/chitosan-polycaprolactone scaffolds with biomimetic microarchitecture[J]. Colloids Surf B Biointerfaces,2014,113:352-360.

[3] 张文强,黄岳山,支晓兴.透明质酸在临床医学中的应用[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(23):4515-4518.

[4] 马克昌.骨生理学[M].郑州:河南医科大学出版社,2000:303-314.

[5] MOUV J K, OU G, WEAVER V M. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014,15(12):771-785.

[6] SIVARAMAN B, BASHUR C A, RAMAMURTH A. Advances in biomimetic regeneration of elastic matrix structures[J]. Drug DelivTransl Res,2012,2(5):323-350.

[7] VEIS A, DORVEE J R. Biomineralization Mechanisms: A new paradigm for crystal nucleation in organic matrices[J]. Calcif Tissue Int,2013,93(4):307-315.

(责任编辑:陈雯)

(上接第 214 页)

3) HX 系统的处理温度对除碱效率影响不大,选用 800 ℃ 为宜,随处理时间延长,碱金属质量分数降低幅度逐步减小,取 15 min 可达到理想效果。

4) 应用 HX 系统的实践表明,处理后平均 Na 质量分数可降至 1.8×10^{-6} ,除 Na 率为 90.9%;平均 Ca 的质量分数可降至 0.2×10^{-6} ,除 Na 率为 94%,是一种高效环保的除碱技术。

参考文献:

[1] 沈海鸥.用电解铝液生产铝合金扁铸锭的熔体净化工艺[J].轻合金加工技术,2009,37(4):13-16.

[2] 迟福全,王立娟,彭先亮. Na 元素对铝合金铸造性能的影响[J].轻合金加工技术,2002,30(8):14-15.

[3] TALBOT D, GRANGER D A. Effects of sodium and bismuth in aluminum-magnesium alloys[J]. jom,1995,47(2):44-46.

[4] ZHANG L, LÜ X, TORGERSON A T, et al. Removal of Impurity Elements from Molten Aluminum: A Review[J]. Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review, 2011, 32(3): 150-228.

[5] SYLVAIN P. The use of promag N1 at baat Canada inc [C] // The 5th International Melt Quality Workshop. Dubai: UEA, 2012.

[6] LANDOLT H. Thermodynamic properties of inorganic materials compiled by SGTE: heat capacities, enthalpies, entropies and Gibbs energies, phase transition data. Pure substances. Subvol. A[M]. Berlin:Springer,1999.

[7] RASCH B, MYRBOSTAD E, HASFAS K. Refining of potroom metal using the Hydro RAM crucible fluxing process[J]. Light Metals, 1998: 851-854.

(责任编辑:陈雯)