

# 组织工程用聚乳酸梯度支架的制备及分形研究

刘玮健 徐日炜 薛蓉 李默闻 余鼎声\*

(北京化工大学 新型高分子制备与加工北京市重点实验室, 北京 100029)

**摘要:** 采用改进的溶液浇铸/粒子沥滤工艺,将聚乳酸(PLLA)与致孔剂粒子粉碎后,制备了双层和多层孔径梯度变化的 PLLA 泡沫支架。扫描电镜观察表明,材料内部界面处存在一定的扩散现象,且界面处孔的连通性好,通过调整致孔剂粒子的粒径以及 PLLA 与致孔剂粒子的比例,可有效地调控支架的各项参数(材料大小、孔径、孔隙率)。对材料进行分形研究,表明梯度多孔支架内部无明显界面,孔径过渡平缓。

**关键词:** 聚乳酸; 梯度材料; 组织工程; 支架; 分形

**中图分类号:** O631.11

在骨组织工程中,支架的性能对于骨的修复起着至关重要的作用<sup>[1]</sup>,骨骼中骨细胞密度由内层向表层是逐步增加的,这种海绵质向致密质逐步变化的梯度结构使骨骼坚硬结实而又不失柔韧<sup>[2]</sup>。人体骨的特殊结构,要求骨组织工程支架不能是简单的单一结构。尽管现在制备支架的方法很多,如粒子沥滤法<sup>[3]</sup>、相分离法<sup>[4]</sup>、气体发泡法<sup>[5]</sup>以及纤维粘接法<sup>[6]</sup>等多种方法,但是这些方法制备的支架多数结构单一,难以满足生物特性的需求;通过粒子沥滤法制备的多孔膜层叠得到的三维支架,虽然在理论上可以实现支架立体结构的变化,但由于膜间存在明显的界面,黏结区与膜内部结构存在显著差异<sup>[7]</sup>。以往梯度材料的微观形貌都是通过对电子显微镜照片的肉眼来观察,没有一种实施简单且误差小的方法。

本文采用了与人体无排斥性且生物降解性较好的 PLLA 材料,改进了经典的溶液浇铸/粒子沥滤工艺<sup>[8]</sup>,制作了双层和多层孔径梯度变化的泡沫支架;采用分形理论<sup>[9]</sup>,为梯度材料界面扩散研究提供了一种新的方法,将分形维数作为材料表面复杂程度的一种参数,能够合理的表征孔隙率、孔径等因素的综合影响。

## 1 实验部分

### 1.1 原料

聚乳酸(PLLA),粘均分子量 30 万,山东医疗器械研究所;二氯甲烷,分析纯,北京世纪红星化工有限公司;无水乙醇,分析纯,北京世纪红星化工有限公司;氯化钠,天津北方天医化学试剂厂;硝酸银,分析纯,北京化工厂。PLLA 经粉碎后,筛取粒径为 200~300 $\mu\text{m}$ 的颗粒备用,同样方法制取粒径为 300~450 $\mu\text{m}$ ,150~200 $\mu\text{m}$ 的 NaCl 颗粒备用。

### 1.2 支架的制备

将 PLLA 粉末与特定粒径的 NaCl 颗粒混合均匀后加入到柱形模具中(如图 1),加入二氯甲烷,0.5 min 后,开始抽真空,控制液滴的滴速,使二氯甲烷完全渗透到 PLLA 与 NaCl 的混合体系中,在此过程中 PLLA 完全溶解并将致孔剂(NaCl)颗粒包覆其中。待溶剂全部滴下,继续抽真空 1 h,直到材料表面变干,加入大量乙醇,将材料中的残余溶剂去除。

将材料从模具中取出后,放入去离子水中,沥去支架中的造孔剂粒子,每隔 2 h 更换 1 次去离子水。当向沥取液中滴入硝酸银溶液时,无白色沉淀产生,则表明 NaCl 已滤净。记录沥清时间,继续在去离子水中浸泡 24 h,若不发生硝酸银沉淀反应,即说明此沥滤时间可靠有效。

将制得的支架材料放入真空烘箱中干燥 24 h 备用。

按照 PLLA 与 NaCl 质量比为 1:16,将 PLLA 粉末分别与粒径为 300~450 $\mu\text{m}$ 、150~200 $\mu\text{m}$ 的

收稿日期: 2005-12-19

基金项目: 国家自然科学基金(50373001)

第一作者: 男,1981 年生,硕士生

\*通讯联系人

E-mail: yuds@mail.buct.edu.cn

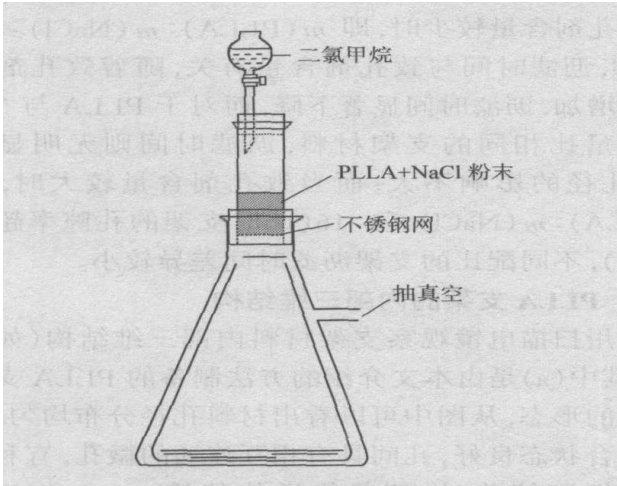


图 1 PLLA 支架的制备装置图

Fig. 1 Schematic diagram of the apparatus used for fabrication of PLLA scaffolds

NaCl 晶体颗粒混合均匀,铺于模具中,重复上述操作过程,制备孔径均匀分布的支架。

将制备的两种孔径的 PLLA 支架表面喷涂一层二氯甲烷,然后粘在一起,制备叠层材料支架。

按照 PLLA 与 NaCl 质量比为 1:16,将 PLLA 粉末分别与 300~450 μm、150~200 μm 的 NaCl 晶体颗粒混合均匀,各取 3 g 依次铺于模具底部,重复上述操作步骤,制备双层梯度支架。

在 NaCl 颗粒与 PLLA 粉末混合之前,参与混合的 300~450 μm、150~200 μm 的 NaCl 晶体颗粒首先被以 5:0.4:1.3:2.1:1.2:3.1:4.0:5 的质量比分别进行混合,从而形成一个粒径大的 NaCl 颗粒逐渐减少而粒径小的 NaCl 颗粒逐渐增大的级分加料

系列。然后按照 PLLA 与 NaCl 质量比为 1:16,将 PLLA 分别加入到以上体系中混合均匀。加料时,将这一系列混合物依次铺于模具当中,压实,重复上述步骤以制备多层梯度支架。

1.3 孔隙率的测定

采用密度法,使用比重瓶测定支架材料的孔隙率<sup>[10]</sup>。

1.4 三维结构观察

将所制得的支架材料切割为 5 mm ×5 mm ×5 mm 的样品,表面喷金后,使用扫描电镜 (Cambridge 250 MK3) 于 19 kV 下观察支架的内部孔径结构及其分布。

1.5 支架材料压缩性能测试

采用 Instron 1185 万能材料试验机测定材料的压缩强度,测试速度 5 mm/min,温度 23℃,湿度 70%,记录支架被压缩 3 mm 时的强度。

1.6 梯度支架的分形研究

将扫描电镜照片用图像软件进行处理,沿孔径变化的方向每隔一定厚度刻度重复取样,截取照片的大小一致。然后将这些截取照片用自行编定的分形维数软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 外观观察

由本文介绍的方法制备的 PLLA 支架外观良好,表面平整,质地均一,形态规则。梯度支架外观无分层现象(如图 2)。

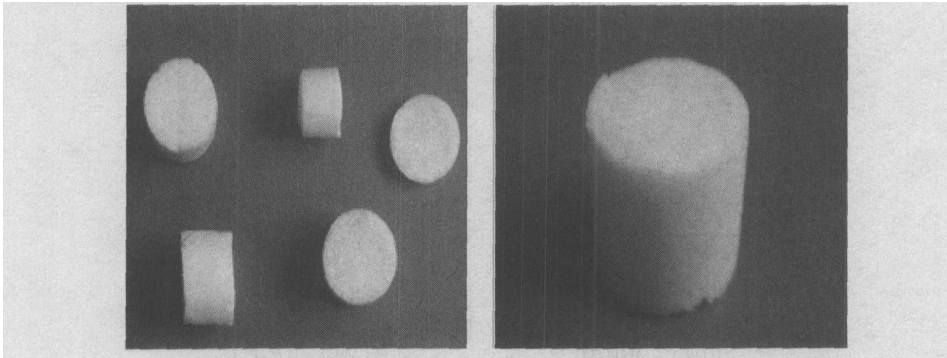


图 2 PLLA 支架的外观图

Fig. 2 External appearance of the PLLA scaffolds

2.2 支架沥滤时间及孔隙率的比较

用重量法测定多孔支架的孔隙率,从表 1 中可以看出,致孔剂 (NaCl) 的用量与多孔支架的孔隙率有比较好的对应关系,随着材料中致孔剂用量的增

加,PLLA 多孔支架的孔隙率逐渐增加,说明致孔剂的浸出是致孔的原因,所以可以通过致孔剂用量来控制多孔支架的孔隙率。

表 1 PLLA 支架的孔隙率测定

Table 1 Porosity of PLLA scaffolds prepared using different weight ratios of salts/ PLLA

样品数目/ 个	$m(\text{PLLA})$ $m(\text{NaCl})$	$m(\text{NaCl})$ / %	孔隙率/ %
32	1 10	90.90	80.37 $\pm$ 2.1
32	1 12	92.31	83.24 $\pm$ 2.5
32	1 14	93.33	88.66 $\pm$ 1.7
32	1 16	94.12	93.80 $\pm$ 2.0
32	1 18	94.74	97.89 $\pm$ 1.2

支架的沥滤时间(如表 2),经统计学处理发现,

表 2 PLLA 支架的沥滤时间

Table 2 Average leaching time of the PLLA scaffolds

$m(\text{PLLA})$ $m(\text{NaCl})$	支架沥滤时间/h			
	孔径均匀分布		孔径梯度分布	
	150 ~ 200 $\mu\text{m}$	300 ~ 450 $\mu\text{m}$	双层梯度	多层梯度
1 10	39.5 $\pm$ 2.2	40.8 $\pm$ 1.9	40.3 $\pm$ 2.0	40.5 $\pm$ 3.6
1 12	29.4 $\pm$ 1.0	30.8 $\pm$ 1.4	30.3 $\pm$ 0.9	31.3 $\pm$ 1.7
1 14	21.9 $\pm$ 1.3	22.2 $\pm$ 1.2	22.5 $\pm$ 1.8	23.2 $\pm$ 1.4
1 16	16.0 $\pm$ 1.1	16.5 $\pm$ 1.5	15.8 $\pm$ 1.6	16.5 $\pm$ 1.1
1 18	15.8 $\pm$ 0.7	16.2 $\pm$ 0.9	15.9 $\pm$ 0.6	16.5 $\pm$ 1.0

当致孔剂含量较少时,即  $m(\text{PLLA}) : m(\text{NaCl}) = 1 : 14$  时,沥滤时间与致孔剂含量有关,随着致孔剂含量的增加,沥滤时间显著下降,而对于 PLLA 与 NaCl 质量比相同的支架材料,沥滤时间则无明显差异,孔径的影响不大;而当致孔剂含量较大时, $m(\text{PLLA}) : m(\text{NaCl}) = 1 : 16$ (此时支架的孔隙率超过 90%),不同配比的支架沥滤时间差异较小。

### 2.3 PLLA 支架的内部三维结构

用扫描电镜观察支架材料内部三维结构(如图 3),其中(a)是由本文介绍的方法制备的 PLLA 支架中孔的形态,从图中可以看出材料孔径分布均匀,孔壁结合状态良好,孔间具有相互连通的微孔,有利于后期细胞培养时,营养物质的传输。(c)(d)是 PLLA 梯度材料的内部形态,在梯度支架中,界面处存在一定的扩散现象,且界面处孔的连通性好,而叠层材料内部(如图 3(b)),明显存在分界,界面处为较致密结构,且附近的孔有压缩变形的现象发生,这些均不利于细胞的繁殖生长,并且由于界面效应,在材料中会存在较大的内应力。

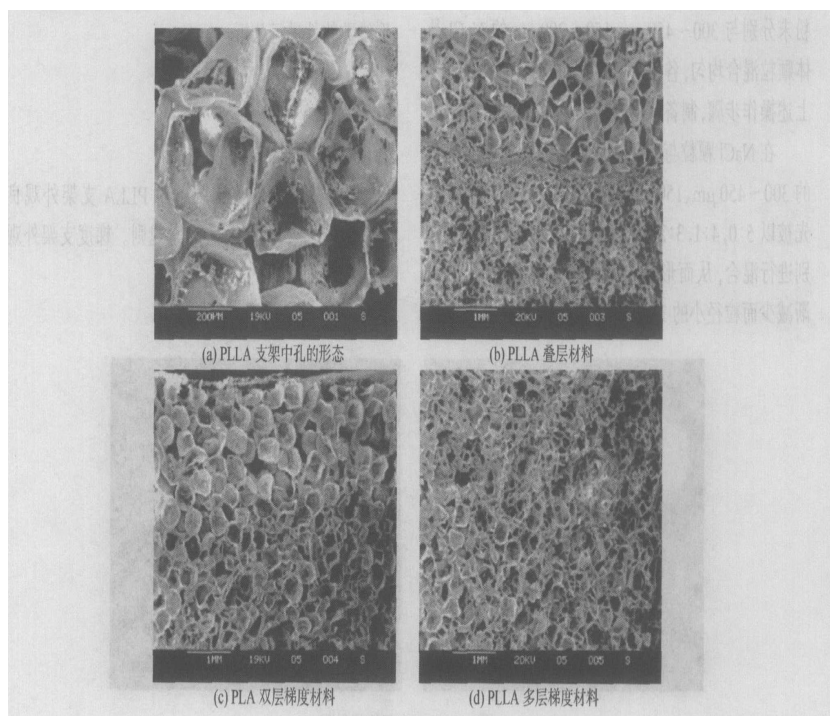


图 3 支架内部三维结构 SEM 照片

Fig. 3 Scanning electron microscope micrographs of the internal three dimensional pore structure

### 2.4 PLLA 支架的机械性能

从图 4 中可以看出,4 种支架材料的压缩强度

均随致孔剂含量的增加(孔隙率上升)而显著下降,且下降趋势相同。对于致孔剂含量相同的 4 种支架

材料,其压缩强度无显著差异,说明该法制备的 PLLA 支架材料在一定的孔径变化范围内,压缩强度与孔隙率有关,而与孔径大小无关,梯度支架与孔径均匀分布的支架压缩强度差别不大。

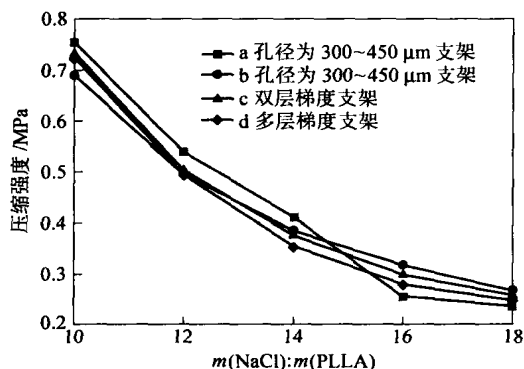


图 4 PLLA 支架的压缩性能

Fig. 4 Compression strength of the PLLA scaffolds

## 2.5 三维结构的分形研究

多孔支架材料在统计学上是分形结构,本文采用改进的网格盒子维法测定分形维数<sup>[11]</sup>。为了尽可能接近真实值,对每一个样品进行重复抽样,剪裁图片的大小一致;编辑程序采用大津方法,即最大类间方差法,对每张照片进行自动阈值选取,再进行二值化处理;对支架进行纹理边界提取,把表面的信息加以归类;用网格覆盖计算分形盒维数,选定盒子的边长以像素(pixel)为单位,作为横坐标,以与图像纹理相交的盒子数为纵坐标,做双对数坐标图,用最小二乘法计算斜率,绝对值即图形的维数。

根据欧氏几何学中的“截面约定”<sup>[11]</sup>, D 维的物体在该截面上的交线为 D-1 维。为了数据处理方便起见,本文在数据处理中仍然沿用网格图斜率直接得出的维数,即比实际情况少一维的数据。

本文制备的支架材料丰富多孔,孔的直径都在 0.15 mm 以上,排布紧密,孔分布密集且均匀,属于

高度立体材料,测定的维数值应该更接近于 2。从 SEM 照片中可以看出,小孔区域比大孔区域有更加复杂的表面形态,单位面积内具有更多的孔、孔壁、孔间皱褶,所以应该具有更高的维数值。

对于叠层材料,中间两种孔材料的粘合部位,由于溶剂作用使边缘孔破裂或扭曲而粘合在一起,这一段区域既有不规则的大孔又有扭曲的小孔,还有一些混杂无规的开孔形成粘合区,这一段材料的复杂度比单纯的大孔或小孔更高,具有更高的分形维数。

如图 5(a) 所示,叠层材料的厚度均是从小孔一段开始表征。分形维数图中可以明显看出前半段材料的维数值和后半段材料维数值分别保持恒定,不随厚度的增加而有明显变化。这说明支架材料的制作工艺可靠,所作的孔形貌均匀,具有相近的维数值。而且前半段是小孔部分的维数值变化,后半段是大孔部分,前者的维数值较后者高。中间的粘合部位 1~2 mm,其维数明显高于前后两部分,甚至高达 2,这说明了粘合部位存在着明显的界面效应,这正是支架材料最应该避免也最不容易避免的缺陷。

对于双层梯度材料,前后两部分大孔和小孔材料维数值分别恒定,这个特征在叠层材料维数图中可以看出,所以梯度材料只表征过渡区域。如图 5(b) 所示,在从小孔区域向大孔区域过渡的 5 mm 区域中,维数值是逐渐下降的,曲线平滑。这说明本文的制作方法有效的解决了界面效应,使梯度支架材料的维数值变化均匀,也就是形态变化均匀。

借助双层梯度材料的制作原理,减少每一层的厚度,就可通过控制工艺将整个材料做成均匀过渡的多层梯度材料。如图 5(c) 所示,多层梯度材料中没有明显过渡面,整个材料的维数变化从小孔区域到大孔区域均匀降低,曲线平滑,说明每层界面处均存在扩散现象,整个材料中的孔径分布变化平缓。

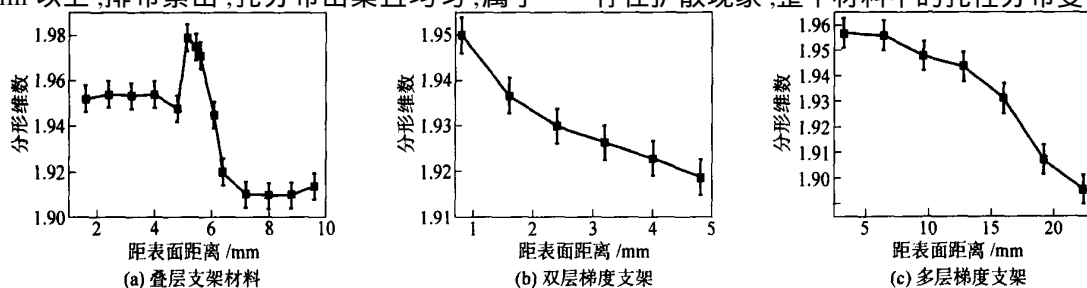


图 5 PLLA 支架分形维数变化

Fig. 5 Variation in fractal dimension of PLLA scaffolds

### 3 结束语

采用改进的溶液浇铸/粒子滤出法可以制备出各项参数(材料大小、孔径、孔隙率、压缩强度)可控、孔径梯度分布的 PLLA 支架材料。采用分形研究表明,材料内部无明显界面存在。

### 参 考 文 献

- [1] Hutmacher D W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage [J]. *Biomaterials*, 2000, 21 (24): 2529 - 2543.
- [2] 温变英. 聚合物梯度材料的制备及材料结构与性能研究[D]. 博士学位论文. 北京:北京化工大学,2003.
- [3] Cai Q, Yang J, Bei J Z, *et al.* A novel porous cells scaffold made of polylactide-dextran blend by combining phase separation and particle-leaching techniques [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(23): 4483 - 4492.
- [4] Whang K, Goldstick T K, Healy K E. A biodegradable polymer scaffold for delivery of osteotropic factors [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(24): 2545 - 2551.
- [5] Nam Y S, Yoon J J, Park T G. A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive [J]. *Journal of Biomedical Materials Research (Part B: Applied Biomaterials)*, 2000, 53(1): 1 - 7.
- [6] Mooney D J, Mazzoni C L, Breuer C, *et al.* Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 1996, 17(2): 115 - 124.
- [7] Mikos A G, Sarakinos G, Leite S M, *et al.* Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 1993, 14: 323 - 330.
- [8] Liao C, Chen C, Chen J H, *et al.* Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method [J]. *Journal of Biomedical Materials Research (Part A)*, 2002, 59(4): 676 - 681.
- [9] 张济忠. 分形[M]. 北京:清华大学出版社,1995.
- [10] 石桂欣, 王身国, 贝建中. 聚乳酸与聚乳酸-羟基乙酸多孔细胞支架的制备及孔隙的表征[J]. *功能高分子学报*, 2001, 14: 7 - 11.
- [11] 褚武扬. 材料科学中的分形[M]. 北京:化学工业出版社,2004.

## The fabrication and fractal study of poly(L-lactic acid) gradient scaffolds for tissue engineering

LIU Wei-jian XU Ri-wei XUE Rong LI Mo-wen YU Ding-sheng

(Key Laboratory of Beijing Municipality for Preparation and Processing of Novel Polymer Materials,  
College of Materials Science & Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** Three-dimensional gradient porous foams were prepared by the solvent-casting and particulate-leaching technique using particles of a certain size of poly(L-lactic acid) and sodium chloride. SEM revealed that a highly porous three-dimensional scaffold having a well interconnected porous structure could be achieved by this process and that the pores were connected with each other around the interface. Porosity and pore size of the scaffold were controlled using different ratios of poly(L-lactic acid) to sodium chloride and particle size of the added salt particles. A fractal dimension study showed that the variation in pore size in the gradient scaffold was smooth without any obvious interface.

**Key words:** poly(L-lactic acid); gradient material; tissue engineering; scaffolds; fractal