

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102526797 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 04

(21) 申请号 201210026907. 6

(22) 申请日 2012. 02. 08

(71) 申请人 同济大学

地址 200092 上海市杨浦区四平路 1239 号

(72) 发明人 黄文岳 陆林楠 王德平 周萁

崔旭 李乐

(74) 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

31200

代理人 张磊

(51) Int. Cl.

A61L 27/10 (2006. 01)

A61L 27/56 (2006. 01)

A61L 27/50 (2006. 01)

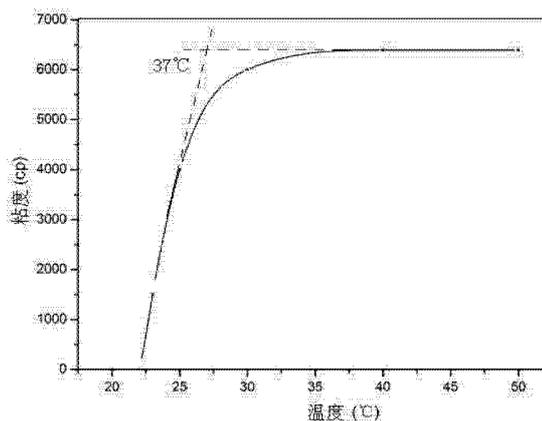
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 7 页

(54) 发明名称

一种有规则孔分布的高强度生物玻璃骨支架的制备方法

(57) 摘要

本发明属于生物工程技术领域,具体涉及一种有规则孔分布的高强度生物玻璃骨支架的制备方法。这种具有生物活性能完全降解的玻璃支架,制备方法包括如下步骤:用熔融法制备硼酸盐生物活性玻璃,将玻璃块粉碎、筛分成一定尺寸的玻璃粉末;将该玻璃粉体与有机调和液丙二醇嵌段聚醚溶液,调配成均匀浆体;通过计算机三维打印过程,在已经设计好的程序下打印出支架前驱体(坯体);将坯体干燥后,在高温下将其烧结,最终得到的玻璃支架不仅具有优良的生物活性。



1. 一种有规则孔分布的高强度生物玻璃骨支架的制备方法,其特征在于具体步骤如下:

(1) 玻璃粉料的制备

用于支架制备的生物玻璃是以硼酸盐为主体的硼硅酸盐体系玻璃,生物玻璃粉料的组成为:以 B_2O_3 或 P_2O_5 为玻璃网络主体或兼含 SiO_2 的含钙玻璃,总摩尔比为 30-90 mol%,玻璃的网络外体含有 CaO , 并且还含有 Na_2O 、 K_2O 碱金属氧化物以及 MgO , SrO 碱土金属氧化物或稀土金属氧化物;网络外体离子氧化物的总摩尔比例占玻璃组成总摩尔量为 5-80mol%,其中碱土金属氧化物的摩尔含量占总摩尔量为 5-60mol%;根据上述玻璃的组成与配比,取与金属氧化物相应的氧化物、氯化物、碳酸盐、硫酸盐和磷酸盐的工业原料作为玻璃配合料,混合均匀,在 1000-1400°C 下熔融玻璃并保温 0.5-8 小时;随后淬冷得到玻璃块;将所得玻璃块依次经横式球磨机粗碎、行星球磨机细碎或气流粉碎机细碎,并筛分得到最终粒径为 0.05-50 μm 的玻璃粉料;

(2) 丙二醇嵌段聚醚有机调和液的制备

将分子量为 1800 - 2500 聚醚和 2,6-二叔丁基对甲酚以 1:1 - 2.5:1 的重量比率混合成悬液浊液,用 50wt% 的甲苯溶液,溶解此悬浊液,置于三口烧瓶中;用铂氯酸的异丙醇溶液作为催化剂,每克反应物中催化剂的用量为 50 μg ,在 70 - 90°C 温度下,搅拌,冷凝回流,氮气保护,反应 5 - 8 小时后,取出反应物,通过减压蒸馏,除去单体和低聚合物,获得粘稠的丙二醇嵌段聚醚;将合成的丙二醇嵌段聚醚(克),溶解在 50%乙醇(毫升)中,比例为 1:0.5-1:1.5 制得溶液,就得到所需的有机调和液;用粘度法表征有机调和液的相变温度在 20 - 40°C 之间;

(3) 玻璃料浆的制备

将步骤 (1) 所得的玻璃粉料与步骤 (2) 所得有机调和液混合,玻璃粉重量(克): 调和液体积(毫升)为 1: 0.1-1: 0.5;经搅拌 4 - 8 小时后置于 10°C - 20°C 水浴中存放以去除气泡,制成均匀的玻璃料浆;放入冰箱中陈化,待用;

(4) 蜂窝状坯体的制备

先将步骤 (3) 所得玻璃料浆用 10 - 225 μm 的筛子过筛,去除大块团聚,并将过筛后的浆料灌入打印机的注射器中,浆料通过注射口直径尺寸为 0.2-2 毫米可调节的注射器,在 0.01-0.05MPa 压力下自注射口挤出,挤出速度为 0.05-1.0 毫米 / 秒,构成连续成线状的浆体柱;打印过程中喷管及挤出的料浆均位于 40°C - 70°C 的油浴中,挤压出的第一层料浆平铺在 Al_2O_3 板上,随后的料浆自下而上逐层累积,固化成由固体柱构成的蜂窝状坯体;坯体制备过程均由电脑程序预先设计,并全程控制挤出浆料的速度,以适应料浆粘结下层固体柱的凝固时间;全程控制挤出的位置,以调节由固体柱形成的上下、左右和高低的三维孔隙,构成不同的孔隙率和孔径的蜂窝状坯体;

(5) 蜂窝状坯体的烧结

支架坯体先放入 10 - 90°C 的烘箱中保温 12 - 48 小时去除大部分煤油;然后放入马弗炉中脱胶并烧结,其烧结条件为:以 1°C /min 升温速度升到 400 - 550°C,保温 5 - 24 小时;以 1°C /min 升温速度升到 550 - 700°C,保温 1 - 5 小时。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所得玻璃支架孔隙规则,孔隙率为 10 - 95%,最大孔径尺寸为 10 - 1000 μm ,抗压强度为 30 - 70 Mpa。

3. 根据权利要求 1 中所述的方法,其特征在于所得支架能应用于节段性骨修复,能用作骨组织工程中骨支架材料,能完全降解形成新骨。

一种有规则孔分布的高强度生物玻璃骨支架的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,具体涉及一种有规则孔分布的高强度生物玻璃骨支架的制备方法。

背景技术

[0002] 支架作为一种为细胞的生长临时搭建一个结构,是能诱导细胞分化再生出与支架形状的相似的组织器官的场所,在骨组织工程中有着重要的作用。骨组织最大的特点是细胞间质具有大量的钙盐沉积形成人体中最硬的组织之一,结构上羟基磷灰石可看作受压材料。对于骨组织工程中的支架材料来说,首要要求的就是力学性能,即支架的力学性能必须与环境组织的力学性能相匹配;强度低的支架不足以支撑人体的日常活动需求。目前制备支架的方法主要有有机泡沫浸渍法、造孔剂法、气体发泡法和热诱发相分离法等,例如在中国发明专利, CN 101050053 B中,介绍了有机泡沫浸渍法制备的骨支架,。这些方法均是试图借助材料组织本身来搭建支架结构的,而且由这些传统方法得到的支架强度普遍偏低,承重能力无法与真正的骨相匹配。另一方面支架材料要求其必须能够促进组织的再生,而组织再生的能力会受材料表面的性状与细胞的相互作用,和支架的物质传导作用的影响。

[0003] 在近些年来一种新型骨组织材料受到越来越多的关注,它就是硼酸盐生物玻璃。它具有很好的生物活性,在生物玻璃、软组织和骨之间存在着密切的离子交换,从而导致材料界面与人体骨组织之间形成化学键合,表面能够生成具有生物活性的羟基磷灰石层,随着时间的延长可以完全降解。但是,由于传统制备方法得到的支架强度问题,生物玻璃支架难以作为承重部位的植入材料应用。

[0004] 建立在已有的一种可控降解性能的玻璃支架制备的基础(中国发明专利, CN 101050053 B和中国发明专利, CN 101125218 B)上,本专利申请描述了一种有规则孔分布的生物玻璃高强度骨支架及其制备方法,与之前的工艺方法相比,本专利制备出的支架强度提高一个数量级,且具有孔分布规则、连通的特点。在本专利中规定了硼酸盐生物玻璃支架的组成;三维打印技术的具体实现方法;打印浆料的制备方法;对支架进行了细胞实验和动物实验。结果表明这种硼酸盐玻璃支架在烧结过程中不析晶,仍保持原有的玻璃相物态,具有良好的加工性能;由于具有均匀的孔分布,坯体烧结时各方向收缩程度一致,因此不会改变孔结构;与传统方法相比该支架抗压强度大大提高;此外,通过细胞实验和动物实验证实了这种方法制备的骨组织工程支架有良好的生物相容、降解性和刺激骨细胞生长的性能。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种有规则孔分布的高强度生物玻璃骨支架的制备方法,解决浆料不能适应快速成形的问题,和传统方法制备的支架的生物活性不够高,或者抗压强度不够高的缺点。

[0006] 本发明提出的有规则孔分布的高强度生物玻璃骨支架的制备方法,利用三维打印

技术将特制的硼酸盐生物玻璃浆料打印(挤出)堆积成支架前驱体(蜂窝状坯体),最后烧结成具有规则孔结构的高强度生物玻璃支架。这种支架不仅在生理模拟液中可以逐渐被降解,有良好的生物相容性和生物活性,对成骨有刺激作用;而且有较高的机械性能,在临床上对节段性骨修复有潜在的应用。具体步骤如下:

(1) 玻璃粉料的制备

用于支架制备的生物玻璃是以硼酸盐为主体的硼硅酸盐体系玻璃,生物玻璃粉料的组成为:以 B_2O_3 或 P_2O_5 为玻璃网络主体或兼含 SiO_2 的含钙玻璃,总摩尔比为 30-90 mol%,玻璃的网络外体含有 CaO , 还含有 Na_2O 、 K_2O 碱金属氧化物以及 MgO , SrO 碱土金属氧化物或稀土金属氧化物;网络外体离子氧化物的总摩尔比例占玻璃组成总摩尔量为 5-80mol%,其中碱土金属氧化物的摩尔含量占总摩尔量为 5-60mol%;根据上述玻璃的组成与配比,取与金属氧化物相应的氧化物、氯化物、碳酸盐、硫酸盐和磷酸盐的工业原料作为玻璃配合料,混合均匀,在 1000-1400°C 下熔融玻璃并保温 0.5-8 小时;随后淬冷得到玻璃块。将所得玻璃块依次经横式球磨机粗碎、行星球磨机细碎或气流粉碎机细碎,并筛分得到最终粒径为 0.05-50 μm 的玻璃粉料;

(2) 丙二醇嵌段聚醚有机调和液的制备

丙二醇嵌段聚醚是由聚醚(分子量为 1800 - 2500)和 2,6-二叔丁基对甲酚(纯度大于 98%)通过亲核取代反应而合成的。前者分子式为 $HO-(C_2H_4O)_m-(C_3H_6O)_n-H$, 后者为 $C_{15}H_{24}O$ 。将两者以 1:1 - 2.5:1 的重量比率混合成悬液浊液,用 50wt% 的甲苯溶液,溶解此悬浊液,置于三口烧瓶中。用铂氯酸($H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$)的异丙醇溶液(浓度为 0.01mol/L)作为催化剂,催化剂的用量为 50 $\mu g/g$ (催化剂重量/反应物重量),在 70 - 90°C 温度下,激烈搅拌,冷凝回流,氮气保护,反应 5 - 8 小时后,取出反应物,通过减压蒸馏,除去单体和低聚物,获得粘稠的丙二醇嵌段聚醚。将合成的丙二醇嵌段聚醚(克),溶解在 50%乙醇(毫升)中,比例为 1:0.5-1:1.5 制得溶液,就得到所需的有机调和液。用粘度法表征有机调和液的相变温度在 20 - 40°C 之间。因为我们需要的浆料在低温时呈溶胶状,有一定流动性,高于相转变温度则立即固化。本实验的相变温度在室温附近,有利于控制相变发生,即该相变温度有利于合成支架坯体。

[0007] (3) 玻璃料浆的制备

将所得的玻璃粉料以一定比例与上述调和液混合,混合的比例(即玻璃粉重量(克):调和液体积(毫升))为 1:0.1-1:0.5;经激烈搅拌 4 - 8 小时后置于 10°C - 20°C 水浴中存放以去除气泡,制成均匀的玻璃料浆。最后放入冰箱中陈化 4 小时后待用。

[0008] (4) 蜂窝状坯体的制备

先将浆料用 10 - 225 μm 的筛子过筛,去除大块团聚,并将过筛后的浆料灌入打印机的注(喷)射器中,浆料会通过注射口直径尺寸为 0.2-2 毫米可调节的注(喷)射器,在 0.01-0.05MPa 压力下自注射口(喷头)挤出,挤出速度为 0.05-1.0 毫米/秒,构成连续成线状的浆体柱。打印过程中喷管及挤出的料浆均位于 40°C - 70°C 的油浴中(99%煤油),以便打印出的料浆能够迅速固化成固体柱,这样不仅可以保证打印出的坯体形状规则,还可以立即承受随后加于其上的固体柱的重量。挤压出的第一层料浆平铺在 Al_2O_3 板上,随后的料浆自下而上逐层累积,固化成由固体柱构成的蜂窝状坯体。坯体制备过程均由电脑程序预先设计,并全程控制挤出浆料的速度,以适应料浆粘结下层固体柱的凝固时间;全程控制挤

出的位置,以调节由固体柱形成的上下、左右和高低的三维孔隙,构成不同的孔隙率和孔径的蜂窝状坯体。

[0009] (5) 蜂窝状坯体的烧结

支架坯体先放入 10 — 90℃ 的烘箱中保温 12 — 48 小时去除大部分煤油。然后放入马弗炉中脱胶并烧结,其烧结条件为:以 1℃ /min 升温速度升到 400 — 550℃,保温 5 — 24 小时;以 1℃ /min 升温速度升到 550 — 700℃,保温 1 — 5 小时。

[0010] 利用本发明所获得支架能应用于节段性骨修复,能用作骨组织工程中骨支架材料,能完全降解形成新骨。

[0011] 利用本发明方法制备得到的玻璃支架有较好生物相容性,能黏附成骨细胞;有较好生物活性,玻璃支架降解后能转化成骨的无机成分羟基磷灰石;有优良的生物降解性,在生物体内完全降解。所得玻璃支架孔隙规则,孔隙率为 10 — 95%,最大孔径尺寸为 10 — 1000 μm ,抗压强度为 30 — 70 MPa,较传统方法制备普遍得到的支架抗压强度高。并且由于三维打印法本身的特点,是按照预先已经设计好的三维外形软件来挤出浆料的,也就能对支架的结构和性能进行预设计,满足不同部位骨修复的需要。

附图说明

[0012] 图 1 为支架各方向形貌图:(a) 立体图,(b) 俯视图,(c) 侧视图。

[0013] 图 2 为丙二醇嵌段聚醚的相转变温度测定。

[0014] 图 3 为支架抗压强度曲线。

[0015] 图 4 为玻璃粉和制备后支架的物相 XRD 测定。

[0016] 图 5 为支架样品浸泡 20 天后的 XRD 图谱。

[0017] 图 6 为支架样品浸泡 20 天后的 FTIR 图谱。

[0018] 图 7 为成骨细胞 MC3T3-E1 在 37℃ 条件下在支架形貌以及其上的细胞黏附情况。其中:(a) 浸泡 3 天后支架形貌,(b) 5 天后细胞黏附,(c) 9 天后细胞黏附。

[0019] 图 8 为节段性骨缺损处实施埋入支架实验后的 X 射线片。(a) 4 周,(b) 8 周,(c) 12 周。

具体实施方式

[0020] 下面通过实施例进一步说明本发明。

[0021] 实施例 1:三维连通支架的制备,由下列五个步骤组成。

[0022] (1) 玻璃粉料的制备

称取称取 3.8185g 无水碳酸钠,9.9587g 无水碳酸钾,1.7502g 碱式碳酸镁,19.8328g 碳酸钙,7.9781g 碳酸锶,9.7420g 二氧化硅,41.2991g 硼酸,5.6206g 磷酸二氢钠。混合均匀并研磨后将配料置于铂金坩埚内在 1200℃ 中保温 30 min;随后将得到的玻璃液浇在钢板上淬冷得到玻璃块。将所得玻璃块依次经横式球磨机粗碎、球磨细碎并过筛得到最终粒径为 0.05—5 μm 的玻璃粉料。

[0023] (2) 丙二醇嵌段聚醚有机调和液的制备和相转变温度的测定

取 50ml 的甲苯溶液(50wt%),置于三口烧瓶中。再称取聚丙二醇醚(分子量为 2200) 15 克,另称取 2,6-二叔丁基对甲酚(纯度大于 98%) 10 克,两者充分混合成均匀的悬浊液,

滴加到三口烧瓶中。再取铂氯酸($H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$)的异丙醇溶液(浓度为 $0.01mol/L$) 1.25 毫克,作为催化剂,滴加到三口烧瓶中。在 $90^\circ C$ 温度下,激烈搅拌,冷凝回流,氮气保护,反应 5 小时后,取出反应物,通过减压蒸馏,获得粘稠的丙二醇嵌段聚醚。

[0024] 将粘稠的丙二醇嵌段聚醚用 30 毫升 50% 乙醇溶解,得到所需的有机调和液。用粘度法表征有机调和液在不同温度下的粘度突变点,确定相变温度为 $27^\circ C$ (见图2)。

[0025] (3) 玻璃料浆的制备

称取 $5g$ 上述玻璃粉,加进 $2ml$ 有机调和液溶液,置于烧杯中搅拌均匀,使玻璃粉料均匀分散在调合液溶液中。然后再将其置于 $10^\circ C$ 水浴中去除气泡,制成均匀的料浆,放到 $4^\circ C$ 冰箱中,冷藏 12 小时后使用。

[0026] (4) 蜂窝状坯体的制备

先将料浆用 $75\mu m$ 的筛子过筛,去除大块团聚,然后将过筛的料浆放入三维打印机针管中。打印过程中针管及挤出的料浆均位于 $40^\circ C$ 的油浴中(99% 煤油)。油浴锅内放入 Al_2O_3 板,将打印喷头置于在 Al_2O_3 板之上,开启计算机打印程序,打印机喷口挤出蜂窝状坯体堆积在 Al_2O_3 板上。

[0027] (5) 蜂窝状坯体的烧结

将蜂窝状坯体放入 $30^\circ C$ 的烘箱中保温 24 小时去除大部分煤油,然后放入马弗炉中脱胶并烧结,其烧结制度为:以 $1^\circ C/min$ 升温速度升到 $500^\circ C$,保温 12 小时;以 $1^\circ C/min$ 升温速度升到 $600^\circ C$,保温 1 小时,然后关闭电源, 24 小时后,炉温降至室温,蜂窝状坯体被烧结成支架。

[0028] 通过上述各步骤,制备成具有规则孔结构的高强度生物玻璃支架(见图1A,1B和1C)。

[0029] 实施例2:支架的孔径、孔隙率的测定和强度的测定

按实施例1所叙述的方法,制备三维连通支架。参照国家标准GBT 5164-1985《可渗性烧结金属材料开孔率的测定》,对支架的孔隙率进行测定,结果表明该支架孔隙率为 60% ,最大孔径尺寸为 $400\mu m$,与图1B和C的SEM的观察相符合。利用抗压强度测定仪测得实施例1中的支架抗压强度为 $30MPa$ (见图3)。

[0030] 实施例3:生物性能的测定:

按实施例1所叙述的方法,制备三维连通支架。对制得的支架进行生物活性、生物降解性和生物相容性的测试。

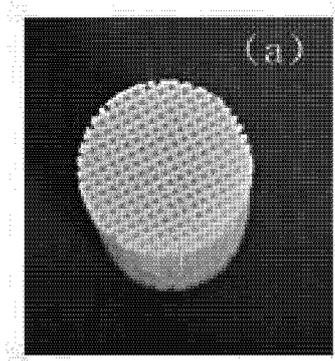
[0031] 对制得的支架作XRD分析,并与玻璃粉作比较(见图4),说明经过一系列的热加工,获得的支架仍为玻璃相。然后对此支架在温度为 $37^\circ C$ 的生理模拟液中作浸泡实验, 20 天后取出支架,通过XRD和FTIR对反应过程和反应后产物进行表征(见图5、和6),产物XRD谱显示为典型的羟基磷灰石晶体的图谱,产物的FTIR谱显示为典型的羟基磷灰石的红外图谱。结果表明:该硼酸盐玻璃生物活性支架样品在体外生物矿化反应中能转化为含锶羟基磷灰石,具有很好的生物活性和降解性。

[0032] 为了考察制备的支架与成骨细胞的生物相容性和细胞黏附性,将制得的支架放入盛有MC3T3-E1成骨细胞培养液的培养皿中分别培养 $3,5$ 和 9 天,取出支架,用戊二醛固定后,再放入乙醇中萃去除水分并冷冻干燥。SEM显示,支架上有大量的细胞黏爬行(见图7),说明该支架很好有生物相容性和细胞黏附性。

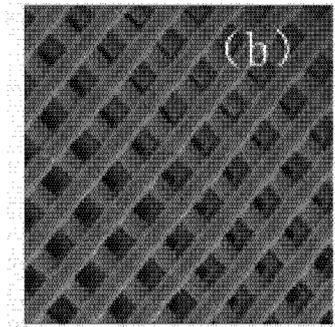
[0033] 实施例 4 : 支架的动物实验 :

按实施例 1 所叙述的方法, 制备三维连通支架。对制得的支架进行动物实验的测试。

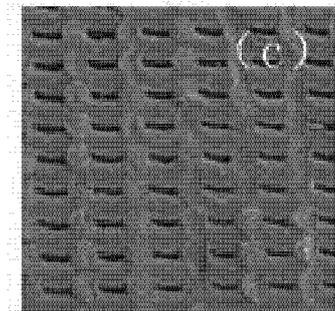
[0034] 将新西兰大白兔的双侧桡骨中段制成 15mm 节段性骨缺损, 埋入实施例 1 制备的支架, 图 8 为节段性骨缺损实验 X 射线片。术后 4, 8, 12 周通过 X 射线摄片观察骨生长情况, 可以看出, 植入 4 周后支架材料和骨直接结合; 8 周后支架材料密度降低, 材料两端和骨基本融合; 12 周后材料完全降解、骨生成明显, 骨塑形基本完成。说明制得的支架对动物的骨缺损有很好的修复作用。



(a)



(b)



(c)

图 1

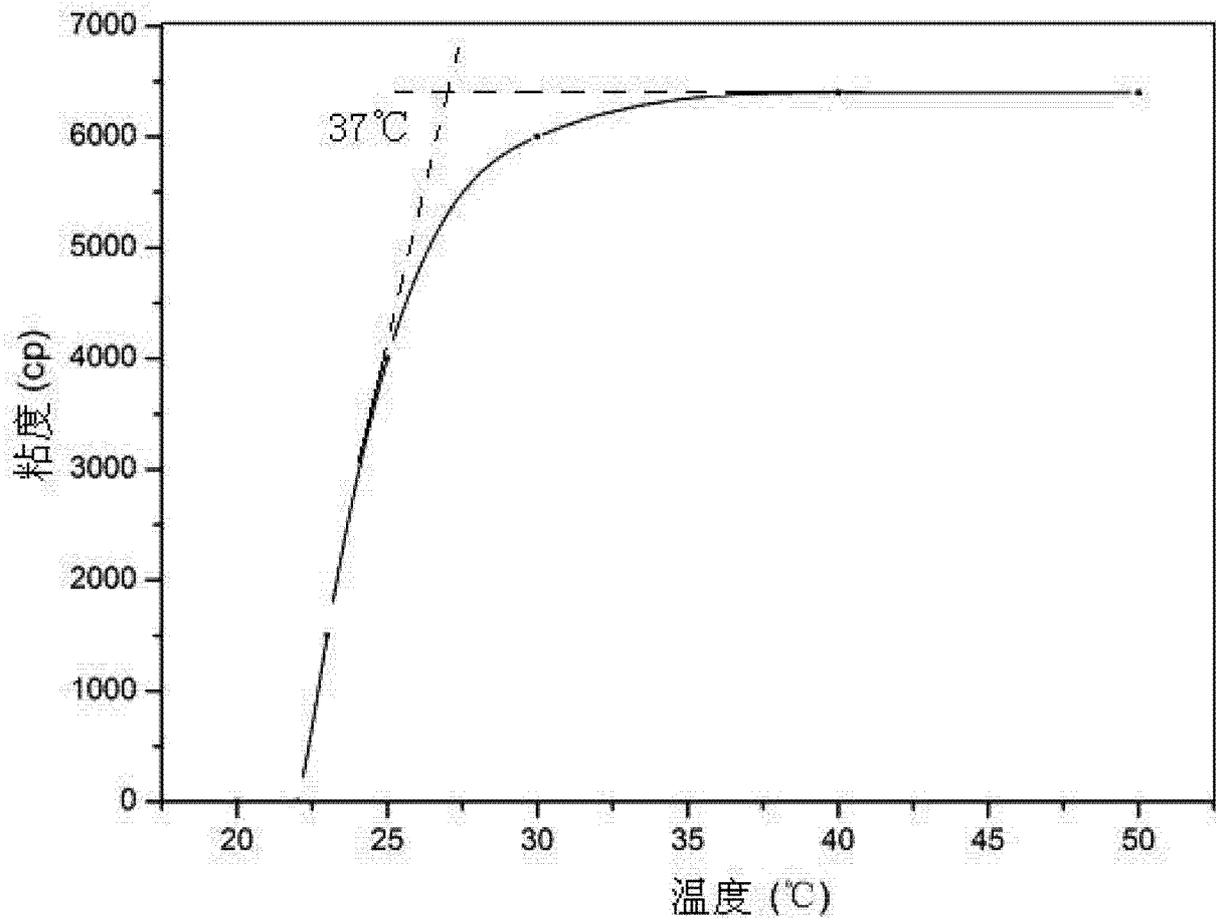


图 2

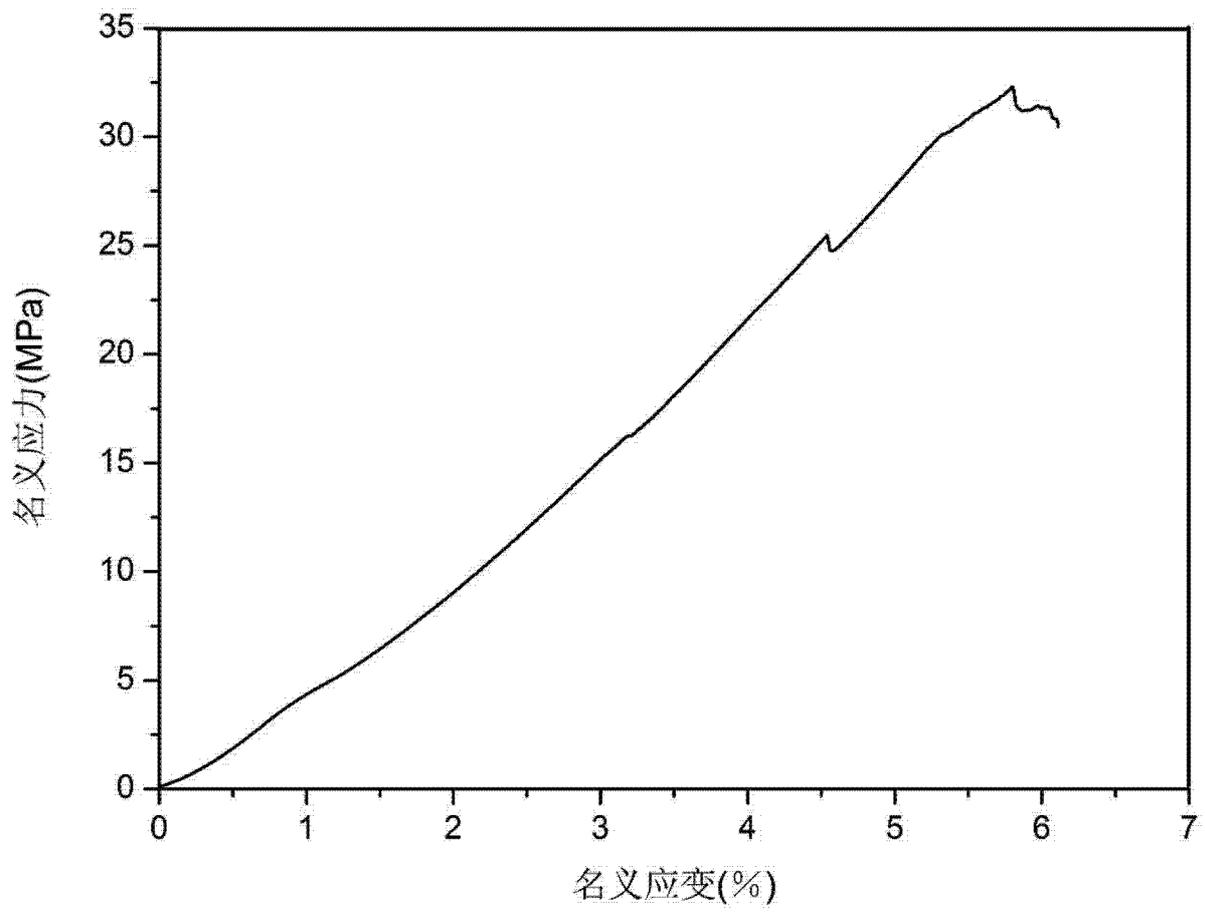


图 3

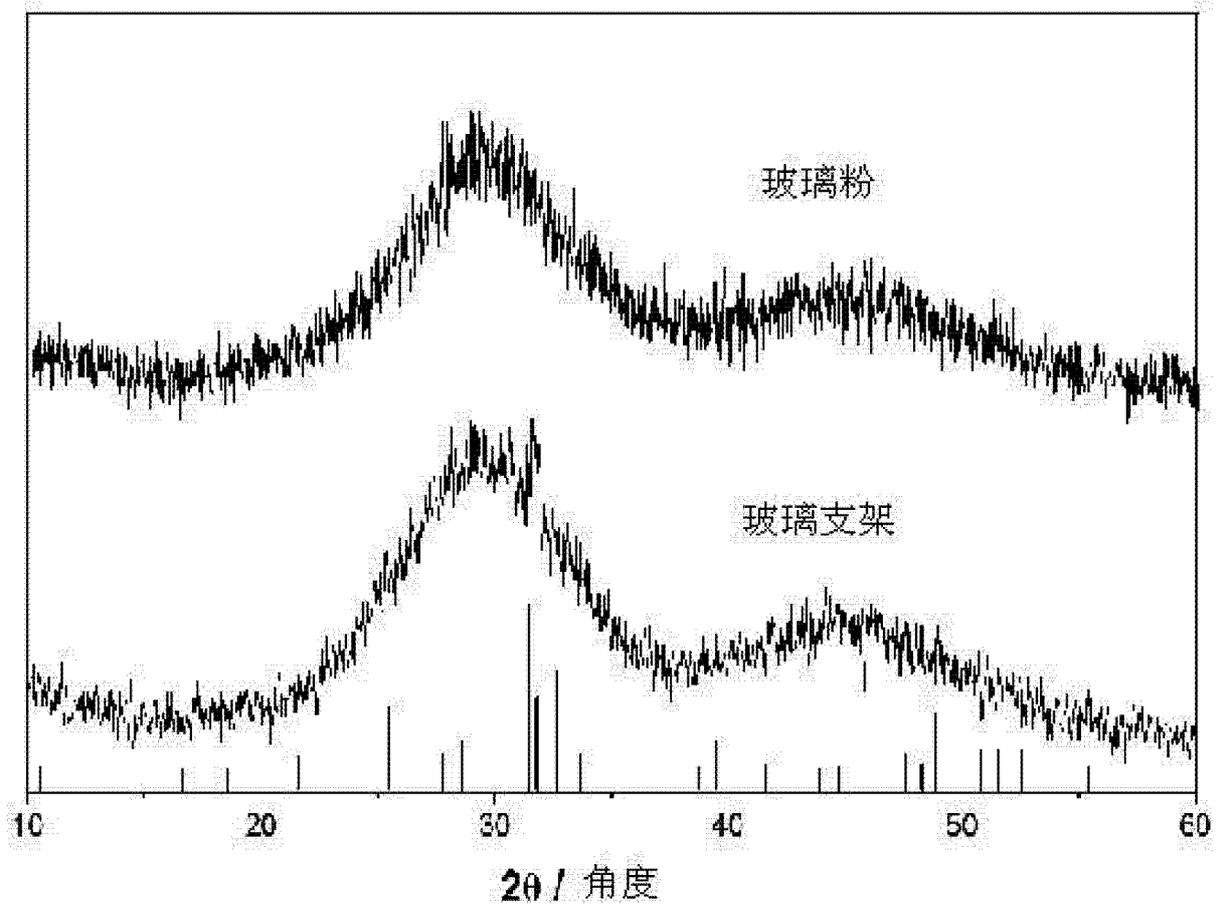


图 4

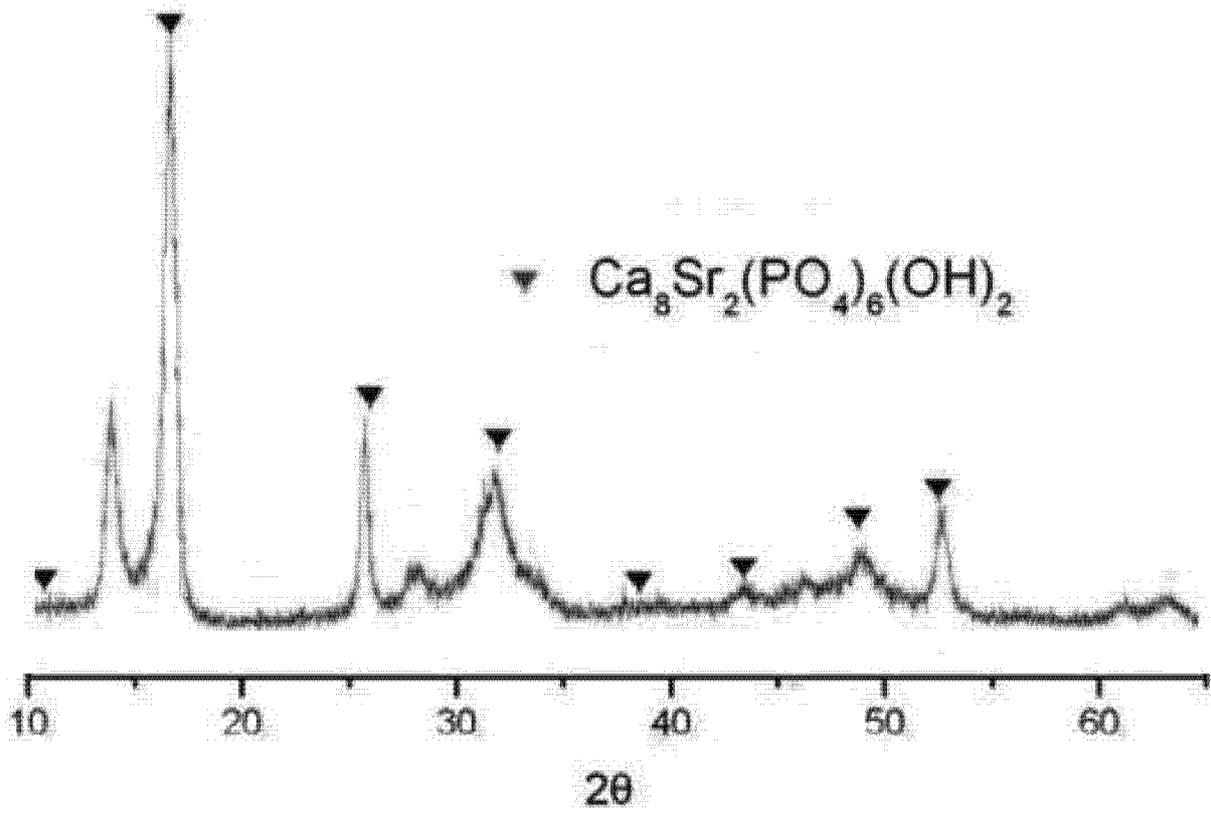


图 5

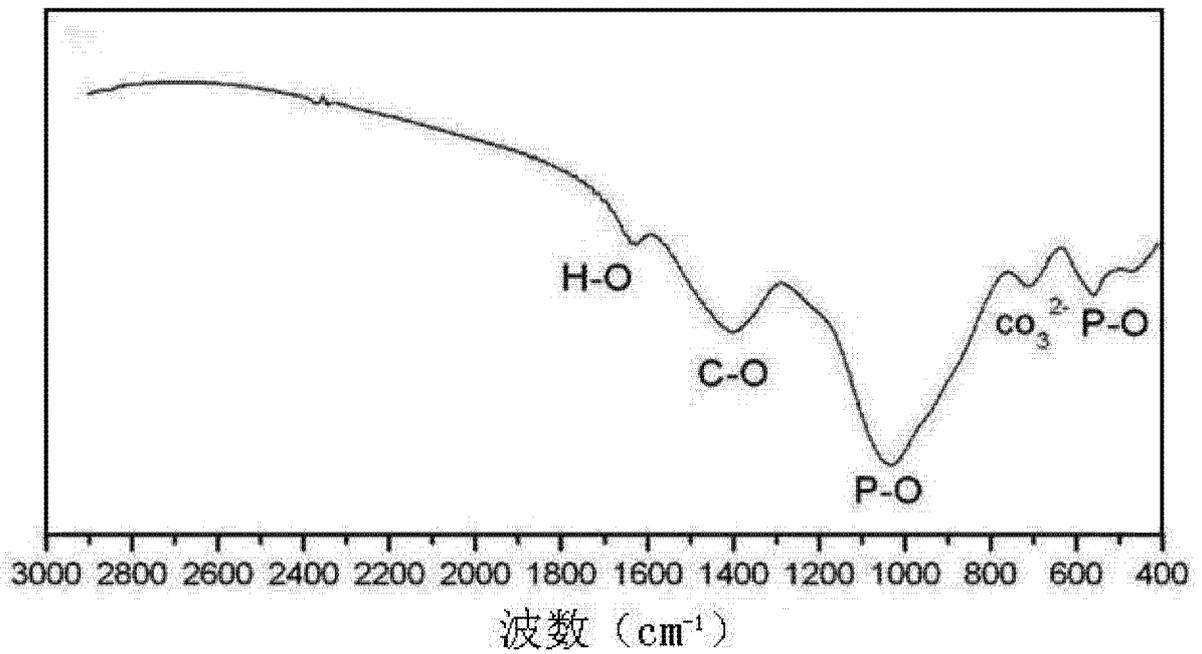
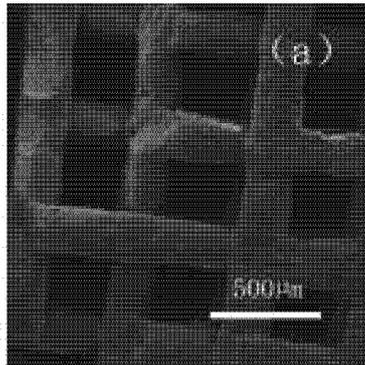
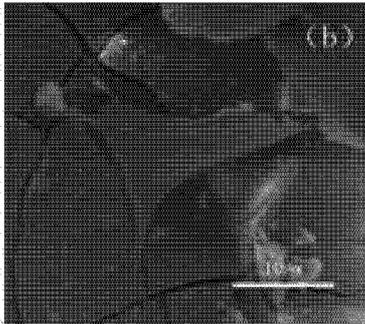


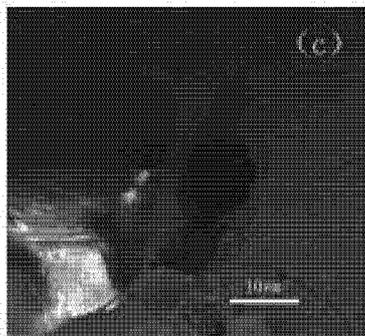
图 6



(a)



(b)



(c)

图 7

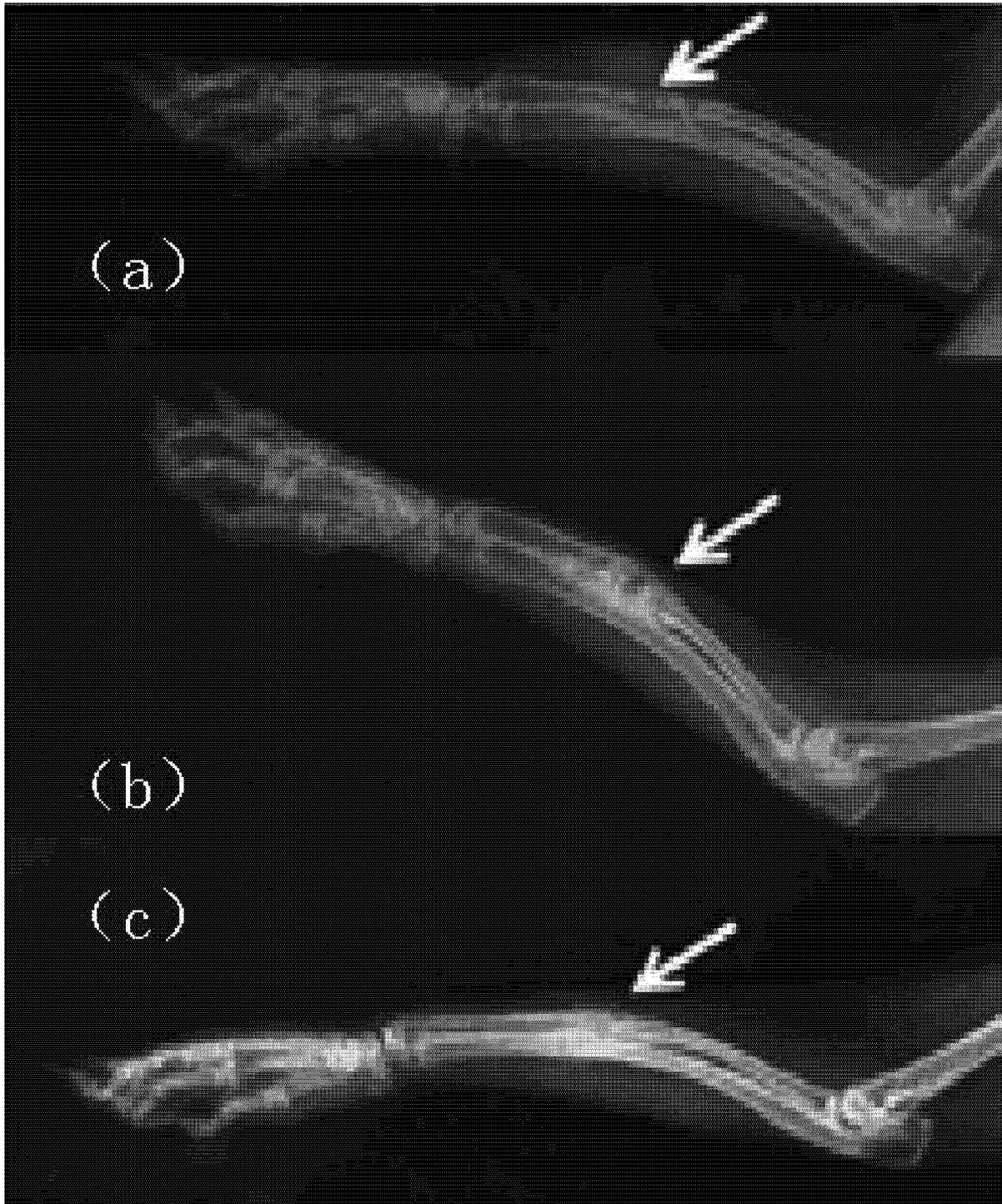


图 8