

文章编号: 1001-4888(2009)01-0001-07

骨细胞培养过程对羟基磷灰石 力学性质影响的研究^{*}

赵巍^{1,2}, 侯振德¹, 任朝峰¹, 毕平³

(1. 天津大学 力学系, 天津 300072; 2. 唐山学院基础部, 河北唐山 063000; 3. 天津医科大学, 天津 300072)

摘要: 采用数字图像相关方法研究骨细胞对人造羟基磷灰石力学性质的影响。采用了三种试样: 羟基磷灰石试样、培养了骨细胞的羟基磷灰石试样、用戊二醛溶液浸泡的羟基磷灰石试样(与培养骨细胞同样环境但不培养骨细胞)。研究得到了试样完整的应力—应变曲线; 同时测出弹性模量和泊松比, 还测量了压缩极限应力。实验结果表明试样的应力—应变曲线在断裂前呈良好的线性关系; 戊二醛溶液不影响羟基磷灰石的弹性模量和泊松比, 但会使压缩极限应力降低; 骨细胞培养过程能使羟基磷灰石材料的弹性模量和强度增加(所培养的骨细胞约占表面积 3.75%)。对照显示, 羟基磷灰石培养骨细胞后其弹性模量增加了 15.2%, 压缩极限应力增加了 26.1%。

关键词: 骨替代材料; 羟基磷灰石; 骨细胞; 力学性质; 图像相关

中图分类号: Q666; R318.01

文献标识码: A

0 引言

随着生物材料技术的发展, 人造的骨替代材料越来越多地应用于临床。骨替代材料主要作为植入人体骨内的构架, 骨细胞和胶原纤维在其上生长, 最终成为活体骨的一部分。人造羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA)是应用越来越广泛的骨替代材料, 羟基磷灰石是人体内骨和牙齿中的主要无机成分, 人骨成分中羟基磷灰石的质量约占 77%, 人的牙齿釉质中则占 95% 以上^[1-2]。临床应用发现人造的羟基磷灰石具有良好的生物活性、生物相容性, 具有骨传导性, 植入活体骨内后可能发生降解并被新骨组织替代^[3-4]。

在羟基磷灰石表面培养骨细胞是研究这类材料的生物相容性和诱导骨组织再生能力的基本方法^[5-8]。拟从力学的角度研究在羟基磷灰石表面培养骨细胞后, 羟基磷灰石的力学性质是否发生变化。考虑这一问题的背景是人造骨替代材料不仅需要具有生物相容性, 还应具有力学相容性。当羟基磷灰石被植入人体后骨组织包括骨细胞在其内部生长, 它的强度、刚度逐渐增加, 最终成为活体骨的一部分。如果最终能与周围骨组织的力学性质一致, 则会与活体骨起到相同的力学作用, 可以称为力学相容性。

基于上述目的, 实验测试了表面培养了骨细胞的羟基磷灰石的压缩弹性模量、泊松比和压缩极限应力。作为对比, 还测量了仅用的戊二醛溶液浸泡(固定骨细胞形态所用)但不培养骨细胞的羟基磷灰石的力学性质。实验发现经过骨细胞培养过程, 羟基磷灰石的弹性模量提高了 15.2%, 压缩极限应力提高了 26.1%。

^{*} 收稿日期: 2008-06-10; 修订日期: 2008-12-24

基金项目: 天津市应用基础研究计划资助项目(05YFJMJC10500)

通讯作者: 侯振德(1954—), 男, 教授, 主要研究领域: 实验固体力学和生物力学。E-mail: hou@tju.edu.cn

1 实验原理和方法

实验所用的羟基磷灰石材料以是珊瑚为基体由水热交换法制成的(材料的孔隙度为 50%,由北京意华健科贸有限公司生产)。测量的试样分为基本组、试验组、对照组。基本组为原羟基磷灰石试样,测量基本组的目的之一是检验测试方法的可靠性,试样尺寸为 $10 \times 10 \times 30 \text{ mm}$,外形规整是出厂前制备好的;试验组为培养了骨细胞的羟基磷灰石试样;对照组为用戊二醛溶液浸泡的羟基磷灰石试样,每组 5 个试样,为了满足培养骨细胞的需要,试验组和对照组的试样尺寸不能太大,实际尺寸为 $2.6 \times 4.5 \times 12 \text{ mm}$ 。

由 Instron3343 电子万能实验机对试样加载荷 F (量程为 1000N),由于试样尺寸比较小无法应用一般引伸计测量变形,采用非接触的图像相关方法测量变形。在试样表面制上随机散斑图作为表面变形信息的载体。图像采集通过高分辨率 CCD(分辨率为 1004×1003 个像素, Basler A202k)完成。在试样中部采集图像(视场边长约为 $3.5 \sim 4 \text{ mm}$),以保证图像范围内应变均匀分布。为减少偏心加载的影响,所有试样两端面打磨平整保持平行;同时试样上端面粘贴一尺寸为 $3 \times 3 \text{ mm}$ 的橡胶垫尽量使试验机压头平面均匀地压缩试样。实验装置见图 1。

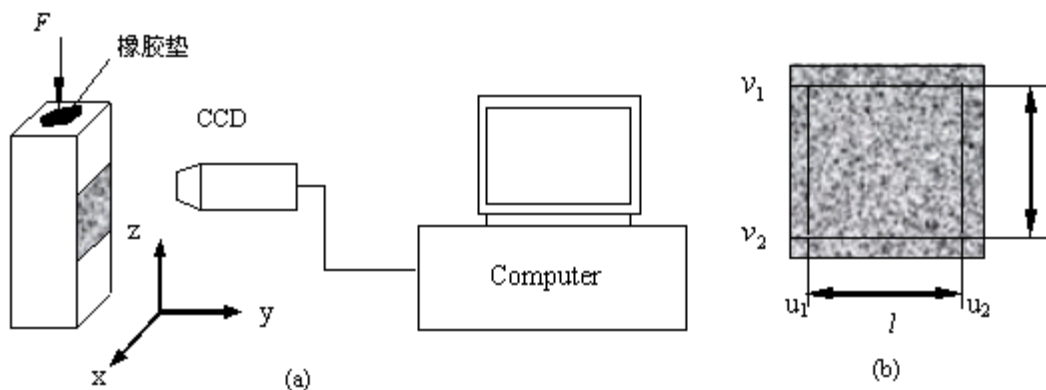


图 1 测试系统示意图

Fig. 1 Schematic of measurement system

试样应变按下述方法获得,测量靠近图像上下边缘水平线的纵向位移 v_1 和 v_2 (见图 1(b)),两条水平线间的距离为 $l=800$ 像素,纵向线应变为 $\epsilon=(v_1-v_2)/l$,实时时沿水平方向在每条水平线的第 100 像素至 900 像素之间每隔 10 个像素取一个点,共取了 80 个点,对应地计算出这两条水平线间 80 个点间的纵向位移 v_1 和 v_2 ,然后取平均值除以 l 后得到纵向线应变 ϵ 。这样做不仅减少了随机误差,也消除了载荷 F 沿水平方向(即 x 轴方向,见图 1(a))的偏心引起的纵向线应变测量误差。为了消除载荷 F 沿 y 轴方向的偏心的影响,实际测量时在试样的前后两个表面均需制斑,分别对前后两个表面采集图像,取前后两个表面在相同载荷作用下的应变的平均值作为该载荷下的纵向线应变的最终测量值。同理,测出图 1(b)中两条垂直线的水平位移 u_1 、 u_2 ,采用上述相同的处理方法可以得到横向线应变 ϵ' 进而可获得泊松比 μ 。

实验测量过程如下:首先对试样加初载并采集此时图像作为变形前的图像,然后对试样缓慢匀速加载(加载速率为 5 N/min),每隔一定的载荷增幅采集一幅图像作为变形后的图像,共采集九幅变形后的图像。计算出试样在不同载荷下的纵向线应变 ϵ ,同时也可以算出相应的横向线应变,得到泊松比。由每次采集图像时的载荷 F 除以试样横截面面积得到与各应变对应的正应力,应用最小二乘法对系列应力和应变进行线性拟合其斜率即为弹性模量。如前所述,弹性模量和泊松比是两侧结果的平均值。

为了确保每个试样都能测得弹性模量和泊松比。弹性模量和极限应力分两次测试。先在相对小的载荷 F 下测出弹性模量和泊松比,然后再进行破坏性实验测出极限应力。测量极限应力时,方法相同

且初载荷和加载速率不变,但采用较大的载荷增幅直至断裂,载荷 F 的最大值与试样横截面之比压缩极限应力 σ_b 。

为了验证方法的有效性,先做了验证性实验。采用比较大的牛骨试样以适应于用引伸计来测量变形。分别用与上述相同的图像相关法方法和引伸计方法对牛骨试样的弹性模量进行了测量,共对比测量了三个试样,尺寸为 $4\times 10\times 30\text{mm}$ 。测量结果如表 1,若以引伸计的测量结果为标准值,最大相对误差为 3.10%,最小相对误差为 0.38%,平均值为 1.82%。由此可以证明图像相关法方法测量弹性模量的有效性。

表 1 图像相关法方法和引伸计方法的测试结果
Tab.1 Results by image correlation and extensometer

Samples	Image correlation	Extensometer	Error
	Young's modulus E (GPa)	Young's modulus E (GPa)	
1	20.89	20.97	0.38%
2	21.20	21.63	1.98%
3	19.05	19.65	3.1%

2 实验结果

因为基本组试样的尺寸与试验组合对照组不一致,为了确定用同样方法测试两种尺寸试样的结果是否一致,还从大尺寸羟基磷灰石中切出小尺寸试样($2.6\times 4.5\times 12\text{mm}$)并测试其弹性模量。共测试了两个试样,弹性模量分别为 11.44 GPa 和 10.98 GPa,与表 2 中的结果是一致的。

还需要指出的是小尺寸试样是自行切割的,每个试样需用 800 目以上的超细砂纸仔细研磨并保证试样外表面的平行和垂直。

2.1 基本组试样的测试结果

表 2 羟基磷灰石试样的测试结果
Tab.2 Results of Hydroxyapatite

Samples	Young's modulus	Poission's ratio	R	Ultimate strength (MPa)
	E (GPa)	μ		
1	11.43	0.247	0.998	14.28
2	11.44	0.242	0.999	14.09
3	11.09	0.245	0.999	14.28
4	11.24	0.279	0.999	10.95
5	9.34	0.209	0.996	16.60

表 2 中列出了基本组 5 个试样的测试结果。弹性模量的平均值和标准差为 $10.9\pm 0.88\text{GPa}$;泊松比为 0.244 ± 0.025 ;极限应力为 $14.04\pm 2.10\text{MPa}$ 。从表 2 中可看出 5 号试样的弹性模量和泊松比明显小于其它试样,极限应力大于其它试样。这可能是个体差异引起的。若根据前四个试样的结果计算,弹性模量、泊松比和极限应力的平均值和标准差分别为 $11.30\pm 0.17\text{GPa}$ 、 0.253 ± 0.017 和 $13.40\pm 1.63\text{MPa}$ 。R 是测量试样弹性模量时对应力—应变曲线进行线性拟合的相关系数。

2.2 试验组试样的实验结果

在无菌条件下,利用 1 日龄兔的股骨干组织的细胞在 LD MEM 培养液和胎牛血清培养液内培养骨细胞,培养一周后放入羟基磷灰石试样使骨细胞在其孔隙内生长,附着于孔隙表面形成羟基磷灰石/成

骨细胞复合物。然后,用戊二醛溶液浸泡固定细胞形态。

表 3 中列出了试验组 5 个试样的测试结果。弹性模量、泊松比和极限应力的平均值和标准差分别为 $12.84 \pm 0.62 \text{ GPa}$ 、 0.240 ± 0.026 和 $14.54 \pm 0.39 \text{ MPa}$ 。线性拟合的相关系数超过 0.987,说明各个试样的应力—应变曲线同样也都显示了较好的线性。图 2 为测量弹性模量时其中一个试样的应力—应变曲线。图 3 为测量压缩强度时其中一个试样的应力—应变曲线(最后一个点为断裂点),断裂前的应力—应变曲线仍保持良好的线性,断裂点的极限应力 14.63 MPa 。

表 3 有骨细胞的羟基磷灰石试样的实验结果

Tab. 3 Results of Hydroxyapatite with bone cells

Samples	Young's modulus $E(\text{GPa})$	Poisson's ratio μ	R	Ultimate strength $\sigma_b(\text{MPa})$
1	12.44	0.196	0.999	14.47
2	13.47	0.247	0.995	15.07
3	12.31	0.249	0.998	13.96
4	12.42	0.241	0.994	14.56
5	13.57	0.268	0.987	14.63

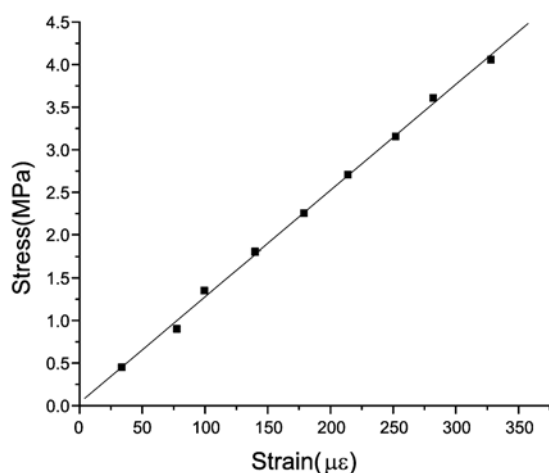


图 2 有骨细胞的羟基磷灰石的应力—应变曲线

Fig. 2 Stress-strain curves of Hydroxyapatite with bone cells

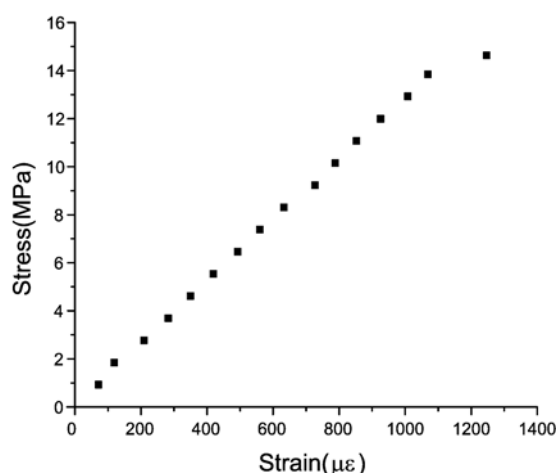


图 3 有骨细胞的羟基磷灰石的应力—应变曲线(包括断裂点)

Fig. 3 Stress-strain curves of Hydroxyapatite with osteoblasts (including failure point)

在此要说明的是并非每个试样都能测得发生断裂时的应变值,因为每隔一定的载荷增幅采集一幅图像,而断裂时的载荷可能是载荷增幅之间的任何值。实际情况就是如此,在这组试样中只有 2 号试样断裂时恰好处在采集图像的时机,而得到应力—应变曲线的断裂点的最后一点;其它试样的都只得到断裂前一点的应变值(线性段)。

2.3 对照组试样测试结果

表 4 中列出了对照组 5 个试样的测试结果。弹性模量、泊松比和极限应力分别为 $11.15 \pm 0.23 \text{ GPa}$ 、 0.239 ± 0.010 和 $11.53 \pm 0.27 \text{ MPa}$ 。图 4 为测量弹性模量时其中一个试样的应力—应变曲线,各个试样线性拟合的相关系数 R 均超过了 0.99,说明用戊二醛溶液浸泡的羟基磷灰石材料的应力—应变曲线仍然具有了良好的线性。图 5 为测量压缩强度时其中一个试样的应力—应变曲线(最后一个点为断裂点),断裂前的应力—应变曲线呈良好的线性,断裂点的极限应力 11.28 MPa 。

表 4 用戊二醛溶液浸泡无细胞的羟基磷灰石试样的测试结果
Tab. 4 Results of Hydroxyapatite soaked in glutaral pentanedial solution

Samples	Young's modulus E (GPa)	Poission's ratio μ	R	Ultimate strength σ_b (MPa)
1	11.21	0.255	0.998	11.28
2	11.18	0.237	0.999	11.35
3	11.06	0.242	0.991	11.78
4	10.98	0.229	0.996	11.56
5	11.42	0.248	0.999	11.24

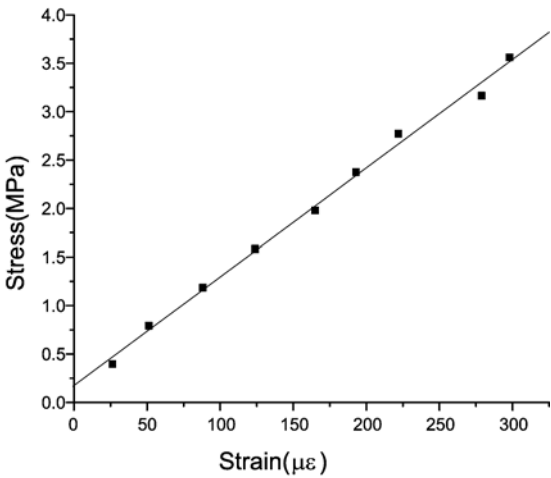


图 4 用戊二醛溶液浸泡羟基磷灰石的应力—应变曲线
Fig. 4 Stress-strain curves of Hydroxyapatite soaked in glutaral pentanedial solution

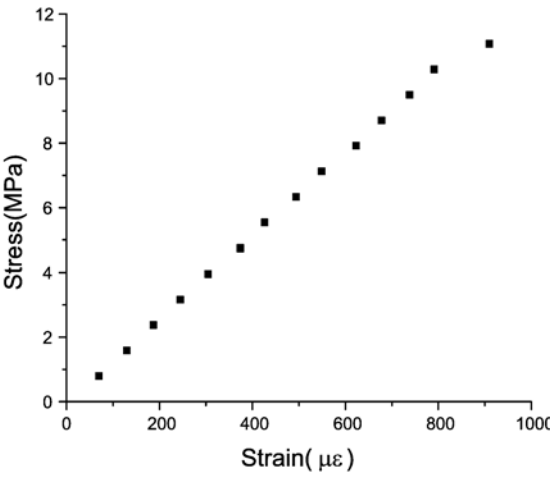


图 5 用戊二醛溶液浸泡羟基磷灰石的应力—应变曲线(包括断裂点)
Fig. 5 Stress-strain curves of Hydroxyapatite soaked in glutaral pentanedial solution (including failure point)

3 结果与讨论

为便于分析比较,将三组试样弹性模量、泊松比和压缩极限应力测量结果的平均值和标准差列于表 5。

表 5 三组试样测量结果
Tab. 5 Results of the three groups

Groups	Young's modulus E(GPa)	Poission's ratio μ	Ultimate strength (MPa)
1(基本组)	10.91±0.88	0.244±0.025	14.04±2.10
1(基本组—前 4 个试样)	11.30±0.17	0.253±0.017	13.40±1.63
2(试验组)	12.84±0.62	0.240±0.026	14.54±0.39
3(对照组)	11.15±0.23	0.239±0.010	11.53±0.27

根据表 5 对照组的弹性模量大于基本组,若与只计算前 4 个试样的基本组比较,两组弹性模量的结果基本相同;但对照组试样的压缩极限应力减少了 14.0%。说明戊二醛溶液不影响试样的弹性模量,但会使压缩强度降低。

试验组试样的弹性模量与对照组试样弹性模量相比增加了 15.2%，压缩极限应力增长了 26.1%。说明经过培养骨细胞的过程后羟基磷灰石材料的弹性模量和强度都增加了，且使强度增加地更多。

各组试样泊松比的基本无变化，即骨细胞培养过程和戊二醛溶液均不影响羟基磷灰石材料的泊松比。试验组试样的极限应力的平均值增加到 14.54MPa 与基本组试样极限应力的平均值 14.04MPa 基本相同。说明羟基磷灰石试样经过培养骨细胞的过程抵消了戊二醛溶液对极限应力降低的影响；也体现了骨细胞培养过程使羟基磷灰石材料强度增加的作用。

图 6 是羟基磷灰石表面的扫描电镜照片，骨细胞附着在羟基磷灰石表面上；在 $80 \times 50 (\mu\text{m})^2$ 范围内分布着两个骨细胞，长度约为 $20 \sim 30 \mu\text{m}$ ；宽度约为 $5 \sim 7 \mu\text{m}$ 。可以设想骨细胞在试样表面是均匀分布的，由此可以推算出在 1mm^2 范围内大约分布 250 个骨细胞。每一个骨细胞都相当于一根短纤维，与羟基磷灰石形成一种表面增强纤维复合材料。图 7 为设想的试样（尺寸为 $2.6 \times 4.5 \times 12\text{mm}$ ）表面的骨细胞分布示意图，其排列是任意的。由于羟基磷灰石是多孔材料，孔隙直径约为 $150 \sim 200 \mu\text{m}$ 。因此骨细胞不但存在于试样的外表面也会存在于羟基磷灰石孔隙内的表面，可以说骨细胞在羟基磷灰石内部三维方向上是随机均匀分布的，所以这类羟基磷灰石复合材料的性质也会是各向同性的。因为单位平方毫米范围内约有 250 个骨细胞，总共所占有的面积约为 0.0375mm^2 ，相当于占 3.75% 的表面积。应该说骨细胞使弹性模量和压缩强度的提高是有贡献的。

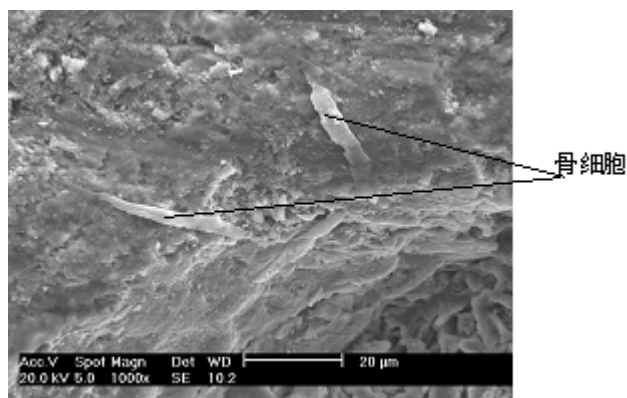


图 6 试样表面的骨细胞

Fig. 6 Osteoblasts on surface of hydroxyapatite



图 7 试样上骨细胞分布的示意图

Fig. 7 Schematic diagram of hydroxyapatite with osteoblasts

需要指出的是，尽管试验组和对照组最后的处理过程都是由戊二醛浸泡，但试验组还经过 LDMEM 培养液和胎牛血清培养液的浸泡，这一过程可能也对羟基磷灰石材料的力学性质有增强作用。因此，使弹性模量提高了 15.2%；压缩极限应力增长了 26.1%，可能是骨细胞和培养液共同作用的结果。

若将培养了骨细胞的羟基磷灰石植入体内，骨细胞除在生物方面影响组织的生长，对组织的刚度和强度的影响也是值得进一步探讨的问题。

另外，不同孔隙率的羟基磷灰石材料具有不同的表面形貌，不同的表面形貌特别是孔洞表面的粗糙度等因素在影响着这类复合材料的成骨能力同时对其力学性质的影响也需进一步研究。

参考文献：

- [1] 李世普. 生物陶瓷[M]. 武汉: 武汉工业大学出版社, 1989 (Li Shipu. Bioceramics[M]. Wuhan: Wuhan University of Technology Press, 1989 (in Chinese))
- [2] 朱武, 朱东波, 周科朝, 等. 羟基磷灰石复合骨替代材料的研究现状与发展趋势[J]. 材料导报, 2005, 19(z2): 344—347 (Zhu Wu, Zhu Dongbo, Zhou Kechao, et al. Hydroxyapatite bone replacement composites: current status and future directions[J]. Materials Review, 2005, 19(z2): 344—347 (in Chinese))
- [3] Xue M, Ning L. Biocompatibility and Biomechanical Evaluation on Hydroxyapatite Implanted in Animal [C]. Proc of First Int Symp on Apatite. 1992, 1: 223.

- [4] 李志宇, 田伟, 刘波. 珊瑚羟基磷灰石人工骨在颈前路植骨融合术中的应用[J]. 中华创伤骨科杂志, 2005, 7(8): 711—713 (Li Zhiyu, Tian Wei, Liu Bo. Long term results of anterior cervical interbody fusion using coral bone spacer for cervical spondylosis[J]. Chinese Journal of Orthopaedic Trauma, 2005, 7(8): 711—713. (in Chinese))
- [5] Despina D D, Nikoleta D K, Petros G K, et al. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength[J]. Biomaterials, 2001, 22: 87—96.
- [6] Yuan Gao, Wen-Ling Cao, Xiao-Yan Wang, et al. Characterization and osteoblast-like cell compatibility of porous scaffolds: bovine hydroxyapatite and novel hydroxyapatite artificial bone [J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2006, 17: 815—823.
- [7] 严宁, 张汉东, 周磊, 等. Y500R可吸收珊瑚羟基磷灰石人工骨体外成骨细胞相容性研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2006, 22(8): 456—459 (Yan Ning, Zhang Hangdong, Zhou Lei, et al. Biocompatibility Study on osteogenesis of Y500R absorbable coral hydroxyapatite in vitro[J]. Journal of Clinical Stomatology, 2006, 22(8): 456—459 (in Chinese))
- [8] 张芳, 崔春翔, 戚玉敏, 等. 羟基磷灰石/钛合金骨替代材料体外培养成骨细胞的实验研究[J]. 功能材料, 2005, 5(36): 740—742 (Zhang Fang, Cui Chunxiang, Qi Yurain, et al. Studies on cultured osteoblast cells on HA/Ti substitute for bone tissue[J]. Journal of Functional Materials, 2005, 5(36): 740—742 (in Chinese))

On the Influence of Osteoblastic Cell Culture on the Mechanical Properties of Hydroxyapatite

ZHAO Wei^{1,2}, HOU Zheng-de¹, REN Chao-feng¹, BI Ping³

(1. Department of Mechanics of Tianjin University, Tianjin 300072; 2. Thanshan College, Hebei Tangshan 063000; 3. Tianjin Medical University, Tianjin 300072)

Abstract: Influence of osteoblast on the mechanical properties of hydroxyapatite was investigated by using digital image correlation technique (DIC). Three groups of sample were tested. They are hydroxyapatite, hydroxyapatite with osteoblasts and hydroxyapatite soaked in glutaral pentanedral solution without osteoblasts. Integral stress-strain curves of all three sample groups were obtained. Both Young's modulus and Poisson ratio were obtained by DIC, and the limit pressure stress was also measured. Test results show that all three sample groups present a linear stress-strain relationship before sample fracture; glutaral pentanedral solution has no effect on Young's modulus and Poisson's ratio of hydroxyapatite, but reduces the value of limit pressure stress. Results also show that osteoblastic cell culture (osteoblastic cells take 3.75% surface area) increases 15.2% Young's modulus and 26.1% compressive strength of hydroxyapatite respectively.

Keywords: bone substitute materials; hydroxyapatite; osteoblastic cells; mechanical property; digital image correlation(DIC)