

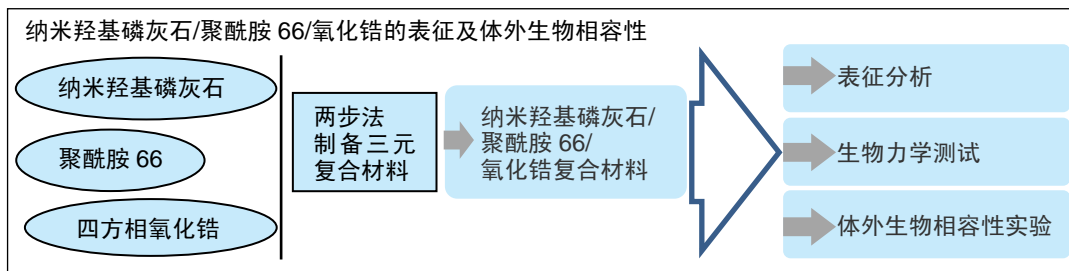
新型三元复合材料纳米羟基磷灰石/聚酰胺66/氧化锆的制备及体外生物相容性

李毓灵¹, 蒋科¹, 陈路¹, 蔚芑¹, 陈骞¹, 谯波², 蒋电明³ (1)川北医学院附属医院骨科, 四川省南充市 637000; (2)重庆医科大学附属第一医院, 重庆市 400016; (3)重庆医科大学附属第三医院骨与创伤中心, 重庆市 401120)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1546

ORCID: 0000-0003-4659-1013(李毓灵)

文章快速阅读:



李毓灵, 男, 1987年生, 四川省南充市人, 汉族, 博士, 主要从事生物材料研究。

通讯作者: 蒋电明, 教授, 重庆医科大学附属第三医院骨与创伤中心, 重庆市 401120

文献标识码: B

稿件接受: 2018-09-13



文题释义:

马氏体相变增韧: 复合材料的增韧是通过氧化锆马氏体相变来实现的。氧化锆存在三种晶体构型, 分别为单斜晶相、四方相及立方相, 这3种构型可在不同温度下互相转换。氧化锆与纳米羟基磷灰石的复合是通过高温烧结来实现的, 高温可使氧化锆由单斜晶相向四方相转变, 而在降温冷却过程中又会发生四方相向单斜晶相的转变, 在这个降温转变过程中, 氧化锆颗粒产生体积膨胀, 同时对纳米羟基磷灰石基体产生压应力, 阻止裂纹扩展, 即产生应力诱导的相变增韧。

生物相容性: 是指机体对生物材料产生反应的一种性能, 一般指宿主与材料之间的相容性。生物材料是否能应用于未来, 生物相容性是评价的首要指标, 生物相容性也决定了材料的性质及用途。研究中根据ISO10993-12:2007标准选用了细胞毒性实验(CCK-8), 细胞与生物材料的结合情况观察(免疫荧光技术)来评价复合材料的生物相容性, 以评价验证其未来进一步研究前景。

摘要

背景: 纳米羟基磷灰石/聚酰胺66复合材料具有高仿生特性, 可通过与宿主骨直接结合来发挥生物活性作用, 但其缺乏足够的力学强度。

目的: 制备新型三元复合材料纳米羟基磷灰石/聚酰胺66/氧化锆(nano-hydroxyapatite/polyamide 66/ytria-stabilized tetragonal zirconia, nHA/PA66/YTZ), 验证其力学特性及体外生物相容性。

方法: 采用两步法制备三元复合材料nHA/PA66/YTZ, 其中纳米羟基磷灰石与氧化锆的质量比分别为100:0、90:10、80:20、60:40。扫描电镜观察复合材料表征, 力学测试仪测试其抗弯强度、抗张强度、抗压强度、弹性模量、断裂伸长率等力学参数, 评价其力学性能, 筛选最佳质量比复合材料, 用于以下实验。分别采用细胞培养液(空白对照组)、纳米羟基磷灰石/聚酰胺66材料浸提液(对照组)、nHA/PA66/YTZ材料浸提液(实验组)培养小鼠成骨细胞MC3T3-E1, CCK-8法检测细胞增殖; 将纳米羟基磷灰石/聚酰胺66材料(对照组)、nHA/PA66/YTZ材料(实验组)分别与小鼠成骨细胞MC3T3-E1共培养, 24 h后采用激光共聚焦显微镜观察MC3T3-E1细胞在复合材料表面的黏附、增殖情况。

结果与结论: ①扫描电镜显示, 氧化锆晶粒填充了原本纳米羟基磷灰石晶粒之间的空隙, 纳米羟基磷灰石/氧化锆均匀分散在聚酰胺66基体中; ②生物力学测试显示, 纳米羟基磷灰石与氧化锆质量比为60:40 nHA/PA66/YTZ材料的抗压强度、抗弯强度、抗张强度、断裂伸长率及弹性模量最高, 力学性能最优, 选择其进行细胞相容性实验; ③CCK-8检测显示, 随着时间的延长, 3组细胞数量逐渐增加, 3组间细胞增殖比较无差异; ④激光共聚焦显微镜显示, 实验组复合材料上的细胞呈现融合、团聚及分层现象, 细胞内肌动蛋白丝更多; 对照组复合材料上的细胞呈现单层及分散现象, 细胞数量与细胞内的肌动蛋白丝较实验组少; ⑤结果表明, 三元复合材料nHA/PA66/YTZ在体外实验中表现出良好的力学性能、生物安全性及生物相容性。

关键词:

口腔材料; 纳米羟基磷灰石; 氧化钇稳定型氧化锆; 聚酰胺66; 三元复合材料; 肌动蛋白丝

主题词:

羟基磷灰石类; 尼龙; 材料试验; 组织工程

中图分类号: R459.9; R318.08

基金资助:

国家自然科学基金青年基金(NSFC81501876), 项目负责人: 谯波; 四川省科技厅应用基础项目(2018JY0250), 项目负责人: 李毓灵

缩略语:

纳米羟基磷灰石: nano-hydroxyapatite, nHA; 聚酰胺66: polyamide 66, PA66; 氧化锆: yttria-stabilized tetragonal zirconia, YTZ

Li Yuling, MD, Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Jiang Dianming, Professor, Bone and Trauma Centre, the Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401120, China

Preparation and *in vitro* biocompatibility of a novel ternary biomaterial, yttria-stabilized zirconia reinforced nano-hydroxyapatite/polyamide 66

Li Yuling¹, Jiang Ke¹, Chen Lu¹, Yu Peng¹, Chen Qian¹, Qiao Bo², Jiang Dianming³ (¹Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China; ²the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; ³Bone and Trauma Centre, the Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401120, China)

Abstract

BACKGROUND: Nano-hydroxyapatite/polyamide 66 (nHA/PA66) composite materials possess high bionic properties and exert biological activity by directly combining with host bone, but it lacks sufficient mechanical strength.

OBJECTIVE: To prepare a novel ternary biomaterial composed of nHA/PA66/yttria-stabilized tetragonal zirconia (YTZ), and to investigate its mechanical properties and biocompatibility.

METHODS: The biomaterial was prepared by two-step approach, and the mass ratio of nano-hydroxyapatite to yttria-stabilized tetragonal zirconia was 100:0, 90:10, 80:20, and 60:40, respectively. The characterization of nHA/PA66/YTZ was observed by scanning electron microscope. The mechanical parameters of nHA/PA66/YTZ including bending strength, tensile strength, compressive strength, elastic modulus and breaking elongation were tested to evaluate its mechanical properties. The mechanical properties were evaluated by the mechanical tester to select composite materials with the optimum mass ratio applied to the following experiments. The MC3T3-E1 cells were cultured by the cell-culture medium (blank control group), nHA/PA66 material extract (control group), nHA/PA66/YTZ material extract (experimental group). The cell proliferation was detected by cell counting kit-8 assay. The nHA/PA66 material (control group) and nHA/PA66/YTZ material (experimental group) were respectively co-cultured with MC3T3-E1 cells. The adhesion and proliferation of MC3T3-E1 cells on the surface of composite materials were observed by the laser scanning confocal microscope after 24 hours.

RESULTS AND CONCLUSION: The scanning electron microscope showed that YTZ grains filled the gaps between the original nano-hydroxyapatite grains and the nHA/YTZ was evenly dispersed in the matrix of polyamide 66. The biomechanical test revealed that the compressive strength, bending strength, tensile strength, elongation at break and elastic modulus were the highest at 60:40 of the mass ratio of nHA and YTZ, while the mechanical properties were optimal, which could be chosen for the cell compatibility experiments. Cell counting kit-8 assay showed that there was no significant difference in the cell proliferation among groups as the time expended and the number of cells in each group increased. The laser scanning confocal microscope displayed that the cells showed fusion, agglomeration and stratification and more actin filaments in themselves on nHA/PA66/YTZ composite material. The cells had monolayer and dispersion on nHA/PA66 composite material. The number of cells and actin filaments in cells were less than those in the group of nHA/PA66/YTZ. These results showed that the ternary composite materials of nHA/PA66/YTZ exhibit good mechanical properties, biological safety, and biocompatibility *in vitro* experiment.

Subject headings: Hydroxyapatites; Nylons; Materials Testing; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China for the Youth, No. NSFC81501876 (to QB); the Applied Basic Project of Science & Technology Department of Sichuan Province, No. 2018JY0250 (to LYL)

0 引言 Introduction

近年来越来越多的研究提出,由具有生物活性的无机化合物及高分子化合物组成的生物材料兼具生物活性与较好的力学性能,故而该类生物材料得到了科研工作者的重视及较为广泛的临床应用^[1-3]。纳米羟基磷灰石/聚酰胺66(nano-hydroxyapatite/polyamide 66, nHA/PA66)作为该类型生物材料的一种,既往研究已证明其具有高仿生特性,可通过与宿主骨的直接结合来发挥其生物活性作用,并且在长期植入人体后并不会产生毒副作用及引起不良反应^[4-5]。因此,以nHA/PA66为基础所衍生出来的各类产品,诸如骨填充材料、椎体融合器等也在临床应用中得到了较多的关注与好评^[6-8],但该类生物材料并不具备足够的力学强度,难以满足更广泛的临床所需。因此,近年来一些诸如聚乳酸、玻璃纤维、碳纤维等增韧材料被用于添加到生物材料中,用于增加这些生物材料的力学性能^[9-11]。

相比于其他类型的陶瓷材料,氧化锆陶瓷材料尤其是由氧化钇作为稳定剂的四方相氧化锆(yttria-stabilized tetragonal zirconia, YTZ)陶瓷材料,具有更优的高断裂韧度及抗弯折强度,同时还具有耐磨损、耐腐蚀、耐高温、抗氧化、具有亲水性等优越的性能,能够解决常规陶瓷材料强度和韧性不足等问题^[12]。同时YTZ属于生物陶瓷类材料,具有良好的生物相容性、骨传导性及骨结合性,不会像其他金属材料可能引起人体变态反应,故而目前已被广泛用于人工髋关节假体、齿冠及其他一些口腔科植入材料^[13-14]。由于

YTZ的各种优良特性,已成为传统金属修复材料的重要替代品。故而,是否可将YTZ与目前临床上已广泛应用的一些生物工程材料组成复合材料,得到生物学及物理学性能更优良的新一代骨科内固定物呢?基于此种假设,作者设计制备了基于氧化锆增韧的新型三元复合材料nHA/PA66/YTZ,并对其表征、力学性能及生物相容性进行初步检测及论证,讨论其进一步研究应用的前景及可行性。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 材料学表征分析及细胞体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年5月至2018年2月在川北医学院附属医院、重庆医科大学附属第一医院及四川大学完成。

1.3 材料 小鼠成骨细胞MC3T3-E1细胞(ATCC); DMED/F12培养基、双抗、PBS、胰蛋白酶(Hyclone公司); 胎牛血清(Gibco公司); nHA、PA66(四川国纳科技有限公司); YTZ(日本东曹达株式会社); CCK-8试剂盒、鬼笔环肽染色试剂盒、DAPI染色液(Sigma-Aldrich公司); 多聚甲醛、曲拉通X-100(武汉博士德生物工程有限公司); 细胞培养瓶、细胞培养孔板(Hyclone公司); 一次性巴氏吸管(NEST公司); 细胞计数板(上海求精生化仪器有限公司); 微量移液器(Eppendorff公司); 高速离心机(Sigma公司); 生物显微镜(Olympus公司); 二氧化碳孵箱、全波长酶标仪(Thermo Scientific公司); 激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss公司); 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); 电热恒温水箱(上海

一恒科学仪器有限公司); 行星球磨仪(Retsch公司); 氧化铝坩埚(唐山开平盛兴化学瓷厂); 高温真空数控箱式电炉(洛阳炬星窑炉有限公司); 真空干燥箱(成都兴天宇实验仪器有限公司); 注塑成型机(宁波双马机械公司); 力学测试仪(深圳瑞格尔仪器有限公司); 扫描电镜(日本电子株式会社); X线衍射仪(Philips公司); 傅里叶变换红外光谱仪(Nicolte公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 nHA/YTZ复合材料的制备 将nHA及YTZ粉末以100:0、90:10、80:20、60:40四种质量比在PM100行星球磨仪中进行研磨混合, 将混合物装入氧化铝坩埚中, 压坯, 置于数控电炉中行高温烧结, 制备得到nHA、10%nHA/YTZ、20%nHA/YTZ、40% nHA/YTZ材料(百分比为YTZ粉末的质量分数)。

1.4.2 nHA/PA66/YTZ复合材料的制备 将不同质量比的nHA/YTZ复合材料(nHA/YTZ与PA66的质量比为3:7)进行粉碎, 与PA66注塑成型。各组样本分别为nHA/PA66、10%nHA/PA66/YTZ、20%nHA/PA66/YTZ、40%nHA/PA66/YTZ。

1.4.3 扫描电镜观察复合材料结构 对nHA/YTZ复合材料粉予以烘干、超声分散, 并于喷金后于扫描电镜下观察材料形貌特征; nHA/PA66/YTZ复合材料放置于液氮中浸泡后, 折断复合材料, 对材料断面进行喷金后, 于扫描电镜下观察材料形貌特征。

1.4.4 X射线衍射检测 对nHA/YTZ及nHA/PA66/YTZ两类复合材料进行X射线衍射检测, 扫描范围为 10° - 70° , 扫描速度为 4° /min。

1.4.5 力学性能测试 参照标准为ISO527-2-2012, 测试复合材料的抗压强度、抗弯强度、抗张强度、断裂伸长率及弹性模量。筛选最佳nHA及YTZ质量比的三元复合材料, 进行细胞相容性实验。

1.4.6 细胞毒性实验 根据ISO10993-12:2007标准制备复合材料浸提液, 以含胎牛血清及双抗溶液的DMEM/F12培养基为提取液, 将复合材料与培养基的质量比为0.2 g/mL, 于 37°C 环境下进行浸提。

MC3T3-E1细胞种植24 h后, 吸出原培养基, 于相应孔中分别加入DMEM/F12培养基(空白对照组)、nHA/PA66复合材料浸提液(对照组)及nHA/PA66/YTZ复合材料浸提液(实验组)。培养周期为更换为材料浸提液后7 d, 观测点为培养后第1, 4, 7天, 在各观测时间点行CCK-8检测。

1.4.7 细胞黏附与增殖观察 按 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 种植密度将MC3T3-E1细胞铺板, 然后分别加入DMEM/F12培养基(空

白对照组)、nHA/PA66复合材料(对照组)及nHA/PA66/YTZ复合材料(实验组), 培养周期及观测时间点为24 h。培养结束后, 进行细胞的提取与固定, 吸弃各孔内培养基, PBS清洗各组复合材料表面3次, 加入40 g/L多聚甲醛室温下固定15 min。固定完成后, 加入0.1%曲拉通 X-100室温下破膜处理5 min。PBS清洗待测样品3次后, 加入罗丹明标记-鬼笔环肽染色液, 染色液工作浓度为50 mg/L, 室温下避光染色30 min。染色完成后再次加入PBS清洗3次, 后加入DAPI染色液进行细胞核染色, 室温下避光染色15 min。染色完成后PBS清洗多余染液。将样本从染色孔板中取出, 滴加防荧光淬灭液封固, 避光保存, 并在激光共聚焦显微镜下观察MC3T3-E1细胞形态、细胞骨架及细胞在各组复合材料表面的早期黏附、生长情况。

1.5 主要观察指标 不同材料的微观结构、生物力学性能, 以及对细胞黏附、增殖的影响。

1.6 统计学分析 采用SPSS 21.0(SPSS公司, 美国)统计软件对数据进行统计分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 扫描电镜观察结果 由图1可见, 在nHA/YTZ中, YTZ晶粒填充了原本nHA晶粒之间的空隙; 在nHA/PA66/YTZ的断面扫描电镜中, 可以观察到nHA/YTZ均匀分散在PA66基体中, 不同质量比的三元复合材料结构未见明显差异。

2.2 X射线衍射检测结果 在X射线衍射检测中, 可发现nHA的特征峰位于 $2\theta=25.87^{\circ}$ 、 31.79° 及 32.19° 处, 而YTZ的特征峰则位于 $2\theta=30.23^{\circ}$ 、 35.15° 及 50.27° 处; 在nHA/YTZ中, 可观察到这两者的特征峰; nHA/PA66/YTZ复合材料的X射线衍射扫描结果显示, 除能在上述位置观察到nHA与YTZ的特征峰外, 还可在 $2\theta=20.39^{\circ}$ 和 22.71° 处观察到PA66的特征峰, 见图2。

2.3 力学性能检测结果 如表1所示, 随着YTZ的加入, 复合材料的力学性能得到了显著加强, 而且随着YTZ在复合材料中质量比的增加, 力学性能参数也呈上升趋势, 而40%nHA/PA66/YTZ各项力学数据最优。故而, 后续生物相容性检测选用40%nHA/PA66/YTZ作为实验组。

2.4 细胞毒性实验 如图3所示, 随着培养时间的延长, 3组中的细胞数量均逐渐增多, 在各观测时间点进行细胞增殖情况检测, 各组间的吸光度情况相似($P > 0.05$), 检测结果说明复合材料浸提液对MC3T3-E1细胞无明显毒性作用, 未对细胞增殖产生负面作用。

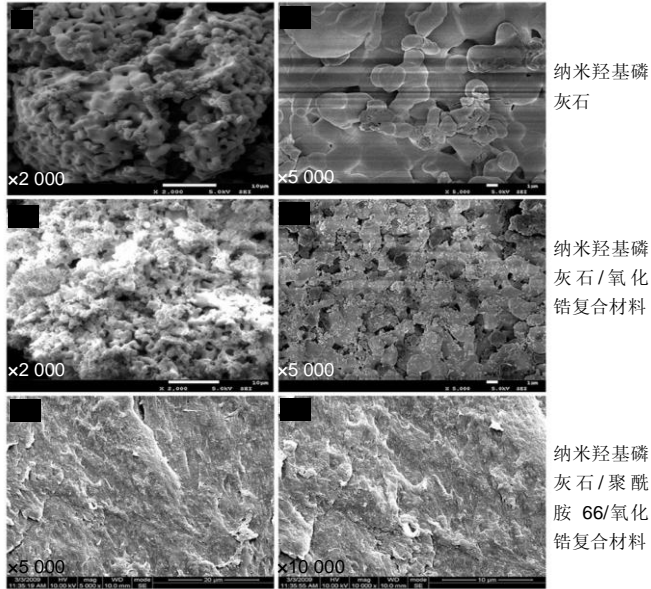
表1 不同材料的力学性能参数

Table 1 Mechanical properties of different materials

检测样品	抗压强度(MPa)	抗张强度(MPa)	抗弯强度(MPa)	断裂伸长率(%)	弹性模量(GPa)
nHA/PA66	95.30±5.41	60.53±3.47	72.26±1.76	5.22±0.61	1.83±0.15
10%nHA/PA66/YTZ	117.57±4.60	78.43±2.85	95.11±2.57	6.48±0.40	2.23±0.14
20%nHA/PA66/YTZ	128.36±9.25	101.14±3.59	106.71±3.18	10.33±0.63	2.75±0.33
40%nHA/PA66/YTZ	150.46±6.90	122.21±2.24	120.25±3.87	10.49±0.48	3.55±0.20
F值	44.15	303.18	190.05	99.53	46.49
P值	< 0.000 1	< 0.000 1	< 0.000 1	< 0.000 1	< 0.000 1

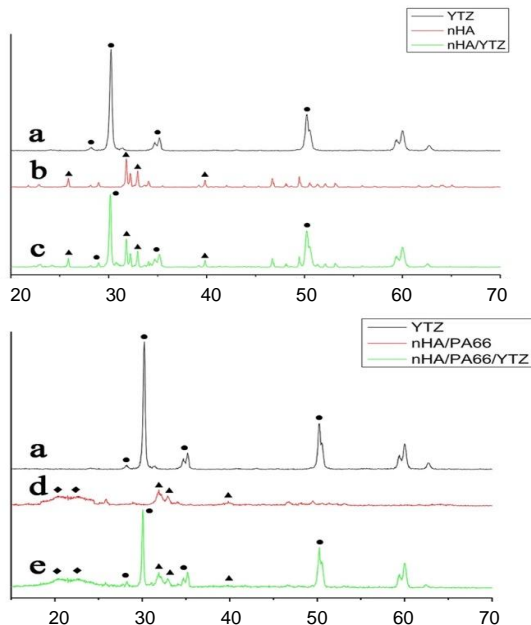
表注: nHA: 纳米羟基磷灰石, PA66: 聚酰胺 66, YTZ: 氧化锆; 10%, 20%, 40%指氧化锆在纳米羟基磷灰石/氧化锆复合材料中的质量分数。

2.5 激光共聚焦显微镜观察细胞在复合材料表面的早期黏附情况 通过激光共聚焦显微镜进一步观察MC3T3-E1细胞在复合材料表面的早期黏附情况,见图4所示,可清楚观察细胞形态及细胞骨架,在实验组复合材料上的细胞呈现融合、团聚及分层现象,细胞内肌动蛋白丝更多;在空白对照组及对照组内的细胞则呈现出单层及分散现象,相较实验组细胞数量更少,而且细胞内的肌动蛋白丝也更多。



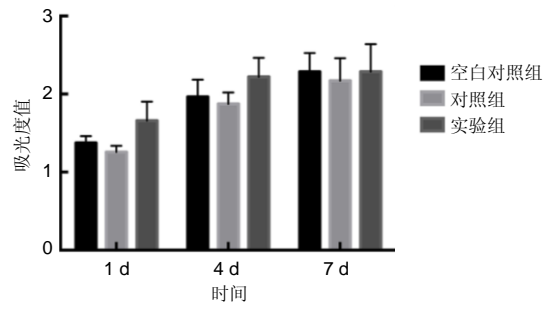
图注:在纳米羟基磷灰石/氧化锆复合材料中,氧化锆晶粒填充了原本纳米羟基磷灰石晶粒之间的空隙;在纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66/氧化锆复合材料的断面中,可观察到纳米羟基磷灰石/氧化锆均匀分散在聚酰胺 66 基体中。

图 1 扫描电镜观察不同材料的形貌特点
Figure 1 Morphological characteristics of different materials under scanning electron microscope

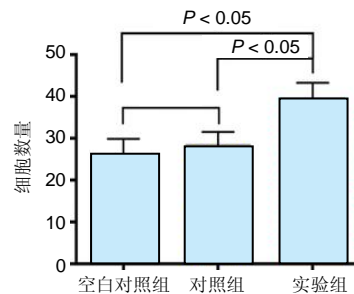
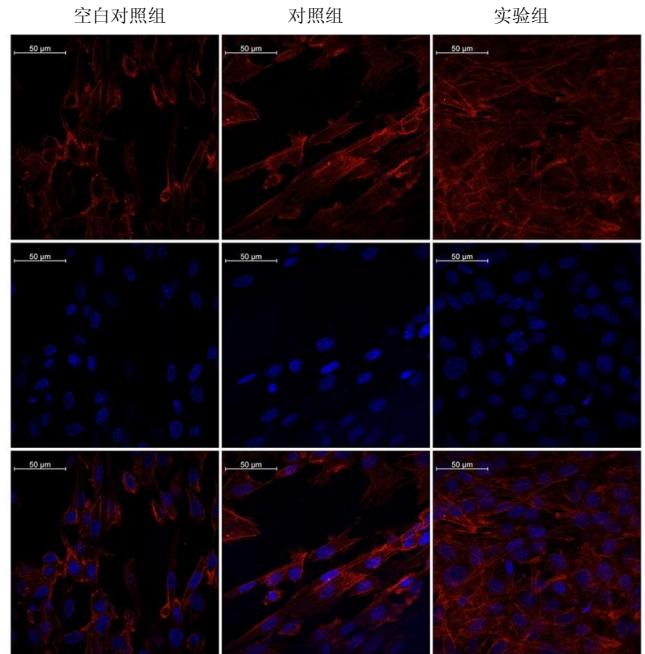


图注:图中 a 为氧化锆(YTZ), b 为纳米羟基磷灰石(nHA), c 为 nHA/YTZ, d 为纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66(nHA/PA66), e 为 nHA/PA66/YTZ。●代表氧化锆的特征峰,▲代表纳米羟基磷灰石的特征峰,◆代表聚酰胺 66 的特征峰。

图 2 不同材料的 X 射线衍射图谱
Figure 2 X-ray diffraction profiles of different materials



图注:在不同的时间点,3 组间细胞增殖无差异。
图 3 CCK-8 检测各组 MC3T3-E1 细胞增殖情况
Figure 3 Proliferation of MC3T3-E1 cells in each group detected by cell counting kit-8 assay



图注:图中红色为罗丹明-鬼笔环肽染色,染色细胞骨架;蓝色为 DAPI 染色,染色细胞核。
图 4 激光共聚焦显微镜观察 MC3T3-E1 细胞在不同材料表面的黏附生长情况
Figure 4 Adhesion of MC3T3-E1 cells on the surface of different materials under laser scanning confocal microscope

3 讨论 Discussion

由于金属内植物具有较好的生物相容性及优良的力学性能, 仍是临床应用中的首选。但金属内植物在提供可靠力学性能的同时, 其自身也存在缺陷, 而其中最致命的缺陷即为金属内植物的高弹性模量。高弹性模量可引起应力遮挡, 而应力遮挡则会引起内植物所在部位的骨萎缩及骨质疏松, 尤其在内植物下方的骨组织, 甚至在该区域出现再骨折情况^[15]。另外, 金属内植物释放出的金属离子所引起的变态反应亦并不少见^[16]。因此, 研发出不会引起局部或全身不良反应, 具有生物活性, 力学性能可满足人体内固定需要的金属或非金属材料就显得尤为迫切。

骨组织主要是由无机成分及有机成分构成, 即羟基磷灰石及 I 型胶原。nHA/PA66 的仿生特性是因为其组成结构与骨组织相似, 而如何充分利用其仿生特性, 扩大其在临床中的应用成为研究者们关注的热点。虽然有一些关于拓展其临床应用的研究报道, 但这些研究受限于 nHA/PA66 的力学性能不足, 因此相关研究结果并不理想^[17-19]。故而, 如何提高其力学性能及生物学性能以便拓展其应用范围, 是此次研究的初衷及出发点。在此次研究中, 为了提高 nHA/PA66 的力学性能与生物学性能, 作者通过两步法制备了基于 YTZ 增韧的新型三元复合材料 nHA/PA66/YTZ, 并对其材料学特性、生物相容性进行了初步探讨。

通过扫描电镜观察发现, 在 nHA/YTZ 中, YTZ 晶粒填充了原本 nHA 晶粒之间的空隙, 通过高温烧结后, 使复合材料的结构变得更为致密; 从 nHA/PA66/YTZ 的断面扫描电镜中可观察到, nHA/YTZ 均匀分散在 PA66 基体中, 这说明了 nHA/YTZ 在合成 nHA/PA66/YTZ 的过程中并未出现明显的粉粒团聚, 仍保持了较好的纳米结构, 这对于发挥纳米材料的生物学性能是极为重要的。

通过对 X 射线衍射检测进行详细分析可以得知, YTZ (ICDC: 49-1642) 的特征峰位于 $2\theta=30.23^\circ(111)$ 、 $35.15^\circ(200)$ 及 $50.27^\circ(220)$; nHA (ICDC: 09-0 432) 的特征峰位于 $2\theta=25.87^\circ(002)$ 、 $31.79^\circ(300)$ 及 $32.19^\circ(211)$ 。当 nHA 与 YTZ 进行混合烧结后, nHA/YTZ 复合物的 X 射线衍射分析中兼具 nHA 及 YTZ 的特征峰。PA66 的 X 射线衍射扫描分析中可看到, PA66 具有两种晶型, α -晶型及 β -晶型, 其分别位于 $2\theta=20.39^\circ$ 及 22.71° 处。nHA/PA66/YTZ 复合材料的 X 射线衍射扫描结果可见上述各种组分的特征峰, 这就证明了复合材料成功地各组份结合在了一起。

通过 YTZ 的加入, nHA/PA66/YTZ 相较 nHA/PA66 拥有了更为优良的力学性能, 甚至达到或超过了人体皮质骨的力学强度。与 nHA/PA66 相比, nHA/PA66/YTZ 的力学性能在抗压强度方面增强了 32%~88%, 抗张强度增强了 30%~101%, 抗弯强度增强了 29%~63%, 断裂伸长率增强了 30%~102%, 弹性模量增强了 29%~112%。尤其是 40% nHA/PA66/YTZ 复合材料, 其力学性能表现最优, 故而作者选取该质量比的复合材料进行后续研究。

生物相容性是评价生物材料的首要指标^[20]。在细胞毒性检测实验中, 3 组内细胞数量均随着培养时间的延长而增加, 3 组间各观测时间点的细胞增殖情况无差异。生物材料在植入体内后, 细胞在其表面的定植、扩展与黏附对

生物材料发挥后续作用扮演了尤为重要的角色, 同时也是细胞-材料间相互作用的基础^[21]。而且, 细胞只有在生物材料上完成了黏附后才可能发挥其生物学功能: 增殖、分化、成熟等。因此, 此次研究通过激光共聚焦显微镜观察细胞在各组复合材料表面的早期黏附情况, 评价其生物相容性及是否具备良好的促细胞黏附能力。通过激光共聚焦显微镜除可观察细胞在复合材料表面的黏附情况外, 还可清楚的观察到细胞形态、细胞骨架及细胞肌动蛋白丝的情况, 其中肌动蛋白丝具有多种功能。Ma 等^[22]研究表明, 肌动蛋白丝在诸如细胞黏附、伸展、迁移、吞噬、分裂等一系列的生物学功能中都发挥了重要作用。nHA/PA66/YTZ 复合材料表面的细胞中可观察到更多的肌动蛋白丝, 这也提示黏附于 nHA/PA66/YTZ 复合材料表面的细胞, 可能具有更好的细胞-生物材料接触及可能发挥更优良的生物学功能。Meyer 等^[23, 24]研究指出, 长梭形的细胞形态更有利于朝成骨细胞方向分化, 而在空白对照组及对照组可观察到呈圆形或多边形的细胞形态。通过激光共聚焦显微镜的观察可得知, 实验组相较空白对照组及对照组表现出了更优的促细胞黏附能力, 同时使黏附于其表面细胞呈现出更有利于向成骨细胞方向分化的细胞形态, 而这一优良特性则可能更有利于新骨形成, 增加生物材料植入生物体内后的成功率。

目前新兴的非金属类生物材料主要包括降解型及非降解型 2 大类, 诸如聚氨基酸、聚乳酸等近年来在骨科中应用的一些可降解型生物材料, 因为其降解速率不可控、降解产物可能产生细胞毒性或改变局部 pH 值而影响成骨细胞活性等自身缺陷, 而限制了其进一步的临床应用^[25-27]。与此同时, 科研工作者们将关注的重点逐渐转向如何研发具有生物活性的由无机化合物及高分子化合物组成的非降解型生物材料^[28-30]。此次研究中所涉及制备的非降解型生物材料 nHA/PA66/YTZ, 在植入宿主体内后不会降解, 而是力求与宿主骨之间通过骨整合成为一体。骨整合是最为理想的内植物-骨界面^[31], 此时内植物材料与骨之间除了简单的机械反应外, 还存在生物化学反应, 最终内植物可与骨之间实现真正的无缝连接。而在未来, 基于 nHA/PA66/YTZ 三元复合材料基础上制备的骨修复材料或内固定材料, 不仅可为骨科生物材料这个大家庭增加一位新成员, 还将有望成为传统骨科生物工程材料的替代者, 同时也可为患者带来福音。

综上, 通过两步法可成功制备基于 YTZ 增韧的新型三元复合材料 nHA/PA66/YTZ, 同时该三元复合材料具有优良的力学性能及生物相容性, 具有进一步研究应用的前景。

作者贡献: 第一、三、六、七作者参与了课题的设计; 第一、二、四、五作者负责课题的实施; 第二、三、四、七作者负责对实验方法及结果进行评估。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金青年基金 (NSFC81501876)、四川省科技厅应用基础项目 (2018JY0250)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报

告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计声明: 该文统计学方法已经由川北医学院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Zhang Y, Quan Z, Zhao Z, et al. Evaluation of anterior cervical reconstruction with titanium mesh cages versus nano-hydroxyapatite/polyamide66 cages after 1- or 2-level corpectomy for multilevel cervical spondylotic myelopathy: a retrospective study of 117 patients. *PLoS One*. 2014;9(5):e96265.
- [2] Shokrollahi P, Mirzadeh H, Scherman OA, et al. Biological and mechanical properties of novel composites based on supramolecular polycaprolactone and functionalized hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A*. 2010;95(1):209-221.
- [3] Zhang X, Zhang Y, Zhang X, et al. Mechanical properties and cytocompatibility of carbon fibre reinforced nano-hydroxyapatite/polyamide66 ternary biocomposite. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015;42:267-273.
- [4] Li J, Man Y, Zuo Y, et al. In Vitro and In Vivo Evaluation of a nHA/PA66 Composite Membrane for Guided Bone Regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2011;22(1-3):263-275.
- [5] Xiong Y, Ren C, Zhang B, et al. Analyzing the behavior of a porous nano-hydroxyapatite/polyamide 66 (n-HA/PA66) composite for healing of bone defects. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:485-494.
- [6] Zhang Y, Deng X, Jiang D, et al. Long-term results of anterior cervical corpectomy and fusion with nano-hydroxyapatite/polyamide 66 strut for cervical spondylotic myelopathy. *Sci Rep*. 2016;6:26751.
- [7] Yang P, Bian C, Huang X, et al. Core decompression in combination with nano-hydroxyapatite/polyamide 66 rod for the treatment of osteonecrosis of the femoral head. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2014;134(1):103-112.
- [8] Yang X, Song Y, Liu L, et al. Anterior reconstruction with nano-hydroxyapatite/polyamide-66 cage after thoracic and lumbar corpectomy. *Orthopedics*. 2012;35(1):e66-73.
- [9] Zhao Z, Jiang D, Ou Y, et al. A hollow cylindrical nano-hydroxyapatite/polyamide composite strut for cervical reconstruction after cervical corpectomy. *J Clin Neurosci*. 2012; 19(4):536-540.
- [10] Im SM, Huh YH, Cho LR, et al. Comparison of the fracture resistances of glass fiber mesh- and metal mesh-reinforced maxillary complete denture under dynamic fatigue loading. *J Adv Prosthodont*. 2017;9(1):22-30.
- [11] Lewicki JP, Rodriguez JN, Zhu C, et al. 3D-Printing of Meso-structurally Ordered Carbon Fiber/Polymer Composites with Unprecedented Orthotropic Physical Properties. *Sci Rep*. 2017;7: 43401.
- [12] Manicone PF, Rossi Iommetti P, Raffaelli L. An overview of zirconia ceramics: basic properties and clinical applications. *J Dent*. 2007;35(11):819-826.
- [13] Bergschmidt P, Bader R, Mittelmeier W. Metal hypersensitivity in total knee arthroplasty: revision surgery using a ceramic femoral component—a case report. *Knee*. 2012;19(2):144-147.
- [14] Bergschmidt P, Bader R, Ganzer D, et al. Ceramic femoral components in total knee arthroplasty—two years follow-up results of an international prospective multicentre study. *Open Orthop J*. 2012;6:172-178.
- [15] Sumitomo N, Noritake K, Hattori T, et al. Experiment study on fracture fixation with low rigidity titanium alloy: plate fixation of tibia fracture model in rabbit. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(4): 1581-1586.
- [16] Morwood MP, Garrigues GE. Shoulder arthroplasty in the patient with metal hypersensitivity. *J Shoulder Elbow Surg*. 2015;24(7): 1156-1164.
- [17] Yao MZ, Huang-Fu MY, Liu HN, et al. Fabrication and characterization of drug-loaded nano-hydroxyapatite/polyamide 66 scaffolds modified with carbon nanotubes and silk fibroin. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:6181-6194.
- [18] Liao J, Zhang Y, Guan X, et al. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite/polyamide 66 biocomposites reinforced with multi-walled carbon nanotubes. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2016; 27(16):1674-1684.
- [19] You F, Li Y, Zuo Y, et al. The influence of γ -ray irradiation on the mechanical and thermal behaviors of nHA/PA66 composite scaffolds. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:162384.
- [20] Asgharzadeh Shirazi H, Ayatollahi MR, Asnafi A, et al. To reduce the maximum stress and the stress shielding effect around a dental implant-bone interface using radial functionally graded biomaterials. *Comput Methods Biomech Biomed Engin*. 2017; 13:1-10.
- [21] Gyorgyey A, Ungvari K, Kecskemeti G, et al. Attachment and proliferation of human osteoblast-like cells (MG-63) on laser-ablated titanium implant material. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(7):4251-4259.
- [22] Ma R, Tang S, Tan H, et al. Preparation, characterization, and in vitro osteoblast functions of a nano-hydroxyapatite/polyetheretherketone biocomposite as orthopedic implant material. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:3949-3961.
- [23] Meyer U, Buchter A, Wiesmann HP, et al. Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. *Eur Cell Mater*. 2005;9:39-49.
- [24] Kilian KA, Bugarija B, Lahn BT, et al. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(11):4872-4877.
- [25] Walker J, Shadanbaz S, Woodfield TB, et al. Magnesium biomaterials for orthopedic application: a review from a biological perspective. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014;102(6): 1316-1331.
- [26] Ding Y, Tian R, Yang Z, et al. Effects of serum albumin on the degradation and cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes. *Biophys Chem*. 2017;222:1-6.
- [27] Bojar W, Ciach T, Kucharska M, et al. Cytotoxicity Evaluation and Crystallochemical Analysis of a Novel and Commercially Available Bone Substitute Material. *Adv Clin Exp Med*. 2015;24(3):511-516.
- [28] Li H, Gong M, Yang A, et al. Degradable biocomposite of nano calcium-deficient hydroxyapatite-multi(amino acid) copolymer. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:1287-1295.
- [29] Liu X, Shen H, Song S, et al. Accelerated biomineralization of graphene oxide-incorporated cellulose acetate nanofibrous scaffolds for mesenchymal stem cell osteogenesis *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017;159:251-258.
- [30] Zhang X, Zhang Y, Zhang X, et al. Mechanical properties and cytocompatibility of carbon fibre reinforced nano-hydroxyapatite/polyamide66 ternary biocomposite. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015;42:267-273.
- [31] Anselme K. Biomaterials and interface with bone. *Osteoporos Int*. 2011;22(6):2037-2042.