

基于低温 3D 打印丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架的力学性能

https://doi.org/10.12307/2022.304

孟露露^{1, 2}, 刘浩³, 刘涵^{3, 4}, 张军³, 李瑞欣³, 高丽兰^{1, 2}

投稿日期: 2021-01-28

采用日期: 2021-03-12

修回日期: 2021-06-09

在线日期: 2021-06-24

中图分类号:

R459.9; R318.01; R-331

文章编号:

2095-4344(2022)22-03550-06

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点一

△采用低温 3D 打印技术构建了 3 种打印角度的丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架和 3 种打印角度的聚己内酯 / 羟基磷灰石支架, 对 6 种支架进行单轴压缩实验。

实验材料:

分别 3D 低温打印丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架和聚己内酯 / 羟基磷灰石支架, 支架打印角度分别为 30°, 45°, 90°。

检测指标:

(1) 单轴压缩下压缩力学性能、应力松弛数据和曲线、蠕变实验数据和曲线。
(2) 位移-时间的变化规律、载荷-时间变化规律。

干预:

(1) 单轴压缩力学性能: 对以上 6 种支架进行了单轴压缩, 压缩实验以 0.5%/s 的压缩速率加载至支架 30% 的应变, 观察其应力随着应变的变化关系。
(2) 应力松弛性能: 对丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架进行单轴压缩加载, 应力松弛实验以 0.5%/s 的压缩速率分别加载至支架 10%, 20%, 30% 的应变, 松弛时间保持 3 h, 观察其应力随时间的变化关系。
(3) 蠕变性能: 对 90° 丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架进行单轴压缩加载, 蠕变实验分别以 2.5, 3.75, 5 kPa 的恒定压力压缩支架, 蠕变保持时间 3 h, 观察其应变随时间的变化关系。

文题释义:

应力松弛: 在总应变不变的条件下, 由于黏弹性材料内部的黏性应变分量随时间不断增长, 使回弹性应变分量随时间逐渐降低, 从而导致变形恢复力随时间逐渐降低的现象。

蠕变: 蠕变实验方法有很多种类, 如通过对材料试件施加恒定的压力以研究材料压缩蠕变性能, 还可以对材料施加恒定扭力以研究材料的扭转蠕变性能等。

摘要

背景: 随着 3D 打印技术在组织工程的快速发展, 通过 3D 打印制备出多种支架材料被广泛用于下颌骨缺损修复, 3D 打印技术为下颌骨缺损修复带来了新的可能。

目的: 采用低温 3D 打印技术构建三维仿生骨支架材料, 精确控制支架材料内部结构, 并对其进行力学性能分析。

方法: 在同等体积下, 通过改变打印支架线束与线束的交错角度, 采用低温 3D 打印技术分别打印不同角度(30°, 45°, 90°)的丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架与聚己内酯 / 羟基磷灰石支架(共 6 组支架)。单轴压缩力学实验以 0.5%/s 的压缩速率加载 6 组支架, 压缩至 30% 的应变, 观察应力随着应变的变化关系; 应力松弛实验以 0.5%/s 的压缩速率分别加载至 3 种打印角度丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架 10%, 20%, 30% 的应变, 松弛保持时间 3 h, 观察应力随时间的变化关系; 蠕变实验分别以 2.5, 3.75, 5 kPa 的恒定压力压缩打印角度为 90° 的丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架, 蠕变保持时间 3 h, 观察应变随时间的变化关系。

结果与结论: ①单轴压缩力学实验: 对于丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架和聚己内酯 / 羟基磷灰石支架, 相同压缩应变下打印角度为 90° 支架的杨氏模量高于打印角度为 30°, 45° 的支架。②应力松弛实验: 当保持压缩速率、压缩应变及压缩角度恒定时, 丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架的应力随松弛时间的延伸先快速降低, 然后缓慢降低, 随着松弛时间的延长, 支架在开始时间段(1 600 s 以内)应力下降很快, 在后期时间段(3 700 s)应力降低速度减小, 最后趋于平缓; 当保持压缩速率、压缩应变恒定时, 相对于打印角度为 30°, 45° 的支架, 打印角度为 90° 丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架的应力初值及趋于平稳时的应力值较高; 当压缩速率及压缩角度恒定时, 随着压缩应变值增加, 丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架的应力值增加。③蠕变实验: 随着蠕变时间的延长, 90° 的丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架的应变增加, 在初始阶段(500 s 内)应变增殖较快, 随后应变缓慢增加最终趋于平缓, 2.5 kPa 下支架的应变变化范围为 35% 到 55%, 3.75 kPa 下支架的应变变化范围从 43% 到 57%, 5 kPa 下支架的应变变化范围从 45% 到 57%。

关键词: 3D 打印; 生物支架; 丝素蛋白; I 型胶原; 羟基磷灰石; 单轴压缩; 生物力学

¹ 天津理工大学, 天津市先进机电系统设计与智能控制重点实验室, 天津市 300384; ² 机电工程国家级实验教学示范中心(天津理工大学), 天津市 300384; ³ 南开大学附属口腔医院, 天津市口腔医院, 天津市口腔功能重建重点实验室, 天津市 300041; ⁴ 南开大学, 天津市 300071

第一作者: 孟露露, 男, 1992 年生, 山西省怀仁市人, 汉族, 天津理工大学在读硕士, 主要从事生物力学研究。

通讯作者: 李瑞欣, 副研究员, 博士, 南开大学附属口腔医院, 天津市口腔医院, 天津市口腔功能重建重点实验室, 天津市 300041

通讯作者: 高丽兰, 教授, 博士, 天津理工大学, 天津市先进机电系统设计与智能控制重点实验室, 天津市 300384; 机电工程国家级实验教学示范中心(天津理工大学), 天津市 300384

https://orcid.org/0000-0003-3758-0910 (孟露露); https://orcid.org/0000-0002-7288-6686 (高丽兰)

基金资助: 国家自然科学基金项目(11972198), 项目负责人, 李瑞欣; 天津市临床医学重点学科专项(HWZX001), 项目负责人:

刘浩; 天津市重大疾病防治科技重大专项(19ZXDBSY00070), 项目负责人: 刘浩

引用本文: 孟露露, 刘浩, 刘涵, 张军, 李瑞欣, 高丽兰. 基于低温 3D 打印丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架的力学性能 [J].

中国组织工程研究, 2022, 26(22):3550-3555.



Mechanical properties of silk fibroin/type I collagen/hydroxyapatite scaffolds based on low-temperature 3D printing

Meng Lulu^{1,2}, Liu Hao³, Liu Han^{3,4}, Zhang Jun³, Li Ruixin³, Gao Lilan^{1,2}

¹Tianjin Key Laboratory for Advanced Mechatronic System Design and Intelligent Control, School of Mechanical Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China; ²National Demonstration Center for Experimental Mechanical and Electrical Engineering Education (Tianjin University of Technology), Tianjin 300384, China; ³The Affiliated Stomatological Hospital of Nankai University, Tianjin Stomatological Hospital, Tianjin Key Laboratory of Oral and Maxillofacial Function Reconstruction, Tianjin 300041, China; ⁴Nankai University, Tianjin 300071, China

Meng Lulu, Master candidate, Tianjin Key Laboratory for Advanced Mechatronic System Design and Intelligent Control, School of Mechanical Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China; National Demonstration Center for Experimental Mechanical and Electrical Engineering Education (Tianjin University of Technology), Tianjin 300384, China

Corresponding author: Li Ruixin, Associate researcher, MD, The Affiliated Stomatological Hospital of Nankai University, Tianjin Stomatological Hospital, Tianjin Key Laboratory of Oral and Maxillofacial Function Reconstruction, Tianjin 300041, China

Corresponding author: Gao Lilan, Professor, MD, Tianjin Key Laboratory for Advanced Mechatronic System Design and Intelligent Control, School of Mechanical Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China; National Demonstration Center for Experimental Mechanical and Electrical Engineering Education (Tianjin University of Technology), Tianjin 300384, China

Abstract

BACKGROUND: With the rapid development of 3D printing technology in tissue engineering, a variety of scaffold materials prepared by 3D printing are widely used in mandibular defect repair. 3D printing technology brings new possibilities for mandibular defect repair.

OBJECTIVE: The 3D bionic bone scaffold material was constructed by low-temperature 3D printing technology, and the internal structure of the scaffold was precisely controlled, and the mechanical properties of the scaffold were analyzed.

METHODS: Under the same volume, by changing the interlacing angle of the printed scaffold wire harness and the wire harness, low-temperature 3D printing technology was used to print silk fibroin/type I collagen/hydroxyapatite scaffolds with different angles (30°, 45°, 90°) and polycaprolactone/hydroxyapatite scaffolds (a total of 6 sets of scaffolds). The uniaxial compression mechanics experiment was loaded to 6 groups of scaffolds at a compression rate of 0.5%/s, compressed to 30% strain to observe the relationship between stress and strain. The stress relaxation experiment was applied to the three printing angles of silk fibroin/collagen I/hydroxyapatite scaffolds at a compression rate of 0.5%/s at 10%, 20%, and 30% strain, and the relaxation retention time was 3 hours to observe the relationship between stress and time. In the creep experiment, the silk fibroin/collagen I/hydroxyapatite scaffold with an angle of 90° was compressed and printed at a constant pressure of 2.5, 3.75, and 5 kPa, and the creep retention time was 3 hours to observe the relationship between strain and time.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Uniaxial compression mechanics experiment: The mechanical properties of 3D printed silk fibroin/type I collagen/hydroxyapatite scaffold and polycaprolactone/hydroxyapatite scaffold compression showed that the 90° scaffold had higher Young's modulus than the 30° and 45° scaffolds under the same compression strain. (2) Stress relaxation experiment: When the compression rate, compression strain and compression angle were constant, the stress of silk fibroin/type I collagen/hydroxyapatite scaffold decreased rapidly with the extension of relaxation time, then slowly decreased. With the extension of relaxation time, the stress of the scaffold decreased rapidly in the beginning time (within 1 600 seconds), and in the later period (3 700 seconds). When the compression rate and compression strain were kept constant, the initial and stable stress values of silk fibroin/type I collagen/hydroxyapatite scaffolds with 90° printing angle were higher than those of scaffolds with 30° and 45° printing angle. When the compression rate and compression angle were constant, the initial and stable stress values of silk fibroin/type I collagen/hydroxyapatite scaffolds increased with the increase of compression strain. (3) Creep test: With the extension of creep time, the strain of 90° silk fibroin/type I collagen / hydroxyapatite scaffolds increased rapidly in the initial stage (within 500 seconds), then increased slowly, and finally leveled off. The strain range of the scaffolds was 35% to 55% at 2.5 kPa, and 43% to 57% at 3.75 kPa. The strain of the scaffold ranged from 45% to 57% under 5 kPa.

Key words: 3D printing; biological scaffold; silk fibroin; type I collagen; hydroxyapatite; uniaxial compression; biomechanics

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 11972198 (to LRX); the Key Discipline of Clinical Medicine of Tianjin, No. HWZX001 (to LH); Major Disease Prevention and Control Technology Project of Tianjin, No. 19ZXDBSY00070 (to LH)

How to cite this article: MENG LL, LIU H, LIU H, ZHANG J, LI RX, GAO LL. Mechanical properties of silk fibroin/type I collagen/ hydroxyapatite scaffolds based on low-temperature 3D printing. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(22):3550-3555.

0 引言 Introduction

目前临床由于感染、肿瘤、创伤导致骨缺损的患者相当多见,但由于自体骨有限及人工骨免疫排斥反应等问题导致治疗情况不佳^[1-2]。虽然应用传统方法制作骨组织工程支架取得一定的成就,但在支架的三维结构、力学强度、支架个性化方面依然不太满意,通过3D打印技术制作支架的方法有望改变这些不足^[3]。骨组织工程支架是组织细胞分化和代谢的场地,对颌骨缺损修复起着重要的影响。理想的支架材料应兼顾力学性能和生物学性能要求,其设计标准包括:满足机械强度要求,以支持人体下颌骨恢复期间正常咀嚼等生理功能;满足孔隙连通性要求,允许组织的持续生长和足够的物质扩散;满足生物渗透性要求,以促进骨组织细胞的生长;良好的生物相容性,为细胞代谢分化提供合适的场所;合适的降解性,植入后能够在人体中降解^[4]。3D打印支架材料的性能与其原料密切相关。丝素蛋白是一种天然高分子纤维蛋白,大量文献表明丝素蛋白在生物相容性和降解性能上表现出明显的优势;还具有良好的氧气渗透性;对机体细胞

黏附能力强;其可塑性好,可加工成膜、颗粒、纤维、支架等多种形态,加工工艺相对简单;因此在支架基体材料的开发中丝素蛋白开始映入人们的眼帘^[5]。I型胶原是骨基质的主要成分,对细胞的成骨分化、增殖及骨骼的发育起着重要作用^[6]。CHOMCHALAO等^[7]使用I型胶原作为培养基质对骨髓基质细胞进行培养,研究发现骨髓基质细胞可定向分化为成骨细胞。胶原-整合素相互作用是骨髓基质细胞分化为成骨细胞的重要信号,有研究者通过阻断此通路发现大鼠骨髓基质细胞向成骨细胞表型的表达受到抑制。羟基磷灰石是颌骨的主要无机成分,由于其在生物相容性及仿生方面表现优异,羟基磷灰石在骨组织工程支架的应用广受青睐^[8-10]。国内外文献表明,羟基磷灰石的颗粒直径越小,植入体内后在扭转模量、拉伸模量、拉伸强度和疲劳强度4个指标表现上就越优越^[11-13]。天然生物材料如胶原蛋白、丝素蛋白、壳聚糖等具有良好的细胞相容性,但其力学性能较差。设计和制备支架时要综合考虑其生物活性和力学性能,单一材料难以满足要求,因此许多学者采用3D打印制备有机/无机复

合材料、合成/天然高分子复合材料或负载生长因子的复合材料。丝素蛋白、胶原、羟基磷灰石都具有良好的生物相容性,其复合材料在机械性能方面也具有很大的优势。相关研究证实,丝素蛋白/I型胶原/羟基磷灰石复合材料可以弥补单一材料在单独应用时的不足,复合后的材料可应用于3D打印,是组织工程构建骨支架的良好材料^[14]。由于低温3D打印可保持材料的生物活性,避免高温对材料的损伤,这使得具有生物活性的材料如丝素蛋白、胶原等的打印成为了可能。

此次研究通过3D打印技术打印出丝素蛋白/I型胶原/羟基磷灰石支架和聚己内酯/羟基磷灰石支架,利用丝素蛋白/I型胶原/羟基磷灰石复合材料提供成骨活性,利用聚己内酯/羟基磷灰石等材料作为框架结构提供力学支撑,为后期这两种支架的复合奠定研究基础;先以相同单轴压缩速率对支架进行压缩实验,探讨支架打印角度对支架力学性能的影响;同时,参考袁清献^[4]丝素蛋白-II型胶原软骨支架的制备及性能研究,采用0.5%/s的压缩速率、压缩支架30%的应变,以及不同的压缩应变值对支架进行应力松弛实验,探究3D打印角度、应力幅值对支架应力松弛行为的影响。实验所得结果可为3D打印丝素蛋白/I型胶原/羟基磷灰石支架和聚己内酯/羟基磷灰石支架对于下颌骨的缺损修复提供理论基础,探索出更加符合骨组织(下颌骨)修复用的复合材料。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 3D 打印材料生物力学实验。

1.2 时间及地点 实验于2020年8-12月在天津理工大学机械工程学院生物力学实验室完成。

1.3 材料 蚕丝(市场商蚕丝,苏州);新鲜牛肌腱(本地屠宰场获得新鲜牛肌腱);纳米级羟基磷灰石(南京埃普瑞公司,中国);聚己内酯(相对分子质量80 000);凯尔测控实验系统有限公司研制的电磁式动态力学实验系统M-100以及上海大学研制的非接触式图像采集系统;3D打印机(OrganP 1800 Lite,中国科学院沈阳自动化研究所)。

1.4 方法

1.4.1 丝素蛋白的制备 将桑蚕丝在0.5%的 Na_2CO_3 溶液中,于98-100℃处理30 min,重复3次;空气中晾干后用 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (物质的量浓度比为1:2:8)三元溶剂于(70±2)℃搅拌溶解,经透析、过滤、浓缩后得到浓度为15%的丝素蛋白溶液。

1.4.2 胶原蛋白的制备 将新鲜牛肌腱洗净后剥尽外膜,去除脂肪组织,清洗干净,充分粉碎,用0.05 mol/L Tris 缓冲液浸泡24 h,清除可溶性杂质。放入离心机中,1 800 r/min 离心10 min。收集沉淀加入含有胃蛋白酶的醋酸溶液中,充分溶胀,离心收集上清液。加入NaCl溶液进行盐析,放入离心机中,2 000 r/min 离心10 min。收集盐析沉淀物,4℃去离子水中透析5 d,每日更换去离子水,获得精制胶原凝胶。

1.4.3 丝素蛋白/I型胶原/羟基磷灰石支架的制备 使用计算机辅助设计软件Solidworks 2016设计3D支架三维模型,设计尺寸大小为10 mm×10 mm×2.4 mm,将模型保存成.stl格式导入3D打印机,将丝素蛋白/I型胶原/羟基磷灰石(质量比为3:9:2)共混,然后装入低温打印机针桶进行3D打印,见图1。初试成型后,将其置于-80℃下放置12 h,在真空冷冻干燥机中处理72 h以形成稳定的结构,然后用无水乙醇和NaOH溶液进行后处理,最后用去离子水洗涤,⁶⁰Co灭菌后低温冷冻保存备用。实验室低温3D打印的丝素蛋白/I型胶原/羟基磷灰石支架打印角度分别为30°,45°,90°,支架每层之间的旋转方向为逆时针方向。

1.4.4 聚己内酯/羟基磷灰石支架的制备 使用计算机辅助设计软件Solidworks 2016设计3D支架三维模型,设计尺寸大小为10 mm×10 mm×2.4 mm,将模型保存成.stl格式导入3D打印机,将70 mL乙酸放入带盖玻璃瓶中,缓慢加入3.745 g纳米羟基磷灰石,搅拌器搅拌30 min后逐渐加入14.98 g聚己内酯颗粒材料,充分搅拌48 h;然后装入低温打印机针桶进行3D打印,初试成型后,将其置于-80℃下放置12 h,在真空冷冻干燥机中处理72 h以形成稳定的结构,⁶⁰Co灭菌后低温冷冻保存备用。实验室低温3D打印的丝素蛋白/I型胶原/羟基磷灰石支架打印角度分别为30°,45°,90°,支架每层之间的旋转方向为逆时针方向。

1.4.5 支架力学性能检测 实验在室温下(25℃)进行,实验设备采用凯尔测控实验系统有限公司研制的电磁式动态力学实验系统M-100以及上海大学研制的非接触式图像采集系统,见图2,该系统包括控制计算机和力学加载装置,主要由主机、压缩夹具、电气系统、多通道闭环系统和软件等组成,最大加载力可达100 N,其精度可达到0.001 N,完全满足实验要求。实验结束后,计算机中配套的软件会自动记录实验数据。

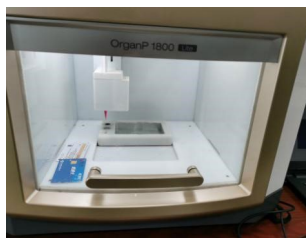


图1 | OrganP 1800 Lite 3D 打印机
Figure 1 | OrganP 1800 Lite 3D printer



图2 | 电磁式动态力学实验系统
Figure 2 | Electromagnetic dynamic mechanical experiment system

第一步,采用0.5%/s的压缩速率对6组支架进行单轴压缩实验。实验时将支架试样固定在下夹具上,然后移动上夹具直至其与试样上表面贴合,然后对支架进行压缩,压缩至支架30%的应变实验停止。每组重复3次实验。实验后计算机自动保存实验数据。

第二步,对3种打印角度的丝素蛋白/I型胶原/羟基磷灰石支架进行相同压缩速率下的应力松弛实验,对试样加

载到不同应变值 (10%, 20%, 30%), 然后保持不变, 应力保持时间为 3 h。每组重复 3 次实验。实验后计算机自动保存实验数据。

第三步, 对打印角度 90° 的丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架进行蠕变实验, 分别施加恒定压力 2.5, 3.75, 5 kPa (支架在实验机上的最底层表面积 = 丝素个数 × 丝素直径 × 支架长, 计算可得面积大约为 59.2 mm², 由公式压强 = 作用力 / 接触面积, 可以计算出相应的作用力), 蠕变保持时间为 3 h。每组实验条件重复 3 次实验, 实验后计算机自动保存实验数据。

1.5 主要观察指标 各组支架单轴压缩、应力松弛、蠕变数据和曲线, 以及位移-时间的变化规律、载荷-时间变化规律。

1.6 统计学分析 实验数据通过 Excel 软件进行处理, 每组实验条件获得数据的平均值, 然后采用 Origin 2017 软件进行绘图。

2 结果 Results

2.1 相同压缩速率下的支架单轴压缩性能 图 3 为丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架打印角度分别为 90°, 45° 和 30° 下的应力-应变曲线图, 以应变值 <30% 时的应力-应变曲线斜率作为支架的杨氏模量, 杨氏模量分别为 39.89, 29.70, 12.90 kPa, 见图 4。

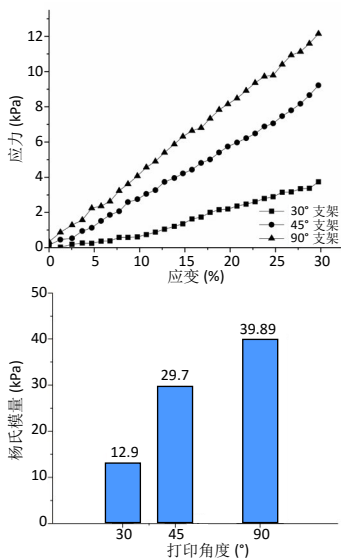


图 3 | 不同打印角度丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架的单轴压缩力学实验应力-应变曲线
Figure 3 | Stress-strain curves of silk fibroin/type I collagen/hydroxyapatite scaffold under uniaxial compression at various printing angles

图 4 | 单轴压缩下 <30% 应变时不同打印角度丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架的弹性模量
Figure 4 | Elastic modulus of silk fibroin/type I collagen/hydroxyapatite scaffolds at various printing angles and < 30% strain under uniaxial compression

图 5 为聚己内酯 / 羟基磷灰石支架打印角度分别为 90°, 45° 和 30° 下的应力-应变曲线图, 以应变值 <30% 时的应力-应变曲线斜率作为支架的杨氏模量, 杨氏模量分别为 2.00, 0.90, 0.45 MPa, 见图 6。

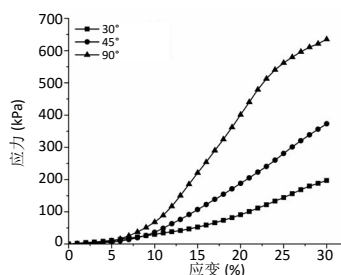


图 5 | 不同打印角度聚己内酯 / 羟基磷灰石支架的单轴压缩力学实验应力-应变曲线
Figure 5 | Stress-strain curves of polycaprolactone/hydroxyapatite scaffold under uniaxial compression at various printing angles

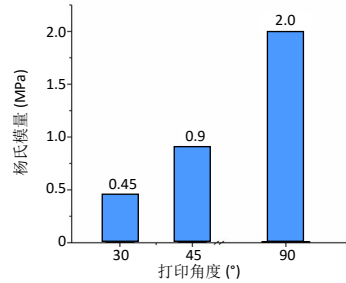
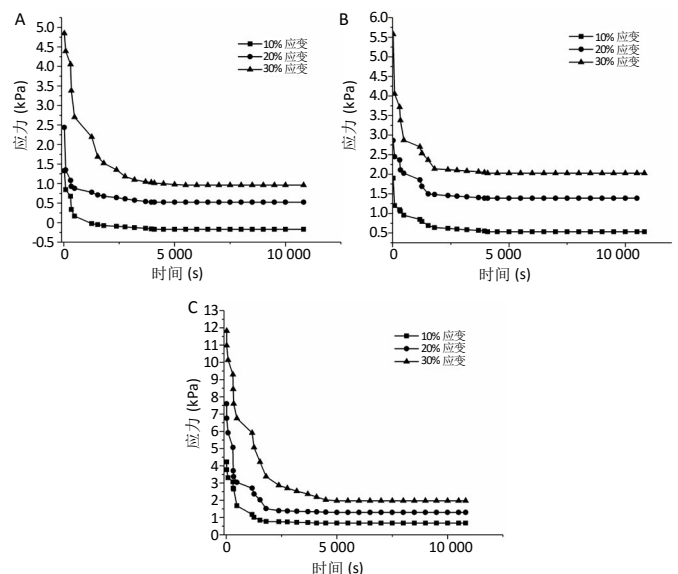


图 6 | 单轴压缩下 <30% 应变时不同打印角度聚己内酯 / 羟基磷灰石支架的弹性模量
Figure 6 | Elastic modulus of polycaprolactone/hydroxyapatite scaffolds at various printing angles and < 30% strain under uniaxial compression

2.2 相同压缩速率下的丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架的应力松弛行为 图 7 为丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架在恒定压缩速率为 0.5%/s 压缩到不同应变程度时应力随时间的变化情况。结果显示, 当压缩应变为 10%, 20%, 30% 时, 45° 支架对应的初始应力值分别为 1.90, 2.86, 5.58 kPa, 30° 支架对应的初始应力值分别为 1.33, 2.44, 4.85 kPa, 90° 支架对应的初始应力值分别为 4.22, 7.60, 11.82 kPa; 在压缩速率、压缩角度一定时, 随着压缩应变的增加, 支架压缩初始应力值也在增加; 当保持压缩速率、压缩应变及压缩角度恒定时, 随着松弛时间的延长, 支架在开始时间段 (1 600 s 以内) 应力下降很快, 在后期时间段 (3 700 s) 应力降低速度减小, 最后趋于平缓。当压缩应变为 10%, 20%, 30% 时, 在松弛 (3 700 s) 后支架应力趋于平缓时, 45° 支架对应的应力值为 0.53, 1.39, 2.03 kPa, 30° 支架对应的应力值分别为 0.17, 0.52, 0.96 kPa, 90° 支架对应的应力值分别为 0.67, 1.30, 1.97 kPa; 当压缩速率、压缩角度恒定时, 随着压缩应变的增加, 支架压缩后趋于稳定的应力值也在增

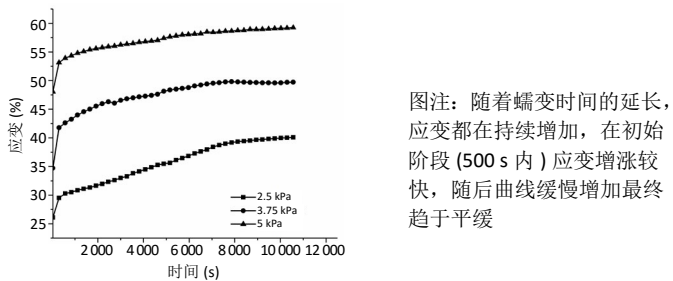


图注: A 为打印角度 30° 的支架, B 为打印角度 45° 的支架, C 为打印角度 90° 的支架。在压缩速率、压缩角度一定时, 随着压缩应变的增加, 支架压缩初始应力值增加; 当保持压缩速率、压缩应变及压缩角度恒定时, 随着松弛时间的延长, 支架在开始时间段 (1 600 s 以内) 应力下降很快, 在后期时间段 (3 700 s) 应力降低速度减小, 最后趋于平缓。相同压缩速率和应变下, 相对于打印角度 30°, 45° 的支架, 打印角度 90° 支架具有较高的初始压缩应力值和趋于稳定时的压缩应力值
图 7 | 不同打印角度丝素蛋白 / I 型胶原 / 羟基磷灰石支架分别压缩应变时的应力-时间曲线
Figure 7 | Stress-time curves of silk fibroin/type I collagen/hydroxyapatite scaffolds under compression at various printing angles

加。综上所述,相同压缩速率和应变下,相对于打印角度为30°,45°的支架,90°的支架具有较高的初始压缩应力值和趋于稳定时的压缩应力值。

由于聚己内酯/羟基磷灰石支架的弹性模量远远大于丝素蛋白/I型胶原/羟基磷灰石支架,在后续两种支架的复合3D打印制备中,聚己内酯/羟基磷灰石支架在下颌骨修复中提供力学支撑,由于单轴压缩实验测试出90°的聚己内酯/羟基磷灰石支架弹性模量高于45°和30°,故采用90°的聚己内酯/羟基磷灰石支架作为后续复合支架的3D打印。

2.3 不同应力下的丝素蛋白/I型胶原/羟基磷灰石支架蠕变行为 图8为打印角度90°丝素蛋白/I型胶原/羟基磷灰石支架在不同压缩应力下蠕变应变值随时间变化的情况。结果显示,随着蠕变时间的延长,应变都在持续增加,在初始阶段(500 s内)应变增涨较快,随后曲线缓慢增加最终趋于平缓。支架在2.5 kPa压缩应力下的应变变化范围为35%到55%,在3.75 kPa压缩应力下的应变变化范围从43%到57%,在5 kPa压缩应力下的应变变化范围从45%到57%。



图注:随着蠕变时间的延长,应变都在持续增加,在初始阶段(500 s内)应变增涨较快,随后曲线缓慢增加最终趋于平缓

图8 | 单轴压缩下打印角度90°丝素蛋白/I型胶原/羟基磷灰石支架不同恒定压力下的蠕变实验

Figure 8 | Creep test and strain time curves of 90° silk fibroin/type I collagen/hydroxyapatite scaffold under different constant pressures under uniaxial compression

3 讨论 Discussion

随着骨组织工程的发展,生物可吸收材料的优势明显显露,材料植入人体后可以降解;避免了传统金属材料机械强度太高导致周围组织不能承受足够载荷,功能逐渐退化;避免了金属植入物腐蚀导致组织感染等一系列问题^[15-17]。课题采用低温3D打印丝素蛋白/I型胶原/羟基磷灰石支架,克服了胶原蛋白快速降解和低机械性能的缺点,缓冲了丝素降解产物的pH值变化,改善了羟基磷灰石材料在负载和扭转条件下的力学强度不足、材料脆性大易破损碎裂的缺点,同时3D打印技术赋予了它良好的孔隙率以提高细胞生长所需的三维空间,增大了细胞与材料的接触面积,便于细胞附着生长^[18-21]。在同等体积下获得多种力学性能支架,通过改变线束与线束的交错角度进而改变线束与线束之间的接触面积,从而改变支架整体的力学性能,说明打印角度90°支架的整体结构更加稳定,在相同应变下可以承受更大的载荷。

3D打印技术的快速发展为解决个性化骨缺损修复提供了新方法,它可以根据缺损情况打印出大小、形状及空隙

合适的个性化支架^[22-23]。支架的杨氏模量是衡量支架力学性能的一个重要参数^[24-26],以应变值小于30%时的应力-应变曲线斜率作为支架的杨氏模量,文中单轴压缩实验测试了支架的杨氏模量,通过实验得出结论:丝素蛋白/I型胶原/羟基磷灰石支架是非线性黏弹性材料,随着压缩应变的增加,支架的杨氏模量和最大压缩应力都变大,在压缩应变小于30%时,当打印角度为90°时支架的弹性模量为39.89 kPa,当打印角度为45°时支架的杨氏模量为29.7 kPa,当支架打印角度为30°时支架的杨氏模量为12.9 kPa。这与支架的结构特征有关,支架是一种类似于海绵状的多孔黏弹性材料,当压缩应变较高时单位压缩载荷施加的力也大,导致支架的杨氏模量较大,相比于其他打印角度,打印角度为90°支架具有较高的杨氏模量。李东等^[25]制备了丝素蛋白/I型胶原/羟基磷灰石支架,力学性能显示支架的弹性模量为(340.93±71.98) kPa。而纯羟基磷灰石骨支架的抗压强度为20-37 MPa,与松质骨的抗压强度相当,远小于密质骨。有效弹性模量随着孔隙率的增大而降低^[28]。打印角度90°支架的孔隙率相对于打印角度30°,45°支架的小,从而弹性模量比打印角度30°,45°支架的数值高。

黏弹性的主要表现形式为蠕变和应力松弛。丝素蛋白/I型胶原/羟基磷灰石支架是黏弹性材料,它的这种黏弹性力学特性一方面适应骨缺损修复,另一方面也满足细胞分化增殖等功能的需要而存在。此次应力松弛实验则是测试3D打印角度、应力幅值对于支架应力松弛行为的影响,从而对黏弹性材料进行研究。通过实验可以发现,松弛应力在最初1600 s内迅速降低,之后应力缓慢下降,最后基本趋于不变。

应力松弛是在一定的温度及力的作用下,试样随时间的延长应力逐渐降低的现象。应力松弛实验是长时间的实验,所以要控制恒定的温度,如果温度不恒定会对实验结果带来影响,所以实验室要使用空调来控制实验室温度。

当保持压缩速率、压缩应变及压缩角度恒定时,支架的应力随松弛时间的延伸先快速降低,然后降低速度减缓,最后趋于平缓。当保持压缩速率、压缩应变恒定时,相比于其他打印角度的支架,打印角度90°的支架具有较高的松弛应力初值及趋于平稳的应力值。当压缩速率及压缩角度恒定时,随着压缩应变值增加,压缩应力初值也在增加。

在不同的恒定应力水平下,支架试样的蠕变应变随加载时间的增加先快速增大,之后缓慢增大。随着恒定压力的增大,试样的蠕变应变增大,而蠕变柔量减小。

作者贡献:孟露露、李瑞欣进行实验设计,实验实施为孟露露,实验评估为李瑞欣,资料收集与成文为孟露露,高丽兰审校。

经费支持:该文章接受了“国家自然科学基金项目(11972198)、天津市临床医学重点学科专项(HWZX001)及天津市重大疾病防治科技重大专项(19ZXDBSY00070)”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。

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] LI C, LIU D, ZHANG Z, et al. Triple point-mutants of hypoxia-inducible factor-1 α accelerate in vivo angiogenesis in bone defect regions. *Cell Biochem Biophys*. 2013;67(2):557-566.
- [2] 胡超然, 邱冰, 周祝兴, 等. 3D 打印聚己内酯 / 纳米羟基磷灰石复合支架与骨髓间充质干细胞的体外生物相容性 [J]. *中国组织工程研究*, 2020,24(4):589-595.
- [3] 孙凯, 李瑞欣, 范猛, 等. 3D 打印丝素蛋白 / 胶原蛋白支架的制备及性能 [J]. *中国组织工程研究*, 2017,21(2):280-285.
- [4] 袁清献. 丝素蛋白 - II 型胶原软骨支架的制备及性能研究 [D]. 天津: 天津理工大学, 2018.
- [5] REED DA, IRIARTE-DIAZ J, DIEKWISCH TGH. A three dimensional free body analysis describing variation in the musculoskeletal configuration of the cynodont lower jaw. *Evol Dev*. 2016;18(1):41-53.
- [6] 王真. 羟基磷灰石多孔骨支架的光固化制备工艺及力学与生物学性能研究 [D]. 济南: 山东大学, 2020.
- [7] CHOMCHALAO P, PONGCHAROEN S, SUTHEERAWATTANANONDA M, et al. Fibro-in and fibroin blended three-dimensional scaffolds for rat chondrocyte culture. *Biomed Eng Online*. 2013;12:28.
- [8] 年争好. 大鼠 BMSCs 成骨诱导及复合支架构建组织工程骨的研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2015.
- [9] 年争好, 李晖, 李瑞欣, 等. 纳米羟基磷灰石 / 胶原蛋白 / 丝素蛋白复合骨组织工程支架材料的生物相容性 [J]. *中国组织工程研究*, 2015,19(8):1149-1154.
- [10] 陈磊, 葛为民, 吕林蔚, 等. 人工软骨支架层间的力学性能 [J]. *中国组织工程研究*, 2019,23(30):4763-4768.
- [11] 尹璐璐. 人体颌面部软硬组织三维建模及其有限元分析 [D]. 西安: 第四军医大学, 2010.
- [12] 华昕. 软骨组织支架的 3D 打印成型及性能分析 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2018.
- [13] 孙凯, 年争好, 徐成, 等. 丝素蛋白复合胶原蛋白支架的制备及性能研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2014,28(7):903-908.
- [14] 王超飞, 章文博, 彭歆. 应用于下颌骨缺损修复的 3D 打印重建钛板力学性能的初步研究 [C]. 中华口腔医学会口腔颌面外科专业委员会. 第十四次中国口腔颌面外科学术会议论文汇编. 中华口腔医学会口腔颌面外科专业委员会: 中华口腔医学会, 2018:558.
- [15] 孙凯, 李瑞欣, 李昊, 等. 支架材料层叠的有限元计算分析论证 [J]. *中国组织工程研究*, 2019,23(30):4787-4792.
- [16] 吕春堂, 张庆福. 计算机辅助设计和 3D 打印技术与下颌骨缺损的个体化重建 [J]. *口腔颌面外科杂志*, 2017,27(1):1-7.
- [17] 张庆福. 3D 打印组合式钛合金全下颌骨假体的设计与制作研究 [C]. 中华口腔医学会口腔修复学专业委员会第十次全国口腔修复学术大会, 2016.
- [18] 李金雨. 利用羟基磷灰石支架孔隙结构调控血管生长和异位骨形成 [D]. 成都: 西南交通大学, 2016.
- [19] 吐尔逊. 牙生. 钛生物力型下颌骨 (BMM) 设计和实验研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2007.
- [20] 刘怀勤, 徐建华, 高宇. 数字化技术与钛合金相结合在下颌骨缺损个体化修复中的应用 [J]. *中国美容医学*, 2014,23(8):627-630.
- [21] 丁刘闯, 赵小琦, 韩祥祯. 3D 打印 PVA/nHA 支架与 SF/PVA/nHA 支架的性能比较 [J]. *口腔医学*, 2018,38(7):598-602.
- [22] BHARDWAJ N, KUNDU SC. Chondrogenic differentiation of rat MSCs on porous scaffolds of silk fibroin/chitosan blends. *Biomaterials*. 2012;33(10): 2848-2857.
- [23] MATMATI M, NG T, ROSENZWEIG D, et al. Protection of bovine chondrocyte phenotype by heat inactivation of allogeneic serum in monolayer expansion cultures. *Ann Biomed Eng*. 2013;41(5): 894-903.
- [24] MAO M, HE J, LIU Y, et al. Ice-template-induced silk fibroin-chitosan scaffolds with predefined microfluidic channels and fully porous structures. *Acta Biomater*. 2012;8(6): 2175-2184.
- [25] 李东, 张振辉, 孙凯, 等. 基于低温三维打印技术制备纳米羟基磷灰石 / 丝素蛋白 / 胶原蛋白复合组织工程支架的结构及其性能分析 [C]. 中国力学学会中国生物医学工程学会生物力学专业委员会、中国生物物理学会生物力学与生物流变学专业委员会. 第十一届全国生物力学学术会议暨第十三届全国生物流变学学术会议会议论文摘要汇编. 中国力学学会中国生物医学工程学会生物力学专业委员会、中国生物物理学会生物力学与生物流变学专业委员会: 中国力学学会, 2015:225.
- [26] ZHANG K, MO XM, HUANG C, et al. Electrospun scaffolds from silk fibroin and their cellular compatibility. *J Biomed Mater*. 2010;93(3): 976-983.
- [27] LIEN SM, KO LY, HUANG TJ. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater*. 2009;5(2): 670-679.
- [28] BACIU F, VLSCEANU D, HADR A. The Influence of 3D Printing Parameters on Elastic and Mechanical Characteristics of Polylactide. *Mater Sci Forum*. 2019;957:483-492.

(责任编辑: GW, ZN, ZJP)