

覃柳琪, 董先明, 苏祥郁, 等. 生物基聚乳酸复合材料 3D 打印制备含微孔支架及性能研究 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(1): 37-43.
QIN Liuqi, DONG Xianming, SU Xiangyu, et al. Preparation and properties of microporous scaffolds by 3D printing of bio-based polylactic acid composites[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(1): 37-43.

生物基聚乳酸复合材料 3D 打印制备 含微孔支架及性能研究

覃柳琪^{1,2}, 董先明^{1,2}, 苏祥郁², 周武艺^{1,2}, 郑文旭^{1,2}

(1 生物基材料与能源教育部重点实验室, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 材料与能源学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】探讨生物基聚乳酸复合材料用于 3D 打印直接构建含微孔支架的可行性。【方法】采用热重分析仪和差示扫描量热仪探究聚乳酸复合材料的热性能, 扫描电镜表征支架的微观形貌, 活/死细胞染色检测支架的细胞黏附情况。【结果】所制备的 0.6%ADC-PHAP 和 40%NaCl-PHAP 复合材料具有良好的热稳定性和加工性, 适用于熔融沉积 3D 打印。当压缩应变为 80% 时, 0.6%ADC-PHAP 和 40%NaCl-PHAP 支架相应的压缩应力分别为 45.27 和 52.11 MPa; 0.6%ADC-PHAP 复合材料的初始分解温度比 40%NaCl-PHAP 复合材料低 19.5 °C; 0.6%ADC-PHAP 支架的孔隙率达到 63.33%, 有利于细胞黏附, 且细胞相容性比 40%NaCl-PHAP 支架更好。【结论】生物基聚乳酸复合材料可通过熔融沉积型 3D 打印直接构建含微孔支架, 所制备的 0.6%ADC-PHAP 支架具有一定的应用潜力。

关键词: 熔融共混; 3D 打印; 支架; 聚乳酸; 生物基材料

中图分类号: S511;S502

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2022)01-0037-07

Preparation and properties of microporous scaffolds by 3D printing of bio-based polylactic acid composites

QIN Liuqi^{1,2}, DONG Xianming^{1,2}, SU Xiangyu², ZHOU Wuyi^{1,2}, ZHENG Wenxu^{1,2}

(1 Key laboratory of Bio-based Materials and Energy, Ministry of Education, Guangzhou 510642, China; 2 College of Materials and Energy, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To explore the feasibility of using bio-based polylactic acid composites to directly construct microporous scaffolds by 3D printing. 【Method】Thermogravimetric analyzer and differential scanning calorimeter were used to explore the thermal properties of bio-based polylactic acid composites, scanning electron microscopy was used to characterize the microscopic morphology of the bio-scaffold, and the live/dead cell staining was used for detecting cell adhesion of the scaffold. 【Result】The prepared 0.6%ADC-PHAP and 40%NaCl-PHAP composites had good thermal stability and processability, and were suitable for the fused deposition modeling 3D printing process. When the compressive strain was 80%, the corresponding compressive stresses of the 0.6%ADC-PHAP and 40%NaCl-PHAP scaffolds were 45.27 and 52.11 MPa, respectively. The initial decomposition temperature of the 0.6%ADC-PHAP composite was 19.5 °C lower than

收稿日期: 2021-06-10 网络首发时间: 2021-12-17 14:16:48

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20211216.1848.002.html>

作者简介: 覃柳琪, 硕士研究生, 主要从事生物医用 3D 打印材料的研究, E-mail: ruqe67@163.com; 通信作者: 周武艺, 教授, 博士, 主要从事微纳纤维超滤膜和 3D 打印材料制备及应用研究, E-mail: zhouwuyi@scau.edu.cn; 郑文旭, 副教授, 博士, 主要从事分子模拟研究, E-mail: wzheng@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技厅国际合作项目 (2020A0505100050); 广东省自然科学基金 (2020A1515011004); 广东普通高校新冠肺炎疫情防控工作专项 (2020KZDZX1035)

that of the 40%NaCl-PHAP composite. The porosity of the 0.6%ADC-PHAP scaffold reached 63.33% which was conducive to cell adhesion, and the cell compatibility was better than that of the 40%NaCl-PHAP scaffold.

【Conclusion】The bio-based polylactic acid composites can be used to directly construct microporous bio-scaffolds through fused deposition modeling 3D printing, and the prepared 0.6%ADC-PHAP bio-scaffold has certain application potential.

Key words: Melt blending; 3D printing; Scaffold; Polylactic acid; Bio-based material

聚乳酸 (Polylactic acid, PLA) 是一种生物可降解聚合物材料, 是以含糖、淀粉、纤维素等生物质材料为原料, 经发酵制成乳酸, 再由乳酸聚合而成的高分子材料。PLA 在熔融状态下具有良好的流变性和优异的可加工性, 这奠定了 PLA 在熔融沉积型 3D 打印材料中的主导地位。但 PLA 脆性大、亲水性差以及降解物呈酸性等不足, 依然限制着其在生物医学领域的应用。将聚合物如聚己内酯 (Polycaprolactone, PCL)^[1-2]、聚丙烯 (Polypropylene, PP)^[3]、无机粒子如羟基磷灰石 (Hydroxyapatite, HA)^[4] 等引入 PLA 的熔融共混过程, 有利于改善上述情况。在组织工程支架的构建中, 100~1 000 μm 的大孔有助于细胞向支架内生长, 有利于血管形成及骨骼向内生长; 而 1~10 μm 的微孔则有利于细胞黏附与发育^[5]。可见, 制备含有微孔结构的支架对组织修复是极其有益的。通过在钛管中积累羟基磷灰石球体制备多孔生物陶瓷支架, 虽然能构建出直径小于 10 μm 的丰富微孔, 但该方法很难满足支架的个性化制造^[6-7]。将高度个性化的 3D 打印技术与发泡技术相结合制备含微孔支架存在操作过程繁杂、稳定性差、机械性能差异大及重复性低等不足^[8-9]。而冷冻干燥与溶出结合的制备方法虽操作简单, 但易导致孔洞分散不均, 缺乏孔隙内连接, 同时受成型方式及造孔机理的制约, 此方法成型单一, 难以制造厚支架, 不利于组织工程的实际应用^[10-11]。为此, 针对以上不足, 在相关研究基础上^[12-13], 本研究将 PCL 用于增韧 PLA/HA 复合材料, 通过在 PLA/HA/PCL 复合材料中添加发泡剂偶氮二甲酰胺 (Azodicarbonamide, ADC) 或制孔剂氯化钠 (Sodium chloride, NaCl), 采用熔融共混并挤出拉丝制备生物基 3D 打印用标准线材 [直径为 (1.75±0.05) mm], 系统探究生物基 PLA 复合材料通过熔融沉积型 3D 打印构建含微孔支架的可行性。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

聚乳酸 (PLA), 4032D, 美国 NatureWorks 公司; 聚己内酯 (PCL), capa6500, 瑞典 Perstorp 公司;

w 为 99% 的纳米级羟基磷灰石 (HA), 西安通泽生物科技有限公司; 氯化钠 (NaCl), 过 200 目筛, 国药集团化学试剂有限公司; 偶氮二甲酰胺 (ADC), 西亚化学科技 (山东) 有限公司; 小鼠骨髓间充质干细胞 (Bone marrow mesenchymal stemcells, BMSCs), CRL12424, 美国 ATCC; 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)、DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液, 美国 Gibco 公司; 钙黄绿 AM (Calcein-AM)、碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI), 日本同仁化学研究所。

双螺杆挤出机, SHJ-20B, 南京杰恩特机电有限公司; 3D 打印耗材生产线, MESI-25, 广州市普同实验分析仪器有限公司; 桌面式 3D 打印机, FS-200, 广州飞胜智能科技股份有限公司; 万能电子测试仪, UTM4204, 深圳新三思纵横科技股份有限公司; 热重分析仪, TG209F1Libra™, 德国耐驰仪器制造有限公司; 差示扫描量热仪, DSC8000, 英国 Polymer Laboratories 公司; 扫描式电子显微镜, EVO MA 15, 美国珀金埃尔默公司; 共聚焦显微镜, TCS SP-8, 德国徕卡公司。

1.2 含 NaCl 或 ADC 的 PLA 复合材料线材制备

参照前期试验及研究结果^[14-15], 以 PLA 和 HA 质量比为 9:1, 增韧相 PCL 的质量分数固定为 15%, 熔融共混后得 PLA/HA/PCL 复合材料, 作为空白样, 标记为 PHAP。再分别将制孔剂 NaCl、发泡剂 ADC 与 PLA/HA/PCL 进行熔融共混, 其中 NaCl 按照 10%、20%、30% 和 40% 的质量分数添加, 分别标记为 10%NaCl-PHAP、20%NaCl-PHAP、30%NaCl-PHAP 和 40%NaCl-PHAP; ADC 按照 0.2%、0.4%、0.6% 和 0.8% 的质量分数添加, 分别标记为 0.2%ADC-PHAP、0.4%ADC-PHAP、0.6%ADC-PHAP 和 0.8%ADC-PHAP。上述复合材料样品均先通过双螺杆挤出机进行熔融挤出、造粒, 最后再经过 3D 打印耗材生产线制备出直径为 (1.75±0.05) mm 的 3D 打印线材, 螺杆转速为 25 r/min, 螺杆各温区温度分别为 185、190、190 和 185 ℃。

1.3 PLA 复合材料 3D 打印支架制备

将所制备的线材用于桌面式 3D 打印机, 实现各支架的个性化打印。其中, 支架模型设计为带正

六边形(蜂窝状)孔径的圆柱形支架, 支架的直径为 20 mm、高度 10 mm, 正六边形(蜂窝)的边长为 1.5 mm。

1.4 PLA 复合材料线材热性能表征

热重测试 (Thermogravimetric analysis, TG) 在氮气氛围下, 程序以 20 °C/min 的升温速率从 35 °C 升温到 600 °C 进行, 先将样品进行为期 3 d 的浸泡溶出试验, 每 8 h 换 1 次水, 烘干后分别取 2~5 mg 复合材料线材进行测试。θ₀ 为起始分解温度, θ_{max} 为最大降解速率温度, θ_{end} 为终止分解温度。试验同时记录微商热重分析 (Derivative thermogravimetry, DTG) 结果。

采用差示扫描量热仪 (Differential scanning calorimet, DSC) 开展热性能测试时, 取 5~10 mg 样品装于铝坩埚中, 再用标准压片机对坩埚进行密封。程序第 1 次加热扫描从 50 °C 到 200 °C, 为了消除热历史, 程序在 200 °C 下保温 5 min, 冷却后再进行第 2 次升温扫描, 记录材料的玻璃化温度 (θ_g)、熔融温度 (θ_m)、最大转变峰、熔融焓 (ΔH_m)、结晶度 (X_c)。其中, 结晶度由如下公式计算:

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{w \Delta H_m^0}, \tag{1}$$

式中, ΔH_m⁰ 指的是 PLA 100% 结晶的熔融焓, w 是复合材料中 PLA 的质量分数。ΔH_m⁰ 的值为 93.7 J·g⁻¹[16]。

1.5 PLA 复合材料 3D 打印支架表面形貌测试

利用扫描电子显微镜在电场加速电压为 5.00 kV, 电流为 25 pA 的环境下, 观察蜂窝状支架表面形貌。试验截取固定高度的蜂窝支架, 侧贴在导电胶上, 通过导电胶包围支架进一步固定后观察支架形貌, 并截取图片。

1.6 PLA 复合材料 3D 打印支架孔隙率测试

根据液体置换法测量支架的孔隙率 (P), 用无水乙醇作为进入支架孔的运动流体。计算如下所示:

$$P = (V_1 - V_3)/(V_2 - V_3) \times 100\%, \tag{2}$$

式中, V₁ 为初始乙醇的体积, V₂ 为多孔支架与乙醇充分接触后的体积, V₃ 为取出支架后剩余乙醇的体积。每组样品进行 5 个平行样的测定, 取平均值进行绘图统计。

1.7 PLA 复合材料 3D 打印支架力学性能测试

压缩试验从应力-应变图获得支架的机械性能, 包括应力、应变对应关系等, 测试样品是直径与厚度为 2:1 的圆形脚手架, 20 kN 称重传感器以 2 mm/min 的压缩速度施加载荷。重复 5 次平行试验获取平均值。

1.8 PLA 复合材料 3D 打印支架细胞毒性测试

将 BMSCs 培养在添加 10%(φ)FBS 溶液的 DMEM 培养基中。将材料置于 12 孔板中, 加入

75% (φ) 乙醇溶液浸泡 2 h 后, 用无菌 PBS 清洗 3 次, 然后加入细胞培养液浸泡 12 h 后, 将 20 μL 细胞悬液 (每孔 3×10⁴) 接种到材料上, 2 h 后加入 500 μL 完全培养基, 置于 37 °C、5% (φ)CO₂ 细胞培养箱中培养 48 h 后取样, PBS 漂洗, 再加入 Calcein-AM 和 PI, 避光孵育 25 min 后, PBS 漂洗 1 次, 最后利用共聚焦显微镜观察材料表面细胞活性并采集图片。采用 Image J 软件统计不同样品图片中的细胞存活和死亡的数量。

1.9 数据分析

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行单因素方差分析。假定方差齐性, 组间两两比较采用 LSD 法检验; 未假定方差齐性, 组间两两比较采用 Tamhane's T2 检验, P<0.05 时认为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 含 NaCl 或 ADC 的 PLA 复合材料线材及其 3D 打印支架形态特征

将水溶性 NaCl、发泡剂 ADC 分别与 PLA 复合材料熔融共混加工, 得到如图 1 所示的系列 3D 打印线材, 由图 1 可知, 0.6%ADC-PHAP 的线材略显淡黄色, 其他线材均呈白色, 此外, 0.8%ADC-PHAP 出现明显的膨胀、弯曲现象, 不适用于 3D 打印, 其他复合材料粗细均匀、表面光滑, 具备 3D 打印条件。

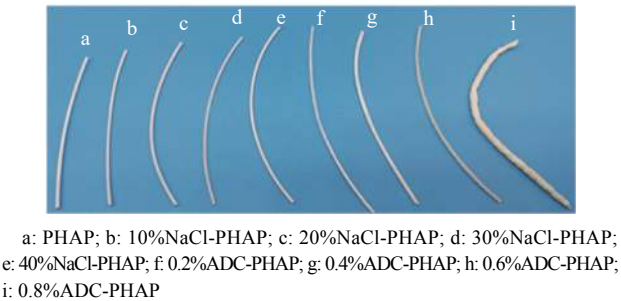


图 1 用于制备 3D 打印支架的线材
Fig. 1 Wires used for scaffolds preparation by 3D printing

图 2 分别是由 40%NaCl-PHAP 和 0.6%ADC-PHAP 线材打印的蜂窝状支架实物, 这 2 种复合材料的 3D 打印成型效果优异, 其中, 40%NaCl-PHAP 支架的孔径均匀, 支架呈白色; 而 0.6%ADC-PHAP 支架略微膨胀, 显淡黄色。为了更有效地探究含微孔支架的构建情况, 在后续研究中, 重点讨论制孔剂、发泡剂添加量较高的 40%NaCl-PHAP 和 0.6%ADC-HAPP 样品, 同时, 试验以 10%NaCl-PHAP 和 0.2%ADC-PHAP 作为对比样, PHAP 为空白参照样。

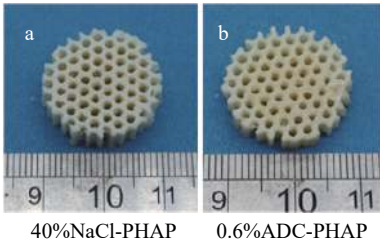


图 2 3D 打印蜂窝结构支架实物图

Fig. 2 Physical images of 3D printed scaffolds with honeycomb structure

2.2 PLA 复合材料的热性能

图 3 为聚乳酸复合材料的 TG 和 DTG 曲线图, 由 TG 图 (图 3a) 可知, 在试验加工温度下, 复合材料均具有良好的热稳定性。但 NaCl 或 ADC 的加入, 均使复合材料的初始热分解温度降低, 且存在 ADC 的复合材料初始热分解温度进一步降低的情况。表 1 列出了复合材料的热降解具体数值, 相较 PHAP 空白样, 含 ADC 质量分数为 0.6% 的复合材

料的初始分解温度降低了约 35 ℃, 这可能是由于发泡材料孔内存在的氧气促进了 PLA 基质的热分解, 而 0.6%ADC-PHAP 产生的孔洞更丰富, 比表面积更大, 与氧气的接触面增大, 反应活性更高, 因此其初始热分解温度比 0.2%ADC-PHAP 复合材料更低^[17], 这一结果与 Abu Hassan 等^[18] 的发现一致。残余量数值显示, 浸出 3 d 后, NaCl 被部分去除, 10%NaCl-PHAP、40%NaCl-PHAP 复合材料的残余量分别达到 17.26%(理论残余率 17.65%, 其中, NaCl 10%、HA 7.65%) 和 37.96%(理论残余率 45.10%, 其中, NaCl 40%、HA 5.10%), 对比不同 NaCl 添加量的复合材料残余率可知, 当添加的 NaCl 质量分数达到 40% 时, 整体材料的质量损失率最大。这是因为 NaCl 的添加量越多, 聚合物内可形成连续的晶粒状, 易于被水溶出, 而当 NaCl 的添加量较少时, 晶粒周围被高聚物紧密包裹, 无法被水洗出, 所以当 NaCl 的添加量越低时, 其热重残余率越逼近理论残余率。

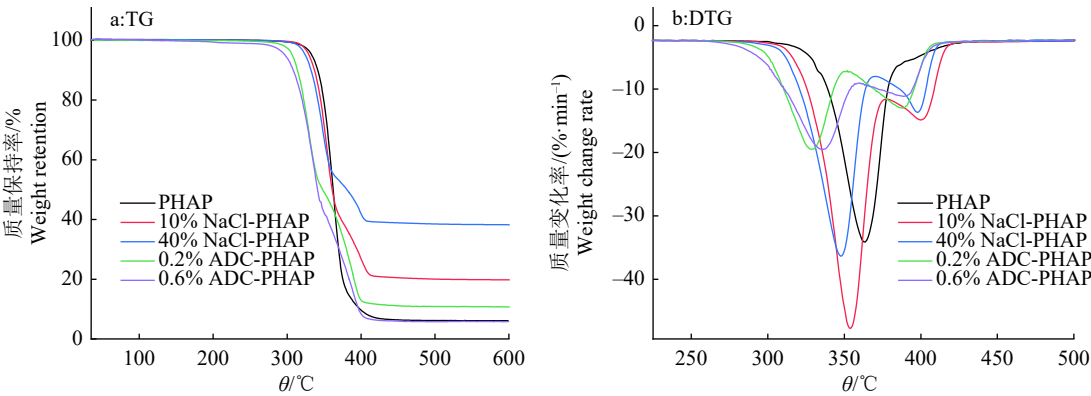


图 3 PLA 复合材料的 TG 曲线和 DTG 曲线
Fig. 3 TG and DTG curves of PLA composites

表 1 PLA 复合材料热降解数值统计

Table 1 Numerical statistics of thermal degradation of PLA composites

样品 Sample	$\theta_0/^\circ\text{C}$	$\theta_{\max 1}(\theta_{\max 2})/^\circ\text{C}$	$\theta_{\text{end}}/^\circ\text{C}$	残余量/% Residue
PHAP	344.4	363.4	377.5	6.03
10%NaCl-PHAP	336.1	355.4(399.9)	374.9	17.26
40%NaCl-PHAP	328.5	348.1(397.8)	368.5	37.96
0.2%ADC-PHAP	310.5	332.9(390.0)	367.4	10.72
0.6%ADC-PHAP	309.0	336.7(390.3)	373.4	5.82

PLA 复合材料的 DSC 升温曲线如图 4 所示, 与之对应的 DSC 测试数值结果如表 2 所示。在相同的加工条件下, 含制孔剂 NaCl 的复合材料的 θ_g 和 θ_m 变化不大, 添加发泡剂 ADC 的质量分数达到 0.2% 时, 0.2%ADC-PHAP 复合材料的玻璃化转变温度比空白样 PHAP 提高了 4 ℃。NaCl、ADC 的加入, 均使复合材料的熔融焓下降。从图 4

观察到 0.6%ADC-PHAP 出现 2 个熔融峰, 这意味着聚合物中存在不同形式的晶体。可见, 发泡剂对 0.2% ADC-PHAP、0.6%ADC-PHAP 复合材料中晶体结构的形成有影响。具有较低熔融温度的晶体可能与在冷结晶期间形成的较小晶粒有关, 而具有较高熔融温度的晶体是在一次结晶过程中所形成的微晶^[19]。

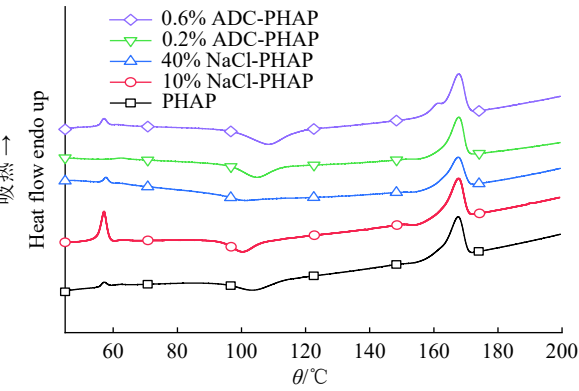


图 4 PLA 复合材料的 DSC 升温曲线

Fig. 4 DSC heating curve of PLA composites

2.3 3D 打印支架的微观形貌分析

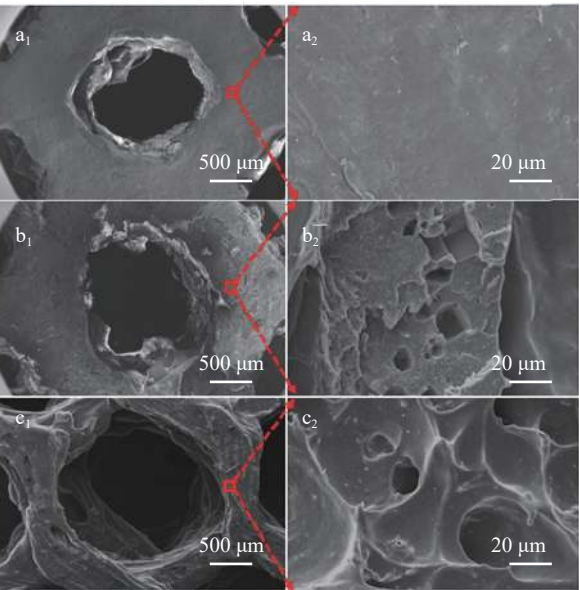
图 5 分别为 PHAP、40%NaCl-PHAP 和 0.6%ADC-PHAP 复合材料构造的 3D 打印蜂窝结构支架扫描电镜图。由图 5 可知, PHAP 复合材料打印的蜂窝状支架表面光滑, 表面均匀分散的白

点为复合材料中分散的羟基磷灰石。分别由 40%NaCl-PHAP 和 0.6%ADC-PHAP 复合材料构建的蜂窝状支架表面更粗糙, 其中, 40%NaCl-PHA 支架表面存在立方状孔洞, 这是由于聚合物中正八面体的 NaCl 晶体溶出后留下的, 但类似孔洞并不丰富。由此可知, 40%NaCl-PHAP 支架中仍残留大量被高聚物包裹的 NaCl, 这些 NaCl 留在支架内部无法被水溶出。0.6%ADC-PHAP 复合材料构建的蜂窝状支架表面存在大小均匀的球状孔洞结构, 该支架的大部分孔径直径范围为 10~50 μm, 张学盈等^[20]在探究偶氮二甲酰胺对聚氯乙烯发泡材料性能的影响中也有类似的观察。从 SEM 图 (图 5) 还可以观察到直径小于 5 μm 的孔洞, 因此, 由 Zhou 等^[5]的统计可知, 这些孔洞对细胞黏附和发育更有利。可见, ADC 质量分数为 0.6% 的 0.6%ADC-PHAP 复合材料可通过 3D 打印技术, 制备出富含微孔的支架。

表 2 PLA 复合材料的 DSC 测试结果

Table 2 DSC test results of PLA composites

样品 Sample	玻璃化温度(θ_g)/°C Glass transition temperature	熔融温度(θ_m)/°C Melting temperature	熔融焓(ΔH_m)/(J·g ⁻¹) Melting enthalpy	结晶度(X_c)/% Crystallinity
PHAP	56.23	167.53	27.06	37.75
10%NaCl-PHAP	56.04	167.66	26.44	40.98
40%NaCl-PHAP	56.79	167.50	22.28	51.80
0.2%ADC-PHAP	60.89	167.77	22.43	31.35
0.6%ADC-PHAP	56.16	167.89	21.69	30.44



a₁, a₂: PHAP; b₁, b₂: 40%NaCl-PHAP; c₁, c₂: 0.6%ADC-PHAP, a₂, b₂, c₂ 为 a₁, b₁, c₁ 的局部放大图

a₁, a₂: PHAP; b₁, b₂: 40%NaCl-PHAP; c₁, c₂: 0.6%ADC-PHAP, a₂, b₂ and c₂ are partial enlarged views of a₁, b₁, c₁, respectively

图 5 PLA 复合材料 3D 打印支架 SEM 图

Fig. 5 SEM image of PLA composites 3D printed scaffold

2.4 3D 打印支架的孔隙率分析

图 6 为 3D 打印 PHAP、10%NaCl-PHAP、40%NaCl-PHAP、0.2%ADC-PHAP 和 0.6%ADC-PHAP 支架的孔隙率统计结果。由图 6 可知, 40%NaCl-PHAP 和 0.6%ADC-PHAP 2 种支架具有更高的孔隙率, 分别达到 62.78% 和 63.33%, 结合图 5 的 SEM 图可知, 40%NaCl-PHAP 和 0.6%ADC-PHAP 2 种支架上存在的微孔一定程度上提高了支架对乙醇的吸附性能, 使得二者的孔隙率测试结果均高于 PHAP、10%NaCl-PHAP 和 0.2%ADC-PHAP 这 3 种支架。对各支架的孔隙率进行差异显著性分析, 发现 40%NaCl-PHAP 的孔隙率显著高于 PHAP、10%NaCl-PHAP 支架 ($P<0.05$), 0.6%ADC-PHAP 支架的孔隙率极显著高于 PHAP 和 0.2%ADC-PHAP 支架的 ($P<0.01$)。

2.5 3D 打印支架的压缩性能分析

图 7 是 3D 打印蜂窝结构支架的力学试验结果。由压缩应力、应变曲线可以看出, 40%NaCl-

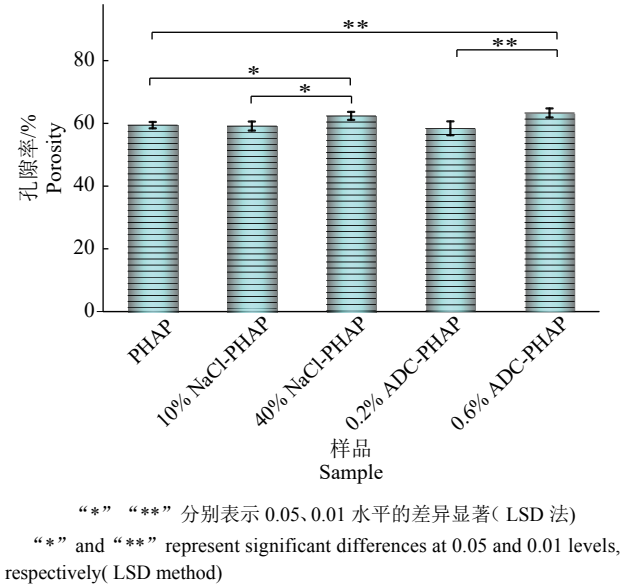


图 6 PLA 复合材料 3D 打印支架孔隙率
Fig. 6 Porosity of PLA composites 3D printed scaffold

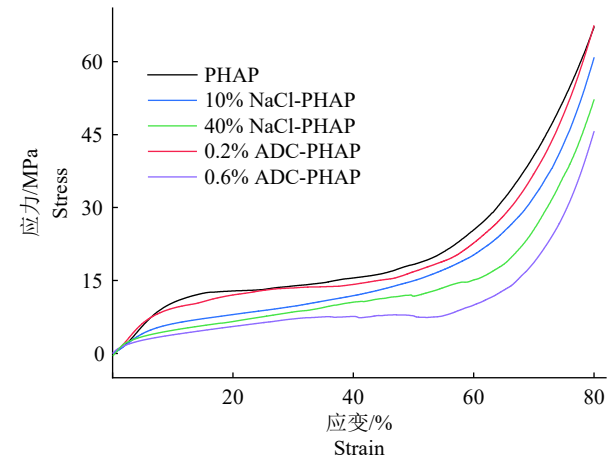
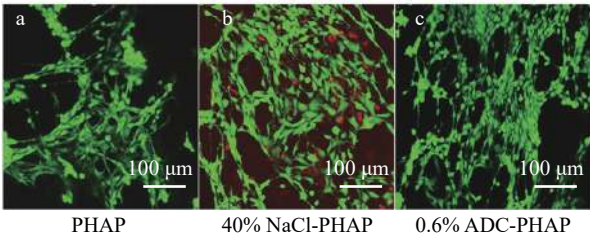


图 7 PLA 复合材料 3D 打印支架压缩性能
Fig. 7 Compression performance of 3D printed scaffold using PLA composites

PHAP 和 0.6%ADC-PHAP 2 种支架在应变达到 35% 之后, 曲线出现较为明显的波动, 这是内部结构出现坍塌的结果, 当应变达到 65% 之后, 应力开始急剧上升, 这是由支架结构致密化导致的结果。在压缩应变为 80% 时, PHAP、10%NaCl-PHAP 和 40%NaCl-PHAP 3 种支架的压缩应力分别为 67.15、60.75 和 52.11 MPa, 当添加的 ADC 的质量分数为 0.2% 时, 支架相应的压缩应力与 PHAP 支架相差不大, 达到了 67.34 MPa, 但随着 ADC 质量分数的进一步提高, 0.6%ADC-PHAP 支架的压缩应力仅为 45.27 MPa。结合图 5 支架的 SEM 可知, 相比空白样品 PHAP 支架, 40%NaCl-PHAP 和 0.6%ADC-PHAP 2 种支架的力学性能减弱是支架微孔化引起的不良结果。

2.6 3D 打印支架对细胞黏附的影响

图 8 为 PHAP、40%NaCl-PHAP 和 0.6%ADC-PHAP 3 种 3D 打印支架在共聚焦显微镜下观察到的 BMSCs 细胞染色图。在进行细胞染色试验之前, 将含 NaCl 的样品进行了为期 3 d 的浸泡溶出试验。由图 8 可知, 在同样的操作条件下, 40%NaCl-PHAP 和 0.6%ADC-PHAP 2 种支架表面观察到的细胞数量明显比 PHAP 支架多, 这是因为含微孔的支架表面的粗糙度提高了。同时, 由 SEM 图 (图 5) 观察到小于 10 μm 的微孔, 也对细胞的黏附起到积极作用。在 40%NaCl-PHAP 支架上观察到较多的红色细胞, PHAP 和 0.6%ADC-PHAP 2 种支架表面基本没有观察到红色, 可见含 NaCl 的支架不利于细胞的成长。对比发现, 0.6%ADC-PHAP 支架表现出较高的细胞活性, 是更具应用潜力的含微孔支架。计数结果 (图 9) 显示, PHAP、40%NaCl-PHAP 和 0.6%ADC-PHAP 支架的细胞存活率分别为 $(98.60\pm0.43)\%$ 、 $(88.49\pm1.02)\%$ 和 $(99.06\pm0.16)\%$, 40%NaCl-PHAP 支架的细胞存活率极显著低于 PHAP、0.6%ADC-PHAP 支架的 ($P<0.01$)。



图中, 绿色为活细胞, 红色为死细胞
In the figure, green cells are live cells, red cells are dead cells
图 8 3D 打印支架接种 BMSC 细胞染色的共聚焦显微镜照片

图 8 Confocal microscope photo of 3D printed scaffold inoculated with BMSC cells

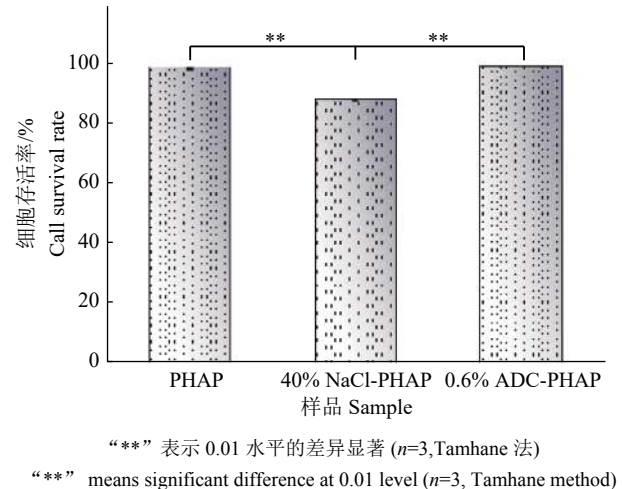


图 9 3D 打印支架接种 BMSC 细胞的存活率
Fig. 9 Cell survival statistics of live/dead staining of 3D printed scaffold inoculated with BMSC cells

3 结论

本研究发现, 含 NaCl 或 ADC 的 PLA 复合材料线材适用于熔融沉积型 3D 打印, 可用于制备含微孔支架。NaCl 或 ADC 的加入, 均使得 PLA 复合材料的初始分解温度降低, 0.6%ADC-PHAP 复合材料的初始分解温度比 40%NaCl-PHAP 复合材料低 19.5 ℃, 比空白样 PHAP 低 35 ℃。所构建的 0.6%ADC-PHAP 支架力学性能虽有所减弱, 但其孔隙率比空白样高, 达到 63.33%, 差异具有统计学意义。同时, 该支架除了含有直径为 10~50 μm 的微孔之外, 还存在有利于细胞黏附的、直径小于 5 μm 的孔洞。所构建的 0.6%ADC-PHAP 支架比 40%NaCl-PHAP 支架表现出更好的细胞存活率, 在组织工程中具有较好的应用潜力。

参考文献:

[1] OSTAFINSKA A, FORTELNÝ I, HODAN J, et al. Strong synergistic effects in PLA/PCL blends: Impact of PLA matrix viscosity[J]. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2017, 69(5): 229-241.

[2] 宋中波, 甄卫军. PCL 增韧 PLA 材料的流变行为及其热降解动力学[J]. *塑料*, 2017, 46(4): 32-38.

[3] BAI Z F, DOU Q. Rheology, morphology, crystallization behaviors, mechanical and thermal Properties of poly(lactic acid)/polypropylene/maleic anhydride-grafted polypropylene blends[J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2018, 26(3): 959-969.

[4] 程思敏, 陈丽杰, 洪阳阳, 等. 羟基磷灰石的表面改性及其对聚乳酸基多孔支架性能的影响[J]. *复合材料学报*, 2018, 35(5): 1087-1094.

[5] ZHOU C, YANG K, WANG K, et al. Combination of fused deposition modeling and gas foaming technique to fabricated hierarchical macro/microporous polymer scaffolds[J]. *Materials & Design*, 2016, 109(21): 415-424.

[6] SCOTT G D, KILGOUR D M. The density of random close packing of spheres[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 1969, 2(6): 863-866.

[7] ZHANG J, XIAO D, HE X, et al. A novel porous bio-ceramic scaffold by accumulating hydroxyapatite spheres for large bone tissue engineering: III: Characterization of porous structure[J]. *Materials Science & Engineering : C*, 2018, 89(8): 223-229.

[8] KAKUMANU V, SRINIVAS SUNDARRAM S. Dual pore network polymer foams for biomedical applications via combined solid state foaming and additive manufacturing[J]. *Materials Letters*, 2018, 213(4): 366-369.

[9] SONG P, ZHOU C, FAN H, et al. Novel 3D porous

biocomposite scaffolds fabricated by fused deposition modeling and gas foaming combined technology[J]. *Composites Part B:Engineering*, 2018, 152(21): 151-159.

[10] LU T, LI Y, CHEN T. Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2013, 8(1): 337-350.

[11] HAIDER A, HAIDER S, KUMMARA M R, et al. Advances in the scaffolds fabrication techniques using biocompatible polymers and their biomedical application: A technical and statistical review[J]. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2020, 24(2): 186-215.

[12] LI X, ZHANG S J, ZHANG X, et al. Biocompatibility and physicochemical characteristics of poly(ε-caprolactone)/poly(lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering[J]. *Materials & Design*, 2017, 114(2): 149-160.

[13] PATI F, SONG T H, RIJAL G, et al. Ornamenting 3D printed scaffolds with cell-laid extracellular matrix for bone tissue regeneration[J]. *Biomaterials*, 2015, 37(2): 230-241.

[14] FERRI J M, JORDÁ J, MONTANES N, et al. Manufacturing and characterization of poly(lactic acid) composites with hydroxyapatite[J]. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 2017, 31(7): 865-881.

[15] ZHAO H, ZHAO G. Mechanical and thermal properties of conventional and microcellular injection molded poly(lactic acid)/poly(ε-caprolactone) blends[J]. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2016, 53(1): 59-67.

[16] HO M P, LAU K T, WANG H, et al. Improvement on the properties of polylactic acid (PLA) using bamboo charcoal particles[J]. *Composites Part B:Engineering*, 2015, 81(14): 14-25.

[17] ABBASI H, ANTUNES M, VELASCO J I. Graphene nanoplatelets-reinforced polyetherimide foams prepared by water vapor-induced phase separation[J]. *Express Polymer Letters*, 2015, 9(5): 412-423.

[18] ABU HASSAN N A, AHMAD S, CHEN R S, et al. Cells analyses, mechanical and thermal stability of extruded polylactic acid/kenaf bio-composite foams[J]. *Construction and Building Materials*, 2020, 240(11): 117884.

[19] FRACKOWIAK S, LUDWICZAK J, LELUK K, et al. Foamed poly(lactic acid) composites with carbonaceous fillers for electromagnetic shielding[J]. *Materials and Design*, 2015, 65(1): 749-756.

[20] 张学盈, 崔永岩. AC 发泡剂与增塑剂对 PVC 发泡材料性能的影响[J]. *塑料*, 2016, 45(1): 32-34.