

# Study on Preparation and Three-Dimension Print of Silk Fibroin/Nano-Hydroxyapatite Composites

Chunquan Fan<sup>1\*</sup>, Yuying Lu<sup>2\*</sup>, Hui Liu<sup>1#</sup>, Zhenqi Ding<sup>1#</sup>, Bin Lin<sup>1</sup>, Dannong He<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopaedic Surgery, The 909th Hospital of PLA, Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, Zhangzhou Fujian

<sup>2</sup>Shanghai Naxu Industry CO., Ltd., Shanghai

Email: <sup>#</sup>liuhui0863@sina.com, <sup>#</sup>dzqi@xmu.edu.cn

Received: Dec. 13<sup>th</sup>, 2019; accepted: Dec. 26<sup>th</sup>, 2019; published: Jan. 2<sup>nd</sup>, 2020

## Abstract

A composite material of silk fibroin (SF) and nano-hydroxyapatite (HA) was prepared by co-precipitation method using mulberry silk and inorganic salt to solve the problem of brittle fracture and low toughness of single hydroxyapatite. The composite material was characterized by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR) and X-ray diffraction (XRD). The tensile tests of the composites which were printed via three-dimension printer were done. The results show that the size of the HA/SF is about 20 - 50 nm. The length of the nano-particles with long axis orientation is about 80 - 120 nm. The crystalline state of HA was weakened by the SF in HA/SF. HA/SF scaffolds were printed by three-dimension printer. Via adding nanocellulose disperses solution into the HA/SF composite, the compressive strength of HA/SF scaffolds can be 52 MPa which can be satisfied with the demand of body bone. The composite scaffolds have uniform pores compared to those scaffolds obtained by foaming, freeze-drying, etc. The size of pores is about 250 - 350  $\mu\text{m}$ . The suitable concentration of nanocellulose disperses solution to help to form and increase toughness is 3%. The ratio of HA/SF and nanocellulose is 1:2. So HA/SF composite can be a suitable bone repair material. Three-dimensional printing is an ideal process to manufacture bone scaffolds efficiently.

## Keywords

Hydroxyapatite, Silk Fibroin, Bone Repair, 3D Printing

# 丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料的制备及3D打印成型研究

范纯泉<sup>1\*</sup>, 卢玉英<sup>2\*</sup>, 刘 晖<sup>1#</sup>, 丁真奇<sup>1#</sup>, 林 斌<sup>1</sup>, 何丹农<sup>2</sup>

\*共同第一作者。

#共同通讯作者。

<sup>1</sup>联勤保障部队第909医院/厦门大学附属东南医院, 福建 漳州

<sup>2</sup>上海纳旭实业有限公司, 上海

Email: "liuhui0863@sina.com, "dzqi@xmu.edu.cn

收稿日期: 2019年12月13日; 录用日期: 2019年12月26日; 发布日期: 2020年1月2日

## 摘要

针对单一羟基磷灰石制成的骨件易碎、强度差等问题, 采用共沉淀法用桑蚕丝和无机盐制备了丝素蛋白(SF)与纳米羟基磷灰石(HA)的复合材料。采用扫描电镜(SEM)、傅立叶红外光谱、X射线衍射(XRD)对复合材料的结构进行表征。采用3D打印的方式将复合材料打印成型, 并进行了抗压强度测试。结果表明: 此方法得到的HA/SF复合材料粒径约为20~50 nm, 长度约为80~120 nm, 具有一定的长轴取向性, 丝素蛋白与羟基磷灰石复合弱化了羟基磷灰石的结晶状态。骨修复材料的成型可以通过3D打印来实现, 成型后其抗压强度可达到52 MPa, 可以满足人体骨的强度要求。

## 关键词

羟基磷灰石, 丝素蛋白, 骨骼修复, 3D打印

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

骨损伤疾病是较为普遍的临床医学损伤。随着生物医学发展的需要, 促使人们不断地寻找理想的骨修复替代材料。作为一种理想的骨骼修复材料需要具备以下特点: 生物相容性、生物活性、良好的机械性能、生物降解性以及诱导再生性。总之, 修复材料的性能要与自然骨骼相似。目前已知的修复材料, 如: 部分陶瓷材料、金属材料以及高分子材料, 都具有生物相容性, 但只有小部分材料兼具良好的机械强度。与人骨组织最接近的材料是羟基磷灰石(Hydroxyapatite, 简称 HA), 因此它是目前公认的最具潜力的骨组织修复材料。人体骨组织中的羟基磷灰石主要是纳米针状单晶体结构, 沿一定的方位分布在胶原组织中, 而纳米羟基磷灰石与人体骨组织成分相似, 具有良好的生物活性, 所以纳米羟基磷灰石被认为是最具前景的骨组织替代材料[1]。但临床医学研究表明: 运用单一的羟基磷灰石制成的人工骨骼易碎、强度低、韧性差, 限制了它的临床应用和效能发挥。为此研究者采用其他材料与羟基磷灰石进行复合使用, 试图改善或提高单一羟基磷灰石制成的骨骼的机械性能。为了满足骨材料所需的力学性能, 生物活性和体内降解等方面的性能, 采用不同材料进行复合成为目前骨替代材料研究的热点[2]-[8]。丝素蛋白(silk fibroin, 简称 SF)属线状蛋白质, 具有抗蛋白水解酶, 抗紫外线以及显著的柔韧性。丝素蛋白以其良好的生物相容性、生物降解性以及纯度高、价格低等优点成为生物医药材料中的重要天然材料, 在生物医药材料上有广阔的应用前景, 应用领域主要有: 药物载体、骨骼与软骨组织修复材料、神经与血管移植等[9] [10] [11]。丝素蛋白与羟基磷灰石的复合支架已有研究, 但基本是通过发泡、冷冻干燥等方法制得, 该复合支架存在结构单一, 孔径不均匀等技术问题[12] [13]。纳米纤维素是完全源于生物质, 并能完全生物降解的高分子材料, 它具有高强度, 无毒, 可再生等特点, 在制备高性能纳米复合材料中前景广

阔。因此,本实验将 HA/SF 材料与纳米纤维素再次复合,进一步提高机械强度。

3D 打印是一种快速成型技术,它是一种以数字模型文件为基础,运用粉末状可粘合材料,通过逐层打印的方式来构造物体的技术。通过 3D 打印技术的分层制造,逐层叠加的原理[14],可以对骨支架的孔隙大小进行调整,亦可以实现复杂形状的成型,为骨支架提供了简单、高效的成型途径[15][16][17][18]。同时应用 3D 打印制备的生物支架,能够满足生物相容性、生物活性、力学性能等要求,其高孔隙率的三维立体结构更适合种子细胞增值、分化及诱导成骨修复缺损,具有巨大的应用价值。在此研究中,制备出 HA/SF 纳米复合纤维后,采用 3D 打印技术将复合纤维打印成型,希望通过 3D 打印技术获得易成型的可定制化的骨修复材料。

## 2. 实验部分

### 2.1. 试剂与仪器

蚕茧(网上购买),碳酸钠、氯化钙、磷酸氢二铵、氨水(均为分析纯,购买自探索平台),纳米纤维素。

S-4800 场发射扫描电镜(SEM,日立公司,加速电压 0.5~30 KV)、D/max-2600PC 型 X 射线粉末衍射仪(XRD,理学公司,加速电压 45 KV,2 $\theta$  扫描范围:5~125 $^{\circ}$ )、Nicolet 6700 型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR,美国赛默飞世尔科技公司,4000~400  $\text{cm}^{-1}$ ,分辨率 4  $\text{cm}^{-1}$ )、CMT-10 万能材料试验机。

### 2.2. 实验过程

#### 2.2.1. 纳米 HA/SF 复合材料制备

去除蚕蛹的家蚕茧清洗后,放置于浓度为 1%的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液中煮沸 30 分钟,脱去丝胶蛋白,然后用 70 $^{\circ}\text{C}$  蒸馏水清洗干净,50 $^{\circ}\text{C}$  下烘干,获得丝素纤维。将丝素丝溶解在摩尔比为 1:2:8 的  $\text{CaCl}_2\cdot\text{C}_2\text{H}_6\text{O}:\text{H}_2\text{O}$  的三元溶液中,75 $^{\circ}\text{C}$  下电磁搅拌 30 分钟,即得到丝素蛋白混合溶液。取磷酸氢二铵配置 500 毫升溶液,其中,磷酸氢二铵中的 P 与氯化钙中的 Ca 的摩尔比为 6:10,水温 75 $^{\circ}\text{C}$ ,电磁搅拌 30 分钟,然后将其均匀的倒入丝素蛋白溶液中,并不停地加入氨水调节 PH 值到 10,反应完毕后将其室温放置,生物矿化 24 小时,然后将其过滤,用去离子水清洗多次后,将沉淀物放置在 50 $^{\circ}\text{C}$  下干燥,获得丝素蛋白纳米羟基磷灰石复合材料 HA/SF,其中纳米羟基磷灰石含量为 70%。

#### 2.2.2. 纳米 HA/SF 复合骨支架 3D 打印

将 HA/SF 粉末与纳米纤维素分散液混合,混合质量比为 1:2,纳米纤维素的浓度分别为 1%和 3%。使用计算机 CAD 设计模型,保存为 STL 格式,然后导入 3D 打印机中,将待打印溶液倒入打印机料筒中进行打印,打印温度为-20 $^{\circ}\text{C}$ 。打印成型后,冷冻干燥。骨支架打印成 10 mm  $\times$  10 mm  $\times$  5 mm,每组三个样品,进行抗压强度测试。

#### 2.2.3. 材料的表征

用日立 S-4800 场发射扫描电镜观察 HA/SF 粉体形貌特征。采用理学 D/max-2600PCX 射线衍射仪(XRD)分析 HA/SF 和 HA 粉体晶体物相结构。采用 Nicolet 6700 型傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR)分析 SF, HA 和 HA/SF 的有机相官能团,以研究丝素蛋白对羟基磷灰石相结构的影响。采用万能材料试验机进行抗压强度测试。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. 形貌分析

图 1(a)是 HA 材料的扫描电镜照片,图中所示纯 HA 材料为无序不规则结构,粒径约为 20~100 nm,

长度约为 50~150 nm。图 1(b)是 HA/SF 复合材料粉体扫描电镜照片, 矿化后的 HA/SF 颗粒呈现为细长纺锤形, 具有一定的长轴取向性, 颗粒大小分布更加均匀, 粒径约为 20~50 nm, 长度约为 80~120 nm。SF 溶解在  $\text{CaCl}_2$  溶液中, 由于  $\text{Ca}^{2+}$  离子的作用, 丝状链的构象发生变化, 从无规线团转变为反平行  $\beta$  折叠, 这样就使更多的 OH-、COO-等亲水基团露出来, 在矿化过程中 SF 不断地凝聚成微纤维束, HA 晶体与微纤维上露出来的亲水性基团结合, 并以 SF 微纤维为核生长[19] [20]。

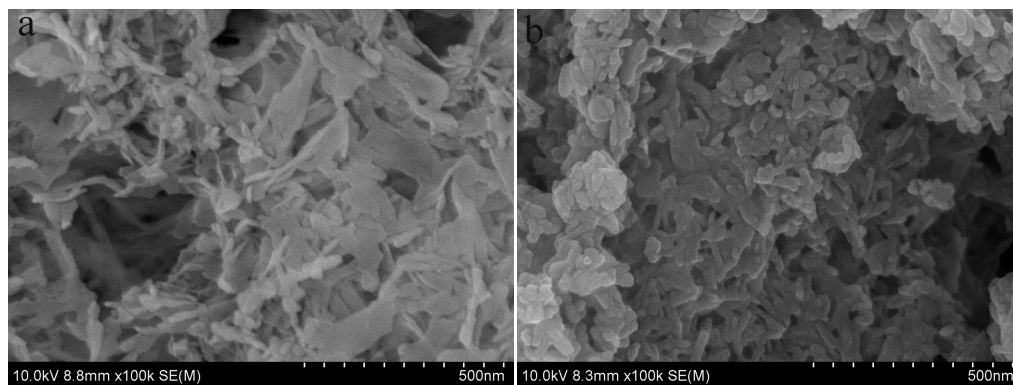


Figure 1. SEM images of HA (a) and HA/SF (b)

图 1. HA (a)和 HA/SF(b)的扫描电镜形貌

图 2 为 HA (a)和 HA/SF (b)的扫描电镜 EDS 能谱图, 表 1 为 HA (a)和 HA/SF (b)的能谱成份分析。可以看出, 两种粉体中主要为羟基磷灰石, a 粉体中含有少量的碳酸钙和极少量的氯化钙, b 粉体中除了以上成份外, 增加了丝素蛋白的成份, 两者比较, b 粉体中钙和磷元素占有比例都有所减少, 这是由于丝素蛋白的加入, 丝素蛋白中还含有 N 元素, 由于含量较少, 且气相原子较小, 因此并不能标记出来, 需要配合其他测试分析。

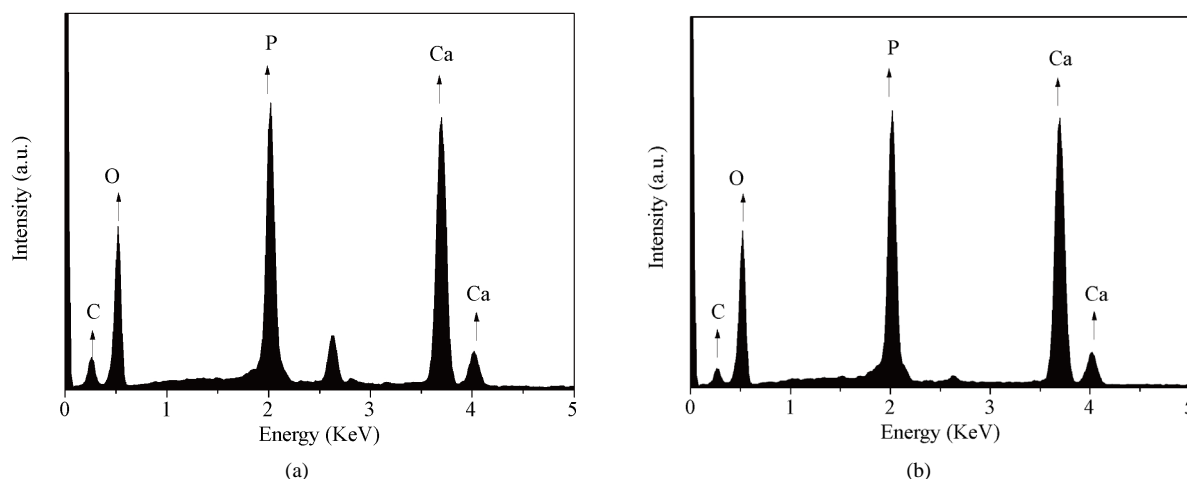


Figure 2. EDS of HA (a) and HA/SF (b)

图 2. HA (a)和 HA/SF (b)的扫描电镜能谱分析

### 3.2. 傅里叶红外光谱分析

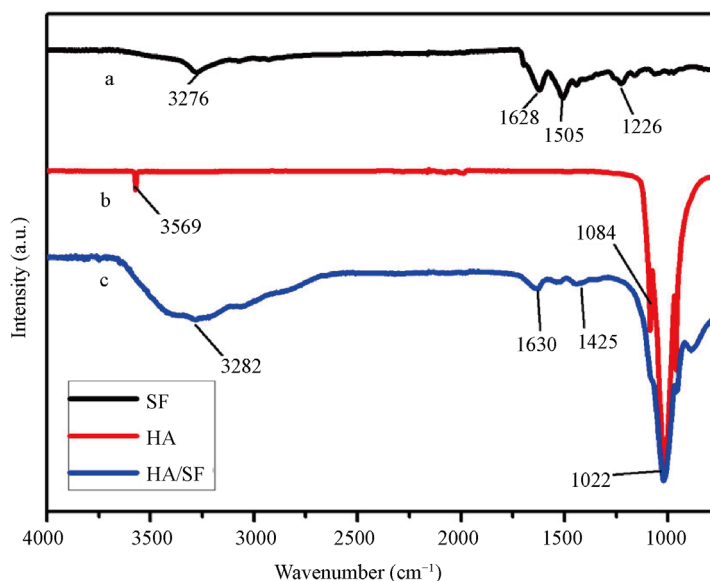
图 3 是丝素蛋白, 羟基磷灰石以及 HA/SF 复合材料的红外光谱。3650~3100  $\text{cm}^{-1}$  是 OH<sup>-</sup> 的特征频率区, 图中 a、b、c 谱线在此区域均有吸收峰, 频率大概为 3280  $\text{cm}^{-1}$ 。图中 a 谱线 1628  $\text{cm}^{-1}$  和 c 谱线 1630

$\text{cm}^{-1}$  处为叔酰胺  $\text{C}=\text{O}$  官能团的特征峰,  $\text{Ca}^{2+}$  与 SF 间的静电和共价作用形成叔酰胺, 而且两者之间发生了一定的螯合作用, 使叔酰胺的特征谱向高波数方向发生了偏移[21]。

**Table 1.** Composition percentage of HA and HA/SF

**表 1.** HA 和 HA/SF 元素含量对比

元素	HA		HA/SF	
	重量百分比	原子百分比	重量百分比	原子百分比
C	5.06	9.17	7.92	13.94
O	44.55	60.58	43.84	57.93
P	18.19	12.78	17.33	11.83
Ca	32.21	17.48	30.92	16.31
总量	100.00	100.00	100.00	100.00



**Figure 3.** FT-IR images of SF (a), HA (b) and HA/SF (c)

**图 3.** 样品的傅里叶红外光谱分析

### 3.3. X 射线衍射

图 4 中羟基磷灰石的衍射峰主要为  $25.9^\circ$  (002)、 $31.9^\circ$  (211)、 $40.2^\circ$  (310)、 $46.5^\circ$  (222)、 $49.2^\circ$  (213)、 $52.4^\circ$  (004) 和  $64.4^\circ$  (304)。HA/SF 的衍射峰与羟基磷灰石的特征峰基本一致, 但是峰形却明显比前者宽且杂, 尤其是  $25.9^\circ$  和  $31.9^\circ$  附近, 这说明 HA/SF 中 HA 呈弱结晶状态。这主要是由于丝素蛋白与羟基磷灰石复合而弱化了羟基磷灰石的结晶状态。

### 3.4. 3D 打印成型

图 5 为 3D 打印的 HA/SF 复合材料支架的扫描电镜照片。复合支架孔径大小较为均一, 尺寸约为  $250\sim 350\ \mu\text{m}$ , 研究表明,  $150\sim 500\ \mu\text{m}$  的孔隙可以诱导矿化骨的形成[22]。与传统的冷冻干燥法及化学交联法相比, 3D 打印技术可以轻松实现快速打印成型, 孔隙率可调控, 尤其是在制造结构复杂的骨支架时, 更显示出其高度的可操作性。

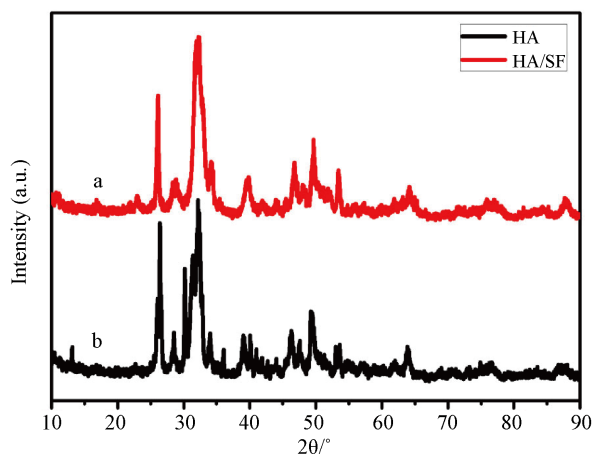


Figure 4. XRD images of HA (a) and HA/SF (b)

图 4. HA (a) 和 HA/SF (b) 的 XRD 图谱

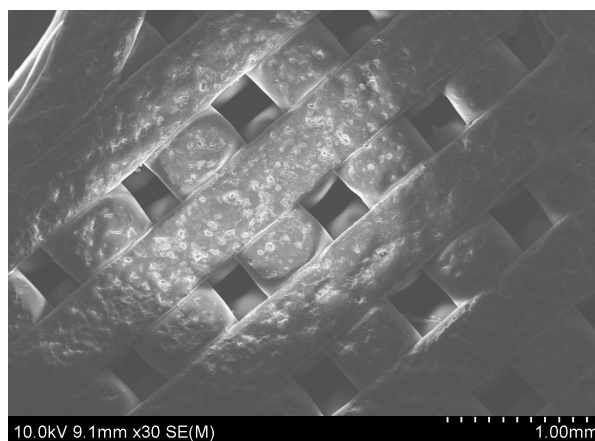


Figure 5. 3D printed composite scaffold

图 5. 3D 打印复合材料支架的扫描电镜图

### 3.5. HA/SF 复合材料的抗压强度

用万能材料试验机对 3D 打印成型的样品进行抗压强度测试。纳米纤维素浓度为 1% 时，抗压强度为 39 MPa，纳米纤维素浓度为 3% 时，抗压强度为 52 MPa。由于纳米纤维素具有更高的机械强度和较高的杨氏模量，所以纳米纤维素的加入量越高，HA/SF 支架的强度提高越明显。另一方面因为 SF 的反平行  $\beta$  折叠结构更加稳定，相较无规线团的 SF 有更好的力学性能，这就使脆性的 HA 力学性能得到补偿，能得到更高的抗压强度[23] [24]一般认为，抗压强度高于 10 MPa 时即可符合人体骨抗压强度的需求[25]。因此，本研究采用 3D 打印技术制备的 HA/SF 材料有望用于骨修复材料。

## 4. 结论

本研究采用共沉淀法制备出粒径为 20~50 nm 的纳米级的 HA/SF 复合材料，其中 SF 主要以反平行  $\beta$  折叠结构存在，使复合材料具有更好的力学性能。HA/SF 中 HA 呈弱结晶状态。这主要是由于丝素蛋白与羟基磷灰石复合而弱化了羟基磷灰石的结晶状态。3D 打印技术可以打印出孔径大小较为均一的骨支架，孔径约为 250~350  $\mu\text{m}$ ，其抗压强度可达到 52 MPa，孔径大小及力学性能均达到人体骨所需的要求，因此，本研究采用 3D 打印技术制备的 HA/SF 材料有望用于骨组织支架材料。

## 基金项目

军队医学科技青年培育计划(15QNP022); 南京军区医学科技创新课题(15MS107); 上海市闵行区中小企业技术创新计划(2017MH078)。

## 参考文献

- [1] Lang, H., Mertens, T. and Gerlack, K.L. (1989) Re Implantation Homologous Cultured Osteoblast for Improvement of Bone Regeneration. An Animal Study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 18, 244-248. [https://doi.org/10.1016/S0901-5027\(89\)80064-5](https://doi.org/10.1016/S0901-5027(89)80064-5)
- [2] Wang, Q.T., Zhang, Y.M., Hu, N.S., et al. (2004) Microstructure Analysis of Fractured Ti Alloy Implant. *Rare Metal Materials and Engineering*, 33, 442-444.
- [3] Wen, C.E., Mabuchi, M., Yamada, Y., et al. (2001) Processing of Bio-Compatible Porous Ti and Mg. *Scripta Materialia*, 45, 1147-1153. [https://doi.org/10.1016/S1359-6462\(01\)01132-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6462(01)01132-0)
- [4] 陈斌, 彭向和, 范镜泓. 生物自然复合材料的结构特征及仿生复合材料的研究[J]. 复合材料学报, 2000, 17(3): 59-62.
- [5] Kikuchi, M., Matsumoto, H.N., Yamada, T., et al. (2004) Glutaraldehyde Cross-Linked Hydroxyapatite/Collagen Self-Organized Nanocomposites. *Biomaterials*, 25, 63-69. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00472-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00472-1)
- [6] Yasunaga, T., Matsusue, Y., Shikinami, Y., et al. (2015) Bonding Behavior of Ultrahigh Strength Unsintered Hydroxyapatite Particles/Poly(L-lactide) Composites to Surface of Tibial Cortex in Rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research*, 47, 412-419. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19991205\)47:3<412::AID-JBM17>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19991205)47:3<412::AID-JBM17>3.0.CO;2-B)
- [7] Thein-Han, W.W. and Misra, R.D. (2009) Biomimetic Chitosan-Nanohydroxyapatite Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Acta Biomaterialia*, 5, 1182-1197. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.11.025>
- [8] Gil, E.S., Frankowski, D.J., Hudson, S.M., et al. (2007) Multiporous Silk Fibroin Membranes from Solvent-Crystallized Silk Fibroin/Gelatin Blends: Effects of Blend and Solvent Composition. *Materials Science and Engineering: C*, 27, 426-431. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.017>
- [9] Kundua, B., Rajkhowa, R., Kundu, S.C., et al. (2013) Silk Fibroin Biomaterials for Tissue Regenerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 457-470. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.043>
- [10] Pooyan, P., Tannenbaum, R. and Garmestani, H. (2012) Mechanical Behavior of a Cellulose-Reinforced Scaffold in Vascular Tissue Engineering, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 7, 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.09.009>
- [11] Kim, U.J., Park, J., Li, C., Jin, H.J., et al. (2004) Structure and Properties of Silk Hydrogels. *Biomacromolecules*, 5, 786-792. <https://doi.org/10.1021/bm0345460>
- [12] Yunoki, S., Ikoma, T., Monkawa, A., et al. (2006) Control of Pore Structure and Mechanical Property in Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials Letters*, 60, 999-1002. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2005.10.064>
- [13] Wahl, D.A., Sachlos, E., Liu, C., et al. (2007) Controlling the Processing of Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 201-209. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0682-9>
- [14] 贺超良, 汤朝晖, 田华雨, 等. 3D 打印技术制备生物医用高分子材料的研究进展[J]. 高分子学报, 2013, 52(6): 722-732.
- [15] Leong, K.F., Cheah, C.M. and Chua, C.K. (2003) Solid Freeform Fabrication of Three-Dimensional Scaffolds for Engineering Replacement Tissues and Organs. *Biomaterials*, 24, 2363-2378. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00030-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00030-9)
- [16] Kim, U.-J., Park, J., Kim, H.J., et al. (2005) Three-Dimensional Aqueous-Derived Biomaterial Scaffolds from Silk Fibroin. *Biomaterials*, 26, 2775-2785. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.044>
- [17] Wang, Y.Z., Rudym, D.D., Walsh, A., et al. (2008) In Vivo Degradation of Three-Dimensional Silk Fibroin Scaffolds. *Biomaterials*, 29, 3415-3428. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.05.002>
- [18] Jones, J.R., Ahir, S. and Hench, L.L. (2004) Large-Scale Production of 3D Bioactive Glass Macroporous Scaffolds for Tissue Engineering. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 29, 179-188. <https://doi.org/10.1023/B:JSST.0000023848.96123.8e>
- [19] 姚菊明, 魏克民, 励丽, 等. 桑蚕丝素蛋白初始结构对其矿化作用的影响[J]. 化学学报, 2007, 65(7): 635-639.
- [20] Ping, Z., Xun, X., Knight, D.P., et al. (2004) Effects of PH and Calcium Ions on the Conformational Transitions in Silk

Fibroin Using 2D Roman Correlation Spectroscopy and C-13 Solid-State NMR. *Biochemistry*, **43**, 11302-11311.  
<https://doi.org/10.1021/bi049344j>

- [21] 陆旋, 朱正华. 家蚕丝素蛋白铜元素螯合物的制备及其对动物生理影响研究[J]. 蚕桑通报, 2005, 36(3): 16-20.
- [22] 江捍平, 王大平, 阮建明, 等. 纳米羟基磷灰石人工骨的毒性与细胞相容性实验研究[J]. 中国医学工程, 2005, 10(5): 458-461.
- [23] 霍波, 翟勇, 崔福斋. 蚕丝中蛋白构象含量与其力学性质间的关系[J]. 高分子学报, 2002, 3(3): 261-264.
- [24] 王佳倍, 胡建恩, 白雪芳, 等. 蚕丝素蛋白及其应用[J]. 精细与专用化学品, 2004, 12(12): 13-18.
- [25] 肖斌, 周大利, 杨为中, 等. 磷灰石-硅灰石/ $\beta$  磷酸三钙复合多孔材支架材料的制备和表征[J]. 无机材料学报, 2006, 21(2): 427-432.