



氧化锆@生物活性玻璃/碳纳米纤维复合膜的制备及其性能

康 静^a, 骆菁菁^b, 熊 杰^b

(浙江理工大学, a.材料科学与工程学院; b.纺织科学与工程学院, 杭州 310018)

摘 要: 将静电纺丝技术与热处理工艺相结合, 制备了柔性氧化锆@生物活性玻璃/碳纳米纤维($ZrO_2@BG/CNFs$)复合膜, 并对复合膜的结构和性能进行了系统表征。结果表明: 随着碳化保温时间的延长, $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜表面的 BG 粒子先增大后变小, BG 主要以 $\beta-CaSiO_3$ 和 $Ca_3(Si_3O_9)$ 的形式存在, ZrO_2 纳米粒子的主要结晶相为四方晶相($T-ZrO_2$); 通过添加 ZrO_2 纳米粒子, $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜表现出柔性可弯曲性能。通过体外培养小鼠前成骨细胞(MC3T3-E1)实验, 发现 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜上细胞生长、增殖良好。文章制备得到了既有良好的生物相容性又有一定柔韧性和可塑性的 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜, 解决了 CNFs 的脆性问题, 进一步拓展了以 BG/CNFs 为基础的纳米纤维复合材料在骨组织工程领域中的应用。

关键词: 生物活性玻璃; 碳纳米纤维; 氧化锆; 静电纺丝; 骨组织工程

中图分类号: TB332

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2020)05-0609-09

Preparation and properties of zirconia@bioactive glass/carbon nanofiber membranes

KANG Jing^a, LUO Jingjing^b, XIONG Jie^b

(a. School of Materials Science and Engineering; b. College of Textile Science and Engineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The combination of electrospinning technology and high temperature treatment process were used to prepare flexible zirconia@bioactive glass/carbon nanofiber membranes ($ZrO_2@BG/CNFs$). The structure and performance of the nanofiber membranes were systematically characterized. The results showed that with the increase of carbonization holding time, the BG particles on the surface of $ZrO_2@BG/CNFs$ membranes first increased and then decreased. BG mainly existed in the form of $\beta-CaSiO_3$ and $Ca_3(Si_3O_9)$, and the main phase of ZrO_2 was tetragonal phase ($T-ZrO_2$). By adding ZrO_2 nanoparticles, $ZrO_2@BG/CNFs$ membranes exhibited flexible and bendable properties. *In vitro* culture of mouse preosteoblast MC3T3-E1 cells showed that the cells grew and proliferated well on $ZrO_2@BG/CNFs$ membranes. $ZrO_2@BG/CNFs$ membranes with good flexibility, plasticity, and biocompatibility were successfully prepared to solve the brittleness problem of CNFs and will further expand the application of BG/CNFs nanofiber composites in the field of bone tissue engineering.

Key words: bioactive glass; carbon nanofibers; zirconia; electrospinning; bone tissue engineering

收稿日期: 2020-02-10 网络出版日期: 2020-04-02

作者简介: 康 静(1994-), 女, 陕西宝鸡人, 硕士研究生, 主要从事生物复合材料方面的研究。

通信作者: 熊 杰, E-mail: jxiong@zstu.edu.cn

0 引言

生物活性玻璃(Bioactive glass, BG)作为重要的无机医用材料,具有良好的骨结合能力、生物相容性和骨传导性,成为骨组织工程修复材料的研究热点^[1-3]。碳纳米纤维(Carbon nanofibers, CNFs)因具有亚微米和纳米级的直径,显示出优异的机械性能、高比表面积、优良电化学性能和良好生物相容性等特点,其弹性模量与骨骼十分接近^[4],常作为增强材料应用于骨组织工程^[5]。通过静电纺丝技术制备的BG/CNFs复合膜具有三维纳米网络结构,具有一定的孔隙率和力学强度,可以很好模拟细胞外基质的组成结构^[6-7]。但是由于CNFs本征柔韧性差,因而BG/CNFs复合膜脆性大,不容易加工,在一定程度上限制了其在骨缺损治疗领域的应用。因此,实现BG/CNFs复合膜的柔性化具有重要的研究意义。

二氧化锆(ZrO_2)是一种生物惰性陶瓷,具有良好的生物相容性、骨传导性、力学性能等优点,是生物医学领域广泛应用的修复材料^[8]。早在1969年, Lerouge等^[9]就报道了 ZrO_2 陶瓷在全髋关节置换术中的应用。与氧化铝陶瓷(Al_2O_3)相比, ZrO_2 拥有更高的断裂韧性^[10],在口腔陶瓷修复^[11]与人工关节置换术^[12]中有广泛的应用。Josset等^[13]利用粘附的 ZrO_2 支架体外培养人成骨细胞,结果表明, ZrO_2 对成骨细胞无诱变或致癌作用,并可以促进细胞外基质生成,具有良好生物相容性。朱瑞乔等^[14]制备了 ZrO_2 纳米多孔支架,体外实验结果表明,犬骨髓间充质干细胞(BMSCs)在支架上粘附和生长良好, ZrO_2 纳米多孔支架能诱导成骨细胞分化,在植入犬下颌骨缺损部位12周后发现缺损部位有新骨形成,表明 ZrO_2 纳米多孔支架具有一定的成骨能力。Scarano等^[15]在兔胫骨中植入 ZrO_2 陶瓷,4周后组织学观察发现缺损部位生长的大量新生骨与 ZrO_2 表面紧密接触,接触率达 $68.4\% \pm 2.4\%$,且界面之间无纤维组织、炎症细胞或多核细胞,研究证实 ZrO_2 具有高度的生物相容性和骨传导性。

本文采用静电纺丝技术与热处理工艺相结合,通过掺杂 ZrO_2 纳米粒子增加复合纳米纤维膜的柔韧性,开发一种高柔性 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜,对其表面形貌、化学组成、结晶性、柔韧性、生物相容性等表征,测试分析 ZrO_2 掺杂对复合纳米纤维膜形貌和结构的影响,并通过体外小鼠前成骨细胞(MC3T3-E1)培养实验评估 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜的生物相容性。

1 实验部分

1.1 实验原料与试剂

正硅酸乙酯(TEOS,化学纯,杭州高晶精细化工有限公司);磷酸三乙酯(TEP,化学纯,麦克林试剂有限公司);四水合硝酸钙($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$,化学纯,杭州高晶精细化工有限公司);浓硝酸(HNO_3 ,浓度37.0%,化学纯,上海凌峰化学试剂有限公司);冰乙酸(CH_3COOH ,化学纯,杭州高晶精细化工有限公司);正丙醇锆($Zr(C_3H_7O)_4$,75 wt%,麦克林试剂有限公司);无水乙醇(EtOH,化学纯,天津市科密欧化学试剂);聚丙烯腈(PAN,化学纯, $M_w=1.4 \times 10^5$,杭州湾腈纶有限公司);聚甲基丙烯酸甲酯(PVP,化学纯, $M_w=1.3 \times 10^6$,阿拉丁试剂上海有限公司);N,N-二甲基甲酰胺(DMF,化学纯,杭州高晶精细化工有限公司);去离子水(实验室自制);牛血清培养液(FBS,细胞培养级,Biowest公司); α -MEM培养基(细胞培养级,赛默飞世尔有限公司);磷酸缓冲盐溶液(PBS,实验室自制);小鼠前成骨细胞株(MC3T3-E1,实验室保存)。

1.2 实验方法

1.2.1 纺丝液的配制

首先将1.20 g PAN和1.20 g PVP溶解于20.00 mL的DMF溶液中,在25℃条件下搅拌过夜制备澄清透明溶液。58S生物活性玻璃(SiO_2 (58 mol%)- CaO (33 mol%)- P_2O_5 (9 mol%))制备参考Zhang等^[16]的方法,提前配置水解TEP溶液,按照摩尔比 $M(TEP):M(H_2O):M(EtOH)=1:3:3$ 的比例将反应物加入试剂瓶中,通过调节pH值使得 $pH < 2$,以促进TEP水解,封口置于80℃油浴中,搅拌24 h后得到磷酸混合液。根据58S生物活性玻璃的硅、磷、钙摩尔比,取0.65 mL TEOS、水解后0.16 mL TEP、0.42 g $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$,依次加入到配制好的纺丝液中,常温下磁力搅拌3 d。根据本课题组对 $ZrO_2/CNFs$ 复合膜的研究^[17],将0.50 mL冰乙酸与2.00 mL $Zr(C_3H_7O)_4$ 分别加入纺丝液中,继续搅拌过夜得到淡黄色透明前驱体纺丝液。

1.2.2 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜的制备

将纺丝液倒入10.00 mL无菌注射器中,针头接通高压电源,设置流速为0.40 mL/h,电压为15 kV,纺丝距离为15 cm,控制纺丝环境温度(25℃)和湿度(25.0%),结束纺丝后,获得的 $Zr(C_3H_7O)_4@BG/PAN&PVP$ 纳米纤维膜放于80℃真空干燥箱

干燥 24 h。最后,将前驱体纤维膜放入高温管式炉中,在空气中以 $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温至 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$,预氧化 2 h,再在 N_2 气氛中 $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$,分别碳化 1、2、3 h 以获得柔性 $\text{ZrO}_2\text{@BG}/\text{CNFs}$ 复合膜,以同样参数制备 BG 纳米粒子,以及 $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ 碳化 2 h 获得 CNFs、 ZrO_2/CNFs 复合膜、BG/CNFs 复合膜。

1.2.3 细胞培养

为了考察 BG/CNFs 复合膜和 $\text{ZrO}_2\text{@BG}/\text{CNFs}$ 复合膜生物学性能,将纳米纤维膜剪成 6 mm 的圆片,置于 96 孔板中,用 70.0% 乙醇浸泡 4 h,无菌 PBS 冲洗 3 次,每次 30 min,在牛血清细胞培养液(FBS)、改良型 $\alpha\text{-MEM}$ 培养基浸泡过夜。笔者将小鼠前成骨细胞(MC3T3-E1) $100\text{ }\mu\text{L}$ 细胞悬液(每毫升 5×10^3 个细胞)接种在 BG/CNFs 复合膜和 $\text{ZrO}_2\text{@BG}/\text{CNFs}$ 复合膜上,最后将接种好细胞的纳米纤维膜在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5.0% CO_2 的细胞培养箱中连续培养 2、7 d,每 3 d 换 1 次培养液。

1.3 测试与表征

1.3.1 $\text{ZrO}_2\text{@BG}/\text{CNFs}$ 复合膜的性能测试

采用热重分析仪(TGA)对制备的前驱体纳米纤维膜进行热分析,称量 0.70 g 的待测样品在 N_2 气氛中从室温升温至 $800\text{ }^{\circ}\text{C}$,升温速率为 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$;通过场发射扫描电子显微镜(FE-SEM)观察 CNFs、BG/CNFs 复合膜、 ZrO_2/CNFs 复合膜和 $\text{ZrO}_2\text{@BG}/\text{CNFs}$ 复合膜上纳米粒子的形貌,将不同条件下制备的样品裁剪合适大小,贴于样品台并对样品表面喷金 50 s,最后设置加速电压为 3 kV,观察样品的表面形貌;采用 X 射线能谱分析(EDS, Mapping)检测试样所选区域的元素组成和分布情况,将电压调整为 10 kV,在样品上选取一根纤维,分析样品元素组成,获得样品能谱图;利用高分辨率透射电子显微镜(HR-TEM)观测 $\text{ZrO}_2\text{@BG}/\text{CNFs}$ 复合膜中 ZrO_2 和 BG 纳米粒子的结构形貌,将复合纳米纤维膜剪碎后置于玛瑙研钵中研磨 5~10 min,分散在 EtOH 中超声处理 10 min,最后用毛细管吸取适量溶液滴在铜网上,在红外灯下烘干 30 min;通过 X 射线衍射仪(XRD)分析样品的结晶状况,并对 CNFs、 $\text{ZrO}_2\text{@BG}/\text{CNFs}$ 复合膜、 ZrO_2 纳米粒子、BG 纳米粒子进行元素分析测试,测试时所选放射源为 Cu 靶 $\text{K}\alpha$ 射线,管电压为 40 kV,管电流为 40 mA,扫描范围为 $2\theta=10.0^{\circ}\sim 80.0^{\circ}$,扫描速度 $3^{\circ}/\text{min}$;通过 X 射线光电子能谱仪(XPS)分析 $\text{ZrO}_2\text{@BG}/\text{CNFs}$ 复合膜表面 ZrO_2 纳米粒子、BG

纳米粒子的价键和化学组成。通过傅里叶红外测试(FTIR)表征纳米纤维膜的化学性质,选用 KBr 压片法,设定光谱范围为 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 。

1.3.2 $\text{ZrO}_2\text{@BG}/\text{CNFs}$ 复合膜体外细胞形貌表征

细胞培养 2 d 和 7 d 后,吸除培养液,用 PBS 轻冲洗 3 次,去除未附着的细胞,随后用浓度为 2.5% 戊二醛固定细胞,用不同浓度酒精(50.0%、70.0%、80.0%、85.0%、90.0%、95.0%、100.0%)脱水处理,冷冻干燥后喷金处理,得到用于观察的电镜样品。

2 结果与讨论

2.1 前驱体复合纳米纤维膜 TGA 分析

图 1 为前驱体 CNFs、BG/CNFs 和 $\text{ZrO}_2\text{@BG}/\text{CNFs}$ 复合膜在 N_2 氛围中的 TGA 曲线,从中可以看出,不同前驱体纤维膜热重曲线非常相像,这是由于材料的热稳定性与其组成有关,三种前驱体纳米纤维膜的主要成分均是 PAN&PVP 聚合物,因而他们的稳定性基本相同,热重曲线相似,均显示出两个主要失重阶段。第一阶段主要在 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之前,所有样品约有 10.0% 的失重,前驱体纳米纤维膜在固化过程中表面残余的溶剂、吸附的少量水等,受热挥发或分解造成失重。第二阶段是 $300\sim 450\text{ }^{\circ}\text{C}$,BG/CNFs 复合膜中的 BG 组分在 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时出现较大的失重,此时 BG 前驱体中烷氧基($-\text{OR}$)氧化、 $-\text{OH}$ 脱除, $\text{Zr}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_4$ 受热分解出丙烯、水、 ZrO_2 等造成损失,与此同时 PAN、PVP 高分子热解、交联、环化,纳米纤维中有更多的 H、N、O 元素脱除,有明显的失重。随着温度逐渐升高,BG 前驱体缩聚, NO_3^- 分解直至 $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后趋于稳定,复合纳米纤维形成了乱层碳结构。根据最终剩余成分可知, $\text{ZrO}_2\text{@BG}/\text{CNFs}$ 复合膜经过热处理后碳的残余量接近 20.0%,BG 纳米粒子的含量约 15.0%, ZrO_2 纳米粒子的含量约 10.0%,与前驱体纳米纤维膜制备时的投料比一致。

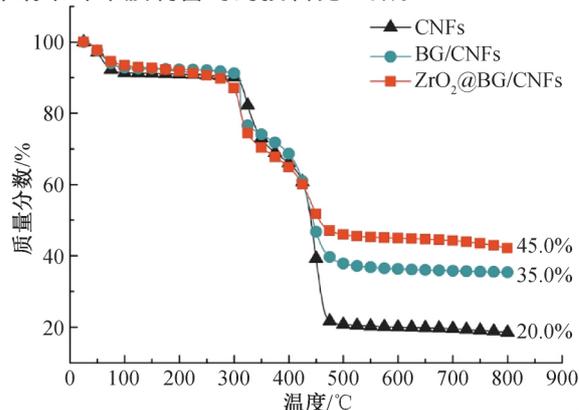


图 1 前驱体纳米纤维膜的 TGA 曲线

2.2 不同碳化保温时间的 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜表面形貌分析

图2是1000 °C条件下碳化1 h(图2(a)), 2 h(图2(b))和3 h(图2(c)), 获得的纳米纤维膜的SEM图。同一碳化温度下, 随着碳化保温时间的增加, 观察到CNFs的直径变化不明显, 纤维上纳米粒子形貌发生了变化。由图2(a)可见1000 °C碳化1 h

时, 纤维表面分布微小颗粒。碳化时间延长至2 h时(图2(b)), 明显观察到纤维表面均匀分布着纳米颗粒。根据课题组前期工作中对 $ZrO_2/CNFs$ 复合膜的研究, 延长碳化温度, 纳米粒子可在热力学推动力作用下由纤维内部迁移到纤维表面^[17]。因此, 随着碳化时间的延长有利于纤维内部熟化的纳米粒子向纤维表面迁移, 使得粒径逐渐变大。

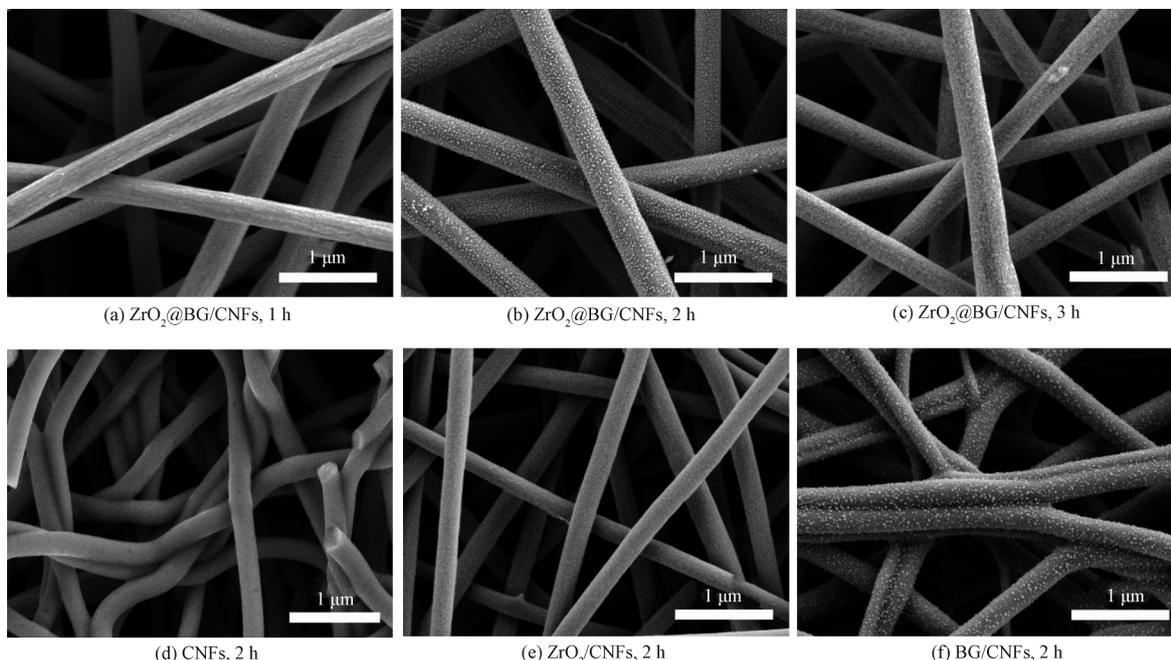


图2 1000 °C碳化不同时间制得的纳米纤维膜 SEM图

当保温时间延长至3 h时(图2(c)), 复合纳米纤维表面出现了更多细小密集的纳米粒子, 而未见凸出的颗粒结构。笔者制备多次样品均发现这一现象, 这是由于纳米粒子在持续的热力学推动力作用下, 粒子生长过快, 而未能观察到小尺寸粒子之间融合脱落的过程, 根据聚集融合理论^[18], 纳米粒子可通过相互融合形成较大颗粒, 容易从纤维表面脱落。作为对比, 在1000 °C碳化保温2 h制备CNFs(图2(d))、 $ZrO_2/CNFs$ 复合膜(图2(e))、BG/CNFs复合膜(图2(f))。从图2中可以看出, 纯CNFs表面光滑, 部分纤维之间有粘结, 而 $ZrO_2/CNFs$ 复合膜粗细均匀, 粘结较少。BG/CNFs复合膜纤维之间存在粘结, 表面均匀分布BG纳米颗粒。由此笔者推测在碳化保温2 h时 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜表面的纳米颗粒为BG。因此, 后续实验设定碳化保温时间为2 h, 以获得纳米粒子均匀分布的 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜。

2.3 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜 EDS 分析

图3为1000 °C条件下碳化2 h获得的 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜的EDS谱图和Mapping谱图。

由图3(a)可知, $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜表面含有C、O、Si、Ca、Zr等元素。根据mapping元素分布图(图3(b))可以看到, 这些元素均匀分布在纳米纤维中。C元素归因于CNFs, Si、Ca、O元素是BG纳米粒子的组成元素, Zr、O元素归因于 ZrO_2 纳米粒子。初步证实 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜中均匀分布着BG纳米粒子和 ZrO_2 纳米粒子。

2.4 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜 TEM 分析

通过TEM表征 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜中 ZrO_2 和BG纳米粒子的结构形貌。 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜TEM图如图4(a)所示, 从图中可以看出 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜表面粗糙, 有许多细小的凹坑, 表面有明显的纳米粒子, 由于制样过程超声对BG与CNFs之间形成的作用力有破坏作用, 造成部分粒子的脱落形成团聚体堆积在复合纳米纤维表面。对 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜表面的纳米粒子进行高分辨分析, 得到的纳米粒子HR-TEM图如图4(b)所示, 从图中可以清晰的看出复合纳米纤维表面存在两种晶面间距的纳米粒子, 其中一种晶格条纹明显, 晶面

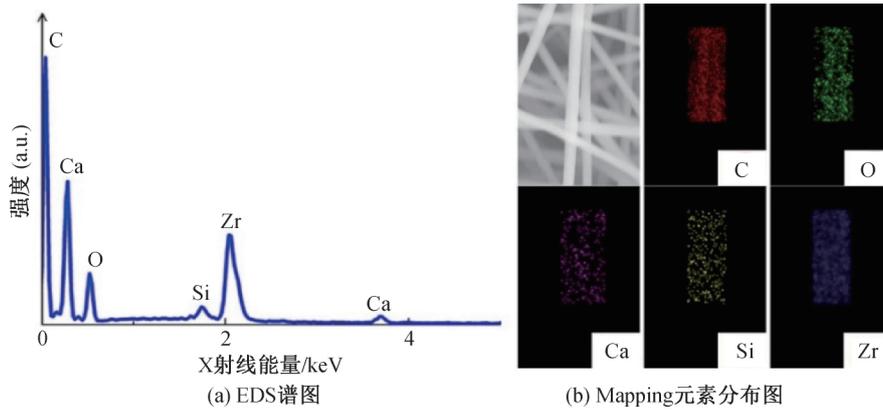


图 3 ZrO₂@BG/CNFs 复合膜的 EDS 谱图及 Mapping 元素分布图

间距为 0.325 nm, 对应的是四方晶系 ZrO₂ 纳米粒子 (T-ZrO₂)^[19], 其中 ZrO₂ 纳米粒子约为 5.000 nm, 另一种较大形态的纳米粒子呈现不完全结晶状态, 模糊的晶格条纹对应的晶面间距为 0.330 nm, 最为符合

硅灰石 (β-CaSiO₃) 的 (102) 晶面^[20]。由此结合 SEM (图 2)、EDS 能谱 (图 3) 和 TEM (图 4) 的结果, 可以初步证明 ZrO₂ 纳米粒子与 BG 纳米粒子在 CNFs 中均匀分布, 纤维表面凸出的较大颗粒是 BG 纳米粒子。

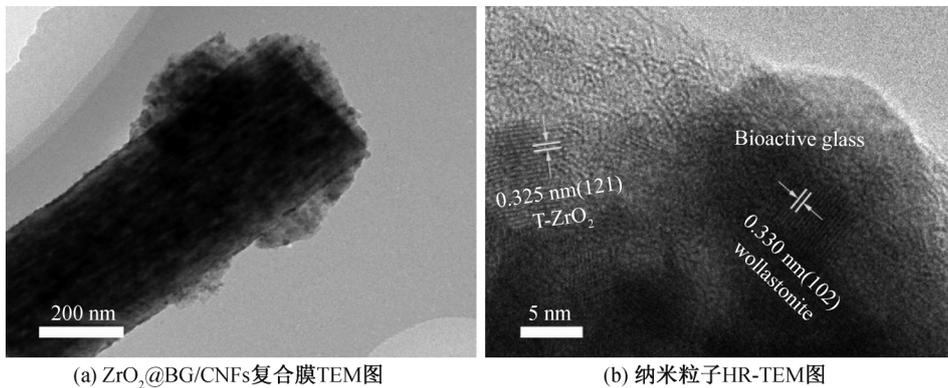


图 4 ZrO₂@BG/CNFs 复合膜的 TEM 图及表面纳米粒子 HR-TEM 图

2.5 ZrO₂@BG/CNFs 复合膜 XRD 分析

通过 XRD 测试分析 ZrO₂@BG/CNFs 复合膜中纳米粒子的结晶性。如图 5(a) 所示, CNFs 中石墨的 (002) 晶面和 (101) 晶面分别在 $2\theta = 24.8^\circ$ 和 $2\theta = 45.0^\circ$ 左右, 显示为两个较弱的衍射峰, 峰形较宽而且低。BG/CNFs 复合膜上 BG 纳米粒子的特征峰被 C 峰屏蔽, 因而只观察到一个宽峰。ZrO₂@BG/CNFs

复合膜在 1000 °C 碳化 2 h 后, 存在 4 个不同晶面 ZrO₂ 纳米颗粒, 分别是 30.4° 的 (111) 晶面、 50.7° 的 (220) 晶面和 60.7° 的 (121) 晶面, 它们均为四方晶相 ZrO₂ 纳米粒子 (T-ZrO₂) (JCPDS 50-1089), 以及衍射峰 $2\theta = 34.2^\circ$ 单斜晶相 ZrO₂ 纳米粒子 (M-ZrO₂) 的 (200) 晶面 (JCPDS 37-1484)^[19], 结果证明, ZrO₂ 纳米粒子被成功加入到 CNFs 基体中。

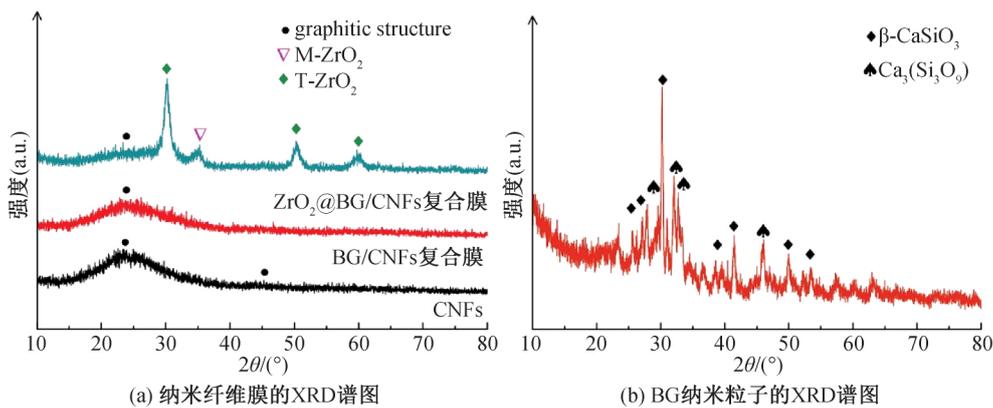


图 5 纳米纤维膜及 BG 纳米粒子的 XRD 谱图

为对比在不受 CNFs 影响时, BG 纳米粒子的结晶情况, 进一步对 BG 进行 XRD 分析。图 5(b) 是在相同参数条件下制备的纯 BG 纳米粒子的 XRD 图。结合图 HR-TEM 结果, 该温度下存在硅灰石的结晶峰^[20], 主要是 $\text{Ca}_3(\text{Si}_3\text{O}_9)$ 和 $\beta\text{-CaSiO}_3$, 26.1° 、 27.4° 、 30.1° 、 31.6° 、 38.6° 、 41.6° 、 50.3° 处的结晶峰对应主相 $\beta\text{-CaSiO}_3$ (JCPDS 42-0547), 以及 29.3° 、 31.9° 、 33.4° 、 46.5° 处的结晶峰的对应用于 $\text{Ca}_3(\text{Si}_3\text{O}_9)$ (JCPDS 74-0874)。由此可以证明制备的 $\text{ZrO}_2@BG/\text{CNFs}$ 复合膜上的纳米粒子为 ZrO_2 和 BG。其中 ZrO_2 纳米粒子存在两种晶型分别是 T- ZrO_2 和 M- ZrO_2 , BG 纳米粒子结晶度不高, 主要结晶相为 $\beta\text{-CaSiO}_3$ 和 $\text{Ca}_3(\text{Si}_3\text{O}_9)$ 。

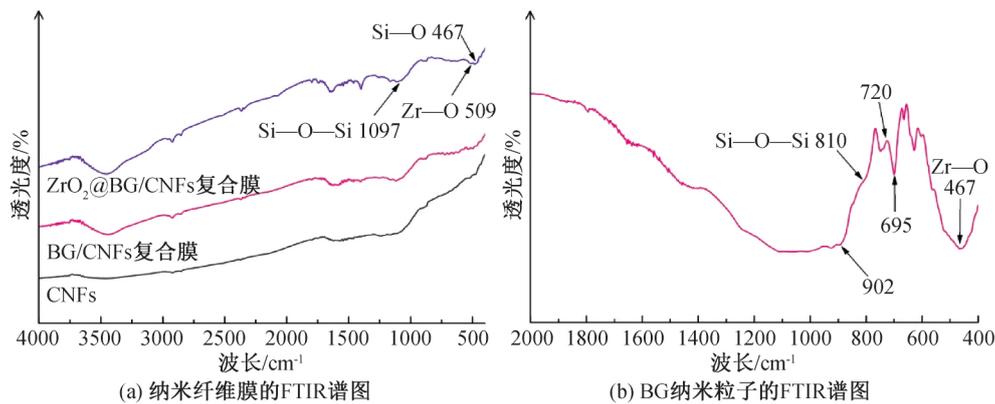


图 6 纳米纤维膜及 BG 纳米粒子的 FTIR 谱图

2.7 $\text{ZrO}_2@BG/\text{CNFs}$ 复合膜 XPS 分析

图 7 是采用 XPS 测试 $\text{ZrO}_2@BG/\text{CNFs}$ 复合膜表面的化学组成和价键结构。图 7(a) 是碳化 2 h 制备的 $\text{ZrO}_2@BG/\text{CNFs}$ 复合膜 XPS 全谱图, 其中 C 1s 为校准参考 (284.8 eV), 从图中可以看出, 复合纳米纤维膜主要元素为 C、O、Ca、Si、Zr。图 7(b) 是 C 1s 的 XPS 光谱, 主要是结合能为 284.5 eV 的 C—C 键。图 7(c) 显示了 Ca 2p 的 XPS 光谱图, 观察到两种轨道分裂峰^[24], 一种是位于 (351.2 ± 0.2) eV 的 Ca 2p_{1/2}, 另一种位于 (347.3 ± 0.2) eV 的 Ca 2p_{3/2}。图 7(d) 中 Si 的结合能为 102.9 eV。图 7(e) 是 Zr 3d 的高分辨率光谱图, Zr 3d 两个主要峰的结合能是 182.5 eV (3d_{5/2}) 和 184.8 eV (3d_{3/2}), 两个峰的自旋轨道分裂值为 2.3 eV, 验证了样品中过渡金属 Zr^{4+} 氧化态的存在^[25]。图 7(f) 显示了 O 1s 的 XPS 光谱, 从中可以清楚的看出 O 1s 主要存在三种结合能, 分别是 530.5、531.7、532.8 eV, 分别对应 ZrO_2 中的 Zr—O 键, $\beta\text{-CaSiO}_3$ 中的 Si—O—Si 键和 Si—O—H 键^[23-24]。综上测试证明了 $\text{ZrO}_2@BG/\text{CNFs}$ 复合

2.6 $\text{ZrO}_2@BG/\text{CNFs}$ 复合膜 FTIR 分析

图 6(a) 是通过 FTIR 表征手段对复合纳米纤维膜进行结构分析。可以看出三种材料在 3460 cm^{-1} 均存在 O—H 吸收峰, 该峰主要是由于吸附水的存在。从图 6(a) 可观察到复合纤维膜中 BG 纳米粒子的特征峰, Si—O 弯曲吸收峰大约是 467 cm^{-1} , Si—O—Si 键的非对称拉伸振动峰为 1097 cm^{-1} 。相对于纯 CNFs, $\text{ZrO}_2@BG/\text{CNFs}$ 复合膜中还存在位于 509 cm^{-1} 处的 Zr—O 拉伸振动峰^[21]。图 6(b) 是单独制备的纯 BG 纳米粒子 FTIR 谱图, 在 902 、 720 、 695 cm^{-1} 特征峰对应 $\beta\text{-CaSiO}_3$, 810 cm^{-1} 的吸收峰是 Si—O—Si 对称拉伸振动^[22-23]。这与 XRD 测试的数据相吻合, 复合膜中存在 ZrO_2 纳米粒子, BG 纳米粒子主要以 $\beta\text{-CaSiO}_3$ 和 $\text{Ca}_3(\text{Si}_3\text{O}_9)$ 的形式存在。

膜中 ZrO_2 和 BG 纳米粒子的存在。

2.8 $\text{ZrO}_2@BG/\text{CNFs}$ 复合膜柔性测试

CNFs 是一种具有高比强度、比模量等优异性能的脆性材料, 因此, 研究纤维的柔性化具有显著的意义。两种复合膜的数码照片如图 8 所示。从图 8(a) 可以明显看出, 对于 BG/CNFs 复合膜施加一个很小的外力, 纳米纤维膜就会发生断裂, 本征柔韧性差的缺点一定程度上限制了其应用范围。而本文制备的 $\text{ZrO}_2@BG/\text{CNFs}$ 复合膜具有优良柔性, 从图 8(b) 可以看到, 复合膜可以进行卷曲, 且不会发生断裂。由图 8(c)—(e) 观察到该复合膜不仅可以被灵活裁剪成特定形状, 还表现出优异的柔性可弯曲性能, 反复弯曲折叠后, 纤维膜仍能恢复为初始状态。

这种柔韧特性的改善主要得益于 ZrO_2 纳米粒子的存在。从 $\text{ZrO}_2@BG/\text{CNFs}$ 复合膜的 SEM、TEM 和 XRD 结果可以看出, ZrO_2 纳米粒子粒径约为 5.000 nm , 具有良好的结晶性。更重要的是, ZrO_2 粒子均匀的分布在 CNFs 中, 可以对 CNFs 载体产生良好的钉扎作用。这种 ZrO_2 纳米粒子的嵌

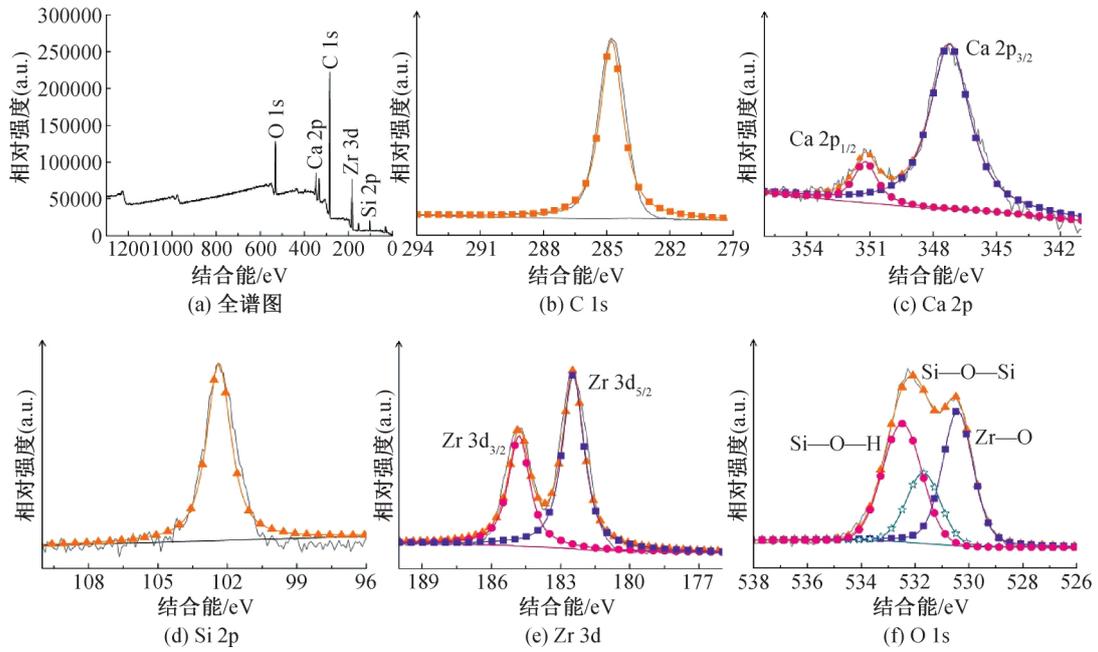


图 7 ZrO₂@BG/CNFs 复合膜 XPS 光谱图

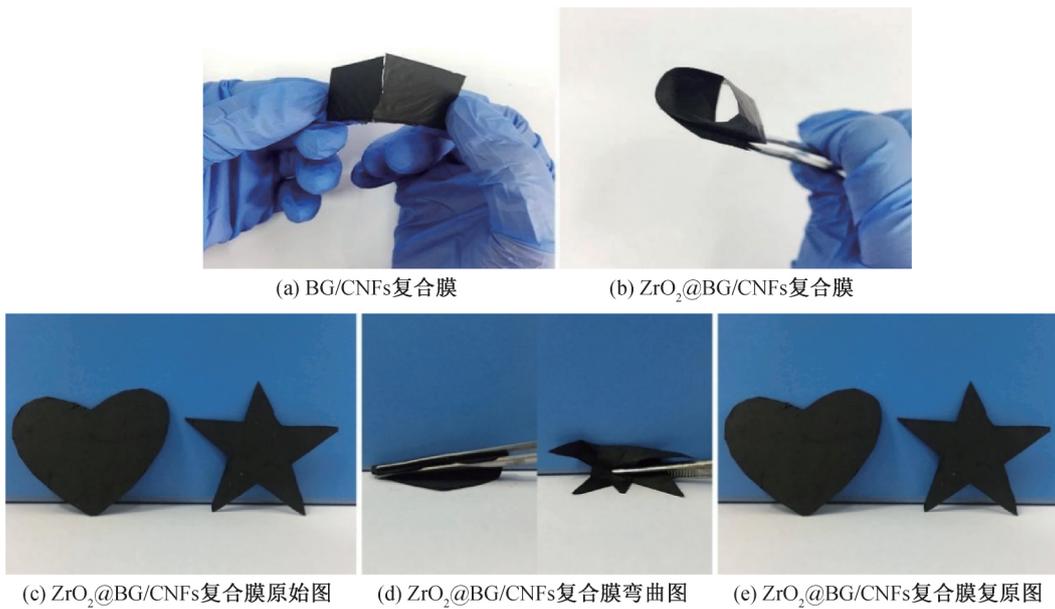


图 8 复合膜的柔性数码照片

入会在 CNFs 上产生相应的微裂纹区域,当 ZrO₂@BG/CNFs 复合膜受到外部载荷作用时,产生的弯曲应力会被微裂纹充分吸收,从而有效避免了应力集中现象的产生^[26]。这极大的提高了复合纳米纤维膜的承载能力,并降低了纤维断裂的可能性。因此,ZrO₂@BG/CNFs 复合膜的柔韧可弯曲性能得到了极大的改善,即便在大幅度变形的情况下也可恢复原状,这种柔性 ZrO₂@BG/CNFs 复合膜扩展了其在骨缺损治疗中的应用。

2.9 ZrO₂@BG/CNFs 复合膜生物相容性评价

通过体外将小鼠成骨细胞(MC3T3-E1)与复合纳米纤维膜共同培养 2 d、7 d 后,通过 SEM 观察细胞在支架上的黏附、铺展、增殖情况,评估复合膜的生物相容性。图 9(a)–(b)为细胞在复合纳米纤维膜上培养 2 d 后的 SEM 图。细胞在纳米纤维膜表面开始铺展,BG/CNFs 复合膜和 ZrO₂@BG/CNFs 复合膜表面仅贴附少量细胞,呈扁平状铺展。

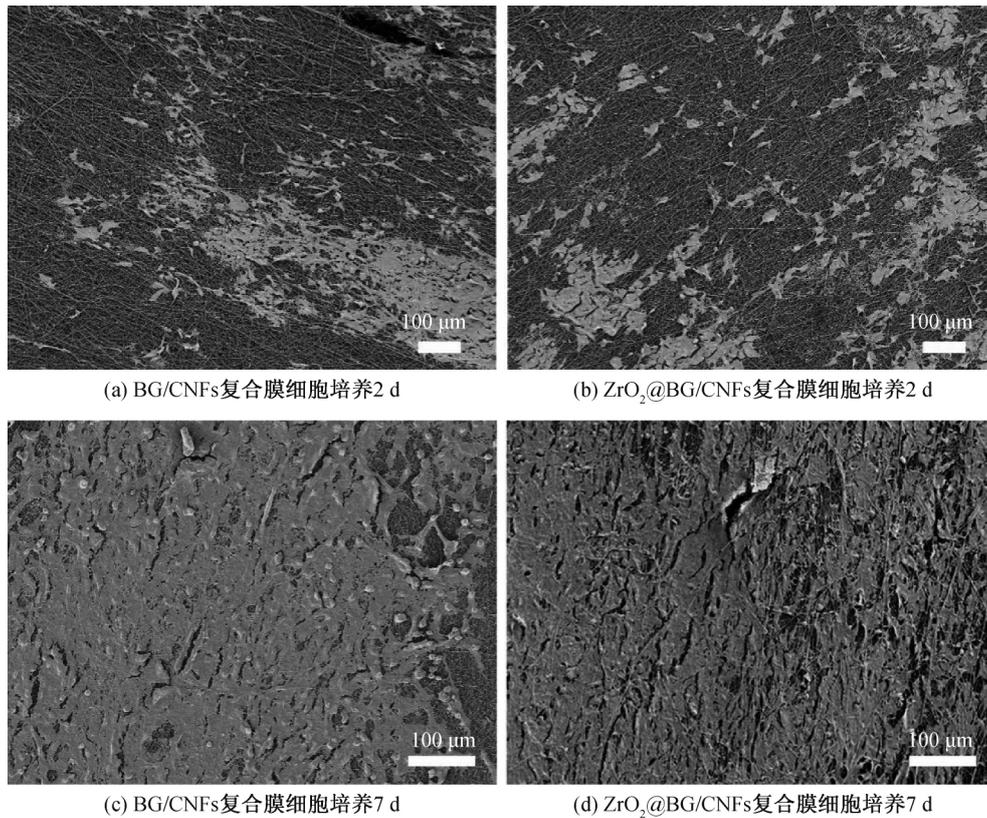


图9 复合纳米纤维膜细胞培养不同天数后的微观形貌 SEM图

当小鼠前成骨细胞(MC3T3-E1)与复合膜培养7 d后,由图9(c)—(d)观察到,BG/CNFs复合膜和 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜表面的细胞数量逐渐增多,成骨细胞连接成片在纤维表面铺展,复合纳米纤维膜表面几乎全部被细胞覆盖。这是由于复合膜表面BG纳米粒子的作用,促进细胞增殖因而细胞连接成片。这表明BG/CNFs复合膜与 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜均具有良好生物相容性,均有利于细胞的贴附、生长与增殖^[16], ZrO_2 的掺杂并未影响 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜的生物相容性。因而,碳化条件为1000℃保温2 h时获得的 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜是成骨细胞贴附和增殖的理想支架。

3 结论

本文采用静电纺丝技术结合热处理工艺,通过 ZrO_2 掺杂提高复合纳米纤维膜的柔韧性,制备了柔性 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜,对制备的复合膜表面形貌、结构进行表征。研究发现,随着碳化保温时间的延长, $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜表面的形貌变化较大,BG纳米粒子先增大后变小甚至脱落。当碳化温度1000℃保温2 h时, ZrO_2 与BG纳米粒子均匀分布在复合纳米纤维膜表面, ZrO_2 纳米粒子的主要结晶相为四方晶相($T-ZrO_2$),BG纳米粒子的结晶度

低,主要结晶相为 $\beta-CaSiO_3$ 和 $Ca_3(Si_3O_9)$ 。体外细胞培养结果表明, $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜上细胞生长、增殖良好。此外 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜反复弯曲折叠后仍能恢复初始状态。因此,本文成功探索制备了既有良好的生物相容性又有一定柔韧性的 $ZrO_2@BG/CNFs$ 复合膜,该复合膜具有良好可塑性能被加工成所需的形状,拓展了以BG/CNFs复合膜为基础的纳米纤维复合材料在骨组织工程领域中的应用。

参考文献:

- [1] Jones J R, Brauer D S, Hupa L, et al. Bioglass and bioactive glasses and their impact on healthcare [J]. *International Journal of Applied Glass Science*, 2016, 7 (4): 423-434.
- [2] Lobb D C, DeGeorge B R Jr, Chhabra A B. Bone graft substitutes: current concepts and future expectations [J]. *The Journal of Hand Surgery*, 2019, 44(6): 497-505.
- [3] 訾园兴, 刘涛, 陈颖睿, 等. SF/SA/HBG纤维支架材料的构建及体外生物矿化[J]. *浙江理工大学学报(自然科学版)*, 2019(4): 427-432.
- [4] Scholz M S, Blanchfield J P, Bloom L D, et al. The use of composite materials in modern orthopaedic medicine and prosthetic devices: a review [J]. *Composites Science*

- and Technology, 2011, 71(16): 1791-1803.
- [5] Naskar D, Bhattacharjee P, Ghosh A K, et al. Carbon nanofiber reinforced nonmulberry silk protein fibroin nanobiocomposite for tissue engineering applications[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(23): 19356-19370.
- [6] Leong K F, Cheah C M, Chua C K. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs[J]. Biomaterials, 2003, 24(13): 2363-2378.
- [7] Nagrath M, Alhalawani A, Rahimnejad Yazdi A, et al. Bioactive glass fiber fabrication via a combination of Sol-gel process with electro-spinning technique[J]. Materials Science and Engineering: C, 2019, 101: 521-538.
- [8] 李毓灵, 蒋科, 陈路, 等. 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[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(6): 930-935.
- [9] Lerouge S, Huk O, Yahia L, et al. Characterization of in vivo wear debris from ceramic-ceramic total hip arthroplasties [J]. Journal of Biomedical Materials Research, 1996, 32(4): 627-633.
- [10] Christel P, Meunier A, Dorlot J M, et al. Biomechanical compatibility and design of ceramic implants for orthopedic surgery[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1988, 523(1): 234-256.
- [11] 王强, 尹娇娇, 杨华哲. 口腔修复材料氧化锆生物陶瓷的制备方法及应用进展[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(21): 3178-3184.
- [12] 祝云利, 吴海山. 陶瓷材料在人工关节置换术中的应用现状[J]. 国际骨科学杂志, 2009, 30(2): 70-73.
- [13] Josset Y, Oum'Hamed Z, Zarrinpour A, et al. In vitro reactions of human osteoblasts in culture with zirconia and alumina ceramics [J]. Journal of Biomedical Materials Research, 1999, 47(4): 481-493.
- [14] 朱瑞乔. 纳米氧化锆骨组织工程支架的性能优化及体内成骨研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [15] Scarano A, di Carlo F, Quaranta M, et al. Bone response to zirconia ceramic implants: An experimental study in rabbits [J]. Journal of Oral Implantology, 2003, 29(1): 8-12.
- [16] Zhang C H, Cheng D, Tang T H, et al. Nanoporous structured carbon nanofiber-bioactive glass composites for skeletal tissue regeneration[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2015, 3(26): 5300-5309.
- [17] Yin X, Xie X Y, Song L X, et al. The application of highly flexible ZrO₂/C nanofiber films to flexible dye-sensitized solar cells[J]. Journal of Materials Science, 2017, 52(18): 11025-11035.
- [18] Fouilloux S, Taché O, Spalla O, et al. Nucleation of silica nanoparticles measured in situ during controlled supersaturation increase. Restructuring toward a monodisperse nonspherical shape[J]. Langmuir, 2011, 27(20): 12304-12311.
- [19] Jeong C, Suh Y W. Role of ZrO₂ in Cu/ZnO/ZrO₂ catalysts prepared from the precipitated Cu/Zn/Zr precursors[J]. Catalysis Today, 2016, 265: 254-263.
- [20] Ma J, Chen C Z, Wang D G, et al. Influence of the sintering temperature on the structural feature and bioactivity of Sol-gel derived SiO₂-CaO-P₂O₅ bioglass [J]. Ceramics International, 2010, 36(6): 1911-1916.
- [21] Wang H L, Ma X K, Li Y N, et al. Synthesis, antimicrobial and release of chloroamphenicol loaded poly (L-lactic acid)/ZrO₂ nanofibrous membranes [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 62: 494-499.
- [22] Meng Q, Lin J, Fu L, et al. Sol-gel deposition of calcium silicate red-emitting luminescent films doped with Eu³⁺ [J]. Journal of Materials Chemistry, 2001, 11(12): 3382-3386.
- [23] Palakurthy S, Venu G R K, Samudrala R K, et al. In vitro bioactivity and degradation behaviour of β -wollastonite derived from natural waste [J]. Materials Science and Engineering: C, 2019, 98: 109-117.
- [24] Liu L H, Liu J Y, Zhao L, et al. Synthesis and characterization of magnetic Fe₃O₄ @ CaSiO₃ composites and evaluation of their adsorption characteristics for heavy metal ions [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2019, 26(9): 8721-8736.
- [25] Luo J M, Luo X B, Hu C Z, et al. Zirconia (ZrO₂) embedded in carbon nanowires via electrospinning for efficient arsenic removal from water combined with DFT studies [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2016, 8(29): 18912-18921.
- [26] Oh J M, Kumbhar A S, Geiculescu O, et al. Mesoporous carbon/zirconia composites: A potential route to chemically functionalized electrically-conductive mesoporous materials [J]. Langmuir, 2012, 28(6): 3259-3270.

(责任编辑:唐志荣)