・论著・

纳米压痕检测中保载时间对骨微观弹性模量和硬度影响

杨春宝 史雪峰 续力民* 吕继宏 孙振军 项毅 张浩 中国人民解放军第264 医院骨科,山西太原 030001

中图分类号: R318.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-7108(2016) 03-0291-04 摘要:目的 观察不同保载时间对骨微观弹性模量和硬度的影响,探讨 SD 大鼠合适的保载时间。方法 10 只10 月龄雌性 SD 大鼠,取双侧股骨制备成纳米压痕标本。采用纳米压痕技术分别在不同保载时间下(分为 15 s,30 s,60 s,90 s,120 s 五组) 测量皮质骨的微观硬度和弹性模量。结果 随着保载时间的增加,在 15 s,30 s,60 s 时硬度和弹性模量有递增趋势,在 60 s 之后有下降趋势或者反折。硬度 H 组间 P > 0.05,无显著性差异;弹性模量 Er 组间 P < 0.05,有显著性差异。结论 60 s 是 SD 大鼠合适的保载时间。为更准确的测量大鼠微观力学特性提供了理论依据。 关键词:纳米压痕;保载时间;微观力学;皮质骨;大鼠

The dynamic change of bone hardness and E, as the holding time by nanoindentation

YANG Chunbao, SHI Xuefeng, XU Limin, LV Jihong, SUN Zhenjun, XIANG Yi, ZHANG Hao Department of Orthopedics, the 264th Hospital of PLA, Taiyuan 030001, China Corresponding author: Xu Limin, Email: sxliminxu@ hotmail.com

Abstract: Objective To discuss the best holding time for the SD rats by the dynamic change of the micro biomechanical properties of hardness and elastic modulus as the holding time changes. **Methods** Ten female SD rats aged ten months were divided into 5 groups: 15 group, 30 s group, 60 s group, 90 s group, 120 s group. Their bilateral femurs were prepared into nanoindentation specimens. The hardness and elastic modulus of the specimens were measured by nanoindentation. **Results** As the increase of the holding time, the curves of the hardness and elastic modulus of the cortical specimens were increasing on the holding time of 15 s, 30 s and 60 s. But the curves of the hardness and elastic modulus were opposite on the holding time of 90 s and 120 s. Therr is no significant difference in each Hardness groups (P < 0.05). There is the significant difference in each Er groups (P < 0.05). **Conclusion** 60 s is the best holding time for the SD rats by nanoindentation. It provides the theory basis for measuring the micromechanics properties in rats.

Key words: Nanoindentation; Holding time; Micromechanics; Cortical bone; Rats

骨质疏松是我国老年人群的三大疾病之一。20 世纪 90 年代, Oliver 提出的纳米压痕技术 (nanoindentation)成为研究材料微纳观力学特性的 新技术。它不仅能够精确测量骨小梁细微结构的弹 性模量、硬度,而且可以用于骨微结构断裂韧性的检 测。因此,近年来,国内外学者对骨质疏松的生物力 学研究已从骨骼的宏观力学层面逐渐转向纳米水平 的微观力学。

而影响纳米压痕产生误差的因素有很多,粘弹 作用是其中比较重要的影响因素。目前纳米压痕的 测量方法是基于弹性、各向同性的样品材料和可以 忽略的粘附力,但许多生物材料常常表现出粘弹性 或与时间相关的行为,可能会受到针尖和样品之间 的粘合相互作用。这种作用会使纳米压痕测量发生 误差。纳米压痕中最容易发生的粘弹性是蠕变或者 叫做恒定负荷下进针中针尖下沉。

合适的保载时间(Holding time)可以消除这种 不良因素。保载时间是在纳米压痕测量压头增加载 荷过程中加载到一定负荷时保持加载力度的一段时 间^[1,2]。目前国内外对保载时间研究尚少^[3,4],且都 是牛等大型动物,而纳米压痕测量最常用的为大鼠 模型。因此,本实验通过比较纳米压痕检测下不同 保载时间(15 s,30 s,60 s,90 s,120 s)对正常 SD 大 鼠股骨标本的弹性模量和硬度的影响来探讨合适的 保载时间,为更准确的测量大鼠微观力学特性提供 理论依据。

^{*}通讯作者:续力民, Email: sxliminxu@ hotmail. com

1 材料和方法^[5]

1.1 实验标本

1.1.1 实验动物:10 只健康雌性 SD 大鼠,年龄(10 ±0.5)月,体重(300 ± 20)g,由第四军医大学实验 动物中心提供。

1.1.2 标本制备:用钻石锯切片机从股骨中段切出 一段约5 mm 厚的皮质骨薄片,切割同时不间断地 用去离子水冲洗切割部位。随后用不同碳化硅粒度 的砂纸(依次600、800、1000、1200 目)打磨标本直至 表面光滑如镜面,然后用铝粉抛光器进行表面抛光, 最后用超声波清洗机洗去标本表面的碎屑,再次用 去离子水冲洗10s。标本浸泡在生理缓冲液中,放 置-20℃冰箱冷藏。

1.2 纳米压痕测量

把 SD 大鼠股骨标本从冰箱取出,放至常温下 自然解冻,保持纳米压痕仪器室内常温 20℃ 和湿度 60% 到 70% 左右。纳米压痕仪的加载负荷精确到 0.05 μN,它的位移可以精确到 0.01 nm。我们选取 Berkovich 压头,因为相比于其他压头,玻式压头更 适合测量弹性模量和硬度。选取加载速度为 0.1 mN/s,加载到最大压力为 1 mN 时,卸载时间为 0.1 mN/s,最大压力 400 mN,保持以上条件不变,保载 时间分别采用 15 s、30 s、60 s、90 s、120 s 共 5 组。 每组时间分别压 10 个点,压点区域都选在皮质骨标 本中心到最边缘的中间 1/2 的位置,之间的距离保 持在 5 μm。

整合所得数据,可以得到载荷-位移曲线。卸载 曲线的初始斜率即为该压点的弹性接触刚度,缩写 S。载荷(P)和卸载曲线的上半部分有关,并可以由 以下公式得到:

$$P = a(h - h_t)^m \tag{1}$$

其中 a 和 m 是公式里的常数。当压痕深度为 最深,即 h = h_{max}时, S 可以由以下公式得到

$$S = \frac{dP}{dh} \tag{2}$$

为了得到弹性模量和硬度,还需要得到接触面 积的值,即A。而在纳米压痕测量中,接触面积是由 其仪器的压头所决定的。

通过以下公式可以由弹性接触刚度 S 而得到弹性模量 E_r :

$$E_r = \frac{1}{\beta} \frac{\sqrt{\pi}}{2} \frac{S}{\sqrt{A}}$$
(3)

 β 是压头的几何学常数,对于玻式压头来说 β =

 $1.\,034_{\,\circ}$

$$\frac{1}{E_r} = \frac{(1 - V_i)}{E_i} + \frac{(1 - v^2)}{E}$$
(4)

其中 *E*_i是约化模量,*V*_i是波松比。对于骨组织, 其波松比 *V* = 0.3。从而可以用下面的公式求得弹 性模量 *E*:

$$E = \frac{(1 - V^2)}{(1/E_r) - ((1 - V_i)/E_i)}$$
(5)

处于峰值负荷的接触硬度(H_a)即为硬度,故可 由下面公式求得硬度为

$$H_{\rm c} = \frac{P_{\rm max}}{A} \tag{6}$$

1.3 统计学处理

计量资料采用均数 ±标准差表示,采用 SPSS19 进行方差分析,组间多重比较采用单方向方差分析 (One-Way ANOVA),预先用 Levene 方法进行方差 齐性检验,方差齐性采用最小显著差值法(Least-Significant Different, LSD)检验,方差不齐则采用 Welch 方法进行检验。选用 *P* < 0.05 为统计学显 著性界值。

2 结果

表1 各保载时间组间硬度和弹性模量的比较

Table 1 Co	omparison	of	the	hardness	and	Ε.	in	each	group
------------	-----------	----	-----	----------	-----	----	----	------	-------

保载时间(Time,s)	硬度值(H,MPa)	弹性模量(E,,GPa)
15 s	1023. 9 ± 129. 6	26. 2 ± 1. 3
30 s	1243. 0 ± 192. 2	28.3 ± 2.2
60 s	1451.7 ± 104.2	31. 1 ± 2. 4
90 s	1139. 2 ± 176. 5	30. 3 ± 2.2
120 s	1068. 8 ± 76. 1	31.6 ± 2.7

硬度 H 组间 P > 0.05, 无显著性差异; 弹性模量 E, 组间 P < 0.05, 有显著性差异。</p>

表 2 各保载时间改变时硬度、弹性模量变化比例

Table 2 Change ratio of the hardness and E_r in each group

保载时间 (Time,s)	平均硬度变化 百分率(%)	平均弹性模量 变化百分率(%)
15 s→30 s	21.4	8.0
30 s→60 s	16.8	9.9
60 s→90 s	21.5	2.6
90 s→120 s	6.1	4.3

从表1和图1、2中可以看到:随着保载时间的 增加,硬度和弹性模量并不是一个单纯递增的曲线, 而是在60s之后有下降趋势或者反折。从表1得 知硬度H组间P>0.05,无显著性差异;弹性模量 *E*,组间P<0.05,有显著性差异。从表2可得知,保 载时间每改变30s时硬度、弹性模量变化比例平均

万方数据











Fig.2 Change of the cortical bone E_r as the holding time

为 14.8%, 5.6%。

3 讨论

纳米压痕测量对于样品的厚度和表面光滑度有 一定的要求。目前最常用的两种打磨方法为:脱水 包埋切片打磨和直接切片打磨(简称"干、湿" 法)^[6]。"干"方法和"湿"方法的区别在于前者在切 片打磨之前需要用乙醇梯度脱水并用 PMMA 进行 包埋。"干"方法在包埋中会产生大量的热量。经本 实验核实,外部温度大约 70℃左右,内部温度则更 高,对骨结构有一定的破坏性;并且包埋液会渗透进 皮质骨的空隙中,而纳米压痕测量测定是十纳米甚 至几纳米的区域,一旦此区域含有包埋液,则会对测 量结构产生影响。"湿"方法在纳米压痕测量中标 本的粘弹性更高,对测量值有一定的影响^[7]。但粘 弹性可以通过纳米压痕测量中加载过程中加入一定 的保载时间来消除。根据 Briscoe^[8]的研究,将峰值 前后 10s 进行合并,使其载荷恒定,从而消除粘弹作 用。一般采用 30 s 到 120 s^[3,4]的保载时间,从而消 除材料粘弹作用对卸载曲线的影响^[9-11]。具体的保 载时间应该由实验材料的粘弹性质和卸载率来确 定^[12]。Ngan^[13]和 Cheng^[14]等人发现可用梯形加载 函数来分析粘弹性材料,从而保证材料的粘弹作用 不会对最终的弹性模量计算产生不良影响。因此, 本实验采用能更好保持骨活性和骨结构的"湿法" 来对 SD 大鼠股骨标本进行处理,并且在后期纳米 压痕测量中采用保载时间和特定加载函数来消除粘 弹性带来的不良影响。

本实验选取 SD 大鼠的股骨中段部分。因为骨 的这片区域可以更好的代表人骨整体的骨微观力学 性质^[15]。Hoc^[16]和 Dong^[17]等人发现,皮质骨的微 观力学强度与松质骨一样具有极为显著的各向异 性,并且处在同一同心圆的骨板的弹性模量和硬度 没有显著性差异。而纳米压痕测量中两个样本最少 要相隔5μm,否则各个压点间会因为压头挤压样本 组织而相互影响。本实验压点选定标本中心到最边 缘的 1/2 的位置,压点之间的距离保持在 5 μm。皮 质骨在接近的区域,微观力学性质相近,而且股骨中 段的皮质骨横截面为类中空圆状,同一半径圆上的 微观力学性质较为一致,故选取皮质骨做本实验的 标本,并且选取两压点间距离为纳米压痕仪器能检 测的最小距离 5 μm。所以,基本可以认为本实验是 在相同的压点区域内,并且其他试验条件不变的情 况下,研究保载时间对弹性模量和硬度的影响,即保 载时间对标本骨粘弹性的影响。

从研究结果可以得知,保载时间每改变 30 s 时 硬度、弹性模量变化比例平均为 14.8%、5.6%,说 明保载时间对微观力学检测值有较大影响。随着保 载时间的增加,硬度和弹性模量并不是一个单纯递 增的曲线,而是在 60 s 之后有下降趋势或者反折。 这提示 60 s 可能是一个临界点。依据纳米压痕中 弹性模量和硬度值的降低。从各表可知道,硬度值 在 60 s 是最高,提示保载时间为 60 s 时,骨标本的 粘弹作用最小;而在弹性模量值中 60 s 和 120 s 为 最高,而且二者之间没有显著性差异。而 Norman 等人^[18]在研究中证实骨组织中的弹性模量和硬度 也有着显著的正相关性。120 s 保载时间的硬度为 1.07 GPa,远低于 60 s 的 1.45 GPa。而纳米压痕检 测中产生误差的原因很多,比如标本表面欠光滑等等。根据 Wu 等^[19]的研究发现,标本表面欠光滑会导致弹性模量和硬度正相关性降低。因此,本课题 组推测 120 s 保载时间的弹性模量可能是一个误差数据。

综上可得,60 s 是 SD 大鼠合适的保载时间。 探索出合适的保载时间后,可以进一步更准确的测 量各组去势大鼠股骨标本的微观力学性质,从而研 究 SD 大鼠骨微观力学随去势时间的变化规律。

【参考文献】

- [1] Rho JY, Tsui TY, Pharr GM. Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation
 [J]. Biomaterials, 1997. 18(20): 1325-30.
- [2] Rho JY, Zioupos P, Currey JD, et al. Microstructural elasticity and regional heterogeneity in human femoral bone of various ages examined by nano-indentation [J]. J Biomech, 2002. 35(2): 189-98.
- [3] Rho JY, Zioupos P, Currey JD, et al. Variations in the individual thick lamellar properties within osteons by nanoindentation [J]. Bone, 1999. 25(3): 295-300.
- [4] Rho JY, Pharr GM. Effects of drying on the mechanical properties of bovine femur measured by nanoindentation [J]. J Mater Sci Mater Med, 1999. 10(8): 485-8.
- [5] 杨春宝,李阳,吴子祥,等.纳米压痕技术观察骨微观力学 特性变化的实验研究[J].中国骨质疏松杂志,2013,19 (7):691-696.
 Yang CB, Li Y, Wu ZX, et al. The study on the dynamic

change of bone micro biomechanical characteristics by nanoindentation [J]. Chin J Osteoporos, 2013, 19(7): 691-696. (in Chinese)

- [6] Pathak S, Swadener JG, Kalidindi SR, et al. Measuring the dynamic mechanical response of hydrated mouse bone by nanoindentation [J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2011. 4(1): 34-43.
- [7] Pathak S, Swadener JG, Kalidindi SR, et al. Measuring the dynamic mechanical response of hydrated mouse bone by nanoindentation [J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2011. 4(1):

34-43.

- [8] Briscoe DM, Alexander SI, Lichtman AH. Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection [J].
 Curr Opin Immunol, 1998. 10(5): 525-31.
- [9] Monti RJ, Roy RR, Hodgson JA, et al. Transmission of forces within mammalian skeletal muscles [J]. J Biomech, 1999. 32 (4): 371-80.
- [10] Ebenstein DM, Pruitt LA. Nanoindentation of soft hydrated materials for application to vascular tissues [J]. J Biomed Mater Res A, 2004. 69(2): 222-32.
- [11] Angker L, Swain MV, Kilpatrick N. Characterising the micromechanical behaviour of the carious dentine of primary teeth using nano-indentation [J]. J Biomech, 2005. 38(7): 1535-42.
- [12] Chudoba C, Fujimoto JG, Ippen EP, et al. All-solid-state Cr: forsterite laser generating 14-fs pulses at 1.3 mum[J]. Opt Lett, 2001. 26(5): 292-4.
- [13] Ngan, J., D. A. Goss and J. Despirito, Comparison of fixation disparity curve parameters obtained with the Wesson and Saladin fixation disparity cards[J]. Optom Vis Sci, 2005. 82(1): 69-74.
- [14] Cheng Y, Wang Y, Chen D, et al. Evolution of single crystalline dendrites from nanoparticles through oriented attachment [J]. J Phys Chem B, 2005. 109(2): 794-8.
- [15] Teramura K, Fukushima S, Iwai T, et al. Incadronate inhibits osteoporosis in ovariectomized rats[J]. Eur J Pharmacol, 2002. 457(1): 51-6.
- [16] Hoc T, Henry L, Verdier M, et al. Effect of microstructure on the mechanical properties of Haversian cortical bone [J]. Bone, 2006. 38(4): 466-74.
- [17] Dong XN, Luo Q, Sparkman DM, et al. Random field assessment of nanoscopic inhomogeneity of bone [J]. Bone, 2010. 47(6): 1080-4.
- [18] Norman J, Shapter JG, Short K, et al. Micromechanical properties of human trabecular bone: a hierarchical investigation using nanoindentation [J]. J Biomed Mater Res A, 2008. 87 (1): 196-202.
- [19] Wu Z, Baker TA, Ovaert TC, et al. The effect of holding time on nanoindentation measurements of creep in bone[J]. Journal of Biomechanics, 2011. 4(1): 1066-1072.

(收稿日期: 2015-08-12)