

· 论 著 ·

对比 3 种人工复合材料修复骨缺损实验研究*

肖智博¹, 吕富荣^{1△}, 蒋电明², 吕发金¹, 李 杰²
(重庆医科大学附属第一医院:1. 放射科;2. 骨科 400016)

摘 要:**目的** 对比研究 3 种人工骨复合材料[纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66(n-HA/PA66)复合材料、瑞邦骨泰(CPC)、医用骨水泥Ⅱ(PMMA)]修复骨缺损的效果,为临床骨缺损修复材料的合理选择提供实验依据。**方法** 将 48 只新西兰大白兔随机分为 3 组,每组 16 只。行双侧胫骨髁钻孔,3 组中每只兔子双侧分别植入 n-HA/PA66 复合材料、PMMA 和 CPC。术后各时间点摄数字化 X 线片(DR),并取材进行组织学观察和力学检测。**结果** (1)组织学观察:n-HA/PA66 复合材料植入侧在 4~12 周时,逐步有骨小梁形成长入,材料被分隔成小岛,可见大量成骨细胞及破骨细胞;PMMA 植入侧材料始终未被包绕,界膜内细胞形成纤维膜,但仍未见成骨细胞;CPC 植入侧 6~12 周界膜包绕材料,原始骨小梁形成,可见成骨细胞和破骨细胞。(2)X 线显示 n-HA/PA66 复合材料侧骨化早于其他两侧。(3)生物力学测试:3 种材料最大承载负荷比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** n-HA/PA66 复合材料具有良好的生物相容性和骨传导性,具有临床实用性。

关键词: 骨移植;羟基磷灰石类;聚酰胺 66;复合材料;磁共振成像

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.03.003 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2011)03-0215-03

Comparison of three types of bone graft materials in the experiment of repairing bone defects*
Xiao Zhibo¹, Lv Furong^{1△}, Jiang Dianming², Lv Fajin¹, Li Jie²
(1. Department of Radiology; 2. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To compare the osteoinductive activity by the way of the experiment of repairing bone defects with nano-hydroxyapatite and polyamide-66 composite, mean while with polymethylmethacrylate and calcium phosphate cement as matched control. **Methods** Forty eight New Zealand rabbits were classified randomly into three groups: A, B and C, every group had 16 rabbits. The Condyle of tibia was performed boring which was 3 mm diameter and 5 mm depth. In group A, B and C, n-HA/PA66 composite, PMMA and CPC were implanted dividedly by means of every two materials in every rabbit of one group. The specimens were taken respectively in different times: 2nd, 4th, 6th, 8th, 12th week after surgery, and were examined by the methods of plain roentgenography, histology and biomechanical testing in vitro. Finally the collected data was analyzed using SAS8.0 software. **Results** (1) The histology showed that every group was forming a layer of interface membrane. From the 4th week, The interface membrane on the hand of n-HA/PA66 composite had been widest and revolved the n-HA/PA66 composite partly where the number of cells was increasing. Till the 12th week, there were some bone trabecula formed and the HA was separated into small islands, more osteoclasts appeared. The material of PMMA was never involved, and at the 12th week, the interface membrane transformed into fibrous membrane. On the side of CPC, it was from 6th week that the number of osteoblast, osteoclast and the primitive bone trabecula were increasing gradually and quickly, while the number of inflammatory cells decreased. (2) X-ray: there were more bony generation on the side of n-HA/PA66 than the other two, happening earlier too. (3) Biomechanical testing in vitro: in the vertical compression testing, the maximum loading among 3 materials was no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion** The experimental results show that the n-HA/PA66 Composite has the attribute of good biocompatibility and osteoconductibility, which can be manifested by plain roentgenography.

Key words: bone transplantation; hydroxyapatites; polyamide-66; composite; magnetic resonance imaging

目前人工骨应用广泛,在整形、整容外科及牙科中越来越多地使用具有生物相容性并可被再吸收的复合材料,尤其是在自体骨移植、充填骨空腔以及修复骨缺损方面具有特殊的用途(如治疗由牙周疾病、外伤、肿瘤、外科手术或脊柱融合所导致的骨缺损或空腔)^[1-2]。用于人工骨的材料很多,大致可分为生物医用金属材料、医用高分子材料、陶瓷材料及生物材料等^[3],其中使用最广泛的主要是羟基磷灰石(HA)、生物陶瓷和脱钙骨等。但这些材料具有共同的不足点:不能愈合而成为受体自身材料,容易折断、磨损。自然骨是由 HA 和胶原高分子组成。模仿骨的组成和结构,制备类似自然骨组织的 HA 和高

分子复合骨修复材料近年来引起了国内外许多学者的浓厚兴趣。本文采用 3 种生物材料对照研究,力图从实验研究入手,为临床上骨移植材料的选择提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 20%纳米 HA/聚酰胺 66(n-HA/PA66)复合材料由四川大学国家纳米生物医用材料产业孵化中心提供;瑞邦骨泰(CPC)由上海瑞邦生物材料有限公司提供;医用骨水泥Ⅱ(PMMA)由天津市合成材料工业研究所提供。

1.2 动物分组 实验动物为 48 只同种系健康成年雄性新西兰大白兔,体质量(2.5±0.5)kg,由重庆医科大学动物实验中

* 基金项目:国家高技术研究发展计划资助项目(2002AA326020)。 △ 通讯作者,电话:13908365685;E-mail:lfr918@sina.com。

心提供。适应性饲养 1 周后,随机分成 A、B、C 3 组,行双侧胫骨内上侧骨皮质钻孔,造成柱状骨缺损。A 组双侧分别植入 n-HA/PA66 复合材料和 PMMA,B 组双侧分别植入 n-HA/PA66 复合材料和 CPC,C 组双侧分别植入 CPC 和 PMMA。

1.3 实验方法 予速眠新 0.1 mL/kg 局部肌肉推注麻醉,取俯卧位,在无菌条件下,自髌内侧纵切口,打开关节囊,暴露胫骨内上侧骨皮质,每侧钻 1 个直径 3 mm,深 5 mm 的孔造成圆柱状骨缺损,保留缺损处骨皮质。用明胶海绵充分止血后,将调制好的填充材料用注射器注入骨缺损处,使其完全充满骨缺损,并用原位骨皮质覆盖。术后每只大白兔立即肌注青霉素 40 万 U,连续 3 d,预防感染,不作外固定,分笼饲养。手术均由同 1 组人员完成。

1.4 检查项目和方法

1.4.1 光镜组织学观察 术后第 2、4、6、8、12 周用空气栓塞法处死各组白兔 2 只,用于组织学观察。

1.4.2 数字化 X 线片(DR)检查 不同时间点行 X 线摄片,观察填充材料的分布、与周围骨连接、新骨形成情况以及填充材料降解吸收情况、周围骨质疏松情况及邻近关节的改变情况等。

1.4.3 生物力学测试实验 垂直压缩实验用 Instron 1011 生物力学测试系统(Instron Co.,USA);常温常压下,每个标本放于 Instron 测试机两加载头之间,加载速度为 2 mm/min,0.7 kN 预压 3 次后,应力加到材料断裂停止加载;得到椎体轴向位移测试值以及最大负荷值。分析有无线性关系,建立线性方程,方程的斜率即每移动 1 mm 所需拉力,每组斜率计算均值,进行方差分析。

1.5 统计学处理 各组实验指标的参数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。结果用 SAS8.0 统计软件处理,数据经方差分析后用配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 光镜组织学观察 术后 2~4 周,在各填充材料与宿主骨交界处形成界膜,n-HA/PA66 复合材料侧材料内部呈均匀一片分布未见明显的细胞,周边部分材料被较厚的界膜包绕,其内可见大量间充质细胞、成纤维细胞及小血管(主要为新生毛细血管);PMMA 侧仅有少量界膜,仅少量成纤维细胞、间充质细胞及炎细胞;CPC 侧术区的填充材料大部分被洗脱,界膜内细胞也较少,较多炎性细胞,仅少量间充质细胞(封 2 图 1)。术后 6~8 周,n-HA/PA66 复合材料侧界膜宿主面可见膜内成骨征象,内部血管增多,可见环状的成骨细胞;PMMA 侧材料未被界膜包绕,未见明确的纤维膜形成,炎性细胞继续存在;CPC 侧术区的填充材料被界膜分隔,细胞增多,炎性细胞减少,原始骨小梁及成骨细胞层开始形成。术后 12 周,n-HA/PA66 复合材料侧界膜内可见原始骨小梁形成,骨小梁表面为扁平状、排列整齐的成骨细胞,较多类骨质形成,纤维成分减少,材料被分隔成 HA 小岛;PMMA 侧材料未被界膜包绕,界膜内可见大量成纤维细胞,未见成骨细胞;CPC 侧术区的填充材料被分隔成 CPC 小岛,原始骨小梁增多(封 2 图 2)。

2.2 X 线摄片检查 术后 2~6 周,双侧骨缺损区的填充材料和周围骨之间可见透光带,n-HA/PA66 复合材料侧呈略低密度影;PMMA 侧呈明显高密度影;CPC 侧呈较高密度影,邻近关节无明显改变,未见明显的骨膜反应。术后 8 周,n-HA/PA66 复合材料填充区可见类圆形较高密度影,界线不清;PMMA 填充区仍为高密度致密影,周围骨小梁与之分界清楚;CPC 填充区密度逐步减低,小梁逐步伸入。术后 12 周,

n-HA/PA66 复合材料的中等密度填充区内可见高密度影,与周围界线不清,附近骨膜反应明显;PMMA 填充区仍为中高密度致密影,周围骨小梁与之分界清楚,周围骨膜反应不明显;CPC 填充区呈高密度影但与周围分界不清,有小梁伸入,周围可见骨膜反应(图 3)。

2.3 生物力学测试 各组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组在各时间点最大承载负荷(kN)比较(n=4)			
时间(周)	n-HA/PA66	PMMA	CPC
4	0.798 4±0.121	0.836 8±0.094 4	0.772 5±0.072 6
8	0.966 6±0.122 7	1.016 4±0.200 6	0.946 6±0.176 0
12	0.984 4±0.076 8	1.008 4±0.009 8	0.891 2±0.109 5



A:箭头处的 n-HA/PA66 复合材料填充区域呈高密度影,有骨小梁伸入;对侧 PMMA 填充区仍为高密度;B:箭头处 CPC 填充区高密度影,但与周围分界不清,有小梁伸入。

图 3 3 种材料植入第 12 周 X 线检查结果

3 讨 论

人工材料作为骨移植替代物用于骨缺损的修复,是医学和生物材料学领域内的一项重要研究课题。PMMA 和 CPC 作为人工材料已经广泛用于实验及临床^[4-5]。n-HA/胶原骨是利用纳米技术在纳米结构单元或纳米数量级(1~100 nm)下生产的新型材料,经动物实验研究证实,比普通 HA 有更为优越的生物相容性和生物活性,无细胞毒性,能促进和加快骨创伤的愈合^[6]。

HA、磷酸钙、钙盐(碳酸钙、硫酸钙)以及具有生物活性的玻璃都是骨组织替代材料的良好选择,但比较同等大小的颗粒,HA 比其他材料更稳定^[7]。许多 HA 骨水泥已经显示出很好的生物相容性和极大的临床应用价值^[8],其为正常骨组织的成分,具有良好骨传导性,已被多项研究证实其修复骨缺损的作用^[9-10]。同时,聚酰胺(PA)是一种具有高韧性,生物相容性良好的高聚物材料,无生物活性,临床上作为外科缝线长期使用。将具有良好生物活性的 HA 和 PA 复合形成新型骨修复材料,既提高了材料的机械性能、增加了韧性,又使聚合物材料带有骨传导特性,可以达到优势互补。通过调节 HA 与 PA66 的比例,有效地将 n-HA 材料的高强度与 PA66 的良好韧性相结合,使其在结构和性能上更接近天然骨^[11-12]。周立伟等^[13]用 n-HA/PA66 修复兔颅骨缺损,术后伤口愈合好,未发现排斥反应,骨修复材料可与骨组织形成骨性结合。Bhattacharyya 等^[14]认为 n-HA 作为骨组织工程的支架材料,后期可以与周围正常骨组织达到骨性融合,并有骨组织长入支架内,支架与骨组织牢固结合。本实验将其应用于骨端缺损的修复,研究其对骨愈合的影响和体内生物力学变化。

本实验结果显示,n-HA/PA66 复合材料在植入后第 4 周

开始就有成骨细胞出现在界膜骨小梁侧,边缘少数 HA 被包绕,说明 HA 晶体的刺激使骨细胞活跃,提供晶体核成为新骨形成的支架,发挥骨引导作用,PMMA 和 CPC 侧界膜范围小,内部细胞少,可见炎性细胞浸润。这时的普通 X 线观察无明显改变。6~8 周时,n-HA/PA66 复合材料侧界膜宿主面可见膜内成骨征象,内部血管增多;CPC 侧开始出现界膜逐步包绕材料,成骨细胞及血管逐渐增多,炎性细胞逐渐减少;PMMA 侧界膜向纤维膜过渡,材料未被包绕,成骨细胞未出现。此时,X 线可见 n-HA/PA66 复合材料植入区密度逐步升高,与周围界线不清;CPC 植入区界线开始模糊,但 PMMA 侧仍为高密度影,与周围界清。12 周时,n-HA/PA66 复合材料侧界膜内原始骨小梁面积增多、增大,HA 被新生小梁分隔,大量成骨细胞及破骨细胞形成;CPC 侧植入区内部多个小梁形成,表面成排成骨细胞,还可见破骨细胞;PMMA 侧界膜转变成纤维组织膜。X 线检查与组织学观察一致,n-HA/PA66 复合材料的中等密度填充区内可见高密度影,与周围界线不清,附近骨膜反应明显;CPC 填充区仍是高密度影,但与周围分界不清,有小梁伸入,周围可见骨膜反应;PMMA 填充区仍为中高密度致密影,周围骨小梁与之分界清楚,周围骨膜反应不明显。生物力学测试显示 3 种材料最大承载负荷比较差异无统计学意义($P>0.05$),说明 3 种材料本身的生物参数无显著差异,但 n-HA/PA66 复合材料最大承载负荷绝对值低于 PMMA 而高于 CPC,在术后 4~12 周其自身最大承载负荷绝对值呈逐渐递增。PMMA 自身最大载荷绝对值在 12 周时较 8 周有所下降,与其引起的异物反应导致骨吸收、骨强度下降以及骨质疏松等有关;同时,其单体晶体聚合是放热反应,在经皮椎体成形术(PVP)过程中 PMMA 聚合产生热量的程度和持续时间足以对骨及周围组织产生损伤,最终导致邻近椎体骨坏死、骨塌陷及骨折的发生率增加^[15-16]。对于 CPC,本实验结果与 Lu^[17]等研究结果一致,表明其力学性能欠佳,CPC 的强度和弹性模量在植入前高于松质骨,但在植入后的整个过程中,强度和弹性模量都低于松质骨。n-HA/PA66 复合材料略高于 CPC 侧,体现出纳米材料本身能够提高机械性能,考虑是由于 n-HA/PA66 复合材料植入体内与骨组织形成了骨性键合,增加了其强度。当然,管状骨的承重主要依靠皮质骨,本实验只是将材料植入松质骨,而保留宿主皮质骨覆盖,所以在 12 周时的变化提示材料对宿主机械性能的长期影响还需进一步观察。

综上所述,本研究结果显示,n-HA/PA66 复合材料较 CPC 及 PMMA 成骨更明显,具有更好的生物相容性和骨传导性,也易于临床随访观察。

参考文献:

- [1] 欧云生,蒋电明,权正学,等. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 复合生物活性人工椎体在胸腰椎骨折前路重建手术中的应用[J]. 中国修复重建外科杂志,2007,21(10):1084-1089.
- [2] 梁勇,蒋电明. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 椎间融合器对山羊颈椎的融合效果研究[J]. 第三军医大学学报,2007,9(24):2333-2335.
- [3] 杨晓庆,李玉宝,魏杰,等. 医用羟基磷灰石二氧化钛纳米

复合材料的制备及性能研究[J]. 中国现代医学杂志,2003,12(5):26-28.

- [4] 滕海军,周跃,初同伟,等. 注射型磷酸钙骨水泥和 PMMA 在椎体成形术中的生物力学研究[J]. 中国矫形外科,2004,12(1/2):70-73.
- [5] 陈滔,朱美忠,周鹏程,等. 人工髋关节置换术治疗 23 例高龄股骨转子间骨折[J]. 重庆医学,2009,38(1):60-61.
- [6] 林晓艳,鲁建,李虎,等. 纳米羟基磷灰石胶原复合材料制备方法比较研究[J]. 化学研究与应用,2005,17(5):611-614.
- [7] Tay BK,Patel VV,Bradford DS. Calcium sulfate-and calcium phosphate-based bone substitutes: Mimicry of the mineral phase of bone[J]. J Orthop Clin North Am,1999,30(4):615-623.
- [8] Chow LC,Takagi SA. Nature bone cement A laboratory novelty led to the development of revolutionary new biomaterials[J]. Res Natl Inst Stand Technol,2001,106(12):1029-1033.
- [9] Guelcher SA. Biodegradable polyurethanes: synthesis and applications in regenerative medicine[J]. Tissue Eng Part B Rev,2008,14(1):3-17.
- [10] Li J,Zuo Y,Cheng X,et al. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/polyamide 66 composite GBR membrane with asymmetric porous structure[J]. Mater Sci Mater Med,2009,20(5):1031-1038.
- [11] Zhang L,Li YB,Wang XJ,et al. Studies on porous scaffold made of the nano-HA/PA66 composite[J]. Mater Sci,2005,40(1):107-110.
- [12] 孟纯阳,安洪,蒋电明,等. 新型纳米骨重建和修复材料羟基磷灰石/聚酰胺体内植入的生物相容性及安全性[J]. 中国临床康复,2004,8(29):6330-6333.
- [13] 周立伟,魏世成,李玉宝,等. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 复合人工骨修复颅骨缺损的动物实验研究[J]. 口腔医学,2009,29(11):561-564.
- [14] Bhattacharyya S,Kumbar SG,Khan YM,et al. Biodegradable polyphosphazene-nanohydroxyapatite composite nanofibers: scaffolds for bone tissue engineering[J]. Biomed Nanotechnol,2009,5(1):69-75.
- [15] Syed MI,Patel NA,Jan S,et al. New symptomatic vertebral compression fractures within a year following vertebroplasty in osteoporotic women[J]. AJNR,2005,26(6):1601-1604.
- [16] Ahn Y,Lee JH,Lee HY,et al. Predictive factors for subsequent vertebral fracture after percutaneous vertebroplasty[J]. J Neurosurg Spine,2008,9(2):129-136.
- [17] Lu JX,About I,Stephan G,et al. Histological and biomechanical studies of two bone colonizable cements in rabbits[J]. Bone,1999,25(2):415-455.