

· 论 著 ·

新型带负电荷钙磷复合材料促进脊柱融合的实验研究*

毛海青, 邹俊, 姜为民, 许运, 朱雪松, 耿德春, 杨惠林
(苏州大学附属第一医院骨科, 江苏苏州 215006)

摘要:目的 研究一种新型带负电荷钙磷复合材料诱导脊柱融合并观察其融合能力。方法 将新型带负电荷钙磷复合材料置入 10 只大鼠的脊柱融合模型中, 作为实验组; 另取 10 只大鼠仅建模, 作为假手术组。术后 8 周行 X 线评分, 手触力学测试, Micro CT 扫描分析和组织学观察。结果 X 线评分、Micro CT、手触力学测试和组织学切片均显示实验组达到骨性融合, 假手术均未融合。结论 这种带负电荷钙磷复合材料能够很好地诱导脊柱融合, 具有良好的应用前景。

关键词: 脊柱融合术; 钙磷复合材料; 负电荷

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.07.003

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)07-0631-02

A novel calcium phosphate composite with negative charge for spine fusion*

Mao Haiqing, Zou Jun, Jiang Weimin, Xu Yun, Zhu Xuesong, Geng Dechun, Yang Huilin

(Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215006, China)

Abstract: **Objective** To evaluate a novel calcium phosphate composite with negative charge for spine fusion. **Methods** 10 rats were implanted with composite, as treatment group. 10 rats did sham surgery, as control group. After scarifying, their spine samples were assessed by radiographs, manual palpation, Micro CT, and histological analysis. **Results** Radiographic evaluation, Micro CT, manual palpation and histological analysis revealed spinal fusion in the treatment group. None of the rats in the control group developed fusion. **Conclusion** This novel calcium phosphate composite could induce sufficient spinal fusion with a good prospect.

Key words: spine fusion; calcium phosphate composite; negative charge

下腰痛是门诊遇到的最常见的疾病之一。在美国, 下腰痛仅次于上呼吸道感染而位居第 2 位^[1]。目前, 脊柱融合术仍是对经保守治疗无效的下腰痛患者所采取的一种标准治疗方法, 其中最主要的是假关节发生率高、临床疗效不佳^[2]。因此, 提高融合率成为众多学者研究的重点^[3]。钙磷材料一直是应用最广的一种骨移植替代材料^[4]。目前大量的研究瞄准了改良的钙磷材料在骨科的应用前景, 如调整钙磷在材料中的成分比例, 对钙磷离子表面进行修饰, 产生了一些积极的作用^[5-8]。本研究将一种表面带有可再生负性电荷的钙磷复合材料植入脊柱融合的大鼠模型中, 并观察检测其诱导脊柱融合的能力, 现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 材料 该种钙磷复合材料(Biocomposites LTD, Keele, England)是由两种形态的钙, 即 β -磷酸三钙和 α -半水硫酸钙 1:1 组合而成, 具有可再生的负性表面电荷。室温下将这种复合材料调制 5 min 后, 切割制作成 5 mm×10 mm 长条状, 放在 EP 管里。

1.2 方法

1.2.1 脊柱融合模型的建立 将 20 只 10~12 周龄的雄性 SD 大鼠(体质量 300~400 g)随机分为实验组和假手术组, 每组 10 只。将 SD 大鼠麻醉后, 取后正中切口切开皮肤, 在棘突两侧旁开 3 mm 切开筋膜。暴露 L_{4,5} 两侧横突, 用高速磨钻去皮质, 在实验组中将复合材料置于两侧横突间, 在假手术组中不置入任何材料, 以 4-0 的可吸收缝线逐层关闭切口。术后分笼饲养, 自由进食进水。术后 10 d 拆线。术后 8 周处死各组大鼠。

1.2.2 X 线评分 用高分辨率的 X 线摄片机于 4、6、8 周拍摄前、后位 X 线片。由 3 名相对独立的医生采用 Peterson 6 级评定法进行脊柱融合情况的评定^[9]。0 分为没有骨性融合, 1 分为骨融合区域小于 25%, 2 分为骨融合区域占 25%~<50%, 3 分为骨融合区域占 50%~<75%, 4 分为骨融合区域占 75%~99%, 5 分为全部区域融合。

1.2.3 手触力学评定 对融合块进行力学性能测试被认为是众多检测方法中的金标准。脊柱融合模型中可用定量和半定量的生物力学测定方法。定量法包括压缩、牵拉、弯曲和扭曲力学测试等。而半定量的“手触力学评定”则是最常用、最易操作的方法^[10]。8 周后处死大鼠, 并将其进行解剖。剔除周围肌肉及韧带, 保留长度从第 12 胸椎到骶骨的脊柱标本。由 3 名骨科医生各自用手检测 L₃₋₄、L₄₋₅、L₅₋₆ 活动度, 评价融合情况。无活动判定为融合, 有活动判定为不融合。

1.2.4 Micro CT 观察 手触力学评定后, 将标本置于 10% 多聚甲醛保存。采用三维 Micro CT 对标本进行扫描和重建。

1.2.5 组织学观察 标本用 10% 甲醛固定, 10% HCL 脱钙, 石蜡包埋, 做成矢状位切片, 常规用 HE 染色。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件分析, X 线评分结果采用方差分析, 手触力学评定结果采用 Fisher 精确检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 X 线评分 X 线评分结果显示实验组在各个时间点均明显高于对照组($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 手触力学评定 实验组大鼠的横突间出现骨性融合, 没有前后或侧方的活动。假手术组大鼠脊柱均未达到融合。两

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(11072165); 江苏省普通高校研究生科研创新计划资助项目(CX09B_038Z); 江苏省卫生厅面上科研课题资助项目(H200916); 苏州市“科教兴卫”青年科技资助项目(SWKQ0905)。

组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 Micro CT 扫描 实验组大鼠的 L₄₋₅ 横突间长满大块的新生骨组织,紧贴于脊柱背侧,横突间的骨性连接结构明显(插 I 图 1)。假手术组大鼠 L₄₋₅ 横突间有较大的间隙存在,没有形成骨性融合,见插 I 图 2。

表 1 两组大鼠 X 线评分比较(分)

组别	4 周	6 周	8 周
实验组	3.42*	4.58*	5.00*
假手术组	0.23	0.51	0.94

* $P < 0.05$, 与假手术组比较。

2.4 组织学观察 实验组大鼠标本可以看见大量新生的成熟骨,实验材料大部分消失(插 I 图 3)。假手术组大鼠标本均没有骨性融合出现,见插 I 图 4。

3 讨论

近年来因腰椎间盘突出退行性疾病而接受脊柱融合手术的患者逐年增加,随着此类手术的广泛开展,其存在的问题也逐渐引起了人们的重视^[11-12]。其中最主要的是假关节发生率高、临床疗效不佳。据统计,单节段自体髂骨移植脊柱融合的患者中约 35% 不愈合。即便辅以内固定,仍有 10%~15% 的脊柱融合患者发生假关节^[2]。为了解决这些问题,人们从脊柱融合的生物学和生物力学等多方面进行了尝试,包括内固定器械的广泛应用及融合技术的改进等,但经大量研究结果表明所有上述技术改进对融合率和临床疗效均无显著影响^[3]。

钙磷材料具有骨传导性,在血管丰富的骨性环境中,如胫骨和股骨的干骺端,可单独作为骨移植替代材料,或与自体骨混合移植,能产生很好的骨修复和骨愈合。但是,在血管不丰富的骨性环境中,如脊椎横突间,由于缺少骨诱导性,达到完全融合的时间比自体骨长,不能够在单独移植中使用,仅可以作为骨移植的扩展物或细胞与诱导因子的载体支架或支撑物^[4]。

20 世纪 60 年代,有学者进行了一系列关于骨的应力电位和电刺激骨生成的研究,激发了医学界对电刺激成骨作用的关注^[13]。生物活性材料经过极化后,内部束缚电荷定向排列形成微电场,其表面的束缚电荷对体液中异种电荷成分能产生定向吸附作用,有利于吸附聚集液体、血浆中的各种分子、蛋白和骨形成相关因子如骨形态发生蛋白等物质,诱导骨形成^[14]。本实验所采用材料是一种人工合成的、可吸收的新型骨移植材料,它赋予了骨缺损填充物一种独特的 Z 电势控制的理念^[15]。该材料通过其表面的负电荷,刺激骨细胞活性,吸引新骨生成所必需的大量关键蛋白质,包括 CBFA1(一种鉴别造骨细胞的转录因子)、骨胶原 Type I(作为附着成骨细胞的固位凹槽)来引导成骨细胞附着和增生以加速骨生成。骨缺损处的组织吸收了这些蛋白质可以提高骨细胞活性,从而促进新骨生长。该材料的颗粒可以相互结合形成多孔性骨架,且具有适当的吸收率和良好的力学性能^[16]。本实验结果表明,这种新型带负电荷钙磷复合材料可以在大鼠的脊柱融合模型中产生很好的融合效果,所有待融合节段在 X 线评分、Micro CT、手触力学评定和组织学观察中都显示达到了坚强的骨性融合,有望成为一种新颖、简便且高效的骨融合材料,将为大量需要脊柱融合的患者带来福音。

参考文献:

[1] Frymoyer JW. Back pain and sciatica[J]. N Engl J Med,

1988,318(5):291-300.

- [2] Lee CK, Langrana NA. A review of spinal fusion for degenerative disc disease; need for alternative treatment approach of disc arthroplasty[J]. Spine J, 2004, 4(6): 173-176.
- [3] Bono CM, Lee CK. Critical analysis of trends in fusion for degenerative disc disease over the past 20 years influence of technique on fusion rate and clinical outcome [J]. Spine, 2004, 29(4): 455-463.
- [4] Whang PG, Wang J. Bone graft substitutes for spinal fusion[J]. Spine J, 2003, 3(2): 155-165
- [5] Zhang P, Hong Z, Yu T, et al. In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide)[J]. Biomaterials, 2009, 30(1): 58-70.
- [6] Kim HM, Chae WP, Chang KW, et al. Composite nanofiber mats consisting of hydroxyapatite and titania for biomedical applications[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2010, 94(2): 380-387.
- [7] Tyagi P, Catledge SA, Stanishevsky A, et al. Nanomechanical properties of electrospun composite scaffolds based on polycaprolactone and hydroxyapatite[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2009, 9(8): 4839-4845.
- [8] 赵光荣, 廖涛, 张绍伟. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 生物活性人工椎间支撑体治疗胸腰椎爆裂骨折 76 例临床观察[J]. 重庆医学, 2010, 39(11): 397-1398
- [9] Peterson B, Iglesias R, Zhang J, et al. Genetically modified human derived bone marrow cells for posterolateral lumbar spine fusion in athymic rats: beyond conventional autologous bone grafting[J]. Spine, 2005, 30(3): 283-289.
- [10] 郑振耀, 秦岭, 唐盛平, 等. 实验性脊柱融合术骨与植入物界面融合的评估方法[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2005, 15(7): 440-443.
- [11] Errico TJ, Gatchel RT, Schoferman J, et al. A fair and balanced view of spine fusion surgery[J]. Spine J, 2004, 4(5): 129-142.
- [12] 陈启祥. 退行性腰椎管狭窄症 65 例诊治体会[J]. 重庆医学, 2009, 38(12): 1521-1522.
- [13] 陈立今, 陈治清, 张敏. 一种新型的骨修复材料——压电陶瓷[J]. 生物医学工程学杂志, 2001, 18(4): 577-579.
- [14] 王鹏, 张晓周, 杨平, 等. 生物压电复合陶瓷 TCPLNK 对大鼠成骨细胞生物相容性的体外研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2008, 26(2): 133-136.
- [15] Smeets R, Kolk A, Gerressen M, et al. A new biphasic osteoinductive calcium composite material with a negative Zeta potential for bone augmentation [J]. Head Face Med, 2009, 5(13): 1-8.
- [16] Stein JM, Fickl S, Yekta SS, et al. Clinical evaluation of a biphasic calcium composite grafting material in the treatment of human periodontal intrabony defects: a 12-month randomized controlled clinical trial [J]. J Periodontol, 2009, 80(11): 1774-1782.