

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.23.006

T-CAM 表面修饰 n-HA/PA66 复合骨修复材料修复兔桡骨骨缺损的实验研究*

邱皓¹,董靖¹,卢公标²,卢旻鹏^{1△},曹春风¹,王群波¹,张铭华^{1△}

(1. 重庆医科大学附属永川医院骨科,重庆 402160;2. 山东省济宁市人民医院骨科 272011)

[摘要] **目的** 探讨 T-CAM 表面修饰纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66(nano-hydroxyapatite/polyamide 66, n-HA/PA66) 复合骨修复材料修复兔桡骨中段骨缺损的疗效。**方法** 选择 36 只成年新西兰大白兔,建立右桡骨中段 1.5 cm 骨缺损模型后分为两组:实验组植入 T-CAM 表面修饰 n-HA/PA66 复合骨修复材料;对照组植入 n-HA/PA66。观察术前,术后 2、4、8、12 周静脉血碱性磷酸酶(ALP)值;术后 4、8、12 周每个时间点处死 6 只兔子,进行 X 线片、大体标本观察、组织学等观察兔骨缺损愈合情况。**结果** 所有兔子术后切口均一期愈合,无死亡,无体内植入材料脱落。影像学及组织学结果表明实验组在术后 4 周就有新生骨组织,随着时间的延长,实验组新骨生长速度和数量明显优于对照组,术后 12 周 Lane-Sandhu 法 X 线片和组织学评分实验组均高于对照组($P < 0.05$);术后 2 周实验组 ALP 值开始升高,随着时间的推移,两组 ALP 值均升高,术后 8 周达最高峰,之后开始下降,在 12 周时接近于术前,静脉血 ALP 值在术后第 2、4、8 周与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** T-CAM 表面修饰 n-HA/PA66 复合骨修复材料具有促进骨质愈合的作用,尤其在早期修复骨缺损的效果优于 n-HA/PA66。

[关键词] 桡骨;碱性磷酸酶;骨折愈合;骨缺损;纳米羟基磷灰石;聚酰胺 66**[中图分类号]** R318.08**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)23-3185-03

The experimental research of T-CAM surface modification nano-hydroxyapatite/polyamide 66 composite materials repair of rabbit radius bone defect*

Qiu Hao¹, Dong Jing¹, Lu Gongbiao², Lu Minpeng^{1△}, Cao Chunfeng¹, Wang Qunbo¹, Zhang Minghua¹

(1. Department of Orthopedics, Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China;

2. Department of Orthopedics, Jining First People's Hospital, Jining, Shandong 272011, China)

[Abstract] **Objective** To discuss the efficacy of T-CAM surface modification nano-hydroxyapatite/polyamide 66 (T-CAM/n-HA/PA66) composite materials on the recovery of rabbit radius bone defect. **Methods** A total of 36 New Zealand rabbits were artificially made to be bone defect by resecting the 1.5 cm substantia ossea with periosteum of radius, and were divided into two groups averagely depending on implanted materials: experimental group (T-CAM/n-HA/PA66), control group (n-HA/PA66). The alkaline phosphatase (ALP) of venous blood was observed at preoperative and week 2, 4, 8, 12 postoperative. Every 6 rabbits were sacrificed on week 2, 4, 8, 12, and the radius healing status was observed by X-ray, histology. **Results** No rabbit was infected or died, no implant material was dropped. Gross observation, X-ray results and histology results demonstrated that the experimental group began to have a new bone tissue at 4 weeks after the operation; with the extension of time, the experimental group's new bone growth speed and the quantity were better than the those of control group. The Lane-Sandhu method X-ray score showed that there were significant differences between two groups ($P < 0.05$), as well as the Lane-Sandhu method histological score. The ALP value of experimental group began to rise at two weeks postoperative; with the extension of time, ALP value of both groups increased, peaked at 8 weeks, then began to decline, lastly close to the preoperative at 12 weeks, The ALP value at 2, 4 and 8 weeks were significant between two groups ($P < 0.01$). **Conclusion** T-CAM/n-HA/PA66 composite materials could accelerate the healing of bone defect, the effect of repair of bone defect is better than that of n-HA/PA66 artificial bone in the early.

[Key words] radius; alkaline phosphatase; fracture healing; bone defect; T-CAM nano-hydroxyapatite; polyamide 66

骨缺损的修复是困扰骨科医生的难题之一。纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 (nano-hydroxyapatite/polyamide 66, n-HA/PA66) 复合骨修复材料是课题组前期开发的具有优良的生物学性能和类骨活性的骨修复材料^[1]。T-CAM 黏附分子(Tetra-cell adhesion molecule)是包含 RGD (arginine-glycine-aspartic acid), PHSRN (proline-histidine-serine-arginine-asparagine), EPDIM (glutamic acid-proline-aspartic acid-isoleucine-methionine), YH (tyrosine-histidine) 4 个序列互补性修饰的黏附分子,能够促进细胞的黏附与扩散,动物实验表明复合 T-CAM

黏附分子的脱钙骨有良好的修复骨缺损能力^[2]。本研究将 T-CAM 黏附分子修饰于 n-HA/PA66 上,制备 T-CAM 表面修饰 n-HA/PA66 复合骨修复材料,观察其对兔桡骨中段骨缺损的修复能力,并为其应用于临床提供理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 n-HA/PA66 复合骨修复材料(材料规格:4.0 mm×15.0 mm 圆柱体)。

1.2 方法

1.2.1 T-CAM 表面修饰 n-HA/PA66 复合骨修复材料的制备

按文献[3]制备 T-CAM 黏附分子。将 n-HA/PA66 复合骨修复材料置入溶有一定量 T-CAM 黏附分子的磷酸盐缓冲液(PBS)中浸泡 24 h 后室温下风干,然后在水提取器除去未被修饰的 T-CAM,制得 T-CAM 表面修饰 n-HA/PA66 复合骨修复材料。

1.2.2 骨缺损动物模型制备及实验分组 4~6 月龄健康成年新西兰大白兔(由重庆医科大学实验动物中心提供,雌雄不限)用速眠新(3 mL/kg)麻醉后,按孟纯阳等^[4]的方法制作节段性右侧桡骨中段骨缺损模型,缺损长度 1.5 cm。将 36 只造模成功的新西兰大白兔分为两组,每组 18 只。其中,实验组植入 T-CAM 表面修饰 n-HA/PA66 复合骨修复材料(图 1);对照组植入 n-HA/PA66 复合材料。所有兔子术后均分笼饲养,每天每只肌内注射青霉素 8×10^5 U(分 2 次),稀碘伏消毒伤口(2 次/天),连续 3 d。

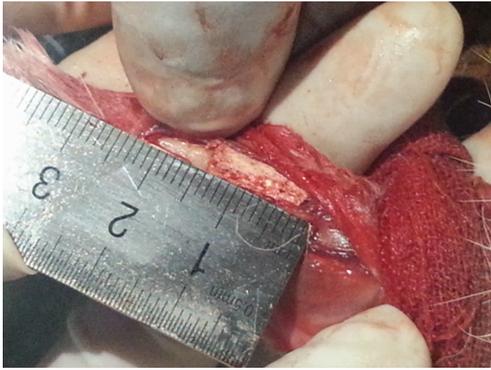


图 1 实验组术中植入材料

1.2.3 观察指标

1.2.3.1 一般情况观察 术后观察兔子的饮食、前肢功能、步态及伤口愈合情况。

1.2.3.2 血清碱性磷酸酶(ALP)测定 于术前,术后 2、4、8、12 周分别抽取静脉血检测 ALP 值。观察两组兔子血清 ALP 的变化,进行统计学分析。

1.2.3.3 影像学观察 术后 4、8、12 周行兔右桡骨 X 线片检查,观察骨折愈合情况;采用 Lane-Sandhu X 射线评分标准^[5]评估骨-材料界面骨痂形成及骨愈合情况。

1.2.3.4 大体及组织学观察 术后 4、8、12 周处死兔子,将植入材料连同两端 0.5 cm 正常骨组织取出,观察桡骨骨缺损修复情况。之后将标本置于 10% 福尔马林中固定,经脱钙,石蜡包埋,纵行切片后,行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察新生骨组织长入材料内情况及材料周围新生骨组织情况。并采用 Lane-Sandhu 组织学评分标准^[6]评估骨缺损修复情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件包进行数据的统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 术后 1 h 后兔子苏醒,可自由活动,但进食稍差;术后 3 d 内所有兔子饮食均稍差,活动少;1 周后兔子饮食明显增加;所有兔子术后切口均一期愈合。

2.2 血清 ALP 检测结果 术后 2、4、8 周时各组 ALP 均较术前显著升高,术后 2 周实验组 ALP 值开始升高,随着时间的推移,两组 ALP 值均升高,术后 8 周达最高峰,之后开始下降,在 12 周时接近于术前;静脉血 ALP 值在术后第 2、4、8 周与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.3 影像学结果 术后第 4 周,实验组骨-材料界面界面模

糊,可见骨痂形成,对照组材料与骨组织分界仍较清楚,有少量骨痂形成;术后第 8 周,实验组材料周围骨痂明显增多,材料-骨组织界面模糊,分界不清,对照组相骨痂明显较少;术后第 12 周,实验组和对照组均可见新生骨痂包裹材料,材料-骨组织界面模糊,实验组材料周围大量骨痂形成,量较对照组多。术后第 12 周 Lane-Sandhu X 线片评分结果显示实验组(10.24 ± 0.37)分,对照组(8.41 ± 0.77)分,二者比较差异有统计学意义($t = 2.147, P = 0.037$),见表 2。

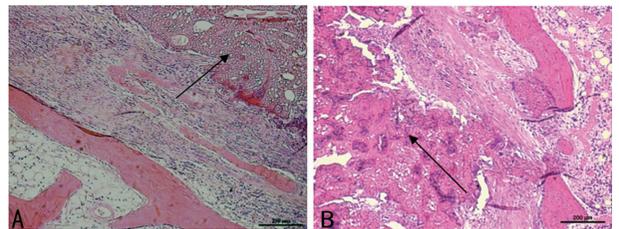
表 1 各组血清 ALP 检测结果($\bar{x} \pm s$)

时间	实验组	对照组	<i>t</i>	<i>P</i>
术前	51.78 ± 10.37	56.74 ± 13.42	3.567	0.075
术后 2 周	83.26 ± 7.38	59.98 ± 15.87	3.536	0.035
术后 4 周	121.37 ± 4.19	98.71 ± 6.57	2.732	0.041
术后 8 周	178.20 ± 14.65	149.14 ± 17.28	1.945	0.047
术后 12 周	57.37 ± 8.53	58.92 ± 11.74	3.727	0.324

表 2 各组 Lane-Sandhu X 线片评分结果($\bar{x} \pm s$, 分)

时间	实验组	对照组	<i>t</i>	<i>P</i>
术后 4 周	4.97 ± 0.83	3.14 ± 0.67	2.264	0.046
术后 8 周	8.17 ± 0.33	5.86 ± 0.41	1.784	0.026
术后 12 周	10.24 ± 0.37	8.41 ± 0.77	2.147	0.037

2.4 组织学观察结果 术后 4 周,实验组材料-骨界面可见纤维骨痂、新生血管组织及骨组织,对照组在材料-骨界面可见大量纤维组织、软骨细胞及少量新生骨组织,但未见明显新生血管组织;术后 8 周,实验组材料-骨界面可见大量新生骨组织、新鲜松质骨及新生血管组织,对照组在材料-骨界面可见纤维组织、新生血管、骨母细胞等;术后 12 周,实验组可见大量板层骨形成,骨痂塑形完好,对照组在材料-骨界面可见大量新生骨组织、密质骨,见图 2。术后第 12 周 Lane-Sandhu 组织学评分结果显示实验组(11.65 ± 0.58)分,对照组(9.33 ± 0.26)分,二者比较差异有统计学意义($t = 2.438, P = 0.031$),见表 3。



A: 实验组; B: 对照组。箭头所指为骨填充材料。

图 2 术后 12 周骨-材料界面 HE 染色(×100)

表 3 各组 Lane-Sandhu 组织学评分结果($\bar{x} \pm s$, 分)

时间	实验组	对照组	<i>t</i>	<i>P</i>
术后 4 周	4.98 ± 0.69	2.61 ± 0.83	2.483	0.027
术后 8 周	8.86 ± 0.49	5.94 ± 0.37	1.659	0.042
术后 12 周	11.65 ± 0.58	9.33 ± 0.26	2.438	0.031

3 讨论

骨缺损的修复和重建是目前骨科研究领域中的热点课题,现阶段临床上应用较为广泛的骨修复材料主要包括自体骨、自体骨和人工生物材料等。自体骨来源有限,自体骨移植可能使

患者产生免疫排斥反应,也存在伦理问题和引入外源病菌、病毒的风险。这些问题与风险促使人们研制更加先进、有效的人工骨修复材料来实现骨组织缺损的再生与重建。n-HA/PA66 复合骨修复材料因具有良好的生物力学性能、生物相容性及生物安全性,目前已广泛用于骨缺损的填充及修复,并取得了不错的临床效果^[1,5,7]。但该材料无骨诱导作用,早期成骨效果及材料-骨界面稳定性较差^[5,8]。

近年来,有学者提出将生物活性分子固定在人工合成材料表面进行修饰,为种子细胞提供黏附、增殖和分化信号的生物界面^[9]。目前,使用最广泛的是含 RGD 序列的多肽, RGD 是一类存在于多种黏附蛋白结构中的共有基序,因此将其修饰到材料表面可增强成骨细胞黏附、增殖和分化,促进 hESCs 细胞黏附、增殖及骨矿物质的合成,促进植入物周边新生骨形成,增强早期成骨标志-ALP 活性^[10-14]。然而由于缺乏附属或调节性结构域,导致 RGD 肽生物活性及 RGD 序列的功能受限^[15]。为提高生物利用度,部分学者提出在 RGD 序列周围圈定足够的功能位点,其中最重要的方法之一是核心基序 RGD 和辅助序列 PHSRN 的互补性修饰^[16]。Lee 等^[3]发现 EPDIM 和 YH 互补性修饰能够促进细胞的黏附与扩散,并在此基础上进一步合成包含 RGD, PHSRN, EPDIM, YH 4 个序列互补性修饰的 T-CAM 黏附分子,动物实验表明复合 T-CAM 黏附分子的脱钙骨有良好的修复骨缺损能力。为此,作者将 T-CAM 黏附分子复合到 n-HA/PA66 材料表面进行修饰,期望通过黏附分子表面修饰提高材料早期诱导成骨性能。

Park 等^[17]研究显示 T-CAM 表面修饰的植入材料能明显促进兔股骨植入物周边新生骨的形成。本研究结果显示,动物实验中组织学和影像学结果表明术后实验组新骨生长速度和数量明显优于对照组,显示 n-HA/PA66 材料经 T-CAM 黏附分子表面修饰后具有良好的诱导成骨效应。ALP 的表达可反应软骨及骨细胞的增生、活跃程度,ALP 结果提示术后 2 周时实验组 ALP 水平是术前的 1.6 倍,对照组 ALP 接近术前水平,说明实验组从术后 2 周开始即有成骨;4 周时实验组和对照组分别是术前的 2.0 和 1.7 倍,术后 8 周达最高峰,实验组和对照组分别是术前的 3.4 和 2.6 倍,之后开始下降,在 12 周时 ALP 水平接近于术前。这提示材料植入后 4 周骨及软骨细胞增生活跃,8 周时达最高峰,而 T-CAM 表面修饰 n-HA/PA66 复合骨修复材料的成骨效果优于 n-HA/PA66 复合材料。

综上所述,本实验结果表明,从 X 线片、大体标本及组织学观察,相对于 n-HA/PA66 复合材料, T-CAM 表面修饰 nHA/PA66 复合骨修复材料体内具有更好的成骨特性,尤其是在愈合早期,可满足局部骨缺损的修复,具有良好的临床应用前景。

参考文献

[1] 温从游,孟纯阳,蒋电明. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 复合材料的研发及应用[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(3):464-469.

[2] Park JW, Lee SG, Choi BJ, et al. Effects of a cell adhesion molecule coating on the blasted surface of Titanium implants on bone healing in the rabbit femur[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2007, 22(4):533-541.

[3] Lee JH, Park JW, Choi BJ, et al. Anorganic bone mineral coated with tetra-cell adhesion molecule enhances bone

formation in rabbit calvarial defects[J]. Key Engine Materi, 2006(309):981-984.

- [4] 孟纯阳,安洪,蒋电明,等. 网孔纳米羟基磷灰石/聚酰胺人工骨修复兔桡骨缺损[J]. 中华创伤杂志, 2005, 21(3):31-35.
- [5] 卢昱鹏,王群波,董靖,等. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66/富血小板血浆复合物修复兔股骨中段骨缺损的实验研究[J]. 重庆医学, 2015, 44(7):885-887.
- [6] Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting[J]. Orthop Clin North Am, 1987, 18(2):213-225.
- [7] Yang X, Chen Q, Liu L, et al. Comparison of anterior cervical fusion by Titanium mesh cage versus nano-hydroxyapatite/polyamide cage following single-level corpectomy[J]. Int Orthop, 2013, 37(12):2421-2427.
- [8] 梁勇. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 椎间融合器的实验研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2007.
- [9] Wang F, Li Y, Shen Y, et al. The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(7):13447-13462.
- [10] Dettin M, Zamuner A, Roso M, et al. Facile and selective covalent grafting of an RGD-peptide to electrospun scaffolds improves HUVEC adhesion[J]. J Pept Sci, 2015, 21(10):786-795.
- [11] Chien CY, Liu TY, Kuo WH, et al. Dopamine-assisted immobilization of hydroxyapatite nanoparticles and RGD peptides to improve the osteoconductivity of Titanium[J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 101(3):740-747.
- [12] Chen W, Zhou H, Weir MD, et al. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on Calcium phosphate cement-chitosan-RGD scaffold for bone repair[J]. Tissue Eng(Part A), 2013, 19(7/8):915-927.
- [13] Thoma DS, Subramani K, Weber FE, et al. Biodegradation, soft and hard tissue integration of various polyethylene glycol hydrogels: a histomorphometric study in rabbits[J]. Clin Oral Implants Res, 2011, 22(11):1247-1254.
- [14] 李长文,郑启新,郭晓东,等. RGD 多肽修饰的改性 PLGA 仿生支架材料对骨髓间充质干细胞黏附、增殖及分化影响的研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2006, 25(2):142-146, 157.
- [15] Muthiah M, Park IK, Cho CS. Surface modification of Iron oxide nanoparticles by biocompatible polymers for tissue imaging and targeting[J]. Biotechnol Adv, 2013, 31(8):1224-1236.
- [16] Gaertner FC, Kessler H, Wester HJ, et al. Radiolabelled RGD peptides for imaging and therapy[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2012, 39(Suppl 1):S126-138.
- [17] Park JW, Lee SG, Choi BJ, et al. Effects of a cell adhesion molecule coating on the blasted surface of titanium implants on bone healing in the rabbit femur[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2007, 22(4):533-541.