

基础研究

新型可注射性磷酸钙骨水泥对松质骨成骨作用的实验研究

靳安民¹, 姚伟涛¹, 张 辉¹, 王 瑞¹, 时冠军²

(1 南方医科大学珠江医院骨科 510282 广州市; 2 解放军第 155 医院 475003 河南省开封市)

【摘要】目的:研制一种新型的、可注射的磷酸钙骨水泥,并测试该骨水泥的成分、理化特性及其在松质骨内的生物降解和成骨特性,探讨该骨水泥在松质骨内的代谢情况。**方法:**根据相关文献合成一种含有 β -磷酸三钙、磷酸二氢钙、碳酸钙和纳米相羟基磷灰石的磷酸钙骨水泥,并用海藻酸钠的液相成分将该骨水泥调制成可用注射器和 16 号穿刺针操作的注射物。在新西兰大白兔的股骨髁部钻取直径为 2mm 的骨洞,注入该骨水泥。在术后 4、8、12、16 周分别取标本,骨脱钙后石蜡包埋并行 HE 染色,光镜下观察该骨水泥在松质骨内的降解及新骨再生情况。扫描电镜观察骨-骨水泥界面的超微结构。**结果:**采用 Gillmore 双针法测试该型骨水泥的初凝时间为 25~30min,终凝时间为 17~20h,扫描电镜发现该骨水泥的颗粒较小、孔隙率较高。术后切片见骨水泥在松质骨内相容性良好。4 周时骨水泥在体内开始降解,12 周为降解反应的高峰期,16 周降解反应基本完成,降解同时有大量的骨小梁生成。**结论:**该型磷酸钙骨水泥可操作性强、生物相容性好、具有骨传导和骨诱导作用,有望成为老年骨质疏松性椎体压缩骨折治疗中较好的填充剂。

【关键词】可注射性磷酸钙骨水泥;松质骨;骨替代;动物实验

中图分类号:R318.06 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-01-0038-04

An experimental study of a new injectable calcium phosphate cement in cancellous bone osteogenesis/JIN Anmin, YAO Weitao, ZHANG Hui, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(1): 38~41

【Abstract】 Objective: To develop a new and injectable calcium phosphate cement (CPC) and to investigate its components, physicochemical and biological characters in cancellous bone. **Method:** The cement was mainly composed of β -tricalcium phosphate (β -TCP), dicalcium phosphate anhydrous (DCPA), calcium carbonate and hydroxyapatite (HA) in nano-grade. Sodium alginate solution was added in to the cement in order to make it could be injected through a 16-gauge needle. The cement was injected into cylindrical defects (2mm in diameter) in the femoral condyles of New Zealand rabbits. And specimens were harvested in 4 to 16 weeks after operation, which were then decalcified, embedded in paraffin and cut into 10 μ m sections, stained by hematoxylin and eosin for histopathologic examinations. At the same time, the specimens was cut and observed by scanning electron microscope (SEM) for ultrastructures. **Result:** The initial and final setting time was 25~30 minutes, 17~20 hours respectively by Gillmore needles at 37 $^{\circ}$ C and 100% moisture. Small particles and large lacunae in the interface were seen by scanning electron microscope (SEM). The histological study indicated that the cement had excellent compatibility in cancellous bone, which degraded from 4 weeks, reached climax in 12 weeks and terminated in 16 weeks after operation. At the same time, much more new trabeculae bone were formed when the cement disappeared. **Conclusion:** The new cement has the characters such as injectable, biocompatible, osteoconductive and osteotransductive, which might be a candidate material for use as a bone substitute in the treatment of osteoporosis and vertebral compression fractures (VCFs).

【Key words】Injectable calcium phosphate cement (ICPC); Cancellous bone; Bone substitute; Animal study

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Zhu Jiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, 510282, China

基金项目:广东省科技计划项目资助课题(项目编号 20034369)

第一作者简介:男(1952-),主任医师,教授,医学硕士,研究方向:脊柱脊髓损伤

电话:020-61643250 E-mail: ywtwhm@163.com

老年骨质疏松性椎体压缩骨折等已成为我国老年人的常见病、多发病。传统的治疗方法多是卧床休息、腰部外固定支架及口服补钙药物。近年来采用向疏松及骨折椎体内灌注骨水泥即椎体成形

术的方法,不但稳定了病变椎体,而且起到了明显的止痛作用^[1]。临床上常用的骨水泥是聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA),其生物相容性差,不能与骨组织牢固结合,易松动。近年来又提出“骨水泥病”的概念,即 PMMA 聚合时释放大量的热量,可将周围的活性组织杀死;毒性单体的释放和 PMMA 碎屑的作用使细胞生长、DNA 合成和糖代谢等受到抑制等。此外 PMMA 还可引起过敏、局部组织抗感染能力下降、致肿瘤等不良反应。虽然人们对 PMMA 骨水泥进行了一系列改进:如加入生物活性的无机颗粒,加入纤维增强的高分子骨粘接剂等,但其机械性能却快速减弱。我们根据既往的研究,自行研制了一种新型、可注射性磷酸钙骨水泥,对其自身性状、在松质骨内的降解和成骨等进行研究,以期椎体成形术提供更好的填充材料。

1 材料与方法

1.1 β -磷酸三钙的制备与鉴定

β -磷酸三钙(β -TCP)主要采用高温煅烧的方法制备,即将分析纯的无水磷酸氢钙和分析纯的碳酸钙按 2:1 的比例混合均匀后,在高温炉中逐步升温($200^{\circ}\text{C}/\text{h}$)至 900°C ,保温 2h,冷却后取出。采用 X 光衍射图(XRD,华南理工大学)鉴定煅烧后的产物。

1.2 磷酸钙骨水泥的制备、性能测试与鉴定

磷酸钙骨水泥主要由固、液双相组成。固相成分为一定比例的 β -TCP、磷酸二氢钙、碳酸钙和纳米相羟基磷灰石(图 1)构成;液相成分为含 0.8%藻酸钠、 $\text{pH}=7.4$ 的 $0.25\text{M Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液。并用不含藻酸钠的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液作为对照。

将骨水泥注入直径为 2cm、高 2cm 的模具内,放入温度为 37°C 、湿度为 100% 的恒温箱内,并采用 Gillmore 双针法^[2]测定该型骨水泥的初凝时间与终凝时间。

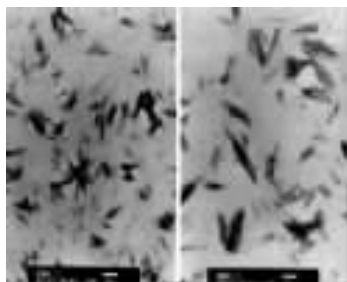


图 1 纳米相羟基磷灰石的电镜图,颗粒直径小于 10nm

将该骨水泥注入 37°C 水浴的林格氏液中,放置 48h 后用 XRD 测试其组成成分,验证反应的终产物。将终产物研磨后固定,表面喷金,扫描电镜观察终产物的颗粒与孔径大小。

1.3 骨水泥的灭菌

将固相成分称重、混匀、研磨成粉状,放入环氧乙烷中灭菌,并分袋包装;同样方法处理藻酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和氢氧化钠,在超净台上用双蒸水配置出含 0.8%藻酸钠、 pH 为 7.4 的 $0.25\text{M Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液,密封。

1.4 动物模型的制备

选取 12 只新西兰大白兔,随机分为 4 组。腹腔注射戊巴比妥钠($40\text{mg}/\text{kg}$)麻醉后,取俯卧位,双下肢脱毛、肥皂水刷洗,碘酒、酒精消毒。在兔大腿下端的后外侧切口、分离股外侧肌并显露双侧股骨下段,沿垂直于股骨纵轴的方向在股骨髁钻取直径为 2mm 的骨洞(保留对侧骨皮质,防止下肢骨折及骨水泥外漏),纱布压迫止血。将固液相按 1:0.6(g:ml)的比例调配好的骨水泥用刮勺放入 5ml 的注射器内,将 16 号腹穿针插入左侧骨洞内,采用边注射边后退的方法向股骨髁松质骨内注入该骨水泥约 1ml。右侧骨洞注射 PMMA 骨水泥作为对照。再次止血(如出血明显可在洞口用骨蜡止血)后缝合伤口。术后放珠江医院动物饲养中心统一喂养。

1.5 标本的收集与固定

术后 4、8、12、16 周时处死对应观察组的大白兔,切取双侧股骨髁,放入 4%的多聚甲醛内固定。

1.6 病理学检查

固定后的标本用 10%的硝酸浸泡脱钙后,依次脱水、透明,石蜡包埋后,沿平行于股骨纵轴的方向切取股骨髁(片厚 $10\mu\text{m}$),烘干后脱蜡,常规 HE 染色,在光学显微镜下观察周围组织的反应、骨水泥的代谢和成骨情况。

1.7 超微结构观察及能谱分析

标本固定、脱钙后(同上),将股骨髁纵向剖开,磷酸缓冲液逐级浸泡,30%~100%乙醇逐级脱水,临界点干燥,真空喷金,日立 X-560 型扫描电镜下观察骨-骨水泥界面的情况及超微结构。

2 结果

采用 X 光衍射图(XRD)分析煅烧后及骨水泥反应后的产物,证实主要为 β -磷酸三钙(图 2)。

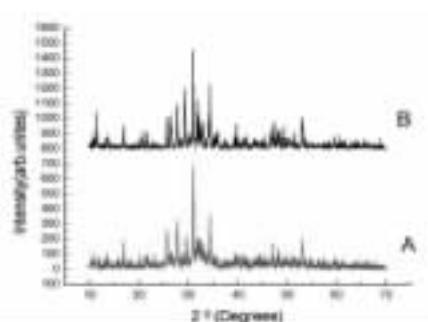


图2 A为 β -TCP,B为骨水泥终产物的XRD图

固液相在混合比例为1:0.6(g:ml)时可用注射器和16号穿刺针在无阻力的情况下注射,注射入水内不发生崩解,且不影响骨水泥的凝固。不含藻酸钠的骨水泥固液比为1:0.3(g:ml),但粘度较高,注射困难。Gillmore双针法证实骨水泥的初凝时间和终凝时间分别为25~30min和17~20h。因此较传统的PMMA骨水泥有充分的操作时间。不含藻酸钠的骨水泥初凝时间、终凝时间分别为15min、6h。骨水泥的终产物在扫描电镜观察可见颗粒直径约5~30 μ m,颗粒间的孔隙约10~50 μ m,且结构较为松散(图3,后插页I)。不含藻酸钠的骨水泥颗粒较为粗大10~100 μ m,孔隙较小,结构紧密(图4,后插页I)。

大白兔术后无死亡及伤口感染等并发症的发生。术后4周时X线片见骨水泥的影像明显(图5,后插页I)。术后早期(4周)骨-骨水泥交界处未见明显的炎症细胞,且骨水泥可向松质骨内较远部位渗透,说明该骨水泥与骨组织结合较为紧密,且其组织相容性良好。在骨-骨水泥交界处形成明显的降解带(图6,后插页I),说明该骨水泥在松质骨内易于降解,且其降解过程是骨的爬行替代过程(creeping substitution)。该骨水泥的降解是由周围的类骨细胞、成纤维细胞、巨噬细胞或破骨细胞(Osteoblasts)等参与的(图7,后插页I)。术后12周时,在降解的骨水泥周围形成新的骨小梁和类骨质(图8,后插页I),术后16周时骨水泥降解基本完成,且有大量的新生骨小梁形成(图9,后插页I)。说明该骨水泥在松质骨内不但具有骨传导性(osteoconductive),而且具有骨诱导活性(osteotransductive)。而对照组术后早期在骨水泥周围形成炎症反应,2~3个月时在骨-骨水泥交界部位形成一纤维带,未见新骨形成。扫描电镜观察:骨水泥填充股骨髁4周时,在骨-骨水泥交接

部位新生的纤维状组织将骨水泥分割为不同的区域(图10,后插页I);随着骨水泥降解反应的进一步发展,新生的纤维状组织增多,其周围钙盐沉积、钙化,并形成骨基质(图11,后插页I)。

3 讨论

磷酸钙作为一种骨缺损的填充材料已有100多年的历史,但由于吸收过快限制了它在临床的应用。Brown和Chow根据 β -磷酸钙和羟基磷灰石等不同物质有不同的降解速率,将几种钙磷产物混合后研制出一种磷酸钙骨水泥——Bone Source。但该骨水泥粘度高,注射困难,且在体内易崩解,因此主要用于颅骨修补术。随着人们对各种钙磷反应物的不断深入研究,发现将不同的磷酸钙盐混合后,可控制其在体内的降解速率,即骨水泥的可控性生物降解作用。同时在骨水泥中加入添加剂可使其粘度显著降低,并易于注射。这种可注射性磷酸钙骨水泥是近年来研究并开发的一种新型骨水泥,具有无毒副作用、凝固时不产热、组织相容性好、体内可降解吸收、降解同时可诱导新骨形成等优点^[3]。Lim等^[4]在完整的胸腰椎骨质疏松椎体标本内注射PMMA骨水泥、磷酸钙骨水泥等,结果证实椎体的抗压强度(load to failure)、硬度(stiffness)均得到明显恢复,且二者无明显差异。虽然各种体外实验均证实磷酸钙骨水泥在椎体成形术中均有良好的填充作用,但骨水泥最终的生物力学强度主要取决于该种骨水泥在体内转化为正常骨组织的多少及其强度,即骨水泥的成骨作用。国内外有关可注射性磷酸钙骨水泥在体内降解和成骨作用的报道较少,我们在这一方面进行了研究。

3.1 骨水泥中各种成分的作用

以往的研究证实^[5],磷酸钙骨水泥中各种成分的构成与配比不但决定了骨水泥的自身理化性质,而且直接影响了其在体内的降解速率和成骨作用。其中羟基磷灰石(hydroxyapatite)和磷酸三钙(tricalcium phosphate)是影响骨水泥降解速率的决定性因素。本实验采用 β -TCP和纳米相的羟基磷灰石作为骨水泥的主要成分之一,旨在加快骨水泥的降解与吸收,避免材料长时间滞留而影响新骨的塑形,同时减小注射物颗粒的大小,以降低材料的粘度。磷酸钙骨水泥在体内的化学反应过程主要是: β -TCP中的 Ca^{2+} 与固化液中的羧酸

根形成络合物——羟基磷灰石颗粒, 其中羟基磷灰石在该反应中起催化剂的作用, 并形成络合中心。因此小颗粒的羟基磷灰石可加速反应进程, 并使反应进行得更加充分。

骨水泥液相成分中的磷酸二氢钠是初凝和终凝时间的决定性因素, 目前研究证明快凝固型骨水泥(Fast-setting CPC, FSCPC)是采用 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 的调和液作为促凝剂, 调整其 pH 值在 37℃时为 7.4, 表现为固化时间明显缩短, 仅为 5~7min。同时, 如果将磷酸二氢钠的浓度由 4%降为 2%, 骨水泥的凝固时将显著延长^[6]。添加剂的作用: ①磷酸二氢钙。磷酸二氢钙在 pH 为 7.4 时溶解度为 β -TCP 的 8 倍, 为羟基磷灰石的 15 倍, 二者联合应用后, 磷酸二氢钙可被新骨降解替代, 磷酸钙颗粒则成为新骨塑形的支架, 形成“浸入式支架效应 (inverse scaffolding effect)^[7]”。②碳酸钙。 CO_3^{2-} 是正常骨的无机成分之一, 在骨水泥中加入碳酸钙, 使部分 CO_3^{2-} 取代 PO_4^{3-} , 这种骨水泥叫作“碳化磷灰石 (Carbonated apatite)^[8]”, 碳酸盐基的 CPC 比单纯 CPC 具有更好的生物相容性, 而且可有效地提高骨水泥的机械强度并改善临床的操作性能。LeGeros 等^[9]研究发现, 碳酸钙的加入可使骨水泥的结晶颗粒变小, 体内溶解度增加, 从而利于新生骨的替代。③藻酸钠。藻酸钠与溶液中的钙离子结合形成藻酸钙凝胶, 可防止水对骨水泥的浸泡和侵蚀, 从而避免骨水泥在液体中的崩解; 同时藻酸钠的加入使骨水泥的粘度显著下降, 便于操作; 藻酸钠的加入还可提高骨水泥生成产物的孔径率, 增加其韧性。我们所用的藻酸钠含量为 0.8%, 虽然使骨水泥的凝固时间有所延长, 但由于使生成产物的颗粒变小, 粘度降低, 孔径率增加, 从而实现了加快骨水泥降解的进程。

3.2 骨水泥在松质骨内的降解与成骨作用。

本研究证明, 该骨水泥在松质骨内可逐步降解, 且降解的同时有新的骨小梁形成, 最终形成大面积的新生小梁骨。新骨形成的方式主要是爬行替代^[7], 而不是由纤维组织转化为骨组织的过程, 说明该骨水泥在治疗脊柱骨质疏松中是一种理想的骨填充材料。研究表明, 骨水泥的降解发生在骨-骨水泥的交界部位。降解及成骨的机理^[10]可能是交界部位的骨水泥降解后形成含 Ca^{2+} 的水解

层, 诱导并粘附破骨、成骨细胞等的吸附, 促进其活化, 加速骨细胞及骨基质的形成, 从而形成新骨。术后 16 周骨水泥基本降解完全, 并有新生的骨小梁形成, 这与骨折的愈合及新骨形成速度是一致的。

本实验在组织学上证实了该种可注射性磷酸钙骨水泥在松质骨内的降解性和成骨作用, 但由于该骨水泥仅用于兔股骨髁的实验研究, 其在人体内的最终降解和成骨作用尚需进一步研究。

4 参考文献

1. Ledlie JT, Renfro MJ. Balloon kyphoplasty: one-year outcomes in vertebral body height restoration, chronic pain, and activity levels[J]. Neurosurg, 2003, 98(1): 36-42.
2. Driessens FCM, Boltong MG, Bermudez O, et al. Formulations and setting times of some calcium orthophosphate cements—a pilot study[J]. J Mater Sci Mater Med, 1993, 4(2): 503-508.
3. Ooms EM, Wolke JG, Van der Waerden JP, et al. Trabecular bone response to injectable calcium phosphate (Ca-P) cement [J]. J Biomed Mater Res, 2002, 61(1): 9-18.
4. Lim TH, Brebach GT, Renner SM, et al. Biomechanical evaluation of an injectable calcium phosphate cement for vertebroplasty[J]. Spine, 2002, 27(12): 1297-1302.
5. Manjubala I, Sivakumar M, Sureshkumar RV, et al. Bioactive and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition[J]. J Biomed Mater Res, 2002, 63(2): 200-208.
6. Barralet JE, Gaunt T, Wright AJ, et al. Effect of porosity reduction by compaction on compressive strength and microstructure of calcium phosphate cement [J]. J Biomed Mater Res, 2002, 63(1): 1-9.
7. Giese A, Wieling R, Böhner M, et al. Resorption patterns of calcium-phosphate cements in bone [J]. J Biomed Mater Res, 2003, 66A: 532-540.
8. Khairoun I, Magne D, Gauthier O, et al. In vitro characterization and in vivo properties of a carbonated apatite bone cement[J]. J Biomed Mater Res, 2002, 60(4): 633-642.
9. LeGeros RZ, Skakae T, Bautista C, et al. Magnesium and carbonate in enamel and synthetic apatites [J]. Adv Dent Res, 1996, 10(2): 225-231.
10. Lu J, Descamps M, Dejou J, et al. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone [J]. J Biomed Mater Res, 2002, 63(4): 408-412.

(收稿日期: 2004-05-27 修回日期: 2004-08-30)

(英文编审 王忠植)

(本文编辑 卢庆霞)