

聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨 复合人工骨的体外降解

周磊, 闫景龙, 胡春杰(哈尔滨医科大学附属第一医院骨四科, 黑龙江省哈尔滨市 150081)

周磊, 男, 1974年生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族, 哈尔滨医科大学在读博士, 主治医师, 主要从事骨组织工程学的研究。 huchunjie2008@yahoo.com.cn

通讯作者: 闫景龙, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 哈尔滨医科大学附属第一医院骨四科, 黑龙江省哈尔滨市 150081

国家自然科学基金资助项目(30371441)

收稿日期: 2006-04-15

修回日期: 2006-07-31

摘要

目的: 观察聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨复合材料的体外降解特性。

方法: 实验于2005-02/10在哈尔滨医科大学附属第一医院动物实验中心完成。①取兔髂骨制成直径300~500 μ m的微小颗粒骨。②分别按质量比聚磷酸钙纤维:磷酸钙骨水泥:微小颗粒骨=1:4:4(聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组)和磷酸钙骨水泥:微小颗粒骨=1:1(磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组)制成两组生物复合材料。③通过扫描电镜观察复合材料的孔径并计算孔隙率。④进行体外降解实验,将两组复合材料置于pH值7.4的磷酸盐缓冲液中,观察复合材料在降解液中失重率的变化,降解液pH值的变化及在不同降解时间复合材料生物力学的变化。

结果: ①两种复合材料孔隙率及溶液pH值、降解质量变化:聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨复合材料孔隙率为72.1%,孔径为100~400 μ m,降解过程中pH值稳定,4周内质量变化较小,4周后下降较快,12周时为初始质量的50%;磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组复合材料孔隙率为58.2%,孔径50~300 μ m,降解过程中pH值有轻度变化,6周内质量变化较小,6周后下降较快,12周时为初始质量的70%。②两种复合材料在降解过程中生物力学性能的变化:聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨复合材料初始抗压强度9.28MPa,磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨复合材料初始抗压强度为6.21MPa,两者差异有显著性($P<0.05$);聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/颗粒骨强度在0~4周下降较慢,4周后下降较快,12周时为0.18MPa,磷酸钙骨水泥/颗粒骨强度均匀下降,12周时为0.24MPa。

结论: 聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨具有良好孔隙率、孔径和降解性能,可能成为一种新型治疗骨缺损材料。

关键词: 磷酸钙类; 骨代用品; 生物降解

Degradation of bone repairing composite of calcium polyphosphate fiber/calcium phosphate cement/ micromorselized bone *in vitro*

Zhou Lei, Yan Jing-long, Hu Chun-jie

Fourth Department of Orthopedics, First Hospital Affiliated to Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China

Zhou Lei, Studying for doctorate, Attending physician, Fourth Department of Orthopedics, First Hospital Affiliated to Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Yan Jing-long, Doctor, Chief physician, Professor, Tutor of doctor, Fourth

Abstract

AIM: To explore the degradation characteristics of composite of calcium polyphosphate fiber (CPPF), calcium phosphate cement (CPC) and micromorselized bone *in vitro*.

METHODS: The experiment was conducted in the Central Laboratory of Animal Experiment in the First Hospital Affiliated to Harbin Medical University from February to October 2005. ① The rabbit iliac bone was made into micromorselized bone with the diameter of 300-500 μm . ② Two groups of biochemical composite were made respectively according to the mass-ratios of CPPF/CPC/micromorselized bone at 1: 4: 4 (CPPF group/CPC group/micromorselized bone group) and that of CPC/micromorselized bone at 1:1 (CPC group/micromorselized bone group). ③ The porosity was calculated by studying the pore diameter of composite under scanning electron microscope. ④ *In vitro* experiment of degradation, two groups of composite were put into the phosphate buffered solution (PBS) (pH 7.4) respectively to study the changes in weight-loss ratio of composite in degradation liquid as well as the changes in pH value of degradation liquid and the biomechanical changes in composite at different time-points.

RESULTS: ① Changes in porosity, pH value and mass of degradation of both kinds of composites: The porosity of composite of CPPF/CPC/micromorselized bone was 72.1% with the pore diameter of 100-400, and the pH value was constant while degradation. The mass changed little within 4 weeks and decreased rapidly after the 4th week, which was 50% of the initial mass in the 12th week. The porosity of compound materials of CPC/micromorselized bone was 58.2% and was 50-300 μm in the gap diameter with slight changes in pH value, and the mass changed little within 6 weeks, which decreased rapidly after 6 week, and was 70% of the initial mass in the 12th week. ② Biomechanical changes in composite of two groups in the degradation: the primary biomechanical strength was 9.28MPa in CPPF/CPC/micromorselized bone and was 6.21MPa in CPC/micromorselized bone, and there was significant difference between them ($P < 0.05$). The strength of CPPF/CPC/micromorselized bone decreased slowly within 4 weeks, then decreased obviously after 4 weeks, which was 0.18MPa in the 12th week, while the strength of CPC/micromorselized bone decreased symmetrically and was 0.24MPa in the 12th week.

CONCLUSION: The composite of CPPF/CPC/micromorselized bone is a new bone repair material, which is suitable for bone tissue engineering for its good characteristics of porosity, pore diameter and degradation.

背景资料:

研制理想的复合人工骨修复骨缺损已成为骨科领域的一个重要课题。临床上急需研制出能满足临床力学要求, 具有良好生物相容性、可塑性、降解性能的复合人工骨。受纤维增强理论启发而设计出的复合人工骨, 希望能为骨缺损修复提供新思路。目前, 微小颗粒骨的研究为国内外首创, 聚磷酸钙纤维与骨水泥和成骨物质复合构建组织工程骨尚未见报道。

应用意义:

受纤维增强原理及骨组成与结构的启发, 以磷酸钙骨水泥为基体, 聚磷酸钙纤维为增强剂, 构建聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨复合人工骨, 为临床上骨缺损修复探索了一种新方法, 且该复合人工骨制作容易, 材料易于获得, 更重要的是, 该支架基本能满足临床需要, 因此具有很好临床应用前景及社会价值。

专家评价:

复合人工骨是目前组织工程与重建医学研究的热点之一。本篇论文将聚磷酸钙纤维与骨水泥复合, 从而提高人工骨的强度等方面的性质, 选题具有一定的先进性。

0 引言

近年来, 随着组织工程学的发展, 研制理想的人工生物材料复合人工骨修复骨缺损已成为

骨科及生物材料科学领域的一个重要课题。磷酸钙骨水泥作为一种新型人工骨替代材料，成为生物医学材料领域的热点课题。但由于该材料强度低、脆性大、柔韧性不够，降解困难，使其应用受到限制。因此合成一种新型复合材料，使其具有较高强度、良好生物相容性、可降解性及诱导成骨的能力，成为一个亟待解决的问题。受纤维增强原理及微小颗粒骨成骨优点的启发，本文选取生物相容性较好的聚磷酸钙纤维为增强材料，以磷酸钙骨水泥为基体，复合微小颗粒骨，制备聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨复合人工骨，并对其体外降解特性进行研究^[1]。

1 材料和方法

设计：对比观察。

单位：哈尔滨医科大学附属第一医院骨四科。

材料：实验于2005-02/10在哈尔滨医科大学附属第一医院动物实验中心完成。聚磷酸钙纤维：聚磷酸钙纤维单根纤维直径为 $(15.0 \pm 1.2) \mu\text{m}$ ，长25cm，弹性模量 $(48.0 \pm 7.6) \times 10^9 \text{N/m}^2$ ，拉伸强度 $(1.0 \pm 0.2) \times 10^9 \text{N/m}^2$ 。兰州交通大学复合材料研究所合成；磷酸钙骨水泥：上海瑞邦生物材料有限公司。四五个月龄新西兰大耳白兔，体质量2.2~2.5kg，雌雄不限（哈尔滨医科大学附属第一医院动物实验中心提供）。

设计、实施、评估者：设计为第一、二作者，实施为第一、三作者，由第二作者进行评估，均受过相关培训。

方法：

微小颗粒骨的制备：切取兔一侧髌骨，去除骨膜及软骨，置于生理盐水中，完全浸泡髌骨，以直径4mm的钻头低速研磨，使髌骨在生理盐水中磨制成微小骨粒，然后将混有此种骨粒的生理盐水用网孔直径为 $500 \mu\text{m}$ 的丝网进行筛选，最后将筛选后混有微小颗粒骨的生理盐水在离心机中以3000r/min离心5min，弃去上清，即得到直径 $300 \sim 500 \mu\text{m}$ 的颗粒骨。

复合人工骨的制备：分别将剪成2.0~3.0mm长聚磷酸钙纤维、磷酸钙骨水泥、微小颗粒骨按质量比1:4:4（聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组），磷酸钙骨水泥与微小颗粒骨按1:1均匀复合（磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组）并加少许固化液，使之呈均匀稠厚糊状，填入自制的模具内，制成长15mm，直径4mm圆柱人工骨，37℃真空干燥48h，聚乙烯膜封装，环氧乙烷消毒，贮-80℃冰箱备用。

检测指标：①复合材料的电镜观察：扫描电镜观察复合材料的孔径，计算孔隙率^[2]。②复合材料pH值变化：将聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨复合材料及磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨复合材料各36块分为6组，每组6块，每块置于装有50mL37℃pH值7.4的磷酸盐缓冲液的容器中，分别于每周末用pH计测pH值1次。③复合材料体外降解质量变化：144个容器分别加入50mL37℃、pH值7.4的磷酸盐缓冲液中，并分别加入一个已知质量的聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组或者是磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组复合材料样品，7d更换液体1次，分别于每周末各取6个样品，滤纸除去表面水分，真空干燥3d，计算失重百分率= $[(\text{初重}-\text{现重}) / \text{初重}] \times 100\%$ 。④复合材料压缩强度测试：在哈尔滨工业大学进行，分别于每周末各取6块样品，在德国Zwick 2010型试验机上测其抗压极限强度。

主要观察指标：①复合材料扫描电镜观察及孔隙率的测定结果。②两组复合材料溶液pH值变化。③两组复合材料降解质量变化。④复合材料在降解过程中生物力学性能的变化。

统计学分析：由第一作者应用SPSS 10.0软件进行配对t检验处理， $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 复合材料扫描电镜观察及孔隙率的测定结果：见图1。聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组复合材料：孔径 100~400 μm ，孔隙率 72.1%；磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组复合材料：孔径 50~300 μm ，孔隙率58.2%。

图1聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组复合材料扫描电镜观察

2.2 两组复合材料溶液pH值变化：见图2。聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组复合材料溶液在12周降解过程中pH值变化不明显，4周时最低为7.0，10周时最高为8.2。磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组复合材料溶液在12周降解过程中pH值变化略大于聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组，4周时降至最低约6.6，12周时最高为8.1。

2.3两组复合材料降解质量变化：见图3。聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组质量在4周内变化较小，4周后下降较快，12周时为初始质量的50%；磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组质量在4周内变化较小，4周后下降较快，12周时为初始质量的70%。

2.4复合材料在降解过程中生物力学性能的变化：见图4。初始抗压强度；聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组为9.28MPa，磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组为6.21MPa，两者有统计学意义($P<0.05$)，聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组4周内下降较小，4周后下降逐渐加快，12周时为0.18MPa；磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组4周内下降也较小，4周后逐渐下降，但下降幅度小于聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨组，12周时为0.24MPa。

3 讨论

支架材料作为组织工程研究的人工细胞外基质，是组织工程研究的一个重要方面。它不仅具有保持原有组织形状的作用，而且还起到模板作用。为细胞提供赖以寄宿、生长、分化和增殖的场所，引导受损组织的再生和控制再生组织的结构，更重要的是支架会影响种子细胞的生物学特征和培养效率，并且决定移植后能否与受体很好地结合在一起，发挥其修复缺损的作用^[3-5]。故组织工程研究中缺乏理想的细胞外基质材料一直是限制组织工程发展的“瓶颈”。骨组织工程细胞支架材料的要求有^[6-8]：①良好的生物相容性、无毒、不致畸，利于种子细胞黏附、增殖、生长和分化，降解产物对细胞无毒，不会引起局部炎症反应。②良好的生物降解性。基质材料在完成支架作用后能降解，降解速度应与组织细胞生长速度相适应，降解时间能根据组织生长特性进行调控。③具有三维立体多孔结构，孔隙率最好达90%以上，且有很高的面积体积比。高孔隙率和较大的面积体积比利于细胞黏附生长、细胞外基质沉积、营养和氧气进入、代谢产物排出、以及血管和神经长入。④具有可塑性和较好的机械强度，可预先制作成一定形状，并具有一定的机械强度，为新生组织提供支撑，能保持一定的时间直至新生组织具有自身生物力学特性。⑤材料表面微环境利于细胞黏附、增殖，能激活细胞特异基因表达，维持细胞正常表达。

作为一种骨替代材料，磷酸钙骨水泥受到学者们广泛关注，其具有许多优点，如体温条件下自然固化，且为等温固化，对周围组织无损伤，能任意塑型，具有良好的生物相容性和生物

安全性，一定的抗压强度及可生物降解等。靳安民等^[9]将磷酸钙骨水泥用于兔股骨髁骨缺损处，研究其在松质骨内的降解及成骨作用，取得满意疗效。但磷酸钙骨水泥脆性大，强度低、降解缓慢限制了其应用。为克服这些缺点，学者们通过向磷酸钙骨水泥中添加某些物质来改进其性能，Xu等^[10, 11]向磷酸钙骨水泥中加入可吸收的PLG纤维，使其力学性能明显提高，但PLG纤维降解时产生酸性降解产物，易引起局部炎症反应，不利于成骨。

聚磷酸钙纤维的出现，为我们制备理想的人工骨复合材料提供了新思路。研究表明聚磷酸钙纤维的化学成份是与入骨矿物质相近的磷酸钙和磷酸二氢钙，具有良好的生物相容性、生物安全性、可降解性。力学性能优于高分子材料（聚L-乳酸、聚羟基乙酸）纤维和碳纤维，可用于骨水泥的增强及制备有机与无机复合物植入材料。

纵观骨修复过程，不难发现，生长因子在此过程中发挥重要作用，其产生与否和量的多少均受到各种正负反馈机制和一些未知机制的调节，由此可见，单一因子往往不能，或不能充分发挥其生物学效应。颗粒骨本身含有多种骨生长因子，其诱导成骨作用已有报导^[12-14]。所以，作者采用聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/颗粒骨复合制备人工骨，研究表明，此复合材料既克服了单纯颗粒骨松散、易溃散的缺点，又克服了磷酸钙骨水泥脆性大、抗压强度低、降解缓慢的缺点，同时该复合材料表现出良好的生物学性能。

从聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨复合材料的降解看，12周的降解过程中，pH值基本维持稳定，略偏碱性，这是有利于成骨的环境，同时避免了炎症反应的发生。

孔径和孔隙率是三维多孔材料的两个重要评价指标，备受学者关注。一般认为孔径 $<100\mu\text{m}$ ，不利于骨细胞长入。Jone等^[15]报告，以孔径 $>100\mu\text{m}$ 的生物活性玻璃为组织工程支架取得满意结果，孔隙率大有利于提高比表面积，利于细胞长入，但降低了力学强度，本实验中聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/颗粒骨复合材料孔径为 $100-400\mu\text{m}$ ，孔隙率为72%，当孔隙率 $>50\%$ 以后，孔隙间可相互连通，新生组织也可从多孔材料表面“爬行”向孔内生长^[16]，是组织快速长入的重要因素。

从聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨复合材料的降解看，12周的降解过程中，pH值基本维持稳定，略偏碱性，这是有利于成骨的环境，同时避免了炎症反应的发生。

聚磷酸钙纤维的加入增强了材料初始力学强度，也延迟了降解时力学强度的下降，避免了过早塌陷，有利于保持空间结构，尤其在降解早期为骨细胞的长入提供了较好的空间支持，而在后期质量的快速丢失又减少了材料对细胞增殖空间的阻碍。支架材料随时间延长而逐渐降解，聚磷酸钙纤维的降解产物为钙离子和磷酸根离子，随着钙离子和磷酸根离子释放，营造了一个利于成骨的微环境，引导骨组织长入，钙离子和磷酸根离子沉积到纤维上，对骨基质起钙化作用，促进新骨生成，且这一过程与骨组织中基质钙化过程相似。另外，复合材料中的聚磷酸钙纤维束缚住了磷酸钙骨水泥颗粒防止其移位，使纤维血管组织和骨组织长入，为骨生长提供支架。前期研究也表明，骨创伤早期，骨断端释放大量内源性诱导因子促进骨生长，5周后内源性诱导因子急剧减少，此时材料快速降解，颗粒骨为局部提供足够外源性骨诱导因子促进骨愈合。

虽然聚磷酸钙纤维/磷酸钙骨水泥/微小颗粒骨复合材料有诸多优点，但与理想支架材料的要求尚有较大差距，随着研究的不断深入，复合支架材料的性能会越来越理想。

4参考文献

1. 徐立新，石宗利，史雪婷，等. CPP/TCP骨水泥复合材料研究[J]. 兰州大学学报，2004，40（3）：22-5
2. 石桂欣，王身国，贝建忠. 聚如酸与聚乳酸-羟基一算多孔细胞支架的制备及孔隙的表征[J]. 功能高分子学报，2001，14（1）：7-10
3. 颜文龙，孙恩杰，郭海英，等. 组织工程支架材料[J]. 上海生物医学工程，2004，25

- (1) : 51-4
4. Gross KA, Rodriguez-Lorenzo LM. Biodegradable composite scaffolds with an interconnected spherical network for tissue engineering. *Biomaterial* 2004;25:4955-62
 5. 钟锐, 邱凯, 万昌秀. 骨组织工程支架材料生物陶瓷的研究进展[J]. *医疗卫生装备*, 2005, 26 (4) : 26-8
 6. Lin AS, Barrows TH, Cartmell SH, et al. Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds. *Biomaterials* 2003; 24 (3):481-9
 7. Li S, De Wijn JR, Li J, et al. Macroporous biphasic calcium phosphate scaffold with high permeability/porosity ratio. *Tissue Eng* 2003; 9(3):535-48
 8. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* 2003; 24(13):2161-75
 9. E. Sachlos, N. Reis, C. Ainsley, et al. Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication. *Biomaterials* 2003; 24 (8);1487-97
 10. 靳安民, 姚伟涛, 张辉, 等. 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[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2005, 15 (1) : 38-41
 11. Xu HH, Quinn JB, Takagi S, et al. Synergistic reinforcement of in situ hardening calcium phosphate composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25:1029-37
 12. Xu HHK, Carl G, Simon Jr. Self-hardening calcium phosphate composite scaffold for tissue engineering. *J Orthop Res* 2004;22(3):535-43
 13. Xu HHK, Eichmiller FC, Giuseppetti AA. Reinforcement of a self-setting calcium phosphate cement with different fibers. *J Biomed Mater Res* 2000;52:107-114
 14. Xu HHK, Quinn JB. Calcium phosphate cement containing resorbable fibers for short-term reinforcement and macroporosity. *Biomaterials* 2002;23:193-202
 15. Xu HHK, Quinn JB, Takagi S, et al. Strong and macroporous calcium phosphate cement: effects of porosity and fiber reinforcement on mechanical properties. *J Biomed Mater Res* 2001;57:457-466
 16. 张滨, 闫景龙, 夏景君, 等. 骨形态发生蛋白在微小颗粒骨诱导成骨过程中的表达[J]. *中国矫形外科杂志*, 2004, 12 (16) :1247-50
 17. 武明鑫, 张志鹏, 刘玉田, 等. 微小颗粒骨自体异位成骨过程中BMP- 2、TGF- β 1 的表达[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2005, 15 (11) :690-3
 18. 王洪伟, 闫景龙, 张滨, 等. 微小颗粒骨在异位成骨过程中TGF的表达[J]. *临床骨科杂志*, 2004, 7 (2) : 217-21
 19. 侯占江, 闫景龙, 付海亮, 等. 微小颗粒骨异位成骨过程中碱性成纤维细胞生长因子的表达[J]. *中华创伤杂志*, 2003, 19 (12) :734-7
 20. Jones JR, Ahir S, Hench LL. Large-scale production of 3D bioactive glass macroporous scaffolds for tissue engineering. *J Sol Gel Sci Tech* 2004, 29: 179-88
 21. Wei J, Li YB. Tissue engineering scaffold material of nano-apatite crystals and polyamide composite. *Eur Polymer J* 2004; 40: 509-15

Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research

地址: 沈阳1200邮政信箱 邮编: 110004 传真: +8602423388105

投稿邮箱:kf23385083@sina.com kf22838105@sina.com kf22838106@sina.com kf22854097@sina.com

咨询电话: +86 24 23384352 +86 24 23389106 +86 24 23388105