

不同孔径骨修复材料消旋聚乳酸对骨再生的影响

张亮¹、靳安民¹、袁志民²、袁少雄²、袁大萍³、袁泽俭³ 第一军医大学珠江医院脊柱骨科 广东 广州 510282 白解放军 175 医院骨科 福建 漳州 363000 中山大学高分子研究所 广东 广州 510275 冤

摘要 目的 探讨不同孔径三维多孔骨修复材料 DL-PLA 植入兔桡骨骨缺损区对骨长入的影响 遥方法 将采用浇铸盐析技术制成的孔隙率为 75% 而孔径不同的三维多孔 DL-PLA 材料植入兔桡骨骨缺损区 冤并设立空白对照组 冤分别在术后 2 尧尧尧 2 周行 X 线检查 冤取材做大体观察 冤组织形态学检查 冤生物力学检测 冤结果 植入材料孔径为约 250 尧00 尧50 滋n 者均有大量新生骨组织形成 冤而植入孔径为约 75 滋n 者及空白对照组 12 周时骨缺损区两端骨髓腔已闭合 遥植入 250 滋n 者 8 和 12 周时抗弯强度最高 渊<0.01 冤 冤结论 三维多孔材料孔径大小对骨长入起决定性作用 冤孔径为约 250 滋n 的材料最有利于骨长入 遥

关键词 消旋聚乳酸 孔径 骨缺损 骨再生

中图分类号 院683 文献标识码 院 文章编号 院000-2588(2002)05-0423-04

Effect of pore size of D, L-poly(lactic acid) as bone repair material on bone regeneration

ZHANG Liang¹, JIN An-min¹, GUO Zhi-min², MIN Shao-xiong¹, QUAN Da-ping³, LU Ze-jian³

¹Department of Orthopaedics, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China; ²Department of Orthopaedics, 175 Hospital of PLA, Zhangzhou 363000, China; ³Institute of Macromolecule, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: Objective To study the bone regeneration behavior in porous D, L-poly(lactic acid) (D, L-PLA) with different pore sizes. Method A particulate-leaching method was employed to prepare porous biodegradable D, L-PLA with different pore sizes (75, 250, 400, 750 滋n) and with porosity of 75% as the material to repair bone defects in rabbits. The materials were then implanted at random into 40 rabbits with bilateral radius bone defect, leaving another 10 rabbits without implantation as blank control. Gross observation and X-ray and histomorphological examination as well as assessment of the biomechanics of the implants were performed in 2, 4, 8 and 12 weeks respectively after the operation. Results New bone tissue occurred around the implanted materials with pore sizes of 250, 400 or 750 滋n 12 weeks after the operation. In the control group and in the rabbits with implants with pore size of 75 滋n, the bone defect was filled with connective tissues. The implants with 250-滋n pores had the strongest biomechanical strengths of all the materials (P<0.01) at 8 weeks and 12 weeks after the operation. Conclusion The pore size of the porous implants decides the behavior of bone regeneration, and D, L-PLA polymer with 250-滋n pores produce the most desired effects.

Key words: D, L-poly(lactic acid); pore size; bone defect; bone regeneration

骨缺损是骨科的一个难题 冤目前治疗方法的研究主要集中在自体尧异体骨移植和组织工程技术上 冤前两者存在来源不足 冤或传播疾病 冤免疫排斥 冤等问题 冤后者是一个被逐渐重视起来的治疗方法 冤而材料的空间结构是该技术的一个重要方面 冤以往的研究由于材料的选择和制孔技术的限制 冤关于孔径对骨长入的影响尚未取得定论 冤本研究选择可塑性高的国产消旋聚乳酸 渊D, L-poly(lactic acid), D, L-PLA 冤通过浇铸盐析技术 冤制成 4 种孔隙率约为 75% 而孔径不同的三维多孔结构植入兔桡骨骨缺损区 冤研究不同孔径对骨长入的影响 冤而选择出适合骨生长的最佳孔径 冤

1 材料与方 法

1.1 材料制作

D, L-PLA 由中山大学高分子研究所提供 冤选择不同大小的盐颗粒 渊分别为 75 尧50 尧00 尧50 滋n 冤与 D, L-PLA 混合 冤应用浇铸盐析技术 冤制成 M_r 为 39400 尧孔隙率 75% 左右和孔径大小分别约为 75 尧50 尧00 尧750 滋n 的材料 冤修成 2mm 伊 mm 伊 0mm 的块状结构 冤不氧乙烷消毒备用 冤

1.2 动物模型的建立及分组

将兔桡骨距远端 15 及 25mm 作为截骨平面 冤连同骨膜截除 10mm 造成骨缺损模型 冤遥选用由第一军医大学动物所提供的健康新西兰兔 50 只 冤体质量 2.5~3.0 kg 冤遥适应性饲养 1 周 冤随机分为 4 个实验组和 1 个对照组 冤每组 10 只兔 共 20 个前肢 冤制作骨缺损后 冤实验组分别植入 75 渊冤 50(B) 尧00(C) 尧50 滋n (D) 材料 冤对照组仅制造 10mm 骨缺损 冤不植入材料

收稿日期 院001-09-14

基金项目 院广东省医学科研课题 渊2000406 冤

作者简介 张亮 渊971- 冤男 冤福建周宁人 冤2001 年毕业于第一军医大学 冤硕士 冤医师 冤工作单位为广州市第二人民医院矫形外科 冤电话 院020-8129218

直接缝合遥

1.3 观察方法

渊兔大体观察院观察术后兔的饮食尧活动情况及切口反应曰取材时肉眼观察植入材料部位的情况如表面情况尧有无成骨尧有无红肿等曰渊兔线观察院术后第 2尧尧尧2 周行 X 线检查袁并处死动物取材曰渊兔组织学切片观察院取材后标本用 10% 福尔马林固定 2 4 h袁 10% EDTA 脱钙 1~3 周尧脱水石蜡包埋袁切片厚 5 滋n袁常规 HE 染色尧光学显微镜下观察照相遥

1.4 生物力学检查

取出兔整根桡骨袁牙托粉包埋两端袁用 ISTRON 型生物力学测试机进行三点折弯测试袁加速度为 1 mm/min²遥

1.5 统计方法

折弯强度数值用完全随机方差分析和 SNK 法进行统计学处理遥

2 结果

2.1 大体观察

所有实验兔术后均无死亡或伤口感染尧饮食情况良好遥 周时材料 A尧尧尧尧 均有大量组织长入袁表面有一层白色结构袁对照组骨缺损区被白色组织填充遥

周时材料 B尧尧尧 周围有大量的白色物质包围袁材料 A 有被向外挤出倾向袁白色物质主要集中在靠近尺骨侧曰对照组为纤维结缔组织填充遥8 周时材料 B尧尧尧 周围有明显的骨连结袁材料被分隔与骨分辨不清袁材料 A 被排斥出来曰对照组为纤维结缔组织填充遥2 周材料 B尧尧尧 与骨连结良好袁材料 A 被明显排斥袁骨的连接仅在近尺骨侧曰对照组骨缺损区为软组织连结遥

2.2 X 线检查

对照组 12 周时骨缺损两端骨髓腔闭合骨缺损区无骨长入影(图 1)遥骨缺损区植入材料 A尧尧尧尧 者在 2 周时骨缺损区均出现模糊影袁对照组没有出现模糊影遥 周时骨缺损区植入材料 B尧尧尧 者袁模糊影由两端向中心接近袁骨缺损区仅剩一缝隙无模糊影袁植入材料 A 者仅在靠近尺骨侧有较窄模糊影袁对照组无明显变化遥8 周时植入材料 B尧尧尧 者骨缺损区模糊袁骨连结袁植入材料 A 者则在靠近尺骨侧有极少骨连结袁缺损区两端骨髓腔有闭合倾向袁对照组骨髓腔亦有闭合倾向遥12 周植入材料 B渊图 2尧尧尧尧 者骨缺损区基本修复袁植入材料 A 者骨缺损区两端骨髓腔闭合袁靠近尺骨侧有少许骨连结渊图 3尧尧尧尧 对照组骨髓腔闭合遥



图 1 对照组 12 周时 X 线图

Fig.1 Radiograph of control group 12 weeks after operation

图 2 12 周时植入材料 B 的 X 线图

Fig.2 Radiograph of the implant with 250-滋n pores 12 weeks after operation

图 3 12 周时植入材料 A 的 X 线图

Fig.3 Radiograph of the implant with pore size of 75 滋n 12 weeks after operation

2.3 组织学观察

术后 2 周植入材料 B尧尧尧 者有大量的软骨细胞出现袁并见到少量的淋巴细胞曰植入材料 A 者多为成纤维细胞尧软骨细胞袁淋巴细胞较少曰对照组为成纤维细胞尧软骨细胞遥术后 4 周植入材料 B尧尧尧 者有大量编织骨形成袁植入材料 A 者主要为成纤维细胞尧软骨细胞曰对照组为纤维组织尧软骨细胞遥术后 8 周 B尧尧尧 C尧尧尧 组出现板层骨袁植入材料 A 者为纤维组织曰对照组亦为纤维组织遥12 周 B渊图 4尧尧尧尧 组均出现髓腔袁

植入材料 A 者为纤维组织曰对照组为纤维连结渊图 5尧尧尧尧

2.4 生物力学测试

用三点折弯试验对植入材料 B尧尧尧 的兔桡骨抗弯强度测试结果见表 1遥用完全随机方差分析法分析 3 种材料植入 8尧2 周时的抗弯强度袁示材料 B 最高袁 F 值分别为 11.706尧1.205袁均<0.01曰SNK 法示 B 与 C 有显著差别袁值分别为 2.446尧.417袁均约.05袁与 D 有显著差别袁值分别为 4.839尧.437袁均约.05袁与 D 有显著差别袁值分别为 2.392尧.316袁均约.01遥

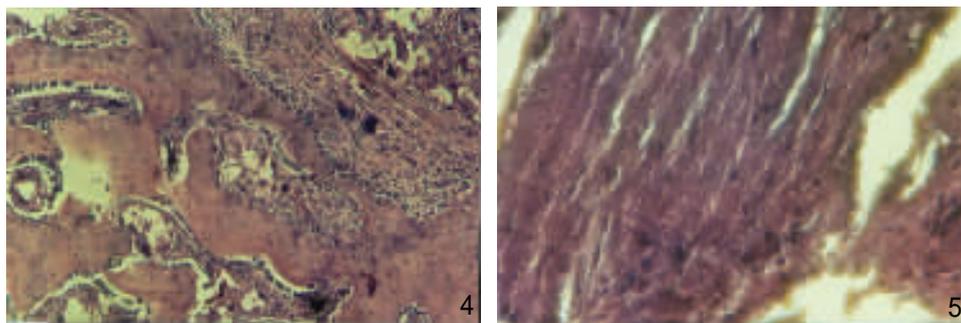


图 4 12 周时植入材料 B 的组织切片 苏E, 伊00 冤

Fig.4 Histological examination of the implant with pore size of 250 μm 12 weeks after operation (HEstaining, 伊00)

图 5 12 周时对照组的组织切片 苏E, 伊00 冤

Fig.5 Histological examination of control group 12 weeks after operation (HEstaining, 伊00)

表 1 三点折弯试验测试 3 种不同材料植入 8 尧 12 周时兔 桡骨的抗弯强度 渊IPa, n=4, x依冤

Tab.1 Three-point bending test of the radius in rabbits 8 and 12 weeks after imlantation with 3 different materials 渊IPa, n=4, Mean依D 冤

Poresizeof implants(μm)	Anti-bendingintensity	
	8weeks	12weeks
250	22.3依.7*	29.8依.1*
400	17.8依.5	25.0依.7
750	13.4依.6#	20.4依.6#

*P<0.01 vs implantswithporesizeof750 μm; #P<0.05 vs implantswithporesizesof250and400 μm

3 讨论

3.1 实验材料的制作方法 及材料的选择

孔径对骨长入的影响袁即多大孔径的材料最有利于骨长入一直是一个有争议的问题遥这是由于过去材料的制作技术及方法的限制袁极难制作出所需的准确孔径袁因此实验结果并不是十分客观遥比如曾经十分流行的气体发泡法尧有机溶剂注模法遥尽管可制作出高孔率的材料袁但孔径极为不均匀袁变化范围极大袁用于研究孔径对骨长入的影响结果不是十分可信遥我们采用浇铸盐析颗粒滤出法是在有机溶剂注模的基础上袁在注模过程中加入不溶于有机溶剂的结晶颗粒袁这些颗粒大小可通过筛网控制而得到袁通过改变颗粒的质量分数控制孔径遥遥选择不同大小盐颗粒 渊NaCl冤 尧不同盐与 PLA 的比例制作出所需的孔径和孔隙率的材料袁盐颗粒大小只改变孔径而不改变孔率遥遥这是我们探讨孔径对骨长入影响的重要基础遥我们选择 D, L-PLA 作为原料袁主要是其良好的可塑性袁降解生物相容性较好袁制孔容易遥遥电镜扫描证实本方法研制三维多孔材料的孔径十分准确均匀袁其间交联极好渊附孔径为 250 μm 尧孔隙率为 75% 的 D, L-PLA

电镜扫描照片袁图 6 冤遥本研究选用盐与 PLA 比例为 4 颐 1 袁制出的孔隙率约为 75% 袁与人体松质骨结构相似遥另外我们选择植入体内而非体外细胞培养主要考虑到体外培养缺乏新生血管及体外培养系统缺乏机械刺激的缘故遥

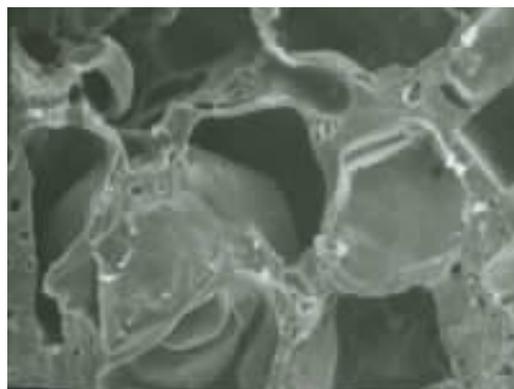


图 6 材料 B 的内部扫描电镜图 渊伊00 冤

Fig.6 Observation of the structure of the material with pore size of 250 μm under scanning electron microscope 渊伊00 冤

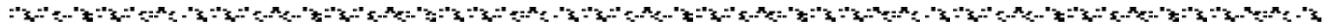
3.2 孔径对骨长入的影响

在试验过程中发现骨缺损区植入孔径为 75 μm 的材料骨缺损的修复十分不满意袁材料被明显排斥袁 12 周时骨缺损两端骨髓腔已闭合遥尽管 2 周时 X 线片示有模糊影袁但 4 周时模糊影并未增加袁组织病理学切片为成纤维细胞及少量的软骨细胞遥这可能是由于孔太小袁分裂的间充质细胞尧新生骨和软骨细胞不易长入所致袁而靠近尺骨侧可能是因骨膜刺激反应袁使骨生长较快袁从而逐渐将材料顶出遥实验组植入孔径为 250 μm 尧 50 μm 材料者袁在 12 周时均基本修复骨缺损区袁在组织学尧 X 线片表现方面无明显区别袁表明以上 3 种孔径可以满足骨长入遥骨长入这

3种孔径的材料后其基本成骨过程可能是相似的。骨量的差别不能从 X 线片上明显体现。但生物力学检测却有明显不同。这说明这 3 者在成骨的质量和数量上还是有区别。检测结果显示植入材料在 8 周及 12 周三点折弯强度均 $P < 0.05$ 。这说明孔径增大到一定程度后继续增大反而影响骨长入的质量。使其生物力学性能下降。其原因可能是孔径增大后相邻孔内细胞间的距离增大。接触减少。形成相邻孔的细胞和基质的结合程度相对下降。而引起力学性能的下降。通过对比发现。在植入 8 周及 12 周孔径为 250 μm 的材料骨长入最好。主要原因可能是其孔径尺寸大小形态比另两种孔径材料更有利于细胞之间保持正确的接触方式。提供特殊的生长和分化信号。调节细胞的迁移与生长。

选择 D, L-PLA 通过浇铸盐析技术制成的不同孔径的三维多孔结构。孔径控制准确。有利于探讨不同孔径对骨长入的影响。本研究提示孔径大小在材料的骨长入过程中起到一个极其重要的作用。在孔隙率为 75% 孔径为 75 μm 者最有利于骨长入。

参考文献



连接 422 页

实验研究证实。急性血瘀大鼠的全血比粘度、血浆比粘度、血原粘度改变。红细胞比容异常。气虚大鼠低切变全血粘度及红细胞比容改变。而使用生发灵后。各项观察指标均得到明显改善。证实生发灵在改善血液流变学方面。对全血粘度、血浆粘度及红细胞比容等都有明显的降低作用。与文献报道相符。

参考文献

马平勃. 水溶性氮酮在生发灵酊剂中对阿魏酸体外透皮吸收的促进作用研究. 第一军医大学学报, 2002, 22(1): 56-8.
 MaPB. Promotion of ferulic acid transdermal absorption by water-soluble azone in Shengfaling tincture. J First Mil Med Univ, 2002, 22(1): 56-8.
 姚治, 张奕. 三焦化湿合剂对大鼠血液流变学的影响. 中成药, 1998, 20(3): 31-3.

Summers BN, Eisenstein SM. Donor site pain from the ilium: a complication of lumbar spine fusion. Bone Joint Surg Br, 1989, 71(4): 677-80.
 Horowitz MC, Friedlaender GE. The immuneresponse to bone grafts. In: Freedlaender GE, Goldberg VM, eds. Bone and cartilage allografts. Park Ridge: American Academy Orthop Surg, 1991, 75-84.
 Saltzman WM. Weaving cartilage at zero: the reality of tissue engineering in space. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(25): 13380-2.
 Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. Biomaterials, 1998, 19(1): 1405-12.
 Mooney DJ, Baldwin DF, Suh NP, et al. Novel approach to fabricating porous sponges of poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. Biomaterials, 1996, 17(14): 1417-22.
 Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, et al. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. Biomed Mater Res, 1997, 36: 17-28.
 Mikos AG, Thorsen AJ, Czerwonka LA, et al. Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams. Polymer, 1994, 35: 1068-77.
 Widmer MS, Gupta PK, Lu L. Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. Biomaterials, 1998, 19: 1945-55.
 Hollinger JO, Battistone GC. Biodegradable bone repair materials: synthetic polymers and ceramics. Clin Orth, 1986, 207: 290-305.

陈前. 中药药理研究方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 564-50.
 吕育剂, 白洁, 倪小虎等. 五大连池矿泥抗炎和促进毛发生长的作用. 中草药, 2000, 31(4): 281-3.
 张艳, 戈坟, 朱建立, 等. 补肾生发药酒活血化瘀作用的实验研究. 中国实验方剂学杂志, 2000, 6(6): 46-7.
 杜亚明, 黄先菊, 石贵林, 等. 川丹口服液对急性血瘀模型大鼠血液流变学的影响. 中国医院药学杂志, 2000, 20(9): 531-2.
 Du YM, Huang XJ, Shi GL, et al. Effect of Chuandan oral solution on hemorrheology of the acute blood stasis rats model. Chin J Hosp Pharm, 2000, 20(7): 531-2.
 张笑丽, 苏慧敏. 首乌降压汤治疗阴虚阳亢型高血压病 288 例临床观察. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(5): 55-7.
 Zhang XL, Su HM. 288 cases of hypertension with yin-deficiency of an excessive yang treated clinically by Shouwujiang decoction. Chin J Exp Tradit Med Formul, 1998, 4(5): 55-7.
 宗红心, 李竞, 赵钰, 等. 当归补血口服液临床疗效观察. 中成药, 1999, 21(3): 132-3.