

文章编号:1672-3961(2008)03-0073-04

C/C + HA 骨植入材料对杂交波尔山羊 生理生化机能的影响

薛成骞¹, 董建文², 孟宪锋³, 常虹⁴, 曹宁¹, 陈华英¹, 李木森¹

(1. 山东大学材料科学与工程学院, 山东 济南 250061;

2. 山东中医药大学第二附属医院骨科, 山东 济南 250001;

3. 山东省农业科学院畜牧兽医研究所, 山东 济南 250100;

4. 济宁医学院附属医院检验科, 山东 济宁 272000)

摘要:碳/碳复合材料+羟基磷灰石涂层(C/C+HA)骨植入材料具有与人体骨组织十分接近的弹性模量和优良的表面生物活性,是一种具有重要临床应用价值的骨替换材料.采用杂交波尔山羊作为动物实验模型,开展了C/C+HA复合材料骨内植入实验,并从呼吸、心跳、消化、血液和免疫等方面考察了该植入材料对实验动物生理、生化指标的影响,进而探讨了该材料的生物安全性.结果表明:在植入手术后61d的观察期内,虽然实验动物出现轻度贫血和消化吸收功能下降,但未发现C/C+HA复合材料引起的热源性反应、急性感染和免疫功能下降,说明该材料具有较好的生物安全性.

关键词:C/C+HA复合材料;山羊;生理指标;生化指标

中图分类号:TB332 **文献标志码:**A

The effect of C/C + HA bone-repairing material to the physiological and biochemical response of the crossed Boer Goat

XUE Cheng-qian¹, DONG Jian-wen², MENG Xian-feng³, CHANG Hong⁴,

CAO Ning¹, CHEN Hua-ying¹, LI Mu-sen¹

(1. School of Materials Science and Engineering, Shandong University, Jinan 250061, China;

2. Department of Orthopedics, Second Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250001, China;

3. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, China;

4. Department of Inspection, Hospital of Jining Medicine College, Jining 272000, China)

Abstract: Carbon/carbon composite material with hydroxyapatite coating (C/C + HA) bone-implant materials has elastic modulus, which is highly close to human bone tissue and of excellent surface biological activity, and has great value of clinical application as a kind of bone replacement material. This study adopted the crossed Boer Goat as the animal experimental model, developed the experiment of C/C + HA composites implanted into bone, and investigated the effect of this implant material on the physiological and biochemical index of the test animal in breathing, heartbeat, digestion, blood and immunity, etc. The results show that although the test animals appeared mildly anemia and their digestion and absorption declined, heat source reaction, acute infection and immunity function decrease were not observed during the 61-day observation period after the implant surgery. It indicates that this material has preferable biological safety.

Key words: Carbon/Carbon + hydroxyapatite composite materials; goat; physiological index; biochemical index

收稿日期:2007-09-19

基金项目:教育部高等学校博士学科点专项基金资助项目(20060422040);山东省科学技术发展计划资助项目(2006GG2202009)

作者简介:薛成骞(1985-),男,山东汶上人,硕士研究生,从事生物医用材料的生物安全性研究.

E-mail: xuechengqian2000@yahoo.com.cn

0 前言

碳/碳复合材料(简称 C/C)是由碳纤维增强石墨化的树脂碳或化学气相沉积碳形成的一种新型复合材料.它具有优异的生物相容性和生物力学性能(C/C的弹性模量与人体骨骼十分接近),被认为是最有前途的生物医用材料之一^[1-3].但由于 C/C 为生物惰性材料,植入生物硬组织内后,通常以机械嵌合方式与周围组织结合,因而,结合强度普遍不高.另外,由于该材料表面易发生碳粉脱落,长期植入人体内会发生“黑肤效应”,限制了它作为骨组织替换材料的应用^[4].羟基磷灰石(HA)作为人体骨骼和牙齿的主要无机成分,具有优异的生物活性^[5],常被用于生物惰性材料的表面生物活性涂层材料^[6].近年来,国内外许多学者尝试多种方法在 C/C 表面制备了 HA 涂层,L. S. Popich^[7]利用等离子喷涂方法在 C/C 表面制备了一层 50~75 μm 的 HA 涂层,并将有无 HA 涂层的 C/C 种植体分别植入狗的体内,3~6 周后将种植体取出进行机械性能和组织学测试,结果表明:带有 HA 涂层的种植体在界面剪切强度、刚度及与生物硬组织的融合性能方面均优于未涂敷 HA 的 C/C 种植体.熊信柏^[8]通过碱热处理工艺对 C/C 表面阴极声电沉积的磷酸钙生物陶瓷涂层进行处理,使其转变为磷灰石涂层.涂层与基体形成化学键合,结合强度可达 4.2 MPa.

采用杂交波尔山羊作为动物实验模型,开展了 C/C+HA 骨内植入实验研究,并从呼吸、心跳、消化、血液和免疫等方面进一步考察了对 C/C+HA 骨植入材料的生理生化响应,进而初步探讨了该材料的生物安全性.

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

C/C 原料(烟台冶金新材料研究所提供)、HA 粉体(粒度 38~75 μm ,实验室自制)、雄性杂交波尔山羊 2 只(约 1 岁,编号 SD02 和 SD03,山东省动物实验中心提供)、麻醉剂为盐酸氯胺酮注射液(齐齐哈尔第二制药有限公司)和 2,4-二甲基苯胺噻唑(中国农业科学院中兽医研究所药厂).骨科手术器械及检验设备均由山东中医药大学第二附属医院提供,手术台架为自行设计.

1.2 植入体制备

首先取杂交波尔山羊腰椎的侧位和俯卧位,拍

摄 X 光片.根据 L4-5 椎间隙及椎体的大小尺寸加工尺寸为 6 mm × 10 mm × 16 mm 的块状 C/C 样品.然后,经喷砂粗化处理和等离子体喷涂,在样品表面制备厚度约 75 μm 的 HA 涂层,获得 C/C+HA 植入体.最后,将种植体和全套手术器械经压力蒸汽灭菌(0.210 MPa, 134 $^{\circ}\text{C}$, 4~6 min)处理后,备用.

1.3 材料植入与术后护理

实验动物于正常饲养条件下提取全血及血清样本,测定其血常规、血生化、C 反应蛋白和肝肾功能指标,作为对照.术前首先注射 5 mg/kg 的 2,4-二甲基苯胺噻唑,3 min 后注射 10 mg/kg 的盐酸氯胺酮,诱导期约 10 min.常规备皮、消毒、铺无菌巾后,依次切开皮肤,剥离肌层,经腰椎后路硬膜囊一侧,显露 L4-5 椎间隙,采用骨科环钻和各型号刮匙制备种植床.然后,将植入体植入 L4-5 椎间隙,并保持融骨面与上下椎体的紧密配合.最后依次逐层缝合肌肉和皮肤组织.手术过程中,经动物颈静脉滴注 10% 葡萄糖生理盐水,以补充体液损失.实验动物于术后约 30 min 基本苏醒.

术后 4 d,每日静脉注射复方消炎药物(氧氟沙星 0.6 g,维生素 B₁ 1 g,维生素 B₆ 1 g,维生素 B₁₂ 2.5 mg,维生素 C 5 g,氨苄西林钠 10 g,地塞米松 10 mg).10 d 后创口完全愈合.动物的食欲、精神状态恢复良好,排泄正常,毛色光亮.手术后每天测量记录山羊的体温、呼吸、心跳、肠胃蠕动音和排泄情况 1 次.于手术后 15 d 提取全血样本进行血常规检测,手术后 30 d 提取血清样本以测定其肝功、肾功和 C 反应蛋白等血液生化指标.

2 结果与讨论

2.1 实验动物的日常生理指标

图 1 和图 2 分别为实验动物术后 61 d 内的体温随时间的变化曲线和呼吸、心跳随时间的变化曲

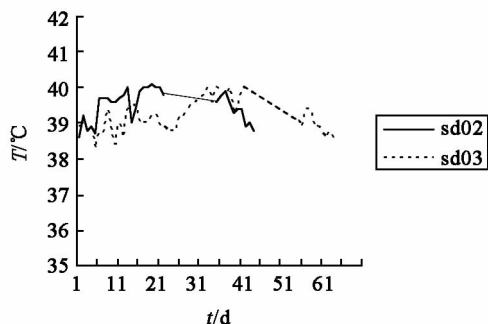


图 1 实验动物体温随时间的变化曲线

Fig. 1 The body temperature changing with time of the experimentation animal

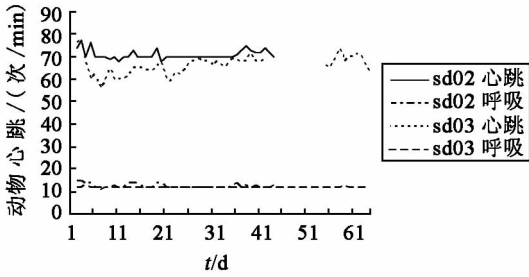


图2 实验动物呼吸,心脏随时间的变化曲线

Fig.2 The curve of experimental animal's breathing and heartbeat changing in time

线.由图2可见,手术后72 h内,实验动物的呼吸、心跳均正常,未见异常表现.表明受试材料未造成动物的急性中毒反应.由图1可知,术后实验动物的体温在38.3℃~40.3℃的正常范围内波动.有学者曾通过向新西兰家兔的耳缘静脉注入材料浸提液的方法,对多种常规可降解骨替换材料进行热源试验研究^[9-10].结果发现,所研究材料均有致动物体温升高的热源效应.通过对比可以证明,C/C+HA复合材料在热源反应方面优于常规骨替换材料.

图3和图4分别为实验动物术后61 d内的瘤胃蠕动音随时间的变化曲线和肠蠕动音随时间的变化曲线.由于术后实验动物的活动量下降,自第4 d起,动物的心跳一直保持在60次/min上下波动,低于参考值^[11];随着时间的延长,动物的心律逐渐恢复正常水平.术后第4 d,动物的瘤胃蠕动音和肠蠕动音分别为1次/2 min和2次/min,均低于正常值.这可能是由于术后初期动物的进食减少,且活动量较小所致.4d后,随着动物消化功能的恢复,以

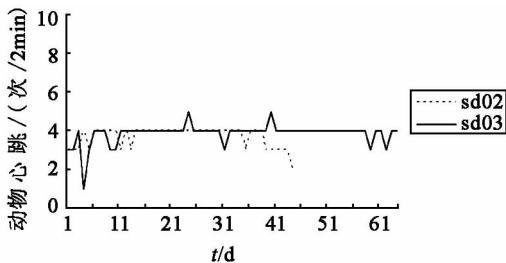


图3 实验动物瘤胃蠕动音随时间的变化曲线

Fig.3 The peristalsis of rumen changing with time of the experimental animal

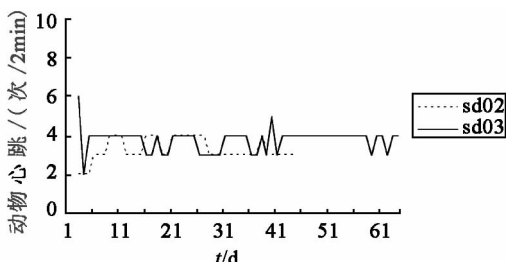


图4 实验动物瘤肠蠕动音随时间的变化曲线

Fig.4 The intestinal peristalsis changing with time of the experimental animal

上两项指标恢复到正常值,并一直保持稳定,这与食量的变化相一致.从整个实验过程来看,实验动物在术后的呼吸、心跳、消化和体温等日常生理指标基本在正常的范围内.虽然手术造成的失血和活动受限使得实验动物术后初期出现了生理机能的下降,但材料植入后长时间的生理指标观察表明:植入体未对动物的消化系统、呼吸系统和循环系统产生显著的负面影响.

2.2 血常规化验结果

红细胞计数、红细胞压积和血红蛋白等是反映造血机能变化的重要指标.通过对红细胞的检测,可为贫血及有关疾病的诊断提供依据,并可作为病情监测、疗效观察和愈后判断的指标.白细胞计数,淋巴细胞计数则是人体免疫系统活动的重要标志,能间接反映生物体的疾病状况^[12].由于杂交代数不同和个体的差异,两只山羊以上指标存在一定的差异^[13].表1为手术后15 d实验动物血常规化验结果及其与手术前的血常规指标对照如所示.由此可知,术后实验动物的白细胞数下降明显,同时红细胞计数、红细胞压积和血红蛋白均有一定的下降.这主要是由于术中的失血和脊椎受损造成的造血功能障碍.平均红细胞体积、平均RBC HB量和平均RBC HB浓度均无明显变化,说明术后动物出现正常细胞性贫血,而非因感染、炎症或肿瘤等原因造成的大细胞性贫血、单纯小细胞性贫血及小细胞低色素性贫血^[14].淋巴细胞的增多表明动物可能发生轻微的感染.综上所述,手术对山羊的造血机能构成了轻度的损伤,但未引起严重的并发症和急性中毒反应.实验动物术后生理机能基本正常.

表1 实验动物手术前后的血常规指标

Table 1 The routine blood indexes of the experimental animal before and after surgery

| 代号 | 项目 | SD02 手术前 | SD02 手术后 | SD03 手术前 | SD03 手术后 |
|---------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|
| WBC | 白细胞总数/($10^3 \cdot \text{mm}^{-3}$) | 24.68 | 10.74 | 20.5 | 11.89 |
| LYMPH # | 淋巴细胞/(%) | 0.00 | 0.00 | 4.15 | 4.26 |
| RBC | 红细胞计数/($10^6 \cdot \text{mm}^{-3}$) | 2.7 | 1.54 | 1.52 | 1.37 |
| HGB | 血红蛋白/ μg | 101 | 64 | 69 | 62 |
| HCT | 红细胞压积/(%) | 29.5 | 17.3 | 13 | 11.2 |
| MCV | 平均红细胞体积/ fL | 109.3 | 112.3 | 85.5 | 81.8 |
| MCH | 平均RBC HB量/ μg | 37.4 | 41.6 | 45.4 | 45.3 |
| MCHC | 平均RBC HB浓度/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) | 342 | 370 | 531 | 554 |

2.3 血液生化指标

表2为术前与术后30 d实验动物的肝功、肾功和C反应蛋白等血清检验指标的对比.其中,谷丙转氨酶是反映肝脏实质损害的重要酶标志物,谷草

转氨酶尽管不是特异性肝酶,但也是较敏感的肝酶;而谷氨酰转氨酶、碱性磷肽酶和胆碱酯酶的来源较广泛,对肝脏系统的诊断缺乏特异性.由表中可以看出,实验动物在手术后谷丙转氨酶、谷草转氨酶水平有一定程度的升高,谷氨酰转氨酶、碱性磷肽酶和胆碱酯酶的水平则有比较明显的下降,表明手术对动物的肝功能造成了一定程度的损伤;但并未达到肝炎、肝硬化等恶性病变的诊断标准,基本可以排除病毒感染的可能.

表2 实验动物手术前后的血液生化指标

Table 2 The blood biochemical indices of the experimental animal before and after surgery

| 代号 | 项目 | SD02 手术前 | SD02 手术后 | SD03 手术前 | SD03 手术后 |
|-----|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| ALT | 谷丙转氨酶/(U·L ⁻¹) | 37 | 30 | 20 | 29 |
| AST | 谷草转氨酶/(U·L ⁻¹) | 104 | 197 | 97 | 164 |
| GGT | 谷氨酰转氨酶/(U·L ⁻¹) | 50 | 32 | 63 | 45 |
| ALP | 碱性磷肽酶/(U·L ⁻¹) | 63 | 68 | 37 | 18 |
| CHE | 胆碱酯酶/(U·L ⁻¹) | 293 | 234 | 118 | 46 |
| BUN | 尿素氮/(mmol·L ⁻¹) | 5.79 | 4.33 | 5.94 | 9.52 |
| CRE | 肌酐/(μmol·L ⁻¹) | 67.0 | 39.3 | 47.6 | 39.6 |
| UA | 尿酸/(μmol·L ⁻¹) | 6 | 11 | 2 | 1 |
| TP | 总蛋白/(g·L ⁻¹) | 76.8 | 74.5 | 78.0 | 70.8 |
| ALB | 白蛋白/(g·L ⁻¹) | 27.6 | 13.6 | 27.9 | 22.5 |
| GLO | 球蛋白/(g·L ⁻¹) | 49.20 | 60.9 | 50.10 | 48.3 |
| A/G | 白球比 | 0.6 | 0.2 | 0.6 | 0.5 |
| CRP | C反应蛋白/(mg·L ⁻¹) | 1.8 | 1.6 | 4.0 | 4.0 |

尿素氮是指示各种肾脏疾病,包括肾小球、肾小管、间质或血管病变的重要指标;肌酐的变化可以反映肾小球滤过功能的变化.表中尿素氮、肌酐和尿酸的变化表明,动物的肾功能受到了一定的损伤,SD02和SD03在尿素氮和尿酸的变化趋势不同,这反映了不同杂交代数山羊的个体差异.两只山羊的肌酐均下降,显示了贫血和肝功能障碍的可能.

血清总蛋白和白蛋白测定是反映肝脏合成功能或肾脏病变造成蛋白质丢失的重要指标.试验中,两只山羊在手术后血清总蛋白、白蛋白和白球比均有一定的下降,手术的确对动物的肝、肾功能产生了一定的影响.此外,手术中的失血、手术后消化吸收功能下降也可能是造成这种变化的原因.

C反应蛋白是目前临床上最常用的急性时相反应指标.手术前后实验动物C反应蛋白的变化不大,表明没有急性感染发生.

3 结论

(1) C/C + HA 复合材料植入体植入山羊体内

后,动物的体温、心跳、呼吸、瘤胃蠕动音和肠蠕动音等日常生理指标与术前无明显异常,初步判断手术未对动物的消化系统、呼吸系统及循环系统造成明显影响,实验材料未造成动物的热源反应和急性毒性反应.

(2) 手术前后的血常规数据对比和手术前后血清指标的对比分析均表明手术仅造成了实验动物的正常细胞性贫血和术后初期的轻微术区感染,但无相关并发症出现.手术后60d,实验动物生理机能恢复良好.

(3) 在排除手术因素的影响后,实验表明:C/C + HA作为一种新型的骨组织替换材料对实验动物的生理生化机能无显著的影响,具有较好的生物安全性和临床应用价值.

参考文献:

- [1] 熊信柏,李贺军,黄剑锋,等.医用碳材料对骨组织的响应及其生物活化改性[J].稀有金属材料与工程,2005,34(4):515-520.
XIONG Xin-bo, LI He-jun, HUANG Jian-feng, et al. Response of bone tissue to carbon and its bioactive modification [J]. Rare Metal Materials and Engineering, 2005, 34(4): 515-520.
- [2] ADAMS D, WILLIAMS D F, HILL J. Carbon fiber-reinforced carbon as a potential implant material[J]. Journal of Biomedical Materials Research, 1978, 12(1):35-42.
- [3] 曹宁,李木森,马泉生,等.医用碳/碳复合材料的制备及骨组织相容性研究[J].山东大学学报:工学版,2007,37(1):1-5.
CAO Ning, LI Mu-sen, MA Quan-sheng, et al. Preparation of biomedical carbon/carbon composites and their bone tissue biocompatibility[J]. Journal of Shandong University: Engineering Science, 2007, 37(1):1-5.
- [4] JIN Ling-sui, LI Mu-sen, LÜ Yu-peng, et al. Plasma-sprayed hydroxyapatite coatings on carbon/carbon composites[J]. Surface and Coatings Technology, 2004, 176:188-192.
- [5] 俞耀庭,张兴栋.生物医用材料[M].天津:天津大学出版社,2000:125-137.
YU Yao-ting, ZHANG Xing-dong. Bio-Medical materials[M]. Tianjin: Tianjin University Press, 2000: 125-137.
- [6] 隋金玲,李木森,吕宇鹏,等.碳/碳复合材料表面羟基磷灰石涂层的研究[J].生物医学工程学杂志,2005,22(2):247-249.
SUI Jin-ling, LI Mu-sen, LÜ Yu-peng, et al. Hydroxyapatite bioactive coating on carbon/carbon composites[J]. Journal of Biomedical Engineering, 2005, 22(2):247-249.

(下转第103页)

(上接第76页)

- [7] POPICH L S, RUST-DAWICKI A M, KLAWITTER J J, et al. In vivo characterization of hydroxylapatite(HA) coated pyrolytic carbon implants [J]. Biomedical Engineering Conference, 1995, 4:71-74.
- [8] 熊信柏, 李贺军, 黄剑锋, 等. 碳/碳复合材料表面声电沉积/碱热处理复合工艺制备羟基磷灰石生物活性涂层研究[J]. 稀有金属材料与工程, 2005, 34(9):1489-1492. XIONG Xin-bo, LI He-jun, HUANG Jian-feng, et al. Bioactive hydroxypatite coating on carbon/carbon composite prepared by sonoelectrodeposition and alkaline-heat treatment[J]. Rare Metal Materials and Engineering, 2005, 34(9):1489-1492.
- [9] 陈华, 张伯勋, 张巨松. 柠檬酸化半水硫酸钙作为骨移植替代材料的安全性及生物相容性评价[J]. 中国临床康复, 2005, 9(34):56-58. CHEN Hua, ZHANG Bo-xun, ZHANG Ju-song. Safety and biocompatibility of citrated calcium sulphate hemihydrate as substitute of bone transplantation[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2005, 9(34):56-58.
- [10] 王放, 冯超, 周庆海, 等. 新型可降解生物材料改性PPC生物安全性评价[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(12):1508-1509. WANG Fang, FENG Chao, ZHOU Qing-hai, et al. Biological safety evaluation of modified PPC as a new biodegradable material[J]. Chinese Journal of Public Health, 2006, 22(12):1508-1509.
- [11] 石岩. 医学动物实验实用手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 233-244. SHI Yan. Medical animal experiment practical manual[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002: 233-244.
- [12] 庞保军, 吴铁军. 临床化验一本通[M]. 北京: 人民军医出版社, 2005:25-33. PANG Bao-jun, WU Tie-jun. Clinical test manual[M]. Beijing: Chinese Military Medical Press, 2005: 25-33.
- [13] 屈孝初, 李文平. 浏阳黑山羊品种改良配套技术研究[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2002, 28(2):139-140. QU Xiao-chu, LI Wen-ping. Breeding improvement of liuyang black goat I. blood physio-biochemical indexes of hybridized liuyang black goat[J]. Journal of Hunan Agricultural University, 2002, 28(2):139-140.
- [14] 商微羽, 贾静, 陶雷. 患者学看化验单[M]. 北京:煤炭工业出版社, 1994:1-7. SHANG Zhi-yu, JIA Jing, TAO Lei. Patients learn reading laboratory sheets[M]. Beijing: Coal Industry Press, 1994:1-7.

(编辑:孙广增)