

# 复合重组人骨形态发生蛋白 2 壳聚糖缓释水凝胶的新型 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔泡沫陶瓷人工椎体修复犬脊椎骨缺损

全仁夫 谢尚举 李强 曹国平 庄伟 张亮 邵荣学 严世贵 杨迪生

**【摘要】** 目的 研制复合重组人骨形态发生蛋白 2 (rhBMP-2) 壳聚糖水凝胶的新型 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔泡沫陶瓷人工椎体, 并观察其修复 beagle 犬椎体骨缺损的能力。方法 离子交联法制备壳聚糖水凝胶作为 rhBMP-2 的缓释载体, 扫描电镜下观察其微观形态, 检测其载药量、包封率及缓释速率。将 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔泡沫陶瓷人工椎体复合 rhBMP-2 壳聚糖水凝胶, 构建新型 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔泡沫陶瓷人工椎体。将 12 只 beagle 犬按数字表法随机分为 3 组, 每组 4 只; 均采用手术造成半径 9 mm, 高 23 mm 的半圆柱状 L<sub>4</sub> 椎骨缺损模型, 其中 A 组植入复合 rhBMP-2 壳聚糖水凝胶的新型 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔泡沫陶瓷人工椎体, B 组植入复合空白干燥壳聚糖的新型 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔泡沫陶瓷人工椎体, C 组植入实验犬自体髂骨。术后 6、12、24 周对实验犬行大体观察、X 线影像学观察; 术后 24 周取实验犬椎体标本行离体 Micro CT 新生骨量检测及生物力学检测。结果 制备所得壳聚糖水凝胶扫描电镜下呈 3D 网状结构, 内部均匀分布壳聚糖微球, 其负载 rhBMP-2 后包封率达 91.88% ± 1.53%, 载药量为 (39.84 ± 2.34) ng/mg; 释放率第 1 天为 28.32% ± 3.01%, 第 3 天为 48.92% ± 6.27%, 第 12 天为 74.40% ± 6.29%。术后 6 周 C 组动物平均活动度恢复较 A 组和 B 组快 ( $P$  值均 < 0.05), A、B 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 术后 12、24 周 B 组与 C 组活动度比较差异均有统计学意义 ( $P$  值均 < 0.05), A、C 组差异均无统计学意义 ( $P$  值均 > 0.05)。术后 6、12、24 周 X 线影像学观察显示, A 组椎体置换术后骨痂生成逐渐增多, 植入材料与宿主骨之间的界线逐渐模糊, 至 24 周时人工椎体周围新生骨与自体骨融为一体; C 组在 24 周时出现明显非承重部位的骨吸收, 出现较快的自体骨塑形; B 组椎体置换术后人工椎体与自体骨的融合速度慢于 A 组和 C 组。术后 24 周标本 Micro CT 新生骨量检测结果显示, A 组 (145.38 ± 18.52) mm<sup>3</sup>, B 组 (86.30 ± 15.60) mm<sup>3</sup>, 两组比较差异有统计学意义 ( $t = 4.879, P < 0.01$ )。术后 24 周 A、B、C 组手术节段椎体标本抗压强度分别为 (14.03 ± 1.67) MPa、(8.62 ± 1.24) MPa、(13.79 ± 1.43) MPa, A 组和 C 组椎体极限抗压强度均高于 B 组 ( $P$  值均 < 0.01), 而 A 组与 C 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 复合 rhBMP-2 壳聚糖水凝胶新型 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔泡沫陶瓷人工椎体能有效修复脊柱骨缺损, 有望代替自体髂骨移植运用于临床骨缺损的修复。

**【关键词】** 羟基磷灰石类; 钙; 组织工程; 人工椎体; 重组人骨形态发生蛋白 2

**基金项目:** 浙江省重大科技专项 (2014C03031); 浙江省科学技术厅公益技术研究社会发展项目 (2012C33114); 杭州市重大科技专项 (20122513A14)

**Research on novel HA/ZrO<sub>2</sub> gradient biocomposite artificial vertebrae loaded by recombinant human bone morphogenetic protein** Quan Renfu\*, Xie Shangju, Li Qiang, Cao Guoping, Zhuang Wei, Zhang Liang, Shao Rongxue, Yan Shigui, Yang Disheng. \*Department of Orthopedics, the Jiangnan Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hanzhou 311200, China  
Corresponding author: Quan Renfu, Email: quanrenfu@126.com

**【Abstract】 Objective** To prepare the chitosan hydrogel as release carrier of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2), and loaded the prepared recombinant human bone morphogenetic protein 2 chitosan hydrogel in novel HA/ZrO<sub>2</sub> gradient biocomposite artificial vertebrae and study bone reparation effect of it in a beagle dog' vertebral defect model. **Methods** To prepare rhBMP-2 chitosan

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-7041.2016.01.013

作者单位: 311200 杭州, 浙江中医药大学附属江南医院骨科 (全仁夫、谢尚举、李强、曹国平、庄伟、张亮、邵荣学); 浙江大学附属第二医院骨科 (严世贵、杨迪生)

通信作者: 全仁夫, Email: quanrenfu@126.com

hydrogel by ion-crosslinked method. Scanning electron microscopy was used to observe lyophilized chitosan microscopic surface morphology, test its swelling coefficient and detect drug loading mass, encapsulation efficiency and sustained release characteristics of the chitosan hydrogel loaded with rhBMP-2. Loaded the rhBMP-2 chitosan hydrogel onto novel HA/ZrO<sub>2</sub> gradient biocomposite artificial vertebrae. Then 12 beagle dogs were randomly divided into three groups (A, B, and C) by number table, each group included four dogs. Afterwards, a 23 mm radius and 9 mm high semi-cylindrical bone defect model was caused by surgery in each dog. While the bone defect location was implanted artificial vertebral body composite rhBMP-2 chitosan gel in group A, implanted artificial vertebral body composite blank dried chitosan in group B, and implanted autologous bone in group C. After operations, general observation and X-ray observation were carried out at week 6, 12, and 24. At week 24, all beagle dogs were sacrificed and taken vertebral body specimens, then detect new bone volume in the artificial vertebral body by Micro-CT and detect ultimate compressive strength by biomechanical testing. **Results** SEM scanning showed the lyophilized chitosan was a three-dimensional network structure with uniform distribution of chitosan microspheres internal. When loaded with rhBMP-2, chitosan hydrogel encapsulation efficiency was  $91.88\% \pm 1.53\%$ , the loaded mass of drug was  $(39.84 \pm 2.34)$  ng/mg; the release rate was  $28.32\% \pm 3.01\%$  at day 1,  $48.92\% \pm 6.27\%$  at day 3, and  $74.40\% \pm 6.29\%$  at day 12. The average recovery ratio of group C was faster than group A and group B at 6 weeks postoperatively (all  $P$  values  $< 0.05$ ), and there was no statistically significant difference between group A and group B ( $P > 0.05$ ). 12 and 24 weeks postoperatively, there was statistically significant difference between group B and group C (all  $P$  values  $< 0.05$ ), and there was no statistically significant difference between group A and group C ( $P > 0.05$ ). X-ray imaging observation showed: in group A, with the passage of time after vertebral replacement surgery, callus formation gradually increased around the material, the gap between artificial vertebrae and autogenous bone was gradually filled with new bone. Since the artificial vertebrae and autologous bone had almost closely banded at week 24 with no obvious boundary; in group C, there were apparently self-absorption and bone osteolysis on non-load bearing areas at week 12 and 24, and appeared rapidly autologous bone remodeling; in group B, however, the repair to bone defect was slower than that of group A and group C. The specimens were taken at week 12. And in vitro Micro CT observation showed that three dimensional CT reconstruction could be seen a large number of new bone formation inside the artificial vertebral, and bone volume detection result at week 24 were  $(145.38 \pm 18.52)$  mm<sup>3</sup> in group A and  $(86.30 \pm 15.60)$  mm<sup>3</sup> in group B, there was significant difference between the two groups ( $t = 4.879$ ,  $P < 0.01$ ). Ultimate compressive test showed the maximum compressive strengths of vertebrae were  $(14.03 \pm 1.67)$  MPa in group A;  $(8.62 \pm 1.24)$  MPa in group B, and  $(13.78 \pm 1.43)$  MPa in group C. The group A and group C were significantly higher than that of group B in statistics analysis (all  $P$  values  $< 0.01$ ). There was no statistically significant difference between group A and group B ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** The novel HA/ZrO<sub>2</sub> gradient biocomposite artificial vertebrae loaded with rhBMP-2 can excellently repair vertebral defect, it may be an ideal bone substituted material for clinical application.

**[Key words]** Hydroxyapatites; Zirconia; Tissue engineering; Artificial vertebrae; Recombinant human bone morphogenetic protein 2

**Fund Program:** Science and Technology Major Project of Zhejiang Province of China (2014C03031); Public Social Development Research Project of Science Technology Department of Zhejiang (2012C33114); Science and Technology Major Project of Hangzhou (20122513A14)

目前,临床上通过移植人工骨的方法治疗骨缺损已经变得十分普遍,其成功的关键在于人工骨能诱导正常新生骨长入并使之融为一体<sup>[1]</sup>。而如何提高人工骨组织材料的成骨性能和骨融合率成为骨组织工程研究的热点<sup>[2-5]</sup>。重组人骨形态发生蛋白 2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2) 是公认的骨诱导因子,是唯一能诱导多能造血干细胞和间充质干细胞中所有成骨细胞分化的形态发生蛋白。但其临床应用也存在许多问题和不足<sup>[6-7]</sup>: 首先,纯化的骨形态发生蛋白半衰期短,植入体内后与体液和酶类接触很快被扩散并水解<sup>[8]</sup>; 其次,一次性过量使用 rhBMP-2 又带来许多副作用,如植入物周围早期的骨溶解,继发植入物松动<sup>[9-10]</sup>、椎管内异位骨化<sup>[11]</sup>等。故寻找能够承载并缓释 rhBMP-2 的方法,使局部可长时间维持稳定有效的 rhBMP-2 浓度具有重要的理论和实际应用价值<sup>[12-13]</sup>。壳聚糖是一种具有良好生物相容性及生

物可降解性的无毒天然材料,其带正电荷和-NH<sub>2</sub>基团的特性,使其可与带负电荷的聚合物,大分子蛋白相互作用,近来被广泛应用于生物制药及药物缓释领域<sup>[14-15]</sup>。本课题采用 ZrO<sub>2</sub> 作为 HA 的增强体制备 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔泡沫陶瓷人工椎体,并将其复合 rhBMP-2 壳聚糖水凝胶,以期制备具有良好生物相容性、骨诱导性和高力学强度的新型 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔泡沫陶瓷人工椎体,为临床脊柱骨缺损的治疗奠定实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及主要试剂、仪器

beagle 犬 12 只,雄性,月龄 5 ~ 6 个月,体质量 10.3 ~ 12.5 kg,清洁级,由浙江中医药大学实验动物中心提供 [生产许可证号: SCXK (浙) 2010-0043],普通环境饲养。实验人员在整个实验过程中都遵循实验动物保护条例。壳聚糖(脱乙酰度 >

90%, Sigma, 美国); 三聚磷酸钠 (Sigma, 美国); rhBMP-2 (Sigma, 美国); ELISA 试剂盒 (R&D, 美国); 冷冻干燥仪 (Labconco, 美国); 酶联免疫测试仪 (Thermo Scientific Varioskan Flash,); Micro CT (SKYSCAN BRUKER, 比利时); 扫描电镜 (S-3000N HITACHI, 日本); 真空离子溅射仪 (HITACHI E-1010, 日本); 万能材料实验机 (INSTRON 5569, 美国)。

## 1.2 rhBMP-2 壳聚糖水凝胶的制备及检测方法

### 1.2.1 空白壳聚糖水凝胶制备

参照文献[14]中的制作方法并加以改进, 将一定质量壳聚糖溶解于 0.3% 醋酸溶液中, 搅拌至完全溶解, 配置成 1.5 mg/mL 壳聚糖溶液; 将一定质量三聚磷酸钠溶于超纯水中, 配置成 0.5 mg/mL 三聚磷酸钠溶液。取壳聚糖溶液 100 mL, 以壳聚糖与三聚磷酸钠总质量比为 5:1 量取对应所需三聚磷酸钠溶液, 两种溶液依次用 0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。在持续磁力搅拌下, 用 7 号注射器吸取三聚磷酸钠溶液缓慢滴加到壳聚糖溶液中, 滴速控制在 30 滴/min。反应完全后可见溶液由无色变为淡蓝色, 继续搅拌 1 h, 用 0.5% NaOH 溶液调节 pH 值至 7.2 ~ 7.4。将交联所得溶液分装至培养皿, 冷冻干燥。

### 1.2.2 扫描电镜观察

将冻干壳聚糖水凝胶裁剪成 3 mm  $\times$  1 mm 的小片, 用导电胶固定于样品台上, 真空离子溅射仪表面溅射喷金, 扫描电镜观察干燥壳聚糖水凝胶表面 3D 结构, 并选择合适倍数拍摄扫描照片。

### 1.2.3 壳聚糖水凝胶复合 rhBMP-2 载药量及包封率测定

本实验采用先制备出空白干燥壳聚糖, 再利用壳聚糖的吸水溶胀作用负载 rhBMP-2, 故采用 ELISA 法测定壳聚糖负载 rhBMP-2 凝胶化后管底残留的 rhBMP-2 量来计算壳聚糖水凝胶的载药量和包封率。

载药率 =  $[(\text{投入 rhBMP-2 总量} - \text{管壁残留 rhBMP-2 总量}) / \text{干燥壳聚糖总质量}] \times 100\%$

包封率 =  $[(\text{投入 rhBMP-2 总量} - \text{管壁残留 rhBMP-2 总量}) / \text{投入 rhBMP-2 总量}] \times 100\%$

### 1.2.4 壳聚糖水凝胶复合 rhBMP-2 及其体外累积释放率检测

取 5 mL 试管 5 支, 每支试管中置入干燥壳聚糖 40 mg, 向每管干燥壳聚糖中滴加 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rhBMP-2 100  $\mu\text{L}$ , 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中凝胶化。待复合 rhBMP-2 壳聚糖水凝胶变为淡黄色凝胶状后, 向每支试管中加入 2 mL 含 0.1% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) (pH 7.4), 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱。取每支试管不同时间点 (0.5、1、2 和 3 d, 以后每隔 3 d 1 次, 至第 15 天) 上清液 100  $\mu\text{L}$ ,

采用 ELISA 法检测上清液 rhBMP-2 浓度, 后补充相应量含 0.1% BSA 的 PBS 液。根据 ELISA 标准曲线计算采样 rhBMP-2 含量并绘制累积释放曲线。

rhBMP-2 累积释放率 =  $[(\text{上清液 rhBMP-2 浓度} \times 2 \text{ mL}) / 2 \mu\text{g}] \times 100\%$

## 1.3 复合 rhBMP-2 壳聚糖水凝胶的新型 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔泡沫陶瓷人工椎体的制备

(1) 新型 HA/ZrO<sub>2</sub> 泡沫陶瓷人工椎体制备: 由本课题合作单位上海大学材料学院, 尺寸按实验犬椎体参数设定。半径 9 mm、高 23 mm, 见图 1。(2) 复合空白干燥壳聚糖人工椎体的制备: 将采用上述方法交联所得壳聚糖溶液分装至培养皿。将 HA/ZrO<sub>2</sub> 泡沫陶瓷人工椎体浸入交联完全的壳聚糖溶液中, 冷冻干燥。取出冻干后空隙中负载干燥壳聚糖的 HA/ZrO<sub>2</sub> 泡沫陶瓷人工椎体, 环氧乙烷消毒备用。(3) 复合 rhBMP-2 壳聚糖水凝胶的新型 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔泡沫陶瓷人工椎体的制备: 在术中临时制备。术中安放人工椎体前 30 min, 取出消毒好的负载有交联后空白干燥壳聚糖的 HA/ZrO<sub>2</sub> 泡沫陶瓷人工椎体, 将 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rhBMP-2 溶解液 500  $\mu\text{L}$  均匀滴加至 1 个人工椎体上, 使 500  $\mu\text{L}$  rhBMP-2 溶解液完全被干燥壳聚糖吸附。故每个椎体共负载 rhBMP-2 10  $\mu\text{g}$ 。

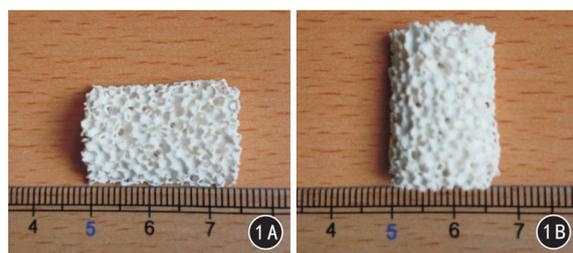


图 1 新型 HA/ZrO<sub>2</sub> 泡沫陶瓷人工椎体 1A 人工椎体高 1B 人工椎体直径

## 1.4 新型 HA/ZrO<sub>2</sub> 泡沫陶瓷人工椎体复合 rhBMP-2 动物体内成骨活性研究

### 1.4.1 实验动物分组及手术

将 12 只实验犬按数字表法随机分为 3 组, 每组 4 只。A 组: 植入复合 rhBMP-2 壳聚糖水凝胶的新型 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔泡沫陶瓷人工椎体; B 组: 植入复合空白干燥壳聚糖的新型 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔泡沫陶瓷人工椎体; C 组: 植入实验犬自体髂骨。所有骨缺损造模、血管结扎、材料放置与钢板固定均由同一组实验人员完成。手术采用 3% 戊巴比妥钠按 1 mL/kg 剂量经静脉注射麻醉。实验犬取右侧卧位, 手术取腰椎前外侧入路, 切口长约 12 cm, 依次切开腰背部皮肤、皮下组织, 触摸实验犬最下肋及腰椎横突定位。在 L<sub>4</sub> 椎体水平自腰

大肌间隙钝性分离肌肉,充分游离 L<sub>4</sub> 椎体水平双侧腰横动脉及伴行静脉并予以结扎。盐水纱布保护并牵开腹主动脉、下腔静脉,充分暴露 L<sub>4</sub> 椎体及上下相邻半个椎体。在冠状面以横突为界平行凿除 L<sub>4</sub> 椎体的前 2/3,以不可超越横突为限,以免凿入椎管,手术造成约半径 9 mm、高 23 mm 半圆柱形骨缺损。A、B、C 组按实验设计植入不同的内置物。确认各组内置物无松动后,再以长度 50 mm 手外科钢板偏侧面固定上下 2 椎体,钢板两端各上 1 枚螺钉固定。术后常规喂养,不作其他外固定。术后每只动物予以青霉素 160 万 U 肌肉注射,每日 1 次,持续 3 d。

1.4.2 实验犬术后大体观察、X 线影像学观察及取材 术后即刻观察实验犬站立情况,分别在术后 6、12、24 周行活动度检测。活动度检测方法为记录相同食物、相同高度诱惑下实验犬每分钟跳跃次数,每只实验犬每隔 0.5 h 重复 1 次,共计 3 次。分别与术后 6、12、24 周,在静脉麻醉下,摄腰椎侧位 X 线片,观察植入泡沫陶瓷人工椎体周围骨痂生长情况及置换节段椎体高度变化。术后 24 周,在 3% 戊巴比妥钠(1 mL/kg) 静脉麻醉下,采用空气栓塞法处死各组动物;暴露手术节段,相邻椎体从椎间盘处离断,取手术节段实验犬腰椎椎体;剔除腰椎椎体周围软组织,保留椎体小关节突完整, -20 °C 冰箱冷冻保存。

1.4.3 离体标本 Micro CT 新生骨量检测及 3D 图像重建 Micro CT 180°平扫取 A 组、B 组术后 24 周离体实验犬椎体标本,定位全部材料区域为感兴趣区(region of interest, ROI);以 50 μm 作为横切面厚度,对材料区域行横切面扫描,采用 Micro CT 信号选择功能抑制材料本身超高信号区域,产生约 200 张新生骨 2D 图像。利用 Micro CT 计算全部材料区域的新生骨量(bone volume, BV)。选取靠近材料上表面 5 张 2D 图像(共 250 μm 厚度),利用 Micro CT 自带分析软件进行新生骨 3D 重建。

1.4.4 生物力学测试(极限抗压实验) 生物力学测试是检验生物材料修复骨缺损有效性的金标准,极限抗压实验是脊柱生物力学常用的方法。本试验利用极限抗压实验测量泡沫陶瓷人工椎体和实验犬自体骨融合后整个椎体的抗压强度。具体方法:取出 -20 °C 冰箱冷冻椎体标本置于常温下解冻 24 h。采用游标卡尺测量每个椎体表面的平均长度和宽度,计算每个材料受力界面表面积计为 S(m<sup>2</sup>)。再将椎体标本上下端牢固固定,保证材料中心力线不倾斜。试验机加载速率为 0.5 mm/min,载荷从零开始一直压缩至椎体屈服为止,计算机辅助设计自动

记录仪记录载荷 - 位移曲线。实验在结构模拟、加载速度、安装固定方法等条件上均保持一致,以提高检测精确度。根据载荷 - 位移曲线读取最大抗压力 F<sub>m</sub>(N)。极限抗压强度计算公式:

$$P(\text{Pa}) = F_m(\text{N}) / S(\text{m}^2)$$

F<sub>m</sub>(N) 为最大载荷, S(m<sup>2</sup>) 为受力表面积。

## 1.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件对研究数据进行统计学分析。术后活动度检测及极限抗压强度检测采用单因素方差分析及 SNK-q 检验;新生骨量检测采用独立样本 t 检验。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 冻干壳聚糖水凝胶扫描电镜观察

扫描电镜下冻干壳聚糖呈 3D 网状薄膜结构, 3D 孔径 50 ~ 300 μm, 膜状结构表面均匀分布有直径微米级壳聚糖微球, 微球圆形径粒均一, 表面光滑无皱, 见图 2。

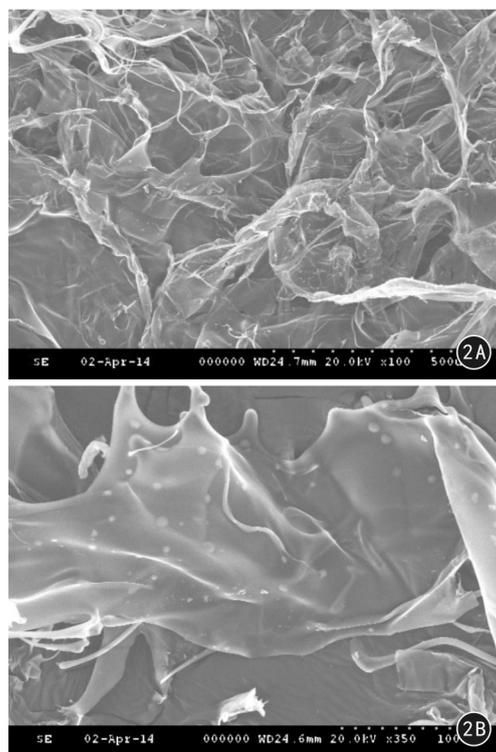


图 2 冻干水凝胶扫描电镜照片 2A 水凝胶呈 3D 网状薄膜结构(×100) 2B 膜状结构表面均匀分布有圆形、表面光滑的微米级壳聚糖微球(×350)

### 2.2 壳聚糖水凝胶复合 rhBMP-2 载药量及包封率测定

经测定制备所得壳聚糖水凝胶复合 rhBMP-2 的包封率为 91.88% ± 1.53% (n = 3); 载药量为 (39.84 ± 2.34) ng/mg (n = 3)。

### 2.3 复合 rhBMP-2 壳聚糖水凝胶的体外累积释放

曲线

rhBMP-2 累积释放量以游离 rhBMP-2 含量占负载总量的百分比表示。rhBMP-2 的释放表现出阶段性释放规律:在前 3 天中 rhBMP-2 表现为爆发性释放阶段,第 1 天时释放率为  $28.32\% \pm 3.01\%$ ,第 3 天时释放率达  $48.92\% \pm 6.27\%$ ,之后逐渐进入 rhBMP-2 缓慢释放阶段(第 3~12 天),到第 12 天时累积释放率达  $74.40\% \pm 6.29\%$ ,最后进入稳定阶段(第 12~15 天),到第 15 天时 rhBMP-2 累积释放率为  $76.97\% \pm 6.05\%$ ,最后 3 天释放率仅增加 2.57%。见图 3。

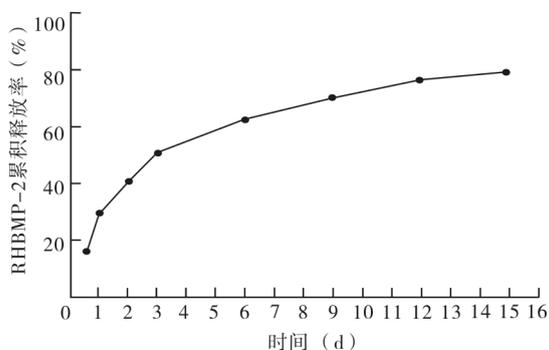


图 3 壳聚糖水凝胶复合 rhBMP-2 累积释放曲线

2.4 术后大体观察

实验犬术毕均能自主站立;术后所有实验动物未出现伤口感染、化脓现象。术后 6、12、24 周活动度检测显示,术后 6 周 C 组动物平均活动度恢复较 A 组和 B 组快( $P < 0.05$ ),A、B 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ );术后 12、24 周 B 组与 C 组活动度比较差异均有统计学意义( $P$  值均  $< 0.05$ ),但 A、C 组差异均无统计学意义( $P$  值均  $> 0.05$ )。见表 1。取材时观察植入材料周围组织的反应及泡沫陶瓷内部新生骨形成情况,可见术后 24 周 A 组与 B 组人工椎

体均与周围自体骨融合良好,材料内部有明显新生骨形成;C 组自体髂骨与椎体已融为一体,无明显界限。

表 1 3 组实验犬术前及术后 6、12、24 周活动度的比较(次/min,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	术前	术后 6 周	术后 12 周	术后 24 周
A	4	$19.67 \pm 6.56$	$4.17 \pm 1.80$	$12.25 \pm 4.03$	$15.25 \pm 4.43$
B	4	$22.33 \pm 3.98$	$3.92 \pm 1.78$	$9.42 \pm 3.12$	$12.25 \pm 3.89$
C	4	$21.25 \pm 5.24$	$7.42 \pm 1.93^{ab}$	$13.67 \pm 4.27^b$	$18.25 \pm 5.48^b$
F 值	-	0.753	13.538	3.816	5.002
P 值	-	$> 0.05$	$< 0.01$	$< 0.05$	$< 0.01$

注:A:复合 rhBMP-2 壳聚糖水凝胶人工椎体组;B:复合空白壳聚糖水凝胶人工椎体组;C:自体髂骨组;SNK-q 检验;与 A 组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,与 B 组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$

各组实验犬术后 6、12、24 周腰椎 X 线检查见图 4。与术后 6 周比较,术后 24 周 A 组复合 rhBMP-2 壳聚糖水凝胶人工椎体周围有明显新生骨形成,表现为人工椎体内部密度逐渐增强,人工椎体与自体骨间隙逐渐减小,且腰椎正常生理曲度逐渐恢复,手术节段椎体高度无明显丢失;B 组复合空白壳聚糖水凝胶人工椎体周围亦有新生骨形成,人工椎体与自体骨间隙有所减小,椎体高度亦无明显改变,但术后 24 周实验犬腰椎正常生理曲度恢复较 A 组和 C 组缓慢;C 组自体髂骨术后 24 周腰椎后突畸形基本消失,上下椎体间有少量骨桥形成,且在不承重区域出现明显骨吸收,说明自体髂骨塑形快于 A 组和 B 组。

2.5 离体标本 Micro CT 新生骨量检测及 3D 图像重建

术后 24 周 Micro CT ROI 新生骨量检测结果显示,A 组( $n = 4$ )材料内部新生骨量为  $(145.38 \pm 18.52) \text{mm}^3$ ,B 组( $n = 4$ )为  $(86.30 \pm 15.60) \text{mm}^3$ ,差异有统计学意义( $t = 4.879, P < 0.01$ )。采用 Micro

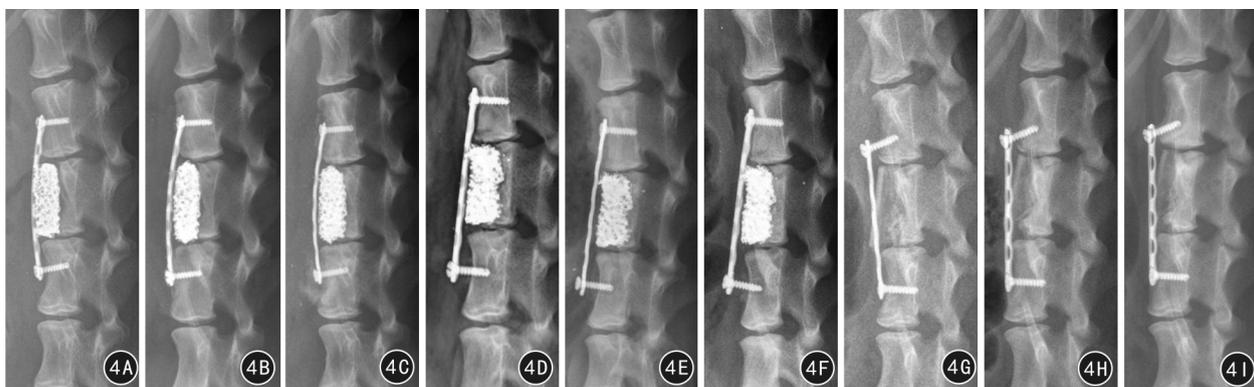


图 4 3 组实验犬术后 6、12、24 周腰椎 X 线片 4A~4C 分别为复合 rhBMP-2 壳聚糖水凝胶人工椎体组术后 6、12、24 周腰椎 X 线片 4D~4F 分别为复合空白壳聚糖水凝胶人工椎体组术后 6、12、24 周腰椎 X 线片 4G~4I 分别为自体髂骨组术后 6、12、24 周腰椎 X 线片

CT 信号选择功能抑制材料本身超高信号后对 2 组材料上表面 250  $\mu\text{m}$  范围行 Micro CT 新生骨 3D 重建,结果见图 5。

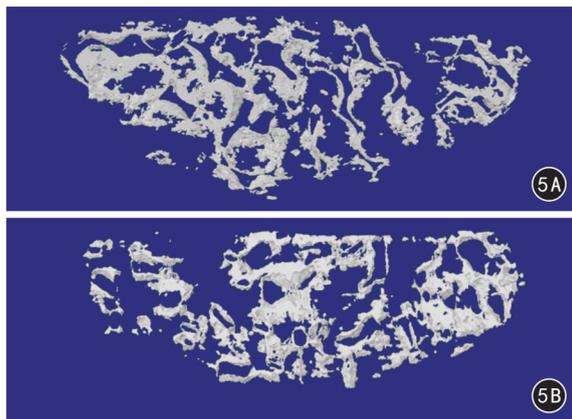


图 5 人工椎体上表面 250  $\mu\text{m}$  范围空洞内新生骨 Micro CT 3D 重建 5A 复合 rhBMP-2 壳聚糖水凝胶人工椎体组 5B 复合空白壳聚糖水凝胶人工椎体组

## 2.6 生物力学测试

单纯 HA/ZrO<sub>2</sub> 泡沫陶瓷人工椎体体外的极限抗压强度为 (2.24 ± 0.36) MPa。植入术后 24 周, A、B、C 组椎体标本的极限抗压强度分别为 (14.03 ± 1.67) MPa、(8.62 ± 1.24) MPa、(13.79 ± 1.43) MPa, 差异具有统计学意义 ( $n$  均为 4,  $F = 17.596, P < 0.01$ )。其中 A 组、C 组抗压强度高于 B 组, 差异均有统计学意义 ( $P$  值均  $< 0.01$ ); A、C 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

壳聚糖具有一定的止血、抗菌、抗癌转移等作用<sup>[16]</sup>。由于 rhBMP-2 极易失活, 为保证载药水凝胶中 rhBMP-2 活性, 本实验采用单纯三聚磷酸钠作为交联剂, 先制备出空白干燥壳聚糖, 再利用壳聚糖水凝胶的吸水溶胀作用将 rhBMP-2 载入的方法, 明显缩短了 rhBMP-2 在外界环境中的暴露时间, 最大限度地保证了药物活性。

从 rhBMP-2 体外累积释放曲线可以看出, rhBMP-2 的释放表现出阶段性规律, 在前 3 天时为爆发性释放阶段, 之后逐渐进入缓慢释放阶段 (3 ~ 12 d), 最后进入稳定阶段 (13 ~ 15 d)。这主要取决于 rhBMP-2 从壳聚糖水凝胶中缓释的机制。rhBMP-2 从壳聚糖水凝胶中释放的机制包括: (1) 通过静电、表面吸附等物理包埋方式所结合的 rhBMP-2 从水凝胶表面释放, 特征为爆发性释放, 称为扩散缓释; (2) 通过与特殊化学基团形成共价键作用所结合的 rhBMP-2, 这部分 rhBMP-2 伴随着壳聚糖的

降解从水凝胶内部游离出来, 特征为缓慢释放, 称为降解缓释。15 d 后进入稳定阶段, 即药物基本释放完全, 但此时 rhBMP-2 含量也仅占滴加总量的 76.97%, 这可能是由于 rhBMP-2 在溶解和缓释取样过程中的损耗、失活等原因造成。本实验所制备的壳聚糖水凝胶具有良好的表面形态, 制备流程安全、简单, 并能起到很好的缓释作用。

另外, 理想的人工骨材料需要具有良好的生物相容性和足够的力学强度。人工骨材料植入人体后会在机体内长期存留, 故良好的生物相容性是材料安全性的保障。HA/ZrO<sub>2</sub> 梯度复合材料是一种无细胞毒性、无急性体内毒性、不致溶血性, 具有良好组织相容性的生物材料<sup>[17-19]</sup>; 通过材料的浸提液培养新提取的健康年轻人末梢血单个核细胞, 包括对其凋亡、CD3/CD69 的表达、淋巴细胞的转化和细胞因子变化的检测, 表明 HA/ZrO<sub>2</sub> 生物陶瓷材料具有良好的生物相容性<sup>[20]</sup>。本研究将 HA/ZrO<sub>2</sub> 复合材料制成人工椎体植入实验犬椎体后发现, 实验动物术后活动度、饮食等大体情况良好, 伤口及手术深部未出现感染等表现, 实验犬术后也未出现体温升高等免疫排斥反应。证明 HA/ZrO<sub>2</sub> 复合材料人工椎体植入后不引起机体周围组织的不良反应, 具有良好的体内生物相容性。

此外在促使骨融合方面, HA 良好的骨传导性和骨诱导性已经得到了充分的验证, 是广泛应用于基础及临床研究的骨替代材料<sup>[21]</sup>。HA 部分降解后可释放出大量 Ca<sup>2+</sup> 和 HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 离子沉积于陶瓷基体表面。骨缺损的修复, 主要在于诱导新生骨形成, 而新生骨形成不管膜内成骨或软骨内化骨, 都需要经过新生骨的矿化过程。而新生骨的矿化实质上是体液中的钙、磷离子沉积形成磷灰石的过程。故要使新生骨快速矿化需要使局部钙、磷离子浓度升高至临界值, 从而刺激新骨的生成; 本研究将 HA/ZrO<sub>2</sub> 复合材料制成多孔泡沫陶瓷人工椎体后, 材料表层 HA 与新生骨接触面积增加, 也可明显提高植入材料与自体骨结合的程度<sup>[21-22]</sup>。最后, 将 HA/ZrO<sub>2</sub> 复合材料人工椎体制成多孔状泡沫陶瓷后可同样保证其具备足够的力学强度, 可满足术后即时稳定性。本研究制备的泡沫陶瓷人工椎体体外具有 2.31 ~ 3.10 MPa 的抗压强度, 植入动物体内 24 周后极限抗压强度可达 (8.62 ± 1.24) MPa, 而复合 rhBMP-2 壳聚糖水凝胶后的人工椎体植入体内 24 周后极限抗压强度可达 (14.03 ± 1.67) MPa, 接近自体髂骨移植后椎体的极限抗压强度。术后 24 周 CT 3D 重建及新生骨量检测也显示人工椎体空洞内有大量的新生骨形成, 表明 HA/ZrO<sub>2</sub> 梯度复

合泡沫陶瓷材料人工椎体可起到良好的修复椎体缺损的作用,而将其复合 rhBMP-2 壳聚糖水凝胶后可进一步提升人工椎体的体内成骨诱导能力。

本研究从动物体内实验方面充分证实复合 rhBMP-2 壳聚糖水凝胶人工椎体具备良好的椎体骨缺损修复能力,但其细胞水平的骨诱导机制尚未完全阐明,有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 姚一民, 檀臻炜, 匡红, 等. 生物人工材料人工骨修复下肢骨缺损的临床观察[J]. 中华创伤杂志, 2012, 28(8): 708-711. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-8050.2012.08.012
- [2] Müller U, Imwinkelried T, Horst M, et al. Do human osteoblasts grow into open-porous Titanium? [J]. Eur Cell Mater, 2006, 11: 8-15.
- [3] Abarrategi A, Moreno-Vicente C, Martínez-Vázquez FJ. Biological properties of solid free form designed ceramic scaffolds with BMP-2: *in vitro* and *in vivo* evaluation[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e34117. DOI:10.1371/journal.pone.0034117.
- [4] Yusop AH, Bakir AA, Shaharom NA, et al. Porous biodegradable metals for hard tissue scaffolds: a review [J]. Int J Biomater, 2012, 2012: 641430. DOI:10.1155/2012/641430.
- [5] Kim H, Lee CK, Yeom JS, et al. The efficacy of porous hydroxyapatite bone chip as an extender of local bone graft in posterior lumbar interbody fusion [J]. Eur Spine J, 2012, 21(7): 1324-1330. DOI:10.1007/s00586-011-2092-z.
- [6] Rodgers MA, Brown JV, Heirs MK, et al. Reporting of industry funded study outcome data: comparison of confidential and published data on the safety and effectiveness of rhBMP-2 for spinal fusion[J]. BMJ, 2013, 346: f3981. DOI:10.1136/bmj.f3981.
- [7] Woo EJ. Expanded indication for recombinant human bone morphogenetic protein 2 [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011, 36(21): 1817.
- [8] Seeherman H, Wozney JM. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2005, 16(3): 329-345. DOI:10.1016/j.cytogr.2005.05.001.
- [9] Shields LB, Raque GH, Glassman SD, et al. Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2006, 31(5): 542-547. DOI:10.1097/01.brs.0000201424.27509.72.
- [10] Vaidya R, Sethi A, Bartol S, et al. Complications in the use of rhBMP-2 in PEEK cages for interbody spinal fusions [J]. J Spinal Disord Tech, 2008, 21(8): 557-562. DOI:10.1097/BSD.0b013e31815ea897.
- [11] Smucker JD, Rhee JM, Singh K, et al. Increased swelling complications associated with off-label usage of rhBMP-2 in the anterior cervical spine [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2006, 31(24): 2813-2819. DOI:10.1097/01.brs.0000245863.52371.c2.
- [12] Shi S, Cheng X, Wang J, et al. RhBMP-2 microspheres-loaded chitosan/collagen scaffold enhanced osseointegration: an experiment in dog [J]. J Biomater Appl, 2009, 23(4): 331-346. DOI:10.1177/0885328208090013.
- [13] Patel ZS, Yamamoto M, Ueda H, et al. Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2 [J]. Acta Biomater, 2008, 4(5): 1126-1138. DOI:10.1016/j.actbio.2008.04.002.
- [14] Kim S, Kang Y, Krueger CA, et al. Sequential delivery of BMP-2 and IGF-1 using a chitosan gel with gelatin microspheres enhances early osteoblastic differentiation [J]. Acta Biomater, 2012, 8(5): 1768-1777. DOI:10.1016/j.actbio.2012.01.009.
- [15] 王玮, 尹庆水, 张余. 重组人骨形态发生蛋白 2 壳聚糖纳米微球的制备及体外细胞毒性 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(25): 4611-4614. DOI:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.25.013.
- [16] Wang AH, Chen XG, Liu CS, et al. Preparation and characteristics of chitosan microspheres in different acetylation as drug carrier system [J]. J Microencapsul, 2009, 26(7): 593-602. DOI:10.3109/02652040802586167.
- [17] 全仁夫, 杨迪生, 吴晓春, 等. 二氧化锆梯度复合羟基磷灰石生物陶瓷的制备及其体外免疫相容性 [J]. 生物医学工程学报, 2006, 23(5): 1056-1061. DOI:10.3321/j.issn:1001-5515.2006.05.032.
- [18] 全仁夫, 汤祥华, 杨迪生, 等. HA/ZrO<sub>2</sub> 复合材料颗粒的体外基因毒性的初步研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(1): 175-178. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2011.01.034.
- [19] 全仁夫, 杨迪生, 苗旭东, 等. 二氧化锆梯度复合羟基磷灰石生物材料对大鼠成骨细胞体外活性的影响 [J]. 中华创伤杂志, 2006, 22(11): 852-857. DOI:10.3760/j.issn:1001-8050.2006.11.015.
- [20] 张敏, 汪宏斌, 全仁夫, 等. 羟基磷灰石-二氧化锆生物复合材料的制备及其生物相容性 [J]. 复合材料学报, 2006, 23(2): 115-122. DOI:10.3321/j.issn:1000-3851.2006.02.021.
- [21] Ohgushi H, Dohi Y, Tamai S, et al. Osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells in porous hydroxyapatite ceramics [J]. J Biomed Mater Res, 1993, 27(11): 1401-1407. DOI:10.1002/jbm.820271107.
- [22] 全仁夫, 威记伟, 杨迪生, 等. 羟基磷灰石和二氧化锆梯度复合生物材料修复犬骨缺损 [J]. 中华创伤杂志, 2012, 28(10): 946-953. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-8050.2012.10.022.

(收稿日期:2015-05-10)

(本文编辑:章新生)