

磷酸钙骨水泥人工骨的制备及修复兔桡骨大段骨缺损的实验研究

同志超¹ 王坤正¹ 韩学哲² 李毅¹ 刘森² 赵小魁¹ 刘凯¹

(1. 西安交通大学第二医院骨科, 陕西 西安 710004; 2. 西安交通大学第一医院骨科)

【摘要】 目的 制备水泥型羟基磷灰石(CPC)人工骨,并研究 CPC 人工骨修复兔桡骨大段骨缺损的成骨效果。方法 高温法制备出磷酸四钙,然后在模拟体内环境下将其与无水磷酸氢钙发生水化固化反应,合成水泥型羟基磷灰石人工骨,将自制的 CPC 人工骨植入新西兰兔桡骨大段骨缺损模型中,术后 4、8、12、16 周取材,采用 HE 染色和 Masson 三色染色分析评价骨缺损修复效果。结果 CPC 植入后 4 周有新生软骨形成及未成熟的骨组织,可见大量的软骨细胞、成骨细胞、胶原组织及较多的小血管。8~16 周新骨继续生成,人工骨逐渐改建为成熟的板层骨、骨小梁和髓腔结构。结论 CPC 人工骨制备简单,有良好的生物相容性和成骨效果,可能是一种较理想的骨移植替代材料。

【关键词】 磷酸钙类; 骨移植; 桡骨

Preparation of calcium phosphate cement as artificial bone and experimental studies on the repair of rabbits' segmental defects of radius TONG Zhichao, WANG Kunzheng, HAN Xuezhe, et al. Department of Orthopaedic Surgery, the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University (Shanxi Xi'an, 710004, China)

【Abstract】 **Objective** To prepare the tetra-calcium phosphate cement(CPC)in higher temperature and study it's effect in the repair of rabbits' segmental defects of radius. **Methods** Tetra-calcium phosphate (TTCP) was prepared by high heating, than imitated the internal situation of humanbody, for hydrolization and solidation, to synthesize the hydroxy-calcium phosphate, as artificial bone in sement-type(CPC), then implanted them into the large segmental defect of radius of New Silan rabbits model. The implanted materials were taken out at 4th, 8th, 12th, and 16th weeks after implantation. The histological sections, with HE and Masson's trichromic staining made, to evaluate the effectiveness of repair of bony defect. **Results** There existed new cartilage and new immature bone tissue in the bone substitute in 4 weeks after operation, as well as mass of cartilagenous cells, osteoblasts, collagen tissue and more small vessels were seen. In the period of 8 to 16 weeks after operation, new bone was formed continuously, artificial bone gradually reconstructed to mature lamellar bone, bone trabeculae and medullary cavity, etc. **Conclusion** The preparation of CPC is simple. Its effectiveness of biocompatibility and osteogenesis is excellent and it may be an ideal bone substitution. Its clinical application in future will be very hopeful.

【Key words】 Calcium phosphates; Bone transplantation; Radius

长骨节段性骨缺损、骨不连等是骨科治疗的一个难题,骨移植术是常用且有效的治疗方法之一。目前临床上对需植骨的患者多采用自体骨移植,虽自体骨移植成骨效果较好,但需开辟第二术野,增加患者手术痛苦及术后供骨区出现形态和功能障碍等并发症,而目前的骨替代品又存在许多缺陷,因此,寻求和研制理想的骨移植材料一直是骨科生物材料科学领域的一项重要课题。本研究采用兔桡骨干大段骨缺损模型,研究应用自制的 CPC 人工骨修复兔桡骨大段骨缺损的能力,为该人工骨的临床应用提

供基础资料。

1 材料与方法

1.1 CPC 人工骨的制备 取一定量的化学分析纯 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 CaCO_3 粉末,在 1400°C 高温下反应 24 h,即得到 $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ 。将 $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ 和 CaHPO_4 粉末充分混匀后,按一定比例加入 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液,调和成糊状物,装入模具中,于 37°C 恒温水箱中进行固化反应,反应产物为羟基磷灰石($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$),24 h 后,即制得 CPC 骨块,

并将其加工成 4 mm×4 mm×10 mm 的柱形骨块,消毒备用。同时制作直径为 8 mm,高为 10 mm 的圆柱状骨块,测其抗压强度。

1.2 CPC 人工骨的体外测试

1.2.1 CPC 人工骨肉眼观察

CPC 骨块色白,表面光滑,质硬,较脆,可用剪刀切割,置于水中不溃散,肉眼观察未见明显孔隙结构(图 1)。

1.2.2 CPC 骨块 SEM 观察

将 CPC 骨块横断,常规处理,用 KYKY 2000 型扫描电镜进行观察:见 CPC 骨块主要由针状、花瓣状晶体构成,微孔直径约 4~10 μm,孔隙相互交通(图 2)。

1.2.3 CPC 骨块 X 线衍射观察(XRD)

取一定量的 CPC 粉末,于理学 D/max-III 型 X-射线衍射(XRD)分析仪上测试。结果分析提示:CPC 骨块主要成分为低结晶度的 HA,同时有少许未反应完全的磷酸四钙及极少量的磷酸三钙。

1.2.4 抗压强度测定

将直径 8 mm,高 10 mm 测试骨块相对端面处理平行后,测量其直径,计算受压面积,并置于 WE-10 型万能材料实验机加载平台上,对骨块施加垂直压缩力,测量骨块的破坏负荷,按公式 $R_0 = P/S$ 计算骨块的抗压强度,测量结果见表 1。式中 R_0 :压缩强度(MPa);P:破坏负荷(N);S:受压缩面积(cm²)。

表 1 抗压强度测量结果(n=5)

编号	样品直径 mm	受压缩面积 cm ²	破坏负荷 kN	耐压强度 MPa
1	8.66	0.589	2.50	42.44
2	8.65	0.588	2.52	42.86
3	8.65	0.588	2.51	42.52
4	8.67	0.590	2.53	42.90
5	8.66	0.589	2.55	43.29
均值	8.658	0.589	2.522	42.80

2 动物实验

2.1 兔桡骨干节段性骨缺损模型的建立与修复

选用新西兰兔 24 只,体重 2.0~2.5 kg,平均分为 4 组,采用自身对照分为实验侧和空白对照侧。行双侧前肢前臂纵切口,于桡骨干中 1/3 处,切除桡骨干 10 mm(含骨模),造成桡骨干节段性骨缺损模型。一侧为空白对照,另一侧植入自制的 CPC 人工骨(4 mm×4 mm×10 mm)。

2.2 观察指标

2.2.1 大体观察

观察术后动物生长情况及各时期取材时移植物的颜色、质地、血管形成,与宿主骨界面情况和周围软组织情况。

2.2.2 X 线检查

术后第一天、4 周、12 周各组兔行双侧前肢正位 X 线摄片,观察骨缺损区的修复情况。

2.2.3 组织学检查

术后 4、8、12、16 周各组骨标本取材,行大体观察,再经常规固定,脱钙,包埋,纵形切片,HE 及 Masson 三色染色,光镜下观察桡骨骨缺损的修复情况。

2.3 结果

2.3.1 大体观察

术后术肢伤口无红、肿及分泌物,无窦道形成。术后取材标本:术后 4 周,人工骨在桡骨断端嵌顿紧密,周围较多软/硬骨痂形成,人工骨骨膜与桡骨干骨膜延续,将人工骨环形包裹,人工骨表面粗糙不平,呈虫蚀样改变,虫蚀样处有软/硬骨痂形成。12、16 周,人工骨被骨痂完全包埋,人工骨与宿主骨界限消失,硬/软骨痂桥接骨缺损,横切人工骨见有血丝。术后各时期,人工骨周围软组织未见变性、坏死及包裹物质。空白对照组,桡骨缺损处仅有软骨痂形成,周围未见明显纤维包裹,至 12 周桡骨干断端髓腔封闭硬化。

2.3.2 X 线检查

实验侧:术后 1 d,桡骨截骨面清晰,植入人工骨表面光滑,呈高密度影,密度明显高于骨皮质,与骨缺损断端嵌顿紧密;术后 4、8、12、16 周连续观察可见人工骨表面及两端逐渐模糊,桡骨截骨面出现硬骨痂,其中 16 周时,边缘部分隐约可见骨纹理,人工骨密度降低,但仍高于骨皮质密度影。空白对照侧:术后 1 d,桡骨骨缺损处呈明显低密度影,术后 4 周,截骨端少许骨痂生长;术后 12 周,桡骨干断端髓腔封闭、钙化,形成骨不连。

2.3.3 实验侧组织学检查

术后 4 周,人工骨两端及周边部分出现新生软骨及不成熟的骨组织,呈片状或岛状。可见软骨细胞、骨细胞及破骨细胞,未见炎性细胞聚集(图 3)。术后 8 周,人工骨两端及周边向中心部位逐渐出现较多新生软骨及不成熟的骨组织,有网状的骨小梁结构,开始出现髓腔结构,可见大量的软骨细胞、成骨细胞及胶原组织(图 4)。术后 12 周,出现大量的新生软骨及成熟的骨组织,新骨逐步改建,形成板层骨结构(图 5)。术后 16 周,新骨进一步改建,骨结构逐步成熟,大量新生的板层骨相互融合生长,新骨与宿主骨直接接触,两者间无纤维组织间隔(图 6)。

3 讨论

羟基磷灰石人工骨材料应用于临床始于 20 世纪 70 年代,由于其良好的生物相容性及骨引导作

用,而逐渐被临床使用。Felsenfeld 等^[1]发现,多孔陶瓷板植入骨创面 2 年,其孔内仅 17% 为新骨组织,而 44% 仍为软组织。而颗粒状羟基磷灰石由于其颗粒松散,不能凝结塑形,植入骨创面后,材料易流失^[2]。我们经研究试制,自行合成了能够克服以上缺陷的 CPC 人工骨,它可在常温及模拟体内环境下自行固化,与陶瓷型的 HA 一样具有良好的生物相容性,且操作方便,可塑性强,是一种很有前途的新一代人工骨材料。从微观结构上看,CPC 骨块主要由针状、花瓣状晶体构成,微孔直径约 4~10 μm ,孔隙间相互交通,与 Pater、Knnack、Constantz 等^[3-5]的观察结果一致。微孔增大了材料与组织液接触的面积,有利于生物降解^[3]。从力学性能上看,正常松质骨抗压强度为 50 MPa,抗折强度为 3.5 MPa。Constantz 等^[5]发现 CPC 混合 12 h 后其强度最强,压缩强度约 55 MPa,大于松质骨,抗张强度约 2.1 MPa,约等于松质骨。我研制的 CPC 人工骨抗压强度为 42.80 MPa,与 Constantz 的研究结果基本一致,可适用于人皮质骨和非负重骨缺损的修复。因本材料模型较小,未行抗折强度的测定。

(1) 生物相容性。Yuan 等^[6]、Costantino 等^[7]将 CPC 制成的盘状物植入实验动物的皮下或肌肉内,术后 3~6 个月,组织学观察肌肉中 CPC 包埋部位均无排异反应、无组织坏死,本实验中 CPC 修复兔桡骨大段骨缺损,CPC 周围未见破溃液化,4~16 周 CPC 脱钙骨组织切片观察,未见炎性细胞聚集,证明了 CPC 具有良好的生物相容性。

(2) 可降解性。我们研究证实,CPC 在体内 4 周其边缘部分开始降解,大体标本观察表现为其表面的虫蚀样改变,4~16 周脱钙骨组织切片观察,植入 CPC 材料边缘可见破骨细胞,并在周边降解部位有软骨形成,继而发生软骨内成骨,而其中心部位为未降解的 CPC 无定型组织,但有少量纤维连接。随观察周期的延长,继续向中心部位缓慢降解,降解区未形成空腔,无体积缺失,而被新生软骨和骨组织替代。Knnack 等^[4]认为水化固化反应终产物为低结晶度的 HA,其在犬股骨缺损修复的实验中发现 CPC 降解与新骨生成速度相匹配,植入术后 26 周,CPC 组约有 99% 的新骨形成。我们认为 CPC 具有良好

的骨传导性和一定的生物降解性。

(3) 骨传导性。4~16 周脱钙骨组织切片观察,4 周即有骨宿主床的内外骨膜、骨髓和周围组织向植入 CPC 的降解区长入,毛细血管和血管周围组织的骨前体细胞(间充质细胞、成软骨细胞)、软骨细胞和骨细胞,产生新生软骨和骨组织修复骨缺损,新骨与材料直接接触,两者间无纤维组织。随观察周期的延长,植入 CPC 材料从边缘至中心部位逐渐降解吸收而被新生骨取代,并逐渐形成成熟的板层骨和髓腔结构,CPC 骨块中心尚未完全降解,为纤维组织连接的无定型物质。说明 CPC 人工骨在成骨过程中边缘降解边成骨边改建,降解从人工骨周边部开始,以软骨化骨成骨。

综上所述,我们合成的 CPC 人工骨,体外测试具有一定空间结构及机械强度,有关 CPC 的细胞毒性实验、肌肉包埋等安全性实验以及复合细胞因子实验也已完成,证实该材料有良好的生物相容性,并可作为细胞因子、抗菌素等的理想载体并能保证其充分发挥作用。动物实验亦证实该人工骨有良好的骨传导性,为其修复骨缺损的临床应用提供实验基础,具有进一步研究价值和广阔的临床应用前景。

(本文图 1-6 见后插页 1)

参考文献

- 1 Felsenfeld AJ, Harrelson JM, Gutman RA. A quantitative histomorphometric comparison of 40 micron thick paragon section with 5 micron thick goldner sections in study of undecalcified bone. *Calcif Tissue Int*, 1982, 34: 232-240.
- 2 Shindo ML, Costantino PD, Friedman CD, et al. Facial skeletal augmentation using hydroxyapatite cement. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1993, 119: 185-194.
- 3 Pater D, Costantino MD, Crain D, et al. Experimental hydroxyapatite cement cranioplasty. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1992, 90(2): 174-191.
- 4 Knnack D, Goad ME, Aiolova M, et al. Resorbable calcium phosphate bone substitute. *J Biomed Mater Res*, 1998, 43(4): 399-409.
- 5 Constantz BR, Ison IC, Fulmer MT, et al. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science*, 1995, 267: 1796-1805.
- 6 Yuan H, Li Y, Bruijn JD, et al. Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs. *Biomaterials*, 2000, 21(12): 1283-1290.
- 7 Costantino PD, Friedman CD, Chow LC, et al. Hydroxyapatite cement I. Basic chemistry and histologic properties. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1991, 117(4): 379-389.

(收稿:2002-11-01 修回:2003-02-19 编辑:王宏)

韦氏活骨 I 号胶囊治疗家兔股骨头缺血性坏死的实验研究

(正文见 716 页)

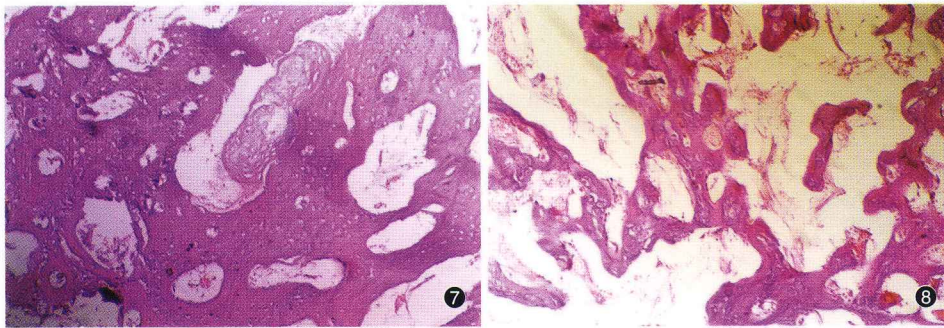


图7 实验组术后第20周组织学切片见骨小梁致密整齐,分布均匀。HE × 100

图8 对照组术后第20周负重区软骨下骨小梁杂乱稀疏。HE × 100

实验性骨质疏松大鼠胫骨髌病理变化的图像分析研究

(正文见 719 页)

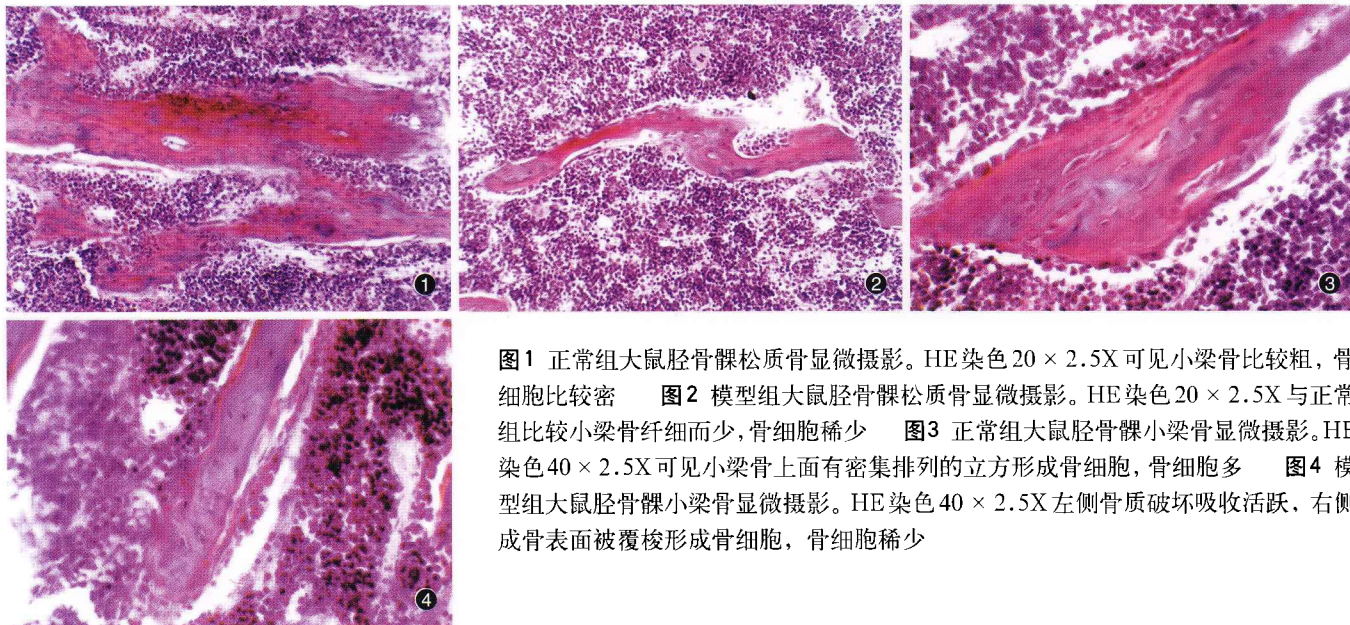


图1 正常组大鼠胫骨髌松质骨显微摄影。HE染色20 × 2.5X可见小梁骨比较粗,骨细胞比较密 图2 模型组大鼠胫骨髌松质骨显微摄影。HE染色20 × 2.5X与正常组比较小梁骨纤细而少,骨细胞稀少 图3 正常组大鼠胫骨髌小梁骨显微摄影。HE染色40 × 2.5X可见小梁骨上面有密集排列的立方形成骨细胞,骨细胞多 图4 模型组大鼠胫骨髌小梁骨显微摄影。HE染色40 × 2.5X左侧骨质破坏吸收活跃,右侧成骨表面被覆梭形成骨细胞,骨细胞稀少

磷酸钙骨水泥人工骨的制备及修复兔桡骨大段骨缺损的实验研究

(正文见 723 页)

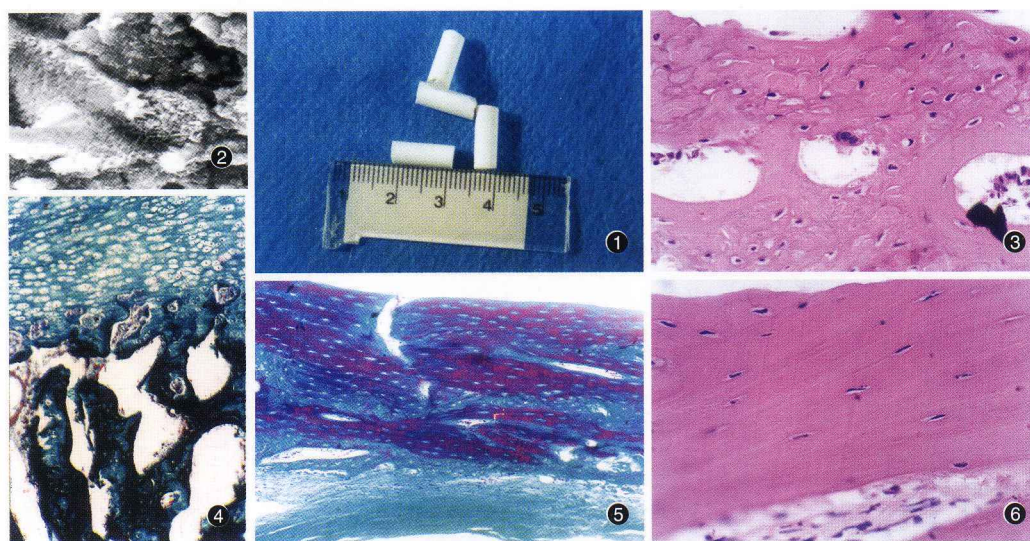


图1 CPC人工骨肉眼观察可见骨块色白,表面光滑,质硬,较脆,未见明显孔隙结构 图2 CPC骨块SEM可见骨块主要由针状、花瓣状晶体构成,微孔直径约4~10μm(SEM × 3000) 图3 植入术后4周,出现新生软骨及不成熟的骨组织,可见软骨细胞、骨细胞及破骨细胞(HE × 40) 图4 植入术后

8周,出现髓腔结构,可见大量的软骨细胞、成骨细胞及胶原组织(Masson × 10) 图5 植入术后12周,出现大量的新生软骨及成熟的骨组织,并向板层骨改建(Masson × 4) 图6 植入术后16周,骨结构逐步成熟,板层骨相互融合生长(HE × 40)