

# 明胶-磷灰石-米诺环素仿生纳米复合材料修复兔胫骨缺损\*\*\*

周 剑,汤 健,李全利,张建湘,周 健,窦晓晨

## Rabbit tibial defects repaired by nano-gelatin-apatite-minocycline bionic composite

Zhou Jian, Tang Jian, Li Quan-li, Zhang Jian-xiang, Zhou Jian, Dou Xiao-chen

#### Abstract

**BACKGROUND**: The bionic nano-composite materials have the similar structure and microenvironment to the autologous bone. Thus they are promising to be applied in the clinic.

**OBJECTIVE:** To observe the feasibility of repairing rabbit tibial defects by the new bionic composite of nano-gelatin-apitate-minocycline

METHODS: Twenty healthy adult New Zealand rabbits were used in this study to establish a 15mmx8mm critical size defect on rabbit tibial bones. All rabbits were randomly divided into experimental (*n*=16) and blank control groups (*n*=4). New materials were implanted into the segmental bone defects in the experimental group, but no implant was given to the blank control group. X ray and histological examinations were performed to compare the union of fracture at 2, 4, 8, and 12 weeks postoperatively. **RESULTS AND CONCLUSION:** General observations showed that the fractured bone healed at 8 weeks postoperatively in the experimental group, and the moulding was close to normal at 12 weeks. X ray showed that bony callus gradually increased over time was went by in the experimental group, the fractures almost healed and the moulding was finished at 12 weeks postoperatively. Histological examination indicated that the materials began to be absorbed at 4 weeks postoperatively, reconstractured by new bone at 8 weeks postoperatively, and completely repaired at 12 weeks postoperatively in the experimental group, and the bone defects were filled with the fibrous tissues. The new bionic composite of nano-gelatin-apitate-minocycline can repair critical size defect effectively.

Zhou J, Tang J, Li QL, Zhang JX, Zhou J, Dou XC.Rabbit tibial defects repaired by nano-gelatin-apatite-minocycline bionic composite. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(25):4563-4567. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

#### 摘要

背景:仿生纳米复合材料具有与自体骨相似的组成和结构,有较好的应用前景。
目的:观察新型明胶-磷灰石-米诺环素仿生纳米复合材料修复兔胫骨缺损的效果。
方法:取 20 只健康成年新西兰大白兔,制作胫骨上端 15 mm×8 mm 的腔隙性临界性骨缺损。随机数字表法分为实验组(n=16)和空白对照组(n=4)。实验组植入课题组研制的明胶-磷灰石-米诺环素仿生纳米复合骨修复材料新型复合材料,空白对照组不植入任何材料。分别于术后 2,4,8,12 周行大体观察、X 射线平片及组织学观察新型骨修复材料的骨修复效果。
结果与结论:大体观察显示实验组植入 8 周后缺损已经融合,12 周时塑形接近正常。X 射线平片显示随着时间延长,实验组骨缺损骨痂增多,12 周基本愈合,塑形完成,空白对照组未见骨性修复,形成骨不连。组织学观察实验组术后 4 周材料开始吸收,8 周后降解被新生骨取代,12 周完全修复,空白对照组各时间点均由纤维组织充填。提示新型明胶-磷灰石-米诺环素仿生纳米复合材料能有效促进临界性骨缺损的修复。
关键词:明胶;羟基磷灰石;米诺环素;生物相容性;兔;组织工程doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.25.002

周剑,汤健,李全利,张建湘,周健,窦晓晨.明胶-磷灰石-米诺环素仿生纳米复合材料修复兔胫骨缺损[J].中国组织工程研 究与临床康复,2010,14(25):4563-4567 [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

临床上由于骨肿瘤及车祸等高能量的创 伤增多,骨折致骨缺损的患者大量增加,经常 需要做植骨治疗,目前临床上的植骨主要有自 体骨,异体骨(包括异体冻干骨,异体脱矿骨 基质),人工骨等。自体骨移植是临床治疗骨 缺损的金标准,但是存在着对患者的二次创伤 以及取材量少的缺点,异体骨存在着难以克服 的免疫排斥反应以及疾病的传播,因此近年来 人工骨的研究为解决这个难题带来了希望。

近20年来,生物材料的分子仿生设计已成 为现代硬组织修复材料设计的主导思想和实 现新一代生物材料的理想途径。其主要思想是 在温和的生理条件下,以有机大分子为模板控 制无机晶体的形成,通过生物大分子的自组装 形成纳米等级的、有序的类骨结构<sup>[1-7]</sup>。

课题组采用明胶作为调控羟基磷灰石晶体成 核、生长的有机基质模板,同时装载抗菌药物米 诺环素,合成一种新型的、可降解的、生物活性 的、可缓释抗菌药物的纳米复合硬组织修复材料。 Department of Orthopaedics, First Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Stomatology Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Anhui Province Laboratory of Oral Disease, Hefei 230032, Anhui Province, China

Zhou Jian, Studying for master's degree, Department of Orthopaedics, First Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Stomatology Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Anhui Province Laboratory of Oral Disease, Hefei 230032, Anhui Province, China zhoujian831207@ 163.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No.30772440\*; High-Tech Research and Development Program of Anhui Province, No.08010302196\*

Received: 2009-12-06 Accepted: 2010-01-29

安徽 医科大学附属第一医院骨科, 安第一医院骨科, 安徽 医唇科大学附属口腔医病研究省 口腔废病研究省省 级实验室,安徽省 合肥市 230032

中图分类号:R318 文献标识码:B 文章编号:1673-8225 (2010)25-04563-05

收稿日期:2009-12-06 修回日期:2010-01-29 (20091206005/WL•H) 实验通过制作兔胫骨临界性骨缺损动物模型来评价这种 新型硬组织修复材料促进骨缺损修复的效果。

## 1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点:实验于2009-03/10在安徽医科大学动物实验中心完成。

材料:健康新西兰大白兔20只,体质量2.5~3.5 kg, 雌雄不拘,购于安徽医科大学动物实验中心(合格证号: 皖医实动准字02号),实验过程中对动物的处置符合中 华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验 动物的指导性意见》标准<sup>[8]</sup>。随机数字表法分为实验组 (*n*=16)和空白对照组(*n*=4)。

## 主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
溶液沉淀合成、非烧结羟基 磷灰石粉末(微米级)	四川大学口腔医学院材料研究室
明胶 <b>(G9382)</b>	Sigma 公司
盐酸米诺环素(纯度 99%)	武汉远城科技发展有限公司
显微镜	Olympus bx51 pixellink
微型直流高速调速电钻套装	韩国 STRONG 204 系列
Revolution XR/d X射线光机	美国 GE 公司

## 实验方法:

复合材料的合成:将一定量的常规羟基磷灰石、米诺 环素的HCI溶液,加入一定质量的明胶溶液中,在碱性 条件下,反应2 h。沉淀物静止、陈化,后离心,用去 离子水反复洗涤,使pH值接近中性。最后将沉淀物冷冻 干燥,获得新型仿生纳米复合骨修复材料,见图1。



动物模型制备:参照文献制作胫骨上端15 mm×8 mm 的腔隙性临界性骨缺损<sup>[9-13]</sup>。3%戊巴比妥钠按1 mg/kg 行耳缘静脉注射麻醉,采用静脉静滴针术中留置静脉通 道补液,待麻醉效果满意后,固定四肢,剪除双膝以下 小腿的兔毛,碘伏消毒,铺洞巾。以膝关节以下胫骨内 髁的平台为基点,做一纵行切口,约3 cm,分离软组织, 仔细剪除内髁平台周围骨膜,用口腔科磨钻切除胫骨内 髁的平台关节面以近皮质骨约1.5 cm×0.8 cm大小,刮 匙刮除骨髓及松质骨。冲洗后,仔细止血。实验组:于 术后2,4,8,12周实验组各取4只动物填塞实验材料, 压紧填实;空白对照组未处理。全层缝合皮肤,外用手 术切口敷料包裹切口,术中采用静脉通道补液250 mL, 术后未予以固定,笼养,常规饲养。

## 指标检测:

大体观察:于术后2,4,8,12周耳缘静脉注射空 气处死动物,取动物双下肢,去除软组织,观察植入材 料与骨缺损界面的生长情况。

X射线检查:于术后2,4,8,12周取动物双下肢拍片,观察骨缺损愈合情况,条件为0.4 s,50 mA,40 kV。

病理切片:取下来的骨缺损样本甲醛固定后甲酸常规脱钙石蜡包埋,切片苏木精-伊红染色,观察骨缺损 变化及材料与宿主骨结合情况。

**主要观察指标**:大体观察、**X**射线平片及组织学观察 新型骨修复材料的骨修复效果。

设计、实施、评估者:实验设计为第一作者在导师 指导下设计完成,实验材料的合成,干预实施,数据采 集等均为全体作者,评估为第一作者。

#### 2 结果

2.1 实验动物数量分析 通过改进实验条件和术后饲 养水平,以及合理改进实验时间,20只家兔均成活至实 验要求时间。

2.2 大体观察植入材料与骨缺损界面的生长情况

空白对照组:第12周软组织增生充填覆盖骨缺损, 未形成骨性愈合。标本剖面见骨缺损髓腔形成空腔, 髓腔两端封闭,未有新生骨长入,见图2。



a: 12 wk postoperatively

b: Sectional drawing at 12 wk postoperatively

Figure 2Gross observation of the growth of implant on<br/>bone defect surface in the blank control group图 2大体观察空白对照组植入材料与骨缺损界面的生长<br/>情况

实验组:第2周手术伤口愈合良好,无红肿,无渗出。 处死后取材观察骨缺损表面,见植入材料颜色未改变, 内有少量红色组织形成,植入物材料的硬度较材料本身 明显增加,已经形成整体。与周围组织界限仍然较清晰, 接触较好,无包膜,无炎症反应,见图3a。第4周手术 切口已经完全愈合,新毛长出,无红肿,无渗出,动物



活动自如。处死后取材见植入材料颜色较之前变淡, 与周围骨组织界限已经模糊,植入物材料的硬度较材 料本身明显增加,与周围骨组织的硬度已接近,无炎 症反应,见图3b。第8周:手术切口已与正常无异。处 死后取材见植入材料颜色较之前变淡,植入物材料的 硬度与周围骨组织的硬度已接近,缺损周围有大量骨 痂生成,无炎症反应,见图3c。第12周:处死后取材 见骨缺损区已骨性愈合,有血管孔生成,见图3d。



a: 2 wk postoperatively; b: 4 wk postoperatively; c: 8 wk postoperatively; d: 12 wk postoperatively

Figure 3Gross observation of the growth of implant on<br/>bone defect surface in the experimental group<br/>图 3图 3大体观察实验组植入材料与骨缺损界面的生长情况

2.3 X射线观察骨缺损愈合情况

空白对照组:12周缺损区边界硬化,境界清晰,缺 损区密度不均匀,见图4。



实验组:术后当天:与胫骨上段形成一个1.5 cm× 0.8 cm大小的骨缺损,与髓腔相通,骨折断端清晰, 与髓腔相通。术后2周:骨缺损区密度轻度增高,但仍 较清楚,骨折断端周围有毛玻璃样骨组织形成,见图 5a。术后4周:骨缺损面积减少,骨痂密度增高,呈云 雾状,骨痂基本能将缺损处充填,骨缺损区基本上已 模糊,见图5b。术后8周:骨缺损区密度较之前明显增 高,骨折周围界限模糊,见图5c。术后12周:缺损区 已经基本愈合,密度稍降低,骨缺损边界已看不清, 见图5d。



2.4 苏木精-伊红染色观察骨缺损变化及材料与宿主 骨结合情况

实验组: 植入2周: 大量的骨髓基质细胞长入材料内部(材料含无机材料较多,制片过程中在甲酸的作用下已 经溶解,切片中呈空腔图像),无明显的炎症反应。成骨 活跃,新生骨基质周围包绕着大量成骨细胞,可见片状、 条索状、网状的新生骨基质。成骨方式主要表现膜性成 骨,见图6。植入4周: 新骨形成明显增多,大量的网状 编织骨形成,钙化较2周明显较强,大量的成骨细胞包



埋在骨陷窝中成为骨细胞,可见软骨细胞岛。膜性成骨 及软骨内成骨均可见。新形成的骨,开始早期塑形改变, 可见破骨细胞,见图7。植入8周:软骨样骨组织已经少 见,编织样骨组织进一步成熟,骨小梁趋于有序性。纤 维的排列方向表现出负荷的适应性改建,见图8。植入 12周:新生骨组织进一步成熟,表现为松质骨逐渐向密 质骨的改建,出现板层骨结构,可见小血管,骨创边缘 与原有正常骨组织相接,表现骨的连续性,见图9。



sections in the experimental group at 4 wk after implantation (NB: new bone; OC: osteoblasts; arrow: cartilage island) 图 7 苏木精-伊红染色观察材料植入 4 周脱钙切片



空白对照组:12周时观察见髓腔封闭,黄骨髓形成,无明显成骨现象,大量纤维组织及炎症细胞浸润,见图10。



# 3 结论

临界性骨缺损模型是评价骨组织修复材料促进骨 创修复效果的标准模型。Schmitz等<sup>[14]</sup>将临界性骨缺损 定义为:在一特定动物的特定骨上,在此动物的生命周 期内不能自行愈合的最小骨缺损,认为其临界值为实验 位置周径的1.5~2.5倍或为长度的1/10以上。本次实验所 形成的缺损远超过此临界值的需求,在实验中空白对照 组也显示12周时骨缺损区无骨性愈合,表明实验设计的 缺损模型是一种骨创不能自行愈合的骨缺损模型。此位 置较固定,骨缺损区不易移动,减少了假性愈合的可能 性。本实验从宏观大体观察、X射线平片摄片、组织学3 个层次评价了新型骨修复材料的骨修复效果。

大体观察此种硬组织修复材料的标本在各个时间 点均具有良好的成骨效果,骨痂形成,表面硬化,12周 时表面已形成骨连接,并见骨的滋养血管长入。而对照 组12周时表面有纤维组织覆盖,剖面图见骨髓腔硬化封 闭形成空腔,未有新骨形成。

术后不同时间点的X射线平片摄片证明,实验组每 个时间点都有骨痂形成,骨缺损区形成毛玻璃样模糊



影, 且随着时间的推移, 骨缺损区的边界越模糊, 到12 周时缺损已经不能看到,符合大体观察标本所看到的情 况。而空白对照组骨缺损区12周时周围骨皮质硬化,缺 损清晰,表明未有新生骨形成,骨缺损仍然存在。

组织学观察术后不同时期染色切片,随着骨修复的 进程,实验组植骨材料逐渐分解,周围有新鲜骨小梁形 成,12周时骨小梁重建排列有序,板状骨形成,而空白 对照组断端有大量纤维结缔组织形成,骨折断端封闭, 新骨形成少,未形成骨性连接。

本实验通过以上3个层次,表明课题组合成的明胶-磷灰石-米诺环素新型仿生纳米复合材料可以促进骨缺 损的修复。其可能的机制如下: 仿生合成的复合物具有 类骨的结构。是由明胶-磷灰石组成的纳米复合物。有 机相为明胶,是胶原蛋白的水解产物。明胶具有与胶原 相同的氨基酸,良好的生物相容性,同时还具有较好的 黏附作用和骨诱导性,可被人体降解吸收<sup>[15-17]</sup>。合成复 合物的无机相理论比例为质量分数80%,纳米的磷灰石 晶体与天然的磷灰石结构类似<sup>[18-19]</sup>,为纳米级的、低结 晶的含碳酸根的羟基磷灰石晶体,晶粒发育不完善。纳 米级的羟基磷灰石晶体均匀的分布于明胶基质中。羟基 磷灰石作为人体骨骼最理想的替代材料,其晶粒越细, 生物活性越高[20-21]。磷灰石与明胶的符合也不是物理的 混合,类似于天然骨中胶原对磷灰石的关系。本材料合 成过程中,明胶作为磷灰石晶体合成的有机质模板,调 控磷灰石的成核、生长、改善羟基磷灰石的结构。另外, 材料在合成的过程中,装载了米诺环素。米诺环素是四 环素类药物,能够与Ca<sup>2+</sup>等阳离子络合<sup>[21-22]</sup>。复合物的 米诺环素分子被包裹在羟基磷灰石晶体和明胶分子中, 能够持续,稳定,高效的缓慢释放。体外实验已经证明 复合物中,米诺环素可以不断的缓释,发挥抗菌作用。 米诺环素不仅具有抗菌,而且可以抑制胶原酶、抑制骨 吸收、易于新骨形成等作用<sup>[23]</sup>。因此,在本实验中,选 择米诺环素作为抗菌的有效成分。

结论:明胶-磷灰石-米诺环素新型仿生纳米复合材 料可以促进临界性骨缺损的修复,为此新型材料的临床 应用打下了基础。

#### 4 参考文献

- Weiner S, Addadi LH, Wagner D. Materials design in biology. [1] Materials Science and Engineering. 2000;11(1):1-8. Green D, Walsh D, Mann S, et al. The potential of biomimesis in
- [2] bone tissue engineering: lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons. Bone. 2002;30(6):810-815.
- bouglas T, Hempel U, Mietrach C, et al. Fibrils of different collagen types containing immobilized proteoglycans (PGs) as [3] coatings:characterization and influence on osteoblast behaviour.
- Biomol Eng. 2007;24(5):455-458. Brodie JC, Merry J, Grant MH. The mechanical properties of calcium [4] phosphate ceramics modified by collagen coating and populated by osteoblasts. J Mater Sci Mater Med. 2006;17(1):43-48.
- Hu QL. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. [5] 2008:12(45):8935-8938. 胡庆柳.仿松质骨的胶原/纳米羟基磷灰石人工骨修复兔大段骨缺损[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(45):8935-8938.

- Kong L, Ao Q, Wang A, et al. Preparation and characterization of a [6] multilayer biomimetic scaffold for bone tissue engineering. J Biomater Appl. 2007;22(3):223-239.
- [7] Waked W, Grauer J. Silicates and bone fusion. Orthopedics. 2008; 31(6):591-597.
- The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. [8] 2006-09-30.

中华人民共和国科学技术部 关于善待实验动物的指导性意见 2006-09-30.

- Lill CA, Hesseln J, Schlegel U, et al. Biomechanical evaluation of [9] healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis.J Orthop Res. 2003;21(5):836-842.
- Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone [10] defect in testing bone-regenerating materials. J Craniofac Surg. 1998;9(4):310-316
- [11] Li J, Wang ZQ, Yuan L, et al. Zhongguo Linchuang Kangfu. 2005; 9(10):80-82.
- [12]
- 329-331.
- 端建雅,周磊,郭毅.利用兔胫骨干骺端骨缺损模型对骨代用品研究的 实验方法探讨[J].临床口腔医学杂志,2009,6:329-331. Qin H, Xu JZ, Wang XQ, et al. Zhongguo Linchuang Kangfu. 2004; [13]
- 8(20):3974-3975. 秦辉,许建中,王序全,等.组织工程用大段负重骨缺损动物模型的建 立[J].中国临床康复,2004,8(20):3974-3975.
- Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental [14] model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop Relat Res. 1986;(205):299-308.
- Zhao F, Yin YJ, Song XF, et al. Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi. 2001;15(5):276-279. 赵峰, 尹玉姬, 宋雪峰, 等.壳聚糖-明胶网络/羟基磷灰石复合材料支 架的研究一制备及形貌[J].中国修复重建外科杂志, 2001, 15(5): [15] 276-279
- [16] Richter F, Schnorr D, Deger S, et al. Improvement of hemostasis in open and laparoscopically performed partial nephrectomy using a gelatin matrix-thrombin tissue sealant (FloSeal). Urology. 2003; 61(1): 73-77
- Peng XH, Wan K. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(14):2777-2779. [17]
- Kangru. 2008;12(14):2///-2//9. 彭湘红,万昆.壳聚糖/纳米多层结构羟基磷灰石/明胶复合膜的性能[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(14):2777-2779. Li RQ, Zhang GP, Ren LZ, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(19):3747-3750. 李瑞琦,张国平,任立中,等.纳米羟基磷灰石及其复合生物材料的特 征及应用[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(19):3747-3750. [18]
- Ye CH, Xi TF. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang [19] Kangfu. 2008;12(45):8897-8900. 叶成红,奚廷斐.纳米技术在医用材料领域中的应用[J].中国组织工程研
- 究与临床康复,2008,12(45): 8887-8900. Li ZH, Wu JM, Li RX, et al. Yiliao Weisheng Zhuangbei. 2007;28(4): [20] 30-31.
- 李志宏,武继民,李瑞欣,等.纳米羟基磷灰石及其复合材料的研究进展[J].医疗卫生装备,2007,28(4):30-31. Chen YQ, Wu JZ, Wang LX. Zhongguo Taoci. 1992;5:38-43.
- [21] 陈玉清, 吴皆正, 王连星, 堇青石的合成及应用[J]. 中国陶瓷, 1992, 5: 38-43
- [22] Isik AG, Tarim B, Hafez AA, et al. A comparative scanning electron microscopic study on the characteristics of demineralized dentin root surface using different tetracycline HCI concentrations and application times. J Periodontol. 2000;71(2):219-225.
- Grevstad HJ, Bone OE. Effects of doxycycline on surgically induced [23] osteoclast recruitment in the rat. Eur J Oral Sci. 1995;103(3): 156-159

## 来自本文课题的更多信息---

基金资助: 国家自然科学基金资助项目(30772440); 安 徽省科技攻关项目(08010302196)。

利益冲突: 赞助情况无其他利益冲突。

提供临床借鉴的价值:实验制备出来的新型的、可降解 的、生物活性的、可缓释抗菌药物的纳米复合硬组织修复材料 在动物实验检测的基础上证明能有效满足骨组织替代的要求, 可以作为骨组织替代材料,满足骨缺损修复的要求,在今后的 研究中还可以进一步定量分析,设计,添加不同的生物活性成 分等。