

纳米化表面钛合金内植物的界面组织学和生物力学评价**

黄成龙¹, 赵常利², 韩培¹, 嵇伟平¹, 郭尚春¹, 蒋垚¹, 张小农²

Histological and biomechanical evaluation in the interface between nano-surface titanium alloy implants and bone

Huang Cheng-long¹, Zhao Chang-li², Han Pei¹, Ji Wei-ping¹, Guo Shang-chun¹, Jiang Yao¹, Zhang Xiao-nong²

Abstract

BACKGROUND: Prosthetic loosening is the main cause of arthroplasty failure and revision. Surface treatment of the materials can promote the osseointegration rate and the stability of implants.

OBJECTIVE: To evaluate the osseointegration of nano-surface titanium alloy (Ti6A14V) implant in animals.

METHODS: Novel nanophase Ti6A14V substrates were prepared according to the severe plastic deformation principle. Ti6A14V substrate implants with common surface, hydroxyapatite-coated surface and nanophase surface were transplanted into each femoral intercondylar notch of beagle dogs. Three months later, all the beagle dogs were checked with X-ray film, then sacrificed. The condyles of femur with the implants were taken out, non-decalcification group sections were prepared for Van Gieson staining, bone ingrowth between the interfaces of the bone-implant were studied and kinesics parameter was measured. Pull-out test was applied to compare the shear strength between the interfaces of the bone-implant.

RESULTS AND CONCLUSION: Radiographic examinations showed bone recovery around the implant and no obvious lucent gap in the interface of implant-bone. Histological examination suggested that lots of mature trabecular bone formed around Ti6A14V substrate implants with hydroxyapatite-coated surface and nanophase surface, the interface osseointegration rates showed no difference between them ($P > 0.05$), but all significantly higher than that of Ti6A14V substrate implants with common surface ($P < 0.001$). Pull-out test demonstrated that shear strength showed no difference between Ti6A14V substrate implants with hydroxyapatite-coated surface and nanophase surface ($P > 0.05$), but all significantly stronger than that of Ti6A14V substrate implants with common surface ($P < 0.001$). Ti6A14V substrate implants with nanophase surface improves the bone-implant osseointegration *in vivo* as hydroxyapatite-coated surface did, suggesting that novel nanophase Ti6A14V substrates prepared according to the severe plastic deformation principle may has a bone induction activity and might has a prosperous future for implant applications.

Huang CL, Zhao CL, Han P, Ji WP, Guo SC, Jiang Y, Zhang XN. Histological and biomechanical evaluation in the interface between nano-surface titanium alloy implants and bone. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(21):3867-3870. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 假体松动是造成人工关节置换失败和翻修的主要原因之一。材料表面处理能够促进假体和骨组织界面的骨整合, 提高假体的稳定性。

目的: 研究纳米化表面钛合金(Ti6A14V)内植物在动物体内的骨整合情况。

方法: 基于严重塑性变形原理制备纳米化表面钛合金。在比格犬股骨髁间植入普通表面、羟基磷灰石表面和纳米化表面钛合金内植物, 置入后3个月取材, 处死前行影像学观察, 处死后取带有内植物的股骨髁制作不脱钙骨组织磨片, 行Van Gieson苦味酸-品红染色, 观察内植物和骨组织界面组织学情况, 并进行骨动力学参数计算。同时行推出实验, 比较不同表面内植物和骨组织界面生物力学情况。

结果与结论: 影像学检查, 见内植物和骨组织结合良好; 界面组织学可见羟基磷灰石表面和纳米化表面钛合金与骨界面有大量成熟骨小梁直接结合, 两者界面骨结合率相似($P > 0.05$), 但都优于普通表面钛合金($P < 0.01$); 推出实验显示羟基磷灰石表面和纳米化表面钛合金内植物和骨组织的结合力相似($P > 0.05$), 但都优于普通表面钛合金($P < 0.001$)。提示严重塑性变形原理制备的纳米化表面钛合金和羟基磷灰石表面钛合金一样具有成骨诱导活性, 能够促进骨整合, 具有良好的临床应用前景。

关键词: 骨整合; 生物力学; 钛; 纳米; 羟基磷灰石

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.21.016

黄成龙, 赵常利, 韩培, 嵇伟平, 郭尚春, 蒋垚, 张小农. 纳米化表面钛合金内植物的界面组织学和生物力学评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(21):3867-3870. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

目前, 假体松动是造成人工关节置换失败和翻修的主要原因之一。Judet等^[1]提出的骨长入生物固定概念极大地促进了生物型假体固定方法的研究, 但生物固定假体的骨长入能力仍

有限。早期Cook等^[2]和Engh等^[3]的研究认为多孔表面骨长入的总量其实不足10%, 假体与骨的固定更多是依靠纤维组织而不是骨组织, 为了改善骨组织假体界面的骨整合情况, 提高生物型假体的长期稳定性, 假体表面羟基磷灰石涂层和生物活性涂层的应用, 使得骨组织假体界面的骨长入和假体的长期稳定性有所提高,

¹Department of Orthopaedics, the Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China; ²School of Materials Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Huang Cheng-long★, Studying for master's degree, Department of Orthopaedics, the Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China
huangchenglonghcl@163.com

Correspondence to: Jiang Yao, Master, Chief physician, Professor, Department of Orthopaedics, the Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China
jiangyao1951@163.com

Supported by: Nano Foundation of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, No 0852nm02800*

Received: 2010-11-27
Accepted: 2010-12-22

¹ 上海交通大学附属第六人民医院骨科, 上海市 200233; ² 上海交通大学材料科学与工程学院, 上海市 200240

黄成龙★, 男, 1984 年生, 浙江省衢州市人, 汉族, 上海交通大学医学院在读硕士, 主要从事骨科及关节外科方面的研究。
huangchenglong
hcl@163.com

通讯作者: 蒋焱, 硕士, 主任医师, 教授, 上海交通大学附属第六人民医院骨科, 上海市 200233
jiangyao1951@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2011)21-03867-04

收稿日期: 2010-11-27
修回日期: 2010-12-22
(20100609014/D·Y)

但还是有待进一步提高^[4-7]。随着材料加工工艺的进步, 纳米表面金属材料表现出与普通材料完全不同的物理和化学性质, 材料表面的电化学性质等许多特性发生了显著的变化, 已有体内实验证实纳米表面钛合金有利于成骨^[8-9]。

实验基于严重塑性变形原理^[10-11], 制备纳米化表面钛合金, 用普通表面和羟基磷灰石表面钛合金作对照, 对纳米化表面钛合金的骨整合情况和骨结合强度作进一步证实与研究, 为表面纳米化技术在生物型固定假体的基础和临床研究中提供进一步的资料。

1 材料和方法

设计: 随机对照, 动物实验。

时间及地点: 实验于 2009-06/2010-08 在上海交通大学附属第六人民医院动物实验中心完成。

材料: 选择健康比格犬 9 只, 体质量 12~14 kg, 雌雄不限, 体质量 12~14 kg, 由上海交通大学附属第六人民医院动物实验中心提供, 实验动物许可证号: SCXK(沪) 2007-0004。动物分笼饲养。实验过程中动物处置符合动物伦理学标准^[12]。

内植物: 实验所用钛合金为 Ti6Al4V 合金。普通表面、羟基磷灰石表面和纳米化表面钛合金的制备由上海交通大学材料学院完成, 3 种钛合金各 6 枚, 均为直径 5 mm 高 30 mm 的圆柱体, 纳米化表面钛合金经扫描电镜观察, 鉴定为纳米材料。用超声波清洗、脱脂, 再用去离子水清洗, 高压蒸汽消毒备用。纳米化表面的制备是基于严重塑性变形原理完成的, 采用超音速微粒轰击设备将压缩氮气(压强 2 MPa)加热到 100~110 °C, 进入特殊设计的喷枪, 携带直径 30~50 μm 的氧化铝陶瓷微粒, 轰击内植物表面。

主要仪器及试剂:

仪器及试剂	来源
LEICA2500 型切片机;	德国 Leica 公司
DM4000 荧光显微镜	
5569 万能材料试验机	美国 INSTRON 公司
Van Gieson 苦味酸-品红染液	美国 Sigma 公司

实验方法:

实验分组: 根据材料表面特征分为普通表面、羟基磷灰石表面和纳米化表面钛合金组, 每组 3 只比格犬, 应用随机数字表进行完全随机

化分组。

植入过程: 以 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 静脉注射麻醉, 生效后双下肢备皮, 仰卧位将动物固定于手术台上, 常规消毒铺无菌巾, 取膝前正中切口切开皮肤约 4 cm, 沿髌旁内侧入路打开膝关节, 外翻髌骨, 暴露股骨髁间窝, 透视下沿股骨干髓腔方向钻直径 5 mm, 深 30 mm 的孔, 放入内植物, 常规冲洗缝合, 术后肌注青霉素 80 kU, 2 次/d, 连续 3 d。

影像学观察: 置入后 3 个月, 于股骨远端植入体处拍摄 X 线片, 观察内植物与骨组织愈合情况。

组织学观察和骨组织计量学分析: 置入后 3 个月, 取出带内植物的股骨远端标本, 体积分数 4% 甲醛固定 1 周, 流水冲洗 24 h, 梯度乙醇脱水, 置于塑料包埋盒中, 聚甲基丙烯酸甲酯包埋, 真空干燥箱内干燥, 硬组织切片机切片, 制备 50 μm 厚的不脱钙骨组织磨片, Van Gieson 苦味酸-品红染色后显微镜下观察内植物与骨界面的组织形态学, 用图像处理软件分析内植物周围的骨结合率。

骨结合力测定: 置入后 3 个月, 取新鲜股骨远端标本进行推出实验。将标本修整后固定于万能材料试验机的底托上, 将直径为 4.5 mm 的顶冲头垂直对准内植物并与其长轴成一直线, 以 0.5 mm/min 的加载速度加压, 记录峰值载荷, 此值代表内植物与骨的最大剪切力。

主要观察指标: 内植物和骨组织界面的骨整合情况。

统计学分析: 由第一作者使用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 采用单因素方差分析进行数据分析, 组间比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

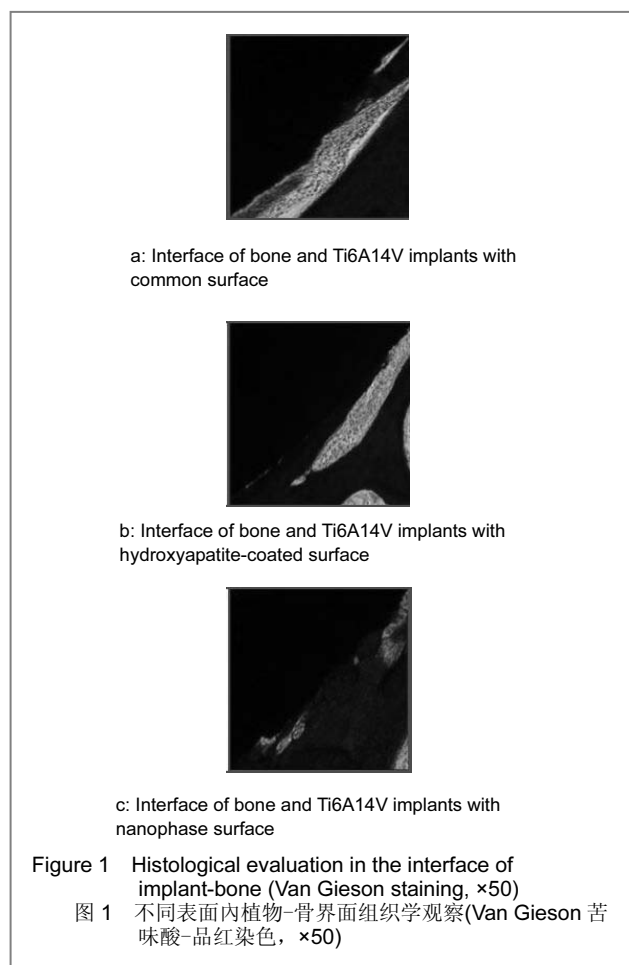
2 结果

2.1 实验动物数量分析 9 只比格犬均进入结果分析, 无脱落。

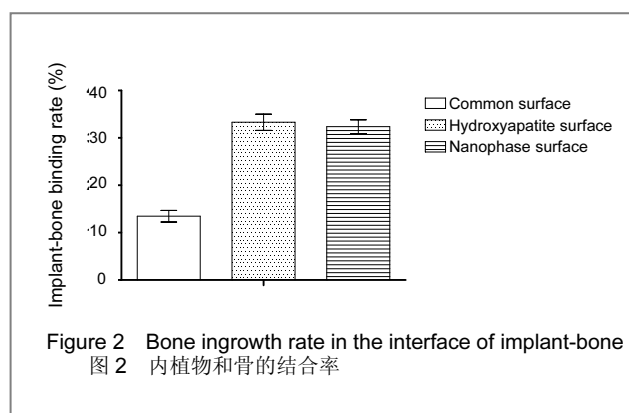
2.2 影像学观察 X 线摄片结果显示不同表面内植物与骨组织均紧密结合, 界面及其附近均未见骨缺损、透亮带和明显的骨密度降低现象。

2.3 组织学观察 不脱钙骨组织磨片 Van Gieson 苦味酸-品红染色后, 显微镜下可见: 普通表面内植物-骨界面纤维组织长入, 部分骨小梁与表面直接接触, 纤维组织外可见板状骨小梁(图 1a); 羟基磷灰石和纳米化表面内植

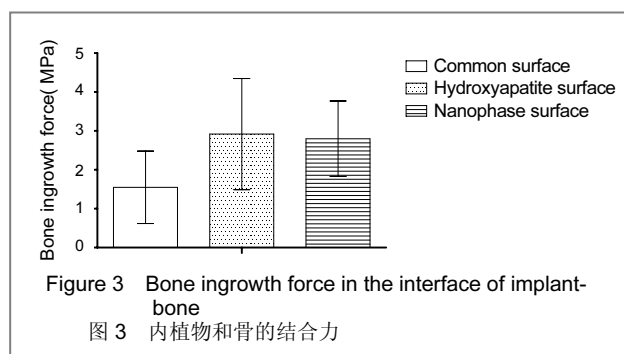
物-骨界面可见少量空隙及大量骨小梁与表面直接接触, 未见纤维组织长入(图1b,c)。



2.4 骨组织计量学分析 图像分析显示, 羟基磷灰石表面和纳米化表面的骨结合率都高于普通表面, 差异有非常显著性意义($P < 0.001$); 羟基磷灰石表面和纳米化表面的骨结合率差异无显著性意义($P = 0.285$), 见图2。



2.5 骨结合力测定 推出实验显示, 羟基磷灰石表面和纳米化表面的骨结合力都高于普通表面, 差异有非常显著性意义($P < 0.001$)。羟基磷灰石表面和纳米化表面的骨结合力差异无显著性意义($P = 0.079$), 见图3。



2.6 不良反应 所用材料为公认的假体材料, 具有良好的生物相容性, 此次实验未从动物生物相容性角度进行研究, 未出现明显的不良反应。

3 讨论

钛合金具有良好的生物相容性、较高的机械强度和疲劳强度, 因此特别适合制造内植物, 在骨科和口腔科得到了广泛的应用。但钛合金本身固有的光滑而惰性的金属表面使之难以与骨组织形成骨整合, 不利于人工关节和口腔种植体与骨组织的牢固结合。人工关节置换后主要并发症之一就是假体松动, 对生物型固定假体, 通过压配技术实现初始稳定, 而假体的长期稳定性则依靠假体与骨组织的牢固结合实现。假体的表面结构和性能是影响假体长期稳定性的最主要因素之一, 术后早期加快假体和骨组织的骨整合速度和程度可以减少假体术后松动发生率。近年来, 如何提高假体和骨组织的骨整合已成为人工关节重要研究领域之一。

钛合金表面羟基磷灰石涂层可以提高假体表面的生物活性, 发挥骨传导作用, 提高假体稳定性, 降低金属离子渗透, 阻止磨屑远移, 减少骨溶解, 已被广泛应用于假体表面结构改性, 表面羟基磷灰石涂层假体的临床疗效也得到了认可^[13-14]。实验结果显示: 羟基磷灰石表面内植物可见大量骨小梁与表面直接接触, 只有少量空隙, 未见纤维组织长入, 骨组织计量学分析和骨结合力测定结果均优于普通表面内植物, 表明羟基磷灰石表面能减少纤维连接的形成, 提高骨整合率、整合速度及内植物与骨之间的结合强度。

表面粗化处理也是近年来假体表面处理的常用技术之一, 已有多项研究表明, 粗化表面能够提高骨整合^[15-17]。本次实验通过纳米化表面钛合金和羟基磷灰石表面及普通表面钛合金的对照, 发现钛合金表面纳米化后出现了普通表面钛合金不具有的性能, 而表现出与羟基磷灰石表面相似的生物学活性, 能提高骨组织和内植物界面的骨整合和骨质修复, 减少纤维组织长入, 并能促进内植物表面新骨形成, 提高假体与骨组织之间的稳定性。这可能与纳米表面能够促进成骨

细胞的黏附、增殖、分化、矿化、基因表达上调和细胞外基质黏附有关^[8,18]。

钛合金表面纳米化的途径有多种, 通过严重塑性变形原理制备纳米化表面具有更好的前景, 一方面这一方法在工业应用上不存在明显技术缺陷^[11,19], 另一方面材料的组织沿厚度方向呈梯度变化, 在使用过程不会发生剥层和分离^[20-21], 这就有效的避免了羟基磷灰石涂层与假体结合不牢固、易剥脱和远期降解等问题^[22-23]。目前, 基于严重塑性变形原理制备的纳米化表面内植物的体内实验不多, 本次实验结果提示该方法和运用该方法制备的纳米化表面钛合金具有良好的医学适用性, 可以促进和加速内植物与骨组织的骨整合, 提高内植物与骨之间的结合强度, 有利于内植物的长期稳定性。

4 参考文献

- [1] Judet R, Siguier M, Brumpt B, et al. A noncemented total hip prosthesis. Clin Orthop Relat Res. 1978;(137):76-84.
- [2] Cook SD, Barrack RL, Thomas KA, et al. Quantitative analysis of tissue growth into human porous total hip components. J Arthroplasty. 1988;3(3):249-262.
- [3] Engh CA, Bobyn JD, Glassman AH. Porous-coated hip replacement. The factors governing bone ingrowth, stress shielding, and clinical results. J Bone Joint Surg Br. 1987;69(1):45-55.
- [4] Benum P, Aamodt A. Uncemented custom femoral components in hip arthroplasty. A prospective clinical study of 191 hips followed for at least 7 years. Acta Orthop. 2010;81(4):427-435.
- [5] Daugaard H, Elmengaard B, Bechtold JE, et al. The effect on bone growth enhancement of implant coatings with hydroxyapatite and collagen deposited electrochemically and by plasma spray. J Biomed Mater Res A. 2010;92(3):913-921.
- [6] Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F, et al. Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. Bone. 2002;30(6):816-822.
- [7] Lamberg A, Bechtold JE, Baas J, et al. Effect of local TGF-beta1 and IGF-1 release on implant fixation: comparison with hydroxyapatite coating: a paired study in dogs. Acta Orthop. 2009;80(4):499-504.
- [8] Liu H, Slamovich EB, Webster TJ. Increased osteoblast functions Among nanophase titania/poly(lactide-co-glycolide) composites of the highest nanometer surface roughness. J Biomed Mater Res A. 2006;78(4):798-807.
- [9] Han P, Ji WP, Jiang Y, et al. Zhonghua Yixue Zazhi. 2008;88(25):1767-1771. 韩培, 嵇伟平, 蒋焱, 等. 钛合金表面纳米结构在兔体内对骨结合的影响[J]. 中华医学杂志, 2008,88(25):1767-1771.
- [10] Tong WP, Tao NR, Wang ZB, et al. Nitriding iron at lower temperatures. Science 2003;299(5607):686-688.
- [11] Lu K, Lu J. Nanostructured surface layer on metallic materials induced by surface mechanical attrition treatment. Materials Science and Engineering A. 2004;375-377:38-45.
- [12] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 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.
- [13] Capello WN, D'Antonio JA, Jaffe WL, et al. Hydroxyapatite-coated femoral components: 15-year minimum followup. Clin Orthop Relat Res. 2006;453:75-80.
- [14] Hermida JC, Bergula A, Dimaano F, et al. An in vivo evaluation of bone response to three implant surfaces using a rabbit intramedullary rod model. J Orthop Surg Res. 2010;5:57.

- [15] Nasatzky E, Gultchin J, Schwartz Z. The role of surface roughness in promoting osteointegration. Refuat Hapeh Vehashinayim. 2003;20(3):8-19,98.
- [16] Schwartz Z, Nasatzky E, Boyan BD. Surface microtopography regulates osteointegration: the role of implant surface microtopography in osteointegration. Alpha Omegan. 2005;98(2):9-19.
- [17] Schwartz Z, Raz P, Zhao G, et al. Effect of micrometer-scale roughness of the surface of Ti6Al4V pedicle screws in vitro and in vivo. J Bone Joint Surg Am. 2008;90(11):2485-2498.
- [18] Ji WP, Han P, Zhao CL, et al. An investigation of surface nanophase Ti6Al4V. Chinese Science Bulletin. 2008;53(11):1757-1762.
- [19] Lu K, Lu J. Surface nanocrystallization (SNC) of metallic materials-presentation of the concept behind a new approach. Journal of Materials Science technology. 1999; 15(3):193-197.
- [20] Tao NR, Wang ZB, Tong WP, et al. An investigation of surface nanocrystallization mechanism in Fe induced by surface mechanical attrition treatment. Acta Mater. 2002;50(18):4603-4616.
- [21] Zhang HW, Hei ZK, Liu G, et al. Formation of nanostructured surface layer on AISI 304 stainless steel by means of surface mechanical attrition treatment. Acta Mater. 2003;51(7):1871-1881.
- [22] Choi JM, Kim HE, Lee IS. Ion-beam-assisted deposition (IBAD) of hydroxyapatite coating layer on Ti-based metal substrate. Biomaterials. 2000;21(5):469-473.
- [23] Zheng X, Huang M, Ding C. Bond strength of plasma-sprayed hydroxyapatite/Ti composite coatings. Biomaterials. 2000;21(8):841-849.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 上海市纳米专项基金资助项目 (0852nm02800), 生物医用纳米钛技术及其在植入医疗器械中的应用。

作者贡献: 所用作者共同进行实验设计, 第一、二、三、四、五作者进行实施, 通讯作者和第七作者进行实验评估, 资料收集为第一、二作者, 第一作者成文, 第二作者审核, 第一、二作者对文章负责。

致谢: 感谢上海交通大学附属第六人民医院动物实验中心在动物饲养、管理上的帮助。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 基础研究, 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

本文创新性:

提供证据: 检索 CNKI, PubMed, web of knowledge 数据库, 检索时间 2010-09, 检索关键词设定为骨整合; 生物力学; 钛; 纳米; 羟基磷灰石

创新性特点说明: 实验通过硬组织切片和生物力学测试来评价新型纳米化表面钛合金材料对骨整合的影响, 从组织学和生物力学角度进行相互论证, 并用普通表面和羟基磷灰石涂层表面钛合金作对照, 使得评价更具有客观性。结果证实钛合金表面纳米化处理可以起到类似表面羟基磷灰石涂层的作用, 能够提高内植物和骨组织界面的骨结合率和骨结合强度, 有利于骨整合, 这一结果也进一步证实了金属表面纳米化处理技术是一种有效的假体表面处理技术, 为假体表面处理提供了新的选择, 具有良好的医学应用前景。