

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.12.002 [http://www.crter.org]
聂玮, 何伟. 纳米双相陶瓷人工骨的成骨及降解[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(12):2100-2107.

纳米双相陶瓷人工骨的成骨及降解**

聂 玮, 何 伟

湖北省中医院外四科, 湖北省武汉市 430074

文章亮点:

- 1 烧结后的纳米羟基磷灰石结晶度很高, 在体内很难降解; 纳米 β -磷酸三钙的降解速度太快, 不利于体内生物组织在材料上附着, 不利于引导成骨。为此实验研制新型纳米羟基磷灰石/纳米 β -磷酸三钙双相陶瓷人工骨, 拟研究该人工骨的引导成骨作用及降解性能。
- 2 纳米羟基磷灰石/纳米 β -磷酸三钙双相陶瓷人工骨支架有良好的生物相容性, 支架材料逐渐降解, 最终被新生的骨组织所取代, 可有效引导骨再生。
- 3 双相陶瓷人工骨系初次提出, 尚未进行大样本研究。

关键词:

生物材料; 组织工程骨材料; 纳米; 双相; 人工骨; 羟基磷灰石; β -磷酸三钙; 成骨; 降解; 骨缺损; 骨传导; 陶瓷; 省级基金; 生物材料图片文章

摘要

背景: 烧结后的纳米羟基磷灰石结晶度很高, 在体内很难降解; 纳米 β -磷酸三钙的降解速度太快, 不利于体内生物组织在材料上附着, 不利于引导成骨。

目的: 观察纳米羟基磷灰石/纳米 β -磷酸三钙双相陶瓷人工骨的成骨及降解性能。

方法: 将 36 只青紫蓝兔随机分为实验组、对照组及空白组, 制作左侧挠骨缺损模型, 实验组与对照组分别植入纳米羟基磷灰石/纳米 β -磷酸三钙双相陶瓷人工骨、纳米羟基磷灰石人工骨, 空白组不植入任何材料。术后 4, 8, 12 周观察成骨和材料降解情况。

结果与结论: ①术后 12 周时 X 射线: 实验组可见材料基本降解, 连续性骨痂通过骨缺损部位。对照组材料未见明显降解, 骨缺损处有骨痂修复。空白组骨缺损未见修复。②术后 12 周时组织学观察: 实验组材料孔隙内以骨细胞和成骨细胞为主, 有少量软骨细胞, 出现散乱的骨松质, 材料完全降解。对照组材料孔隙内以骨细胞为主, 有少量成骨细胞和软骨细胞, 材料未见明显降解。空白组可见纤维结缔组织及胶原纤维。③术后 12 周时扫描电镜观察: 实验组材料降解, 骨缺损部位被新生骨松质取代。对照组材料未见降解, 骨缺损部位大都被新生骨松质取代。空白组无明显骨重建。表明纳米羟基磷灰石/纳米 β -磷酸三钙双相陶瓷人工骨具有良好成骨能力及降解性能。

聂玮, 男, 1975 年生, 湖北省大悟县人, 汉族, 1998 年武汉大学医学部毕业, 主治医师, 主要从事组织工程在外科的应用研究。
lidaoziyuan@163.com

通讯作者: 何伟, 副主任医师, 湖北省中医院骨伤科, 湖北省武汉市 430074

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)12-02100-08

收稿日期: 2012-11-20
修回日期: 2012-12-19
(20120920005/GW · C)

Osteogenesis and degradation performances of nano biphasic ceramic artificial bone

Nie Wei, He Wei

Fourth Department of General Surgery, Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430074, Hubei Province, China

Abstract

BACKGROUND: Nano-hydroxyapatite has a high crystallinity after sintering and difficultly degrades *in vivo*. Due to the high degradation rate, nano- β -tricalcium phosphate is not conducive for the biological tissue to attach on the material *in vivo*, which is not conducive to osteogenic induction.

OBJECTIVE: To observe the bone formation and degradation performances of nano-hydroxyapatite/

Nie Wei, Attending physician,
Fourth Department of General
Surgery, Hubei Provincial
Hospital of Traditional Chinese
Medicine, Wuhan 430074,
Hubei Province, China
lidaoziyuan@163.com

Corresponding author: He Wei,
Associate chief physician,
Fourth Department of General
Surgery, Hubei Provincial
Hospital of Traditional Chinese
Medicine, Wuhan 430074,
Hubei Province, China

Supported by: Science and
Technology Research Project of
Hubei Provincial Department of
Education, No.Q20121609*;
Integrated Traditional and
Western Medicine Foundation
of Health Department of Hubei
Province, No. 2012Z-B05*

Received: 2012-11-20
Accepted: 2012-12-19

nano- β -tricalcium phosphate biphasic ceramic artificial bone.

METHODS: Thirty-six Chinchilla rabbits were randomly divided into experimental group, control group and blank group, and the rabbits were used to establish the left radius bone defect model. The rabbits in the experimental group and the control group were implanted with nano-hydroxyapatite/nano- β -tricalcium phosphate biphasic ceramic artificial bone and nano-hydroxyapatite artificial bone respectively, and the blank group was not implanted with any materials. The bone formation and degradation performances were observed at 4, 8 and 12 weeks after implantation.

RESULTS AND CONCLUSION: X-ray film at 12 weeks after operation showed that the materials in the experimental group were basically degraded, the continuity callus grew through the bone defect site; the materials in the control group were not degraded obviously, and there was callus at the bone defect site; the bone defect in the blank group was not repaired. Histological observation at 12 weeks after operation showed that the material pores in the experimental group were filled with bone cells and osteoblasts, as well as a small amount of chondrocytes, the scattered cancellous bone appeared and the materials were completely degraded; the material pores in the control group were filled with bone cells, as well as a small amount of osteoblasts and chondrocytes, and the materials were not degraded completely; fibrous connective tissue and collagen fibers could be seen in the blank group. Scanning electron microscope observation at 12 weeks after operation showed that in the experimental group, the materials were degraded, and the bone defect sites were replaced with new bone cancellous bone; materials in the control group were not degraded, and most of the bone defect sites were replaced with new cancellous bone; no obvious bone reconstruction could be seen in the blank group. The results indicate that nano-hydroxyapatite/nano- β -tricalcium phosphate biphasic ceramic artificial bone has good degradation performances.

Key Words: biomaterials; tissue-engineered bone materials; nano; biphasic; artificial bone; nano-hydroxyapatite; beta-tricalcium phosphate; bone formation; degradation; bone defects; bone conduction; ceramic; provincial grants-supported paper; biomaterial photographs-containing paper

Nie W, He W. Osteogenesis and degradation performances of nano biphasic ceramic artificial bone. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(12): 2100-2107.

0 引言

在骨科创伤及肿瘤中骨缺损需要植骨的情况十分多见,临床上主要有3种植骨来源,即自体骨、同种异体骨与人工骨。自体骨虽然是植骨的金标准,但来源有限,而且可能造成供骨区的并发症;同种异体骨会造成免疫排斥反应和传染疾病,因此人工骨的研究和临床应用成为热点。

羟基磷灰石是人体骨组织的主要成分,自20世纪70年代末,羟基磷灰石作为新型生物材料问世以来,已在材料学科和医学界被广泛应用于整形外科、矫形外科、口腔科等医学相关领域修复各类骨缺损。但普通的多孔型羟基磷灰石质脆强度低,生物机械性能较差;致密型羟基磷灰石植入后不能被新骨完全替代,在局部形成占位。利用生物活性陶瓷材料羟基磷灰石的高生物活性、稳定性,以及 β -磷酸三钙的吸收降解特性合成的双相磷酸钙生物陶瓷作为骨修复材料得到了深入研究和广泛应用^[1]。

近些年来,利用纳米技术在纳米结构单元或纳米数量级下生产新型纳米级组织工程骨材料的结构与天然骨相似,有助于人体细胞及大分子对其识别,从而有效提高材料的生物活性、利用度和生物相容性,符合理想人工骨的性能要求。理想的人工骨修复材料就是尽量模拟天然骨的结构和组成,而纳米羟基磷灰石是最接近人体天然骨组成的人工骨材料。与普通羟基磷灰石相比,粒径为1-100 nm的纳米羟基磷灰石具有溶解度较高、表面能较大、吸附性更强等优点。医学界也相继开始了对纳米羟基磷灰石的研究,并已发现纳米羟基磷灰石具有更强的生物活性^[2]。

目前对纳米级羟基磷灰石人工制品的研究取得了长足进展,并在临床上获得了广泛应用,但仍距离结构功能一体化的要求相差很远,还存在某些不可克服的缺点,如缺少连通的、均匀的孔结构,不利于骨组织的生长;其降解速度与天然骨组织生长替代速度不协调;力学强度与天然骨组织的力学性能不匹配等。而且国内外大多数学者认为单纯的羟基磷灰石只具有骨生长引导作用,不具有骨诱导活性。虽然纳米羟基磷灰石具有优良的生物相容性,可较快地传导骨再生,不通过中间介质可直接与骨键合,然而烧结后的纳米羟基磷灰石结晶度很高,因其细胞降解性弱、立体空间结构紊乱及无成骨诱导因子存在等缺点,故进一步应用受到限制^[3]。纳米β-磷酸三钙较羟基磷灰石有着更好的溶解性和降解性,但β-磷酸三钙的降解速度太快,不能形成良好的骨键合,并且过快的降解速率不利于体内生物组织在材料上的附着,不利于引导成骨^[4-6]。为此实验研制出新型纳米羟基磷灰石/纳米β-磷酸三钙双相陶瓷人工骨,拟研究该人工骨的引导成骨作用及降解性能,从而为组织工程化人工骨提供支架材料。

1 材料和方法

设计: 随机对照,动物体内实验。

时间及地点: 于2011年4至7月在湖北省中医院动物实验室完成。

材料:

实验动物及分组: 健康成年青紫兰兔36只,由湖北省动物防疫站提供,体质量1.5-2.5 kg,随机数字表法分为实验组、对照组和空白组,每组12只。

纳米双相陶瓷人工骨成骨及降解性能实验的主要材料:

Main experimental materials:

材料	来源
纳米羟基磷灰石人工骨	湖南共创生物材料有限公司
CaCl ₂ 、Na ₃ PO ₄	国药集团化学试剂有限公司
S-450 型扫描电镜	武汉理工大学测试中心

实验方法:

纳米双相陶瓷人工骨的制备: 以CaCl₂和Na₃PO₄为原料,采用化学沉淀法,将一定量磷酸钠加入500 mL蒸馏水里配制成0.24 mol/L磷酸钠水溶液,再加入氢氧化钠使水溶液pH值达到10,然后再加入0.24 mol/L氯化钙水溶液500 mL,使钙磷摩尔比达到1.67,加入明胶添加剂,在常温常压下静置24 h,24 h沉淀析出后取出,用蒸馏

水洗5次以去除残余的氯化钠,然后将粉末置于80 °C烘箱进行干燥24 h,24 h后在马弗炉中以5 °C/min加热至1 000 °C 12 h,即可得纳米粉体。向纳米双相粉体加入体积分数5%双氧水溶液,静置10 min后再添加5%聚乙二醇,混合后的浆料装入模具中制成长度3 cm和80皿的胚体放入50 °C烘箱中,缓慢升温发泡温度至50 °C保温12 h,使双氧水分解,得到初步成型素胚体,再将初步成型胚体置入马弗炉中升温至400 °C烧12 h,脱离初胚体中的游离水分及有机添加物,再以5 °C/min高温烧至1 200 °C加热烧结3 h,得到孔隙率为70%的纳米双相陶瓷人工骨,见图1,2。

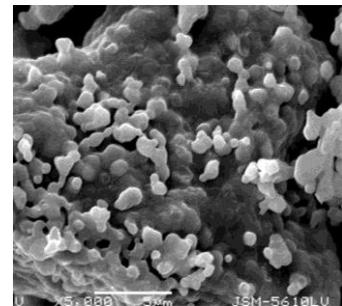


图1 扫描电镜观察纳米羟基磷灰石/纳米β-磷酸三钙双相陶瓷人工骨,孔隙率为70%(×5 000)

Figure 1 The porosity of nano-hydroxyapatite/nano-β-tricalcium phosphate biphasic ceramic artificial bone observed under scanning electron microscope was 70% (×5 000)

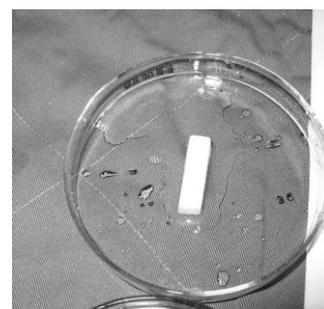


图2 纳米羟基磷灰石/纳米β-磷酸三钙双相陶瓷人工骨的外观

Figure 2 Appearance of nano-hydroxyapatite/nano-β-tricalcium phosphate biphasic ceramic artificial bone

实验动物造模方法: 兔腹腔注射20%乌拉坦注射液予全麻,于左前臂中段作2 cm纵形切口,暴露桡骨干,在距桡骨干远端3 cm处锯断骨干,用同样的方法在近端锯断骨干,截骨长度约1.5 cm,生理盐水冲洗伤口后,实

验组与对照组分别植入纳米双相陶瓷人工骨与纳米羟基磷灰石人工骨2 cm, 空白组不植入任何材料, 缝合伤口, 局部不做外固定, 伤口不予包扎, 麻醉清醒后放入笼内常规喂养, 术后每天 80×10^4 U青霉素肌注, 连续3 d。

动物一般情况及大体标本观察: 术后观察兔的饮食、活动及伤口反应, 取材后观察植入材料表面骨痂及有无炎症反应等情况。

X射线检查: 术后4, 8, 12周每组各取4只进行实验肢体的X射线片检查, 通过Lane-Sandhu X射线评分标准评估骨形成及塑形情况。

Lane-Sandhu X射线评分标准:

Lane-Sandhu X-ray score:

骨形成情况	与骨连接情况	骨塑型情况
无骨形成, 0分	骨折线清晰, 0分	未见塑型, 0分
骨形成占缺损25%, 1分	骨折线部分存在, 1分	髓腔形成, 2分
骨形成占缺损50%, 2分	骨折线消失, 2分	皮质骨塑型, 4分
骨形成占缺损75%, 3分		
骨形成充满缺损区, 4分		

组织学检查: 摄X射线片后处死动物取出标本, 截取植入材料及两端约0.5 cm正常挠骨, 体积分数10%甲醛固定, 常规制作切片以Lane-Sandhu组织学评分标准评估骨形成及塑形。

Lane-Sandhu组织学评分标准:

Lane-Sandhu histological score:

连接	松质骨	皮质骨
无连接, 0分	无骨细胞活性, 0分	无皮质骨生长, 0分
纤维连接, 1分	新骨早期聚集, 1分	皮质骨生长的早期表现, 1分
骨与类骨连接, 2分	有活性的新骨聚集, 2分	皮质骨正在形成, 2分
骨连接, 3分	松质骨正在改造, 3分	大部分被改造, 3分
骨干完全再生, 4分	松质骨完全形成, 4分	完全骨再生, 4分

扫描电镜观察: 分别从实验组和对照组各个时间点中截取骨缺损部位及与材料交界处两端各0.5 cm, 用2.5%戊二醛固定后, 体积分数50%–100%乙醇梯度脱水, 临界点干燥, 喷金镀膜后在S-450型扫描电镜下观察骨生成及材料降解情况。

主要观察指标: 各组X射线及组织学观察结果。

统计学分析: 所得实验 $\bar{x} \pm s$ 采用表示, 运用统计软件包SPSS 11.0版本进行数据统计处理, X射线及组织学评分采用方差分析及两两比较的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 36只兔均进入结果分析。

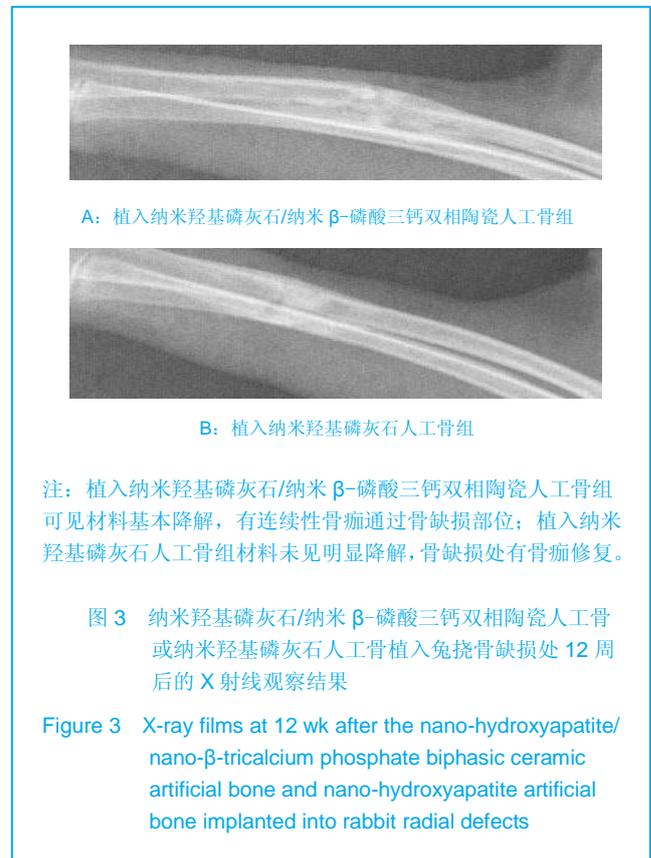
2.2 实验动物一般情况 所有动物术后饮食及活动均未见异常, 无死亡及伤口感染等情况, 实验组及对照组标本处均未见明显炎症反应, 实验组术后4周材料周围可见一层结缔组织膜包绕, 术后8周可见材料明显降解, 材料有新骨形成, 12周可见材料被骨松质所取代。术后12周对照组未见材料明显降解。

2.3 各组X射线表现

实验组: 术后4周时材料有少许降解, 未见明显新生骨生成, 术后8周时植入材料有明显降解, 可见有新生骨形成, 术后12周时可见材料基本降解, 有连续性骨痂通过骨缺损部位, 见图3A。

对照组: 实验结束时纳米羟基磷灰石人工骨未见明显降解, 骨缺损处有骨痂修复, 见图3B。

空白组: 术后12周时骨折断硬化, 骨缺损未见修复。



X射线骨形成及塑形定量分析结果统计学分析显示, 实验组(或对照组)组内术后不同时间点: 4周<8周<12周, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 术后不同时间点实验组与对照组比较差异无显著性意义, 两者与空白组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。结果显示纳米双相陶瓷人工骨有良好的渐进成骨作用及降解性能, 见表1。

表 1 各组术后不同时间点 X 射线骨形成及塑形评分比较

Table 1 X-ray scores of bone formation and moulding in each group at different time points after operation ($\bar{x} \pm s$)

组别	4 周	8 周	12 周
实验组	4.66±0.38 ^a	8.55±0.68 ^{ab}	12.55±0.92 ^{ab}
对照组	4.57±0.25 ^{ab}	8.58±0.72 ^{ab}	11.87±0.89 ^{ab}
空白组	1.22±0.11	1.32±0.20	1.83±0.28

与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 实验组(或对照组)组内与前一时间点比较, ^b $P < 0.05$ 。

注: 实验组与对照组分别于兔桡骨缺损处植入纳米羟基磷灰石/纳米 β -磷酸三钙双相陶瓷人工骨、纳米羟基磷灰石人工骨, 空白组兔桡骨缺损处未植入任何材料; 结果表明纳米双相陶瓷人工骨有良好的渐进成骨作用及降解性能。

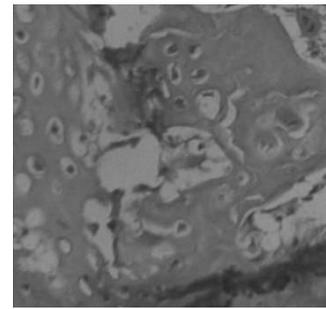
2.4 各组组织学检查结果

实验组: 材料植入4周后材料孔隙内有成骨细胞, 成软骨细胞及成纤维母细胞, 材料孔隙内纤维结缔组织增生, 8周后有大量骨细胞, 成骨细胞和软骨细胞, 以成骨细胞和软骨细胞为主伸向材料孔隙中, 孔隙内以纤维增生, 材料部分降解, 12周后以骨细胞和成骨细胞为主, 有少量软骨细胞, 出现散乱的骨松质, 材料完全降解, 见图4A。

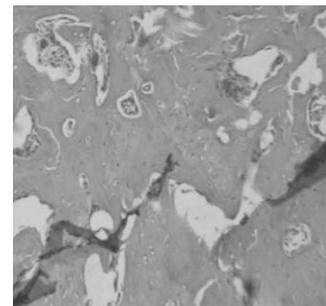
对照组: 材料植入4周后骨缺损部位有少量骨细胞, 成骨细胞, 成软骨细胞及纤维母细胞, 8周后有可见成骨细胞和软骨细胞, 12周后以骨细胞为主, 有少量成骨细胞和软骨细胞, 材料未见明显降解, 见图4B。

空白组: 术后4周时可见大量成纤维细胞, 8, 12周后可见纤维结缔组织及胶原纤维。

成骨情况组织学定量分析统计学分析结果显示, 实验组(或对照组)组内各个时期比较, 4周<8周<12周, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 术后不同时间点实验组与对照组比较差异无显著性意义, 两者与空白组比较差异有显著性意义($P < 0.05$); 结果说明纳米羟基磷灰石/纳米 β -磷酸三钙双相陶瓷人工骨有明显的渐进成骨作用, 见表2。



A: 植入纳米双相陶瓷人工骨组



B: 植入纳米羟基磷灰石人工骨组

注: 植入纳米双相陶瓷人工骨组以骨细胞和成骨细胞为主, 有少量软骨细胞, 出现散乱的骨松质, 材料完全降解; 植入纳米羟基磷灰石人工骨组以骨细胞为主, 有少量成骨细胞和软骨细胞, 材料未见明显降解。

图 4 纳米羟基磷灰石/纳米 β -磷酸三钙双相陶瓷人工骨或纳米羟基磷灰石人工骨植入兔桡骨缺损处 12 周后的组织学观察结果(苏木精-伊红染色, $\times 78.75$)

Figure 4 Histological observation at 12 wk after nano-hydroxyapatite/nano- β -tricalcium phosphate biphasic ceramic artificial bone and nano-hydroxyapatite artificial bone implanted into rabbit radial defects (Hematoxylin-eosin staining, $\times 78.75$)

表 2 各组术后不同时间点组织学骨形成及塑形评分的比较

Table 2 Histological scores for bone formation and molding in each group at different time points after operation ($\bar{x} \pm s$)

组别	4 周	8 周	12 周
实验组	2.22±0.28 ^a	4.95±0.33 ^{ab}	8.57±0.28 ^{ab}
对照组	2.33±0.29 ^a	4.87±0.15 ^{ab}	8.28±0.42 ^{ab}
空白组	0.72±0.11	1.21±0.17	1.34±0.23

与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 实验组(或对照组)组内与前一时间点比较, ^b $P < 0.05$ 。

注: 实验组与对照组分别于兔桡骨缺损处植入纳米羟基磷灰石/纳米 β -磷酸三钙双相陶瓷人工骨、纳米羟基磷灰石人工骨, 空白组兔桡骨缺损处未植入任何材料; 结果说明纳米羟基磷灰石/纳米 β -磷酸三钙双相陶瓷人工骨有明显的渐进成骨作用。

2.5 实验组与对照组扫描电镜观察结果

实验组: 术后4周可见支架孔隙完整, 材料内有纤维组织填充。术后8周材料部分降解, 有新生骨组织及纤维组织填充, 12周后材料降解, 骨缺损部位被新生骨松质取代。

对照组: 术后4周可见支架孔隙完整, 材料内有纤维组织填充。术后8周材料未见降解, 有新生骨组织及纤维组织填充, 12周后材料未见降解, 骨缺损部位大部被新生骨松质取代。

空白组: 无明显骨重建。

3 讨论

骨移植是治疗骨缺损的主要方法。自体骨移植作为骨移植的金标准在临床实践中取得了较好效果, 但其来源有限^[7], 而且存在取骨部位手术并发症, 人工骨的研制及临床应用是骨科基础研究的一项重要内容, 研究结果证实6%–20%的取骨患者会出现取骨部位疼痛等并发症, 而其中3%–9%会出现严重并发症。同种异体脱矿骨来源有限且存在免疫原性、不稳定的骨诱导性、远期吸收、围手术期及以后发生感染危险。结构性的异体骨有可能完全与宿主融合, 血管可长入到表面下, 但宿主骨不能大块长入, 内部也没有活骨, 因此结构性异体骨有发生微骨折的危险等问题制约了它的应用。异种骨来源丰富、价格低廉, 具有一定的开发应用前景; 其天然网状孔隙系统未受明显破坏, 保留骨小梁、小梁间隙及骨内管腔系统, 骨盐支架的三维结构形态存在, 具有良好的孔隙率、孔隙交通, 以及孔径大小合适, 有利于组织细胞黏附、生长并为细胞外基质分泌提供宽大的内部空间及表面积; 其无机成分主要为羟基磷灰石, 是人骨的天然成分, 植入体内后易被宿主组织细胞接近而爬行替代, 具有良好的生物降解性。但去除有机成分的骨矿材料疏松易碎, 无机机械强度, 脱钙骨缺乏骨矿, 质地柔软, 不具有力学刚度, 且存在有免疫原性, 从而限制了异种骨在骨组织工程中的应用。人工合成的骨替代材料, 如生物磷酸钙陶瓷、高分子聚合物、胶原材料等种类繁多, 但至今为止仍没有一种材料能够取得令人满意的效果。因而研制理想的骨移植替代材料一直是骨科研究的热点, 理想的人工骨不是骨组织结构和成分的简单模仿, 而是需要构建符合生物学特性的多孔隙高强

度骨细胞爬行支架, 随着骨缺损的逐渐愈合, 材料能够降解, 最终由正常骨组织完全取代骨缺损。

纳米羟基磷灰石陶瓷材料有着优良的生物相容性, 可较快地传导骨再生, 不通过中间介质直接与骨键合^[8-13]。朱伟民等^[8]通过动物实验探讨多孔纳米羟基磷灰石人工骨的骨缺损修复作用, 并观察骨重建过程中的再血管化过程。实验采用新西兰大白兔24只, 在单侧桡骨制备骨缺损动物模型, 然后将纳米羟基磷灰石人工骨材料植入骨缺损处进行修复作为实验组, 以植入普通羟基磷灰石人工骨材料作为对照组; 术后2, 4, 8, 12周分别行⁹⁹Tc^m-亚甲基二膦酸盐放射性核素骨显像监测在骨缺损修复中再血管化的过程, 并以X射线、组织学检查作比较。结果显示通过ROI方法定量对比两种材料植入区和正常区放射性浓集比值, 实验组成骨代谢及骨缺损修复能力明显优于对照组($P < 0.05$); 结果表明纳米羟基磷灰石人工骨具有优异的成骨能力, 可望成为新型的骨缺损修复材料。朱伟民等^[9]另一篇动物实验同样表明纳米羟基磷灰石人工骨具有良好的成骨能力和生物相容性, 可望成为一种理想的骨缺损修复材料。

富建明等^[10]观察了纳米羟基磷灰石修复颌骨缺损模型兔的生长特性及生物相容性。实验以摸球法将实验兔随机分为实验组和对照组, 每组12只。在各组兔下颌骨体部造成直径1.5 cm的骨缺损, 实验组以纳米羟基磷灰石修复, 对照组以普通羟基磷灰石修复, 于术后1, 4, 8, 12周分别麻醉后处死, 用医学图像分析系统分析各组织的组织生成量, 并进行组织学定性和定量分析, 观察材料的组织相容性及新生骨生成情况。结果显示, 实验组骨缺损修复区随时间增长修复材料被利用与新生组织结合成骨而不断减少, 直至与正常骨接近而趋于稳定; 对照组骨痂不能长入材料内。相关分析结果表明材料与新生骨之间呈直线负相关($r = -0.9120$, $P < 0.01$)。

骨缺损修复过程中新生骨与纳米羟基磷灰石之间相互关系密切, 且随着新生骨不断产生、增多, 修复材料被利用与新生组织结合成骨而不断减少, 表明纳米羟基磷灰石可与新生骨组织结合且成骨较快, 有良好的生物相容性。然而烧结后的羟基磷灰石结晶度很高, 所以在体内很难降解。纳米 β -磷酸三钙较纳米羟基磷灰石有着更好的溶解性和降解性^[14-17]。但研究表明纳米 β -磷酸三钙的降解速度太快, 不能形成良好的骨键合, 并且过快的降解速率不利于体内生物组织在材料上的附着, 从

而不利引导成骨。纳米双相生物陶瓷是由混合不同比例的纳米 β -磷酸三钙和纳米羟基磷灰石而得到的生物陶瓷材料^[18-19]。采用水合沉淀法合成的钙磷比约为1.67, 表明纳米羟基磷灰石: β -磷酸三钙约为7:3, 从而达到综合二者在力学性能和降解性能方面的优点。纳米粉体的尺寸介于1-100 nm, 具有巨大的表面能, 因而在热力学上是不稳定的, 有相互吸附形成团聚体以降低表面能的趋势。纯明胶是由大量-CO-NH-CHR-的多肽链以立体交叉形式构成的, 从结构上明胶分子中既有氨基, 又有羧基; 既有亲水基团, 又有疏水的基团, 因此明胶具有表面活性。其中表面活性剂的加入不仅可对磷酸钙粒子的生长起到抑制作用, 同时也可使颗粒稳定悬浮而不发生团聚, 因而其被认为是制备纳米磷酸钙粉体最有效的方法之一, 因此粉体的粒子尺度通过加入明胶后可以控制在纳米级, 工艺较为简单实用。结构因素对于骨质的再生和血管化非常重要。纳米双相生物陶瓷是由纳米羟基磷灰石和纳米 β -磷酸三钙以60:40均匀混合造孔烧结后而得到的纳米双相生物陶瓷人工骨支架, 孔隙率为70%, 由于纳米羟基磷灰石和纳米 β -磷酸三钙都具有良好的生物相容性, 植入体内安全无毒, 故烧结后的纳米双相生物陶瓷也具有有良好的生物相容性, 相对于单相纳米羟基磷灰石人工骨高结晶度, 加入40%纳米 β -磷酸三钙可降低人工骨结晶度, 从而赋予人工骨降解性能, 植入动物体内后发挥引导成骨作用, 逐渐被体液缓慢吸收, 为新骨的生成提供支架及丰富的钙和磷。

松质骨结构有开放的三维相通孔隙结构, 不仅能为成骨细胞黏附、增殖及分泌基质提供空间, 而且有利于营养成分的渗透和血管化的形成。人工骨的作用受孔隙结构影响比较大。多孔的材料与致密的材料相比具有更大的表面积, 有利于材料表面与周围体液之间的离子交换。通过溶解-沉淀过程加速材料表面类骨磷灰石层的形成, 从而有利于骨前体细胞的黏附、增殖与分化, 加速基质的矿化, 加快新骨的生成。这些因素加速多孔材料上骨生成的速度, 能够提高新骨的数量。孔隙率是决定材料比表面积的一个重要因素。在维持一定外形和机械强度的前提下, 通常要求组织工程支架材料的孔隙率应尽可能高。生物材料的表面特性如颗粒直径、颗粒之间的孔径是影响成骨细胞存活、增殖等生理功能的主要决定因素^[3]。纳米陶瓷材料具有小尺寸效应及表面或界面效应^[20], 使其呈现出与普通陶瓷显著不同的独特性能, 采用化学沉淀法获得的纳米羟基磷灰石和纳米 β -磷酸三钙平均直径约

80 nm, 由于表面积的增加, 人工骨支架材料表面的微观和亚微观结构对细胞的黏附与生长产生重要影响, 12周后组织学及电镜观察显示人工骨完全被新生骨所取代, 人工骨基本降解, 表明其引导组织细胞的能力和生物降解性增强。

人工骨的成骨作用受材料孔隙结构的影响, 致密的纳米羟基磷灰石植入体内后只在表面形成一层纤维组织, 而多孔的羟基磷灰石能使骨组织长入孔隙内, 并保持正常的代谢关系, 因此为达到骨的成骨性多孔是必要的, 孔隙率一般要求在60%左右^[21]。纳米双相生物陶瓷人工骨同时具有纳米生物粒子的细胞黏附性和生物相容性, 孔隙率为70%, 满足人工骨生物力学要求的同时, 保持高孔隙率而有效促进新生骨的爬行替代作用。

通过实验可以得出结论, 该支架有良好的生物相容性, 植入体内安全无毒, 未见明显炎症反应, 骨组织再生后, 支架材料逐渐降解, 最终被新生的骨组织所取代, 材料采用的高孔隙率结构, 可有效引导骨再生。虽然实验显示纳米双相生物陶瓷具有成骨性和降解性, 但人工骨植入后与周围环境如何相互作用, 以该人工骨为支架构建组织工程骨尚需进一步研究。

基金资助: 湖北省教育厅科学技术研究项目(Q20121609); 湖北省卫生厅中医药中西医结合科研项目(2012Z-B05)。

作者贡献: 何伟进行实验设计, 实验实施为聂玮, 实验评估为何伟, 资料收集为聂玮, 聂玮成文, 何伟审校, 何伟对文章负责。

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。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Daculsi G, Laboux O, Malard O, et al. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. J Mater Sci Mater Med. 2003;14(3):195-200.

- [2] Cheng SQ, Gou L, Ji JG, et al. Xiandai Jishu Taochi. 2004;25(1): 14-17.
程顺巧, 苟立, 季金苟, 等. 双相HA/β-TCP陶瓷的多孔结构对类骨磷灰石形成的影响[J]. 现代技术陶瓷, 2004, 25(1): 14-17.
- [3] Hu NM, Chen Z, Liu X, et al. Mechanical properties and in vitro bioactivity of injectable and self-setting calcium sulfate/nano-HA/collagen bone graft substitute. J Mech Behav Biomed Mater. 2012;16(12):119-128.
- [4] He W, Xiao DJ. Guoji Gukexue Zazhi. 2007;28(4):222-223.
何伟, 肖建德. 复合型纳米羟基磷灰石人工骨的研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2007, 28(4): 222-223.
- [5] Daculsi G, Passuti N, Martin S, et al. Macroporous calcium Phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs: Clinical and histological study. J Biomed Mater Res. 1990;24(3):379-396.
- [6] LeGeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R, et al. Biphasic calcium Phosphate bioceramics: Preparation, Properties and applications. J Mater Sci Mater Med. 2003;14(3):201-209.
- [7] Xiao DJ. Beijing: Kexue Chubanshe. 2006:414-415.
肖建德. 现代骨移植学[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 414-415.
- [8] Zhu WM, Wang DP, Xiong JY, et al. Zhongguo Weixunhuan. 2006;10(5):344-348.
朱伟民, 王大平, 熊建义, 等. 纳米羟基磷灰石人工骨修复骨缺损的再血管化研究[J]. 中国微循环, 2006, 10(5): 344-348.
- [9] Zhu WM, Wang DP, Meng ZB, et al. Zhongguo Linchuang Jiepouxue Zazhi. 2006;24(6): 670-673.
朱伟民, 王大平, 孟志斌, 等. 纳米羟基磷灰石人工骨修复骨缺损的实验研究[J]. 中国临床解剖学杂志, 2006, 24(6): 670-673.
- [10] Fu JM, Miao B, Jia LH, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(1):157-160.
富建明, 苗波, 贾刘合, 等. 纳米羟基磷灰石修复兔颌骨缺损的组织学分析[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(1): 157-160.
- [11] Li SC, Kong XP, Li DC. Kouqiang Yixue Yanjiu. 2008;24(5): 537-539.
李善昌, 孔祥盼, 李德超. 纳米羟基磷灰石修复种植体周围骨缺损的实验研究[J]. 口腔医学研究, 2008, 24(5): 537-539.
- [12] Fu JM, Miao B, Jia LH, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(12):2387-2390.
富建明, 苗波, 贾刘合, 等. 纳米羟基磷灰石修复兔颌骨缺损的骨密度分析[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(12): 2387-2390.
- [13] Sun QS, Meng XC, Liang N. Heilongjiang Yiyao Kexue. 2003; 26(3):6-7.
孙庆顺, 孟祥才, 梁楠. 纳米羟基磷灰石修复牙槽骨缺损的动物实验研究[J]. 黑龙江医药科学, 2003, 26(3): 6-7.
- [14] Shi DW, Zhu ZA, Dai KR, et al. Guowai Yixue: Gukexue Fence. 2003;24(4):241-242, 253.
史定伟, 朱振安, 戴尅戎, 等. 多孔磷酸三钙修复骨缺损的临床观察[J]. 国外医学: 骨科学分册, 2003, 24(4): 241-242, 253.
- [15] Wang Z, Mao KY, Hou XJ, et al. Jiefangjun Yixue Zazhi. 2008; 33(9):1136-1138.
王征, 毛克亚, 侯喜君, 等. 多孔β-磷酸三钙修复骨缺损的实验研究[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(9): 1136-1138.
- [16] Liu Y, Pei GX, Jiang S, et al. Zhongguo Xiufu Chongjian Waikexue Zazhi. 2007;21(10):1123-1127.
刘勇, 裴国献, 江汕, 等. 新型多孔β-磷酸三钙作为骨组织工程支架材料的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(10): 1123-1127.
- [17] Liu Y, Pei GX, Jiang S, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(23): 4562-4657.
刘勇, 裴国献, 江汕, 等. 新型多孔β-磷酸三钙作为骨组织工程支架材料的评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(23): 4562-4657.
- [18] Ran X, Ran JG, Xing XZ, et al. Sichuan Daxue Xuebao: Gongcheng Kexueban. 2008;40(4):100-103.
冉旭, 冉均国, 邢现柱, 等. 微波等离子体烧结制备多孔纳米CHA/β-TCP双相生物陶瓷[J]. 四川大学学报: 工程科学版, 2008, 40(4): 100-103.
- [19] He W. Hubei Zhongyi Xueyuan. 2009.
何伟. 纳米双相陶瓷人工骨的制备和实验研究[D]. 湖北中医学院博士论文, 2009.
- [20] Zhang LD. Beijing: Huaxue Gongye Chubanshe. 2000:39-41.
张力德. 纳米材料[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 39-41.
- [21] Kühne JH, Bartl R, Frisch B, et al. Bone formation in coralline hydroxyapatite. Effects of pore size studied in rabbits. Acta Orthop Scand. 1994;65(3):246-252.