

基于三维CT图像辅助研制表面纳米化的仿生椎间融合器**☆

郭洪刚¹, 刘 静², 李峰坦¹, 杨少光³, 陈 治⁴, 姚芳莲⁵, 代凤英⁶, 刘文广⁶

Design of a biomimetic nanoscaled spinal cage by using computed tomography based three-dimensional construction

Guo Hong-gang¹, Liu Jing², Li Feng-tan¹, Yang Shao-guang³, Chen Zhi⁴, Yao Fang-lian⁵, Dai Feng-ying⁶, Liu Wen-guang⁶

Abstract

BACKGROUND: The surface characteristics of nanoscaled spinal cage are the key factors to restrict the long-term clinical efficacy. The key step to develop the nanoscaled spinal cage is how to optimize the biological activity and structural features of the biodegradable cage to meet the cell growth.

OBJECTIVE: To analyze the feasibility of digital imaging and surface-modification in developing the spinal cage and to evaluate the method to construct the scaffold.

METHODS: The morphology of the scaffold was obtained by analyzing anatomic data from digital scanning in spinal area; the biomimetic nanoscaled spinal cage was made with combination of β -tricalcium phosphate/chitosan/polycaprolactone via Nd: YAG with RGD modification. Morphology of the scaffold was observed, and its compatibility, hydrophilicity and degradation and biomechanical characteristics were observed at different periods.

RESULTS AND CONCLUSION: The three-dimensional construction of imaging could improve the fabrication accuracy of outer morphology for the scaffold, and it could reduce the parameter error during the simple physical and chemical preparation process which made the physical layout of the scaffold was remarkably arranged. As a satisfactory candidate for the spinal cage, Nd: YAG plus RGD surfaced modified scaffold showed more stable chemophysical characteristics and excellent affinity, and can meet the mechanical requirements of cage scaffolds. It has a good biocompatibility and has been regarded as an ideal candidate material for spinal cages.

Guo HG, Liu J, Li FT, Yang SG, Chen Z, Yao FL, Dai FY, Liu WG. Design of a biomimetic nanoscaled spinal cage by using computed tomography based three-dimensional construction. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(21): 3851-3854. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 椎间融合器的表面特征是制约其远期临床疗效的关键因素。如何优化可降解性融合器的生物活性和结构特征以适应细胞生长是仿生研制椎间融合器的核心步骤。

目的: 分析数字化影像学及表面修饰技术研制椎间支架的可行性, 评估构筑生物支架的方法。

方法: 获取颈椎标本解剖数据, 对相邻层匹配轮廓间三维表面进行重构来确定支架形貌, 以 Nd:YAG 激光联合 RGD 表面修饰纳米级 β -磷酸三钙/壳聚糖/聚己内酯支架, 观察支架形貌, 测定支架的相容性、亲水性及降解力学特性。

结果与结论: 图像三维重构可提高支架外部轮廓的精确度, 减少单纯理化制备过程的参数误差, 使支架空间三维布局更加合理, 联合表面改性后的支架拥有稳定的降解速率及良好的亲水表面, 能达到椎间支架的力学要求, 且具备良好的生物相容性, 是一种理想的椎间融合器候选材料。

关键词: 仿生椎间融合器; 图像; 三维重建; 纳米; 融合器; 表面改性
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.21.012

郭洪刚, 刘静, 李峰坦, 杨少光, 陈治, 姚芳莲, 代凤英, 刘文广. 基于三维 CT 图像辅助研制表面纳米化的仿生椎间融合器[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(21):3851-3854. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

迄今, 聚合物融合器(cage)已逐步替代金属类cage成为生物型cage研发的趋势^[1]。然而, 其并非完美。有学者发现聚合物cage呈现不同程度的崩解等异物反应, 伴随大量骨溶解^[2]。如何强化骨整合与预防cage周围骨溶解是目前脊柱外科界研究的热点。

如果赋予椎间cage生物活性, 在延长其应用寿命前提下使之能够自我修复和重建, 则脊柱融合术将发生质的飞跃。课题组提出了从生物活性角度研发椎间cage的设计理念, 即通过

相应手段对生物降解性cage表面修饰及其细胞亲和性改性, 以增加其细胞相容性和生物活性, 促进融合器-骨界面间组织再生。本研究基于数字化影像学与材料表面修饰学技术, 从宏观与微观方面对cage进行仿真, 测试支架空间布局、理化性质及生物力学特性, 探讨上述技术辅助研制生物支架的可行性。

1 材料和方法

设计: 多样本观察, 对照实验。

时间及地点: 于2010-10/2011-08分别在天津医科大学、天津大学及中国医学科学院血

¹Department of Orthopedics, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; ²Central Obstetrics and Gynecology Hospital of Tianjin, Tianjin 300052, China; ³Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300052, China; ⁴Precision School of Tianjin University, Tianjin 300072, China; ⁵School of Chemical Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; ⁶School of Materials Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Guo Hong-gang ☆, Doctor, Associate professor, Master's supervisor, Department of Orthopedics, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China
honggangguo2000@yahoo.com.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81041061*; Science and Technology Foundation of Tianjin Education Commission, No. 20090125*

Received: 2011-10-15
Accepted: 2011-12-17

¹ 天津医科大学总医院骨科, 天津市 300052; ² 天津市中心妇产科医院, 天津市 300052; ³ 中国医学科学院血液病研究所, 天津市 300052; ⁴ 精密学院, ⁵ 化工学院, ⁶ 材料学院, 天津市 300072

郭洪刚☆, 男, 1969年生, 河北省武安市人, 汉族, 2002年解放军军医进修学院、解放军总医院博士毕业, 新加坡国立大学博士后, 副教授, 硕士生导师, 主要从事脊柱外科与组织工程学的研究。
honggangguo2000@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)21-03851-04

收稿日期: 2011-10-15
修回日期: 2011-12-17
(20110915020/M·C)

液病研究所完成。

材料:

主要仪器	来源
精密螺旋三维CT系统	美国GE公司 Lightspeed16
扫描电镜	日本日立公司 Hitachi S520
原子力显微镜	美国VALEX公司 Autopnbe
材料力学试验机	英国Instron公司 5848

方法:

椎间仿生cage的制备: 将健康成年雄性安哥拉山羊颈椎标本置于精密螺旋三维CT系统, 获取连续薄层平面CT图像, 精确测量椎间关节的解剖数据, 经三维重建, 按下列公式计算, $C_{3/4}$ 椎间中心距 C_4 上终板前后间距 $\times C_{3/4}$ 椎间中心距 C_4 上终板左右间距 $\times C_{3/4}$ 终板垂直间距(轴位像) = 支架长度 $\times$ 支架宽度 $\times$ 支架高度(支架体积), 最终确定支架尺寸为长(18.21 $\pm$ 1.31) mm, 宽(17.21 $\pm$ 0.81) mm, 高(15.34 $\pm$ 0.75) mm; 利用沉淀、共混复合及冷冻干燥法制备出三维多孔纳米级 β -磷酸三钙/壳聚糖/聚己内酯($n\beta$ -TCP/CS/PCL)材料。

β -TCP/CS/PCL仿生基质表面改性: 基于前期工作^[3], 对孔径200~350 μ m, 孔隙率(88.61 $\pm$ 0.43)%的纳米级 β -TCP/CS/PCL仿生基质采用掺钕钇铝石榴石(Nd:YAG)激光处理, 获得微槽表面, 具体参数: 能量90 mJ/cm²、照射角度25°、扫描速率18 mm/s、脉冲频率14 Hz、波长265 nm, 每个样品处理30 min。纳米表面改性的 β -TCP/CS/PCL支架置于含RGD肽溶液(1 mmol/L), 4℃反应72 h, 真空干燥, 备用。

支架形态学观察: 大体与扫描电镜及原子力显微镜观察其宏观及微观形貌。

支架亲水性测定: 取4块不同处理模式支架(即Nd:YAG+RGD联合表面改性组, Nd:YAG改性组, RGD修饰组, 无表面改性组)称取质量(m_0), 室温下置入5 mL去离子水中4 h, 于1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h后取样品, 用滤纸吸净样品表面水分, 称其质量(m_1), 计算吸水率: 吸水率 = $(m_1 - m_0) / m_1 \times 100\%$, 绘制吸水率随时间变化的曲线。

降解测试: 将支架样品完全浸泡在37℃、pH7.4的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液中进行降解试验, 定期(1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h)取样测试支架质量丢失率及相对分子量。支架质量丢失率 = $(m_0 - m_x) / m_0 \times 100\%$, 其中 m_0 为降解前质量, m_x 代表各时段质量结果, 以三氯甲烷溶解样品, 凝胶色谱测定相对分子量。

生物力学测定: 采用三点弯曲法测量不同处理模式支架, 聚醚醚酮cage及异体骨cage的抗弯强度、抗压强度及弹性模量。

细胞相容性: 第4代成骨化羊脂肪基质细胞接种到上述4组支架, 培养7, 14, 21, 28 d后倒置显微镜观察生长情况。

统计学分析: 由第二作者采用SPSS 11.0软件完成统计处理, 各组数据比较采用单因素多水平方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 支架形态学观察 大体观察显示: 支架具备多孔蜂窝状结构, 孔隙结构均匀。扫描电镜观察显示: 支架呈现结构均匀的镂空状, 三维空间结构布局主要体现在排列规整的支架小梁(柱状结构)及连通性孔隙结构。表面改性后支架槽深(185.3 $\pm$ 18.9) nm, 间距宽度(205.2 $\pm$ 11.6) nm, 见图1。

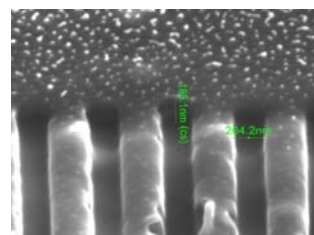


Figure 1 Micro-grooved topography of surface-modified β -tricalcium phosphate/chitosan/polycaprolactone scaffold (Scanning electron microscope, $\times 600$)
图1 表面改性后 β -磷酸三钙/壳聚糖/聚己内酯支架微槽结构形貌(扫描显微镜, $\times 600$)

取部分样品行原子力显微镜对比观察, 显示表面改性组支架具备纳米级沟槽形貌, 该形貌沿长轴排列, 呈现有规律的纳米级三维结构, 见图2; 无改性组呈现表面排列无序状凹凸状结构, 见图3。

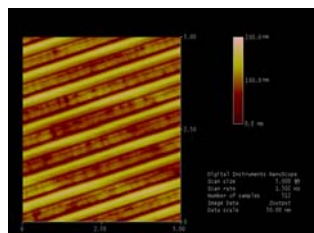


Figure 2 Nanoscaled topography of surface-modified β -tricalcium phosphate/chitosan/polycaprolactone scaffold (Atomic force microscope)
图2 具备纳米级拓扑形貌的 β -磷酸三钙/壳聚糖/聚己内酯支架(原子力显微镜)

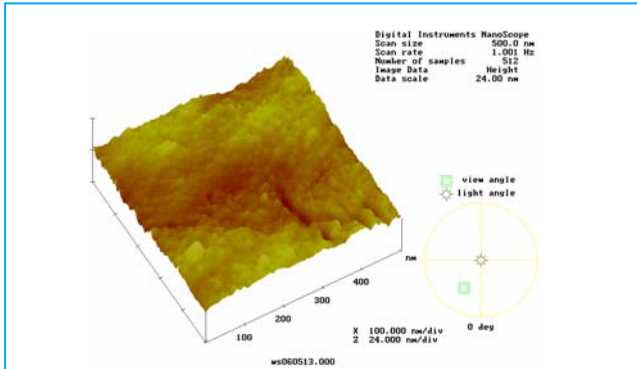


Figure 3 Irregular surface characteristics of non-modified β -tricalcium phosphate/chitosan/polycaprolactone scaffold (Atomic force microscope)

图3 表面排列无序状凹凸结构的无改性支架(原子力显微镜)

2.2 支架亲水性 支架具有较强的亲水性, 吸水性后体积明显增加, 无改性组、RGD修饰组支架吸水率基本维持不变, 联合改性组、Nd:YAG改性组支架吸水率比无改性组支架高, 且随时间延长, 其吸水率不断增加, 至48 h达最大值(334.0 ± 28.9)%, 见图4。

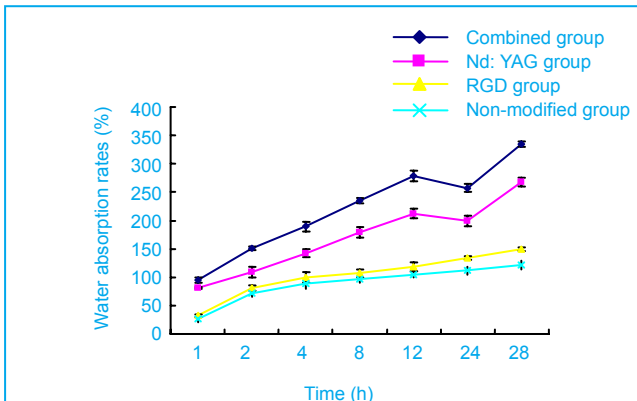


Figure 4 Water absorption rates in different scaffold groups at different intervals

图4 不同改性支架的吸水率

2.3 降解测试 支架材料质量丢失率随降解时间延长而明显增加, 联合改性组支架质量丢失率显著高于无改性组, 无改性组与RGD修饰组支架质量丢失率无差异, 所有支架组质量并未完全丢失, 见表1。

表1 不同改性支架质量丢失率
Table 1 Quality loss ratio among different scaffolds ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, %)

Time (h)	RGD group	Nd:YAG group	Combined group	Non-modified group
1	2.13 $\pm$ 1.53	9.38 $\pm$ 2.82	15.66 $\pm$ 1.39 ^a	4.12 $\pm$ 1.51
2	6.19 $\pm$ 2.23	11.15 $\pm$ 2.64	25.32 $\pm$ 3.06 ^a	5.32 $\pm$ 0.93
4	9.38 $\pm$ 3.12	13.18 $\pm$ 1.86	32.67 $\pm$ 1.25 ^a	8.16 $\pm$ 1.82
8	12.21 $\pm$ 2.27	17.12 $\pm$ 3.30	38.93 $\pm$ 1.62 ^a	10.92 $\pm$ 1.33
12	14.09 $\pm$ 1.42	28.31 $\pm$ 3.81	42.48 $\pm$ 1.93 ^a	13.12 $\pm$ 2.50
24	18.32 $\pm$ 3.48	31.47 $\pm$ 4.19	59.03 $\pm$ 1.72 ^a	17.22 $\pm$ 2.61
28	20.18 $\pm$ 2.51	33.82 $\pm$ 1.96	62.62 $\pm$ 2.30 ^a	19.30 $\pm$ 1.41

^a $P < 0.05$, vs. RGD group; Nd: YAG group and non-modified group

由表1可见, 支架相对分子质量呈线性降低, 降解前24 h, 联合改性组、Nd:YAG改性组支架的相对分子质量小于无改性组与RGD修饰组支架, 24 h后, 无改性组的相对分子质量比改性组支架大, 表明降解后期, 无改性组支架的降解速率降低。

2.4 生物力学性能分析 $\eta\beta$ -TCP/CS/PCL支架的抗弯强度、抗压强度、弹性模量与聚醚醚酮cage参数接近, 差异无显著性意义, 但与异体骨cage比较差异具有显著性意义(压缩强度和压缩模量小), 改性组与无改性组支架的抗弯强度、抗压强度、弹性模量无明显差异, 入选的联合改性组支架, 相对满足骨生物支架的力学要求 ($F_{\text{抗弯强度}}=650.412$, $F_{\text{抗压强度}}=334.840$, $F_{\text{弹性模量}}=27.016$, $P < 0.05$), 见表2。

表2 各组支架生物力学测试结果
Table 2 Biomechanical test results among different scaffolds ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, MPa)

Allocation group	Bending strength	Compressive strength	Elastic modulus
Combined	16.09 $\pm$ 2.53 ^a	7.18 $\pm$ 2.12 ^a	58.61 $\pm$ 1.59 ^a
Nd: YAG	15.98 $\pm$ 1.83	7.36 $\pm$ 2.61	56.36 $\pm$ 3.76
RGD	16.03 $\pm$ 2.41	7.28 $\pm$ 1.36	58.83 $\pm$ 2.25
Non-modified	15.93 $\pm$ 0.32	7.21 $\pm$ 1.25	54.83 $\pm$ 1.25
Peek cage	18.09 $\pm$ 2.21	8.28 $\pm$ 1.36	61.83 $\pm$ 2.26
Bone allograft	8.09 $\pm$ 1.42	3.28 $\pm$ 1.87	23.83 $\pm$ 3.16

^a $P < 0.05$, vs. bone allograft group

2.5 细胞相容性 培养第7天, 联合改性组、RGD修饰组细胞伸出伪足, 沿沟槽结构向支架中央处迁移, 胞体呈不规则。第14天, 细胞伸展良好, 细胞数量增多, 细胞间彼此连接紧密, 向孔隙呈三维迁移, 以联合改性组明显, 见图5。第21天, 联合改性组较RGD修饰组细胞间紧密连接, 支架孔隙、柱状结构及中央区布满增殖的细胞网络, 见图6。与其他组相比, 联合改性组支架孔隙处及柱状结构表面细胞分布比例明显增多。第28天, 联合改性组细胞分布有序、呈多层状排列, 有丰富细胞外基质; Nd:YAG组较RGD修饰组细胞排列规则, 但细胞外基质逊色于RGD修饰组。

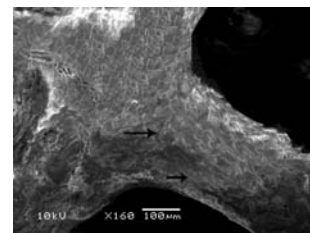


Figure 5 At 14 d, cells grew three-dimensionally along the pore into the scaffold in combined group (Scanning electron microscope)

图5 联合改性组第14天细胞沿柱状结构向支架孔隙处三维内生长(扫描电镜)

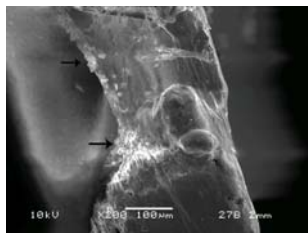


Figure 6 At 21 d, cells were interconnected and remarkable extracellular matrix was secreted in combined group (Scanning electron microscope)

图6 联合改性组第21天细胞间紧密连接,分泌细胞基质丰富(扫描显微镜)

第7天无改性组细胞从支架中央脱落,第14天形态不规则、呈无序状伸展,随后细胞伸展变形慢,集中在支架边缘,细胞间连接疏松、分布不均匀,细胞外基质较少,见图7。

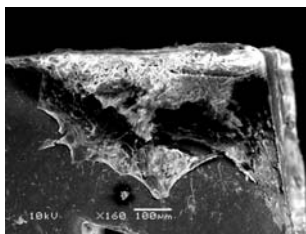


Figure 7 At 21 d, cells sparsely survived at the edge of scaffold with minor quantity of the extracellular matrix in non-modified group (Scanning electron microscope)

图7 无改性组第21天细胞散存在支架边缘,细胞外基质较少(扫描显微镜)

3 讨论

虽然计算机辅助设计的应用为椎间cage研发提供了新的发展空间,但人工材料的不可再生性决定了现今的cage均不能避免磨损及日后翻修的命运^[4-5]。作者提出了从生物活性角度研发椎间cage的设计理念,即通过相应手段对生物降解性cage表面修饰及其细胞亲和性改进,以增加其细胞相容性和生物活性,促进融合器-骨界面间组织再生。

为使cage更具仿生化,作者拟设计出解剖型cage,基于山羊C_{3/4}椎间3D CT图像重建,获取解剖数据,提供建模方案,制成 β -TCP/CS/PCL cage,通过对宿主部位相邻层匹配轮廓间三维表面进行重构来确定支架形貌,有望提高支架外部轮廓尺寸的精确度,减少单纯理化制备过程的参数误差,使支架外部形态与宿主受损部位相匹配。这提示数字化影像学技术是一种理想的支架辅助研制手段。

材料的纳米拓扑结构可调控细胞的生长,增加细胞迁移、增殖,促进细胞外基质合成^[6]。激光造型技术能制备纳米结构表面,改善细胞黏附,为细胞生长创造有

利微环境。实验对生物支架进行表面改性,原子力显微镜显示其具备纳米拓扑表面结构。

RGD多肽对细胞识别位点进行空间组合^[7]。前期证实RGD修饰表面改性后的膜材能构筑仿生骨膜,与工程化骨联用取得了满意的融合效果^[8]。实验采用纳米表面工程技术将RGD多肽固定在经Nd:YAG激光处理后的 β -TCP/CS/PCL cage之纳米级沟槽表面,对其生物化处理,以期增加cage的细胞间亲和力,增强cage-骨界面间的组织相容性。降解结果验证了联合改性组具备稳定的降解特性,力学测试显示,联合改性组支架可达到椎间cage力学要求,并拥有良好的生物相容性,这提示经物理与化学途径修饰的表面改性支架可作为理想的椎间cage,并具有稳定的理化性征,能解决与宿主部位相匹配的难题,具有潜在的研究空间。

4 参考文献

- [1] Ding JY, Qian S, Wan L, et al. Design and finite-element evaluation of a versatile assembled lumbar interbody fusion cage. Arch Orthop Trauma Surg. 2010;130(4):565-571.
- [2] Chuah HG, Abd Rahim I, Yusof MI. Topology optimisation of spinal interbody cage for reducing stress shielding effect. Comput Methods Biomech Biomed Engin. 2010;13(3):319-326.
- [3] Guo HG, Liu J, Li FT, et al. Zhongguo Jiaoxing Waikexue. 2009; 17(20):1562-1565.
郭洪刚,刘静,李峰坦,等.基于三维CT图像重建研制纳米仿生骨基质支架的研究[J].中国矫形外科杂志,2009,17(20):1562-1565.
- [4] Balseiro S, Nottmeier EW. Vertebral osteolysis originating from subchondral cyst end plate defects in transforaminal lumbar interbody fusion using rhBMP-2. Report of two cases. Spine J. 2010;10(7):e6-e10.
- [5] Fabbri N, Rustemi E, Masetti C, et al. Severe osteolysis and soft tissue mass around total hip arthroplasty: description of four cases and review of the literature with respect to clinico-radiographic and pathologic differential diagnosis. Eur J Radiol. 2011;77(1):43-50.
- [6] Yim EKF, Darling EM, Kulangara K, et al. Nanotography-induced changes in focal adhesions, cytoskeletal organization, and mechanical properties of human mesenchymal stem cells. Biomaterials. 2010; 31(6):1299-1306.
- [7] Beuvelot J, Portet D, Lecollinet G, et al. In vitro kinetic study of growth and mineralization of osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surface coated with a RGD functionalized bisphosphonate. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009; 90(2):873-881.
- [8] Guo HG, Liu J, Liu HF, et al. Zhonghua Xiaowai Ke Zazhi. 2009; 30(12):878-882.
郭洪刚,刘静,刘海峰,等.RGD修饰的仿生骨膜及纳米化诱导骨促进兔脊柱融合的实验研究[J].中华小儿外科杂志,2009,30(12):878-882.

来自本文课题的更多信息——

基金声明: 国家自然科学基金项目(81041061), 天津市教委科技基金资助项目(20090125)。

作者贡献: 实验设计为郭洪刚, 实验实施为郭洪刚、刘静、姚芳莲, 杨少光, 实验评估为陈治、代凤英, 刘文广, 资料收集为李峰坦、陈治。郭洪刚成文, 姚芳莲审核, 郭洪刚对文章负责。

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应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。