

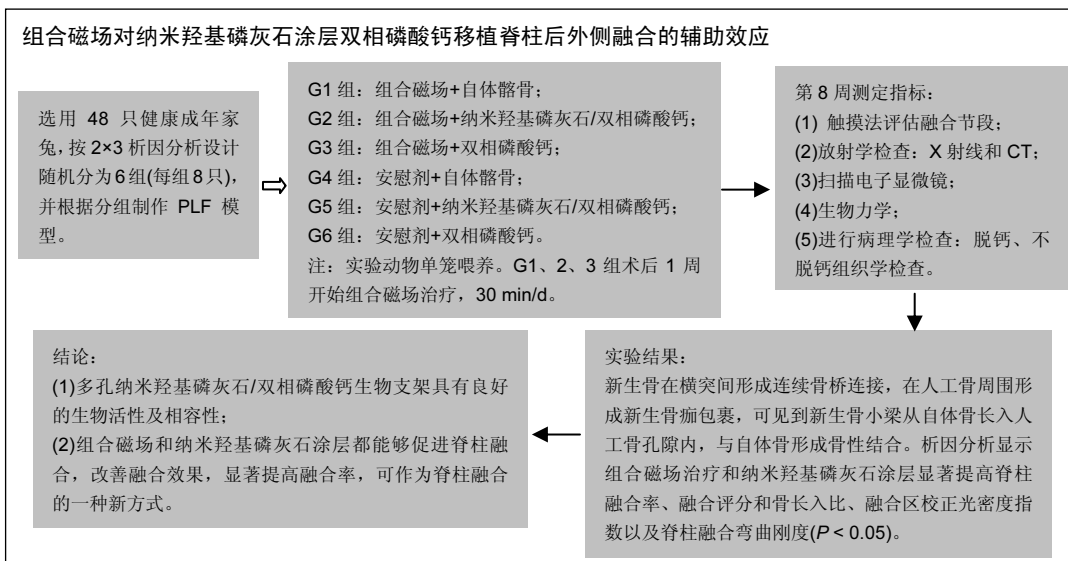
纳米羟基磷灰石/涂层双相磷酸钙人工骨移植脊柱后外侧融合： 组合磁场的辅助作用

卓祥龙¹，吕红斌²，胡建中³，李兵¹，刘咏⁴，吴祖同³(¹柳州市工人医院脊柱外科，广西壮族自治区柳州市 545001；中南大学湘雅医院，²运动医学科，³脊柱外科，湖南省长沙市 410008；⁴中南大学粉末冶金研究院，湖南省长沙市 410008)

引用本文：卓祥龙，吕红斌，胡建中，李兵，刘咏，吴祖同. 纳米羟基磷灰石/涂层双相磷酸钙人工骨移植脊柱后外侧融合：组合磁场的辅助作用[J]. 中国组织工程研究，2016，20(34):5089-5097.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.34.012 ORCID: 0000-0002-3239-0539(卓祥龙)

文章快速阅读：



卓祥龙，1976 年生，安徽省灵璧县人，汉族，2011 年中南大学湘雅医院毕业，博士，副主任医师，硕士生导师，主要从事脊柱疾病微创治疗及生物材料相关研究。

通讯作者：胡建中，中南大学湘雅医院脊柱外科，湖南省长沙市 410008

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2016)34-05089-09

稿件接受: 2016-06-04

文题释义：

纳米羟基磷灰石涂层双向磷酸钙人工骨：双相磷酸钙是由不同比例的羟基磷灰石和 β -磷酸钙混合而成，两者均属于磷酸钙陶瓷，与天然骨矿物质充分和结果类似，具有良好的生物活性和生物相容性。天然骨中羟基磷灰石是以纳米形式存在，纳米羟基磷灰石具有更好地生物活性，在双相磷酸钙人工骨表面进行纳米羟基磷灰石涂层能够提高人工骨的活性和生物相容性。

组合磁场：为一种新型的生物物理刺激，其信号是 2 种波的组合，为动态交替的正弦电磁场并联合叠加于静磁场上组成。静磁场强度 0.2 Gs，正弦电磁场的磁场强度为 0.4 Gs，频率 76.6 Hz，正好在 0-150 Hz 范围内，这个区域的频率对刺激成骨效果最佳。

摘要

背景：自体骨移植是脊柱融合的主要方法，但其来源有限，而且伴有很多并发症的发生，人工合成材料已成为最有前途的骨移植替代材料。

目的：观察组合磁场和纳米羟基磷灰石涂层对双相磷酸钙人工骨移植兔脊柱后外侧融合的影响。

方法：制作 48 只兔双侧 L_{5/6} 横突间融合模型，随机分成 6 组：G1 组为组合磁场+自体髂骨；G2 组为组合磁场+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙；G3 组为组合磁场+双相磷酸钙；G4 组为安慰剂+自体髂骨；G5 组为安慰剂+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙；G6 组为安慰剂+双相磷酸钙。术后 1 周开始组合磁场治疗，30 min/d，治疗 8 周后处死实验动物，分别进行触摸法、X 射线、CT、组织学(脱钙和不脱钙骨)和生物力学评估脊柱融合效果。

结果与结论：①触摸法、X 射线法和组织学评估 G2 组脊柱融合率最高，G6 组最低，差异有显著性意义($P < 0.05$)。G2 组新生骨长入比显著高于 G3，G5 组和 G6 组($P < 0.05$)；②X 射线片显示融合区校正吸光度指数 G2 组显著高于其他各组($P < 0.05$)；③CT 和组织学可见新生骨小梁从自体骨长入人工骨孔隙内，与自体骨形成骨性结合；④生物力学结果显示，G2 组脊柱弯曲刚度最高，显著高于其他各组

Zhuo Xiang-long, M.D.,
Associate chief physician,
Master's supervisor,
Department of Spine
Surgery, Liuzhou Worker's
Hospital, Liuzhou 545001,
Guangxi Zhuang
Autonomous Region,
China

Corresponding author:
Hu Jian-zhong,
Department of Spine
Surgery, Xiangya Hospital
of Central South University,
Changsha 410008, Hunan
Province, China

($P < 0.05$); ⑤析因分析结果显示, 组合磁场治疗和纳米羟基磷灰石涂层可显著提高脊柱融合率、融合评分、骨长入比、融合区校正吸光度指数及脊柱融合弯曲刚度($P < 0.05$); ⑥结果提示, 组合磁场联合纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙生物支架进行兔脊柱后外侧融合能够显著提高融合率, 融合效果类似于单纯的自体骨融合, 可作为脊柱融合的一种新方式。

关键词:

生物材料; 骨生物材料; 纳米羟基磷灰石涂层; 组合磁场; 双相磷酸钙; 腰椎后外侧融合; 国家自然科学基金

主题词:

腰椎; 脊柱融合术; 纳米复合物; 羟基磷灰石类; 电磁场; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81171699)

Nano-hydroxyapatite coated biphasic calcium phosphate for posterolateral lumbar fusion: combined magnetic field plays an auxiliary role

Zhuo Xiang-long¹, Lv Hong-bin², Hu Jian-zhong³, Li Bing¹, Liu Yong⁴, Wu Zu-tong³ (¹Department of Spine Surgery, Liuzhou Worker's Hospital, Liuzhou 545001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²Department of Sport Medicine, ³Department of Spine Surgery, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China; ⁴Powder Metallurgy Research Institute, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Autologous bone is considered the main material for spinal fusion, while synthetic materials overcome the shortcomings caused by the autologous bone (complications and limited source) and become the most promising bone graft substitute materials.

OBJECTIVE: To investigate the effects of nano-hydroxyapatite (nano-HA) coating and combined magnetic field (CMF) on the biphasic calcium phosphate (BCP) transplantation for rabbit posterolateral lumbar fusion.

METHODS: Forty-eight rabbits underwent bilateral intertransverse processes fusion at the level of L₅₋₆, and were then randomly divided into six groups: rabbits in group G1 received autologous iliac bone graft and CMF treatment; group G2 was given nano-HA/BCP and CMF treatment; group G3 received BCP and CMF treatment; group G4 received autologous iliac bone graft and placebo; group G5 underwent nano-HA/BCP and placebo; group G6 received BCP and placebo. CMF treatment was performed 30 minutes each day for 8 consecutive weeks beginning at 1 week after surgery. These rabbits were euthanized at 9 weeks after surgery to evaluate spinal fusion effects through palpation, X-ray examination, CT examination, histological analysis (decalcified and undecalcified sections) and biomechanical assessment.

RESULTS AND CONCLUSION: The palpation, X-ray and histological examinations showed that there was significant difference in the fusion rate between groups G2 and G6, the highest in the group G2, and the lowest in the group G6 ($P < 0.05$). The bone ingrowth rate in the group G2 was significantly higher than those in the groups G3, G4 and G6 ($P < 0.05$). The normalized optical density index of fusion mass and bending stiffness in the group G2 were significantly higher than those in the other groups ($P < 0.05$). CT and histological observations found that new bone trabecula grew into the biological scaffold, exhibiting osseointegration. Factorial analysis showed that CMF and nano-HA coating could significantly improve the spinal fusion rate, fusion score, bone ingrowth rate and bending stiffness ($P < 0.05$). In conclusion, CMF combined with nano-HA/BCP for rabbit posterolateral lumbar fusion can significantly ameliorate the fusion rate, which is analogous to the single autologous bone; therefore, it can be used as a new spinal fusion method.

Subject headings: Lumbar Vertebrae; Spinal Fusion; Nanocomposites; Hydroxyapatites; Electromagnetic Fields; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81171699

Cite this article: Zhuo XL, Lv HB, Hu JZ, Li B, Liu Y, Wu ZT. Nano-hydroxyapatite coated biphasic calcium phosphate for posterolateral lumbar fusion: combined magnetic field plays an auxiliary role. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(34):5089-5097.

0 引言 Introduction

脊柱融合术是治疗脊柱疾病的主要方法之一, 自体骨是植骨融合的金标准, 然而自体骨来源有限, 总的并发症高达30%^[1]。人工合成材料被认为是最有前途的骨移植替代材料, 双相磷酸钙促进干细胞分化、增殖和诱导成骨分化^[2], 双相磷酸钙具有适中的生物降解性, 双相磷酸钙作为修复新西兰大白兔颅骨缺损材料比去蛋白牛骨组织形成更多的矿化新生骨和更少材料残留, 有利于诱导成骨, 甚至比自体骨具有更优异的稳定性和成骨能力^[3-4]。纳米羟基磷灰石与单纯羟基磷灰石相比有更好的生物活性, 显著促进成骨分化^[5-9]。组合磁场能够刺激骨形成、骨折愈合^[10-11]。临床随机对照试验结果也提示组合磁场治疗能够显著提高脊柱后外侧融合率^[12]。文章应用纳米羟基磷灰石涂层双相磷酸钙人工骨进行脊柱融合, 并联合组合磁场治疗以期进一步促进脊柱融合。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 2因素3层次析因分析设计。

1.2 时间及地点 实验于2009年3月至2010年11月完成。材料实验在中南大学粉末研究院完成, 动物实验在中南大学动物学部完成, 病理性检测在中南大学湘雅医院病理科及上海中医药大学附属曙光医院完成, 生物力学检测在中南大学粉末研究院完成。

1.3 材料 用PASS 2008软件估计样本量(检验水准 $\alpha=0.05$, 检验效能 >0.80), 结果每组不少于7只。查表法把48只健康成年家兔随机分成6组, 见表1。

48只纯种健康成年家兔, 由中南大学动物学部提供, 体质量(2.2±0.2) kg, 雌雄不拘。多孔双相磷酸钙人工骨(湖南省共创生物功能材料有限公司), 纳米羟基磷灰石涂层多孔双相磷酸钙人工骨(自制), 戊巴比妥钠(Sigma公司), 组合磁场治疗仪(美国Donjoy公司赠送)。Motic病理图像自动采集系统, Image-pro Plus 6.0 图像分析软件。

1.4 实验方法

1.4.1 动物模型建立、治疗及标本采集 家兔单笼喂养1周后手术, 饲养笼标记分组实验动物。3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)经耳缘静脉注射麻醉, L₅棘突为中心正中切口, 椎旁肌间隙显露L₅横突, 去皮质, 同切口每侧切取2.5 cm³ 肋骨备用。各组根据实验设计植入移植材料后缝合切口。术后1周开始组合磁场治疗, 30 min/d, 治疗8周后安乐死法处死, 切取L₁-S₂ 脊柱标本放入-70 °C超低温冰箱中保存。

1.4.2 大体观察及触摸法评估脊柱融合^[13] 根据自体肋骨、人工骨与脊柱横突结合牢固程度进行评估, 对每个样品两侧分别单独评分。融合区域分为2级: 活动记为0分, 牢固记为1分, 总分0-2分。固定认为融合, 否则为不融合。

1.4.3 X射线检测 分别于术后1, 3, 5, 7, 9周拍摄前后位X射线片。采用Faxitron X射线摄片机, 球管电压70 kV, 电流0.3 mA, 曝光时间15 s。根据Lopez等^[14]描述的标准对X射线进行双盲评分。根据Huang等^[15]介绍的方法测量融合区吸光度。用IPP图像分析软件把X射线图片转换为黑白照片以提高融合区密度使其有更高的吸光度(图1)。采用标准化吸光度指数进行组间比较。校正吸光度指数=融合区累积吸光度/相邻椎体校正累积吸光度。

1.4.4 双源CT扫描 测量前夜标本4 °C过夜至完全解冻, 扫描条件: 准直16 mm×0.3 mm; 重建层原0.4 mm; 重建间距0.2 mm; 卷积核U90, U70sharp; 重建视野(FOV)50 mm, 120 kV, 180 mA; 螺距0.85; 扫描时间14-18 s, 进行脊柱融合区扫描, 获取扫描层次原始数据, 用Minics 8.0进行重建。观察人工骨与自体骨整合情况以及骨痂形成量。

1.4.5 生物力学测试 测试前夜标本4 °C过夜至完全解冻, 剔除全部软组织和肌肉, 仅保留肌腱和小关节囊, 将试样放置于材料力学实验机的支座正中, 止点跨距设为25 mm, 进行三点弯曲实验。预载10 N, 加载速度0.4 mm/s, 5次循环后应变达到0.5 mm。然后加载速度设为3 mm/min, 继续加载至样本断裂。测定弯曲载荷-变形曲线, 测出弯曲最大载荷、最大应力、根据压力应变曲线计算脊柱弯曲刚度指标^[16], 定量分析样本力学特征。

1.4.6 组织学分析 脱钙融合区骨组织切片苏木精-伊红染色, 不脱钙融合区组织切片甲苯胺蓝染色^[17], 根据融合区纤维组织、软骨、不成熟和成熟新生骨的比例对切片进行评分, 总分10分^[18], 评分大于6分认为成功融合, 指的是有连续骨桥通过临近横突。IPP 6.0测量计算骨长入比及人工骨残留百分率。骨长入比例是指新生骨总量占孔隙总量的比例^[19]。

1.5 主要观察指标 术后1周安乐处死实验动物, 分别进行触摸法、X射线、CT、组织学(脱钙、不脱钙)和生物力学检测, 观察其融合效果。

1.6 统计学分析 SPSS 13.0统计软件包建立本实验计量资料和计数资料数据库。采用一般线性模型单变量析因

分析实验数据, 如有交互作用则对各因素的单独效应进行分析; 计量资料采用方差分析, 若方差不齐, 两样本采用Wilcoxon秩和检验, 多样本采用Kruskal-Wallis秩和检验, 若有显著差别再用LSD法检验分析; 等级资料采用Wilcoxon符号秩检验或Kruskal-Wallis秩和检验, 若有显著差别再LSD法进行分析; 率或构成比采用卡方检验进行分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 共有48只成年家兔纳入实验, 随机分成6组, 每组8只。在实验早期(术后2周内)有2只兔手术中死亡, 按序补入。

2.2 大体观察及触摸法融合评估结果 触摸法融合率和评分见表2。各组融合率以G2组最高(94%), G6组最低(44%), 2组相比差异有显著性意义($P=0.006$), G1组也显著高于G6组($P=0.023$), G5和G3组略高于G4组, 但差异无显著性意义。析因分析显示A和B两因素没有交互作用($F=0.56$, $P=0.949$), A因素主效应提高融合率23%, 差异有显著性意义($F=6.747$, $P=0.011$), B因素主效应是提高融合率19%, 差异也有显著性意义($F=3.513$, $P=0.034$)。

G1, 2, 5组融合评分都显著高于G6组($P=0.003$, 0.001 , 0.028), G2组也高于G4组($P=0.028$), 余各组间比较差异无显著性意义。析因分析结果显示A因素和B因素没有交互作用($F=0.073$, $P=0.930$), A因素主效应提高融合评分0.33, 差异有显著性意义($F=4.667$, $P=0.037$); B因素的主效应提高0.38, 差异有显著性意义($F=4.594$, $P=0.016$)。

2.3 X射线片结果 术后5周各组均可见到横突间有多少不等的骨痂形成, 但不连续; 术后7周, 在G1和G2组中可见到横突间连续骨痂出现, 各有3只实验动物达到了影像学融合标准, 但各组间骨痂形成量没有明显差别。术后9周, 组合磁场治疗组形成的骨痂量相对要多一些, G1, G2和G5组骨痂形成稍多, G3, G4和G6组形成较少。

2.3.1 X射线融合评价 X射线融合率和评分见表2。G1和G2组融合率最高, 显著高于G6组($P=0.023$), 其他各组之间差异无显著性意义。析因分析结果显示A因素和B因素没有交互作用($F=0.51$, $P=0.95$), A因素(组合磁场治疗)主效应提高融合率为21%, 差异有显著性意义($F=5.102$, $P=0.026$); B因素提高融合率为17%, 差异无显著性意义($F=2.908$, $P=0.06$)。

比较各组间融合评分结果显示G1, G2, G5组融合

评分显著高于G6组($P=0.006$, 0.01 , 0.025), 余各组间比较差异无显著性意义($P>0.05$)。析因分析显示A因素和B因素没有交互作用($F=0.538$, $P=0.588$), A和B因素主效应分别为0.79和0.75, 差异有显著性意义($F=4.521$, $P=0.039$; $F=3.243$, $P=0.49$)。

2.3.2 融合区校正吸光度指数 由图2所示融合区校正吸光度指数, 自体髂骨组(G1组和G4组)校正吸光度指数始终显著低于其他各组($P<0.05$), 但保持增高的趋势。而G2, G3, G5和G6四组校正吸光度指数经历升高、下降后再缓慢升高的过程。第5周G3组校正吸光度指数高于其他各组, 此后G2组校正吸光度指数升高加快, 第7, 9周始终明显高于其他各组($P<0.05$)。

由图3可以看出术后9周, 组合磁场治疗组校正吸光度指数均显著高于对照组, G2组显著高于其他各组($P<0.05$), G3和G5组也明显高于G6组($P=0.009$, $P=0.63$)。析因分析结果显示A因素和B因素之间没有交互作用($P=0.835$), A因素主效应提高校正吸光度指数3.15($P=0.000$), B因素主效应提高了2.15($P=0.008$)。

2.4 CT分析结果 CT扫描显示自体髂骨组植骨大部分被吸收, 在相邻横突之间新生骨痂形成骨桥连接。在G1组新生骨痂量要多于G4组, 密度也高于G4组, 这与X射线的校正吸光度指数结果一致(图4A, B)。人工骨组可见到新生骨自横突和小关节突与人工骨紧密连接并长入人工骨内部, 形成连续骨桥连接相邻横突。G2组与其他组相比, 人工骨变得稀疏、松散, 人工骨残留减少明显, 有更多的骨痂形成包绕人工骨, 人工骨与自体骨形成紧密骨整合(图4C)。G3和G5组人工骨与自体骨形成骨整合, 但新生骨痂相对G2组少, 人工骨稍松散, 孔隙变大, 结构尚规整(图4D, E), G6组新生骨骨痂更少, 有时在界面区可见到线状缝隙, 这说明人工骨与自体骨之间新生骨矿化不完全, 密度稍低于周围组织, 人工骨较规整(图4F)。

2.5 生物力学结果 如表3所示, G2组脊柱弯曲刚度最高, 显著高于其他各组($P<0.05$), G4组脊柱弯曲刚度最低, 亦显著低于G1和G5组($P<0.05$), G5组脊柱弯曲刚度还显著高于G6组($P<0.05$)。余各组间比较差异无显著性意义($P>0.05$)。析因分析结果显示A因素和B因素没有交互作用($F=1.521$, $P=0.068$), A因素(组合磁场治疗)主效应为提高弯曲刚度20.41 N/mm, 差异有显著性意义($F=14.12$, $P=0.01$); B因素的主效应是提高弯曲刚度23.85 N/mm, 差异有显著性意义($F=16.43$, $P=0.000$)。

由表3可见, G3组的最大应力和最大弯曲载荷最大, 显著高于其他各组($P<0.05$); G6组最大应力和最大弯曲

表 1 实验动物分组 (n=8)
Table 1 Experimental animal grouping

A 因素(组合磁场, 2 水平)	B 因素(骨移植材料, 3 水平)		
	自体骨	纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙	双相磷酸钙
组合磁场	G1	G2	G3
安慰剂	G4	G5	G6

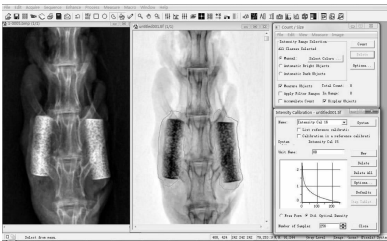


图 1 融合区校正吸光度指数测量
Figure 1 Measurement of the normalized absorbance index of fusion mass

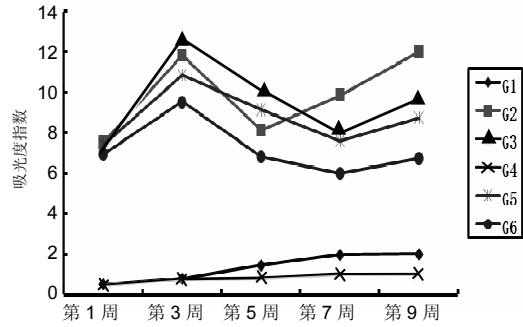


图 2 各组不同时间点融合区 X 射线校正吸光度指数比较
Figure 2 Comparison of the normalized absorbance index of fusion mass by X-ray examination among groups at different time points after surgery
图注: G1 组: 组合磁场+自体髂骨; G2 组: 组合磁场+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G3 组: 组合磁场+双相磷酸钙; G4 组: 安慰剂+自体髂骨; G5 组: 安慰剂+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G6 组: 安慰剂+双相磷酸钙。

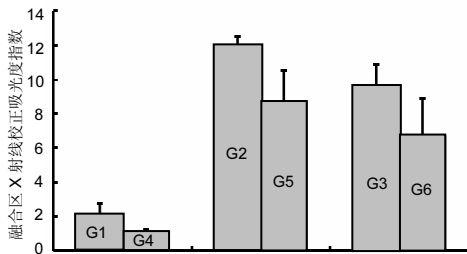


图 3 术后 9 周各组融合区 X 射线校正吸光度指数误差条图
Figure 3 The error bar chart of the normalized optical density index of fusion mass by X-ray examination among groups at 9 weeks after surgery
图注: G1 组: 组合磁场+自体髂骨; G2 组: 组合磁场+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G3 组: 组合磁场+双相磷酸钙; G4 组: 安慰剂+自体髂骨; G5 组: 安慰剂+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G6 组: 安慰剂+双相磷酸钙。

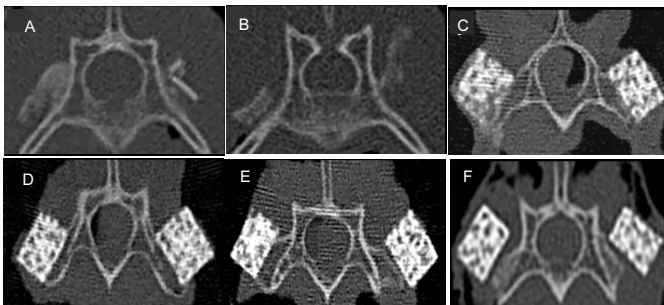


图 4 术后 9 周各组融合区 CT 扫描轴位像
Figure 4 Axial images of the fusion zone by CT scan in each group at 9 weeks after surgery
图注: 图 A 为 G1 组轴位像, B 为 G4 组轴位像, C 为 G2 组轴位像, D 为 G5 组轴位像, E 为 G3 组轴位像, F 为 G6 组轴位像。G1 组: 组合磁场+自体髂骨; G2 组: 组合磁场+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G3 组: 组合磁场+双相磷酸钙; G4 组: 安慰剂+自体髂骨; G5 组: 安慰剂+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G6 组: 安慰剂+双相磷酸钙。

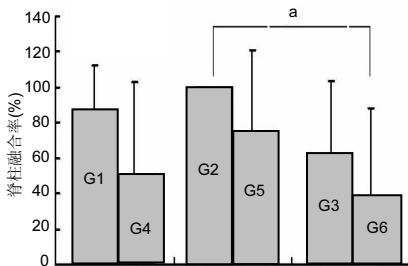


图 5 各组组织学脊柱融合率误差条图
Figure 5 The error bar chart of the spinal fusion rate by histology in each group
图注: G1 组: 组合磁场+自体髂骨; G2 组: 组合磁场+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G3 组: 组合磁场+双相磷酸钙; G4 组: 安慰剂+自体髂骨; G5 组: 安慰剂+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G6 组: 安慰剂+双相磷酸钙。G2 组融合率显著高于 G6 组。^aP < 0.05。

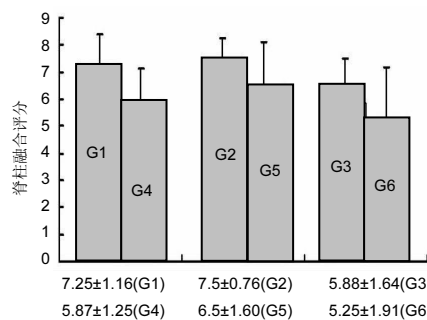


图 6 各组组织学脊柱融合评分误差条图
Figure 6 The error bar chart of the spinal fusion score by histology in each group
图注: G1 组: 组合磁场+自体髂骨; G2 组: 组合磁场+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G3 组: 组合磁场+双相磷酸钙; G4 组: 安慰剂+自体髂骨; G5 组: 安慰剂+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G6 组: 安慰剂+双相磷酸钙。

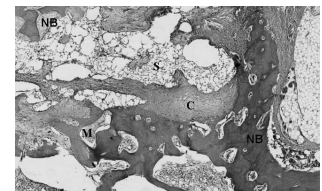


图 7 自体骨与人工骨结合界面(苏木精-伊红染色, ×70)
Figure 7 The interface between autogenous bone and artificial bone (hematoxylin-eosin staining, ×70)
图注: 可见到人工骨与新生骨紧密结合, 新生骨已形成骨髓腔和骨小梁结构, 同时伴有大量的软骨成骨, 孔隙内有新生骨形成(M: 骨髓, NB: 新生骨; C: 软骨; S: 人工骨)。

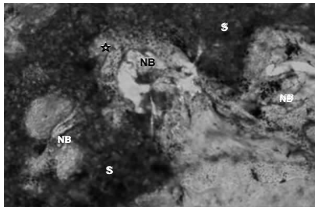


图8 不脱钙组织切片(甲苯胺蓝染色, ×40)

Figure 8 Undecalcified histological sections (toluidine blue staining, x40)

图注: 显示人工骨孔隙内相互连通新生骨小梁、骨陷窝、骨细胞和骨小管结构(☆)。NB: 新生骨, S: 人工骨。

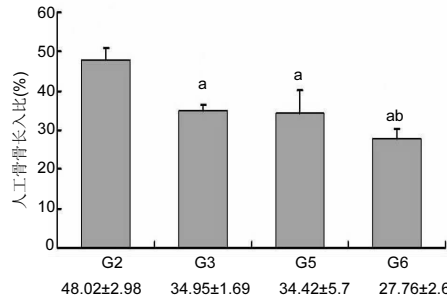


图9 各组人工骨骨长入比误差条图

Figure 9 The error bar chart of bone ingrowth rate of the artificial bone in each group

图注: G2组人工骨长入比显著高于G3, 5, 6组($P < 0.05$), G3组人工骨长入比显著高于G6组($P < 0.05$)。与G2组比较, $^aP < 0.05$; 与G3组比较, $^bP < 0.05$ 。G1组: 组合磁场+自体髂骨; G2组: 组合磁场+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G3组: 组合磁场+双相磷酸钙; G4组: 安慰剂+自体髂骨; G5组: 安慰剂+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G6组: 安慰剂+双相磷酸钙。

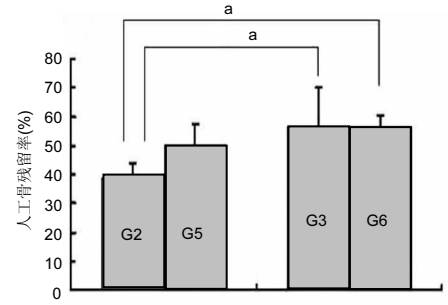


图10 各组人工骨残留率误差条图

Figure 10 The error bar chart of residual rate of the artificial bone in each group

图注: G3组人工骨残留率显著高于G2组, G6组人工骨残留率显著高于G5组, $^aP < 0.05$ 。G1组: 组合磁场+自体髂骨; G2组: 组合磁场+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G3组: 组合磁场+双相磷酸钙; G4组: 安慰剂+自体髂骨; G5组: 安慰剂+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G6组: 安慰剂+双相磷酸钙。

表2 各组触摸法、X射线和组织学脊柱融合评估结果比较

Table 2 Comparison of spinal fusion evaluations by palpation, X-ray and histological examination among groups

项目		G1	G2	G3	G4	G5	G6
触摸法	融合(n/N)	14/16	15/16	11/16	10/16	12/16	7/16
	评分($\bar{x} \pm s$)	1.75±0.46	1.88±0.35	1.38±0.52	1.25±0.71	1.50±0.53	0.88±0.64
X射线	融合(n/N)	14/16	14/16	10/16	10/16	11/16	7/16
	评分($\bar{x} \pm s$)	4.88±0.64	4.75±1.04	4.00±0.93	3.75±1.04	4.50±1.20	3.00±2.27
组织学	融合(n/N)	7/8	8/8	5/8	4/8	6/8	3/8
	评分($\bar{x} \pm s$)	7.25±1.16	7.50±0.76	5.88±1.64	5.87±1.25	6.50±1.60	5.25±1.91

表注: G1组: 组合磁场+自体髂骨; G2组: 组合磁场+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G3组: 组合磁场+双相磷酸钙; G4组: 安慰剂+自体髂骨; G5组: 安慰剂+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G6组: 安慰剂+双相磷酸钙。触摸法和X射线中n=脊柱融合侧数, N=总侧数; 组织学中n=脊柱融合动物数, N=每组动物总数。

表3 各组三点弯曲实验结果比较

Table 3 Comparison of results in three-point bending test among groups

项目	G1	G2	G3	G4	G5	G6
弯曲刚度(N/mm)	102.49±20.62	140.19±24.32	94.37±17.94	82.33±17.41	108.05±8.54	85.44±20.23
最大应力(MPa)	374.18±36.14	436.75±45.32	543.47±32.67	368.64±43.63	378.38±21.49	316.88±18.38
最大弯曲载荷(N)	475.80±52.13	555.40±47.82	691.10±38.83	468.80±40.25	481.10±32.17	402.90±25.37

表注: G1组: 组合磁场+自体髂骨; G2组: 组合磁场+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G3组: 组合磁场+双相磷酸钙; G4组: 安慰剂+自体髂骨; G5组: 安慰剂+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙; G6组: 安慰剂+双相磷酸钙。

载荷最小, 显著小于其他各组($P < 0.05$); G2组显著高于G1, G4和G5组($P < 0.05$), 余各组间比较差异无显著性意义。G1, G4和G5组之间差异无显著性意义($P > 0.05$)。组合磁场治疗组可显著提高人工骨组最大应力和最大弯曲载荷($P < 0.05$), 但对自体髂骨组没有明显作用。

2.6 组织学分析结果

2.6.1 脊柱融合评价结果 各组脊柱融合率见图5。G2

组融合率高于其他各组, 但只显著高于G6组($P=0.029$), 其他各组间融合率差异无显著性意义($P > 0.05$)。析因分析显示A和B两因素没有交互作用($F=0.108$, $P=0.898$)。A因素主效应能够显著提高融合率, 为29%($F=5.277$, $P=0.027$); B因素主效应能够提高融合率, 为25%($P=0.06$)。

各组脊柱融合评分见图6。G2组融合评分显著高

于G3, G4和G6组($P < 0.05$), G1组亦显著高于G6组($P=0.008$), 余各组之间比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。析因分析显示A和B两因素之间没有交互作用($F=0.272, P=0.763$)。A因素主效应提高融合评分1.0($F=5.81, P=0.02$), B因素主效应提高融合评分0.96($F=4.206, P=0.022$)。

横突间可见连续骨桥形成, 人工骨周围生成新生骨痂, 并长入人工骨内, 形成骨性相连, 有成熟骨髓腔和骨小梁结构。界面区域内有大量的成骨细胞、软骨细胞存在、骨髓(图7)。人工骨孔隙内由新生骨、纤维组织组成, 可见骨细胞陷窝和骨细胞, 有成熟骨小梁并相互连通, 可见到骨小管, 人工骨变得稀疏, 松散, 边缘模糊(图8), 成骨细胞围绕在新生骨周围, 破骨细胞和软骨细胞少见, 并可见到较多血管长入, 骨样基质沉积在成骨样细胞周围并逐渐钙化, 在人工骨周围和内部可见到多核细胞围绕。G2组人工骨自体骨整合效果最佳, 有连续新生骨小梁长入人工骨孔隙内, 可见到成熟新生骨小梁结构形成的网络, 而且孔内新生骨形成也高于其他人工骨组, 周围骨痂以成熟骨组织为主。G6组新生骨小梁最少, 孔隙内以纤维组织为主, 伴有新生骨形成, 在新生骨边缘可见成骨细胞和破骨细胞围绕, 人工骨周围骨痂纤维组织较多。G3和G5组相对G6组来说, 新生骨增加, 胶原纤维减少, 新生骨与纤维组织的比例在50%左右。人工骨周围包裹的骨痂以软骨为主。

2.6.2 人工骨孔隙内骨长入比 G2组骨长入比最高并显著高于其他各组($P < 0.05$), G6组最低并显著低于G3组($P < 0.05$)和G5组($P=0.054$)。析因分析结果显示A和B因素的主效应分别为10.305和9.865($P=0.001$)(图9)。

2.6.3 人工骨残留率 在新生骨形成的同时伴随着人工骨的降解, IPP软件计算的人工骨残留面积百分率结果显示(图10), G2组人工骨残留率最少为38%, 显著低于G3和G6组($P < 0.05$), 余各组残留率比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。析因分析结果显示, A因素对人工骨降解没有显著促进作用($P=0.13$), B因素能够显著促进人工骨降解($P=0.003$)。

3 讨论 Discussion

3.1 组合磁场+纳米羟基磷灰石涂层对脊柱融合人工骨骨整合的影响 Linovitz 等^[20]多中心临床 RCT 双盲研究组合磁场对无内固定脊柱融合的影响, 术后 9 个月治疗组的融合率为 64%显著高于对照组的 43%($P=0.003$)。Marks^[21]研究显示脉冲电磁场能够显著提高腰椎后外侧

融合率, 促进骨桥形成, 提高临床治疗效果。文章结果显示, 组合磁场治疗能够显著提高纳米羟基磷灰石涂层多孔双相磷酸钙人工骨兔脊柱后外融合率。对触摸法评估结果进行析因分析, 组合磁场治疗能够提高融合率为 23%, B 因素主效应能够提高融合率为 19%, 差异有显著性意义($F=6.747, P=0.011; F=3.513, P=0.034$), 这说明组合磁场治疗和纳米羟基磷灰石涂层能够显著提高脊柱融合率, 组合磁场+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙的能够获得理想的融合率(94%), 显著优于单纯自体髂骨植骨(63%), 甚至较组合磁场+自体髂骨植骨融合效果要好(88%)。校正吸光度指数析因分析结果进一步支持了触摸法融合评估结果, 组合磁场治疗和纳米羟基磷灰石涂层均能够显著提高融合区校正吸光度指数, 说明融合区的骨密度得到了提高, 这表示融合区的新生骨生成量、骨成熟度得到显著增加。Ito 等^[22]的研究表明脉冲电磁场能够提高融合区骨密度, 并且能够降低因内固定引起的压力遮挡。CT 扫描显示在 G2 组人工骨块体周围形成的骨痂显著多于其他人骨植入组, 而且新生骨长入人工骨内部更明显。

这些都说明组合磁场和纳米羟基磷灰石涂层能够显著提高双相磷酸钙人工骨兔腰椎后外侧融合率, 有利于双相磷酸钙与骨整合, 组合磁场治疗促进了人工骨与自体骨整合, 提高了融合率。组合磁场辅助治疗联合纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙移植具有最佳脊柱融合效果, 显著提高了脊柱融合率, 而且显著高于单纯自体髂骨移植。

3.2 组合磁场+纳米羟基磷灰石涂层对脊柱融合区成骨的影响 组合磁场和纳米羟基磷灰石显著提高了脊柱融合评分说明组合磁场和纳米羟基磷灰石涂层能够显著改善融合效果, 有利于新生骨生成和矿化。与其他组相比, G2 组纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙人工骨周围有更多的新生骨痂形成, 与自体骨结合更紧密, 有连续骨桥形成与自体骨形成骨性结合。孔隙内有更多骨长入, 骨长入比最高, 以新生骨为主, 骨小梁成熟度更高。

作者所在课题组前期曾采用低强度脉冲超声波刺激多孔羟基磷灰石块体用于兔脊柱后外侧融合的研究, 结果显示低强度脉冲超声波刺激能够显著促进新生骨形成并长入羟基磷灰石孔隙内, 促进成骨细胞、成软骨细胞迁徙入支架内部^[19], 在使用组合磁场治疗兔髌腱连接点损伤过程发现组合磁场能够促进髌腱连接点修复过程中骨形成, 从而治愈髌腱连接点损伤^[23]。实验结果显示在 G2 组人工骨孔隙内有更多的新生骨小梁长入, 骨小梁成熟度高, 以板层骨为主, 人工骨内部孔隙内新生骨形成明显多于其他人骨组(G3、G5 和 G6 组), 人工骨孔隙内骨长入比结

果显示 G2 组显著高于 G3、G5 组和 G6 组($P=0.002$, 0.002 和 0.000), 而且 G6 组也显著低于 G4 和 G5 组($P=0.039$, $P=0.052$)。析因分析结果显示组合磁场和纳米羟基磷灰石涂层显著提高骨长入比($P=0.001$)。这说明组合磁场和纳米羟基磷灰石涂层都能显著促进新生骨长入人工骨内部孔隙, 促进孔隙内新生骨生成, 而且以组合磁场+纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙效果最好, 这也说明组合磁场改善了人工物的生物相容性和生物活性, 这与 Fini 等^[24-25]的研究结果一致。这些也从 CT 扫描结果得到证实, 在 G2 组周围见到更多的高密度骨痂, 人工骨与自体骨没有低密度缝隙, 而 G3 和 G5 组相对骨痂相对较少, 而 G6 组周围可见到线样低密度缝隙。

从硬组织切片和 CT 扫描看两种人工骨材料都可以见到人工骨降解的表现, 这说明在新生骨形成的同时, 人工骨进行着降解。析因分析结果发现纳米羟基磷灰石涂层能够显著降低人工骨残留率达 12%($P < 0.05$), 而组合磁场只能降低 6%($P > 0.05$), 这说明纳米羟基磷灰石涂层可调节双相磷酸钙人工骨更快的降解, 还不能认为组合磁场有促进人工骨降解的作用, 这样有利于新生骨的爬行替代。

3.3 组合磁场+纳米羟基磷灰石涂层对融合的生物力学的影响 动物实验证明脉冲电磁场能够显著改善生物材料的组织学反应, 提高生物支架生物相容性, 促进自体骨与支架材料骨整合, 提高新生骨形成率, 显著改善骨整合力学性能。Galzer 等^[26]把 10 只新西兰大白兔自体骨后外侧融合融合模型随机分成脉冲电磁场治疗组和对照组。6 周后力学测试表面脉冲电磁场显著提高了脊柱弯曲刚度(35%), 最大弯曲位移(37%)和最大载荷(42%), 融合区新生骨显著增加。此次实验采用三点弯曲实验被认为能够完全确定融合是否成功的检测方法。力学检测结果与 Galzer 实验结果相一致, G2 组脊柱弯曲刚度最高, 显著高于其他各组($P < 0.05$), G5 组也显著高于 G4 和 G6 组($P < 0.05$), G1 组显著高于 G4 组($P < 0.05$)。析因分析显示组合磁场能够显著提高脊柱融合的弯曲刚度 20.41 N/mm ($F=14.12$, $P=0.01$), 骨移植材料因素也能显著提高脊柱融合弯曲刚度达 23.85%($F=16.43$, $P=0.000$)。这说明组合磁场和纳米羟基磷灰石涂层对于提高多孔双相磷酸钙人工骨脊柱融合的力学性能都改善起到显著作用, 两者结合能够显著提高双相磷酸钙人工骨移植脊柱后外侧融合的力学性能, 组合磁场治疗能够显著改善人工骨脊柱融合的力学性能。然而测量的融合区最大弯曲载荷和最大应力与弯曲刚度

结果不一致, G3 组的最大应力和最大弯曲载荷最大, 显著高于其他各组($P < 0.05$); G6 组最大应力和最大弯曲载荷最小, 显著小于其他各组($P < 0.05$); G2 组显著高于 G1, G4 和 G5 组($P < 0.05$), 余各组间比较差异无显著性意义。G1, G4 和 G5 组之间差异无显著性意义($P > 0.05$)。组合磁场治疗组显著提高人工骨组最大应力和最大弯曲载荷($P < 0.05$), 但对自体髂骨没有明显作用。最大弯曲载荷和最大应力与脊柱融合弯曲刚度结果不一致, 这是因为两者测量方法不一致, 弯曲刚度表现的是脊柱的初始刚度, 既在进行弯曲开始形变的前 2 mm 范围内的应力变化, 可准确反映脊柱的融合效果, 而最大弯曲载荷和最大应力则是代表融合区破坏的最大能量, 这不但受融合本身的影响, 而且还受到椎体大小、椎间盘、小关节和韧带等因素的影响, 所以认为弯曲刚度能够才能准确反映脊柱融合效果。

小结: 实验发现制备的多孔纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙人工骨具有良好的生物相容性、生物活性和降解性, 组合磁场和纳米羟基磷灰石涂层都能够促进脊柱融合和改善融合效果, 组合磁场辅助治疗联合纳米羟基磷灰石/双相磷酸钙进行兔脊柱后外侧融合能够显著提高融合率, 融合效果近似、甚至好于单纯的自体移植, 而且组合磁场治疗能够改善人工物的生物活性和生物相容性。

致谢: 感谢张莹博士在材料制作中的无私帮助, 感谢周京泳硕士在动物实验中的帮助。

作者贡献: 第一作者和通讯作者构思并设计、实施实验, 第一作者对文章进行撰写, 通讯作者修改。第二、四、五作者参与实验设计并指导实验实施, 并对文章进行修改, 第四、五、六作者共同分析文献资料。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 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。实验方案中有关动物伦理问题已经中南大学实验动物伦理委员会讨论批准。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者和通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Morone MA, Boden SD. Experimental posterolateral lumbar spinal fusion with a demineralized bone matrix gel. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1998;23(2): 159-167.
- [2] Lobo SE, Glickman R, Da SW, et al. Response of stem cells from different origins to biphasic calcium phosphate bioceramics. *Cell and Tissue Res*. 2015;36(2):477-495.
- [3] Kitayama S, Wong LO, Ma L, et al. Regeneration of rabbit calvarial defects using biphasic calcium phosphate and a strontium hydroxyapatite-containing collagen membrane. *Clin Oral Implants Res*. 2015.
- [4] Fella BH, Gauthier O, Weiss P, et al. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials*. 2008;29(9): 1177-1188.
- [5] Pang KM, Lee JK, Seo YK, et al. Biologic properties of nano-hydroxyapatite: An in vivo study of calvarial defects, ectopic bone formation and bone implantation. *Biomed Mater Eng*. 2015;25(1):25-38.
- [6] Juhasz JA, Best SM, Bonfield W. Preparation of novel bioactive nano-calcium phosphate-hydrogel composites. *Sci Tech Adv Mat* 2010; 11(1):014103.
- [7] Ou KL, Wu J, Lai W, et al. Effects of the nanostructure and nanoporosity on bioactive nanohydroxyapatite/reconstituted collagen by electrodeposition. *J Biomater Res*. 2010;92A(3): 906-912.
- [8] Xiao T, Peng C, Luo Y, et al. [Culture of chondrocytes using nano-hydroxyapatite/collagen in vitro]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2007;32(4): 641-645.
- [9] Venkatesan J, Kim SK. Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering—a review. *J Biomed Nanotechnol*. 2014;10(10):3124-3140.
- [10] Deibert MC, Mcleod BR, Smith SD, et al. Ion resonance electromagnetic field stimulation of fracture healing in rabbits with a fibular osteotomy. *J Orthop Res*. 1994;12(6): 878-885.
- [11] Oishi M, Onesti ST. Electrical bone graft stimulation for spinal fusion: a review. *Neurosurgery*. 2000;47(5): 1041-1055, 1055-1056.
- [12] Linovitz RJ, Pathria M, Bernhardt M, et al. Combined magnetic fields accelerate and increase spine fusion: a double-blind, randomized, placebo controlled study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002;27(13): 1383-1389.
- [13] Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC. An experimental lumbar intertransverse process spinal fusion model. Radiographic, histologic, and biomechanical healing characteristics. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20(4): 412-420.
- [14] Lopez MJ, McIntosh KR, Spencer ND, et al. Acceleration of spinal fusion using syngeneic and allogeneic adult adipose derived stem cells in a rat model. *J Orthop Res*. 2009;27(3): 366-373.
- [15] Huang RC, Khan SN, Sandhu HS, et al. Alendronate inhibits spine fusion in a rat model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(22): 2516-2522.
- [16] Motomiya M, Ito M, Takahata M, et al. Effect of Hydroxyapatite porous characteristics on healing outcomes in rabbit posterolateral spinal fusion model. *Eur Spine J*. 2007;16(12): 2215-2224.
- [17] Qiu QQ, Shih MS, Stock K, et al. Evaluation of DBM/AM composite as a graft substitute for posterolateral lumbar fusion. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;82(1): 239-245.
- [18] Kim DH, Jahng TA, Fu TS, et al. Evaluation of HealosMP52 osteoinductive bone graft for instrumented lumbar intertransverse process fusion in sheep. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004;29(24): 2800-2808.
- [19] Hing KA, Best SM, Tanner KE, et al. Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res A*. 2004;68(1): 187-200.
- [20] Linovitz RJ, Pathria M, Bernhardt M, et al. Combined magnetic fields accelerate and increase spine fusion: a double-blind, randomized, placebo controlled study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002;27(13): 1383-1389, 1389.
- [21] Marks RA. Spine fusion for discogenic low back pain: outcomes in patients treated with or without pulsed electromagnetic field stimulation. *Adv Ther*. 2000;17(2): 57-67.
- [22] Ito M, Fay LA, Ito Y, et al. The effect of pulsed electromagnetic fields on instrumented posterolateral spinal fusion and device-related stress shielding. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1997;22(4): 382-388.
- [23] Hu J, Zhang T, Xu D, et al. Combined magnetic fields accelerate bone-tendon junction injury healing through osteogenesis. *Scand J Med Sci Sports*. 2015;25(3):398-405.
- [24] Fini M, Giavaresi G, Giardino R, et al. Histomorphometric and mechanical analysis of the hydroxyapatite-bone interface after electromagnetic stimulation - An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg*. 2006;88B(1): 123-128.
- [25] Fini M, Cadossi R, Cane V, et al. The effect of pulsed electromagnetic fields on the osteointegration of hydroxyapatite implants in cancellous bone: a morphologic and microstructural in vivo study. *J Orthop Res*. 2002;20(4): 756-763.
- [26] Glazer PA, Heilmann MR, Lotz JC, et al. Use of electromagnetic fields in a spinal fusion. A rabbit model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1997;22(20): 2351-2356.