

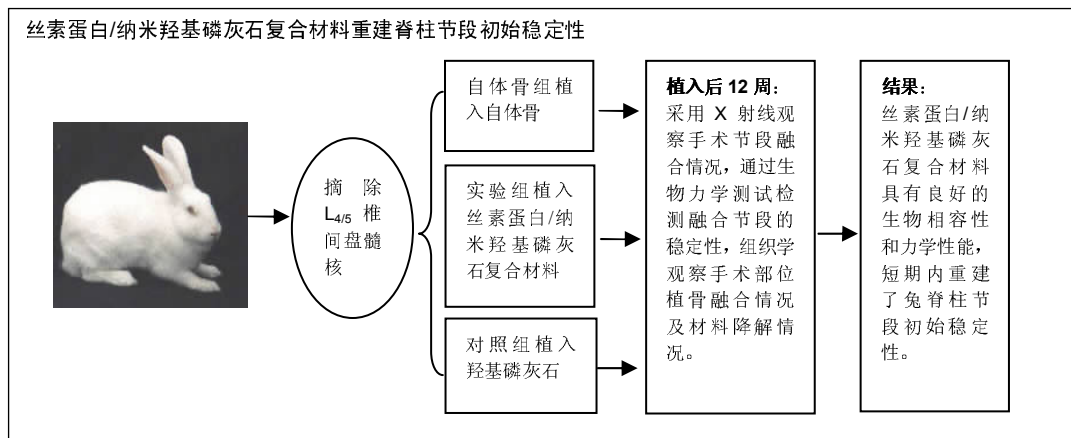
腰椎椎体间植入丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料后的初始稳定性

邓必权, 滕宇, 胡华, 李舰, 江红辉, 张卫国(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院脊柱外科, 湖北省武汉市 430000)
引用本文: 邓必权, 滕宇, 胡华, 李舰, 江红辉, 张卫国. 腰椎椎体间植入丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料后的初始稳定性[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(26):4160-4166.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.26.011

ORCID: 0000-0002-5796-3524(邓必权)

文章快速阅读:



邓必权, 男, 1974 年生, 湖北省武汉市人, 汉族, 博士, 主治医师, 主要从事脊柱外科方面的研究。

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2017)26-04160-07

稿件接受: 2017-04-12

文题释义:

脊柱融合材料: 医学界多采用医学金属材料、高分子材料、医用陶瓷材料, 其中金属材料强度较高, 具有耐腐蚀性、耐磨性等优点, 常用于脊柱融合术, 然而由于其远期移植效果差, 术后不便于进行影像学观察而受到限制; 高分子有机化合物是另一类可降解的高分子生物材料, 因具有良好的机械强度、可控性、生物相容性及降解性, 但该类材料机械强度低, 难以满足骨组织修复的硬度要求; 与此同时, 医用生物陶瓷材料进入公众视野, 羟基磷灰石就是其中之一。羟基磷灰石的理化性质与骨骼、牙齿等硬组织类似, 具有良好生物相容性, 但因其脆性大、可塑性差、降解慢等缺点, 临床应用具有一定局限。

兔腰椎融合模型: 研究表明, 与大动物模型相比, 小动物模型更能够获得丰富的实验数据和信息, 因此更具有参考价值。以往常选择鼠和犬, 然而研究发现鼠的腰椎太小, 与研究使用的复合材料不相符, 而犬的脊柱融合过程与人有着明显区别, 均不是最佳的动物模型。经过反复筛选, 把目标锁定到兔。兔的腰椎解剖与人类最相似且体积小, 便于操作, 能为移植提供足够空间, 其动物模型被大量应用于脊柱融合研究, 且术后此类动物创伤小、恢复快、周期短、植骨融合率高, 因此兔是制备脊柱失稳模型最佳选择。

摘要

背景: 随着纳米技术的发展, 将丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料用于组织修复的报道开始出现, 但鲜见将其用于脊柱稳定性的报道。

目的: 探究丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料重建脊柱节段初始稳定性的可行性。

方法: 将 36 只新西兰兔按随机数字表法分为 3 组, 均摘除 L_{4/5} 椎间盘髓核, 自体骨组在椎间植入自体骨, 实验组植入丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料, 对照组植入羟基磷灰石。植入后 12 周, 采用 X 射线观察手术节段融合情况, 通过生物力学测试检测融合节段的稳定性, 组织学观察手术部位植骨融合情况及材料降解情况。

结果与结论: ①X 射线观察: 自体骨组、实验组及对照组分别有 11, 7, 2 只符合融合标准; ②生物力学测试: 实验组前屈及后伸脊柱活动度明显低于自体骨组和对照组($P < 0.05$); ③组织学观察: 自体骨组髓核和周边组织分界处可见骨性连接, 新骨周边可见大量骨母细胞、纤维母细胞, 内部见编织骨; 实验组材料部分降解, 其周边可见纤维组织, 内部有新生编织骨, 陷窝细胞和骨细胞散在分布; 对照组材料周边可见血管增生, 材料内部有大量巨噬细胞; ④结果表明: 丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料具有良好的生物相容性和力学性能, 短期内重建了兔脊柱节段初始稳定性。

关键词:

生物材料; 骨生物材料; 丝素蛋白; 纳米; 羟基磷灰石; 脊柱节段失稳; 兔; 湖北省自然科学基金

主题词:

丝素蛋白; 羟基磷灰石类; 脊柱融合术; 组织工程

基金资助:

湖北省自然科学基金(2014CFB459)

Deng Bi-quan, M.D.,
Attending physician,
Department of Spine
Surgery, the Central Hospital
of Wuhan, Tongji Medical
College, Huazhong
University of Science and
Technology, Wuhan 430000,
Hubei Province, China

Silk fibroin/nano-hydroxyapatite composite material as a lumbar interbody implant: a study on initial segmental stability

Deng Bi-quan, Teng Yu, Hu Hua, Li Jian, Jiang Hong-hui, Zhang Wei-guo (Department of Spine Surgery, the Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, Hubei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: With the development of nanotechnology, silk fibroin/nano-hydroxyapatite composite materials used for tissue repair have been reported; however, there are few reports on its use in spinal stability.

OBJECTIVE: To explore the feasibility of silk fibroin/nano-hydroxyapatite composite materials for the initial segmental stability of the reconstructed spine.

METHODS: Thirty-six New Zealand rabbits were randomly divided into three groups, and the L_{4/5} nucleus pulposus was removed in all the animals. Autologous bone group was implanted with autologous bone, experimental group implanted intervertebrally with silk fibroin/nano-hydroxyapatite composite material, and control group implanted with hydroxyapatite. At 12 weeks after implantation, lumbar interbody fusion was observed using X-ray, the spinal stability of the fusion segments was measured by biomechanical test, and histologically, bone graft fusion and material degradation at the surgical site were observed.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) X-ray observation: In the autologous bone group, the experimental group and the control group, there were respectively 11, 7, 2 rabbits meeting the standard of fusion. (2) Biomechanical test: The spinal activity during flexion-extension was significantly lower in the experimental group than the autogenous bone group and control group ($P < 0.05$). (3) Histological observation: Bony union was found at the junction between the iliac bone and surrounding tissues in the autologous bone group, and a large number of bone cells and fibroblasts were found around the new bone, while woven bone was found inside. The material was partially degraded in the experimental group, fibrous tissues were visible in the surrounding tissue, new woven bone was found inside, and pit cells and bone cells were scattered. Blood vessel growth around the material was visible in the control group, and a large number of macrophages were found inside the material. To conclude, the silk fibroin/nano-hydroxyapatite composite material has good biocompatibility and mechanical properties, which could rebuild the initial segmental stability in the rabbit spine in the short time.

Subject headings: Silk; Hydroxyapatites; Spinal Fusion; Tissue Engineering

Funding: the Natural Science Foundation of Hubei Province in 2014, No. 2014CFB459

Cite this article: Deng BQ, Teng Y, Hu H, Li J, Jiang HH, Zhang WG. Silk fibroin/nano-hydroxyapatite composite material as a lumbar interbody implant: a study on initial segmental stability. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(26):4160-4166.

0 引言 Introduction

近年来, 由于脊柱畸形、创伤、感染等原因, 脊柱失稳的发病率逐年上升, 给患者带来严重的困扰^[1]。而内固定的采用虽为脊柱短期稳定提供了一定支撑, 但脊柱长期稳定离不开骨性融合^[2]。目前, 脊柱节段失稳的治疗常实施脊柱融合^[3], 一直以来, 自体骨被认为是最理想的脊柱融合材料, 但其来源有限, 加之易给患者自身带来取骨部位的创伤, 导致神经损伤、创面感染等, 其临床应用受到一定制约。异体骨作为脊柱融合材料的选择之一, 虽弥补了自体骨的部分不足, 但仍存在排斥反应、传播疾病的隐形风险。因此, 迫切需要寻找性能优良的人工骨移植修复材料作为自体骨的替代物。现有的用于骨组织修复的材料包含金属材料、高分子材料、生物陶瓷材料等^[4-6]。随着生物降解材料在医学领域的广泛应用及对生物力学研究的深入, 传统的单一材料因作用局限其弊端日益显现, 难以满足临床需要。因此, 开发出具有良好生物学性能的复合材料, 成为近年来的研究热点^[7]。国内外学者把焦点分别集中到以丝素蛋白和羟基磷灰石为代表的生物可降解材料^[8-9]。随着纳米技术的发展, 在生物医学领域制备丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料用于组织修复的报道开始出现^[10], 但鲜见有其用于脊柱稳定性的报道且大多文献仅从生物学角度进行探索, 研究不够

全面。基于此, 研究首先制备兔脊柱节段失稳模型, 然后植入丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料, 再通过大体标本、影像学、病理学、生物力学测试全面观察手术节段间的融合情况, 探究丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料重建脊柱节段初始稳定性的可行性, 旨在为临床脊柱失稳的治疗提供新的思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 动物对比观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年1至9月在华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院实验室完成。

1.3 材料 羟基磷灰石(上海源叶生物); 纳米羟基磷灰石(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院实验室自行制备); 桑蚕茧(四川南充市丝绸有限公司); 所用试剂和溶液由华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院实验室提供。

实验动物: 健康4月龄清洁级新西兰兔36只, 雌雄不拘, 体质量(2.8±0.2)kg, 由中国科学院上海实验动物中心提供, 许可证号: SYXK(沪)2016-0003。将上述实验动物按照随机数字表法分为自体骨组、实验组和对照组, 每组12只, 予以不同干预措施。为避免误差, 所有手术操作均由同一个实验人员执行。

1.4 实验方法

1.4.1 复合支架材料的制备 室温环境下,在纳米羟基磷灰石中滴加去离子水,超声处理后,将2%丝素蛋白溶液滴加其中,之后加入0.05%戊二醛交联剂,再次超声振荡后,将混合液置于本实验室特制的直径为5 mm、高10 mm的圆柱状模具,放于低温冰箱冷冻,经干燥获得丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合支架材料(两者比例为1:2),经环氧乙烷灭菌后,冷冻储藏备用。

1.4.2 复合支架材料的表征 将少量丝素蛋白/纳米羟基磷灰石和羟基磷灰石分别进行透射电镜观察,对比两组材料的异同。

1.4.3 模型制备及分组干预 动物单笼饲养1周,待环境适应良好伺机手术。术前24 h禁食禁水,采用20%乌拉坦经耳缘静脉麻醉(5 kg/mL)。待麻醉显效后,俯卧位固定,腰背部去毛备皮,消毒,以L₄、L₅棘突为中心于后正中逐层切开皮肤、筋膜及皮下组织并游离至两侧。切开浅层肌肉,用器械分开深层肌间隙,暴露两侧髂嵴连线以上椎间盘。确定L₄、L₅腰椎间隙后,用器械去掉椎间盘组织,同时用骨刀刮除相邻椎体的软骨终板,以骨质微渗血为度。自体骨组用骨刀凿取左侧髂骨骨块(4 mm×3 mm×2 mm),植入椎间隙;实验组植入丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料进行椎间融合;对照组植入单纯羟基磷灰石进行椎间融合。所有手术动物被逐层缝合肌肉、筋膜和皮肤。术后隔日换药,分笼单独饲养,减少活动。为预防伤口感染,所有实验动物在术后肌注青霉素80×10⁴ U/d,连注3 d。

1.4.4 术后一般情况及大体观察 观察动物术后伤口愈合情况、感染数、死亡数,动物饮食、活动状态等。处死后取材,观察周围是否有纤维囊,检查植入材料的硬度,观察标本植骨区骨小梁长入情况。

1.5 主要观察指标

影像学检查: 植入后 8, 12周,采用国产500 mA光机(上海泰益医疗仪器设备有限公司)摄取实验动物侧卧位X射线片(技术参数: 45 kV, 80 mA, 0.08 s),观察手术节段融合情况。由2名骨科大夫参照Tian等^[11]制定标准进行盲法阅片评估,当放射学评分≥3分时被认为坚固融合。

生物力学测试: 植入后12周,所有实验动物行空气栓塞处死后立即取材,采集实验节段的标本与相邻椎体,剔除皮肤、肌肉、脂肪等附属组织,制备完整的腰椎标本。用脊椎三维运动试验机(台湾智泰精密仪器有限公司)对其进行生物力学测试。用Image J软件处理图像,计算出标本的三维运动范围,具体数值用脊柱活动度表示。

组织学观察: 植入后12周,采集的标本先行手触检测后予以剪碎,置于40 g/L多聚甲醛固定72 h, 20%甲酸脱钙,石蜡包埋、4 μm切片,行苏木精-伊红染色,在光学显微镜下观察组织形态学变化。利用观察到的典型图片作为代表,以显微镜视野里接近典型图片表现的80%作为阳

性例数进行半定量分析。

1.6 统计学分析 采用SPSS 21.0统计分析软件进行数据分析。计量资料比较使用方差分析,两两比较采用 t 检验,计数资料比较采用卡方检验。所有结果均以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 复合支架材料的表征 图1是在投射电镜下拍摄的典型羟基磷灰石和丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料照片,两者之间在形状上差别很大,前者呈棒状,长度和宽度分别在200 nm和50 nm左右;复合材料呈束状纳米纤维,长度和宽度分别在300 nm和20 nm左右。

2.2 术后动物一般情况及大体观察 实验动物当日清醒,术后正常进食进水,精神状态良好。1只因术中麻醉药过敏致死,1只因失血过多死亡,均于术后补充完整。

植入后观察12周,所有存活动物伤口恢复良好,未出现神经损伤、出血、红肿、渗出及感染等术后并发症。3组标本重点观察融合部位,质地均较硬,其中自体骨组可见大量骨小梁长入,有骨连接;实验组材料与周围肌肉组织结合紧密,有融合迹象,可见部分骨小梁长入,已形成骨连接;对照组有少量骨小梁长入,骨性连接不坚固。

2.3 动物实验影像学检查结果 如图2所示:①自体骨组:植入后第8周,L₄、L₅椎体与髂骨植骨块分界处有少量骨小梁长入,到12周时,分界处有大量骨小梁长入,密度较前增高,X射线评估有11只符合融合标准;②实验组:植入后第8周,L₄、L₅椎体与丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料分界处可见部分骨小梁长入,12周时骨小梁较前增多,X射线评估有7只符合融合标准;③对照组:植入后第8周,L₄、L₅椎体与单纯羟基磷灰石分界处可见少量骨小梁长入,12周时骨小梁较前稍增多,X射线检测有2只评定为融合,见表1。

2.4 动物实验生物力学测试结果 植入后12周,通过对两组手术节段的脊柱三维非破坏性生物力学试验,结果显示,3组总体比较差异有显著性意义,其中,实验组、对照组前屈、后伸的脊柱活动度值均小于自体骨组,但仅实验组与自体骨组比较差异有显著性意义($P < 0.05$);实验组脊柱活动度值低于比对照组($P < 0.05$),见表2。

2.5 动物实验组织学观察结果 图3为植入后12周时,各组在光学显微镜下组织学观察到的典型图片代表(由于在第8周时,各个组别的病理图片区分度不多,所以组织学展示的是12周各组病理图片),自体骨组髂骨和周边组织分界处可见骨性连接,新骨周边可见大量骨母细胞,表面亦可见纤维母细胞,内部见编织骨;实验组材料部分降解,其周边可见纤维组织,内部有新生编织骨,陷窝细胞和骨细胞散在分布;对照组材料周边可见血管增生,材料内部有大量巨噬细胞;其中自体骨组中接近图3A病理类型改变的有10只,实验组中接近图3B病理类型改变的有8只,对照组中接近图3C病理改变的有9只。

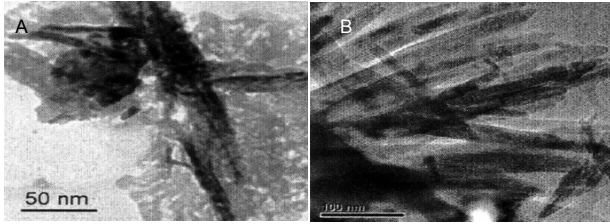


图 1 透射电镜观察羟基磷灰石与丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料($\times 2\,000$)

Figure 1 Silk fibroin/nano-hydroxyapatite under transmission electron microscope ($\times 2\,000$)

图注: 图中 A 为羟基磷灰石, 呈棒状, 长度和宽度分别在 200 nm 和 50 nm 左右; B 为丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料, 呈束状纳米纤维, 长度和宽度分别在 300 nm 和 20 nm 左右。

表 1 各组植入后 12 周融合情况放射学评分
Table 1 Radiological scoring of spinal fusion at 12 weeks after implantation

组别	样本	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
自体骨组	12	0	0	1	1	10
实验组	12	0	1	2	3	4
对照组	12	7 ^a	2	1	1	1

表注: 与其余两组比较, ^a $P < 0.05$ 。

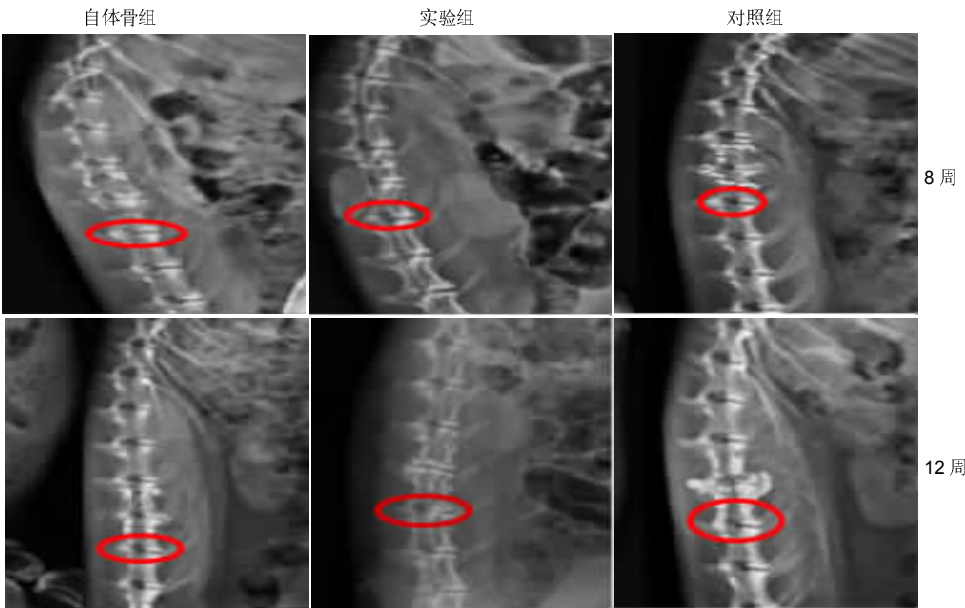


图 2 各组植入后不同时间点的手术节段 X 射线影像

Figure 2 X-ray images of the surgical segments at different time after implantation

图注: 自体骨组植入后第 8 周, L₄、L₅ 椎体与肋骨植骨块分界处有少量骨小梁长入, 到 12 周时, 分界处有大量骨小梁长入, 密度较前增高; 实验组植入后第 8 周, L₄、L₅ 椎体与丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料分界处可见部分骨小梁长入, 12 周时骨小梁较前增多; 对照组植入后第 8 周, L₄、L₅ 椎体与单纯羟基磷灰石分界处可见少量骨小梁长入, 12 周时骨小梁较前稍增多。红圈指示手术节段。

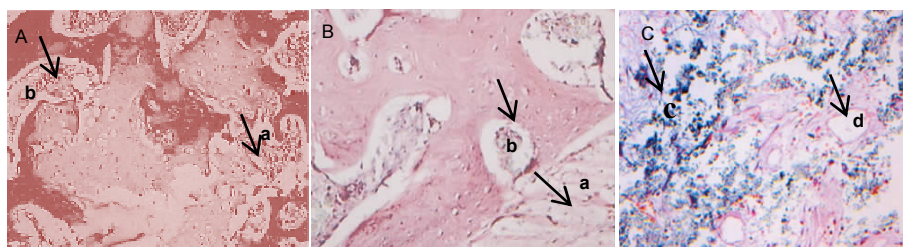


图 3 各组植入后 12 周手术节段组织学观察结果(苏木精-伊红染色, $\times 200$)

Figure 3 Histological observation of the surgical segment at 12 weeks after implantation (hematoxylin-eosin staining, $\times 200$)

图注: 图中 A 为自体骨组, 肋骨和周边组织分界处可见骨性连接, 新骨周边可见大量骨母细胞, 表面亦可可见纤维母细胞, 内部见编织骨; B 为实验组, 材料部分降解, 其周边可见纤维组织, 内部有新生编织骨, 陷窝细胞和骨细胞散在分布; C 为对照组, 材料周边可见血管增生, 材料内部有大量巨噬细胞。a 显示纤维母细胞, b 显示编织骨, c 显示巨噬细胞, d 显示血管。

表 2 各组植入后 12 周生物力学测试结果 ($\bar{x} \pm s$, °)

Table 2 Biomechanical testing of the spine at 12 weeks after implantation

组别	前屈	后伸
自体骨组	12.23 $\pm$ 0.90	14.24 $\pm$ 0.87
实验组	9.01 $\pm$ 0.12 ^a	8.05 $\pm$ 0.25 ^a
对照组	11.84 $\pm$ 0.51	13.18 $\pm$ 0.93

表注: 与其余两组比较, ^a $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

脊柱节段要维持稳定性需要依靠良好的脊柱功能单位^[12-14]。在正常生理条件下脊柱运动节段在外力作用下可产生相应部分的变形, 并产生正常的生理活动。当脊柱运动节段出现病变时, 在生理状态下也会出现异常活动^[15-16]。从生物力学的角度看, 脊柱退行性疾病的进程就是脊柱稳定性逐渐丧失的过程, 随着对本病发病特点的深入了解, 人们逐渐意识到实施脊柱融合在重建脊柱稳定

中的重要性。脊柱融合治疗脊柱不稳疗效显著, 得益于其能以病变椎体为切入点, 在相邻的上、下位椎体间, 借助骨的生长力量使多个节段的椎体发生融合, 从而构建一个力学整体, 达到维持脊柱序列的稳定性的目的^[17]。

长期以来, 医学界多采用医学金属材料、高分子材料、医用陶瓷材料作为脊柱融合材料。其中金属材料强度较高, 具有耐腐蚀性、耐磨性等优点, 常用于脊柱融合, 然而由于其远期移植效果差, 术后不便于进行影像学观察而受到限制^[18]。高分子有机化合物是另一类可降解的高分子生物材料, 因具有良好的机械强度、可控性、生物相容性及降解性, 被广泛应用于组织工程领域^[19], 但该类材料机械强度低, 难以满足骨组织修复的硬度要求。与此同时, 医用生物陶瓷材料进入公众视野, 羟基磷灰石就是其中之一。羟基磷灰石的理化性质与骨骼、牙齿等硬组织类似, 具有良好生物相容性, 但因其脆性大、可塑性差、降解慢等缺点, 临床应用具有一定局限。而纳米羟基磷灰石因结构改良, 拥有纳米级结构的表面效应和界面效应, 其生物相容性、强度、硬度、韧性和可塑性均可得到明显提升^[20]。

理想的人工骨移植修复材料应该具有良好的生物相容性; 能降解, 可控制降解速度; 拥有一定机械强度及韧性; 容易加工, 可塑形强^[21-23]。当前, 单一材料难以达到上述要求, 因此, 利用不同特点的单一材料制作出力学性能、理化性质等方面模拟人体骨组织的复合生物材料已成为一种趋势^[24-25]。有研究等将成年家兔制备骨缺损模型随机均分为两组, 实验组于骨缺损处植入纳米羟基磷灰石/丝素蛋白复合人工骨材料, 对照组于骨缺损处植入单纯羟基磷灰石, 分别在植入后不同时间取材, 进行生物学和生物力学检查, 结果表明纳米羟基磷灰石/丝素蛋白复合人工骨材料优于单纯羟基磷灰石^[26]。由此可见复合生物材料具备单一组分材料所不具备的新功能, 因此其在硬组织修复领域占有一席之地。

蚕丝作为一种有中国特色的优势原料, 来源充足, 成本低廉, 具有强大的骨修复潜力, 近年来备受学者关注^[27]。蚕丝主要成分是丝素蛋白, 该成分提取简单, 性能与骨骼的胶原蛋白雷同却无免疫原性, 具有良好的生物相容性和骨诱导性^[28]。另外, 丝素蛋白可作为无机物矿化的平台, 诱导无机离子附着并控制无机晶体的形态和大小^[29]。即便如此, 丝素蛋白单独作为骨修复材料时, 因机械强度差作用受到限制^[30]。

既往经验表明, 羟基磷灰石与丝素蛋白具有较强的亲和力, 能附着在丝素蛋白上^[10, 31-39]。因此, 将丝素蛋白与纳米羟基磷灰石复合起来用于脊柱融合的骨移植修复, 显示出良好的应用前景。羟基可影响羟基磷灰石晶体的自组装趋向。而丝素蛋白是一种线性的含有氨基酸多肽, 该结构其主要链含有大量的羰基, 为钙离子的结合可提供潜在的结合位点。当丝素蛋白纤维溶解在氯化钙、水和乙醇溶液中时, 可提供更多的自由羰基基位点, 因此, 钙离子可与丝素蛋白

上的羟基结合, 形成钙离子-丝素蛋白复合物。基于此, 研究通过共沉淀的方法成功制备了丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料, 结果发现复合材料组呈束状纳米纤维, 长度和宽度分别在300 nm和20 nm左右, 与天然骨组织中的磷灰石晶体相似, 从结构和功能上极大程度地模拟天然骨组织。

随着生物工程学的迅猛发展及新植骨融合材料的大量出现, 脊柱动物模型发挥的作用日益凸显^[40-42]。国内外学者尝试制作不同脊柱融合动物模型对植骨材料的生物学及力学性能进行探究。研究表明, 与大动物模型相比, 小动物模型更能够获得丰富的实验数据和信息, 因此更具有参考价值^[43]。以往的动物实验常选择鼠和犬, 然而研究发现, 鼠的腰椎太小, 与此次研究使用的复合材料不相符; 而犬的脊柱融合过程与人有着明显区别, 均不是最佳的动物模型。经过反复筛选, 把目标锁定到兔。兔的腰椎解剖与人类最相似且体积小, 便于操作, 兔脊柱解剖特点能为移植物提供足够空间, 其动物模型被大量应用于脊柱融合研究, 且术后此类动物创伤小、恢复快、周期短、植骨融合率高, 因此兔是制备脊柱失稳模型最佳选择^[44]。在接下来的实验中, 研究以新西兰兔为研究对象, 从大体、影像学、病理学、生物力学角度全方位探究丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料重建脊柱节段的初始稳定性。

对于脊柱融合相关实验, 拍摄X射线平片简单易行, 此法特异性高, 价格便宜, 患者易于接受, 是术后评价骨折愈合情况的重要辅助手段, 因此备受医患双方推崇^[45-47]。然而, 单次X射线片很难对脊柱融合效果进行客观评价, 通常在脊柱融合后的6-12周内, 经过多次拍摄X射线正侧位片就可清晰地观察植骨融合变化过程^[48]。在研究中, 植入后在8, 12周行X射线检查观察复合材料与椎体的融合情况, 通过骨小梁的多少即可判定骨融合程度。研究X射线检查结果显示, 第8周时, 与自体骨组相比, 实验组和对照组植入材料与L₄、L₅椎体的分界处均有骨小梁长入, 充分显示了两种生物材料的生物相容性, 但对照组的骨小梁比实验组少, 提示对照组单纯羟基磷灰石植入材料的骨诱导能力略逊于实验组的复合材料。随着时间的推移, 到第12周时, 两种材料与椎体间分界处的骨小梁较前均有增多, 显示了两种生物材料均具有诱导骨细胞增殖的能力。经X射线评定, 自体骨组骨融合能力最强, 作为检验植骨材料骨融合能力的金标准, 共11只符合融合标准。其他两种材料与之相比, 实验组符合融合标准的有7只, 而对照组仅有2只, 上述结果再次表明复合生物材料的生物学性能优于单一生物材料, 与大体标本所观察到的结果是一致的。

脊椎稳定性指在正常生理状态不出现过活动及移位, 脊柱活动度数值越小代表稳定性越好。值得注意的是, 植入后12周时, 通过对手术节段的脊柱三维非破坏性生物力学试验, 结果显示3组总体比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 两两比较后发现, 对照组脊柱活动度值虽低于自体骨组, 但并无统计学意义, 显示该组力学性能改善不明显;

实验组脊柱活动度值低于比自体骨组和对照组($P < 0.05$),再次佐证了复合材料力学性能优于单一生物材料的报道。

另据文献报道,在骨髓血流经部位存在骨细胞及软骨细胞^[49]。据此规律,实验在制备兔脊柱失稳模型时,刻意用小勺搔刮椎体终板至渗血状,植入与椎体大小相吻合的生物支架材料,在第12周观察椎间隙细胞组织学变化,对照组大部分病理结果表明,单一材料周边可见血管增生,显示了一定的骨传导功能,但材料内部有大量巨噬细胞,表明单纯羟基磷灰石被机体当作一种异物被吞噬,生物相容性相对较差。实验组复合支架材料部分降解,其周边可见纤维组织,内部有新生编织骨,陷窝细胞和骨细胞散在分布,可见复合材料植入体内后作为骨诱导因子的载体发挥其骨传导作用显,其生物相容性及骨诱导性明显优于单一羟基磷灰石组,与孙庆治^[50]的报道是相符的。尽管如此,复合支架材料内部并未见成熟骨组织等形成,与自体骨组内外组织学环境相比,其成骨能力有待提高。

综上所述,通过12周的动物实验,发现丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料的生物学性能与自体骨移植相当,显著优于单一羟基磷灰石,具有良好的生物相容性、骨传导性和骨诱导性。然而,两组生物材料于植入后12周见仍可见材料残留,提示材料降解速率与新骨形成不同步。因此,在后续的研究中需进一步优化生物支架材料的生物学和力学性能,缩短与自体骨的差距,旨在成为理想的骨移植替代物。

作者贡献: 邓必权进行实验设计,实验实施为滕宇,实验评估为胡华、李舰,资料收集为江红辉、邓必权,张卫国成文,李舰审核。

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: 实验方案经华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院动物实验伦理委员会批准,批准号为 20160467。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

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审核,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 邓必权对于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(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。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,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。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] Chen Y,Wang X,Chen D,et al.Posterior hybrid technique for ossification of the posterior longitudinal ligament associated with segmental instability in the cervical spine.J Spinal Disord Tech.2014;27(4):240-244.

[2] Barz T,Melloh M,Lord SJ,et al.A Conceptual Model of Compensation/Decompensation in Lumbar Segmental Instability. Med Hypotheses.2014;83(3):312-316.

[3] 费琦,赵凡,杨雍,等.腰椎后路融合手术对失稳模型节段稳定性及相邻节段力学的影响[J].中华医学杂志,2015,95(45):3681-3686.

[4] Li H,Sun S,Liu H,et al.Use of a biological reactor and platelet-rich plasma for the construction of tissue-engineered boneto repair articular cartilage defects.Exp Ther Med. 2016;12(2):711-719.

[5] Janson IA,Putnam A J.Extracellular matrix elasticity and topography: material-based cues that affect cell function via conserved mechanisms.J Biomed Mater Res A.2015;103(3):1246-1258.

[6] Bianchi M,Urquia Edreira ER,Wolke JG,et al.Substrate geometry directs the in vitro mineralization of calcium phosphate ceramics.Acta Biomater.2014;10(2):661-669.

[7] 张琦,浦益琼,王冰,等.羟基磷灰石复合材料制备技术的研究进展[J].中成药,2015,37(12):2722-2725.

[8] 李浩,曹呈斌,杨惠林,等.丝素蛋白/羟基磷灰石复合物对磷酸钙骨水泥性能的影响[J].现代生物医学进展,2013,13(33):6435-6439.

[9] Shokrollahi P,Mehmanchi M,Atai M,et al.Effect of interface on mechanical properties and biodegradation of PCL HAp supramolecular nano-composites.J Mater Sci Mater Med. 2014;25(1):23-35.

[10] 唐俊杰,李文杰,李根,等.骨组织工程诱导性支架材料修复骨缺损[J].中国组织工程研究,2015,19(3):340-346.

[11] Tian X,Zhu G,Wang J,et al.Study on the relation between tissues pathologies and traditional chinese medicine syndromes in knee osteoarthritis:Medical image diagnostics by preoperative X-ray and surgical arthroscopy.J Xray Sci Technol.2016;24(4):509-519.

[12] Byvaltsev VA,Kalinin AA,Belykh EG,et al.Optimization of segmental lumbar spine instability treatment using minimally invasive spinal fusion technique.Zh Vopr Neurokhir Im N N Burdenko.2015;79(3):45-54.

[13] Ploumis A,Christodoulou P,Kapoutsis D,et al.Surgical treatment of lumbar spinal stenosis with microdecompression and interspinous distraction device insertion.A case series.J Orthop Surg Res.2012;(7):35.

[14] Samadian M,Hosseinzadeh Bakhtevvari M,Jahangiri Babadi A,et al.Congenital Posterior Spinal Agenesis Leads to L2-L3 Instability: a Case Report and Review of the Literature.Arch Iran Med.2015;8(12):861-864.

[15] 刘晓光.不稳定型脊柱骨折脱位的内固定技术及进展[J].中国骨伤,2014,27(2):89-91.

[16] 嘉士健,黄翠华,雷行华,等.针刀配合脊椎平衡手法康复训练治疗下颈椎不稳症临床观察[J].中国中医急症,2015,24(10):1829-1831.

[17] 封亚平,章翔,封雨.加强脊髓脊柱术后不稳与重建研究[J].中华神经外科疾病研究杂志,2013,12(2):97-100.

[18] Pound BG.Passive films on metallic biomaterials under simulated physiological conditions.J Biomed Mater Res A.2014;102(5):1595-1604.

[19] Bing W,Dong J,Li Q,et al.Mechanism of inhibition on L929 rat fibroblasts proliferation induced by potential adhesion barrier material poly(p-dioxanone-co-l-phenylalanine) electrospun membranes[J].J Biomed Mater Res A. 2014;102(11):4062-4070.

- [20] Paşcu EI, Stokes J, McGuinness GB, McGuinness. Electrospun composites of PHBV, silk fibroin and nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(8):4905-4916.
- [21] 侯立刚, 杨建义. 骨修复中应用的生物降解可吸收材料[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(3):441-445.
- [22] 贾世双, 张堃, 李双. 股骨颈并股骨干骨折的修复: 骨移植与组织及细胞移植效果评价[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(21): 3424-3428.
- [23] 邢麟子, 桂鉴超, 徐燕, 等. 微骨折技术结合自体骨软骨碎屑移植修复兔膝关节软骨缺损的实验研究[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2012, 14(5):424-428.
- [24] 王凤玲. SPIO标记细胞磁靶向移植修复关节软骨缺损可行性的初步研究[D]. 第三军医大学, 2013.
- [25] 李练兵, 张其清, 侯志伟, 等. 复合人工骨材料对骨形成影响的实验研究[J]. *北京生物医学工程*, 2014, 33(3):240-246.
- [26] 马立坤, 叶鹏, 邓江, 等. 丝素蛋白/壳聚糖/纳米羟基磷灰石骨组织工程支架材料的体外细胞毒性评价[J]. *西部医学*, 2014, 26(8): 975-977, 980.
- [27] 帅亚俊, 张璨, 邓连霞, 等. 矿化柞蚕丝胶膜表面粗糙度的调控及其对骨髓间充质干细胞生长行为的影响[J]. *复合材料学报*, 2015, 32(5):1527-1535.
- [28] Zhu M, Kai W, Mei J, et al. Fabrication of highly interconnected porous silk fibroin scaffolds for potential use as vascular grafts. *Acta Biomater*. 2014;10(5):2014-2023.
- [29] Hofmann S, Stok K S, Kohler T, et al. Effect of sterilization on structural and material properties of 3-D silk fibroin scaffolds. *Acta Biomaterialia*. 2014;10(1):308-317.
- [30] Lai GJ, Shalumon KT, Chen SH, et al. Composite chitosan/silk fibroin nanofibers for modulation of osteogenic differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells. *Carbohydr Polym*. 2014;111(11):288-297.
- [31] Niu B, Li B, Gu Y, et al. In vitro evaluation of electrospun silk fibroin/nano-hydroxyapatite/BMP-2 scaffolds for bone regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2017;28(3):257-270.
- [32] Le TD, Liaudanskaya V, Bonani W, et al. Enhancing bioactive properties of silk fibroin with diatom particles for bone tissue engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016. doi: 10.1002/term.2373. [Epub ahead of print]
- [33] Yao MZ, Huang-Fu MY, Liu HN, et al. Fabrication and characterization of drug-loaded nano-hydroxyapatite/polyamide 66 scaffolds modified with carbon nanotubes and silk fibroin. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:6181-6194.
- [34] Ran J, Hu J, Sun G, et al. A novel chitosan-tussah silk fibroin/nano-hydroxyapatite composite bone scaffold platform with tunable mechanical strength in a wide range. *Int J Biol Macromol*. 2016;93(Pt A):87-97.
- [35] Ding Z, Fan Z, Huang X, et al. Silk-Hydroxyapatite Nanoscale Scaffolds with Programmable Growth Factor Delivery for Bone Repair. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(37): 24463-24470.
- [36] Hu JX, Ran JB, Chen S, et al. Carboxylated Agarose (CA)-Silk Fibroin (SF) Dual Confluent Matrices Containing Oriented Hydroxyapatite (HA) Crystals: Biomimetic Organic/Inorganic Composites for Tibia Repair. *Biomacromolecules*. 2016; 17(7):2437-2447.
- [37] Wu J, Liu J, Shi Y, et al. Rheological, mechanical and degradable properties of injectable chitosan/silk fibroin/hydroxyapatite/glycerophosphate hydrogels. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016;64:161-172.
- [38] Bhattacharjee P, Naskar D, Maiti TK, et al. Non-mulberry silk fibroin grafted poly (ε-caprolactone)/nano hydroxyapatite nanofibrous scaffold for dual growth factor delivery to promote bone regeneration. *J Colloid Interface Sci*. 2016;472:16-33.
- [39] Sinlapabodin S, Amornsudthiwat P, Damrongsakul S, et al. An axial distribution of seeding, proliferation, and osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells and rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells across a 3D Thai silk fibroin/gelatin/hydroxyapatite scaffold in a perfusion bioreactor. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;58:960-970.
- [40] 王海莹, 张旭, 丁文元, 等. 椎间盘退变动物模型的研究进展[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2015, 25(3):279-282.
- [41] 钟锐, 刘少喻. 腰椎间盘退变动物模型构建的研究进展[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(7):1760-1762.
- [42] 王鹏. 骨质疏松大鼠脊柱融合后邻近节段椎间盘退变的实验性研究[D]. 河北联合大学, 2015.
- [43] 杨泽雨, 杨欣建, 陈扬, 等. 新型3D打印多孔钛人工椎体在猪脊柱模型置换前后的生物力学测试研究[J]. *生物骨科材料与临床研究*, 2016, 13(1):7-9.
- [44] 牛伟民, 于德水, 李名武, 等. 椎体间纤维性融合重建兔脊柱稳定性的初步探索[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2012, 22(12):1108-1112.
- [45] 杨洋, 黎庆初, 朱召银, 等. 双节段前路颈椎自锁式融合器融合术后矢状位影像学参数的变化[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2016, 26(2): 116-123.
- [46] 谭海涛, 孟志斌, 黄涛, 等. 三点稳定式脊柱融合技术效果的动物实验研究[J]. *临床医学工程*, 2014, 21(3):278-280.
- [47] 张春霖, 王若愚, 李莹, 等. 腰椎失稳症患者腰椎间隙X线解剖分型及其临床意义[J]. *中华解剖与临床杂志*, 2015, 20(6):488-493.
- [48] 吕厚辰, 唐佩福. 骨组织形态及微观结构的影像学评价及进展[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2016, 9(1):68-74.
- [49] 江祖忻, 谭波, 代辉, 等. 骨髓间充质干细胞和软骨细胞共培养在组织工程化软骨中的研究进展[J]. *实用医院临床杂志*, 2014, 11(1): 188-190.
- [50] 孙庆治. 纳米羟基磷灰石/丝素蛋白人工骨修复骨缺损[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(8):1190-1194.