

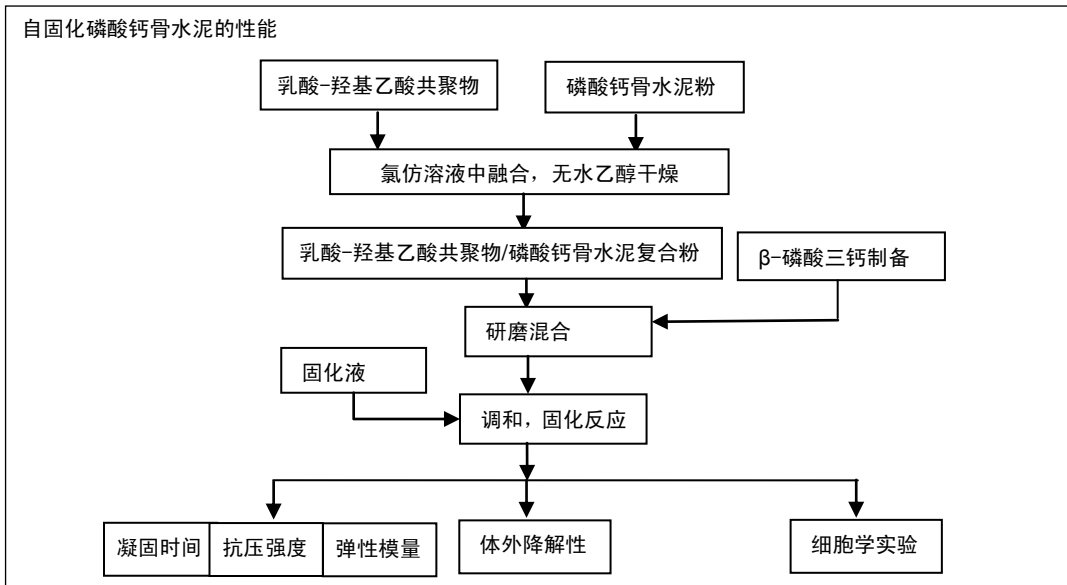
自固化磷酸钙骨水泥的制备及其性能评估

王剑龙¹, 何由², 程哲², 郑治¹, 朱凯迪³ (¹中南大学湘雅三医院骨科, 湖南省长沙市 410000; ²中南大学湘雅医学院, 湖南省长沙市 410000; ³湖南航天医院, 湖南省长沙市 410000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0851

ORCID: 0000-0002-1577-7758(朱凯迪)

文章快速阅读:



王剑龙, 男, 1972年生, 汉族, 2004年中南大学湘雅医学院毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事骨组织工程及脊髓损伤研究。

通讯作者: 朱凯迪, 硕士, 湖南航天医院, 湖南省长沙市 410000

中图分类号:R318

文献标识码:A

稿件接受: 2018-02-01



文题释义:

自固化磷酸钙骨水泥: 按照固相组成的 Ca/P 比可归纳为以下几类: ①磷酸氢钙(DCPD 或 DCPA)型, 其固相组成的 Ca/P 比为 1.0; ②磷酸八钙型, 其固相组成的 Ca/P 比为 1.33; ③缺钙型羟基磷灰石型其固相组成的 Ca/P 比为 1.5; ④羟基磷灰石型, 其固相组成的 Ca/P 比为 1.67。随着对磷酸钙骨水泥的研究越来越多, 其存在着脆性大、力学性能相对不足及降解速度较慢, 不能与新骨生成速率相适应等问题受到关注。

摘要

背景: 前期研究发现, 乳酸-羟基乙酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)可改善磷酸钙骨水泥的抗压强度与降解性能。

目的: 在前期研究的基础上制备具有更好力学性能、生物相容性及降解性的自固化磷酸钙骨水泥。

方法: 采用液相沉淀法制备乳酸-羟基乙酸共聚物/β-磷酸三钙/磷酸钙骨水泥, 使复合骨水泥中 β-磷酸三钙的含量分别为 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 检测复合骨水泥及磷酸钙骨水泥的凝固时间、抗压强度、弹性模量及降解性能, 筛选最佳 β-磷酸三钙含量, 进行细胞培养实验。分别以磷酸钙骨水泥浸提液(对照组)、PLGA/β-磷酸三钙/磷酸钙骨水泥浸提液(实验组)、含有体积分数 10%胎牛血清及 1%青霉素-链霉素双抗的 α-MEM 培养基(阴性对照组)、含体积分数 6.4%苯酚的液体(阳性对照组)培养 MC3T3-E1 细胞, 培养 1, 3, 5 d, MTT 法检测细胞增殖, 同时观察细胞形态变化; 培养 1, 3 d, 检测培养液中乳酸脱氢酶活性。在 PLGA/β-磷酸三钙/磷酸钙骨水泥与磷酸钙骨水泥表面接种 MC3T3-E1 细胞, 3 d 后进行扫描电镜观察。

结果与结论: ①随着 β-磷酸三钙含量的增加, 复合骨水泥的初凝时间、终凝时间均有所增加, 与磷酸钙骨水泥初凝时间、终凝时间比较无差异($P > 0.05$); ②复合骨水泥的抗压强度及弹性模量均高于磷酸钙骨水泥, 其中以 β-磷酸三钙含量为 20%的复合骨水泥抗压强度最高, 弹性模量也较好, 因此实验选择 β-磷酸三钙含量为 20%的 PLGA/β-磷酸三钙/磷酸钙骨水泥进行细胞实验; 复合骨水泥的降解性能优于磷酸钙骨水泥; ③随着培养时间的延长, 实验组细胞吸光度、乳酸脱氢酶活性逐渐升高, 不同时间点的吸光度值、乳酸脱氢酶活性与阴性对照组比较均无差异; 实验组细胞生长良好; ④在 PLGA/β-磷酸三钙/磷酸钙骨水泥表面的 MC3T3-E1 细胞生长正常, 能充分伸展, 在材料表面伸出伪足, 能够与材料紧密贴附; ⑤结果表明, 含 20%β-磷酸三钙的 PLGA/β-磷酸三钙/磷酸钙骨水泥复合材料具有较普通磷酸钙骨水泥更佳的抗压强度、弹性模量及降解性能, 且细胞相容性好, 无明显细胞毒性。

关键词:

磷酸钙骨水泥; β-磷酸三钙; PLGA; 生物材料; 骨科材料; 性能研究; 国家自然科学基金

主题词:

磷酸钙类; 抗压强度; 弹性模量; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金面上项目(30670558)

Wang Jian-long, M.D.,
Associate chief physician,
Department of Orthopedics,
the Third Xiangya Hospital,
Central South University,
Changsha 410000, Hunan
Province, China

Corresponding author:
Zhu Kai-di, Master, Hunan
Aerospace Hospital,
Changsha 410000, Hunan
Province, China

缩略语:

乳酸-羟基乙酸共聚物: poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA

Preparation and property evaluation of a self-setting calcium phosphate cement

Wang Jian-long¹, He You², Cheng Zhe², Zheng Zhi¹, Zhu Kai-di³ (¹Department of Orthopedics, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410000, Hunan Province, China; ²Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410000, Hunan Province, China; ³Hunan Aerospace Hospital, Changsha 410000, Hunan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Preliminary studies have found that poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) can improve the compressive strength and degradability of calcium phosphate cement.

OBJECTIVE: To prepare a self-setting calcium phosphate cement which has better mechanical properties, biocompatibility and degradability on the basis of the previous findings.

METHODS: Beta-tricalcium phosphate (β -TCP), pure calcium phosphate cement (CPC) and PLGA powder were mixed at different mixing ratios for preparation of PLGA/ β -TCP/CPC. Setting time, compressive strength, elastic modulus and degradation properties of the composite bone cement were evaluated to screen the optimal level of β -TCP. MC3T3-E1 cells were cultured in CPC extract (control), PLGA/ β -TCP/CPC extract (experimental), α -MEM containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin double antibody (negative control), and 6.4% phenol liquid (positive control). MTT method was used to detect cell proliferation at 1, 3, 5 days after culture, and lactate dehydrogenase activity in culture media was detected at 1 and 3 days after culture. MC3T3-E1 cells were seeded on the surface of PLGA/ β -TCP/CPC and pure CPC respectively, and were then observed by scanning electron microscopy after 3 days.

RESULTS AND CONCLUSION: Initial setting time and final setting time among of the composite bone cement were increased with the increasing of β -TCP content, but had no significant difference from those of the CPC ($P > 0.05$). The compressive strength and elastic modulus of the composite bone cement were higher than those of the CPC, and moreover, the composite bone cement with 20% β -TCP exhibited the highest compressive strength and higher elastic modulus as compared with the other groups. Therefore, PLGA/20% β -TCP/CPC was selected in the cell test. Moreover, the degradation properties of the composite bone cement were also better than those of the CPC. (3) With the growth of culture time, cell absorbance value and lactate dehydrogenase activity were gradually increased in the experimental group, and no difference existed between the experimental group and the negative control group. The cells in the experimental group also grew well. (4) MC3T3-E1 cells grew well and fully extended on the surface of PLGA/ β -TCP/CPC, and cell pseudopodia on the material surface were tightly adhered to the material. To conclude, PLGA/20% β -TCP/CPC has better compressive strength, elastic modulus, degradation properties and cytocompatibility relative to the CPC, and moreover, the composite bone cement has no obvious cytotoxicity.

Subject headings: Calcium Phosphates; Compressive Strength; Elastic Modulus; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 30670558

0 引言 Introduction

在临床工作中上, 因为感染、创伤及病理性骨折等各种原因导致的骨缺损及骨不连日渐增多, 临床处理上, 特别是大面积的骨缺损修复尤为困难, 临床上通常需要骨移植来治疗^[1-4]。现阶段使用的骨修复材料来源主要有自体来源骨、异种异体骨、同种异体骨和人工合成骨, 目前骨不连与骨缺损修补的金标准依然是自体骨移植。但自体骨移植依然存在很多不足, 如来源受限、不可塑形、对患者造成再次创伤等, 尤其是在治疗大面积骨缺损上, 自体骨移植不足尤为明显^[5-7]。相对而言, 异体骨移植存在疾病传播、免疫排斥等现象及伦理道德方面的制约, 限制了异体骨移植的广泛应用。另一方面, 异体骨还存在着移植后吸收过快, 与成骨细胞长入的速度不相适应, 导致出现新的缺损而再发病理性骨折等^[8-10]。因此, 研究一种具有良好理化性能、生物相容性、降解性、易塑形性的骨组织修复材料已成为骨组织工程的首要工作。

目前国内外使用较多的人工骨组织修复材料有聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥、磷酸三钙陶瓷和羟基磷灰石陶瓷、磷酸钙生物骨水泥等^[11-14]。聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥因其可塑性好, 是目前临床上使用较多的可注射型材料, 但其固化过程放热较高, 容易导致周围组织坏死, 在体内几乎不能被降解吸收, 单体吸收易导致血压下降及栓塞, 并且植

入后还可引起炎症反应并形成纤维包裹, 存在时间长易出现松动脱落等现象^[15]。磷酸三钙 $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ 为磷酸钙盐中的一种, 目前骨组织修复材料的研究以 β -磷酸三钙居多。而磷酸三钙陶瓷与羟基磷灰石陶瓷虽然具备良好的生物相容性, 但存在脆性差、塑形困难、降解性差、缺乏骨诱导作用等缺陷, 限制了其应用^[16-19]。目前研究的自固化磷酸钙骨水泥按照固相组成的Ca/P比可归纳为以下几类: ①磷酸氢钙(DCPD或DCPA)型, 其固相组成的Ca/P比为1.0; ②磷酸八钙型, 其固相组成的Ca/P比为1.33; ③缺钙型羟基磷灰石型其固相组成的Ca/P比为1.5; ④羟基磷灰石型, 其固相组成的Ca/P比为1.67。随着磷酸钙骨水泥的研究发展, 其Ca/P比逐渐提高, 目前使用的磷酸钙骨水泥一般Ca/P比大于1.5, 且较为接近正常人体骨组织中的Ca/P比。在对其的各种改性研究中, 其组成也由单纯的磷酸钙盐类转变成含有氟离子、碳酸根离子等的多元复杂化合物, 从而更接近骨组织中的无机成分^[20-21]。

随着对磷酸钙骨水泥的研究越来越多, 其存在着脆性大、力学性能相对不足及降解速度较慢, 不能与新骨生成速率相适应等问题受到关注^[22-23], 课题组前期选用了具有良好生物相容性、降解性且降解时间可调的乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]对磷酸钙进行改性研究, 以PLGA较快的降解速率(一二月)形成缓慢成

孔的现象, 加快磷酸钙降解, 研究中发现当PLGA与磷酸钙的比例为30:70时, 复合材料的抗压强度及降解性能均有明显改善。此次研究在前期研究基础上, 拟通过PLGA、磷酸钙盐中降解性相对较高且具有强吸收性的 β -磷酸三钙对磷酸钙骨水泥进行改进, 以制备具有良好理化性质、生物相容性及降解性的PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙生物复合骨水泥材料。研究不同 β -磷酸三钙含量对复合磷酸钙骨水泥物相和力学性能等的影响, 优化骨水泥组分含量; 对材料抗压强度、韧性、凝结时间、显微结构等力学指标进行测定分析; 后期进行材料的生物相容性、体内降解时间测定等评估该研究改性的新型骨水泥材料的应用及研究价值, 为其进一步研究奠定科学基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 对比观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年5月至2016年5月在中南大学湘雅三医院实验室完成。

1.3 材料 磷酸钙骨水泥粉末(上海瑞邦公司); PLGA(山东医药器械研究所); MC3T3-E1细胞(中南大学湘雅三医院实验室); 胎牛血清、 α -MEM培养基(Gibco); 苯酚液体(南京海克尔); 乳酸脱氢酶活性检测试剂盒(上海酶联); 酶标仪(上海皓庄仪器有限公司); 吖啶橙染色试剂盒(南京莱富赛生物科技有限公司); JEM-100SX型透射电镜、扫描电镜(上海长方光学仪器有限公司); 荧光显微镜(奥林巴斯); Image Pro Plus 5.1图像分析系统(HAIPS-1000)。

1.4 实验方法

1.4.1 共沉淀法制备 β -磷酸三钙 ①将 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 加入纯水配制100 mL, 获得0.45 mol/L的 Ca^{2+} 溶液, 将 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 加入纯水中配成100 mL, 获得0.3 mol/L的 PO_4^{3-} 溶液; ②在磁力搅拌下, 将 Ca^{2+} 溶液用酸式滴定管缓慢滴入 PO_4^{3-} 溶液(滴加速度为2 mL/min), 得悬浮液, 用氨水将pH值调节为11.0, 用保鲜膜封好, 搅拌3 h; ③减压抽滤, 将滤饼置于托盘中, 在恒温干燥箱中烘干, 得到白色块状, 研磨成细粉; 以上所得粉末放置于高温箱式炉中, 设置90 min加热, 根据相关文献研究, 加热温度设置为900 $^{\circ}\text{C}$, 保温180 min, 降温后取出, 将 β -磷酸三钙粉末装入试剂瓶内。

1.4.2 PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥复合粉末制备 ①根据课题组前期研究结果, 将PLGA、磷酸钙骨水泥、 β -磷酸三钙按体积比分别为3:6.5:0.5、3:6:1、3:5.5:1.5、3:5:2、3:4.5:2.5和3:4:3取不同体积的3种粉末; ②其中首先将PLGA/磷酸钙骨水泥和PLGA以不同体积比先进行复合, 具体过程为PLGA用氯仿使其完全溶解, 一般需搅拌5 min; ③将称取好的磷酸钙骨水泥粉末加入到PLGA氯仿溶液中反应, 振荡、搅拌5 min; ④将上述混合体系以一定速度滴加至无水乙醇中搅拌进行分散, 5 min后用真空泵抽滤, 无水乙醇洗涤, 之后将滤饼放于真空干

燥箱中干燥8 h, 取出后轻轻研磨即可得到PLGA/磷酸钙骨水泥复合粉末; ⑤将PLGA/磷酸钙骨水泥复合粉末与 β -磷酸三钙粉末按预先设定的比例混合成骨水泥混合粉末, 按固液比为3 g/mL加入固化液, 用搅拌机搅拌后倒入模具中成形, 得到 β -磷酸三钙含量分别为5%、10%、15%、20%、25%和30%的骨水泥模型。

1.4.3 PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥、磷酸钙骨水泥性能评估

材料凝结时间测定: ①采用吉尔摩双针法, 具体步骤如下, 首先自行制备两支质量分别为54 g和113 g、针尖直径分别为2.0 mm和1.0 mm的吉尔摩粗、细针, 分别用于测定材料的初凝时间和终凝时间; ②以不被较轻且针尖直径较大的针、较重且针尖直径较小的针留下刺痕的时间分别作为初凝时间和终凝时间; ③实验所用模型尺寸为6 mm \times 3 mm \times 3 mm, 温度设为37 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度超过30%, 测定时单一样品重复3次, 同时每种样品设置3个平行样以保证结果准确可靠。

固化骨水泥抗压强度、弹性模量分析: ①取骨水泥, 以固化液混合, 再用直径为3 mm的模具成型, 制成3 mm \times 6 mm高度的供试样本; ②在模拟体液(9.0 g NaCl, 0.2 g NaHCO_3 , 0.25 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g KCl以1 000 mL去离子水溶解, 调节pH值为7.2左右)环境下浸泡7 d后取出, 用砂纸打磨形成上下表面平行, 高度约6 mm的圆柱形供试样品, 之后用CSS-44100电子万能试验机对材料进行抗压强度、弹性模量测定; ③测定不同 β -磷酸三钙含量对骨水泥强度的影响, 每组设置5个平行, 以平均值作为最终结果。

固化骨水泥体外降解性能评估: ①取骨水泥及生理盐水, 固液比1:62.5, 将其分别用细丝线悬于密闭的装有生理盐水的广口瓶中, 在(37 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中进行降解实验, 整个实验过程均保持避光; ②在6周取样, 喷金后使用扫描电镜观察分析材料的降解情况。

1.4.4 磷酸钙骨水泥的体外细胞毒性及相容性 前期研究完成了不同含量 β -磷酸三钙改性的骨水泥材料的体外性能评估, 最终认为20% β -磷酸三钙改性的骨水泥体外性能较好, 能够满足临床应用需要。为保证该新型磷酸钙骨水泥材料的安全性, 为其临床应用提供科学基础, 此次研究拟对其体外细胞毒性及体内降解性能进行考察。

材料浸提液的制备: 参照ISO10993标准, 材料表面积和液体体积比值为3 cm²/mL制备浸提液, 将已完成消毒的磷酸钙骨水泥及PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥分别置于6孔板内, 根据确定比例按顺序加入含体积分数10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗的 α -MEM培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡72 h即可获得100%浸提液, 无菌环境下完成封装, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。

细胞增殖检测: ①采用MTT法检测细胞增殖情况, 首先用0.25% Trypsin-EDTA消化MC3T3-E1细胞系, 制成细胞浓度 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液, 并以每孔100 μL 接种量接种

于96孔板,再加入含有体积分数10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗的 α -MEM培养基;②在37℃、体积分数5%CO₂条件下培养24h,将原培养液及未贴壁细胞舍弃,分4组培养,分别加入磷酸钙骨水泥浸提液(对照组)、PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥浸提液(实验组)、含有体积分数10%胎牛血清及1%青霉素-链霉素双抗的 α -MEM培养基(阴性对照组)、含体积分数6.4%苯酚的液体(阳性对照组);③在液体置换完成后,在37℃、体积分数5%CO₂条件下培养1,3,5d,并将原有培养液移出,分别加入相应的新鲜培养液180 μ L,再加入5 g/L的MTT溶液20 μ L;④在37℃、体积分数5%CO₂条件下培养4h后弃去原培养液,加入150 μ L二甲基亚砜,适度吹打,促进新生成的紫色结晶物质充分溶解,之后将吹打后的液体转移至新的96孔板,以酶标仪在490 nm波长检测吸光度值。

乳酸脱氢酶活性分析:①②操作同细胞增殖检测;③在液体置换完成后,在培养第1,3天从各组随机取5孔,每孔40 μ L,用乳酸脱氢酶活性检测试剂盒检测细胞培养液的乳酸脱氢酶活性。

细胞系生长情况评估:①采用倒置荧光显微镜对各组细胞的生长情况进行评估,首先将MC3T3-E1细胞系接种在96孔板,并调整每孔细胞数1 000;②在37℃、体积分数5%CO₂条件下培养24h,根据上述分组替换相应的浸提液,分别在1,3,5d以40 g/L多聚甲醛固定,吖啶橙染色试剂盒对细胞进行荧光染色,之后观察细胞生长情况。

细胞与材料亲和性评估:①将完成消毒的磷酸钙骨水泥及PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥放置在48孔板内,用0.25%Trypsin-EDTA消化MC3T3-E1细胞制备细胞悬液,以细胞数1 000/孔接种在各孔内,并按及时更换培养液;②在培养3d后,以40 g/L多聚甲醛固定,依次使用体积分数为50%,70%,80%,90%,100%的无水乙醇进行梯度脱水,之后以扫描电镜观察细胞形态。

1.5 主要观察指标 PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥的凝结时间、机械性能、降解性能及细胞相容性。

1.6 统计学分析 采用SPSS 19.0数据分析软件进行数据处理,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,均以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 磷酸钙骨水泥体外性能评估结果

2.1.1 凝结时间 从图1可看出随着 β -磷酸三钙含量的增加,PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥复合材料的初凝时间、终凝时间均有所增加,但均保持初凝时间5 min左右,终凝时间为15 min左右,PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥的初凝、终凝时间与磷酸钙骨水泥比较差异均无显著性意义($P > 0.05$)。

2.1.2 抗压强度 随着 β -磷酸三钙含量的增加,PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥复合材料的抗压强度呈现先升高

然后有所下降的变化趋势,当 β -磷酸三钙含量为20%时,骨水泥的抗压强度显著高于磷酸钙骨水泥[(50.31 \pm 3.34), (34.80 \pm 2.10) MPa, $P < 0.05$],见图2。随着 β -磷酸三钙含量的增加,PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥复合材料的弹性模量较磷酸钙骨水泥显著增加,其中20%含量时弹性模量远大于磷酸钙骨水泥(13.5, 5.4 GPa, $P < 0.05$),见图3。

2.1.3 体外降解 图4为PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥、磷酸钙骨水泥在模拟体液中浸泡6周的扫描电镜图,PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥此时大部分PLGA材料已完全降解,并留下了大量孔隙,孔隙孔径150-300 μ m;磷酸钙骨水泥只有小部分材料发生降解,且降解形成的孔径较小。

2.2 磷酸钙骨水泥体外细胞亲和性结果

2.2.1 MTT检测结果 随着培养时间的增长,对照组、实验组吸光度值均逐渐升高,与阴性对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$),相同时间点吸光度值均显著高于阳性对照组($P < 0.05$);阳性对照组吸光度值随培养时间的增长变化不显著,见表1。

2.2.2 乳酸脱氢酶活性 随着培养时间的增长,对照组、实验组及阴性对照组培养液中乳酸脱氢酶活性均呈现增加趋势,阳性对照组乳酸脱氢酶活性有降低趋势;对照组、实验组及阴性对照组相同时间点培养液中乳酸脱氢酶活性比较差异均无显著性意义($P > 0.05$),对照组、实验组及阴性对照组相同时间点培养液中乳酸脱氢酶活性均低于阳性对照组($P < 0.05$),见图5。

2.2.3 细胞形态 在培养第1,3,5天时,对照组和实验组细胞形态均呈多角形、纺锤型,生长状态良好,细胞形态与阴性对照组比较差异不显著,阳性对照组中大部分细胞崩解死亡,可观察到少许细胞碎片(图6)。

2.2.4 细胞生长情况 通过扫描电镜观察,可以看到细胞在磷酸钙骨水泥和PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥表面均能够正常生长,且能充分伸展,细胞在材料表面伸出伪足,能够与材料紧密贴附(图7)。

3 讨论 Discussion

根据对PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥凝结时间的检测,可以看出随着 β -磷酸三钙含量的增加,复合骨水泥的初凝时间、终凝时间均有所增加,但不同 β -磷酸三钙含量的复合骨水泥初凝、终凝时间与磷酸钙骨水泥比较差异不显著($P > 0.05$)。这一结果反映了 β -磷酸三钙和PLGA对骨水泥的凝结时间无显著影响。此外,无论 β -磷酸三钙含量的高低,骨水泥初凝时间均大于3 min,终凝时间均大于15 min且不超过20 min,能够满足临床作为骨修复材料使用对凝结时间的要求。随着 β -磷酸三钙含量的增加,复合材料的抗压强度呈现先升高后降低的变化趋势。在此次研究中所使用的原材料、加工方法、浸泡液体及时间都保持

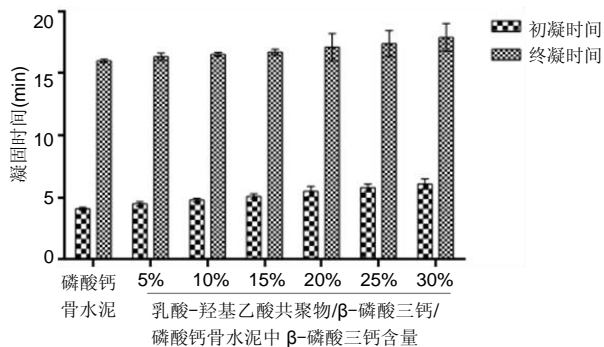


图1 不同骨水泥凝结时间的比较

Figure 1 The setting time of different bone cements

图注: 随着 β -磷酸三钙含量的增加, 乳酸-羟基乙酸共聚物/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥复合材料的初凝时间、终凝时间均有所增加, 但均保持初凝时间 5 min 左右, 终凝时间为 15 min 左右。

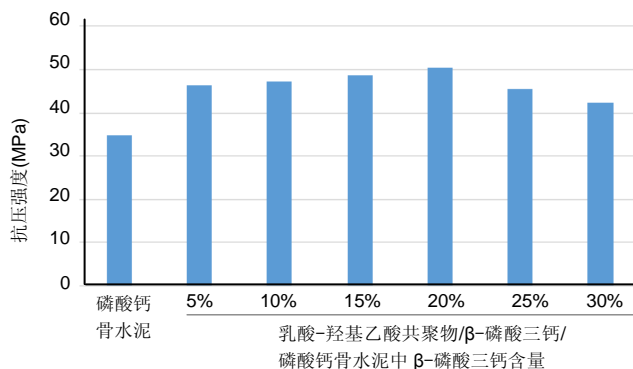


图2 不同骨水泥抗压强度的比较

Figure 2 The compressive strength of different bone cements

图注: β -磷酸三钙含量为 20% 的乳酸-羟基乙酸共聚物/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥抗压强度显著高于磷酸钙骨水泥 ($P < 0.05$)。

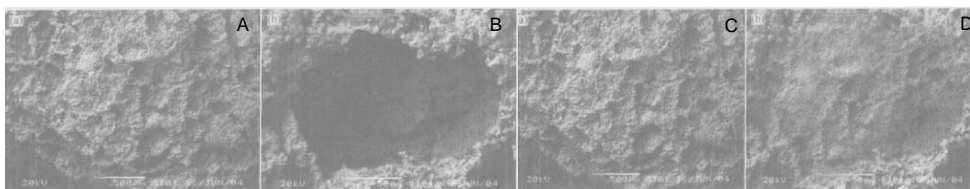


图4 不同骨水泥在模拟体液中浸泡6周的降解情况(扫描电镜)

Figure 4 Degradation of different bone cements soaked in simulated body fluid for 6 weeks (scanning electron microscope)

图注: 图中 A、B 为乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥, 大部分 PLGA 材料已完全降解, 并留下了大量孔隙, 孔隙孔径 150-300 μm ; C、D 为磷酸钙骨水泥, 只有小部分材料发生降解, 且降解形成的孔径较小。

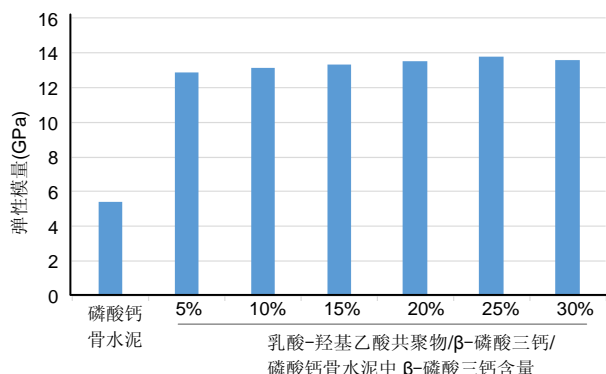


图3 不同骨水泥弹性模量的比较

Figure 3 The elastic modulus of the composite bone cement with different concentrations of β -tricalcium phosphate

图注: β -磷酸三钙含量为 20% 的乳酸-羟基乙酸共聚物/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥弹性模量显著高于磷酸钙骨水泥 ($P < 0.05$)。

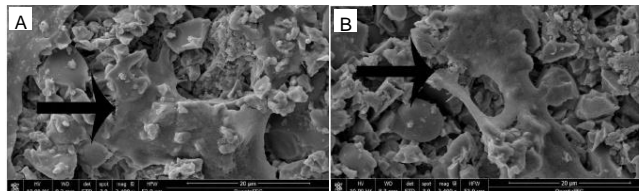


图7 电镜扫描观察 MC3T3-E1 细胞在不同骨水泥表面生长 3 d 时的情况 ($\times 2400$)

Figure 7 Growth of MC3T3-E1 cells on the surface of different bone cements at 3 days of culture under scanning electron microscope ($\times 2400$)

图注: 图中 A 为磷酸钙骨水泥, B 为乳酸-羟基乙酸共聚物/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥。MC3T3-E1 细胞在两种骨水泥表面均能够正常生长(见箭头示), 且能充分伸展, 细胞在材料表面伸出伪足, 能够与材料紧密贴附。

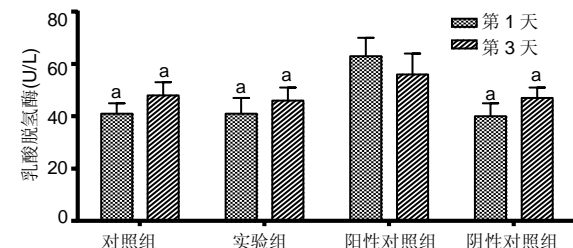


图5 各组细胞培养不同时间点后培养液中乳酸脱氢酶活性的比较

Figure 5 Lactate dehydrogenase activity of MC3T3-E1 cells cultured in different media at different time of culture

图注: 与同时点阳性对照组比较, $^a P < 0.05$ 。

表1 MTT 检测各组细胞吸光度值结果

($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Absorbance values of cells in different groups determined by MTT test

组别	第1天	第3天	第5天
对照组	0.211 \pm 0.043	0.573 \pm 0.027 ^a	1.032 \pm 0.017 ^a
实验组	0.207 \pm 0.021	0.569 \pm 0.019 ^a	1.026 \pm 0.015 ^a
阳性对照组	0.213 \pm 0.031	0.209 \pm 0.022 ^b	0.214 \pm 0.026 ^b
阴性对照组	0.207 \pm 0.033	0.581 \pm 0.022 ^a	1.041 \pm 0.018 ^a

表注: 与阳性对照组比较, $^a P < 0.05$; 与阴性对照组比较, $^b P < 0.05$ 。

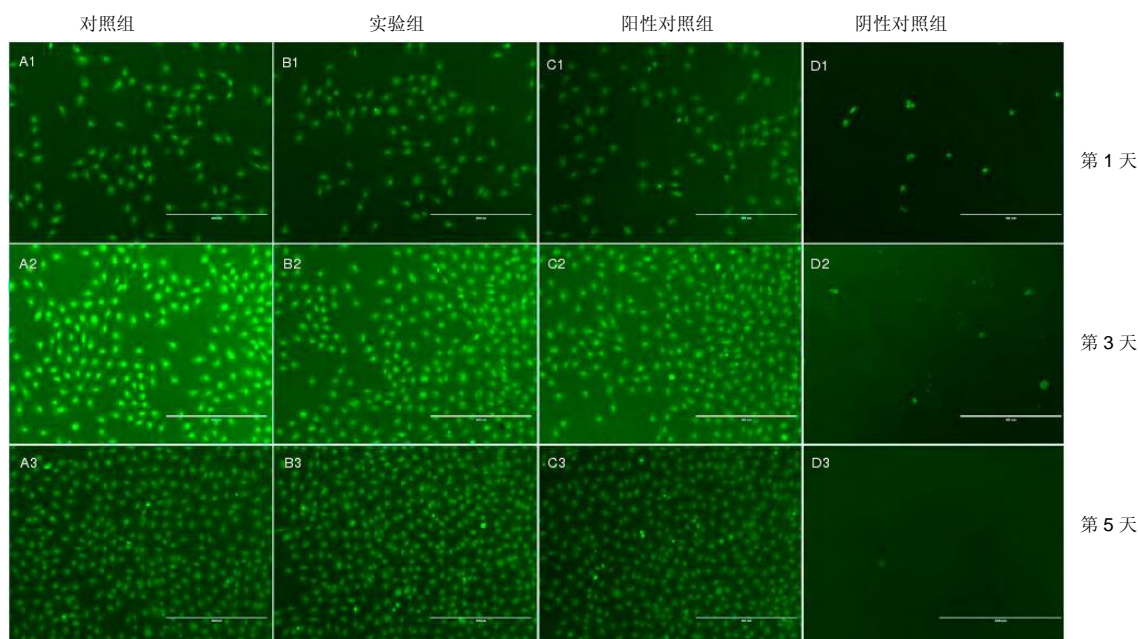


图6 倒置荧光显微镜观察各组细胞形态($\times 40$)

Figure 6 Morphological observation of cells in different groups under inverted fluorescence microscope ($\times 40$)

图注: 对照组细胞呈纺锤型或多角型, 生长良好(A₁-A₃); 实验组细胞呈纺锤型或多角型, 生长良好(B₁-B₃); 阳性对照组细胞呈纺锤型或多角型, 生长良好(C₁-C₃); 阴性对照组活细胞数较少, 可见细胞碎片(D₁-D₃)。

了基本一致, 可以认为影响此次研究抗压强度的因素主要是复合材料的孔隙率及 β -磷酸三钙含量。当复合材料中加入PLGA时, 起到填充孔隙、降低孔隙率的作用, 另一方面, β -磷酸三钙降解转化为羟基磷灰石, 使抗压强度升高; 而随着 β -磷酸三钙含量过高升高, 材料降解性增加, 抗压强度有所下降; 同样PLGA作为有机高分子材料加入复合材料中, 可有效改善复合材料的韧性, 提高弹性模量。根据此次研究对PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥材料在模拟体液中浸泡6周的扫描电镜图, 可以看出PLGA已大部分降解, 并留下孔隙, 孔隙的孔径150-300 μm , 适合新生骨组织的长入。综上所述, 可知通过在磷酸钙骨水泥中加入 β -磷酸三钙和PLGA确实能够提高骨水泥材料的降解性能, 主要原因一方面为PLGA、 β -磷酸三钙具有较好的降解性, 与骨水泥混合后有助于加速降解; 另一方面PLGA的降解产物均为弱酸性物质, 有助于促进钙盐的溶解, β -磷酸三钙为弱碱性, 两者的存在可以保证降解反应在中性环境中进行, 能促进两者的降解, 而 β -磷酸三钙的强吸水性在材料周围聚集组织液又能促进PLGA的降解。

此次研究结果还表明, 对照组、实验组细胞增殖情况正常, 即PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥不会影响细胞增殖, 材料不具有细胞毒性, 安全性较高。此外, 研究还检测了细胞培养液中的乳酸脱氢酶活性, 结果表明阳性对照组细胞损伤程度较阴性对照组、对照组、实验组更为严重, 而对对照组和实验组无显著差异, 即PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥材料细胞毒性不显著, 安全性较高。此次研究采用荧光倒置显微镜在细胞培养第1, 3, 5天时对细胞形态进行观察, 发现磷酸钙骨水泥及PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙

骨水泥材料本身不具有明显的细胞毒性。此次研究通过扫描电镜观察可以看到, 细胞在磷酸钙骨水泥和PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥表面均能够正常生长, 且能充分伸展, 细胞在材料表面伸出伪足, 能够与材料紧密贴附。这一结果提示该材料与细胞间具有较好的生物相容性, 细胞能够在其表面生长、增殖, 为移植后骨组织的生长提供了理想的支架结构, 对于缺损骨的修复具有积极意义。

但此次实验主要研究了PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥复合材料的体外性能、细胞相容性及细胞毒性, 缺乏对体内降解性、骨传导性和骨诱导性及促血管生成性能的研究^[24-29], 是实验下一步重要研究方向。另外, 目前骨组织工程前沿研究认为其3个重要要素为种子细胞、支架材料、细胞因子^[30-35], 实验侧重对支架材料的研究, 获得理想支架材料后拟结合种子细胞及细胞因子开展进一步实验研究。

含20% β -磷酸三钙的PLGA/ β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥复合材料具有较普通磷酸钙骨水泥更佳的抗压强度、弹性模量及降解性能, 且细胞相容性好, 无明显细胞毒性, 具有良好的研究前景。

致谢: 对为实验研究提供实验条件的中南大学湘雅三医院实验室表达衷心的感谢!

作者贡献: 王剑龙进行实验设计, 实验实施为朱凯迪, 实验评估为郑治, 资料收集为程哲, 何由成文, 王剑龙审核。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金面上项目(30670558)”的基金资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 该作者声明在课题研究和文章撰写过程, 没有因其岗位角色影响文章观点和对数据结果的报道, 不存在利益冲突。

伦理问题: 研究用材料科学的实验方案符合相关伦理学要求, 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

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: 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。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 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] 黄雷,田金翌,杨涛,等.创伤晚期胫骨缺损的病例回顾分析[J].中华创伤骨科杂志,2014,16(11):946-950.
- [2] 解琛,蔡锦方,李宗玉,等.髓内腓骨移植结合Ilizarov技术治疗胫骨感染性骨不连及骨缺损(附7例报告)[J].山东医药, 2014, 54(17):41-43.
- [3] Li BL, Liu L, Zhao WB, et al. Bottleneck and development trend of bone xenograft for the treatment of bone defect. Zhongguo Gu Shang. 2015; 28(12):1166.
- [4] 薛震,牛丽媛,安刚,等.可注射式纳米羟基磷灰石复合支架与骨髓间充质干细胞修复兔桡骨骨缺损[J].中国组织工程研究, 2015, 19(3):378-383.
- [5] Li P, Honda Y, Arima Y, et al. Interferon- γ enhances the efficacy of autogenous bone grafts by inhibiting postoperative bone resorption in rat calvarial defects. Prosthodont Res. 2016; 60(3):167-176.
- [6] 杜辉,付勤.同种异体骨移植与自体骨移植修复四肢粉碎性骨折:骨性愈合及骨活性比较[J].中国组织工程研究, 2015,19(8): 1206-1210.
- [7] 马武秀,程永生.自体骨移植修复骨缺损的研究进展[J].中国骨与关节损伤杂志,2011,26(6):574-576.
- [8] 马捷,陈晓东,戴力扬,等.人工骨移植替代物的应用研究与进展[J].生物骨科材料与临床研究,2007,4(2):30-33.
- [9] 左健,康健敏,潘乐. 同种异体骨移植用于骨缺损修复的应用现状[J].中国组织工程研究,2012,16(18):3395-3398.
- [10] Shibuya N, Jupiter DC. Bone graft substitute: allograft and xenograft. Clin Podiatr Med Surg. 2015; 32(1):21.
- [11] 尤琦,张赢心,李佳乐,等.双相磷酸钙陶瓷化学组成对其材料性能的影响[J].海南医学,2016,27(15): 2502-2504.
- [12] 方洪松,周建林,彭昊,等.组织工程支架材料修复关节软骨缺损[J].中国组织工程研究,2016,20(52):7891-7898.
- [13] Yuan Y, Shi X, Gan Z, et al. Modification of porous PLGA microspheres by poly-L-lysine for use as tissue engineering scaffolds. Colloids Surf B Biointerfaces. 2017;161:162-168.
- [14] 董静静,毕龙,李娜,等.多孔磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶性状及对成骨细胞生物学行为的影响[J].中国组织工程研究, 2014, 18(30):4831-4837.
- [15] 贾崇哲,唐海,陈浩,等.聚甲基丙烯酸酯骨水泥的基础研究进展[J].临床和实验医学杂志,2017,16(5):519-521.
- [16] 李淑阳,李鸿,王鹏,等.可降解磷酸钙生物陶瓷的制备与性能[J].功能材料,2015,46(24):24147-24152.
- [17] 吴珍珍,包崇云,李明政,等.载有人胚胎干细胞的多孔磷酸钙骨水泥与富血小板血浆复合后修复大鼠骨缺损的实验研究[J].中国口腔颌面外科杂志, 2017,15(1):6-10.
- [18] 杨俊.磷酸钙与聚甲基丙烯酸甲酯制备复合型骨水泥的生物学研究[D].南方医科大学,2015.
- [19] 魏富达,汪小华,谢肇. PMMA骨水泥与磷酸钙骨水泥诱导成膜及其对成骨活性的差异[J].第三军医大学学报, 2015,37(10): 973-977.
- [20] 李曙霞,张敏,王京旗,等.掺铈磷酸钙骨水泥材料的生物学性能体外研究[J].北京口腔医学,2017,25(2):81-84.
- [21] Calvo-Guirado JL, Garces M, Delgado-Ruiz RA, et al. Biphasic β -TCP mixed with silicon increases bone formation in critical site defects in rabbit calvaria. Clin Oral Implants Res. 2015; 26(8):891-897.
- [22] 邱耿韬,史占军,赵亮. 磷酸钙骨水泥在骨组织再生修复应用中的研究进展[J].中国矫形外科杂志,2013,21(14):1406-1409.
- [23] 董静静,毕龙,李娜,等.多孔磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶性状及对成骨细胞生物学行为的影响[J].中国组织工程研究, 2014, 18(30):4831-4837.
- [24] 魏丽,李德超,王静,等.聚乳酸-壳聚糖纤维/羟基磷灰石-硅酸钙复合支架材料的细胞相容性[J].中国组织工程研究与临床康复, 2010,14(8):1397-1401.
- [25] 杨晓彬,周苗.颌骨组织工程血管化的研究进展[J].生物医学工程研究, 2017,36(2):187-190.
- [26] 纪经涛,胡永成,夏群,等.血管内皮生长因子和骨形态发生蛋白在骨组织工程中的作用[J].中国组织工程研究, 2015,19(33): 5356-5363.
- [27] Ko SW, Soriano JPE, Lee JY, et al. Nature derived scaffolds for tissue engineering applications: Design and fabrication of a composite scaffold incorporating chitosan-g-d,l-lactic acid and cellulose nanocrystals from Lactuca sativa L. cv green leaf. Int J Biol Macromol. 2017. pii: S0141-8130(17)33618-8. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.109. [Epub ahead of print]
- [28] Bryant SJ, Vernerey FJ. Programmable Hydrogels for Cell Encapsulation and Neo-Tissue Growth to Enable Personalized Tissue Engineering. Adv Healthc Mater. 2017. doi: 10.1002/adhm.201700605. [Epub ahead of print]
- [29] 潘婷,曹晓东.快速成型制备凝胶支架在组织工程中的应用及进展[J].中国材料进展,2015,34(3):236-245,235.
- [30] Yu E, Zhang J, Thomson JA, et al. Fabrication and Characterization of Electrospun Thermoplastic Polyurethane/Fibroin Small-Diameter Vascular Grafts for Vascular Tissue Engineering. Int Polym Process. 2016;31(5): 638-646.
- [31] 李珺,李晓桐,赵明,等.无机纳米材料及其在生物医学方面的应用研究[J].医疗卫生装备,2015,36(7):97-101,105.
- [32] Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, et al. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. Eur Cell Mater. 2012;24:1-17.
- [33] 周长春,叶兴江,肖占文,等.磷酸钙骨组织工程支架表面微纳米化改性研究[J].表面技术,2014,43(4):82-85.
- [34] Farokhi M, Mottaghi F, Samani S, et al. Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. Biotechnol Adv. 2017. pii: S0734-9750(17)30121-0. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.10.001. [Epub ahead of print].
- [35] Dong L, Wang SJ, Zhao XR, et al. 3D-Printed Poly(ϵ -caprolactone) Scaffold Integrated with Cell-laden Chitosan Hydrogels for Bone Tissue Engineering. Sci Rep. 2017;7(1):13412.