

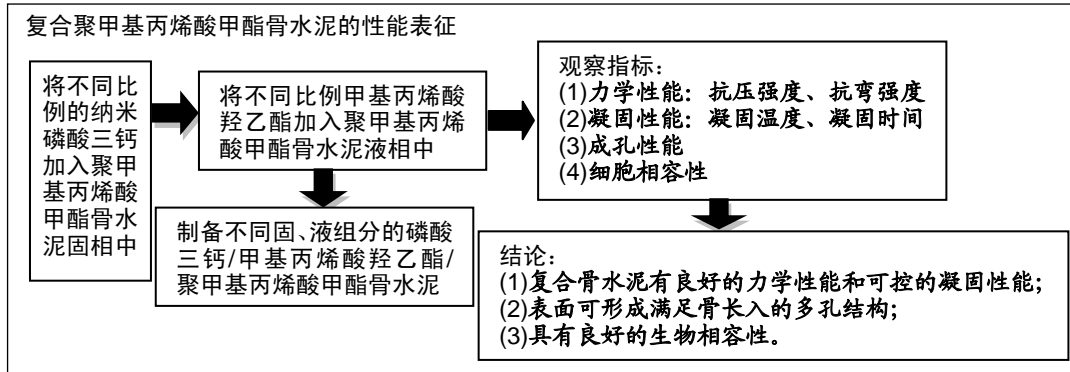
新型多孔聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥的制备及性能分析

高山¹, 周方¹, 吕扬¹, 袁亮¹, 李爱玲², 邱东² (¹北京大学第三医院骨科, 北京市 100191; ²中国科学院化学研究所, 北京市 100190)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1508

ORCID: 0000-0002-9157-5218(高山)

文章快速阅读:



高山, 男, 1991年生, 江苏省镇江市人, 汉族, 北京大学第三医院在读博士, 主要从事骨移植替代物的研究。

通讯作者: 周方, 主任医师, 教授, 北京大学第三医院骨科, 北京市 100191

文献标识码:A

稿件接受: 2018-09-26



文题释义:

聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥: 主要由固相和液相两部分组成, 拥有可注射、凝固后力学强度高、体内不良反应少等优点, 在临床骨科应用中常作为填充材料填补骨缺损。但由于其为惰性材料不被人体所吸收, 长期存在体内会发生磨损引起松动, 限制了它的远期应用。

多孔聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥: 向聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥中加入可降解材料改性, 可形成孔隙结构促使骨长入, 减少磨损的发生。但为了获得满意的多孔结构, 需加入大量改性材料, 这严重影响了多孔骨水泥的力学性能。

摘要

背景: 多孔磷酸三钙/聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate, PMMA)骨水泥可改善传统 PMMA 骨水泥骨传导性差的不足, 但加入的大量致孔剂显著降低了复合骨水泥的力学性能。

目的: 为改善多孔磷酸三钙/PMMA 骨水泥的力学性能, 制备含不同比例纳米磷酸三钙、甲基丙烯酸羟乙酯的复合 PMMA 骨水泥, 观察其力学性能、凝固性能、成孔性能及生物安全性。

方法: 向 PMMA 骨水泥固相中加入不同比例的纳米磷酸三钙(质量分数 40%, 50%, 60%), 液相中加入不同比例的甲基丙烯酸羟乙酯(质量分数 0%, 5%, 10%, 15%, 20%), 混合固相与液相, 制备不同组分的复合骨水泥, 检测各组骨水泥的抗压强度、抗弯强度、凝固最高温度及凝固时间, 筛选优选比例组骨水泥。将优选组骨水泥浸泡在模拟人细胞外液中 12 周, 扫描电镜观察成孔性能。采用优选组骨水泥浸提液培养成骨前体细胞, 24 h 后利用 CCK-8 法检测吸光度, 计算细胞活力。

结果与结论: ①在固相中加入 40%, 50%的磷酸三钙, 可增强复合骨水泥的抗压强度, 但当其比例达到 60% 时, 复合骨水泥的抗压强度明显下降; 磷酸三钙可明显降低复合骨水泥的抗弯性能, 呈线性关系; 在液相中加入甲基丙烯酸羟乙酯, 可加强复合骨水泥的抗压、抗弯强度, 但当浓度超过 15% 时, 复合骨水泥的力学性能不再增强; ②复合骨水泥的凝固最高温度约为 80 °C, 与磷酸三钙、甲基丙烯酸羟乙酯比例无关; 复合骨水泥的凝固时间随磷酸三钙比例的增加而缩短, 随甲基丙烯酸羟乙酯比例的增加而延长; ③优选组骨水泥比例, 纳米磷酸三钙为 50%, 甲基丙烯酸羟乙酯为 0%, 5%, 10%, 此 3 种复合骨水泥在模拟人细胞外液中浸泡 12 周后, 表面可形成孔径约为 100 μm 的多孔结构; ④在 3 种优选复合骨水泥浸提液中, 成骨前体细胞活力均大于 75%, 无细胞毒性; ⑤综合以上结果发现, 在加入 PMMA 固相中加入 50%磷酸三钙、液相中加入 10%甲基丙烯酸羟乙酯为最优复合骨水泥配方。

关键词:

聚甲基丙烯酸甲酯; 磷酸三钙; 甲基丙烯酸羟乙酯; 骨水泥; 多孔骨水泥; 复合骨水泥; 骨生物材料; 国家自然科学基金; 生物材料

主题词:

聚甲基丙烯酸类; 磷酸钙类; 骨粘合剂; 组织工程

中图分类号: R459.9; R318

基金资助:

国家自然科学基金项目(51473004, 项目负责人: 周方)

缩略词:

聚甲基丙烯酸甲酯: polymethyl methacrylate, PMMA; 甲基丙烯酸羟乙酯: hydroxyethyl methacrylate, HEMA

Gao Shan, Doctorate candidate, Department of Orthopedics, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Corresponding author: Zhou Fang, Chief physician, Professor, Department of Orthopedics, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Preparation and characterization of novel porous polymethyl methacrylate bone cements

Gao Shan¹, Zhou Fang¹, Lü Yang¹, Yuan Liang¹, Li Ailing², Qiu Dong² (¹Department of Orthopedics, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China; ²Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract

BACKGROUND: Porous tricalcium phosphate/polymethyl methacrylate bone cement can overcome the poor osteoconduction of traditional polymethyl methacrylate bone cement. But the addition of porogens may cause a significant reduction in the mechanical properties of composite bone cements.

OBJECTIVE: To improve the mechanical properties of porous tricalcium phosphate/polymethyl methacrylate at different proportions, and to observe the mechanical properties, agglomeration, porosity and biosafety of composite bone cements.

METHODS: Different groups of composite bone cements were prepared by adding different contents of tricalcium phosphate (40%, 50%, 60%) in solid phase and hydroxyethyl methacrylate (0%, 5%, 10%, 15%, 20%) in liquid phase. The compressive strength, bending strength, maximum setting temperature, and setting time were measured, and screened the optimal ratio preliminarily. Then the pore formation properties of the optimal specimens were observed by scanning electron microscopy at 12 weeks after soaking in simulated body fluid. The osteogenic precursor cells were co-cultured with the preferred composite bone cement extract for 24 hours. The absorbance was then measured by cell counting kit-8 assay, and the cell viability was calculated.

RESULTS AND CONCLUSION: The compressive strength of composite bone cement was increased when adding 40% and 50% of tricalcium phosphate in solid phase, but decreased when tricalcium phosphate concentration reached 60%. The bending strength was significantly decreased after adding tricalcium phosphate, showing a linear relationship. Addition of hydroxyethyl methacrylate in liquid phase could strengthen the compressive strength and bending strength of composite bone cements, but no longer enhanced the mechanical properties when the concentration exceeded 15%. The maximum setting temperature of the composite bone cement was about 80 °C, regardless of the contents of tricalcium phosphate and hydroxyethyl methacrylate. The setting time prolonged with the increasing of tricalcium phosphate and shortened with the increasing of hydroxyethyl methacrylate. The formulas containing 50% tricalcium phosphate in the solid phase and 0%, 5% and 10% hydroxyethyl methacrylate, respectively in liquid phase were chosen as preferable groups. After immersing in the simulated body fluid for 12 weeks, there was porous structure whose pore size was approximately 100 μm formed on the surface of composite bone cement. The cell viabilities of the preferable composite bone cement extract were all more than 75%, showing there was no cytotoxicity. In conclusion, the addition of 50% tricalcium phosphate in solid phase and 10% hydroxyethyl methacrylate A in liquid phase into polymethyl methacrylate from the optimal composite bone cement formulation.

Subject headings: Polymethacrylic Acids; Calcium Phosphates; Bone Cements; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 51473004 (to ZF)

0 引言 Introduction

聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate, PMMA)骨水泥具有良好的可注射性能和优秀的力学性能,自1958年John Charnley爵士^[1]第一次将PMMA应用于髋关节置换以来,其已被广泛应用于临床骨科的各个领域。但PMMA骨水泥本身有其局限性:PMMA为生物惰性材料,自身骨组织无法长入其中,骨与骨水泥之间仅形成机械性填充界面,因此在体内长久磨损后会产生大量PMMA颗粒,并激活巨噬细胞引起骨溶解^[2-4],最终造成无菌性松动^[5-6],这限制了其长期应用。

为了解决这一缺陷,众多学者对PMMA骨水泥进行了改性研究,结果发现向PMMA中加入可降解材料如磷酸钙^[7-9]、羟基磷灰石^[10-11]、羧甲基纤维素等^[11-12],可制备出多孔复合骨水泥,植入体内后随着致孔剂的降解、吸收,可形成满足骨、血管、神经长入的孔隙结构^[13],显著改善了PMMA骨水泥的骨传导性,加强了骨-骨水泥界面。在众多改性材料中,磷酸三钙是研究最为深入的一种^[7-9]。磷酸三钙作为一种常见的生物陶瓷医学材料,其化学结构与人体骨骼主要无机盐成分羟基磷灰石相似,具有良好的生物相容性和可降解性,植入体内3-6个月可被人体所吸收^[14];同时,研究发现磷酸三钙还具有良好的骨诱导性^[15],可促进成骨细胞的分化和增殖^[16]。将磷酸三钙加入PMMA中制备的复合骨水泥材料,具有良好的细胞、组织安全性,表面可形成多孔结构,将骨水泥植入动物体内3个月后可见大

量新生骨长入骨水泥内^[7-9],骨-骨水泥界面明显增强^[17]。但与此同时,研究发现若为满足骨长入的孔径、孔隙率而加入大量磷酸三钙改性,多孔骨水泥的力学性能明显下降^[7-8],当磷酸三钙含量达到50%时,抗压强度只能达到传统PMMA的一半(40 MPa vs.78 MPa)^[8]。其原因主要为:①PMMA为疏水有机材料,而磷酸三钙是亲水无机材料,单纯混合两者只能形成悬浊液,造成固化后力学性能的丢失;②既往研究使用的磷酸三钙为微米级颗粒,近年研究发现向PMMA骨水泥固相中加入纳米材料,可在一定范围保证复合骨水泥的力学性能^[18-19]。

因此,为改善既往磷酸三钙/PMMA多孔骨水泥力学性能不足的缺点,此次研究向PMMA骨水泥液相中加入甲基丙烯酸羟乙酯(hydroxyethylmethacrylate, HEMA),由于HEMA为双亲溶液,能在凝固过程中使脂族链沉降在聚合物相内,亲水基团从表面突出,增强与磷酸三钙的连接,保证复合骨水泥力学性能^[20];同时选用纳米级的磷酸三钙作为致孔剂,加入PMMA骨水泥固相中,制备了新型多孔磷酸三钙/HEMA/PMMA骨水泥。实验将对制备的不同组分新型复合骨水泥的力学强度、凝固性能、表面成孔性能、细胞毒性等内容进行研究。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 材料学研究。

1.2 时间及地点 实验于2015年3月至2016年6月在北京

大学第三医院中心实验室和中国科学院化学研究所高分子化学与物理实验室完成。

1.3 材料 I型丙烯酸骨水泥(天津市合成材料工业研究有限公司, 中国); 纳米磷酸三钙(南京埃普瑞纳米材料有限公司, 中国); HEMA(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 中国); 过氧化苯甲酰(北京百灵威科技有限公司, 中国); N, N-二甲基对甲苯胺(国药集团化学试剂有限公司, 中国); α -MEM培养基、胎牛血清(Gibco公司, 美国); CCK-8试剂盒(日本同仁化学研究所, 日本); 小鼠成骨细胞系MC3T3-E1由中国科学院化学研究所提供; 扫描电子显微镜(JSM-6700F, JEOL公司, 日本); 酶标仪(ELX808, BioTek, 德国)。

1.4 实验方法

1.4.1 复合骨水泥的制备 复合骨水泥固体成分中引发剂过氧化苯甲酰含量恒定为1.25%, 液体成分中阻聚剂N, N-二甲基对甲苯胺含量固定为2%^[21]。在超净台内向磷酸三钙中加入1.25%过氧化苯甲酰, 混合均匀; 然后将商品PMMA固体粉末按照不同质量比例加入混合, 在漩涡混匀器下充分混匀。将甲基丙烯酸单体与HEMA、N, N-二甲基对甲苯胺按照不同质量比混合。

将不同组分骨水泥按照2 g : 1 mL的固液比混合并均匀搅拌^[8], 注入按照《YY0459-2003/ISO5833 : 2002丙烯酸类树脂骨水泥》^[22]标准制备的不同尺寸四氟乙烯模具中, 固化30 min脱模, 用于不同实验。各组骨水泥命名方式以固体组分中含有50%磷酸三钙, 液体组分中含有10% HEMA为例, 表示为THP50/10组, 其他组以此类推。

1.4.2 抗压强度 实验组采取正交实验法, 固体组分为加入质量分数40%, 50%, 60%的纳米磷酸三钙, 液体组分为加入质量分数0%, 5%, 10%, 15%, 20%的HEMA, 共计15组。对照组为纯PMMA组。制备直径6 mm、高度12 mm圆柱体不同组分骨水泥试件。根据ISO5833标准相关要求^[22], 将试件放置在万能力学机上, 以20 mm/min的速度移动横梁, 直到压缩到原高度的50%或圆柱体破裂, 计算抗压强度。每组骨水泥重复测量5次。

1.4.3 抗弯强度 实验组采取正交实验法, 固体组分为加入质量分数40%, 50%, 60%的纳米磷酸三钙, 液体组分为加入质量分数0%, 5%, 10%, 15%, 20%的HEMA, 共计15组。对照组为纯PMMA组。制备长度80 mm、宽度4 mm、高度10 mm的长方体不同组分骨水泥试件。根据ISO5833标准相关要求^[22], 将试件放置在万能力学机上, 以2 mm/min的速度移动横梁, 直到样品破坏, 计算出抗弯强度。每组骨水泥重复测量5次。

1.4.4 凝固温度和凝固时间 实验组采取正交实验法, 固体组分为加入质量分数40%, 50%, 60%的磷酸三钙, 液体组分为加入质量分数5%, 15%, 25%的HEMA, 共计9组。对照组为纯PMMA组。称量5 g不同组分骨水泥固体, 置于50 mL离心管内, 加入2.5 mL骨水泥液体, 均匀搅拌

1 min, 待骨水泥变成的糊状物后, 将热电偶温度及插入骨水泥中, 记录凝固最高温度 T_{max} (精确至1 °C), 室温为 T_{amb} , 根据ISO5833标准中关于凝固时间的计算公式计算凝固时间 T_{set} ^[22], 精确到5 s。将每次结果化整, 精确到15 s。每组骨水泥重复测量3次。

$$T_{set}=(T_{max}+T_{amb})/2\times 100\%$$

1.4.5 成孔性能 根据骨水泥力学性能和凝固性能筛选出优势组分, 然后将骨水泥试件置于液模拟人细胞外液中, 37 °C水浴恒温浸泡12周后取出, 真空烘干24 h, 导电胶固定在观察台上, 喷金120 s后利用扫描电镜观察骨水泥试件表面形貌。每组骨水泥重复3个样品, 每个样品随机拍摄3个视野, 利用医学图像处理软件ImageProPlus 6(IPP)计算视野内孔径大小及孔密度。

1.4.6 细胞毒性

材料浸提液制备: 向 α -MEM细胞培养基中加入体积分数10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素制备全细胞培养基。将优势组分骨水泥环氧乙烷消毒后, 按照0.2 g : 1 mL比例浸泡在全细胞培养基中, 置于37 °C恒温箱中浸提24 h, 然后800 r/min离心5 min, 取上清液即为骨水泥浸提液, -20 °C保存。

细胞活力检测: 根据国际ISO10993-1994标准^[23], 选用成骨细胞MC3T3-E1细胞株^[24], 复苏传代至第3代, 消化后加入全细胞培养基重悬, 调整细胞浓度为 1×10^8 L⁻¹。向96孔细胞培养板中每孔加入100 μ L细胞悬液, 置于37 °C、体积分数5%CO₂细胞培养箱内孵育24 h, 吸除培养基, 实验组加入100 μ L优势组分骨水泥浸提液, 对照组加入全细胞培养基, 细胞培养箱内继续培养24 h。取除培养板, 每孔加入10 μ L CCK-8溶液, 放入细胞培养箱内孵育2 h, 于酶标仪检测450 nm处的A值, 根据公式计算细胞活力, 每组骨水泥重复5次。

$$\text{细胞活力}(\%)=(\text{实验组}A\text{值}-\text{空白组}A\text{值})/(\text{阴性对照组}A\text{值}-\text{空白组}A\text{值})\times 100\%$$

1.5 主要观察指标 ①不同比例复合骨水泥的力学性能、凝固性能变化; ②优势组分复合骨水泥的成孔性能; ③优势组分复合骨水泥浸提液对细胞活力的影响。

1.6 统计学分析 利用SPSS 24.0统计软件进行统计学分析, 所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间两两比较采用独立样本t检验, 多组比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 各组复合骨水泥的抗压强度 各组分骨水泥的抗压强度结果, 见图1。

与对照组比较, THP60/00组抗压模量降低($P < 0.01$), 其他组抗压模量均升高, 除其中的THP40/05组抗压模量与对照组相比差异无显著性意义外($P > 0.05$), 其余比较均有显著性意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

在实验组组内,当HEMA比例一定时(0%, 5%, 10%), 纳米磷酸三钙质量分数为50%组分的抗压模量优于40%、60%组分($P < 0.05$);当HEMA比例 $\geq 15\%$ 时, 纳米磷酸三钙比例变化对复合骨水泥的抗压模量无明显影响($P > 0.05$)。

在实验组组内,当纳米磷酸三钙比例一定时, 抗压模量在一定范围内随着HEMA比例(0%–15%)的增高逐渐升高;当HEMA比例 $\geq 15\%$ 时, HEMA比例增高对复合骨水泥的抗压模量无明显影响($P > 0.05$)。实验表明磷酸三钙和HEMA的加入,可一定范围内增强复合骨水泥的抗压性能。以PMMA组为参照,其中THP50/00组、THP50/05组、THP50/10组为优势组分。

2.2 各组复合骨水泥的抗弯强度 各组分骨水泥的抗弯强度结果,见**图2**。

与对照组相比,THP40/00组、THP50/00组、THP50/05组及所有磷酸三钙质量分数为60%组分的复合骨水泥抗弯强度明显下降,呈线性关系($P < 0.05$)。

在实验组组内,当HEMA比例一定时,随着纳米磷酸三钙比例的增加,复合骨水泥的抗弯强度逐渐降低;在所有含有HEMA组分的复合骨水泥中,40%纳米磷酸三钙组分的抗弯强度高于60%纳米磷酸三钙组分($P < 0.05$);当HEMA比例为10%, 15%时,50%纳米磷酸三钙组分的抗弯强度高于60%纳米磷酸三钙组分($P < 0.05$)。

在实验组组内,当磷酸三钙比例一定时(40%, 50%),随着HEMA比例(0%–15%)的增加,复合骨水泥的抗弯强度逐渐上升;当HEMA比例 $\geq 15\%$ 时,复合骨水泥的抗弯强度下降,并且THP40/20组、THP50/20组的抗弯强度分别小于THP40/15组、THP50/15组($P < 0.05$);在60%磷酸三钙组分中,复合骨水泥的抗弯强度并没有随着HEMA比例的变化发生明显变化,稳定在35 MPa左右。实验提示磷酸三钙的加入,可显著降低复合骨水泥的抗弯性能,但加入HEMA后可在一定范围内加强复合骨水泥的抗弯性能。以对照组为参照,进一步筛选,发现THP50/10组为优势组分。

2.3 各组复合骨水泥的凝固最高温度和凝固时间 各组复合骨水泥的凝固最高温度结果,见**图3**。各实验组凝固过程中的最高温度都在80 °C左右,与对照组无明显差别,并没有随着磷酸三钙和HEMA比例的变化发生明显变化。

各组复合骨水泥的凝固时间结果,见**图4**。与凝固最高温度不同,复合骨水泥的凝固时间明显受到磷酸三钙、HEMA比例的影响:当HEMA比例一定时,随着磷酸三钙比例的增加,复合骨水泥的凝固时间明显延长;当磷酸三钙比例一定时,随着HEMA比例的增加,复合骨水泥的凝固时间明显缩短。根据ISO5833标准对丙烯酸类骨水泥凝固温度为(90 \pm 5) °C^[22],凝固时间6.5–15 min之间的要求,THP50/10组满足该要求。

2.4 各组复合骨水泥的成孔性能 根据力学性能和凝固性能,选取THP50/00组、THP50/05组、THP50/10组作为

实验组。各组试样在模拟人细胞外液中浸泡12周后,扫描电镜观察骨水泥,见**图5**。发现纯PMMA骨水泥表面光滑、平坦,无明显孔洞存在;在含有磷酸三钙的实验组中,所有骨水泥样品表面在扫描电镜下均可见孔径在100 μm 左右的多孔结构,IPP软件分析结果,见**表1**,在实验组组内孔径、孔密度无明显差别。

表1 各组复合骨水泥在模拟人细胞外液中浸泡12周后的表面成孔性能

Table 1 Pore-forming properties of different groups of composite bone cements after soaking into simulated body fluid for 12 weeks

项目	THP50/00组	THP50/05组	THP50/10组	P值
孔径(μm)	100.8 \pm 20.4	95.9 \pm 18.0	100.6 \pm 15.7	0.830
孔密度(个/ cm^2)	11.1 \pm 1.4	10.0 \pm 2.2	9.5 \pm 1.7	0.394

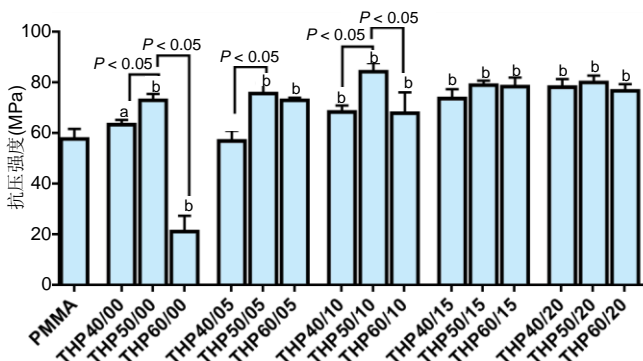
表注: THP50/00 为含质量分数 50%磷酸三钙的聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥, THP50/05 为含质量分数 50%磷酸三钙、质量分数 5%甲基丙烯酸羟乙酯的聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥, THP50/10 为含质量分数 50%磷酸三钙、质量分数 10%甲基丙烯酸羟乙酯的聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥。

2.5 各组复合骨水泥浸提液的细胞毒性 CCK-8法检测在PMMA组、THP50/00组、THP50/05组、THP50/10组骨水泥浸提液中MC3T3-E1细胞的活力变化,结果见**图6**。所有组分骨水泥的相对细胞活力均能达到75%以上,根据ISO10993标准细胞毒性分级为I级^[23],属于无细胞毒性,与对照组属于同一等级。与PMMA骨水泥相比,THP50/00组细胞活力明显较低($P=0.008$);随着复合骨水泥中HEMA比例的升高,各组细胞活力逐渐升高,THP50/05组、THP50/10组细胞活力与对照组比较无差异($P > 0.05$)。

3 讨论 Discussion

PMMA骨水泥应用于临床骨科已有超过60年的历史^[1],目前市售的PMMA骨水泥品牌已超过40种^[21],但这些骨水泥均未能改善PMMA本身生物惰性的缺点,在体内随着骨与骨水泥之间机械性交锁的失效,二者之间将会形成间隙,从而发生磨损,微小的磨损颗粒将会诱导巨噬细胞向促炎性M1表型分化,进而释放炎症因子,引起无菌性松动^[3-4]。研究发现改性的多孔PMMA骨水泥,其孔隙结构有利于组织交换氧气和营养物质,利于排除代谢产物,并诱导细胞黏附生长和细胞外基质沉积,增加了骨与骨水泥的接触面积,显著加强了骨-骨水泥界面^[13]。但是为了满足骨长入的孔径条件,加入大量改性材料将会严重影响复合骨水泥的力学性能^[7-8],而同时由于多孔骨水泥可与骨直接键合,导致骨水泥需承受更大的生物应力^[25],这成为了限制多孔骨水泥发展的重要原因。

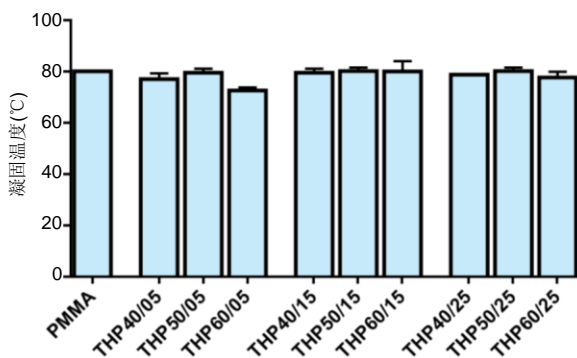
基于以上研究结果,研究向PMMA骨水泥固相中加入纳米磷酸三钙颗粒,并向液相中引入HEMA溶液,制备了新型多孔复合磷酸三钙/HEMA/PMMA骨水泥材料。利用磷酸钙良好的生物相容性和可降解性作为致孔剂,并降低其粒径,以保证复合骨水泥的力学性能;同时加入HEMA,



图注: PMMA 为聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥; THP 为新型多孔磷酸三钙/甲基丙烯酸羟乙酯/聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥, 各组骨水泥命名方式以固体组分中含有质量分数 50% 纳米磷酸三钙, 液体组分中含有质量分数 10% 甲基丙烯酸羟乙酯为例, 表示为 THP50/10 组, 其他组以此类推。与 PMMA 比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

图 1 不同组分复合骨水泥的抗压强度

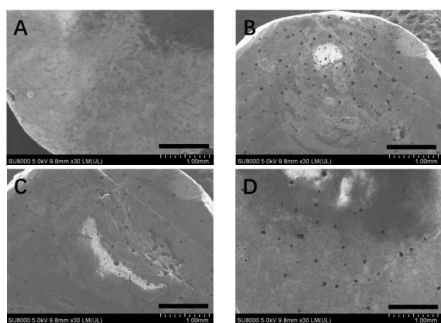
Figure 1 Compressive strength of different composite bone cements



图注: PMMA 为聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥; THP 为新型多孔磷酸三钙/甲基丙烯酸羟乙酯/聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥, 各组骨水泥命名方式以固体组分中含有质量分数 50% 纳米磷酸三钙, 液体组分中含有质量分数 10% 甲基丙烯酸羟乙酯为例, 表示为 THP50/10 组, 其他组以此类推。各组凝固过程中的最高温度都在 80 °C 左右, 无明显差别。

图 3 不同组分复合骨水泥的凝固最高温度

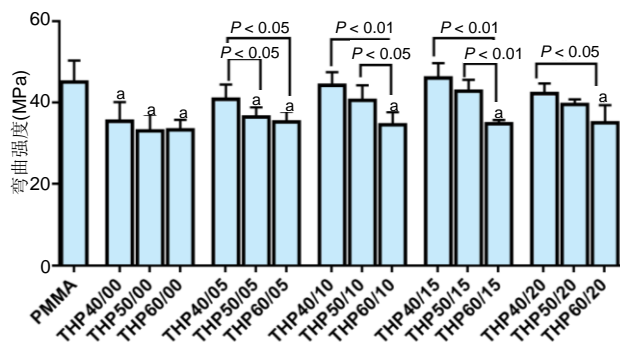
Figure 3 Maximal setting temperature of different composite bone cements



图注: A 为聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥, 表面光滑、平坦, 无明显孔洞存在; B 为含质量分数 50% 磷酸三钙的聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥; C 为含质量分数 50% 磷酸三钙、质量分数 5% 甲基丙烯酸羟乙酯的聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥; D 为含质量分数 50% 磷酸三钙、质量分数 10% 甲基丙烯酸羟乙酯的聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥, 此 3 组骨水泥可见孔径在 100 μm 左右的多孔结构。

图 5 各组复合骨水泥在模拟人细胞外液中浸泡 12 周后的表面情况 (扫描电镜, 标尺为 1 mm)

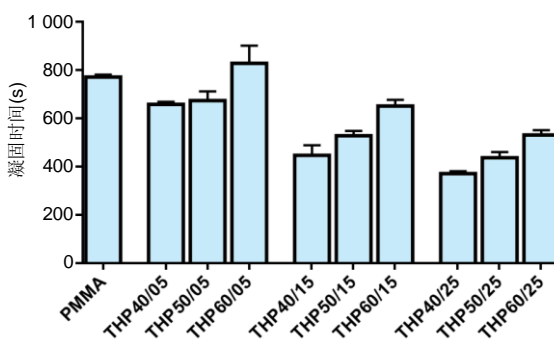
Figure 5 Surface topography of different composite bone cements after soaking into simulated body fluid for 12 weeks (scanning electric microscope, scale bar=1 mm)



图注: PMMA 为聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥; THP 为新型多孔磷酸三钙/甲基丙烯酸羟乙酯/聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥, 各组骨水泥命名方式以固体组分中含有质量分数 50% 纳米磷酸三钙, 液体组分中含有质量分数 10% 甲基丙烯酸羟乙酯为例, 表示为 THP50/10 组, 其他组以此类推。与 PMMA 比较, ^a $P < 0.05$ 。

图 2 不同组分复合骨水泥的抗弯强度

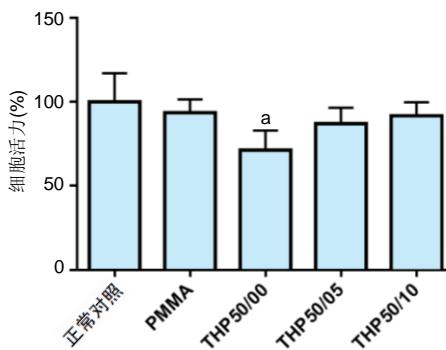
Figure 2 Bending strength of different composite bone cements



图注: PMMA 为聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥; THP 为新型多孔磷酸三钙/甲基丙烯酸羟乙酯/聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥, 各组骨水泥命名方式以固体组分中含有质量分数 50% 纳米磷酸三钙, 液体组分中含有质量分数 10% 甲基丙烯酸羟乙酯为例, 表示为 THP50/10 组, 其他组以此类推。当甲基丙烯酸羟乙酯比例一定时, 随着磷酸三钙比例的增加, 复合骨水泥的凝固时间明显延长; 当磷酸三钙比例一定时, 随着甲基丙烯酸羟乙酯比例的增加, 复合骨水泥的凝固时间明显缩短。

图 4 不同组分复合骨水泥的凝固时间

Figure 4 Setting time of different composite bone cements



图注: PMMA 为聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥; THP50/00 为含质量分数 50% 磷酸三钙的聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥, THP50/05 为含质量分数 50% 磷酸三钙、质量分数 5% 甲基丙烯酸羟乙酯的聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥, THP50/10 为含质量分数 50% 磷酸三钙、质量分数 10% 甲基丙烯酸羟乙酯的聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥。与 PMMA 比较, ^a $P < 0.05$ 。

图 6 各组复合骨水泥浸提液对 MC3T3-E1 成骨细胞活力的影响
Figure 6 Effects of composite bone cement extracts on cell viability of MC3T3-E1 osteoblasts

在骨水泥凝固后,其脂族链沉降在聚合物相内,亲水的羟基从表面突出,增强共聚物和磷酸三钙的连接^[20],进一步增强复合骨水泥的力学性能。探寻新型多孔骨水泥为获得满意骨长入孔径而加入大量纳米磷酸三钙改性后,能否继续保证良好的抗压、抗弯强度及生物安全性。

目前,PMMA骨水泥已被应用于如关节置换^[26-27]、椎体成形^[28-29]、增强内固定骨把持力等骨科临床工作中^[30-31],各种应用的治疗效果已得到肯定,因此新型复合骨水泥的力学性能应匹配乃至优于传统PMMA骨水泥,以满足多样化的临床实际需求。实验表明在≤50%的范围内加入纳米磷酸三钙,可增加复合骨水泥的抗压强度,这与近期其他研究结果相似^[18-19];而单纯加入纳米磷酸三钙,复合骨水泥的抗弯性能下降明显,与磷酸三钙比例呈线性关系,相较于对照组差异显著。而HEMA溶液的加入,可显著加强复合骨水泥的抗压、抗弯性能,使得部分组分复合骨水泥达到甚至超过PMMA的力学性能,但当其比例超过15%时将不再增强,这是由于HEMA中的羟基与磷酸三钙连接饱和,在此基础上继续增加HEMA比例将不再增强力学性能。综上,THP50/10组的抗压强度优于对照组,且二者抗弯强度相比无统计学差异,因此选为最优比例。

凝固性能是评估PMMA骨水泥应用的重要因素,因为骨水泥液相单体聚合时常释放大热量,造成周围组织热坏死^[32],尤其当骨水泥用于椎体成形时,若发生骨水泥泄露,对脊髓损伤的致病因素除了力学挤压外,热灼伤也起了重要作用^[33]。但在体内实验中测得的骨水泥凝固温度却明显低于体外检测结果(49.3 °C左右)^[34],其原因可能是因为实际应用中骨水泥使用量较少,并且血液循环和与其相连的重要组织热消耗降低了凝固温度^[21, 34],但根据相关研究表明,当温度超过42 °C时将会对机体组织造成损害^[32],因此对于骨水泥凝固温度的测量是十分必要的。同时,骨水泥凝固时间过长或过慢均不利于临床应用:若凝固时间过长,将会增加骨水泥泄露的风险,并延长手术时间,增加患者感染概率;若凝固时间过短,又将会降低骨水泥的注射性,增加手术难度^[21]。因此ISO标准明确规定丙烯酸类骨水泥凝固温度因小于(90±5) °C,凝固时间在6.5-15 min之间^[22]。研究发现磷酸三钙和HEMA的比例变化对复合骨水泥的凝固最高温度没有明显影响,在80 °C左右,与市售商品骨水泥凝固温度相似,满足ISO相关标准;而凝固时间随磷酸三钙增加而延长,随HEMA增加而缩短,凝固时间可控。其中THP50/10组满足ISO5833中对于凝固时间的要求^[22]。

目前针对多孔支架骨长入的孔径要求尚没有统一结论,但大部分研究认为适合骨长入的最佳孔径大小为100-400 μm^[35-36]。由于磷酸三钙的降解周期为3-6个月,因此将复合骨水泥支架浸泡在模拟人细胞外液中12周,评估成孔性能。虽然加入的是纳米级磷酸三钙颗粒,但由于纳米材料表面能较高,易发生团聚,因此团聚的颗粒降解

后仍然可形成满意的多孔结构。扫描电镜结果表明,所有实验组复合骨水泥表面均能形成孔径约100 μm的多孔结构,孔径和孔密度不随HEMA比例的变化而改变,满足骨长入的基本条件,提示复合骨水泥拥有良好的成孔性能。

研究所选用的纳米磷酸三钙、HEMA、PMMA骨水泥材料均已被广泛应用于临床各个领域,各自安全性能已得到多年肯定,但是将3者复合后得到的新型骨水泥材料安全性仍需要检测。其中PMMA骨水泥本身具有一定的细胞毒性,这是由于甲基丙烯酸单体在聚合过程中会释放自由基及残留的甲基丙烯酸单体吸收进入体内导致^[37],其释放特点为爆裂式释放,然后为平台期^[38-39],在完全聚合后为生物惰性,无细胞毒性。因此选取小鼠成骨细胞系MC3T3-E1与多孔骨水泥浸提液短期(1 d)培养后^[40],利用CCK-8法计算细胞活力评估材料毒性,结果表明所有组分骨水泥的细胞活力均大于75%,根据ISO10993的相关规定,属于无细胞毒性,表明复合骨水泥拥有良好的生物安全性。同时HEMA的加入可加强细胞活力,进一步保证生物安全性。

综上所述,研究发现利用纳米磷酸三钙、HEMA溶液改性的复合骨水泥材料,能够在加入大量磷酸三钙改性的基础上,保证复合骨水泥优秀的力学强度和可控的凝固性能,并能形成满足骨长入要求的多孔结构,拥有可靠的细胞相容性,是一种具有良好应用前景并能够快速应用于临床的新型骨水泥材料。其中THP50/10组相较拥有最好的综合性能,被选为优选比例。研究将进一步对复合骨水泥的骨诱导能力、体内骨长入能力进行深入探讨。

作者贡献: 周方教授、邱东教授、吕扬、李爱玲进行实验设计,实验实施为高山,实验评估为周方教授,资料收集为高山、袁亮,高山成文,周方教授、邱东教授审核。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金项目(51473004)”的资助。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: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守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: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经北京大学第三医院生物统计学专家审核。

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4.0”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] CHARNLEY J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Joint Surg Br*. 1960;42-B:28-30.

- [2] Mahon OR, O'Hanlon S, Cunningham CC, et al. Orthopaedic implant materials drive M1 macrophage polarization in a spleen tyrosine kinase- and mitogen-activated protein kinase-dependent manner. *Acta Biomater.* 2018;65:426-435.
- [3] Gao X, Ge J, Li W, et al. LncRNA KCNQ1OT1 ameliorates particle-induced osteolysis through inducing macrophage polarization by inhibiting miR-21a-5p. *Biol Chem.* 2018; 399(4): 375-386.
- [4] Antonios JK, Yao Z, Li C, et al. Macrophage polarization in response to wear particles in vitro. *Cell Mol Immunol.* 2013;10(6): 471-482.
- [5] Kim W, Yoon PW, Kwak HS, et al. Primary hybrid THA using a polymethyl methacrylate-precoated stem: A single-center experience with a 10-year minimum follow-up. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017;105(5):1300-1306.
- [6] Ayre WN, Denyer SP, Evans SL. Ageing and moisture uptake in polymethyl methacrylate (PMMA) bone cements. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2014;32:76-88.
- [7] Dall'Oca C, Maluta T, Cavani F, et al. The biocompatibility of porous vs non-porous bone cements: a new methodological approach. *Eur J Histochem.* 2014;58(2):2255.
- [8] Yang J, Zhang K, Zhang S, et al. Preparation of calcium phosphate cement and polymethyl methacrylate for biological composite bone cements. *Med Sci Monit.* 2015;21:1162-1172.
- [9] Lye KW, Tideman H, Wolke JC, et al. Biocompatibility and bone formation with porous modified PMMA in normal and irradiated mandibular tissue. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24 Suppl A 100: 100-109.
- [10] Sa Y, Yu N, Wolke JGC, et al. Bone Response to Porous Poly(methyl methacrylate) Cement Loaded with Hydroxyapatite Particles in a Rabbit Mandibular Model. *Tissue Eng Part C Methods.* 2017;23(5):262-273.
- [11] Sa Y, Yang F, de Wijn JR, et al. Physicochemical properties and mineralization assessment of porous polymethylmethacrylate cement loaded with hydroxyapatite in simulated body fluid. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;61:190-198.
- [12] Wang L, Yoon DM, Spicer PP, et al. Characterization of porous polymethylmethacrylate space maintainers for craniofacial reconstruction. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013;101(5): 813-825.
- [13] Lewis G. Properties of acrylic bone cement: state of the art review. *J Biomed Mater Res.* 1997;38(2):155-182.
- [14] 张森林. 磷酸钙骨水泥的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2003, 16(1): 62-63.
- [15] 陈浩东, 姚金凤, 梁志刚. 磷酸钙的固有骨诱导性及其应用[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(25): 3785-3792.
- [16] Li Y, Jiang T, Zheng L, et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) induced by three calcium phosphate ceramic (CaP) powders: A comparative study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;80:296-300.
- [17] 尚希福, 汤亭亭, 戴魁戎. TCP-PMMA骨水泥-骨界面强度变化的研究[J]. 医用生物力学, 2006, 21(2): 111-114.
- [18] Liu Z, Tang Y, Kang T, et al. Synergistic effect of HA and BMP-2 mimicking peptide on the bioactivity of HA/PMMA bone cement. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015;131:39-46.
- [19] Lewis G. Properties of nanofiller-loaded poly (methyl methacrylate) bone cement composites for orthopedic applications: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017;105(5):1260-1284.
- [20] Wolf-Brandstetter C, Roessler S, Storch S, et al. Physicochemical and cell biological characterization of PMMA bone cements modified with additives to increase bioactivity. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013;101(4):599-609
- [21] Klaus-Dieter Kuhn. PMMA骨水泥[M]. 张克, 吕维加译. 北京: 北京大学医学出版社, 2015.
- [22] 行业标准YY0459-2003/ISO5833:2002丙烯酸类树脂骨水泥: 国家食品药品监督管理局, 2013.
- [23] ISO 10993-11:1994, Biological evaluation of medical devices-Part 11: Tests for systemic toxicity. 2003.
- [24] Langer R, Vacanti JP. *Tissue engineering.* Science. 1993;260 (5110):920-926.
- [25] Fottner A, Nies B, Kitanovic D, et al. Performance of bioactive PMMA-based bone cement under load-bearing conditions: an in vivo evaluation and FE simulation. *J Mater Sci Mater Med.* 2016; 27(9):138.
- [26] Verburg H, van de Ridder LC, Verhoeven VW, et al. Validation of a measuring technique with computed tomography for cement penetration into trabecular bone underneath the tibial tray in total knee arthroplasty on a cadaver model. *BMC Med Imaging* 2014; 14:29.
- [27] Van Susante JLC, Verdonschot N, Bom LPA, et al. Lessons learnt from early failure of a patient trial with a polymer-on-polymer resurfacing hip arthroplasty. *Acta Orthop.* 2018;89(1):59-65.
- [28] Chen C, Li D, Wang Z, et al. Safety and Efficacy Studies of Vertebroplasty, Kyphoplasty, and Mesh-Container-Plasty for the Treatment of Vertebral Compression Fractures: Preliminary Report. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151492.
- [29] Wang H, Sribastav SS, Ye F, et al. Comparison of Percutaneous Vertebroplasty and Balloon Kyphoplasty for the Treatment of Single Level Vertebral Compression Fractures: A Meta-analysis of the Literature. *Pain Physician.* 2015;18(3):209-222.
- [30] Chandra W, Prasad BC, Jagadeesh MA, et al. Segmental polymethylmethacrylate-augmented fenestrated pedicle screw fixation for lumbar spondylolisthesis in patients with osteoporosis - A case series and review of literature. *Neurol India.* 2017;65(1): 89-95.
- [31] Kim JG, Jin YJ, Chung SK, et al. Unilateral augmented pedicle screw fixation for foraminal stenosis. *J Korean Neurosurg Soc.* 2009;46(1):5-10.
- [32] Yimin Y, Zhiwei R, Wei M, et al. Current status of percutaneous vertebroplasty and percutaneous kyphoplasty--a review. *Med Sci Monit.* 2013;19:826-836.
- [33] Wegener B, Zolyniak N, Gülecüyüz MF, et al. Heat distribution of polymerisation temperature of bone cement on the spinal canal during vertebroplasty. *Int Orthop.* 2012;36(5):1025-1030.
- [34] McMahan S, Hawdon G, Baré J, et al. In vivo response of bone defects filled with PMMA in an ovine model. *Hip Int.* 2011;21(5): 616-622.
- [35] Xu HH, Burguera EF, Carey LE. Strong, macroporous, and in situ-setting calcium phosphate cement-layered structures. *Biomaterials.* 2007;28(26):3786-3796.
- [36] Tsuruga E, Takita H, Itoh H, et al. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem.* 1997;121(2):317-324.
- [37] Moreau MF, Chappard D, Lesourd M, et al. Free radicals and side products released during methylmethacrylate polymerization are cytotoxic for osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res.* 1998;40(1): 124-131.
- [38] Bettencourt A, Calado A, Amaral J, et al. In vitro release studies of methylmethacrylate liberation from acrylic cement powder. *Int J Pharm.* 2000;197(1-2):161-168.
- [39] Hoess A, López A, Engqvist H, et al. Comparison of a quasi-dynamic and a static extraction method for the cytotoxic evaluation of acrylic bone cements. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;62:274-282.
- [40] 郭新辉, 吕扬, 范积平, 等. 磷酸钙与聚甲基丙烯酸甲酯制备复合型骨水泥的生物安全性研究[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2016, 31(5): 506-510.