

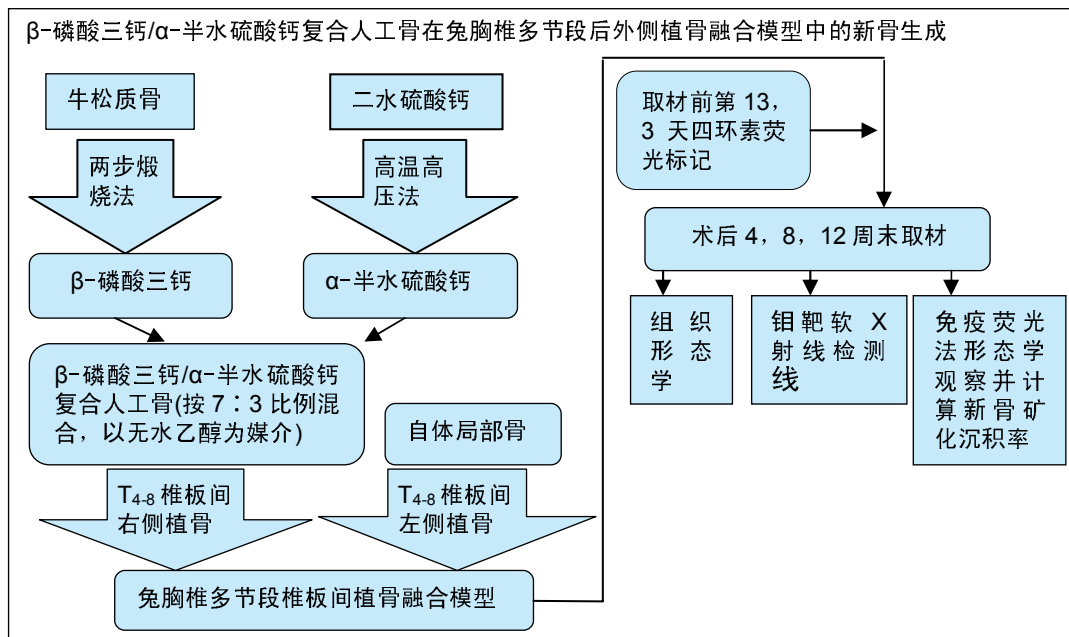
# $\beta$ -磷酸三钙/ $\alpha$ -半水硫酸钙复合人工骨修复兔脊柱多节段椎板间融合的成骨性能

梁茂华<sup>1</sup>, 毛克亚<sup>2</sup>, 夏波<sup>1</sup>, 刘强<sup>1</sup>, 唐佩福<sup>2</sup>, 王继芳<sup>2</sup> (1泰安市中心医院创伤手足外科, 山东省泰安市 271000; 2解放军总医院骨科, 北京市 100853)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1277

ORCID: 0000-0001-5867-8533(梁茂华)

文章快速阅读:



梁茂华, 男, 1976年生, 山东省泰安市人, 医学博士, 主治医师, 主要从事运动医学损伤及生物材料方面的研究。

文献标识码:A

稿件接受: 2019-03-13



## 文题释义:

**复合人工骨:** 实验所使用的复合人工骨, 是利用无水乙醇对人体无害、能够在常温下自行挥发且不与 $\alpha$ -半水硫酸钙发生水化反应的特点, 将其与 $\alpha$ -半水硫酸钙、由牛松质骨经2次煅烧保留了天然骨孔隙的 $\beta$ -磷酸三钙颗粒制成混悬液, 在体温条件下温育, 使无水乙醇挥发完全,  $\alpha$ -半水硫酸钙粉末进入 $\beta$ -磷酸三钙内部孔隙内且黏附在 $\beta$ -磷酸三钙孔隙内部和孔壁上, 使2种材料充分复合, 形成新型复合材料。

**多节段椎板间融合:** 实验通过构建兔胸椎多节段植骨融合模型, 以模拟多节段椎板间植骨需要大量植骨替代材料的临床情境, 进而评价复合人工骨的成骨性能, 融合阶段为 $T_{4-8}$ 节段, 该节段胸椎由于受胸廓限制相对活动度小, 可降低节段间活动度对融合效果的影响。

## 摘要

**背景:** 前期研究制备的 $\beta$ -磷酸三钙/ $\alpha$ -半水硫酸钙复合人工骨材料, 具有良好的力学强度与体外降解性能。  
**目的:** 观察 $\beta$ -磷酸三钙/ $\alpha$ -半水硫酸钙复合人工骨在兔胸椎多节段后外侧植骨融合模型中的新骨生成及降解效能。

**方法:** 取36只雄性新西兰大白兔(解放军总医院医学实验动物中心提供), 去除 $T_4$ - $T_8$ 椎体棘上、下关节突关节、双侧椎板和横突皮质, 右侧植入 $\beta$ -磷酸三钙/ $\alpha$ -半水硫酸钙复合人工骨(实验组), 左侧植入自体骨(对照组)。处死动物前的第13, 3天静脉注射盐酸四环素作荧光标记。术后4, 8, 12周末取出整段胸椎, 进行四环素荧光标记新骨生成形态学观察、钼靶软X射线影像形态学观察与组织学观察。实验经解放军总医院实验动物伦理委员会批准(批准号: 201511007)。

**结果与结论:** ①随着时间的延长, 两组植骨材料的新骨矿化沉积率逐渐下降, 术后4周末时新生骨矿化沉积最快, 实验组术后不同时间点的植骨区新骨矿化沉积率稍慢于对照组, 但组间差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); ②钼靶软X射线显示, 术后4周末, 可见到完整的人工骨外形轮廓及人工骨与骨组织之间清晰的界限; 术后8周末, 人工骨材料的轮廓已经模糊, 新生骨长入人工骨材料内部; 术后12周末, 大部分人工骨已被新生骨爬行替代, 仅在植骨区域中心见到少量人工骨残余物质; ③Giemsa染色显示, 随着时间的延长, 实验组复合人工骨逐渐降解并被新骨包裹, 至术后12周末已完全降解为细小的碎块状结构; ④结果表明,  $\beta$ -磷酸三钙/ $\alpha$ -半水硫酸钙复合人工骨用于兔脊柱多节段椎板间融合, 具有良好的成骨性能与降解性能。

**关键词:**

$\beta$ -磷酸三钙;  $\alpha$ -半水硫酸钙; 复合人工骨; 植骨材料; 生物材料; 复合材料; 脊柱融合; 多节段; 兔; 胸椎; 侧后路

Liang Maohua, MD,  
Attending physician,  
Department of Traumatic  
Hand and Foot Surgery,  
Taian City Central Hospital,  
Taian 271000, Shandong  
Province, China

中图分类号: R459.9; R318.08

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(51772328), 项目负责人: 毛克亚

## Osteogenic property of beta-tricalcium phosphate/alpha-calcium sulphate hemihydrate combined bone graft in multi-segment posterolateral arthrodesis of rabbit thoracic vertebrae

Liang Maohua<sup>1</sup>, Mao Keya<sup>2</sup>, Xia Bo<sup>1</sup>, Liu Qiang<sup>1</sup>, Tang Peifu<sup>2</sup>, Wang Jifang<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Department of Traumatic Hand and Foot Surgery, Taian City Central Hospital, Taian 271000, Shandong Province, China; <sup>2</sup>Department of Orthopedics, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Preliminary studies have revealed that  $\beta$ -tricalcium phosphate/ $\alpha$ -calcium sulphate hemihydrate combined bone graft has ideal biomechanical strength and degradation performance *in vitro*.

**OBJECTIVE:** To observe the new bone formation and resorption of  $\beta$ -tricalcium phosphate/ $\alpha$ -calcium sulphate hemihydrate combined bone graft in rabbit models of multi-segment posterolateral arthrodesis of thoracic vertebrae.

**METHODS:** Thirty-six male New Zealand white rabbits (provided by Experimental Animal Center of General Hospital of PLA) were selected and their superior/inferior articular processes, bilateral vertebral plate and transverse processes of T<sub>4</sub>-T<sub>8</sub> were removed.  $\beta$ -Tricalcium phosphate/ $\alpha$ -calcium sulphate hemihydrate combined bone grafts were transplanted into the right side (experimental group), and autologous bone was transplanted into the another side (control group). Tetracycline hydrochloride was injected through vein as fluorescent mark 13 and 3 days before the rabbits were euthanized. Thoracic segments of spine were removed at 4, 8 and 12 weeks postoperatively. Tetracycline hydrochloride staining was used to observe the morphology of newly formed bones. Molybdenum soft X-ray was used for morphological observation and histological observation was conducted. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee of General Hospital of PLA, approval number: 201511007.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) The new bone mineral appositional rate of graft materials in the two groups decreased with time, and peaked at the end of postoperative 4 weeks. The new bone mineral appositional rate in the graft area at postoperative different time points in the experimental group was lower than that in the control group ( $P > 0.05$ ). (2) Mammography revealed that the contours of combined bone grafts and boundaries between graft and bones were clear at the end of postoperative 4 weeks, but contours of combined bone grafts were blurred at the end of postoperative 8 weeks and the new bones grew into scaffolds of combined bone grafts. The graft materials were crawling substituted by new bones at the end of postoperative 12 weeks, and there were only small amount of remains at the central of graft sites. (3) Giemsa staining showed that combined bone graft materials degraded gradually, and were surrounded by new bone over time; these materials had completely degraded into fine fragments by the end of 12 weeks after operation. (4) Our results indicate that  $\beta$ -tricalcium phosphate/ $\alpha$ -calcium sulphate hemihydrate combined graft in the multi-segment posterolateral arthrodesis of rabbit thoracic vertebrae holds good osteogenic property and degradation property.

**Key words:**  $\beta$ -tricalcium phosphate;  $\alpha$ -calcium sulphate hemihydrate; combined bone graft; bone graft; biomaterial; combined material; spinal arthrodesis; multi-segments; rabbit; thoracic vertebrae; posterolateral approach

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 51772328 (to MKY)

## 0 引言 Introduction

脊柱植骨融合是各类脊柱疾病最常见的外科解决方法,随着该类手术数量的逐年增加,对移植骨量的需求也在逐年增加。骨的愈合及节段间活动度的恢复,取决于植骨材料的特性。由于兼具成骨活性、骨诱导性及骨传导性,自体髂骨移植被认为是脊柱融合的金标准<sup>[1]</sup>,然而自体骨骨量有限,加之需要额外的手术过程及取骨区存在并发症,自体骨植骨尚不完美。

随着用于替代自体骨的各类生物材料的发展演化,对研制各类生物骨替代材料的兴趣也在逐渐增加。理想的植骨材料应该具有自体骨的一切特性,同时还应有低免疫原性及无疾病传播的风险。近几十年来,各类同种异体骨及人工合成材料得以研制,使用骨移植替代物或填充物已成为一个竞争剧烈的商业市场,然而目前离大量临床应用尚有很大差距,而且因为理化性质的特点,单独使用一种植骨替代材料常常无法完全满足植骨融合的要求,目前的研究主要集中在联合两种或多种植骨材料,使其理化性质更加接近自体骨的特性<sup>[2]</sup>。

前期采用 $\beta$ -磷酸三钙及 $\alpha$ -半水硫酸钙制备了复合人工植骨替代材料<sup>[3]</sup>,通过将两种材料按照不同配比混合并研究其理化性质,发现随着 $\alpha$ -半水硫酸钙在复合材料中占

比的增高,其固化后的抗压强度逐渐增强;当 $\alpha$ -半水硫酸钙在材料中的占比降低,其降解速度逐渐降低,当 $\alpha$ -半水硫酸钙与 $\beta$ -磷酸三钙质量比为3:7时,其养护7d后的抗压强度为7.32 MPa,高于纯磷酸三钙的抗压强度4.47 MPa,既能达到提高复合人工骨力学强度的目的,又不因硫酸钙含量过高而导致降解速度过快,引发植骨区形成腔隙<sup>[4]</sup>。实验将 $\beta$ -磷酸三钙/ $\alpha$ -半水硫酸钙复合人工骨( $\beta$ -磷酸三钙与 $\alpha$ -半水硫酸钙质量比为7:3)用于兔胸椎多节段侧后路脊柱融合模型中,旨在达到检验其新骨矿化沉积效能、材料降解及与新骨结合形态学特征的目的。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机分组设计、对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年3月至9月在解放军总医院骨科研究所完成。

1.3 材料 盐酸四环素(百灵克生物技术公司);速眠新II号(解放军军事医学科学院军事兽医研究所产品,1.5 mL/支);氯胺酮(福建古田药业有限公司产品,2 mL/支);戊巴比妥钠(中国医药集团上海化学试剂有限公司产品,1 g/瓶);日本奥林巴斯NP70型显微镜;德国徕卡1600型硬组织切片仪;日本尼康图像数字化分析仪;美国GE铂靶软X

射线照相机。复合人工骨原材料, 见表1。

表1 复合人工骨原材料理化性能介绍

Table 1 Combined bone grafts

项目	$\beta$ -磷酸三钙	$\alpha$ -半水硫酸钙
来源	牛松质骨锻烧制备	经二水硫酸钙制备
制备方法	两步煅烧法	高温高压法制备
组成成分	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\text{CaSO}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$
材料外形	颗粒状	粉末状
理化性质	经 X 射线衍射证实符合 $\beta$ -磷酸三钙成分	经 X 射线衍射证实符合 $\alpha$ -半水硫酸钙
功能	植骨替代材料	植骨替代材料

**实验动物:** 健康雄性新西兰大白兔36只, 由解放军总医院医学实验动物中心提供, 体质量2.5-3.0 kg。

**1.4 实验方法** 实验方案经解放军总医院实验动物伦理委员会批准(批准号: 201511007), 所有动物均在麻醉下实施手术, 在取材时实施安乐死, 按照动物实验伦理要求最大限度降低其痛苦及不适。

**1.4.1 复合人工骨的制备** 将 $\alpha$ -半水硫酸钙粉末按照固液比为1 g/2 mL放入无水乙醇中, 搅拌均匀, 制备成 $\alpha$ -半水硫酸钙-无水乙醇混悬液; 按照 $\beta$ -磷酸三钙脱有机质骨颗粒/ $\alpha$ -半水硫酸钙粉末质量比7:3称取 $\beta$ -磷酸三钙颗粒, 将其倒入上述混悬液中再次搅拌均匀, 将上述混悬液放入37 °C电热通风干燥箱中, 使无水乙醇自然挥发, 干燥至恒质量。

**1.4.2 模型制备** 取36只新西兰大白兔, 首先将速眠新II号1.5 mL、氯胺酮2 mL混合, 为实验动物实施肌肉注射麻醉, 每只大白兔按照0.2 mL/kg给药。动物取俯卧位, 将四肢固定于专用手术台上, 8%NaS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>溶液术区脱毛, 消毒铺巾, 取背部正中切口, 逐层显露T<sub>4</sub>-T<sub>8</sub>椎体棘突, 沿棘突、两侧椎板一直显露至横突末端, T<sub>4</sub>-T<sub>8</sub>椎体棘突用咬骨钳咬下作为自体局部骨备用, 将上、下关节突关节、双侧椎板和横突用牙科磨钻打磨, 以去除皮质, 将复合人工骨按照每只动物3 g剂量植于右侧椎体横突及椎板间(实验组), 将刚刚取下的等量自体局部骨植于同水平左侧横突及椎板间(对照组)。

**1.4.3 术后处理** 术后将动物分笼饲养, 定期定量投放饮食。术后连续2 d肌注青霉素, 2次/d, 40×10<sup>4</sup> U/次。每天定期观察动物手术切口有无红肿及渗液, 愈合情况如何, 同时注意观察动物活动、饮食、精神状况。于实施安乐死前第13, 3天2次按照30 mg/kg剂量给予所有实验动物静脉注射盐酸四环素作荧光标记, 2次间隔给药时间为10 d。

**1.5 主要观察指标** 术后4, 8, 12周末, 每个时间点随机取12只兔, 给予100 mg/kg戊巴比妥钠腹腔内注射实施安乐死, 整块取出融合节段胸椎并剔除附着之软组织。标本经脱水脱脂、浸液包埋等程序后, 采用Leica1600硬组织切片机对于T<sub>4-8</sub>运动节段脊柱融合处标本进行切片, 分别切取厚度为50, 200  $\mu\text{m}$ 的切片, 前者用于Giemsa染色观察材料周围骨长入情况, 以及荧光显微镜观察四环素荧光双标线情况; 后者行钼靶软X射线检查显像检查(拍摄条件25 kV, 86 mAs, 115 ms)。

**新骨矿化速率的测量:** 各个时间点所有实验动物均选取标本, 每个标本于T<sub>4-8</sub>运动节段脊柱融合处随机切片3张, 每个切片双侧各随机选取3个视野, 用荧光显微镜观察均四环素金黄色的荧光双标线, 计算机图像采集系统对图像进行采样, 用尼康图像数字化分析仪测量2条矿化带的前沿垂直距离, 每个视野随机选取1个数据, 按照Parffit方法计算出新骨矿化沉积速率<sup>[5]</sup>: 
$$v = \frac{L \times \pi / 4}{\Delta t}$$

其中, v为新骨的矿化沉积率; L为2条四环素标记线(内标记带内缘到外标记带内缘)的平均距离, 代表2次给药之间形成的新骨的矿化带厚度;  $\Delta t$ 为2次给药的间隔天数。

**1.6 统计学分析** 将上述步骤获得的数据录入SPSS 19.0版软件包, 用单因素方差分析方法对结果进行统计分析。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 36只新西兰大白兔均进入结果分析。

**2.2 四环素荧光标记新骨生成形态学观察结果**

**对照组:** 实验全程皆可见植骨区内浓聚的荧光标记, 术后4周末时, 四环素荧光标记线主要位于自体骨植骨区域边缘; 术后8周末时, 荧光标记已出现在植骨块中央地区, 说明在此时段新骨沉积到达自体植骨的内部, 此时四环素双标线为实验全程最整齐清晰时段, 说明此时新骨矿化沉积最活跃; 至术后12周末时, 自体骨植骨区中央及无缘地带的荧光标记已经显著减少, 说明这时新骨矿化沉积速率显著减低, 见图1。

**实验组:** 同自体植骨区一致, 实验全程皆可见复合人工骨植骨区中浓聚的四环素荧光标记, 材料被荧光物质围绕, 术后8周末时, 复合人工骨区域四环素荧光标线最为整齐清晰, 说明此时新骨生成沉积最活跃; 术后4周末时, 四环素荧光标线主要位于复合人工骨的边缘地带; 术后8, 12周末时, 四环素荧光标记线已进入复合人工骨中央区域, 说明新生骨已爬行长入复合人工骨中央区域, 见图2。

**新骨矿化沉积率:** 随着时间的延长, 两组植骨材料的新骨矿化沉积率逐渐下降, 复合人工骨植骨区术后不同时间点的新骨矿化沉积率均较自体骨植骨区域稍慢, 但组间差异均无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见表2。

表2 两组术后不同时间点新骨矿化沉积率的对比 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\mu\text{m}/\text{d}$ )

Table 2 Comparison of new bone mineral appositional rate between experimental and control groups at postoperative different time points

组别	术后4周末	术后8周末	术后12周末
对照组	2.037±0.154	1.975±0.174	1.781±0.159
实验组	1.919±0.176	1.795±0.128	1.693±0.148
P值	> 0.05	> 0.05	> 0.05

**2.3 钼靶软X射线影像形态学观察结果** 术后4周末时, 尚可见到完整的复合人工骨外形轮廓及复合人工骨与骨组织之

间清晰的界限,复合人工骨明显比周边骨组织密度高,可见复合人工骨材料孔隙性结构;至术后8周末时,复合人工骨密度已显著降低,与周围骨组织密度逐渐接近,复合人工骨材料轮廓已模糊,新生骨长入复合人工骨材料内部;术后12周末时,复合人工骨密度已达到与周围骨组织相同水平,已难以分辨复合人工骨轮廓,仅在植骨区域中心见到少量复合人工骨残余物质,大部分复合人工骨已被新生骨爬行替代,见图3。

## 2.4 组织学Giemsa染色观察结果

**实验组:** 术后4周末时,复合人工骨中的 $\alpha$ -半水硫酸钙已被全部吸收降解,仅见到 $\beta$ -磷酸三钙,结构完整清晰,未见材料周边有降解痕迹,可见 $\beta$ -磷酸三钙周边区域有新生骨生成包绕;至术后8周末时, $\beta$ -磷酸三钙周边新生骨进一步增多并爬行入材料内部,已对材料形成包围,但新生骨骨小梁结构凌乱而不规则,边缘可见其少量降解碎片,材料染色较术后4周末时明显变淡;至术后12周末时,新生骨组织完全包围,可见增粗的骨小梁结构, $\beta$ -磷酸三钙材料边缘可见大量降解而成的碎片状结构, $\beta$ -磷酸三钙结构已不清晰,见图4。

**对照组:** 术后4周末时,自体骨植骨区可见杂乱稀疏的骨小梁,有核的新生骨出现于自体植骨块周围,但占绝大多数的仍然是淡染的无核自体骨植骨块;术后8周末时,新生骨组织进一步增多,占据视野主导地位的已是有核的新生骨组织,但新生骨骨小梁排列杂乱、稀疏而无规则;术后12周末时,自体骨植骨区域已形成大量新生骨组织,自体骨植骨块被新生骨完全取代,骨小梁排列整齐、规则,局部仅可见少量无核的自体骨植骨块,见图5。

## 3 讨论 Discussion

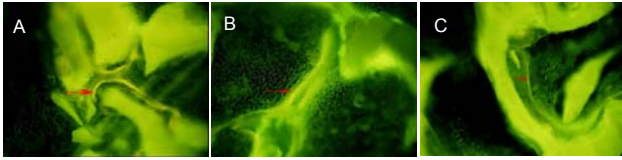
目前常用的人工替代材料中,无机植骨材料具有来源广泛、生物相容性高、力学强度适宜、在一定条件下可体内降解等特点<sup>[6-7]</sup>。羟基磷灰石是目前最常应用的单一无机植骨材料,体外研究表明其有促进基质干细胞生长、分化的作用,基质干细胞可在羟基磷灰石表面黏附与增殖<sup>[8-10]</sup>。用羟基磷灰石治疗动物临界尺寸骨缺损,能够促进骨的修复愈合,说明羟基磷灰石作为植骨替代材料具备了骨传导性<sup>[11]</sup>。然而多个独立的体外实验显示,在 $\beta$ -磷酸三钙支架中基质干细胞的黏附、增殖、分化、长入及骨诱导因子表达,均明显优于羟基磷灰石及硫酸钙等市售人工材料,说明 $\beta$ -磷酸三钙材料是一种理想的骨传导支架及植骨替代材料<sup>[12-15]</sup>。

具有孔隙结构的植骨材料有利于输送营养物质和代谢废物的排出,有利于细胞代谢、血管长入及骨诱导因子的内附,使基质干细胞时期分化,进一步促进发挥骨诱导活性<sup>[16]</sup>。研究表明,植骨材料的孔隙达到50  $\mu\text{m}$ 直径时即可允许骨细胞长入<sup>[17]</sup>。Demirel等<sup>[18]</sup>的研究表明,具有高孔隙率和较好孔间交联率的支架材料,接种入基质干细胞后细胞活性会更好。Pihlman等<sup>[19]</sup>将一种 $\beta$ -磷酸三钙材料微颗

粒构成的新型多孔支架植入兔颅骨临界性缺损,发现4周后已有血管侵入孔隙内。课题组前期实验表明,牛松质骨在特定条件下经化学处理及物理煅烧可获得的 $\beta$ -磷酸三钙材料,既保留了天然骨孔隙结构又彻底去除了异种抗原及其他化学成分<sup>[4]</sup>,所以此次研究中复合人工骨所使用的 $\beta$ -磷酸三钙材料,保留了天然松质骨的骨孔隙,有利于毛细血管、骨细胞的长入及营养物质的输送。

虽然 $\beta$ -磷酸三钙有优秀的骨传导性能,但能否以适当的速度降解并被新生骨取代,也是影响其使用前景的重要因素<sup>[2]</sup>。有研究表明,纯 $\beta$ -磷酸三钙植入体内后可保持6个月之久不发生降解,而完全被新生骨替代则需要长达1年的时间<sup>[20]</sup>。 $\beta$ -磷酸三钙是通过耐酒石酸磷酸酶阳性细胞及破骨细胞介导的途径降解的,植入患者体内二三周后, $\beta$ -磷酸三钙的外围出现降解并逐渐向中央蔓延<sup>[21]</sup>。研究表明,破骨细胞分泌酸性物质来降解骨矿物质,所以模仿酸性环境可增加 $\beta$ -磷酸三钙的降解<sup>[22]</sup>。通过向 $\beta$ -磷酸三钙中加入不同植骨材料组成复合人工骨,可调节其理化性质,甚至可对材料超微结构进行调整,满足不同的临床需要<sup>[8]</sup>。临床试验表明在长达6个月的愈合期内,对比单相 $\beta$ -磷酸三钙,羟基磷灰石/ $\beta$ -磷酸三钙双相植骨材料在保持植骨部位新生骨体积方面更有优势<sup>[23]</sup>。添加了硫酸钙的羟基磷灰石对基质干细胞增殖与分化有明显上调作用<sup>[24]</sup>。Leventis等<sup>[25]</sup>将 $\beta$ -磷酸三钙加入硫酸钙用于修复兔颅骨去皮质缺损,发现术后8周末愈合区新生骨厚度明显大于单独使用 $\beta$ -磷酸三钙或同种异体骨植骨材料。因此,此次实验设想利用硫酸钙较快的降解速度为新生骨早期长入留出空间,同时硫酸钙降解时形成的微酸性环境可起到促进 $\beta$ -磷酸三钙降解的作用<sup>[26]</sup>。课题组前期研究表明,通过调节 $\alpha$ -半水硫酸钙在复合人工骨中的占比,可调解硫酸钙降解时形成的微酸性环境酸碱度,进一步调节复合人工骨的降解速度,使其达到与新骨长入速度相匹配的程度。

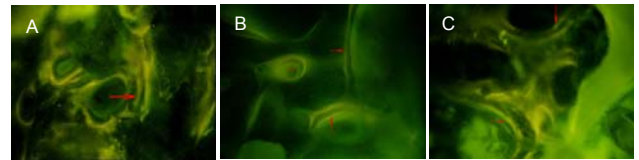
硫酸钙是最早应用于临床的植骨替代材料,生物相容性好,具有自固化特性,固化后初始力学强度高<sup>[27]</sup>。临床上常对 $\alpha$ -半水硫酸钙遇水生成二水硫酸钙的自固化过程加以利用,研究表明通过调整 $\alpha$ -半水硫酸钙的含量,可调整植骨材料的固化时间及固化强度,以满足不同的临床需要<sup>[28]</sup>。在课题组前一个阶段的研究中,通过调节 $\alpha$ -半水硫酸钙在复合人工骨中的占比,可调节复合人工骨的固化强度,当 $\alpha$ -半水硫酸钙/ $\beta$ -磷酸三钙=3:7时,其抗压强度在养护7 d后为7.32 MPa,接近纯 $\beta$ -磷酸三钙抗压强度的2倍,比自体新鲜松质骨的强度略高,可用于负重部位的骨缺损修复<sup>[4]</sup>。谭海涛等<sup>[29]</sup>曾将 $\alpha$ -半水硫酸钙及 $\beta$ -磷酸三钙按照1:1的比例用于兔脊柱多节段后外侧植骨融合,人工骨融合率达到了与自体骨植骨类似的效果,但该实验没有为脊柱融合区域内新骨生成效果提供数据依托。所以,此次研究中结合前期实验数据,优化了复合人工骨2种材料的配比,利用盐酸四环素在随新生骨矿物质沉积的特性,用荧光显像方法观察2次注射



图注: 图中 A 为术后 4 周末, 自体骨植骨区显示清晰的四环素双标线; B 为术后 8 周末, 自体骨植骨区显示清晰的四环素双标线; C 为术后 12 周末, 自体骨植骨区四环素双标线较前减少。箭头所示为四环素双标线。

图 1 对照组术后不同时间点植骨区四环素荧光标记新骨生成形态学观察( $\times 20$ )

Figure 1 Morphological observation of newly formed bones observed by tetracycline fluorescent labeling in the control group at postoperative different time points ( $\times 20$ )



图注: 图中 A 为术后 4 周末时, 复合人工骨植骨区可见材料周围包裹的四环素双标线; B 为术后 8 周末时, 复合人工骨植骨区可见清晰、规则的四环素双标线; C 为术后 12 周末时, 复合人工骨植骨区模糊, 四环素双标线数量减少。箭头所指为四环素双标线。

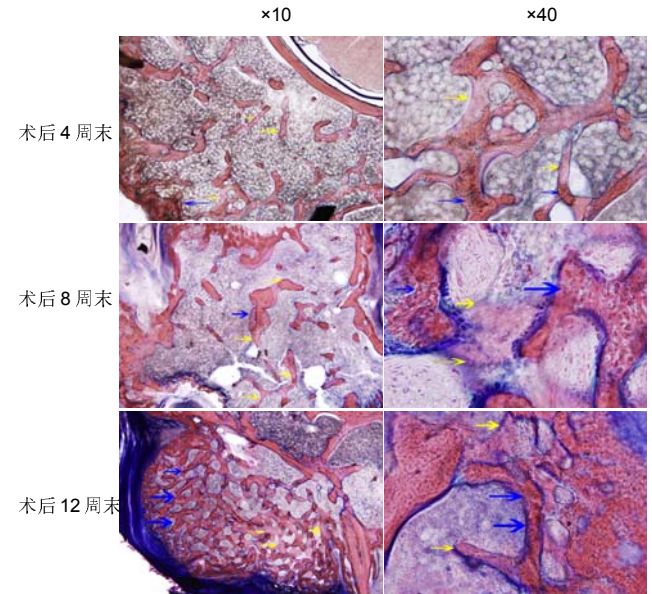
图 2 实验组术后不同时间点植骨区四环素荧光标记新骨生成形态学观察( $\times 20$ )

Figure 2 Morphological observation of newly formed bones observed by tetracycline fluorescent labeling in the experimental group at postoperative different time points ( $\times 20$ )



图注: 图中 A 为术后 4 周末时, 复合人工骨密度高于周围骨组织, 结构清晰, 与周围骨组织界限明显, 见箭头示; B 为术后 8 周末时, 部位复合人工骨密度较前显著降低(红色箭头所指), 轮廓模糊, 新生骨长入材料内部(黄色箭头所指); C 为术后 12 周末时, 仅在植骨区域中心见到少量复合人工骨残余物质(红色箭头所指), 新生骨爬行替代并包裹植骨材料(黄色箭头所指)。

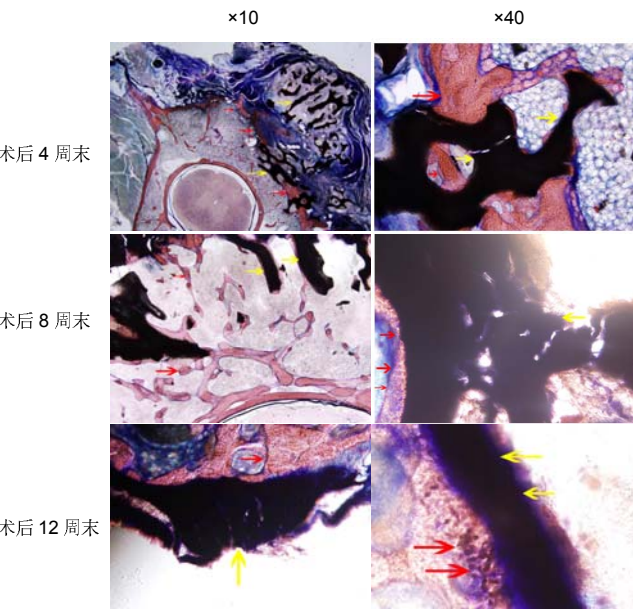
图 3 实验组术后不同时间点植骨区钼靶软 X 射线影像形态学观察  
Figure 3 Mammography images of the graft area in the experimental group at postoperative different time points



图注: 术后 4 周末, 自体骨植骨区骨小梁稀疏, 仅见少量新骨长入; 术后 8 周末, 自体骨植骨区新生骨长入明显增多, 但骨小梁依然稀疏; 术后 12 周末, 自体骨植骨区有核的新生骨占据视野主要部分, 骨小梁编织成网状。蓝色箭头所指为深染有核的新生骨, 黄色箭头所指处为淡染无核的自体骨。

图 5 对照组术后不同时间点植骨区组织学观察(Gimsa 染色)

Figure 5 Histological images of graft area in the control group at postoperative different time points (Gimsa staining)



图注: 术后 4 周末时, 材料结构清晰, 材料边缘可见新骨生成, 材料无降解; 术后 8 周末时, 材料较前淡染, 材料边缘可见斑片状降解碎片, 边缘模糊不清; 术后 12 周末, 材料已无先前清晰结构, 材料边缘新骨明显增多。红色箭头所指处为新生骨, 黄色箭头所指处为人工骨。

图 4 实验组术后不同时间点植骨区组织学观察(Gimsa 染色)  
Figure 4 Histomorphometric images of graft area in the experimental group at postoperative different time points (Gimsa staining)

盐酸四环素间期内新骨矿化带厚度, 并计算新骨沉积率。实验结果显示, 复合人工骨植骨区内的新骨沉积率实验全程与自体局部骨植骨区无统计学差别, 说明复合人工骨用于兔胸椎多节段的侧后路植骨, 在新骨生成效能方面已达到接近自体植骨水平, 该人工骨具有理想的骨传导性能。

实际上, 对于此种复合人工骨的应用不应仅局限于直接植入骨缺损部位。Orellana 等<sup>[30]</sup>的研究表明, 硫酸钙能够将添加入其中的大、小分子持续缓慢释放, 可作为某些治疗因子的载体使用。因此, 目前的研究常常将植骨材料中加入硫酸钙, 作为抗生素、骨诱导材料等的载体<sup>[31-33]</sup>。Sakata 等<sup>[34]</sup>的研究表明, 向多孔 $\beta$ -磷酸三钙材料中添加富血小板血浆, 可提高骨再生效果。本试验所有复合材料中,  $\alpha$ -半水硫酸钙具有亲水的特性, 有利于早期吸附植骨床中

的渗血,可聚集骨诱导因子,而保留了天然松质骨孔隙的 $\beta$ -磷酸三钙材料,可方便细胞及血管的长入。因此可展望将此次实验所使用复合材料载入骨诱导因子及抗生素,或者作为构建组织工程骨的支架材料,满足不同的临床需要,当然这依赖于更多的体内、外研究数据加以支持。

**作者贡献:** 梁茂华、毛克亚进行实验设计,实验实施为梁茂华、夏波、刘强,实验评估为全部作者,资料收集为刘强,梁茂华成文,唐佩福、王继芳审核。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金资助项目(51772328)”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不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验经解放军总医院实验动物伦理委员会批准(批准号:201511007)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。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。

**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解放军总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] Abdullah KG, Steinmetz MP, Benzel EC, et al. The state of lumbar fusion extenders. Spine (Phila Pa 1976). 2011;36(20):E1328-1334.
- [2] Buser Z, Brodke DS, Youssef JA, et al. Synthetic bone graft versus autograft or allograft for spinal fusion: a systematic review. J Neurosurg Spine. 2016; 25(4):509-516.
- [3] Mao K, Cui F, Li J, et al. Preparation of combined  $\beta$ -TCP/ $\alpha$ -CSH artificial bone graft and its performance in a spinal fusion model. J Biomater Appl. 2012; 27(1):37-45.
- [4] 毛克亚, 李江涛, 杨云, 等.  $\beta$ -TCP/ $\alpha$ -CSH复合植骨材料的制备与理化性能检测[J]. 生物医学工程与临床, 2011, 15(3):205-209.
- [5] Parfitt AM. Bone histomorphometry: proposed system for standardization of nomenclature, symbols, and units. Calcif Tissue Int. 1988;42(5):284-286.
- [6] Pierannunzi L, Zagra L. Bone grafts, bone graft extenders, substitutes and enhancers for acetabular reconstruction in revision total hip arthroplasty. EFORT Open Rev. 2016;1(12):431-439.
- [7] Fillingham Y, Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. Bone Joint J. 2016;98-B(1 Suppl A):6-9.
- [8] Rh OG, Dard M, Larjava H. Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2018;106(6): 2493-2512.
- [9] Barbanti BG, Griffoni C, Nataloni A, et al. Biomaterials as bone graft substitutes for spine surgery: from preclinical results to clinical study. J Biol Regul Homeost Agents. 2017;31(4 suppl 1):167-181.
- [10] Pulyala P, Singh A, Dias-Netipanyj MF, et al. In-vitro cell adhesion and proliferation of adipose derived stem cell on hydroxyapatite composite surfaces. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017;75: 1305-1316.
- [11] Oliveira HL, WLO DR, Cuevas-Suárez CE, et al. Histological Evaluation of Bone Repair with Hydroxyapatite: A Systematic Review. Calcif Tissue Int. 2017;101(4):341-354.
- [12] Li B, Liu Z, Yang J, et al. Preparation of bioactive  $\beta$ -tricalcium phosphate microspheres as bone graft substitute materials. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017;70(Pt 2): 1200-1205.
- [13] Fathima H, Harish. Osteostimulatory effect of bone grafts on fibroblast cultures. J Nat Sci Biol Med. 2015;6(2):291-294.
- [14] Dahabreh Z, Panteli M, Pountos I, et al. Ability of bone graft substitutes to support the osteoprogenitor cells: An in-vitro study. World J Stem Cells. 2014;6(4):497-504.
- [15] Barradas AM, Monticone V, Hulsman M, et al. Molecular mechanisms of biomaterial-driven osteogenic differentiation in human mesenchymal stromal cells. Integr Biol (Camb). 2013;5(7):920-931.
- [16] 毛文文, 茹江英. 羟基磷灰石类陶瓷在骨组织工程中的研究与更广泛应用[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(30):4855-4863.
- [17] Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Jinno Y, et al. Micro-computed tomography analysis of early stage bone healing using micro-porous titanium mesh for guided bone regeneration: preliminary experiment in a canine model. Odontology. 2017;105(4):408-417.
- [18] Demirel M, Aksakal B. Effect of porosity on the structure, mechanical properties and cell viability of new bioceramics as potential bone graft substitutes. Acta Bioeng Biomech. 2018;20(2):11-22.
- [19] Pihlman H, Keränen P, Paakinaho K, et al. Novel osteoconductive  $\beta$ -tricalcium phosphate/poly(L-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone) scaffold for bone regeneration: a study in a rabbit calvarial defect. J Mater Sci Mater Med. 2018;29(10):156.
- [20] Okada T, Kanai T, Tachikawa N, et al. Histological and Histomorphometrical Determination of the Biogradation of  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Granules in Maxillary Sinus Floor Augmentation: A Prospective Observational Study. Implant Dent. 2017;26(2):275-283.
- [21] Tanaka T, Komaki H, Chazono M, et al. Basic research and clinical application of beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP). Morphologie. 2017;101(334): 164-172.
- [22] Matsunaga A, Takami M, Irié T, et al. Microscopic study on resorption of  $\beta$ -tricalcium phosphate materials by osteoclasts. Cytotechnology. 2015; 67(4):727-732.
- [23] Jelusic D, Zirk ML, Fienitz T, et al. Monophasic  $\beta$ -TCP vs. biphasic HA/ $\beta$ -TCP in two-stage sinus floor augmentation procedures - a prospective randomized clinical trial. Clin Oral Implants Res. 2017;28(10):e175-e183.
- [24] Fouad H, AlFotawi R, Allothman OY, et al. Porous Polyethylene Coated with Functionalized Hydroxyapatite Particles as a Bone Reconstruction Material. Materials (Basel). 2018;11(4). pii: E521. doi: 10.3390/ma11040521.
- [25] Leventis M, Fairbairn P, Mangham C, et al. Bone Healing in Rabbit Calvaria Defects Using a Synthetic Bone Substitute: A Histological and Micro-CT Comparative Study. Materials (Basel). 2018;11(10). pii: E2004. doi: 10.3390/ma11102004.
- [26] Shih TC, Teng NC, Wang PD, et al. In vivo evaluation of resorbable bone graft substitutes in beagles: histological properties. J Biomed Mater Res A. 2013; 101(8):2405-2411.
- [27] Pförringer D, Harrasser N, Mühlhofer H, et al. Osteoinduction and -conduction through absorbable bone substitute materials based on calcium sulfate: in vivo biological behavior in a rabbit model. J Mater Sci Mater Med. 2018; 29(2):17.
- [28] Tan V, Evaniew N, Finlay K, et al. Chronology of the Radiographic Appearances of the Calcium Sulfate-Calcium Phosphate Synthetic Bone Graft Composite Following Resection of Bone Tumors: A Follow-up Study of Postoperative Appearances. Can Assoc Radiol J. 2016;67(1):21-27.
- [29] 谭海涛, 孟志斌, 李俊, 等.  $\beta$ 磷酸三钙和 $\alpha$ 半水硫酸钙复合人工骨生物相容性及在脊柱融合模型中的应用[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(26):4119-4124.
- [30] Orellana BR, Hilt JZ, Puleo DA. Drug release from calcium sulfate-based composites. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2015;103(1):135-142.
- [31] Wu CC, Huang YK, Chang WJ, et al. Limitation of the antibiotic-eluting bone graft substitute: An example of gentamycin-impregnated calcium sulfate. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2018;106(1): 80-87.
- [32] 王睿, 耿广起, 丛晓明, 等. 载三联抗骨质疏松钙/聚氨基酸缓释材料在兔脊柱结核模型体内的缓释性能[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(10):1520-1526.
- [33] Civinini R, Capone A, Carulli C, et al. The kinetics of remodeling of a calcium sulfate/calcium phosphate bioceramic. J Mater Sci Mater Med. 2017;28(9):137.
- [34] Sakata M, Tomomura H, Itsuji T, et al. Bone Regeneration of Osteoporotic Vertebral Body Defects Using Platelet-Rich Plasma and Gelatin  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Sponges. Tissue Eng Part A. 2018; 24(11-12): 1001-1010.