文章编号:1000-5404(2007)24-2333-03

论著

纳米羟基磷灰石/聚酰胺66椎间融合器对山羊颈椎的融合效果研究

梁 勇,蒋电明 (重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016)

提 要:目的 研究纳米羟基磷灰石/聚酰胺66(n-HA/PA66)复合生物活性椎间融合器对山羊颈椎的融合效果和可行性。**方法** 取30只成年雌性山羊,按随机数字表分为2组:n-HA/PA66复合生物活性椎间融合器组和自体髂骨组。所有山羊行颈3、4椎间盘及部分椎体切除术,分别植入n-HA/PA66复合生物活性椎间融合器和自体髂骨块,术后4、12、24周行CT检查;术后12、24周行组织学和生物力学评估。**结果** 24周时n-HA/PA66椎间融合器与自体髂骨在山羊颈3、4椎间均可形成骨性融合,组织学、影像学及生物力学等各项测试指标比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** n-HA/PA66椎间融合器具有良好的骨传导性和生物力学特性,达到了良好的融合效果,是一种理想的椎间融合材料。

关键词: 纳米羟基磷灰石;聚酰胺66;椎间融合器;颈椎融合;山羊
中图法分类号: R-332;R681.505;R687.3 **文献标识码:** A

In vivo study on intervertebral fusion cage made by nano-hydroxyapatite and ploy-amide66 composites

LIANG Yong, JIANG Dian-ming (Department of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To evaluate the characteristics of fusion by using biomimetic nano-hydroxyapatite and ployamide66 composites (n-HA/PA66) interbody cage. **Methods** Thirty adult female goats underwent c3-4 discectomy and intervertebral fusion with n-HA/PA66 interbody cage ($n=15$) or autogenous iliac crest bone graft ($n=15$). CT scanning was performed at 4th, 12th and 24th week after surgery to evaluate fusion. After the goats were killed respectively on the 12th and 24th week, nondestructive biomechanical test for stiffness, undecalcified histology were performed. **Results** The goats receiving n-HA/PA66 or autograft all showed complete fusion at 24th week, without statistically significant difference upon biomechanics, radiography and histomorphology ($P>0.05$). **Conclusion** The intervertebral fusion cage of n-HA/PA66 has good biocompatibility and osteo-conductibility. It may be the ideal interbody fusion cage.

Key words: nano-hydroxyapatite; ployamide66; intervertebral cage; cervical vertebral fusion; goats

颈椎前路减压融合术能有效地清除退变的椎间盘、增生的骨赘、椎管内的骨折块等,并可同时行植骨融合,已被广泛的应用于治疗颈椎病、颈椎肿瘤和创伤等疾患。虽然自体髂骨植骨术是颈椎椎间融合的金标准,但取骨不可避免地带来一系列并发症,如疼痛、感染、出血及股外侧皮神经损伤等。异体骨及异种骨虽然取材方便,但存在疾病传播及免疫排斥的危险。金属的椎间植入物已经得到了广泛的应用,具有较高的强度,能提供早期的稳定性,但因其具有金属的腐蚀电解、应力遮挡以及异物刺激反应等不足,而且其产生的金属伪影,干扰了术后对椎间融合效果的评估。

因此,研制一种既具有骨传导性,可与自体骨愈合,同时又具有与金属材料相近强度的新型椎间融合器,有很大的临床意义。本研究选用类自然骨的纳米羟基磷灰石/聚酰胺66(n-HA/PA66)复合材料[1]作为椎间融合器进行动物实验,探讨其作为椎间融合器的融合效果和可行性,为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

纳米羟基磷灰石/聚酰胺66复合生物活性椎间融合器系我们和四川大学国家纳米材料孵化基地与四川国纳科技有限公司共同开发,规格为9 mm(直径)×10 mm(高度),中间孔径

基金项目: 国家高技术研究发展计划("863"计划)(2002AA326020)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2002AA326020)
作者简介: 梁 勇(1973-),男,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事脊柱外科及骨科生物材料方面的研究。电话:(023)89011200
通讯作者: 蒋电明,电话:(023)89011200,E-mail:jdm571026@vip.163.com
收稿日期: 2007-03-07;**修回日期:** 2007-05-09

为3 mm的圆柱体，表面行粗糙处理。

1.2 动物及分组

30只2岁龄雌性山羊，体质量20～25 kg，由重庆医科大学实验动物中心提供。应用随机数字表分A、B两组，每组15只。A组：植入自体髂骨块；B组：植入n-HA/PA66复合生物活性椎间融合器。

1.3 手术方法

山羊术前禁食、禁饮24 h，肌注青霉素钠80万单位。速眠新0.15～2 ml/kg肌肉注射诱导麻醉后，平卧固定于手术台上，快速行气管内插管，持续给予1%异氟醚吸入维持麻醉。便携式C臂X线机透视定位颈3、4椎间隙。消毒铺巾，取右颈前外侧纵形切口，逐层切开皮肤、皮下组织，从气管、食管与颈动脉鞘之间分离进入，于中线处切开剥离颈长肌，暴露颈3、4椎体及椎间隙，再次经X线机透视确认。

在颈3、4椎体上植入Caspar撑开器，切除颈3、4椎体椎间盘及部分颈3椎体，用磨钻打磨清除软骨终板，未切除后纵韧带及暴露椎管。A组取左侧自体髂骨块9 mm×9 mm×10 mm植入；B组植入n-HA/PA66复合生物活性椎间融合器，在融合器中空部分填塞自体骨。用3孔窄加压钢板固定于颈3、4椎体，连续缝合颈长肌，冲洗切口，逐层缝合，术中彻底止血，未安置引流。

术后观察山羊至麻醉完全苏醒，颈部无需制动。连续5 d，每日2次肌肉注射青霉素钠80万单位，并检查伤口情况。

1.4 效应指标和资料收集方法

1.4.1 一般情况　术后观察各组颈部外观，四肢活动及伤口情况，在规定时相点取材时观察椎间融合情况。

1.4.2 影像学检查　所有动物在第4、12、24周行螺旋CT扫描检查，将颈3、4椎体在植骨或植入椎间融合器处取4个矢状切面，每2毫米1个层面，每个层面又分为与椎体相接的1、2、3 3个区域（图1）进行融合度评分。评分标准如下[2]：0分：无新生骨的形成；1分：可见新生骨的形成，但椎体与植入物间无骨性连接；2分：椎体与植入物间已形成骨性连接。

1.4.3 组织学观察　术后12周和24周每组各处死5只山羊，切取颈3、4椎间植入物，两端各保留部分椎体，放入40 g/L多聚甲醛中保存，制作不脱钙切片，行HE染色、甲苯胺蓝染色和Masson染色行组织学观察椎间融合及新骨形成情况。

1.4.4 力学性能测试　术后24周每组处死5只山羊，取完整的颈3、4椎体标本，为减少对测试影响，标本两端均用聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）制作矫正测试夹具，以Instron力学测试机（美国Model 8874）对两组标本以6种方式[3]（前屈、后伸、左侧弯曲、右侧弯曲、左侧扭转、右侧扭转）进行非破坏性生物力学检测。所有标本在行前屈、后伸、左侧弯曲、右侧弯曲运动时以恒定的速度（5 mm/min）移动5 mm；在行左侧扭转、右侧扭转运动时，以恒定的角速度（15°/min）移动15°，连续记录位移-载荷曲线，得到载荷值即抗弯曲力（N）或抗扭转力（扭矩单位为Nmm）。比较在最大位移（5 mm和15°）时得到的最大载荷值，衡量两组颈椎标本融合后的力学稳定性有无差异。

1.5 统计学分析

测试各项指标所得数据用$\bar{x} \pm s$表示，以SPSS 12.0统计软件行两样本间t检验。

2 结果

2.1 大体形态观察

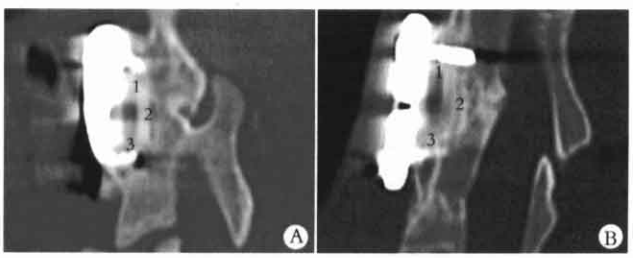
麻醉清醒后，所有山羊均可正常活动。伤口无感染、渗液，愈合良好，未观察到机体明显的排斥反应。12周时自体髂骨与椎体之间已基本融合，结合处可见纤维骨痂和骨样组织；n-HA/PA66复合生物活性椎间融合器和椎体骨紧密结合，结合处可见纤维骨痂形成；24周时，自体髂骨与椎体骨之间融合完好；n-HA/PA66复合生物活性椎间融合器与椎体骨之间结合紧密，无明显间隙。

2.2 影像学结果分析

4周时，A组（自体髂骨组）：部分CT层面可见新生骨形成，部分区域植骨块与椎体之间已有骨性连接产生；B组（n-HA/PA66椎间融合器组）：部分CT层面见新生骨形成，融合器与椎体之间未见骨性连接。

12周时，A组所有CT层面的均可见新生骨形成，大部分区域植骨块与椎体之间已有骨性连接；B组所有CT层面均可见新生骨形成，部分区域融合器与椎体之间已形成骨性连接（图1A）。

24周时，两组所有CT层面均可见植骨块与椎体之间已形成骨性连接（图1B）。



A：12周　可见新生骨形成；B：24周　可见融合器与椎体之间有骨性连接形成　1，2，3：分别表示与椎体相接的3个区域

图1　n-HA/PA66组螺旋CT扫描结果

2.3 组织学检查

12周时，自体髂骨块和n-HA/PA66复合生物活性椎间融合器均被纤维骨痂包裹，自体髂骨组可见较多的纤维骨痂形成成，在骨小梁表面有红色的类骨质，部分区域有成熟的骨小梁（图2）；n-HA/PA66复合生物活性组在材料交界处可见大量纤维骨痂及新生骨形成，有较多的成骨细胞和破骨细胞沿着界面排列，骨组织和粗糙的材料表面已发生牢固嵌合（图3）。24周时，自体髂骨组的植骨块与椎体间的新生骨小梁已改建为成熟的骨小梁，部分区域尚可见未完全矿化的类骨质，植骨块与椎体间已完全骨性融合（图4）；n-HA/PA66复合生物活性组在椎间融合器边缘可见大量成熟的骨小梁组织，融合器与椎体间也已形成骨性融合，但材料未见明显降解吸收（图5）。

将所有CT层面进行融合度评分，并分别进行各时相点两组之间的比较。在4周时，A组的融合度评分高于B组，差异有统计学意义（$P<0.05$）；在12周和24周时A组的融合度评分仍高于B组，但两组之间的差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果见表1。

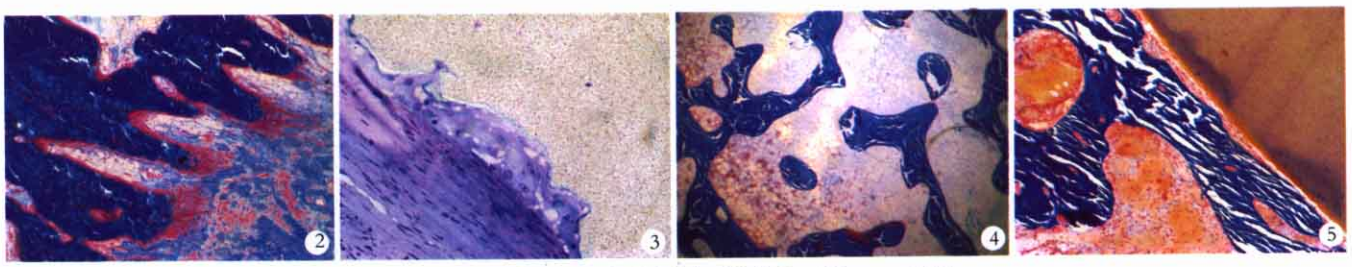


图 2　自体髂骨移植术后 12 周　可见大量淡蓝色纤维骨痂　（Masson ×100）
图 3　n-HA/PA66 融合器移植术后 12 周　界面上可见纤维新生骨形成　（甲苯胺蓝 ×400）
图 4　自体髂骨移植术后 24 周　原始骨小梁已改建为成熟骨小梁　（Masson ×40）
图 5　n-HA/PA66 椎间移植术后 24 周　融合器边缘形成成熟骨小梁　（Masson ×250）

表 1　CT 融合度评分比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	4 周	12 周	24 周
A 组	10.93 ± 1.10	15.80 ± 0.94	23.80 ± 0.42
B 组	7.73 ± 1.03	15.33 ± 0.82	23.60 ± 0.52
P 值	0.000	0.158	0.355

2.4　生物力学测试

A 组和 B 组于 24 周各取 5 个标本，行前屈、后伸、左侧弯曲、右侧弯曲、左侧扭转、右侧扭转非破坏性生物力学检测。将每个受力方向，每组标本的最大载荷值进行统计学分析，无显著性差异（$P>0.05$），可见自体髂骨组与 n-HA/PA66 组的椎间融合的力学稳定性在术后 24 周时比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果见表 2。

表 2　生物力学测试结果（最大载荷值，$n=5$，$\bar{x} \pm s$）

组别	前屈 (N)	后伸 (N)	左侧弯曲 (N)	右侧弯曲 (N)	左侧扭转 (Nmm)	右侧扭转 (Nmm)
A 组	35.93 ± 0.38	35.70 ± 0.63	43.30 ± 0.76	43.65 ± 0.81	3 567.80 ± 143.65	3 582.40 ± 108.96
B 组	35.55 ± 0.45	35.77 ± 0.55	42.86 ± 0.85	43.01 ± 0.78	3 540.60 ± 134.21	3 563.60 ± 115.47

3　讨论

纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66（n-HA/PA66）复合材料具有优良的生物相容性、刚性、尺寸稳定性和韧性，其形态、结构和组成上与人体骨中的磷灰石纳米针晶相似；与普通的 HA 比较，n-HA/PA66 具有更好的骨传导生物活性，且其力学性能与人体皮质骨相近[4]。在本实验中，n-HA/PA66 复合生物活性椎间融合器植入山羊第 3、4 颈椎间隙后，CT 检查显示 4 周时仅有少许新生骨形成，融合器和椎体间尚未形成骨性融合；而在 12 周和 24 周时，CT 检查显示融合度与自体髂骨相比已无显著统计学差异。n-HA/PA66 复合生物活性椎间融合器虽具有良好的骨传导性，但缺乏骨诱导活性，早期只能靠椎体骨组织爬行形成新骨，新生骨组织生成量少，随着时间的延长，成骨细胞和破骨细胞大量聚集在材料和骨组织界面，并释放活性因子诱导成骨。这些可能因为早期（4 周）自体髂骨组在新生骨的形成和椎体间融合的稳定性均优于 n-HA/PA66 组，而随着时间的延长（12、24 周），两组的融合程度无显著性差异。同时，组织学检查结果也证实在 12 周时已有新生骨组织长入融合器表面的粗糙小凹中；24 周时，在融合器边缘有较多骨小梁形成。两组比较新骨形成的数量和质量上无明显差异，提示 n-HA/PA66 椎间融合器在行颈椎椎间融合时，12 周后可达到与自体髂骨移植相近的融合效果。

生物力学测定被认为是衡量椎间融合效果的另一个重要客观指标。对自体髂骨和 n-HA/PA66 两组在 24 周时分别行前屈、后伸、左侧弯曲、右侧弯曲、左侧扭转、右侧扭转非破坏性生物力学检测，以全面、客观地评价椎间融合的生物力学稳定性。上述各项测试结果表明，自体髂骨组和 n-HA/PA66 组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），说明在 24 周时 n-HA/PA66 组生物力学稳定性已与自体髂骨移植组相近。

组织学、影像学及生物力学检测结果显示，在 24 周时，n-HA/PA66 复合生物活性椎间融合器与自体髂骨组在组织融合度及力学稳定性两方面相比，均无显著差异，说明 n-HA/PA66 复合生物活性椎间融合器达到了良好的融合效果。由于 n-HA/PA66 具有优良的生物相容性[5,6]、骨传导性和生物力学特性，故可作为一种理想的椎间融合材料。但由于该材料不具有骨诱导作用，早期成骨较少，可考虑使用网孔型的 n-HA/PA66 材料并复合 BMP 等成骨因子，以有利于新生血管和组织的快速长入和诱导新骨生成，进一步增强椎体间的早期融合效果。

参考文献：

[1] 王学江，李玉宝. 羟基磷灰石纳米针晶与聚酰胺仿生复合生物材料研究[J]. 高技术通讯，2001，11(5)：1－5.
[2] Hojo Y，Kotani Y，Ito M，*et al*. A biomechanical and histological evaluation of a bioresorbable lumbar interbody fusion cage[J]. Biomaterials，2005，26(15)：2643－2651.
[3] Pflugmacher R，Schleicher P，Gumnior S，*et al*. Biomechanical Comparison of Bioabsorbable Cervical Spine Interbody Fusion Cages[J]. Spine，2004，29(16)：1717－1722.
[4] 李玉宝. 纳米生物医药材料[M]. 北京：化学工业出版社，2003：36－40.
[5] 孟纯阳，安　洪，蒋电明，等. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺的细胞相容性研究[J]. 中华创伤骨科杂志，2005，7(8)：749－752.
[6] 王群波，蒋电明，李　智，等. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺66复合人工椎体治疗胸腰椎椎体肿瘤的效果[J]. 第三军医大学学报，2006，28(3)：263－265.

（编辑　陈聪连）