维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)07-0714-04

新型生物活性椎间融合器的实验研究

梁 勇,蒋电明

(重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66(n-HA/PA66)椎间融合器复合重组人骨形态蛋白 -2(rhBMP-2)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,随机分为三组:n-HA/PA66 椎间融合器组、复合 rhBMP-2 的 n-HA/PA66 椎间融合器组和自体髂骨组。所有山羊均行颈 3~4 椎间盘及部分椎体切除术,分别植入 n-HA/PA66 椎间融合器、复合 rhBMP-2 的 n-HA/PA66 椎间融合器和自体髂骨块,术后 4 周、12 周行 X 线检查;术后 12 周行组织学和生物力学评估。结果:12 周时复合 rhBMP-2 的 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生物相容性、骨传导性、和生物力学特性,复合 rhBMP-2 后使其具有骨诱导性,加快了的椎间融合速度,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;重组人骨形态蛋白 -2;椎间融合器;颈椎融合;山羊

【中国图书分类法分类号】R318 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-03-15

Experiment study of intervertebral fusion cage made by a new biomimetic grafting material

LIANG Yong,et al

(*Department of orthopaedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the characteristics of fusion using biomimetic n-HA/PA66 interbody cage with rhBMP-2 and discuss the feasibility of it. *Methods*: Thirty adult female goats underwent C_{3-4} discectomy and interverbral fusion performed with nHA/PA66 interbody cage without rhBMP-2(n=10)、nHA/PA66 interbody cage with rhBMP-2(n=10)、autogenous iliac crest bone graft (n=10).X ray was carried out at 4 and12 weeks after surgery to evaluate fusion quality.The goats were killed respectively on the 12th week.Nondestructive biomechanical testing for stiffness, un-decalcified histology were performed. *Result*: The goats in the n-HA/PA66 with rhBMP-2 group and the autogrft group all showed complete fusion at 12th week.there was no statistically significant differience between the n-HA/PA66 with rhBMP-2 group and the autogrft group upon biomechanics, radiography and histomorphology. *Conclusion*: The interverbral fusion cage with n-HA/PA66 has good biocompatibility and osteoconductive ability and it may be good osteoionductive with rhBMP-2, so it was one ideal interbody fusion cage.

【Key words】Nano-hydroxyapatite; Ployamide66; rhBMP-2; Interverbral cage; Cervical vertebral fusion; Goats

颈椎前路减压融合术已被广泛的应用于治疗颈椎病、颈椎的肿瘤和创伤等疾患。自体髂骨移植被公认为是颈椎前路植骨融合术融合率最高的方法,然而自体髂骨的切取不可避免地会带来一系列的并发症,如术后取骨处的疼痛、出血、感染以及股部感觉障碍等。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,但具有金属的腐蚀电解,应力遮挡以及异物刺激反应等不足之处,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。

纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66(n-HA/PA66)复合材料是将纳米羟基磷灰石和聚酰胺进行共溶制成的高分子聚合物,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,nHA/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[1]。本实验选用 n-HA/PA66 复合材料作为椎间融合器并复合 rhBMP-2,进行山羊的颈椎间融合,探讨其作为椎间融合器的效果和可行性。

作者介绍:梁 勇(1973-),男,博士生,讲师,
主要研究方向:脊柱外科及骨科生物材料,周围神经损伤。

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)基金资助项目(2002AA326020)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

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,规格为直径 9mm×高度 10mm,中间孔径为 3mm 的圆柱体,表面行粗糙处理。

基因重组人骨形态发生蛋白 2(rhBMP-2)购于广州市达晖生物技术有限公司;胶原蛋白海绵购于北京益而康生物技术有限公司。

1.2 动物分组

30 只 2 岁龄雌性山羊,体重在 20~25kg,随机分成 3 组,每组 10 只。A 组:植入自体髂骨块;B 组:植入 n-HA/PA66 椎间融合器;C 组:植入复合 rhBMP-2 的 n-HA/PA66 椎间融合器。

1.3 手术方法

山羊术前禁食禁饮 24h,肌注青霉素钠 80 万单位。速眠新 0.15~2ml/kg 肌肉注射诱导麻醉后,平卧固定于手术台上,行气管内插管,持续给与 1%异氟醚吸入维持麻醉效果。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,从气管、食管与颈动脉鞘之间分离进入,剥离颈长肌,暴露颈 3、4 椎体及椎间隙,再次 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,未切除后纵韧带及暴露椎管。A 组取左侧自体髂骨块长 9mm×宽 9mm×高度 10mm 植入;B 组植入 n-HA/PA66 椎间融合器,在融合器中空部分填塞胶原蛋白海绵作为空白对照组;C 组植入 n-HA/PA66 椎间融合器,在融合器中空部分填塞复合 rhBMP-2 的胶原蛋白海绵[2]。用 3 孔钢板固定,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 天每日 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,在取材时观察颈 3、4 椎体间融合情况。

1.4.2 影像学检查 所有动物在 4、12 周行 X 线检查,观察植入物与椎体间融合情况。

1.4.2 组织学观察 术后 12 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 40g/L 多聚甲醛中保存,制作不脱钙切片,行 HE 染色、甲苯胺兰染色和 Masson 染色行组织学观察椎间融合及新骨形成情况。

1.4.3 力学性能测试 术后 12 周每组处死 5 只山羊,取完整的颈 3、4 椎体标本,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)对三组标本以六种方式[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(5mm/min)移动 5mm;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。比较在最大位移(5mm 和 15°)时得到的最大载荷值,衡量三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 SPSS12.0 软件行 One-Way-ANOVA 分析,$P<0.05$ 为有统计学意义。

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。12 周时,A 组自体髂骨与椎体之间可见纤维骨痂形成;B 组可见 n-HA/PA66 椎间融合器和椎体骨结合处有纤维组织连接;C 组 nHA/PA66 椎间融合器与椎体骨之间可见新生骨组织。

2.2 影像学结果分析

术后 4 周,A 组和 C 组可见植骨块和融合器周围的透亮线变模糊,表明已有新生骨组织形成;B 组 n-HA/PA66 融合器周围有明显的透亮线,表明无新生骨组织形成。术后 12 周 A 组和 C 组可见自体髂骨和椎间融合器周围的透亮线基本消失(图 1、2),表明与椎体之间形成骨性融合;B 组可见 n-HA/PA66 椎间融合器周围的透亮线变模糊(图 3),表明与椎体间已有骨组织形成。

2.3 组织学检查

12 周时,A 组可见自体髂骨与椎体之间有较多的纤维骨痂,部分区域有成熟的骨小梁形成(图 4);B 组 在材料交界处可见纤维骨痂,有成骨细胞和破骨细胞沿着界面排列,新生骨组织和粗糙的材料表面已发生嵌合(图 5);C 组 在椎间融合器边缘有纤维骨痂形成,可见较多成熟骨小梁,融合器与椎体间已骨性融合(图 6),但材料未见明显降解吸收,也未见新生骨组织长入材料内。

2.4 生物力学测试

将每组标本各受力方向上所得的最大载荷值进行 One-Way-ANOVA 分析,结果显示在各受力方向上所得的平均最大载荷值均为 C 组>A 组>B 组。比较各组之间 P 值,在前屈、左侧弯曲和右侧弯曲 3 个受力方向,$P>0.05$,各组的最大载荷值差异无统计学意义;在后伸、左侧扭转和右侧扭转 3 个受力方向,A 组和 B 组、A 组和 C 组之间 $P>0.05$,最大载荷

维普资讯 http://www.cqvip.com

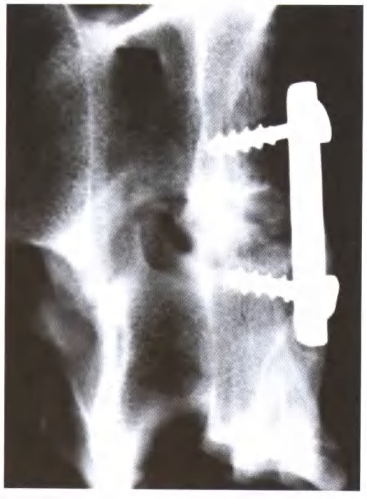


图 1 术后 12 周，X 线检查示自体髂骨周围的透亮线基本消失

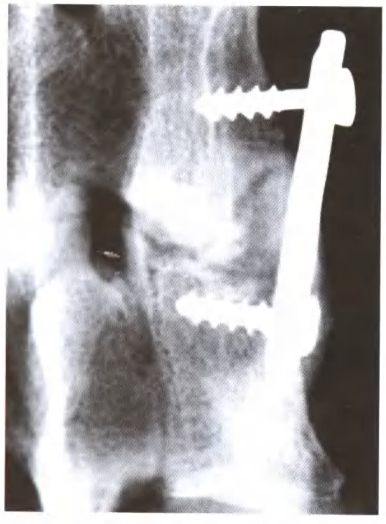


图 2 术后 12 周，X 线检查示复合 rhBMP-2 的 n-HA/PA66 融合器周围的透亮线基本消失

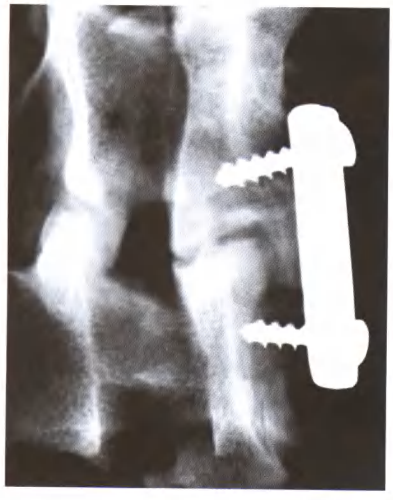


图 3 术后 12 周，X 线检查示 n-HA/PA66 融合器周围的透亮线变模糊

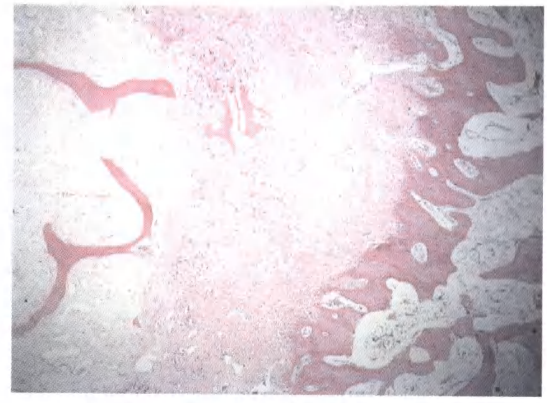


图 4 A 组术后 12 周，自体髂骨块与椎体之间有较多的纤维骨痂形成，部分区域有成熟的骨小梁形成。HE 染色×40

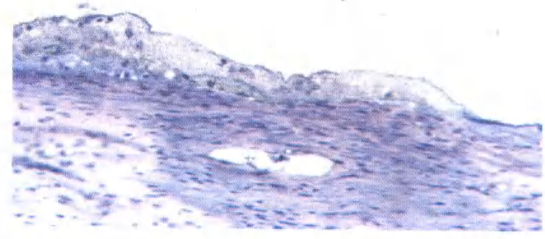


图 5 B 组术后 12 周，材料交界处可见纤维骨痂形成，有较多的成骨细胞和破骨细胞沿着界面排列。甲苯胺蓝×400

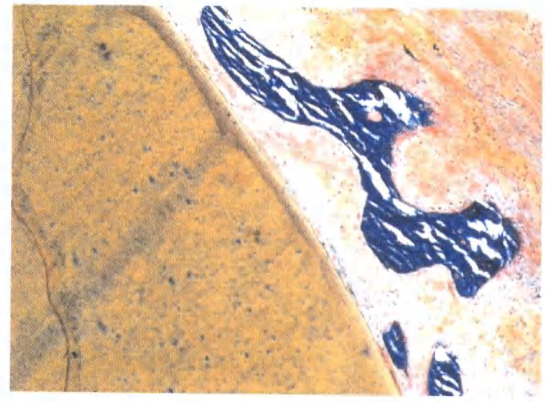


图 6 C 组术后 12 周，在椎间融合器边缘可见较多骨小梁形成。masson×250

值差异无统计学意义，而 C 组和 B 组之间比较，$P<0.05$，最大载荷值差异有统计学意义，提示复合 rhBMP-2 的 n-HA/PA66 椎间融合器在术后 12 周时的生物力学稳定性与自体髂骨比较无统计学差异，但优于未复合 rhBMP-2 的 n-HA/PA66 椎间融合器组，说明复合 rhBMP-2 能提高 n-HA/PA66 椎间融合器椎间行椎间融合的生物力学稳定性。见表 1。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 力学测试结果(最大载荷值)

组别	标本数	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	5	35.70±0.63	35.93±0.38	43.30±0.76	43.65±0.81	3567.80±143.65	3582.40±108.96
B 组	5	35.56 ±0.43	35.42±0.17	42.86±0.85	43.01±0.78	3466.40±53.22	3498.60±56.93
C 组	5	36.25±0.44	36.13±0.57	44.19±1.07	44.15±0.85	3670.80±76.63	3649.00±48.43

3 讨 论

本项实验中 X 线检查、组织学检查及生物力学稳定性测试均显示复合 rhBMP-2 的 n-HA/PA66 组和自体髂骨移植组在新骨形成和力学稳定性方面无明显差异,而优于单纯的 n-HA/PA66 组。分析其原因, 一方面本实验中选用的 n-HA/PA66 复合材料具有与人体骨组织更为接近的理化性能,其弹性模量达 7GPa,更接近于人体骨皮质的弹性模量(7~25GPa)。复合材料中 n-HA 针晶在形态、组成上与人体骨磷灰石针晶相似, 具有优良的生物相容性,能充分发挥 HA 的骨传导性。在植入后,HA 释放出 Ca^{2+}和 PO_4^{3-},营造了一个利于成骨的微环境。Ca^{2+}和 PO_4^{3-}沉积在纤维上,对基质起钙化作用,促进新骨的生成。这一过程与骨组织中的基质钙化过程相似[4]。而融合器表面的粗糙处理也为骨组织的长入提供了条件。另一方面骨形态发生蛋白-2 是诱导成骨活性最强的细胞因子之一, 其基因重组产品 rhBMP-2 能促进脊柱的融合,FDA 已经批准临床应用于腰椎前路椎间融合术。胶原蛋白海绵能使 rhBMP-2 的逐步释放,使其在植入体内的一段时间能维持一定的浓度,以更有利于诱导新骨的形成[5]。这些均可能是在早期 (12 周) 复合 rhBMP-2 的 nHA/PA66 椎间融合器就可以达到与自体髂骨移植相近融合效果的原因,而单纯的 n-HA/PA66 椎间融合器因为缺乏骨诱导作用,新生骨形成较慢,故早期(12 周)融合的效果低于自体髂骨和复合 rhBMP-2 的 nHA/PA66 椎间融合器。

组织学、影像学和生物力学检测结果显示,12 周时复合 rhBMP-2 的 nHA/PA66 椎间融合器与自体髂骨在椎体间的融合度及力学稳定性比较均无显著性差异。说明复合 rhBMP-2 的 nHA/PA66 椎间融合器具有良好的椎间融合效果。由于 nHA/PA66 具有优良的生物相容性、骨传导性和生物力学特性, 复合 hBMP-2 后又具有了一定的骨诱导性,促进了新生骨组织的形成,增强了椎体间的早期融合效果,可作为一种理想的椎间融合器材料。

(通讯作者: 蒋电明, 教授, 博士导师,E-mail: jdm571026@vip.163.com)

参 考 文 献

[1] 李玉宝,主编.纳米生物医药材料[M].第 1 版,北京:化学工业出版社,2004.36-40.

[2] Harvinder S,Sandhu,Jeffrey M.Toth,Ashish D.Diwan, et al.Histologic Evaluation of the Efficacy of rhBMP-2 Compared With Autograft Bone in Sheep Spinal Anterior Interbody Fusion[J]. Spine, 2002;27:567-575.

[3] Robert Pflugmacher,Philipp Schleicher,Sarah Gumnior,et al. Biomechanical Comparison of Bioabsorbable Cervical Spine Interbody Fusion Cages[J].Spine,2004;29:1717-1722.

[4] 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;5:1-5.

[5] Harvinder S,Sandhu.Bone Morphogenetic Proteins and Spinal Surgery[J].Spine,2003;28:S64-S73.

(上接第 691 页)

(7):1206-1208.

[3] Gazzaniga P,Gradilone A,Giuliani L,et a1.Expression and prognostic significance of livin,survivin and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer[J].Ann Oncol, 2003;14(1):85-90.

[4] Crnkovic-Mertens I,Hoppe-Seyler F,Butz K.Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML2IAP/KIAP gene[J].Oncogene,2003;22(51):8330-8335.

[5] Ashhab Y,Alian A,Plliack A,et a1.Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern[J].FEBS Lett,2001;495(4):56-60.

[6] Kasof GM,Gomes BC.Livin,a novel inhibitor of apoptosis protein family member[J].J Biol Chem,2001;276(5):3238-3246.

[7] 鞠 文,何远桥,杨 军,等.BP H 和前列腺腺癌中 Livin 的表达及其意义[J].临床泌尿外科杂志,2005;20(12):762-764.

[8] Schmollinger JC,Vonderheide RH,Hoar KM,et al.Melanoma inhibitor of apoptosis protein(ML-IAP)is a target for immune-mediated tumor destruction[J].Proc Natl Acad Sci USA,2003;100(6): 3398-4403.

[9] Andersen MH,Becker JC,Straten P.Identification of an HLA-A3-restricted cytotoxic T lymphocyte(CTL)epitope from ML-IAP[J].J Invest Dermatol,2004;122(5):392-399.