维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)06 - 0828 - 03

纳米羟基磷灰石/聚酰胺复合材料人工肱骨头的体内生物相容性研究

张　健,安　洪,蒋电明,周爱国

(重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆　400016)

【摘　要】目的:了解纳米羟基磷灰石/聚酰胺(nHA/PA)复合材料人工肱骨头的体内生物相容性。方法:20 只新西兰大白兔行 nHA/PA 人工肱骨头置换术,术后 3、6、12、24 周标本行组织学及免疫组织化学检查。结果:仅在 nHA/PA 植入动物体内 3 周时,界膜上少量 CD_4^+, CD_8^+ 淋巴细胞浸润。其余各周未见淋巴细胞及炎症细胞侵润。结论:nHA/PA 具有良好的体内生物相容性。

【关键词】关节置换术;羟基磷灰石;聚酰胺;生物相容性

【中国图书分类法分类号】R683　　【文献标示码】A　　[收稿日期]2005 - 05 - 17

Study on compatibility of the nHA/PA composite implant

ZHANG Jian ,et al

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

【Abstract】Objective: To evaluate the compatibility of the nHA/PA composite implant. Methods: The component was implanted into the proximal humeral metaphysis of rabbits. The prosthetic humeral head replacement was performed in 20 rabbits. The rabbits were killed at the 3rd, 6th, 12th, 24th week after operation. Specimens were observed by histology and immunohistochemitry. Results: Immunohistochemistry results showed that there were some CD_4^+, CD_8^+ lymphocytes infiltrated into the interface at the 3rd week, without other inflammatory cells being observed. While at 6th, 12th, 24th week, neither lymphocytes nor inflammatory cells were seen. Conclusion: The nHA/PA prostheses show good biocompatibility.

【Key Words】Arthoplasty; Hydroxyapatite; Polyamide; Biocompatability;

理想的人工关节是能与受体骨愈合并最终存活而成为患者"自身"的材料,从而避免界面的存在而导致碎屑产生引起的假体松动[1]。目前认为人工关节材料的生物相容性不仅是它临床应用的基本条件,还是克服假体松动的重要因素。

纳米羟基磷灰石/聚酰胺(nHA/PA)复合人工假体采用纳米级显微结构的 HA 制成人工假体,由于 nHA 毕竟改变了材料的晶粒尺寸,晶界宽度,第二相分布,气孔尺度等物理化学性质。我们前期 nHA/PA 体外实验发现:nHA/PA 同人体胚胎成纤维细胞相容性好,符合医用材料相应标准[2]。但该材料在动物体内生物相容性如何?是否会引起机体对它的排异反应,是本文研究目的。

作者介绍:张　健(1966 -)男,副教授,博士,
主要研究方向:人工关节置换。

基金项目:国家 863 计划资助 编号 2002AA326020。

1　材料与方法

1.1　实验材料及动物实验

实验材料由四川大学国家纳米生物医用材料产业孵化基地提供,为 60%(重量比)的 n - HA/PA 人工肱骨头。实验动物为 8 月新西兰大白兔 20 只,体重 3.36 ± 0.46kg,由重庆医科大学动物实验中心提供。随机平均分为 4 组,每组 5 只。动物先行饲养 2 周。实验时用 5% 戊巴比妥钠(30mg/kg)耳缘静脉注射麻醉成功后,俯卧于手术台上,四肢束带固定。取右肩前外侧切口约 50mm。依次切开皮肤、浅深筋膜、分开三角肌及胸大肌、切开关节囊。尖刀切断肱骨头韧带,向前外侧脱出肱骨头颈,在小结节上 5mm 行截骨切除肱骨头。探明髓腔,用特制髓腔锉扩大髓腔。放置 n - HA/PA 人工肱骨头。分层缝合。术后不制动,即刻负重活动。

1.2　鼠抗兔 CD4、CD8 单克隆抗体购自晶美生物制剂公司。

维普资讯 http://www.cqvip.com

SP 试剂盒、DAB 试剂盒购自中山生物试剂公司(批号 20772222)

1.3 方法:

1.3.1 HE 染色:

石蜡切片,常规脱蜡。自来水冲洗,HE 染色。

1.3.2 CD_4^+、CD_8^+ 免疫组织化学染色:

石蜡切片,常规脱蜡,自来水冲洗,硬片用乙二醇乙醚乙酸酯工液、Ⅱ液各作用 0.5h。用火棉胶作用 1min,95% 乙醇,90% 乙醇,80% 乙醇分别处理 2 min。自来水冲洗。预处理的石蜡片和硬片用 3% H_2O_2 作用 5 min,消除内源性过氧化物酶活性。PBS 洗涤 3 次,用 0.1% 胰酶室温 10 min,进行抗原修复,PBS 洗涤。滴加封闭血清,再加入 1:200 的 CD_4^+、CD_8^+ 单抗,4℃冰箱过夜。PBS 洗涤后加入二抗,37℃,30 min,洗涤后加入辣根酶标记链卵白素工作液 37℃,30 min。洗涤后用 DAB 显色,自来水冲洗,用苏木素复染,待干镜检。

2 结 果

人工假体植入 3 周时,肉眼观察可见围绕假体形成 1 条很薄的界膜。镜下见界膜上有部分细胞聚积,从形态上辨认可能为间充质细胞、单核巨噬细胞、成纤维细胞和少量淋巴细胞,未见有中性粒细

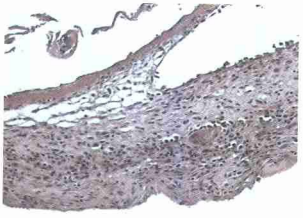


图 1 生物材料植入 3 周,界面组织可见炎症细胞侵润 ×100

胞;在界膜表面均有少量呈镶边状排列的成骨细胞(图 1)。用免疫组化染色进一步确认界膜上有少量 CD_4^+、CD_8^+ 的淋巴细胞浸润(免疫组织化学染色 CD_4^+、CD_8^+ 阳性细胞可见胞膜为棕黄色)(图 2,3)。由于咨询方所能及的生物试剂公司均未购买到抗兔 CD_{68} 单克隆 Ab(抗巨噬细胞 CD_{68} 单克隆 Ab),所以对巨噬细胞的浸润仅能从形态上加以辨认,不能经免疫组化确认。另外,我们实验发现一只动物的界膜组织切片中,部分浸润细胞呈泪滴状,核呈车轮状,偏位,形似浆细胞。由于浆细胞缺乏特异的表面

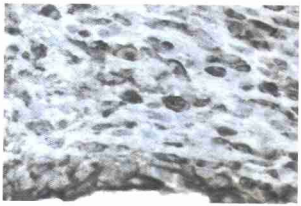


图 2 生物材料植入 3 周,在界面组织中,免疫组化染色发现 CD_4^+ 细胞 ×400



图 3 生物材料植入 3 周,在界面组织中,免疫组化染色发现 CD_8^+ 细胞 ×400

标志,故也未能用免疫组化方法加以确认。

人工假体植入 6 周时,经免疫组织化学染色观察,未见膜上 CD_4^+、CD_8^+ 阳性细胞和形似浆细胞的细胞浸润。(图 4)

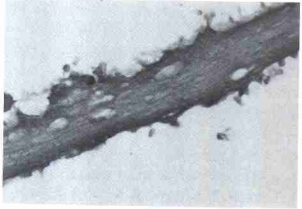


图 4 生物材料植入 6 周,在界面组织中,免疫组化染色发现 CD_4^+ 细胞 ×400

人工假体植入 12、24 周,未见膜上 CD_4^+、CD_8^+

维普资讯 http://www.cqvip.com

阳性细胞和形似浆细胞的细胞浸润。

3 讨 论

人工材料的生物相容性主要包括对受体细胞和组织无刺激性,不干扰机体的免疫机制,不引起免疫排异反应等方面。植入材料抗原通过直接或间接途径,促进 T、B 细胞活化,B 细胞增殖分化为浆细胞,分泌抗体至血液或植入物局部,发挥抗体的生物学作用。另一方面,植入材料抗原使受者 T 淋巴细胞致敏并分化、增殖,形成大量对该抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(Tc 细胞,CD_8^+ 细胞),杀伤靶细胞;同时致敏 Th 细胞(CD_4^+ 细胞)释放细胞因子,吸引和激活巨噬细胞,造成局部组织损伤。因此,材料植入局部的病理改变为单核细胞、巨噬细胞及 CD_4^+、CD_8^+T 以及浆细胞、B 细胞浸润。而急性局部排斥反应多属细胞免疫反应,即迟发性变态反应[3]。

目前用于制造临床假体的生物材料主要是钴合金与钛合金、超高分子聚乙烯以及羟基磷灰石喷涂假体。近来证实在一些无菌性松动的金属人工关节所形成的界膜中可见肉芽肿组织,由大量 CD^+68异物巨细胞,单核细胞组成,在多核巨细胞和巨噬细胞的胞质中可见大量黑色金属磨损颗粒。这说明假体松动与巨噬细胞非特异性吞噬磨损颗粒密切相关;此外,界膜中还有 CD_4^+、CD_8^+、CD_{25}^+的 T 淋巴细胞浸润,进一步说明机体对人工关节材料产生了特异性免疫反应,即在界膜中产生发迟发性超敏反应或/和排异反应[4]HA 是自然骨中主要的无机成分,它良好的生物学性能使其在硬组织替代材料中扮演着重要角色,然而纯 HA 机械性能比较差,因此目前单纯 HA 骨材料在医学上的应用仅限于小范围的非承重部位[5]。而纳米 HA 由于其尺寸小,比表面积大,表面能高,与普通 HA 在物理、化学、力学、扩散及烧结性能上都有显著变化,已证明 nHA 比普通 HA 在骨修复中具有更高的生物活性。但同时也有研究证明单独 nHA 的人工关节仍具有脆性大的缺点,为增加其韧性,研究者常用 nHA 喷涂与生物降解聚合物的复合,如 nHA 与聚乳酸复合[6],nHA 与聚酰胺复合[7]。四川大学纳米材料研究中心开发出仿生的 nHA 与聚酰胺 66(nHA/PA)复合材料,其中 PA66 是一种具有高韧性的高聚物材料,已在临床上作为外科缝线长期使用,具有良好的生物相容性。

研究表明,nHA/PA 人工关节假体在植入体内 3 周时,在局部有轻微的排异反应,仅少量 CD_4^+、CD_8^+ 淋巴细胞浸润,未见有中性粒细胞等炎症反应细胞;而在术后 6、12、24 周均未见明显淋巴细胞浸润。值得一提的是,nHA/PA 人工关节假体在植入 3 周时,我们发现一只动物的界膜组织切片中,有部分形似浆细胞的细胞浸润,这提示该动物对植入材料可能产生了特异性体液免疫。虽然急性局部排斥反应多属细胞免疫反应,但不排除由于动物个体差异所导致的不同个体对材料反应的特殊性。这也提示我们在临床推广使用某种关节假体材料时应密切观察病人术后情况,以防止严重并发症的出现。

本实验还可通过以下现象说明 nHA/PA 人工关节假体具有良好的生物相容性:①在植入 3 周时,界膜上仅少量淋巴细胞和巨噬细胞浸润,未见植入局部出现急性排斥反应的急性血管炎,急性间质炎引起的组织细胞变性坏死,未见有炎症细胞浸润。推测 nHA/PA 人工关节假体仅引起宿主极轻微的适当的排异反应。由于 HA 是自然骨中的无机成分,它引起宿主排异反应可能性小,此轻微的排异反应的产生可能与 PA 有关。另也有研究证实 PA 虽然耐受性很好,但在块状植入物周围组织中仍有炎症反应;②术后动物伤口无红肿,发热等感染征象。

参 考 文 献

[1] Weyand Cm, Geisler A, Brack A, et al. Oligoclonal T - cell proliferation and interferon - gamma production in periprosthetic inflammation[J]. Lab Invest, 1998; 78:677 - 685.

[2] 孟纯阳,安 洪,蒋电明,等. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 与人胚胎成纤维细胞的生物相容性研究[J]. 重庆医科大学学报,2005;30(2):169 - 172.

[3] 卢宏章,朱天岳,柴卫兵,等. 人工关节无菌性松动界膜中的免疫反应[J]. 中华骨科杂志,2001;(6):371 - 374.

[4] Merritt K, Rodrigo JJ. Immune response to synthetic materials. Sensitization of patients receiving orthopaedic implants [J]. Clin Orthop, 1996;(326):71 - 79.

[5] Tancred DC, Mc Cor mack BA, Carr AJ. A quatitative study of the sintering and mechanical properties of hydrosyapatite/phosphate glass composites [J]. Biomaterials, 1998; 19 (19):1735 - 1743.

[6] Barralet JE. Compaction on compressive strength and microstruture of calcium phosphate cement [J] JBiomed Mater Res. 2002; 163(1): 1 - 9.

[7] Deng X, Hao J, Wang C. Preparation and menchanical properties of nanocomposite of poly with Ca - deficient hydroapatite nanocrystal[J]. Biomaterials, 2001;22(21):2867 - 2873.