DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.023
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
800 2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)07-0800-03

磷酸钙骨水泥/BMP复合人工骨的理化性能及缓释作用

孙明林[1],胡蕴玉[1],雷 伟[1],袁 志[1],吴永辉[2],丛 锐[1] ([1]第四军医大学西京医院全军骨科研究所,西安 710033;[2]西安交通大学机械工程学院,西安 710049)

提 要:目的 研制CPC/BMP复合人工骨,检测其理化特性及缓释作用。方法 制备CPC/BMP及CPC骨块,扫描电子显微镜观察表面结构。用材料力学实验方法测定不同凝固时间的抗压强度和弹性模量的变化。测定孔隙率和体外溶解度,并以庆大霉素为例研究了CPC作为载体的缓释作用。结果 结晶后的材料呈多孔状结构,BMP呈微球状分布在孔隙间。测定的孔隙率为44.5%。骨块在体外实验有一定的溶解度。最初24 h内,凝固时间与抗压强度和弹性模量成正相关,凝固2 h后抗压强度达到极限强度的50%以上。24 h基本达到最高强度,分别为51.0 MPa和60.6 MPa。对庆大霉素的释放可持续20 d以上,20 d累计释放出实验总量的84.5%。结论 材料多孔状结构利于骨生长,同时具有理想的力学强度、缓释作用和一定的溶解度,可望用于临床骨缺损的修复。

关键词:骨形态发生蛋白;磷酸钙骨水泥;骨移植
中图法分类号:R318.08;R683 文献标识码:A

Physical and chemical properties and extended release action of calcium phosphate cement/BMP composite bone graft material

SUN Ming-lin, HU Yun-yu, LEI Wei, YUAN Zhi, WU Yong-hui, CONG Rui (Institute of Orthopeadics of Chinese PLA, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China)

Abstract: Objective CPC/BMP composite were constructed by combining CPC with BMP, and then to detect some of the main properties related to clinical use, including physical and extended chemical properties and extended releasing property. Methods The surface of CPC/BMP and CPC grafts were observed with scanning electron microscope. The compression strength and Young's modulus in different crystallizing time were measured by compressive load-to-failure test. The porosity and solubility in saline were determined by different means. To know the extended releasing property of CPC graft as delivery system, gentamicin was detected by HPLC. Results By scanning electron microscope, BMP was seen as microsphere distributing in the pores of the CPC/BMP composite. Porosity of the CPC/BMP composite was 44.5% and solubility in saline was preferable. The crystallizing time evidently affected the strength and fragility in the first 24 h. The strength was still more than half of the ultimate strength within 2 h. 24 h after crystallizing, the compression strength of CPC/BMP and CPC grafts were 48.9 MPa and 60.6 MPa respectively. As a delivery system, the CPC can release gentamicin at least for 20 d, 84.5% of total gentamicin was released in the first 20 d. Conclusion The porous structure of the composite was suitable for osteoanagenesis, the compression strength, porosity, solubility and extended releasing property suggest the CPC/BMP composite could be used as material for bone graft substitute.

Key words: BMP; calcium phosphate cement; bone graft

骨缺损的修复是骨科的一个重要课题,寻找合适的骨移植材料一直是研究十分活跃的领域。目前临床应用的骨修复材料可大致分为两类,一类是具有高效骨诱导活性的成骨因子,如骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP);另一类是没有骨诱导活性,仅具有骨传导作用的无机材料,如羟基磷灰石等。根据组织工程原理,将二者结合起来,使材料既具有骨诱导活性,又具有骨传导作用,将大大提高骨修复材料的临床实用价值。本研究将自行合成的磷酸钙骨水泥(Calcium phosphate cement, CPC)作为载体与BMP复合成人工骨,并对其进行系列的相关研究,探讨其临床应用的可能性。本实验主要检测CPC/BMP复合人工骨的理化性能及CPC的缓释效果。

1 材料与方法

1.1 BMP

由第四军医大学西京医院综合骨库提供。参照Urist等[1]方法从新鲜牛皮质骨中提取,经小鼠肌袋实验证明有较高的骨诱导活性。

1.2 CPC制备

参考文献[2~5]方法合成,由固相粉末和液相固化液两部分组成,固相主要成份为磷酸四钙(TTCP)、磷酸氢钙(DCPD)、磷酸二氢钙(MCPA)、磷酸三钙(TAP)和无水磷酸二氢钙(MCPA)。固化液为磷酸溶液。

1.3 CPC/BMP复合人工骨的制备

干燥BMP称重后剪成碎块,浸泡于固化液中24 h,玻璃匀浆器研磨成悬浊液。CPC固相粉末与含BMP的固化液按比例调和成糊状,注入直径5 mm,高5 mm的模具中,30 min后脱模

作者简介:孙明林(1970-),男,黑龙江省齐齐哈尔市人,博士,主治医师,主要从事骨移植材料方面的研究,发表论文5篇。电话:(029)2532803

收稿日期:2000-11-09;修回日期:2001-02-26

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

制成柱形骨块备用。CPC 骨块用固化液按上述方法自制得。以上两种骨块环氧乙烷灭菌。

1.4　扫描电镜分析

将备用的 CPC/ BMP 和 CPC 骨块表面喷金处理后, 用日本 S-520型扫描电子显微镜观察表面结构及孔径, 并粗测孔径大小。

1.5　不同凝固时间抗压强度及弹性模量测定

为了解骨块不同凝固时间抗压强度及弹性模量的变化, 分别取凝固时间为 0.5、2、8、24、48 h 的 CPC/ BMP 和 CPC 骨块, 用电子万能材料试验机检测其抗压强度和弹性模量。骨块置于载物平台, 使上下面与台面平行, 对骨块缓慢施加垂直压缩力。记录骨块遭破坏的最大载荷力, 计算出强度极限 R_b。并记录载荷-高度变形量曲线, 取其初始直线部分用于计算弹性模量 E。计算公式如下:

$R_b = P_{max}/A$　　$E = \Delta P \cdot L/\Delta L \cdot A$

R_b: 强度极限(MPa)　　P_{max}: 最大破坏载荷(N)

A: 骨块截面积(mm^2)　　E: 骨块弹性模量(MPa)

L: 骨块原始高度(mm)　　ΔL: 高度变形量(mm)

ΔP: 载荷变量(N)

1.6　孔隙率测定

根据 Archimedean 原理, 采用排水法分别测定 CPC/ BMP 和 CPC 骨块的孔隙率。

1.7　溶解度试验

1.7.1　静态溶解度　　将预先制备的 CPC/ BMP 和 CPC 骨块各两块分别置于盛有 200 ml 生理盐水的广口瓶中, 37 ℃恒温水浴, 间歇轻柔搅拌。分别于 1、2、4、6、8、10、12、14 d 取浸泡液, 测定钙离子浓度。

1.7.2　动态溶解度　　为模仿生理状态下体液循环对溶解度的影响, 根据蠕动泵原理, 设计动态滴注系统。将骨块置于 200 ml生理盐水中, 37 ℃恒温水浴, 用两个输液管分别作为滴入管和滴出管, 调整滴入速度和流出速度, 使之同时达到 1 000 ml/ 24 h。分别于 1、2、4、6、8、10、12、14 d 收集流出的浸泡液, 测定钙离子浓度。

1.8　缓释作用试验

鉴于 BMP 难以定量检测, 本实验以庆大霉素为例, 观察 CPC 的缓释效果。操作如下: CPC/ BMP 和 CPC 骨块制备前, 在 CPC 固相粉末加入定量的庆大霉素粉剂, 使每个骨块中约含有庆大霉素 8 mg。将两种骨块分别浸泡于 10 ml pH 7.4 的PBS 缓冲液中, 37 ℃恒温水浴。分别于 1、2、5、10、15、20 d 天更换 PBS 液, HPLC 法测定庆大霉素浓度。

2　结果

2.1　扫描电镜观察

扫描电镜可见 CPC 骨块由规则的短棒状晶体和扁平状晶体构成, 晶体互相连接附着, 晶体间充满均匀而又不规则的孔隙, 孔隙大小约 2～20 nm, 见图 1A。CPC/ BMP 骨块同样由短棒状和扁平状两种晶体构成, 晶体上附着大量的圆球形 BMP 颗粒, 大小为 1～5 nm, 晶体间孔径约为 5～50 nm, 见图 1B。

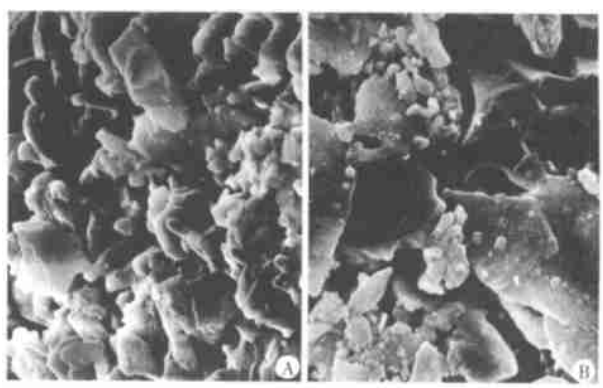


图 **1**　骨块形态特征　(SEM× 2 000)

Fig 1　Morphological feature of bone graft　(SEM× 2 000)

A: CPC; B: CPC/ BMP

2.2　不同凝固时间抗压强度及弹性模量

材料成型后开始凝固结晶, 2 h 抗压强度达极限强度的 50%以上。两种骨块均在 24 h 左右达到最大强度, 分别为 51 MPa和 60 MPa。随着抗压强度的提高, 弹性模量也增加, 说明材料的脆性变大, 见表 1。

表 **1**　不同凝固时间材料的抗压强度及弹性模量(**MPa**)

Tab 1　The compression strength and Young's modulus of different crystallizing time(MPa)

	Compression strength					Young's modulus				
	0.5 h	2 h	8 h	24 h	48 h	0.5 h	2 h	8 h	24 h	48 h
CPC/ BMP	14.5	29.4	41.3	51.0	51.1	59.7	97.4	92.2	110.5	91.6
CPC	15.1	33.3	54.0	60.6	62.7	83.0	121.9	101.5	183.6	177.4

2.3　孔隙率

经排水法测定 CPC/ BMP 骨块和 CPC 骨块孔隙率各 5 次, 取平均值, CPC/ BMP 骨块孔隙率为 44.5%, CPC 骨块孔隙率为 39.0%。

2.4　溶解度测定

随着时间的增加, 浸泡液中钙离子浓度不断提高, 尤其以前 6 d明显。说明材料有一定的溶解度。在动态溶解实验中, 14 d钙释放总量是静态实验的 17 倍, 提示材料在体液不断流动的生理环境中, 溶解速度会明显增加, 见表 2。

表 **2**　钙浓度测定结果

Tab 2　Concentration of calcium soluble in saline

	1 d	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	Total
				(mmol/ L)					(mmol)
Static test	0.9	1.8	2.0	2.9	3.6	3.6	3.6	3.7	0.74
Flowing test	0.6	0.8	1.5	1.1	1.0	0.7	0.5	0.5	12.8

2.5　缓释作用试验

庆大霉素在最初的 2 d 有一个爆炸释放效应, 总量的 49.3%在前 2 d内被释放出来, 其中第 1 天释放了 31.6%。随

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

后释放速度下降，20 d 以后检测不到药物的存在。20 d 累计释放出 7.29 mg 的庆大霉素，占总量的 91.1%，见表 3。

表 3 庆大霉素测定结果

Tab 3 Concentration of gentamicin in PBS buffer

	1 d	2 d	5 d	10 d	15 d	20 d
Gentamicin(μg/ml)	253.3	142.0	96.7	87.9	83.6	65.5
Cumulation(mg)	2.53	3.95	4.92	5.80	6.63	7.29

3 讨论

长期实验和临床观察都反复证实 BMP 是具有高效骨诱导活性的成骨因子[1,6~8]。但由于 BMP 产量低，提取工作繁琐，植入体内后很快被吸收或冲释，使其应用受到了限制。寻找理想的 BMP 载体成为国内外众多学者的研究目标[7~11]。BMP 载体应具有以下特点：①有一定的强度和立体支架作用；②能被降解或爬行替代；③生物相容性好，无免疫原性；④对 BMP 有缓释作用，不影响活性；⑤来源广泛，价格低廉，易于制备。磷酸钙骨水泥(CPC)又称羟基磷灰石骨水泥(Hydroxyapatite cement)，是指一类以各种磷酸钙盐为主要成份，在生理条件下具有自固化能力及骨传导作用的无机材料，最先由 Brown 和 Chow 于 1985 年研制成功。与陶瓷类生物材料相比，生物相容性好，有降解和成骨活性[3~5]。与传统骨水泥相比，在固化的塑型过程中不产热，适应了临床修复骨缺损的需要。因此，有关 CPC 的基础和应用研究正逐渐成为热点。本研究参照国外有关文献自行合成了 CPC，探讨将其作为 BMP 载体用于临床骨缺损的修复的可能性。

扫描电镜可见结晶后的 CPC 呈规则的多孔状结构，BMP 呈微球状均匀分布于 CPC 晶体表面及孔隙间，直径约 1~5 nm，易于扩散和分布。磷酸钙骨水泥对多种药物及 BMP 的有缓释作用[12]，本实验中 CPC 在静态 PBS 溶液中对庆大霉素的释放可持续 20 d 以上。药物的释放速度与其分子量成正相关，庆大霉素的分子量远远小于 BMP，因此 CPC 对 BMP 的缓释时间很可能比 20 d 更长，利于新骨的形成。为了解复合 BMP 后对 CPC 力学方面的影响，本实验测试了不同结晶时间抗压强度和弹性变化。发现复合 BMP 后，抗压极限强度略有下降，这与复合前后孔隙率由 39.0%上升为 44.5%是一致的。下降后的强度仍大于松质骨，可满足临床病人低负重部位骨缺损修复的需要。复合 BMP 后，弹性模量下降，表明材料脆性降低，其柔韧度较单纯的 CPC 好，这一点对临床应用是有利的。良好的载体应该易于被降解，不妨碍新骨的生长与改建[13]。无机类材料降解有 3 种方式：物理化学的溶解；化学侵蚀分裂成小颗粒；机体吞噬细胞的吞噬消化。材料降解速度与化学成份，晶体结构，密度，孔隙率和植入部位有关。材料的体外溶解性能间接地反映其在生理状态下的溶解及降解情况。有研究认为磷酸钙骨水泥在体内可被溶解成离子状态的钙/磷，直接参与新骨形成的钙磷代谢。在本实验，溶解在静态 PBS 溶液中的钙离子 6 d 达到一个相对平衡。动态溶解实验中，钙离子 4 d 达到高峰，以后逐渐降至相对稳定的速度，但 14 d 总计钙溶出量是静态实验的 17 倍。说明流动的液体环境可明显地促进材料的溶解。因此，可以推断植入局部的微循环可以促进材料的溶解，从而间接地影响吸收降解速度。从以上实验结果可以看出 CPC 在理化特性等方面可基本满足作为 BMP 载体的需要，具有实际应用价值。

参考文献：

[1] Urist M R, Nilsson O, Rasmussun J, *et al*. Bone regeneration under the influence of a bone morphogenetic protein (BMP) beta tricalcium phosphate (TCP) composite in skull trephine defects in dogs[J]. Clin Orthop, 1987, (214): 295—304.

[2] Chow L C. Development of self-estting calcium phosphate cements[J]. J Ceram Soci Jap, 1991, 99(10): 954—960.

[3] Costantino P D, Friedman C D, Jones K, *et al*. Hydroxyapatite cement. I. Basic chemistry and histologic properties[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1991, 117(4): 379—384.

[4] Hollinger J O, Brekke J, Gruskin E, *et al*. Role of bone substitutes[J]. Clin Orthop, 1996, (324): 55—65.

[5] Lacout J L, Mejdoub E, Hamad M. Crystallization mechanisms of calcium phosphate cement for biological uses[J]. J Mater Sci, 1996, 7: 371—376.

[6] Zheng Z T, Ma P, LU R, *et al*. Reparation of bone defect and nonunion by percutaneous injection of bone morphogenetic protein and red bone marrow in rabbits[J]. Di-si Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ), 1999, 20(8): 726—729.

[7] Lou Z J, Hu Y Y, Wang Q. Antigen-extracted bovin cancellous bone block/bBMP composite graft in repairing segmental radial disphysial defects in rabbits[J]. Di-si Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ), 2000, 21(1): 48—51.

[8] Zhou Y, Fang Q Y, Jiang W Z, *et al*. Bone induction of copmound material of decalcified bone matrix with rhBMP-2 impregnated bone cement [J]. Di-si Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ), 1999, 20(12): 1 085—1 087.

[9] Hollinger J. Factors for osseous repair and delivery: Part I[J]. J Craniofac Surg, 1993, 4(2): 102—108.

[10] Wang D, Zhao G Y, Hu Y Y, *et al*. Development of β-TCP/rhBMP-2 composites with different degradation reat as bone graft substitutes and assessment of its osteoinductive potential[J]. Di-si Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ), 1998, 19(3): 198.

[11] Wang D, Hu Y Y, Zhao G Y, *et al*. Scanning electron microscope examination of β-TCP/rhBMP-2 composite in heterotopic osteoinduction of mice[J]. Di-si Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ), 1998, 19(6): 517—519.

[12] Kamegiai A, Shimamura N, Natiou K, *et al*. Bone formation under the influence of bone morphogenetic protein/self-setting apatite cement composite as a delivery system[J]. Biomed Mater Eng, 1994, 4(4): 291—307.

[13] Ohgushi H, Okumura M, Tamai S. Marrow cell induced osteogenesis in poroushydroxyapatite and tricalcium phosphate: a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation[J]. J Biomed Mater Res, 1990, 24(12): 1 563—1 570.

（编辑 张大春）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net