

# 用于骨质疏松脊柱压缩骨折的新型可降解材料的体外实验研究

尤瑞金<sup>1\*</sup> 于龙<sup>2</sup> 吕宏升<sup>1</sup> 吴子祥<sup>2</sup> 雷伟<sup>2</sup>

1. 福建泉州解放军第 180 医院, 福建泉州 362000
2. 陕西省西安市第四军医大学西京医院, 西安 710032

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 06-0683-05

**摘要:** **目的** 研发一种用于治疗骨质疏松椎体压缩骨折的新型复合生物玻璃的磷酸钙骨水泥, 并观察其体外材料学及生物学活性。**方法** 将不同质量百分比的生物玻璃(bioglass, BG)与磷酸钙(calcium phosphate cement, CPC)球磨后物理共混获得一种具有可注射、自固化、可降解的椎体成型替代材料。分别对该替代材料的凝固时间、流动性、力学强度进行测定并行材料体外成骨细胞粘附实验、增殖实验, 观察其生物相容性。**结果** 随着新型替代材料中 BG 组分含量的增加, 替代材料的凝固时间逐渐延长, 同时, 流动性较磷酸钙骨水泥改善明显。随着凝固时间的延长, 替代材料固化后的抗压强度显著高于实验组 CPC 骨水泥。此外, 与 CPC 相比, 替代材料更有利于细胞的粘附、增殖及分化, 具有良好的生物相容性。**结论** 新型复合生物玻璃的磷酸钙的生物材料不仅具有可注射性和较高的力学强度, 同时骨传导性能更好, 有希望成为临床治疗骨质疏松椎体压缩骨折的一种新型椎体成形材料。

**关键词:** 磷酸钙骨水泥; 生物玻璃; 成骨细胞; 骨诱导活性; 椎体成形术

## Development of a new degradable bioglass-based bone cement for osteoporotic compressive fractures: an in vitro experimental study

YOU Ruijin<sup>1</sup>, YU Long<sup>2</sup>, LV Hongsheng<sup>1</sup>, WU Zixiang<sup>2</sup>, LEI Wei<sup>2</sup>

1. The 180 Hospital of PLA, Quanzhou Fujian, 362000
2. Xijing Hospital of the Forth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: YOU Ruijin, Email: 7192133@qq.com

**Abstract: Objective** To develop a new type of bone cements by adding bioglass (BG) into calcium phosphate cement (CPC) and evaluate its material properties and bioactivity. **Methods** Different proportions of the CPC-BG composite were mixed to obtain an injectable, self-solidified, and degradable alternative material. The osteoblasts (OB) were seeded onto the CPC-BG composite disks and the adhesion, proliferation, morphology, and differentiation abilities of the OB were observed. **Results** The setting times of CPC-BG were prolonged as the content of BG increased. The injectability of CPC-BG composite paste improved significantly compared to that of CPC paste ( $P < 0.05$ ). The compressive strength of CPC-BG composites was higher than that of CPC significantly ( $P < 0.05$ ). In addition, the degree of cell attachment, proliferation and differentiation, and biocompatibility increased by adding BG into CPC. **Conclusion** CPC-BG with injectability and high strength and good bioactivity, may become a new material for vertebroplasty in the treatment of osteoporotic compressive fractures.

**Key words:** Calcium phosphate cement; Bioactive glass; Osteoblasts; Bone-induced activity; Vertebroplasty

骨质疏松性椎体压缩骨折(osteoporotic vertebral compressive fractures, OVCFs)是骨质疏松最常见的并发症, 微创椎体成型术和球囊成型术是治疗 OVCFs 的主要外科手段<sup>[1-3]</sup>。目前, 国内外最常采用的椎体成型材料是聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥

(PMMA), 但该材料存在多种缺陷: 在体内无法吸收, 长期以异物形式存在; 可引起相邻节段应力集中, 增加临近脊柱节段骨折的风险; 单纯为力学支撑材料, 无骨传导、骨诱导作用, 阻碍脊柱骨折愈合等。因此, 寻找一种具有促成骨形成、可吸收的生物材料在骨质疏松椎体压缩骨折的治疗中具有重要意义。

\*通讯作者: 尤瑞金, Email: 7192133@qq.com

磷酸钙骨水泥(calcium phosphate cement,CPC)是一种可吸收生物材料,曾应用于椎体成型术中,但是由于凝固过快、不易降解、术中操作不便等缺点,最终未能获得临床广泛推广。生物玻璃(bioglass,BG)是一种硅酸盐类材料,不仅可直接参与骨组织的代谢和修复过程,诱导新生骨组织的生长<sup>[4]</sup>,而且能够与多种生物材料复合并改变其理化特性,但尚未见将其与磷酸钙复合的报道。本研究拟将生物玻璃与磷酸钙骨复合,改善其可注射性,进一步提高磷酸钙骨水泥生物活性,进而为 OVCFs 的治疗提供一种新的强化材料。

1 材料和方法

1.1 材料制备及实验分组

将 45S5 BG(bioglass,45S5 NovaBone, Alachua, 美国)和 CPC(自行制备)将球磨后获得颗粒粒径约 10 微米的粉末,按不同重量比进行物理共混(表 1)。取质量浓度 1 mol/L 磷酸二氢钾和磷酸氢二钾作为液相,按固相粉末与液相的比例 2.0 g/mL,配制成牙膏状灌入圆柱体模具中,在 100% 相对湿度的温箱中 37℃ 固化。

表 1 材料实验分组

Table 1 Experimental grouping

| 分组  | BG 含量(%) | CPC 含量(%) |
|-----|----------|-----------|
| A   | 10       | 90        |
| B   | 20       | 80        |
| C   | 30       | 70        |
| CPC | 0        | 100       |

1.2 理化性质测定

①凝固时间:根据 ASTM C187-98 标准测试方法,使用 ISO 水泥标准稠度凝结时间测定仪(河北宏宇仪器设备有限公司)测量做凝固时间。每组测定 6 次,取平均值。

②可注射性:分别在材料的固液相混合 1、3、5、7、10 和 15 min 后灌入 2.5 mL 一次性注射器针管中,逐渐将材料压出。测量压出前后替代材料的重量。流动性(%) = 推出的材料重量/注射前的材料重量,每一组材料重复测量 6 次,取平均值。

③力学强度:通过磨具制备标准规格的材料试样(直径 5 mm、高度 10 mm)。在固化 1d 和 7d 后,使用万能力学试验机以 1 mm/min 的加载速度进行加压,并记录最大断裂载荷( $F_{最大}$ )。抗压强度 =  $F_{最大}/A$ ,A 为横截面积。每组每个时间点重复测 6 次,取平均值。

1.3 体外细胞学实验

采用 MTT 法检测大鼠成骨细胞在材料表面的粘附和增殖情况。以  $5.0 \times 10^4$ /孔的浓度将成骨细胞接种于 24 孔板中消毒好的各组材料上,加入细胞培养液 1 mL。在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养 4 小时,8 小时后每孔加入 100 μL 的 MTT 液,继续培养 4 h,小心弃去培养液,取出材料,置于新 24 孔细胞培养板中,每孔滴加 DMSO 600 μL,震荡 10 min,每孔吸取 3 份 150 μL 溶液转移到 96 孔培养板中,单纯 DMSO 加入空白孔调零,用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长测定 OD 值。成骨细胞增殖实验的接种及培养方法同前,分别在培养 1、4 及 7d 后,用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长测定 OD 值。每组每个时间点 6 个样本,取平均值。形态学采用扫描电镜观察。

ALP 活性检测:将成骨细胞以  $2.0 \times 10^4$ /孔的浓度接种于 24 孔板中的材料表面共培养 4、7d,弃去培养液用 PBS 小心清洗 3 次。用 1% Triton-X100 溶液裂解成骨细胞,4℃ 条件下孵育 12 h。用 ALP 检测试剂盒测定裂解产物中酶的活性,选择 405 nm 波长处测得溶液的吸光值。用 BCA 方法测定每孔细胞的总蛋白量。ALP 活性以总蛋白量标准化下的值来表示。

1.4 统计学处理

计量资料采用 mean ± SD 表示,采用 SPSS 19.0 进行方差分析(ANOVA),不同组均数之间采用 SNK-q 检验进行两两比较。细胞学实验组间比较采用双侧 t 检验或单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$  认为有统计学差异。

2 结果

2.1 凝固时间

替代材料 A、B、C 组及对照材料 CPC 组的凝固时间见表 2。随着替代材料中 BG 组分含量的增加,替代材料的凝固时间逐渐延长。

表 2 不同实验组的凝固时间结果

Table 2 The results of the setting time in different groups

| 分组  | 凝固时间(min) |
|-----|-----------|
| A   | 21 ± 1.4  |
| B   | 25 ± 0.9  |
| C   | 34 ± 1.1  |
| CPC | 15 ± 0.8  |

2.2 流动性

在混合后第 1、3、5 min 后,各组材料的流动性无明显差距,均有良好的可注射性;但在第 7 分钟后,替代材料仍能保持较好的流动性,可注射性明显高于对照组 CPC 材料( $P < 0.05$ )。第 10 分钟后,各组材料的可注射性差异进一步增加,混合 20% BG 的替代材料组的可注射性达 90%,而纯 CPC 组仅为 58%。15 min 后,各材料组可注射性均有不同程度下降,其中又以 CPC 组降低程度最大,可注射性仅为 21% (图 1)。

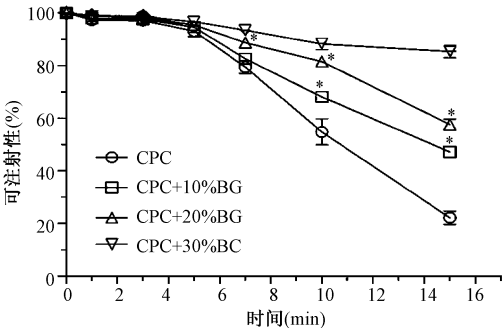


图 1 不同材料组的流动性结果比较  
(\*  $P < 0.05$  与 CPC 组比较)

Fig. 1 Comparison of the injectability among different groups  
\*  $P < 0.05$ , compared with CPC group

2.3 力学强度

各组材料抗压强度结果见图 2。各组材料的抗压强度均随凝固时间延长而增加。在同一时间点,混合 20% BG 的替代材料具有最高的力学强度(40 MPa),显著高于对照组 CPC 材料(第 1 天为 15 MPa,第 7 天为 22 MPa) ( $P < 0.05$ )。

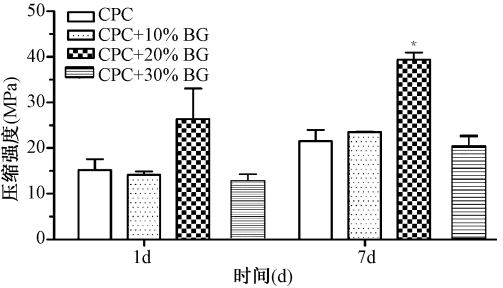


图 2 不同材料组的力学强度比较  
(\*  $P < 0.05$  与 CPC 组比较)

Fig. 2 Comparison of compressive strength among different groups  
\*  $P < 0.05$ , compared with CPC group

2.4 成骨细胞在材料表面粘附能力测定

MTT 实验结果显示:共培养 4 h 后,CPC 组与各材料组无统计学差异( $P > 0.05$ )。共培养 8 h 后,

各材料组的吸光度值(OD)高于 CPC 组,其中 B、C 组与 CPC 组比较具有统计学差异( $P < 0.05$ ),B 组在 8 h 时 OD 值最高(图 3)。

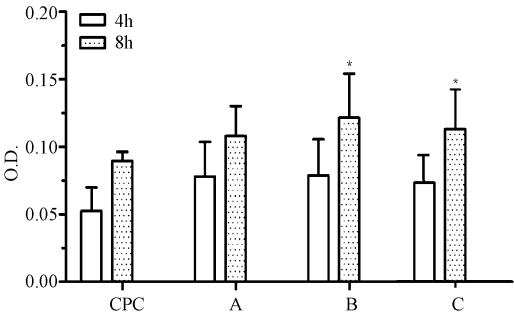


图 3 细胞在不同材料表面不同时间  
点粘附能力比较

Fig. 3 Comparison of cell attachment on different surface of the material and different time-points

2.5 成骨细胞在材料表面增殖能力测定

随着细胞接种材料时间的延长,细胞在不同材料表面均呈持续性增加。图 4 为细胞增殖曲线。在培养 4、7d 后,B、C 组 OD 值均高于 CPC 组并具有统计学差异( $P < 0.05$ ),提示与 CPC 组相比,替代材料组更有利于细胞生长及增殖且无细胞毒性。

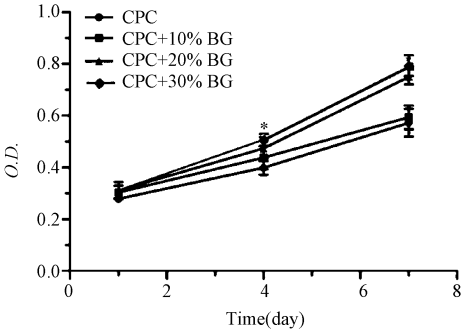


图 4 细胞在不同材料表面不同时间  
点增殖能力比较

Fig. 4 Comparison of cell proliferation on different surface of the material and different time-points

2.6 成骨细胞在材料表面分化能力( ALP 活性)测定

随着时间的延长,各组细胞 ALP 活性均逐渐增高,图 5 为细胞与材料共培养 4d 及 7d 后 ALP 活性检测结果,细胞接种于细胞培养板培养作为阳性对照组。结果发现,在 4d 及 7 天 d,B、C 组 ALP 活性比 CPC 组及单纯培养板组高,具有统计学差异( $P < 0.05$ )。A 组的 ALP 活性虽然比 CPC 组及单纯培养板组高但是并无统计学差异( $P > 0.05$ )。

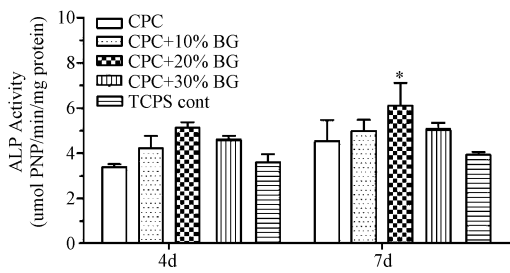


图5 细胞在不同材料表面不同时间点 ALP 活性比较

Fig. 5 Comparison ALP activity in cells on different surface of the material and different time-points

3 讨论

目前治疗 OVCFs 的椎体填充材料绝大多数是聚甲基丙烯酸甲酯。然而,该材料存在明显的缺陷:单纯的力学支撑,不具有骨传导、骨诱导作用;无法被自身组织吸收替代;弹性模量过高,甚至会出现 PMMA 骨水泥块松动移位<sup>[5]</sup>。因此,迫切需要一种新型的椎体成型替代材料,在对疏松椎体提供足够力学支撑的同时,还可通过骨传导和骨诱导作用促进骨折的愈合。

磷酸钙骨水泥 (calcium phosphate cement, CPC) 有显影能力,凝固不放热,无细胞毒性,因此曾被尝试应用于椎体成型术<sup>[6,7]</sup>。但由于其脆性大、力学强度较差,遇体液和血液后固化困难、后期难以满足老年人骨质疏松脊柱骨折的术后即刻稳定要求,因此多用于年轻患者的椎体 A 型骨折<sup>[8,9]</sup>。

生物玻璃是一类可直接参与骨组织的代谢和修复过程,最终在材料表面形成与人体骨相同无机矿物成分的新型骨修复材料<sup>[4]</sup>。与传统骨水泥材料相比,生物玻璃具有两个优点:(1)生物玻璃可溶出硅离子,在材料界面与人体骨组织之间形成化学键合,这种化学键的连接强度提供了很高的移植物与骨界面的稳定性,其骨传导性优于羟基磷灰石;(2)生物玻璃可以通过改变各组分的含量以调节其生物活性、降解性以及机械性能,形成具有各种特殊功能的替代材料,满足不同的临床要求<sup>[10-12]</sup>。但是,现有生物玻璃主要为固态,不能够适应椎体成型或球囊成型术的要求。同时,现有生物玻璃的生物力学强度相对较低,不适合应用于脊柱等重要承重部位的骨修复。本研究通过对生物玻璃进行改性研究,使其获得流动性特点,而且具有一定的力学强度和良好的生物活性,能够满足椎体成形术的要求。

使用 PMMA 骨水泥填充至压缩骨折的椎体内,

实质上通过是粘结椎体内的细微骨折块,获得力学稳定达到止痛的目的,但这一过程也直接影响骨折愈合。本实验结果发现细胞与新型替代材料共培养后,替代材料组 OD 值明显高于 CPC 组,提示生物玻璃材料的引入有助于提高细胞粘附的作用。其可能原因为生物玻璃与体液接触后可在其表面形成富 SiO<sub>2</sub> 层,可产生高的负电,通过吸附血清蛋白促进细胞与材料粘附<sup>[13]</sup>。扫描电镜结果发现,成骨细胞可在 CPC 及替代材料表面保持正常的细胞形态并通过突起在材料表面粘附并生长,提示 CPC 及替代材料均适合细胞的粘附生长,证实新材料具有良好的生物活性。

成骨细胞与替代材料共培养 4d 和 7d 后,ALP 活性高于 CPC 组,并随着时间延长,ALP 活性逐渐增加,提示将生物玻璃加入 CPC 中,可提高细胞分化并获得优于 CPC 的生物活性。在本实验中,替代材料表面溶解析出的离子也可为细胞提供了富 Ca 及 Si 离子的微环境,有利于细胞的生长、增殖和分化<sup>[14,15]</sup>。但也有文献报道 45S5 生物玻璃对人的骨髓基质干细胞 ALP 活性的提高并不明显<sup>[16]</sup>。但是在体内实验中生物玻璃却能显著促进骨再生,其可能原因在于人体内的微环境复杂包括多种骨细胞以及生长因子,因此推断 BG 在体内的对骨再生的促进的机制更复杂,可能不仅仅通过促进骨髓基质干细胞的分化来实现的<sup>[17]</sup>。最近一项研究又发现,PLGA-S-BG 替代材料可有效促进人骨髓基质干细胞的分化<sup>[18]</sup>。由此可见,目前关于生物玻璃对人骨髓基质干细胞的促进作用还存在一定分歧。后期研究中仍需要针对人骨髓基质干细胞对生物玻璃或替代材料的生物学反应进行更加深入的研究。

4 结论

新型复合生物玻璃的磷酸钙骨水泥具有较好的流动性及生物力学性能,同时具备良好的生物相容性,有望成为一种治疗 OVCFs 的新型椎体成形材料。

【参考文献】

[1] 周毅,海涌,苏庆军,等.椎体后凸成形术治疗骨质疏松椎体压缩性骨折疗效分析[J].中国骨质疏松杂志,2012,18(5):429-433.

Zhou Y, Hai Y, Su QJ, et al. Clinical analysis of percutaneous kyphoplasty for osteoporotic vertebral compression fracture. Chin J Osteoporosis, 2012, 18(5):429-433. (in Chinese)

(下转第 696 页)

Journal of Guangzhou Medical College, 2007,35:31-33.

[ 17 ] Gokhan G, Fatma S M, Zeynep Y et al Evaluation of vertebral bone marrow fat content by chemical-shift MRI in osteoporosis Skeletal Radiology. 2011, 40: 577-585.

[ 18 ] M. A. Fischer, D. Nanz, A. himakawa, et al. Quantification of muscle fat in patients with low back pain: comparison of multi-echo MR imaging with single-voxel MR spectroscopy, 2013, 1674-1897.

[ 19 ] Ojanen X, Borra RJ, Havu M, et al. Comparison of vertebral bone marrow fat assessed by 1HMRSand inphase and out-of-phase MRI among family members. Osteoporos Int, 2013; 24:72-9.

( 收稿日期: 2014-08-07 )

(上接第 686 页)

[ 2 ] Denaro V, Longo UG, Denaro L. Vertebroplasty versus conservative treatment for vertebral fractures. Lancet, 2010, 376 ( 9758 ) : 2071.

[ 3 ] Klazen CA, Lohle PN, de Vries J, et al. Vertebroplasty versus conservative treatment in acute osteoporotic vertebral compression fractures ( Vertos II ): an open-label randomised trial. Lancet, 2010, 376 ( 9746 ) : 1085-1092.

[ 4 ] Vargas GE, Mesones RV, Bretcanu O, et al. Biocompatibility and bone mineralization potential of 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds in chick embryos. Acta Biomater, 2009, 5: 374-380.

[ 5 ] Nüchterlein M, Bail HJ. A rare complication of kyphoplasty is PMMA-cement loosening - case report and literature review. Z Orthop Unfall, 2013, 151 ( 5 ) : 463-467.

[ 6 ] Verron E, Pissonnier ML, Lesoeur J, et al. Vertebroplasty using bisphosphonate-loaded calcium phosphate cement in a standardized vertebral body bone defect in an osteoporotic sheep model. Acta Biomater, 2014, 10 ( 11 ) : 4887-4895.

[ 7 ] Nakano M, Hirano N, Ishihara H, et al. Calcium phosphate cement-based vertebroplasty compared with conservative treatment for osteoporotic compression fractures: a matched case-control study. J Neurosurg Spine, 2006, 4 ( 2 ) : 110-117.

[ 8 ] Maestretti G, Sutter P, Monnard E, et al. A prospective study of percutaneous balloon kyphoplasty with calcium phosphate cement in traumatic vertebral fractures: 10-year results. Eur Spine J, 2014, 23 ( 6 ) : 1354-1360.

[ 9 ] Blattert TR, Jestaedt L, Weckbach A. Suitability of a calcium phosphate cement in osteoporotic vertebral body fracture augmentation: a controlled, randomized, clinical trial of balloon kyphoplasty comparing calcium phosphate versus polymethylmethacrylate. Spine, 2009, 34 ( 2 ) : 108-114.

[ 10 ] Nandi SK, Kundu B, Datta S, et al. The repair of segmental bone defects with porous bioglass: an experimental study in goat. Res Vet Sci, 2008, 2: 162-173.

[ 11 ] Bretcanu O, Misra S, Roy I, et al. In vitro biocompatibility of 45S5 Bioglass ( ( R ) ) -derived glass-ceramic scaffolds coated with poly ( 3-hydroxybutyrate ). J Tissue Eng Regen Med, 2009, 2: 139-148.

[ 12 ] Reilly GC, Radin S, Chen AT, et al. Differential alkaline phosphatase responses of rat and human bone marrow derived mesenchymal stem cells to 45S5 bioactive glass. Biomaterials, 2007, 28: 4091-4097.

[ 13 ] Lee MH, Ducheyne P, Lynch L, et al. Effect of biomaterial surface properties on fibronectin-alpha ( 5 ) beta ( 1 ) integrin interaction and cellular attachment. Biomaterials, 2006, 27: 1907-1916.

[ 14 ] Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, et al. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. J Biomed Mater Res, 2001, 55 ( 2 ) : 151-157.

[ 15 ] Hoppe A, Guldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. Biomaterials, 2011, 32 ( 11 ) : 2757-2774.

[ 16 ] Reilly GC, Radin S, Chen AT, et al. Differential alkaline phosphatase responses of rat and human bone marrow derived mesenchymal stem cells to 45S5 bioactive glass. Biomaterials, 2007, 28: 4091-4097.

[ 17 ] Gerhardt LC, Widdows KL, Erol MM, et al. The pro-angiogenic properties of multi-functional bioactive glass composite scaffolds. Biomaterials, 2011, 32 ( 17 ) : 4096-4108.

[ 18 ] Pamula E, Kokoszka J, Cholewa-kowalska K, et al. Degradation, bioactivity, and osteogenic potential of composites made of PLGA and two different sol-gel bioactive glasses. Ann Biomed Eng, 2011, 39: 2114-2129.

( 收稿日期: 2015-03-31 )