

文章编号: 1004-0609(2004)S1-0337-04

无生命材料参与有生命组织的过程^①

李世普, 戴红莲, 闫玉华, 沈春华, 江 昕

(武汉理工大学 生物材料与工程研究中心, 武汉 430070)

摘 要: 探讨细胞对可降解多孔磷酸三钙陶瓷(β -TCP)降解的影响及材料骨内植入后在体内超微结构的变化, 研究了磷酸三钙陶瓷的生物降解、新骨生成过程及结构的变化, 为可降解钙磷材料的生物降解和骨生成机制提供依据。研究表明, 材料在体内超微结构的变化是影响材料降解的重要因素之一; 钙磷材料通过溶解沉积参与新骨形成, 以 OCP, DOHA 和 HAP 的形式存在于骨胶原纤维中, 与其他有机质一起构成新骨。

关键词: 磷酸三钙陶瓷; 生物降解; 超微结构; 参与; 新骨形成

Process of non-life materials participating in life tissue

LI Shi-pu, DAI Hong-lian, YAN Yu-hua, SHEN Chun-hua, JIANG Xin

(Biomedical Materials and Engineering Center, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

Abstract: The effect of cells on the biodegradation of porous tricalcium phosphate (β -TCP) and the ultrastructure transformation of the materials after implantation were studied. The process of biodegradation, new-bone formation and structural change of calcium phosphate ceramics were also investigated. The results provide the direct evidence of the mechanism of biodegradation and osteogenesis for biodegradable calcium-phosphor (CaP) ceramics, and show that the ultrastructural transformation of CaP in vivo is one of the important factors of biodegradation. Non-life CaP materials participate in new-bone formation by force of dissolution and deposition. It constitutes bone tissue with other organics together in the form of OCP, DOHA and HAP, which consist in osteocollagenous fibers.

Key words: calcium phosphate ceramics; biodegradation; ultrastructure; participation; bone formation

钙磷基生物陶瓷材料的化学组成与骨组织的无机成分相近, 具有良好的生物相容性, 无变异性, 不会引起炎症, 材料植入骨内可直接与骨组织接触, 没有纤维包裹层, 避免自体移植和异体移植的缺点^[1,2]。因此, 钙磷(CaP)生物活性陶瓷材料具有广泛的应用价值和发展潜力。目前对 CaP 生物陶瓷材料的研究主要集中在四大热点: 一是 CaP 陶瓷的生物相容性和生物活性; 二是 CaP 陶瓷在体内的降解机理和代谢过程; 三是 CaP 陶瓷的骨诱导性, 即是否能诱导骨生长; 四是 CaP 陶瓷生物体内的骨转化现象, 即无生命向有生命的转化。前三者是研究无生命材料参与有生命过程的基础。CaP 生物陶瓷材料在体内能发生溶解和生物降解,

释放出 Ca^{2+} , PO_4^{3-} 离子, 参与钙磷代谢, 并在植入部位附近参与骨沉积和重建。CaP 材料发生降解是无生命材料向有生命的转化的必要条件^[3]。目前对 CaP 生物陶瓷材料降解机理的研究还需进一步深化, CaP 在体内的代谢途径及产物的研究取得了初步的进展, 但还没有得到具体量化的结果, CaP 生物陶瓷材料在体内参与有生命组织过程的条件及机制的研究尚未见报道^[4,5]。这些问题的存在使 CaP 生物陶瓷材料的临床应用具有盲目性, 妨碍了 CaP 材料的研究开发及其在骨缺损修复等医学领域的应用。

磷酸钙陶瓷中 β -磷酸三钙(β -TCP)陶瓷的生物降解性能显著。研究表明, 单一的 β -TCP 陶瓷的烧

① 基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(G1999064701)

作者简介: 李世普(1946-), 男, 教授, 博士生导师。

通讯作者: 李世普, 教授; 电话: 027-87651852; 传真: 027-87880734; E-mail: lisp@public.wh.hb.cn

成温度较高,降解速度太慢与骨生长速度不匹配^[6]。为了进一步增加材料在体内的溶解度,采用Ca-P系低熔点水解玻璃为粘结剂,降低了烧成温度而保持了 β -TCP的活性。本研究将根据仿生设计制备的多孔 β -TCP陶瓷植入体内,观察材料在体内的超微结构变化及材料于细胞的相互作用,以探讨无生命材料参与有生命组织过程。

1 材料与方法

1.1 材料制备

以高纯超微 β -TCP粉为原料,加入以CaO和 P_2O_5 为主要成分的高温玻璃粘接剂,采用发泡法成型,经850℃保温2h得到 β -TCP多孔陶瓷。材料密度为1.2 g/cm³,气孔率为50%,孔径为240~510 μ m,抗压强度为15 MPa。材料内部大孔与微孔连通,颗粒间为颈部连接,结构与松质骨相似。材料的主晶相为 β -Ca₃(PO₄)₂,还存在少量其他磷酸钙晶相(NaCa(PO₄)₂, Ca₂P₂O₇、Ca₄(PO₄)₂O等)与非晶相(玻璃相)。

1.2 细胞培养

将近交系C₅₇BL/6小鼠腹腔收集的巨噬细胞,纯化后,以无血清RPMI1640培养液将巨噬细胞稀释到 2×10^6 /mL,与 β -TCP陶瓷粉末制成的混悬液混合培养,并以材料与培养液及单纯的培养液为2对照组。培养72h后,在显微操作系统中用纳米级超微电极检测各组培养皿内细胞内及细胞膜外微区pH值;培养第7天,检测培养液Ca与P的离子浓度;取巨噬细胞与TCP陶瓷混合培养的玻片标本,经2.5%戊二醛和1%锇酸双固定,逐级酒精脱水,临界点干燥,表面喷金,通过日本SX-40型扫描电镜观察巨噬细胞与材料的作用。

1.3 骨内植入实验

新西兰白兔16只,质量2~2.5 kg。按无菌原则,作双膝内侧纵切口,在踝间凹中心各钻一直径5 mm、深8 mm的骨腔洞,用生理盐水冲洗净骨屑。将高压蒸汽消毒后的圆柱状 β -TCP陶瓷(直径5 mm,长8 mm)植入兔子双侧股骨孔内,使试样尾俯于骨皮质,分层缝合切口。手术后每月定期处死2只动物,将植入材料连同周围组织完整取出,经4℃下2.5%的戊二醛缓冲溶液前固定,酒精逐级脱水,真空干燥,1%的锇酸后固定,树脂812包埋,沿垂直植入材料长轴方向用超薄切片机(Leica UL-

tracut R)做切片(75 nm厚),上铜网,醋酸铀、柠檬酸铅双重染色,用透射电镜(Philips CM20)对植入材料及所得切片进行观察分析。

2 结果与讨论

β -TCP陶瓷植入骨内后,巨噬细胞可向植入区聚集。因此巨噬细胞对陶瓷的降解发挥重要作用。体外实验证明巨噬细胞与 β -TCP陶瓷混合培养后,培养液中的钙磷浓度明显高于单纯 β -TCP陶瓷浸泡于培养液中浓度,统计学处理差异有显著性($P < 0.01$)。培养72h,用纳米超微电极测出 β -TCP/培养液和巨噬细胞/培养液2个对照组中,溶液及细胞内外的pH值与单纯培养液中的pH值一致,均为弱碱性(pH=8.30),而 β -TCP陶瓷/巨噬细胞/培养液组中,细胞内及细胞膜外微区变成弱酸性(pH=6.10)。SEM观察发现,巨噬细胞一方面伸出小的突起将材料颗粒包裹并吞噬到细胞内进而与溶酶体融合在多种水解酶作用下进行细胞内降解,在细胞内降解后产生的钙、磷可被转运到细胞外(图1)。这种吞噬活动属于非免疫性吞噬,与磷酸钙陶瓷颗粒表面的静电和疏水力有关^[7]。

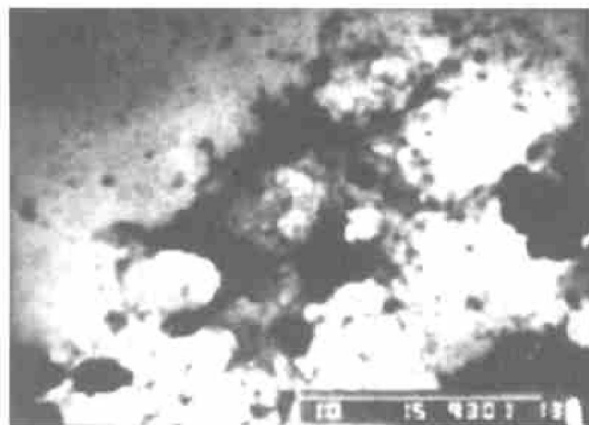


图1 巨噬细胞吞进材料颗粒(SEM)

β -TCP陶瓷的降解机理主要是通过体液的侵蚀发生溶解,另一方面是由于细胞的吞噬与传递。将 β -TCP陶瓷材料植入大耳白兔的股骨内4周后的结果发现,材料的晶相颗粒呈分离状,彼此被骨组织或纤维组织分开。材料降解从玻璃连接相开始突破,晶体呈无规则的几何形状,连接晶粒的玻璃相在体液下发生水解,从而伴随晶相颗粒的分离^[5]。

TEM显示 β -TCP材料植入体内1个月后,材料分散并被新生骨组织包裹,材料周围的胶原纤维

逐渐矿化, 材料颗粒与骨组织直接紧密相连, 并在界面沿骨组织平行排列。在材料与骨组织交界处, 发现材料表面被溶解、浸蚀。在界面细胞外基质中材料界面析出针状羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HAP) 晶体, 发生了结构的改变。材料植入 2 个月后, 材料分散并被新生骨组织包裹, 材料周围的胶原纤维逐渐矿化, 出现了类骨质—编织骨—板层骨的过渡, 材料颗粒与骨组织直接紧密相连, 并在界面沿骨组织平行排列。这种成骨方式表现为典型的膜内成骨。植入 5 个月时材料界面部分呈现解理趋势, 出现片状结构, 长轴垂直(012)面, 宽的方向垂直(210)面, 晶面簇{110}的面间距为 0.52 nm。这表明 β -TCP 材料沿(001)面发生解理, 形成片状晶体(图 2), 这种结构是热力学不稳定的, 有利于材料降解。

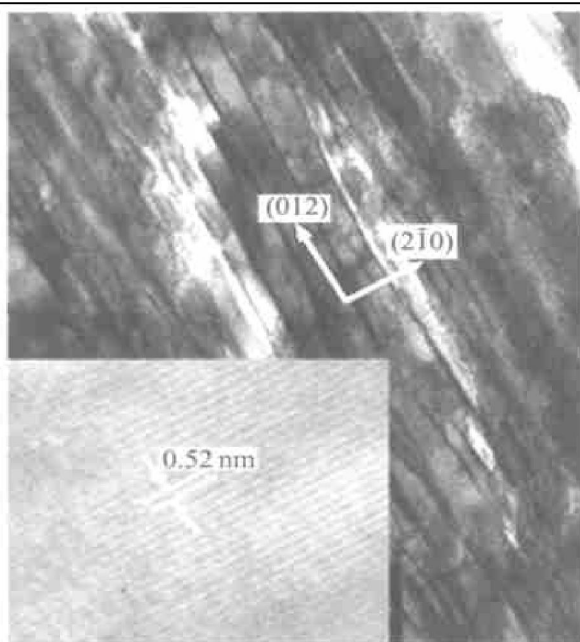


图 2 植入 5 个月后材料解理成片状晶体(TEM)

材料植入 8 个月后, 材料颗粒与骨组织完全交织在一起, 互相包围连成一片, 部分材料以纳米级颗粒存在于新骨组织中, 参与成骨, 胶原纤维逐渐矿化、成熟。界面处可见的圆柱形成骨细胞成群排列, 成骨现象明显。新骨组织中可见破骨细胞, 体积大, 具多核, 表面有突起, 呈叶状。材料相邻的组织区还可观察到巨噬细胞, 体积大, 形状不规则, 带伪足或突起, 正在吞噬材料颗粒(图 3)。材料与骨组织之间基本不存在界面, 并在界面处有不稳定的磷酸二氢钙(Dicalcium phosphate dihydrate, DCPD)沉积。而在骨组织与材料解理成片状晶体的界面处出现磷酸八钙(Octacalcium phosphat, OCP)晶体沉积。在新骨组织中, 材料颗粒以 OCP 的形式

存在参与新骨的形成。材料植入 15 个月后, 胶原纤维呈交织状平行排列, 材料以针状晶体存在于骨胶原纤维中, 结晶的 HAP 和缺钙磷灰石(Calcium hydrogen phosphate hydroxide, DOHA)同时存在, 骨纤维完全矿化(图 4), 形成新骨, 材料与组织已组成一个有机的生命体, 表明材料已参与成骨。

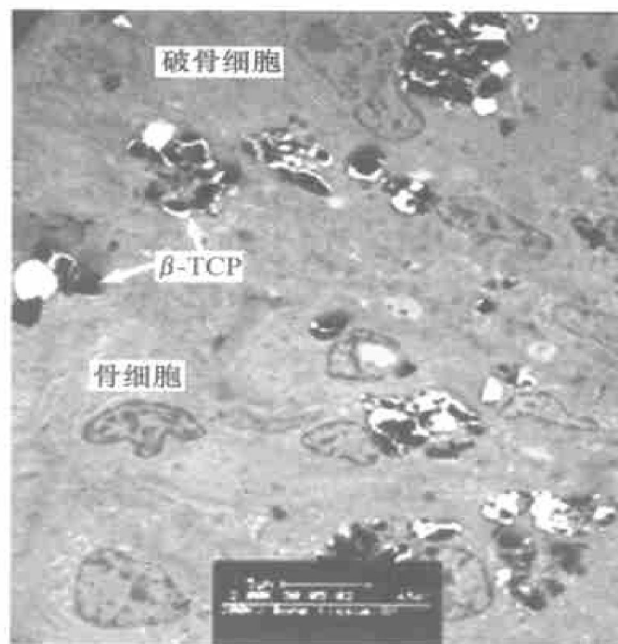


图 3 植入 8 个月后材料呈颗粒状分散在新骨中(TEM)

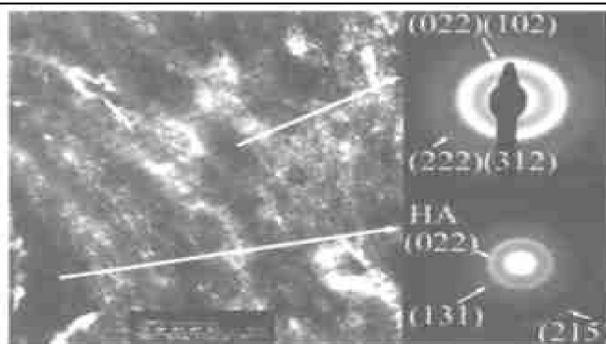


图 4 植入 15 个月后胶原纤维的矿化和成熟(TEM)

材料降解是无机材料参与有生命组织过程的基础, 材料降解有 2 种途径: 一是通过体液降解; 二是通过巨噬细胞的吞噬及其和破骨细胞的细胞外降解。从以上结果可见, 巨噬细胞伸出伪足吞噬材料颗粒, 并在细胞内与溶酶体融合, 在多种生物酶的作用下进行细胞内降解, 也可伸出突起与材料表面接触, 使材料发生细胞外降解和吸收。而降解产物一方面通过血液循环分布到各脏器组织中, 另一部分则储存于钙库中, 并被利用参与植入局部或植入远处新骨的钙化。材料不断降解的同时, 新骨不断形成, 并逐渐发育完整。材料的生物降解和新骨生成过程同时进行, 是既相互联系又相互制约的复杂而缓慢的生物转化过程。

在生命过程中 Ca 始终为无机物, 仅以游离 Ca^{2+} 和钙盐晶体沉积 2 种方式存在; 无机磷酸则不同, 由于磷原子结构上的多价态, 易变价, 且磷酸基积极参与各种生化过程, 因此磷在生命化学中处于特殊位置。植入后陶瓷材料的无机钙和磷已转化成有生命的有机钙磷化合物, 进而参与了宿主生命的代谢过程和骨的形成。正是由于这些活细胞的不断参与和转换, 促进了材料的生物降解吸收和新骨组织的生成和发展, 并使骨生成和吸收处于一种动态平衡, 骨成熟后矿物相最终以 DOHA、HAP 等形式存在, 从而标志着钙磷生物陶瓷通过生物转化已成为有生命的骨组织一部分, 实现无生命材料参与有生命的组织活动。

3 结论

磷酸钙陶瓷不仅可作为骨生长的支架, 而且能被逐渐吸收降解, 引导新骨生成并参与宿主骨的生命过程。磷酸钙陶瓷通过体液的浸蚀和细胞的作用, 逐渐降解, 产生的钙、磷参与体内钙循环和骨组织的再生; 降解中材料颗粒在界面处呈平行排列, 沿(001)逐渐解理, 成为片状结构, 有利于材料的进一步降解, 并由微米级转化为纳米级材料, 分散在新骨组织中, 与骨组织交织在一起, 最终以 OCP、DOHA、HAP 的形式存在于骨胶原纤维中, 与其他有机质一起构成新骨。实验结果阐明了 β -TCP 材料的生物降解和新骨形成过程, 为可降解 Ca-P 材料的生物降解和骨生成机理提供了直接证据。材料生物降解和新骨生成过程同时进行, 是既相互联系又相互制约的复杂而缓慢的生物转化过

程。钙磷生物陶瓷通过生物降解发生溶解沉积和生物转化而成为有生命的骨组织一部分, 实现了无生命材料参与有生命的组织活动。

参考文献

- [1] Begley C T, Doherty M J, Mollanr A B, et al. Comparative study of the bioceramic, coral and processed bone graft substitutes[J]. *Biomaterials*, 1995, 16: 1181 - 1185.
- [2] Gao T J, Lindholm T S, Kommonen B, et al. Microscopic evaluation of bone implant contact between hydroxyapatite, bioactive glass and tricalcium phosphate implanted in sheep diaphyseal defects[J]. *Biomaterials*, 1995, 16: 1175 - 1179.
- [3] DAI Hong-lian, LI Shi-pu, YAN Yu-hua, et al. The osteogenesis process of tricalcium phosphate ceramics in vivo[J]. *Trans Nonferrous Met Soc China*, 2003, 13(1): 65 - 68.
- [4] Malard O, Bouler J M, Guicheux J, et al. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: Preliminary in vitro and in vivo study[J]. *J Biomed Mater Res*, 1999, 46: 103 - 111.
- [5] Schwartz Z, Boyan B D. Underlying mechanisms at the bone biomaterial interface[J]. *J Cell Biochem*, 1994, 56: 340 - 347.
- [6] LeGeros R Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates[J]. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2002, 395: 81 - 89.
- [7] Vaananen H K, Liu Yir-kun, Lehenkari P, et al. How do osteoclasts resorb bone[J]. *Materials Science and Engineering C*, 1998, 6: 205 - 209.

(编辑 陈爱华)