

[文章编号] 1004-0609(2002)06-1252-05

磷酸钙骨水泥的生物相容性^①

戴红莲¹, 闫玉华¹, 曹猷英¹, 李世普¹, 贺建华¹, 余国荣²

(1. 武汉理工大学 生物材料与工程研究中心, 武汉 430070; 2. 武汉大学 中南医院, 武汉 430072)

[摘 要] 磷酸钙(α -TCP/TTCP)复合骨水泥具有良好的水硬性能,与固化液按固液比为 1.50 g/mL 拌和后,凝固时间可调,抗压强度达 45.36 MPa,其水化产物为羟基磷灰石(HAP)。通过体外模拟溶解实验表明, α -TCP/TTCP 骨水泥具有一定的溶解性能。通过体外实验、动物实验,结合 SEM 和 EPMA 观察表明 α -TCP/TTCP 骨水泥不会产生全身或局部毒性反应,对肌肉无刺激,不致溶血、凝血,不引起炎症和排斥反应等,有利于骨组织长入并与骨组织紧密接触。 α -TCP/TTCP 骨水泥在动物体内可继续水硬化,且随着植入时间的延长,材料与宿主骨完全融合在一起。 α -TCP/TTCP 骨水泥具有优良的生物相容性和生物活性,具有一定的降解性能和较好的成骨作用,适合于作为骨缺损的填充材料。

[关键词] 磷酸钙骨水泥;生物相容性;生物活性

[中图分类号] R 318.08

[文献标识码] A

钙磷材料从组成和结构上与人体骨、齿等硬组织的无机成分相近,作为一种骨替代材料越来越受到人们的关注^[1]。目前,临床上用的钙磷人工骨材料主要是块状或颗粒状的陶瓷与玻璃^[2],块状材料需要预先成型烧结,存在与骨缺陷外形适应性问题,而粒状材料很难限制在修复的面积范围内维持所需形状,在骨创面易发生植入材料的流失,且抗压性能差。临床上广泛应用的 PMMA 有机骨水泥,虽可任意塑型,但化学成分与人体骨组织成分不同,生物相容性差,不能与骨组织牢固结合,其聚合时产生很高的热量,可将周围活组织细胞杀死,有毒单体的释放使其具有细胞毒性^[3]。自 1976 年 Hideki Monma 发现 α -磷酸三钙(α -TCP)具有水化特性以来^[4],各国学者对磷酸钙骨水泥(Calcium Phosphate Cement,简称 CPC)进行了广泛的探索研究^[5,6]。作者系统研究了 α -TCP/TTCP 复合骨水泥的制备和性质,并重点评价 α -TCP/TTCP 复合骨水泥的生物相容性。

1 材料和体外实验

1.1 实验材料

将分析纯的 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 与 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 按一定比例混合,经共沉淀反应后再与超细 CaCO_3 按 $m(\text{Ca})/m(\text{P})=2$ 的比例充分混合,然后于 1 500 °C 下反应 5 h,得到磷酸四钙(TTCP);又

将分析纯 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 与 CaCO_3 按 $m(\text{Ca})/m(\text{P})=1.5$ 的比例充分混合,然后于 1 200 °C 下反应 2 h,得到 α -TCP。将 α -TCP 与 TTCP 按一定比例混匀,即得 CPC 粉末。该材料为白色、无臭无味粉末(比表面积为 0.718 5 m^2/g)。将 CPC 粉末与固化液(含 3 个羧酸根基团的生命物质)按固液比 1.50 g/mL 调匀后固化,凝结时间为 10 min(凝结时间亦可根据固化液浓度可调),可根据临床需要任意塑型。37 °C,100%湿度环境中固化 24 h 后抗压强度达 45.36 MPa,抗弯强度 7.11 MPa,水化产物为 HAP^[7]。

1.2 体外模拟实验

采用模拟体液(SBF)^[8],对材料做体外浸泡实验。其组成为(mmol): Na^+ 142, K^+ 5.0, Mg^{2+} 1.5, Cl^- 148.0, HCO_3^- 4.2, HPO_4^{2-} 1.0, $\text{pH}=7.25$ 。将硬化后的 CPC 试样块(10 mm × 10 mm × 30 mm)浸入(37 ± 0.5) °C 的模拟体液中,浸泡 10 周,每隔 1 周取出 8 mL 溶液,并同时补充相同体积的空白模拟体液。用磷钼兰比色法^[9]测溶液中 PO_4^{3-} 浓度,用原子吸收光谱测溶液中 Ca^{2+} 的浓度。

2 生物相容性实验

2.1 急性毒性试验

对大白鼠预先查体重及血常规。将 CPC 复合骨水泥的硬化物粉末加入到生理盐水中配成混悬溶

① [基金项目] 湖北省自然科学基金资助项目(2000H034)

[收稿日期] 2001-12-06; [修订日期] 2002-01-28

[作者简介] 戴红莲(1970-),女,副研究员,硕士。

液, 无菌条件下注入大白鼠腹腔, 观察动物有无死亡或不良反应。

2.2 亚急性毒性实验

将材料硬化物粉末加入到生理盐水中配成混悬液, 无菌条件下注入大白鼠腹腔, 注射后观察动物有无不良反应, 两周后复查体重及血常规, 与注射前比较, 作统计学处理。然后处死动物, 取心、肝、肾组织处理后, 光学显微镜下观察。

2.3 肌肉刺激试验

将 CPC 硬化体在无菌条件下埋置在实验动物双侧股四头肌肉, 分别于术后 1, 2, 3, 4, 5, 6 月处死动物, 取材料周围肌肉, HE 染色, 光镜观察。

2.4 溶血试验

将材料硬化物粉末定量加入人细胞混悬溶液及生理盐水, 观察有无溶血现象。

2.5 凝血试验

取正常人血浆, 用血液凝固测定仪测定凝血凝固时间(PT)、部分凝血活酶凝固时间(APT.T)、凝血酶凝固时间(TT)和纤维蛋白质。取材料硬化物粉末加入正常人混合血浆, 测定 PT, APT.T, TT 和纤维蛋白质与加入材料前比较。

3 体内埋植实验

选用健康大白兔, 用氯胺酮肌内注射全身麻醉, 双下肢去毛, 常规消毒铺巾, 在双侧胫骨上段开槽 4 mm×4 mm×4 mm, 植入 αTCP/TTCP 骨水泥固化物。术后观察动物一般情况, 于 2, 3, 4, 5, 6 个月后分批处死动物, 将材料与周围组织一并取下, 用戊二醛固定, 梯度酒精脱水, 干燥。用日本 JCXA-33 型电子探针 X 射线显微分析仪对标本表面进行观察及线扫描分析。采用日本 JEOL JSM-5800LV 型扫描电镜观察界面情况、材料吸收情况。

4 结果和讨论

4.1 体外模拟实验

从表 1 可知, 在浸泡的初期, 模拟体液中 Ca^{2+} , PO_4^{3-} 的溶出呈上升趋势, 这可能是由未反应的 αTCP, TTCP 或一些可溶性的硬化产物(如 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 等)溶解所致, 而随着浸泡时间的延长, 溶解量减少, 模拟体液中的 $[\text{Ca}^{2+}]$, $[\text{PO}_4^{3-}]$ 已经很小, 达到动态平衡。由于在中性环境中, HAP

是最稳定的磷酸盐, CPC 的硬化产物主要是 HAP (图 1)。在浸泡过程中, 水化反应会不断进行, HAP 等水化产物数量不断增加, 晶体不断长大, 而孔隙不断减小。由于水泥颗粒之间孔隙的减小, HAP 晶体主要生长为皱状(短纤维状、棒状或柱状)(图 2), 它们填充在孔隙之间, 相互交错攀附, 重叠搭接, 形成坚强的骨架, 一些不定形凝胶又填充于晶体骨架空隙中, 各水化产物填满原来由水所占据的空间, 形成较为致密的结构。由于人体骨组织的主要无机成分是 HAP, 因此, αTCP 和 TTCP 这种化学反应及晶相转化特性从组织相容性角度来看是有益的, 致密结构将保证骨充填时的初试强度, 不定形凝胶及一些可溶性硬化产物的形成将有助于 CPC 的降解和骨的替代, 而硬化体中微孔的存在对骨组织的长入是有利的。

4.2 生物相容性实验

所有试验动物活动自如, 食欲正常, 无死亡, 无惊厥、昏迷、呼吸困难等不良反应。血常规、血小板与注射前无显著差异($D > 0.05$)。心、肝、肾

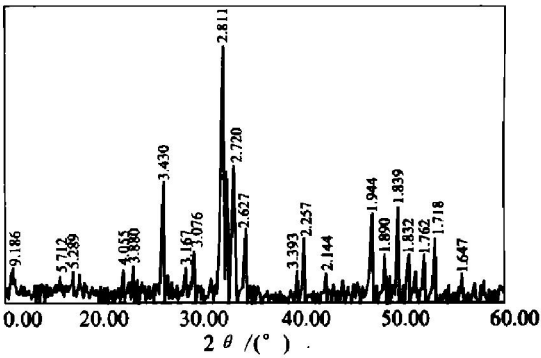


图 1 浸泡 10 周后固化体的 XRD 图谱
Fig. 1 XRD pattern of hardened body after soaking for 10 weeks

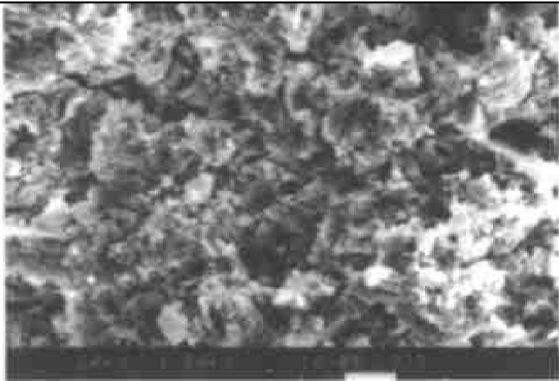


图 2 硬化体断面的 SEM 照片
Fig. 2 SEM photograph of fracture surface of hardened body after soaking for 10 weeks

表 1 CPC 浸出液中的钙、磷含量

Table 1 Content of calcium and phosphorus in soak (10 ⁻⁷ mol/L)													
Time	1 d	3 d	5 d	7 d	2 weeks	3 weeks	4 weeks	5 weeks	6 weeks	7 weeks	8 weeks	9 weeks	10 weeks
Ca ²⁺	4.48	6.73	7.38	6.20	5.05	4.68	4.55	4.40	4.22	4.13	3.95	3.88	3.85
PO ₄ ³⁻	1.40	2.07	2.56	2.07	1.28	1.21	1.15	1.11	1.06	1.01	0.97	0.95	0.94

组织切片未见细胞变性或坏死。组织学检查材料周围肌肉无变性、坏死，无渗出和炎性细胞浸润。涂片镜检未见红细胞破裂或凝集。血浆中 4 项指标均属正常范围。本材料由 α -TCP/TTCP 及其水化产物 (主要是 HAP) 组成，主要成分为 Ca、P 元素， $m(\text{Ca})/m(\text{P})$ 比值为 1.67，其化学成分及晶体结构与骨基质中无机成分相似，所用固化液也是人体内必不可少的生命物质，因此生物控制检测指标显示它不会产生全身或局部毒性反应，对肌肉无刺激，不致溶血、凝血，不引起炎症和排斥反应等。

4.3 体内埋植试验

动物术后一般情况良好，伤口无红肿，属 I 期愈合。术后各期取材均看不到材料与骨头的间隙，用器械不易分离材料，强行取出时，见材料表面有很多骨组织附着。4 个月后材料逐渐变小，6 个月取材料只有原材料的 1/3 大小，并且多与周围骨质界线不清(图 3~ 8)。

术后 2 个月后材料与刚硬化时对比，其微观结构发生了变化，由花瓣状向六方柱状晶体转变。新生骨小梁从骨组织经过过渡层向材料方向生长，材料与骨组织之间没有空隙，结合很紧密(图 3)。由图 4 可见界面过渡层有 Ca 和 P 富集。这可能是硬化体内未反应的 α -TCP、TTCP 或一些可溶性的硬化产物在体液中不断发生降解，导致 Ca 和 P 溶出，

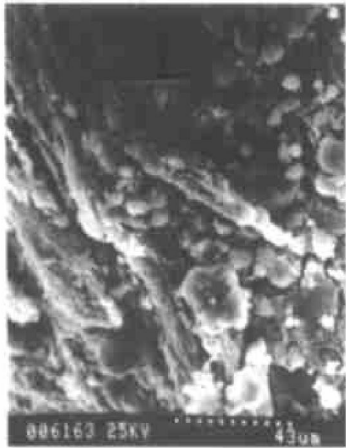


图 3 术后 2 个月材料与骨组织表面形貌

Fig. 3 SEM photograph of bone tissue surface with materials after implanting for 2 months

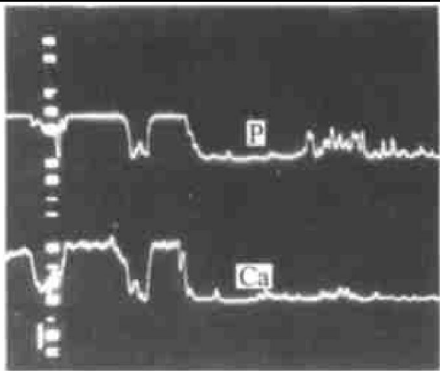


图 4 植入 2 个月后材料与骨组织界面的 EPMA

Fig. 4 EPMA of interface of materials and bone tissue after implanting for 2 months



图 5 术后 3 个月材料与骨组织表面形貌

Fig. 5 SEM photograph of bone tissue surface with materials after implanting for 3 months

在界面形成富集区。术后 3 个月材料晶体表面布满了细小的纤维状骨小梁。过渡层内材料晶体结构进一步发生变化，晶体变小，晶体棱角逐渐消失，变成针状，材料中间夹有新生的骨小梁，这就是说靠近骨组织的硬化体发生了降解(图 5)。术后 4 个月材料与骨组织过渡层明显变小，新生骨小梁增粗，并伸向材料内部(图 6)。术后 5 个月材料与骨组织过渡层已完全消失，大部分晶体已成为椭球状。较为成熟的骨小梁将材料包围，众多的骨小梁交织在一起(图 7)。术后 6 个月材料已完全失去原有形态，部分降解，材料已与骨组织融为一体，材料已被骨组织所取代(图 8)，其线扫描已变得平缓，

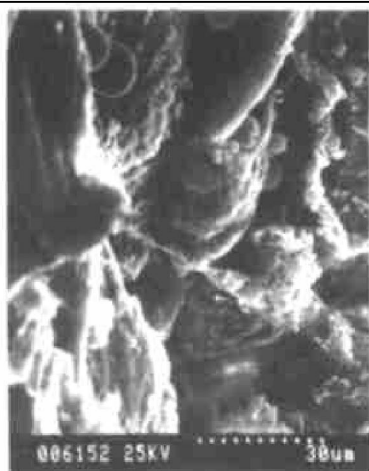


图 6 术后 4 个月材料与骨组织表面形貌

Fig. 6 SEM photograph of bone tissue surface with materials after implanting for 4 months



图 7 术后 5 个月材料与骨组织表面形貌

Fig. 7 SEM photograph of bone tissue surface with materials after implanting for 5 months

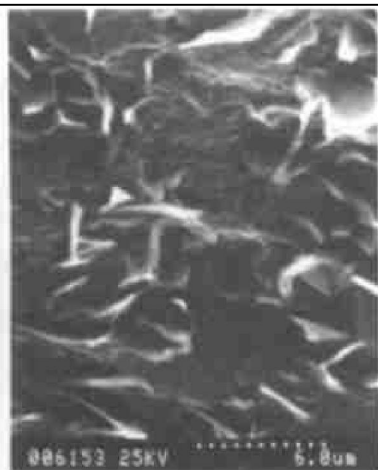


图 8 术后 6 个月材料与骨组织表面形貌

Fig. 8 SEM photograph of bone tissue surface with materials after implanting for 6 months

基本不存在 Ca 和 P 富集区。

CPC 硬化体在模拟体液中有一定的溶解性,而在体内大部分材料被吸收并被骨组织代替,可见硬化体在体内逐步发生了降解。CPC 硬化体植入体内后,在体液及体内细胞、酶等的作用下,其中的不定形凝胶、一些可溶性的硬化产物及低结晶的 HAP 等发生了溶解,溶解的 Ca 和 P 被周围组织吸收的结果是磷酸钙富含区域的形成。高浓度磷酸钙会引发钙盐沉积或者刺激相邻骨组织向材料内生长,在这个高浓度磷酸钙的表面区域,植入材料与宿主骨通过 Ca-P 富集层的键合加强^[10]。一方面, Ca 和 P 可被成骨细胞摄取,参与植入区局部新生物质的钙化,形成新骨,构成新骨基质中的无机成份;另一方面,磷酸钙富含区的 Ca 和 P 与体液中 Ca 和 P 可等离子发生交换,参与体内的钙、磷新陈代谢,最终达到平衡, Ca 和 P 富集层消失。CPC 植入体内后,材料的生物降解和新骨生成同时进行,是一个复杂而缓慢的生物转化过程。在骨创面, CPC 引导新骨形成,骨组织呈直接长入,随时间增长,新骨组织向材料内爬入越深,新长入地骨组织互相交织成网,可提高材料本身及材料与骨组织界面的结合强度,最终新生骨完全替代植入材料。

5 结论

通过系列实验表明 α -TCP/TTCP 复合磷酸钙骨水泥是一种无毒、无刺激,有良好血液相容性和组织相容性的生物材料。磷酸钙骨水泥与其它的生物充填材料相比具有以下优点: ①操作方便,在临床手术时可根据骨缺损情况任意塑型,填充不规则的骨腔; ②在体内中能自行凝固,硬化时间合理; ③在体内能逐渐降解并诱导骨组织长入,被骨组织爬行代替等。因此,该材料是一种较理想的替代材料,可用于非承重骨缺损部位的充填等。

[REFERENCES]

- [1] 顾汉卿, 许国风. 生物医学材料学[M]. 天津: 天津科技出版翻译公司, 1993: 54 - 56.
GU Han-qing, XU Guo-feng. Biomedical Materials[M]. Tianjin: Tianjin Publishing Translation Corporation of Science and Technology, 1993: 54 - 56.
- [2] Friedman Craig D. Bone graft and bone graft substitutes: A review of current technology[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1991, 117: 385.

- [3] 吕厚山. 人工关节外科学[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 546 - 549.
LU Hourshan. Artificial Joint Surgery[M]. Beijing: Science Press, 1998. 546 - 549.
- [4] Monma H, Ueno S, Kanazawa T. Properties of hydroxyapatite prepared by the hydrolysis of tricalcium phosphate[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1981, 31(1): 15 - 24.
- [5] Bohner M, Vanlanduyt P. Composition effects on the pH of a hydraulic calcium phosphate cement[J]. J Mater Sci Mater Med, 1997, 8: 675 - 681.
- [6] Constantino P D, Friedman C D. Synthetic bone graft substitutes[J]. Otolaryngol Clin Nor Am, 1994, 27: 1037.
- [7] DAI Hong-lian, YAN Yu-hua, LI Shi-pu, et al. Properties of the cement materials in α -TCP-TTCP- $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ [J]. Bioceramic, 2000, 13: 821 - 824.
- [8] Masami Tamahashi, Takeshi Yao. Apatite coating on organic polymers by a biomimetic process[J]. J Am Ceram Soc, 1994, 77(1): 95 - 101.
- [9] 关 英. 岩石矿物分析[M]. 北京: 地质出版社, 1991. 158 - 159.
GUAN Ying. Analysis of Rock Mineral[M]. Beijing: Geologic Press, 1991. 158 - 159.
- [10] Damien C J, Ricci J L, Christel P, et al. Formation of a calcium phosphate-rich layer on absorbable calcium carbonate bone graft substitutes[J]. Calcif Tissue Int, 1994, 55(2): 151 - 158.

Biocompatibility of calcium phosphate bone cement

DAI Hong-lian¹, YAN Yu-hua¹, CAO Xian-ying¹, LI Shi-pu¹, HE Jian-hua¹, YU Guo-rong²

(1. Biomedical Materials and Engineering Center, Wuhan University of Technology,

Wuhan 430070, China;

2. Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

[Abstract] α -tricalcium phosphate(α -TCP)/tetracalcium phosphate(TTCP) composite bone cement (CPC) has good hydration characteristic. CPC powder mixture is mixed with water at a powder/liquid (P/L) ratio of 1.50 g/mL. The setting time can be adjusted, the maximal compressive strength is 45.36 MPa, and the hydration product is hydroxyapatite (HAP). In vitro biological simulated experiments indicate that α -TCP/TTCP bone cement has certain dissolubility. The hardened product is mainly HAP after soaking in simulated body fluid (SBF) for 10 weeks. The results of in vitro test and animal experiments and SEM analyses show that no local or general toxicity response, no muscle stimulation, no haemolysis, no cruor and no inflammatory reaction, no exclusion response are caused by α -TCP/TTCP cement, which contributes to bone tissue spreading and impinging. α -TCP/TTCP cement hydrates and hardens continually in vivo. The materials fuse with host bone together with implanting time prolonging. α -TCP/TTCP composite bone cement has good biocompatibility and bioactivity, certain biodegradation and good osteogenesis as well. It is qualified as an artificial bone material.

[Key words] calcium phosphate bone cement; biocompatibility; bioactivity

(编辑 朱忠国)