

自固化磷酸钙人工骨的生物学安全性试验研究

王文波¹ 陈中伟² 陈统一² 叶舜华³ 宋 键³ 张树勋⁴

(1 复旦大学中山医院骨科,上海 200032 2 哈尔滨医科大学附属第一医院骨科,哈尔滨 150001)
(3 复旦大学环境卫生教研室,上海 200032 4 黑龙江省第四医院骨科,哈尔滨 150001)

提 要: 本文报告了自固化磷酸钙(CPC)人工骨的遗传毒性试验及动物体内植入实验结果。体外试验采用CPC的浸出液,试验项目包括 Ames 试验、微核试验及 UDS 试验;体内实验包括骨内植入及肌肉内植入实验。结果表明,CPC 浸出液对体细胞的遗传物质无损害作用,无致基因突变的作用。植人体内后,只出现一过性的炎症反应,无异物反应。CPC 与骨形成直接的骨性愈合,其溶解形成的钙、磷颗粒经髓腔或哈氏管系统运输。结果是 CPC 具有良好的生物相容性,适合于作为骨缺损的填充材料。

关键词: 自固化磷酸钙;人工骨;生物学安全性;骨性结合机理

分类号: R318.08; R683

0 引言

自固化磷酸钙,即 Calcium Phosphate Cement (CPC)的中文译名,又称为 Hydroxyapatite Cement (HAC)。它是由 Brown 和 Chow 于 80 年代中期研制出来的牙科磷酸钙盐水泥材料,以后逐渐被用作骨修复材料。CPC 由磷酸钙盐粉末与固化液两部分组成,使用时将二者充分混合,混合物呈糊状,即可用于骨缺损的填充。粉末与固化液混合的同时发生固化反应,于 4h 后转变成含微孔的羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HAP)晶体。CPC 的独特之处是克服了 HAP 陶瓷烧结成形、修整困难等固有缺点,具有调和成形、制备简便、填充缺损容易等优点。美国食品和药物管理局(FDA)于 1991 年批准了 CPC 的临床试用,用于修复颅底骨缺损;1997 年底又批准了 CPC 的正式临床使用^[1,2]。华东理工大学亦研制出类似材料,我们对该材料进行了临床试用前的生物学安全性评价试验,报告如下。

1 材料与方法

1.1 CPC 浸出液的制备

试验采用 CPC 的生理盐水浸出液,制备方法:将固化完全的 CPC,在玻璃研钵内研细,分别过 20 目和 40 目筛。将颗粒分成大于 20 目和小于 20 目而大于 40 目两组(以下简称 20 目和 40 目组)。分别取两组颗粒物各 19g 均置于小烧杯中,加入生理盐水 38ml,各以锡纸封其开口,置 37℃ 恒温水浴内浸润 24h。经蔡氏漏斗过滤去菌得到灭菌的 CPC 浸出液,其浓度为 500mg/ml,进行以下试验。浸出液中钙、磷含量见表 1。

表 1 CPC 浸出液中的钙、磷含量

样品	Ca ²⁺ × 10 ⁴ (mol/L)	P × 10 ³ (mol/L)
40 目组	9.78	2.01
20 目组	15.58	5.66

1.2 Ames 试验

采用平板掺入法。使用 TA98 和 TA100 两个菌株。大鼠肝脏微粒体酶系(S9)由多氯联苯诱导,制成肝匀浆后在 -80℃ 冰箱内保存,使用时用 BaP 或 2-氨基苄测定其活力。

浸出液用生理盐水作溶剂,两组样品(20 目组和 40 目组)分别稀释成 1000ug/0.1ml、2000ug/0.1ml 和 5000ug/0.1ml。阳性对照物选用 2,7-二氨基苄(2,7-AF)、叠氮化钠(SA)和 2-氨基苄(2-AF)三种具有不同致突变活性的已知致突变剂。2,7-AF 配成 100ug/0.1ml,用于 TA98 菌株的直接致突变活性指示(不加

• 本课题为上海市科委重点资助项目的一部分
收稿日期:1996-09-16,1998-10-06 修回

S9);SA配成 $1\mu\text{g}/0.1\text{ml}$,用于TA100菌株的直接致突变活性指示;2-AF配成 $10\mu\text{g}/0.1\text{ml}$,用于TA98、TA100菌株的间接致突变活性指示(加S9),空白对照用同样体积的生理盐水。

1.3 微核试验

40只体重为 $18\sim 20\text{g}$ 的健康雄性昆明种成年小鼠(由上海医科大学动物部提供),随机分成8组,每组5只。以生理盐水为阴性对照,环磷酰胺(CTX)为阳性对照。试验组及阴性对照组每只小鼠分别按体重每次腹腔注射浸出液或生理盐水 $0.1\text{ml}/20\text{g}$ 。阳性对照组按体重腹腔注射 $\text{CTX}80\text{mg}/\text{kg}$ 。两次腹腔注射染毒间隔24h,第二次染毒6h后用颈椎脱臼法将小鼠处死。迅速用剪刀将小鼠的两条股骨剪下,除去筋膜肌肉,剪去股骨两端。用注射器吸取 1ml 小牛血清插入骨髓腔中,将骨髓冲洗入离心管中,反复冲洗至骨髓腔无血。然后以 1000rpm 的转速离心5min,弃去上清液,用毛细管轻轻打匀沉淀物,吸少许均匀涂片。每只小鼠涂片两张,待晾干后用甲醛固定, $0.25\%\text{M-G}$ 染液染色,再以 $1:10\text{Giemsa}$ 染液染色10min,用蒸馏水分色10s,晾干后镜检。

高倍镜下选择细胞分布均匀、染色好的区域油镜下计数骨髓的嗜多染红细胞(PCE)。PCE在油镜下呈灰蓝色,无细胞核。微核直径相当于PCE的 $1/20\sim 1/5$,呈圆形,边缘光滑,染色与其它有核细胞核质一样,呈紫红色或蓝紫色。每片计数1000个PCE,共计数2000个PCE中含有微核的PCE数,一个PCE中出现两个以上的微核时,按一个微核细胞计,结果以%表示。

1.4 大鼠肝细胞程序外DNA合成(UDS)试验

肝细胞悬液的制备,按照我校环境卫生教研室的方法。制备的肝细胞悬液,用DMEM(含5%小牛血清、0.2%白蛋白、20ml羟基脲)稀释至浓度为 $1\times 10^6/\text{ml}$ 。

将 $1\times 10^6/\text{ml}$ 的肝细胞悬液 1ml 分装至小试管中,在每个小试管中加入浓度为 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 的CPC浸出液 5ml ,各做3个平行样本。生理盐水作阴性对照,氮芥作阳性对照。每管加 $\text{H-TdR}5\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 37°C 恒温水浴震荡培养3h,然后用 2ml 冰生理盐水终止反应。用多头细胞仪收集细胞至滤膜上,用蒸馏水抽吸两次,依次用5%三氯醋酸 1ml 固定,75%及无水乙醇脱水,将滤膜 37°C 烘干,放入闪烁杯中,加入 0.5ml 闪烁液,在Backman液闪计数器上测定CPM值。

1.5 骨内植入实验

健康新西兰白兔12只,体重 $2.5\sim 3.5\text{kg}$,雌雄不限。随机分成4组,每组3只。根据观察时间不同,分别称为A组(半个月组)、B组(1个月组)、C组(3个月组)和D组(6个月组)。

3%戊巴比妥钠静脉麻醉,俯卧位固定,单侧下肢脱毛。在无菌条件下,于股骨外侧髌处纵行切开皮肤,显露股骨外侧髌。用 4.5mm 的钻头,从外侧髌向内侧髌横行钻孔。钻穿后,冲净骨屑。测量骨洞的距离。然后将制备的柱状CPC(方法略)用手术刀片切成相应长短,植入到骨洞内,逐层缝合切口。

1.6 肌肉内植入实验

在骨内植入后,于同侧肢体的臀外侧部另做切口,分离肌肉成一肌袋,植入 5mm 的柱状CPC,观察时间同前。

2 结果

2.1 Ames试验

Ames试验结果见表2。

表2 鼠伤寒沙门氏菌回复突变数

样 本	浓度(ug/m)	TA100 + S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA98 - S9
生理盐水	0.00	128.6 ± 1.5	118.7 ± 2.1	30.0 ± 1.0	26.7 ± 1.5
>20 目	1000.00	121.3 ± 1.5	121.3 ± 2.5	29.7 ± 1.5	29.3 ± 1.5
	2000.00	123.0 ± 1.0	119.0 ± 4.6	34.0 ± 2.0	33.0 ± 1.0
	5000.00	121.3 ± 4.9	123.3 ± 1.5	42.0 ± 1.0	36.3 ± 1.5
>40 目	1000.00	118.7 ± 1.5	119.0 ± 2.0	29.7 ± 2.1	26.0 ± 2.6
	2000.00	121.3 ± 3.1	125.7 ± 3.0	33.3 ± 2.1	32.3 ± 3.2
	5000.00	125.0 ± 5.2	123.7 ± 5.5	39.0 ± 1.0	38.3 ± 2.1
SA	1.00	-	964.0 ± 63.0**	-	-
2-AF	10.00	997.7 ± 14.6**	-	931.6 ± 30.1**	-
2,7-AF	100.00	-	-	-	918.3 ± 48.3**

*: > = 2 × C; **: > = 3 × C

结论:试验结果为阴性。CPC 浸出液不引起鼠伤寒沙门氏菌回复突变数增加。

2.2 微核试验

微核试验结果见表3。

结论:CPC 浸出液与对照组相比未引起小鼠骨髓嗜多染红细胞微核检出率的升高。

2.3 UDS 试验

UDS 试验结果见表4。

结论:与对照组相比,CPC 浸出液未见有引起大鼠肝细胞程度外 DNA 合成增加的作用。

表3 浸出液对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率的影响(%)

样 本	浓 度		
	125mg/ml	250mg/ml	500mg/ml
20 目组	1.9 ± 0.9	2.0 ± 0.8	3.1 ± 1.0
40 目组	2.1 ± 1.2	3.1 ± 0.9	3.3 ± 0.5
阴性对照	2.6 ± 0.8		
阳性对照	30.4 ± 4.4**		

** : P < 0.01

表4 UDS 试验结果

样 本	浓度(ug/ml)	CPM($\bar{X} \pm SD$)	R
生理盐水(阴性对照)		814 ± 206	1
CPC 浸出物	100	698 ± 105	0.86
	200	1206 ± 2	1.48
	500	1262 ± 296	1.55
氮芥(阳性对照)	50	6734 ± 1275	8.28**

** : P < 0.01

2.4 骨内植入实验结果

取材时,各组中植入的 CPC 均已牢固地固定于骨洞内。脱钙的组织学切片中,CPC 已全部被溶解,呈现空缺,仅留有少量淡红染的无细胞成分的网状物(性质待定)。植入物周边部为新生骨组织,未见纤维包膜形成。不脱钙的骨切片(甲基丙烯酸甲酯包埋)中,A组(半个月组)、B组(1个月组),在 CPC 与骨之间可见大量的软骨细胞,形成软骨内成骨;部分新生骨组织已与 CPC 直接愈合(图1,图2)。C组(3个月组)、D组(6个月组):骨的再生修复基本完成,CPC 与骨组织形成直接的骨性愈合。CPC 边缘完整,未见降解或新生骨组织的长入。CPC 内部可见散在的不规则空隙(图3、图4)。

CPC 与骨形成直接的骨性愈合的同时,骨髓腔和骨的哈佛氏管也直接延续到 CPC 表面,CPC 完全浸泡于髓液之中。在后者的作用下,CPC 边缘变模糊,发生溶解。溶解后产生大量细小的 HAP 颗粒,偶可见巨大的 HAP。这些钙、磷成分,一部分直接参与局部类骨质的钙化,另一部分经由髓腔或哈佛氏系统运输(图5、图6)。

2.5 肌肉内植入结果

脱钙后的切片,与骨内脱钙切片相似,CPC已被溶解,缺损处为少量无细胞成分的、淡红染的网状物。A组(半个月组),在界面周围的肌肉内可见到少到中等程度的炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主。CPC周围见不同程度的纤维细胞增生及纤维组织形成(图7)。B组(1个月组),浸润的炎性细胞开始减少,增生的纤维组织逐渐形成比较完整的包膜(图8)。C组(3个月组)、D组(6个月组),纤维包膜变薄,完整地包绕CPC。浸润的炎性细胞消失或已很少见到。在上述组织学变化中,未见到异物巨细胞的出现(图9、图10)。

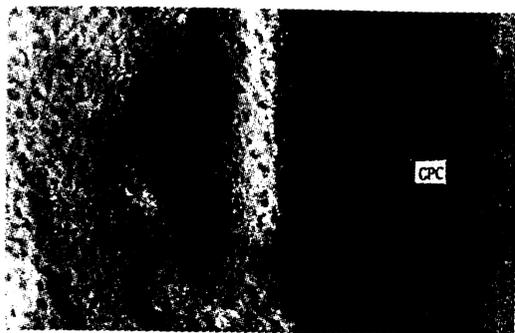


图1 CPC植入骨内后半个月,不脱钙切片,可见CPC-骨界面处软骨细胞增生(甲苯胺蓝-Sirius Red染色,×100)

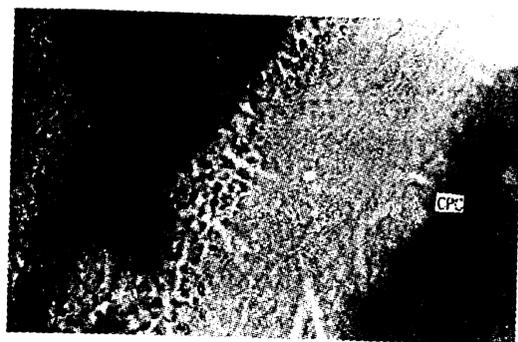


图2 CPC植入骨内后1个月,不脱钙切片,界面处仍见软骨细胞增生,软骨内成骨;骨组织修复尚未完成(染色同前,×100)

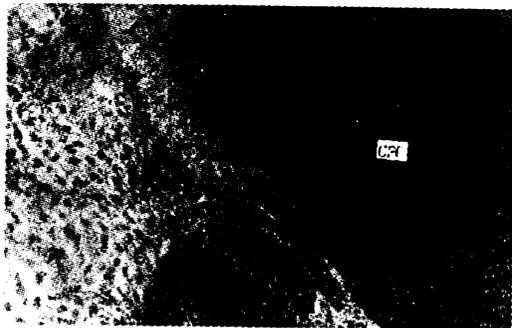


图3 CPC植入骨内后3个月,不脱钙切片,骨组织再生修复完成,CPC与骨形成直接的骨性愈合(染色同前,×100)

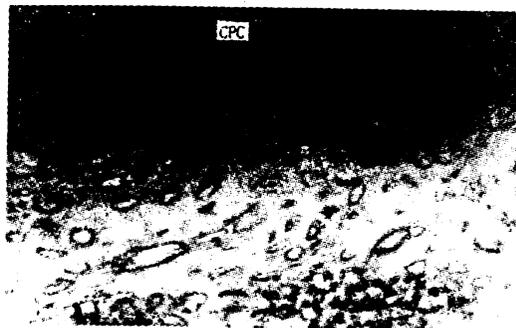


图4 CPC植入骨内后6个月,不脱钙切片,CPC-骨界面处形成直接的但却是较疏松的骨性愈合(染色同前,×100)



图5 CPC浸泡于髓腔液之中,CPC代谢形成的钙、磷颗粒,一部分直接参与新生类骨质的钙化,另一部分由哈佛氏系统运输(染色同前,×200)



图6 较大的CPC代谢颗粒也由骨内哈佛氏系统运输(染色同前,×200)



图 7 肌肉内植入标本,半个月。脱钙后,CPC 全部被溶解,仅留有淡红色的无细胞成分的网状物;周围肌肉内可见少到中等程度的炎性细胞浸润(HE 染色,×40)

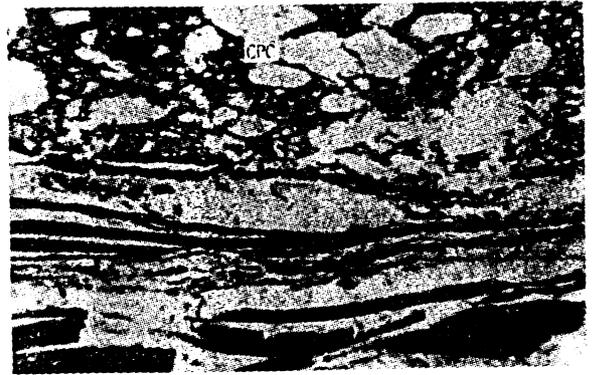


图 8 肌肉内标本,1个月,可见 CPC 周围有不同程度的纤维细胞增生及纤维组织形成(HE 染色,×80)

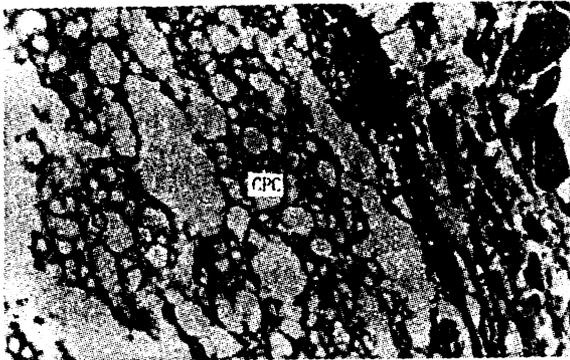


图 9 肌肉内标本,3个月。已无炎性细胞浸润,CPC 周围有不规则的纤维包膜形成(HE 染色,×100)



图 10 肌肉内标本,6个月,CPC 周围形成完整的纤维包膜,CPC-肌肉之间形成纤维性愈合(HE 染色,×80)

3 讨论

(1) CPC 与 HAP 陶瓷的区别。CPC 在微观结构、理化性质及植入体内的生物学行为等方面均不同于已广泛使用的 HAP 陶瓷,其区别在于:①如前所述,CPC 是几种磷酸钙盐的水化产物,经调和成形,制备方法简单,而 HAP 陶瓷多由烧结法制备,即需要预先将 HAP 颗粒粘结起来,塑成一定形状,然后在高温下烧结制成(预制烧结);②CPC 调和物充填骨缺损的操作简便,并可很容易地根据缺损处的解剖要求随意塑形、修整,达到完全地重建骨缺损。而 HAP 陶瓷植入缺损处时,需要高速磨钻的磨削,加之陶瓷本身质脆易碎的特点,修整后的 HAP 也很难适应缺损处的形状,骨与陶瓷间的密接性差,间隙大,容易造成纤维组织的介入生长;③CPC 充填骨缺损亦优于颗粒状(granule)的 HAP。以水、甘油或其它生物胶调和的 HAP 颗粒植入骨缺损后,稳定性差,易于移位、散失,需要待数月后纤维组织长入其中,才能与宿主骨形成并非牢固的纤维性连结。而 CPC 填入骨缺损后,

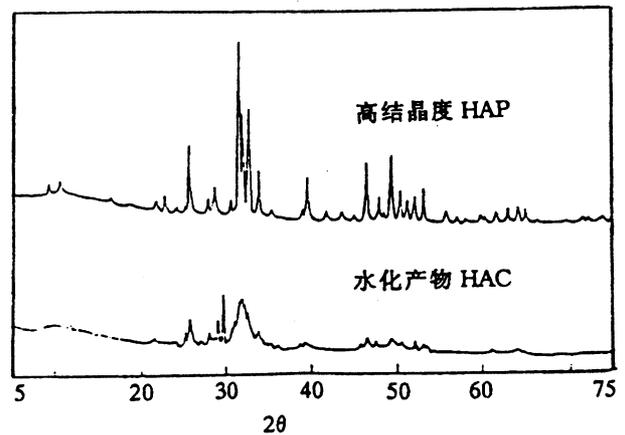


图 11 CPC 的 XRD 图
与上方的高结晶度 HAP 陶瓷的 XRD 相比,衍射峰低

稳定性较好,并由于与骨组织紧密接触,能很快地和新生骨组织形成更稳定的骨性愈合,界面处无纤维包膜形成;④由于是调和成形,并非烧结体。

固化形成的 HAP 晶体,其结晶度低于 HAP 陶瓷,其 X 射线衍射(XRD)图中,虽然各个特征峰均存在,但其峰强度远低于高结晶度、烧结体的 HAP 陶瓷的衍射峰(图 11)。这一方面体现在它的抗压强度低于 HAP 陶瓷,为 50MPa 左右,另一方面也使植入的 CPC 可以发生缓慢降解(HAP 陶瓷几乎无降解)。Costantino^[3]综合多个实验结果显示,填充于动物颅面部骨缺损的 CPC,12 个月时约 35% 的材料发生降解,降解处由纤维-骨组织取代(其中骨成分占 75%),这显然有利于 CPC 最终被宿主骨的改造、替代。

(2)Gruninger 等^[4]报道了对 Brown 等制备的 CPC 进行的生物学安全性实验的结果,证实 CPC 确实具有磷酸钙盐类材料的良好生物相容性。其体外试验包括溶血试验、鼠急性毒性试验(口服染毒)、小鼠成纤维细胞克隆效率试验及 Ames 试验;体内实验包括豚鼠皮内植入及大鼠胫骨内植入。结果表明,固化的 CPC 无毒,无致突变作用,植入体内后未引起任何不良的组织反应,能够被动物体很好地接受。

由于本试验进行时对生物材料的安全性评价试验,我国尚未颁布国家标准(96 年底我国才初步制定出《生物材料和医疗器材生物学评价标准》),所以,我们在制订上述试验时,主要参照了《ISO》^[5]《ASTM》^[6]中骨内植入材料的试验要求,选择了上述试验项目,其目的在于尽可能客观地评价 CPC 用于体内的安全性。然而,对于医用材料的遗传毒理试验,即致癌、致突变、致畸形试验,由于耗时耗资大,目前除美国等少数国家外,多数国家均未要求进行这方面的检测;按我国目前的现状,亦难以普及。因此,采用了三种短期测试试验,即 Ames 试验、微核试验和 UDS 试验,分别从染色体、DNA 及遗传基因的角度,观察了 CPC 的作用。

Ames 试验是采用鼠伤寒沙门氏菌的组氨酸缺陷型突变株,观察在测试的化学物作用下的回突变的菌落数,它是一种简易快速而有效的检测致突变性的方法^[7]。而微核是间期细胞内观察到的特定类型染色体畸变的遗留产物。当遗传毒物或致变因子作用于间期细胞染色体或有丝分裂染色体和纺锤体时,能导致染色体断裂,其断片或整条染色体从纺锤体脱落,继而在分裂末期及以后的间期细胞中形成与主核脱离的微核,它是筛选致癌物、致突变物的重要手段之一,也是预报致癌危险及其它遗传危害的短期测试方法^[8]。UDS,即 S 期外 DNA 合成。在一般情况下细胞内 DNA 合成只见于 S 期,但当处于非 S 期细胞 DNA 受损伤时,随着 DNA 损伤的修复也将发生 DNA 合成现象。此时当把同位素标记的 DNA 前体物加入培养环境中时,受损的 DNA 仍以非合成期半保留复制的方式摄入 DNA 链中,而可以被同位素技术检测出来。因此它也是检测环境致变物、致癌物的短期测试方法^[8]。上述三个试验结果表明,CPC 浸出液对体细胞的遗传物质无损害作用,无致遗传基因突变的作用。

(3)CPC 植入肌肉内的目的,在于观察 CPC 可能引起的组织细胞反应和探讨它是否具有诱导成骨作用。从组织学的结果看,肌肉内的 CPC 周围无新骨形成,表明它不具有异位诱导成骨活性,这一点与报道的植入头皮软组织内的结果相同。尽管如此,仍可见 CPC 周围形成一层完整的、较薄的纤维包膜,使 CPC 与肌肉之间形成仍然是比较稳定的纤维性愈合。组织学上的另一变化是,CPC 的植入仅引起一过性的炎症反应,至 3 个月时,这种反应已基本消失,并且未见到组织中异物反应的出现。从而证实,实验中所用的 CPC,具有和 HAP 陶瓷一样的高度的组织相容性,植入体内后,能很好地被机体“容受”(图 7~10)。

植入骨内的 CPC 在 6 个月的观察时间内,尚未发生降解,但却与新生的骨组织直接愈合这种理想的界面结合方式,证实 CPC 具有骨性结合(Osteointegrity)的特性,适合于作为骨缺损的填充材料。

(4)本实验的重要发现是 CPC 的降解机理。以往国内外文献中均未能阐明这一实质性问题。由骨内植入标本的组织切片(图 5、6)可见,CPC 是通过溶解作用而降解的。溶解后形成的大量 HAP 晶体颗粒,一部分直接参与局部新生类骨质的钙化,另一部分则经由髓腔及哈佛氏管运输进入代谢系统。表 1 中列出了检测到的 CPC 浸出液中的钙、磷含量,证实在生理盐水的作用下 CPC 确实能发生缓慢的溶解(降解);而植入体内后,在体液的作用下,CPC 溶解形成钙、磷颗粒,由上述途径运输。由于 CPC 的溶解度很小,因而这一降解的过程非常缓慢,因此不会造成血液中钙、磷水平的波动(作者在另外的实验中监测了动物术后 10 周内钙、磷值,结果未见明显变化。另文报道)。

(5)由于上述评价方法主要是离体或动物实验的结果,而将这类实验结果外推到人,可能会存在不同程度的偏差,因此对于CPC人工骨的生物学安全性评价,至此应该说只是完成了一部分,而真正的客观评价,则只有待临床应用结果,特别是远期结果的资料取得后,才应算是真正地完成。

4 参考文献

- 1 王文波,陈统一,陈中伟.羟基磷灰石水泥石人造骨的研究进展.中华创伤杂志,1997,13(2):127
- 2 王文波,陈中伟,陈统一.自固化磷酸钙人工骨的最新研究进展.生物医学工程学杂志,2000,17(1):80
- 3 Constantino PD, Fredman CD. Synthetic bone graft substitutes. Otolaryngol Clin Nor Am, 1994,27:1037
- 4 Gruninger SE, Siew C, Chow L, et al. Evaluation of the biocompatibility of a new calcium phosphate setting cement. J Dent Res 1984,63:200 Abstr No. 276
- 5 《ISO》: Biological evaluation of medical devices. ISO 10993-1:1992(E)
- 6 《ASTM》编著,奚廷裴译.《ASTM》标准年鉴 13.01 卷.成都:成都科技出版社,1979,233~236
- 7 《工业毒理学实验方法》编写组.工业毒理学实验方法.上海:上海科学技术出版社,1979,233~236
- 8 鄂征主编.组织培养技术.北京:人民卫生出版社,1993,第二版,248

EXPERIMENTAL STUDY ON BIOLOGICAL COMPATIBILITY OF CALCIUM PHOSPHATE CEMENT (CPC) AS AN ARTIFICIAL BONE MATERIAL

Wang Wenbo², Chen Zhongwei¹, Chen Tongyi¹, Ye Shunhua³, Song Jian³, Zhang Shuxun⁴

(1 Department of Orthopedics, Zhong shan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032)

(2 Department of Orthopedics, 1st Affiliated Hospital, Harbin Medical University Harbin 150001)

(3 Laboratory of Environmental Health, Fudan University Shanghai 200032)

(4 Department of Orthopedics, 4th Hospital, Heilongjiang Province 150239)

ABSTRACT

We presented the results of the inherited toxic tests and implanted experiment in animals on self-setting calcium phosphate cement (CPC) as an artificial bone material. In vitro tests were done using CPC extracts from physiological saline, including Ames test, microneuclear test and UDS test. In vivo tests included implanting in bone and muscle. The results showed that there was neither harmful effect on genetic material, nor mutagenesis of cells. After being implanted in rabbits, a directed union was formed between CPC and the host bone. Upon infiltrating in body fluid, solid CPC gradually dissolved into a large number of tiny calcium and phosphorus particles, which were delivered by way of the marrow cavity and the Haversian and Volkmann's canal. The conclusion was that CPC had a highly biological compatibility, and was qualified as an artificial bone material.

Key words: CPC; HAC; Artificial bone; Biological compatibility; Bony union mechanism