

载药妥布霉素人工骨(磷酸钙骨水泥) 修复骨缺损的动物试验*

王传军 陈统一 张 健 刘昌胜[△]

(复旦大学附属中山医院骨科 上海 200032; [△]华东理工大学生物材料研究所 上海 200237)

【摘要】 目的 评价自固化磷酸钙骨水泥 CPC(calcium phosphate cement)载药妥布霉素及植入兔体内后的 CPC 生物降解特性。方法 把 CPC 棒和妥布霉素 CPC 药棒植入兔股骨,观察其界面组织学等变化。结果 通过 3 个月观察,发现 CPC 棒和 CPC 药棒有部分被吸收现象,并且药棒中有新骨形成。结论 载药后的磷酸钙骨水泥仍然具有生物降解特性和骨转导作用。

【关键词】 磷酸钙骨水泥; 妥布霉素; 组织学

【中国图书馆分类法分类号】 R687.3

An *in Vivo* Study of Tobramycin-Impregnated Calcium Phosphate Cement as an Artificial Bone Material Repairing Bone Defect

WANG Chuan-jun, CHEN Tong-yi, ZHANG Jian, LIU Chang-sheng[△]

(Department of Orthopaedics, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032; [△] Institute of Biological Materials, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

【Abstract】 **Purpose** To evaluate the biodegradability of the tobramycin-impregnated self-setting calcium phosphate cement (CPC) after planted into rabbits' bodies. **Methods** We observed the histological and other changes of the interface between bone and cement after CPC bars and drug-loaded CPC bars were implanted into the femora of rabbits. **Results** Three months later the CPC and tobramycin-loaded CPC were partially absorbed and new bone formed in bars. **Conclusions** The drug-loaded CPC has biodegradability and osteoconductivity functions.

【Key words】 calcium phosphate cement; tobramycin; histology

应用骨组织和人工骨材料在骨折的修复和骨骼的重建方面已经取得了明显疗效,其临床应用也在增加^[1]。但是,由于自体骨的来源有限,而同种异体骨易引起并发症^[1],合成骨材料的研究就成了医学界的关注点。在这些人工骨材料中,能被生物降解的材料具有许多优点^[2~4],所以不但被作为骨的替代品成功地应用于临床,而且还被作为许多药物的载体进行研究^[3~5]。一种可以生物降解的材料—自固化磷酸钙骨水泥(self-setting calcium phosphate cement)已经被应用于骨缺损患者并显示出优越性,但是国内尚无载药研究的报道。我们的实验目的是观察这种 CPC 在载药妥布霉素后是否仍然具有生物降解特性和骨转导作用。

材 料 和 方 法

主要材料 空白 CPC 棒及载药妥布霉素(6.5%)CPC 药棒(直径 3.2 mm,长度 10.0 mm,上海瑞邦公司),BMP-2 抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc.,羊抗人 BMP-2 的多克隆抗体),第二抗体(Maxim Biotech, Inc.,生物素标记兔抗羊 IgG 的多克隆抗体),HRP-Streptavidin(Maxim Biotech, Inc.)。

试验动物及分组 新西兰大白兔 12 只,雄性 7 只,雌性 5 只,体重 1.95~2.8 kg。按照进入手术的时间顺序随机分成 3 组,每组 4 只,分别为:半月组、

* 上海市现代生物与新药产业发展基金(994319203)资助项目

1 月组、3 月组。

CPC 棒及药棒修复骨缺损模型的建立 氯氨酮(25 mg/kg)麻醉,常规备皮、消毒、铺巾,在左股外侧、髌上做长约 10.0 mm 的直切口,在外侧髌与股骨干交界处,用直径 3.5 mm 钻头由股骨外侧向内侧横向慢速钻孔,钻透两侧皮质骨,用生理盐水冲尽骨碎屑后,用手指轻轻顶入 CPC 药棒,二侧洞口不封闭,分层缝合,该侧为试验组;用同样方法在右股骨与对侧相同的位置植入空白 CPC 棒作为对照组。手术后正常分笼饲养,不应用抗菌化疗药物。

标本的处理 在植入 CPC 棒后半个月、1 个月、3 个月,分别对各个组兔摄片后实行安乐死,取出股骨,肉眼观察骨缺损修复情况,然后把骨标本置入 4% 中性甲醛 24 h,再放入 20% 的 EDTA 中脱钙 2~3 周,做成石蜡块,切片后再作以下处理:① HE 染色;② SP 免疫组化染色法:切片再通过脱蜡(松节油、梯度酒精),微波处理,加入以 1:100 比例稀释后的 BMP-2 抗体,37℃ 烘箱中孵化 1.5 h,再加入二抗,37℃ 烘箱中再孵化 30 min,加入 HRP-Streptavidin 溶液,室温 30 min,DAB 显色,酒精苏木素染核,树胶封片,用显微镜观察组织切片。阳性反应部位见棕色颗粒。

结 果

肉眼观察 所有兔都成活,伤口没有感染而且愈合良好,所有骨标本均无明显骨折,从半月组至 3 月组,CPC 与骨组织结合均较为紧密,无明显缝隙,无化脓、积液和药棒松动,外露的药棒周围骨痂明显,但是暴露于骨表面的药棒并没有明显残缺不全的生物降解表现。

X 片观察 在植入 CPC 药棒的第 1 天,CPC 的边缘比较锐利,界线明显,棒密度比较均匀,而在第 3 个月时,虽然两组 CPC 棒边界仍然清晰可见,但是较前为模糊,CPC 棒密度也不太均匀,与骨结合界面无明显间隙可见,其周围可见骨痂形成,两者并没有明显区别(封三图 1、2a、2b)。

组织学观察

HE 染色 术后半个月,试验组与对照组的 CPC 与骨结合均较为紧密,界面无纤维膜形成,也没有明显的炎症反应(封三图 3a1、3b1);术后一月,两组中的 CPC-骨界面均有新生骨形成,图中可见骨母细胞和骨样组织(封三图 3a2、3b2);术后 3 月,新形成的骨变成了板层骨,并有岛状新骨凸入 CPC 中(封三图 3a3、3b3)。

免疫组织化学染色 可见两组骨组织病理切片

中的岛状组织内有成骨细胞存在,证明这个岛状组织为新形成的骨组织。试验组与对照组在组织学上并未见明显区别(封三图 4a、4b)。

讨 论

在临床上常用的骨缺损修复材料是自体骨、同种异体骨和人工骨材料。因为自体骨的数量有限,并且在取骨术后可能出现局部疼痛、过敏等并发症,而同种异体骨容易引起宿主的免疫排异和炎症反应^[1],所以医学界和材料学界就试图找到一种理想的材料来造福于患者。聚甲基丙烯酸甲酯(poly-methylmethacrylate PMMA)是一种常用的人工骨材料,在假体置换、骨缺损的修复以及 PMMA 药珠治疗骨感染方面已经取得了明显疗效。然而由于其固有的组织相容性差、凝结过程中放热损害周围组织易引起骨组织坏死、单体对人体免疫系统的毒性以及在作为治疗和预防骨感染的药物载体时需要二次手术并且药物释放不完全等许多缺点^[2~4],所以其进一步应用价值受到了限制。被称之为能与骨组织生物学结合的生物活性材料^[6]已经被广泛研究,与骨组织无机矿物质组成相似的羟基磷灰石(hydrox-yapatite,HA),具有组织相容性好、新生骨可以在其表面和孔中形成等优点,曾经试图作为 PMMA 的替代品应用在假体上以克服 PMMA 相关的并发症^[7]。然而它具有吸收困难、引起骨溶解、具有一定的脆性并且弹性强度差等缺点。一些可以生物降解的材料如:CPC、Poly(D,L-lactide)^[5],由 Polylactic Acid 和 Poly(D,L-lactide)成分组成的材料^[2],壳聚糖(chitosan)^[8]等已经显示出它们具有组织相容性好和可以被生物降解等优点。

CPC 自 80 年代中期发明以来业已成为生物医学材料的研究热点之一,可以作为骨转导材料和药物载体的 CPC 是由至少含有除了 HA 以外的两种磷酸钙盐的固相和液相组成的复合体,它具有制备简便、凝结过程中几乎无放热反应等特点,克服了陶瓷材料的修整困难、难以吸收等缺点,在人体内最终转化为羟基磷灰石。它的应用价值得到了肯定^[9~12],并且已经应用于临床,取得了良好的效果^[13]。

本实验所用的 CPC 是华东理工大学国家超细粉末工程研究中心研制的类似材料,临床应用已经显示它是一种较为理想的人工骨材料^[14]。实验结果表明,载药后的 CPC 与骨组织始终结合得较为紧密,界面没有纤维膜的形成,也没有明显的炎症反应,提示 CPC 具有良好的组织相容性。在 CPC 药

棒植入兔体内3个月内,新生骨逐渐在CPC-骨界面形成,HE染色和免疫组织化学染色证明了第3个月有新骨长入药棒内,形成岛样骨组织结构。虽然由于脱钙而从组织切片上看不出CPC生物降解的迹象,但是从X片和新生骨的形态结构可以说明CPC药棒的周边成分业已被吸收,即被生物降解了。试验组与对照组未见明显差别。本试验结果说明,在CPC中加入6.5%妥布霉素后,并没有明显改变其生物降解特性,CPC药棒的骨转导作用仍然较为明显。

然而,有人认为妥布霉素对成骨细胞有影响,Miclau等^[15]通过妥布霉素在体外对成骨细胞的毒性研究后,认为当妥布霉素浓度 $\leq 200 \mu\text{g/ml}$ 时对成骨细胞的复制几乎没有影响, $400 \mu\text{g/ml}$ 时有明显影响, $10\,000 \mu\text{g/ml}$ 时则导致成骨细胞死亡。Murakami等^[16,17]认为妥布霉素对骨组织的毒性不但与妥布霉素的浓度有关,而且与pH也有关系。当其浓度高到 2.0 mg/ml 并且pH低到6.8时,骨组织的代谢就很差。结果表明妥布霉素对骨组织是有毒性的,并且高浓度的妥布霉素和低值pH的微环境可以明显抑制代谢。但是加入 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 提高pH值时,骨组织的代谢就增强了,而且还可以增强妥布霉素的抗菌效果。但是Lindsey等^[18]通过松质骨载药妥布霉素(90 mg妥布霉素/3 g自体骨)植入犬的股骨,观测3个月,结果表明其在组织学、X片和生物力学等方面并没有改变骨的愈合过程。

本试验所用是含妥布霉素药量为6.5%的CPC,试验结果并没有显示出明显阻止新生骨的形成副作用,但是CPC载药量增加后是否对成骨有影响,尚须作进一步研究。

CPC作为一种可以被生物降解的材料,在载药6.5%的妥布霉素后仍然具有良好的组织相容性、骨转导作用和可被生物降解特性,其作为妥布霉素的载体在预防、治疗骨感染和骨缺损的重建方面可能是一种较为理想的人工骨材料。

参 考 文 献

- Bauer T, Muschler GF. Bone graft materials. *Clin Orthop*, 2000, (371):10
- Calhoun JH, Mader JT. Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant. *Clin Orthop*, 1997, (341):206
- Shinto Y, Uchida A, Korkusuz F, et al. Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics. *J Bone Joint Surg Br*, 1992, 74-B:600
- Meyer JD, Falk RF, Kelly RM, et al. Preparation and *in vitro* characterization of gentamycin-impregnated biodegradable beads suitable for treatment of osteomyelitis. *J Pharm Sci*, 1998, 87(9):1149
- Zhang X, Wyss UP, Pichora D, et al. Biodegradable controlled antibiotic release devices for osteomyelitis: optimization of release properties. *J Pharm Pharmacol*, 1994, 46:718
- Hamadouche M, Sedel L. Ceramics in orthopaedics. *J Bone Joint Surg*, 2000, 82-B(8):1095
- Willert HG, Bertram H, Buchhorn GH. Osteolysis in alloarthroplasty of the hip: the role of bone cement fragmentation. *Clin Orthop*, 1990, 258:108
- Chen AM, Hou CL, Bao JL, et al. Antibiotics loaded chitosan bar. *Clin Orthop*, 1999, 366:239
- Frankenburg EP, Goldstein SA, Arbor A, et al. Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement. *J Bone Joint Surg*, 1998, 80-A(8):1112
- Bai B, Jazrawi LM, Kummer FJ, et al. The use of an injectable, biodegradable calcium phosphate bone substitute for the prophylactic augmentation of osteoporotic vertebrae and the management of vertebral compression fractures. *Spine*, 1999, 24(15):1521
- Yetkinler DN, Ladd AL, Poser RD, et al. Biomechanical evaluation of fixation of intra-articular fractures of the distal part of the radius in cadavera: kirschner wires compared with calcium-phosphate bone cement. *J Bone Joint Surg*, 1999, 81-A(3):391
- Thordarson DB, Hedman TP, Yetkinler DN, et al. Superior compressive strength of a calcaneal fracture construct augmented with remodelable cancellous bone cement. *J Bone Joint Surg*, 1999, 81-A(2):239
- Sanchez-Sotelo J, Munuera L, Madero R. Treatment of fractures of the distal radius with a remodelable bone cement. *J Bone Joint Surg*, 2000, 82-B(6):856
- 陈统一, 王文波, 李力, 等. 自固化磷酸钙人工骨修复四肢骨缺损的初步临床应用. *中华创伤杂志*, 1999, 15(3):184
- Miclau T, Edin ML, Lester GE, et al. Bone toxicity of locally applied aminoglycosides. *J Orthop Trauma*, 1995, 9(5):401
- Murakami T, Murakami H, Ramp WK, et al. Interaction of tobramycin and pH in cultured chick tibiae. *J Orthop Res*, 1996, 14(5):742
- Murakami T, Murakami H, Ramp WK, et al. Calcium hydroxide ameliorates tobramycin toxicity in cultured chick tibiae. *Bone*, 1997, 21(5):411
- Lindsey RW, Probe R, Miclau T, et al. The effects of antibiotic-impregnated autogeneic cancellous bone graft on bone healing. *Clin Orthop*, 1993, (291):303

(收稿日期:2001-06-29)(编辑:张秀峰)

载药妥布霉素人工骨(磷酸钙骨水泥) 修复骨缺损的动物试验

(正文见第473页)

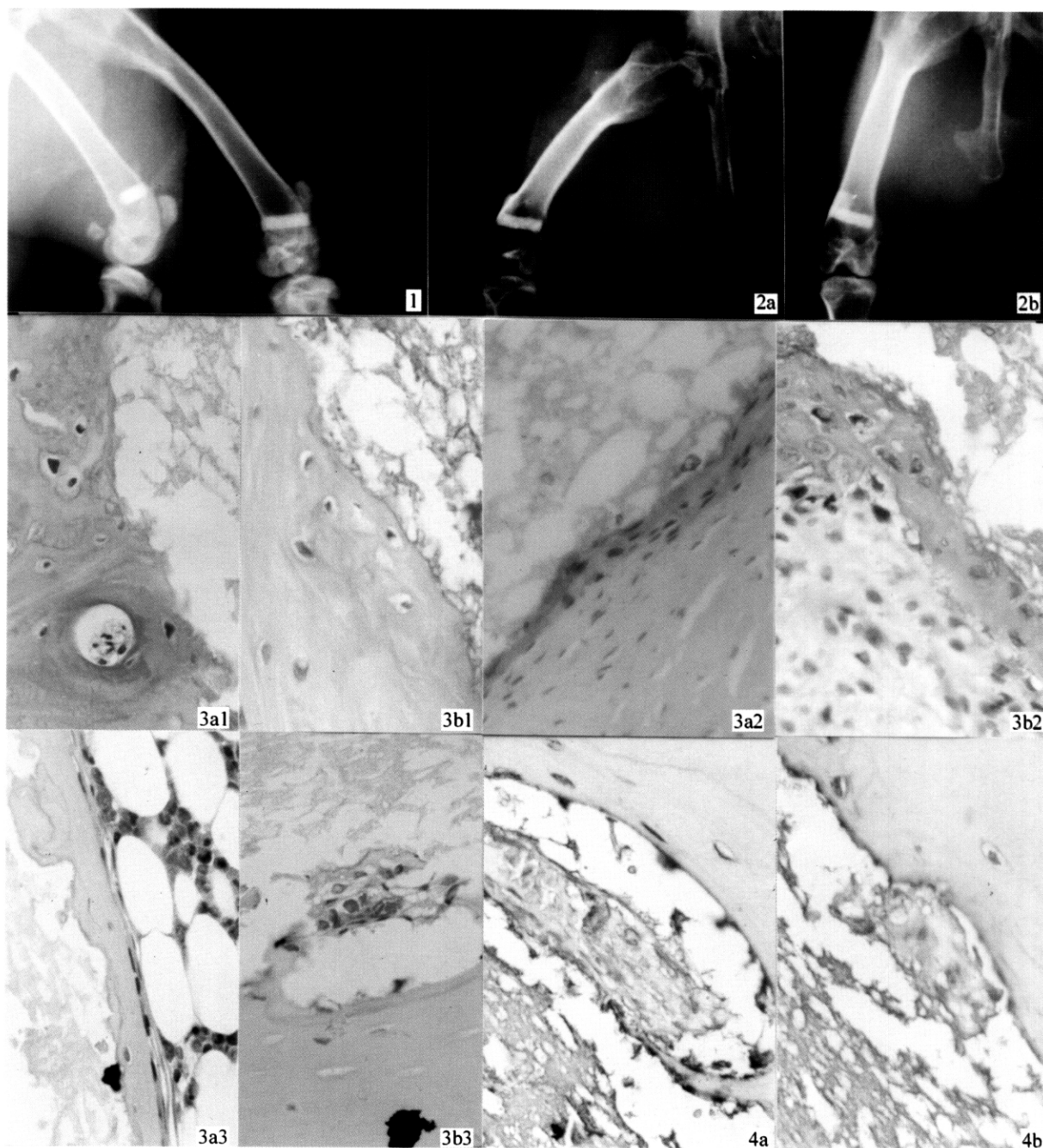


图 1 股骨植入CPC后的第1天X片

Fig 1 Radiograph showing the CPC in a rabbit's femora the first day after implantation

The left:control group; The right:test group

图 2 植入术后3个月X片

Fig 2 Radiograph of the rabbit's femora 3 months after implantation

a.Control group with CPC bar; b.Test group with drug-loaded CPC bar

图 3 植入术后半个月(3a1,3b1)、1个月(3a2,3b2)、3个月(3a3,3b3)组织切片

Fig 3 Histological sections half a month (3a1,3b1),one month(3a2,3b2) and three months (3a3,3b3)after implantation) (HE,original magnification $\times 200$)

a1,a2,a3:Control group; b1,b2,b3:Test group

图 4 植入术后3个月组织切片

Fig 4 Histological sections three months after implantation (Immunohistochemical staining,original magnification $\times 200$)

a:Control group; b:Test group