

# 网孔型纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 复合生物活性材料 治疗早期股骨头缺血坏死的实验研究<sup>\*</sup>

陈 诚, 梁 熙, 黄 伟, 胡 宁, 阳明明, 尹世杰

(重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆 400000)

**【摘要】** 目的 观察网孔型纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66(n-HA/PA66)支撑棒及其复合血管内皮细胞生长因子(VEGF)后治疗兔股骨头早期缺血性坏死的实验效果。方法 将 n-HA/PA66 支撑棒及 VEGF 缓释微球植入兔早期股骨头缺血坏死模型, 术后 3、6、12 周行影像学及组织切片观察。结果 植入 n-HA/PA66 支撑棒的实验兔未发现股骨头塌陷的影像学征象且骨质修复良好, 其组织学检查显示新生骨长入 n-HA/PA66, VEGF 的持续缓释能促进骨长入及血管重建。结论 网孔型 n-HA/PA66 支撑棒能有效预防早期股骨头缺血坏死的股骨头塌陷, VEGF 缓释微球能加快骨修复过程。

**【关键词】** 羟基磷灰石/聚酰胺 66; 股骨头缺血坏死; 骨修复; 动物实验

**【中图分类号】** R 318.08 **【文献标识码】** A **【文章编号】** DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2011.08.004

## Nano-hydroxyapatite/polyamide 66 biocomposites (n-HA/PA66) for treating early avascular necrosis of femoral head

CHEN Cheng LIANG Xi HUANG Wei *et al*

(Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University,

Chongqing Medical University, Chongqing 400000)

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of porous n-HA/PA66 rods and vascular endothelial growth factor (VEGF) for treatment of early stage avascular necrosis of femoral head in rabbits. **Methods** The n-HA/PA66 supporting stick and VEGF microcapsul were implanted into the rabbit models of vascular necrosis of femoral head. Results were evaluated by radiograph and histology at the end of 3rd, 6th and 12th week after operation. **Results** In the group B and C, no collapse of femoral head was observed. The New bone formation and the repair of the femoral head were observed by radiograph. Under microscope, the cancellous bone grew into cage. VEGF microcapsul can boost the progress of bone formation and. **Conclusion** It shows that the n-HA/PA66 is effective in providing structural support the subchondral bone and prevent collapse. And the composite of VEGF is active in inducing new bone formation and vascular remodeling.

**【Key words】** Nano-hydroxyapatite/polyamide 66; Avascular necrosis of femoral head; VEGF; Zooperly; Support

股骨头缺血性坏死(ANFH)是股骨头血供中断或受损,引起骨细胞及骨髓成分死亡及随后的修复,继而导致股骨头结构改变,股骨头塌陷,关节功能障碍的疾病。ANFH 分期方法较多,国际上较为公认的 Steinberg 分期和 ARCO 分期规定股骨头塌陷前为早期 ANFH 0-II期,早期 ANFH 治疗以延缓或阻止坏死发展进程,防止股骨头塌陷,尽可能避免或推迟全髋置换治疗为目的。本研究是将网孔型纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66(n-HA/PA66)支撑棒及 VEGF 缓释

微球植入兔早期股骨头缺血坏死的模型,观察其支持股骨头、促骨生长和重建血管的效果。

### 1 材料与方法

1.1 网孔型 n-HA/PA66 材料 本研究采用由四川国纳科技有限公司制作网孔型 n-HA/PA66 支撑棒。据文献和我们以前的研究,确定 n-HA/PA66 国家“863”项目(2002AA326020)支撑棒网孔率为 60~80%,平均孔径为 250~500 $\mu$ m。支撑棒长度为 10mm,直径为 3mm<sup>[1,2]</sup>。使用时可据实际情况对长度进行修整。

1.2 VEGF 缓释微球制备 采用明胶法制作 VEGF 明胶缓释微球<sup>[3]</sup>,此法制备的微球具有良好的缓释性能,释药速度平稳,动态透析法进行体外释药实验,7

基金项目:国家“863”项目(2002AA326020);重庆市自然科学基金资助(CSTC2007BB5291)

通讯作者:梁熙,电话:13594059590

天后累计释放 91%。

1.3 模型制造 选用健康新西兰白兔 50 只, 雌雄不限, 体重 2.5~3.0kg。单笼标准饮食喂养, 经耳缘静脉注射马血清(德国 PAA 公司), 每次 10 ml/kg, 共 2 次, 间隔 3 周, 第 2 次注射马血清后 2 周, 连续 3 天腹腔内注射地塞米松磷酸钠(西南药业股份有限公司), 每天 10 mg/kg。经 MRI 筛选造模满意(T1W1、T2W1、STIL 出现带状低信号, 图 1)的新西兰大白兔 36 只。

1.4 手术方法及动物分组 将 36 只实验兔随机分

为 A、B、C3 组。3%戊巴比妥钠麻醉, 在双侧股骨大转子下 1cm 沿股骨各做一约 2cm 纵行切口, 暴露大转子及股骨干。在透视下, 于大转子下 1cm 处沿股骨头颈钻一  $\Phi 3.0$ mm 隧道至股骨头软骨下方(图 2A)。

A 组仅行髓心减压术, B 组沿隧道方向植入 n-HA/PA66 支撑棒(图 2B)。C 组模型于隧道内先后植入 VEGF 缓释微球及 n-HA/PA66 支撑棒。术后连续 3 天肌注青霉素, 剂量为 160 万 U/d。

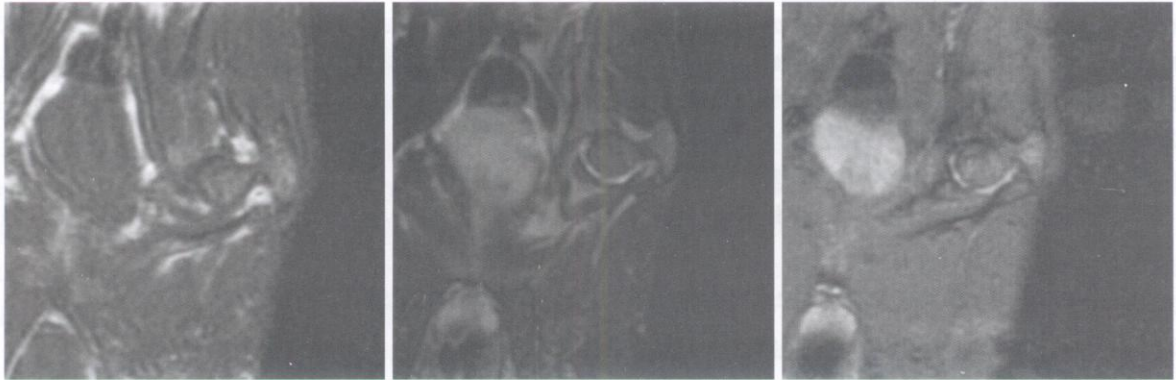


图 1 兔早期股骨头坏死模型, T1W1、T2W1、STIL 出现带状低信号  
Figure 1 T1W1, T2W1 and STIL demonstrated low signal

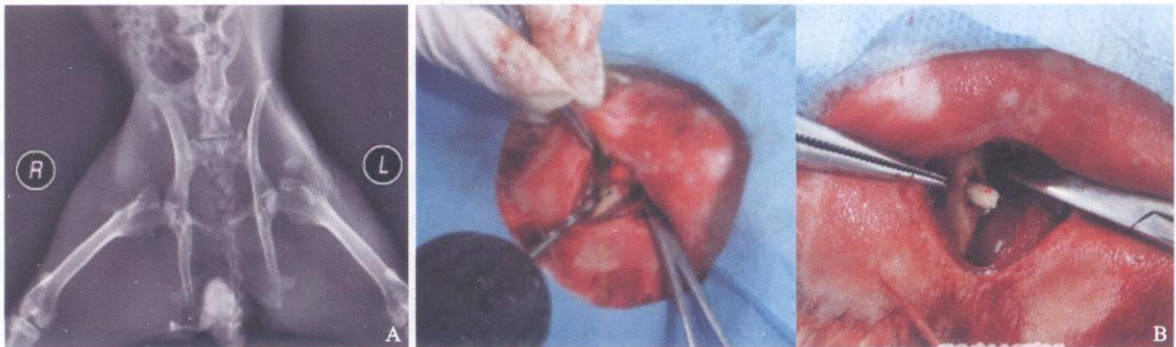


图 2 手术方式  
Figure 2 Method of operation

1.5 观察方法 术后 3、6、12 周取各组大白兔 4 只, 观察后肢步态, 行双髋 X 线、MRI 检查。猝死制作股骨头颈脱钙切片行 HE、马森及甲苯胺蓝染色进行观察。

## 2 结果

2.1 一般情况 36 只兔子无 1 例发生感染或死亡, B、C 组术后 3 周开始用双足蹬地行走, A 组开始以上活动时间为术后 5 周。

2.2 组织切片观察 术后 3 周, A 组隧道边缘及 B、C 组 n-HA/PA66 孔隙中有纤维组织浸润, 数量 A、B、C 三组逐渐递增。Masson 染色片中见蓝染的 I 型胶原

(图 3A)。术后 6 周, B、C 组支撑棒空隙及与骨接触面出现软骨成骨现象(图 3B)。C 组见少量新生骨小梁形成, 贴附于孔隙的内面。孔隙中央有成骨细胞及纤维细胞的活动(图 3C)。A 组隧道边成骨现象较弱。术后 12 周, B、C 组无明显差异, 表现为团状骨小梁及骨细胞对孔隙较充分填充。新生骨小梁与正常骨小梁形态相当, 支撑棒周围两者出现延续(图 3D)。

2.3 影像学检查 A 组: 术后 3 周出现股骨头塌陷 1 例(图 4A), 术后 6 周时减压针道开始模糊。B、C 组 X 线、MRI 均未发现股骨头塌陷的征象, 术后 6 周, T1、T2 低信号影消失(图 4B、4C), 针道边界不清。

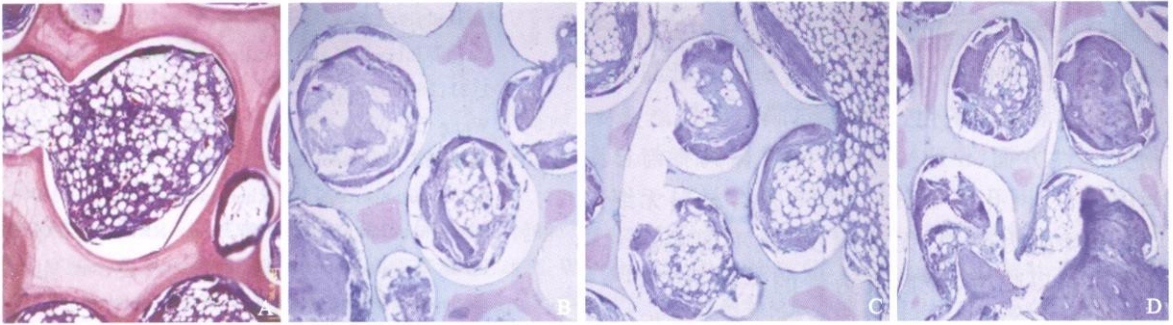


图 3 组织切片所见

Figure 3 Tissue slice

注: A. 术后 3 周, 马森染色  $10\times 20$ , 网孔中见蓝染的 I 型胶原; B. 术后 6 周, 甲苯胺蓝染色  $10\times 20$ , B、C 组支撑棒空隙及与骨接触面出现软骨成骨现象; C. 术后 6 周, 甲苯胺蓝染色  $10\times 20$ , C 组支撑棒空隙中可见少量新生骨小梁形成; D. 术后 12 周, 甲苯胺蓝染色  $10\times 20$ , B、C 组中团状骨小梁及骨细胞对孔隙较充分填充

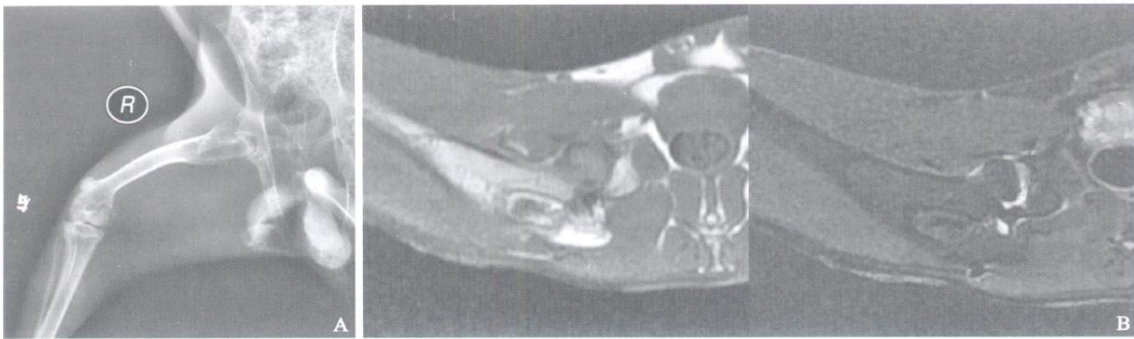


图 4 影像医学检查

Figure 4 Medical imaging detection

注: A. 术后 3 周, A 组中 I 模型出现股骨头塌陷(新月征); B. 术后 6 周, B 组模型 T1、T2 低信号影消失

### 3 讨论

对早期 ANFH 的患者, 如不进行治疗, 85% 以上有临床症状的 I 期和 II 期患者在两年内会因为关节面塌陷而需要进行股骨头置换<sup>[4]</sup>。高纯度氧通过改善微循环及局部缺氧, 从而加速损伤组织的修复。但随着局部血流的降低, 其疗效会受到很大的限制。此外, 电刺激、体外冲击波治疗、电磁场治疗等也被证实了有促进血管重建及组织修复的作用<sup>[5]</sup>。药物治疗方面, 抗骨质疏松药物二磷酸盐<sup>[6]</sup>、环前列腺素衍生物伊洛前列素<sup>[7]</sup>等药物被用做 ANFH 的辅助治疗, 但其疗效有待进一步临床证实。

目前主流的治疗方案仍为手术治疗, 应用比较普遍的是 Arlet 和 Ficat 首先开展的髓芯钻孔减压术。由于缺少对软骨下骨板的结构性支撑, 可致软骨塌陷学者开始寻找能对股骨头进行有效结构支撑的治疗方法。包括髓芯减压+单纯骨移植术、带血管蒂的骨移植术、骨水泥填补、镍钛记忆合金网球<sup>[8]</sup>及多孔钽棒<sup>[9]</sup>。本研究采用的网孔型 n-HA/PA66 支撑棒同

样具有对股骨头进行生物力学支撑的作用。材料中的 n-HA 含量可达 60% 左右, 接近自然人骨中羟基磷灰石的水平, 且能均匀分布在聚合物的纤维网状结构中。其抗压、抗弯强度与弹性模量与人皮质骨相似。其分子及结构特性保证了其良好的支撑力。

较之骨移植术常发生移植骨坏死吸收, 生物植入材料还可以提供永久的结构支撑, 保证远期疗效。相之于骨水泥、镍钛记忆合金网球、多孔钽棒, 网孔型 n-HA/PA66 支撑棒优势在于: 其他材料除提供支撑以外, 促骨生成作用十分微弱。而网孔型 n-HA/PA66 具有很好的生物活性及骨传导作用。n-HA/PA66 可以在体内形成表面磷灰石晶体层, 并借新生骨与原有骨形成紧密键合, 并用网孔型 n-HA/PA66 替代材料成功修复了兔桡骨缺损<sup>[10, 11]</sup>。近年有人把间充质干细胞复合到钽棒上促进骨修复<sup>[12]</sup>。因股骨头缺血坏死局部 VEGF 表达减弱, VEGF165 基因转染脱蛋白骨, 可促进植骨区血管的形成<sup>[13]</sup>; 许多实验已经证实血管内皮因子在骨和材料的再血管化具有重要的意

义。VEGF 通过促进新生血管的形成, 加快骨转换和阻止软骨细胞的凋亡, 从而促进软骨内成骨。VEGF 还可以参与破骨细胞的趋化作用, 加速基质骨母细胞向骨细胞的分化和基质矿化, 从而促进膜内成骨。

生物安全性方面, n-HA/PA66 支撑棒具有与自然骨相当的成分, 网孔型 n-HA/PA66 复合材料无细胞毒性, 致敏反应为阴性, 无热原反应, 不溶血。n-HA/PA66 还可以降解, 最后成为骨的一部分<sup>[14, 15]</sup>。

蒋电明等发明的 n-HA/PA66 可降解螺钉及接骨板临床应用效果满意。而且这种材料具有良好的生物相容性与安全性。但钽、镍、钛、骨水泥等材料存在异物反应, 金属粒子的吸收沉积及骨水泥应用技术的局限可导致周围骨溶解、肝肾等组织器官功能受损。此外, n-HA/PA66 材料的可通过射线且不会对电磁场产生影响, 有助于 MRI 检查和治疗效果的观察评估。

#### 4 结论

网孔型 n-HA/PA66 支撑棒能对兔早期 ANFH 进行早期结构支撑, 相较镍钛记忆合金、钽棒、骨水泥, 具有更佳的骨诱导作用、生物相容性及安全性。配合 VEGF 缓释微球, 在术后早期能更明显促进骨长入支撑棒网孔结构中及新生血管的重建。有效防止股骨头塌陷, 延缓或阻止了坏死发展进程。

#### 【参考文献】

[1] Jie Wei, Yubao Li, Yi He. Processing properties of nano apatite—polyamide biocomposites[J]. Journal of materials Science, 2005, 40: 793-796.

[2] Jie Wei, Yubao Li, Weiqun Chen, et al. A study on nano-composite of hydroxyapatite and polyamide[J]. Journal of materials Science, 2003, 38: 3303-3306.

[3] 王璐, 郭树忠, 马显杰, 等. VEGF 明胶缓释微球对大鼠背部随意皮瓣存活的影响[J]. 中国美容医学, 2008, 17(5): 673-676.

(上接第 1420 页)

#### 4 结论

辛伐他汀可在蛋白水平上减少丙烯醛诱导的大鼠气道粘蛋白 MUC5AC 过度表达, 此作用可能通过甲羟戊酸途径调控 NF- $\kappa$ B 活性, 从而影响由多种炎症机制参与的黏液高分泌。鉴于他汀类药物作用的多效性, 其分子水平的具体机制还有待更深入的研究。

#### 【参考文献】

[1] 周向东, 兰箭, 董瑾. 慢性阻塞性肺疾病气道黏蛋白表型的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(7): 437.

[2] Wang H, Liu X, Umino T, et al. Cigarette smoke inhibits human bronchial epithelial cell repair processes [J]. Am J Respir Cell

[4] Alex L, Joseph F, James JH. biostructural augmentation for the treatment of osteonecrosis: rationale, technique and case example [J]. Journal of the Southern Orthopaedic Association, 2002, 11(3): 167-171.

[5] Wang CJ, Wang FS, Ko JY, Huang HY, Chen CJ, Sun YC, Yang YJ. Extracorporeal shock wave therapy shows regeneration in hip necrosis [J]. Rheumatol 2008; 47: 543-546.

[6] Ramachandran M, Ward K, Brown RR, Munns CF, Cowell CT, Little DG. Intravenous bisphosphonate therapy for traumatic osteonecrosis of the femoral head in adolescents [J]. J Bone Joint Surg Am 2007; 89: 1727-1734.

[7] Disch AC, Matziolis G, Perka C. The management of necrosis-associated and idiopathic bone-marrow oedema of the proximal femur by intravenous iloprost [J]. J Bone Joint Surg Br 2005; 87: 560-564.

[8] 王岩, 赵德伟, 王继方等. 镍钛记忆合金网球治疗成年人股骨头缺血坏死初步报告 [J]. 中华外科杂志, 1998, 36(10): 578-581.

[9] Tsao AK, Roberson JR, Christie MJ, et al. biomechanical and clinical evaluation of a porous tantalum implant for the treatment of early-stage osteonecrosis [J]. J Bone Joint Surg Am, 2005; 87 Suppl 2: 22-27.

[10] 孟纯阳, 安洪, 蒋电明. 新型纳米骨关节修复重建材料的生物活性及近期对机体钙磷代谢的影响 [J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2005, 20(10): 682-684.

[11] 孟纯阳, 安洪, 蒋电明, 等. 网孔纳米羟基磷灰石/聚酰胺人工骨修复兔桡骨缺损 [J]. 中华创伤杂志, 2005, 21(3): 187-191.

[12] Xu M, Peng D. Mesenchymal stem cells cultured on tantalum used in early-stage avascular necrosis of the femoral head [J]. Med Hypotheses, 2010; 20.

[13] 曹凯, 黄伟, 安洪, 等. 脱蛋白骨联合 VEGF 基因转染治疗股骨头缺血坏死 [J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(3): 215-219.

[14] 孟纯阳, 安洪, 蒋电明, 等. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺的细胞相容性研究 [J]. 中华创伤骨科杂志, 2005, 7(8): 749-752.

[15] 李鸿, 李玉宝, 严永刚, 等. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 多孔材料制备和生物安全性初步评价 [J]. 生物医学工程学杂志, 2008, 25(5): 1126-1129.

(收稿日期: 2011-05-16; 编辑: 张文秀)

Mol Biol, 2001, 25: 772-779.

[3] Orchers MT, Carty MP, Leikauf GD. Regulation of human airway mucins by acrolein and inflammatory mediators [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 1999, 276: 549-555.

[4] Orchers MT, Wesselkamper S, Wert SE, et al. Monocyte inflammation augments acrolein-induced Muc5ac expression in mouse lung [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 1999, 277: 489-497.

[5] 李莉, 冯玉麟, 文富强. 核因子  $\kappa$ B 介导丙烯醛刺激大鼠气道黏蛋白高表达 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 11(28): 794-795.

[6] Preciado D, Lin J, Wuertz B, et al. Cigarette smoke activates NF kappa B and induces Muc5b expression in mouse middle ear cells [J]. Laryngoscope, 2008, 118(3): 464-471.

(收稿日期: 2011-04-08; 编辑: 张文秀)