

# 网孔纳米羟基磷灰石 / 聚酰胺人工骨 修复兔桡骨缺损

孟纯阳 安洪 蒋电明 李玉宝

**【摘要】**目的 探讨新型网孔纳米羟基磷灰石 / 聚酰胺 66 (n - HA / PA66) 复合材料作为骨组织工程支架修复长骨骨缺损的能力及作为人工骨修复替代材料的可行性。方法 选用新西兰大白兔双侧桡骨制作骨缺损模型, 将 n - HA / PA66 复合材料植入左侧骨缺损处, 右侧骨缺损以脱蛋白骨 (deprotein bone, DPB) 植入作为实验对照, 另做不植入任何材料的骨缺损空白对照, 同时设置未行任何处理只供力学测试的正常对照。在 2, 4, 8, 12, 16 周各时相点分别进行大体观察、X 线照片、组织学切片、扫描电镜观察及力学测试。结果 n - HA / PA66 人工骨组与牛脱蛋白骨 (bDPB) 组骨缺损均完全修复, 而空白对照组骨缺损未见修复; n - HA / PA66 与 bDPB 两组间及两组分别与正常对照组生物力学各项测试指标比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 新型骨修复和重建材料 n - HA / PA66 具有良好的骨传导能力和力学特性以及生物相容性, 有望成为骨组织工程中修复骨缺损的理想支架材料。

**【关键词】** 羟基磷灰石; 聚酰胺; 复合材料; 骨缺损

**Repair of bone defect with porous composite of nano-hydroxyapatite and polyamide** MENG Chun-yang, AN Hong, JIANG Dian-ming, LI Yu-bao Department of Orthopaedics, First Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China Corresponding author: 蒋电明, 电话: 023 - 89011212, Email: jdm571026@vip 163.com

**【Abstract】** Objective To evaluate the ability of porous nano-hydroxyapatite crystals and polyamide composite (n-HA/PA66) in repairing bone defects and discuss the feasibility of n-HA/PA66 as bone substitute material. Methods The animal models of bilateral radius bone defect created by surgery in the New Zealand white rabbits were implanted with n-HA/PA66 on the left bone defect (experimental group) and with deprotein bone (DPB) on the right defects (control group). The bone defects with no implant were used as blank control group. Normal control was set in rabbits that received nothing of treatment. The effect was observed by gross, X-ray, histopathological, transmission electron microscopic and dynamic examinations 2, 4, 6, 8, 12 weeks after operation. In the meantime, the interface of implants and receptor bone was observed by the scanning electron microscope and biomechanics determined 16 weeks after operation. Results The defects of experimental group and experimental control group got repaired perfectly. There was no statistically significant difference between experimental group and control group upon biomechanics ( $P > 0.05$ ). Conclusion n-HA/PA66 has good biocompatibility and osteoconductive ability and may be one of ideal scaffolds in repairing bone defects in bone engineering.

**【Key words】** Nano-hydroxyapatite; Polyamide; Composite; Bone defect

因创伤、肿瘤、感染等因素造成的大段骨缺损的修复, 始终是困扰矫形外科医师的一大难题。自上个世纪 80 年代以来, 寻求一种既具有良好生物相容性又具有成骨能力的新型骨修复和替代材料, 始终

是材料学和矫形外科领域追踪的热点。以具有骨传导特性的羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HA) 修复骨缺损已取得公认, 但普通 HA 粒径大、抗弯强度低、脆性大, 在生理环境中的抗疲劳性不高, 只能应用于不承受负荷或仅承受纯压力负荷的环境中; 同时由于其降解速度慢, 难于被机体完全替代、利用, 其他骨修复替代材料也存在类似问题<sup>[1,2]</sup>。上述缺陷使得普通 HA 在临床上的应用受到限制。国内学者以新工艺将具有骨传导特性的纳米羟基磷灰石 (nano-hydroxyapatite, n - HA) 与有机质高分子聚酰胺 66

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目 (2002AA326020)  
作者单位: 400016 重庆医科大学附属第一医院骨科 (孟纯阳、安洪、蒋电明); 四川大学材料分析测试中心 (李玉宝)  
通讯作者: 蒋电明, 电话: 023 - 89011212, Email: jdm571026@vip.163.com

(polyamide, PA66)进行共溶而制成的高分子聚合物 n - HA /PA66,是“十五”国家科技攻关计划研制出的具有我国自主知识产权和国际领先水平的新型纳米生物活性骨修复替代材料。各种分析表明,这是一种纳米晶类骨的高强柔韧复合材料<sup>[3,4]</sup>。前期用致密型 n - HA /PA66修复犬下颌骨体缺损实验取得了满意的结果<sup>[5]</sup>,表明在骨修复和组织工程方面具有广阔的应用前景,为获得结构和性质类似于人体骨组织的生物医学材料开辟了一条广阔的途径。笔者将网孔 n - HA /PA66复合材料作为骨组织工程支架,对其用于修复长骨骨缺损的能力及作为人工骨修复替代材料的可行性进行探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

网孔 n - HA /PA66由四川大学国家纳米材料孵化基地提供规格为 15 mm ×4 mm大小骨圆柱体,共制作 60个。牛脱蛋白骨(bDPB),以文献[6]方法制成并加工成规格为 15 mm ×4 mm大小骨圆柱体,共制作 60个。

### 1.2 动物分组

取 45只健康成年新西兰兔,体重 2.2~2.5 kg,随机选其中 36只兔,共 72侧桡骨,手术造成骨缺损。实验分为 n - HA /PA66组:为每只兔左侧桡骨缺损 36侧,以网孔 n - HA /PA66植入; bDPB组:为每只兔右侧桡骨缺损 36侧,以 bDPB植入;空白对照组:再随机选 4只兔,手术造成双侧骨缺损,为不植入任何材料的骨缺损;正常对照组:即剩余 6只兔,不做任何处理,与其他组同条件喂养,留作正常对照的力学测试。

### 1.3 手术方法

20 g/L戊巴比妥钠 30 mg/kg兔耳缘静脉注射麻醉。俯卧固定于手术台上,褪毛消毒铺无菌巾。取前臂内侧纵行约 3 cm直切口。充分显露桡骨中段,电锯造成约 15 mm节段骨缺损(带骨膜),造成公认的兔桡骨缺损模型。n - HA /PA66组和 bDPB组分别在左右骨缺损处嵌植入大小适宜的相应材料块(保证嵌插固定牢靠而无须内固定),空白对照组只造成单纯骨缺损不作材料植入,逐层缝合切口。术后立即肌肉注射青霉素 40万 U/只,连续 3 d,不予外固定,分笼喂养。

### 1.4 效应指标和资料收集方法

1.4.1 一般情况:术后观察各组术侧上肢外观功能、步态,在规定各时相点取材时观察骨缺损修复及

骨端骨痂生长情况。

1.4.2 X线检查:不同时相点行 X线摄片,观察骨愈合和修复骨缺损情况。

1.4.3 组织学观察:术后 2, 4, 8, 12, 16周时, n - HA /PA66组和 bDPB组分别处死 5只兔,各组获 5个标本,切取植入骨缺损中的移植物,远近端均保留周围新生骨性组织 4 mm,放入 40 g/L多聚甲醛中保存,制作硬组织切片,矢状位切片,HE染色、甲苯胺蓝染色和 Massons 染色行组织学检查,观察新骨形成情况。

1.4.4 扫描电镜观察:各时相点各组取 2个标本,放入 25 g/L戊二醛中保存,制样后电镜下观察比较植入体与受体界面键合情况。

1.4.5 力学性能测试:术后 16周取材时, n - HA /PA66组、bDPB组及正常对照组各分别取 10个完整尺桡骨标本,为避免分离尺骨时造成微骨折影响测试结果,选择两组标本均带有尺骨,为系统误差。为减少桡骨弧度对测试的影响,每一标本两端分别用聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)制作矫正测试夹具,选择与临床相关的压缩试验和三点弯曲试验,以 Instron力学测试机(美国 Model 8874)对两组修复骨缺损的标本进行测试。从不同角度选择反映力学强度(最大载荷)、韧性(挠度,即最大载荷时的位移)和弹性(弹性参数)的各项力学测试指标,对 n - HA /PA66、bDPB组骨缺损修复后的力学性能进行全面综合评价比较,并与正常对照组进行组间比较。

### 1.5 统计学分析

测试各项指标所得数据用  $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 10.0软件进行配对 t检验。

## 2 结果

### 2.1 大体形态观察

术后麻醉清醒后,兔行走步态如常,1周内均可观察到 bDPB组较 n - HA /PA66组手术区域明显肿胀,bDPB组有 3例切口被兔自身咬裂开,至 2周时两组手术切口均获良好愈合,未见窦道形成及不愈合。2周时取材见复合材料和脱蛋白骨均已与受体骨纤维连接,且植入物被松散的纤维组织不完整包裹,bDPB周围组织较 n - HA /PA66组材料周围组织炎性水肿明显,bDPB组组织切割时出血较多。4周时,植入体被致密的纤维性膜性组织完整包裹,远近端均已与受体牢固愈合,但植入体与受体接合处可见突起,植入体表面有突起新生骨,两组外观已无明显差异。8周时,两组植入体与受体远近端接合

处突起消失,植入体表面基本平整。12周时,两种植入体表面均变得较为光滑,但仍较自体骨粗糙;16周时,植入体光滑类似自体骨。空白对照组骨缺损区为大量纤维组织充填,远、近断端均变光滑,类似软骨。

## 2.2 X线检查结果

4周时,n-HA/PA66与bDPB和受体结合部均见骨痂形成,其密度较低,n-HA/PA66组较bDPB组骨痂形成量多,空白对照组清晰显示骨缺损。8周时,X线显示两种植入体均已与受体断端骨性愈合,但皮质骨连续性差,骨髓腔尚未贯通,部分标本断端仍见骨痂包绕植入体(图1)。12周时,两种植入体均已与受体骨骨性愈合,皮质骨连续性较好,骨髓腔已贯通,但两组植入区密度均较受体密度稍低(图2),空白对照组显示骨缺损区尚未修复。16周时,两种植入体均已与受体骨骨性愈合成一体,空白

对照组显示骨缺损两断端硬化,仍无修复迹象。

## 2.3 组织学检查

2周时,n-HA/PA66支架被纤维组织包裹,网孔内长入较多纤维组织,高倍镜下可见到支架与受体骨界面上有大量胶原形成,并见破骨细胞出现在材料边缘;bDPB支架内有毛细血管形成,纤维组织长入较n-HA/PA66组少,而炎性细胞较n-HA/PA66组为多。4周时,n-HA/PA66支架网孔里胶原浓聚成团,其周围已有较多纤维骨痂及类骨质形成,见丰富的新生血管,支架边缘被破骨细胞吸收成月牙状残缺,部分标本可观察到纤维骨痂组织已冲破n-HA/PA66支架间隔(图3);bDPB支架内有大量纤维骨痂形成,其间仍可见少量散在分布的炎性细胞,可观察到新生骨痂包绕死骨支架,但骨痂连接受到死骨阻隔(图4)。8周时,可见n-HA/PA66支架网孔里有大量新生软骨形成软骨岛,部分软骨岛相互连接成网状;bDPB组也观察到较多新生骨岛形成,但彼此间连接较多地受到死骨的阻隔。12周时,n-HA/PA66支架网孔里新生骨逐步矿化,可见成熟的小梁骨形成,Masson染色可见新生蓝色骨小梁及粉红色的条形类骨质(图5);bDPB组除新生骨小梁和类骨质外,还可见少量死骨碎片充次其间(图6)。16周时,n-HA/PA66支架网孔里已长满成熟的骨小梁,网孔间新生骨小梁相互连接成网状和板状;bDPB组死骨已基本被新生小梁骨和板层骨组织替代。

## 2.4 扫描电镜观察

4周时,n-HA/PA66及bDPB两组均可观察到成骨细胞,骨细胞黏附和类骨质形成,有骨纤维结构形成。8周时,n-HA/PA66与受体骨界面上有纤维成分及新骨形成,材料与受体骨融合较紧密;bDPB组与受体骨界面上有新生纤维骨痂与bDPB融合,覆盖原死骨小梁陷窝,新生纤维组织呈定向分布。16周时,网孔里新骨形成增多,n-HA/PA66材料上形成的新骨骨基质小泡分布均匀,类似自体骨基质,而HA呈现小颗粒,钙盐沉积好;bDPB上新骨组织的HA分布均匀,类似自体骨。

## 2.5 16周三点弯曲及压缩试验力学测试结果

从表1可以看出,三点弯曲试验n-HA/PA66组与bDPB组及正常对照组各组间两两比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

从表2可以看出,压缩试验n-HA/PA66组与bDPB组及正常对照组各组间两两比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

图1 植入术后8周,n-HA/PA66与bDPB植入体均已与自体骨远、近断端骨性愈合,但皮质骨连续性差,且植入区密度低于自体骨,髓腔尚未贯通。左为n-HA/PA66组;右为bDPB组

图2 植入术后16周,n-HA/PA66与bDPB植入体均已完全与自体骨远、近断端融合成一体,皮质骨连续性好,且植入区密度接近自体骨,髓腔已贯通。左为n-HA/PA66组;右为bDPB组

图 3 n - HA / PA66植入骨缺损 4周,支架内有大量纤维骨痂形成,可观察到纤维骨痂组织已冲破支架间隔,相邻网孔内形成的纤维骨痂已桥接 ( ) 甲苯胺蓝染色  $\times 100$  图 4 bDPB 植入骨缺损 4周,支架内有纤维骨痂形成,其间仍可见少量散在分布的炎性细胞,可观察到新生骨痂包绕死骨支架,但骨痂连接受到死骨阻隔 ( ) 甲苯胺蓝染色  $\times 100$  图 5 n - HA / PA66植入骨缺损 12周,Masson染色可见网孔内新生蓝色骨小梁 (↑)及粉红色的条形类骨质 ( ) Masson染色  $\times 200$  图 6 bDPB 植入骨缺损 12周,新生骨小梁和类粉红色骨质 ( ),还可见少量死骨碎片充次其间 (↑) Masson染色  $\times 200$

表 1 三点弯曲试验结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	标本数	最大载荷 (N)	挠度 (mm)	弹性参数 (N/mm)
n - HA / PA66组	5	147.39 $\pm$ 10.99	2.94 $\pm$ 1.21	55.10 $\pm$ 15.94
bDPB组	5	164.84 $\pm$ 41.16	2.69 $\pm$ 0.74	64.47 $\pm$ 19.77
正常对照组	5	167.54 $\pm$ 30.12	2.80 $\pm$ 0.71	61.86 $\pm$ 17.03

表 2 压缩试验结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	标本数	最大载荷 (N)	挠度 (mm)	弹性参数 (N/mm)
n - HA / PA66组	5	349.34 $\pm$ 103.46	1.29 $\pm$ 0.57	270.71 $\pm$ 101.82
bDPB组	5	290.78 $\pm$ 114.10	1.49 $\pm$ 0.67	195.15 $\pm$ 113.59
正常对照组	5	364.14 $\pm$ 87.99	1.31 $\pm$ 1.86	277.97 $\pm$ 104.05

### 3 讨论

#### 3.1 网孔 n - HA / PA66的优点及成骨作用

新型纳米骨修复替代材料 n - HA / PA66具有优良的生物相容性、刚性、尺寸稳定性和韧性,其形态、结构和组成上与人体骨中磷灰石纳米针晶相似;与普通 HA 相比, n - HA / PA66具备更好的骨传导生物活性,且其力学性能,特别是抗压、抗弯强度和弹性模量与人体皮质骨相近<sup>[3]</sup>。本实验中 n - HA / PA66网孔材料植入桡骨缺损区域后,光镜观察结果显示,2周后可见其网孔内即有纤维组织长入及新生血管生成。分析受体纤维组织快速长入的因素与 n - HA / PA66多孔材料的三维立体多孔结构密切相关,因多孔结构具有较高的比表面积,可提供较大的表面积和空间,不但能促进细胞黏附生长,而且有利于细胞外基质的沉积以及营养和氧气的进入及代谢产物的排出,也有利于血管和神经的长入。孔径和孔隙率是三维多孔材料的两个主要评价指标,备受研究人员关注。人工材料孔径究竟多大适宜,目前尚存争议。一般认为,孔径 < 100  $\mu\text{m}$ ,

不利于骨细胞长入。Jones等<sup>[7]</sup>报告,以孔径 > 100  $\mu\text{m}$ 的网孔生物活性玻璃作为组织工程支架取得了满意的结果。孔隙率对骨修复材料的成骨效应也极为重要,但采用多大的孔隙率要考虑到材料的用途,孔隙率增大有利于提高比表面积,利于细胞长入,但降低了材料的力学强度。本实验中使用的网孔材料的网孔孔径平均为 300  $\mu\text{m}$ ,孔隙率为 80%。研究显示 n - HA / PA66多孔复合材料的孔隙率超过 50%以后,孔隙之间能够相互连通,新生组织也可从多孔材料的表面“爬行”向孔内生长<sup>[8,9]</sup>,是组织快速长入的重要因素。

X线及组织学观察证实,4~8周,新骨在网孔 n - HA / PA66中的形成速度和质量与 bDPB 组没有明显差异。光镜下发现两组 8~12周同期标本新生骨岛和骨小梁在相互连接时, n - HA / PA66组各邻近网孔内的新生骨组织可较好桥接, bDPB 组则过多地受到了死骨的阻隔,可能与死骨的吸收改建较慢有关,而网孔 n - HA / PA66材料可快速修复骨缺损,与该复合材料的自身结构有关,因 n - HA / PA66针晶在形态、组成上与人体骨中磷灰石纳米针晶相似,在植入后能充分发挥 n - HA 的骨传导性, n - HA 释放出  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{PO}_4^{3-}$ ,营造了一个利于成骨的微环境,引导骨组织向纤维网络中生长,  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{PO}_4^{3-}$  沉积在纤维上,对骨基质起钙化作用,促进新骨的生成,且这一过程与骨组织中的基质钙化过程相似。另外,复合材料中纤维状基底束缚住 HA 颗粒而防止其移位,使纤维血管组织和骨组织长入,为骨生长提供了支架<sup>[8,9]</sup>。Bauer等<sup>[10]</sup>指出,具备骨传导作用是骨移植替代物的一项基本要求,因骨传导物质可为新骨的生长和类骨质的沉积提供支架和基质,说明骨组织工程中的支架具有骨传导作用至关重要。 n - HA / PA66主要成分为具有优良骨传导

特性的 n - HA,符合这一要求。另外,由于植入区远、近端均为髓腔,使得植入部位有较高的骨髓细胞浓度,包括定向性骨祖细胞(DOPC)和可诱导性骨祖细胞(DPC),而网孔复合材料表面独特的多孔结构具备宽大的内部空间和表面积,在植入后能容纳吸附大量骨髓细胞,这些条件也客观地为成骨提供了有利场所及条件。这些均可能是材料植入后新生骨组织快速长入的主要因素。

### 3.2 网孔 n - HA/PA66与 DPB 修复骨缺损的综合评价

目前,以 DPB作为骨移植修复替代材料已获公认。迄今为止,我国已建立了多个同种异体骨库,经脱蛋白去抗原处理的同种异体骨获准应用于临床已有数年历史,且获得了满意的临床疗效。X线和组织学切片被公认为衡量骨愈合优劣的两项金标准。本实验各期 X线检查结果及组织学观察结果证实,在各观察期, n - HA/PA66组与 bDPB组在骨愈合及新骨形成的数量和质量无明显差异,提示以 n - HA/PA66修复骨缺损可以达到与脱蛋白骨相近似的修复效果。力学测试结果也证实了这一点。但 bDPB组在植入 2周内,可观察到兔前臂植入区肿胀,2周时光镜下可见较多的炎性细胞,均可能为异种骨植入引起的排异反应所致。而 n - HA/PA66组未出现类似现象,说明 n - HA/PA66具有良好的生物相容性。郑谦等<sup>[5]</sup>将其用于修复犬下颌骨体缺损的实验结果也证实了这一点。同时,由于材料本身具有可塑性,即根据修复部位的不同制成不同的形状,且来源不限,可根据需要批量生产,这些优点都是 DPB所无法比拟的。

骨愈合的另一个重要衡量指标是力学性能测试。因此,骨缺损修复后能否在一定的时间内达到基本应力的要求,无疑是检验修复效果的良好尺度。尽管多孔复合材料的初始强度较致密材料低,但植入体内后,由于随时间延长,骨组织可快速、自由长入到材料孔隙内,同时组织学证实,随时间延长,长入到材料孔隙内的新生骨小梁数量增加,植入体与自然骨组织的融合度增加,且新生骨组织逐步矿化,使得新生骨密度和强度增加,最终导致多孔植入体的整体强度显著增加。16周时,三点弯曲试验和压

缩试验中全面、客观反映力学修复效果的强度、韧性及弹性指标的各项测试结果表明, n - HA/PA66与 bDPB两组间及两组分别与正常对照组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),说明在 16周时,两组修复骨缺损均已达到了与正常骨相近的力学性能。

本实验结果表明,网孔 n - HA/PA66替代材料修复兔桡骨缺损取得了满意的结果,说明该材料具有优良生物相容性和骨传导成骨活性以及良好的力学特性。而从工艺上讲,网孔的存在又可为与生长因子的复合、偶联提供载体空间,因此,可作为骨组织工程中理想的支架材料<sup>[9]</sup>。可以预见, n - HA/PA66将成为在骨科、口腔修复整形外科等领域具有广泛用途的新型生物活性材料。近期该材料已获国家食品药品监督管理局(FDA)批准进入二期临床试用阶段。

### 4 参考文献

- 1 Hench LL, Wilson J. Surfaceactive biomaterials Science, 1984, 226: 630 - 636.
- 2 Hemmerle J, Leize M, Voegle JC. Long - term behaviour of a hydroxyapatite /collagen - glycosaminoglycan biomaterial used for oral surgery: a case report Mater Sci Mater Med, 1995, 6: 360 - 366.
- 3 李玉宝,主编. 纳米生物医药材料. 第 1版. 北京:化学工业出版社, 2004. 36 - 40.
- 4 Wei J, Li YB, Chun WQ, et al. A study on nano - composite of hydroxyapatite and polyimide. J Mater Sci, 2003, 38: 3303 - 3306.
- 5 郑谦,周立伟,魏世成,等. 纳米羟基磷灰石 - 聚酰胺人工骨修复犬下颌骨体缺损的实验研究. 中华口腔医学杂志, 2004, 39: 60 - 63.
- 6 胡永康,安洪,曹本珍,等. 四种脱蛋白骨组织学和生物力学比较研究. 中华创伤杂志, 1998, 14: 277 - 279.
- 7 Jones JR, Ahir S, Hench LL. Large - scale production of 3D bioactive glass macroporous scaffolds for tissue engineering. J Sol Gel Sci & Tech, 2004, 29: 179 - 188.
- 8 Wei J, Li YB. Tissue engineering scaffold material of nano - apatite crystals and polyamide composite. Eur Polymer J, 2004, 40: 509 - 515.
- 9 王学江,李玉宝. 羟基磷灰石纳米针晶与聚酰胺仿生复合生物材料研究. 高技术通讯, 2001, 5: 1 - 5.
- 10 Bauer TW, Muschler GF. Bone graft material. An overview of the basic science. Clin Orthop, 2000, (371): 10 - 27.

(收稿日期:2004 - 07 - 05)

(本文编辑:向勇)

## 更正

因作者疏忽,在本刊第 21卷第 1期第 11页将“>39”写成“>36”,特此提出更正!