

同种异体骨与PMMA骨水泥组合物体内生物相容性的研究

王志坤^{1*}, 张贤森¹, 李再学¹, 冯庆裕¹, 陈建庭², 谢文伟^{1#}

¹东莞市松山湖中心医院骨科, 广东 东莞

²南方医科大学附属南方医院脊柱骨病科, 广东 广州

Email: wangqqq2005@126.com, #wwwincn@139.com

收稿日期: 2021年3月12日; 录用日期: 2021年4月19日; 发布日期: 2021年4月27日

摘要

目的: 通过兔椎骨骨缺损模型体内实验评估该新型组合骨水泥作为椎体填充材料的有效性和可行性。方法: 将72只兔椎骨骨缺损模型随机分为三组: 聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)组, 实验(组合物)组和空白对照组。PMMA和实验组分别使用PMMA骨水泥和组合物填充。术后4、8、12周时处死动物。在每个时间点进行微型CT分析, 生物力学测试和组织学分析。结果: 从植入填充物后4~12周, 实验组填充物有效强化兔椎骨与PMMA组无明显差异($P > 0.05$), 同时通过微CT及组织学观察发现实验组填充的组合物周围骨小梁生长在三组中最明显($P < 0.05$)。结论: 同种异体骨与PMMA骨水泥组合物在有效强化骨缺损椎体的同时有促成骨作用, 该组合物可以成为椎体填充物有价值的生物材料。

关键词

同种异体骨, 聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥, 生物相容性, 动物模型

Biocompatibility of Allogeneic Bone and PMMA Bone Cement Composition in Vivo Model

Zhikun Wang^{1*}, Xiansen Zhang¹, Zaixue Li¹, Qingyu Feng¹, Jianting Chen², Wenwei Xie^{1#}

¹Department of Orthopaedics, SSL Central Hospital of Dongguan City, Dongguan Guangdong

²Department of Spinal Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou Guangdong

Email: wangqqq2005@126.com, #wwwincn@139.com

Received: Mar. 12th, 2021; accepted: Apr. 19th, 2021; published: Apr. 27th, 2021

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 王志坤, 张贤森, 李再学, 冯庆裕, 陈建庭, 谢文伟. 同种异体骨与 PMMA 骨水泥组合物体内生物相容性的研究[J]. 外科, 2021, 10(2): 26-32. DOI: 10.12677/hjs.2021.102005

Abstract

Objective: To evaluate the effectiveness and feasibility of the new composite bone cement as vertebral body filling material by in vivo experiments of rabbit vertebral bone defect model. **Methods:** 72 rabbit bone defect models were randomly divided into three groups: polymethyl methacrylate (PMMA) group, experimental group and blank control group. PMMA and experimental groups were filled with PMMA cement and composition respectively. Animals were sacrificed at 4, 8, and 12 weeks after operation. Micro CT analysis, biomechanical test and histological analysis were performed at each time point. **Results:** There was no significant difference between the experimental group and the PMMA group from 4 to 12 weeks after implantation ($P > 0.05$). At the same time, micro CT and histological observation showed that the trabeculae around the composition filled in the experimental group were the most obvious in the three groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Allogeneic bone and PMMA bone cement composition can effectively strengthen bone defect vertebrae and promote bone action. The composition can be used as valuable biomaterial for vertebral body filler.

Keywords

Allogeneic Bone, Polymethyl Methacrylate Bone Cement, Biocompatibility, Animal Model

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate, PMMA)骨水泥, 是由液态 MMA 单体和粉末状 MMA 聚合物[1]组成的丙烯酸聚合物。作为一种常见的骨填充材料, PMMA 具有可注射性, 快速的止痛作用和良好的分散性能等优点, 已在临床上长期使用[2]。PMMA 骨水泥不仅可以立即缓解疼痛, 还可以提供机械稳定性[3]。但是, 由于 PMMA 骨水泥具有生物学惰性, 不适合骨骼生长, 因此 PMMA 的生物学活性很差, 导致局部骨骼与 PMMA 水泥之间的相互作用较差[4]。为了提高 PMMA 水泥的生物活性, 已经研究了将各种活性成分如 TiO_2 , 磷酸三钙(TCP), 羟基磷灰石(HA)和生物陶瓷掺入 PMMA 水泥[5] [6]。活性成分的引入可以减少聚合过程中产生的热量, 促进骨水泥与骨组织之间钙磷沉积过渡层的形成, 并使材料具有一定的生物活性[7]。本项前提研究已经证实由 PMMA 骨水泥和同种异体骨组成的骨替代物可促进成骨细胞的活力, 粘附力和分化的作用[8]。本研究通过动物实验进一步观察 PMMA 骨水泥和同种异体骨组成的骨替代物体内生物活力。

2. 材料与方法

2.1. 材料

选用兔龄 5~7 个月, 体重 3.2~3.5 kg 的新西兰大白兔 80 只, 兔由省动物实验中心提供。PMMA 骨水泥(每盒 20 g, 泰科瑞股份公司); 兔同种异体骨(将 8 只健康成年新西兰大白兔按美国组织库标准[9]制备同种异体骨作为供体)。

2.2. 兔腰椎椎体内骨缺损模型建立

用宿眠新 I 号(0.3 ml/kg)对兔子进行诱导麻醉, 1 分钟后用 3% 戊巴比妥溶液(0.3 ml/kg)肌注。麻醉成功后, 动物取俯卧位, 常规消毒铺单, 采用后正中切口, 依次切开皮肤、皮下筋膜, 以骨刀剥离双侧椎旁骶棘肌, 露 L1-L6 椎弓根与横突交界处, 骨膜剥离显露骨标志。以 L4、L5 为目标椎体, 根据同系动物离体标本上所测得的进针点及进针角度, 采用 2.5 mm 克氏针制作成开路锥穿刺进入椎体 5~7 mm。探针探察针道四壁, 确保没有突破周围骨皮质后, 用刮匙经椎弓根于椎体内尽可能刮除松质骨, 将刮出的松质骨进行称重并记录。

2.3. 骨水泥填充兔腰椎骨缺损模型建立

将上述模型的 72 只兔随机分为注射新型组合物组, (实验组 $n = 24$)、注射 PMMA 组(PMMA 组, $n = 24$)和空白组对照组($n = 24$)。实验组和 PMMA 组接受填充物强化术。采用 12 号骨穿针插入椎体骨缺损处, 以无菌方式制备包括 PMMA 和组合物(PMMA: 同种异体骨 1:1)的骨水泥。使用 5 ml 注射器提取混合物, 通过套管针注射到每只动物骨缺损椎体内。记录注射填充物的数量。术中兔子平稳, 无死亡, 充分止血并冲洗伤口后, 逐层缝合。术前 2 h 及术后三天内均给予头孢唑啉钠抗感染(0.1 mg/kg/day)。

2.4. 影像学及生物力学检测

术后 4、8、12 周时每组分别处死 4 只白兔, 整体取出 L4、L5 椎体, 剔除附着的软组织及后部结构, 分别行 micro-CT 扫描。然后每组 24 个椎体标本用牙托粉固定置于力学实验仪平行金属板上。采用单椎体垂直恒速加载, 预加载 100 N, 以消除标本松弛或蠕变的影响, 加载速度 5 mm/min, 以 100 Hz 的频率记录载荷、位移数据。分别加载至椎体出现骨折停止。根据测试仪器所记录的不同时间点的载荷、位移值, 使用 Graphpad prism 7 软件绘制各组的载荷 - 位移曲线, 根据曲线上出现的拐点及曲线的斜率得出各组标本的失效强度及刚度。整个过程保持室温恒定并使用注射器向椎体上喷洒生理盐水以保持椎体湿润。

2.5. 组织形态学观察

分别于术后 4、8、12 周每组随机处死 4 只兔子。取 L4、L5 椎体, 去除附着软组织, 将标本用 10% 中性甲醛固定, 梯度酒精脱水、常规脱钙后石蜡包埋, 沿缺损方向切片, 改良丽春红染色, 光镜下观察, 用 Image-PRO PLUS 6. 0 图像分析软件测量新生成骨面积和骨缺面积, 新骨生成率(NB) = 新生成骨的面积/骨缺陷面积 $\times 100\%$ [10]。在同一张片上随机选择 6 个视野按上述公式计算取得 6 个 NB 样本值。每个视野由 3 人分别观察计算后取均值。

2.6. 统计学处理

测定指标采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示, 所有数据的统计分析均采用美国 SPSS 23 软件进行分析。两组之间数据比较采用 SNK 检验, 多组之间的数据比较采用单因素方差分析。选用 $P < 0.05$ 为统计学显著性界值。

3. 结果

3.1. 一般情况

72 只兔子均成功建立 L4、L5 椎体骨缺损模型, 3 组刮除椎体松质骨重量无明显差异($P > 0.05$)。实验组与 PMMA 组注射到椎体内填充物体积无明显差异($P > 0.05$), 两填充物可注射时间无明显差异($P > 0.05$)

(表 1)。两组行椎体强化术的兔子没有观察到并发症,例如由于水泥渗出而麻痹。手术后,兔子没有表现出身体状况或日常活动的任何异常变化。

Table 1. Weight of cancellous bone, volume of cement and injectable time of vertebral body scraping in each group
表 1. 各组椎体刮除松质骨重量、骨水泥体积及可注射时间

组别	刮除松质骨重量(g)	填充物体积(ml)	填充物可注射时间(min)
空白组	1.64 ± 1.57	-	-
实验组	1.56 ± 1.64	1.34 ± 1.57	7.34 ± 1.51
PMMA 组	1.61 ± 1.51	1.38 ± 1.21	7.64 ± 1.57

3.2. 影像学情况

术后 4、8、12 周时各组的 micro-CT 扫描结果。术后 4 周时,实验组填充材料密度高于正常骨,在缺损处分布良好,与骨组织连接紧密,无缝隙;PMMA 组填充材料呈高密度充满整个缺损,材料与骨的界限明显,未见明显降解吸收征象,部分椎体填充物与骨的界面间可见有缝隙;空白对照组缺损密度低,边缘整齐,无新骨生成,部分椎体上下终板间出现骨折线。术后 8 周时,实验组填充物的密度无明显改变,与骨的边界变模糊,有少量骨痂在填充物周围形成,未见椎体骨折;PMMA 组材料密度无改变,但材料周围骨质密度较前降低,部分骨质有吸收表现,原来材料与骨质之间的缝隙增大;空白对照组缺损修复不明显,边缘稍钝化,原来骨折线变模糊。术后 12 周时,实验组材料密度较前低,与骨的边界更模糊,材料周围更多骨痂生长,部分向材料内蔓延;对照组材料密度无改变,但材料周围骨质密度较前增高,骨质吸收表现无进一步加重,原来材料与骨质之间的缝隙变模糊;空白对照组缺损依然较大,呈低密度影,缺损边缘有少量新骨生成,骨折线消失。

3.3. 生物力学测试结果

为了更好地评估实验组材料在体内的机械性能,每个样品在不同时间点的力学性能如表 2 所示。从 4 w 到 12 w,实验组和空白对照组的最大抗压强度值均逐渐增加,实验组各时间点最大抗压强度均高于空白对照组($P < 0.01$)。PMMA 对照组术后 8 W 时最大抗压强度有下降,术后 12 w 时恢复正常,与实验组无明显差异($P > 0.05$)。椎体刚度:从 4 w 到 12 w,空白对照组 $<$ 实验组 $<$ PMMA 组($P < 0.01$)。

Table 2. Mechanical properties of vertebral bodies in each group at different time points
表 2. 各组椎体在不同时间点的力学性能

组名	样本数	失效强度(N)			刚度(N/mm)		
		术后 4 w	术后 8 w	术后 12 w	术后 4 w	术后 8 w	术后 12 w
空白组	24	1050.64 ± 133.57	1350.64 ± 133.57	1479.54 ± 140.77	607.60 ± 38.22	647.60 ± 38.22	653.8 ± 19.11
实验组	24	1569.24 ± 113.77	1679.24 ± 110.77	1873.10 ± 179.44	765.08 ± 65.51	790.08 ± 65.51	800.32 ± 62.04
PMMA 组	24	1882.96 ± 100.29	1782.96 ± 100.29	1884.44 ± 130.43	915.4 ± 48.08	835.4 ± 48.08	890.02 ± 50.43

3.4. 组织学观察

1) 空白对照组:4 周时椎体缺损处由纤维结缔组织填充,可见成纤维细胞,无骨小梁结构,缺损区与正常骨小梁交界区可见散在的成骨细胞和破骨细胞。8 周时椎体缺损处仍由纤维结缔组织填充,缺损

边缘有少量幼稚骨小梁形成。12 周时, 椎体缺损内仍为纤维结缔组织, 成纤维细胞聚集成块, 缺损边缘骨小梁结构增多, 可见散在的成骨细胞及破骨细胞; 2) 实验组: 4 周时缺损区周围结构散乱, 可见大量成骨细胞和破骨细胞, 散在有吞噬细胞。8 周时缺损区骨小梁出现, 周围有仍可见大量成骨细胞和破骨细胞减少, 可见部分幼稚骨小梁成形。12 周缺损区可见大量成骨细胞和破骨细胞, 紧靠破骨细胞附近有梭形核肥大细胞和血管内皮细胞, 成骨细胞分泌淡红色类骨质, 有散在骨小梁出现, 内有少量成骨细胞, 周围可见多数破骨细胞; 3) PMMA 骨水泥组: 4 周时填充区可见散乱的均质淡红染的结构, 内无细胞存在, 周围可见大量炎细胞。骨小梁界面结构不完整, 8 周时骨水泥周围仍有大量炎细胞及坏死组织, 少量破骨细胞, 12 周时缺损区仍可见均质淡红染结构, 内无细胞存在, 骨水泥骨小梁界面与 4 周时表现相似。各组新骨生长情况如表 3 所示。

Table 3. New bone formation rate at different time points after operation in each group ($n = 24$, $\bar{x} \pm s$, %)

表 3. 各组术后不同时间点的新骨生成率($n = 24$, $\bar{x} \pm s$, %)

	术后 4 w	术后 8 w	术后 12 w
空白组	7.64 ± 1.57	8.61 ± 1.50	10.54 ± 1.77
实验组	12.24 ± 3.77	16.24 ± 2.77	20.10 ± 5.44
PMMA 组	2.96 ± 0.69	1.90 ± 0.50	4.44 ± 1.43

4. 讨论

迄今为止, PMMA 仍是椎骨强化术中最流行的填充材料: 低粘度, 易于灌注, 快速增强和硬化椎体的能力以及相对便宜的价格[11]。但是, 它也有一些局限性, 单体毒性, 高放热反应温度和过高的刚度[12]。本研究利用同种异体骨对 PMMA 骨水泥进行改性, 我们首次展示了新型组合在填充骨缺损椎骨和增加椎体内新骨小梁向内生长方面在椎体强化术方面的可行性和有效性。组合由 50% 市售 PMMA 骨水泥和 50% 的兔同种异体骨粉组成。

本研究通过新西兰白兔椎体骨缺损模型, 三组兔椎体刮除松质骨重量比较无明显差异, 实验组和 PMMA 组注射填充物体积无明显差异, 提示模型具有可比性。

传统 PMMA 骨水泥在聚合过程中的热效应和聚合后 MMA 单体的毒性可能导致骨水泥周围的骨坏死[13] [14]。本研究通过 microCT 观察 PMMA 组术后 8 周出现填充物周围部分骨质有吸收表现, 填充物与骨质之间的缝隙增大。力学实验同时发现 PMMA 组术后 8 W 时最大抗压强度有下降, 术后 12 w 时恢复正常。组织学观察 PMMA 术后 8 周时骨水泥周围仍有大量炎细胞及坏死组织, 与 Medeiros 等证实 PMMA 植入后的椎体骨组织切片水泥骨界面坏死, 并持续一定时间结果相符[15]。PMMA 植入引起的骨坏死导致椎体内骨骼的破坏和骨骼强度的下降, 最终导致再次骨折的发生。

近年来, 冻干处理后的同种异体骨去除了成脂成分和杂质蛋白, 细胞成分死亡, 破坏了异体骨各种细胞表面的抗原结构, 降低了材料的抗原性, 无机成分与人骨的天然成分相似, 具有良好的组织相容性[16] [17]。同种异体骨组织天然的网格结构未受到明显的破坏, 仍然留有原有的骨小梁及小梁间隙, 骨组织支架的三维结构依然存在, 有利于组织工程种子细胞的黏附和生长, 并为细胞外基质的分泌提供了空间。Hautamäki M [18]在 2010 年报告说, 表面多孔纤维增强的 PMMA 具有生物相容性并具有成骨性。

与纯 PMMA 相比, PMMA + 同种异体骨具有更好的处理性能和足够的刚度。在我们的研究中, 实验组通过 microCT 观察填充物与骨组织连接紧密, 无缝隙, 术后 4 周到 12 周, 填充物周围均未发现明显组织坏死, 而且骨小梁随着时间逐渐增多。生物力学结果表明, 实验组可以为腰椎提供足够的强度,

并且机械性能会随着骨骼的向内生长而增加。组织学分析表明, 实验组具有成骨能力并能够与骨表面连接。总之, 这些发现表明新型的可注射组合物具有良好的成骨能力, 足够的生物力学强度。通过进一步的验证, 新型组合物有望成为一种有价值的填充生物材料, 用于诱导成骨, 增强骨质疏松性椎骨和在椎体成形术中使用的可用骨水泥。

基金项目

东莞市社会科技发展重点项目(2018507150241633)。

参考文献

- [1] Song, W., Seta, J., Eichler, M.K., *et al.* (2018) Comparison of *in Vitro* Biocompatibility of Silicone and Polymethylmethacrylate during the Curing Phase of Polymerization. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **106**, 2693-2699. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34086>
- [2] Arora, M., Chan, E.K., Gupta, S., *et al.* (2013) Polymethylmethacrylate Bone Cements and Additives: A Review of the Literature. *World Journal of Orthopedics*, **4**, 67-74. <https://doi.org/10.5312/wjo.v4.i2.67>
- [3] Ridwan-Pramana, A., Idema, S., Te Slaa, S., *et al.* (2019) Polymethylmethacrylate in Patient-Specific Implants: Description of a New Three-Dimension Technique. *The Journal of Craniofacial Surgery*, **30**, 408-411. <https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000005148>
- [4] Wang, B., Lin, Q., Shen, C., *et al.* (2014) Hydrophobic Modification of Polymethylmethacrylate as Intraocular Lenses Material to Improve the Cytocompatibility. *Journal of Colloid and Interface Science*, **431**, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.05.056>
- [5] Le Ferrec, M., Mellier, C., Boukhechba, F., *et al.* (2018) Design and Properties of a Novel Radiopaque Injectable Apatitic Calcium Phosphate Cement, Suitable for Image-Guided Implantation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **106**, 2786-2795. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34059>
- [6] Meng, H.S., Chen, C., Yan, Z.R., *et al.* (2019) Co-Doping Polymethylmethacrylate and Copper Tailings to Improve the Performances of Sludge-Derived Particle Electrode. *Water Research*, **165**, Article ID: 115016. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115016>
- [7] Darwish, G., Huang, S., Knoernschild, K., *et al.* (2019) Improving Polymethylmethacrylate Resin Using a Novel Titanium Dioxide Coating. *Journal of Prosthodontics: Official Journal of the American College of Prosthodontists*, **28**, 1011-1017. <https://doi.org/10.1111/jopr.13032>
- [8] Wang, Z.K., Li, Z.X., Zhang, X.S., *et al.* (2021) A Bone Substitute Composed of Polymethyl-Methacrylate Bone Cement and Bio-Gene Allogeneic Bone Promotes Osteoblast Viability, Adhesion and Differentiation. *Bio-Medical Materials and Engineering*, **32**, 29-37. <https://doi.org/10.3233/BME-201139>
- [9] 胡蕴玉. 骨库的建立与管理[J]. 中华骨科杂志, 1995, 15(1): 54-56.
- [10] Liu, J.H., Mao, K.Z., Liu, Z.S., *et al.* (2013) Injectable Biocomposites for Bone Healing in Rabbit Femoral Condyle Defects. *PLoS ONE*, **8**, e75668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075668>
- [11] Chen, L.H., Lai, P.L. and Chen, W.J. (2011) Current Status of Vertebroplasty for Osteoporotic Compression Fracture. *Chang Gung Medical Journal*, **34**, 352-359.
- [12] Boger, A., Bisig, A., Bohner, M., *et al.* (2008) Variation of the Mechanical Properties of PMMA to Suit Osteoporotic Cancellous Bone. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **19**, 1125-1142. <https://doi.org/10.1163/156856208785540154>
- [13] Heo, D.H., Chin, D.K., Yoon, Y.S., *et al.* (2009) Recollapse of Previous Vertebral Compression Fracture after Percutaneous Vertebroplasty. *Osteoporosis International*, **20**, 473-480. <https://doi.org/10.1007/s00198-008-0682-3>
- [14] Urrutia, J., Mery, P. and Rojas, C. (2008) Early Histologic Changes Following Polymethylmethacrylate Injection (Vertebroplasty) in Rabbit Lumbar Vertebrae. *Spine*, **8**, 877-882. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31816b46a5>
- [15] Medeiros, C.C., Borghetti, R.L., Nicoletti, N., *et al.* (2014) Polymethylmethacrylate Dermal Fillers: Evaluation of the Systemic Toxicity in Rats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **43**, 62-67. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2013.06.009>
- [16] 李明东, 裴国献, 奚延斐, 等. 冻干同种异体骨粉与人淋巴细胞共培养时对细胞的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(8): 1517-1520.
- [17] 李明东, 奚延斐, 金丹, 等. 冻干同种异体骨的免疫原性评价及免疫实验动物模型的选择[J]. 中华创伤骨科杂志,

2009, 11(7): 671-674.

- [18] Hautamaki, M., Meretoja, V.V., Mattila, R.H., Aho, A.J. and Vallittu, P.K. (2010) Osteoblast Response to Polymethylmethacrylate Bioactive Glass Composite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **21**, 1685-1692. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4018-4>