

利塞膦酸盐对磷硅酸钙理化及生物性能的影响

巩天星, 米昊炀, 陈亚东, 张静淑
(东北大学 中荷生物医学与信息工程学院, 辽宁 沈阳 110619)

摘 要: 将利塞膦酸盐(0.5%和1.0%)与含有磷硅酸钙的骨水泥粉末混合后进行水化反应,测定骨水泥固化时间及抗压强度,并分析其载药前后的微观结构变化.通过细胞毒性与基因表达水平检测分析了骨水泥的生物性能.结果表明:在0.5%药物水平下,骨水泥促进成骨细胞增殖与分化效果最佳.药物可延缓骨水泥固化,但骨水泥的气孔率会随之降低且晶体结构会更加紧密.载有利塞膦酸的磷硅酸钙骨水泥具有与松质骨相似的力学强度及良好的生物相容性,作为骨组织修复材料具有很好的应用价值.

关 键 词: 磷硅酸钙;利塞膦酸盐;骨质疏松;骨水泥;骨组织修复

中图分类号: TH 145.1⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-3026(2018)10-1516-05

Effect of Risedronate on Physicochemical and Biological Properties of Calcium Phosphate Silicate

GONG Tian-xing, MI Hao-yang, CHEN Ya-dong, ZHANG Jing-shu
(School of Sino-Dutch Biomedical & Information Engineering, Northeastern University, Shenyang 110169, China.
Corresponding author: GONG Tian-xing, E-mail: gongtx@bmie.neu.edu.cn)

Abstract: Risedronate (0.5% and 1.0%) was mixed with bone cement powder containing calcium phosphate silicate for hydration reaction. The curing time and compressive strength of bone cement were measured and the microstructural changes before and after drug loading were analyzed. The biological properties of bone cement were analyzed by detection of cytotoxicity and gene expression levels. The results showed that the best proliferation and differentiation of osteoblasts were obtained at 0.5% drug level. The drug can delay the curing of bone cement, but the porosity of bone cement decrease and the crystal structure become tighter. The calcium phosphate silicate cement containing risedronate acid has good biocompatibility and the mechanical strength similar to cancellous bone, which is prosperous in the application of a bone tissue repair material.

Key words: calcium phosphate silicate; risedronate; osteoporosis; bone cement; bone tissue repair

伴随人口加速老龄化,骨质疏松已经成为不可忽视的健康问题.在中国,约70%~80%的中老年继发性骨折与骨质疏松有直接关系.目前,中国中老年人中约有5000万人患有骨质疏松症,且每年有接近30万的新增患者^[1].骨质疏松是由多种病因引起的代谢性骨结构病变;在合并骨质疏松性骨折治疗中,可以通过植入具有生物活性的骨水泥填充骨缺损部位,达到促进骨愈合及恢复日常活动的目的.然而,这种骨修复方法并没有直接祛除骨质疏松病灶;同时,最新的研究表明骨质疏松严重影响骨长入与重建的速率,增加再发骨折的几率.双膦酸盐类药物已被广泛应用在骨质疏松类疾病的治疗中.研究表明,载有双膦酸盐类药物的磷酸钙骨水泥通过体内降解缓释药物,在骨质疏松条件下促进骨重建并提高植入体的生物稳定性^[2].前期研究通过硅酸钙骨水泥搭载利塞膦酸盐(第三代双膦酸盐)发现利塞膦酸盐延长骨水泥的固化时间,但对其机械强度没有明显影

响^[3]. 最新研究成果表明磷硅酸钙骨水泥具有较高的机械强度及生物相容性,作为新一代骨缺损填充材料具有很好的应用价值^[4].

本文设计一种复合利塞膦酸(RA)的磷硅酸钙骨水泥(CPSC)药物缓释系统,通过研究 RA 对 CPSC 材料理化性能及生物相容性的影响,阐明这种新型复合双膦酸盐类药物的生物陶瓷骨水泥具有促进修复合并骨质疏松性骨折的作用.

1 材料与方法

1.1 利塞膦酸对磷硅酸钙骨水泥理化性能的影响

将含有硅酸二钙与硅酸三钙(质量比为 1:1)的硅酸钙粉末与磷酸二氢钙(质量比为 9:1)均匀研磨混合并添加质量分数 0.5% 和 1% 的 RA 制备复合 RA - CPSC 骨水泥,并依次命名为 CPSC (不含 RA),CPSC05R (0.5% RA) 及 CPSC10R (1.0% RA). 将骨水泥与水按 2:1 的比例混合研磨后,将骨水泥膏体注入 17 mm × 2 mm (直径 × 高度)及 6 mm × 12 mm 的模具中用于测定载药骨水泥的固化时间及固化后(37 d)的抗压强度.

1.2 利塞膦酸对磷硅酸钙骨水泥微观结构的影响

将固化后的骨水泥样本研磨粉碎后,通过 X 射线衍射仪定性分析固体中晶体相的组成并结合 Rietveld 数字拟合的方法定量测算各晶体相的相对含量. 在定性分析中,X 射线以每分钟 2°的速度在 10° ~ 60°的范围内连续扫描,每个实验样本重复 4 次;在定量分析中,将样本研磨成直径小于 10 μm 的颗粒,以递进式的方式在 10° ~ 120°内扫描并利用荷兰 PANalytical 公司 HighScore Plus 软件进行全谱拟合. 将固化后的骨水泥样本通过瑞士 SCANCO Medical 公司的 Micro - CT 进行断层扫描(层厚 5 μm)并利用日本日立公司 Hitachi S - 3000N 型电子扫描电镜(SEM)观察骨水泥样本的微观结构,从而评价 RA 对 CPSC 微观结构的影响.

表 1 CPSC, CPSC05R 和 CPSC10R 的固化时间及抗压强度

样品名称	固化时间 min	抗压强度/MPa	
		3 d	7 d
CPSC	108.00 ± 2.45	14.41 ± 2.92	13.42 ± 3.45
CPSC05R	110.50 ± 9.57	13.79 ± 1.35	13.02 ± 1.42
CPSC10R	155.00 ± 4.40	6.87 ± 1.33	12.02 ± 4.16

1.3 成骨细胞体外培养及骨水泥浸出液培养基的制备

使用酶消化过程从 SD 大鼠胎鼠(< 2 d)颅骨中分离成骨细胞. 首先,将大鼠颅骨碎屑在磷酸盐缓冲液(PBS, pH = 7.4)中清洗次,在 0.25% 胰蛋白酶 - EDTA 溶液中处理 20 min 祛除成纤维细胞污染并使用 1 mg/mL 胶原蛋白酶溶液处理 90 min 从而释放成骨细胞. 在本研究中,使用成骨细胞均为传代后 2 ~ 4 代细胞.

将固化 1 d 后的骨水泥样本浸泡在 10 mL 的 PBS 中 3 d 并将浸出液通过 0.22 μm 滤膜过滤灭菌;按体积比 1:9 与 DMEM 培养基混合并添加 10% 的胎牛血清,制备骨水泥浸出液培养基.

1.4 复合利塞膦酸的磷硅酸钙骨水泥生物相容性

将骨水泥浸出液培养基添加在 96 孔板中(200 μL/孔)并在每孔种植 5 × 10³ 个成骨细胞,在 37 °C,5% CO₂ 培养箱中孵育 3 d 后,利用 MTT 比色法测定成骨细胞的存活率. 在本研究中,通过美国 Bio - Rad 公司 CFX96 型 real - time PCR 仪检测 4 种与成骨细胞增殖、分化相关基因(ALPOPGrunx2 与 TGF - β)的表达情况;同时,利用美国 BD 公司的 FACS Canto II 型流式细胞分析仪分析载药骨水泥对成骨细胞周期及凋亡的影响.

1.5 统计分析

利用 IBM[®] SPSS[®] Statistical software v. 19.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) 统计数据分析所有数据结果以平均值 ± 标准差的形式给出. 单向方差分析(ANOVA)用来比较各组数据之间的统计学差异($p < 0.05$).

2 结果与讨论

2.1 复合利塞膦酸的磷硅酸钙骨水泥理化性能

研究发现 RA 对 CPSC 的理化性能有很大影响(表 1). 在固化 3 d 后的骨水泥样本中,可以发现 1.0% 的 RA 显著降低了 CPSC 的固化速率及机械强度;在 CPSC 和 CPSC05R 样本中,固化 3 d 后的抗压强度与固化 7 d 后的抗压强度类似,均为 12 ~ 17 MPa;然而,在 CPSC10R 样本中,固化 7 d 后的抗压强度显著升高. 上述数据表明 RA 对于 CPSC 的固化过程具有延缓作用但不会导致 CPSC 终止固化^[5]. 在 CPSC 固化过程中,CPSC 中的硅酸钙与水反应形成硅酸钙水凝胶,而 RA 附着在已经形成水凝胶颗粒的表面阻碍水化反应

进一步进行^[3]. 因此,在高浓度 RA 样本中,固化 3 d 后的 CPSC10R 骨水泥的水化反应被明显阻碍,导致机械强度低于其他两种材料;但是,在固化 7 d 后的 CPSC10R 样本中,水化反应缓慢进行,机械强度逐渐增加. 因此其抗压强度与两种材料在固化 7 d 后的抗压强度类似. 虽然 RA 影响 CPSC 的机械强度,但整体材料的抗压强度仍优于松质骨^[6]. 晶相分析(表 2)的结果验证了 RA

延缓 CPSC 骨水泥固化过程的假设. 在 CPSC 固化过程中,硅酸钙与水反应生成硅酸钙水凝胶及氢氧化钙,而氢氧化钙可以与磷酸二氢钙进一步反应生成磷灰石与水. 在 3 种材料中,硅酸钙水凝胶及磷灰石的含量随着 RA 含量的增高而降低,而非晶态含量变化的趋势正好相反;这表明 RA 通过附着在已形成水凝胶的表面,形成一种保护层,从而阻碍水化反应的进一步进行^[5].

表 2 CPSC,CPSC05R 和 CPSC10R 固化 7 d 后各晶相的相对比例

Table 2 Relative proportion of crystalline phases in CPSC, CPSC05R and CPSC10R after 7 day' hydration %					
样品名称	氢氧化钙	硅酸二钙	磷灰石	硅酸钙水凝胶	非晶相
CPSC	6.63 ±0.33	24.00 ±1.20	22.50 ±1.22	26.38 ±1.32	20.50 ±1.03
CPSC05R	6.50 ±0.33	23.00 ±1.15	20.00 ±1.00	17.88 ±0.89	32.63 ±1.63
CPSC10R	1.58 ±0.08	10.63 ±0.53	7.26 ±0.36	15.58 ±0.78	65.05 ±3.25

Micro-CT 与 SEM 的结果证明 RA 影响 CPSC 固化后的微观结构. 7 d 固化后,CPSC, CPSC05R, CPSC10R 的 SEM 如图 1 所示,可知 CPSC 的孔隙率与 CPSC05R 及 CPSC10R 相比较大,但是 RA 的含量对孔隙率并没有显著影响. 这可能因为 Micro-CT 的分辨率为 5 μm,由于 RA 对 CPSC 水化过程的影响导致非晶态含量增加,从而使微孔数量增加,不利于 Micro-CT 的检测^[7]. 骨水泥固化后产生的气孔与磷酸二氢钙和氢氧化钙所生成的水含量有直接联系. 由于 RA

附着在已形成水凝胶的表面,阻碍内部的氢氧化钙接触外部的磷酸二氢钙,从而减少水含量及由水蒸发导致的气孔数量^[5]. 如图 2 所示,随着 RA 的增加,晶体尺寸越小晶体的显微结构更加紧密. RA 阻碍了硅酸钙水凝胶的生长并产生更多的非晶相;这些小晶体与非晶相可以填充在较大的空隙中,导致 Micro-CT 无法分辨直径 5 μm 以下的气孔,从而造成 CPSC05R 与 CPSC10R 孔隙率没有明显差异性^[8].

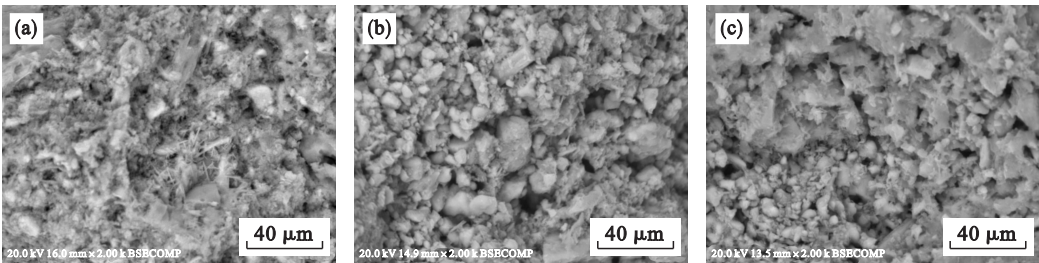


图 1 7 d 固化后 CPSC,CPSC05R 及 CPSC10R 的 SEM

Fig. 1 SEM of CPSC, CPSC05R and CPSC10R after 7 day' hydration

(a)—CPSC; (b)—CPSC05R; (c)—CPSC10R.

2.2 复合利塞膦酸的磷硅酸钙骨水泥生物相容性

在 CPSC,CPSC05R 和 CPSC10R 样本培养下成骨细胞的相对存活率如图 3 所示,载有 RA 的 CPSC 骨水泥样本对成骨细胞未表现任何细胞毒性;同时,在 CPSC05R 浸出液培养基中培养的成骨细胞具有最高的存活率,表明适量的 RA 可以促进成骨细胞的增殖与分化.

为验证上述假设,通过流式细胞仪,进一步比较在 CPSC,CPSC05R 及 CPSC10R 浸出液培养基

中成骨细胞周期的变化. CPSC, CPSC05R 及 CPSC10R 样本对细胞周期的影响如图 4 所示,可知与 CPSC05R 共同培养的成骨细胞含有最高的 DNA,证明 RA 具有促进成骨细胞增殖与分化的作用^[9].

为了进一步研究载有 RA 的 CPSC 促进成骨细胞的增殖与分化的作用机理,4 种与成骨相关的基因在 3 种培养基培养的细胞中的表达情况通过 real-time PCR 仪进行检测.

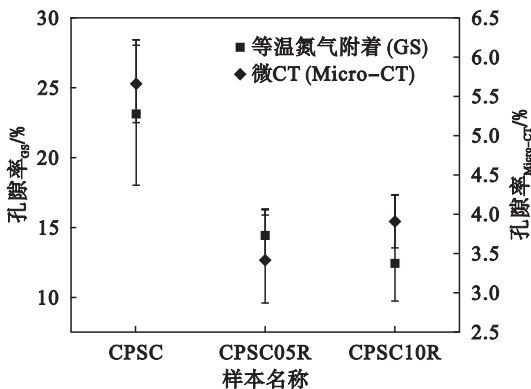


图2 CPSC,CPSC05R 和 CPSC10R 的孔隙率
Fig.2 Porosity of CPSC, CPSC05R and CPSC10R

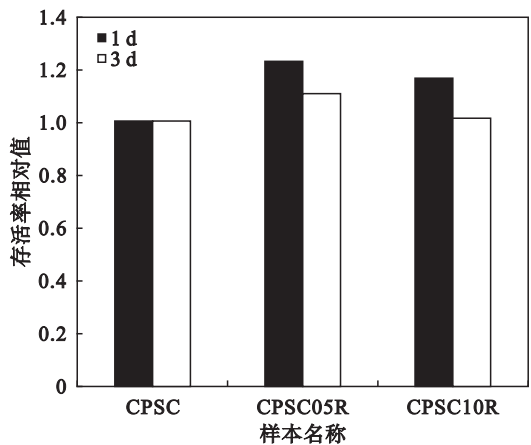


图3 CPSC,CPSC05R 和 CPSC10R 样本培养下成骨细胞的相对存活率
Fig.3 Relative survival rate of osteoblast under CPSC, CPSC05R and CPSC10R

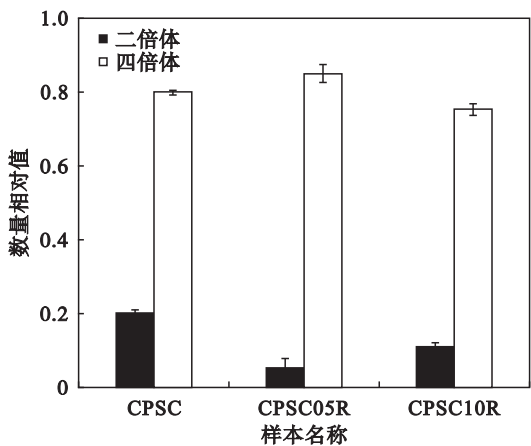


图4 CPSC,CPSC05R 和 CPSC10R 样本对细胞周期的影响
Fig.4 Effect of CPSC, CPSC05R and CPSC10R on cell cycle

CPSC,CPSC05R 和 CPSC10R 对基因表达水平的影响如图 5 所示,ALP,OPG 及 runx2 这 3 种基因的表达水平在 CPSC05R 培养基培养的成骨细胞中最高;TGF- β 基因的表达水平随着 RA 含量的增高而降低. runx2 基因在成骨细胞分化

中扮演着重要的角色,而 RA 对 runx2 基因的调控与 RA 的浓度相关^[10];转录因子 runx2 通过调节 ALP 与 OPG 基因的表达,促进成骨细胞的增殖与分化^[11]. 因此上述三种基因的表达情况与成骨细胞存活率完全一致,证明在 0.5% RA 水平下,CPSC 促进成骨细胞增殖与分化的功能最佳. 另一方面,TGF- β 基因的表达情况与 SiO_4^{4-} 离子浓度正相关,而 RA 结合硅酸钙水凝胶后阻碍 SiO_4^{4-} 离子的释放,因此 TGF- β 基因的表达情况随着 RA 浓度的增高而降低^[12].

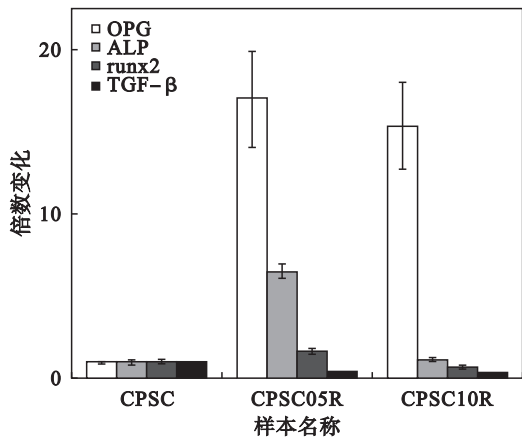


图5 CPSC,CPSC05R 和 CPSC10R 对基因表达水平的影响
Fig.5 Effect of CPSC, CPSC05R and CPSC10R on gene expression level

3 结 论

利塞膦酸对磷硅酸钙骨水泥的固化时间和机械强度均有影响,但在较低的利塞膦酸情况下,磷硅酸钙骨水泥的理化性能改变并不显著. 实验证明利塞膦酸可以改变磷硅酸钙的晶体结构,降低固化后骨水泥的气孔率及气孔直径. 体外实验揭示载有利塞膦酸的磷硅酸钙骨水泥具有很强的生物相容性;低水平的利塞膦酸可以促进成骨细胞的增殖与分化,提高复合骨水泥的生物活性. 复合利塞膦酸的磷硅酸钙骨水泥具有促进修复合并骨质疏松性骨折的作用,作为骨组织修复材料具有很好的应用价值.

参考文献:

[1] Qu J, Yan R, Wang L, et al. Free dermatoplasty combined with vacuum sealing drainage for the treatment of large-area soft tissue defects accompanied by bone exposure in the lower leg [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2013, 5 (5):1375 - 1380.

[2] Taxel P, Ortiz D, Shafer D, et al. The relationship between implant stability and bone health markers in post-menopausal

- women with bisphosphonate exposure [J]. *Clinical Oral Investigations*, 2014, 18(1): 49–57.
- [3] Gong T, Wang Z, Zhang Y, et al. Preparation, characterization, release kinetics, and in vitro cytotoxicity of calcium silicate cement as a risedronate delivery system[J]. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 2014, 102(7): 2295–2304.
- [4] Fujikawa K, Sugawara A, Murai S, et al. Bone regeneration in critical-sized bone defect enhanced by introducing osteoinductivity to biphasic calcium phosphate granules[J]. *Clinical Oral Implants Research*, 2016, 28(3): 251–260.
- [5] Gong T, Chen Y, Zhang Y, et al. Osteogenic and anti-osteoporotic effects of risedronate-added calcium phosphate silicate cement [J]. *Biomedical Materials*, 2016, 11(4): 045002.
- [6] Barralet J E, Gaunt T, Wright A J, et al. Effect of porosity reduction by compaction on compressive strength and microstructure of calcium phosphate cement[J]. *Journal of Biomaterials Research*, 2002, 63(1): 1–9.
- [7] LeGeros R. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphate[J]. *Bioactive Materials in Orthopaedic Surgery*, 2002, 395: 81–98.
- [8] Gong T, Wang Z, Zhang Y, et al. A comprehensive study of osteogenic calcium phosphate silicate cement: material characterization and in vitro/in vivo testing [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2016, 5: 457–466.
- [9] 张玉彪, 柳云恩, 施琳, 等. 含利塞膦酸的磷硅酸钙水门汀对成骨细胞增殖和功能的影响[J]. *成都医学院学报*, 2013, 8(3): 226–229.
(Zhang Yu-biao, Liu Yun-en, Shi Lin, et al. The effect of phosphorus-containing cements risedronate acid extracts on the osteoblast proliferation and function [J]. *Journal of Chengdu Medical College*, 2013, 8(3): 226–229.)
- [10] Rasmussen H, Bordier P, Marie P, et al. Effect of combined therapy with phosphate and calcitonin on bone volume in osteoporosis [J]. *Metabolic Bone Disease and Related Research*, 1980, 2(2): 107–111.
- [11] Koch F P. Zoledronate, ibandronate and clodronate enhance osteoblast differentiation in dose dependent manner—a quantitative in vitro gene expression analysis of Dlx5, Runx2, OCN, MSX1 and MSX2 [J]. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2011, 39(8): 562–569.
- [12] Elisseeff J, McIntosh W, Fu K, et al. Controlled-release of IGF-I and TGF- β 1 in a photopolymerizing hydrogel for cartilage tissue engineering [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2001, 19(6): 1098–1104.

(上接第 1510 页)

- [3] Maghyreh A I, Awartani B. Financial integration of GCC banking markets: a non-parametric Bootstrap DEA estimation approach[J]. *Research in International Business & Finance*, 2012, 26(2): 181–195.
- [4] Wanke P, Barros C P, Emrouznejad A. Assessing productive efficiency of banks using integrated fuzzy-DEA and Bootstrapping: a case of Mozambican banks [J]. *European Journal of Operational Research*, 2016, 249(1): 378–389.
- [5] Simar L, Wilson P W. Estimation and inference in two-stage, semi-parametric models of production processes[J]. *Journal of Econometrics*, 2007, 136(1): 31–64.
- [6] Stewart C, Matousek R, Nguyen T N. Efficiency in the Vietnamese banking system: a DEA double Bootstrap approach [J]. *Research in International Business and Finance*, 2016, 36(1): 96–111.
- [7] Wijesiri M, Viganò L, Meoli M. Efficiency of microfinance institutions in Sri Lanka: a two-stage double Bootstrap DEA approach[J]. *Economic Modeling*, 2015, 47(1): 74–83.
- [8] 李平, 曾勇, 朱晓林. 中国银行业改革对中外资银行效率变化的影响[J]. *管理科学学报*, 2013, 16(8): 47–53.
(Li Ping, Zeng Yong, Zhu Xiao-lin. Impact of the reform of China's banking sector on the changes in efficiency of Chinese banks [J]. *Journal of Management Sciences in China*, 2013, 16(8): 47–53.)
- [9] 黄志鸿. 中国商业银行前沿效率研究——基于 Bootstrap 修正的 DEA 模型[J]. *时代金融*, 2013, 20(5): 160–162.
(Huang Zhi-hong. Research on frontier efficiency of China's commercial banks based on modified Bootstrapped-DEA model[J]. *Times Finance*, 2013, 20(5): 160–162.)
- [10] Charnes A, Cooper W W, Rhodes E. Measuring the efficiency of decision making units [J]. *European Journal of Operational Research*, 1978, 2(6): 429–444.
- [11] Banker R D, Charnes A, Cooper W W. Some models for estimating technical and scale inefficiencies in data envelopment analysis [J]. *Management Science*, 1984, 30(9): 1078–1092.