

氧化锆改性磷酸镁骨水泥的生物力学性能体外初步测试

胡金凤¹ 郭卫春^{1△} 余铃¹ 孙虹¹ 陈敬腾¹

[摘要] 目的:对氧化锆(ZrO_2)改性磷酸镁骨水泥(MPC)进行初步的生物力学性能评估。方法:将质量分数分别为 0%,5%,10%,15%及 20%五个梯度的 ZrO_2 与 MPC 混合(MPC,Z5MPC,Z10MPC,Z15MPC 及 Z20MPC)后,按固液比 3 g/mL 的比例与去离子水调和制成氧化锆-可注射骨水泥(ZMPC),分别对 ZMPC 的固化时间、抗压强度、细胞毒性、碱性磷酸酶活性、生物降解性能进行检测。结果:MPC,Z5MPC,Z10MPC,Z15MPC 及 Z20MPC 的固化时间分别为 (9.10 ± 1.12) , (9.62 ± 0.78) , (10.40 ± 1.16) , (10.83 ± 1.06) , (10.02 ± 1.16) min,Z15MPC 自固化时间相比 MPC 差异有统计学意义($P < 0.05$)。MPC,Z5MPC,Z10MPC,Z15MPC 及 Z20MPC 抗压强度分别为 (5.78 ± 0.39) , (6.27 ± 0.48) , (10.68 ± 1.82) , (23.98 ± 0.85) , (15.30 ± 0.84) MPa,Z10MPC,Z15MPC 及 Z20MPC 与 MPC 相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。MPC,Z5MPC,Z10MPC,Z15MPC 及 Z20MPC 相对增殖率(RGR)分别为 $(87.2 \pm 3.8)\%$, $(83.8 \pm 4.5)\%$, $(81.8 \pm 4.5)\%$, $(81.6 \pm 4.5)\%$ 及 $(81.8 \pm 5.6)\%$,均大于 80%,各组材料对成骨细胞 MC3T3-E1 细胞增殖影响差异无统计学意义($P > 0.05$),根据材料毒性评级标准均为 I 级。比色法测定 MPC,Z5MPC,Z10MPC,Z15MPC 及 Z20MPC 碱性磷酸酶(ALP)活性分别为 0.229 ± 0.025 , 0.269 ± 0.013 , 0.298 ± 0.024 , 0.378 ± 0.019 , 0.236 ± 0.038 ,Z5MPC,Z10MPC 及 Z15MPC 组较 MPC 组有较高的 ALP 活性,差异有统计学意义($P < 0.05$);Z20MPC 组与 MPC 对照组之间 ALP 表达差异不明显,差异无统计学意义($P > 0.05$)。质量丢失率显示 Z5MPC,Z10MPC,Z15MPC 以及 Z20MPC 的降解速度与 MPC 组类似,各组间降解率近似,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:随着 ZrO_2 的加入,ZMPC 的固化时间得以延缓,抗压强度也有所提高,各组材料也表现出良好的生物相容性及优良的生物降解性能,有望成为新型的骨组织修复材料。

[关键词] 磷酸镁骨水泥;氧化锆;改性;力学性能;生物相容性

[中图分类号] R318.01 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)11-0015-04

Preliminary Biomechanical Test of Zirconia Modified Magnesium Phosphate Cement

HU Jinfeng¹ GUO Weichun^{1△} YU Ling¹ SUN Hong¹ CHEN Jingteng¹

¹Department of Orthopedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China.

Abstract Objective: To do a preliminary biomechanical evaluation of zirconia modified magnesium phosphate cement. **Methods:** The zirconia-injectable bone cement(ZMPC) was prepared by mixing ZrO_2 with MPC according to the mass fraction of 0%,5%,10%,15%,20% of ZrO_2 (Named: MPC,Z5MPC,Z10MPC,Z15MPC,Z20MPC) at the solid to liquid ratio of 3 g/mL. Then the setting time,compressive strength,cytotoxicity,alkaline phosphatase activity and biodegradability were tested respectively. **Results:** The setting time of MPC,Z5MPC,Z10MPC,Z15MPC,Z20MPC were (9.10 ± 1.12) , (9.62 ± 0.78) , (10.40 ± 1.16) , (10.83 ± 1.06) , (10.02 ± 1.16) min,respectively. And the difference between Z15MPC and ZPC were statistically significant($P < 0.05$). The compressive strength of MPC,Z5MPC,Z10MPC,Z15MPC,Z20MPC were (5.78 ± 0.39) , (6.27 ± 0.48) , (10.68 ± 1.82) , (23.98 ± 0.85) , (15.30 ± 0.84) MPa,respectively. There were significant differences between Z10MPC,Z15MPC,Z20MPC and MPC($P < 0.01$). The relative proliferation rate of MPC,Z5MPC,

Z10MPC,Z15MPC,Z20MPC were $(87.2 \pm 3.8)\%$, $(83.8 \pm 4.5)\%$, $(81.8 \pm 4.5)\%$, $(81.6 \pm 4.5)\%$, $(81.8 \pm 5.6)\%$, respectively. There was no significant difference in the proliferation of osteoblasts MC3T3-E1 between the three groups($P > 0.05$).

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81502575)

¹ 武汉大学人民医院骨科(湖北 武汉,430060)

[△]通信作者 E-mail:15391531608@126.com

According to the material toxicity rating criteria, they were all grade I. The activity of alkaline phosphatase of MPC, Z5MPC, Z10MPC, Z15MPC, Z20MPC were 0.229 ± 0.025 , 0.269 ± 0.013 , 0.298 ± 0.024 , 0.378 ± 0.019 , 0.236 ± 0.038 , respectively. The ALP activity of Z5MPC, Z10MPC and Z15MPC groups was higher than that of MPC group ($P < 0.05$). There was no significant difference in ALP expression between Z20MPC group and MPC control group ($P > 0.05$). The weight loss rate showed that the degradation rates of Z5MPC, Z10MPC, Z15MPC and Z20MPC were similar to those of the MPC group. The degradation rate between the groups was similar, and there was no statistically significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion:** With the addition of ZrO_2 , the setting time of ZMPC is delayed, and the compressive strength is also improved. The materials of each group also exhibit good biocompatibility and excellent biodegradability, and it is expected to become a new type of bone tissue repair material.

Keywords: magnesium phosphate cement; zirconia; modified; compressive strength; cytotoxicity; alkaline phosphatase activity; biodegradability

骨水泥因其自固化性能可以直接注射并填充于复杂骨缺损处而引起研究者的极大兴趣。磷酸镁骨水泥 (Magnesium Phosphate Cement, MPC) 因其凝结时间短、早期强度高、粘接性能好等优点获得了广泛关注^[1]。然而目前使用的 MPC 因起始强度低、降解率过高及凝结时间过短等不足, 难以满足临床需求, 亟需寻求新的替代材料。

本研究采用氧化锆 (Zirconia, ZrO_2) 与 MPC 调制成氧化锆镁骨水泥 (以下简称 ZMPC), 对该复合载体固化时间、抗压强度、细胞毒性、碱性磷酸酶活性 (Alkaline Phosphatase, ALP)、生物降解性进行观察和分析, 初步探讨其物理化学性能。

1 材料与方法

1.1 材料

ZMPC 固相主要由 ZrO_2 , MgO , NaH_2PO_4 及硼砂等组成; 液相为去离子水。 ZrO_2 购自上海卜微应用材料技术有限公司, 其余药品均购于国药集团化学试剂有限公司。其中 MgO 先在 $1\ 600\ ^\circ C$ 煅烧从而降低反应活性, 保温 2 h, 随炉冷却。煅烧后的 MgO 以及所使用磷酸盐均采用尼龙筛 (400 目) 过筛处理。体外生物学实验所用细胞为成骨细胞 MC3T3-E1 细胞株, 购自中国科学院上海生物研究所。

1.2 ZMPC 骨水泥的制备

根据文献[2]制备 MPC 粉体, 即通过混合 MgO , NaH_2PO_4 和硼砂得到 MPC 粉体, 其中 MgO 与 NaH_2PO_4 摩尔比为 3.8:1.0, 硼砂质量分数为 3%。然后将 ZrO_2 按质量分数 5%, 10%, 15%, 20% 与实验室自制 MPC 粉体混合即得到实验所需 ZMPC 骨水泥固相, 分组如下: 0% ZrO_2 100% MPC (MPC), 5% ZrO_2 95% MPC (Z5MPC), 10% ZrO_2 90% MPC (Z10MPC), 15% ZrO_2 85% MPC (Z15MPC), 20% ZrO_2 80% MPC (Z20MPC)。随后将上述骨水泥固相分别与液相按照 3 g/mL 的比例进行混合、搅拌成匀浆。待搅拌均匀后, 用注射器将骨水泥匀浆注入底面直径为 6 mm, 高为 2 mm 的圆盘形有机玻璃模具中成型 (见图 1), 制备细胞毒性测试及生物降解性能测试

样品。抗压强度测试样品采用底面直径为 6 mm, 高为 12 mm 的圆柱形有机玻璃模具中成型 (见图 1), 成型后将模具置于 $37\ ^\circ C$ 恒温箱中固化 24 h。为了降低环境温度对实验结果的影响, 实验室设置为恒温 ($25\ ^\circ C$)。

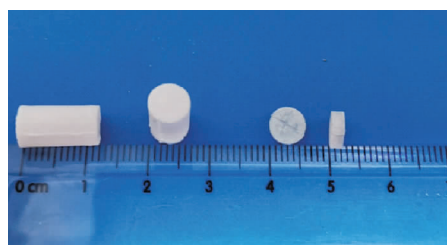


图 1 骨水泥样本宏观形貌

1.3 固化时间测定

根据国标 GB/T1346—2001, 采用维卡仪 (河北虹宇仪器设备有限公司) 测量 ZMPC 固化时间。测定时将样品试针与样品表面接触, 试针自由沉入浆体, 观察指针指示数值。从固液两相混合开始, 至试针沉入浆体不超过 1 mm 时, 所需时间即为固化时间, 每组测试 3 次, 取平均值。

1.4 抗压强度测试

将制备的骨水泥样品置于水温 $37\ ^\circ C$, 100% 湿度的恒温水浴锅中水化 24 h。取水化后的试样, 将其两端磨平, 平衡度误差 0.01 mm。随后利用万能材料试验机 (MTS810, 美国) 上测量其抗压强度, 加载速度为 1 mm/min。

1.5 体外细胞毒性测试

将已加工好的圆盘材料环氧乙烷灭菌后放入 96 孔培养板中, 接种成骨细胞 MC3T3-E1 细胞接种于圆盘膜上, 镜下观察材料表面细胞生长情况。7 d 后更换新的培养基, 取出材料加入 MTT (50 mL) 于 $37\ ^\circ C$ 孵育 4 ~ 5 h, 弃上清液, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 轻柔冲洗 2 次, 加入 200 μL 二甲基亚砷 (DMSO), 轻摇 10 min, 取出圆形材料并于 DMSO 中漂洗 2 次, 摇匀后于 490 nm 酶标仪测 A 值并比较。

细胞相对增殖率 (RGR) 计算公式如下: $RGR = \text{试验组 } D(490) \text{ 值} / \text{阴性对照组 } D(490) \text{ 值}$ 。细胞毒性分级标准为: $RGR \geq 100\%$ 为 0 级; 75% ~ 99% 为 I 级;

50% ~ 74% 为Ⅱ级;25% ~ 49% 为Ⅲ级;1% ~ 24% 为Ⅳ级。

1.6 比色法检测碱性磷酸酶活性

先接种细胞于 24 孔板上培养 3 d,终止培养,采用 0.125% 胰酶消化并收集细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/L$,取 1 mL $1\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min,弃上清液;加入 1 mL 2% Triton X-100,4 ℃ 过夜,取 50 mL 细胞裂解液于测定管内,按碱性磷酸酶(ALP)试管盒说明添加所需药品,然后加入 1.5 mL 显色剂混匀,于波长 520 nm 光径 0.5 cm(空白管调零),测定各管 A 值。碱性磷酸酶活性 = [(测定管 A 值/标准管 A 值) \times 0.005 \times 100]/0.05。

1.7 生物降解性能测试

在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲盐水(Tris-HCl)中进行 4 周的降解研究。称重底面直径为 6 mm,高为 2 mm 的圆盘状骨水泥试样,随后置于 37 ℃ 含有 40 mL Tris-HCl 的 50 mL 无菌试管中。Tris-HCl 储存液每隔 1 d 更新 1 次。每周从各自的容器中取出圆盘,用纸巾吸干,重新称重以评估任何重量变化。湿重的百分比变化 $M_t = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100\%$,其中 M_t 和 M_0 分别为时间 t 和最初的试样的湿质量。

1.8 统计学方法

应用 SPSS 19.0 统计软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析方法进行检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 固化时间

图 2 所示为 ZMPC 的自固化时间。从图中可以看出,ZMPC 的自固化时间随着 ZrO_2 加入含量的增加而逐渐延长,不同质量分数(0%,5%,10%,15%及 20%) ZrO_2 下的 ZMPC 固化时间(min)分别为(9.10 ± 1.12),(9.62 ± 0.78),(10.40 ± 1.16),(10.83 ± 1.06),(10.02 ± 1.16)min.当加入 ZrO_2 的质量分数为 15%时,自固化时间达到最大值,相比未加入任何 ZrO_2 的 MPC,该条件下的 ZMPC 自固化时间显著延长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

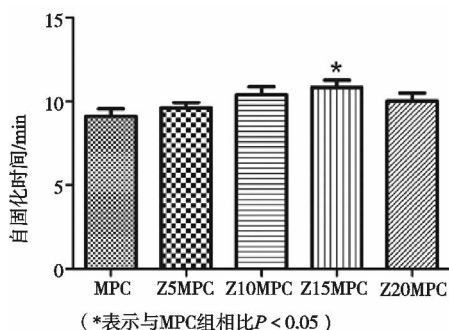


图 2 不同组分对 ZMPC 固化时间的影响

2.2 抗压强度

图 3 显示了不同比例 ZMPC 试样,在 37 ℃ 和 100% 湿度条件下养护 24 h 后的力学测试结果。结果表明,各组分下的 ZMPC 试样抗压强度均高于空白 MPC 样品。5% ZMPC 强度最低,为 (6.27 ± 0.48) MPa,与对照组强度差异无统计学意义($P > 0.05$);15% ZMPC 强度最高,可以达到 (23.98 ± 0.85) MPa.当 ZMPC 的比例增加到 20% 时,抗压强度反而降低,为 (15.30 ± 0.84) MPa 左右。10%,15% 及 20% 条件下的 ZMPC 与 MPC 相比,试样组与空白组差异有统计学意义($P < 0.01$)。

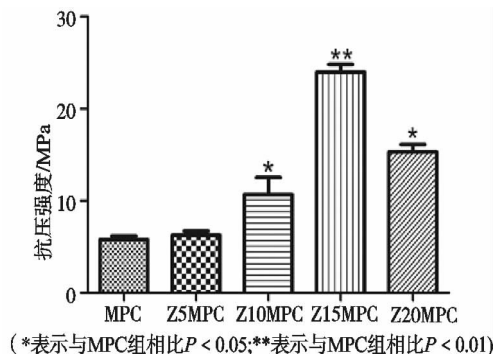


图 3 不同组分对 ZMPC 抗压强度的影响

2.3 细胞毒性检测

由图 4 可见各组材料相对增殖率(RGR)均大于 80%,各组材料对成骨细胞 MC3T3-E1 细胞增殖的影响无明显差别。根据材料毒性评级标准均为Ⅰ级,符合国际标准化组织 ISO/TC194 标准规定。

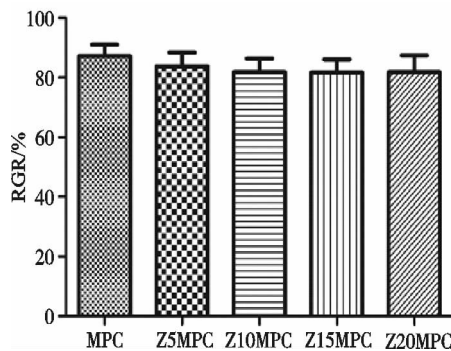


图 4 不同组分的 ZMPC 下成骨细胞 MC3T3-E1 细胞相对增殖率

2.4 ALP 活性测定

ALP 活性测定结果见图 5,细胞培养第 7 天,Z5MPC,Z10MPC,Z15MPC 实验组与 MPC 对照组之间 ALP 活性出现了明显的差异,实验组较对照组有较高的 ALP 活性,差异有统计学意义($P < 0.05$);但是 Z20MPC 实验组与 MPC 对照组之间 ALP 表达差异不明显,差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明 ZMPC 能够促进成骨细胞的 ALP 活性表达,呈剂量依赖性,但过高的 ZrO_2 开始抑制成骨细胞的分化。

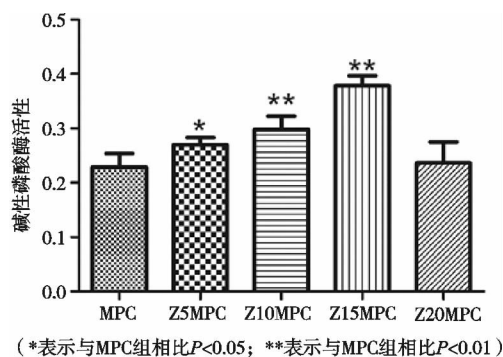


图5 不同组分对 ZMPC 碱性磷酸酶活性的影响

2.5 生物降解性能测试

对各组骨水泥试样生物降解性能进行测试,结果如图6所示。相比于其余各组,MPC在前7d内降解更快($12.08\% \pm 1.08\%$),而之后降解速度减慢,在28d后降解率为 $16.00\% \pm 0.25\%$ 。Z5MPC, Z10MPC, Z15MPC以及Z20MPC的降解速度与MPC类似,但各组降解率均低于MPC,且各组间降解率近似,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

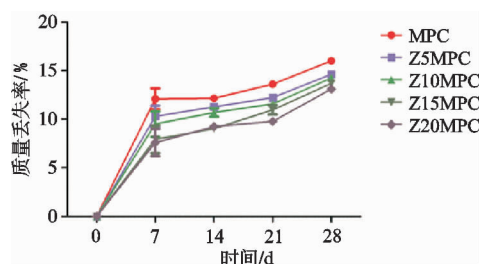


图6 不同组分对 ZMPC 生物降解性能的影响

3 讨论

骨水泥临床应用需要足够的操作时间,一般要求其凝结时间最好控制在8~15min,但无统一标准^[3]。对于MPC骨水泥来说,固化是由 NaH_2PO_4 (酸性反应物)与 MgO (碱性反应物)之间的快速酸碱反应引起,这也是MPC固化时间迅速的主要原因^[2]。目前解决MPC固化时间过于迅速的措施主要有两种:1)煅烧重烧 MgO ;2)添加缓凝剂。 MgO 通过高温处理,起反应活性大幅度降低,从而缩短凝固时间^[3,4]。目前已有关于 ZrO_2 作为添加物参与CPC的研究,其结果显示 ZrO_2 在该反应过程中作为促凝剂加速了CPC固化。本研究采用不同质量分数的 ZrO_2 与MPC调和得到Z5MPC, Z10MPC, Z15MPC及Z20MPC,对其固化时间测定发现ZMPC的自固化时间随着 ZrO_2 加入含量的增加而逐渐延长,均介于8~15min,可满足临床操作需要。同时笔者发现当加入量为15%时,自固化时间达到最大值,为(10.83 ± 1.06)min。相比未加入任何 ZrO_2 的MPC,该条件下的ZMPC自固化时间差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明 ZrO_2 的加入延长了MPC的凝固时间,在此反应体系中 ZrO_2 可作为一种缓凝剂。

力学性能是骨水泥临床应用需要考虑的另一重要因素。MPC因其水合后的快速凝固和相对紧凑的结构使其具有较高的初始抗压强度,但未能达到临床需求^[5,6],而 ZrO_2 因其高硬度、致密性和耐磨损等特性很早就用于骨科临床应用^[7]。本研究通过复合MPC和 ZrO_2 后发现,15%比例的ZMPC强度最高,可以达到(23.98 ± 0.85)MPa,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$);而当ZMPC的比例增加到20%时,抗压强度反而降低,表明在一定范围内, ZrO_2 可以改善MPC抗压强度,使其能够保持稳定。在一项 ZrO_2 改性CPC的研究中发现,15%质量分数 ZrO_2 条件下,CPC内部形成了许多针状物质与块状物质交织的结构,晶须增韧使抗压强度增高^[6],而本研究中15%条件下抗压强度增高的原因是否由于该原因引起仍需进一步探讨。

良好的生物相容性是骨水泥应用于临床的首要条件^[8]。本研究通过MTT法检测细胞在材料不同质量浓度浸提液中的增殖情况来反映材料对细胞的生物相容性,结果显示各组骨水泥试样对BMSCs增殖毒性均无明显影响,细胞毒性级别均为I级,符合ISO/TC190标准规定。另外对各组细胞ALP活性测定,结果表明ZMPC能够促进成骨细胞的ALP活性表达,呈剂量依赖性,但过高的 ZrO_2 开始抑制成骨细胞的分化,表明 ZrO_2 具有理想的成骨能力。

成功的骨植入材料应是可生物降解的,以便逐渐被再生的新骨组织替代^[9]。本研究所有5种骨水泥在Tris HCl缓冲溶液中均逐渐降解,随着浸泡时间延长,其降解速率随着水泥的不同化学组成而变化。在此复合骨水泥中,降解作用主要由MPC主导,因为其降解曲线类似于MPC骨水泥的降解曲线。然而由于 ZrO_2 相对缓慢的降解,复合材料的降解速率低于MPC的降解速率。因此,通过调整组成成分,可以获得具有不同降解速率的复合水泥。

综上所述,通过添加不同质量分数的 ZrO_2 于MPC中,成功合成了一种新型的骨水泥材料。随着 ZrO_2 的加入,ZMPC的凝固时间得以延缓,抗压强度也有所提高,各组材料也表现出良好的生物相容性及优良的生物降解性能,有望成为新型的骨组织修复材料。

参考文献

- [1] NABIYOUNI M, BRÜCKNER T, ZHOU H, et al. Magnesium-based bioceramics in orthopedic applications[J]. Acta Biomater, 2018, 66: 23-43.