

·基础研究·

多孔钛合金不同孔径大小对新骨长入的影响 *

刘邦定¹ 郭 征^{1△} 郝玉琳² 李述军² 王财儒¹ 袁超凡¹ 张涌泉¹ 王 攀¹ 杨小卫¹

(1 第四军医大学西京医院骨科 陕西 西安 710032 ; 2 中国科学院沈阳金属研究所 辽宁 沈阳 110016)

摘要 目的 评价不同孔径多孔钛合金植入物在骨缺损区对新骨长入的影响。方法 采用电子束熔融 (EBM) 技术制备三种不同孔径 (孔径分别为 1.0 mm, 2.0 mm, 3.0 mm) 的多孔钛合金材料, 其孔隙率依次为 73 %, 79 %, 86 %。将 18 只家犬随机分为 1.0 mm 孔径材料组, 2.0 mm 孔径材料组, 3.0 mm 孔径材料组, 每组 6 只。制备家犬双侧股骨外侧髁缺损模型, 然后植入各孔径组材料, 术后 4 周, 8 周, 12 周分别行大体标本观察, X 线片观察, 组织形态学观察三组不同孔径材料与周围骨的整合情况及孔隙中的新骨长入情况。结果 通过大体标本观察和 X 线片观察显示, 12 周后三组材料均与周围紧密骨连接。其中 1.0 mm 孔径组材料中心明显成骨, 2.0 mm 孔径组和 3.0 mm 孔径组中心仍为较多白色组织填充。组织学观察显示, 12 周时 2.0 mm 孔径组和 3.0 mm 孔径组材料周围有骨质包绕, 但中心空洞, 基本无骨质形成。1.0 mm 孔径组材料周围骨质包绕紧密, 孔中新生骨形成较多, 且有大量纤维母细胞和软骨细胞形成。各时间点 1.0 mm 孔径组新生骨面积百分比明显高于 2.0 mm 孔径组和 3.0 mm 孔径组, $P < 0.01$, 差异具有统计学意义。2.0 mm 孔径组和 3.0 mm 孔径组相比, $P > 0.05$, 无显著差异。结论 孔径大小影响多孔钛合金材料的骨长入, 适当孔径的设计将更有利于材料的传导成骨。

关键词 孔径 孔隙率 多孔钛合金 骨缺损 成骨

中图分类号 Q95-3, R318.08, R314 **文献标识码** A **文章编号** : 1673-6273 (2012) 09-1601-04

Effect of Pore Sizes of Porous Titanium Alloys as Bone Material on Bone Formation*

LIU Bang-ding¹, GUO Zheng^{1△}, HAO Yu-lin², LI Shu-jun², WANG Cai-ru², YUAN Chao-fan¹,

ZHANG Yong-quan¹, WANG Pan¹, YANG Xiao-wei¹

(1 Department of Orthopaedics, Xijing Hospital, The Fourth Hospital Medical University, Xi'an 710032, China;

2 Institute Of Metal Research, Chinese Academy Of Sciences, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of regeneration as porous titanium alloys with three different pore sizes. **Methods:** Porous titanium alloys with three different pore sizes (1.0 mm, 2.0 mm, 3.0 mm) and three different porosities (73%, 79%, 86%), were made by Electron Beam Machining (EBM). They were implanted the defects of condylus lateralis femoris of 18 dogs. The 18 dogs were randomly divided into three experimental groups. The specimens were harvested after 4, 8, 12 weeks, then were examined by gross observation, X ray and histological. **Results:** The gross observation and X-ray observations revealed, three groups of materials were closely related with the surrounding bone after 12 weeks. The implant with 1.0 mm pore size was obvious bone formation in the materials center, the center of the implant with 2.0 mm pore size and the implant with 3.0 mm pore size was still more white tissue filling. There were a large number of bone formation around the the implant with 2.0 mm pore size and the implant with 3.0 mm pore size of materials after 12 weeks, but there was no bone formation in the center. The implant with 1.0 mm pore size was wrapped tightly by the bone, new bone formation more in holes of the center, and a large number of fibroblasts and chondrocytes were formed. Area percentage of new bone formation in the implant with 1.0 mm pore size was significantly higher than the implant with 2.0 mm pore size and the implant with 3.0 mm pore size at each time point, $P < 0.01$, the difference was statistically significant. The implant with 2.0 mm pore size compared with the implant with 3.0 mm pore size, $P > 0.05$, there was no significant difference. **Conclusion:** Pore size of porous titanium alloy materials have effect on bone ingrowth, appropriate aperture design will be more conducive to bone conduction.

Key words: Pore size; Porosity; Porous titanium alloys; Bone defect; Osteogenesis

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, R318.08, R314 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)09-1601-04

前言

具有孔隙结构的材料能促进营养物质和代谢产物的运输,

促进细胞的黏附, 多孔材料的孔径大小、孔隙率和连通孔结构等结构因素和材料表面粗糙程度、化学组成、表面的亲水性、表面能的高低和适合的表面电荷等因素均影响新生骨的长

* 基金项目 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 课题 (2011AA030100)

作者简介 刘邦定 (1985-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 骨修复重建。电话: 13488476260, E-mail: 253727605@qq.com

△通讯作者 郭征, E-mail: guozheng@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-06-30 接受日期 2011-07-24)

入^[1-3],因此,多孔骨植入物材料逐渐成为研究和临床应用的趋势。然而,孔隙结构必然导致材料的力学性能下降,故作为骨移植物的多孔材料必须有足够的力学性能。具有多孔结构的钛合金因其良好的力学性能和生物相容性,已成为植入物研究的一个很重要的选择方向。目前,孔径大小多少更利于骨长入,尚无统一标准。本研究采用电子束熔融(EBM)技术制备三种不同孔径的多孔钛合金,分别植入家犬股骨外侧髁部位,以探索孔径大小对骨形成的影响,并进一步探讨有利于骨缺损修复和新骨长入的最佳孔径。

1 材料与方法

1.1 材料制备

本实验采用电子束熔融(EBM)技术制备三种不同孔径多孔钛合金,由沈阳中科院金属研究所提供,孔径大小分别为1.0 mm,2.0 mm,3.0 mm,为规则孔,孔隙率均依次为73%,79%,86%,规格均为1 cm×1 cm×1 cm 正方体(图1)。

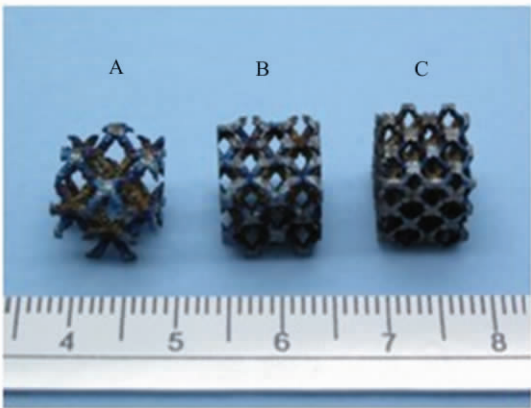


图1 材料大体观 依次为 A:3.0 mm, B:2.0 mm,C:1.0 mm 孔径材料
Fig.1 The implants with 3.0 mm, 2.0 mm and 1.0 mm pore size

1.2 实验动物及模型的建立

健康成年家犬18只,雌雄不限,平均体重约为12.6 kg(10.8 kg~14.6 kg),购于第四军医大学实验动物中心,家犬单笼正常饲养。随机分为3个实验组。采用速眠新(0.1 ml/kg)肌肉注射麻醉,并肌注百分比为3%的戊巴比妥(0.1 ml/kg)维持麻醉效果,术前剃净家犬股骨外侧髁部位周围的毛,将动物侧卧位固定于手术台上,碘伏消毒手术区域,铺消毒洞巾,取股骨外侧髁部位切口,长约4~5 cm,逐层切开显露股骨外侧髁部位,用摆锯在股骨外侧髁中心部位取1.1 cm×1.1 cm×1.1 cm 正方体切口,周围以磨钻打磨光滑。缺损中心植入三种孔径分别为1.0 mm(a组),2.0 mm(b组),3.0 mm(c组)的多孔钛合金材料,植入完成后依次用百分比为3%的双氧水,甲硝唑,生理盐水冲洗创口,逐层缝合创口。术后给予1.0 g 头孢唑啉钠肌肉注射,1次/d,共计注射3天。术后拍X线片观察植入物的植入位置情况。

1.3 标本取材与处理

分别于4,8,12周处死家犬,取双侧股骨外侧髁标本,固定于体积百分比为80%的酒精溶液中24~48 h,然后进行大体观察,X线片观察和组织学观察。大体观察:分别于术后4,8,12周取材后观察植入物周围成骨情况,有无骨痂形成等;X线片观察:分别于术后4,8,12周进行家犬股骨外侧髁正侧

位X线拍摄,并观察评估骨缺损修复状况。组织学观察:分别于术后4,8,12周将取材并经80%酒精处理过的植入材料进行脱水,树脂包埋,硬组织切片,V-G染色,LEICA MTLA全自动专业研究级显微镜(德国LEICA公司)下采集图像,观察植入材料与骨界面的整合情况以及新骨长入状况。采集图像后,利用Image pro plus6.0专业图像分析软件,对骨组织(newly formed bone, NB)面积比进行半定量分析。具体计算方法为:NB%=骨组织面积/感兴趣区视野总面积(包括带有骨髓的新生骨面积和材料面积)×100%^[4,5]。

1.4 统计学处理

应用SPSS18.0统计学软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以方差分析作显著性检验,P<0.05时具有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察

4周后取材见a,b两组材料周围有少许白色组织包绕。c组材料周围亦有少许白色组织包绕,但材料中心明显空洞。8周后三组材料均与周围有明显的骨连接,b组和c组材料中心空洞为白色组织填充。12周后三组材料均与周围紧密骨连接。其中a组材料中心明显成骨,b组和c组中心仍为较多白色组织填充,如图2所示。

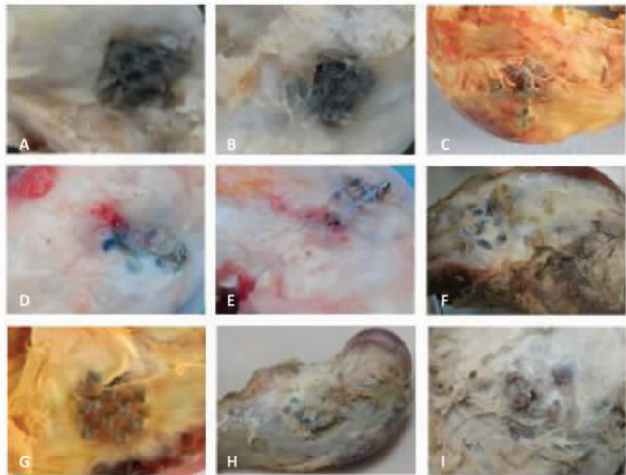


图2 大体观察结果:A-C依次为a,b,c三组材料4周时大体观。D-F依次为a,b,c三组材料8周时大体观。G-I依次为a,b,c三组材料12周时大体观。

Fig.2 The gross observation of the implants with 1.0 mm, 2.0 mm and 3.0 mm pore size 4 weeks after operation(A-C).The gross observation of the implants with 1.0 mm, 2.0 mm and 3.0 mm pore size 8 weeks after operation(D-F).The gross observation of the implants with 1.0 mm, 2.0 mm and 3.0 mm pore size 12 weeks after operation(G-I).

2.2 X线观察

术后X线片示各组材料与周围骨之间安放紧治,骨缺损线清晰可见,材料中的孔亦清晰可见。4周后各材料组骨缺损线有些许模糊。随着时间的延长,尤其是8周后,骨质与材料界限逐渐模糊,骨缺损逐渐被骨组织取代,缺损区骨皮质与正常骨皮质连续。成骨沿周围向中心生长。植入材料周围无骨坏死,骨溶解和硬化现象。12周时三组材料周边骨折线均模糊,a组尤甚。但b组和c组可以看到清晰的材料孔隙。如图3所示。

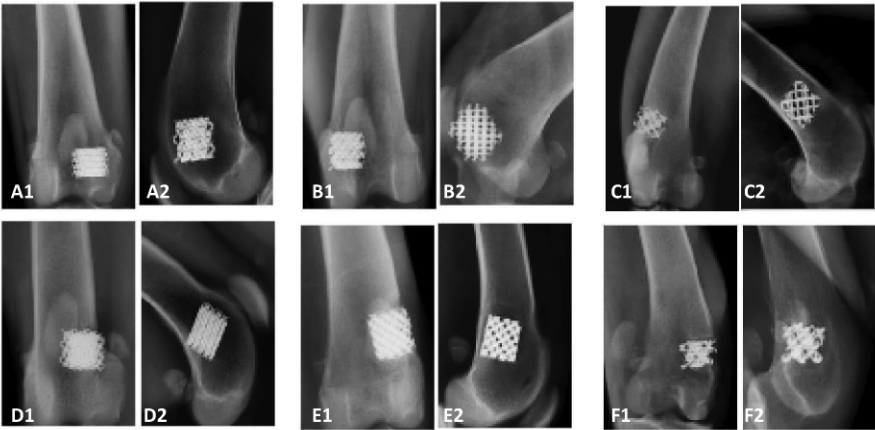


图3 X线片观察:A-C 术后8周时 a,b,c 组材料正侧位X线片。D-F 术后12周 a,b,c 组材料正侧位X线片。

Fig.3 Radiograph of the implants with 1.0 mm, 2.0 mm and 3.0 mm pore size 8 weeks after operation(A-C).Radiograph of the implants with 1.0 mm, 2.0 mm and 3.0 mm pore size 12 weeks after operation(D-F).

2.3 组织学观察

12周时b组和c组材料周围有骨质包绕,但中心空洞,基本无骨质形成。a组材料周围骨质包绕紧密,孔中新生骨形成较多,且有大量纤维母细胞和软骨细胞形成。对组织学切片采用组织形态定量法进行分析^[6]。分析结果示各时间点a组新

生骨面积百分比明显高于b组和c组, $P<0.01$,差异具有统计学意义,如表1所示。b组和c组相比, $P>0.05$,无显著差异。纵向分析示a组新生骨面积比随时间延长而增加显著。b组8周和4周相比新生骨面积比显著增加。12周与8周相比无明显增多。c组随时间延长新生骨面积比缓慢增加。如图4所示。

表1 术后4,8,12周各组材料新骨形成面积占缺损面积百分比($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 1 The percentage of new bone formation area in each group at 4,8,12 weeks ($\bar{x} \pm s, \%$)

术后时间(周) The weeks after surgery	a组 Group a	b组 Group b	c组 Group c
4	11.39± 1.36	6.92± 1.47	7.72± 1.38
8	15.59± 3.10	9.42± 0.91	7.78± 1.69
12	20.11± 2.74	10.45± 1.83	9.26± 1.00

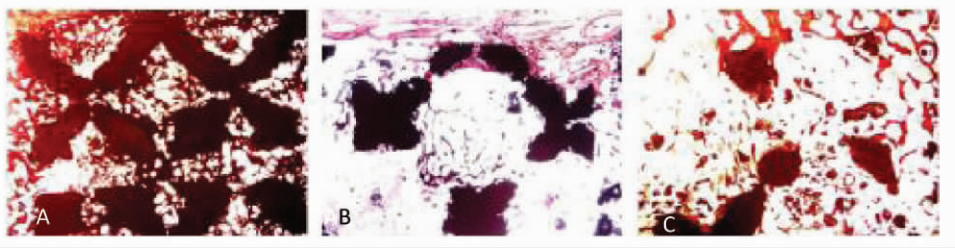


图4 示12周时 a,b,c 组材料组织学切片 (V-G, × 16)

Fig.4 Histological examination of the implant with 1.0mm, 2.0mm and 3.0mm pore size 12 weeks after operation. (V-G, × 16)

3 讨论

金属钛和钛合金以其良好的力学强度和生物相容性,被认为是良好的骨组织替代物^[7]。然而,目前应用的钛种植体多为全致密型,致密型的钛种植体弹性模量高达110 GPa,而骨组织弹性模量仅为2~18 GPa,弹性模量相差过大,易导致应力遮挡,不利于种植体的长期稳定。本实验采用EBM技术制作孔径规则,大小分别为1.0 mm,2.0 mm,3.0 mm,孔隙率依次为73 %,79 %,86 %的多孔钛合金。多孔钛合金可通过孔径大小和孔隙率来调节其弹性模量,实现与骨组织匹配的力学性能,有利于界面应力传导,为骨组织长入植入体提供结构条件^[8-10],当新骨长入后当新骨长入材料孔隙后,可增强多孔钛合金植入物的机

械锁固,从而获得更好的长期固定效果^[11-13]。并且多孔材料的多孔结构有利于细胞的黏附增殖,有利于营养物质和代谢物质的运输,还有利于血管与神经的长入,是比较理想的植入材料。Kuboki等学者1998年通过异位成骨实验对致密羟基磷灰石和多孔羟基磷灰石的成骨能力进行了比较研究,发现多孔材料内可以直接成骨,致密羟基磷灰石则未见新骨形成^[14]。而且,从骨的结构来看,松质骨为骨小梁连接构成的网状框架结构,孔隙率50~90 %,孔径约1.0 mm,皮质骨结构致密,孔隙率约为3~12%。可见,孔径大小和孔隙率不论对于自然骨还是组织工程骨支架材料来说,都具有十分重要的作用。本实验通过组织学观察新骨形成的面积百分比发现,1.0 mm孔径相对于其他两个孔径材料而言,有更多的新骨形成。而2.0 mm孔径和3.0

mm 孔径材料组与其相比,材料中心空洞,且各时间点两组材料新骨形成缓慢,仅有少量新骨形成。对于孔隙率,学者们通过体内试验证实对于相同孔径的材料,在一定范围内,孔隙率越大越有利于成骨,更大孔隙率材料可发现更多的骨长入^[15-17],未发现低孔隙率有利于成骨的相关报道,故本实验不认为是孔隙率过大导致新骨长入缓慢。

目前,对于孔径,研究人员公认孔径大于 100 μm 更利于新骨形成,但对孔径大小多少最适合新生骨形成尚无定论,国内外学者对此持不同观点。Cyster 等认为较大孔径更利于细胞长入、骨内生和移植物的稳定^[18]。孔径较大更利于营养物质和氧气的进入加速血管化过程,且更有利于植入物与体液的充分接触为细胞提供更大的黏附面。有学者通过对 100 μm , 200 μm , 300 μm 三种孔径的钛合金修复骨缺损的效果进行了比较研究,结果显示具有较大孔径的 300 μm 钛合金材料内形成的片状骨最多^[19]。Karageorgiou 认为,在一定条件下,大孔径(大于 300 μm)更能促进骨形成和毛细血管的形成^[20]。Moreau 和 Xu 认为材料孔径越大则单位体积表面积越大,从而更有利于细胞的黏附^[21]。孔径越大越有利于细胞粘附,但对新骨长入的作用尚不清楚。小孔径材料成骨研究已有许多,但大孔径材料(大于 500 μm)的研究尚不充分,究竟大孔径的不同孔径材料对成骨有何影响需要研究,这也就是本研究的主要内容。另一问题就是 EBM 技术已在一些国家使用,目前其制备的多孔钛合金孔径最小在 500 μm ,而实际使用中往往需要制备更大的孔径,但其传导成骨作用不详。本实验中,当孔径过大时,局部骨缺损修复不佳和新骨长入缓慢,认为一方面是由于缺乏材料的支架作用,新骨形成逐渐受到限制,材料孔中心部分新骨生成速度缓慢。另一方面是由于材料为单纯金属支架材料,新骨的长入缺乏与骨成分相似的物质的诱导作用。

研究中采用单纯多孔钛合金材料对孔径大小的影响新骨形成作用进行了比较,认为孔径大于一定范围后材料中新骨长入由于缺乏材料的支架作用,新骨生成速度缓慢。然而,根据文献报道^[18,20,21],大孔径材料更有利于血管化的发生,更有利于细胞的黏附,更有利于营养物质和代谢产物的运输。那么,孔径多大是这个优势的极限?是否经过改性如多孔结构中喷涂磷酸三钙或材料中复合细胞和骨诱导因子后,孔径较大的材料更具优势,更能促进新骨形成?还需进一步研究。对于单纯金属支架材料,是否 1.0 mm 以下的孔径更适合新骨形成,利于新生骨长入的最佳孔径到底多少合适,尚待进一步探索。

参考文献(References)

- [1] Itala AI, Yl?nen HO, Ekholm C, et al. Pore diameter of more than 100 micron is not requisite for bone ingrowth in rabbits[J]. Biomed Mater Res, 2001, 58(6): 679-683
- [2] Otsuki B, Takemoto M, Fujibayashi S, et al. Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants [J]. Biomaterials, 2006, 27 (35): 5892-5900
- [3] Jones AC, Arns CH, Sheppard AP, et al. Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT[J]. Biomaterials, 2007, 28 (15): 2491-2504
- [4] Recker RR, Weibel ER, Hayew TM, et al. Bone histomorphometry : technique and interpretation [M]. 2th ed. Florida: CPC press, 1990: 54-56
- [5] Bobinac D, Spanjol J, Zoricic S, et al. Changes in articular cartilage and subchondral bone histomorphometry in osteoarthritic knee joints in humans[J]. Bone, 2003, 32(3): 284-290
- [6] Odgaard A. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture[J]. Bone, 1997, 20(4): 315-328
- [7] Li J. Behaviour of titanium and titania-based ceramics in vitro and in vivo[J]. Biomaterials, 1993, 14(3): 229-232
- [8] MacDonald DE, Rapuano BE, Deo N, et al. Thermal and chemical modification of titanium-aluminum-vanadium implant materials: effects on surface properties, glycoprotein adsorption, and MG63 cell attachment[J]. Biomaterials, 2004, 25(16): 3135-3146
- [9] Ryan G, Pandit A, Apatsidis DP. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications [J]. Biomaterials, 2006, 27(13): 2651-2670
- [10] Holy CE, Fialkov JA, Davies JE, et al. Use of a biomimetic strategy to engineer bone [J]. J Biomed Mater Res A, 2003, 65(4): 447-453
- [11] Sirkin M, Sanders R, DiPasquale T, et al. A staged protocol for soft tissue management in the treatment of complex pilon fractures [J]. J Orthop Trauma, 2004, 18(8 Suppl): S32-38
- [12] Joshi D, Ahmed A, Krishna L, et al. Unreamed interlocking nailing in open fractures of tibia [J]. J Orthop Surg (Hong Kong), 2004, 12(2): 216-221
- [13] San Giovanni TP, Keblish DJ, Thomas WH, et al. Eight-year results of a minimally constrained total ankle arthroplasty[J]. Foot Ankle Int, 2006, 27(6): 418-426
- [14] Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, et al. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and non-feasible structures: topology of osteogenesis [J]. Biomed Mater Res, 1998, 39(2): 190-1909
- [15] Roy TD, Simon JL, Ricci JL, et al. Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques[J]. Biomed Mater Res A, 2003, 66(2): 283-291
- [16] Lewandowski KU, Gresser JD, Bondre S, et al. Developing porosity of poly (propylene glycol-co-fumaric acid) bone graft substitutes and the effect on osteointegration: a preliminary histology study in rats [J]. Biomater Sci Polym Ed, 2000, 11(8): 879-889
- [17] Krut MC, de Bruijn JD, Wilson CE, et al. Viable osteogenic cells are obligatory for tissue-engineered ectopic bone formation in goats[J]. Tissue Eng, 2003, 9(2): 327-336
- [18] Cyster LA, Grant DM, Howdle SM, et al. The influence of dispersant concentration on the pore morphology of hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering[J]. Biomaterials, 2005, 26(7): 697-702
- [19] Götz HE, Müller M, Emmel A, et al. Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants [J]. Biomaterials, 2004, 25(18): 4057-4064
- [20] Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis[J]. Biomaterials, 2005, 26(27): 5474-5491
- [21] Moreau JL, Xu HH. Mesenchymal stem cell proliferation and differentiation on an injectable calcium phosphate-chitosan composite scaffold[J]. Biomaterials, 2009, 30(14): 2675-2682