doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.32.009

# 低浓度万古霉素复合 PMMA 骨水泥的细胞毒性研究 *

祝勇刚 邹继伟 赵广跃 杨 照 李 军△

(第四军医大学西京医院骨二科 陕西 西安 710032)

**摘要 目的:**研究低浓度万古霉素(1%)复合聚甲基丙烯酸甲酯 PMMA 骨水泥对 SD 仔鼠原代成骨细胞的增殖以及凋亡的影响。**方法:**采用分离 SD 仔鼠颅骨与胰酶消化法获取 SD 仔鼠原代成骨细胞,通过细胞爬片碱性磷酸酶染色对原代成骨细胞进行鉴定;利用 CCK-8 法检测低浓度万古霉素复合 PMMA 及纯 PMMA 骨水泥浸提液对 SD 大鼠原代成骨细胞的增殖影响、流式细胞仪检测万古霉素复合 PMMA 及纯 PMMA 骨水泥浸提液对对 SD 大鼠原代成骨细胞的凋亡影响。**结果:**SD 大鼠原代成骨细胞在低浓度万古霉素复合 PMMA 骨水泥浸提液中第 1、2、3 天的增殖更明显($P < 0.05$),在纯 PMMA 骨水泥浸提液中第 1、5 天凋亡显著增加($P < 0.05$)。**结论:**低浓度万古霉素复合 PMMA 骨水泥相比 PMMA 骨水泥具有较低的细胞毒性,在临床应用于骨缺损伴局部骨感染的治疗方面具有一定的优势。

**关键词:**万古霉素;聚甲基丙烯酸甲酯;细胞毒性;骨水泥

**中图分类号:**R-33; R318.08; R68 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)32-6247-05

# Study on Cytotoxicity of Low Concentration Vancomycin/PMMA Composite Cements*

*ZHU Yong-gang, ZOU Ji-wei, ZHAO Guang-yue, YANG Zhao, LI Jun△*

*(Institute of Orthopaedics, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)*

**ABSTRACT Objective:** To study the cytotoxicity of vancomycin (low concentration,1% )/polymethyl methacrylate (PMMA) cements on SD rat-derived primary osteoblasts. **Methods:** Primary osteoblasts were obtained by the calvarias trypsin-digestion method, which were isolated from newborn Sprague-Dawley rats. To identify the primary osteoblasts, alkaline phosphatase staining was used.The activity of cell proliferation in vancomycin (low concentration)/ polymethyl methacrylate (PMMA) and polymethyl methacrylate (PMMA) cements extract were assessed by CCK-8 assay. Apoptosis of osteoblasts induced by vancomycin (low concentration)/ polymethyl methacrylate (PMMA) and polymethyl methacrylate (PMMA) cements extract was observed by flow cytometry. **Results:** The activity of SD rat rat-derived osteoblasts proliferation in the vancomycin (low concentration)/ polymethyl methacrylate (PMMA)cement extracts was significantly more than that in the group of PMMA cement extracts on day 1, 2, 3 ($P < 0.05$). The apoptotic rate of primary osteoblasts in extracts from the vancomycin (low concentration)/PMMA cements was significantly lower than that in extract from the PMMA cement on day 1 and 5 ($P < 0.05$). **Conclusion:** Compared with PMMA cements, the vancomycin (low concentration)/PMMA cements has a good cytocompatibility with primary osteoblasts. It will be useful inbone defect with infection repair.

**Key words:** Vancomycin; PMMA; Cytotoxicity; Bone cement

**Chinese Library Classification(CLC): R-33; R318.08; R68 Document code:A**

**Article ID: 1673-6273(2017)32-6247-05**

## 前言

聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)骨水泥是临床治疗创伤后骨缺损最常用的骨组织填充物,其粘合作用可有效稳定骨折并对局部骨缺损起到填充作用。但创伤后骨缺损常伴有骨及周围软组织的感染,现有 PMMA 骨水泥并不具备抗感染能力;万古霉素(Vancomycin)是一种三环糖肽类抗生素[1],其能干扰细菌的细胞壁肽聚糖交联而使细菌溶解,对葡萄球菌、肠球菌、链球菌、芽孢杆菌、厌氧球菌、部分棒状杆菌、梭状芽孢杆菌、李斯特菌等多种革兰阳性菌均有抗菌活性[2]。特别是对骨组织常见感染菌金黄色葡萄球菌,以及耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant staphylococcus aureus, MRSA),万古霉素具有不可替代的强效作用[3]。近年来,研究者将万古霉素与 PMMA 骨水泥混合应用于骨组织缺损填充,以结合二者的特性,达到骨水泥体内缓释抗菌药物的作用[4]。本文拟研究低浓度万古霉素复合聚甲基丙烯酸甲酯 PMMA 骨水泥和 PMMA 骨水泥对原代成骨细胞的毒性作用,为临床创伤后骨缺损伴感染的填充物选择奠定基础。

## 1 材料和方法

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81301535)

作者简介:祝勇刚(1979-),硕士,主治医师,主要研究方向:创伤显微骨科,电话:15109115812,E-mail: zfirework@163.com

△ 通讯作者:李军 (1974-),本科,主治医师,主要研究方向:创伤显微骨科,电话:18309180677,E-mail: siyida@126.com

(收稿日期:2017-08-17 接受日期:2017-09-10)

### 1.1 材料及仪器

SD 仔鼠(出生 24h)购于第四军医大学试验动物中心;低糖 DMEM 培养基、胎牛血清购于 Hyclone 公司;CCK-8 检测试剂盒购于 Dojindo Molecular Technologies 公司;PMMA 骨水泥购于 VertaPlex™ 公司;万古霉素购于 Sigma 公司;碱性磷酸酶(ALP)染色试剂盒购于碧云天公司;ThermoSteri-Cycle $CO_2$ 培养箱;倒置相差显微镜(CKX-31,Olympus,Japan);TD5M-WS 赛特湘仪离心机;SW-CJ-1F 水平层流洁净工作台;Thermo 酶标仪;FACScan 流式细胞仪(BD Biosciences, NJ, USA)。

### 1.2 万古霉素复合聚甲基丙烯酸甲酯 PMMA 骨水泥的制备与浸提液的获取

**1.2.1 万古霉素复合聚甲基丙烯酸甲酯 PMMA 及 PMMA 骨水泥的制备** 称取万古霉素药粉与商品化 PMMA 固相粉末,按照质量比为 1:100 充分混合成为万古霉素 /PMMA 复合水泥粉态,按 PMMA 固液比加入液相混匀后放入模具,制备成含 1% 万古霉素的复合 PMMA 骨水泥。PMMA 骨水泥直接按照固液比混合固液相后获得。

**1.2.2 万古霉素复合 PMMA 骨水泥及 PMMA 骨水泥浸提液的制备** 称取之前制备的万古霉素复合 PMMA 骨水泥及 PMMA 骨水泥各 40 g,密封后送第四军医大学钴 60 辐照中心照射灭菌(25℃, 25KGY)。将灭菌后骨水泥分别浸泡于预先制备的含 10%胎牛血清的无菌低糖 DMEM 培养基 200 mL 内,置于 37℃孵箱内 24 h 后取出去除骨水泥即可获得相应的骨水泥浸提液。

**1.2.3 实验分组** 根据实验随机分为实验组和对照组,实验组分别为万古霉素复合 PMMA 骨水泥组及 PMMA 骨水泥浸提液组,对照组为含 10%胎牛血清的无菌低糖 DMEM 培养基组。CCK8 细胞增殖实验每组内重复 5 个副孔,流式细胞检测细胞凋亡实验每组内重复 3 个副孔;随机的方法及分组依据为:先将进行 CCK8 细胞增殖实验的 96 孔板及 6 孔板进行编号,从随机数字表中任一行任一列开始,抄取 3 个随机数字,如遇相同数字,抄取下一个随机数,对随机数字按从小到大排序,从排序后的数字中规定第一个为第一天检测孔板,依次类推。在每块培养板内将培养孔随机分为实验组和对照组同此方法。

### 1.3 SD 大鼠原代成骨细胞的提取、培养与鉴定

**1.3.1 SD 大鼠原代成骨细胞的提取与培养** 配制含 10%胎牛血清的低糖 DMEM 完全培养基。取出生 24 h 的 SD 仔鼠,颅骨分离法提取原代成骨细胞[5]。SD 仔鼠脱颈处死后,酒精消毒,无菌条件下取出颅骨并完全去除周围软组织,以 PBS 液反复冲洗后将颅骨片剪成 1× 1 mm 大小,用 0.25%胰酶消化 10 min,用完全培养基终止消化后,将骨片转至培养瓶中分散铺开,培养瓶置于 37℃、5% $CO_2$ 细胞孵箱。培养 24 h 后换液,之后每 2 天换液一次,显微镜下观察贴壁细胞生长 80%-90%融合时,用 0. 25%胰蛋白酶液进行消化传代。取 2-4 代细胞进行实验。

**1.3.2 SD 大鼠原代成骨细胞的鉴定** 取之前提取的细胞接种至 6 孔培养板内的无菌细胞爬片(24× 24 mm)上,连续培养至细胞生长 70%-80%融合时,用 4%多聚甲醛固定后进行碱性磷酸酶(ALP)染色鉴定(ALP 染色试剂盒)。

### 1.4 细胞增殖活力测定(CCK-8 法)

取之前提取的细胞接种至 96 孔培养板内孔中,每孔接种 4000-5000 个细胞,万古霉素复合 PMMA 骨水泥及 PMMA 骨水泥试验组孔内分别使用各自的浸提液进行培养,对照组使用含 10%胎牛血清的低糖 DMEM 完全培养基进行培养,培养第 1、2、3 天分别于每组培养细胞的孔中取 5 个孔,每孔加入 100 μLCCK-8 液,37℃,$CO_2$ 孵箱中孵育 4 小时。4 小时后取出培养板,将 96 孔板置于酶标仪中 450 nm 检测读数,每组 5 个读数求平均值。

### 1.5 细胞凋亡测定

取之前提取的细胞接种至 6 孔培养板内孔中,每孔接种 1× $10^6$ 个细胞,万古霉素复合 PMMA 骨水泥及 PMMA 骨水泥试验组孔内分别使用各自的浸提液进行培养,对照组使用含 10%胎牛血清的低糖 DMEM 完全培养基进行培养,培养第 1、5 天分别消化收集每组内 3 个孔的培养细胞,重悬于无菌 PBS 液中送学校基础部免疫教研室流式细胞术分析细胞凋亡率,每组 3 个计数求平均值和标准差。

### 1.6 数据处理

数据采用 SPSS 12.0 for Windows 软件进行分析,组间比较以单因素方差分析进行显著性检验, $P < 0.05$ 差异有显著性意义。

## 2 实验结果

### 2.1 SD 仔鼠原代成骨细胞培养与鉴定

SD 仔鼠原代成骨细胞形态呈长梭形。连续培养 7-10 天后细胞爬片上原代成骨细胞呈聚集状,ALP 染色可见原代成骨细胞合成的碱性磷酸酶与试剂盒底物发生反应形成不溶性的四唑硝基蓝 - 三苯基甲脂,产生深蓝色或蓝黑色显色。显微镜下选取显色阳性细胞比例较高处进行图片采集。

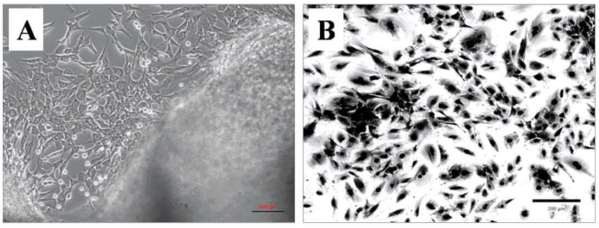


**图 1 原代 SD 大鼠成骨细胞培养与鉴定**

Fig.1 Observation and identification of the cultured SD rat-derived primary osteoblasts

**图 1A 图为从颅骨边缘爬出的原代成骨细胞(标尺:100 μm),B 图为原代成骨细胞碱性磷酸酶染色(标尺:200 μm)**

Fig.1 A: SD rat-derived primary osteoblasts(Scale bar: 100 μm), B: Alkaline phosphatase staining(Scale bar: 200 μm)

### 2.2 细胞增殖活力比较

CCK-8 比色法测定 450 nm 吸光度(OD 值),检测细胞增殖活力。实验组分别为万古霉素复合 PMMA 骨水泥组及 PMMA 骨水泥浸提液组,对照组为含 10%胎牛血清的无菌低糖 DMEM 培养基组。分组方法及依据同前所述。各个时间点两组间比较如(图 1)。培养第 1、2、3 天,万古霉素复合 PMMA 骨水泥组及对照组与 PMMA 骨水泥组 CCK-8 读数间比较 (p <

0.05)，其中万古霉素复合 PMMA 骨水泥组原代成骨细胞增殖活力明显优于 PMMA 骨水泥试验组。

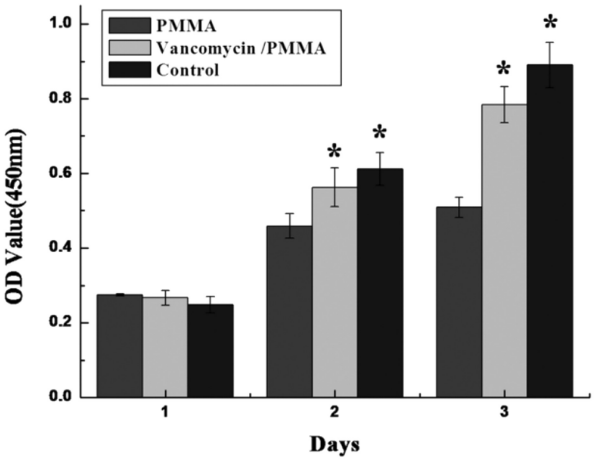


图 2. CCK-8 检测原代成骨细胞增殖活力

Fig. 2. CCK-8 assay of primary osteoblasts

注:2 中深灰色柱状图代表 PMMA 浸提液组原代成骨细胞增殖活力测定结果;灰色柱状图代表万古霉素复合 PMMA 浸提液组原代成骨细胞增殖活力测定结果;黑色柱状图代表完全培养基对照组原代成骨细胞增殖活力测定结果。培养第 1、2、3 天,* :与 PMMA 浸提液组 CCK-8 读数间比较(P< 0.05).

Fig.2 CCK-8 assay of primary osteoblasts cultured for 1, 2, 3 days in extracts from the vancomycin /PMMA cements( light grey histograms ), in extracts from the PMMA cements (dark grey histograms )and in control group( black histograms ) (n = 5, mean ± standard deviation, *P < 0.05).

### 2.3 细胞凋亡率比较

流式细胞检测结果显示原代成骨细胞在骨水泥浸提液中凋亡情况。实验组分别为万古霉素复合 PMMA 骨水泥组及 PMMA 骨水泥浸提液组，对照组为含 10%胎牛血清的无菌低糖 DMEM 培养基组。分组方法及依据同前所述。(图 3)培养第一天,PMMA 骨水泥组原代成骨细胞平均凋亡率为 3.03%± 0.12%,万古霉素复合 PMMA 骨水泥组原代成骨细胞平均凋亡率为 2.33%± 0.16%，对照组原代成骨细胞平均凋亡率为 1.13%± 0.04%，万古霉素复合 PMMA 骨水泥组及对照组与 PMMA 骨水泥组流式细胞仪检测结果比较，细胞平均凋亡率有显著差异(P＜0.05)。培养第五天,PMMA 骨水泥组原代成骨细胞平均凋亡率为 25.53%± 2.12%，万古霉素复合 PMMA 骨水泥组原代成骨细胞平均凋亡率为 17.94%± 0.9%，对照组原代成骨细胞平均凋亡率为 13.65%± 0.77%,万古霉素复合 PMMA 骨水泥组及对照组与 PMMA 骨水泥组 CCK-8 读数间比较,细胞平均凋亡率有显著差异(P＜0.05)。结果提示两组中,PMMA 骨水泥浸提液对细胞毒性较大。该结果与 CCK-8 结果相匹配。

## 3 讨论

创伤后骨缺损伴感染是临床常见的骨科难题之一,传统的治疗方案建立在先进行彻底清除感染灶后对骨缺损部位进行自体骨移植等治疗[6,7],患者往往经历多次手术仍达不到满意效果。近年来,骨填充物材料的研究发展迅速,特别是材料载药缓释系统的建立为骨缺损伴感染带来了新的希望[8,9]。近年来对于骨感染的治疗在手术清除感染骨组织、重建骨的稳定性、以及

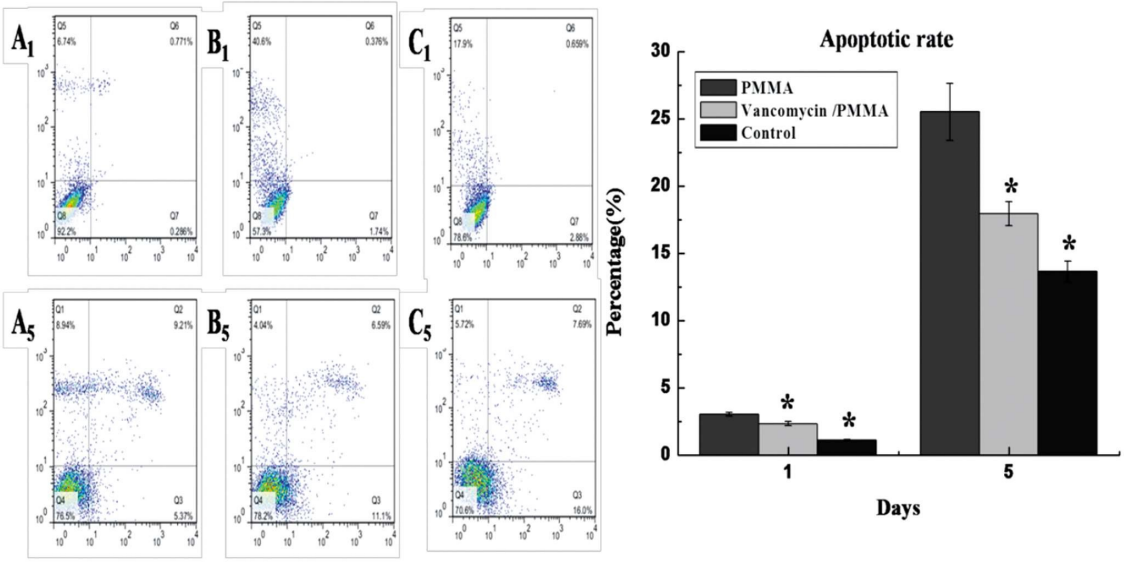


图 3 流式细胞仪检测原代成骨细胞凋亡率

Fig.3 Analysis of apoptosis in primary osteoblasts

注:3.中左图:A1 为第 1 天对照组细胞凋亡率流式细胞结果图;A5 为第 5 天对照组细胞凋亡率流式细胞结果图;B1 为第 1 天万古霉素复合 PMMA 骨水泥组细胞凋亡率流式细胞结果图;B5 为第 5 天万古霉素复合 PMMA 骨水泥组细胞凋亡率流式细胞结果图;C1 为第 1 天 PMMA 骨水泥组细胞凋亡率流式细胞结果图;C5 为第 5 天 PMMA 骨水泥组细胞凋亡率流式细胞结果图;右图:深灰色柱状图代表 PMMA 浸提液组原代成骨细胞凋亡率结果;灰色柱状图代表万古霉素复合 PMMA 骨水泥组原代成骨细胞凋亡率结果;黑色柱状图代表对照组原代成骨细胞凋亡率结果。培养第 1、5 天,* :与 PMMA 浸提液组细胞凋亡率比较(p < 0.05)。

Fig. 3. Analysis of apoptosis in primary osteoblasts on day 1 and 5. Apoptosis of osteoblasts in vancomycin /PMMA cement extracts( light grey histograms ). Apoptosis of osteoblasts inPMMA cement extracts( dark grey histograms )and in control group( black histograms )(n = 3, mean ± standard deviation, *P < 0.05).

覆盖良好的软组织的基础上,强调局部联合应用抗生素[10]。

万古霉素强大的抗菌作用使其成为临床常用的材料载药抗生素，当前万古霉素复合 PMMA 广泛应用于临床填补骨缺损伴感染。Kankilic 等 [11] 用万古霉素复合 PLA-β- 磷酸三钙（β-TCP）来治疗钛颗粒及抗甲氧西林金黄色葡萄球菌制作的慢性骨髓炎模型鼠,发现在 6 周时,实验组炎症已被抑制,并伴随有新骨生成,该结果提示万古霉素复合材料填充感染骨可有效抑制炎症并促进新骨生成。Yang Di-cheng 等[12]将透钙 β- 磷酸三钙骨水泥作为万古霉素的载体,检测发现盐酸万古霉素水溶性较好,其主要通过扩散作用达到从材料释放的目的;在 2% 的载药量下,药物 7h 的释放量为 60%,而当载药量为 5%时,药物释放量达到 60%所需时间为 13 h。此外，研究认为，大于 10000 μg/mL 时可致细胞凋亡，低浓度的万古霉素（浓度＜1000 μg/mL)对细胞无影响[13]。

目前临床常用的骨填充水泥有以下几种:PMMA 骨水泥;磷酸钙骨水泥(calcium phosphate cement, CPC);硫酸钙骨水泥(calcium sulfate cement, CSC)。CPC 的主要缺陷是强度低,使其主要应用受限于非承重部位骨缺损修复[14]。CSC 存在的不足是降解速度较快而不利于发挥骨传导作用促进骨长入[15]。PMMA 骨水泥应用于骨科手术作为粘结填充物已有将近 70 年之久[16,17],其因具有良好的粘合作用、较好的生物力学强度、以及手术中可操作性强等特性,当前已成为骨科手术治疗骨缺损最为常用的骨水泥[18,19]。然而,PMMA 骨水泥因聚合不充分而遗留部分 MMA 单体,MMA 单体可引起细胞凋亡，对人体局部和全身产生一定毒性反应[20-24]。目前研究表明,临床应用 PMMA 骨水泥载药进行局部治疗骨髓炎具有一定疗效。该方法自 1970 年应用于临床以来,技术不断更新成熟[25]。Wentao Zhang [26]等分析指出,PMMA 载药链珠是缓释药物治疗骨髓炎的有效治疗方式。

Bluth 等于 1948 年利用鼠成纤维细胞来筛选聚合物材料,首次通过细胞毒性试验来评价材料的生物相容性[27]。用体外细胞毒性试验来验证材料的生物体毒性,具有可操作性强、重复周期短等优点;但是,生物材料种类繁多、材料的性状不一、材料与细胞之间的接触复杂,使得当前国内外细胞毒性试验方法及标准并不统一。GB/ T 16886. 5-2003《体外细胞毒性试验》中列出 3 种细胞毒性试验方法:直接接触试验、间接接触试验和浸提液试验。当前骨水泥材料的细胞毒性常用浸提液进行检测。MTT 法常用于检测细胞增殖,其测定原理是活细胞内细胞色素 b 和 c 位点的线粒体脱氢酶可以裂解四氮唑环,还原水溶性、淡黄色的溴化 -3 (4 ,5- 二甲基噻唑基 -2)-2 ,5- 二苯基四唑 (Methyl thiazolyl tetrazolium,MTT) 分子,并形成紫色结晶物:甲瓒颗粒,该结晶物不溶于水但易溶解于二甲亚基亚砜(Dimethyl sulfoxide,DMSO) 等有机溶剂。由于细胞数量及活性与结晶物形成量成正比,进行比色测定吸光度值(Optical density , OD)的大小即可反映出活细胞数量及细胞代谢活性强度,因此 OD 值降低程度与生物材料细胞毒性大小成正相关。与 MTT 法有所区别的是,CCK-8 比色法常用于浸提液检测,CCK-8 的试剂主要成分是水溶性四唑盐,为类似于 MTT 的化合物,其在电子耦合试剂存在的条件下可被线粒体内的脱氢酶还原成橙黄色水溶性甲臜,甲臜可以直接溶解在培养基中。酶联免疫检测仪于 450 nm 波长处测定其光吸收值,能够间接地反映活细胞数量,活细胞的数目越多则颜色越深,OD 值也越高[28]。与传统 MTT 相比,浸提液法具有下列优点:检测快速,使用方便,对细胞毒性小,灵敏度高,可操作性强,易重复。细胞凋亡的检测从对立面表现培养细胞的活力,其方法有原位缺口末端标记法、流式细胞术、形态学观察等。其中流式细胞术较为常用,主要用来测定分析体外培养时材料对细胞生物合成方面的影响。流式细胞仪利用鞘流原理,将预先被荧光标记好的单个细胞排成单列后沿重力方向流动。激光照射到细胞表面后发出荧光,检测器可对细胞荧光强度进行逐个测定。荧光强度的定量分析由荧光粒子所发出的光量子所决定，因此用流式细胞仪测定细胞 DNA 含量快捷、方便而准确。当前该技术广泛应用于分子生物学、体细胞遗传学、免疫学、血液学以及肿瘤学等领域。

本实验在成功提取 SD 大鼠原代成骨细胞的基础上,通过细胞增殖和凋亡两大方面对 PMMA 骨水泥的细胞毒性进行评价;经过细胞相容性验证,证明低浓度万古霉素复合的 PMMA 骨水泥与传统 PMMA 骨水泥相比,培养第 1、2、3 天,低浓度万古霉素复合的 PMMA 骨水泥浸提液 CCK-8 检测的 OD 读数比 PMMA 骨水泥浸提液更高($p < 0.05$),表明低浓度万古霉素复合的 PMMA 骨水泥浸提液相对 PMMA 骨水泥浸提液能明显促进 SD 大鼠原代成骨细胞的增殖；万古霉素复合 PMMA 骨水泥组与 PMMA 骨水泥组流式细胞仪检测结果比较，细胞平均凋亡率有显著差异($P<0.05$)。结果提示两组中,万古霉素复合 PMMA 骨水泥组细胞凋亡率明显下降,PMMA 骨水泥浸提液对细胞毒性较大。该结果与 CCK-8 结果相匹配。我们下步将在万古霉素复合的 PMMA 骨水泥上进行进一步加工修饰,从而优化该材料载体,以求获得能适合于治疗骨缺损伴感染的填充物载药体系。

## 参 考 文 献(References)


[1] L Camaione, K Elliott, A Mitchell Van Steele, et al. Vancomycin[J]. Pharmacotherapy, 2013, 33(12): 1278-1287

[2] ShiYi. Vancomycin [J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2015, 38(6): 426

[3] Van Staden A D, Dicks L M. Calcium orthophosphate-based bone cements (CPCs): Applications, antibiotic release and alternatives to antibiotics[J]. J ApplBiomater Function Mater, 2012, 10(1): e2-e11

[4] Shanchao Luo, Tongmeng Jiang, Yingnian Yang, et al. Combination therapy with vancomycin-loaded calcium sulfate and vancomycin-loaded PMMA in the treatment of chronic osteomyelitis [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2016, 17: 502

[5] Liu C, Zhang Y, Wang L, et al. A Strontium-Modified Titanium Surface Produced by a New Method and Its Biocompatibility In Vitro [J]. PLoS One, 2015, 10 (11): e0140669

[6] Chan YS, Ueng SW, Wang CJ, et al. Antibiotic-impregnated autogenic cancellous bone grafting is an effective and safe method for the management of small infected tibial defects: a comparison study[J]. J Trauma, 2000, 48(2): 246-255

[7] Atkins R M. Principles of management of septic non-union of fracture [J]. Injury, 2007, 38(Suppl 2): S23-S32

[8] Roy A, Jhunjhunwala S, Bayer E, et al. Porous calcium phosphate-poly

(lactic-co-glycolic) acid composite bone cement: A viable tunable drug delivery system[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016, 59: 92-101

[9] Guo Zhong-shang, Bi Long, YangMin, et al. Study on Cytotoxicity of Vancomycin/Calcium Phosphate Cement Composite Materials [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15(20): 3813-3816

[10] Leung AH, Hawthorn BR, Simpson AHRW. Suppl 1: M14: The effectiveness of local antibiotics in treating chronic osteomyelitisin a cohort of 50 patients with an average of 4years follow-up [J]. Open Orthop J, 2015, 9: 372-378

[11] Kankilic B, Bilgic E, Korkusuz P, et al.Vancomycincontaining PLLA/beta-TCP controls experimental osteomyelitisin vivo [J]. J OrthopSurg Res, 2014, 9: 114

[12] Yang Di-cheng, Zhong Jian, Tao Liu, et al. Preparation of brushite calcium phosphate cement for controlled drug delivery and its property of drug loading [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2015, 19(3): 427-433

[13] Edin M L, Miclau T, Lester G E, et al. Effect of cefazolin and vancomycin on osteoblasts in vitro [J]. ClinOrthopRelat Res, 1996, (333): 245-251

[14] Piazzolla A, De Giorgi G, Solarino G. Vertebral body recollapse without trauma after kyphoplasty with calcium phosphate cement[J]. MusculoskeletSurg, 2011, 95(2): 141-145

[15] Masala S, Nano G, Marcia S, et al. Osteoporotic vertebral compression fractures augmentation by injectable partly resorbable ceramic bone substitute (Cerament?|SPINE SUPPORT): a prospective nonrandomized study[J].Neuroradiology, 2012, 54(6): 589-596

[16] Kiaer S. Hip arthroplasty with acrylic prosthesis [J]. ActaOrthopScand, 1952, 22(2): 126-140

[17] Haboush E J. A new operation for arthroplasty of the hip based on biomechanics, photoelasticity, fast-setting dental acrylic, and other considerations[J]. Bull Hosp Joint Dis, 1953, 14(2): 242-277

[18] Koh BT, Tan JH, Ramruttun AK, et al. Effect of storage temperature and equilibration time on polymethyl methacrylate (PMMA) bone cement polymerization in joint replacement surgery[J]. J Orthop Surg Res, 2015, 17(10): 178

[19] Chen C, Li D, Wang Z, et al. Safety and Efficacy Studies of Vertebroplasty, Kyphoplasty, and Mesh-Container-Plasty for the Treatment of Vertebral Compression Fractures: Preliminary Report [J]. Plosone, 2016, 11(3): e151492

[20] SM Lim, AUJ Yap, CSL Loo, et al. Comparison of cytotoxicity test models for evaluating resin-based composites [J]. Human and Experimental Toxicology, 2016, 1-10

[21] Cimatti B, Santos MA, Brassesco MS, et al. Safety, osseointegration, and bone ingrowth analysis of PMMA-based porous cement on animal metaphyseal bone defect model [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2017[Epub ahead of print]

[22] Kurt A, Erkose-Genc G, Uzun M, et al. The antifungal activity and cytotoxicity of silver containing denture base material[J]. Niger J Clin Pract, 2017, 20(3): 290-295

[23] Hoess A, Ló pez A, Engqvist H, et al. Comparison of a quasi-dynamic and a static extraction method for the cytotoxic evaluation of acrylic bone cements [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016, 62: 274-282

[24] R Dhivya, J Ranjani, PK Bowen, et al. Biocompatible curcumin loaded PMMA-PEG/ZnO nanocomposite induce apoptosis and cytotoxicity in human gastric cancer cells [J]. Materials Science and Engineering: C, 2017, 80: 59-68

[25] Gupta P, SarkarS, DasB, et al. Biofilm, pathogenesis andprevention-a journey to break the wall: a review[J]. Arch Microbiol, 2016, 198(1): 1-15

[26] Wentao Zhang, Guangyu Lei, Yang Liu, et al. Approach to osteomyelitis treatment with antibiotic loaded PMMA [J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 102: 42-44

[27] Yilin Cao. Tissue engineering[M]. BeiJing: Science Press, 2008

[28] Zou Ying, Wang Wen-mei, Zhu Yan-an, et al. In vitro evaluation the cytotoxicity of dental bonding agents through CCK-8 assay [J]. Journal of Oral Science Research, 2011, 27(8): 673-675

(上接第 6246 页)

[12] Zhao J, Zhang J, Yu M, et al. Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells [J]. Oncogene, 2013, 32 (40): 4814-4824

[13] Han XJ, Yang ZJ, Jiang LP, et al. Mitochondrial dynamics regulates hypoxia-induced migration and antineoplastic activity of cisplatin in breast cancer cells [J]. International journal of oncology, 2015, 46(2): 691-700

[14] Che TF, Lin CW, Wu YY, et al. Mitochondrial translocation of EGFR regulates mitochondria dynamics and promotes metastasis in NSCLC[J]. Oncotarget, 2015, 6(35): 37349-37366

[15] Caino MC, Altieri DC. Cancer cells exploit adaptive mitochondrial dynamics to increase tumor cell invasion[J]. Cell cycle, 2015, 14(20): 3242-3247

[16] Banyard J, Bielenberg DR. The role of EMT and MET in cancer dissemination[J]. Connective tissue research, 2015, 56(5): 403-413

[17] Yeung KT, Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. Molecular oncology, 2017, 11(1): 28-39

[18] Matysiak M, Kapka-Skrzypczak L, Jodlowska-Jedrych B, et al. EMT promoting transcription factors as prognostic markers in human breast cancer [J]. Archives of gynecology and obstetrics, 2017, 295 (4): 817-825

[19] Pasquier J, Abu-Kaoud N, Al Thani H, et al. Epithelial to Mesenchymal Transition in a Clinical Perspective [J]. Journal of oncology, 2015, 2015: 792182

[20] van der Bliek AM, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion [J]. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2013, 5(6)

[21] Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms[J]. Cell, 2011, 147(2): 275-292