

泡沫碳化硅细胞相容性及动物体内植入实验研究

吴琳¹, 徐兴祥², 王禄增³, 荣小芳¹, 田冲², 张劲松²

(1. 中国医科大学 口腔医学院修复科, 沈阳 110002; 2. 中国科学院 金属研究所, 沈阳 110016; 3. 中国医科大学 实验动物部, 沈阳 110001)

摘要: 采用高分子热解结合可控熔渗反应烧结方法制备泡沫 SiC, 观察体外接种到泡沫 SiC 表面的成骨细胞 MG63 的贴壁和生长状况, 评价泡沫 SiC 的细胞相容性. 通过建立兔下颌临界骨缺损人工材料植入模型, 进行大体标本观察、组织学观察及图像分析, 探讨了泡沫 SiC 作为骨替代材料的可行性. 研究结果表明, 体外成骨细胞 MG63 在泡沫 SiC 表面的生长状态良好. 体内植入实验的 26 只实验动物健康状况良好, 伤口均为一期愈合. 大体标本观察表明, 各时间点内的泡沫 SiC 周边及其内部网孔内均有不同程度的骨组织形成; 组织学观察可见骨组织的修复属于正常的骨修复过程. 植入 4w 后, 泡沫 SiC 内新生骨的四环素荧光标记率和成骨面积均低于 HA, 而在 8w 及 24w 后与 HA 接近, 其差异无统计学意义. 由此表明泡沫 SiC 具有良好的细胞相容性, 且泡沫 SiC 修复兔下颌骨缺损的远期效果与 HA 相似, 具有较好的骨传导性.

关键词: 泡沫碳化硅; 骨修复材料; 细胞; 动物植入

中图分类号: R318

文献标识码: A

Study on Cytocompatibility and Animal Implantation Test of Foam SiC

WU Lin¹, XU Xing-Xiang², WANG Lu-Zeng³, RONG Xiao-Fang¹, TIAN Chong², ZHANG Jin-Song²

(1. Department of Prosthodontics, School of Stomatology, China Medical University, Shenyang 110002, China; 2. Institute of Metal Research, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 3. Animal Test Centre, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Foam SiC was prepared by macromolecule pyrolysis combined with reaction bonding method. The osteoblast-like cells MG63 were seeded and cultured *in vitro* on the foam SiC and observed under both SEM and TEM to further evaluate the cytocompatibility of this novel material. The feasibility of the foam SiC as a bone replacement material for clinical treatment was also studied by establishing an animal model for repairing mandibular critical-sized defects in rabbits, and by using general observation, histological observation and bone histomorphometry. The results show that MG63 cells attach and grow well on the surface of the foam SiC, which indicates that the foam SiC is non-toxic and possesses good cytocompatibility. The 26 tested rabbits are all in healthy conditions and the wounds are healed completely. The different degree of osteogenesis is observed on both periphery and inner mesh of the foam SiC at each time point, and the foam SiC shows no adverse effect to the process of bone repair. It is found that both the rate of tetracycline fluorescence labeling and the new bone area on the foam SiC are lower than those of hydroxyapatite (HA) after 4w implantation, but there are no statistical differences after both 8w and 24w implantations, indicating that the foam SiC should be similar to HA in osteo-conduction ability judging from the long-term repair effect to mandibular defects.

Key words: foam SiC; bone replacement material; cell; animal implantation

肿瘤、外伤等原因造成的大面积颌骨缺损, 不仅会给患者造成不同程度的生理畸形和功能丧失, 还会

带来严重的心理创伤. 由于自体骨和异体骨移植均存在着明显的不足, 发展具有松质骨几何结构特征的三

收稿日期: 2009-08-17, 收到修改稿日期: 2009-10-13

基金项目: 国家高技术研究发展(863)计划(2009AA03Z421)

作者简介: 吴琳(1969-), 女, 副教授, 副主任医师. E-mail: wulin13@163.com

维多孔生物活性人工骨是当前生物医用材料领域中的一项重要工作^[1]. 其中以羟基磷灰石(HA)为代表的多孔陶瓷材料,其良好的生物相容性已被大量实验和临床应用所证实^[2-3],但 HA 存在力学性能不足及难以制备几何外形精确的样品等问题,使其难以完成大面积及复杂外形承重骨缺损的修复. Tian 等^[4]采用高分子热解结合可控熔渗反应烧结方法制备了泡沫碳化硅(SiC)材料,发现其具有高强度、弹性模量与皮质骨相当、高孔隙率及与松质骨相近的几何结构特征等特点,且加工性能良好,有助于解决目前多孔骨组织修复材料所面临的主要技术问题^[5]. 前期实验研究结果已初步显示这一新型材料具有良好的生物相容性^[6].

本工作旨在通过观察泡沫 SiC 在体外对成骨细胞的影响以及其对兔下颌骨临界骨缺损的修复效果,进一步研究泡沫 SiC 的生物学特性.

1 实验

1.1 泡沫 SiC 对成骨细胞 MG63 的影响

1.1.1 实验材料

泡沫 SiC 样品由中国科学院金属研究所制备^[4],方法如下:首先,将炭粉、酚醛树脂、工业酒精按一定比例混合制成一定粘度的料浆,再将剪裁好的聚氨酯泡沫浸入料浆,并风干、固化. 上述流程反复多次,直至达到所需体积分数后,置入氮气保护炉中进行热解,获得炭泡沫;然后将该炭泡沫浸入由硅粉、聚乙烯醇水溶液组成的料浆中,再取出、烘干. 反复多次后,获得形成碳化硅所需硅、炭比例. 最后,将该样品置入真空烧结炉中,进行反应烧结获得碳化硅泡沫陶瓷. 反应烧结温度 1700℃,保温时间 30min. 用于细胞实验的泡沫 SiC 尺寸为 $\phi 13\text{mm} \times 2\text{mm}$ (图 1),孔径小于 10 μm . 经超声波震荡清洗及高压蒸汽灭菌(134℃/0.21MPa). 成骨细胞 MG63 由中国医科大学基础医学院提供.

1.1.2 细胞培养

选用高糖 DMEM 作为细胞培养基,内含 10vol% 胎牛血清,青霉素 100U/mL,链霉素 100U/mL,在 37℃,5% CO₂ 饱和湿度下进行培养传代. 细胞培养至 80% 汇合,0.25% 胰酶 0.02% EDTA 消化制成细胞悬液,调整浓度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$.

1.1.3 细胞接种

将泡沫 SiC 样品置于 24 孔板内,培养液加至与样品厚度同等高度预湿 2h,将成骨细胞 MG63 悬液 200 μL 接种于样品上培养.

1.1.4 扫描电镜观察

分别在细胞培养的 0.5 和 24h 时间点,在扫描电镜下观察细胞在泡沫 SiC 样品上的附着情况.

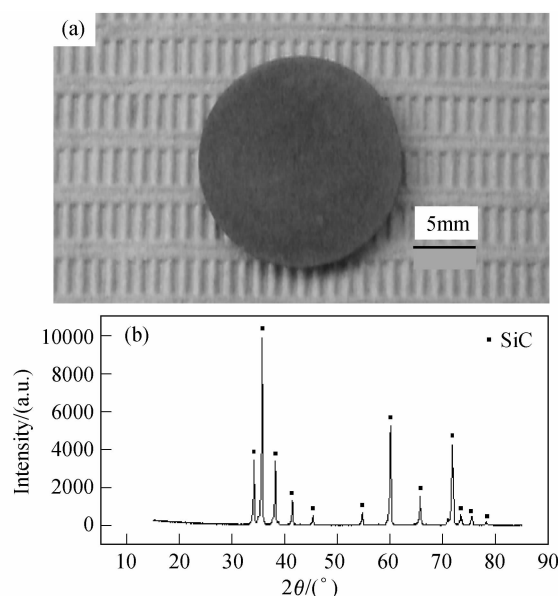


图 1 用于细胞培养的泡沫 SiC 样品(a)及其 XRD 图谱(b)
Fig. 1 Foam SiC sample (a) for cells culture and its XRD pattern (b)

1.1.5 透射电镜观察

细胞培养 5d 后,清洗和收集泡沫 SiC 样品上的细胞,制成透射电镜切片并在电镜下观察.

1.2 泡沫 SiC 修复兔下颌骨临界骨缺损

1.2.1 实验材料

动物实验用泡沫 SiC 由中国科学院金属研究所制备(图 2(a))^[4],样品尺寸为 13mm × 6mm × 4mm,孔隙率 70%,孔径尺寸 800 ~ 1000 μm ,盲孔率 $\leq 1\%$,抗压强度 $\geq 30\text{MPa}$,弹性模量 25GPa,经超声波震荡清洗及高压蒸汽灭菌(134℃/0.21MPa). HA 样品由四川大学生物材料工程研究中心提供(图 2(b)),其尺寸及处理方法与泡沫 SiC 相同,孔径 200 ~ 500 μm ,孔隙率 70%~80%,抗压强度 $\geq 1.5\text{MPa}$.

1.2.2 实验动物

选用健康成年日本大耳白兔 26 只,雌雄各半,年龄 7 ~ 12 个月,体重 2.5 ~ 3.5kg,由中国医科大学动物实验中心提供. 所有动物均独立笼养,自由进食,观察 1w 后将健康动物用于实验.

1.2.3 实验分组

24 只动物随机分为植入 4、8、24w 3 组,每只动物左侧植入泡沫 SiC,右侧植入 HA. 其余 2 只动物的双侧下颌骨缺损留置空白,植入 24w 后取材. 标本进行大体和组织学观察,并进行计算机图像分析及统计学处理.

1.2.4 植入方法和切片

动物肌注速眠新合剂(0.25mL/kg)全身麻醉,常规消毒铺巾,2% 利多卡因局部浸润麻醉,沿下颌缘作平行切口,长度 30 ~ 40mm,暴露范围前至下颌骨正

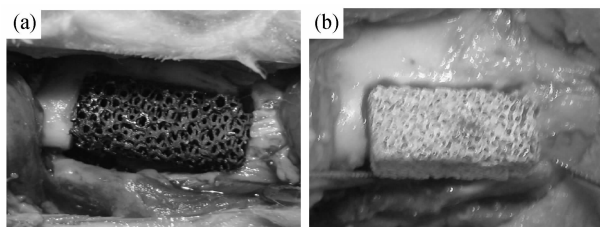


图2 用于植入的泡沫 SiC 样品(a)和 HA 样品(b)

Fig.2 Foam SiC sample (a) and HA sample (b) for implantations

中联合部,后至咬肌前缘.轻轻剥离骨膜后,按照植入材料的尺寸大小标记,低速细裂钻滴水降温下切割形成 $13\text{mm} \times 6\text{mm}$ 的矩形全层骨缺损.材料植入后分层缝合,严密关闭创口.处死前 1w 肌注盐酸四环素 (25mg/kg),取材保留材料周围 $1 \sim 2\text{mm}$ 的骨组织.大体标本观察后用 10% 甲醛固定 1w,梯度酒精脱水,甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 包埋,LEIKASP1600 主锯式切片机垂直于标本长轴切片,厚度 $70 \sim 80\mu\text{m}$.

1.2.5 组织学观察和定量分析

首先采用荧光显微镜直接观察切片.激发光波长 $365 \sim 380\text{nm}$,为紫外光;发出光波长 $530 \sim 540\text{nm}$,呈黄绿色.然后选取几张分别做 HE 和甲苯胺蓝染色,在光镜下观察摄片.每个标本选取中段切片 2 张,每张切片随机选择 3 个视野.荧光四环素标记率以每个视野 ($\times 4$) 四环素标记表面占全部骨表面的百分比来表示.成骨面积采用 HE 染色切片分析,以 1 个视野内 ($\times 10$) 成骨面积的平均值 (μm^2) 来表示.应用 Metamorph Imaging System V4.5 图像分析软件进行荧光四环素标记率和成骨面积测算,所有参数均以 $\bar{x} \pm s$ (均数 \pm 标准差) 表示.根据数据的正态性和方差齐性,应用 SPSS 11.0 统计分析软件进行 t 检验或秩和检验,比较两组之间的差异 (检验水准 0.05).

2 结果与讨论

2.1 泡沫 SiC 对成骨细胞 MG63 的影响

扫描电镜观察表明 (图 3),培养 0.5h 后细胞开始在泡沫 SiC 上贴壁,细胞附着于材料的表面或长入孔中,呈圆梭形、圆三角形、多角形等多种形态.细胞表面凹凸不平,可见微绒毛,细胞间借伸出的伪足相互连接,表明细胞生长状态良好.培养 24h 后,细胞在材料表面进一步伸展呈扁平状,并开始分泌蛋白,部分细胞被分泌的蛋白包裹,出现分化早期征象.

透射电镜观察表明 (图 4),体外复合培养 5d 后,细胞内可见丰富的线粒体、核糖体及大量分泌小泡,粗面内质网呈扩张状态,细胞膜上富含绒毛.泡沫 SiC

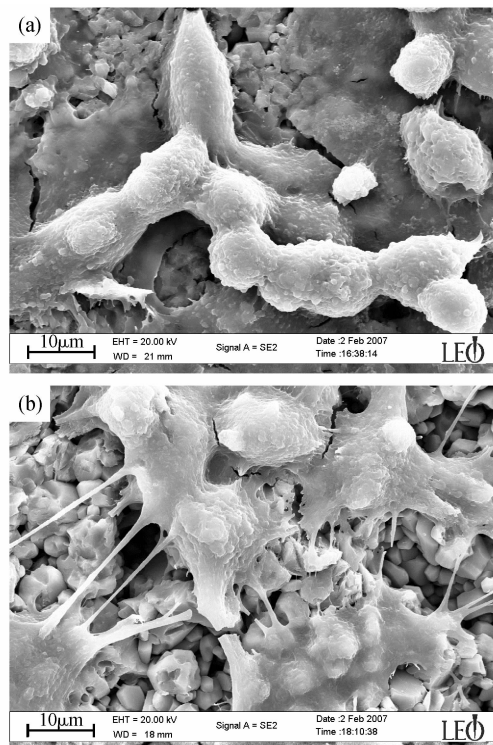


图3 成骨细胞 MG63 在泡沫 SiC 表面生长的扫描电镜照片

Fig.3 SEM images of the attached osteoblast-like cells MG63 to foam SiC

Cultured for (a) 0.5h; (b) 24h

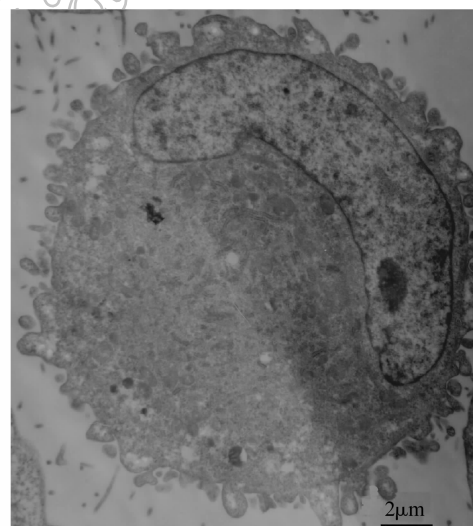


图4 成骨细胞 MG63 在泡沫 SiC 表面上培养 5d 后的透射电镜照片

Fig.4 TEM image of the harvested osteoblast-like cells MG63 cultured on foam SiC for 5d

表面的细胞处于良好的生长状况,表明泡沫 SiC 具有良好的细胞相容性.

2.2 泡沫 SiC 修复兔下颌骨临界骨缺损

用于研究骨修复材料的实验性骨缺损,应大于自行修复能力的范围.在这种情况下,骨植入材料的成骨潜力才有意义.这样的实验性骨缺损称为基准大小

缺损 (critical size defect, CSD), 亦称为临界骨缺损^[7]. 在体重 2.5 ~ 3.5kg 的成年日本大耳白兔的下颌骨体部, 制造的全层骨膜骨缺损前至下颌骨联合部, 后至咬肌前缘, 高度控制在 6mm 左右, 一般不会伤及牙根^[8]. 26 只动物平均在植入后的第 2 ~ 3d 内自主进食, 活动正常, 创口未见感染征象, 健康状况良好.

大体标本观察表明, 植入 4w 时, 泡沫 SiC 和 HA 周边及其内部网孔内均有骨组织形成, 材料与宿主骨边界结合牢固, 各个时间点取材均未见材料松脱及明显炎症反应. 空白缺损组植入 24w 未能完全修复, 骨缺损区被大量的软组织充填.

在荧光显微镜下进行的组织学观察表明, 植入 4w 和 8w 时, 泡沫 SiC 和 HA 周围均有不规则的黄色荧光四环素染色带出现 (图 5), 显示有明显的新骨形

成. 植入 4w 时, 泡沫 SiC 周围可见大量“网织状”胶原纤维, 并有细小编织骨形成, HA 周边可见大量成骨细胞聚集 (图 6). 植入 24w 时, 泡沫 SiC 周边骨组织进一步成熟, 可见典型的哈弗氏系统形成 (图 7).

实验动物均为一期愈合, 组织学切片未见明显炎症反应, 说明本文实验研究的泡沫 SiC 具有良好的生物相容性.

表 1 示出植入 4、8、24w 时, 泡沫 SiC 与 HA 内成骨面积和荧光四环素标记率. 由表 1 中数据可见, 植入 4w 时, 泡沫 SiC 内的成骨面积和荧光四环素标记率均低于 HA, 差别具有统计学意义 (分别为 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$). 动物植入 8w 时, 泡沫 SiC 和 HA 的荧光四环素标记率有明显差别. 植入 24w 后, 二者的成骨面积和荧光四环素标记率才均无明显差异.

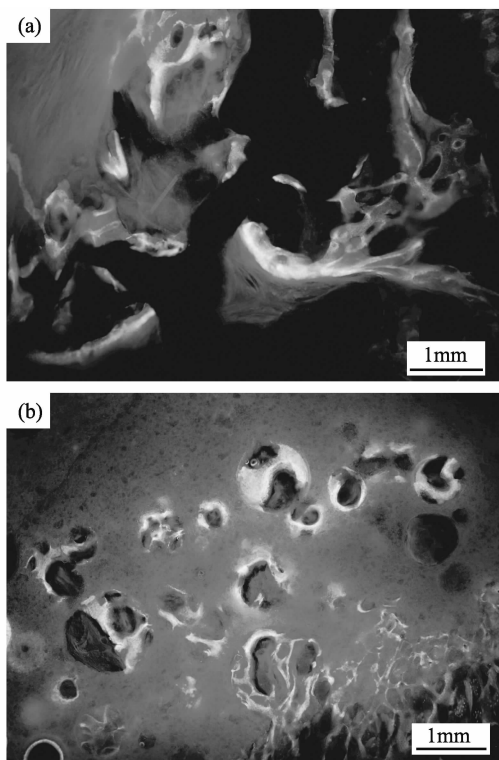


图 5 植入 4w 后的荧光四环素标记

Fig. 5 Fluorescence labelled foam SiC and HA after 4w implantation

(a) foam SiC; (b) HA

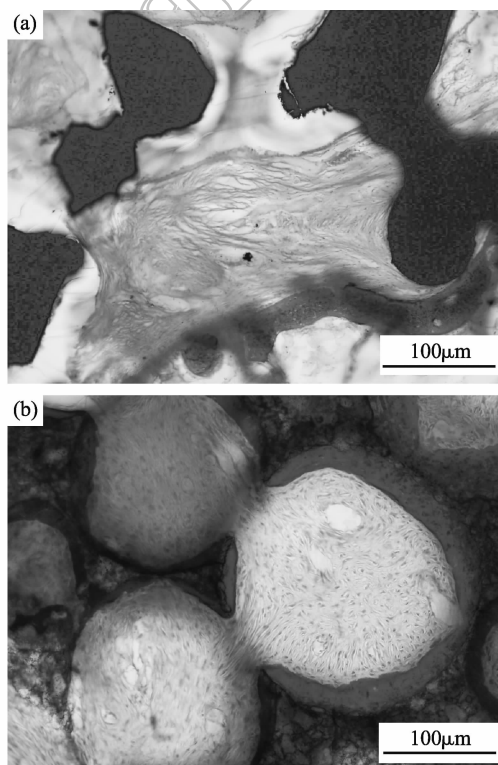


图 6 植入 4w 后的 HE 染色

Fig. 6 HE colored foam SiC and HA after 4w implantation

(a) foam SiC; (b) HA

表 1 泡沫 SiC 与 HA 植入后 4、8、24w 时的成骨面积和荧光四环素标记率的比较 ($n = 6$)
Table 1 Comparison of bone area and rate of fluorescence labeling between foam SiC and HA after 4, 8, 24w implantations ($n = 6$)

Time/w	New bone area/ μm^2		Rate of fluorescence labling/%	
	SiC	HA	SiC	HA
4	46916 \pm 15082 *	67826 \pm 16528 *	10.90 \pm 0.04 **	22.79 \pm 0.02 **
8	69593 \pm 18322	79018 \pm 8844	22.35 \pm 0.09	32.47 \pm 0.10
24	207291 \pm 32989	232977 \pm 26815	21.22 \pm 0.15	24.35 \pm 0.14

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

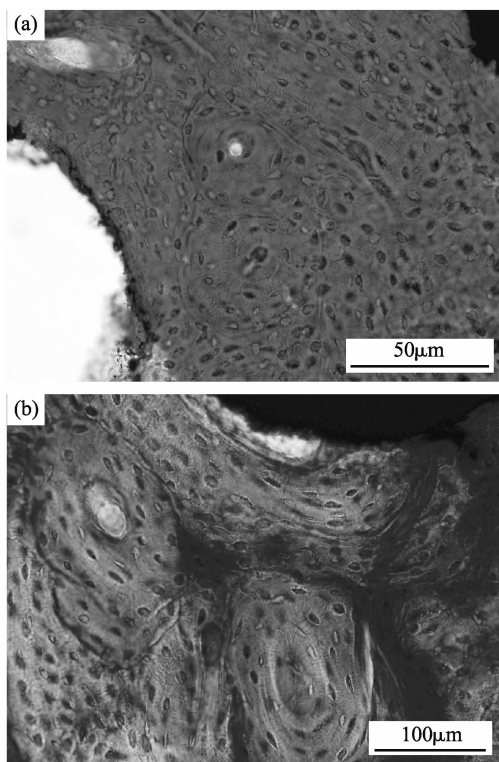


图7 泡沫SiC植入24w

Fig.7 Foam SiC after 24w implantation

(a) HE colored; (b) Toluidine blue colored

荧光四环素标记率即四环素标记表面占全部骨表面的百分比,反映了动物骨组织在标记期间的变化,显示新骨形成的活跃程度.成骨面积的定量分析则可以在一定程度上克服人为影响因素,较为客观地进行组间比较.泡沫SiC在早期的成骨速度和成骨量方面不及HA,但从8w开始就已接近HA水平,表明此时二者具有相当的成骨能力.

3 结论

采用高分子热解结合可控熔渗反应烧结方法制备了泡沫SiC,并对其进行细胞培养和动物植入试验.结果发现,MG63成骨细胞能在泡沫SiC表面贴壁粘附,并能正常生长,表明其具有良好的细胞相容性.泡沫SiC修复下颌骨缺损的远期效果与HA相当,表明泡沫SiC具有较好的骨传导性.

参考文献:

- [1] 王伟,邱蔚六,袁文化,等.应用国产消旋聚乳酸载体复合rhBMP-2和hTGF- β 1修复兔下颌骨缺损.中国口腔颌面外科杂志, 2003, **1**(3): 166-171.
- [2] Cerroni L, Filocamo R, Fabbri M, et al. Growth of osteoblast-like cells on porous hydroxyapatite ceramics: an in vitro study. *Biomolecular Engineering*, 2002, **19**(2-6): 119-124.
- [3] 包崇云,张兴栋.磷酸钙生物材料固有骨诱导性的研究现状与展望.生物医学工程学杂志, 2006, **23**(2): 442-445.
- [4] TIAN Chong, ZHANG Jinsong, CAO Xiaoming. High strength silicon carbide foams and their deformation behavior. *Mater. Sci. Technol.*, 2006, **22**(2): 269-272.
- [5] 陈治清.口腔材料学, 3版.北京:人民卫生出版社, 2003: 108-115.
- [6] 吴琳,徐兴祥,李波,等.泡沫碳化硅的生物相容性.材料研究学报, 2008, **22**(1): 58-62.
- [7] Schmitz J P, Hollinger J O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial Nonunions. *Clini. Orthop. Rel. Res.*, 1986, **205**: 299-308.
- [8] 荣小芳,吴琳,杨晓东,等.兔下颌骨临界骨缺损人工材料植入实验动物模型的建立.中国医科大学学报, 2008, **37**(1): 62-64.