

# 骨碎补载入对磷酸钙骨水泥性能的影响及体外生物学评价

姜晓鑫<sup>1</sup>, 屈树新<sup>2</sup>, 林孙忠<sup>2</sup>, 段可<sup>2</sup>, 翁杰<sup>2</sup>

(西南交通大学 1. 生命科学与工程学院, 2. 材料科学与工程学院, 材料先进技术教育部重点实验室, 成都 610031)

**摘 要:** 通过在湿法合成的二水磷酸氢钙膏体中加入中药骨碎补的提取物, 作为磷酸钙骨水泥(Calcium Phosphate Cement, CPC)原料之一, 分别制备 0、5wt%、10wt%和 15wt%的载骨碎补磷酸钙骨水泥. 采用 Gilmore 针、X 射线衍射仪、红外光谱仪、万能材料试验机、扫描电子显微镜和紫外分光光度计研究载骨碎补 CPC 的理化性能和药物释放; 体外培养 MC-3T3 成骨细胞, 进行 Alamar Blue 和碱性磷酸酶检测, 研究载骨碎补 CPC 对成骨细胞增殖和分化的影响, 扫描电子显微镜观察细胞形貌. 结果表明: 随骨碎补浓度的增加, CPC 凝结时间明显延长, 其抗压强度显著提高; 骨碎补促进初期 CPC 的水化, 却阻碍了  $\alpha$ -磷酸三钙的转化, 且随骨碎补浓度增大作用愈明显, 骨碎补不影响 CPC 水化后的相成分; 含骨碎补 CPC 的微观形貌中出现片状和针状晶体, 结构较空白 CPC 更加致密; 药物释放分为突释和缓释两个阶段, 符合 Higuchi 基质扩散释放模型; 载骨碎补 CPC 对成骨细胞的作用呈剂量和时间依赖关系, 培养 5d 时浓度为 5wt%和 10wt%的 CPC 较明显地促进细胞增殖, 7d 时载骨碎补 CPC 的细胞增殖较稳定, 细胞分化能力无显著性差异; 成骨细胞在载骨碎补 CPC 表面生长形态良好, 表明该材料具有较好的生物相容性.

**关 键 词:** 磷酸钙骨水泥; 骨碎补; 理化性能; 生物相容性

中图分类号: TB321

文献标识码: A

## Influence of Drynaria on Physicochemical and *in vitro* Biological Properties of Calcium Phosphate Cement

JIANG Xiao-Xin<sup>1</sup>, QU Shu-Xin<sup>2</sup>, LIN Sun-Zhong<sup>2</sup>, DUAN Ke<sup>2</sup>, WENG Jie<sup>2</sup>

(1. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 2. Key Lab of Advanced Technologies of Materials, Ministry of Education, School of Material Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

**Abstract:** The extract of drynaria, a traditional Chinese medical herb, was added into dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) with concentration of 5wt%, 10wt% and 15wt% to form drug-loaded calcium phosphate cement (CPC). The effects of drynaria on the physicochemical properties and drug release behavior of CPC were characterized by Gilmore needle tests, X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), compressive tests, scanning electron microscope (SEM) and UV-Vis spectrophotometry (UV-Vis). The effects of drynaria-loaded CPC on the morphology, proliferation, and differentiation of MC-3T3 osteoblast were evaluated by SEM, Alamar blue assay, and alkaline phosphatase assay, respectively. It was found that the addition of drynaria increased the setting time and compressive strength of CPC in dose-dependent manners. The addition of drynaria also accelerated the initial hydration of CPC, but inhibited the subsequent conversion of  $\alpha$ -tricalcium phosphate, which were closely related to the concentration of drynaria. In comparison, the phases of CPC hydration products were not affected by drynaria. Drynaria-loaded CPC consisting of platy and acicular crystals were more compact than the control CPC. The drug release profile exhibited an initial fast release stage followed by a slow release stage, which was fit to the diffusion-controlled Higuchi model. The effect of drynaria-loaded CPC on osteoblasts was time- and dose-dependent. CPC loaded with 5wt% and 10wt% drynaria significantly promoted osteoblast proliferation after

收稿日期: 2010-07-26; 收到修改稿日期: 2010-09-27

基金项目: 国家自然科学基金(30470484, 50975239); 教育部新世纪人才基金(NCET-05-0797)

National Nature Science Foundation of China(30470484, 50975239); New Century Excellent Talents in University (NCET-05-0797)

作者简介: 姜晓鑫(1984-), 女, 硕士研究生. E-mail: whjxiaoxin@163.com

通讯联系人: 屈树新, 教授. E-mail: qushuxin@swjtu.edu.cn

culture for 5d ( $P<0.01$ ). After cultured with drynaria-loaded CPC for 7d, osteoblasts proliferated steadily. Osteoblasts cultured on drynaria-loaded CPCs and control CPC showed similar differentiation. Osteoblasts with a normal morphology were observed on the surface of drynaria-loaded CPC, indicating an excellent biocompatibility.

**Key words:** calcium phosphate cement; drynaria; physicochemical properties; biocompatibility

磷酸钙骨水泥(Calcium Phosphate Cement, CPC)是由一种或多种混合均匀的磷酸钙粉末和固化液组成,二者按一定比例调和后形成膏状物,在室温或体内环境下可自行固化转变为与人体骨组织无机成分相似的羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA)<sup>[1-2]</sup>,CPC具有良好的生物相容性、生物活性、自凝固性和易塑型等优点,已作为骨修复材料被成功地应用于临床<sup>[3]</sup>.另一方面,临床填充骨缺损的同时常需给予药物以治疗骨科疾病或预防感染,通过局部药物释放的途径可减少用药量,降低药物的毒副作用和提高疗效<sup>[4]</sup>.不同于磷酸钙陶瓷,CPC的制备过程避免了高温加热,利于药物的加入,因此常作为药物载体.研究表明,CPC不仅具有优异的生物学性能,而且是良好的骨科药物载体<sup>[5-6]</sup>.

中药治疗骨科疾病或促进骨愈合等疗效显著,并且不良反应小<sup>[7]</sup>.中药骨碎补(简称 GSB)是骨伤科常用药之一,具有促进骨折愈合和补肾强骨的功效,其中柚皮苷是骨碎补接骨疗伤的主要活性成分<sup>[8-9]</sup>.Jeong等<sup>[10]</sup>研究发现骨碎补提取物能促进成骨细胞增殖和分化并可抑制骨吸收;Xu等<sup>[11]</sup>发现骨碎补培养液可明显促进人牙髓细胞的增殖.

近年来关于中药与各种磷酸钙材料复合的研究逐渐增多,Lin等<sup>[12]</sup>通过将中药骨碎补固定在磷酸氢钙表面以促进骨折愈合;姜红江等<sup>[13]</sup>通过在CPC中加入中药丹参发现丹参不影响CPC的基本理化性能;邹琴等<sup>[14]</sup>研究发现黄芪多糖对骨水泥的体外细胞相容性具有明显促进作用;苗波等<sup>[15]</sup>通过动物实验证实了羟基磷灰石/骨碎补复合材料具有良好的生物相容性并可促进骨缺损的修复.本研究选用D型磷酸钙骨水泥配方<sup>[16]</sup>,具有合适的初终凝时间和一定的力学强度,可根据临床需要任意塑型,且原料易制备.骨碎补成分复杂,与前期研究<sup>[15]</sup>不同,本研究选择具有促进骨愈合的骨碎补有效成分柚皮苷作为模型药物.本课题组前期已开展了载中药丹参CPC的制备方法、表征及不同浓度中药对CPC的影响等研究<sup>[4, 17-18]</sup>,发现药物浓度会影响CPC的凝结时间和抗压强度.但由于骨碎补与丹参成分不同,因此它对CPC的凝结时间和抗压强度的影响、骨碎补对CPC水化的影响、骨碎补与CPC间的结合以及体外释放尚不清楚,同时CPC中不同骨碎补

浓度对细胞的影响也需要研究.

本研究拟选用CPC作为骨碎补的载体材料,分别研制载不同浓度骨碎补的CPC,研究骨碎补对CPC的凝结时间和抗压强度的影响,骨碎补对CPC水化的影响以及药物释放,并通过体外成骨细胞培养考察该材料对细胞增殖和分化的作用规律,为制备符合临床应用的载骨碎补CPC提供依据.

## 1 实验部分

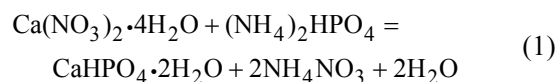
### 1.1 试剂及仪器

$\alpha$ -磷酸三钙[ $\alpha$ -TCP,  $\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ]和羟基磷灰石[HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ]购自四川大学生物材料工程研究中心;骨碎补提取物柚皮苷购自西安天园生物制剂厂;碳酸钙( $\text{CaCO}_3$ )、四水硝酸钙( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )、磷酸氢二铵[( $\text{NH}_4$ ) $_2\text{HPO}_4$ ]、十二水磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )和二水磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )均为分析纯,购自成都市科龙化工试剂厂;二水磷酸氢钙( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , DCPD)为本实验室自制; $\alpha$ -MEM培养基( $\alpha$ -MEM culture medium, BioSource, USA);Alamar Blue(Biosource, USA);Triton X-100(Sigma-Aldrich, USA);4-硝基苯磷酸二钠盐(4-nitrophenyl phosphate disodium salt, 4-NPP, Sigma-Aldrich, USA).

X射线衍射仪(XRD,  $\chi$ 'Pert Pro, Philips, Netherlands);万能材料力学试验机(5567, Instron, USA);傅立叶红外光谱分析仪(FTIR, 5700, Nicolet, USA);扫描电子显微镜(SEM, Quanta 200, Philips, the Netherlands);紫外可见分光光度计(UV-2550, Shimadzu, Japan);酶标仪( $\mu$ -Quant, Bio-Tek Instruments, USA).

### 1.2 材料制备

(1)载骨碎补二水磷酸氢钙( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , DCPD)的制备:采用分析纯  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  和  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,按照  $n(\text{Ca})/n(\text{P})=1.0$  分别配制溶液,溶解并过滤,向搅拌的  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  溶液中缓慢滴加  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  溶液,调节 pH 在 5.0~6.0 之间,合成 DCPD,化学反应方程式如式(1)所示.



将反应后的沉淀室温静置 24 h, 清洗, 抽滤, 平均分为四等份, 分别载入 0、5wt%、10wt%和 15wt%的骨碎补, 依次标记为: CPC-Blank、CPC-5wt%GSB、CPC-10wt%GSB 和 CPC-15wt%GSB, 磁力搅拌器搅拌均匀, 置于鼓风干燥箱 60℃烘干, 研磨, 制备空白 DCPD 和载骨碎补 DCPD。

(2)载骨碎补 CPC 的制备 采用 D 型磷酸钙骨水泥配方<sup>[16]</sup>: 固相为  $\alpha$ -TCP (58 wt%)、 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (25wt%)、HA (8.5wt%)和  $\text{CaCO}_3$  (8.5wt%)粉末混合而成; 液相为磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Solution, PBS): 配制浓度均为 0.2mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  溶液, 二者等体积混合, 调节 pH=7.4. 将充分混匀的 CPC 固相粉末与液相按液固比 0.3 mL/g 调和均匀, 膏体填入圆柱形模具中塑型, 底端压平, 样品脱模, 置于温度为 37℃、相对湿度为 100%的恒温水浴振荡器内水化 24h, 制备载不同浓度骨碎补的 CPC 和空白 CPC(CPC-Blank)。

### 1.3 性能表征及体外药物释放

(1)CPC 凝结时间测试: 采用 Gilmore 双针法测量载药 CPC 的初凝时间(Initial Time, IT)和终凝时间(Final Time, FT)<sup>[19]</sup>, 每隔 15 s 测一次, 每组测六个样品, 进行统计学分析。

(2)XRD 分析: 分别将 CPC 固相粉末、水化 24 h 及浸泡 15 d 的 CPC 置于鼓风干燥箱 60℃烘干, 研磨, 过筛( $\phi 74 \mu\text{m}$ ), 制样. 采用 X 射线衍射仪分析三个不同阶段骨碎补对 CPC 相成分的影响. 测定参数: 铜靶, 电压 40 kV, 电流 40 mA, 扫描范围:  $2\theta=4^\circ \sim 60^\circ$ 。

(3)抗压强度测试: 采用万能材料试验机测试载不同浓度骨碎补 CPC 水化 24 h 和浸泡 15 d 后 CPC 的抗压强度, 样品尺寸为  $\phi 8 \text{ mm} \times 16 \text{ mm}$ , 施加载荷速度为 0.5 mm/min. 同样条件下每组测六个样品, 进行统计学分析。

(4)FTIR 分析: 将载 15%骨碎补的 CPC 浸泡 15 d 前后的样品按照约 1: 100 的比例与溴化钾(KBr)均匀混合, 研磨, 压片, 进行傅立叶红外光谱分析。

(5)微观形貌: 分别将水化 24 h 和浸泡 15 d 的 CPC 样品于 60℃烘干, 切开得到自然断面, 用导电胶将样品固定在铜托盘上, 喷金. 采用扫描电镜观察 CPC 断面的微观形貌。

(6)体外药物释放: 将载不同浓度骨碎补的 CPC 水化 24 h 后按每 1 g CPC 片状样品加入 30 mL PBS, 置于温度为 37℃、相对湿度为 100%的恒温水浴振荡器内, 调节振荡速率为 100 r/min<sup>[4]</sup>. 定时取出 2 mL

溶液, 并补充 2 mL PBS, 采用紫外-可见分光光度计在  $\lambda=280.5 \text{ nm}$  处测定各释放液的吸光度值, 以 PBS 缓冲液作为空白对照, 根据标准曲线计算药物的累积释放浓度。

### 1.4 体外生物学性能评价

将载骨碎补 CPC 片状样品, 用 PBS 浸泡 48 h, 60℃烘干, 每组 6 个样品, CPC-Blank 作为对照, 灭菌后置于 24 孔培养板, 将浓度为  $3 \times 10^4$  的 MC-3T3 成骨细胞接种于试样表面, 每孔加 1 mL  $\alpha$ -MEM 培养基, 于 37℃、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养, 隔日换液。

(1)Alamar Blue 检测: 按 Alamar Blue: 无酚红培养基: 胎牛血清= 8: 1: 1 的体积比配制 Alamar Blue 工作液. 在细胞培养 3、5 和 7 d 后, 吸弃旧培养基, PBS 冲洗 2 次, 每孔加入 500  $\mu\text{L}$  Alamar Blue 工作液, 于  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 3 h, 每孔取 200  $\mu\text{L}$  置 96 孔培养板, 酶标仪 570~600 nm 波长处测吸光度值。

(2)细胞分化能力测定: 在细胞培养 7 d 后, 弃去 Alamar Blue 培养液, 用 PBS 冲洗 2 次, 每孔加入 500  $\mu\text{L}$  0.1%的 Triton X-100, 置-20℃冰箱中反复冻融 3 次以完全裂解细胞, 将细胞裂解液按 100  $\mu\text{L}$ /孔转入 96 孔酶标板中, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  4-NPP, 混匀, 待反应 20 min 后, 酶标仪 405~510 nm 波长处测吸光度值。

(3)细胞形貌: 将载骨碎补 CPC 与成骨细胞共培养 3 d 后, 2.5%戊二醛固定, 乙醇梯度脱水, 再用乙酸乙酯脱醇, 经真空干燥后喷金, 扫描电镜观察。

## 2 结果与讨论

### 2.1 载骨碎补 CPC 的初凝和终凝时间

图 1 为载不同浓度骨碎补 CPC 的初终凝时间, 由图可知, CPC 的 IT 和 FT 均随骨碎补含量的增加而延长, CPC-5wt%GSB 与 CPC-Blank 无显著性差异, 而 CPC-10wt%GSB 和 CPC-15wt%GSB 与 CPC-Blank 之间有极显著性差异( $p<0.01$ )。图 2 为骨碎补主要成分柚皮苷的化学结构式<sup>[20]</sup>, 其中含有-OH 和- $\text{CH}_3$  等大量极性基团, 根据文献这些基团对钙磷盐具有较高的亲和性<sup>[21]</sup>。当 CPC 固相与液相混合时, 由于 DCPD 的溶解度较其它钙磷盐的溶解度大, 水化初期可能先发生溶解, 溶解出的骨碎补可能会吸附在 CPC 的其它磷酸钙盐晶体表面, 掩盖了水化反应的部分活性位点, 阻断了磷酸钙盐的结合, 因此载骨碎补的 CPC 凝结时间较 CPC-Blank 有所延长, 且载药浓度越大凝结时间越长. 凝结时间是 CPC 的

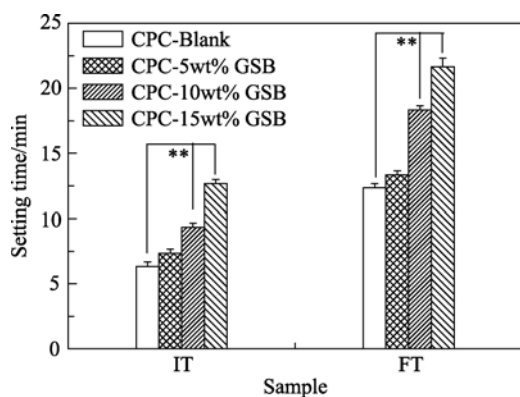


图1 载不同浓度骨碎补的CPC初终凝时间

Fig. 1 Initial and final setting time of CPC loaded with different contents of GSB(\*\* $p < 0.01$ )

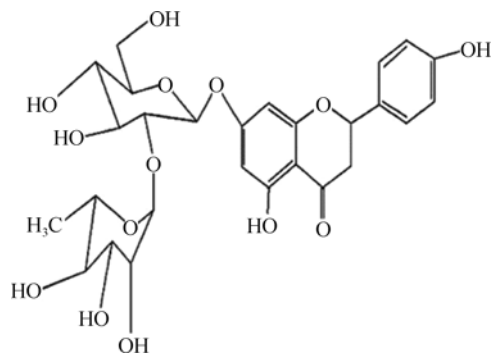


图2 骨碎补主要成分(柚皮苷)的化学结构式<sup>[20]</sup>

Fig. 2 Chemical structure of the main constituent of dry-naria<sup>[20]</sup>

一个重要性能, 决定了手术可操作性, 骨科手术对CPC 凝结时间的基本要求为:  $4 \text{ min} \leq \text{IT} \leq 8 \text{ min}$ ,  $10 \text{ min} \leq \text{FT} \leq 15 \text{ min}$ <sup>[22]</sup>. CPC-Blank 和 CPC-5wt%GSB 基本符合要求, 而 CPC-10wt%GSB 和 CPC-15wt%GSB 凝结时间超出了临床应用范围, 因此在湿法合成 DCPD 的过程中载入骨碎补的浓度范围最好不应超过 5wt%, 另外也可考虑通过其它途径在 CPC 中添加药物以进一步优化载药浓度.

## 2.2 载骨碎补CPC的XRD分析

图3为载不同浓度骨碎补CPC的固相粉末、水化24h及浸泡15d后的XRD图谱. 从图3(a)可见, 载药CPC固相粉末含有HA、DCPD、 $\alpha$ -TCP和 $\text{CaCO}_3$ 四种相成分. 载药后DCPD(PDF#090077)粉末衍射峰的主极大( $2\theta = 11.69^\circ$ )强度明显减弱, 但随骨碎补含量的增加没有发生明显的变化. 本研究中的骨碎补是在湿法合成的DCPD膏体中加入, DCPD晶体已经成核, 加入的骨碎补可能吸附在DCPD晶体表面并抑制其生长, 但具体作用机理尚不清楚. 图3(b)为载骨碎补CPC水化24h的XRD图谱, 最高的衍射峰对应 $\alpha$ -TCP(PDF#090348)衍射

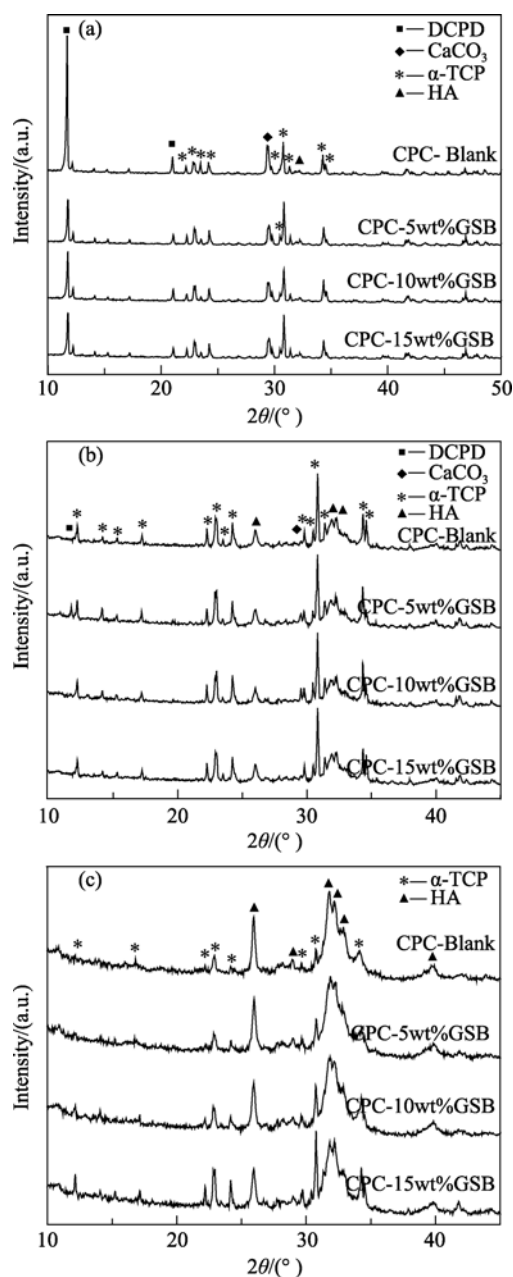


图3 载不同浓度骨碎补CPC水化前(a)、水化后(b)及浸泡15d后(c)的XRD图谱

Fig. 3 XRD patterns of CPC loaded with various contents of GSB before hydration(a), after hydration(b) and after drug release for 15 d(c)

峰的主极. 与水化前的XRD图谱相比, 空白和含5wt%骨碎补的CPC水化24h后DCPD和 $\text{CaCO}_3$ (PDF#240027)的衍射峰明显下降, 含10wt%和15wt%骨碎补的CPC水化24h后DCPD的衍射峰消失, 含15wt%骨碎补的CPC水化24h后 $\text{CaCO}_3$ 的衍射峰也消失, 而HA(PDF#090432)的衍射峰明显上升, 水化初期随着骨碎补的加入和含量增加, 明显促进DCPD和 $\text{CaCO}_3$ 衍射峰降低或消失, 并向热力学稳定的HA转化, 但 $\alpha$ -TCP的衍射峰没有明显的变化.

沈卫等<sup>[23]</sup>研究表明 CPC 水化前期的反应动力学由原料粉末的溶解控制, 本研究所选择的 CPC 起始固相成分中, 在 pH=7.4 的中性条件下, DCPD 和  $\text{CaCO}_3$  的溶解度较其它磷酸钙盐的大, 因此 CPC 早期水化主要由 DCPD 和  $\text{CaCO}_3$  的溶解所控制. 图 3(c)显示载骨碎补 CPC 浸泡 15 d 后的相成分主要为 HA 和少许未转化的  $\alpha$ -TCP, 与图 3(b)相比,  $\alpha$ -TCP 衍射峰强度明显降低, 而 HA 的衍射峰显著增高, 但随骨碎补浓度的增加,  $\alpha$ -TCP 的衍射峰依次增强, 而 HA 的衍射峰依次减弱. 本研究中骨碎补是载入 DCPD 中, 随着 CPC 水化初期 DCPD 的溶解而释放, 而 CPC 中含量最多的  $\alpha$ -TCP 相对于其它成分而言比表面积较大<sup>[24]</sup>, 释放出的骨碎补可能被  $\alpha$ -TCP 表面吸附, 导致  $\alpha$ -TCP 向 HA 的转化较慢, 随载药量增加,  $\alpha$ -TCP 表面骨碎补吸附量增多, 所以 CPC 中骨碎补含量愈大, 残留的  $\alpha$ -TCP 愈多, 对应的  $\alpha$ -TCP 衍射峰强度愈高.

### 2.3 骨碎补对 CPC 抗压强度的影响

图 4 为载骨碎补 CPC 水化 24 h 和浸泡 15 d 的抗压强度随载药量变化图, 如图所示, 随着载药浓度的增大, 水化 24 h 和浸泡 15 d 的载药 CPC 抗压强度均有所提高, 载不同浓度骨碎补的 CPC 抗压强度与空白组比较有极显著性差异( $p < 0.01$ ). 与水化 24 h 的 CPC 相比浸泡 15 d 后各对应载药浓度的 CPC 抗压强度明显增高, 并有显著性差异, 浸泡 15 d 后抗压强度约比浸泡前提高了 12%. 根据 XRD 分析结果, 在 CPC 水化初期(24h 以前)骨碎补的存在可促进 DCPD 和  $\text{CaCO}_3$  等成分的溶解和转化, 使局部  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高<sup>[25]</sup>, 有利于沉积生成 HA, 并随载药浓度的增加而增加. 郜成莹等<sup>[26]</sup>通过对庆大霉素磷酸钙骨水泥的研究发现加入海藻酸钠样品的抗压强

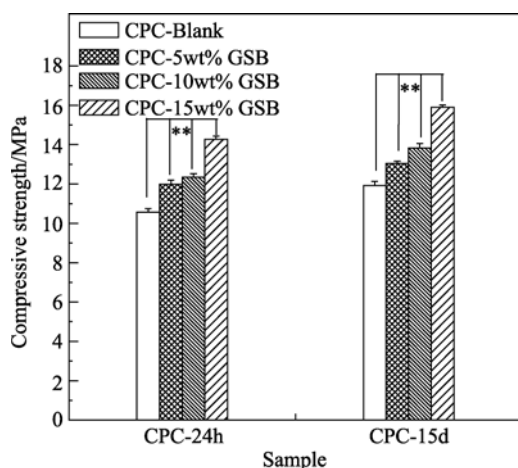


图 4 载不同浓度骨碎补 CPC 的抗压强度

Fig. 4 Compressive strength of drug-loaded CPC with various drug contents (\*\* $p < 0.01$ )

度略高于其它样品, 海藻酸钠起到减水剂的作用, 使骨水泥的稠度增大, 导致样品抗压强度有所提高. 骨碎补易溶于水, 吸水后具有粘性, 因此将 CPC 固相与液相调合后, 骨碎补可能也起到“减水”的作用, 增大了 CPC 的稠度, 形成更加致密的结构, 从而提高了抗压强度.

### 2.4 载药 CPC 的 FTIR 分析

图 5 为 CPC-15wt%GSB 体外释放前后在 400~4000  $\text{cm}^{-1}$  范围内的红外吸收图谱. 在载药 CPC 体外释放前的 FTIR 图谱中可发现骨碎补的红外特征吸收峰:  $\text{C}=\text{O}$  的伸缩振动(1640  $\text{cm}^{-1}$ )、苯环的骨架振动(1450  $\text{cm}^{-1}$ )、芳香- $\text{CH}_3$  的不对称伸缩振动(2930  $\text{cm}^{-1}$ )、 $=\text{CH}$  的面内弯曲振动(714  $\text{cm}^{-1}$ )、 $-\text{OH}$  的面内变形振动(1340  $\text{cm}^{-1}$ ), 随着骨碎补的释放, 各种基团含量随之减少, 由于  $-\text{OH}$  和  $=\text{CH}$  的振动较弱, 所以释放后基本看不到  $-\text{OH}$  和  $=\text{CH}$  的吸收峰, 而  $\text{C}=\text{O}$  和  $\text{C}=\text{C}$  的伸缩振动较强, 释放后仍存在  $\text{C}=\text{O}$  和  $\text{C}=\text{C}$  的吸收峰, 但强度有所减弱. 同时可看出, 释放前后均出现了  $\text{PO}_4^{3-}$  的红外特征吸收峰(1042、962、600、560  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>[27]</sup>, 表明药物的载入没有改变 CPC 中相成分的官能团. 释放后磷酸钙盐吸收峰的位置均未发生偏移, 说明骨碎补的加入对磷酸钙基团的影响较小.

### 2.5 扫描电镜观察

图 6 为水化 24 h 与浸泡 15 d 的 CPC-Blank 和 CPC-15wt%GSB 断面 SEM 图片. 图 6(a<sub>1</sub>)~(a<sub>2</sub>)和图 6(b<sub>1</sub>)~(b<sub>2</sub>)分别为水化 24 h 的 CPC-Blank 和 CPC-15wt%GSB 断面的微观形貌, 图 6(c<sub>1</sub>)~(c<sub>2</sub>)和图 6(d<sub>1</sub>)~(d<sub>2</sub>)分别为浸泡 15 d 的 CPC-Blank 和 CPC-15wt%GSB 断面的微观形貌. 可以看出, 水化 24 h 的 CPC-Blank 颗粒比较大且分布疏松无序, 颗粒间存在大的孔洞(如箭头所示), 这些颗粒可能主要是

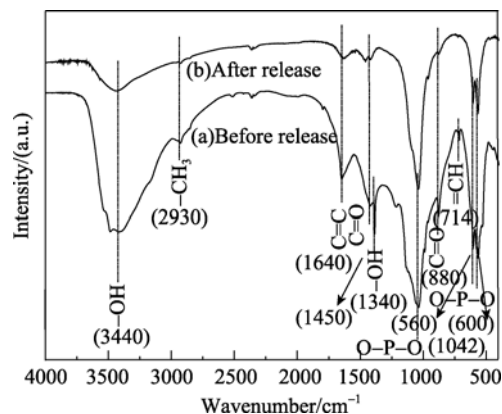


图 5 载药量为 15wt% 的 CPC 药物释放前后的红外图谱

Fig. 5 FTIR spectra of CPC loaded with 15wt% drynaria before and after drug release

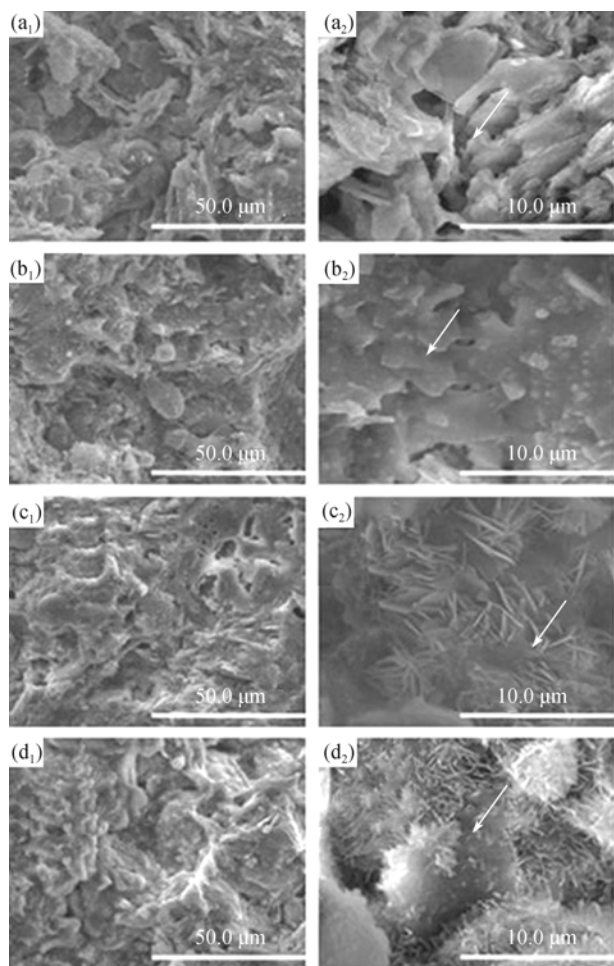


图 6 不同 CPC 样品的 SEM 照片

Fig. 6 SEM images of different CPC samples

- (a<sub>1</sub>)–(a<sub>2</sub>): blank CPC after hydration for 24 h;  
 (b<sub>1</sub>)–(b<sub>2</sub>): CPC-15wt% GSB after hydration for 24 h;  
 (c<sub>1</sub>)–(c<sub>2</sub>): blank CPC after immersion for 15 d;  
 (d<sub>1</sub>)–(d<sub>2</sub>): CPC-15wt% GSB after immersion for 15 d

CPC 的起始原料; 水化 24 h 的含骨碎补 CPC 颗粒较致密, 高倍图片中可见颗粒形貌呈薄片状, 且在片状结构上出现了很多点状沉积物(如箭头所示), 多个薄片状颗粒联结组成了大颗粒, 推测是水化过程形成了新的钙磷盐; 浸泡 15 d 的 CPC-Blank 颗粒形状更加规整, 颗粒间出现了许多细小的孔隙, 可能是原料成分溶解或转化后留下的, 晶体形貌以排列紧密的形似花瓣的片状结构为主(如箭头所示); 浸泡 15 d 的含骨碎补 CPC 与 CPC-Blank 相比颗粒间的孔隙明显减少, 颗粒排列致密, 多呈细小的针状晶(如箭头所示), 晶体间形成相互交织的网状结构, 由于药物释放后留下的空穴为 HA 晶体的生长提供了空间, 晶体生长更加致密<sup>[28]</sup>, 这可能是导致载骨碎补 CPC 抗压强度增高的原因之一。

## 2.6 药物体外模拟释放

图 7 为载不同浓度骨碎补 CPC 的体外累积释放

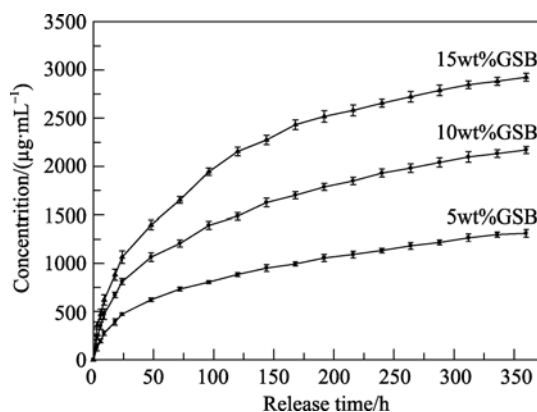


图 7 不同载药量的 CPC 药物累积释放量与时间关系

Fig. 7 Cumulative release of GSB from CPC with different contents of GSB with time

图, 可以看出, 不同载药量的 CPC 释放曲线相似, 主要存在两个明显的释放阶段, 前 48 h 骨碎补的突释阶段和 48 h 之后的稳定释放阶段, 载不同浓度骨碎补 CPC 突释阶段的早期释放速率和释放量不同, 同一时间点的释放速率和释放量均随载药浓度的增加而增大。在突释阶段, 骨碎补的释放速率较快, 这主要是吸附在 CPC 表层的骨碎补的扩散释放, 开始溶液中药物浓度低, 药物扩散相对容易, 而 48 h 之后药物释放逐渐进入平缓期, 释药速率渐趋缓慢并可延续较长一段时间, 推测原因可能是随着 CPC 表层中骨碎补的释放, 溶液中药物浓度逐渐增大, 不饱和度降低, 从而导致释放速率减慢, 而且 CPC 内层的骨碎补需要较长和适当的途径才能扩散至溶液中, 因此, 骨碎补释放速率减慢, 并趋于稳定。另外, 黄粤等<sup>[21]</sup>研究发现随着药物的释放, CPC 发生溶解沉积的再水化过程, HA 可以重结晶, 微孔之间的通道随之不断调整, 从而使微孔结构更为致密, 导致药物释放速率下降并保持相对稳定, 因此初期骨碎补的释放速率明显大于后期释放速率。

本研究将载药 CPC 固相粉末与液相均匀调和, 药物均匀分散在 CPC 固化体中, 因此属于均相基质释放体系<sup>[28]</sup>。Higuchi 等<sup>[29]</sup>对基体型药物扩散控制体系进行了研究, 并建立了该体系的一维假稳态传质动力学模型:

$$M_t = AM_0 \left[ \frac{D'\varepsilon}{\tau} C_s (2C_0 - \varepsilon C_s) t \right]^{1/2} \quad (2)$$

式(2)中  $M_t$  为溶质在  $t$  时刻释放量;  $A$  为传质面积;  $M_0$  为溶质的释放总量;  $D'$  为溶质扩散系数;  $\varepsilon$  为孔隙率;  $\tau$  为微孔曲折度因子;  $C_s$  为溶质溶解度;  $C_0$  为溶质浓度。根据公式(2), 药物在基体中的释放量  $M_t$  与时间的平方根  $t^{1/2}$  呈正比。图 8 为载 5wt%、10wt%、15wt% 骨碎补的 CPC 药物释放量与时间平方根关系

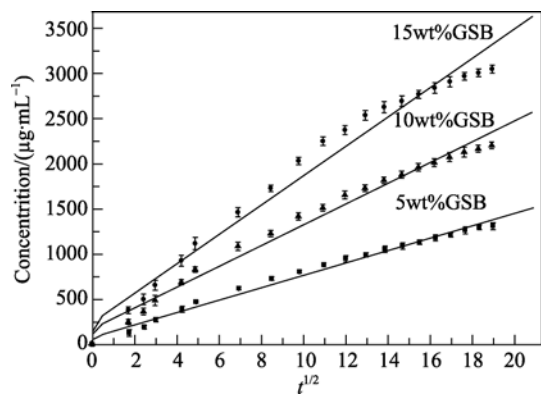


图 8 药物累积释放量与时间平方根关系

Fig. 8 Cumulative release of GSB from CPC against the square root of time

图, 如图所示, 药物的累积释放量与时间的平方根成正比, 说明 CPC 中骨碎补的释放符合 Higuchi 模型。

## 2.7 载骨碎补 CPC 体外生物相容性评价

图 9 为经载骨碎补 CPC 培养的成骨细胞增殖及分化情况。Alamar Blue 是一种无细胞毒性的活体染料, 具有不用破坏微囊结构就可在不同时间检测同

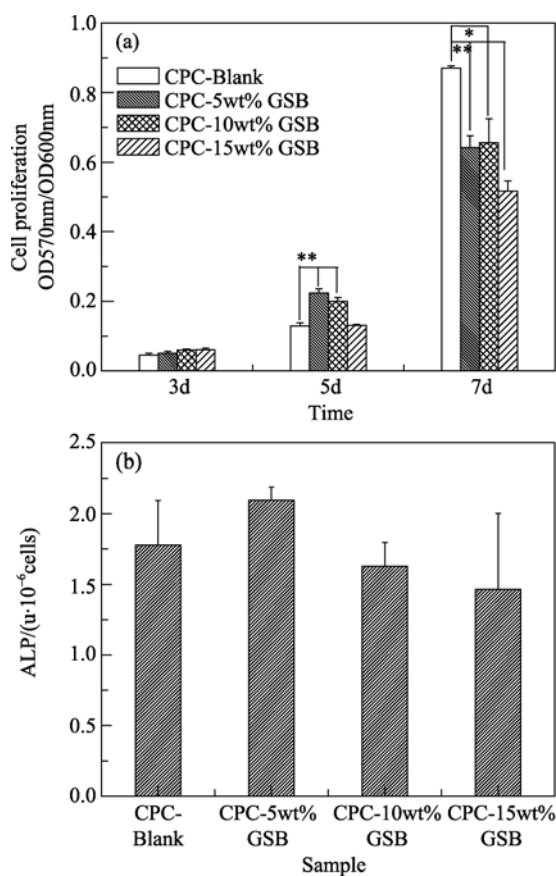


图 9 载骨碎补 CPC 培养细胞的增殖(a)和分化(b)

Fig. 9 Osteoblastic proliferation (a) and differentiation (b) of MC-3T3 cells cultured in the presence of different CPC samples

一批细胞活性和增殖的优点, 因此, 本研究用此方法检测同一批成骨细胞经同一试样培养, 不同时间点的成骨细胞增殖<sup>[30]</sup>。图 9(a)为培养 3、5 和 7 d 的 Alamar Blue 检测结果。在培养 3d 时, 与空白对照相比, 载骨碎补 CPC 促进细胞增殖, 且随载药浓度增大作用愈明显, 但无显著性差异( $p>0.05$ ); 培养至第 5 d, CPC-5wt%GSB 和 CPC-10wt%GSB 非常明显地促进细胞增殖, 与空白对照存在极显著性差异( $p<0.01$ ), 而 CPC-15wt%GSB 作用不明显, 说明载骨碎补 CPC 对细胞增殖的促进作用存在剂量依赖关系; 培养至第 7d, 各载药 CPC 对成骨细胞增殖的促进作用减弱, 细胞增殖基本趋于稳定, CPC-5wt%GSB 和 CPC-15wt%GSB 与空白对照有极显著性差异( $p<0.01$ ), CPC-10wt%GSB 呈显著性差异( $p<0.05$ ), 可见载骨碎补 CPC 对细胞增殖的促进作用存在时间依赖关系。

图 9(b)为培养 7 d 的 ALP 活性检测结果。ALP 是成骨细胞分泌的一种特异性很高的酶蛋白, 是成骨细胞分化成熟的重要标志之一, ALP 活性的高低与成骨细胞的分化呈正相关<sup>[8]</sup>。与空白对照相比, CPC-5wt%GSB 更利于细胞的分化, 而 CPC-10wt%GSB 和 CPC-15wt%GSB 培养的细胞分化能力相对较弱, 但与空白对照均无显著性差异( $p>0.05$ )。从以上结果来看, CPC-5wt%GSB 培养的成骨细胞增殖和分化能力较好, 与范婧蓉等<sup>[8]</sup>关于骨碎补在一定浓度内促进成骨细胞增殖和分化的结论相吻合。

图 10 为载骨碎补 CPC 与成骨细胞共培养 3 d 的扫描电镜图, 图 10(a)~(d)依次为 CPC-Blank、CPC-5wt%GSB、CPC-10wt%GSB 和 CPC-15wt%GSB。由于观察视野的局限性, CPC-Blank 表面难以发现细

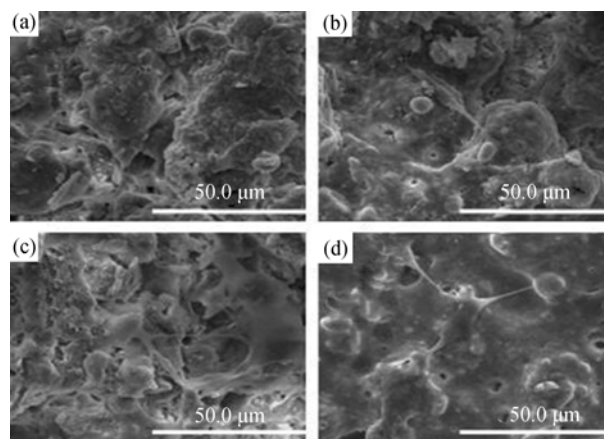


图 10 载骨碎补 CPC 与成骨细胞培养 3d 的 SEM 照片

Fig. 10 SEM photographs of osteoblasts compounding with CPC loaded with GSB cultured for 3 d

(a) CPC-Blank; (b) CPC-5wt%GSB; (c) CPC-10wt%GSB; (d) CPC-15wt%GSB



胞, 载骨碎补 CPC 表面均附着有生长形态良好的成骨细胞, 细胞形态各异. 图 10(b)中细胞伸展成短梭形, 细胞数目较少, 图 10(c)中细胞在 CPC 材料表面铺展生长, 体积较大, 并可见从胞体伸展出长短不一的伪足粘附于 CPC 表面, 细胞之间通过伪足相连, 图 10(d)同样可见类似的细胞铺展状态, 可见成骨细胞能在该材料上正常生长, 说明载骨碎补 CPC 具有较好的生物相容性. 考虑后期将该材料植入动物体内以研究其体内的生物相容性及对成骨能力的影响.

### 3 结论

通过对载骨碎补 CPC 的研究发现:

1) 随骨碎补浓度的增加, CPC 的初终凝时间均延长, CPC-5wt%GSB 凝结时间符合临床要求; 力学性能显著提高, 并随骨碎补浓度增加而增加; 骨碎补的加入利于 CPC 初期的水化, 且不改变水化产物的相成分; 含骨碎补 CPC 水化 24 h 和浸泡 15 d 的微观结构均比 CPC-Blank 致密.

2) 药物释放分为突释和缓释两个阶段, 释放行为与 Higuchi 基质扩散释放模型相吻合.

3) 载骨碎补 CPC 促进了成骨细胞的增殖, 并存在剂量和时间依赖关系; 培养 7 d 的细胞分化能力无显著性差异; 载骨碎补 CPC 利于细胞的粘附和生长.

本实验证实了载骨碎补 CPC 具有良好的生物活性和生物相容性, 有潜在的应用前景.

### 参考文献:

- [1] Li J, Hashida Toshiyuki. Preparation of hydroxyapatite ceramics by hydrothermal hot-pressing method at 300°C. *J. Mater. Sci.*, 2007, **42(13)**: 5013–5019.
- [2] Xu H H K, Carey L E, Simon Jr C G, *et al.* Premixed calcium phosphate cements: synthesis, physical properties, and cell cytotoxicity. *Dental Materials*, 2007, **23(4)**: 433–441.
- [3] Vlad M D, Sindilar E V, Mariñoso M L, *et al.* Osteogenic biphasic calcium sulphate dihydrate/iron-modified  $\alpha$ -tricalcium phosphate bone cement for spinal applications: *in vivo* study. *Acta Biomaterialia*, 2010, **6(2)**: 607–616.
- [4] 李茂红, 屈树新, 姚宁, 等. 含丹参磷酸钙骨水泥的制备和表征. *生物医学工程与临床*, 2005, **9(3)**: 132–135.
- [5] Ginebra M P, Traykova T, Planell J A. Calcium phosphate cements: competitive drug carriers for the musculoskeletal system? *Biomaterials*, 2006, **27(10)**: 2171–2177.
- [6] Okada S, Ito H, Nagai A, *et al.* Adhesion of osteoblast-like cells on nanostructured hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia*, 2010, **6(2)**: 591–597.
- [7] 常德有, 杨靖, 董福慧. 四种中药对体外培养大鼠成骨细胞增殖分化功能的影响. *辽宁中医杂志*, 2009, **36(8)**: 1420–1422.
- [8] 范婧蓉, 韩博, 李禹涛. 骨碎补水提液对大鼠成骨细胞的影响. *中国兽医杂志*, 2009, **45(2)**: 13–15.
- [9] 高颖, 王新雷, 王乃利, 等. 骨碎补中的化学成分. *中国药物化学杂志*, 2008, **18(4)**: 284–287.
- [10] Jeong J C, Lee J W, Yoon C H, *et al.* Stimulative effects of drynariae rhizoma extracts on the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Ethnopharmacology*, 2005, **96(3)**: 489–495.
- [11] Xu Y Z, Gao Y B, Guo J J, *et al.* Effects of different concentrations of rhizoma drynariae decoction on proliferation and differentiation as well as ultrastructural change of human dental pulp cells cultured *in vitro*. *J. Clin. Rehabil. Tissue Eng. Res.*, 2009, **13(2)**: 324–328.
- [12] Sun J S, Dong G C, Lin C Y, *et al.* The effect of Gu-Sui-Bu (drynaria fortunei J.Sm) on bone cell activities. *Biomaterials*, 2002, **23(16)**: 3377–3385.
- [13] 姜红江, 黄相杰, 谭远超, 等. 磷酸钙骨水泥复方丹参缓释体的制备及性能评价. *中国修复重建外科杂志*, 2007, **21(10)**: 1113–1117.
- [14] 邹琴, 张利, 左奕, 等. 载黄芪多糖骨水泥的理化性能及体外细胞相容性研究. *功能材料*, 2008, **39(9)**: 1515–1521.
- [15] 苗波, 隋长德, 李慕勤, 等. 羟基磷灰石/骨碎补复合材料修复骨缺损的实验研究. *黑龙江医药科学*, 2009, **32(2)**: 3–4.
- [16] Oreffo R O C, Driessens F C M, Planell J A, *et al.* Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 1998, **19(20)**: 1845–1854.
- [17] Qu S X, Weng J, Feng B, *et al.* Preliminary study of calcium phosphate immobilized with Chinese medicine. *J. Mater. Sci.* 2005, **40(11)**: 3035–3037.
- [18] 李茂红, 屈树新, 姚宁, 等(LI Mao-Hong, *et al.*). 载不同浓度香丹注射液磷酸钙骨水泥性能研究. *无机材料学报(Journal of Inorganic Materials)*, 2010, **25(5)**: 507–511.
- [19] Khairoun I, Driessens F C M, Boltong M G, *et al.* Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 1999, **20(4)**: 393–398.
- [20] Chang E J, Lee W J, Cho S H, *et al.* Proliferative effects of flavan-3-ols and propelargonidins from rhizomes of drynaria fortunei on MCF-7 and osteoblastic cells. *Arch Pharm Res.* 2003, **26(8)**: 620–630.
- [21] 黄粤, 刘昌胜, 邵慧芳, 等. 萘普生钠/磷酸钙骨水泥药物缓释体系的研究. *药学报*, 2005, **35(1)**: 44–47.
- [22] Khairoun I, Boltong M G, Driessens F C M, *et al.* Effect of calcium carbonate on the compliance of an apatitic calcium phosphate bone cement. *Biomaterials*, 1997, **18(23)**: 1535–1539.
- [23] 沈卫, 刘昌胜, 顾燕芳, 等(SHEN Wei, *et al.*). 磷酸钙骨水泥的水化反应机理研究. *无机材料学报(Journal of Inorganic Materi-*



- als), 1996, **11(4)**: 685–690.
- [24] 郭悦华, 屈树新, 李茂红, 等(GUO Yue-Hua, *et al*). 载双组分药物磷酸钙骨水泥的性质和体外释放行为. 硅酸盐学报(Journal of the Chinese Ceramic Society), 2010, **38(3)**: 472–477.
- [25] 刘昌胜, 刘子胜, 潘颂华(LIU Chang-Sheng, *et al*). 磷酸钙骨水泥的水化放热行为. 硅酸盐学报(Journal of the Chinese Ceramic Society, 2000), **28(6)**: 501–506.
- [26] 郜成莹, 叶建东. 添加剂和载药方法对庆大霉素/磷酸钙骨水泥载药体系性能及药物体外释放的影响. 硅酸盐通报, 2008, **27(2)**: 225–229.
- [27] Deepak K P, Rajalaxmi D, Prasad R C, *et al*. Synthesis and sintered properties evaluation of calcium phosphate ceramics. *J. Mater. Sci. Eng. C*, 2007, **27(4)**: 684–690.
- [28] 黄 粤, 刘昌胜. 具有药物缓释功能的磷酸钙骨水泥的研究进展. 硅酸盐通报, 1999(2): 42–47.
- [29] Ginebra M P, Traykova T, Planell J A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery system: a review. *J. Control Release*, 2006, **113(2)**: 102–110.
- [30] 杨 阳, 刘宝瑞, 钱晓萍. ALamar Blue 用于体外培养细胞活性检测的方法研究. 现代肿瘤医学, 2006, **14(1)**: 6–8.