

· 基础研究 ·

# 硫酸钙/纳米羟基磷灰石免疫人工骨对兔结核性骨缺损治疗的研究

李广杰<sup>1,2</sup>, 陈永刚<sup>3</sup>, 张学良<sup>1</sup>, 耿彬<sup>3</sup>, 安江东<sup>3</sup>, 董海涛<sup>3</sup>, 王栓科<sup>3\*</sup><sup>1</sup>兰州大学第一医院关节与运动创伤科, 甘肃 兰州 730000; <sup>2</sup>兰州大学第二临床医学院, 甘肃 兰州 730000; <sup>3</sup>兰州大学第二医院骨科, 甘肃 兰州 730000

**[摘要]** **目的:**通过制备硫酸钙/纳米羟基磷灰石免疫抗结核人工骨,治疗兔免疫骨结核,探讨纳米羟基磷灰石免疫抗结核骨实际应用的效果。**方法:**采用明胶和聚己内酯复合包裹法制备硫酸钙/纳米羟基磷灰石抗结核人工骨;通过注射结核因子建立兔右侧股骨免疫骨结核模型,对骨结核模型进行病灶清除术,在缺损部位植入硫酸钙/纳米羟基磷灰石抗结核免疫人工骨,并在术后7、14、28 d检测抗结核药血药浓度;术后第4、12周,光镜下观察骨修复情况。**结果:**成功制备硫酸钙/纳米羟基磷灰石抗结核骨,电子显微镜下免疫人工骨空隙基本均匀,抗结核药物分散在空隙之间。成功建立兔股骨结核模型,并形成骨结核空洞;术后28 d治疗组还维持一定的抗结核药血药浓度;术后4周结核骨治疗组患处软骨细胞增殖活跃,并出现骨性愈合;术后12周,治疗组缺损愈合完全,缺损已被抗结核人工骨诱导的骨组织修复;对照组骨损也出现愈合,但骨质愈合弱。抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色显示,术后12周,形成的破骨细胞的体积和数量减少,对照组的破骨数量多于治疗组。ELISA结果显示,治疗后血清C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、白细胞介素(interleukin, IL)-8、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )水平均降低。**结论:**硫酸钙/纳米羟基磷灰石免疫抗结核骨能够有效地治疗兔免疫骨结核,并保持一段时间的血药浓度,成骨效果好。

**[关键词]** 硫酸钙; 纳米羟基磷灰石; 人工骨; 骨结核; 骨缺损**[中图分类号]** R529.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2020)08-1130-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20200809

## Therapeutic effect of calcium sulfate/nano hydroxyapatite - immunized artificial bone on tuberculous bone defects in rabbits

LI Guangjie<sup>1,2</sup>, CHEN Yonggang<sup>3</sup>, ZHANG Xueliang<sup>1</sup>, GENG Bin<sup>3</sup>, AN Jiandong<sup>3</sup>, DONG Haitao<sup>3</sup>, WANG Shuanke<sup>3\*</sup><sup>1</sup>Department of Joint and Sports Trauma, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000; <sup>2</sup>The Second Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000; <sup>3</sup>Department of Orthopaedics, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

**[Abstract]** **Objective:** To treat the rabbit model of bone tuberculosis through preparation of calcium sulphate/nano hydroxyapatite immune artificial bone, and discuss the actual effect of nanometer hydroxyapatite immune artificial bone application. **Methods:** Calcium sulfate/nanometer hydroxyapatite was prepared by gelatine and polyhexyl ester composite coating, the rabbit model of the right femoral immune bone tuberculosis was established by injecting tuberculosis factor. After the lesion in the bone tuberculosis model was removed, the calcium sulfate/nanometer hydroxyapatite artificial bone was plated into the defect site. The blood drug concentration of the treated group was detected at 7, 14, 28 days after surgery. At 4 weeks and 12 weeks after surgery, bone repair was observed under a microscope. **Results:** The anti-tuberculous bone of calcium sulfate/nanometer hydroxyapatite was successfully prepared, and the immune artificial bone space was basically uniform under the electron microscope, and the anti-tuberculosis drugs were dispersed between the spaces. The model of rabbit femoral tuberculosis was successfully established and the tuberculosis of bone tuberculosis

**[基金项目]** 甘肃省民生科技计划项目(1303FCMA018); 甘肃省基础研究创新群体项目(1308RJIA004); 甘肃省自然科学基金项目(1010RJZA124)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangshuanke@163.com

was formed. In the treatment group, the blood drug concentration was maintained within 28 days after operation. Chondrocyte proliferation and the occurrence of bone healing of treatment group were active in 4 weeks after operation. At 12 weeks after surgery, the bone defect of treatment group was healed completely, and the defect was repaired by bone tissue induced by anti-tuberculous bone. The bone loss in the control group was also healed, but the bone healing was weak. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) staining showed that the volume and number of osteoclasts formed decreased at 12 weeks after surgery, and the number of osteoclasts in the control group was greater than that in the treatment group. The ELISA results showed that serum C-reactive protein (CRP), interleukin-8(IL-8), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) levels decreased after treatment. **Conclusion:** The sulphate/nanometer hydroxyapatite immune anti-tuberculous bone can effectively treat rabbit immune bone tuberculosis, maintain the blood drug concentration for a period of time, and has a good osteogenic effect.

[key words] calcium sulfate; nanometer hydroxyapatite; artificial bone; bone tuberculosis; bone defect

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(08): 1130-1134]

中国是全球三类结核病高负担国家之一,结核病发病率和死亡率位居法定传染病前列<sup>[1]</sup>。肺结核(bone tuberculosis)是肺外发病率最高的结核病,其病程长,骨质损伤常导致患者丧失劳动力和自理能力,抗结核药物化疗周期长,不良反应大,因此通过缓释药物人工骨植入手术病灶是治疗骨结核损伤的一个重要途径<sup>[2]</sup>。本研究通过给兔股骨结核模型病灶植入硫酸钙/纳米羟基磷灰石免疫人工骨,观察抗结核人工骨融合的性能和治疗骨结核的效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

新西兰白兔30只,每只体重约3 kg,由兰州大学动物实验中心提供,室温饲养。明胶、聚己内酯、异烟肼、吡嗪酰胺(Sigma-Aldrich LLC公司,美国);纳米羟基磷灰石(苏州鼎安科技有限公司);HE染色试剂盒、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色液(北京索莱宝生物科技有限公司);兔C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、兔白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)、兔白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、兔肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )ELISA试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 制备硫酸钙/纳米羟基磷灰石抗结核免疫人工骨

采用明胶和聚己内酯复合包裹法将异烟肼、吡嗪酰胺、半水硫酸钙、纳米羟基磷灰石按照9 mg:1 mg:3 mg:12 mg配比,以水作为固化液,制备硫酸钙/纳米羟基磷灰石抗结核人工骨。

#### 1.2.2 制备兔右侧股骨免疫骨结核模型

将30只新西兰白兔背部皮内接种卡介菌纯蛋

白衍化物(BCG-PPD)0.2 mL/只,3 d后皮内注射卡介苗(BCG)0.2 mL/只;6周后注射BCG-PPD 0.2 mL/只,72 h内注射部位皮丘直径超过1 cm,且有红肿或破溃的计为BCG致敏成功的动物。在BCG致敏动物右侧股骨内髁松质骨内造直径2 mm的隧道。在隧道内注射BCG 0.5 mL和完全佛氏佐剂0.5 mL,注射部位消毒包扎。4周后,建模动物在右侧股骨远端暴露病灶,进行病灶清除,治疗组( $n=15$ )植入抗结核人工骨,对照组( $n=15$ )空置。缝合伤口,消毒包扎。术前、术后进行X线片检查,观察造模区域有无脓肿和死骨形成。

#### 1.2.3 血药浓度检测

在病灶清除术后第7、14和28天分别在治疗组兔耳缘采静脉血,用荧光偏振免疫分析法检测异烟肼和吡嗪酰胺的血药浓度。

#### 1.2.4 病灶骨组织学观察

在病灶清除术后2、4、12周各组分别取右股骨远端2 cm,纵行剖开,甲醛固定,脱钙,脱水,石蜡包埋,常规切片,HE染色。光镜下观察骨修复情况。

#### 1.2.5 TRAP染色

取治疗组和对照组股骨石蜡切片,在烤片机上加热30 min,依次转移至二甲苯I、II、III中脱蜡(各10 min),100%、95%、90%、85%、80%乙醇(各2 min)水洗2~3 min后,按照TRAP染色试剂盒的说明书进行染色,显微镜下观察治疗组和对照组的差异。

#### 1.2.6 血清炎症因子检测

治疗前、治疗4周后检测血清CRP、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 水平的变化,均采用酶联免疫法测定。

### 1.3 统计学方法

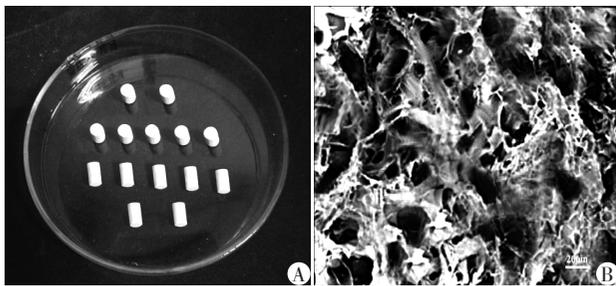
采用SPSS17.0软件进行统计分析,数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分

析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况及大体观察

成功制备硫酸钙/纳米羟基磷灰石抗结核免疫人工骨, 免疫人工骨大小均匀, 光泽匀称(图1); 在电子显微镜下免疫人工骨空隙基本均匀, 抗结核药物分散在空隙之间。兔右侧股骨免疫骨结核模型动物生命体征平稳, 手术顺利。治疗组在植入人工骨手术之前, 在X线片中可以看到已形成明显的结核空洞(图2A); 治疗组结核病灶清除术后植入抗结核免疫人工骨(图2B)。



A: 人工骨大体图; B: 扫描电子显微镜观察( $\times 500$ )。

图1 硫酸钙/纳米羟基磷灰石抗结核免疫人工骨

Figure 1 Calcium sulfate/nano hydroxyapatite - immunized artificial bone



A: 股骨结核病灶; B: 病灶手术后植入人工骨。

图2 治疗组股骨结核病灶

Figure 2 The femoral tuberculosis of the treatment group

### 2.2 治疗组血药浓度的变化

与术后7 d比较, 术后14 d和28 d异烟肼和吡嗪酰胺的血药浓度明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与术后14 d比较, 术后28 d异烟肼和吡嗪酰胺的血药浓度明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。虽然随着时间延长, 异烟肼和吡嗪酰胺血药浓度逐渐降低, 但治疗组一直维持一定的血药浓度(表1)。

表1 治疗组手术后血药浓度的变化

Table 1 Changes of plasma drug concentration after operation in the treatment group

时间	异烟肼	吡嗪酰胺
术后7 d	0.43 ± 0.04	1.25 ± 0.02
术后14 d	0.23 ± 0.05*	0.79 ± 0.05*
术后28 d	0.15 ± 0.05**	0.48 ± 0.04**

( $\mu\text{g/mL}$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=15$ )  
与术后7 d比较, \* $P < 0.05$ ; 与术后14 d比较, \*\* $P < 0.05$ 。

### 2.3 病灶组织学观察

病灶清除术后2周, 治疗组创伤面有大量的纤维结缔组织和软骨, 有少量死骨; 对照组有大量的纤维结缔组织和肉芽组织, 有部分死骨。术后4周, 治疗组创伤面有少量软骨组织和结缔组织, 有少量炎性细胞, 并发生骨性愈合; 对照组创面有大量纤维结缔组织及肉芽组织, 有大量炎性细胞, 骨质愈合不明显。术后12周, 治疗组创伤面已基本修复; 对照组创伤面也趋于修复, 但骨质愈合明显落后于治疗组, 还可见有炎性细胞(图3)。

### 2.4 破骨细胞形成比较

病灶清除术后2周, 治疗组和对照组破骨细胞的数量较多而且体积较大, 随着时间的延长, 形成的破骨细胞的体积和数量减少, 同时可以发现对照组在各个时间段的破骨细胞要多于治疗组(图4)。

### 2.5 血清炎症因子水平比较

治疗前, 治疗组和对照组的血清炎症因子(CRP、IL-8、IL-6、TNF- $\alpha$ )水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 治疗后两组血清CRP、IL-8、IL-6、TNF- $\alpha$ 水平均低于治疗前, 且治疗组低于对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 表2)。

## 3 讨论

在骨科临床中, 常见由于严重创伤、骨髓炎、骨结核和骨肿瘤等原因所致的骨缺损<sup>[3-6]</sup>。其中骨修复材料在骨损伤的修复中起到重要作用, 目前常用的骨修复材料包括自体骨和金属假体<sup>[7-8]</sup>。自体骨来源有限、可能导致二次伤害和增加感染的机会等原因而限制其临床应用<sup>[9]</sup>; 金属假体存在松动、断裂等问题, 容易导致炎性假瘤形成、骨溶解、髓臼松动和功能失用性表现等<sup>[10]</sup>。因此, 人工骨替代材料移植修复骨缺损已经成为医学研究的重点。

人工骨材料通过单独使用或几种材料复合使用来促进骨愈合, 人工骨具有骨形成作用或促进宿主骨与移植材料表面的结合, 引导骨形成; 人工骨还能诱导局部细胞或移植的细胞分化形成成熟的成

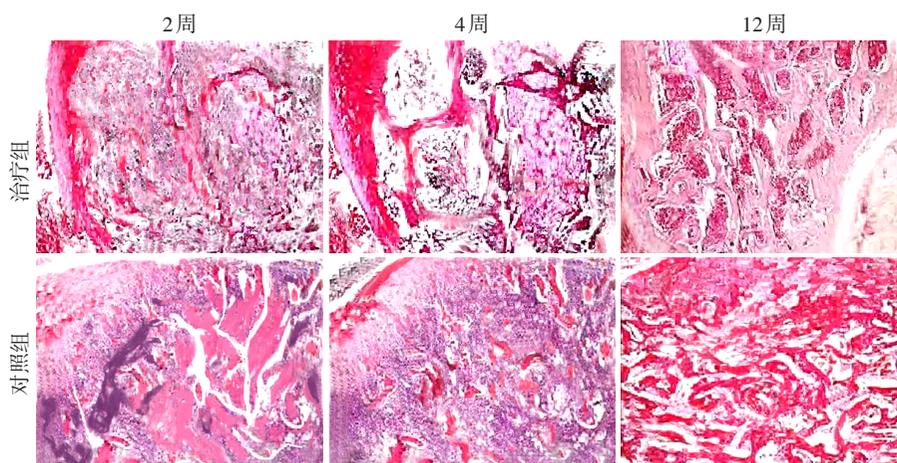


图3 病灶组织学观察(HE,×40)

Figure 3 Histological observation of lesions(HE,×40)

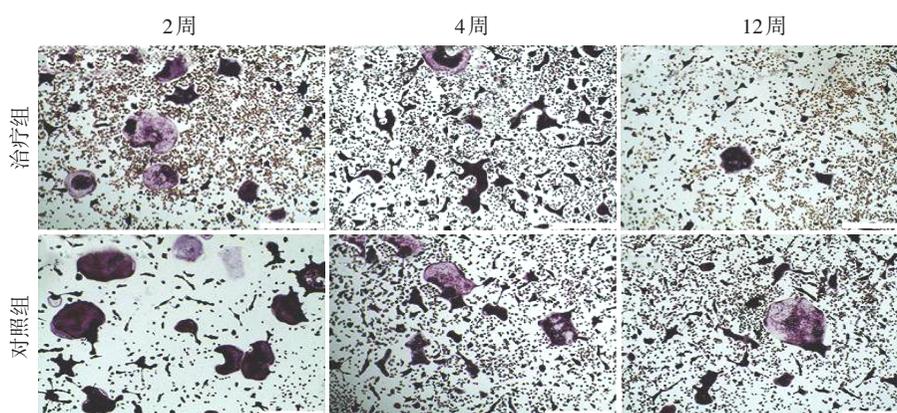


图4 破骨细胞形成比较(TRAP,×40)

Figure 4 Comparison of osteoclast formation(TRAP,×40)

表2 治疗组和对照组血清炎症因子水平比较

Table 2 Comparison of serum inflammatory factors levels between treatment group and control group

		(ng/L, $\bar{x} \pm s, n=15$ )			
组别	时间	CRP	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$
治疗组	治疗前	10.15 $\pm$ 1.15	79.99 $\pm$ 7.61	81.14 $\pm$ 9.51	64.34 $\pm$ 7.86
	治疗后	4.12 $\pm$ 0.56*	38.53 $\pm$ 4.82*	43.12 $\pm$ 4.53*	33.12 $\pm$ 4.51*
对照组	治疗前	9.89 $\pm$ 1.35	80.01 $\pm$ 9.34	82.56 $\pm$ 8.24	66.82 $\pm$ 6.18
	治疗后	5.67 $\pm$ 0.81**	52.31 $\pm$ 4.65**	55.67 $\pm$ 6.36**	47.17 $\pm$ 5.46**

与治疗前比较,\* $P < 0.05$ ;与治疗组治疗后比较,\*\* $P < 0.05$ 。

骨细胞<sup>[11]</sup>。同时人工骨可添加抗炎药物,可以减少手术植入人工骨的感染和感染性疾病的复发<sup>[12]</sup>。本研究成功制备了硫酸钙/纳米羟基磷灰石抗结核免疫人工骨,免疫人工骨大小均匀,光泽匀称;在电子显微镜下免疫人工骨空隙基本均匀,抗结核药物分散在空隙之间。

羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)是骨骼中主要的无机成分,在骨代谢过程中对钙盐的沉积起到支架作用,而且还能诱导新骨形成,因此具有良好的

生物相容性和生物活性的特点<sup>[13]</sup>。纳米级羟基磷灰石的晶体与人体骨中磷灰石大小相似,可增加骨组织的修复<sup>[14]</sup>。硫酸钙(calcium sulfate)是经典成骨材料,有较好的生物相容性和骨传导性<sup>[15]</sup>。将羟基磷灰石与硫酸钙复合按一定的比例制成人工骨,具有良好的微孔性<sup>[16]</sup>。在人工骨中添加抗结核药物,可以有效杀死创伤部位残留的结核杆菌,并通过药物的缓慢释放有效地抑制和杀灭结核杆菌及其滞留菌的生长,防止骨结核的复发<sup>[17]</sup>。本研究通

过制备纳米羟基磷灰石与硫酸钙复合人工骨,并在人工骨中添加抗结核药物异烟肼和吡嗪酰胺,制备成缓释抗结核药物的免疫复合人工骨,既加强人工骨对骨面损伤的修复,又通过药物的缓释,加快骨结核病灶的愈合。本研究结果显示,兔结核动物模型病灶清除手术后4周,治疗组异烟肼和吡嗪酰胺仍然维持一定的血药浓度,可以有效抑制体内结核杆菌的复发,尤其是持留菌的感染。术后4周,治疗组创伤面已出现骨性愈合;术后12周,治疗组创伤面已修复,这也说明抗结核药物的缓慢释放能够有效控制病灶感染,人工骨则加速骨质修复。

硫酸钙/纳米羟基磷灰石免疫抗结核人工骨能够加速骨结核手术后病灶的修复和控制病灶的感染,促进骨结核病的好转。本研究为人工骨材料的选取和开发提供实验依据和临床应用基础。

#### [参考文献]

- [1] 赵飞,杜昕,李涛,等. 基于世界卫生组织公共数据库的中国结核病流行趋势与预测[J]. 临床药物治疗杂志, 2018, 16(4): 1-3
- [2] 韦标方. 病灶清除自体骨联合自骨化磷酸钙人工骨植入治疗早期非创伤性股骨头坏死[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(8): 773-773
- [3] 鲁谊,张海龙,李屹钧. 关节镜下微骨折或自体软骨移植术治疗肘关节剥脱性骨软骨炎早期临床疗效[J]. 中华骨科杂志, 2018, 38(1): 1-7
- [4] 张英泽. 次生损伤的概念及其在创伤骨科的临床意义[J]. 中华创伤骨科杂志, 2017, 19(5): 369-370
- [5] 郭志民,石玲玲,田胜,等. 肢体短缩延长术治疗胫骨感染性骨缺损及慢性骨髓炎疗效观察[J]. 中国修复重建外科杂志, 2017, 31(8): 941-945
- [6] 封亚平,封雨,邓洵鼎,等. 单纯后路手术治疗胸腰椎结核临床疗效分析[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2017, 16(6): 534-537
- [7] 薛英森,付军,郭征,等. 同种异体半髌或半平台重建邻近膝关节肿瘤切除后骨缺损的疗效分析[J]. 中华外科杂志, 2017, 55(4): 289-291
- [8] COTTINO U, DETTONI F, RISITANO S, et al. Two-stage treatment of a large pelvic cystic pseudotumor in a metal-on-metal total hip arthroplasty [J]. Joints, 2017, 5(2): 121-124
- [9] 刘少峰,杜龔,孙建. 退变性腰椎椎体间脊柱融合术中不同植骨材料的应用对比[J]. 中国地方病防治杂志, 2017, 32(11): 1211-1211
- [10] 李金龙,周凯,陈志,等. 大直径股骨头金属对金属人工全髋关节置换术后中远期疗效评价及失败原因分析[J]. 中国修复重建外科杂志, 2017, 31(2): 144-149
- [11] 王金龙,杨述华,叶树楠,等. 人工骨支撑棒结合脱钙骨基质治疗股骨头缺血性坏死的临床观察[J]. 中华显微外科杂志, 2015, 38(3): 226-230
- [12] FRIESENBICHLER J, MAURER-ERTL W, BERGOVEC M, et al. Clinical experience with the artificial bone graft substitute calcibon used following curettage of benign and low-grade malignant bone tumors [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1736
- [13] 张卓,孙宇航,耿广起,等. 载三联抗痨药硫酸钙/聚氨基酸人工骨植入脊柱结核病灶内: 植骨界面的组织学改变[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(47): 7027-7033
- [14] 夏阳,陈慧敏,胡姝颖,等. 联合应用纳米金和磷酸钙骨水泥支架促进牙髓干细胞的增殖和成骨分化[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2018, 38(5): 590-594
- [15] IWAMOTO T, HIEDA Y, KOGAI Y. Effect of hydroxyapatite surface morphology on cell adhesion [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016, 69: 1263-1267
- [16] 马龙冰,贾云兵,宋跃明,等. 聚氨基酸/纳米羟基磷灰石/硫酸钙椎间融合器在腰椎融合术中的初步应用[J]. 中国修复重建外科杂志, 2016, 30(3): 328-335
- [17] 谢广渊,潘伟城,谭志斌,等. 硫酸钙人工骨在良性骨肿瘤刮除术后骨缺损填充中的愈合情况及其重建作用研究[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2017, 14(2): 45-48

[收稿日期] 2019-09-16