**利塞膦酸盐对磷硅酸钙理化及生物性能的影响**

巩天星，米昊炀，陈亚东，张静淑

（东北大学 中荷生物医学与信息工程学院，辽宁 沈阳110619）

**摘要：**研究了加入利塞膦酸盐的磷硅酸钙骨水泥的材料与生物相容性能。将利塞膦酸盐（0.5%和1.0%）与含有磷硅酸钙的骨水泥粉末混合后进行水化反应，测定骨水泥固化时间及抗压强度并分析其载药前后的微观结构变化。通过细胞毒性与基因表达水平检测分析了骨水泥的生物性能。结果表明: 在0.5%药物水平下，骨水泥促进成骨细胞增殖与分化效果最佳。药物可延缓骨水泥固化，但骨水泥的气孔率会随之降低且晶体结构会更加紧密。载有利塞膦酸的磷硅酸钙骨水泥具有与松质骨相似的力学强度及良好的生物相容性，作为骨组织修复材料具有很好的应用价值。

**关键词：**磷硅酸钙；利塞膦酸盐；骨质疏松；骨水泥；骨组织修复

**中图分类号：TH145.1+1 文献标志码：A**

Effect of Risedronate on Physicochemical and Biological Properties Calcium Phosphate Silicate Cement

*GONG Tian-xing, MI Hao-yang, CHEN Ya-dong, ZHANG Jing-shu*

( School of Sino-Dutch Biomedical & Information Engineering, Northeastern University, Shenyang 110169, China. Corresponding author: GONG Tian-xing, Email: gongtx@bmie.neu.edu.cn)

Abstract: Risedronate (0.5% and 1.0%) was mixed with bone cement powder containing calcium phosphosilicate for hydration reaction. The curing time and compressive strength of bone cement were observed, and the changes in microstructure before and after drug loading were analyzed. The biological properties of bone cements were analyzed by detection of cytotoxicity and gene expression levels. The results showed that the best proliferation and differentiation of osteoblasts were obtained at 0.5% drug level. The drug can delay the curing of bone cement, but the porosity of bone cement will decrease and the crystal structure will become tighter. The calcium phosphosilicate cement containing isexondanic acid has similar mechanical strength and good biocompatibility as cancellous bone, and has good application value as a bone tissue repair material.

**Key words:** calcium phosphate silicate; risedronate; osteoporosis; bone cement; bone tissue repair.

伴随人口加速老龄化，骨质疏松已经成为不可忽视的健康问题。在中国，约70 ~ 80%的中老年继发性骨折同骨质疏松有直接关系。目前，中国中老年人中约有5000万人患有骨质疏松症，且每年有接近30万的新增患者[1]。骨质疏松是由多种病因引起的代谢性骨结构病变；在合并骨质疏松性骨折治疗中，可以通过植入具有生物活性的骨水泥填充骨缺损部位，达到促进骨愈合及恢复日常活动的目的。然而，这种骨修复方法并没有直接祛除骨质疏松病灶；同时，最新的研究表明骨质疏松严重影响骨长入与重建的速率，增加再发骨折的几率。双膦酸盐类药物已被广泛应用在骨质疏松类疾病的治疗中。研究表明，载有双膦酸盐类药物的磷酸钙骨水泥通过体内降解缓释药物，在骨质疏松条件下促进骨重建并且提高植入体的生物稳定性[2]。前期研究通过硅酸钙骨水泥搭载利塞膦酸盐（第三代双膦酸盐），发现利塞膦酸延长骨水泥的固化时间，但对其机械强度没有明显改变[3]。最新研究成果表明磷硅酸钙骨水泥具有较高的机械强度及生物相容性，作为新一代骨缺损填充材料具有很好的应用价值[4]。

本文设计一种复合利塞膦酸（RA）的磷硅酸钙骨水泥（CPSC）药物缓释系统，通过研究RA对CPSC材料理化性能及生物相容性的影响，阐明这种新型复合双膦酸盐类药物的生物陶瓷骨水泥具有促进修复合并骨质疏松性骨折的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 利塞膦酸对磷硅酸钙骨水泥理化性能的影响**

将含有硅酸二钙与硅酸三钙（质量比为1:1）的硅酸钙粉末与磷酸二氢钙（质量比为9:1）均匀研磨混合并添加质量份数0.5% 和1%的RA制备复合RA-CPSC骨水泥，并依次命名为CPSC（不含RA），CPSC05R（0.5% RA）及CPSC10R（1.0% RA）。将骨水泥与水按2:1的比例混合研磨后，将骨水泥膏体注入17 mm × 2 mm（直径×高度）及6 mm × 12 mm的模具中用于测定载药骨水泥的固化时间及固化后（3天和7天）的抗压强度。

**1.2 利塞膦酸对磷硅酸钙骨水泥微观结构的影响**

将固化后的骨水泥样本研磨粉碎后，通过X射线衍射仪定性分析固体中晶体相的组成并结合Rietveld数字拟合的方法定量测算各晶体相的相对含量。在定性分析中，X射线以每分钟2°的速度在10 ~ 60°的范围内连续扫描，每个实验样本重复4次；在定量分析中，将样本研磨成直径小于10 μm的颗粒，以递进式的方式在10 ~ 120°内扫描并利用荷兰

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品名称 | 指标 | | | |
| 固化时间/min | 抗压强度（三天）/MPa | | 抗压强度（七天）/MPa |
| CPSC | 108.00 ±2.45 | | 14.41±2.92 | 13.42 ±3.45 |
| CPSC05R | 110.50 ±9.57 | | 13.79±1.35 | 13.02 ±1.42 |
| CPSC10R | 155.00 ±4.40 | | 6.87±1.33 | 12.02±4.16 |
| 表1 CPSC, CPSC05R和CPSC10R的固化时间及抗压强度  Tab.1 Curing time and compress strength of CPSC, CPSC05R and CPSC10R | | | | |

PANalytical公司HighScore Plus软件进行全谱拟合。

将固化后的骨水泥样本通过瑞士SCANCO Medical公司的Micro-CT进行断层扫描（层厚5 μm）并利

用日本日立公司Hitachi S-3000N型电子扫描电镜（SEM）观察骨水泥样本的微观结构，从而评价RA对CPSC微观结构的影响。

**1.3 成骨细胞体外培养及骨水泥浸出液培养基的制备**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品名称 | 相对数量 (%) | | | | | |
| 氢氧化钙 | | 硅酸二钙 | 磷灰石 | 硅酸钙水凝胶 | 非晶相 |
| CPSC | 6.63 ±0.33 | 24.00 ±1.20 | | 22.50 ±1.22 | 26.38 ±1.32 | 20.50 ±1.03 |
| CPSC05R | 6.50 ±0.33 | 23.00 ±1.15 | | 20.00 ±1.00 | 17.88 ±0.89 | 32.63 ±1.63 |
| CPSC10R | 1.58 ±0.08 | 10.63±0.53 | | 7.26±0.36 | 15.58 ±0.78 | 65.05±3.25 |
| 表2 CPSC、CPSC05R和CPSC10R固化7天后各晶相的相对比例  Tab.2 Relative quantity of crystalline phases in CPSC, CPSC05R and CPSC10R after 7 days’ hydration | | | | | | |

使用酶消化过程从SD大鼠胎鼠（<2天）颅骨中分离成骨细胞。首先，将大鼠颅骨碎屑在磷酸盐缓冲液（PBS，pH = 7.4）中清洗三次，在0.25％胰蛋白酶—EDTA溶液中处理20min祛除成纤维细胞污染并使用1mg/mL胶原蛋白酶溶液处理90min从而释放成骨细胞。在本研究中，所使用成骨细胞均为传代后二至四代细胞。

将固化1天后的骨水泥样本浸泡在10 mL 的PBS中3天并将浸出液通过0.22 μm滤膜过滤灭菌；按体积比1:9与DMEM培养基混合并添加10%的胎牛血清，制备骨水泥浸出液培养基。

**1.4 复合利塞膦酸的磷硅酸钙骨水泥生物相容性**

将骨水泥浸出液培养基添加在96孔板中（200 μL/孔）并在每孔种植5×103个成骨细胞，在37 ℃，5% CO2培养箱中孵育3天后，利用MTT比色法测定成骨细胞的存活率。在本研究中，通过美国Bio-Rad公司CFX96型real-time PCR仪检测4种与成骨细胞增殖、分化相关基因（ALP、OPG、runx2与TGF- β）的表达情况；同时，利用美国BD公司的FACS CantoⅡ型流式细胞分析仪分析载药骨水泥对

成骨细胞细胞周期及凋亡的影响。

**1.5 统计分析**

利用IBM® SPSS® Statistical software v.19.0（SPSS, Chicago, IL, U.S.A.）统计数据分析，所有数据结果以平均值±标准差的形式给出。单向方差分析（ANOVA）用来比较各组数据之间的统计学差异（*p*<0.05）.

## 2 结果与讨论

**2.1 复合利塞膦酸的磷硅酸钙骨水泥理化性能**

研究发现RA对CPSC的理化性能具有很强的

影响（表一）。在固化3天后的骨水泥样本中，可以发现1.0%的RA显著降低了CPSC的固化速率及机械强度；在CPSC和CPSC05R样本中，固化3天后的抗压强度与固化7天后的抗压强度的类似，均为12~13 MPa；然而，在CPSC10R样本中，固化7天后的抗压强度显著升高。上述数据表明RA对于CPSC的固化过程具有延缓作用但不会导致CPSC终止固化[5]。在CPSC固化过程中，CPSC中的硅酸钙与水反应形成硅酸钙水凝胶，而RA附着在已经形成水凝胶颗粒的表面阻碍水化反应进一步进行[3]。因此，在高浓度RA样本中，固化3天后的CPSC10R骨水泥的水化反应被明显阻碍，导致机械强度低于其他两种材料；但是，在固化7天后的的CPSC10R样本中，水化反应缓慢进行，机械强度逐渐增加。因此其抗压强度与其它两种材料在固化7天后的抗压强度类似。虽然RA影响CPSC的机械强度，但整体材料的抗压强度仍优于松质骨[6]。晶相分析（表二）的结果验证了RA延缓CPSC骨水泥固化过程的假设。在CPSC固化过程中，硅酸钙与水反应生成硅酸钙水凝胶及氢氧化钙，而氢氧化钙可以与磷

酸二氢钙进一步反应生成磷灰石与水。在3种材料

中，硅酸钙水凝胶及磷灰石的含量随着RA含量的增高而降低，而非晶态含量变化的趋势正好相反；这表明RA通过附着在已形成水凝胶的表面，形成一种保护层，从而阻碍水化反应的进一步进行[5]。

Micro-CT与SEM的结果证明RA影响CPSC固化后的微观结构。7天固化后, CPSC， CPSC05R， CPSC10R的SEM如图1所示，可知CPSC的孔隙率与CPSC05R及CPSC10R相比较大，但是RA的含量对孔隙率并没有显著影响。这可能因为Micro-CT的分辨率为5 μm，由于RA对CPSC水化过程

的影响导致非晶态含量增加，从而使微孔数量增加,

不利于Micro-CT的检测[7]。骨水泥固化后产生的气孔与磷酸二氢钙和氢氧化钙所生成的水含量有直接联系。由于RA附着在已形成水凝胶的表面，阻碍内部的氢氧化钙接触外部的磷酸二氢钙，从而减少水含量及由水蒸发导致的气孔数量[5]。如图2所示，随着RA的增加，晶体尺寸越小但晶体的显微结构更加紧密。RA阻碍了硅酸钙水凝胶的生长并产生更多的非晶相；这些小晶体与非晶相可以填充在较大的空隙中，导致Micro-CT无法分辨直径5μm以下的气孔，从而造成CPSC05R与CPSC10R孔隙率没有明显差异性[8]。

图 2 CPSC，CPSC05R和CPSC10R的孔隙率

Fig.2 Crystal porosity of CPSC, CPSC05R and CPSC10R

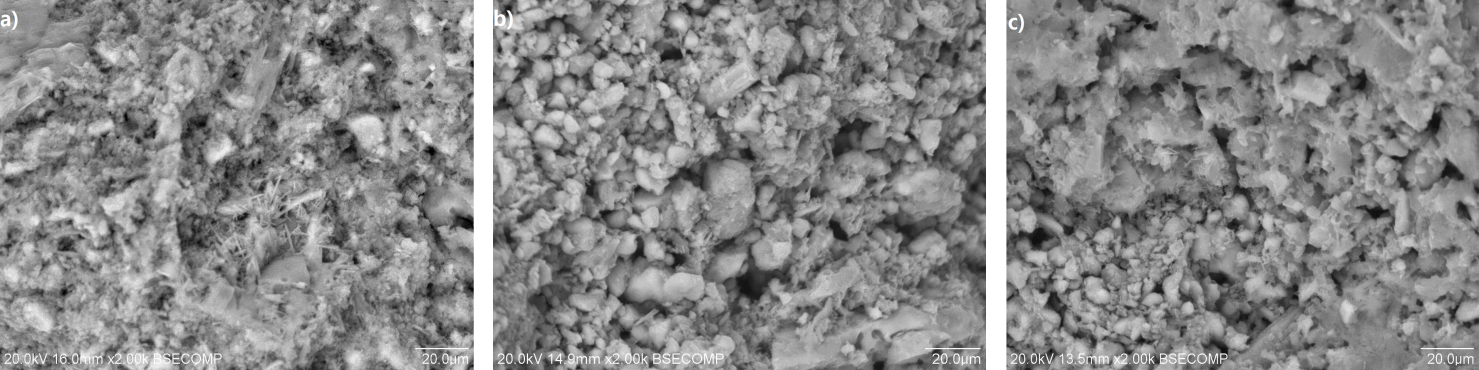


图 1 7天固化后CPSC， CPSC05R及CPSC10R的SEM

Fig.1 SEM of CPSC, CPSC05R and CPSC10R after 7days of setting

**2.2 复合利塞膦酸的磷硅酸钙骨水泥生物相容性**

CPSC，CPSCP05R和CPSC10R样本培养下成骨细胞的相对存活率如图3所示，载有RA的CPSC骨

水泥样本对成骨细胞未表现任何细胞毒性；同时，在CPSC05R浸出液培养基中培养的成骨细胞具有最高的存活率，暗示适量的RA可以促进成骨细胞的

增殖与分化。



图 3 CPSC，CPSCP05R和CPSC10R样本培养下成骨细胞的相对存活率

Fig.3 Relative survival rate of osteoblast under CPSC, CPSCO5R and CPSC10R

为验证上述假设，通过流式细胞仪，进一步比较在CPSC，CPSC05R及CPSC10R浸出液培养基中成骨细胞周期的变化。CPSC，CPSC05RCPSC10R样本对细胞周期的影响如图4所示，可知与PSC05R共同培养的成骨细胞含有最高的四倍体DNA，证明RA具有促进成骨细胞增殖与分化的作用[9]。

图 4 CPSC，CPSC05R和CPSC10R样本对细胞周期的影响

Fig.4 Effect of CPSC, CPSC05R and CPSC10R on cell cycle

为了进一步研究载有RA的CPSC促进成骨细胞的增殖与分化的作用机理，4种与成骨相关的基因在3种培养基培养的细胞中的表达情况通过real-time PCR仪进行检测。

图 5 CPSC，CPSC05R和CPSC10R对基因表达水平的影响

Fig.5 Effect of CPSC, CPSC05R and CPSC10R on gene expression level

CPSC，CPSC05R和CPSC10R对基因表达水平的影响如图5所示，ALP，OPG及runx2这3种基因的表达水平在CPSC05R培养基培养的成骨细胞中最高； TGF-β基因的表达水平随着RA含量的增高而降低。runx2基因在成骨细胞分化中扮演着重要的角色，而RA对runx2基因的调控与RA的浓度相关[10]；转录因子runx2通过调节ALP与OPG基因的表达，促进成骨细胞的增殖与分化[11]。因此上述三种基因的表达情况与成骨细胞存活率完全一致，证明在0.5%RA水平下，CPSC促进成骨细胞增殖与分化的功能最佳。另一方面，TGF-β基因的表达情况与SiO44-离子浓度正相关，而RA结合硅酸钙水凝胶后阻碍SiO44-离子的释放，因此TGF-β基因的表达情况随着RA浓度的增高而降低[12]。

## 3 结论

利塞膦酸对磷硅酸钙骨水泥的固化时间和机械强度均有影响，但在较低的利塞膦酸情况下，磷硅酸钙骨水泥的理化性能改变并不显著。实验证明利塞膦酸可以改变磷硅酸钙的晶体结构、降低固化后骨水泥的气孔率及气孔直径。体外实验揭示载有利塞膦酸的磷硅酸钙骨水泥具有很强的生物相容性；低水平的利塞膦酸可以促进成骨细胞的增殖与分化，提高复合骨水泥的生物活性。复合利塞膦酸的磷硅酸钙骨水泥具有促进修复合并骨质疏松性骨折的作用，作为骨组织修复材料具有很好的应用价值。

**参考文献**

1. Qu J, Yan R, Wang L, et al. Free dermatoplasty combined with vacuum sealing drainage for the treatment of large-area soft tissue defects accompanied by bone exposure in the lower leg[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2013, 5(5):1375-1380.
2. Taxel P, Ortiz D, Shafer D, et al. The relationship between implant stability and bone health markers in post-menopausal women with bisphosphonate exposure[J]. *Clinical Oral Investigations*, 2014, 18(1): 49-57.
3. Gong T, Wang Z, Zhang Y, et al. Preparation, characterization, release kinectics, and in virto cytotoxicity of calcium silicate cement as a risedronate delivery system[J]. *Jornal of Biomedical Materials Research Part A*, 2014, 102(7): 2295-2304.
4. Fujikawa K, Sugawara A, Murai S, et al. Bone Regeneration in critical-sized bone effect enhanced by introducing osteoinductivity to biphasic calcium phosphate granules[J]. *Clinical Oral Implants Research*, 2016, 28(3): 251-260.
5. Gong T, Chen Y, Zhang Y, et al. Osteogenic and anti-osteoporotic effects of risedronate-added calcium phosphate silicate cement[J]. *Biomedical Materials*, 2016, 11(4): 045002.
6. Barralet J E, Gaunt T, Wright A J , et al. Effect of porosity reduction by compaction on compressive strength and microstructure of calcium phosphate cement[J]. *Journal of Biomaterials Research,* 2002, 63(1):1-9.
7. LeGeros, RacquelZapatan. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphate[J]. *Bioactive Materials in Orthopaedic Surgery*, 2002, 395: 81-98.
8. Gong T, Wang Z, Zhang Y, et al. A comprehensive study of osteogenic calcium phosphate silicate cement: material characterization and in vitro/in vivo testing[J]. *Advanced Healthcare Materials,* 2016, 5: 457-466.
9. 张玉彪，柳云恩，施琳，等. 含利塞膦酸的磷硅酸钙水门汀对成骨细胞增殖和功能的影响[J]. 成都医学院学报，2013，8(3): 226-229.

( Zhang Yu-biao, Liu Yun-en, Shi Lin, *et al*. The Effect of phosphorus-containing cements risedronate acid extracts on the osteoblast proliferation and function[J]. *Journal of Chengdu Medical College*, 2013, 8(3): 226-229.)

1. Rasmussen H, Bordier P, Marie P, et al. Effect of combined therapy with phosphate and calcitonin on bone volume in osteoporosis[J]. *Metabolic Bone Disease and Related Research*， 1980, 2(2): 107-111.
2. Koch F P. Zolerdronate, ibandronate and clodronate enhance osteoblast differentiation ind dose dependent manner-a quantitiative in vitro gene expression analysis ofDlx5, Runnx2, OCN, MSX1 and MSX2[J].*Jornal of Cranio-Maxillofacial Surgery,* 2011, 39(8): 562-569.
3. Elisseeff J, Mclntosh W, Fu K, et al. Controlled‐release of IGF‐I and TGF‐β1 in a photopolymerizing hydrogel for cartilage tissue engineering[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2001, 19(6): 1098-1104.