

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.02.0184

异黄酮介孔玻璃水泥支架材料修复兔股骨骨缺损

王 勇¹, 曹烈虎², 吴银生¹, 陈 晓², 翁蔚宗², 汪 琳², 张 军², 周启荣², 苏佳灿^{2*}

1. 温州市中西医结合医院创伤骨科, 温州 325000
2. 第二军医大学长海医院创伤骨科, 上海 200433

[摘要] **目的** 评价异黄酮介孔玻璃水泥支架材料修复兔股骨骨缺损的效果。**方法** 采用不同组分的骨水泥材料,并用介孔玻璃水泥粉末吸附植物性激素大豆异黄酮(isoflavone, IS),制备成载IS的硫酸钙(calcium sulphate, CS)骨水泥(CS/IS)、载IS的20%介孔硅酸钙镁/硫酸钙(20% mesoporous magnesium calcium silicate/calcium sulfate, 20 m-MCS/CS)骨水泥(20 m-MCS/CS/IS)、载IS的40%介孔硅酸钙镁/硫酸钙(40 m-MCS/CS)骨水泥(40 m-MCS/CS/IS),检测不同骨水泥支架材料的体外释药性能。将60只成年雄性新西兰大白兔随机分成4组,每组15只,制作右侧股骨末端骨缺损模型后,分别植入CS、20 m-MCS/CS、40 m-MCS/CS以及40 m-MCS/CS/IS,于术后第4、8、12周各组随机处死5只兔并取材,进行micro-CT扫描,脱钙后切片并进行三色染色,普通显微镜下观察。**结果** 20 m-MCS/CS/IS和40 m-MCS/CS/IS骨水泥对IS的释放均为缓释,但40 m-MCS/CS/IS的释放量更多,在第25天已高达(41.0±1.8)%,因此后续实验中采用40 m-MCS/CS/IS。动物实验表明,骨水泥支架植入12周后,CS组的缺损部位仍比较明显,20 m-MCS/CS组有了一定程度的修复,40 m-MCS/CS组已基本愈合,而40 m-MCS/CS/IS组已基本完全愈合并且骨小梁已贯穿骨缺损区。三色染色结果显示40 m-MCS/CS/IS复合骨水泥有更快的降解速度,能够促进大量新生骨和成熟骨的产生,其促成骨能力也优于40 m-MCS/CS。**结论** 异黄酮介孔玻璃水泥能有效修复腔隙性骨缺损,有望成为新型骨缺损修复材料。

[关键词] 骨代用品;介孔硅酸钙镁;硫酸钙;异黄酮类;骨修复

[中图分类号] R 683 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)02-0184-07

Experimental research of isoflavone-loaded mesoporous glass cement scaffold materials for rabbit-femoral bone defect repair

WANG Yong¹, CAO Lie-hu², WU Yin-sheng¹, CHEN Xiao², WENG Wei-zong², WANG Lin², ZHANG Jun², ZHOU Qi-rong², SU Jia-can^{2*}

1. Department of Trauma Orthopaedics, Wenzhou Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Wenzhou 325000, Zhejiang, China
2. Department of Trauma Orthopaedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the efficacy of isoflavone (IS)-loaded mesoporous glass cement scaffold materials in repairing the rabbit femoral bone defect. **Methods** Various composite glass cements absorbing plant hormones (soy isoflavone) were fabricated as follows: calcium sulphate (CS), 20% mesoporous magnesium calcium silicate/calcium sulfate (20 m-MCS/CS), and 40% mesoporous magnesium calcium silicate/calcium sulfate (40 m-MCS/CS). The *in vitro* isoflavone release profiles of the above materials were evaluated. Sixty New Zealand rabbits were randomized into 4 groups with 15 in each group, and the bone defect models in the distal end of femur were created. Group A: implanted with CS; Group B: 20 m-MCS/CS; Group C: 40 m-MCS/CS; and Group D: IS-loaded 40 m-MCS/CS (40 m-MCS/CS/IS). The rabbits were sacrificed at 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks postoperatively and the bone samples were scanned with micro-CT. Then histology analysis was conducted under microscope after decalcification and Masson trichrome staining. **Results** Controlled release profiles of isoflavone were presented

[收稿日期] 2015-12-25 **[接受日期]** 2016-01-26

[基金项目] 国家自然科学基金国际合作项目(8141101156),国家自然科学基金(31271031),上海市科委基础研究重点项目(15411950600),温州市科技计划项目(Y20130221). Supported by the International Cooperation Project of National Natural Science Foundation of China (8141101156), National Natural Science Foundation of China (31271031), Key Basic Research Program of Shanghai Science and Technology Committee (15411950600) and the Science and Technology Program of Wenzhou (Y20130221).

[作者简介] 王 勇, 硕士, 副主任医师. E-mail: wy118@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31161699, E-mail: jiacansu@126.com

in both 20 m-MCS/CS/IS and 40 m-MCS/CS/IS groups, and a higher cumulative release rate was detected in 40 m-MCS/CS/IS group, which reached $(41.0 \pm 1.8)\%$ on the 25th day; therefore 40 m-MCS/CS/IS was selected for further evaluation *in vivo*, and 40 m-MCS/CS, 20 m-MCS/CS and CS served as controls. Rabbits in Group A implanted with CS showed little new bone formation 12 weeks after operation; those in Group B implanted with 20 m-MCS/CS presented with better bone regeneration in the defect site; and the bone defect sites in group C grafted with 40 m-MCS/CS were almost filled with neo-bone; however, the best results were obtained in group D which was implanted with 40 m-MCS/CS/IS, with the defects fully repaired by the bone trabecular. **Conclusion** Isoflavone-loaded mesoporous glass cement can effectively repair lacunar bone defects, and may serve as a promising new bone regeneration material.

[Key words] bone substitutes; mesoporous magnesium calcium silicate; calcium sulfate; isoflavones; bone repair

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(2): 184-190]

目前因多种因素导致的骨缺损的治疗仍是临床的难点。骨移植是骨缺损的首选治疗方法,其中自体骨移植是骨移植的金标准,但存在取材有限、增加患者痛苦等缺点^[1-2]。同种异体骨和异体骨虽然取材较自体骨广,但也存在感染疾病、免疫反应等风险,且患者不易接受^[3]。骨移植材料的研究给临床上治疗骨缺损带来了福音。大豆异黄酮(isoflavone, IS)的化学结构与雌激素十分相似,能与雌激素受体结合,产生类似雌激素的生物效应^[4],具有良好的生物相容性和生物活性,可促进成骨细胞生长、增加成骨细胞的蛋白质合成,还能增加成骨细胞的生物学标记物——碱性磷酸酶(ALP)的活性,使DNA和钙含量增加^[5-7]。介孔玻璃水泥(介孔孔径:2~10 nm)具有巨大的比表面积和孔径及可调的纳米孔道,具有药物负载量大和缓释效果良好的特点^[8-10]。本研究探索将两种材料均匀组合复合支架材料形成载药的可注射生物活性材料,于2013年6月至2014年6月完成本实验,旨在评价IS介孔玻璃水泥支架材料修复兔股骨缺损的效果,为临床治疗骨软骨缺损提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料 硝酸钙 $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 、硝酸镁 $[\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ (美国Sigma-Aldrich公司),大豆IS(西安迪诺生物科技有限公司),游标卡尺、线锯(上海赛拓五金工具有限公司),倍尔康非接触电子体温计(JXB-180,广州市番禺金鑫宝电子有限公司),电子称(WX-46A-1,北京世纪卓越信息技术有限公司),医用测深器(80W/YL,安徽省宿州金鹿医疗器械销售有限公司),硬组织切片器(Leica 1600,上海创迅医疗器械有限公司),H-E染色剂(第二军医大学长海医院中心实验室提供),戊巴比

妥钠(北京雅安达生物技术有限公司),青霉素钠(哈药集团制药总厂)。

1.2 IS介孔硅酸钙镁/硫酸钙骨水泥的制备

1.2.1 介孔硅酸钙镁(mesoporous magnesium calcium silicate, m-MCS)粉末的制备 采用模板诱导和自组装方法合成 m-MCS 粉末。用非离子型嵌段共聚物 P123 (相对分子质量 5 800, Sigma-Aldrich) 作为结构导向剂,将 P123 溶解在去离子水中,磁力搅拌器强烈搅拌至溶液澄清;用 37% 浓盐酸调节溶液体系的 pH 值至 1,所得溶液在磁力搅拌下经水热处理,将溶液加热到 56℃。称取 7.9 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、7.3 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 15 g 正硅酸乙酯(TEOS)加入混合溶液中,56℃强烈搅拌 4 h 后形成均匀的白色沉淀。将该溶胶在 80℃ 下陈化 1 d 后烘干,烘干的粉末用马弗炉于 550℃ 焙烧 6 h,升温速率 1℃/min,得到 m-MCS 粉末。

1.2.2 硫酸钙(calcium sulphate, CS)粉末的制备 精密称取硫酸钾 43.59 g、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 64 g 分别溶于 500 mL 蒸馏水中,混合以上两种溶液,静置沉淀。布氏漏斗过滤抽干沉淀,洗涤沉淀后再过滤抽干,40℃ 下烘干沉淀并研磨,置于 200℃ 干燥箱中干燥 24 h 后立即取出溶于 100 mL 蒸馏水中并浸泡 24~48 h。待溶液形成良好晶形后,滤掉上层溶液,低温烘干并研磨过 120 目筛,在鼓风干燥器中 110℃ 烘干粉末即得二水硫酸钙($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。将 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 粉末在常压下经 120℃ 加热煅烧 60 min,使其脱去 1.5 个结晶水,即得 CS 粉末。

1.2.3 复合骨水泥的制备 按质量配比 0:100、20:80 和 40:60,精密称取相应质量的 m-MCS 和 CS 粉末放入调和盘中,搅拌均匀,加入固化液调成水泥浆后倒入聚四氟乙烯模具中成型,制成 12 mm×2 mm 的圆片。取制备好的圆片材料放入

100%相对湿度、37℃环境中固化 24 h 即制得 CS、20 m-MCS/CS 和 40 m-MCS/CS 3 种骨水泥。

1.2.4 大豆 IS 载药体系的制备 取 0.5 g 大豆 IS 溶于 100 mL 乙醇溶液中,加入 5 g m-MCS 粉末,磁力搅拌 2 h, $1\ 252 \times g$ 离心,除去上清液,沉淀于 37℃ 烘干待用。将吸附了 IS 的 m-MCS 粉末按 1.2.3 项中的质量配比与 CS 混合,加入固化液调成水泥浆并固化,制成载有 IS 的 CS/IS、20 m-MCS/CS/IS 和 40 m-MCS/CS/IS 骨水泥。

1.3 大豆 IS 缓释实验 取制备好的 20 m-MCS/CS/IS、40 m-MCS/CS/IS 和 CS/IS 骨水泥分别置于 10 mL 离心管中,滴入 PBS(pH 7.4),置于 37℃ 恒温振荡箱中,分别在 1、3、5、7、10、15、21、25 d 时取出,吸取 1 mL 上清液于 96 孔板中,用紫外分光光度计测定光密度(D)值,并根据回归方程算出缓释量,得出缓释比例,计算不同时间点大豆 IS 的累积释放率。

1.4 动物分组及骨缺损模型制作 采用新西兰大白兔右侧股骨末端骨缺损作为骨缺损模型进行支架材料修复。出生 2 个月左右、体质量为 2.0~2.5 kg 的健康雄性新西兰大白兔 60 只,由第二军医大学动物实验中心提供[动物许可证号 SYXK(沪)2012-0003],随机分成 4 组:CS 组、20 m-MCS/CS 组、40 m-MCS/CS 组和 40 m-MCS/CS/IS 组,每组 15 只。所有兔在相同环境下饲养。术前剃去兔手术部位的毛发,用 75%乙醇消毒。在无菌环境下进行手术,首先按体质量 1 mL/kg 的剂量经兔耳缘静脉注射 4%戊巴比妥钠溶液,全身麻醉后切开兔右侧股骨末端的皮肤和肌肉,使用拉钩拨开肌肉组织,暴露右侧股骨末端。用骨科钻钻出 6 mm×6 mm 的孔,用纱布止血后,根据分组分别植入 CS、20 m-MCS/CS、40 m-MCS/CS 或 40 m-MCS/CS/IS 骨水泥于骨洞中,然后对伤口进行缝合,并用青霉素消毒。术后连续 3 d 注射青霉素以防伤口感染,持续观察兔术后的恢复情况。

1.5 同步辐射 micro-CT 成像 术后第 4、8、12 周各组随机处死 5 只兔,取兔植入骨水泥的股骨,剔去肌肉等软组织后送 micro-CT 检测,骨标本在上海同步辐射-生物医学应用光束线站(BL13W)进行成像分析。采用 Image-Pro Plus 6.3 图像分析软件对收集的图像去除背景,并用 VG studio MAX 2.1 CT

可视化软件(Volume Graphics 公司)对图像进行三维重构。

1.6 术后组织学检查 取上述骨标本用 2.5%的戊二醇固定 3 d,然后浸泡于甲醛-甲酸液中脱钙 1 周,脱钙结束后用 PBS 清洗骨标本,再用乙醇梯度脱水。将脱水后的骨标本用聚丙烯酸甲酯进行包裹,用硬组织切片机在垂直方向连续切片,获得厚度为 150~200 μm 的组织切片。取组织切片行三色染色:用二甲苯对脱钙切片进行脱蜡处理,苏木精染色 10 min,并将玻璃上的多余染液用蒸馏水洗净。用 1%盐酸-乙醇溶液(70%乙醇配制)进行分色,通过显微镜观察控制,分色到细胞核及染色质清晰为止。蒸馏水冲洗 30 min 后丽春红酸性品红溶液染色 5 min,再次蒸馏水洗净多余染液,之后用 1%磷酸铝溶液染色 3 min,浸入苯胺蓝冰醋酸中染色 5 min,最后用水迅速冲洗,将切片置于 60℃ 干燥箱中烘干,用二甲苯透明 2 次,滴加适量中性树脂后加盖玻片封片,置于倒置显微镜下观察。每个骨标本切取 1 张切片,分析植入部位新生骨的生成以及材料的降解等情况。通过 Image-Pro Plus 软件对切片进行成骨量分析,将切片放置在倒置显微镜下,随机选取 4 个视野,视野的中心位置应距边界 0.5 mm 以上,通过测量切片成骨面积的平均值来分析每个骨标本的成骨量。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数的多重比较用方差分析的 LSD 检验或 Dunnett 检验,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 骨水泥缓释 IS 效应 通过 Origin 软件计算 CS/IS、20 m-MCS/CS/IS 和 40 m-MCS/CS/IS 骨水泥对大豆 IS 缓释 25 d 的缓释曲线。结果(图 1)发现单纯 CS/IS 骨水泥对 IS 的释放在第 1 天为突释,释放量为 $(11.0 \pm 1.2)\%$,高于其他两组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);但此后释放缓慢,几乎没有释放,到第 25 天总释放量为 $(16.0 \pm 2.6)\%$ 。20 m-MCS/CS/IS 和 40 m-MCS/CS/IS 骨水泥对 IS 的释放均为缓释,但 40 m-MCS/CS/IS 的缓释效能及总缓释量更高:在第 5 天时两种骨水泥的缓释量相仿,差异无统计学意义($P > 0.05$);但在第 25

天 20 m-MCS/CS/IS 的释放量为 $(29.0 \pm 2.7)\%$,而 40 m-MCS/CS/IS 的释放量已高达 $(41.0 \pm 1.8)\%$,高于 CS/IS 组和 20 m-MCS/CS/IS 组($P < 0.05$)。

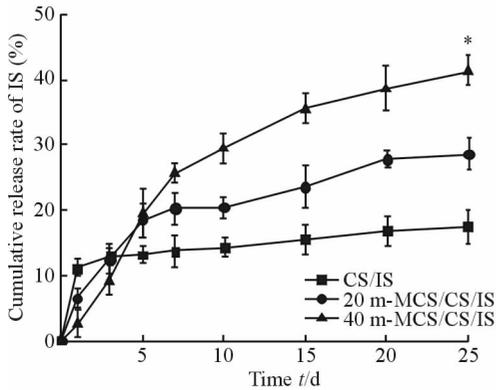


图1 CS/IS、20 m-MCS/CS/IS、40 m-MCS/CS/IS 骨水泥对 IS 的缓释曲线

Fig 1 Controlled release curves of IS by bone cement of CS/IS, 20 m-MCS/CS/IS and 40 m-MCS/CS/IS

m-MCS: Mesoporous magnesium calcium silicate; CS: Calcium sulphate; IS: Isoflavone. * $P < 0.05$ vs the other two groups. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

2.2 骨水泥支架植入后大体外观 骨水泥支架植入兔股骨缺损 3 d 后, 各组兔基本恢复正常, 能正常进食、活动和排泄。术后 1~14 d, 各组兔植入材料区域均无感染现象, 伤口愈合良好, 所有切口甲级愈合; 之后植入区域亦无感染现象发生。术后 3 个月内无一兔发生意外死亡。以上现象表明植入材料对实验动物无明显不良影响。

4 组支架材料植入兔股骨末端 4、8 和 12 周后, 结果(图 2)显示, 植入 4 周后, 4 组兔股骨缺损基本

都愈合, 植入材料已不可见, 40 m-MCS/CS/IS 组缺损部位的炎症反应比较明显; 植入 8 周后, 各组新生骨的骨面均基本与周围正常骨平齐, 新生骨面探诊基本与正常骨相似。植入材料与周围骨组织间界面基本消失, 材料在降解吸收的同时新骨长入骨缺损部位, 新长入的骨已经和周围组织结合紧密; 植入 12 周后, 各组新生骨组织已经成熟、致密, 与周围组织没有明显差别, 表明 4 组骨水泥材料都具有优良的生物相容性和降解性能。

2.3 Micro-CT 图像分析 通过上海同步辐射光源的断层扫描成像技术及 CT 三维重构成像技术得到骨水泥支架植入缺损部位不同时间后的 micro-CT 三维图像(图 3)。可以发现随着时间的增长, 20 m-MCS/CS、40 m-MCS/CS 和 40 m-MCS/CS/IS 组 3 组支架植入的缺损部位均有新生骨组织向材料生长的迹象, 而 CS 组在 12 周后缺损仍比较明显。在 12 周时, 20 m-MCS/CS 组缺损部位已有了一定程度的修复, 40 m-MCS/CS 组缺损部已基本愈合, 而 40 m-MCS/CS/IS 组缺损部位已接近完全愈合并且骨小梁已贯穿骨缺损区。结果表明, CS 组的骨修复性能较差, 而 40 m-MCS/CS 组骨水泥相比于 20 m-MCS/CS 组骨水泥具有更高的成骨活性, 40 m-MCS/CS/IS 组骨水泥的骨修复性能最为出色。

2.4 组织切片染色分析 对 4 组骨水泥支架材料植入兔股骨末端 4、8 和 12 周后行三色染色, 蓝色代表新生骨组织, 深红色代表成熟骨组织, 结果见图 4。

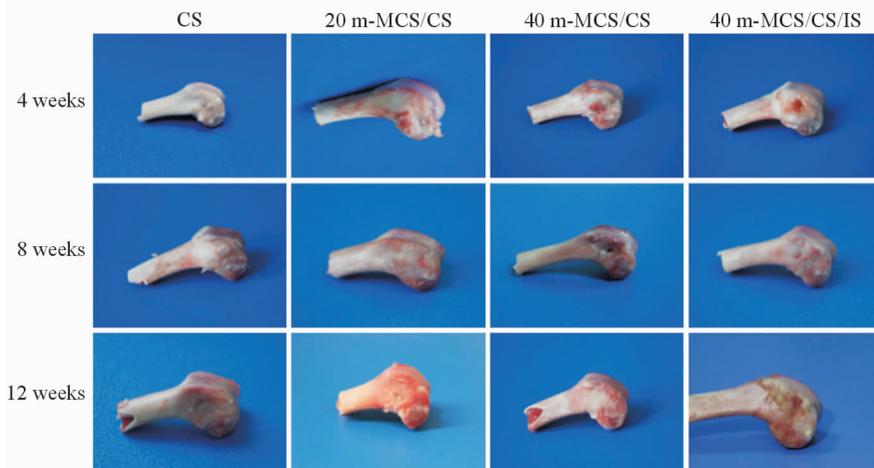


图2 CS、20 m-MCS/CS、40 m-MCS/CS 和 40 m-MCS/CS/IS 骨水泥植入 4、8 和 12 周后兔股骨骨缺损的愈合情况

Fig 2 Bone union of femoral defect of rabbits 4, 8, and 12 weeks after implantation of bone cement CS, 20 m-MCS/CS, 40 m-MCS/CS and 40 m-MCS/CS/IS

m-MCS: Mesoporous magnesium calcium silicate; CS: Calcium sulphate; IS: Isoflavone

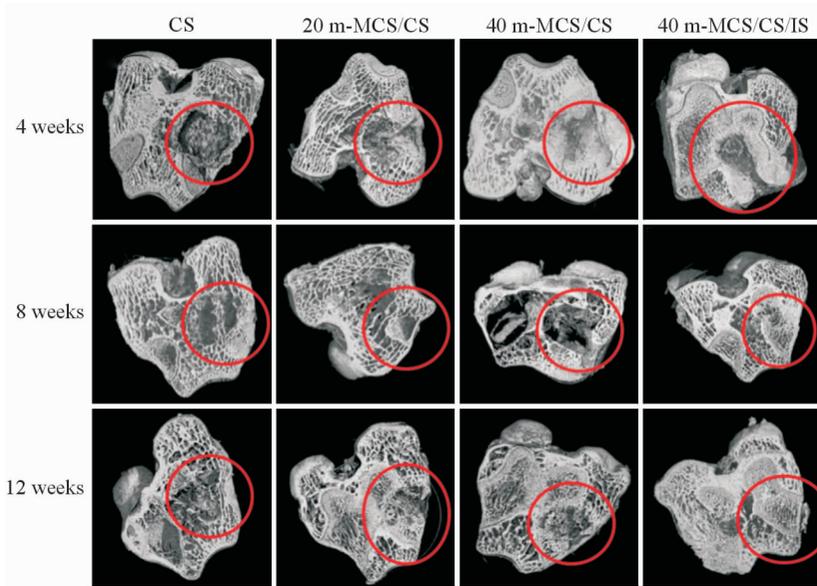


图3 CS、20 m-MCS/CS、40 m-MCS/CS 和 40 m-MCS/CS/IS 骨水泥植入 4、8 和 12 周后兔股骨缺损的 micro-CT 图像

Fig 3 Micro-CT images of femoral defect of rabbits 4, 8, and 12 weeks after implantation of bone cement CS, 20 m-MCS/CS, 40 m-MCS/CS and 40 m-MCS/CS/IS

m-MCS; Mesoporous magnesium calcium silicate; CS; Calcium sulphate; IS; Isoflavone

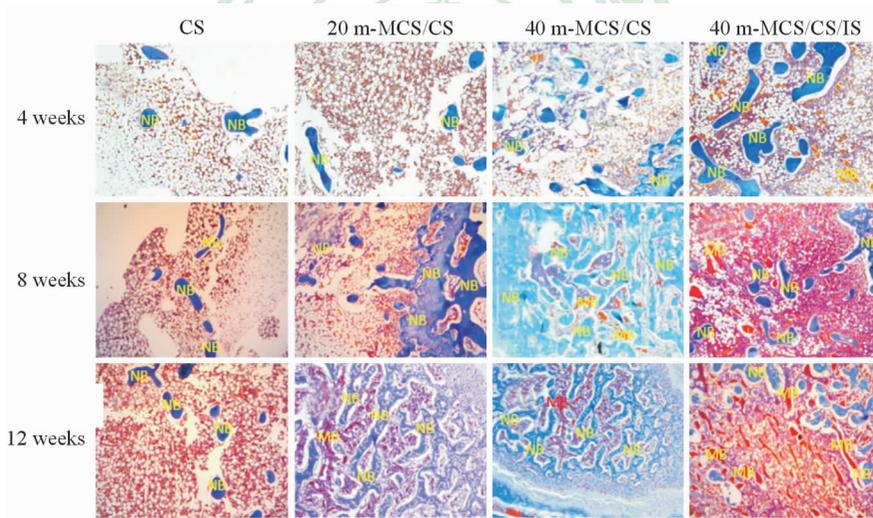


图4 CS、20 m-MCS/CS、40 m-MCS/CS 和 40 m-MCS/CS/IS 骨水泥植入 4、8 和 12 周后兔股骨缺损的三色染色图

Fig 4 Masson trichrome staining of femoral defect of rabbits 4, 8, and 12 weeks after implantation of bone cement CS, 20 m-MCS/CS, 40 m-MCS/CS and 40 m-MCS/CS/IS

NB; New bone; MB; Matrue bone; m-MCS; Mesoporous magnesium calcium silicate; CS; Calcium sulphate; IS; Isoflavone. Original magnification: $\times 100$

利用 Image-Pro Plus 软件对三色染色组织切片进行了统计学分析,得到支架植入后缺损部位不同时间的骨量及成熟骨量(图 5、6),4 组支架植入体内后,材料均随着时间不断降解,并有新生骨和成熟骨的形成。支架植入体内 12 周后,CS 组新生骨面积仅占(34.0 \pm 3.4)% ,而成熟骨面积仅为(2.6 \pm 0.4)% ;20 m-MCS/CS 组新生骨面积为(67.0 \pm 3.6)% ,成熟骨面积为(7.8 \pm 0.6)% ;40 m-MCS/

CS 组材料基本降解,新生骨面积为(86.0 \pm 3.5)% ,成熟骨面积达到(9.8 \pm 0.5)% ;而 40 m-MCS/CS/IS 组材料也基本降解,新生骨面积为(91.0 \pm 3.4)% ,成熟骨面积达到(11.8 \pm 0.7)% 。结果表明,CS 组的降解能力较差,成骨性能较低;20 m-MCS/CS 组骨水泥降解速度较快,可以促进新生骨组织生长,但成熟骨面积小;40 m-MCS/CS 和 40 m-MCS/CS/IS 组有更快的降解速度,能够促进大量新

生骨和成熟骨的产生,两者促骨再生能力优于 CS 组及 20 m-MCS/CS 组 ($P < 0.01$),并且 40 m-MCS/CS/IS 组骨水泥的促成骨能力优于 40 m-MCS/CS 组,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),说明其具有良好的骨修复效果,而搭载 IS 后进一步增强了其成骨性能。

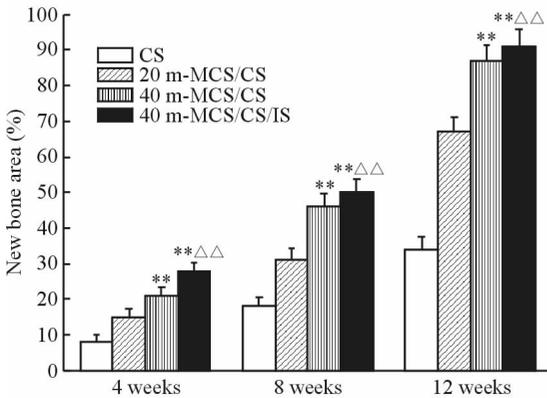


图5 CS、20 m-MCS/CS、40 m-MCS/CS 和 40 m-MCS/CS/IS 骨水泥植入 4、8 和 12 周后兔股骨缺损的新生骨量

Fig 5 New bone mass of femoral defect of rabbits 4, 8, and 12 weeks after implantation of bone cement CS, 20 m-MCS/CS, 40 m-MCS/CS and 40 m-MCS/CS/IS

m-MCS: Mesoporous magnesium calcium silicate; CS: Calcium sulphate; IS: Isoflavone. ** $P < 0.01$ vs CS and 20 m-MCS/CS; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 40 m-MCS/CS. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

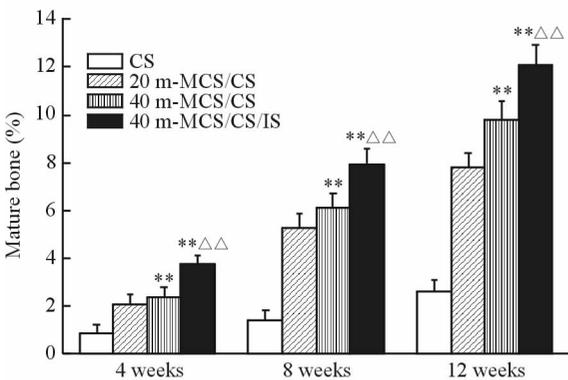


图6 CS、20 m-MCS/CS、40 m-MCS/CS 和 40 m-MCS/CS/IS 骨水泥植入 4、8 和 12 周后兔股骨缺损的成熟骨量

Fig 6 Mature bone mass of femoral defect of rabbits 4, 8, and 12 weeks after implantation of bone cement CS, 20 m-MCS/CS, 40 m-MCS/CS and 40 m-MCS/CS/IS

m-MCS: Mesoporous magnesium calcium silicate; CS: Calcium sulphate; IS: Isoflavone. ** $P < 0.01$ vs CS and 20 m-MCS/CS; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 40 m-MCS/CS. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

本实验通过在 CS 中添加 m-MCS 增加了复合

材料的孔隙率,而且通过体外药物缓释实验也发现, m-MCS 的介孔结构起到了药物控释的效果。随着 m-MCS 含量的增加,复合材料的介孔增多,比表面积也增大,大量的药物被吸附进入介孔孔道,药物的缓释可以达到更好的效果。CS 水泥的释放量在开始 24 h 内呈现突释,主要是因为部分 IS 附着在水泥表面,而内部的药物被固定在 CS 水泥结构内部,无法轻易释放出来。而 40 m-MCS/CS 的水泥表面有大量的介孔材料,因此药物可以有效地缓慢释放,提示 m-MCS 在药物装载和释放领域具有广泛的应用前景。

本研究通过在新西兰大白兔体内植入 IS 介孔玻璃水泥支架验证其对骨缺损的修复能力。植入 4 周后,缺损基本都愈合,但 40 m-MCS/CS/IS 组缺损部位存在一定的炎症反应,8 周后炎症反应消失,可能跟大豆 IS 药物缓释相关。此外,所有动物的植入区域均未出现感染,切口均甲级愈合,表明 IS 介孔玻璃水泥支架具有良好的生物相容性。

本研究使用 micro-CT 观察各组在材料植入后骨缺损的修复过程,40 m-MCS/CS/IS 组优于 40 m-MCS/CS 组,40 m-MCS/CS 组优于 20 m-MCS/CS 组,而 20 m-MCS/CS 组优于单纯 CS 骨水泥组,可以看出,随着 m-MCS 比例的增加,支架的理化性能和骨代谢水平均提高,有效提高了骨组织支架的生物活性。

IS 是一种良好的诱导骨生长的因子^[11],组织学切片的观察结果与影像学的结果一致,40 m-MCS/CS/IS 复合骨水泥有更快的降解速度,能够促进大量新生骨和成熟骨的产生,其促成骨能力也优于 40 m-MCS/CS,说明 IS 介孔玻璃水泥具有良好的生物相容性和成骨能力,进一步证实载 IS 药物的 m-MCS/CS 骨水泥支架骨诱导性更强,因而骨再生能力更佳。

理想的骨移植材料应当具有良好的生物活性和生物相容性,在体内能完全降解,而且还应具有骨传导和骨诱导作用^[12-14]。本研究表明,IS 介孔玻璃水泥作为骨修复移植体,具有优越的成骨作用和良好的降解性能,有望成为新型骨缺损修复材料。

[参考文献]

[1] Meagher P J, Morrison W A. Free fibula flap-donor-

- site morbidity; case report and review of the literature [J]. *J Reconstr Microsurg*, 2002, 18: 465-468.
- [2] Gu Y D, Cheng D S, Zhang G M, Chen X M, Xu J G, Yang X B. Long-term results of toe transfer; retrospective analysis [J]. *J Reconstr Microsurg*, 1997, 13: 405-408.
- [3] Oikarinen J, Korhonen L K. The bone inductive capacity of various bone transplanting materials used for treatment of experimental bone defects [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1979, 140: 208-215.
- [4] Vitale D C, Piazza C, Melilli B, Drago F, Salomone S. Isoflavones; estrogenic activity, biological effect and bioavailability [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2013, 38: 15-25.
- [5] Singh S P, Wahajuddin, Ali M M, Jain G K. High-throughput quantification of isoflavones, biochanin A and genistein, and their conjugates in female rat plasma using LC-ESI-MS/MS; application in pharmacokinetic study [J]. *J Sep Sci*, 2010, 33: 3326-3334.
- [6] Jeon B J, Ahn J, Kwak H S. Effect of isoflavone-enriched milk on bone mass in ovariectomized rats [J]. *J Med Food*, 2009, 12: 1260-1267.
- [7] D' Adamo C R, Sahin A. Soy foods and supplementation; a review of commonly perceived health benefits and risks [J]. *Altern Ther Health Med*, 2014, 20(Suppl 1): 39-51.
- [8] Schneider P, Hudec P, Solcova O. Pore-volume and surface area in microporous-mesoporous solids [J]. *Micropor Mesopor Mater*, 2008, 115: 491-496.
- [9] Vallet-Regí M, Balas F, Arcos D. Mesoporous materials for drug delivery [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007, 46: 7548-7558.
- [10] vander Pol U, Mathieu L, Zeiter S, Bourban P E, Zambelli P Y, Pearce S G, et al. Augmentation of bone defect healing using a new biocomposite scaffold; an *in vivo* study in sheep [J]. *Acta Biomater*, 2010, 6: 3755-3762.
- [11] Zheng X, Lee S K, Chun O K. Soy isoflavones and osteoporotic bone loss; a review with an emphasis on modulation of bone remodeling [J]. *J Med Food*, 2016, 19: 1-14.
- [12] Le Nihouannen D, Saffarzadeh A, Aguado E, Goyenvalle E, Gauthier O, Moreau F, et al. Osteogenic properties of calcium phosphate ceramics and fibrin glue based composites [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2007, 18: 225-235.
- [13] Horner E A, Kirkham J, Wood D, Curran S, Smith M, Thomson B, et al. Long bone defect models for tissue engineering applications; criteria for choice [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010, 16: 263-271.
- [14] Garcia P, Histing T, Holstein J H, Klein M, Laschke M W, Matthys R, et al. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation; a comprehensive review [J]. *Eur Cell Mater*, 2013, 26: 1-14.

[本文编辑] 曾奇峰, 孙岩