

## 新型可降解磷酸镁骨水泥的热原实验

韩振川<sup>1</sup>, 刘洋<sup>2</sup>, 熊森<sup>1</sup>, 张雅宾<sup>1</sup>, 李修璨<sup>1</sup>, 王旭翻<sup>1</sup>, 毛克亚<sup>1</sup>

解放军总医院, 北京 100853 <sup>1</sup>骨科; <sup>2</sup>肿瘤中心实验室

**摘要:** **目的** 通过动物热原实验探讨磷酸镁骨水泥 (magnesium phosphate cement, MPC) 的生物安全性, 补充磷酸镁骨水泥生物相容性的证据, 为其在骨科临床领域应用提供依据。**方法** 选取健康新西兰白兔 20 只, 分为 MPC 实验组 (A 组) 和对照组 (B 组), 每组各 10 只。制备 MPC 浸提液, 将浸提液预热至 38℃, 按照 10 ml/kg 将浸提液通过耳缘静脉注入实验组 (A 组) 兔体内; 同样方法, 将预热至 38℃ 的 0.9% 氯化钠注射液注入对照组 (B 组) 兔体内; 输注速度为 2 ml/min。输注前及给药后每隔 0.5 h 测量体温, 共测量 6 次。**结果** 实验组 (A 组) 及对照组 (B 组) 兔体质量 (kg)、输注液体量 (ml)、初始体温 (℃) 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 实验组 (A 组) 在输注浸提液 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h 测得体温与对照组 (B 组) 相应时刻测得的体温差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 实验组 (A 组) 在输注浸提液后测得的最高体温与对照组 (B 组) 测得的最高体温差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 实验组 (A 组) 及对照组 (B 组) 测得的最高体温与初始体温差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。**结论** MPC 置入动物体内不发生热原反应, 初步证明其热原检测安全可靠。

**关键词:** 生物相容性; 磷酸镁骨水泥; 热原试验; 可降解材料

**中图分类号:** R 687.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2016)05-0483-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2016.05.019

**网络出版时间:** 2016-01-28 09:42:54

**网络出版地址:** http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20160128.0942.002.html

## Pyrogen test about novel biodegradable magnesium phosphate cement

HAN Zhenchuan<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>2</sup>, XIONG Sen<sup>1</sup>, ZHANG Yabin<sup>1</sup>, LI Xiucan<sup>1</sup>, WANG Xuxuan<sup>1</sup>, MAO Keya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopaedics; <sup>2</sup>Department of Cancer Center Laboratory Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: MAO Keya. Email: maokeya@sina.com

**Abstract: Objective** To investigate the biological safety of magnesium phosphate cement (MPC) by pyrogen test and add evidences in biocompatibility of MPC for its application in clinical orthopaedics. **Methods** Twenty New Zealand white rabbits were randomly divided into MPC group (group A) and control group (group B), ten rabbits in each group. MPC leaching solution was prepared and preheated to 38℃, and then it was injected into the rabbits of group A through ear vein with volume of 10 ml/kg. 0.9% sodium chloride injection was preheated to 38℃ and was injected into rabbits of group B by the same way with injection speed of 2 ml/min. The temperature of every rabbit was recorded before injection, and the body temperature was measured every 0.5 h after injection, for total six times. **Results** There was no statistical difference in body weight (kg), injection volume (ml), initial body temperature (℃) between MPC group and control group ( $P > 0.05$ ). After injection leaching solution at time points of 0.5 h, 1 h, 1.5 h, 2 h, 2.5 h, 3 h, no statistical difference was found in the body temperature between MPC group and control group ( $P > 0.05$ ). There was no statistical difference in maximum temperature between MPC group and control group after injection ( $P > 0.05$ ), and no statistical difference was found between maximum temperature and initial temperature in MPC group and control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** There is no pyrogen reaction in animals after being injected with MPC, and the preliminary results show that MPC is safe and can be applied in orthopaedics.

**Keywords:** biocompatibility; magnesium phosphate cement; pyrogen test; biodegradable materials

近年来, 镁合金作为生物医学材料领域的研究热点因其优良的力学性能、与人体良好的生物相容性以及可降解吸收等特点, 越来越受到医学界的关注<sup>[1]</sup>。在人体内应用的生物可降解材料须在组织器官愈合期间发挥作用, 愈合后被逐渐降解吸收, 不在体内残留, 在降解过程可能产生微弱

炎症反应但不会造成其他不良后果<sup>[2]</sup>。新型的骨黏合剂 - 磷酸镁骨水泥 (magnesium phosphate cement, MPC) 具有凝结时间短、早期强度高、黏结性能好<sup>[3]</sup>、反应得到的固化产物对环境 pH 影响小<sup>[4]</sup>、可以降解等优点<sup>[5]</sup>。初步实验表明, 磷酸镁骨水泥黏结强度明显大于传统磷酸钙骨水泥 (Calcium phosphate cement, CPC)<sup>[6]</sup>, 具有广阔的临床应用前景。新型材料在临床应用前首先需要确认其生物安全性, 华东理工大学生物材料研究所刘昌胜教授已经对磷酸镁骨水泥的生物相容性进行了广泛而深入的研究。笔者通过查阅大量相关文献, 未发现有关于磷酸镁骨水泥热原性试验的相关研究

收稿日期: 2015-11-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (51372276)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (51372276)

作者简介: 韩振川, 男, 在读硕士, 医师。研究方向: 脊柱外科。

Email: sunnyhan.good@163.com

通信作者: 毛克亚, 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师。Email:

maokeya@sina.com

报道。为了补充磷酸镁骨水泥生物相容性的证据,笔者进行了磷酸镁骨水泥的热原性实验,为其在骨科临床领域的安全应用提供依据。实验方法遵循国家标准 GB/T 16886.11-2011<sup>[7]</sup>。关于医疗器械热原实验的测试方法有两种:家兔法和细菌内毒素法<sup>[8]</sup>。对于多数医疗器械而言,其材料成分及化学性质较为复杂,通常推荐采用家兔热原法<sup>[9]</sup>。

### 材料和方法

**1 实验动物及分组** 根据 2005 版及 2010 版《中国药典》,要求热原实验家兔初始体温为 38.0℃ ~ 39.6℃<sup>[10]</sup>。经医院动物伦理委员会批准,选取健康新西兰白兔 20 只(北京市海淀区兴隆实验动物养殖场提供)。体质量(1.9 ~ 2.3) kg,均为雄性。按照完全随机化分组方法,将 20 只实验用兔按体质量从小到大 1 ~ 20 编号,用 SPSS19.0 软件随机分为 MPC 实验组(A 组)和对照组(B 组),每组各 10 只。

**2 实验材料** 磷酸镁骨水泥(宁波华科润科技有限公司提供),0.9% 氯化钠注射液,恒温箱,电子秤,输液泵,智能热原仪(ZRY-3)。制备浸提液:取 20 g 初凝后磷酸镁骨水泥于小烧杯中,按 0.2 g/ml 浸提加入 0.9% 氯化钠注射液 100 ml,以锡纸封口,置 37℃ 恒温水浴浸泡 72 h,过滤灭菌后,该液在 24 h 内进行实验。

**3 实验方法** 将浸提液预热至 38℃,按照 10 ml/kg 将浸提液通过兔耳缘静脉注入实验组(A 组)兔体内;同样方法,将预热至 38℃ 的 0.9% 氯化钠注射液按照 10 ml/kg 通过耳缘静脉注入对照组(B 组)兔体内,调整输液泵输注速度为 2 ml/min。输注前及给药后每隔 0.5 h 测量体温,共测量 6 次。

**4 评价方法** 对实验组(A 组)与对照组(B 组)兔的体质量(kg)、初始体温(℃)、输注液体量(ml)、最

高体温(℃)及输注后不同时间点的体温进行比较。

**5 统计学分析** 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,所有计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,本实验数据符合正态分布及方差齐性,采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结果

**1 一般资料比较** 实验组(A 组)及对照组(B 组)兔体质量(kg)、输注液体量(ml)、初始体温(℃)差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。

**2 不同时刻体温比较** 实验组(A 组)兔在输注浸提液 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h 时的体温与对照组(B 组)相应时刻测得的体温差异无统计学意义( $P > 0.05$ );实验组(A 组)兔在输注浸提液后测得的最高体温与对照组(B 组)测得的最高体温差异也无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。

**3 实验组(A 组)及对照组(B 组)测得的最高体温与初始体温,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 3。**

### 讨论

可降解骨水泥一直是骨科研究的热点。近年来, MPC 因其具有潜在的生物降解性能,越来越受到关注<sup>[11]</sup>。MPC 是由氧化镁、磷酸盐、缓凝剂及固化液混合制备而成的一种反应型胶黏材料<sup>[12]</sup>。MPC 与传统的磷酸钙骨水泥相比,具有更强的生

表 3 最高体温与初始体温比较

Tab. 3 Comparison of maximum temperature and initial temperature (°C)

Group (n=10)	Maximum temperature (°C)	Initial temperature (°C)	<i>t</i>	<i>P</i>
A	38.98 ± 0.13	38.84 ± 0.21	1.28	0.24
B	39.02 ± 0.11	38.82 ± 0.19	2.02	0.08

表 1 两组家兔一般资料比较

Tab. 1 Comparison of general information of two groups

Group (n=10)	Body weight (kg)	Injection fluid (ml)	Initial temperature (°C)
A	2.12 ± 0.16	21.2 ± 1.64	38.84 ± 0.21
B	2.14 ± 0.13	21.4 ± 1.34	38.82 ± 0.19
<i>t</i>	0.21	0.21	0.16
<i>P</i>	0.84	0.84	0.88

表 2 两组家兔不同时刻体温比较

Tab. 2 Comparison of body temperature at different time point in two groups (°C)

Group (n=10)	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h	Maximum temperature (°C)
A	38.94 ± 0.11	38.86 ± 0.21	38.76 ± 0.39	38.72 ± 0.30	38.72 ± 0.25	38.70 ± 0.29	38.98 ± 0.13
B	38.92 ± 0.08	38.98 ± 0.11	38.82 ± 0.13	38.78 ± 0.05	38.78 ± 0.19	38.88 ± 0.13	39.02 ± 0.11
<i>t</i>	0.32	1.14	0.33	0.44	0.43	1.26	0.53
<i>P</i>	0.76	0.30	0.75	0.68	0.68	0.25	0.6

物力学性能。同时, MPC 还可以通过调节酸碱组分活性及加入缓凝剂来控制其放热速率, 水泥浆体具有塑性和胶黏性良好、水化产物生物相容性高等优势<sup>[13]</sup>。生物材料要用于人体, 有的甚至终身存留体内, 因此材料的生物相容性和安全性日益受到重视。在一种新型材料临床应用前, 须完成其毒理学特性检测, 综合评定其生物学特性是否符合医用要求<sup>[14]</sup>。故磷酸镁骨水泥在推向临床应用之前, 必须对其进行生物相容性和安全性的评估。华东理工大学生物材料研究所刘子胜和刘昌胜<sup>[15]</sup>已经对 MPC 做了大量相关工作研究, 如 MPC 在细胞毒性、皮肤致敏、皮内刺激、急性全身毒性等几项毒性检测全部合格, 初步证明材料无毒, 可以用于动物体实验。吴建国等<sup>[16]</sup>将 MPC 骨水泥置入家兔股骨髁部, 对家兔肝、肾功能进行监测, 并对肝、肾、心脏、脑组织等做病理学检查证实, MPC 对家兔内脏无毒性作用。吴子征等<sup>[17]</sup>将 MPC 骨水泥用于治疗家兔的胫骨平台骨折实验, 也证实了 MPC 对周围血电解质浓度无影响。张秉文<sup>[18]</sup>在磷酸镁骨黏合剂的生物安全性研究中, 通过遗传毒性实验、体外细胞毒性实验及细胞炎性因子表达测试实验, 证明了 MPC 骨水泥符合生物安全性的要求, 具有良好的生物相容性。将 MPC 置入动物体内不同时期后, 组织学检查发现 MPC 与周围骨组织亲和性良好, 不引起异物反应, 界面处未出现明显的炎症细胞聚集和纤维膜, 也说明了 MPC 具有良好的生物相容性<sup>[19]</sup>。

本研究结果显示, 实验组输注 MPC 浸提液后 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h 时体温与对照组相应时刻体温差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 说明输入 MPC 浸提液后在所观察的时间段内兔体温无明显波动变化。同时, 实验组在输注浸提液后测得的最高体温与对照组测得的最高体温差异也无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 实验组输注浸提液后测得的最高体温与初始体温差异同样无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。以上均证明, 兔在输入 MPC 浸提液后体温未发生明显升高, 进而说明兔体内未发生热原反应, MPC 注入动物体内不会发生热原反应, 安全可靠。

通过文献查阅可知, 学者们已经对 MPC 的生物相容性进行了广泛而深入的研究, 作为对生物

相容性研究内容的补充, 我们的研究证明了 MPC 在动物体不会发生热原反应, MPC 不含有引起热原反应的化学成分或物质, 初步证明其热原检测安全可靠。本研究的不足是实验条件仍不能真实模拟人体内环境, 后期还需研究探讨其在人体内随置入时间延长生物相容性的改变。

#### 参考文献

- 1 王啸虎, 阎钧, 陈义刚, 等. 生物可降解镁合金临床应用研究进展 [J]. 材料导报, 2013, 27 (21): 93-96.
- 2 周建, 杨秀滨. 生物可降解材料在医学领域的应用 [J]. 北京生物医学工程, 2011, 30 (3): 326-330.
- 3 杨楠. 磷酸镁水泥基材料粘结性能研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2014.
- 4 Mestres G, Ginebra MP. Novel Magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties [J]. Acta Biomater, 2011, 7 (4): 1853-1861.
- 5 Waselau M, Samii VF, Weisbrode SE, et al. Effects of a Magnesium adhesive cement on bone stability and healing following a metatarsal osteotomy in horses [J]. Am J Vet Res, 2007, 68 (4): 370-378.
- 6 Pina S, Olhero SM, Gheduzzi S, et al. Influence of setting liquid composition and liquid-to-powder ratio on properties of a Mg-substituted Calcium phosphate cement [J]. Acta Biomater, 2009, 5 (4): 1233-1240.
- 7 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 医疗器械生物学评价第 11 部分: 全身毒性试验 [S]. GB/T 16886.11-2011.
- 8 柯军, 杨立峰, 颜林. 浅谈医疗器械热原试验方法的选择及一些注意事项 [J]. 中国医疗器械信息, 2013, 19 (8): 31-33.
- 9 杜颖, 谭德讲. 热原检查法结果判断新模式的验证 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50 (14): 1243-1250.
- 10 董培智, 朴晋华, 李波. 现行版中、美、英、欧、日五部药典中热原检查法比较 [J]. 中国药品标准, 2010, 11 (2): 135-138.
- 11 周免君. 生物活性骨修复材料的构建与生物学响应研究 [D]. 上海: 华东理工大学, 2011.
- 12 Yu Y, Wang J, Liu C, et al. Evaluation of inherent toxicology and biocompatibility of Magnesium phosphate bone cement [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2010, 76 (2): 496-504.
- 13 孙道胜, 孙鹏, 王爱国, 等. 磷酸镁水泥的研究与发展前景 [J]. 材料导报, 2013, 27 (9): 70-75.
- 14 Ruh é PQ, Hedberg EL, Padron NT, et al. Biocompatibility and degradation of poly (DL-lactic-co-glycolic acid) /Calcium phosphate cement composites [J]. J Biomed Mater Res A, 2005, 74 (4): 533-544.
- 15 刘子胜, 刘昌胜. 无机骨粘固剂 -- 磷酸镁骨水泥的研究进展 [J]. 材料导报, 2000, 14 (5): 29-32.
- 16 吴建国, 俞永林, 刘昌胜, 等. 两种无机骨水泥对家兔内脏毒性的比较研究 [J]. 复旦学报 (医学版), 2005, 32 (6): 707-710.
- 17 吴子征, 张键, 陈统一, 等. 磷酸镁骨粘固剂粘接骨折的实验研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2006, 20 (9): 912-915.
- 18 张秉文. 磷酸镁骨粘固剂的生物安全性研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2010.
- 19 孟德华. 磷酸镁骨水泥粘接犬胫骨平台骨折的实验研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2008.