

综述

实验性脊柱融合术骨与植入物界面融合的评估方法

郑振耀¹, 秦 岭¹, 唐盛平², 朱 锋³, 郭 霞⁴

(1 香港中文大学骨科及创伤学系; 2 深圳儿童医院外科 518000;

3 南京大学医学院附属鼓楼医院 210008; 4 香港理工大学康复学系)

中图分类号: R318.08, R687.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-406X(2005)-07-0440-04

世界卫生组织把 2000~2010 年定为“骨与关节十年”, 其使命是推动骨骼关节肌肉疾病的预防和治疗。脊柱疾病是“骨与关节十年”所确定的五大骨骼关节肌肉系统疾病之一。在脊柱疾患的手术治疗中植骨融合术是最常用的手术之一。以美国为例, 每年需要行超过 50 万例骨移植手术, 而半数与脊柱融合有关^[1]。从 1966 到 2003 年, 在 Medline 上有关脊柱融合的研究报道约 8500 例。这些研究中 80% 是脊柱融合实验研究。随着新的生物因子、生物材料和生物物理干扰技术的不断涌现, 在临床应用前对脊柱骨与植入物界面融合评估方法的实验研究有着重要意义。笔者系统而简要地回顾文献和作者对脊柱融合的评估技术, 同时介绍一些尚未用于脊柱融合效果评估但有很大潜力的评定方法。

1 骨移植在脊柱融合术中的应用

后路脊柱融合术 (posterior spinal fusion, PSF) 是脊柱外科最常用的外科技术, 用于治疗各种脊柱疾病, 包括先天性疾病、畸形、退行性疾病、良性和恶性肿瘤及脊柱骨折。自体骨移植术由于其骨传导性、骨诱导性和骨再生性, 成为矫形外科骨移植的“金标准”。但获取自体骨有许多局限性和并发症, 如供骨量有限、延长手术时间、增加手术切口、取骨处可出现疼痛和血肿等并发症, 对于糖尿病、年幼患者、骨代谢障碍疾病或骨质疏松患者等并不适合^[1]。异体骨移植则要求完善的保存、可靠的灭菌及严格的质控, 同时仍存在感染、病毒传染、HIV 传播等问题。因而, 使骨的替代物得以广泛的研发和应用。

在临床应用前这些研发的骨替代物或干预方法都需在脊柱融合的动物模型中进行评估和验证。目前应用的骨替代物包括单纯使用脱矿骨基质、天然珊瑚或烤瓷材料如羟磷灰石三钙 (hydroxyapatite tricalcium, HA-TCP), 或联合应用骨髓或骨形成蛋白等。这些材料或因子增强融合方面的效果主要通过生物相容性、生物可降解性、骨传导性或骨诱导性和不同时空融合状态等来比较和评价^[2-5]。另外, 目前亦有使用生物物理干预的方法促进脊柱的融合,

如使用电刺激、磁场以及低强度脉冲超声等^[6,7]。

2 实验性脊柱融合评估的必要性

临床主要有三种脊柱融合术: 前路椎体间融合、后路横突间融合和椎板间融合。目前在临床上, X 线平片是传统的评价脊柱融合的方法。然而, 非侵入性方法评估脊柱融合有其局限性, 如由于分辨率低, 不可能对融合块的材料特性和结构强度作出评价。尽管可以通过动态摄像反映融合效果, 但在动态或负重下摄 X 线片, 即使无阳性所见, 在有坚强内固定的情况下也并不一定意味着脊柱融合区牢固融合^[1,8]。相反在应用于临床之前使用动物融合模型可采用各种客观的方法来客观评价各种融合材料和融合技术。

目前有多种动物模型应用于脊柱融合的实验研究中, 其中包括如小鼠、大鼠^[9]、兔^[2-4]、狗^[10,11]、山羊、绵羊^[12]和灵长类动物^[13]。在用于评估骨移植替代物、生长因子或生物干预措施影响的各种融合模型中, 腰椎融合是最常采用的脊柱融合模型。下面主要基于这一脊柱融合模型来讨论对融合的评估方法。

3 实验性脊柱融合术骨与植入物界面融合的评估方法

目前用于评价骨与植入生物材料界面融合程度的技术包括放射影像技术、二维和三维组织形态学、非侵入性骨矿密度仪以及生物力学试验。

3.1 放射线技术

放射线技术可以分为宏观和微观放射照像技术两类。前者包括 X 线平片和 CT, 它们通常被用作活体或离体研究^[14]。由于分辨率较低, 这些二维图像对融合的情况很难作出定性和定量的客观评价。高分辨率的 X 线摄像技术可以精确测量骨融合的量 and 范围, 但这一技术需要将骨融合块包埋在甲基丙烯酸甲酯中, 通过不脱钙组织切片进行分析测定^[15]。

微观放射技术包括微观 X 线照像和高分辨率的 CT 技术, 即所谓的微 CT (Micro-CT)。微观放射技术要求把标本切片, 每个切片呈两个平行的断面, 可以用来研究骨基质矿化程度^[14,15]。微 CT 是一种静态高分辨三维组织形态学评价技术, 分辨率可达 5 μm, 无需组织切片, 可对骨骼和烤

第一作者简介: 男 (1952-), 教授, 医学博士, 研究方向: 脊柱外科和小儿骨科
电话: (00852) 26322729 E-mail: jackcheng@cuhk.edu.hk

瓷生物材料的整体融合体进行客观的三维结构评价。这项技术目前主要用于骨质疏松^[16]或生物材料结构特性的研究^[17]。另外, X 线光电分光光谱仪也是一种选择, 可用于分析融合处的骨生物材料的化学成份和力学特性^[3]。

3.2 组织形态学和组织形态计量学

常规的光镜配备商用的或自制的组织形态计量程序(图像定量分析程序), 用于对骨融合过程的时空变化特征进行定量和定性的组织学研究, 也可用于评价骨融合在不同时段的定性结果。

3.2.1 早期分子水平上的改变 可以通过骨胶原和骨基质蛋白的基因表达研究骨融合的早期过程(术后 2~3 周)中对骨融合块和邻近组织的融合状态进行比较和评价, 包括用分子生物学技术研究骨形态发生蛋白^[2, 5, 9]。

3.2.2 细胞、亚细胞和基质的改变 在融合的早期阶段(术后 4~5 周), 在骨生物材料的表面研究骨和软骨形成与时间和融合体部位的关系和变化, 即植入生物材料后, 研究膜内化骨、软骨内化骨和软骨样化骨的过程^[2, 4, 7, 12]。

为了定性(组织形态学)和定量(组织形态计量学)研究融合过程中的细胞或基质的变化, 人们不断发展和采用许多特殊染色技术, Dickson^[18]和 Von Recum^[19]对此做了较系统综述。其技术线路是首先要制备垂直于植入物长轴的系列不脱钙切片(常为 100 μ m)或脱钙切片(7~10 μ m), 然后染色。甲苯胺兰或碱性 Fusin 染色常用于不脱钙切片的染色, 而苏木素-伊红和其它免疫组化染色方法则被用于研究不同细胞和组织对植入物的反应。随后主要集中在生长因子的促进和生物物理方法的干预后不同时间和空间点上融合块的质量、宿主组织对移植物的反应以及与移植物的结合程度。

3.2.3 其它类型的显微镜及辅助技术 配备有荧光和偏振光附件的传统光镜可分别用来研究有连续荧光标记的骨骼动态重塑过程(同一标本在不同时间点的成骨)和通过胶原纤维排列状况判断骨基质纤维的成熟度。前者原先是用于骨折修复状态^[20, 21], 而最近则用来评价脊柱融合动物试验中成骨的时空变化^[4]。

透射电镜(TEM)用于在细胞和亚细胞水平观察融合块的不同切面, 而扫描电镜(SEM)常用于在细胞和基质水平研究材料界面特性。由于不易取材和选择融合界面, 这两种技术用于定量评估融合程度有一定困难^[22]。最近发展的用于研究骨基质和骨科生物材料的反向散射扫描电镜可以通过评估骨基质的成熟度和矿化程度来评价融合的质量^[23]。另外, 在相同的标本制备和染色条件下, 我们近期的实验研究表明, 组织基质的染色强度或光密度值能反应骨基质力学特性^[15]。由于骨形成和矿化与骨骼的血供相关, 最近的一份研究表明^[24], 在活体注射有色硅胶, 可以在骨融合组织的横段面上半定量测量骨组织内的新生血管。

三维微 CT 技术将会得到更为广泛的应用, 这一技术已被证实与其它器官中有良好的定量效果^[25]。随着三维技术的推广, 目前在骨科生物材料的实验研究中采用的共聚

焦激光显微镜分层评估技术也可应用于脊柱融合的实验性研究中。

3.3 骨密度

非侵入性骨密度测量广泛用于骨质疏松症的研究中, 对骨矿密度(BMD)和骨矿含量(BMC)进行测量, 包括用 DXA(双能 X 线吸收骨密度仪)测量面积骨密度以及采用轴向和外周定量 X 线计算机断层扫描(aQCT 和 pQCT)测量容积骨密度。这些技术适用于临床和实验研究, 评估矿化速度、矿化程度、融合率和融合体质量^[11, 12]。

3.4 生物力学测试

动物脊柱融合模型中植入物最终目的在于增强融合效果, 因对融合块进行力学性能测试被认为是“金标准”或“最终评定标准”。动物脊柱融合模型中可用半定量和定量的生物力学测定方法^[4, 14]。

3.4.1 半定量法 “触诊法”是最常用的方法。首先在骨融合部位用手触摸, 再探测融合块远端和近端运动节段的活动情况, 以区分融合效果以及假关节发生率。

3.4.2 定量法 包括压缩、牵拉、弯曲和扭曲力学测试等。首先将标本固定于自制测试模具或依据特殊标本制作的金属支架上, 再做单轴或双轴力学测试。反映骨融合质量的参数包括强度、硬度、韧性和融合体损坏所需能量。记录损坏的类型也很重要, 这种损坏类型和融合块质量以及融合块不同部位的融合特性有密切相关。

3.5 其它

骨融合块的材料特性还可不用不脱钙组织切片的方法检测, 通过使用: (1) 无创纳米或微米刻压力学测试法(nano-micro-indentation test), 近来也被用于实验性脊柱融合质量的研究^[3]。(2) 非接触性高频扫描声学显微镜可进行细微水平观察, 目前主要用于研究完整骨或骨与牙植入材料界面的力学特性^[15, 24, 26]。无创纳米或微米刻压技术可显示潜在的硬度退化以及受体组织和植入材料的杨氏模量变化^[3], 而高频扫描声学显微镜(scanning acoustic microscopy, SAM)通过测量不同材料对声波的阻抗来反应有关材料的机械特性。SAM 可提供比传统光镜更高分辨率的图像, 并可进行组织形态学和组织形态计量学测量^[15, 26]。

4 评估方法的比较

以上提及的在脊柱融合实验研究中以及骨生物材料界面研究中所采用的方法都有其各自的优势和局限性。传统的二维组织形态计量学的优点在于, 可在细胞、亚细胞及组织基质水平上对宿主组织和植入物以及骨融合情况进行定量分析^[15]。其缺点是在样本的制备、测量和分析上耗时耗力, 在切片过程中甚至会出现标本损坏和假象干扰。近来包括微 CT 和共焦激光显微镜在内的三维无创评估技术的发展可克服这些问题^[26]。由于临床使用的密度仪分辨率相对较低, DXA 或 aQCT 和 pQCT 产生的图像仅可用于估测脊柱融合质量。一些微细力学试验方法如微刻压技术和高频扫描声学显微镜亦可是力学测试的选择, 此类

技术可在不脱钙切片的脊柱融合块上评价融合的质量^[3]。

分子生物学研究表明, 脊柱融合过程涉及多因素, 而且非常复杂。不同动物脊柱融合体在解剖和尺寸大小上有显著不同, 因此没有一种力学试验方法可推荐作为脊柱融合质量评估的标准力学测试方法。这些宏观和微观的评估手段的联合应用, 可以加深我们对植入物融合过程和融合质量的理解。

就动物模型而言, 小动物模型如小鼠和大鼠可用来在分子和细胞水平上对早期改变进行评估。而大动物如狗、山羊、绵羊或灵长类动物, 可用来研究脊柱融合在不同时间点“end-point”的组织学、X 线影像学、骨矿、融合骨结构以及生物力学特性。兔是一种较适中的候选模型, 同时具有较高的成本效应比^[2-4, 10]。此外, 如要采用免疫组织化学技术, 抗体在种系间反应的交叉性和反应性差异也是动物模型可选择性的主要限制^[4-9]。由于单个矫形研究中心不可能装备以上提及的所有研究设备和所需的专业技术人员, 我们提倡区域和国际间合作, 有助于在技术设备要求较高的现代科学研究中做到“资源共享”和“经济实效”。

5 展望

随着动物模型研究的深入, 生物评价技术经验的积累, 将有助于进一步阐明脊柱融合过程中的内在机制。这将更加促进研究和开发新的植骨替代生物材料应用于临床。因此合作研究不仅是生物材料科学家与工程师之间的事, 也需要我们医生、临床科研工作者、生物学家和生物技术学家在一起共同努力。

考虑到可在分子、细胞和组织器官等不同水平评价不同动物脊柱融合模型, 同时结合不同生物的、生物材料的和生物物理的干预措施, 脊柱融合实验研究涉及的面相当广。对于一个特定的实验, 研究者必须明确目的、思路和评价的策略, 从而可以有效地观察实验结果。自身的技术、人力、资金、研究设备、研究效率等, 是确立研究计划、方案实施、数据分析和分析结果的基础。

6 参考文献

1. Boden SD. Overview of the biology of lumbar spine fusion and principles for selecting a bone graft substitute[J]. Spine, 2002, 27(16 Suppl 1): S26-31.
2. Boden SD, Martin GJ Jr, Morone M, et al. The use of coralline hydroxyapatite with bone marrow, autogenous bone graft, or osteoinductive bone protein extract for posterolateral lumbar spine fusion[J]. Spine, 1999, 24(4): 320-327.
3. Guo LH, Guo X, Leng Y, et al. Nanoindentation study of interfaces between calcium phosphate and bone in an animal spinal fusion model[J]. J Biomed Mater Res, 2001, 54(4): 554-559.
4. Guo X, Lee KM, Law LP, et al. Recombinant human morphogenetic protein-4 (rhBMP-4) enhanced posterior spinal fusion without decortication[J]. J Orthop Res, 2002, 20(4): 740-746.
5. Ludwig SC, Boden SD. Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion: a basic science summary [J]. Orthop Clin North Am, 1999, 30(4): 635-645.
6. Chan CW, Lee KM, Yeung HY, et al. Low intensity pulsed ultrasound enhanced the increase in bone volume of spinal processes with implantation of calcium phosphate bioceramics in rabbits posterior spinal fusion model [J]. HK J Orthop Surg, 2003, 7(Suppl): S112.
7. Linovitz RJ, Pathria M, Bernhardt M, et al. Combined magnetic fields accelerate and increase spine fusion: a double-blind, randomized, placebo controlled study [J]. Spine, 2002, 27(13): 1383-1389.
8. Etminan M, Girardi FP, Khan SN, et al. Revision strategies for lumbar pseudarthrosis [J]. Orthop Clin North Am, 2002, 33(2): 381-392.
9. Wang JC, Kanim LE, Yoo S, et al. Effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone marrow cells on spinal fusion in rats [J]. J Bone Joint Surg, 2003, 85-A(5): 905-911.
10. Suh DY, Boden SD, Louis-Ugbo J, et al. Delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 using a compression-resistant matrix in posterolateral spine fusion in the rabbit and in the non-human primate [J]. Spine, 2002, 27(4): 353-360.
11. Jarzem P, Harvey EJ, Shenker R, et al. The effect of fibrin sealant on spinal fusions using allograft in dogs [J]. Spine, 1996, 21(11): 1307-1312.
12. Baramki HG, Steffen T, Lander P, et al. The efficacy of interconnected porous hydroxyapatite in achieving posterolateral lumbar fusion in sheep [J]. Spine, 2000, 25(9): 1053-1060.
13. Akamaru T, Suh D, Boden SD, et al. Simple carrier matrix modifications can enhance delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for posterolateral spine fusion [J]. Spine, 2003, 28(5): 429-434.
14. Foster MR, Allen MJ, Schoonmaker JE, et al. Characterization of a developing lumbar arthrodesis in a sheep model with quantitative instability [J]. Spine Journal, 2002, 2(4): 244-250.
15. Qin L, Hung LK, Leung KS, et al. Staining intensity of individual osteons correlated with elastic properties and degrees of mineralization [J]. J Bone Miner Metabol, 2001, 19(6): 359-364.
16. Schmidt C, Priemel M, Kohler T, et al. Precision and accuracy of peripheral quantitative computed tomography (pQCT) in the mouse skeleton compared with histology and microcomputed tomography (microCT) [J]. J Bone Miner Res, 2003, 18(8): 1486-1496.
17. Jung H, Kim HJ, Hong S, et al. Osseointegration assessment of dental implants using a synchrotron radiation imaging technique: a preliminary study [J]. Int J Oral Maxillofacial Implants, 2003, 18(1): 121-126.
18. Dickson GR. Methods of Calcified Tissue Preparation [R]. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, 1984.
19. Von Recum AF. Handbook of Biomaterials Evaluation: Scientific, Technical, and Clinical Testing of Implant Materials [M]. 2nd edition. Philadelphia: Taylor & Francis, 1999.
20. Bucknall CB. Applications of microscopy to the deformation and fracture of rubber-toughened polymers [J]. J Microscopy, 1999, 195(2): 105-115.

腰椎间融合器的现状及发展方向

张绍东¹, 吴小涛¹, 唐天驷²

(1 东南大学附属中大医院骨科 210009 南京市; 2 苏州大学附属第一医院骨科 215006 苏州市)

中图分类号: R318.08, R687.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-406X(2004)-07-0443-04

20世纪50年代, Cloward首先提出后路腰椎间融合术 (posterior lumbar interbody fusion, PLIF) 的概念。从生物力学看这是一种较为理想的脊柱融合术, 已逐渐发展成为脊柱外科基本技术之一。1984年, DeBowes报道将不锈钢笼 (cage) 置入狗的颈椎获得愈合。1988年, Bagby将 cage 按照 Cloward 方法用于人体颈椎间融合, 并提出“撑开-压缩”原理 (distraction-compression principle) 来描述纤维环撑开后对椎间隙内 cage 形成压缩固定的力学机制。同年, Kuslich 与之合作, 采用钛合金制成 cage 用于腰椎间融合, 命名为 BAK (Bagby And Kuslich, BAK)。1989年, Ray 设计出金属螺纹融合支架 TFC (threaded fusion cage, TFC)。BAK、TFC 成为腰椎间融合器的早期代表。随着临床及生物力学研究逐渐增多, cage 也从早期的螺纹式圆柱体形, 发展出长方体、椭圆形和网状等多种形态。应用 cage 治疗腰椎疾患只有短短的十余年时间, 但它在生物力学方面的优越性越来越受到关注, 新的设计理念不断引入, 技术、材料日益改进、更新, 呈现较快的发展。笔者就相关文献做一综述。

1 腰椎间融合器的作用原理

腰椎间融合器基于 Bagby^[1]阐明的原理, 即利用 cage 置入后的撑开力量使椎间盘纤维环和前、后纵韧带处于张力状态, 而自身重力及椎旁肌肉的动态收缩, 两种力作用相反, 使 cage 达到稳定状态, 在椎间隙狭窄的病例, 可发

挥牵引性加压 (distractive-compression) 作用, 通过恢复椎间隙高度以恢复脊柱前、中柱的应力及稳定, 扩大椎间孔, 缓解神经根受压, 增加椎管前后径, 减轻原有的椎管内占位。cage 对没有椎间隙塌陷的腰椎退变病例并不适宜^[2], 因为椎体受到的支撑力量不足, cage 承载的反作用力相应降低, 保持 cage 稳定的力学平衡被打破, 倘若不能通过附加椎间加压, 建立新的平衡, 术后极易导致 cage 移位。cage 的固定分早期和后期固定两种, 早期是通过 cage 在椎间隙产生的作用力和反作用力获得抗剪切、抗旋转效应, 后期通过界面、植入骨与受体骨面之间骨组织相互长入达到骨性愈合^[3]。

2 cage 在材料、外形方面的发展

继 BAK 之后, Ray^[4]设计的 TFC 将 Osteo-Vich 骨钉与 BAK 结合, 二者都是钛合金制成, 设计原理、外形大同小异, 这是早期的、第一类 cage, 带有螺纹的中空圆柱体状, 其缺陷包括: 融合界面小, 存在骨长入限制区, 妨碍影像学判断融合^[5], 过多破坏骨性终板, 易导致沉陷、移位, 且不能有效防止 cage 在椎间隙内的滚动, 抗扭转力量较弱。1992年 Harms^[6]首次使用直立形钛网状 cage, 此后相继有了 Syncage、TIS (Titanium interbody spacer) 等, 均为直立形, 上、下面锯齿状设计, 通过增加界面摩擦力从而加强与终板的固定, 此为第二类 cage。第三类 cage 主要是长立方体形, 中空, 四周开孔, 内部填充骨屑, 平放于椎间隙内, 融合面有不同形状的锯齿结构, 以防前后滑动。近年来, 该类 cage 发展较快, 出现了多种变化, 如借鉴人工假体的设计理念, 将 cage 四周进行表面喷涂钛丝 (如 PROSPACE)、羟基磷灰石 (HA), 涂层的微孔样结构有利于骨组织长入;

第一作者简介: 男 (1969-), 主治医师, 医学博士, 研究方向: 脊柱外科、创伤骨科

电话: (025) 83272207 E-mail: sheltongzh@163.com

2001, 201 (2): 221-229.

21. Qin L, Leung KS, Chan CW, et al. Enlargement of remaining patella after partial patellectomy in rabbits [J]. Med Sci Sports Exer, 1999, 31 (4): 502-506.
22. Stefflik DE, Corpe RS, Young TR, et al. Light microscopic and scanning electron microscopic retrieval analyses of implanted biomaterials retrieved from humans and experimental animals [J]. J Oral Implantol, 2001, 27 (1): 5-15.
23. Radder AM, Leenders H, Van Blitterswijk CA. Application of porous PEO/PBT copolymers for bone replacement [J]. J Biomed Mater Res, 1996, 30 (3): 341-351.
24. Toribatake Y, Hutton WC, Tomita K, et al. Vascularization of

the fusion mass in a posterolateral intertransverse process fusion [J]. Spine, 1998, 23 (10): 1149-1154.

25. Ortiz MC, Garcia-Sanz A, Bentley MD, et al. Microcomputed tomography of kidneys following chronic bile duct ligation [J]. Kidney Int, 2000, 58 (4): 1632-1640.
26. Katz JL, Meunier A. Scanning acoustic microscopy of human and canine cortical bone microstructure at high frequencies. In: Lowet G, et al. editors: Bone Research in Biomechanics [M]. Amsterdam: IOS Press, 1997. 123-137.

(收稿日期: 2004-07-27 修回日期: 2004-08-29)

(本文编辑 彭向峰)