



# 磷酸钙骨水泥对骨形态发生蛋白缓释作用的体外实验研究<sup>△</sup>

张 伟 侯春林 刘昌胜\* 陈爱民 匡 勇

**摘 要** 目的:研究CPC对BMP的体外缓释作用及其药代动力学,为将CPC与BMP制成复合型生物活性人工骨提供理论依据。方法:以单纯CPC为对照组,以按1g CPC固相配5mg rhBMP-2的配比将CPC与rhBMP-2复合作为实验组,浸入0.01mol/L的磷酸盐缓冲液中,分别在第1、2、3、4、7、14、30、90、180、360d取缓释液,用高效液相色谱仪分析不同时间rhBMP-2缓释量,绘制rhBMP-2缓释曲线,总结药代动力学规律。结果:第1~7d rhBMP-2出现快速释放,释放曲线呈快速上升直线;第7~14d rhBMP-2释放处于平台期;第14~360d rhBMP-2出现缓慢而持久的释放,释放符合Higuchi方程。结论:CPC能对rhBMP-2有缓慢而持久的体外缓释作用,有望充当rhBMP-2的缓释载体,但缓释速度尚有待提高。

**关键词** 磷酸钙水泥; 骨形态发生蛋白; 缓释系统; 药代动力学

**中图分类号** R68 **文献标识码** A **文章编号** 1005-8478(2001)08-0783-04

*In Vitro Study of CPC's Sustained Release of BMP // ZHANG Wei, HOU Chun-lin, LIU Chang-sheng, et al. Department of Orthopedics, Changzheng Hospital, Shanghai 200003*

**Abstract** Objective: In order to study CPC's sustained release of rhBMP-2 and its kinetics in vitro. Methods: We immersed the CPC/rhBMP-2 compound (1g CPC powder to 5 mg rhBMP-2) into 0.01 mol/L phosphate buffer solution. The solution including rhBMP-2 released from CPC/rhBMP-2 compound was extracted after 1, 2, 3, 4, 7, 14, 30, 90, 180 and 360 days respectively. The extracted solution was analyzed by Liquid Chromatograph. The release profile of rhBMP-2 from CPC was scaled and its kinetics was assayed. Results: rhBMP-2 had been released rapidly during the 1st to 7th day, slowly and lastingly during the 14th to 360th day, and almost at a platform period during the 7th to 14th day. The release of rhBMP-2 from CPC/rhBMP-2 compound during the 14th to 360th days followed the Higuchi model equation. Conclusion: It can be concluded that CPC showed its characteristics as a sustained delivery system for rhBMP-2 and may be used as a novel sustained release carrier for rhBMP-2 in clinic.

**Key words** Calcium Phosphate Cement(CPC); Bone Morphogenetics Protein; Sustained release system; Pharmaco kinetics

骨形态发生蛋白(BMP)有诱导成骨作用,但在实际应用之中仍不能令人满意,究其原因缺乏一个好的载体。单纯BMP被植入人体之后,会被组织液稀释及蛋白酶所分解,在局部能保持有效浓度的时间非常有限,不能有效发挥其骨诱导作用。不少学者在致力于寻找合适的载体来提高BMP的利用率。但到目

前为止,尚未发现理想的BMP载体。磷酸钙水泥(CPC)已被证明能用作某些抗生素、抗癌药及白蛋白和胰岛素的缓释载体,对缓释细胞因子类物质目前尚未见报道。为了探索将BMP与CPC复合成生物活性人工骨的可行性有和效性,本文将BMP和CPC按前述的实验研究所得的配比进行体外释放实验研究,探索其释放规律及机制。

## 1 材料和方法

**1.1 主要材料** CPC:华东理工大学瑞邦公司提供; rhBMP-2:购自军事医学科学院

## 1.2 研究方法

**1.2.1 实验分组** 实验组:rhBMP-2/CPC复合物,标本数量为3件,配比为:CPC固相1g和相应的液相

<sup>△</sup>国家自然科学基金资助项目(项目批准号39970748)

作者单位:第二军医大学长征医院骨科,上海 200003

\*华东理工大学瑞邦生物材料研究所

作者简介:张伟(1970-),男,安徽桐城人,主治医师,医学博士。研究方向:1.骨科创伤与修复重建外科;2.骨修复与骨科生物材料。电话:(021)65494527

4ml + rhBMP-25mg, 对照组: 单纯 CPC。

1.2.2 rhBMP-2/CPC 复合物和单纯 CPC 标本的制作 称重 0.5g CPC 固相粉末两份分开置于研钵内, 一个加入 2.5mg 的 BMP, 另一个不加 BMP, 充分研磨混合后放入调皿内, 各加 CPC 液相 2ml, 调和成较稠厚的糊状时, 填入自制的模具内, 用 2kg 的砝码加压驱赶可能残存的空气, 约 10min 后, 小心顶出样条, 样条为直径 6mm, 高 10mm 的圆柱体。将其置于 37℃ 恒温水浴箱内继续固化 30min, 取出样条, 经细砂纸打磨, 外形相同, 置于 4℃ 冰箱内保存备用。上述标本各 20 件, 分别随机抽取 3 件作为待测样本。

1.2.3 缓释体系的模型建立 将待测的实验组和对照组样本分别浸入 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液, 按 1、2、3、4、7、14d、1、3、6 个月和 12 个月分别留取浸出液, 即为相应时间的缓释液。

1.2.4 实验采样和送检 将标本分别放入 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液, 置于 37℃ 恒温水浴箱内持续浸泡 24h, 然后暂时取出标本, 将浸出液摇匀后吸取到送检试管内, 即为缓释第 1d 的待测浸出液。原试管用相同的 PBS 液反复冲洗 3 次, 待用。将已取出的 6 个标本再放入已洗净的试管内, 再分别加入 PBS 液 5ml, 按以上相同方法浸泡、取样。分别留取缓释第 2、7、14d 和第 1、3、6、12 个月的待测浸出液, 标记, 送检。

1.2.5 图形和数据分析 将 BMP 标准品用 0.1mol/L 的 PBS 液分别配制出浓度为 1ug/ml、10ug/ml、50ug/ml、100ug/ml 和 1000ug/ml 的标准参照液, 用高效液相色谱仪测出标准图形, 自动积分方法计算出曲线下面积, 绘制标准 BMP 含量—面积曲线。将待测的实验组和对照组缓释液分别用高效液相色谱仪测出色谱图形, 自动积分方法计算出曲线下面积, 与标准曲线对照, 计算出各个时间样本的 BMP 浓度和含量。6 个样本的各个时间的缓释液 BMP 含量分别与前一时间的 BMP 缓释总量相加, 为该时间的 BMP 缓释总量。

1.2.6 缓释曲线的绘制和分析 分别取实验组和对照组标本在各个时间的 BMP 缓释总量的平均值, 绘制 BMP 缓释曲线。分析 BMP 缓释曲线, 归纳出缓释规律。

## 2 结果

### 2.1 不同时间的 BMP 缓释总量

### 2.2 BMP 缓释总量—时间曲线(见图 1)

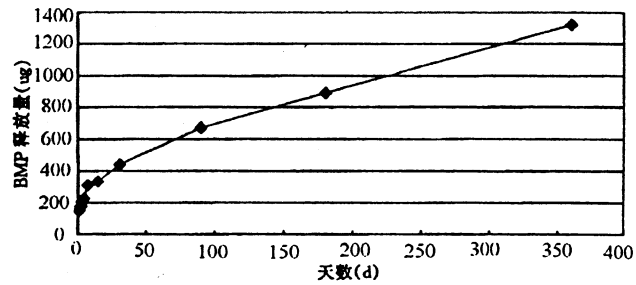


图 1 BMP/CPC 的 BMP 缓释曲线

图 1 所示的 BMP 缓释总量—时间曲线, 在第 1~7d, 曲线呈较陡直的上升支, 第 7~14d, 是一个平台期, 而第 14d 之后, 是一个相对平缓的曲线上升支。

将第 1~7d 的数据进行直线回归分析, 绘制直线如图 2, 其方程为:  $y = 27.191x + 121.23$ 。

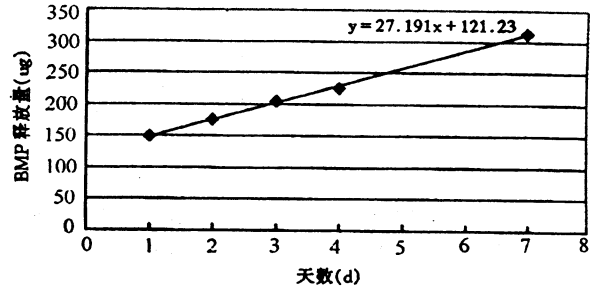


图 2 第 1~7d BMP 缓释的直线回归

将第 14~360d 的 BMP 含量值对天数的  $1/2$  次方绘制散点图如图 3, 经直线回归分析, 绘制直线, 其方程为:  $y = 61.587x' + 82.34$ ,  $x' = x^{1/2}$ 。

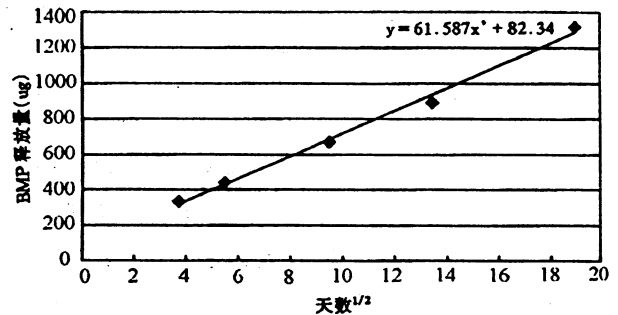


图 3 第 14~360d BMP 释放量—天数<sup>1/2</sup>散点图及直线回归

由该方程可得:  $x = [(y - 82.34) / 61.587]^2$

由此推算:

BMP 的 50% 缓释时间

$$= [(1250 - 82.34) / 61.587]^2 = 359.5d$$

2.3 对照组结果: 各时间浸出液中未检测出 BMP (见表 1)。

表1 不同时间的BMP/CPC复合物浸出液的BMP含量(ug)

标本	1d	2d	3d	4d	7d	14d	30d	90d	180d	360d
1	151.3	169.6	201.6	228.9	317.4	336.8	437.3	673.1	895.3	1 324.6
2	147.7	178.5	207.2	227.4	311.9	336.3	439.2	672.7	888.6	1 321.9
3	149.5	177.4	205.3	221.7	309.7	331.9	442.9	668.4	889.7	1 317.8
$\bar{x}$	149.5	175.2	204.7	226.0	313.0	335.0	439.8	671.4	891.2	1 321.4
$\pm s$	$\pm 1.04$	$\pm 2.80$	$\pm 1.64$	$\pm 2.19$	$\pm 2.29$	$\pm 1.56$	$\pm 1.64$	$\pm 1.50$	$\pm 2.07$	$\pm 1.98$

由表1可见:BMP的第14、30、90、180和360d释放量分别是13.4%、17.6%、26.8%、35.6%和52.8%。由表1数据绘制BMP缓释总量-时间曲线。

### 3 讨论

骨形态发生蛋白(BMP)的诱导成骨作用已经得到国内外众多学者的实验证明,这也是骨科学等生命科学界学者们不争的事实,由此也激发了30余年来关于BMP的生物活性研究的不衰的热潮。但多数学者认为BMP在实际应用中的诱导成骨作用并不理想,在临床的应用也未得到相应的认可和推广。究其原因有三:一是BMP的纯度或活性不足;二是在应用BMP的过程中,使用技巧、剂量掌握等方面的差异对BMP的诱导成骨活性的发挥也有重要影响;三是BMP的活性发挥需要有合适的载体,使BMP在局部组织内能较长时间保持在一个合适的浓度范围。直接将BMP植入机体组织内,与组织液接触,一方面机体内处于不停代谢状态下的组织液很快将BMP稀释或运走,另一方面组织液内的各种蛋白酶很快将BMP分解。因此,如果有一个很好的BMP载体,能较长时间地缓慢释放BMP,使局部在一定时间内保持较高的BMP浓度,就能避免和减轻BMP的浓度下降或活性降低,以利BMP有效发挥其诱导成骨作用。因此,许多学者致力于寻找BMP优良载体的研究。载体除了本身作为植入材料应具有的良好生物性能等,载体首要的性能之一当然是能对BMP有良好的缓释作用<sup>[1]</sup>。CPC已经被证明具有良好的生物安全性、可降解性,是安全的植入材料,且对一些药物或多肽有缓释作用<sup>[2,3,4]</sup>,因此本实验在体外研究CPC对BMP缓释作用,为其缓释载体的研究和应用提供参考。

研究结果显示:第1~7d BMP呈现一快速的释放,BMP释放量与时间成直线关系;在第7~14d BMP释放非常缓慢,处于一个相对的平台期;第14d以后至第360d, BMP呈现持久而缓慢的缓释行为。这与CPC作为载体的特性有关,在释放前7d,所载BMP的释放主要是表面和表层的BMP,这是一个简单的溶解

过程,BMP释放速度较快。CPC内部的BMP释放是通过CPC内部相互连通的微孔结构,在体内各种因素的作用下,CPC内部发生重结晶,微孔结构内的管腔相互连通,不断释放BMP,呈现典型的多孔缓释载体释放行为。第7~14d,是介于两者之间的平台期,这期间材料表面的BMP已经不多,而深部的BMP释放尚少,这样的释放规律与有些作者的文献报道相一致<sup>[5]</sup>。

描述药物的多孔缓释载体的Jugichi方程表述为: $M_t = AM_0 [C_s D_{eff} (2C_d - \epsilon C_s) t]^{1/2}$ 。其中: $M_t$ 为在时间t的药物释放量, $M_0$ 是所载的药物总量,A是载体材料的表面积, $D_{eff}$ 是药物在载体微孔内的有效溶解系数, $C_s$ 是药物的溶解度, $C_d$ 是药物浓度, $\epsilon$ 是载体微孔率,药物在多孔缓释载体中的释放行为应该符合此方程。对于已知的载体材料和所载的药物(例如本研究中的CPC和BMP)来说, $M_0$ 、 $C_s$ 、 $D_{eff}$ 、 $C_d$ 、 $C_s$ 都是常数,A和 $\epsilon$ 在材料成形后也是固定值,因此 $M_t$ 和 $t^{1/2}$ 成正比就是该方程最直接和简单的表现了。在本实验的第14~360d,BMP释放量与时间(天数)的1/2次方基本成直线关系,也就是说在Hugichi图中呈近乎直线,说明以CPC为载体的BMP释放行为符合Hugichi方程,CPC具有多孔缓释载体的特性,有望成为BMP的缓释载体<sup>[2]</sup>。

在本实验中,BMP的释放速度很慢,50%释放时间是359.5d,这个速度显然太慢。但CPC本身并不只是单纯的载体,其缓释行为是与自身的降解与重结晶相伴行的,影响到CPC降解的因素都应该能影响到其对BMP的缓释行为。而CPC在机体内是可自行降解的,而在本实验中的磷酸盐缓冲液是固定的、非生物性的和非代谢性的,BMP/CPC复合物的降解非常微弱,因此其缓释BMP的速度自然就较慢和不完全。而在体内BMP/CPC植于组织液中,周围液体是处于持续的代谢和流动之中,其降解速度会增快其缓释BMP的速度也会加快释放得也将更加完全。如果必要,通过调整CPC的微孔结构如微孔率和微孔孔径等也能

改变其缓释的速度。这些正是本项目的后续研究所要探索和验证的内容。

参考文献:

- [1] Winn SR, Uludag H, Hollinger JO. Carrier system for Bone Morphogenetics Proteins[J]. Clin Orthop, 1999, 367: 95~106.
- [2] Fernandez E, Ginebra MP, Boltong MG, et al, Kinetic study of the setting reaction of a calcium phosphate bone cement [J]. J Biomed Mater Res, 1996, 32(3):367~74.
- [3] Otsuka M, Matsuda Y, Suwa Y, et al, A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement 2: Physicochemical properties and drug release rate of the cement - containing indomethacin[J]. J Pharm Sci, 1994, 83(5):611~5.
- [4] Otsuka M, Matsuda Y, Suwa Y, et al, A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement 3: Physicochemical properties and drug release rate of bovine insulin and bovine albumin[J]. J Pharm Sci, 1994, 83(2): 255~8.
- [5] Otsuka M, Matsuda Y, Suwa Y, et al, A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement 4: Effects of the mixing solution volume on the drug release rate of heterogeneous aspirin-loaded cement[J]. J Pharm Sci, 1994, 83(2):259~63.

(收稿:2001-05-08 修回:2001-06-04)