

鈣磷系骨水泥添加凝血劑對凝血時間及細胞活性的影響

The effects of adding coagulant agent on the blood clotting time and MG63 cell activity of calcium phosphate cement

林佳靜 Chia-Ching Lin^{1,3}, 林殿傑 Dan-Jae Lin^{1,3*}, 陳文正 Wen-Cheng Chen²

¹ 中國醫藥大學口腔衛生學系 Department of Dental Hygiene, China Medical University, Taichung, Taiwan

² 逢甲大學纖維及複合材料學系 Department of Fiber and Composite Materials, Feng Chia University, Taichung, Taiwan

³ 中國醫藥大學口腔生物實驗室 Dental biology Laboratory, China Medical University, Taichung, Taiwan

*Corresponding Email: djlin@mail.cmu.edu.tw

一、中文摘要

本研究的目的是探討添加凝血抗菌劑次沒食子酸鉍(bismuth subgallate, BS)對鈣磷系骨水泥(calcium phosphate cement, CPC)凝血時間及細胞活性的影響。期望能改善鈣磷系骨水泥容易被血沖散的缺點，並可以應用在減少外科手術中之出血量。BS 以 5, 10, 15wt% 比例加入 CPC 原始粉末(TTCP/DCPA)中，以液粉比 0.35 混合 1M 磷酸，填模形成直徑 6mm 厚度 3mm 之試片。以正常成人全血 5 μ L 滴在試片上，每 15 秒鐘以採血針測試是否凝血。人類骨肉瘤細胞株 MG63 培養在硬化後試片上，以 MTT 法測量含 BS 各組及對照組(不含 BS)與空白組(無試片)比較 1 小時及 24 小時之細胞活性。實驗結果發現添加 10wt% BS 時，凝血時間由 418 \pm 13 秒(mean \pm SD)顯著縮短到 358 \pm 6 秒。添加 15 wt% BS 時，凝血時間僅需 188 \pm 7 秒。由 MTT 細胞活性 1 小時的結果發現，含有 BS 的組別細胞活性(OD₅₇₀ 值)較不添加 BS 之對照組及空白組高。經過 24 小時，含有 BS 各組細胞活性比不添加 BS 之對照組高與空白組無顯著差異。添加 BS 的各組 1 小時活性皆都比 24 小時還高，然而空白組 24 小時的細胞活性比 1 小時時高。添加超過 10wt% BS 可以使 CPC 上的凝血時間明顯縮短。添加 BS 會使體外培養 MG63 細胞株 1 小時的活性較對照及空白組高，但 24 小時與空白組無差異。

關鍵字：鈣磷骨水泥、次沒食子酸鉍、凝血、細胞活性

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effects of adding bismuth subgallate (BS) (a coagulant/antimicrobial agent) to the calcium phosphate cement (CPC) on its blood clotting time and cell viability. 5, 10, 15wt% BS (5BS, 10BS, 15BS) were added to the CPC original powder (TTCP/DCPA) and mixed with 1M phosphoric acid at a liquid/ powder ratio of 0.35. The pastes were

filled in a stainless mold to form specimens of 3mm thickness and 6mm diameter. Samples without BS were set as control group. The clotting time was determined by dropping 5 μ L adult whole blood on each specimen and measured the total time until protein fiber formation which was tested every 15sec by a blood taking needle. MG63 human osteosarcoma cell viability were measured by MTT assay at 1 hour and 24 hours. Data were analysis by ANOVA followed with Tukey's test for post-hoc comparison. The clotting time of 10BS (358 \pm 6sec) is significantly shorter than that of the control group (418 \pm 13sec, p<0.001). The clotting time of 15BS is only 188 \pm 7sec. The one hour cell viability of each group containing BS was higher than that of the control group and blank group. After 24 hours, cell activities of BS-contained groups were still higher than that of the control group but there were no significant difference to the blank group. Adding more than 10wt% BS can significantly accelerate the blood clotting on the CPC. Adding BS will increase the viability of MG63 cell at the first hour, but the cell viabilities at 24 hours were similar to the blank group.

Keywords: calcium phosphate cement, bismuth subgallate, coagulation, cell activity

二、緣由與目的

鈣磷系骨水泥硬化後產生的氫氧基磷灰石(hydroxyapatite, HA)晶體結構與自然骨十分接近。而且鈣磷系骨水泥硬化後會含有很大比例的孔隙度，所以具有良好引導骨組織向內生長能力及可以增加機械鍵結。並且具有可塑性，臨床操作性佳，可應用在修補複雜形狀的骨折、骨缺陷、外科手術的骨出血止血。然而，鈣磷系骨水泥硬化時間太長，一般傳統型鈣磷系骨水泥的硬化時間需要約 30 分鐘，且若無可將粉末互相鍵結牽引的添加劑，與血液或體液接觸時會崩解分散。

許多研究藉由起始反應物的改變及熱處理，希望製造快速反應之 CPC。1987 年 Takezawa 等人[1] 研究在 CPC 中加入 HA 的晶種，以增加 HA 反應

析出的速度。另外，Ishikawa 在 1995 年討論利用控制粒徑的方式縮短溶液中離子達到過飽和的時間來控制融解的速率，因為 CPC 是靠溶解達到過飽和後再析出第二相，所以可以將粉末粒徑縮小，增加表面積來加速溶解，縮短達到過飽和的時間[2]。但上述兩種方法縮短硬化時間的效果有限。而 Chow 在 1994 年將硬化劑的磷酸根濃度從 25mM 增加到 1M，很明顯的將硬化時間從 25 分鐘縮短到 5 分鐘。隨後有許多學者添加膠凝劑包括: Hdroypropyl methylcellulose, chitosan lactate...等以加速硬化[3, 4]，減少被血液沖散之情形。

次沒食子酸鈹是一種不易溶解的重金屬化合物，它可活化血液凝結過程中的 Hageman Factor (凝血因子 XII)，導致凝血活化和提早形成的纖維蛋白從而加速血液的凝結[5]。另外，次沒食子酸鈹(BS)經由一系列包括發炎、血液凝結、上表皮再生、纖維素增生及組織重建等複雜的分子及生化反應機制，可以加速凝血並促進傷口癒合。在 1989 年，Maniglia 等人[6]使用 BS 作為止血劑在扁桃體切除術可以制止小血管和毛細血管出血，降低手術後出血。其他作者也陸續證實了 BS 作為止血劑的效力[7, 8]。在外科手術中，常常有開放性的創傷暴露的結締組織，所以止血是相當重要的。在臨床上，凝血功能有障礙的患者在手術過程中如何控制失血也是相當重要。Kim 等人[9]在牙周手術報告曾指出成功利用 BS 改善止血。2002 年 Rey 等人[10]報告了使用 BS 在血友病患者的牙科手術上改善止血的成功案例。一些研究已經證明了 BS 在軟組織具有很好的止血療效，但目前在文獻上極少研究探討 BS 在骨組織修復材可能產生的影響[11]。

三、材料與方法

(一)骨水泥試片製作

利用 Brown 和 Chow 所發展的 CPC，以鹼性的 TTCP 與中性的 DCPA 反應形成弱鹼性的 HA。BS 以 5, 10, 15wt% 比例加入 CPC 原始粉末(TTCP/DCPA)中，以水粉比(L/P ratio)0.35 於充分調拌均勻，並 3 分鐘內完成填入不鏽鋼模中形成直徑 6mm 厚度 3mm 之試片。硬化時間約 5 分鐘，反應式如下： $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O} + \text{CaHPO}_4 \rightarrow \text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ 。

(二) 凝血時間

使用採血針輕刺受試者手指尖端，並加壓使血液流出。接著以每 5 μL 滴在試片上，每隔 15 秒鐘以採血針測試是否凝血

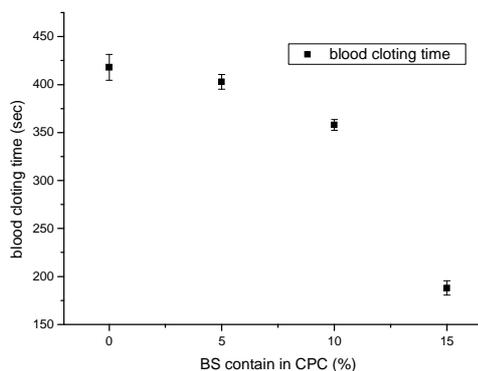
(三) 細胞活性

MTT

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide 可以與活細胞中粒線體(mitochondria)的酵素進行反應而改變顏色由黃色到紫色。因此不同的存活細胞含量在 ELISA reader 中將會有不同的 optical density(OD)值，可以將存活細胞定量。人類骨肉瘤細胞株 MG63 培養在硬化後試片上，以 MTT 法測量含 BS 各組及對照組(不含 BS)與空白組(無試片)比較 1 小時及 24 小時之細胞活性。詳細步驟如下：

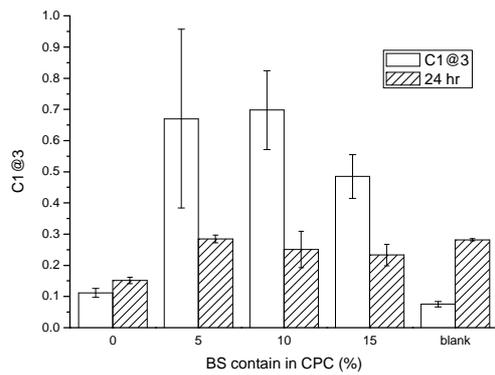
1. 將培養盤中的 medium 抽出並以 PBS 溶液沖洗兩次，將 0.1g 的 MTT 粉末溶於 50ml 的 PBS 溶液中，過濾滅菌，然後在每一個 well 中加入 0.1ml 的 MTT 溶液，置於 incubator 中作用 3 小時，整個過程需避光。
2. 在每個 well 中加入 0.2ml DMSO 溶液，在搖盪器(shaker)上搖 15 分鐘，使其均勻。將細胞內的 MTT 產物 formazan 溶出。
3. 取 0.1ml 溶液置於 96well 的培養盤中，以 ELISA Reader 讀取波長 570 nm 的吸光值

四、結果與討論



圖一、凝血時間變化圖

圖一為凝血時間隨著添加不同比例(0%, 5%, 10%, 15%) BS 在 CPC 裡的變化趨勢圖，由 ANOVA 的結果我們發現隨著添加不同比例(0%, 5%, 10%, 15%) BS 在 CPC 裡確實顯著影響血液凝固時間($F(3,16)=676, P=0$)。經過事後比較分析(Tukey's test)各組凝血時間的差異發現，添加 5% BS (403 \pm 7.5 秒) 和不添加 BS 組 (418 \pm 13.5 秒) 之間並沒有顯著差異($P=0.08$)。可是添加 10% 和 15% BS 組的血液凝固時間(358 \pm 5.7 秒與 188 \pm 7.5 秒)分別都較不添加 BS 組更短($P<0.001$)，同時也比添加 5% BS 血液凝固時間短($P<0.001$)。而當添加 15% BS 在 CPC 中使凝血時間縮短到僅(188 \pm 7.5 秒)為所有組別中凝血時間最短($p<0.0001$)。



圖二、MG63 類骨母細胞培養在含 BS 的 CPC 上 1 小時以及 24 小時的各組 OD 值

圖二為利用 MTT 測量 MG63 類骨母細胞培養在含 BS 的 CPC 上 1 小時以及 24 小時的細胞活性比較圖，經過 ANOVA 分析我們發現添加不同比例的 BS (0%,5%,10%,15%) 在 CPC 對於體外培養 MG63 類骨母細胞活性確實有影響 ((F(4,25)=25.9,P<0.001) for 1hr incubation; (F(4,25)=27,P<0.001) for 24 hr incubation)。事後比較分析(Tukey's test) 各組 OD 值之間的差異發現，在 1 小時測量時發現不添加 BS 組(0.11±0.014) 的 OD 值小於 5 BS 組(0.67±0.29)，10BS 組(0.7±0.13)及 15BS 組(0.48±0.07)(P<0.001)，但對於空白組(0.08±0)卻沒有明顯差異(P=0.9)。而有添加 BS 的各組(5BS, 10BS 及 15BS) OD 值都大於空白組(P<0.001)，5BS 及 10BS 兩組之間並沒有明顯差異，但 10BS 組的 OD 值顯著高於 15BS 組(P=0.1)。在 24 小時的 OD 值變化中，發現只有不添加 BS 的組別 (0.15±0.01) OD 值明顯小於 5BS(0.28±0.01)，10BS(0.25±0.06)，15BS(0.23±0.03) 以及空白組(0.28±0) (P<0.001)。而除了添加 BS 的各組與空白組間並無顯著差異。分析各組在 1 小時以及 24 小時不同時間比較 OD 值大小，我們發現只有沒有添加 BS 的組別在 1 小時以及 24 小時的 OD 值差異不大，其餘 5BS，10BS，及 15BS 各組經 24 小時培養後 OD 值明顯低於培養 1 小時的 OD 值，然而空白組經 24 小時培養後 OD 值明顯高於培養 1 小時的 OD 值。

五、結論

添加超過 10wt%BS 可以使 CPC 上的凝血時間明顯縮短。添加 BS 會使體外培養 MG63 細胞株 1 小時的活性較對照及空白組高，但 24 小時與空白組無差異。

六、參考文獻

- [1] Takezawa Y, Doi Y, Shibata S, Wakamatsu N, Kamemizu H, Goto T (1987) *J Japan Soc Dent Mat Dev*, 6:426-31.
- [2] Ishikawa K, Takagi S, Chow LC, Ishikawa Y (1995) *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 6:528-33.
- [3] Cherng A, Takagi S, Chow LC (1997) *J Biomed Mater Res*, 35:273-7.
- [4] Xu HH, Takagi S, Quinn JB, Chow LC (2004) *J Biomed Mater Res A*, 68:725-34.
- [5] Rafaj RB, Marinculic A, Raic B, Mrljak V, Zvorc Z, Ramadan P (2001) *Rev Med Vet-Toulouse*, 152:545-7.
- [6] Maniglia AJ, Kushner H, Cozzi L (1989) *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 115:92-4.
- [7] Callanan V, Curran AJ, Smyth DA, Gormley PK (1995) *The Journal of Laryngology & Otology*, 109:206-8.
- [8] Conley SF, Ellison MD (1999) *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 125:330-3.
- [9] Kim SH, Grein RL, Tramontina VA (1997) *J Bras Odont Clin*, 1:311-314.
- [10] Rey EA, Puia SA, Castillo W. Dental Extraction in Patients with Haemophilia and Inhibitors, in *Inhibitors in Patients with Haemophilia*, Blackwell Science Ltd; 2008.183-184.
- [11] Puia SA, Renou SJ, Rey EA, Guglielmotti MB, Bozzini CE (2009) *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 38:785-9

[1] Takezawa Y, Doi Y, Shibata S, Wakamatsu N, Kamemizu H, Goto T (1987) *J Japan Soc Dent*

