综述

文章编号:1000-5404(2005)18-1896-03

异种脱蛋白松质骨载体的研究进展

Development of deproteinized xenogenic cancellous bone

高春阳 综述,李起鸿 审校 (第三军医大学西南医院全军骨科,重庆 400038)

单纯骨髓间充质干细胞植入体内成骨能力较低,主要原因是缺乏细胞载体,细胞易流失,不能在植入部位形成有效的细胞浓度[1]。细胞载体不仅为细胞成长提供支持和保护,更重要的是调节细胞的形态发生过程,影响细胞生存、迁移、增殖和功能代谢。所以在骨组织工程研究中制备和筛选有利于种子细胞粘附、增殖和分化的细胞载体十分重要。

骨组织工程需要制备类似于骨小梁结构载体,经脱蛋白处理的松质骨立体空间结构并无大的破坏,由羟基磷灰石和胶原网架构成大小不等、相互交通、开放的孔隙和高度的孔隙间连接。松质骨的这种结构特点不存在种属及个体特异性,使材料的获取更广泛,从组织工程骨支架材料的网架-孔隙角度考虑,选择源于松质骨制作的生物衍生骨为宜[2]。

生物衍生骨来源包括异种骨和异体骨。异体骨的优点是成分和结构与受体相同。但异体骨同样有排斥反应,并有供体来源有限、传播疾病及伦理问题等缺点。异种骨具有自体骨相同的骨小梁结构,Savolain 于 1994 年应用美国生产的异种骨做了 250 例临床对照应用研究,取得了与自体骨相同的效果。异种骨取材广泛, 价格低廉,作为植骨生物材料有着巨大的潜在价值[3]。但由于异种骨移植时种属间的抗原差异, 存在剧烈的免疫排斥反应,骨组织兼容性差。研究表明异种骨移植存活细胞早期具有成骨能力,但免疫排斥反应导致移植骨中细胞被杀死,早期成骨被吸收,其自身成骨作用是无效的[4]。如何减弱或消除异种骨免疫排斥反应是骨科领域的研究重点和难点,去除异种骨中主要抗原成分是异种骨移植研究中的首要任务。

1 异种松质骨的免疫机制

异种骨的抗原包括:①天然异种抗原。α2 半乳糖基抗原(α2Gal)是公认存在于哺乳动物体内的异种抗原,主要分布于哈佛氏管内皮细胞膜上[5]。②主要组织相容性复合物(MHC)决定的细胞表面糖蛋白。MHC-Ⅰ型抗原分布于所有有核细胞,即骨细胞、成骨细胞、破骨细胞等细胞膜表面均表达 MHC-Ⅰ型抗原。MHC-Ⅱ型抗原的组织分布有种属差异性[6]。③骨中的胶原。主要是Ⅰ型胶原,一般认为在各种系间组成差异不大,抗原性很弱。④血型抗原、组织特异性抗原等。⑤松质骨的骨髓和血液中细胞成分,其细胞膜表面表达 α2Gal、MHC-Ⅰ。

异种骨移植的免疫反应主要有两种方式:①体液免疫:人血清中天然存在的抗 α2Gal 抗体与 α2Gal 结合,通过经典途径和替代途径激活补体, 攻击移植物。②细胞免疫:异种骨移植后,主要通过辅助细胞对抗原摄取、处理和提呈,从而导致 T 细胞和 B 细胞活化、增殖,最终产生细胞免疫。在免疫排斥反应中,抗体和细胞均能介导细胞毒作用。细胞介导的细胞毒作用在免疫排斥反应中占有主要作用,它是由 $CD8^+$ T 细胞介导的。异种骨移植无论是 MHC 编码抗原或是非 MHC 编码抗原,均能诱导抗移植物抗体的产生。抗体介导细胞毒作用有直接细胞毒作用和抗体依赖细胞介导的细胞毒作用。在前者,抗体和靶细胞抗原形成抗原抗体复合物,从而导致细胞膜破裂,细胞溶解,在抗体依赖细胞介导细胞毒作用中,产生特异性反应,然后由非特异性杀伤细胞介导杀伤[7]。

T 细胞识别抗原通过直接和间接途径实现。一般在同种移植中,受者 T 细胞主要通过直接途径识别 MHC 抗原;而在异种移植,由于种属间 MHC 结构差异较大,T 细胞需借助于受者的抗原递呈细胞(APC),通过间接途径识别抗原[8]。关于异种细胞免疫反应机制有两种观点:一是认为其具有独特机制;另一则认为其与同种免疫反应相比,只是强度不同,没有本质区别。许多学者通过淋巴细胞刺激增殖实验、淋巴细胞亚群分析、细胞因子检测及组织学检查了解植骨后受者的免疫功能及骨形成情况,寻找同种与异种骨移植排斥特点,从细胞和分子水平探讨异种骨移植的排斥机制。细胞免疫反应的强弱主要取决于抗原性的大小和 T 细胞与 APC 之间 MHC 的适配程度如何,淋巴细胞刺激增殖实验实际上是测定受者效应细胞对抗原肽刺激的增殖反应。研究表明,辅助 T 细胞(Th)被抗原激活后可分化为两类不同功能的细胞,其中 Th1 细胞主要分泌 IL-2 和 IFN-γ,介导细胞免疫。Th2 细胞主要分泌 IL-4 和 IL-10 ,介导体液免疫。因此大多学者认为新鲜异种骨移植排斥有其独特机制,其主要通过 Th2 细胞反应诱发一系列复杂的连锁机制,引起排斥。深入了解这些特点,有助于我们针对不同移植的具体情况采取措施,有效地促进移植物存活[9]。

刘玮等[10]研究了异种皮质骨抗原的分布,发现抗原主要位于骨细胞和哈佛氏管内皮细胞上。松质骨无论是在结构上,还是在组成成分上均与皮质骨存在着很大的差别,抗原成分复杂。松质骨由骨小梁构成,在其疏松的网状孔隙结构中除含有丰富的骨细胞、成骨细胞、软骨细胞和软骨母细胞外,还有大量的血细胞、骨髓造血细胞、以及血管内皮细胞、神经细胞等。国内学者通过双 PAP 及免疫荧光染色方法研究松质骨抗原分布情况, 发现在骨小梁骨基质染色阴性,而骨细胞、成骨细胞、软骨细胞、软骨母细胞以及骨陷窝等均有不同程度的阳性染色。骨小梁间大量的血浆性成分和血细胞、骨髓造血细胞也表现出强烈的阳性染色,在松质骨骨移植后的排斥反应中发挥作用[11]。骨胶原主要是Ⅰ型胶原,一般认为在种系间结构组成差异不大,异种胶原能刺激宿主产生抗体,但抗体的产生与移植排斥反应并无明确的肯定关系。Frank 等[12]认为这对成骨过程无影响,仅为一种副现象。也有学者认为Ⅰ型胶原末端是

作者简介:高春阳(1969-),男,黑龙江省牡丹江市人,博士,主治医师,讲师,主要从事骨组织工程方面的研究。电话:(023)65398458

收稿日期:2005-02-21;修回日期:2005-04-03

移植后引起免疫反应的一个原因[13]。非胶原性骨基质成分在特定条件下也能引起宿主动物产生抗体，抗体对成骨的影响同样存在 2 种相反的结论。异种松质骨移植抗原的研究结果提示我们，在处理异种松质骨的时候，应彻底清除抗原性较强的各种细胞成分及血浆成分，清洁骨陷窝壁，选择性地保留抗原性相对较弱的网状骨基质结构。

2　影响松质骨力学性能的因素

松质骨的最大特点是其疏松的网状孔隙结构，早期在临床应用中，松质骨一般只用于骨缺损的充填，对于能否修复长骨节段性缺损一直存在着争论。一般认为骨的韧性取决于胶原，坚硬决定于钙磷，两者结合构成骨骼的生物力学特征。松质骨中有机质 40%，无机盐 60%，有机质中大约 90% 为胶原，其余为氨基多糖、其它蛋白质、肽类及脂类。胡永康等曾对骨基质进行氨基酸分析，证实了含有芳香族氨基酸浓度越高，组织学反应越重。郑武飞也认为芳香族氨基酸与免疫反应密切相关。骨基质中的胶原主要是Ⅰ型胶原，其主要作用是通过整合素影响细胞与骨基质的粘附，另一方面对细胞生长与代谢起重要作用[14]。Ⅰ型胶原由 2 条 A1 肽链和 1 条 A2 肽链相互拧成的三联螺旋结构。在Ⅰ型胶原 A 肽链的1 000个氨基酸残基中，脯氨酸约占 129 个，羟脯氨酸约占 96 个，赖氨酸约占 30 个。检测骨基质中羟脯氨酸、脯氨酸及芳香族氨基酸含量，可特异地反映有机质中包括胶原蛋白在内的各种组成成分的变化。

以往认为，高浓度 H_2O_2 处理异种骨，其消除抗原性的原理在于清除骨基质中抗原性较强的蛋白成分，即脱蛋白过程。现在发现，骨基质中的氨基酸总量随着 H_2O_2 处理的时间延长并无明显的降低，没有表现出大量去除蛋白的现象。罗卓荆等在保证骨块试样密度基本相同的条件下，检测 H_2O_2 对牛松质骨强度、弹性模量的影响，结果表明处理时间对骨块强度的影响呈指数曲线关系。H_2O_2 处理同样也改变了骨块的弹性模量，随着 H_2O_2 处理时间的增加，骨块弹性模量逐渐减小，发生弹性变形的能力较差，脆性增加。分析消除异种骨抗原性的机制可能在于强氧化剂作用下发生的包括胶原蛋白在内的蛋白质变性[15]。已知Ⅰ型胶原通过细胞表面特异性受体-整合素亚单位与细胞紧密结合，对细胞粘附起重要作用，胶原蛋白的变性使细胞和蛋白质等抗原性物质易于脱除，但也影响骨块的生物力学特性，使得骨块的脆性增加，强度降低。

松质骨的力学性质还受骨块孔隙密度和骨小梁排列方向的影响。孔隙大小及空隙率直接影响骨组织向载体内部生长的速度和载体本身的力学强度。骨块孔隙率越小、密度越大，其抗压强度越大。Adbin 等研究认为孔隙大小平均 500 μm 最适于骨组织载体内部生长，空隙率 60% 即能很好的保持力学强度，孔隙小于 300 μm 不利于骨组织载体内部生长。近期 Herold 等认为体内获得骨生长的最佳孔隙范围是 200 ~ 400 μm，这种空隙范围有利于血管组织生长，也能为成骨细胞表面的力学感受体提供最佳的压力和张力，很好的解决了孔隙率、孔径与材料本身机械强度之间的矛盾。另外骨小梁排列沿着运动所引起的骨的主应变方向，沿骨小梁排列方向加载，松质骨的承载能力最强。

从植入物的最终转归上看，无论皮质骨还是松质骨最终将被新生骨所替代，新生骨进一步改建、塑形，机械强度逐渐增加以适应功能需要。因此植入物的初始强度不应该成为限制松质骨作为成骨细胞支架修复长骨骨缺损的主要因素。在内、外固定器的有效辅助下，使骨缺损植骨区域保持稳定，松质骨作为支架材料有广泛应用的前景。

3　异种脱蛋白松质骨具有良好的载体性能

通过脱脂、脱钙、脱蛋白、深低温冷冻、γ-射线辐照等物理、化学的方法，均能不同程度减少异种骨抗原。研究表明，脱钙骨因失去羟基磷灰石构架而几乎无抗压强度。深低温冷冻可部分保留原材料的特征，其生物力学特性接近新鲜骨，但去抗原不彻底，组织相容性不好。冻干改变了矿化骨的特征，植入前必须重建（再水化），随着重建，冻干骨变脆，抗压强度和最大变形均明显减弱。脱蛋白骨的生物力学性能较好，原因是Ⅰ型胶原的主体被共价嘧啶交叉键牢固的相互连接不易于溶解，同时羟基磷灰石结构具有一定的抗压强度。但部分Ⅰ型胶原蛋白变性，导致了脱蛋白骨力学强度和弹性的降低。

Orell 于 1937 年首先将脱蛋白骨用于临床，因破坏了成骨诱导活性，植入体内后不能成骨而很快被吸收或仅能引起纤维组织替代。近年来，由于 BMP 的发现和骨组织工程的发展，脱蛋白骨作为载体的优势被重新认识，蒋电明等研究认为脱蛋白骨是 BMP 的最佳载体。脱蛋白松质骨具有不规则的高密度孔隙网架结构，保存了原骨的骨小梁、小梁间隙和骨内管腔系统，它的孔径 300 ~ 500 μm，孔隙率可达 75% 以上，为成骨细胞于支架表面进行气体交换、获得营养物质、排出废料、形成骨基质提供了良好的空间三维结构。同时有利于新生毛细血管的长入，进而使无活性的植入物逐渐活化。实验证明移植物血管化的发生非常重要。脱蛋白松质骨表面粗糙，增强细胞在材料表面的粘附强度。其无机成分主要为羟基磷灰石，与人骨成分相同，有良好的生物相容性，在体内更容易被新骨所“爬行替代”，显示了良好的生物降解性。Salama 和同事们证实了异种脱蛋白松质骨复合自体骨髓在实验动物和人都能增强成骨化，在这些实验中，异种脱蛋白骨的作用就象一个骨传导支架，为再血管化和成骨细胞的分化提供一个稳定的环境。

4　结束语

在近 30 年来已研制出多种脱蛋白骨。主要有 Ospurum 骨、Anorganic 骨、Oswestry 骨、Kiel 骨等几种形式。其中组织相容性好的 Oswestry 骨力学性能较差，而生物性能较好的 Ospurum 骨炎症反应较重，过氧化氢乙醚法制备的 Kiel 骨组织相容性和生物力学性能较好。其中 Kiel 骨在欧洲已有商品出售。即便如此，Kiel 骨在临床上仍有显著的免疫反应，并伴有很高的假关节形成率。因此如何改进异种脱蛋白骨的制备，使其既保持良好的力学特性又消除了其抗原性需要进一步研究。

关键词：异种脱蛋白松质骨；细胞载体；骨组织工程
中图法分类号：R138.08；R322.71　**文献标识码**：A

参考文献：

[1] 唐　开，党耕町. 三维细胞培养在骨组织工程中的应用[J]. 中华骨科杂志，2003，23(2)：121 - 123.

[2] Shea L D，Wang D，Franceschi R T，*et al*. Engineered bone development from a pre-osteoblast cell line on three- dimensional scaffolds[J]. Tissue Eng，2000，6(6)：605 - 617.

[3] Savolain S，Usenius J P，Hernesniemi J. Iliac crest versus artificial bone grafts in 250 cervical fusions[J]. Acta Neurochir (Wien)，1994，129 (1-2)：54 - 57.

[4] Botchwey E A, Pollack S R, Levine E M, *et al*. Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarrier matrix system[J]. J Biowed Mater Res, 2001, 55 (2): 242 - 253.
[5] Lanier L L, Phillips J H. Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells[J]. Immunol Today, 1996, 17(2): 86 - 91.
[6] Kon E, Muraglia A, Corsi A, *et al*. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical size defects of sheetp long bones[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 49(3): 328 - 337.
[7] Cooper L F, Masuda T, Whitson S W, *et al*. Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 1999, 14 (1): 34 - 47.
[8] Hankey D P, McCabe R E, Doherty M J, *et al*. Enhancement of human osteoblast proliferation and phenotypic expression when cultured in human serum[J]. Acta Orthop Scand, 2001, 72 (4): 395 - 403.
[9] Ong J L, Carnes D L, Sogal A. Effect of transforming growth factor-beta on osteoblast cells cultured on 3 different hydroxyapatite surfaces [J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 1999, 14 (2): 217 - 225.
[10] 刘 玮, 陆裕朴, 胡蕴玉, 等. 异种植骨抗原的免疫组织化学实验研究[J]. 中华骨科杂志, 1989, 9(1): 53 - 54.
[11] Chang Y L, Stanford C M, Wefel J S, *et al*. Osteoblastic cell attachment to hydroxyapatite-coated implant surfaces *in vitro*[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 1999, 14 (2): 239 - 247.
[12] Frank D J, Holway A H, Wang K K, *et al*. Influence of glial growth factor and Schwann cells in a bioresorbable guidance channel on peripheral nerve regeneration[J]. Tissue Eng, 2000, 6 (2): 129 - 138.
[13] Kuboki Y, Jin Q, Takita H. Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis[J]. J Bone Joint Surg Am, 2001, 83-A Suppl 1 (Pt2): S105 - S115.
[14] 罗卓荆, 胡蕴玉, 王 茜, 等. 异种松质骨移植抗原分布的免疫组化研究[J]. 中国矫形外科杂志, 1998, 5(6): 539 - 540.
[15] Adbin J E. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation[J]. J Cell Biochem, 1999, 72(3): 196 - 410.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2005)18-1898-01

2型糖尿病微生物感染与颈动脉粥样硬化关系分析

Correlation of pathogenic infection and carotid atherosclerosis in type 2 diabetes mellutis

王 毅[1],江学容[1],谭兴容[1],鲁远彪[1],魏祥松[2],韩小蓉[3],汤利华[1] (重庆市第九人民医院:[1]内分泌科,[2]检验科,[3]超声科,重庆 400700)

本研究通过检测颈动脉斑块及特异抗人类巨细胞病毒(human cytomegalovirus,HCMV)抗体IgG、抗疱疹病毒(human simplexvirus, HSV) IgG,目的在于:(1)从流行病学角度观察T2DM AS与病原微生物感染间的关系;(2)了解hs-CRP在T2DM AS所起的作用及与病原微生物感染的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

1.1.1 T2DM组 101例,均为我院住院患者,按1999年WHO标准诊断为T2DM,年龄40岁以上(40~76岁)。通过颈动脉彩超将其分为斑块组(DM A组41例)和正常组(DM B组60例)。

1.1.2 对照组 44例,为我院门诊查体者,年龄大于40岁(40~72岁),通过颈动脉彩超检测其颈动脉内膜均在正常范围内,为对照组。

全部糖尿病患者及查体者均询问病史,测量身高、体重、血压,检测空腹血糖、血脂

1.2 检测指标

1.2.1 颈动脉彩色多普勒超声检测 采用美国GE公司Vivid3型彩超测定双颈动脉起始段2 cm内,距颈总动脉分叉1 cm处后壁内中膜厚度(intima-media thickness,IMT),IMT>0.8 mm并伴有软性斑块及硬性斑块视为AS。

1.2.2 病毒抗体检测 采用ELISA法,试剂由晶美生物工程有限公司提供。

1.2.3 hs-CRP检测 采用免疫比浊乳胶增强法,试剂由芬兰Orion提供。

1.3 统计学处理

采用第二军医大学软件包进行统计学处理,计量资料用方差分析,计数资料采用的χ^2检验,相关分析采用复相相关分析。

2 结果

2.1 对照组与糖尿病组临床资料

对照组与DM A组及DM B组年龄、体重指数无统计学差别;DM A组及DM B组FPG、HbA_1c、TG、hs-CRP均显著高于对照组($P<0.01$),DMA组与DM B组比较,除hs-CRP外($P<0.05$),上述其它指标无差别;DM A组TC显著高于DM B组及对照组($P<0.05$),DM B组与对照组无差别;DM A组与DM B组HDL显著低于对照组($P<0.05$),DM A组于DM B组无差别,见表1。

(下转1905页)

作者简介:王 毅(1963-),男,重庆市人,硕士,副主任医师,主要从事糖尿病慢性并发症临床与研究工作 电话:(023)68115731

收稿日期:2004-11-01;修回日期:2005-07-20