文章编号:1000-5404(2007)01-0009-03

论著

羊脱钙骨基质作为骨组织工程支架材料的性能评估

李 强,何清义,许建中,侯天勇,王序全,曾 琳,冯江华 (第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,重庆 400037)

提 要:目的 制备山羊脱钙骨基质(decalcified bone matrix, DBM),研究其物理和生物力学特性,为其作为理想的组织工程骨支架材料提供理论依据。**方法** 制备山羊完全脱钙骨基质,观察其色泽、质地、孔隙度等物理性状,并用扫描电镜观察其孔隙度,测量其孔径;通过测定吸水率评估其亲水性;用生物力学测定仪测定其不同压缩比率下的瞬时形变恢复率、最大形变恢复率及最大极限压缩强度。**结果** 标准化制备DBM呈乳白色,密度均匀,表面布有较多的微孔,扫描电镜观察其孔径范围为350~450(409.2±39.7) μm,吸水后膨胀,最大值吸水率达(419.0±44.4)%;生物力学测定显示,DBM位移是压缩强度的函数,DBM压缩20%和30%时其最大极限强度分别为(1.43±0.35)N和(1.62±0.51)N,瞬时形变恢复率分别为100%和(91.0±8.2)%。**结论** 完全脱钙骨基质孔径大,亲水性强,形变恢复好,利于细胞的黏附生长,是理想的组织工程支架材料。

关键词: 脱钙骨基质;生物力学;物理特性;骨组织工程
中图法分类号: R318.08; R322.71 **文献标识码:** A

Performance assessment of decalcified bone matrix of goat as scaffold of bone tissue engineering

LI Qiang, HE Qing-yi, XU Jian-zhong, HOU Tian-yong, WANG Xu-quan, ZENG Lin, FENG Jiang-hua (Orthopedics Research Center, Southwest hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To prepare completely decalcified bone matrix (DBM) and study its physical characteristics and biomechanical properties in order to afford theoretical base for DBM as ideal scaffold of bone tissue engineering. Methods Completely decalcified bone matrix from goat was prepared with the standard methods. Its physical characteristics including colour, texture, porosities were observed, and the hole diameter and porosity were detected under scanning electron microscope (SEM). The hydrophilicity of DBM was evaluated by calculating water absorption. Its transient recovery rate of deformation, complete recovery time of deformation and maximal compressive strength were determined with biomechanical approach. Results DBM is ivory white with unique density and redundant microporosities of which the average diameter is (409.2±39.7) μm. The maximum of absorption time and absorption rate of DBM were 12 h and (419.0±44.4)%. The transient recovery rate of deformation was 100% and (91.0±8.2)% when DBM is compressed 20% and 30% respectively. Conclusion The properties of DBM are larger diameter and higher rate of microporosities, better hydrophilicity, easy recover of deformation and more suitable for adhesiveness and growth of breeding cells, which is the ideal scaffold material of bone tissue engineering.

Key words: decalcified bone matrix; biomechanics; physical properties; bone tissue engineering

骨组织工程的支架材料是种子细胞黏附和赖以生存的环境,也是制约其修复骨缺损疗效的关键因素之一。同种异体的脱钙骨基质(decalcified bone matrix, DBM)是理想的骨组织工程支架材料之一[1],除了有免疫原性低和富含促进骨愈合的生长因子的原因外,还可能与其物理学和生物力学特性相关,为此,本研究通过探讨DBM的物理和生物力学特性,为实验和临床应用DBM作为骨组织工程支架材料提供理论据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

青山羊的骨松质,1∶1氯仿/甲醇(重庆化工有限公司),0.6 mol/L的盐酸,20% H_2O_2(江西德成制药有限公司),蒸馏水(第三军医大学西南医院试剂中心),0.1 mol/L磷酸盐缓冲液,5%碳酸氢钠,75%乙醇。微机控制电子万能试验机(深圳

基金项目:国家高技术研究发展计划重大攻关课题("863"计划)(2003AA205020);国家自然科学基金(30300357);
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China(2003AA205020) and the National Natural Science Foundation of China (30300357)

作者简介:李 强(1972-),男,安徽省滁州市人,博士研究生,主治医师,主要从事骨科临床与组织工程方面的研究,现在浙江湖州解放军98医院骨科。E-mail:lqlq101@126.com
通讯作者:许建中,电话:(023)68754164

收稿日期:2006-01-18;修回日期:2006-07-14

市瑞格尔仪器有限公司),扫描电子显微镜观察(AMRAY-1000B,美国),相差显微镜(OLYMBUS-CKX41,日本)。电子天平(JA2003A,上海精天电子仪器有限公司)。超声清洗机,恒温摇床(WSZ-100-A,上海安亭科学仪器厂)。

1.2 自制生物力学测试样品槽和冲头

样品槽和冲头为有机玻璃材料制成,样品槽呈圆筒状,颜色透明,高8 cm,外径1.8 cm,内径1.6 cm,外有刻度标记。冲头呈圆柱状,冲头直径约1.6 cm。

1.3 DBM制作

在无菌操作下剔除青山羊股骨及胫骨的干骺端、骨盆、椎体表面的骨膜、软组织和骨髓等,制成大小约2 cm×0.5 cm×0.5 cm的骨条,用双蒸水反复浸泡,至浸泡液澄清无血色、捞出、沥干,放入无菌的玻璃缸内,在25 ℃恒温摇床中,用1∶1氯仿/甲醇浸泡8 h,用36 ℃双蒸水反复冲洗3次,10~15 min/次。再用0.6 mol/L的盐酸(50 ml/g骨块)脱钙,在20 ℃浸泡24 h,每8小时更换盐酸1次,用5%碳酸氢钠溶液冲洗振摇,直至浸泡液呈中性(pH=7.0,酸度计检测)为止。再加入浓度为20% H_2O_2溶液中,密闭容器置38 ℃恒温箱中,浸泡72 h,每12小时更换溶液1次,每次换液前用36 ℃双蒸水反复冲洗3次,10~15 min/次。最后用装有75%乙醇超声清洗机振荡清洗,每2小时更换洗涤液1次,连续洗涤3次;调pH为(7.3±0.1)。最后用真空冷冻干燥机干燥,用血浆袋分零包装(每包1~2 g),真空热力封口机封口,双层聚乙烯薄膜包装袋包装。

1.4 检测方法

1.4.1 密度和孔隙度测试 参照Zhang[2]氏液体置换法。支架材料样品的体积V=(V2-V1)+(V1-V3)=V2-V3;密度d=W/(V2-V3);孔隙度ε=V1-V3/(V2-V3)×100%。

1.4.2 扫描电子显微镜观察 取1块状干燥的DBM,观察其色泽,质地,孔隙等,并将其用锐刀横切,制成约5 mm×5 mm×5 mm大小,横截面喷金,用AMRAY-1000B(美国)扫描电子显微镜观察其横截面超微结构,并随机选择不同区域,游标卡尺测量样品材料孔径范围。

1.4.3 生物力学测定 将干燥的DBM将其修剪成0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm,用0.1 mol/L磷酸盐缓冲液浸泡24 h,控干,湿润,无滴水置于自制的样品槽内,固定在载物台,将冲头固定在加载系统的等臂杠杆的中点。调节样品表面与冲头的高度使两者呈表面接触状态。然后用一恒定的载荷置于杠杆的冲头上,加载速度为2 mm/min速度,使样品槽内的样品依次发生体积为5%、10%、20%、30%、40%、50%压缩形变,电脑通过配置的软件系统记录发生形变的最小和最大极限强度。解除载荷后,再观察DBM形变恢复情况,记录形变瞬时恢复率、完全恢复率及完全恢复时间。

1.4.4 吸水、释水率测定 参照文献[3]取3个大小不同的DBM,置于100 ml 0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS,pH 7.4,37 ℃)中,于0.25、0.5、1.0、1.5、2、4、6、8、10、12、24、48、72 h后取出样品,用滤纸吸净样品表面水分,称其重量,用下面公式计算:吸水率=[(吸水后样品质量-吸水前样品质量)/吸水前样品质量]×100%。最后取3个结果的平均值,绘制吸水率随时间变化的曲线,得出最大吸水时间和最大吸水值。

1.4.5 释水率测定 取3个大小不同的DBM,100 ml 0.1 mol/L磷酸盐缓冲液,待其达最大吸水时间后,用公式:吸水量=吸水后样品质量-吸水前样品质量,得出吸水量。再用自制的生物力学样品槽和冲头将DBM的分别压缩5%、10%、20%、30%、40%、50%,再用电子天平称其质量,得出残余吸水量,用公式:释水率=[(样品最大吸水量-残余吸水质量)/样品吸水量]×100%

2 结果

2.1 密度和孔隙度测定

羊的DBM的密度较小,为0.15~0.18(0.16±0.01) g/ml,孔隙度较高,为(63±2.1)%。

2.2 扫描电镜观察

DBM的微孔较规则,多呈蜂窝状,类圆形,且孔径大小较均匀,直径多为350~450(409.23±39.7)μm(图1),且网孔间相互沟通。

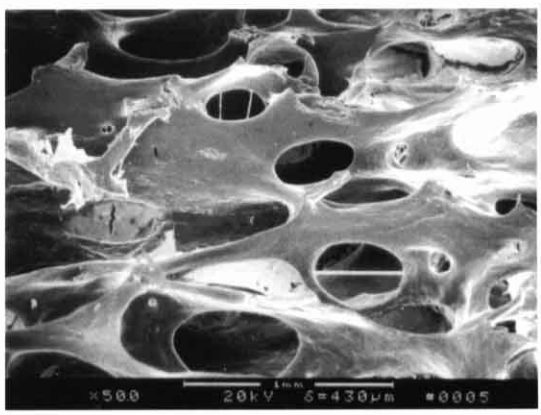


图1 脱钙骨基质的扫描电镜观察 (×500)

2.3 生物力学测定

DBM位移是压缩强度的函数,随着DBM压缩体积的增加,其最大的压缩强度也随之增加,从(0.62±0.07)N增加至(6.62±0.72)N。压缩量≤20%时,瞬时形变恢复率为100%,压缩为30%,瞬时形变恢复率为(91±8.2)%,且随着压缩体积的增加,其瞬时形变恢复率减小(表1)。

表1 脱钙骨基质的生物力学测试结果

形变发生率(%)	最大极限强度(N)	瞬时形变恢复率(%)	最大形变恢复率(%)	最大形变恢复时间(t/s)
5	0.63±0.05	100	100	0.5±0.1
10	0.78±0.08	100	100	1.0±0.1
20	1.37±0.12	100	100	1.3±0.1
30	1.60±0.11	91.0±5.2	100	6.0±1.2
40	3.32±1.65	75.0±4.3	100	16.0±2.3
50	6.51±1.66	70.0±5.6	100	35.0±5.0

2.4 亲水性

DBM的具有较强的亲水性,吸水后膨胀,体积明显增加,且随着时间的延长,其吸水率不断增加,至12 h达最大值(418±44.4)%,吸水率随时间变化的曲线见图2。

2.5 释水率测定

当吸水达到饱和状态的DBM受压缩后释放出水分,释水量的大小与压缩体积呈正相关。压缩5%释放约(15.7±1.2)%,且随着压缩体积的增加,其释放量也增加,压缩10%时,释放(25.6±1.6)%,压缩20%时,释放(41.7±1.2)%,但压缩≤30%其释放量增加较快,达(51.3±1.5)%,随后释放趋

于缓慢，压缩 40% 时，释放（57.0 ± 1.1）%，压缩 50% 时，释放（61.0 ± 1.0）%，压缩≥60% 时，释放量维持在 62% 左右。

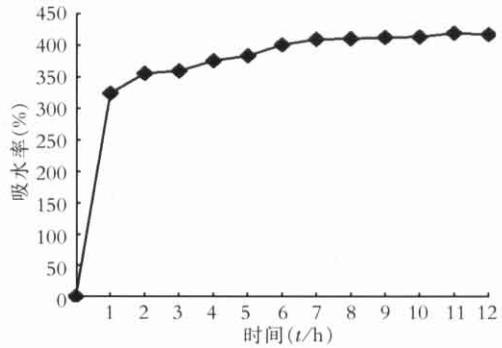


图 2　脱钙骨基质的吸水率随时间变化的折线图

3　讨论

骨组织工程的支架材料是种子细胞黏附和赖以生存的环境，也是制约其修复骨缺损疗效的关键因素之一。良好的组织工程支架材料要求与种子细胞具有良好的相容性，以黏附尽可能多的种子细胞，这就首先要求支架材料具有较大的孔径和较高的孔隙度。此外，为了提高种子细胞的黏附率，有研究者采用双相接种法[4]，通过在支架材料上涂以能促进细胞黏附的胶原物质以增加细胞黏附数量，但涂了胶原的支架材料的孔径和孔隙度将会受到影响，甚至可造成材料网孔之间及网孔表面与宿主的通道堵塞，不利于种子细胞摄取营养物质和排泄代谢废物，在体外可通过增加培养细胞的换液次数为细胞提供增殖与分化的营养[5]。但当构建的组织工程骨植入体内后，特别是用于修复大块骨缺损时，支架材料上过多细胞的黏附因不能及时有效地摄取营养物质而失去增殖、分化的能力，甚至逐渐死亡。因此，在提高种子细胞黏附率的同时，给细胞提供相对应的营养物质是提高组织工程骨修复骨缺损，特别是大块骨缺损的关键因素之一。

同种异体的 DBM 因具有免疫原性低和富含促进骨愈合的生长因子，被认为是理想的骨组织工程材料。DBM 因脱钙量的不同其生物学特性的差异显现：随着脱钙量的增加其力学强度逐渐下降，但其网孔隙度、孔径也随之增加，网孔的增加一方面有利于细胞的黏附与生长，另一方面能使移植材料和种子有更多的接触面，有利于骨形成蛋白等促进成骨的因子释放，使微孔部位成为诱导成骨的中心，从而加速了骨诱导作用，同时还可去除了更多的细胞成分，使免疫反应降低[1]。本研究制备的青山羊完全脱钙 DBM，经体内外研究均证实，其不仅能满足骨组织工程对支架材料的基本要求，而且与骨髓间充质干细胞间具有良好的细胞相容性[5]。本实验通过对其物理与生物力学特性观察，见其呈多孔的蜂窝状，浸水软如海绵状，易于形变和形变恢复。扫描电镜显示微孔直径平均为（409.2 ± 39.7）μm，孔隙度高达 63%，不仅有利种子细胞的黏附，而且更有利于新骨的长入，为种子细胞的黏附提供了物理空间结构；符合较理想的骨组织工程支架材料的参数[6,7]。此外 DBM 又显示了良好的亲水性，最大吸水率约 419.44%，这不仅有利于种子细胞的黏附，还有利于种子细胞从宿主获取营养[8]。通过对其生物力学测试进一步观察，完全脱钙的 DBM 吸水后质地软，发生压缩形变所需的力学强度低，压缩 20% 仅需要 1.3 N，低于正常人的肌张力和肌力，且压缩形变≤ 20%，其瞬时形变恢复率为 100%。吸水达饱和状态的 DBM 发生压缩形变时，会有相应的液体释放，压缩体积为 20% 时，释水量达（41.7 ± 1.2）%，DBM 这种高亲水性、易形变和形变易恢复的特性不仅能黏附较多的种子细胞和为细胞提供充足营养成份，而且用其构建的组织工程骨植入体内后，在肌肉、骨骼等产生多向的生物应力刺激下，其能发生较好的形变，而且很快能恢复形变，这种有效的形变发生与恢复还可加速种子细胞从宿主内获取营养和加快体液的交换，以利于细胞的增殖与分化，进而提高组织工程骨的修复骨缺损的效果。若通过给植入体内的组织工程骨施加一定强度的生物力学刺激，能控制 DBM 的形变程度，将可能更有效地促进种子细胞获取营养和代谢物质的排出，但这尚需进一步研究证实。

参考文献：

[1] 李明善，王葆芳，皇甫超申. 微孔对同种异体表面脱钙骨基质明胶诱导成骨能力的影响[J]. 解剖学研究，2001，23(1)：46－47，34.

[2] Zhang R Y，Ma P X. Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process[J]. J Biomed Mater Res，1999，45(4)：285－293.

[3] 赵建华，廖维宏，王远亮，等. 消旋聚乳酸/羟基磷灰石/脱钙骨基质的制备及其体外降解特性研究[J]. 中国修复重建外科杂志，2003，17(1)：61－64.

[4] 周　强，李起鸿，戴　刚，等. 关节软骨细胞三维支架双相接种体外生成软骨组织的观察[J]. 中华骨科杂志，2002，22(6)：372－376.

[5] 秦　辉，许建中，周　强，等. 两种构建方法对组织工程骨种子细胞黏附和增殖的影响[J]. 第三军医大学学报，2004，26(11)：990－992.

[6] Xu H H，Simon C G，Jr.. Self-hardening calcium phosphate composite scaffold for bone tissue engineering[J]. J Orthop Res，2004，22(3)：535－543.

[7] 杨为中，周大利，尹光福，等. 新型多孔磷灰石/硅灰石生物活性玻璃陶瓷材料的研究[J]. 生物医学工程学杂志，2004，21(6)：913－916.

[8] Gao C，Hu X，Hong Y，*et al*. Photografting of poly(hydroxylethyl acrylate) onto porous polyurethane scaffolds to improve their endothelial cell compatibility[J]. J Biomater Sci Polym Ed，2003，14(9)：937－950.

（编辑　王　红）