论著

文章编号:1000-5404(2007)01-0012-03

异种脱蛋白组织工程骨支架材料的制备及理化特性研究

刘 雷,李起鸿,唐康来,杨 柳,简月奎 (第三军医大学西南医院关节外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 制备及研究可供临床使用的异种脱蛋白组织工程骨支架材料。**方法** 对猪肋骨进行一系列理化处理,制成脱蛋白骨,并对其进行组织学、扫描电镜、红外光谱、X射线衍射分析,X射线能量散射分析、微量凯氏定氮及力学性能测定。**结果** 脱蛋白骨间质胶原纤维染色阳性,黏蛋白染色阴性,而新鲜骨组织黏蛋白及胶原染色均阳性。脱蛋白骨保持原骨组织的天然网状孔隙系统,孔径为(472.51±7.02)μm,孔隙率为(78.15%±6.45%),脱蛋白骨红外光谱显示胶原存在,无脂肪。新鲜骨与脱蛋白骨皆为曲线型羟基磷灰石图谱,Ca/P比分别为(1.71±0.95)、(1.68±0.76),二者差异无显著性($P>0.05$),蛋白质含量分别为(26.6%±2.23%)、(19.1%±2.14%),二者差异有显著性($P<0.05$)。脱蛋白骨除弹性模量比新鲜骨升高外,压缩破坏载荷及破坏极限载荷与新鲜骨差异无显著性($P>0.05$)。**结论** 制备的脱蛋白组织工程骨支架材料的理化性质及力学强度符合理想支架材料要求。其免疫原性有待于进一步实验观察。

关键词:异种骨;脱蛋白;理化性能;支架材料;组织工程

中图法分类号:R318.08;R322.71 **文献标识码**:A

Establishment of scaffold materials of deproteinized heterogeneous bone and their physicochemical properties

LIU Lei, LI Qi-hong, TANG Kang-lai, YANG Liu, JIAN Yue-kui (Department of Joint Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish scaffold materials of deproteinized heterogeneous tissue engineering bone. **Methods** Deproteinized bones were made through a series of physicochemical treatment from pig ribs and were analyzed with histology, scanning electron microscopy, infrared spectrum, X-ray diffraction analysis, X-ray energy scattering analysis, microdose Kjeldahl determination and mechanical analysis. **Results** Stain of interstitial collagen fibers was positive and mucin stain was negative in deproteinized bone, but stain of interstitial collagen fibers and mucin were all positive in fresh bone. Deproteinized bone maintained natural network pore system, its pore size was (472.51±7.02) μm, its porosity was (78.15±6.45)%. Infrared spectrum showed collogen in deproteinized bone. Fresh and deproteinized bone were all of curve style atlas of hydroxyapatite, their ratio of calcium to phosphors was (1.71±0.95) and (1.68±0.76) ($P>0.05$), and their protein content was (26.6±2.23)% and (19.1±2.14)% ($P<0.05$). The compression destruction load and destruction maximum load of deproteinized bone were of no significant difference with those of fresh bone ($P>0.05$), except for high elastic modulus. **Conclusion** Physicochemical property and mechanical strength of scaffold materials of established deproteinized tissue engineering bone meet request of ideal scaffold materials. Its immunogenicity should be further observed.

Key words: heterogeneous bone; deproteinization; physicochemical property; scaffold materials; tissue engineering

制备和选择理想的来源丰富且价格低廉的组织工程骨支架材料是组织工程化骨能否广泛应用于临床的重要因素之一。目前,国内外研究异种骨相对成功的是一些完全去除有机成份的骨矿材料,如Kiel骨、Bio-oss骨,无机骨以及完全去除骨矿成份的有机材料[1]。虽然有用于骨组织工程支架材料的研究报道,但并没有完全满意地解决异种骨的免疫原性及生物力学性能

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)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003AA205020)

作者简介:刘 雷(1966-),男,辽宁省大连市人,博士,副主任医师,主要从事组织工程骨方面的研究,发表论文16篇。电话:13012324402
通讯作者:李起鸿,电话:(023)68754483

收稿日期:2005-12-06;**修回日期**:2006-05-10

的问题，有待于进一步研究。本实验采用一系列理化方法对猪肋骨进行去脂、去细胞、去蛋白处理，制备成组织工程骨支架材料，并对其理化及力学性能进行评价，为能否在临床上使用的异种脱蛋白组织工程骨支架材料提供相关的实验依据。

1　材料与方法

1.1　主要试剂和仪器

NaN_3；NaOH；甲醇；氯仿；H_2O_2；乙二胺；TritonX-100（Sigma，USA）；扫描电镜（AMRAR，USA）；X 射线衍射分析仪及 X 射线量散射分析仪（D/MAX-rA，日本）；红外光谱仪（Perkin Elmer 公司）；RGT-5A 万能生物力学测试仪（深圳瑞格公司）

1.2　异种脱蛋白骨支架材料的制备

取新鲜猪肋骨，去除软组织和骨髓后，锯成 10 mm 及 50 mm 长骨块。依次经过 20% H_2O_2 浸泡 48 h；5 mmol/L NaN_3 浸泡 12 h；含 1% TritonX-100 的 NaOH（1 mol/L）浸泡 10 h；蛋白酶浸泡 6 h；1∶1 甲醇/氯仿混合浸泡 24 h；乙醚浸泡 12 h；乙二胺浸泡 24 h（soxhlet 提取器内）；蒸馏水冲洗、浸泡 12 h；无水乙醇浸泡 12 h；50 ℃以下烘干备用。

1.3　大体及组织学观察

将新鲜骨与脱蛋白骨各 5 块用甲醛固定后放入 20% 的乙二胺四乙酸钠（$EDTANa_2$）液中微波脱钙，以针刺如软组织为止。然后制作 5 μm 厚，石蜡包埋切片，行 HE、黏蛋白及胶原复合染色，光镜观察。

1.4　扫描电镜观察

采用 AMRAR-1000B 型扫描电镜对 5 块脱蛋白骨进行扫描电镜分析，并用 LabwrrksTM 图像分析系统对其孔径大小和孔隙率进行测定。

1.5　红外光谱分析

将新鲜骨和脱蛋白骨骨块各 5 个，研磨成骨粉后，在 SpectrumGX 型红外光谱仪上测试，获得分辨率为 4.0 cm^{-1} 的 4000 ~400 cm^{-1} 之间的红外光谱图。

1.6　X 射线衍射分析

将新鲜骨和脱蛋白骨骨块各 5 个，分别碾成骨粉，干燥后用日本 D/MAX-1200 型 X 射线衍射分析仪对样品进行分析。以 Cukα 射线（λ = 0.154 05 nm）为射线源，工作电压 40 kV，工作电流 100 mA，扫描角度为 10° ~90°，走纸速度 5 mm/min 的条件下进行。

1.7　X 射线能量散射分析

将新鲜骨和脱蛋白骨粉用 X 射线能量散射仪对其钙（Ca）磷（P）含量进行分析，并计算 Ca/P 比例。

1.8　蛋白质含量测定

用微量凯氏定氮法测定新鲜骨及脱蛋白骨的蛋白质含量。每组各 5 个样品。

1.9　力学性能测定

取长 50 mm 新鲜骨及脱蛋白骨各 10 个，用深圳瑞格尔 RGT-5A 型电子式万能材料试验机进行抗压及弹性模量检测。将骨块两端 20 mm 用牙托粉固定，纵向立于试验机加载平台上。骨块上、下平行于平台，加载时移动速度为 1 mm/s，载荷测量精度为 1 N，变形测量精度为 0.005 mm，函数记录仪记录载荷-变形曲线。

1.10　统计学分析

数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　大体及组织学观察

制得的脱蛋白骨为白色柱状，约 10 mm × 5 mm × 3 mm 大小，肉眼可见多孔蜂窝状结构，质硬，无异味。HE 染色显示：脱蛋白骨小梁结构清晰，间质及细胞已脱去，皮质骨板层状结构完整，而新鲜骨可见间质及细胞，脱蛋白骨间质胶原纤维染色阳性，黏蛋白染色阴性，而新鲜骨组织黏蛋白及胶原染色均阳性。

2.2　扫描电镜观察

脱蛋白骨可见有原骨组织支架的三维多孔结构及网状孔隙胶原纤维暴露（图 1），孔隙之间相互交通，其孔隙率为（78.15% ±6.45%），孔径大小为（472.5 ±7.02）μm。

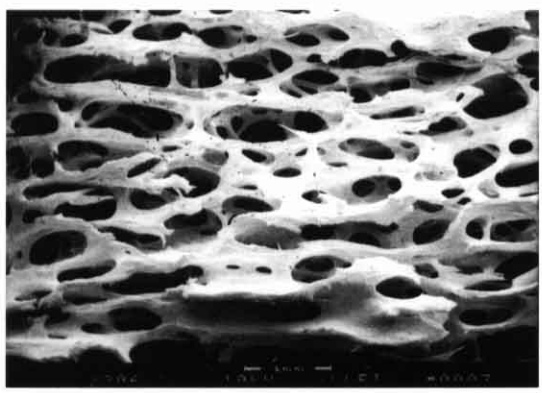


图 1　脱蛋白骨保留原骨组织的网状孔隙结构及暴露的胶原纤维　（SEM ×20）

2.3　红外光谱分析

从脱蛋白骨的红外光谱可以观察到，在 1 400 ~1 700 cm^{-1} 处有胶原相关键的振动，表明有胶原的存在。而新鲜骨在 2 927 cm^{-1} 处可观察到 C-H 键的拉伸振动伴有一尖锐峰，表明骨中含有一定量脂肪。

2.4　X 射线衍射分析

新鲜骨与脱蛋白骨的图谱均为曲线型羟基磷灰石，但新鲜骨含有较多的非晶成分。

2.5　X 射线能量散射分析

新鲜骨的 Ca/P 比值为（1.71 ±0.95），而脱蛋白骨为（1.68 ±0.76），二者差异无显著性意义（$P > 0.05$）。

2.6　蛋白质含量测定

用微量凯氏定氮法测得新鲜骨粉蛋白质含量为（26.6% ± 2.23%），脱蛋白骨为（19.1% ±2.14%），二者差异显著（$P < 0.05$）

2.7　力学性能测定

新鲜骨和脱蛋白骨的载荷变形曲线为受载后函数记录仪描记出骨块载荷—变形曲线，随着载荷的增加，骨块被压缩，开始时曲线呈线性关系，随载荷增加，曲线呈非线性改变，并

形成第1个波峰，即载体变化不大而变形增加明显，此时，观察骨块有部分骨小梁断裂。当时间持续形成第2个波峰时，更多骨小梁被压缩，最后破坏，脱蛋白骨除弹性模量升高外，压缩破坏载荷及破坏极限载荷与新鲜骨差异无显著性意义（$P>0.05$）（表1）。

表1 两组材料的生物力学强度结果比较（$n=10$）

组别	压缩载荷(kN)	压缩极限(MPa)	弹性模量(MPa)
新鲜骨组	3.01±0.95	39.03±5.12	718.39±210.86
脱蛋白骨组	2.93±0.64	37.14±4.51	936.56±297.64[a]

a：$P<0.05$，与新鲜骨组比较

3 讨论

随着组织工程骨在骨缺损修复研究的进展，支架材料成为限制组织工程骨能否真正应用于临床的一个关键因素。目前，对骨组织工程中支架材料的选择尚有分歧[2]，应用于骨组织工程的支架材料种类繁多，国内外学者作了许多有益的尝试[3,4]。理想的骨组织工程支架材料应具备良好的生物相容性、可降解性、合理的三维立体孔隙——网架结构、可塑性和一定的机械强度以及良好的细胞——材料界面等特点[5]。当前骨组织工程研究中所用的支架材料有2类：①生物衍生材料，如，冻干脱钙骨、脱蛋白骨和胶原等。②人工合成材料，如聚乳酸、聚乙醇酸和聚偶磷氮等。采用不同理化技术制备的天然衍生骨支架材料与化学合成材料相比，材料经脱脂、脱钙、脱蛋白等处理后，去除了具有阻滞作用的脂质和杂质蛋白，降低了材料的抗原性，且材料的天然网孔系统未受破坏。这种天然结构利于种子细胞的黏附和生长，并为细胞外基质的分泌提供了宽大的表面积和内部空间，具有良好的组织亲和性和结合力[6,7]。由于骨组织结构在不同种属动物间存在高度同源性，生物衍生骨植入后易于被宿主细胞识别而替代，显示良好的生物降解性，材料来源丰富，制作简便，且理化性能、组织相容性、生物降解性和功能适应性方面优于人工合成材料。

胡永康等[8]将4种不同的脱蛋白骨植入Wistar大鼠的肌袋内，并进行组织学和力学性能比较，发现Kiel骨具有较好的力学强度和组织相容性，而Oswestry骨虽具有较好的组织相容性，但力学性能较差。杨志明等[9]采用理化方法对猪肋骨脱蛋白后也得出了相似的结果。国外的研究也证实，完全脱蛋白骨，如Oswestry骨、Anorganic骨等，虽基本上消除了抗原性，但机械强度差[1]。而部分脱蛋白骨，如Kiel骨，虽然机械强度尚可，但具有弱抗原性，效果不理想。所以，在具体制作工艺中，异种骨脱蛋白处理的无机与有机成分比至关重要。异种骨有机成分中很多非胶原的酸溶性蛋白具有免疫原性，去除不充分则保留较强抗原性，但去除过多胶原蛋白则材料易碎，影响生物力学强度。本研究在总结以往脱蛋白制备工艺的基础上，尽量保留胶原纤维，去除非胶原蛋白、肽类及脂类、细胞等，以降低抗原性，同时保留力学强度。使用弱氧化剂降低对胶原的破坏，NaOH可消除非胶原蛋白，除垢剂Triton X-100是非离子性除垢剂，同蛋白酶一道具有去污、脱细胞作用。而氯仿、甲醇、乙醚等去脂，同时在Soxhlet提取器内抽提去脂。检测结果显示：异种脱蛋白骨的间质胶原纤维染色阳性，黏蛋白染色阴性，保留了原骨组织支架的三维多孔结构及孔隙，其孔隙率与孔经大小分别为（78.15%±6.45%）、（472.51±7.02）μm。红外光谱图显示脱蛋白骨有胶原存在，未见脂肪，X射线衍射及散射分析表明为曲线型羟基磷灰石图谱，Ca/P比为（1.68±0.76），脱蛋白除弹性模量比新鲜骨降低外，压缩破坏载荷及破坏极限载荷与新鲜骨差异无显著性（$P>0.05$），通过以上检测可以认为，制备的异种脱蛋白的组织工程骨支架材料的理化性质及力学强度符合理想支架材料要求。下一步的工作是通过动物实验进一步观察其免疫原性，以在未来的骨缺损修复实践中成为理想的组织工程骨支架材料应用于临床。

参考文献：

[1] Valentini P, Abensur D, Densari D, *et al*. Histological evaluation of Bio-Oss in a 2-stage sinus floor elevation and implantation procedure. A human case report[J]. Clin Oral Implants Res, 1998, 9(1): 59-64.

[2] Boyan B D, Lohmann C H, Romero J, *et al*. Bone and cartilage tissue engineering[J]. Clin Plast Surg, 1999, 26(4): 629-645, ix.

[3] Burg K J, Porter S, Kellam J F. Biomaterial developments for bone tissue engineering[J]. Biomaterials, 2000, 21(23): 2347-2359.

[4] Karabuda C, Ozdemir O, Tosun T, *et al*. Histological and clinical evaluation of 3 different grafting materials for sinus lifting procedure based on 8 cases[J]. J Periodontol, 2001, 72(10): 1436-1442.

[5] Hutmacher D W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage [J]. Biomaterials, 2000, 21(24): 2529-2543.

[6] Mendes S C, Tibbe J M, Veenhof M, *et al*. Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age[J]. Tissue Eng, 2002, 8(6): 911-920.

[7] Orban J M, Marra K G, Hollinger J O. Composition options of tissue-engineered bone[J]. Tissue Eng, 2002, 8(4): 529-539.

[8] 胡永康，安 洪，曹本珍，等. 四种脱蛋白骨组织学和生物力学比较研究[J]. 中华创伤杂志，1998，14：277-279.

[9] 杨志明，李彦林，解慧琪，等. 生物衍生骨支架材料的组织相容性研究[J]. 中华整形外科杂志，2002，18：6-8.

（编辑 薛国文）