文章编号:1000-5404(2006)22-2227-03

论著

异种脱蛋白骨的生物相容性研究

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 评价制备的异种脱蛋白骨植入体内的生物相容性,为临床应用提供实验依据。**方法** 对猪肋骨进行一系列理化处理后,制成10 mm长脱蛋白骨及浸提液。然后采用标准的毒理学实验方法进行急性、亚急性毒理实验、溶血实验、热源实验、皮内注射实验、肌肉埋植实验及细胞毒性实验。**结果** 异种脱蛋白骨的毒性程度为无毒,溶血率<5%,无热源性,对皮肤无刺激,肌肉内埋植后无明显炎症反应,对细胞无明显毒性作用,细胞的毒性均为0级。**结论** 异种脱蛋白骨具有良好的生物相容性,可满足作为组织工程骨支架材料生物相容性的要求。

关键词: 脱蛋白;异种骨;支架材料;生物相容性;组织工程

中图法分类号: R318.08;R322.71 **文献标识码:** A

On biocompatibility of heterogeneous deproteinized bone as scaffold material

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

Abstract: Objective To evaluate the biocompatibility of manufactured heterogeneous deproteinized bone and to provide experimental basis for clinical application. Methods Ten-millimeter long deproteinized bone and leaching liquor were made with a series of physical and chemical method from pig ribs, then were evaluated through acute and subacute toxicity test, hemolysis test, pyrogen test, intracutaneous test, intramuscle implant test and cytotoxicity test. Results No obvious toxicity, hemolysis, pyrogenic characteristics, skin irritation, inflammatory reaction after intramuscle implantation and cytotoxicity were observed. Conclusion The heterogeneous deproteinized bone is of good biological safety and meets all the demand of biocompatibility as scaffold material of tissue engineering bone.

Key words: deproteinization; heterogeneous bone; scaffold material; biocompatibility; tissue engineering

制备和选择理想的组织工程骨支架材料是组织工程化骨组织能否应用于临床的重要因素之一。异种骨具有和人细胞外基质非常接近的网架结构和成分,经过特殊处理或加工提纯,可做为组织工程骨支架材料用于临床。但必须通过生物安全性检测,验证其对植入受体无毒、无害才能使用。异种脱蛋白骨在加工处理过程中是否残留化学物质,对植入受体局部及全身有无毒性作用报道较少。本研究通过制备异种脱蛋白骨及浸提液,参照国家标准(GB)进行生物安全性评价[1-3],从而为临床应用提供实验依据。

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助重大攻关课题("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,主要从事脊柱脊髓伤方面的研究,发表论文15篇。电话:13012324402

通讯作者: 李起鸿,电话:(023)65340297

收稿日期: 2005-12-01;**修回日期:** 2006-05-10

1 材料与方法

1.1 材料

NaN_3、NaOH,甲醇、氯仿、H_2O_2、乙二胺(重庆化学试剂厂),曲拉通X-10(Sigma,USA),RPMI1640培养液(Hyclone,USA),MTT(北京中山生物技术有限公司),酶标仪(550,USA)。

1.2 方法

1.2.1 异种脱蛋白骨的制备 取新鲜猪肋骨,去除软组织和骨髓后,锯成10 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;蛋白酶作用6 h;1∶1甲醇/氯仿浸泡12 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48 h;50 ℃以下烘干;包封后用^{60}Co γ射线(剂量$15\times10^3\sim25\times10^3$ Gy)时间为36 h,辐照后备用。

1.2.2 浸提液制备 20 g和50 g已消毒的异种脱蛋白骨粉末,各置于100 ml无菌生理盐水中,37 ℃恒温箱中静置浸提72 h,每日混匀1次,取上清液制备成20%和50%脱蛋白骨浸提

液。

1.2.3 急性、亚急性毒理实验 2月龄健康SPF昆明种小鼠42只(本校实验动物中心提供),体质量15~25 g,雌雄各半,并分笼饲养,随机分7组,每组6只,按50 ml/kg剂量,自尾静脉注射20%脱蛋白骨浸提液。注射后24、48、72 h、1周(急性毒理)、3、5周(亚急性毒理)分别处死小鼠,对照组注射后5周处死小鼠。注射后观察呼吸、活动、反应、体质量变化,取肝、肾、脾标本行HE染色,光镜下观察。

1.2.4 溶血实验 日本大耳白兔1只(本校动物中心提供),雄性,体质量2.0 kg,取新鲜兔血4 ml,将抗凝新鲜兔血4 ml加入5 ml生理盐水稀释,制得新鲜抗凝血9 ml,放入9只试管内,生理盐水(阴性对照组)、蒸馏水(阳性对照组),50%脱蛋白骨浸提液(实验组),每组3支试管,分别加入0.2 ml稀释新鲜兔血,37 ℃水浴1 h,每管重复3孔,用酶标仪测定吸光度OD值(波长540 nm)[D(540)]取平均值,计算溶血率。溶血率=[样品D(540)值-阴性对照D(540)值]/[阳性对照D(540)值-阴性对照D(540)值]。

1.2.5 热源实验 选用日本大耳白兔5只(本校实验动物中心提供雄性),体质量2.5~3.0 kg,连续5 d用肛温计测量兔基础体温正常。自耳缘静脉按2 ml/kg剂量,注射20%脱蛋白骨浸提液,注射后测量肛温,以后每天早晚各1次,连续5 d,测试环境22 ℃。

1.2.6 皮肤刺激实验 日本大耳白兔1只(同1.2.4),以脊柱背部为中线,5 cm×7 cm皮肤脱毛,椎旁1.5 cm处选3个注射点,间距2 cm,分别用浸提液、生理盐水和20%乙醇生理盐水皮内注射,注射剂量为0.2 ml,于注射后6、24、48、72 h观察皮肤反应情况。

1.2.7 肌肉埋植实验 SPF昆明种小鼠(同1.2.3)24只,随机分4组,每个时间点6只。20 g/L戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠,无菌经左股后切开,分离股后肌成袋状为植骨模型,按1%体质量将所制备的脱蛋白骨植入肌袋内,分别于术后24、72 h、1、2周处死,将植入材料连同周围肌肉组织取出,经固定、脱钙、包埋、切片后行HE染色,光镜下观察。

1.2.8 细胞毒性实验 将脱蛋白骨粉用含10%小牛血清的RPMI1640培养液浸渍24 h,置备20%脱蛋白骨培养液。采用L929细胞(昆明种小鼠),经传代后,于对数生长期胰酶消化制成1×10^5/ml的细胞悬液,分别接种于96孔培养板上,每孔100 μl,分3管,培养24 h后使细胞贴壁,更换培养液,其中对照管为新鲜培养液,阳性管为含0.64%苯酚的培养液,实验管为20%的脱蛋白骨培养液,置于37 ℃,5% CO_2培养箱中培养。分别于2、4 d后取出,每孔加入0.5% MTT 20 μl,继续培养4 h后吸出液体,加入二甲亚砜150 μl/孔,震荡5 min,酶标仪测定每孔OD值(490 nm)[D(490)]。然后计算细胞相对增殖率{RGR=[(实验管D(490)-阳性管D(490)]/[阴性管D(490)-阳性管D(490)]},并进行细胞毒性分级(RGR≥100% 0级,75%~99% Ⅰ级;50%~74% Ⅱ级;25%~49% Ⅲ级;1%~24% Ⅳ级;0 Ⅴ级)。

1.3 统计学分析

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0软件进行组间比较t检验。

2 结果

2.1 急性和亚急性毒理实验

小鼠观察期内食欲正常,精神饱满、活动自如,无呼吸抑制、急促等不良反应,无惊厥、瘫痪、死亡。72 h后体质量增加明显,解剖观察无腹水,腹腔内容物无黏连,HE染色显示肝、脾、肾等未见异常。根据毒性程度,异种脱蛋白骨为无毒。

2.2 溶血实验

制备的脱蛋白骨浸提液对兔血的溶血实验测定见表1,溶血率为2.82%,按标准未超过5%为阴性溶血反应。

表1 溶血实验结果

组别	D(540)
阳性对照组	0.792
阴性对照组	0.082
实验组	0.084

脱蛋白骨的溶血率=(0.084-0.082)/(0.792-0.082)×100%=2.82%

2.3 热源实验

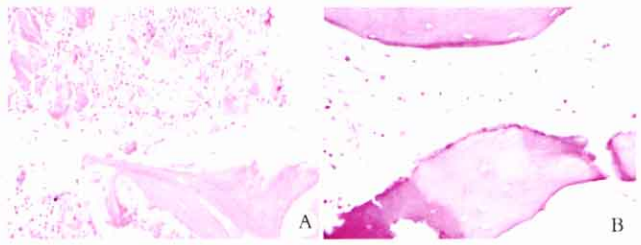
所有实验动物注射前后体温波动在0.8 ℃以内,且注射后不高于注射前体温,波动幅度小于1.4 ℃。

2.4 皮肤刺激实验

注射后各时相点观察显示,注射浸提液及生理盐水处未发现有红斑,水肿或坏死出现,注射20%乙醇生理盐水6、24 h时可见注射区有1.5~2.0 cm直径的红斑,中心部分水肿明显,48 h后红斑加深,72 h中心部分坏死结痂。

2.5 肌肉埋植实验

植入后48 h伤口有红肿,1周时愈合良好,取材后观察未见纤维束形成,植入2周后,纤维包膜开始形成,24、72 h及1周时可见较多炎性细胞,以中性和淋巴细胞为主。2周后炎性细胞减少,材料周围可见多核巨细胞吞噬颗粒,镜下未见有肌肉组织变性、坏死或植入物被排斥。见图1。



A:72 h;B:2周

图1 肌肉内植入异种脱蛋白骨不同时间点的形态学观察 (HE×400)

2.6 细胞毒性实验

异种脱蛋白骨对L929细胞的细胞毒性为0级(表2),实验管细胞增殖率与阴性对照管之间差异无显著性($P>0.05$),与阳性对照管差异有显著意义($P<0.05$)。异种脱蛋白骨的细

胞毒性符合生物材料要求。

表 2　不同材料对 L929 细胞的影响[D(490)]

组别	2 d	4 d
阴性对照管	0.17 ± 0.02	0.27 ± 0.03
实验管	0.21 ± 0.04	0.30 ± 0.05
阳性对照管	0.16 ± 0.01	0.26 ± 0.03[a]

a：$P<0.05$，与实验管比较

3　讨论

目前对骨组织工程支架材料的选择尚有分歧，如何寻找到理想的组织工程支架材料已成为骨组织工程研究中迫切需要解决的问题[4,5]。理想的组织工程支架材料应具有生物相容性、生物可降解性、多孔性等特点，以利于细胞黏附、生长、增殖和分化，并形成功能性组织。异种骨经过脱蛋白、脱脂及脱细胞处理后抗原性降低，同时保留其特有的天然网状结构和骨矿支架，且与人的骨组织结构具有同源性，无机成分主要是羟基磷灰石，与人骨相同，具有较好的生物相容性[6,7]。但以往的完全脱蛋白骨，如 Oswestry 骨、Anorganic 骨等，虽基本上消除了抗原性，但机械强度差。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。我们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。我们对制备的异种脱蛋白骨进行的理化测试结果符合理想支架材料要求。对生物材料的生物安全性评价，国内外先后制定了多种标准，我们参照国家标准(GB)对异种脱蛋白骨进行了急性、亚急性毒实验、细胞毒性实验、溶血实验、肌肉埋植实验等检测，从而进一步了解其生物安全性。

生物材料中的一些易溶出的物质是引起炎症反应和组织反应的主要原因[8]。为研究这些溶出物的毒性，一些研究者提出浸提液法。该法是将试样投入培养液或生理盐水中在适当的条件下进行浸泡，制备出含有溶出物的浸提液。对生物材料的安全性评价主要有 2 种方法：体外实验和体内实验。体外实验是用浸提液进行细胞培养，观察溶出物对细胞的影响，故细胞毒性实验在评价生物相容性方面的地位已得到公认[9]，且标准规定细胞毒性 0 级，Ⅰ级为合格[10]。本研究用体外细胞培养测试异种脱蛋白骨浸提液对细胞的毒性，结果显示，实验管与空白对照管之间无论是增殖速度还是形态并无差异，材料的细胞毒性评定为 0 级。相对体外实验，体内实验更直接和有效。本研究使用制备的异种脱蛋白骨及其浸提液进行的急性、亚急性毒性实验，溶血实验，热源实验，皮肤刺激实验及肌肉埋植实验，结果显示：静脉注射浸提液后，受试动物未见全身毒性反应及死亡，肝、脾、肾 HE 染色未见异常组织学改变。注射前后受试动物体温波动小于 1.4 ℃。材料的溶血率为 2.82%，小于 5% 的标准，对皮肤无刺激。肌肉植入实验显示：植入物周围肌肉组织未见变性坏死、材料与肌肉组织融合生长，光镜下未见明显的淋巴细胞浸润。研究结果表明：制备的异种脱蛋白组织工程骨支架材料具有良好的生物安全性。这为今后构建组织工程骨并进入临床应用奠定了基础。

参考文献：

[1] 赵建华，廖维宏，刘　鹏，等. 新型骨修复材料 PDLLA/HA/DBM 的生物相容性[J]. 生物医学工程研究，2004，23(1)：21－24.

[2] 中国标准出版社第一编辑室. 医疗器械生物学标准汇编(第一部分－第二部分)[M]. 北京：中国标准出版社，2003：14－163.

[3] 高景恒. 二论加速我国医用生物材料的研究与开发——关于医用生物材料(植入体)的安全性评价与评价标准[J]. 实用美容整形外科杂志，2000，11(4)：216－218.

[4] 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.

[5] 高春阳，李起鸿. 异种脱蛋白松质骨载体的研究进展[J]. 第三军医大学学报，2005，27(18)：1896－1898.

[6] 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(1)：6－8.

[7] SCHWARTZ Z，WEESNER T，VAN-DIJK S，*et al*. Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation[J]. J Periodontal，2002，71(8)：1257－1269.

[8] 梁卫东，石应康. 细胞培养法评价生物材料生物相容性研究进展[J]. 生物医学工程杂志，1999，16(1)：86－90.

[9] SRIVASTAVA S，GORHAM S D，COURTNEY J M. Screening of *in vitro* cytotoxicity by the adhensive film test[J]. Biomaterials，1990，11(3)：133－137.

[10] KUE R，SOHRABI A，NAGLE D，*et al*. Enhanced proliferation and osteocalcin production by human osteoblast-like MG63 cells on silicon nitride ceramic discs[J]. Biomaterials，1999，20(13)：1195－1201.

（编辑　薛国文）