论著

文章编号:1000-5404(2008)18-1746-03

异种脱蛋白骨修复长骨大段骨缺损实验研究

简月奎[1],田晓滨[1],赵筑川[1],李 波[1],周焯家[1],赵伟峰[1],张 一[1],李起鸿[2] ([1]贵州省人民医院骨科,贵阳 550002; [2]第三军医大学西南医院关节外科中心,重庆 400038)

摘 要:目的 研究改良法制备的异种脱蛋白骨(deproteinated bone,DPB)作为组织工程支架材料修复大动物长骨大段缺损24周后新生骨的生物力学变化。**方法** 山羊18只,采用完全随机设计法分为正常骨对照组、自体骨组和实验组,每组6只,在自体骨组和实验组每只山羊右侧胫骨中下段造成胫骨总长度20%骨膜和骨缺损,正常骨对照组不截骨,其余2组分别在缺损处植入自体骨、DPB+自体MSCs+rhBMP2,采用半环槽外固定,术后24周取手术侧胫骨进行生物力学检测。**结果** 术后24周,正常骨对照组、自体骨组和实验组新骨生物力学相比无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 改良法制备的异种DPB复合物作为组织工程支架材料修复大动物长骨大段缺损形成的新骨,其生物力学与正常骨对照组、自体骨组相当,可作为骨移植材料试应用于临床。

关键词:异种;脱蛋白骨;缺损;生物力学
中图法分类号:R-332;R318.08;R681.05 **文献标识码**:A

Repair of large segmental long bone defect in goat tibia with heterogeneous deproteinated bone

JIAN Yue-kui[1], TIAN Xiao-bin[1], ZHAO Zhu-chuan[1], LI Bo[1], ZHOU Zuo-jia[1], ZHAO Wei-feng[1], ZHANG Yi[1], LI Qi-hong[2] ([1]Department of Orthopaedics, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002; [2]Center for Joint Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the feasibility of heterogenous deproteinated bone modified in repairing the large segmental long bone defect in goat tibia and to investigate its biomechanical changes. Methods Eighteen goats were randomly divided into 3 groups (6 goats per group): normal control group, autogenous bone group (AB) and heterogenous deproteinated bone group (HDB). The middle or distal right tibia of the goats in groups AB and HDB was made into 20% periosteum and bone defects and repaired with autogenous bone or heterogenous deproteinated bone. The two broken ends of fractured bone and periosteum were be fixed by half-ring sulcated external fixator. The injured side was subjected to biomechanical examination 24 weeks after surgery, and uninjured side was used as normal control. Results The biomechanical examination results showed no significant differences among the three groups 24 weeks after surgery ($P>0.05$). Conclusion Heterogenous deproteinated bone composite used in tissue engineering shows similar biomechanics with autogenous bone, so it can be used in clinic trials.

Key words: heterogeneity; bone; defect; biomechanics

由创伤、感染和肿瘤等原因造成的大段骨缺损修复是骨科的难题,自体骨、同种异体骨、异种骨作为骨移植材料均有一定的局限性。组织工程技术的兴起为骨缺损修复带来了新的希望,支架材料是骨组织工程研究的重要内容。制备来源丰富、价格低廉、性能优良的支架材料,已成为研究的热点之一。近年来国内外虽然有许多异种骨用于骨组织工程支架材料的研究,如Keil、Bio-Oss骨等[1],但没有完全解决异种骨的免疫原性及生物力学性能等问题,导致成骨能力差,只能修复小段骨缺损或小动物骨缺损,而有关异种骨修复

基金项目:贵州省科学技术基金(20063053)
Supported by the Sci & Tech Project of Guizhou Province (20063053)
作者简介:简月奎,男,贵州省遵义市人,博士,主治医师,主要从事组织工程和脊柱外科方面的研究。E-mail: jianyuekui@sina.com
通信作者:李起鸿,电话:(023)65340297
收稿日期:2007-11-29;**修回日期**:2008-02-28

大动物大段骨缺损生物力学的研究报道较少。为此本实验以改良法[2]制备的异种脱蛋白骨(deproteinated bone,DPB)作为组织工程支架材料,在制备过程中加入骨诱导性细胞因子 rhBMP2,使复合物既有生物降解性、骨传导性,又具有骨诱导能力,再复合山羊自体骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)组成异种 DPB 复合物,并以复合物修复山羊胫骨大段骨缺损,为异种骨的临床试用提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　主要仪器和试剂

市售猪股骨,超低温冰箱(日本 NUAIR 公司),AMRAR-1000 扫描电镜(美国 Amrar 公司),RGT-5A 万能生物力学测试仪(深圳瑞格公司),rhBMP2(美国 Sigma 公司)。

1.2　异种 DPB 的制备

参照改良法[1]制备,取新鲜猪股骨,去除软组织和骨髓后,锯成 35 mm×3 mm×3 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% Triton-X 100 的 NaOH(1 mmol/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,蒸馏水浸泡 48 h(每 12 小时换蒸馏水 1 次),50 ℃以下烘干。将烘干的 DPB 放入 -80 ℃超低温冰箱冷冻 3 个月后取出,部分 DPB 浸入含 rhBMP2 浓度为 75 ng/ml[3]溶液中 2 h。将所有 DPB 在 -700 mmHg[3]真空下包装,^{60}Co 照射后置 -20 ℃备用。对 5 块 DPB 进行扫描电镜分析,并用 Labwrrks™图像分析系统对其孔径大小和孔隙率进行测定。

1.3　实验动物分组

选取山羊 18 只(由第三军医大学实验动物中心提供),10~12 月龄,体质量(22.5±2.5)kg,雌雄不限,分笼喂养。采用完全随机完全设计方法分成 3 组,每组 6 只,分别为正常骨对照组(A 组):不截骨,为正常山羊;自体骨组(B 组):骨缺损处植入自体骨;实验组(C 组):骨缺损处植入 DPB + 自体 MSCs + rhBMP2。

1.4　山羊 MSCs 培养及与异种 DPB 复合培养

培养、收集 MSCs,调整细胞数为 1.0×10^6 ml^{-1},将 2 ml 细胞悬液接种于异种 DPB/异种 DPB + rhBMP2 上,放入 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的 CO_2 培养箱中培养 6 h;再加含 15% FBS 的 DMEM 培养基 1 ml,2~3 d 后常规换液。将接种 5 d 的复合物用 3% 戊二醛固定,扫描电镜观察。

1.5　手术方法

动物于术前拍双侧胫骨 X 线片,摄片时测量胫骨干长度、中下段横径,所有动物骨缺损模型的制备与外固定的操作由同一组人员完成。肌注速眠新 0.08 ml/kg 与氯胺酮 2 mg/kg 复合麻醉,术中氯胺酮维持,常规备皮、消毒、铺巾。半环槽外固定器固定,旋紧所有螺母[4,5]。根据 X 线片得到的胫骨长度,在每只山羊右侧胫骨中下段造成 20% 骨和骨膜段缺损[6](胫骨中下段截骨长度/胫骨总长度×100%),在中间 2 组穿针处之间用线锯锯断胫骨和骨膜,根据分组情况植入不同的材料,其中 MSCs 均来自自体骨髓,逐层关闭,测量锯下的胫骨干中下段横径。术后每天检查螺母松紧,定期根据 X 线片观察胫骨两断端对位对线情况并及时调整。1 周内伤口、针道口每日喷洒碘伏,肌注青霉素 160 万 U/d ,常规高蛋白饲料圈养,无异常后放养,自由活动。

1.6　生物力学测定

将术后 24 周各组山羊双侧胫骨取下,剔净软组织,用电子式万能材料试验机进行抗压缩、抗扭转和抗弯曲检测。将胫骨两端用直径 6 cm 的牙托粉凝胶固定,置于试验机加载平台上,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。以所有山羊胫骨对照侧测量值取平均值为评价标准,与实验侧测量值进行比较。

1.7　统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件对各组力学测量结果进行方差分析,并行 q 检验。

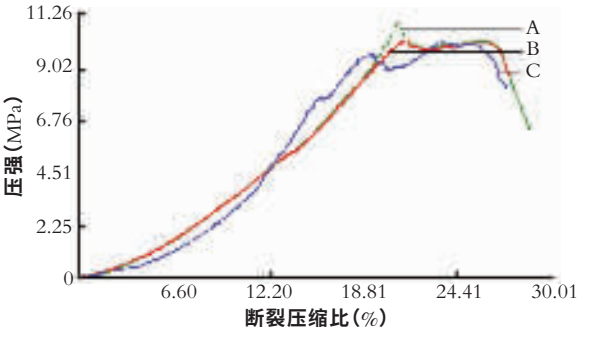
2　结果

2.1　术后山羊观察

所有实验山羊术后伤口无溃烂、流脓,无死亡,术后 2~6 h 山羊苏醒,并能站立进食。螺母松动后及时旋紧,无外固定松动失败,皮肤无坏死。2 d 内伤肢能落地,但不能负重,2 周后可以部分负重,3 周后有轻微跛行,4 周后能自由活动,无跛行。

2.2　生物力学测定结果

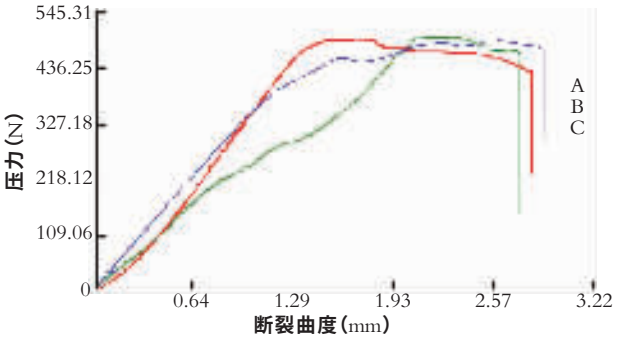
2.2.1　轴向压缩试验　　术后 24 周时,3 组胫骨抗压缩试验结果显示为受压后函数记录仪描记出的压强-变形曲线,曲线呈线性关系,并形成波峰。波峰过后曲线略有下降,并形成一平台期,即此时随压强增加,骨块变形不明显,达到其极限强度后,骨块断裂,为一倾斜向下的曲线。3 组图形状及变化趋势相似,抗压缩极限压强分别为 A 组(10.74±1.23)MPa、B 组(10.11±1.35)MPa、C 组(10.22±1.32)MPa。断裂压缩比分别为 A 组(26.82±0.87)%、B 组(27.17±0.75)%、C 组(28.22±1.12)%(图 1)。3 组抗压缩极限压强及断裂压缩比相比较差异无显著性($P_{AB}=0.415$,$P_{BC}=0.494$)。



A:对照组;B:自体骨组;C:实验组

图 1　抗压缩试验压强-变形曲线图

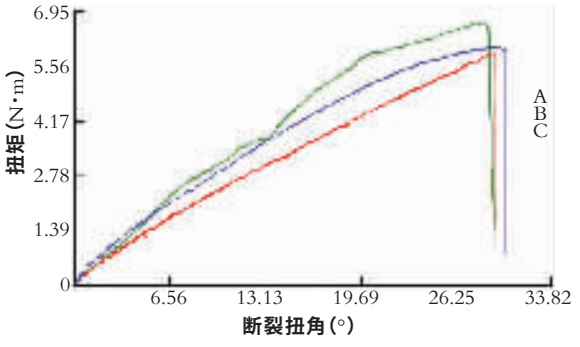
2.2.2　三点抗弯曲试验　　术后24周时,3组胫骨抗弯曲试验为载荷-变形曲线,曲线呈线性关系,无明显波峰,但有一平台期,即此时随压力增加,骨块弯曲不明显,达到其极限弯曲强度后,骨块断裂,为一陡直向下曲线。3组图形状及变化趋势相似,抗弯曲极限压力分别为A组(481.52±12.45)N、B组(478.34±14.68)N、C组(475.62±13.41)N。断裂弯曲度分别为A组(2.62±0.12)mm、B组(2.61±0.15)mm、C组(2.81±0.13)mm(图2)。3组抗弯曲极限压力及断裂弯曲度相比较差异无显著性($P_{AB}=0.7$,$P_{BC}=0.448$)。



A:对照组;B:自体骨组;C:实验组

图2　抗弯曲试验载荷-变形曲线图

2.2.3　抗扭转试验　　术后24周时,3组胫骨抗扭转试验为载荷-变形曲线,曲线呈线性关系,无明显波峰,随扭矩增加,曲线几乎呈直线性变化,达到骨块极限扭矩后骨块断裂,曲线表现为一陡直向下的直线,3组图形状及变化趋势相似,抗扭转极限扭矩分别为A组(6.55±0.25)N·m、B组(6.34±0.18)N·m、C组(6.42±0.21)N·m。断裂扭角分别为A组(29.51±1.64)°、B组(28.88±1.46)°、C组(28.81±1.33)°(图3)。3组抗扭转极限扭矩和断裂扭角比较差异无显著性($P_{AB}=0.123$,$P_{BC}=0.346$)。



A:对照组;B:自体骨组;C:实验组

图3　抗扭转试验载荷-变形曲线图

3　讨论

异种骨的临床应用除了安全性之外,主要是免疫原性[7]和成骨能力。成骨能力的评价不仅包括新骨的数量,还包括新骨的质量,评价异种骨重建过程的力学效果,动物实验是非常重要的,并且要尽可能地模拟临床状态。改良法在制备过程中尽量保留胶原蛋白,去除非胶原蛋白、肽类及脂类、细胞等,降低了抗原性,同时保留力学强度,保存了天然的网状孔隙系统,为细胞的黏附、增殖及分化提供良好的三维空间结构,并加入骨诱导性细胞因子rhBMP2,在植入前复合山羊自体MSCs,使复合物既具有骨传导性,又具有骨诱导性,成骨能力及成骨质量大大增强。经过一系列理化性能检测、安全性及小动物免疫原性及成骨研究的基础上[8,9],本实验在修复缺损过程中主要对新骨的生物力学进行研究,结果显示,所有实验山羊术后伤口无溃烂、流脓,无死亡。与对照组相比较,实验组新骨与对照组抗压缩极限压强及断裂压缩比、抗弯曲极限压力及断裂弯曲度、抗扭转极限扭矩和断裂扭角在抗压缩试验、抗扭转试及抗弯曲试验中相比较差异无显著性意义。表明异种DPB复合物修复大动物长骨大段缺损的所形成的新骨质量与自体骨相当,为临床异种骨修复大块骨缺损的治疗提供新思路。关于异种DPB复合物的安全性,还有待在将来的动物实验中进行研究。若体液免疫、细胞免疫等实验的安全性能得到进一步证实,则有望在临床骨缺损的修复中被广泛应用。

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] Liu L, Tang K L, Yang L, *et al*. Study of biological safety of scaffold material with heterologous deproteinized bone[J]. Chin J Traumatol, 2006, 9(4): 234-237.

[3] Shea C M, Edgar C M, Einhorn T A, *et al*. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis[J]. J Cell Bio Chem, 2003, 90(6): 1112-1127.

[4] 简月奎, 杨　柳, 李起鸿, 等. 半环槽外固定器建立山羊胫骨缺损模型[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(4): 287-289.

[5] 李起鸿, 曾宪政, 区伯平, 等. 半环槽外固定器的研制与临床应用[J]. 中华骨科杂志, 1984, 4(6): 332-334.

[6] 杨　柳, 李起鸿, 周仲安. 骨外固定治疗长骨缺损对肢体血液循环影响的实验研究[J]. 中华外科杂志, 2000, 38(2): 145-147.

[7] 刘日光, 杨述华, 尹培荣, 等. 自制脱蛋白骨与骨髓基质细胞的生物相容性研究[J]. 中华创伤骨科杂志, 2004, 6(11): 1265-1268.

[8] 刘　雷, 李起鸿, 唐康来, 等. 异种脱蛋白骨的生物相容性研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(22): 2227-2229.

[9] 刘　雷, 李起鸿, 唐康来, 等. 异种脱蛋白组织工程骨支架材料的制备及理化特性研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(1): 12-14.

(编辑　张　维)