文章编号:1000-5404(2009)11-1069-04

论著

冻干同种异体髂骨作为支架材料的性能研究

张泽华[1],罗 飞[1],张劲松[1],曾 玲[1],许建中[1],陈卫军[2] (第三军医大学:[1]西南医院骨科,全军矫形外科中心,[2]基础医学部人体解剖学教研室,重庆市生物力学重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 研究冻干同种异体髂骨块支架材料的微观结构及生物力学特点。**方法** 参考美国组织库协会标准,进行髂骨块采取、脱细胞、脱脂、脱蛋白、消毒、保存。分别将纤维蛋白胶、利福平负压灌注入骨块孔隙内;大体观察冻干同种异体髂骨块、载利福平髂骨块的结构特征,扫描电镜观察孔径、孔隙连通、利福平晶体分布情况,液体置换法测定孔隙率和密度,弯曲试验、扭转试验、压缩试验评价其力学性能。**结果** 冻干同种异体髂骨支架材料呈乳白色,为三面薄层皮质骨及中间松质骨组成的"夹心饼结构",具有骨组织天然三维网状孔隙,孔隙内洁净,相互连通,利福平晶体被纤维蛋白胶均匀地固定于骨块表面和内部;冻干同种异体髂骨块密度(0.35±0.03)g/ml,孔隙率(67.23±9.12)%,孔径(395.36±37.02)μm,抗扭强度(5.96±1.53)MPa,抗压强度(9.94±0.73)MPa,弹性模量(376.14±27.32)MPa,抗弯强度(15.70±2.35)MPa。**结论** 冻干髂骨块具有天然生理性孔隙,生物力学性能良好,具有广阔的开发前景。

关键词: 冻干同种异体骨;带三面皮质骨髂骨;生物力学性能
中图法分类号: R318.01; R318.08; R322.71 **文献标识码:** A

Study on properties of freeze-dried iliac crest bone allograft as scaffold material

ZHANG Ze-hua[1], LUO Fei[1], ZHANG Jing-song[1], ZENG Ling[1], XU Jian-zhong[1], CHEN Wei-jun[2] ([1]Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, [2]Biomechanics Section Under the Ministry of Education's Key Laboratory of Biomechanics and Tissue Engineering, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the microstructure and biomechanical properties of freeze-dried iliac crest bone allograft with regard to its potential applications as bone substitute, scaffold for bone tissue engineering and in drug delivery system. **Methods** Procurement, processing, sterilization and conservation of the iliac crest allograft scaffold were all performed according to the guidelines of the American Association of Tissue Banks. The graft segments were impregnated with Fibrin glue and rifampicin using negative pressure technique. Its physical characteristics were observed including colour, texture and porosities. The pore diameter and microstructure were investigated with scanning electron microscope. Its porosity and density were measured by liquid displacement. Biomechanical tests were conducted in axial compression, lateral bending and rotation modes. **Results** The freeze-dried iliac crest bone allograft was ivory white, clean and porous, presenting sandwich structure in tricortical and cancellous bone. The rifampicin crystal was cemented in the pore by fibrin. Its mean density, porosity and pore diameter was (0.35±0.03)g/ml, (67.23±9.12)%, (395.36±37.02)μm, respectively. The mean anti-rotation strength, compressive strength, elastic modulus, buckling strength was (5.96±1.53), (9.94±0.73), (376.14±27.32), (15.70±2.35)MPa, respectively. **Conclusion** The freeze-dried iliac crest bone allograft is a natural porous bone substitute with satisfying biomechanical strength, showing a great potential for further exploration.

Key words: freeze-dried bone allograft; tricortical iliac crest; biomechanical property

在脊柱退变、创伤、感染、肿瘤的手术治疗中,椎间融合术经历了半个多世纪的考验,因具有较高的植骨融合率和可靠的疗效,仍为脊柱外科医师广泛接受。其中自体髂骨椎间植骨重建脊柱前中柱更是"金标准",但存在供骨区创伤增加、出血增多、感染概率大等缺点及术后慢性疼痛的问题。1976年美国组织库协会(American Association of Tissue Banks, AATB)成立,制定了组织获取、加工处理、贮藏和发放方法的标准。随着AATB标准的不断总结和更新,同种异体骨移植在世界范围内逐渐推广,成为仅次于输血的同种异体组织移植[1-4]。本实验参考AATB标准制备了冻干同种异体髂骨支架材料,开发了系列产品,并研究其结构性能。

作者简介:张泽华,男,山东省莱阳市人,博士研究生,医师,主要从事骨关节结核方面的研究。电话:(023)68773076, E-mail: zhangzehuatmmu@yahoo.com.cn
通信作者:许建中,电话:(023)68754164, E-mail: xjzslw@163.com
收稿日期:2009-02-16;修回日期:2009-03-17

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂和仪器

10个成人右侧半骨盆(供体来自西南医院骨库,志愿者捐献)。氯仿、无水甲醇(重庆化工有限公司),利福平原药(上海生工),医用纤维蛋白胶(广州倍绣公司),20% H_2O_2(江西德成制药有限公司),75%乙醇。自制微型负压舱,微机控制电子万能试验机(深圳瑞格尔仪器有限公司),扫描电子显微镜(AMRAY-1000B,美国),电子天平(JA2003A,上海精天电子仪器有限公司),超声清洗机(上海西城科技有限公司),恒温摇床(WSZ-100-A,上海安亭科学仪器厂)。

1.2 冻干同种异体髂骨的制备

骨块切割:无菌条件下去除髂骨翼表面肌肉、韧带、骨膜,电锯切割骨块成长约4.0 cm,宽约1 cm,高约3.0、5.0、7.0 cm不同规格。脱细胞:立即双蒸水高压脉冲清洗,冲去孔隙内骨髓;超声波清洗15 min,再次高压脉冲冲洗,反复直至骨块内部无红骨髓,液体清亮。脱脂:晾干骨块,放入无菌玻璃容器中,氯仿/甲醇(1∶1)浸泡,置于25 ℃恒温摇床8 h;倒除氯仿/甲醇后,37 ℃双蒸水反复清洗3次,每次15 min。脱蛋白:将骨块置入含10%过氧化氢溶液的密闭容器中,37 ℃恒温箱中浸泡72 h,每12小时更换溶液1次,每次换液前用双蒸水漂洗3次,10~15 min/次。二次脱脂:室温下晾干,氯仿/甲醇(1∶1)浸泡18 h,每6小时更换氯仿/甲醇混合液1次,不定时搅拌,最后用37 ℃双蒸水清洗3次,每次15 min。冻干:骨块装入血浆袋,不封口,放入冻干机样品仓,温度传感器插入骨移植物深部,关闭仓门,按程序逐级降温、复温;最后抽真空封血浆袋口,再用1层血浆袋和1层聚乙烯袋封口,贴上标签,灭菌、保存;骨块包装完毕后,$^{60}Co\gamma$射线照射灭菌,常用剂量为15~30 kGy。消毒后保存于-76 ℃冰箱中至少3个月,保存期限2年[3-5]。

1.3 装载利福平同种异体髂骨的制备

按说明书配制纤维蛋白胶,3块冻干髂骨置入自制微型负压舱内,调控舱内压力-0.5 kPa,将纤维蛋白胶快速注入骨块孔隙,维持负压30 min,干燥。将复合纤维蛋白胶骨块再次置入负压舱,浸泡于60 mg/ml利福平甲醇溶液,维持负压0.5 kPa 30 min,避光挥发甲醇,干燥。

1.4 物理机械性能评价

1.4.1 密度与孔隙率测定 取10个供体骨块各3块,大小1 cm×1 cm×0.5 cm,参照Zhang等[6]液体置换法测试。双蒸水(密度为1 g/ml)作为置换液体,密度瓶装满双蒸水质量为W1;质量为Ws的骨块置入密度瓶,抽真空除去孔隙内空气,然后加满双蒸水,密度瓶称量为W2;取出孔隙内充满水的骨块,此时密度瓶质量为W3。公式:骨块孔隙体积Vp = (W2-W3-Ws),骨块支架体积Vs = (W1-W2-Ws),密度d = Ws/Vs = Ws/(W1-W2-Ws),孔隙率ε = Vp/(Vp+Vs) = (W2-W3-Ws)/(W1-W3-2Ws)。

1.4.2 扫描电镜观察 取10个供体骨块各1块,大小1 cm×1 cm×0.5 cm,另取装载利福平髂骨块3块,充分干燥后离子溅射仪喷金,扫描电子显微镜(SEM)放大观察,每个标本选择5个视野,每个视野选择5个孔隙,使用配套图像分析处理软件测量孔径。

1.4.3 生物力学测试 取10个供体骨块各3块,大小1 cm×2 cm×4.5 cm。弯曲试验:牙托粉固定骨块2端,横向固定于RGT-5A微机控制电子万能试验机弯曲平台,横梁跨度为40 mm,限定最大载荷为5 000 N,加载速度为1 mm/min,直到骨块破坏,函数记录仪记录载荷-变形曲线。扭转试验:标本2端分别固定于扭转平台固定端、加载端,标距20 mm;试验速度15°/min,直至骨块破坏,记录力矩-角度曲线。压缩试验:骨块纵向置于加载平台,其上下断面平行于加载端,限定最大压缩载荷为5 000 N,试验速度1 mm/min,记录载荷-变形曲线。

2 结果

2.1 大体观察

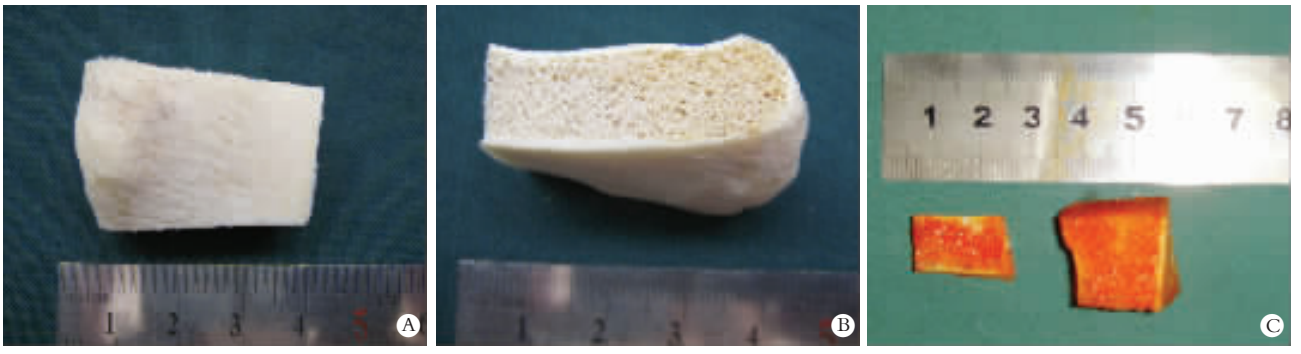
冻干同种异体髂骨支架材料呈乳白色,质硬,为3面薄层皮质骨及中间松质骨组成的"夹心饼样结构",具有骨组织天然三维网状孔隙,孔隙内洁净,相互连通。载利福平髂骨块外观呈鲜红色,药物分布均匀,纤维蛋白胶将骨块孔隙封闭(图1)。

2.2 密度与孔隙率测定

冻干同种异体髂骨块密度为(0.35±0.03) g/ml,孔隙率较高,为(67.23±9.12)%。

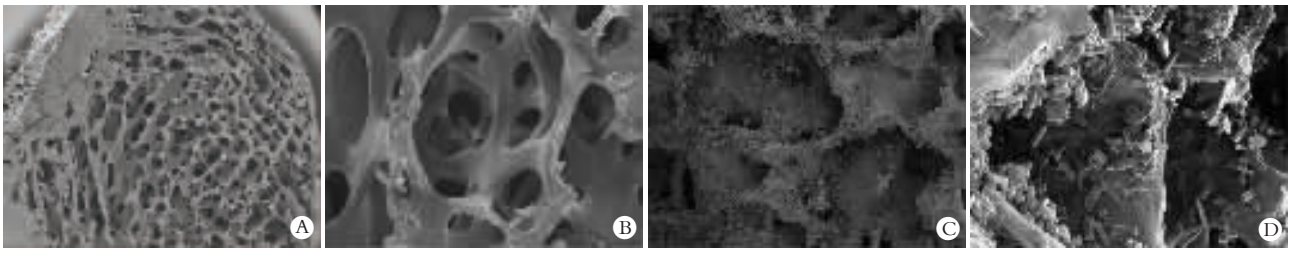
2.3 扫描电镜观察

冻干同种异体髂骨块孔隙内洁净,无残留细胞,孔隙呈卵圆形,大小较均匀,相互交通,孔径(395.36±37.02) μm,皮质骨厚度(1.62±0.21) mm。载药髂骨块中可见纤维蛋白胶将骨块孔隙封闭,表面大量颗粒均匀的利福平晶体,另外,纤维蛋白胶将利福平晶体固定于孔隙表面和内部(图2)。



A:骨块正面;B:骨块侧面;C:载利福平骨块

图1 冻干同种异体髂骨大体观察



A:髂骨块表面(×10);B:松质骨块内部(×46);C:载利福平骨块表面(×25);D:载利福平骨块内部(×100)

图 2　扫描电镜观察薄层皮质骨及内侧松质骨

2.4　生物力学测试

冻干同种异体髂骨抗扭强度较低,为(5.96 ± 1.53) MPa,测试结束后骨块自中间斜行裂开,完整性破坏;抗压强度(9.94 ± 0.73) MPa,测试结束后可见骨块上下断面压缩约 1 mm,整体结构无明显改变,5 000 N 最大载荷不能破坏骨块整体完整性;弹性模量(376.14 ± 27.32) MPa,弯曲强度(15.70 ± 2.35) MPa,测试结束后骨块自中间横行裂开,完整性破坏。

3　讨论

同种异体骨的处理、消毒、保存技术逐渐趋于成熟,因具有良好的骨传导作用和一定的骨诱导作用,同种异体骨成为理想的自体骨替代材料。新鲜冷冻异体骨和冻干异体骨是最常用的 2 种同种异体植骨材料。新鲜冷冻骨在生物力学方面与自体骨无明显差别,在处理过程中保留骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)的骨诱导功能,因此是较为理想的植骨材料,但新鲜冷冻骨在处理、保存、运输方面要求较高,不如冻干骨方便。冻干骨经脱细胞、脱脂、脱蛋白,^{60}Coγ 射线照射灭菌,深低温冷冻处理后的免疫原性低,骨传导作用良好,骨诱导作用仍然得到一定程度的保留。冻干处理能杀死存活的细胞,并使抗原结构发生物理改变,进一步减弱同种异体骨的抗原性,骨移植材料几乎可以无限期地保存,但对移植物的力学性能有一定破坏,冻干骨再水化后抗弯曲强度较新鲜骨减少 45%,抗旋转强度减少 61%,抗压强度无明显改变或轻微增加[7-9]。本研究观察了带 3 面皮质骨冻干同种异体髂骨的抗扭强度、抗压强度、弹性模量、抗弯强度,证实了其具有可靠的生物力学性能,可对抗较强的轴向压缩应力及剪切应力,但对抗扭转应力较差。提示临床应用冻干同种异体髂骨重建脊柱前中柱缺损,可提供机械支撑对抗躯干质量,但需与内固定或(和)外固定联合应用,以协同对抗扭转应力,防止植骨块骨折、塌陷,促进成骨融合。

免疫排斥反应不利于移植后的骨愈合过程,尽可能除去抗原成分是同种异体骨处理过程中的关键。同种异体骨抗原成分为由主要组织相容性复合物决定的细胞表面糖蛋白,主要存在于骨髓细胞、成骨细胞等细胞表面。对于结构性同种异体骨,如髂骨块、半骨盆、股骨头、股骨下端等,除去内部松质骨内的骨髓成分较为困难,技术细节为商业机密。我们的经验是骨块制备时应根据临床骨缺损修复需要,预制成合适尺寸,方便临床应用时修剪,又避免骨块过大影响处理液进出。在血液凝固干燥前,立即用高压脉冲水流冲洗预切割的骨块,尽量将松质骨周边骨髓成分冲净,然后用超声震荡,将骨块中心部位的骨髓成分洗出,2 种方法反复交替进行,直至无肉眼可见红色残留物。否则一旦骨髓成分凝固堵塞松质骨表面孔隙,将影响骨块内部细胞、脂肪、蛋白的清除,骨块较大时可用细钻头钻孔,利于处理液在孔隙内部循环。氯仿/甲醇均有剧毒,因确切的脱脂效果、强挥发性,应用较早、较广泛,但残留量需要严格控制。表面活性剂对亲水、疏水物质的清除均有效,有助于降低异体骨免疫原性,但作为一种有机物质,其残留物的安全性也值得进一步研究[3,4,10]。

Herold 认为支架材料促进骨生长的最佳孔隙范围是 200 ~ 400 μm,这种孔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受体提供最佳的压力和张力[11]。冻干同种异体髂骨的特点为薄层皮质骨包绕松质骨的夹心饼样结构,具有良好的孔隙率、孔径,孔隙间相互连通,利于成骨细胞、血管长入,利于成骨爬行替代。前期工作中,我们采用松质骨脱钙骨基质作为组织工程骨支架材料,系列小动物、大动物体内实验,临床应用均证实异体骨支架构建组织工程骨具有优异的成骨活性和生物安全性,但脱钙骨基质质地柔软,构建的组织工程骨填充骨缺损、促进骨修复,主要依靠内固定提供骨缺损处的机械支撑性能[12,13]。若使用冻干同种异体髂骨作为组织工程骨支架材料,除携带成骨细胞、成骨诱导因子外,还具有良好的机械强度和弹性模量,有望成为理想的骨组织工程支架材料。另外,冻干同种异体髂骨内部松质骨孔隙可作为储药仓库,携带成骨诱导因子、抗生素、抗肿瘤药物等,实现局部缓释、维持有效药物浓度。本研究通过负压灌注技术将三维网状结构纤维蛋白胶和利福平分别灌入孔隙内部,利福平晶体均匀的被固定于骨块内部和表面。Witso 等[14]研究松质骨作为抗生素缓释载体时,将利福平灌注到人冻干松质骨空隙内,体外释放采用洗堤模型,体内缓释采用小鼠肌袋模型,结果发现利福平体内、体外释放曲线相近,7 d 时仍高于 100 倍最

低抑菌浓度(MIC)[14]。因此,冻干同种异体髂骨作为药物、细胞因子载体在骨科植入型缓/控释系统领域研究中具有较大优势。

冻干同种异体髂骨的"夹心饼样结构"整合了皮质骨和松质骨的优点,具有良好的机械强度和理想的孔隙,本中心根据颈椎、胸椎、腰椎椎体高度不同,预制骨块成1~2个椎体缺损高度,开发了系列不同规格产品,已送国家食品药品监督管理局进行质量检验,并将进一步开展冻干同种异体髂骨支架材料用于椎间融合、组织工程骨构建、药物缓释载体等临床和应用基础研究,具有广阔的开发前景。

参考文献:

[1] Wetzel F T, Hoffman M A, Arcieri R R. Freeze-dried allograft in anterior spinal surgery: cervical and lumbar applications[J]. Yale J Biol Med, 1993, 66(3): 263-275.

[2] Govender S, Kumar K P. Cortical allografts in spinal tuberculosis[J]. Int Orthop, 2003, 27(4):244-248.

[3] AATB. American Association of Tissue Banks-Standards for Tissue Banking[S]. McLean: American Association of Tissue Banks,2001.

[4] AATB. American Association of Tissue Banks-Technical Manual: Musculoskeletal tissues[S]. McLean: American Association of Tissue Banks, 1992.

[5] 李 强,何清义,许建中,等.羊脱钙骨基质作为骨组织工程支架材料的性能评估[J].第三军医大学学报,2007,29(1):9-11.

[6] 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.

[7] Zarate-Kalfopulos B, Reyes-Sanchez A. Bone grafts in orthopedic surgery[J]. Cir Cir, 2006, 74(3): 217-222.

[8] Lohmann H, Grass G, Rangger C, *et al*. Economic impact of cancellous bone grafting in trauma surgery[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2007, 127(5): 345-348.

[9] Bauer T W, Muschler G F. Bone graft materials. An overview of the basic science[J]. Clin Orthop Relat Res, 2000, (371):10-27.

[10] 楮 黎,孙 磊,黄啸原. 表面活性剂脱脂生物源性骨移植材料免疫的相关研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(10):685-688.

[11] Herold R W, Pashley D H, Cuenin M F, *et al*. The effects of varying degrees of allograft decalcification on cultured porcine osteoclast cells [J]. J Periodontol, 2002, 73(2): 213-219.

[12] 刘 杰,吴雪晖,罗 飞,等. 自体间充质干细胞构建组织工程骨修复人长骨缺损的临床观察[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(9):851-854.

[13] Hou T, Xu J, Li Q, *et al*. *In vitro* evaluation of a fibrin Gel antibiotic delivery system containing mesenchymal stem cells and vancomycin alginate beads for treating bone infections and facilitating bone formation [J]. Tissue Eng Part A, 2008, 14(7): 1173-1182.

[14] Witso E, Persen L, Loseth K, *et al*. Cancellous bone as an antibiotic carrier[J]. Acta Orthop Scand, 2000, 71 (1): 80-84.

(编辑 栾 嘉)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)11-1072-01

术前动脉化疗栓塞治疗巨块型ⅠB$_2$~ⅡB期宫颈癌21例

兰 鹰[1],胡小红[1],苏 江[2],罗秉庆[3] (柳州医学高等专科学校第一附属医院:[1]妇产科,[2]放射科,[3]病理科,广西 柳州 545002)

巨块型宫颈癌因肿块体积大,切除癌灶概率小,术后复发率高。近年来,对该类患者术前行介入治疗,能有效提高手术切除率及控制微小转移,并对癌灶快速有效止血[1]。2003年3月至2006年8月,我院对21例巨块型ⅠB$_2$~ⅡB期宫颈癌患者行术前子宫动脉化疗栓塞,效果满意,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本组21例,年龄28~56岁。病例肿块直径为4~6 cm。ⅠB$_2$期12例,ⅡA期7例,ⅡB期2例。鳞癌18例,腺癌2例,鳞腺癌1例。7例阴道大出血。

1.2 方法

21例均行1个疗程子宫动脉化疗栓塞。经股动脉穿刺,将5F导管置于髂内动脉前干造影,明确血管形态及肿瘤染色后,超选入子宫动脉主干,先缓慢注入半量稀释的化疗药物,剩余药物与1 mm×1 mm明胶海棉颗粒混合,栓塞双侧子宫动脉。化疗方案:鳞癌用顺铂60 mg/m^2+长春新碱1 mg/m^2+博来霉素20 mg/m^2;腺癌用顺铂60 mg/m^2+阿霉素40 mg/m^2+氟尿嘧啶500 mg/m^2。术后静脉水化并预防感染3 d,48 h内用止痛剂,观察足背动脉搏动。

1.3 疗效判定

完全缓解(CR):病灶消失;部分缓解(PR):肿块缩小达50%以上;好转(MR):肿块缩小25%~50%;稳定(SD):无新病灶出现;病变进展(PD):增大或出现新病灶。

2 结果

2.1 化疗栓塞疗效

治疗后连续3周观察肿块的变化,术前做盆腔CT。第7天见癌块枯萎,第21天见宫颈肿块明显缩小,CR 0例,PR13例,

(下转1086页)

作者简介:兰 鹰,女,广西壮族自治区柳州市人,硕士,副主任医师,主要从事妇科肿瘤与内镜方面的研究,发表论文9篇。电话:(0772)2535889,E-mail:lanyinglz@163.com

收稿日期:2008-07-25;修回日期:2008-10-06