DOI:10.16016/j.1000-5404.1989.05.012

异种脱钙骨基质及其释放系统的实验研究

林贵德 柯新华 王民刚（大坪医院 骨科）

提 要 异种脱钙骨基质（HDBM）及其释放系统（DS）的实验研究旨在提高HDBM诱导成骨的成功率。实验用小公牛长骨干制成HDBM，加DS－$CaCl_2$或$CaSO_4+Na_2HPO_4+KH_2PO_4$移植到家兔尺骨1.5cm缺损内。经观察，X－线照片的骨钙化影出现率除$CaCl_2$组16、20周外可达100%，组织学为100%的新生骨形成。作者认为：HDBM及DS诱导成骨好的原因是$CaCl_2$或$CaSO_4$中Ca^{++}与Na_2HPO_4、KH_2PO_4可促进HDBM中BMP加速释放的结果。

关键词 诱导成骨；异种脱钙骨基质；释放系统

异种骨移植主要是Kiel-Bone、Boplant、Oswertry-Bone、Inorganic-Bone、异种脱钙骨基质〔Heterogeneous Decalcified Bone Matrix(HDBM)〕等，因失败率高，实验和临床仍处于停滞状态。本文报告HDBM及其释放系统〔Delivery System(DS)〕实验，经观察HDBM加DS可提高HDBM诱导成骨成功率。

材料和方法

一、HDBM制备

出生后24～72h的小公牛，活杀后在清洁条件下截取四肢长骨干，剔除软组织、骨膜、劈成骨片，用净化水冲刷骨髓、残血，剪成0.12mm³～0.5mm³（$\bar{X}$ 0.32mm³）骨屑，蒸馏水浸洗过滤、吹干，用不同浓度酒精、无水乙醚脱水、脱脂，30°C恒温干燥，室温（12℃±）下0.5N HCl脱钙72h，洗酸至pH7.01～7.2，再次脱水、脱脂、干燥，分装0.5g/包，三层聚乙烯薄膜密封，环氧乙烷消毒，3次培养无菌生长贮冰箱备用。

二、释放系统配制

配制25mmol$CaSO_4$、25mmol$CaCl_2$、5 mmolNa_2HPO_4、5 mmolKH_2PO_4、0.9%NaCl，高压消毒备用。

三、动物分组

健康成年家兔45只，体重2000～3850g（$\bar{X}$ 2704.5g），雄24，雌21，随机分3组。除（Ⅰ）、（Ⅱ）组2只、（Ⅲ）组1只作单侧外，余均作双侧，相隔4周。（Ⅰ）组：$CaSO_4+Na_2HPO_4+KH_2PO_4$ + HDBM 0.25g；（Ⅱ）组：$CaCl_2+Na_2HPO_4+KH_2PO_4$ + HDBM 0.25g；（Ⅲ）对照组：0.9%NaCl + HDBM 0.25g。

四、移植术

2.5%戊巴比妥钠1.2ml/kg体重，静脉内麻醉，无菌技术下前臂中段外侧切口2.5cm，显露尺骨中段，咬除连骨膜在内的骨质，造成1.5cm缺损，分别按（Ⅰ）（Ⅱ）（Ⅲ）组移植，全层缝合，分笼饲养，条件一致。

五、观察内容

1.X－线照片，术后立即（对照）、4、8、12、16、20、24周正侧位照片观察成骨的生长范围、密度，与母骨的关系。2.组织学检查：3组均按术后4、8、12、16、20、24周活杀取标本，常规切片，HE染色，另有（Ⅰ）组2只（Ⅱ）组2只留作长期观察，并于32、42周照片、活杀作组织学观察。

结果

1.（Ⅰ）组死亡1只，桡骨骨折1只；（Ⅱ）组死亡2只；（Ⅲ）组桡骨骨折1只，共5只不计入结果。则（Ⅰ）（Ⅱ）组各16只30侧，（Ⅲ）组8只15侧。

2.X－线照片：为便于比较3组间X－线片骨钙化影的数量，综合全实验X－线照片，骨钙化影分四级：0级—无；Ⅰ级—灰白色密度增深的点状或云雾状影；Ⅱ级—骨钙化影充填并连接骨端，但不足缺损区纵断面的3/5，或已完全充填并连接骨端，但形状不规则，且排列紊乱；Ⅲ级—Ⅱ级断面超过3/5，且形状规则，排列整齐，密度接近母骨。结果见附表。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

附表 X-线骨钙化影

	Ⅰ组 30侧							Ⅱ组 30侧							Ⅲ组 15侧					
	0		Ⅰ		Ⅱ—Ⅲ		计	0		Ⅰ		Ⅱ—Ⅲ		计	0		Ⅰ		Ⅱ—Ⅲ		计
	侧数	%	侧数	%	侧数	%		侧数	%	侧数	%	侧数	%		侧数	%	侧数	%	侧数	%	
4周	2	6.7	19	63.3	9	30	30	9	30	20	66.7	1	3.3	30	11	73.3	4	26.7	0		15
8周	0		13	50	13	50	26	0		15	57.7	11	42.3	26	6	50	6	50	0		12
12周	0		7	36.8	12	63.2	19	0		10	40	15	60	25	7	70	3	30	0		10
16周	0		6	40	9	60	15	1	5.9	6	35.3	10	58.8	17	4	66.7	2	33.3	0		6
20周	0		3	37.5	5	62.5	8	1	10	4	40	5	50	10	3	75	1	25	0		4
24周	0		0		6	100	6	0		2	33.3	4	66.7	6	2	100	0		0		2
32周	0		0		4	100	4					4	100	4							
42周	0				2	100	2	0		0		2	100	2							

（Ⅰ）（Ⅱ）组骨钙化影的等级基本相同，对照组仅部分动物出现Ⅰ级。

3．组织学检查：（Ⅰ）（Ⅱ）组的组织学变化基本相似，（Ⅲ）组差别较大。故以（Ⅰ）组为主进行描述。早期因死亡、骨折者，作5天及2周观查。5天，HDBM周围炎性细胞密集成团，有的HDBM被间充质细胞围绕，毛细血管附近出现少数成软骨细胞。2周，成软骨细胞、软骨细胞、基质及成骨细胞、骨细胞、基质与胶原纤维、间充质细胞、炎性细胞等纵横交错组成早期“骨样组织”等早期变化嵌于断端之间，其中有孤立的软骨细胞团，骨细胞“岛”。4周，断端间可见软骨内成骨的演变过程—HDBM表面或腔隙内的间充质细胞，软骨细胞和基质，粗大紊乱的骨小梁呈片状连接，而无明显界限。同时可见膜内成骨的演变过程—HDBM周围的毛细血管破裂，RBC外逸，成骨细胞、骨细胞和基质，杂有粗大紊乱的骨小梁。（Ⅰ）组基本相似。（Ⅲ）组断端出现少量软骨细胞团。8周，断端间骨小梁增多，且逐渐改造、重建，其腔隙内出现少量骨髓细胞，仍有残存的早期变化。（Ⅰ）组基本相同，（Ⅲ）组断端间软骨细胞团增加。12周，骨小梁改造、重建、塑形更趋完善，断端间基本上由新生骨组织连接，骨髓腔扩大，骨髓细胞增多，但新生骨组织中仍杂有早期变化。（Ⅰ）组相似，（Ⅲ）组改变不大。16周，断端完全由新生骨组织连接，但新生骨较母骨粗大，密度不一致，塑形仍不完善，骨髓细胞增多，早期变化减少。（Ⅰ）组塑形较差。（Ⅲ）组断端出现孤立的骨小梁。20周，塑形良好的新生骨完全连接断端，仍有HDBM等残存。两种成骨方式及各种成骨阶段仍然存在。（Ⅱ）组相似，（Ⅲ）组无改变。24周，塑形更完善，但仍杂有不规则、粗大的骨小梁。（Ⅰ）组相同。32周，新生骨塑形更为完全，与母骨近似。42周，新生骨无吸收，塑形仍未完全。

讨　论

1889年Senn用牛DBM修复人和犬的骨缺损获得成功，其后HDBM在实验研究和临床应用的结果均不够理想。本实验HDBM诱导成骨的X－线照片和组织学检查均证明诱导成骨优良，但仍有一些问题尚须探索。1984年Urist[1]用β-$Ca_3(PO_4)_2$加BMP（骨形态发生蛋白）以加速BMP释放增强骨诱导活性，结果21天的新生骨量比单纯用BMP大12倍。1965年Patte[2]用$CaCl_2$加DBM及磷酸缓冲液使再钙化率从单纯DBM的20%上升到100%。1983年Nade[3]用$Ca_5(PO_4)_3$-OH、$Ca_3(PO_4)_2$加自体骨髓可产生新生骨。1987年作者在成形DBM实验中发现加用$CaSO_4$者有的动物4周时完成1.5cm骨缺损的骨性连接。因此从本实验结果可以推论：

（一）Ca^{++}在促进HDBM中的BMP加速释放有重要作用，本实验（Ⅰ）（Ⅱ）两组的诱导

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

成骨基本相似，证实DS中Ca^{++}是诱导成骨的关键之一。（二）Na_2HPO_4、KH_2PO_4在DS中的作用，1965年Patte[2]指出：$CaCl_2$处理后产生Ca^{++}的有机复合物，加上Na_2HPO_4、KH_2PO_4则转变为磷酸钙的有机复合物，可能是促成磷灰石沉积的主要动力，使再钙化率达到100%。另外，BMP在弱碱性溶液中活性最强。本实验HDBM的pH为7.01～7.2，加用Na_2HPO_4及KH_2PO_4后使HDBM始终处于弱碱性的环境中，有利于BMP活性的发挥。1975年Chalmer[4]也指出诱导成骨的组织环境对诱导成骨是必需具备的条件之一。可以认为Na_2HPO_4、KH_2PO_4是为HDBM加速释放BMP创造一个良好环境，是DS中的一种有力促进剂。实验中X－线照片的连续观察，骨钙化影的密度始终较母骨为高，且多为颗粒状，结合组织学检查，经制片脱钙后，切片中诱导成骨过程所诱导的细胞和组织间一直有空隙存在，作者认为这是再钙化后沉着的钙盐吸收缓慢之故。另外诱导成骨中早期成骨变化一直到32周始终存在，说明HDBM及DS诱导成骨过程缓慢，而且不够完善。其原因：（1）1963年Karges[5]、Anderson[6]指出异种骨的成骨需6个月以上方可完善；1954年Maatz[7]认为异种骨成骨完全的时间为自体骨的3倍，同种骨的2倍。所以本实验观察时间不够，诱导成骨缓慢且不够完善的现象仍然存在。（2）1985年Thomas[8]等认为双磷酸盐会延缓骨样组织骨化。（3）本实验的HDBM未经^{60}Co处理，故免疫反应不能除外。实验表明：(a) HDBM及DS诱导成骨的方式是软骨内骨化与膜内骨化并存。(b) HDBM加DS可使诱导成骨产生的骨样组织和细胞充填骨缺损，防止结缔组织伸入发生骨不连接。但因诱导成骨缓慢且不完善，不完全符合临床骨移植术中的要求，所以HDBM加DS应用于临床还需要作进一步的研究和探索。

参考文献

1. Urist MR, et al. B-Tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. Clin Orthop 1984; 187:277
2. Putte, KA,et al. Experimental mineralization of collagen sponge and decalcified bone. Clin Orthop 1965; 40:48
3. Nade S, et al. Osteogenesis after bone and bone marrow transplantation. Clin Orthop 1983; 181:255
4. Chalmers D, et al. Observation on the induction on bone in soft tissues. J Bone Joint Surg 1975; 57B:36
5. Karges, et al. Experimental evaluation of processed hetrogenous bone trans Plants. Clin Orthop 1963; 29:230
6. Anderson JK, et al. Clinical evaluation of processed heterogenous bone transplants a preliminary study. Clin Orthop 1963; 29:248
7. Maatz R, et al. Spongiosa test of bone grafts for transplantation. Clin Orthop 1954; 36A:12
8. Thomas BJ,et al. Results of the administration of diphosphonate for the prevention of hetrotopic ossification after total hip arthroplasty. J Bone Joint Surg 1985; 67A:400

（收稿：1988.10.13；修回：1989.6.5）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

An Experimental Study on HDBM and Its Dilivery System

Lin Guide, et al. (Department of Orthopaedic Surgery, Dapin Hospital, Third Military Medical College)

This experiment is carried by using the long bone shafts of ox prepared for the heterogenous decalcified bone matrix(HDBM) and adding the delivery system ($CaCl_2$ or $CaSO_4 + Na_2HPO_4 + KH_2PO_4$), implanted into the 1.5 cm defect of the rabbit ulna. Except the $CaCl_2$ group in 16 w and 20 w all the implanted bone matrix shows 100% calcified shadows and the new bone formation is 100% identified histologically. The author belived that the cause of the excellent bone induction osteogenesis of HDBM and its DS in $CaCl_2$ or $CaSo_4$, was the results of Ca^{++} with Na_2HPO_4 and KH_2PO_4 to enhanced and accelerated BMP dilirery in HDBM.

Key words: induction osteogenic; heterogenic, decalcified bone matrix; dilivery system

---

(上接359页)

Macro-micro-anatomy of Musculo-cutaneous Flaps at Dorsalis Pedis

Zhang Fangming and Chen Eryu (Department of Anatomy, Third Military Medical College)

The m. extensor hallucis brevis and m. extensor digitorum brevis and their blood vessels and nerves of 30 feet of Chinese cadavers are observed and measured under the operative microscope. A. tarsea lateralis and the lateral branch of nervus peroneus profundus are the best choice as the pedicle of the musculocutaneous flaps at dorsalis pedis. According to necessities the size of muscle may be detected randomly from medial to lateral.

Key words: surgical flaps; foot/AH; arteria tarsea lateralis

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net