DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.02.009

异种脱钙骨基质加释放系统诱导成骨的^{3}H-TdR、^{45}Ca示踪研究*

柯新华 林贵德 王民刚（第三军医大学大坪医院 骨科）630042

提 要 采用Wistar大白鼠105只，于双侧股四头肌内随机植入异种脱钙骨基质（简称HDBM）。HDBM+$CaCl_2$+Na_2HPO_4+KH_2PO_4、HDBM+$CaSO_4$+Na_2HPO_4+KH_2PO_4、HDBM+NaCl。通过示踪剂^{3}H-TdR、^{45}Ca连续检测，结果证明$CaSO_4$+Na_2HPO_4+KH_2PO_4或$CaCl_2$+Na_2HPO_4+KH_2PO_4均是HDBM诱导成骨的良好促进剂，用其处理的HDBM具有很好的诱导成骨作用，但前者比后者更优。

关键词 异种脱钙骨基质；释放系统；诱导成骨

为了提高异种骨移植的成骨效率，开展了异种脱钙骨基质（Heterogenous Decalcified Bone Matrix，HDBM）加释放系统（Delivery System，DS）移植的动物实验。本文旨在通过示踪剂^{3}H-TdR（氚标记胸腺嘧啶核甙，即同位素^{3}H-胸腺嘧啶核甙）、^{45}Ca（即同位素钙^{45}）的连续检测，探讨HDBM+DS的异位诱导成骨变化和DS的作用。

1 材料和方法

1.1 HDBM的制备

采用出生后24h内雄性牛，清洁条件下活杀，取四肢长骨干，剔除骨膜及软组织，劈成骨条，净化水洗净残血和骨髓，沥干，剪成0.12mm^{3}～0.5mm^{3}骨屑，蒸馏水反复浸洗、过滤，吹干。不同浓度乙醇按不同时限进行阶梯性脱水，无水乙醚脱脂，过滤，吹干，30℃恒温干燥。然后，室温（12℃左右）下，0.5N盐酸脱钙72h，蒸馏水洗至pH7.0，再次脱水、脱脂，干燥至3次称重恒定，分装40mg/包，两层聚乙烯薄膜密封，环氧乙烷消毒，细菌培养3次无菌生长，4℃下贮存备用。

1.2 DS的配制

按分析化学方法配制25mmol $CaSO_4$、25mmol $CaCl_2$、0.1mol Na_2HPO_4、0.1mol KH_2PO_4，分别分装，100ml/瓶，高压灭菌后使用。

1.3 动物分组、手术方法

健康成年Wistar大白鼠（封闭群）105只，体重为149.7±19.5g，雌性50只、雄性55只。^{3}H-TdR组60只，^{45}Ca组45只。每组又随机分为（A）、（B）、（C）组。（A）组：$CaCl_2$+Na_2HPO_4+KH_2PO_4+HDBM；（B）组：$CaSO_4$+Na_2HPO_4+KH_2PO_4+HDBM；（C）组（对照组）：0.9%NaCl+HDBM。

1%戊巴比妥钠0.35ml/100g体重，腹腔内麻醉，剪毛，常规消毒，无菌技术下两侧股部外侧各切口1cm，钝性分离股部肌肉成穴状，按（A）（B）（C）组植入不同移植物，40mg/部位，分层缝合切口，术后相同条件下分笼饲养。

1.4 标本收集和检测

^{3}H-TdR组术后2d、4d、8d、10d、14d、18d、22d、28d，^{45}Ca组术后8d、14d、18d、22d、28d、34d活杀动物。活杀前2h，^{3}H-TdR组按1μCi/g体重，逐鼠尾静脉注射^{3}H-TdR；^{45}Ca组每鼠按0.5μCi/g体重，于活杀前4h腹腔内注射$^{45}CaCl_2$。（^{3}H-TdR、$^{45}CaCl_2$均由中国原子能科学研究院同位素研究所提供）

动物活杀后立即解剖出标本，去除附着的软组织，滤纸吸干，称重后置有盖磨口试管内，加入70%过

* 国家自然科学基金资助项目

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

氯酸、30%过氧化氢，75℃水浴箱内恒温消化3h，呈无色澄清液体。取0.3ml消化液置闪烁杯内，加入闪烁液13ml，避光保存过夜。LKB-1217液体闪烁计数器测定，放射性强度按dpm/mg组织表示[1]。^{3}H-TdR、^{45}Ca两组均随机取5只作正常股四头肌的^{3}H-TdR、^{45}Ca掺入量测定。

1.5 统计学处理

^{3}H-TdR、^{45}Ca掺入计数值在电子计算机上用我校医用统计程序包PDA-1、PDA-2、PDA-3作（A）（B）（C）组^{3}H-TdR、^{45}Ca掺入计数的两两总体均数比较及显著性检验，以及掺入计数与观察时间的相关系数及显著性检验[2]。

2 结 果

^{3}H-TdR组3处感染，死亡2只不计入结果。正常股四头肌的^{3}H-TdR、^{45}Ca掺入计数见表1，（A）（B）（C）组^{3}H-TdR、^{45}Ca掺入计数见表2和图1、2。统计处理结果：（1）两两总体均数比较及显著性检验：（A）与（B）组，^{3}H-TdR的掺入计数差别不显著，$P>0.05$；^{45}Ca的掺入计数差别显著，

表1 正常股四头肌的^{3}H-TdR、^{45}Ca掺入计数结果

Tab. 1 The result of ^{3}H-TdR, ^{45}Ca incorporation count in normal quadriceps femoris

n	^{3}H-TdR(dpm/mg)	^{45}Ca (dpm/mg)
5	663±138	783±119

表2 ^{3}H-TdR、^{45}Ca掺入计数结果 (dpm/mg, $\bar{x}\pm s, n=4\sim5$)

Tab. 2 The result of ^{3}H-TdR, ^{45}Ca incorporation count (dpm/mg, $\bar{x}\pm s, n=4\sim5$)

		days								
		2	4	8	10	14	18	22	28	34
^{3}H-TdR	A	980.5 ±164	1012 ±302	1285 ±277	1401 ±242	1122 ±57	1286 ±126	1335 ±158	607 ±210	
	B	1164 ±17	1221 ±15	348 ±454	1517 ±362	1037 ±131	1396 ±63	1298 ±494	769 ±125	
	C	309 ±33	1108 ±12	1010 ±166	1168 ±13	1017 ±130	1384 ±59	892 ±69	561 ±16	
^{45}Ca	A			1952 ±260		2652 ±225	5323 ±280	8382 ±497	8872 ±274	14598 ±877
	B			2529 ±104		3141 ±201	11880 ±620	12235 ±483	18626 ±138	24020 ±125
	C			1224 ±71		867 ±98	1182 ±122	953 ±204	1011 ±130	1195 ±74

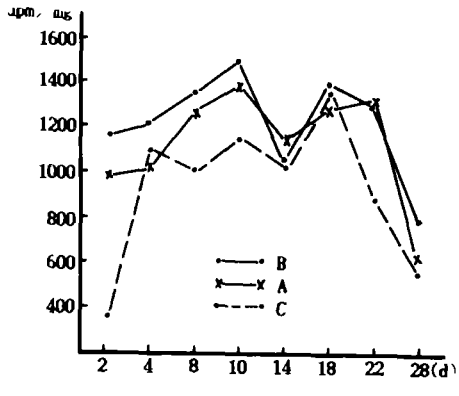


图1 ^{3}H-TdR掺入计数动态曲线

Fig. 1 The curve of ^{3}H-TdR incorporation count.

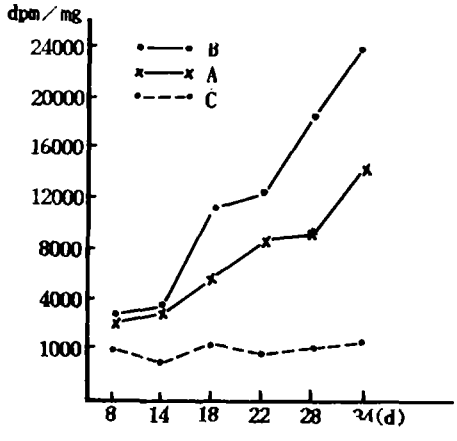


图2 ^{45}Ca掺入计数动态曲线

Fig. 2 The curve of ^{45}Ca incorporation count

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

$P<0.05$。（A）与（C）组，^{3}H-TdR的掺入计数差别显著，$P<0.05$；^{45}Ca的掺入计数差别非常显著，$P<0.001$）。（B）与（C）组，^{3}H-TdR、^{45}Ca的掺入计数差别均非常显著，$P<0.001$。（2）^{3}H-TdR、^{45}Ca掺入计数值与观察时间的相关系数及显著性检验：均为明显正相关，$P<0.001$。

3 讨　论

异种骨移植起始于1668年Van Meekere用犬颅骨修复俄国士兵颅骨缺损得到愈合。之后，未被世人重视。至19世纪末Ollier、Schmitt、Barth以及20世纪初Axhausen、Baschkirzew、Petrow相继报告异种植骨，但结果均不满意。直到1934年和1937年Orell先后报告脱有机质异种骨“Os Purum”、“Os Nooum”临床应用取得成功，此后的异种骨移植报告基本停留在以冰冻、或加入血液成分、或脱有机质的方式进行实验研究和应用。由于对用作移植的异种骨本身而言，不是没有消除抗原性，就是缺乏诱导成骨活性，因之结果亦不尽理想。自1965年Urist证实脱钙骨诱导成骨以来，异种植骨得到进一步研究。然而，采用异种脱钙骨基质加释放系统移植观察诱导成骨的报道颇少。

^{3}H-TdR、^{45}Ca示踪研究诱导成骨的报告较少，方法各异。连续性动态观察则更少，尤其异种诱导成骨用^{3}H-TdR示踪研究，国内未见报告。本实验表明：HDBM＋DS移植后10d内，（A）（B）两组的^{3}H-TdR计数曲线呈上升趋势，10d达高峰。这是由于位于HDBM周围间质细胞受到诱导活性成分骨形态发生蛋白（Bone Morphogetic Protein, BMP）作用，迅速向骨系细胞转化，需要大量的核酸合成原料之故。^{3}H-TdR是细胞核脱氧核糖核酸（DNA）的1个特异前体，静脉注射后的1 min～20min内在DNA合成期特异地掺入DNA，结合后很稳定且不可交换[3]-[5]。所以，^{3}H-TdR计数的多少反映了细胞的发育、增殖、分化的活跃程度。本实验（C）组^{3}H-TdR10d内的计数曲线明显低于（A）（B）组，且呈波波浪状，表明（C）组HDBM中诱导活性物质的作用不及（A）（B）组。在同是HDBM的前提下，出现如此差异，表明DS有促进BMP释放或加强BMP活性的作用。随着间质细胞分裂减少，^{3}H-TdR计数急剧下降。第14d始回升，18d时出现第二高峰，之后又下降。从形态学的角度解释，计数曲线回升期为新骨骨髓形成期，^{3}H-TdR是伴随骨髓细胞的大量生成而增加。史增敦[6]在研究骨基质诱导异位骨形成时证实异位诱导骨的骨髓细胞最早出现在植入基质后的第14d～15d，本实验与史氏结果相符。植入HDBM＋DS后8 d、14d，^{45}Ca掺入计数值很低且增加不明显。第14天后，（A）（B）两组的计数曲线随时间的增加而上升，（C）组则基本保持在低计数的水平线上。这一现象表明（A）（B）两组的成骨量明显地大于（C）组。（A）（B）（C）组的^{3}H-TdR、^{45}Ca掺入计数均明显地高于股四头肌。本文结果表明：^{3}H-TdR示踪测定对于反映HDBM＋DS诱导成骨早期细胞增殖、分化，后期骨髓细胞形成是灵敏的；^{45}Ca之dpm值测定能可靠地反映HDBM＋DS诱导成骨过程中钙盐的沉积和多少。

从^{3}H-TdR、^{45}Ca计数曲线可见（A）（B）组均高于（C）组，总体均数比较及显著性检验表明：（A）（B）组与（C）组间差别均显著，说明DS对HDBM的诱导成骨能力有重要的促进作用。（A）（B）组间从计数曲线看，（B）优于（A），统计学处理结果^{3}H-TdR无差别，^{45}Ca差别显著，说明$CaSO_4$或$CaCl_2+Na_2HPO_4+KH_2PO_4$均是HDBM诱导成骨的良好促进剂，但前者比后者更佳。^{3}H-TdR计数曲线在HDBM＋DS移植后10d内随时间上升幅度较小，提示HDBM＋DS早期诱导骨形成是一个渐进过程。此外，示踪剂的掺入计数与诱导成骨时间为密切正相关，反映了HDBM＋DS诱导新骨形成呈不断完善的趋势。

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

参 考 文 献

1. Reddi AH and Huggins C. Formation of bone marrow in fibroblast-transformation ossicles. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72:2212
2. 苑锡光。以电子计算机为工具的医用统计分析。成都：四川科学技术出版社出版，1985:80～104
3. Tonna EA and Cronkite EP. Autoradiographic studies of cell proliferation in the periosteum of intact and fractured femora of mice utilizing DNA labelling with ^{3}H-TdR. Proc Soc Exp Biol Med 1961; 107:719
4. Tonna EA. The cellular complement of the skeletal system studied autoradiographically with tritiated thymidine (^{3}H-TdR) during growth and aging. J Biophysical and Biochemical Cytology 1961; 9:813
5. Ray RD and Sabet TY. Bone graft: cellular survival versus induction. An experimental study in mice. J Bone Joint Surg (Am) 1963; 45:337
6. 史增敦 莫东旭。骨基质诱导异位骨形成实验模型的组织学和组织化学研究。中华骨科杂志 1987; 6:462

(收稿：1990.03.29；修回：1990.12.25)

A Study on the Osteogenesis Induced by Heterogenous Decalcified Bone Matrix and Delivery System with ^{3}H-TdR and ^{45}Ca Tracing in Rats

Ke Xinhua, Lin Guide, and Wang Mingang (Department of Orthopedics, Daping Hospital, Third Military Medical College, Chongqing 630042)

Abstract one hundred and five Wistar rats were randomized into 3 groups and heterogenous decalcified bone matrix (HDBM) + $CaCl_2$ + Na_2HPO_4 + KH_2PO_4, HDBM + $CaSO_4$ + Na_2HPO_4 + KH_2PO_4, and HDBM + NaCl were implanted into the quadriceps muscle of both thighs of the animals respectively. They were monitored with ^{3}H-TdR and ^{45}Ca tracing to evaluate the efficacy of the 3 delivery systems to enhance osteogenesis. It was found that coadministration of $CaSo_4$, Na_2HPO_4, and KH_2PO_4 could significantly enhance the osteogenesis induced by HDBM. It is concluded that HDBM and the coadministration of Na_2HPO_4, KH_2PO_4, and $CaSO_4/CaCl_2$ together will be much more effective to induce osteogenesis than HDBM is used singly.

Key words heterogeneous decalcified bone matrix; delivery system; osteogenesis induction

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