DOI:10.16016/j.1000-5404.1984.04.001

同种脱钙骨粉和骨块移植的实验观察

陈受谦 刘长江 黄旭东 林贵德 高奉浔*

（第三附属医院 骨科）

张大春 钱昶文 黄明德 李德琼

（野战外科研究所 病理学组）

张序芳

（野战外科研究所 放射学组）

李叶君 吴志峰 杨志发

（野战外科研究所 第三研究室）

提 要

为证实不同形式的脱钙骨基质（DBM）及未脱钙骨的成骨作用进行了本实验。我们采用家兔39只，分为四组：（1）脱钙骨粉组；（2）脱钙骨块组；（3）未脱钙组；（4）空白组。将兔尺骨干造成1cm缺损后植入上述不同DBM及未脱钙骨，定期行X线及组织学观察。实验结果显示两种形式的DBM，在第8—10周标本的骨愈合率为70—80%，二者无明显差别。但未脱钙骨组在第8—10周标本只有部份连接。空白组在第10周无骨连接。以上结果表明DBM的成骨效应较未脱钙骨为优。骨粉制备简单，使用保存方便，可塑性强，作为骨移植材料填充骨腔是可行的。

自Senn（1889年）始用脱钙骨基质（简称DBM—Decalcified bone matrix）移植以来已将百年。近30年来，国外不少实验研究均认为DBM有较强的诱导成骨作用。自1965年Urist[1]用0.6N HCl脱钙骨移植于大鼠及家兔软组织中，也能引起异位成骨。有的学者对不同形式的DBM（骨块、骨粉等）的成骨效应及其特性进行了探讨[2][3]，国内也有报道[4][5]。为进一步证实其疗效，我们作了动物实验，报道如下：

实 验 方 法

一、动物分组：采用体重为2.5—3kg成年家兔39只，随机分为：（1）脱钙骨粉组（以下简称骨粉组）；（2）脱钙骨块组（以下简称骨块组），两组共25只兔。每兔均于左前肢用骨粉移植，右前肢用骨块移植，每组均为25个标本；（3）未脱钙骨块组10只兔，左、右前肢行骨移植，共20个标本。以上各组均于第2、4、6、8、10周进行X线摄片及组织学观察；（4）空白组4只兔4个标本，在第2、4、8、10周进行X线摄片观察。

二、手术方法：在戊巴比妥钠静脉麻醉下，切除尺骨干中1/3一段及其骨膜，造成1cm长的缺损，分别植入：（1）将骨粉0.25g用林格氏液调成糊状，填于缺损部；（2）

* 临床病理科

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

用相应大小一段骨块嵌入缺损部；（3）用相应大小未脱钙骨块嵌入缺损部；（4）空白组不植入任何材料。

三、移植材料的制备：

(1) 骨粉：兔的四肢管状骨，切成0.3cm碎块，用蒸馏水冲洗除去骨髓，然后用无水酒精及乙醚脱脂、脱水干燥后磨成粉末，用孔径为60目细筛过筛（骨粉颗粒约为200μm左右）。再用0.6N HCl脱钙(室温26小时)，蒸馏水冲洗，并测定其pH值为7.1左右。再用无水酒精及乙醚脱水后，用三层塑料袋密封包装，并用200万伦琴^{60}Co照射，经三次细菌培养证明无菌生长，置于干燥皿中，常温下保存备用。经微量分析脱钙率为94%。

(2) 骨块的制备：取兔管状骨，剔除软组织用蒸馏水冲洗除去骨髓，再用0.6N HCl脱钙（室温下72小时），然后用蒸馏水冲洗后置于75%酒精浸泡，经三次培养无菌生长，密封置于4℃冰箱中储存备用。

(3) 未脱钙骨块的处置：在无菌操作下取兔四肢管状骨，剔除软组织，除去骨髓，用75%酒精浸泡，经三次培养无菌生长，置于冰箱中备用。

四、观察方法：

(1) X线摄片检查：各组按规定时间摄片。未脱钙骨块组及空白组的成骨效应行常规观察。骨粉组及骨块组成骨效应的判定按新骨形成量与宿主骨连接情况分为0—Ⅴ级：

0级—无新骨形成。

Ⅰ级—骨断端有少许锚状骨痂或缺损部有少许纤细的斑点状新骨形成。

Ⅱ级—有较多的锚状骨痂或缺损部有较明显的斑点或片状新骨形成。

Ⅲ级—缺损部已基本上为形状不规则、密度不均的新生骨影填充或缺损部的一侧有骨桥形成。

Ⅳ级—缺损部已完全为较均匀的新骨填充且与宿主骨相连接，其密度与正常骨基本一致。

Ⅴ级—新生骨与宿主骨完全融合并有塑形。

(2) 组织学检查：按规定时限定期活杀取标本矢状切片，行镜下观察。

实验结果

一、动物一般情况：术后动物无死亡，2只兔两个肢体发生桡骨近端骨折、尺骨移位（未计算在统计数字内）。除1例1侧肢体伤口有血肿行清除术外，其它各例伤口均一期愈合。

二、X线检查结果：

(1) 骨粉及骨块组不同时期成骨效应的结果(见表)。从表中显示，骨粉与骨块成骨效应经统计学处理无明显差异（$P>0.05$）。第10周骨粉组的骨愈合率（Ⅳ—Ⅴ级）为70%；骨块组为80%。

表 骨粉与骨块不同时期成骨情况分析表

	骨粉				骨块			
	0—Ⅰ	Ⅰ—Ⅲ	Ⅳ—Ⅴ	小计	0—Ⅰ	Ⅰ—Ⅲ	Ⅳ—Ⅴ	小计
第2周	16(64%)	9(36%)	0	25	19(76%)	6(24%)	0	25
第4周	2(10%)	18(90%)	0	20	3(15%)	17(85%)	0	20
第6周	0	12(80%)	3(20%)	15	0	13(86.6%)	2(13.4%)	15
第8周	0	4(40%)	6(60%)	10	0	5(50%)	5(50%)	10
第10周	0	3(30%)	7(70%)	10	0	2(20%)	8(80%)	10
合计	18	46	16	80	22	43	15	80

注：括号内数字为不同时期成骨情况的百分率

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

（2）未脱钙骨块组：第2—4周移植骨块清晰可见，只有少许骨痂形成。第6—8周骨块部分吸收，新骨的量较以前有所增加；8个标本中有3个与宿主骨部分连接；第8—10周骨块有少量残留，6个标本中有4个标本部分连接。

（3）空白组4个标本在第10周依然存在缺损。

三、组织学观察：

(1) 骨粉组：第2周标本有大量新生骨小梁及软骨形成；第4周新生骨小梁及软骨已将缺损大部分填充，骨粉颗粒基本消失，未见异物反应。第8—10周缺损部已为粗大排列而又不规则的成熟骨小梁完全填充，并与宿主骨连接。

（2）骨块组：第2周在移植骨块两端及其周围有明显的骨小梁及软骨结构形成，并有新生血管及纤维细胞向骨块内生长，未见异物反应。第4周骨块大部分吸收为大量新生骨代替，第8—10周基本上与骨粉组相似，与宿主骨完全连接。

（3）未脱钙骨组：第4周绝大部分移植骨块未被吸收，周围有明显炎性反应，只有少量新骨。第8—10周仍有少许残存移植骨片，在两断端间有部分新骨连接，断端间连接部仍有较多软骨和纤维组织。

讨　论

一、DBM的成骨效应较未脱钙骨为优，已为国内外学者证实[1][2][4][6][7]。本实验结果显示，骨粉组及骨块组的成骨效应无明显差异，但均明显优于未脱钙骨组。DBM虽经研磨、脱水、脱脂及辐射等处理，其成骨活性并未受到明显影响。未脱钙骨组在早期镜下可见明显炎性反应，而DBM组则无此反应，说明后者无明显免疫反应，而前者有抗原性存在。以上结果与Urist[1]、Nade[8]、Tuli[9]、及张光铂[4]等报告相似。从本实验的结果可以看出，DBM无论骨粉或骨块都是一种良好的诱导成骨物质。该物质移植后很快被吸收并为新生骨替代，使宿主间质细胞分化为骨母细胞，形成新骨。未脱钙骨则需长时间才能被吸收和替代[1][7]。近年来国外一些研究[3][10][11]，认为DBM中含有成骨蛋白(Bone Morphogenetic Protein—BMP)，已从动物和人的骨肉瘤中提取，并证实有成骨效应。BMP是低分子糖蛋白，没有种属特异性，由小牛骨中提取的BMP可用于修复鼠的颅骨缺损[11]。

二、Glowacki及Mullicken等[2][7]用骨粉及骨块修复颌面部骨缺损及动物实验均表明骨粉表面面积大，易于诱导成骨。Urist等[3][12][13]的研究认为蛋白变性剂、温度、放射线照射、酶及机械能等理化因素，都会影响BMP的成骨活性。骨粉颗粒在150—250μm成骨效应不受影响，如骨粉颗粒小于44—75μm，由于过度研磨产生的机械能，可破坏BMP的成骨活性[3]，不能成骨。本实验的骨粉颗粒为150--250μm，虽经大剂量射线照射，不仅消毒可靠也不影响其成骨活性。X线片上表现骨粉组形成新骨密度不均，其原因可能是个别标本只填充了缺损部的4/5，髓腔出血，引起一部分骨粉被冲散，以及兔的个体较大，缺损部植入量不够等因素有关。

三、从DBM临床应用的展望看，国外虽有用DBM修复颌面部、口腔、颅骨缺损以及脊柱融合术等报道，但未见有用于修复长骨缺损的。可能因其骨质软无支撑作用及固定作用；干冻脱钙骨的制备，需要一定条件和设备，且骨质松脆无支撑作用之故。然而应用骨粉填充骨腔及骨的缺损部位仍是可行的。其主要优点是制备简单，可塑性强，使用方便，易于保存。本实验用骨粉在室温下已保存3、4个月，并未影响其成骨活性。至于长期保存有否影响，尚待进一步实验观察。有些学者认为DBM及BMP无种属特异性，用异种骨制备，可扩大骨源供应，但尚待进一步证实。

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

参 考 文 献

1. Uritst MR, et al: Bone formation by autoinduction. Science 1965;150:893

2. Glowacki J, et al: Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defect. Lancet 1981, May 2, p.959—962

3. Syftested G, et al: Degradation of matrix morphogenetic activity by pulverization. Clin Orthop 1972; 141:281

4. 张光铂等：骨移植的实验研究。中国医学科学院学报 1981; 3卷，增刊(1):1

5. 曾昭荣等：脱钙骨植入修复兔桡骨缺损的动物实验。脊柱疾患及骨科基础理论专题学术会议论文摘要汇编1982; p.124

6. Burwell RG, et al: Studies in the transplantation of bone. J Bone Joint Surg 1963; 59B:597

7. Mulliken JB, et al: Induced osteogenesis for repair and reconstruction in the craniofacial region. Plast Reconstr Surg 1980; 65:553

8. Nade S, et al; Decalcified bone as a substrate for osteogenesis. J Bone Joint Surg 1977; 59B:189

9. Tuli SM, et al: Bridging of large chronic osteoperiosteal gaps by allogenic decalcified bone matrix implants in rabbits. Trauma 1981; 21:894

10. Hanamura H, et al: Solubilization and purification of BMP from Dunn osteosarcoma. Clin Orthop 1980; 153:232

11. Takagi K, et al: The reaction of dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defect. Ann Surg 1982; 196:100—108

12. Urist MR, et al: Transmendrane bone morphogenesis across multiple-walled diffusion chambers. Arch Surg 1977; 112: 612

13. Urist MR, et al: A bovine low molecular weight bone morphogenetic(BMP) fraction. Clin Orthop 1982; 162:219

Experimental Observation on Osteogenetic Effect of Allogenic Decalcified Bone Matrix

Chen Shouqian, et al

(Third Teaching Hospital, The Third Military Medical College)

This experiment was designed to evaluate the osteogenetic effects of different forms of allogenic decalcified bone matrix(DBM). Thirty-nine rabbits were exployed and a bony defect of 1cm in length was made on the shaft of the ulnas of these animals. 39 rabbits were divided into 4 groups. In the first group, the bony defects were filled with allogenic decalcified bone powder; in the second group, with decalcified bone block; in the third group, with undecalcified bone

(下转337页)

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

Isolation of Ribosomal Subunit 50S from Proteus Vulgaris by Sepharose CL—2B Column

Chang Tinglu, Du Fonvan

(Department of Chemistry, The Third Military Medical College)

With a favorable result, we applied Sepharose CL-2B column to the isolation of ribosomal subunit, 50S, from P. Vulgaris cells. This report presents a simple and useful method for preparative separation of subunit species.

Ribosomal preparation 225mg (wet wt.) was loaded on Sepharose CL-2B column (inner diameter 20 mm, gel column height 46 cm) which had been previously equilibrated with pH 7.5 Tris-buffer containing Mg^{2+} 0.001M and KCl 0.1M. The column was developed with the same buffer. Elution was carried out with a flow rate of 12 ml/h. The adsorbance of the eluate was measured at 258nm. Two peaks were obtained in elution development. The result was checked up to be identical with that observed in ultracentrifuge analysis.

According to the proteins contained, the percent recovery of subunit species was 91% in approximate estimation.

(上接322页)

block; and in the fourth group, nothing was filled into the bony defects. Roentgenological and histological observations were made regularly.

It was found that after 8—10 weeks, 70—80% of the specimens filled with DBM showed firm union between the host bone and the graft material and no difference could be found between the two forms of DBM, incomplete union occurred in the third group and non-union in the fourth group. It is clear that the osteogenetic effect of DBM is better than undecalcified bone. It is suggested that decalcified bone powder be used as a graft material to fill bony defects or cavities because it is easily prepared and used, has good plastisity, and can be stored in room temperatmre.

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

同种脱钙骨粉和骨块移植的实验观察（正文见第319页）

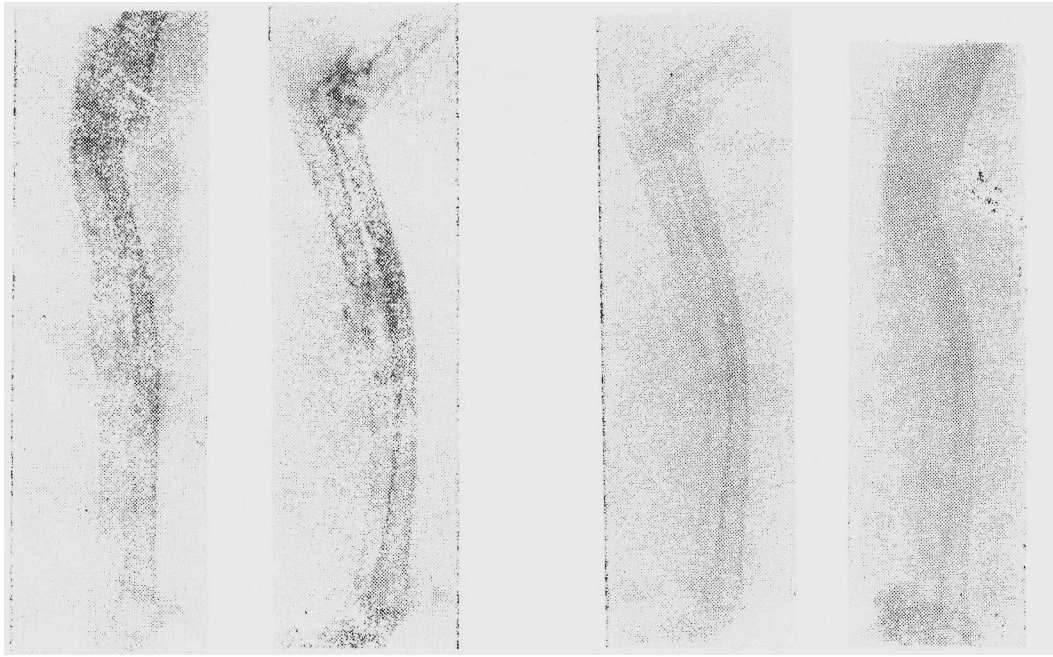


移植后第2周　　移植后第10周

图1　骨粉组移植后2、10周X线片

移植后第2周　　移植后第10周

图2　骨块组移植后2、10周X线片



移植后第2周　　移植后第10周

图3　未脱钙骨块组移植后2、10周X线片

术后第2周　　术后第10周

图4　空白组术后2、10周X线片

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

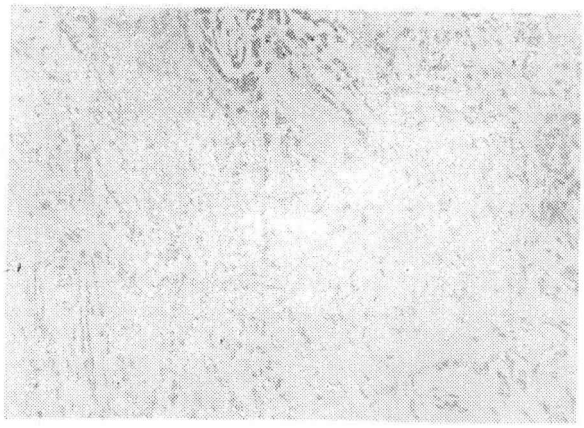


图 5　骨粉移植后 2 周，大量骨小梁形成，结构粗大排列零乱，在新生骨组织尚有软骨组织。　H.E×163



图 6　骨块移植后 2 周，骨块已为长入之血管和纤维细胞侵蚀，周边有明显新骨形成。　H.E×34

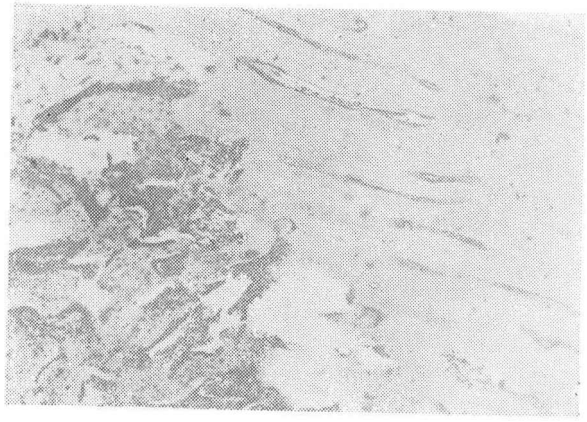


图 7　脱钙骨移植后 4 周，移植骨块未被吸收，仅在周边有少量新骨形成。　H.E×64

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