

## • 基础研究 •

## 骨库骨的抗原性比较研究

王金成 陈伟 刘光耀 高忠礼 段德生 袁绍辉 张远鹰

(吉林大学中日联谊医院, 吉林 长春 130031)

**【摘要】** 目的 研究冷冻、冻干、脱钙同种异体骨和无机骨等骨库骨的抗原性。方法 应用皮肤移植对比分析法, 将骨库骨分为 5 组, 每组 10 例, 与皮肤移植结果相比较, 测定其抗原性。结果 新鲜同种骨移植组平均皮肤脱落时间为  $8.7 \pm 1.1$  天, 与对照组相比显著延长 ( $P < 0.05$ )。冷冻同种骨、冻干同种骨、脱钙同种骨和无机同种骨移植组平均皮肤脱落时间分别为  $10.8 \pm 1.0$ 、 $10.7 \pm 1.4$ 、 $11.7 \pm 0.7$  和  $13.8 \pm 1.5$  天, 与新鲜骨相比延长, 具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 经上述处理后骨的抗原性降低, 但除无机骨外, 均不及一次移植皮肤的  $13.9 \pm 1.1$  天 ( $P < 0.05$ )。无机骨不具有抗原性。无机骨的无抗原性是其作为载体的先决条件。

**【关键词】** 骨移植 移植免疫学 皮肤移植

**Comparative study on antigenicity of stored bone** WANG Jincheng, CHEN Wei, LIU Guangyao, et al. *China Japan Union Hospital of Jilin University (Jilin Changchun, 130031)*

**【Abstract】 Objective** To study the antigenicity of frozen, freeze dried, decalcified and inorganic homograft bones. **Methods** In the experiment, the average scaling time of skin of mice was used as the index to compare antigenicity of different kinds of stored bone after they were grafted. The mice were divided into 5 groups of 10 each: fresh homograft bone group (group I), frozen homograft bone group (group II), freeze dried homograft bone group (group III), decalcified homograft bone group (group IV) and inorganic homograft bone group (group V). Skin graft group served as control group. **Results** The average scaling time of skin in group I was  $8.7 \pm 1.1$  days, which was much longer than that of control group ( $P < 0.05$ ). The average scaling times of skin in group II, III, IV and V were  $10.8 \pm 1.0$ ,  $10.7 \pm 1.4$ ,  $11.7 \pm 0.7$  and  $13.8 \pm 1.5$  days, which were much longer than that of group I ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The results showed that the antigenicity of stored bones decreased after they were handled by above methods. But the antigenicity of stored bones were not better than that of grafted skin except inorganic homograft bones. The inorganic homograft bone has no antigenicity and is suitable to be used as carrier.

**【Key Words】** Bone transplantation Transplantation immunology Skin transplantation

骨移植是除输血外人类最常见的组织移植, 当前骨移植手术应用最多的还是同种异体骨移植。通常所说的骨库骨包括有冷冻、冻干和脱钙同种异体骨。随着研究的深入, 骨库骨将增加新的成分, 诸如无机骨、无机骨骨髓复合物、组织工程骨等。从同种的某个个体(供者)向其他个体(受者)移植的皮肤, 通常 11~15 天脱落 (first set skin rejection)。此后再一次从相同个体移植皮肤, 这个皮肤到脱落的天数缩短至 7~8 天, 这种加速排斥反应称为再次排斥反应 (second set rejection)。这是获得性免疫的主要特征之一, 是免疫回忆反应的结果。骨和皮肤有相同的组织相容性抗原。利用此原理, 能够比较各种组织的抗原性。我们使用两种近交系小鼠, 根据移植各种同种处理骨(冷冻、冻干、脱钙骨、脱蛋白骨即无机骨等)后的皮肤脱落时间研究其抗原性, 我们称之为皮肤移植对比分析法。

## 1 材料和方法

**1.1 实验动物和分组** 采用健康雄性两种近交系小鼠

(BALB/C 小鼠为供者, C57 小鼠为受者), 由白求恩医科大学实验动物部提供, 体重  $20 \pm 2$ g。对照组为二次皮肤移植组; 实验组为新鲜同种骨、冷冻同种骨、冻干同种骨、脱钙同种骨和无机同种骨(5 组)。随机分组, 各组均为 10 只小鼠。

**1.2 实验材料** 取 BALB/C 小鼠股骨, 电锯切成 2cm 长骨段。

**1.2.1 新鲜骨的制备** 无菌操作, 尽量去除附着的骨膜和韧带以及骨髓, 用含有庆大霉素的生理盐水洗净后立即植入。

**1.2.2 冷冻骨的制备** 将上述新鲜骨用灭菌硫酸纸包装后, 无菌塑料三重包装,  $-80^{\circ}\text{C}$  低温冰箱保存。放置于  $40^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$  庆大霉素生理盐水溶液中解冻 1 小时后使用。

**1.2.3 冻干骨的制备** 将上述新鲜骨块置于氯仿和乙醇 (1:1) 混合液中脱脂, 冻干机中真空冷冻干燥。装入灭菌塑料袋中真空密封,  $\gamma$  射线 (25MRD) 照射消毒, 室温保存。

**1.2.4 脱钙骨的制备** 将上述新鲜骨用三蒸馏水 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 洗净, 氯仿:乙醇 (1:1) 液脱脂 (室温, 4h), 0.6N HCl 脱钙 24h

(4℃)。氯仿-乙醇液再处理(室温, 4h), 0.1% 磷酸缓冲液 (pH7.4) 中和(37℃, 72h)。抗生素浸泡处理, 冻干, 灭菌。

1.2.5 脱蛋白骨(无机骨)的制备 用 0.25mmol 的 NaOH 浸泡 48h, 蒸馏水冲洗后, 用 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浸泡 24h, 再次蒸馏水冲洗, 丙酮浸泡 2h 冲洗, 置于无水乙醇中浸泡备用。

1.3 实验方法 将上述骨材料植入 C57 小鼠背部肌肉中, 3 周后, 取 BALB/C 小鼠背部皮肤移植于 C57 小鼠对侧背部。其中对照组第一次为皮肤移植。

1.4 统计学处理 采用 t 检验。

## 2 结果

2.1 对照组 初次皮肤移植 1 周后, 皮片由红变紫, 但无表皮脱落和再生。至平均第 13.9 ± 1.1 天表皮完全破坏、脱落, 露出真皮。再次移植同系供体的皮片时, 平均第 7.0 ± 1.0 天脱落。

2.2 实验组 新鲜同种骨移植组平均皮肤脱落时间为 8.7 ± 1.1 天, 与对照相比显著延长 (P < 0.05)。冷冻同种骨、冻干同种骨、脱钙同种骨和无机同种骨移植组平均皮肤脱落时间分别为 10.8 ± 1.0, 10.7 ± 1.4, 11.7 ± 0.7 和 13.8 ± 1.5 天, 与新鲜骨相比延长具有统计学意义 (P < 0.05)。这说明经上述处理后骨的抗原性降低。但除无机骨外, 均不及一次移植皮肤的 13.9 ± 1.1 天 (P < 0.05)。

## 3 讨论

许多方法证实同种骨主要的抗原成分为由主要组织相容性复合物(MHC)决定的细胞表面糖蛋白抗原, 存在于骨髓细胞、成骨细胞和骨细胞等的细胞表面。骨中除含有多种细胞外, 尚含有矿物质、胶原和基质, 其中胶原和基质也具有一定的抗原性, 而矿物质则无抗原性。

新鲜同种骨移植组平均皮肤脱落时间与对照相比显著延长 (P < 0.05)。这说明骨与皮肤相比较确实抗原性减弱。临床上, 同种骨移植也很少引起移植骨完全被拒绝的免疫反应。这是因为骨的细胞密度低, 含 MHC 抗原的细胞密度也相对低的缘故。

冷冻、冻干、脱钙同种骨移植组平均皮肤脱落时间与新鲜骨相比延长具有统计学意义 (P < 0.05), 但不及一次移植皮肤脱落时间 (P < 0.05)。这说明经上述处理后, 抗原性降低, 但抗原去除得不彻底。同种骨经冷冻处理后, 可使细胞死亡、细胞表面的抗原发生变化, 受者 T 细胞是通过间接途径致敏的, 从而引起慢性排斥反应或产生免疫耐受, 延长了移植骨的

存活时间<sup>[1]</sup>。相对冷冻骨而言, 冻干骨的抗原性更弱。其原因有: 冻干后移植骨中细胞数量减少; 糖蛋白抗原因冻干而黏附于细胞表面时发生变化, 特异性抗体不再与其反应; 细胞膜的物理变化也改变了表面抗原的表达<sup>[2]</sup>。脱钙骨则由于细胞成分破坏, 保留基质成分, 因而抗原性进一步降低。

无机骨移植与一次移植皮肤脱落时间无显著差异, 这说明无机骨抗原完全去除, 仅保留有无抗原性的矿物质成分。罗卓荆等<sup>[3]</sup>证实这种去抗原骨植入 BALB/C 小鼠体内后不引起明显的细胞免疫反应, 特异性血清抗体水平也较低, 组织学观察未见免疫排斥征象, 表现出良好的组织相容性。

移植骨特异免疫反应造成移植骨再血管化以及重建减少。临床上新鲜同种骨移植, 存在较高的骨不愈合率和骨折率。冷冻、冻干、脱钙等库存同种骨因抗原性降低而移植成功率明显提高, 为 80% ~ 90%。

移植骨特异免疫反应的程度和骨诱导甚至传导能力相关, 可以说如降低抗原性则升高(或不降低)骨诱导能力。骨诱导是由移植骨内的骨形态发生蛋白(BMP)引起的, 当然被免疫反应等机制所阻碍。而且, 移植骨被包裹, 血管不能进入, 骨传导也受阻而延迟。所以与新鲜同种骨相比, 经若干处理后降低抗原性的库存同种骨骨诱导和传导能力较好(除无机骨, 因其完全脱蛋白而可能丧失骨诱导能力)。

骨髓或骨髓间质细胞复合于载体上可明显增加其成骨能力。无机骨是同种或异种天然骨经过若干处理后, 完全脱蛋白的一种移植材料。它具备骨的天然结构, 主要成分为羟基磷灰石。由于牛骨与人骨结构和成分的相似性, 这种材料将极易获得, 制备过程简单, 价格便宜。本实验表明: 其不具有抗原性。无机骨的无抗原性是其作为载体的先决条件<sup>[4]</sup>。

### 参考文献

- [1] Muscolo DL, Ayerza MA, Cakabrese ME, et al. Human leukocyte antigen matching, radiographic score, and histologic findings in massive frozen bone allografts. *Clin Orthop*, 1996, 326: 115-126.
- [2] Enneking WF, Mindell ER. Observations on massive retrieved human allografts. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1991, 73(8): 1123-1156.
- [3] 罗卓荆, 胡蕴玉, 王茜, 等. 去抗原异种松质骨移植的免疫反应研究. *中华外科杂志*, 1997, 35(11): 690-693.
- [4] 高中礼, 王金成, 陈伟, 等. 异种骨复合自体骨髓修复骨缺损的实验研究. *中国老年学杂志*, 1999, 19(5): 285-286.

(收稿: 2000-07-06 修回: 2000-12-25 编辑: 李为农)

## 更正

由于我们编校失误, 错将本杂志第五期“重组转化生长因子β复合同种异体骨移植修复骨缺损的实验研究”与“醒髓汤抑制脊髓继发性损伤的实验研究”两文的关键词写颠倒, 正确应为前文的关键词是: 骨移植 骨缺损 转化生长因子β, 相应的英文是: Bone grafting Bone defect Transforming growth factor β; 后文的关键词为: 脊柱损伤 中药疗法 受体, 氨基酸 神经毒素类, 相应的英文: Spinal injury Chinese medicine treatment Recipient, amino acid Neurotoxins。在此更正, 并向读者表示歉意。

本刊编辑部