

· 基础研究 ·

复合型完全脱蛋白骨的细胞相容性研究

李彦林¹ 杨志明² 韩睿¹ 李世和¹ 曾才铭¹

(1. 昆明医学院第一附属医院骨科, 云南 昆明 650032; 2. 华西医科大学附一院骨科, 四川 成都)

【摘要】 目的 探讨复合型完全脱蛋白骨的细胞相容性。方法 将猪肋骨用理化方法制得复合型完全脱蛋白骨(CFDB), 对 CFDB 理化性能进行检测, 又将其与人胎骨膜成骨细胞体外复合培养, 以了解其细胞相容性及细胞毒性。结果 CFDB 的主要成份为羟基磷灰石, 蛋白质含量几乎为零, 仍具有原骨组织骨盐支架的三维多孔网状孔隙结构系统, 对复合培养的人胎骨膜成骨细胞的形态特征、ALP 活性、细胞周期、倍体水平无有害影响。结论 CFDB 具有原骨组织的网状孔隙结构系统, 具有良好的细胞相容性, 可望用于成骨细胞的支架材料。

【关键词】 成骨细胞; 细胞培养; 复合型完全脱蛋白骨

Cellular compatibility study of composite fully deproteinised bone LI Yan-lin, YANG Zhi-ming, HAN Rui, et al. The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College (Yunnan Kunming, 650032)

【Abstract】 Objective To study the cellular compatibility of composite fully deproteinised bone(CFDB) **Methods** CFDB was processed by physical and chemical methods with pig ribs and its properties were examined, Then its cellular compatibility and cytotoxicity were examined by osteoblasts culture in vitro. **Results** The main ingredients of CFDB was hydroxyapatite; it hardly had any protein, and it had natural pore system which possessed pore network system of original bone. It has no bad affect on cell feature, alkaline phosphatase activity and cell cycle of human embryonic periosteal-derived osteoblasts composited with CFDB. **Conclusion** CFDB possessed original bone natural pore system and well cellular compatibility, and it could be used as scaffolds of osteoblasts.

【Key Words】 Osteoblast; Cell culture; Composite fully deproteinised bone

体外细胞培养法是研究骨移植材料生物相容性有用的方法之一, 而且材料与细胞体外复合培养可直接观察细胞与生物材料复合生长的情况, 利于了解细胞与材料相互作用的生物学反应, 有助于组织工程支架材料的挑选。故本研究采用人胎骨膜成骨细胞与复合型完全脱蛋白骨(CFDB)材料体外复合培养, 以了解材料对人胎骨膜成骨细胞的形态特征、ALP 活性、细胞周期、倍体水平等方面的影响, 以便寻找适合人胎骨膜成骨细胞粘附、生长、增殖和功能发挥的支架材料, 进而达到修复骨缺损的目的。

1 材料与方法

1.1 复合型完全脱蛋白骨的制备 取新鲜猪肋骨, 去除其上所附软组织, 初粉碎为 1cm^3 大小, 蒸馏水反复冲洗干净后置于 30% 过氧化氢中 48 小时(24 小时换液一次), 蒸馏水浸洗后于氯仿·甲醇(3:1)中脱脂 4 小时, 用乙二胺于 Soxhlet 提取器中循环提取蛋白质 24 小时, 蒸馏水浸洗后于乙醇中 24 小时, 再经蒸馏水浸洗干净后风干制得完全脱蛋白骨(fully deproteinised bone, FDB)。室温下将 FDB 浸入 4% 的聚-DL-乳酸(poly-DL-lactic acid, PLLA)丙酮溶液中, 于超声振荡器中

振荡脱气, 使材料孔隙内充分浸透 PLLA 溶液, 室温下用乙醇浸泡 24 小时除去丙酮, 风干后让 PLLA 膜粘附于 CFDB 网孔的表面以制得复合型完全脱蛋白骨(composite fully deproteinised bone, CFDB)(图 1)。

1.2 复合型完全脱蛋白骨的性能检测

1.2.1 扫描电镜(SEM)观察 将 CFDB 材料用 X-650 型扫描电子显微分析仪进行形貌观察, 并用 CA6300 型图像处理分析系统对其孔径大小和孔隙率进行测定。

1.2.2 X 射线衍射分析(XRD) 用日本 D/Max-III 型 X 射线衍射分析仪对制得的 CFDB 材料行 X 射线衍射物相分析。

1.2.3 蛋白质含量测定 用微量凯氏定氮法^[1]测定 CFDB 材料中蛋白质含量。

1.3 复合型完全脱蛋白骨的细胞相容性

1.3.1 CFDB 材料的准备 将制得的 CFDB 制成 $5\text{mm} \times 5\text{mm} \times 5\text{mm}$ 大小的块状物共 100 块及 1mm 厚的片状物 20 块经环氧乙烷消毒后备用。

1.3.2 骨膜成骨细胞的培养 无菌条件下取胎儿双侧骨骨膜用 Hanks 液洗涤 3 次, 将骨膜剪成 $1.0\text{mm} \times 1.0\text{mm}$ 大小, 0.25% 胰蛋白酶 37°C 环境中消化 30 分钟, 去上清液, Hanks

液洗涤 3 次,再于 0.1% 胶原酶 37℃ 环境中消化 2 小时,终止消化后过滤去除碎块,滤液离心 6 分钟 1200 转/分,弃上清液,用 Hanks 液及培养液各洗一次,再用培养液(由 F₁₂ 培养基加 10% 新生小牛血清,青、链霉素各 100U/ml 组成)悬浮细胞并接种于培养瓶中,于 37℃ 恒温、5% CO₂ 浓度、饱和湿度的细胞培养箱中培养,每 2~3 天换液一次,待细胞融合成单层后按 1:2 进行传代培养,至第三代细胞融合成单层后终止培养,经鉴定后将细胞收集备用。

1.3.3 倒置相差显微镜观察 将 1mm 厚的 CFDB 材料置于 25ml 培养瓶中预湿,每瓶置 4 片材料,共置 5 瓶,将细胞密度为 5×10^5 个/ml 的第三代同步化人胎骨膜成骨细胞接种于预湿的材料上,每瓶接种 5×10^5 个细胞,加入 4ml 培养液继续培养,每天 2~3 天换液一次,后用 Olympus 倒置相差显微镜观察细胞在材料周围、孔隙内附着及生长情况。

1.3.4 扫描电镜(SEM)观察 将 5mm×5mm×5mm 大小的 CFDB 块状物于 25ml 培养瓶中预湿,每瓶置 4 块材料,共置 5 瓶,按 1.3.3 中的方法将人胎骨膜成骨细胞接种于预湿材料上,培养 1 周后取出材料,将取出材料用 2.5% 戊二醛固定,乙醇脱水,临界点干燥,镀金膜,于 Philips 525M 型扫描电子显微镜下观察细胞在材料上附着情况。

1.3.5 流式细胞仪(FCM)检测 将 5mm×5mm×5mm 大小的 CFDB 块状物于 25ml 培养瓶中预湿每瓶置 4 块材料,同时设空白对照组(未置 CFDB 材料),每组 5 瓶,按 1.3.3 中的方法将人胎骨膜成骨细胞接种于预湿材料上复合培养,每 2~3 天换液一次,连续培养 1 周后,用含 0.25% 胰蛋白酶的 EDTA 液消化收集细胞,并制成细胞悬液,用美国 Coulter 公司 Epics Elite Esp 型流式细胞仪进行检测,了解材料对人胎骨膜成骨细胞的细胞周期、DNA 含量及倍体水平的影响。

1.3.6 碱性磷酸酶(ALP)活性测定 按 1.3.5 中的方法预置材料并与人胎骨膜成骨细胞培养 1 周后,用含 0.25% 胰蛋白酶的 EDTA 液消化收集细胞,并制成 1ml 细胞悬液,共 10 个样品(其中 5 个样品为空白对照,未置 CFDB 材料),采用磷酸苯二钠法测定 ALP 活性。

2 结果

2.1 CFDB 的理化性能

2.1.1 CFDB 的 SEM 观察 经 SEM 观察可见 CFDB 材料具有原骨组织骨盐支架的三维多孔网状孔隙结构系统(图 2)。材料的孔隙率及孔径大小测定结果分别为 $(52.35 \pm 4.15)\%$ 和 $(350.11 \pm 17.51)\mu\text{m}$ 。

2.1.2 CFDB 的 X 射线衍射分析(XRD) CFDB 材料的 X 射线衍射图谱为曲线型羟基磷灰石[HA, Ca₅(PO₄)₃(OH)]。

2.1.3 CFDB 的蛋白质含量测定 CFDB 材料中蛋白质含量为 $(0.01 \pm 0.02)\%$,表明其蛋白质含量极微,基本不含蛋白质。

2.2 CFDB 的细胞相容性

2.2.1 CFDB 成骨细胞复合培养的倒置相差显微镜观察 细胞接种后 24 小时,可见材料的孔隙及周围有细胞附着,并见细胞附于瓶底;随着培养时间的延长,附于材料上的细胞逐渐增多,且附于瓶底的细胞向材料移行;1 周时,有很多细胞

附于材料的周边及孔内(图 3)。

2.2.2 CFDB 成骨细胞复合培养的 SEM 观察 可见材料的表面皆有细胞附着,细胞呈球形、梭形或多角形,有的细胞表面可见钙颗粒沉积(图 4)。

2.2.3 CFDB 成骨细胞复合培养的 FCM 检测 与 CFDB 材料复合培养的细胞处于分裂前期及分裂期的细胞数较空白对照组多,分别为 6.6% 和 3.4%,且所有细胞皆为正常二倍体细胞,未见任何异倍体细胞,其 DI 值为 0.96(注:DI = 1.0 ± 0.1 为正常二倍体细胞)。

2.2.4 CFDB 成骨细胞复合培养的 ALP 活性测定 与 CFDB 材料复合培养的成骨细胞 ALP 活性与空白对照组相差不大,分别为 (0.958 ± 0.173) IU 和 (1.251 ± 0.144) IU。

3 讨论

3.1 CFDB 的性能分析 新鲜异种骨具有很强的抗原性,其抗原性主要来自异种蛋白质,而异种骨移植所致的免疫排斥反应是导致移植失败的主要原因。为使异种骨能较好地被受体所接受,采用一些理化方法对异种骨进行适当处理,可使其抗原性明显减弱或消除,从而使异种骨具有良好的生物相容性,进而达到修复骨缺损的目的^[2]。

因此,本研究采用脱蛋白、脱脂等一系列理化方法对猪肋骨进行处理制得 CFDB 材料,经 X 射线衍射分析及蛋白质含量测定,其主要成份为羟基磷灰石(HA),蛋白质含量几乎为零,又经脱脂处理,这样其抗原性已基本得以消除,利于其在骨修复中很好地发挥传导成骨作用。此外,CFDB 经扫描电镜观测发现仍具有原骨组织的天然网状孔隙系统,且其表面的 PDLLA 既可增强完全脱蛋白骨的机械性能^[3],又利于成骨细胞的附着及增殖^[4]。这就为成骨细胞附着生长提供良好的生理环境,使得 CFDB 有望成为成骨细胞的支架材料。

3.2 CFDB 的细胞相容性评价 人类正常的体细胞均有较恒定的 DNA 二倍体,当人体发生癌变或具有恶性潜能的癌前病变时,细胞 DNA 含量会出现异常改变,导致 DNA 异倍体出现。FCM 通过测定细胞 DNA 含量而能发现异倍体细胞,从而成为肿瘤细胞学诊断的有效工具^[5]。因此,为了解 CFDB 材料有无致瘤性,本研究采用 FCM 对与 CFDB 材料体外复合培养的人胎骨膜成骨细胞的 DNA 含量、倍体水平进行分析,结果未发现异倍体细胞,说明 CFDB 材料无致瘤性,应用较安全。又通过 FCM 对与 CFDB 材料复合培养细胞的细胞周期进行分析发现:CFDB 材料能使进入分裂前期及分裂期的细胞增多,表明 CFDB 材料可促进人胎骨膜成骨细胞的分裂增殖。

本研究结果还表明人胎骨膜成骨细胞可粘附于 CFDB 材料表面上生长繁殖,说明 CFDB 材料具有良好细胞相容性。这可能由于 CFDB 材料具有天然的网状孔隙系统,其组成及结构符合生理要求,从而利于成骨细胞附着生长。在检测矫形外科材料的细胞毒性检测方法中,McKay 等^[6]认为测定成骨的细胞 ALP 活性比 MTT 法更敏感。因此本研究采用成骨细胞的 ALP 活性测定,结果与 CFDB 材料复合培养的成骨细胞的 ALP 活性存在,表明 CFDB 材料无细胞毒性,是一种较为安全的骨移植替代材料。(本文图 1~4 见插页 1)

参考文献

- 1 陈炳卿. 营养与食品卫生学. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996, 256-258.
- 2 Young C, Sandstedt P, Skoglund A. A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1999, 14(1): 72-76.
- 3 Ignjatovic N, Tomic S, Dakic M, et al. Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials. *Biomaterials*, 1999, 20(9): 809-816.
- 4 Hasegawa Y, Ohgushi H, Ishimura M, et al. Marrow cell culture on poly-L-lactic acid fabrics. *Clin Orthop*, 1999, 358(1): 235-243.
- 5 Merkel DE, McGuire WL. Ploidy, proliferation activity and prognosis: DNA flow cytometry of solid tumors. *Cancer*, 1990, 65(5): 1194-1205.
- 6 McKay GC, Macnair R, Macdonald C, et al. Interactions of orthopaedic metals with an immortalized rat osteoblast cell line. *Biomaterials*, 1996, 17(13): 1299-1344.

(收稿 2002-03-15 编辑: 房世源)

· 短篇报道 ·

AO 动力髁螺钉治疗股骨粗隆间骨折的体会

黎建义 苏培基 黄星垣

(中山市中医院 广东 中山 528400)

我们医院自 1999 年至 2000 年采用 AO 动力髁螺钉治疗股骨粗隆间骨折 19 例, 取得了满意的效果。

1 临床资料

本组 19 例, 男 11 例, 女 8 例; 年龄 47~78 岁, 平均 64.5 岁。全部为外伤所致, 车祸伤 5 例, 跌伤 14 例, 均为闭合性损伤。伤后至手术时间 4~10 天。骨折类型不稳定型 13 例, 稳定型 6 例。

2 治疗方法

采用硬膜外麻醉, 用 Watson-Jones 入路, 患者仰卧位, 臀下垫枕, 显露大粗隆和股骨上段, 折端复位, 以定位器定位, 选择合适的颈干角前倾角, 使打入导针处于股骨颈中央, 针尖至股骨头软骨质下, 测量导针打入的长度(减去 10mm), 以确定所选螺钉的长度, 扩孔器扩孔, 沿导针攻丝, 将空心钛螺钉旋入骨皮质, 安装连接螺钉、导杆, 使导针和螺钉的槽与嵴对齐, 旋入钛螺钉, 拨除导针, 安装套筒钢板, 用推进器将钛钢板旋入骨皮质, 上好螺钉固定股骨上段。术后酌情使用抗生素, 解除牵引。术后 24 小时作股四头肌功能锻炼, 术后第 2 天起床活动, 第 7 天扶拐下地活动, 术后 5~6 周根据骨折愈合情况开始负重行走。

3 治疗结果

本组 19 例, 随访时间 4~6 个月未发现 1 例内固定断裂、松动, 骨折断端移位或骨折不愈合, 未发现 1 例髁内翻。参照王福权等^[1]拟定的评定标准评定, 优: 髁不痛, 关节活动正常, 恢复伤前工作能力及生活自理能力, 本组 14 例; 良: 髁基本不痛, 活动尚好, 行走时有时用单拐, 恢复部分生活自理能力及工作能力, 本组 4 例; 差: 髁仍疼痛, 活动受限, 尚不能下地行走或需扶双拐行走, 生活自理有困难, 本组 1 例。

4 讨论

用 AO 动力髁螺钉治疗股骨粗隆间骨折是比较牢固的固

定。良好复位及复位后稳定性的维持是治疗的关键, 坚强有效的内固定即能防止髁内翻的发生, 为早期功能锻炼创造条件^[2]。AO 动力髁螺钉用粗的髁螺钉通过股骨颈进行加压、防旋作用, 并用套筒钢板固定股骨上段, 延长了内固定在骨折近端的长度, 增强了折端的抗折弯力、抗剪力、抗扭曲力, 保持骨折断端的紧密接触, 利于断端愈合, 有效防止了髁内翻的发生, 便于伤者早日进行功能锻炼, 大大减少了长期卧床引起的并发症, 本组无 1 例出现并发症。由于 AO 动力髁螺钉为钛合金, 表面抗腐层能防止钢板在体内的氧化腐蚀, 并具有很好的生物相容性, 可以防止钢板的折断, 利于断端早日愈合。

手术适应症: ①股骨颈基底部及股骨粗隆部及股骨粗隆部合并股骨上段骨折, 其中以骨质疏松者尤适合。②患者伤前心肺脑及身体状况良好, 可耐受手术的。

手术体会: 术前均行胫骨结节牵引, 以防止肌肉收缩引致折端移位而引起疼痛, 利于骨折复位。术中行股骨颈导针的打入系关键之处, 必须在 C 型臂 X 线透视机下选择正确的定位, 避免螺钉移在颈外, 及因内固定位置不佳而多次开孔引起螺钉松动, 失去牢固固定的作用。如病人骨质疏松, 不宜用丝攻预攻孔, 而直接旋入螺钉。术毕切口必须内置负压引流, 避免血肿, 减少感染机会。术后对骨质疏松患者不宜过早下地负重, 患者完全负重活动时间必须根据骨折愈合情况决定。最后, 我们认为 AO 动力髁螺钉治疗股骨粗隆间骨折是一种比较好的内固定治疗方法。

参考文献

- 1 王福权. 关于老年股骨粗隆间骨折治疗分析. *骨与关节损伤杂志*, 1991, 10(1): 7.
- 2 范卫民. 四种股骨颈转子间骨折内固定物的力学对比及疗效评价. *中华骨科杂志*, 1996, 16(4): 23.

(收稿: 2001-11-26 编辑: 连智华)

复合型完全脱蛋白骨的细胞相容性研究

(正文见 597 页)

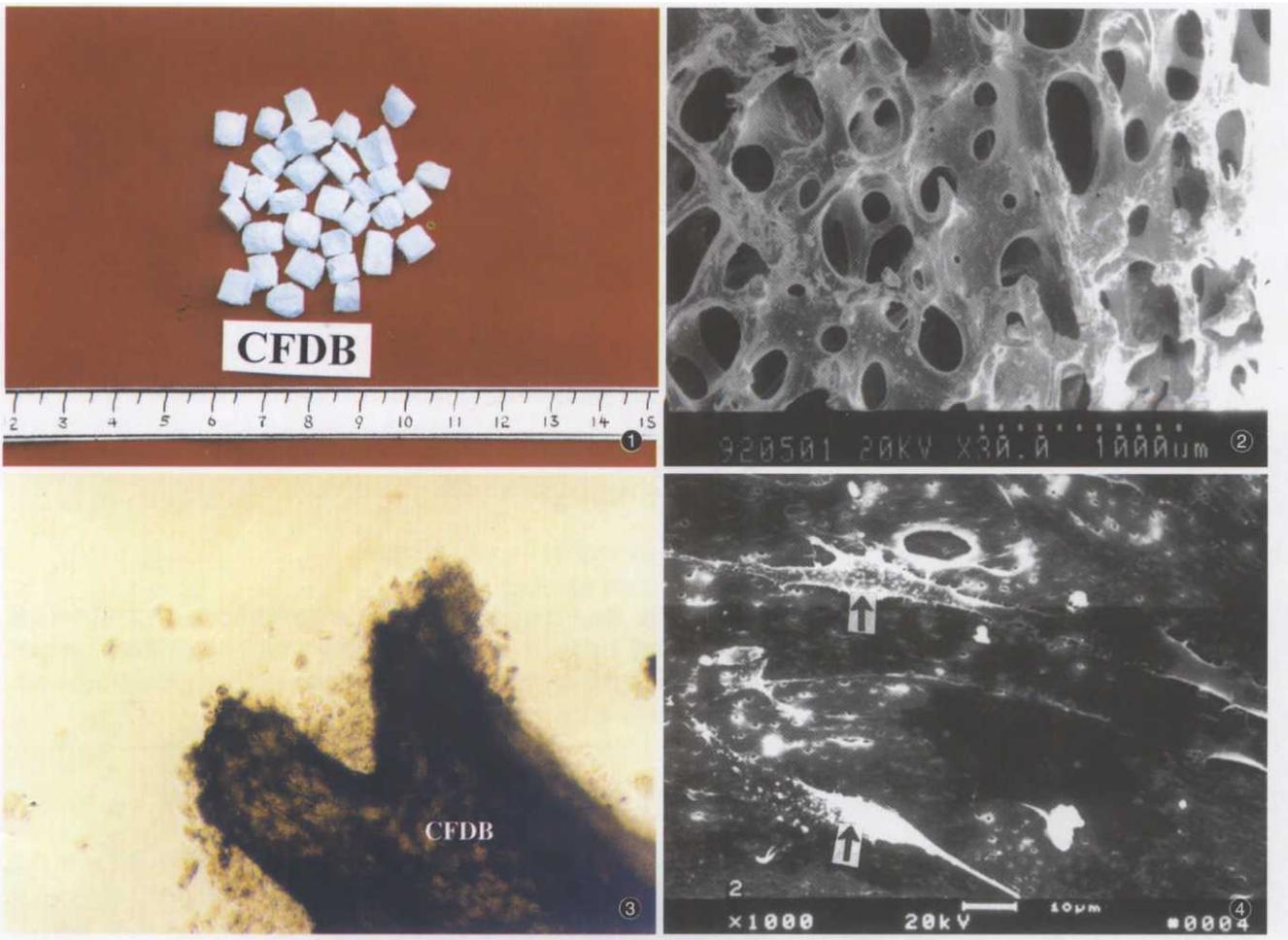


图1 复合型完全脱蛋白骨(CFDB) 图2 CFDB材料的天然网状孔隙结构、网隙彼此通连(SEM × 30) 图3 CFDB与成骨细胞复合培养1周 可见很多团簇状细胞附于CFDB边缘(相差显微镜 × 100) 图4 CFDB与成骨细胞复合培养2周, 附于CFDB材料上的梭形细胞(箭头示) 细胞表面见有钙颗粒沉着(SEM × 1000)

三种移植骨材料修复骨缺损能力的比较研究

(正文见 600 页)



图1 自体皮质骨植入后6周 截骨端骨小梁新骨爬行替代植入物, 形成“潮标”(SEM × 10) 图2 单纯异种无机骨植入后6周 截骨端骨小梁向无机骨内传导, 无机骨孔隙中充满纤维组织(SEM × 4) 图3 复合骨髓的异种无机骨植入后6周 新骨量多于无机骨量、骨髓样组织形成(SEM × 4)