

冻干同种异体骨与冻干异种骨移植治疗骨缺损的比较实验研究

刘玉增¹, 李琪文², 王继芳¹

(1. 中国人民解放军总医院骨科, 北京 100853; 2. 内蒙古医学院第二附属医院)

摘要 目的:对比观察冻干同种异体骨和冻干异种骨移植治疗骨缺损的效果。方法:48 只中国大白兔一侧桡骨造成 1 cm 骨缺损,随机分为同种异体骨组和异种骨组,每组 24 只,分别植入两种移植骨,术后 4、8、12 周分批取材,进行 X 线片和组织学检查,然后做对比分析。结果:术后 4 周异种骨组的 X 线片, Gary X 线评分与同种异体骨组有统计学差异,而术后 8 周同种异体骨组组织学检查以及组织学评分与异种骨组有统计学差异,在其他时期两组比较无统计学差异。结论:冻干异种骨具有很好的成骨效果,可以作为修复骨缺损的移植材料。

关键词 冻干同种异体骨; 冻干异种骨; 骨移植; 骨缺损

Experimental comparison of freeze-drying allograft bone with freeze-drying xenograft bone for the repair of segmental bone defect LIU Yuzeng*, LI Qiwen, WANG Jifang. * The 301st Hospital of PLA, Beijing, 100853, China

Abstract Objective: To compare the therapeutic effect of repairing bone defect with freeze-drying allograft and xenograft bone. **Methods:** Forty-eight rabbits were divided into two groups randomly (allograft group and xenograft group). A segmental bone defect (length 1 cm) was created at one side of radius in each rabbit. The therapeutic effect of segmental bone defect was assessed by serial radiographic and histologic studies respectively. **Results:** Xenograft was superior to allograft on X-ray, Gary's radiographic scoring in the fourth week. And allograft was superior to xenograft on histologic scoring in the eighth week. But no significant difference was demonstrated between two groups in twelfth week after operation on radiographic and histologic studies. **Conclusion:** Xenograft bone appears a promising alternative to repair bone defect.

Key words Freeze-drying allograft bone; Freeze-drying xenograft bone; Bone transplantation; Bone defect

骨移植是修复骨缺损的主要方法,包括自体骨移植、同种异体骨移植和异种骨移植。自体骨虽具备诸多优点,但是来源有限,切取时又会造成新的伤害。异种骨移植近年发展很快,但在基础实验方面与同种异体骨移植之间的比较,报道并不多。统计自 1980 年至 1989 年日本骨移植材料的来源,异种骨移植只占 0.2%,同种异体骨占 2.3%,3.2%为生物骨移植材料,94.3%为自体骨移植^[1]。而两种移植骨之间的对比研究,更是报道极少。为了进一步探寻可靠的骨修复材料,本实验比较冻干异种骨和冻干同种异体骨在修复兔桡骨骨缺损中的应用,评价其的修复效果。

1 材料与方法

1.1 骨移植材料的制备 新鲜的 1 岁小牛和白兔的长骨,切除两端的干骺端,剔尽附丽的软组织和骨膜,刮净髓腔,生理盐水冲洗 3 遍。放置 -70℃ 深低温冰箱冷冻。冷冻干燥机脱水 48 h。环氧乙烷消毒 2 遍。密封备用。

1.2 实验动物分组 健康成年中国大白兔 48 只,体质量 2.0~2.5 kg,雌雄不限,随机分为 A、B 两组,每组 24 只。A 组行冻干同种异体骨移植,B 组行冻干异种骨移植。

1.3 手术方法 A 组:2%乌拉坦(100 mg/kg)腹腔内麻醉,术区剪毛,无菌条件下,在兔一侧桡骨中段作 2 cm 长纵行皮肤切口,沿肌间隙分离至桡骨。用剥离器分开尺骨和桡骨之间的骨间膜,剥离桡骨中段骨膜

1.2 cm,人工制成 1.0 cm 完全骨缺损,将同种骨植入骨缺损处,远端和近端与髓腔各套接约 0.1 cm,不做内固定,逐层缝合,关闭切口。B 组:骨缺损方法同 A 组,将异种骨植入骨缺损处。远端和近端各套接 0.1 cm,不做内固定,逐层缝合,关闭切口。

1.4 检查方法 术后 4、8、12 周每组动物行 X 线检查,其中 4、8 周各取 8 只动物行组织学检查,术后 12 周所有剩余动物 X 线检查后处死,全部行组织学检查。

1.4.1 大体观察 观察两组兔桡骨骨缺损在 4、8 和 12 周不同时期的修复情况,并且比较两组的差异。

1.4.2 X 线检查 动物全麻后,用 500 mA X 线机摄片。条件:30 mA、40 kV 选用 Gary 等^[2]X 线的评分标准对 X 线片进行评分。

1.4.3 组织学检查 动物空气栓塞处死,于前肢取下整段桡骨,剔尽附丽的软组织,然后锯取桡骨中段 1.2 cm,10%福尔马林溶液固定,乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,HE 染色,光镜观察按照胡蕴玉等^[3]骨缺损修复组织学评分标准,进行组织学评分。

1.5 统计方法 应用 Stata 4.0 统计学软件,单向有序定性资料的统计方法, $P < 0.05$ 为有统计学差异, $P > 0.05$ 为无统计学差异。

2 结果

2.1 大体观察 标本肉眼观察各组动物切口愈合良好。4 周内各组植骨处有明显包块,各组植骨处稍膨大。8 周时植骨处与周围骨外观接近,塑形稍差。12 周时各组植骨处塑形好,与周围组织外观无明显区别,各组之间无明显差别。

2.2 放射学检查 A 组:术后 4 周,大部分植骨处无新生骨形成,2 例有新生骨痂形成,但是有 10 例移植骨大部分被吸收;8 周时新生骨量明显增加;12 周时骨缺损中原植骨已大部分吸收,骨缺损达到基本桥接。B 组:术后 4 周植骨处密度增高,大部分无新生骨形成,有的有少量新生骨形成;8 周时骨缺损处出现大量新生骨;12 周植骨处有大量新骨填充,部分已基本桥接。

采用 Gary 等^[2]放射学评定标准,原植骨组织被吸收为 0 分;大部分被吸收为 1 分;少部分被吸收为 2 分;新骨新生塑形差为 3 分;新骨再生塑形好,髓腔再通为 4 分。而在两断端连接情况,无连接为 0 分;断端有少量骨痂为 1 分;断端模糊有骨痂为 2 分;断端连接消失不见为 3 分;新髓腔出现为 4 分。远近端分别计算,最大得分为 12 分。根据 X 线评分标准,

将 X 线片分为差,中等,良 3 个等级:差为 0~4 分,中等为 5~8 分,良为 9~10 分。

两组 X 线检查结果见表 1。经统计学分析,术后 4 周时, $\chi^2 = 4.864 0, P < 0.05$,两组比较有统计学差异;术后 8、12 周时, $\chi^2 = 0.795 4$ 及 0.410 3, $P > 0.05$,两组比较差异无显著性意义。

表 1 两种移植骨不同时间放射学评定结果(单位:例)
Tab. 1 Gary's radiographic result of two groups in different stages(Unit:Case)

Grade	Group A			Group B		
	4 weeks	8 weeks	12 weeks	4 weeks	8 weeks	12 weeks
Poor	18	3	0	15	3	1
Fair	5	11	1	9	12	1
Good	1	2	7	0	1	6
Total	24	16	8	24	16	8

2.3 组织学检查 采用了胡蕴玉等^[3]组织形态学评分标准,骨缺损只有原植骨及炎性纤维组织填充为 0 分;原植骨区出现灶性新生骨、软骨组织为 1 分;新生骨组织区扩大,开始相互连接、爬行替代为 2 分;骨缺损中新生骨、软骨区域大于残留植骨区为 3 分;出现骨髓和大量骨小梁、原植骨基本消失为 4 分;成熟板层骨形成,髓腔再通为 5 分。

根据此标准,将组织学结果分为差、中等及良 3 个等级:0~1 分为差,2~3 分为中等,4~5 分为良。

A 组:4 周时,植入骨内部以原哈佛氏管为中心,出现灶性新生骨组织。可见植入骨的骨细胞陷窝空虚,周围有结缔组织包绕,炎性细胞浸润,有岛样新骨形成且与原植骨紧密相嵌;8 周时,哈佛氏管扩大,新骨岛向外伸展相互融合,部分植骨内可出现淡染区,经软骨化骨方式转变为骨小梁,部分植骨则从骨块内部和周边直接爬行替代形成新骨;12 周时,原植骨大部为骨小梁替代,并且互相融合,出现部分骨髓组织或者髓腔再通。

B 组:4 周时,植入骨内部以移植骨为中心,出现灶性新生骨组织。可见植入骨的骨细胞陷窝空虚,周围有结缔组织包绕,炎性细胞浸润,有少量新骨形成且与原植骨紧密相嵌;8 周时,哈佛氏管扩大,新骨岛向外伸展,但是相互融合较少,而且周围嗜酸性细胞明显增加,提示有免疫反应,软骨化骨方式形成不多;12 周时,原植骨大部为骨小梁替代,并且相互融合,部分动物出现部分骨髓组织,骨小梁互相融合,髓腔再通。

两组组织学结果比较见表 2。经统计学分析表明,4 周 A 组和 B 组比较 $\chi^2 = 0.3768$, $P > 0.05$, 两组差异无显著性意义;8 周时两组间有统计学差异 ($\chi^2 = 0.0346$, $P < 0.05$);12 周时两组间无统计学差异 ($\chi^2 = 0.2909$, $P > 0.05$)。

表 2 两种移植骨不同时间组织学修复能力比较(单位:例)

Tab. 2 Comparison of histology rehabilitative ability between two groups in different stages(Unit:Case)

Grade	Group A			Group B		
	4 weeks	8 weeks	12 weeks	4 weeks	8 weeks	12 weeks
Poor	5	2	1	5	4	1
Fair	2	4	2	3	2	1
Good	1	2	5	0	2	6
Total	8	8	8	8	8	8

3 讨论

近年来随着同种异体骨移植在基础实验的完善和在临床应用的不断探索,技术日趋成熟,骨组织是第一个经过冷冻干燥处理应用于临床的组织^[4]。异种骨移植成功的关键问题在于消除其抗原性,又能保持其诱导新骨的能力。为消除其抗原性,传统的方法有脱蛋白处理,也可用冷冻干燥方法来消除其抗原性以及用射线照射的方法和酒精或福尔马林浸泡来降低其抗原性。爬行取代是指旧骨吸收后的新骨替代,旧骨吸收有时不可避免。但是假如旧骨吸收不能被新骨生成及时替代,将出现超前吸收或过度吸收现象,表现为骨质疏松^[5]。实验结果提示主要是因为 4 周时同种异体骨被吸收过快所导致,而异种骨则无这种现象发生。

骨移植后的骨生长可以通过骨诱导和骨传导来完成。骨诱导是通过诱导因子使结缔组织转化为骨组织,骨形成蛋白(BMP)是重要的骨诱导因子,正常骨基质中就含有这类物质。实验证明深冻和冻干不会影响 BMP 的活性^[5]。BMP 在不同种属间有高度的同源性即它可跨越种属诱导新骨形成。骨移植最初主要起骨传导作用^[4]。有研究表明骨移植,特别是异体骨移植在初期成骨后的 4~8 周有一明显的新成骨期^[4]。本实验在第 8 周时,同种异体骨成骨效果不同于异种骨,其原因考虑可能与宿主对异体骨的免疫反应存在潜伏期有关。在植入的初期由于宿主对异种骨的免疫反应处在潜伏期中移植骨在初期只能是骨传导成骨,此时免疫因素对成骨还无明显的影响,但是在 4 周以后,由于受免疫因素的影响,防碍了 BMP 在异种骨移植中诱导成骨作用。我

们相信随着保存方法的改进,免疫因素的影响会被逐渐克服。

生物医用组分材料必须满足下面几项要求:

具有良好的生物相容性和物理相容性。Wander 等^[6]的动物实验表明预后良好。本实验异种骨组在 8 周时虽受免疫因素的影响,但是并没有强烈的排斥反应。具有良好的生物稳定性。Richardson 等^[7]用牛异种骨治疗人节段性骨缺损,结果与用同种异体冻干骨相比较,各项分析结果两种方法无统计学差异。具有足够的强度和韧性。对有骨传导性能的骨生物制品的动物实验显示它们符合对其具有骨传导性能的要求^[8,9]。具有良好的灭菌性能。本实验通过同种异体骨和异种骨修复骨缺损的对比分析,异种骨可以作为骨移植材料。

异种骨和同种异体骨都可做为修复骨缺损的移植材料。异种骨移植作为移植骨有其独特的特点:异种骨来源广泛,价格低廉;经过适当处理的异种骨能使其保持骨诱导能力,并提供骨支架以利新骨沉积。但仍然有许多问题未解决,例如:异种骨的抗原性的进一步清除以及成骨机制仍须进一步阐明,临床应用的评价规则或者方法,异种骨作为骨生长因子的良好载体,异种骨在支架作用和空间占位方面,如何与 BMP 更好地结合,在体内的降解吸收等方面有待于进一步研究。

参考文献

- Iwamoto Y, Sugioka Y, Chuman H, et al. Nationwide survey of bone grafting performed from 1980 through 1989 in Japan. *Clin Orthop*, 1997, 335(2):292-297.
- Gary DB, Victor MG, Arnold EP. The effect histocompatibility matching on canine frozen bone allograft. *J Bone Joint Surg(Am)*, 1983, 65:89.
- 胡蕴玉, 陆裕朴, 刘纬. 不同复合异种骨修复长骨缺损的实验研究. *中华骨科杂志*, 1990, 10(增刊):74.
- 李孜壮, 卢世璧, 王继芳. 缓慢自然复温冷冻干燥异体骨修复实验性骨缺损. *中华外科杂志*, 1994, 32(12):765-767.
- 山西省医学会. 同种异体骨移植. *组织移植通讯*, 1998, 1(6):3.
- Wander KW, Schwarz PD, James SP. Fracture healing after stabilization with intramedullary xenograft cortical bone pins: a study in pigeons. *Vet Surg*, 2000, 29(3):237-244.
- Richardson CR, Mellonig JT, Brunsvold MA, et al. Clinical evaluation of Bio-Oss: a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defect in humans. *J Clin Periodontol*, 1999, 26(7):421-428.
- Luo Z, Hu Y, Wang Q. The experimental studies of immune response of antigen-extracted bovine cancellous bone grafting. *Chung Hua Wai Ko Tsa Chih*, 1997, 35(11):690-693.
- Rodriguez Y, Baena R, Zaffe D, et al. Osteo-conductive materials: animal experiments and instrumental analysis. II *Minerva Stomatol*, 1997, 46(12):635-647.

(收稿日期:2004-07-20 本文编辑:连智华)