

自体骨与同种异体骨治疗兔桡骨骨缺损的实验对比研究

杨文成¹ 陈 涛² 甘洪全³ 王志强³ 白俊清³

【中图分类号】R-332

【文献标识码】A

【文章编号】1672-6383-(2011)01-0008-02

【摘要】目的:探讨采用同种异体骨治疗兔桡骨骨缺损疗效的实验研究。**方法:**将12只健康成年新西兰大白兔作为同种异体骨供体,28只作为实验受体。按美国组织库标准制备同种异体骨。将受体实验动物双侧桡骨中段切除10 mm,制成骨缺损模型。受体实验动物右侧桡骨骨缺损内植入自体髂骨骨粒(对照组);左侧取等量同种异体骨粒同法植入(实验组)。于术后2、4、8、12周,对骨缺损修复组织内OPG蛋白的表达检测采用免疫组织化学方法。术后12周,检测两组骨小梁相对体积、骨小梁数量和骨密度。结果:术后两组未见感染现象发生。术后2、4周实验组OPG蛋白表达低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后8、12周两组OPG蛋白表达差异无统计学意义。术后12周两组骨小梁相对体积、骨小梁数量和骨密度比较,差异无统计学意义。结论:同种异体骨具有较好的组织相容性,其骨性愈合过程与自体骨移植相似,并且来源广泛,能够避免因自体骨移植带来的诸多并发症,可以成为治疗骨缺损的重要材料。

【关键词】自体骨;同种异体骨;骨缺损

The experimental comparison study of rabbit radius defects treated with autogenous and allogeneic bone

Yang Wen-cheng, Chen Tao, Gan Hong-quan, Wang Zhi-qiang, Bai Jun-qing

【Abstract】Objective: To investigate experimental study of curative effects with allogeneic autogenic bone in rabbit radius defects. **Methods:** 12 New Zealand rabbits were provided allogeneic bone under the standard of American Association of Tissue Bank. 28 experimental rabbits were created 10 mm bone defect model in the bilateral radii. In the left side, allogeneic bone were used to repair bone defect (experimental group), equal capacity autogenous iliac bone was used in the right side (control group). Immunohistochemical method was used to determine the expression of OPG counting at 2, 4, 8, and 12 weeks postoperatively. Percent trabecular area (BV/TV), trabecular number (Tb.N), and bone mineral density were detected in two groups, at 12 weeks postoperatively. **Results:** Infection were not occurred in two groups postoperative. At 2 and 4 weeks, the expression of OPG in control group was significantly higher than that in experimental group ($P < 0.05$); At 8 and 12 weeks, there was no significant difference in OPG protein expression between experimental group and control group ($P > 0.05$); There was no significant difference in Percent trabecular area (BV/TV), trabecular number (Tb.N), and bone mineral density between two groups at 12 weeks postoperatively ($P > 0.05$). **Conclusion:** Allograft bone has good biocompatibility, the bone healing process is similar to autologous bone graft, the wide variety of sources, and avoiding the complications of autogenous bone graft. Allograft bone can be an important material in the treatment of bone defect.

【Key words】allogeneic bone autogenic bone bone defect

骨缺损是由严重创伤、肿瘤、感染引起的骨科临床常见病之一,其治疗难度大,预后差,严重影响患者生活质量。植骨术是目前临床治疗骨缺损的重要方法,自体骨移植被认为是植骨的最好材料,但自体骨常受到取材数量以及形状的限制,无法满足范围较大的骨缺损。同种异体骨来源丰富,可塑性强,生物活性良好,可成为自体骨的主要替代品。本实验对自体骨与同种异体骨治疗兔桡骨缺损的预后进行比较,探讨同种异体骨修复骨缺损的能力,以期临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂仪器:健康成年新西兰大白兔40只,雌雄不限,体重2.2~3.5 kg,由中国辐射防护研究院实验动物中心提供。其中12只作为供体,参照美国组织库标准^[1]制备同种异体骨;另28只作为实验受体。

羊抗兔OPG多克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);免疫组织化学S-P试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司);⁶⁰Co辐射源(中国辐射防护研究院);冻干机(LABCONCO公司,美国);超声清洗机(H66MC,无锡超声电子设备有限公司);病理组织包埋机(常州中威电子仪器厂);石蜡切片机(Leica公司,德国);CX41RF型显微镜、摄像显微镜、显微摄像装置(Olympus公司,日本);CMIAS真彩色医学图像分析系统(北京航空航天大学)。QDR-2000型DEXA骨密度仪(Hologic公司,美国)。

1.2 动物模型制备及分组:受体实验动物3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)经耳缘静脉注射麻醉,取兔双前肢前外侧切口,显露桡骨干,制备双侧桡骨干中段10 mm骨缺损模型。于右侧髂骨处另取切口,凿取髂骨全板,以咬骨剪剪成0.1~0.2 cm³大小骨块,取4~5块移植于右侧桡骨骨缺损内(对照组);左侧取等量同种异体骨同法植入(实验组)。分别于术后2、4、8、12周处死动物,取材观察。

1.3 观测指标

1.3.1 大体观察:术后2、4、8、12周,动物同上法麻醉后,按原伤口切开皮肤、肌肉,暴露桡骨干,观察缺损处骨痂形成、植入骨块吸收、周围软组织与骨缺损修复情况。

1.3.2 组织学观察:术后2、4、8、12周,大体观察后,取下包括骨缺损范围在内的组织,切开后一半置于10%甲醛缓冲液固定、脱水、石蜡包埋,切片,HE染色,光镜下观察两组骨缺损修复情况。术后12周,将另一半置于甲醛缓冲液中固定24 h,乙醇脱水后行甲基丙烯酸甲酯塑料包埋,硬组织切片机5 μm切片,制备不脱钙骨组织切片,光镜观察新生骨组织矿化程度,并采集图像。骨组织形态计量学参数计算采用^[2]CMIAS真彩色医学图像分析系统测量经von Kossa染色的骨小梁相对体积(percent trabecular area, BV/TV)、骨小梁数量(trabecular number, Tb.N),利用美国Hologic公司QDR-2000型DEXA骨密度仪,测量离体两组骨缺损修复区骨组织的骨密度。

1.3.3 免疫组织化学染色检测:术后2、4、8、12周,石蜡包埋骨组织4~5 μm连续切片,采用免疫组织化学(S-P法)检测OPG蛋白表达。用已知阳性组织作为阳性对照, PBS代替一抗作阴性对照。OPG免疫组织化学染色后,阳性信号呈黄褐色,位于胞浆,采用医学图像分析系统对每组免疫组织化学结果进行光密度值(OD值)检测及分析^[3]。每张切片随机选取5个高倍视野(×200),对其中一个具有代表意义阳性结果的视野棕褐色颗粒进行标记,以此标准自动检测所有视野的阳性结果。以参数光密度代表蛋白颗粒密度。

1.4 统计学方法:采用SPSS13.0统计软件进行分析。数据以均数±标准差表示,组间计数比较采用配对 t 检验,定性资料采用 χ^2 检验, P 值 < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察:两组动物未见感染现象发生,两组伤口均I期愈合。术后2周:两组剖面质地不均匀,可见纤维组织包裹骨缺损处,呈梭形

膨大,植入骨与周围组织相连,两组骨缺损处骨痂明显。4周:两组纤维组织包块缩小,硬度增强,植入骨体积减小,质地较第2周增强,无法与周围组织剥离。8周:两组骨缺损处骨质坚硬,缺损处愈合。其边缘由类似皮质骨组织包裹,剖面质地较均匀。12周:两组坚硬的骨痂将骨缺损填充,剖面质地坚硬,均匀一致,连续性较好,颜色、质地与周围正常骨质相似。

2.2 组织学观察及免疫组织化学检测:术后2周可见毛细血管和纤维组织长入同种异体骨内部,OPG蛋白呈棕褐色颗粒位于植入骨小梁边缘的纤维母细胞、软骨细胞胞浆内,在对照组中可见OPG表达于植入骨小梁周围的成骨细胞胞浆内。实验组OPG的表达低于对照组,差异具有统计学意义。术后4周,纤维组织包裹植入骨,软骨化骨已在两组形成,OPG主要表达于两组的纤维母细胞、软骨细胞以及成骨细胞中,实验组OPG的表达仍低于对照组。术后8周,两组骨缺损处可见编织骨填充,OPG表达主要表达于软骨细胞和成骨细胞胞浆中,较前两次观察表达的强度增高,两组进行比较,差异无统计学意义。术后12周,两组骨缺损处均有成熟的骨小梁填充,与周围骨组织相连,OPG主要表达于成骨细胞胞浆内,两组OPG比较无统计学差异。

2.3 骨组织形态计量学和骨密度检测:术后12周,经 von Kossa 染色后,实验组双侧骨缺损处成熟骨小梁被染成黑色,排列有序、增粗、融合成片,并与原有正常骨组织相连接,不易区别,两组骨小梁相对体积(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。两组骨密度相比较,差异无统计学意义。

表1 两组OPG蛋白表达

组别	OPG			
	2	4	8	12
实验组	0.288±0.06	0.4151±0.09	0.663±0.05	0.8078±0.06
对照组	0.211±0.05	0.3278±0.06	0.624±0.13	0.7854±0.04
t	1.75	2.91	1.04	
p	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05

表2 骨组织形态计量学和骨密度检测结果

组别	骨小梁相对体积	骨小梁数量	骨密度
实验组	60.51±12.94	7.63±1.27	0.2528±0.0243
对照组	58.89±12.22	7.29±1.50	0.2413±0.0169
t	0.32	0.60	1.36
P	>0.05	>0.05	>0.05

3 讨论

由于严重创伤、肿瘤、感染等造成的骨缺损,是当今骨科领域治疗的难题之一,严重影响患者预后及生活质量。骨移植术是治疗骨缺损的主要手段。目前骨移植材料众多,包括自体骨、同种异体骨、异种骨、人工复合材料骨。其中尤以自体骨移植为骨缺损修复的“金标准”^[4]。但由于供区取骨有限,并可带来取骨区疼痛、出血、感染或瘢痕等并发症,限制了其应用。同种异体骨作为取自同一种属的骨移植材料越来越受到人们的关注。排斥反应是早期同种异体骨的严重并发症,可引起宿主严重的变态反应^[5-6]。严格的供体选择及有效地灭菌方法是消除异体骨抗原性的最佳方法。本研究植入辐照冻干同种异体骨后未发现炎性细胞浸润及周围组织变性坏死,表明经特殊工艺处理的异体骨能够清除细胞表面抗原,抑制细菌生长,并具备良好的组织相容性。

同种异体骨经有效消毒灭菌后,其自身成骨细胞大部分已死亡,不具备自身成骨能力。胡永成^[7]等研究发现,同种异体骨移植后,移植骨是以破骨吸收为主。本次研究中,早期实验组中具有抑制破骨细胞分化的骨保护素(OPG)的表达低于对照组,这可能是由于经特殊灭菌处理的同种异体骨不具有自体骨所保留的成骨细胞,抑制破骨细胞的相关细胞因子如OPG的分泌减少,易造成破骨细胞的骨吸收。有学者研究发现^[8]同种异体骨植入宿主体内后,移植骨可作为宿主骨组织和新

生血管长入的支架和桥梁,利于新生骨的沉积,形成“爬行替代”。Lind^[9]等研究发现,同种异体骨移植4周后,在移植骨上出现破骨细胞和成骨细胞,并且移植骨段上的哈佛管扩大。王焱^[10]等通过实验研究证实,在植入同种异体骨后,组织形态学观察可见VEGF和MVD的高表达,并有血管长入移植骨段的孔隙间。由此可以看出,同种异体骨是以骨传导的方式促进骨缺损的愈合。有文献报道^[11-12],自体骨与异体骨修复愈合过程基本相同,但异体骨的愈合速度较自体骨缓慢,本组动物实验中骨组织形态计量学结果显示,术后12周两组BV/TV、Tb.N比较不存在统计学差异。并且测量骨密度值显示,两组骨密度比较无统计学差异。说明骨缺损修复晚期,自体骨与同种异体骨修复愈合过程及成骨量基本相同。可能是在骨缺损修复晚期,当大量成骨细胞及血管组织生成后,同种异体骨与自体骨修复方式趋于一致,因此两组骨缺损的愈合时间基本相同。

综上所述,同种异体骨作为骨移植材料,经辐照冻干处理的同种异体骨具有较好的组织相容性,其骨性愈合过程与自体骨移植相似,并且来源广泛,能够避免因自体骨移植带来的诸多并发症,是值得提倡的骨移植材料。

参考文献

- [1] 胡焱玉. 骨库的建立与管理. 中华骨科杂志, 1995, 15(1): 54-56
- [2] 郭文君, 王亦进, 王尊哲, 等. 激素诱发成年兔股骨头坏死的形态计量学研究. 中国体视学与图像分析, 2000, 5(1): 15-18
- [3] 于萍, 步宏, 王华, 等. 免疫组化结果的图像分析与人工计数方法的对比研究. 生物医学工程学杂志, 2003, 20(2): 288-290
- [4] Niederauer GG, Lee DR, Sankaran S. Bone Grafting in Arthroscopy and Sports Medicine. Sports Med Arthrosc, 2006, 14(3): 163-168
- [5] Mankin HJ, Doppelt SH, Sullivan TR. Osteoarticular and intercalary allograft transplantation in the management of malignant bone tumors of bone[J]. Cancer, 1982, 50: 613-630
- [6] Curtiss PH, Herndon CH. Immunological factors in homogenous bone transplantation: I. Serological studies [J]. J Bone Joint Surg (Am), 1956, 38: 103-110
- [7] 胡永成, 王志强, 孙世基, 李宝兴. 同种异体骨移植后的病理组织学观察. 中华骨科杂志, 2004, 24(10): 597-603
- [8] Enneking WF, Mindell ER. Observations on massive retrieved human allografts. J Bone Joint Surg (Am), 1991, 73: 1123-1142
- [9] Lind Lind M. Growth factors: possible new clinical tools. Acta Orthop Scand, 1996, 67(4): 407-417
- [10] 王焱, 李琪佳, 孙瑞军, 等. VEGF及微血管密度在同种异体骨及自体骨移植修复兔桡骨缺损中的表达. 中国修复重建外科杂志, 2010, 24(2): 230-234
- [11] Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the cranio-maxillofacial surgeon. J Craniofac Surg, 2005, 16(6): 981-989
- [12] 印卫锋, 陈苏, 方煌, 等. 同种异体骨材料复合自体浓缩红骨髓移植治疗良性骨肿瘤和瘤样病变. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(16): 3149-3152

作者单位: 063600 河北省乐亭县医院骨科¹
063600 河北省乐亭县医院手术室²
063000 华北煤炭医学院附属医院³