

## 脱钙松质骨的骨支架材料制备及其生物学检测\*\*\*

杨 渊<sup>1</sup>, 林春博<sup>1</sup>, 陈维平<sup>2</sup>

### Preparation and biological detection of demineralized cancellous bone scaffolds

Yang Yuan<sup>1</sup>, Lin Chun-bo<sup>1</sup>, Chen Wei-ping<sup>2</sup>

#### Abstract

**BACKGROUND:** Collagen is the main component of demineralized cancellous bone, because of its excellent three-dimensional space and growth factors that promote cellular proliferation and differentiation, it has a dual function of bone conduction and bone induction, but there are no amendments of a standard scientific preparation process.

**OBJECTIVE:** To prepare rabbit demineralized cancellous bone, to detect the porosity, degradation rate and biocompatibility, and to investigate the feasibility of demineralized cancellous bone used for tissue engineering scaffolds.

**METHODS:** Based on Urist's method, demineralized cancellous bone was prepared using a new method, and the porosity, *in vitro* degradation rate, cell viability and ossification ability of inducing bone marrow mesenchymal stem cells were determined. The experiment was divided into three groups at decalcification 3, 24, 48 hours. The other processing steps were the same.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The porosity of decalcification 3, 24, 48 hours was 76.56%, 81.25%, 84.38%; complete degradation time was 64, 59, 53 days, respectively. Cells in 1-3 days after incubation were latent phase, entered the logarithmic growth phase at 5 days, then entered the stagnate phase. The induced bone marrow mesenchymal stem cells were stained positive for alkaline phosphatase. The demineralized cancellous bone prepared by new methods has no toxicity and can meet the biological characteristics requirements of bone tissue engineering scaffold materials.

Yang Y, Lin CB, Chen WP. Preparation and biological detection of demineralized cancellous bone scaffolds. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(47):8769-8772. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

#### 摘要

**背景:** 脱钙松质骨的主要成分是胶原, 由于其良好的三维空间及促进细胞增殖分化的生长因子, 使其具有传导成骨和诱导成骨的双重功能, 但是目前没有修订出一个规范科学的制备流程。

**目的:** 采用新方法制备兔脱钙松质骨, 并检测其孔隙率、降解率及其生物相容性, 对其能否作为组织工程的支架材料进行评估。

**方法:** 在 Urist 方法的基础上采用新方法制备新西兰兔脱钙松质骨, 并对脱钙松质骨的空隙率、体外降解率、以及细胞活力和诱导骨髓间充质干细胞成骨能力进行检测。实验分为脱钙 3 h, 脱钙 24 h 和脱钙 48 h 组, 其他的处理步骤 3 组都相同。

**结果与结论:** 脱钙 3, 24, 48 h 组的孔隙率分别为 76.56%, 81.25%, 84.38%。完全降解所需时间分别为 64, 59, 53 d。细胞在种植后 1~3 d 为生长滞留期, 第 5 天达到对数生长期, 以后进入到平台期。诱导后的骨髓间充质干细胞行碱性磷酸酶染色呈阳性。结果提示, 新方法制备的脱钙松质骨对细胞无毒害作用, 在生物学特性上达到骨组织工程支架材料的要求。

**关键词:** 脱钙松质骨; 孔隙率; 降解率; 生物学检测; 骨组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.47.007

杨渊, 林春博, 陈维平. 脱钙松质骨的骨支架材料制备及其生物学检测[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(47):8769-8772. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

支架材料是骨组织工程不可或缺的因素之一<sup>[1]</sup>, 主要分为: ①钙磷陶瓷材料, 如羟基磷灰石等。②可降解天然高分子材料, 如脱钙松质骨等。③人工合成高分子材料, 如聚乳酸。④金属材料: 钛钢等。目前并没有找到特别理想的材料, 其中陶瓷类材料降解时间太长, 人工合成材料的机械性及生物相容性仍然不够满意, 金属类材料在生物相容性方面严重不足。

脱钙松质骨由于它良好的生物相容性, 良好的降解性, 满意的三维空间和较好的机械强度, 良好的成骨活性等特点, 自20世纪60年

代以来, 人们就对其进行了大量研究。1965年 Urist等<sup>[2]</sup>首次提出了脱钙骨基质具有成骨诱导能力。这一研究具有里程碑式的意义, 它使脱钙骨基质的研究在理论和临床两个方面都获得了长足而广泛的进展。1979年, Urist在兔骨中提炼出骨形态发生蛋白, 明确提出骨形态发生蛋白学说<sup>[3]</sup>, 使脱钙骨基质的骨诱导理论更具科学性, 随后人们对脱钙松质骨的制备进行了改良<sup>[4-5]</sup>, 但是目前没有修订出一个规范科学的制备流程。Urist的制备法历来被人们所推崇, 目前脱钙松质骨已广泛运用于组织工程研究<sup>[6-11]</sup>。脱钙松质骨的主要成分是胶原, 由于其良好的三维空间及促进细胞增殖分化的生长因子, 使其具有传导成骨和诱导成骨的双重功能, 可以作

<sup>1</sup>Guangxi Orthopaedic Traumatology Hospital, Nanning 530012, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; <sup>2</sup>Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yang Yuan, Professor, Guangxi Orthopaedic Traumatology Hospital, Nanning 530012, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China yangy062@sina.com

Supported by: a grant by Science and Technology Bureau of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 0816004-15\*; a grant by Health Bureau of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 200863\*; a grant by Science and Technology Bureau of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 0832157\*; a grant by Science and Technology Bureau of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 0592007-1G\*

Received: 2010-06-25 Accepted: 2010-08-02

<sup>1</sup>广西骨伤医院, 广西壮族自治区南宁市 530012; <sup>2</sup>广西医科大学, 广西壮族自治区南宁市 530021

杨渊, 男, 1962年生, 广东省湛江市人, 汉族, 1984年广西医科大学毕业, 教授, 主要从事脊柱外科及骨组织工程研究。yangy062@sina.com

中图分类号:R318  
文献标识码:B  
文章编号:1673-8225  
(2010)47-08769-04

收稿日期:2010-06-25  
修回日期:2010-08-02  
(20100810017/W-Y)

为修复骨缺损及骨组织工程的支架材料<sup>[1]</sup>。实验以脱钙松质骨材料为实验对象,研究了该组织工程支架材料的孔隙率、降解率及其生物相容性,对其能否作为组织工程的支架材料进行评估。

## 1 材料和方法

**设计:** 多组样本, 重复测量实验。

**时间及地点:** 实验于2009-10-01/2010-03-20在广西医科大学104馆基础中心实验室进行。

**材料:** 新西兰大白兔, 雄性, 体质量2 kg, 由广西医科大学动物实验中心提供。实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[12]</sup>。

**主要试剂及仪器:**

主要试剂及仪器	来源
无水乙醇, 乙醚, HCl, 环氧乙烷, DMEM	GIBICO
环氧乙烷, DMEM	
胎牛血清	HYCLON
胰蛋白酶、I 型胶原酶	SIGMA
AKP 染色试剂盒	南京建成
倒置相差显微镜	Olympus

**实验方法:**

**Huggins法:** 脱钙松质骨的制备最初是由Urist提出的<sup>[2]</sup>, 之后被Reddi和Huggins<sup>[3]</sup>改良。Huggins法: ①无水乙醇脱水2 h。②乙醚脱脂1 h, 风干0.5 h。③蒸馏水冲洗3次。④0.5 mol/L 盐酸脱钙3 h。⑤蒸馏水多次冲洗至pH为7.0左右为止。⑥无水乙醇脱水2 h。⑦乙醚脱脂1 h。⑧通风橱内通风过夜干燥。⑨<sup>60</sup>Co γ射线辐射消毒。⑩得到脱钙骨基质。

**新方法制备脱钙松质骨:** ①选用3个月龄健康雄性新西兰大白兔。环境温度(23±2) °C, 空气猝死。无菌条件下切取四肢长骨骨干, 剔除骨膜在内的软组织, 将皮质骨劈成骨条, 刮净松质骨和骨髓, 用摩尔造水机造 I 级水反复冲洗, 刮刷残血及骨髓, 直至水清。沥干后将骨条剪成骨屑, 剪断为大约4 mm×4 mm×4 mm的立方骨块, 见图1。

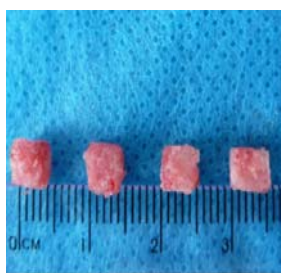


Figure 1 Trimmed cancellous bone  
图1 修剪好的松质骨骨块

②无水乙醇脱水4 h。③乙醚脱脂2 h, 风干0.5 h。④蒸馏水冲洗3次。⑤0.5 mol/L 盐酸脱钙, 分别脱钙3, 24, 48 h。⑥蒸馏水多次冲洗至pH为7.0左右为止。⑦无水乙醇脱水3 h。⑧乙醚脱脂1 h。⑨通风橱内通风过夜干燥。⑩环氧乙烷消毒。⑪得到脱钙松质骨, 备用, 见图2。



Figure 2 Prepared demineralized cancellous bone  
图2 制备完成的脱钙松质骨

**脱钙松质骨的生物学检测:**

**孔隙率的检测:** 计算出支架的表观体积为 $V_1$ , 将其浸入盛有体积为 $V_2$ 的灭菌三蒸水量筒内, 反复抽真空至量筒无气泡冒出, 此时量筒读数为 $V_3$ , 计算支架的孔隙率。

$$\text{孔隙率} P = (V_1 + V_2 - V_3) / V_1 \times 100\%$$

**降解率的检测:** 分别取用不同条件制备的脱钙松质骨各6块, 称质量3次, 取恒质量值 $m_1$ ; 将脱钙松质骨放入胰蛋白酶及 I 型胶原酶混合的液体中, 每2周取出脱钙松质骨风干后取恒质量值 $m_2$ , 计算降解率; 直至脱钙松质骨完全降解, 并记录时间, 记录支架每周降解率。

$$\text{降解率} P = (m_1 - m_2) / m_1 \times 100\%$$

**细胞活力检测:** 脱钙松质骨置于24孔板内, 将骨髓间充质干细胞以 $5 \times 10^5$ 滴加到脱钙松质骨内培养。每天以100 μL CCK-8液检测脱钙松质骨内的细胞, 每天测3个脱钙松质骨, 450 nm波段连续测8 d的A值, 根据A值绘制细胞生长曲线。

**诱导骨髓间充质干细胞成骨能力检测:** 将骨髓间充质干细胞滴加到脱钙松质骨内培养21 d后, 细胞爬片, 按照碱性磷酸酶定性染色试剂盒(重氮盐偶联法)行碱性磷酸酶染色。

**主要观察指标:** 脱钙松质骨的孔隙率, 降解率, 细胞活力, 成骨诱导能力。

**设计、实施、评估者:** 设计者为第一作者, 实施、评估者为全体作者。

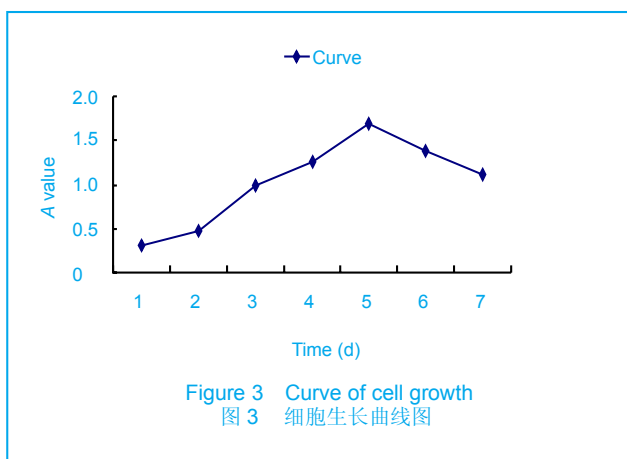
## 2 结果

**2.1 脱钙松质骨的孔隙率** 根据公式: 脱钙3 h组  $P = (0.64 + 5 - 5.15) / 0.64 \times 100\% = 76.56\%$ ; 脱钙24 h组  $P = (0.64 + 5 - 5.12) / 0.64 \times 100\% = 81.25\%$ ; 脱钙48 h组

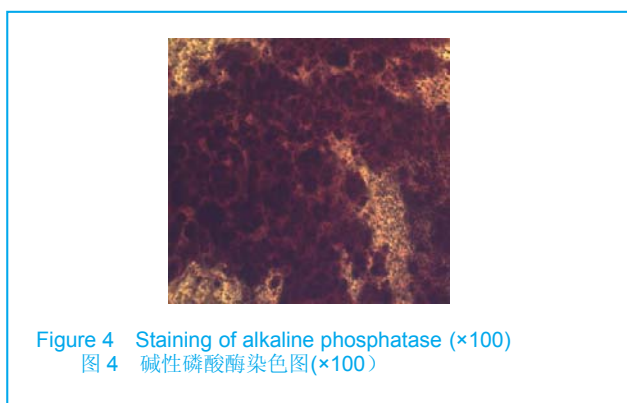
$P=(0.64+5-5.10)/0.64\times 100\%=84.38\%$ 。

**2.2 脱钙松质骨的降解率** 根据公式脱钙骨基质在体外生理降解液中降解时, 0~2周降解率分别为脱钙3 h组14.19%, 脱钙24 h组16.57%, 脱钙48 h组18.29%, 2~4周降解率分别为脱钙3 h组29.52%, 脱钙24 h组35.43%, 脱钙48 h组38.10%, 4~6周降解率分别为脱钙3 h组48.76%, 脱钙24 h组55.62%, 脱钙48 h组64.38%, 6~8周降解率分别为脱钙3 h组80.38%, 脱钙24 h组88%, 脱钙48 h组100%。完全降解所需时间: 脱钙3 h组: 64 d; 脱钙24 h组: 58 d; 脱钙48 h组: 51 d。

**2.3 细胞活力检测** 细胞在种植后1~3 d为生长滞后期, 第5天达到对数生长期, 以后进入到平台期, 见图3。



**2.4 诱导骨髓间充质干细胞成骨的能力检测** 碱性磷酸酶定性染色AKP(重氮盐偶联法): 按照说明书染色, 细胞核呈紫色, cAKP阳性者胞浆中出现红至红棕色颗粒, 有些为棕褐色或咖啡色颗粒; 对照组细胞核紫色, 胞浆未染色, 见图4。



### 3 讨论

理想的组织工程支架材料的孔隙率应达到80%以上, 这能为细胞的均匀分布和生长提供足够的空间。Li等<sup>[13]</sup>测定的部分脱钙骨的孔隙率为(77.15±3.44)%。雷

荣昌等<sup>[14]</sup>用液体静力称重法测量猪松质骨孔隙率为(78.26±2.01)%, Pan等<sup>[15]</sup>检测脱钙松质骨的孔隙率为(77.8±2.8)%, 本实验中所测平均孔隙率为80.73%, 结果较接近国内外其他实验室测定的结果<sup>[16-18]</sup>。

理想的组织工程支架材料应具备良好的生物降解性<sup>[19]</sup>, 即降解速度应与组织再生的速度相匹配。支架材料降解过快则达不到支撑和塑形作用, 过慢则影响新生组织的生长及其结构。支架材料在体液中的降解还与材料的物理、化学性质有密切关系, 材料晶相结构、孔隙率会影响降解过程<sup>[20]</sup>。

本实验结果显示, 脱钙松质骨在体外生理液中的降解时间为八九周, 与Song等<sup>[21]</sup>报道的脱钙松质骨的体外降解时间相符。且随降解时间的延长, 降解速度明显加快, 这与细胞的增殖规律是相近的<sup>[22]</sup>。从实验结果可以发现支架材料孔隙率较大, 降解速度也较快。由此推测: 支架材料孔隙率越大, 它的相对表面积也越大, 从而能与体外降解液充分接触, 于是质量损失率增大, 降解速度加快。

生物相容性是组织工程材料支架在应用前首先要解决的问题<sup>[1]</sup>, 对细胞无毒害作用是其必须具备的特征之一。Zheng等<sup>[23]</sup>通过体内植入法证实脱钙松质骨与骨髓间充质干细胞具有良好的生物相容性, 且具有体内成骨及成软骨能力。周勇等<sup>[24]</sup>将脱钙松质骨颗粒复合材料植入骨缺损处, 其与组织的相容性良好, 修复取得满意效果。李强等<sup>[25]</sup>将同种异体脱钙松质骨基质材料复合自体骨髓间充质干细胞修复全层关节软骨缺损, 证实植入物与组织有良好的生物相容性。Sundar等<sup>[26]</sup>运用修复肌腱, 行组织学等观察未发现排异反应。此外, 还有许多研究<sup>[27-29]</sup>。

体内移植脱钙松质骨, 均未无组织和细胞毒害作用。体内直接植入由于受体内多种环境因素的影响, 反映植入物整体情况, 不能单独反映生物材料与组织细胞的相容性; 而体外复合细胞培养法具有易于控制实验条件, 可直接观察细胞与生物材料复合生长的情况等特点, 有利于了解细胞与材料相互作用。

本实验采用兔骨髓间充质干细胞与脱钙松质骨在体外复合培养, 是为了了解这种天然材料对兔骨髓间充质干细胞是否具有毒害作用, 为骨组织工程修复骨缺损寻找适合的基质材料。

从复合脱钙松质骨后细胞的A值及细胞生长曲线来看, 细胞潜伏期为一两天, 第5天进入对数增长期, 第六七天进入衰退期。这基本与作者前期报道的骨髓间充质干细胞的生长情况相符<sup>[30]</sup>。此外, 本实验制备的脱钙松质骨具有诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的能力, 其诱导的骨髓间充质干细胞行AKP染色呈阳性。

综上所述, 本研究制备的脱钙松质骨在孔隙率, 降解率, 生物相容性方面达到了骨组织工程支架材料的要

求, 其中脱钙24 h的制备方法综合结果较优。

#### 4 参考文献

- [1] E Z,Liu L.Beijing:Beijing chubanshe. 2002:409-422.  
鄂征,刘流.医学组织工程技术及临床应用[M].北京:北京出版社,2002:409-422.
- [2] Urist MR, Silverman BF,Baryi K, et al. The bone indwcbion principle. Clin Orthop Relat Res.1967;53: 243-283.
- [3] Reddi AH, Huggins C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. Proc Natl Acad Sci USA. 1972; 69: 1601-1605.
- [4] Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science.1965;150(698) : 893-899.
- [5] Urist MR. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. Proc Natl Acad Sic USA.1979;76 (4) : 1828-1932.
- [6] Martin GJ, Boden SD, Titus L. New formulations of demineralized bone matrix as a more effective graft alternative in experimental posterolateral lumbar spine arthrodesis. Spine.1999;24: 637-645.
- [7] Tan H, Yang B, Duan X.The promotion of the vascularization of decalcified bone matrix in vivo by rabbit bone marrow mononuclear cell-derived endothelial cells. Biomaterials.2009;30(21):3560-3566.
- [8] Ji WF, Ding WH, Ma ZC,et al.Three-tunnels core decompression with implantation of bone marrow stromal cells (bMSCs) and decalcified bone matrix (DBM) for the treatment of early femoral head necrosis. Zhongguo Gushang.2008;21(10):776-778.
- [9] Tang H, Xu Z, Qin X, et al.Chest wall reconstruction in a canine model using polydioxanone mesh, demineralized bone matrix and bone marrow stromal cells. Biomaterials.2009;30(19):3224-3233.
- [10] Alanay A, Wang JC, Shamie AN,et al.A comparison of commercially available demineralized bone matrix for spinal fusion. Eur Spine J.2007;16(8): 1233-1240.
- [11] Liu G, Li Y, Sun J, et al.In vitro and in vivo evaluation of osteogenesis of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on partially demineralized bone matrix. Tissue Eng Part A. 2010;16(3): 971-982.
- [12] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.  
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30
- [13] Li Q, Tang JC, Wang RY, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009,13(47):9257-9260.  
李强,唐际存,王锐英,等.完全脱钙松质骨的生物学特性[J].中国组织工程研究与临床康复[J]. 2009;13(47):9257-9260.
- [14] Lei RC,Jian XC.Shengwu Yixue Gongcheng yu Linchuang. 2006; 10(3):128-130.  
雷荣昌,翦新春.松质骨支架的制备及结构特征观察[J].生物医学工程与临床.2006, 10(3):128-130.
- [15] Pan Y, Dong SW, Hao Y, et al. Demineralized bone matrix gelatin as scaffold for tissue engineering. African J Microbiology Research. 2010;4(9):865-870.
- [16] Liu G, Sun J, Li Y, et al.Evaluation of Partially Demineralized Osteoporotic Cancellous Bone Matrix Combined with Human Bone Marrow Stromal Cells for Tissue Engineering: An In Vitro and In Vivo Study.Calcif Tissue Int.2008;83(3):176-185.
- [17] Yin H, Cui L, Liu G, et al.Vitreous cryopreservation of tissue engineered bone composed of bone marrow mesenchymal stem cells and partially demineralized bone matrix. Cryobiology.2009; 59(2):180-187.
- [18] Liu G, Shu C, Cui L, et al.Tissue-engineered bone formation with cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells. Cryobiology.2008;56(3):209-215.
- [19] Li ZH.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(47):9372.  
李章华.骨组织工程支架材料在临床中的应用[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(47):9372.
- [20] Sun MY,Yang YW,Mao TQ,et al.Yixue Yanjiusheng Xuebao. 2004; 17(3): 210-221.  
孙沐逸,杨耀武,毛天球,等.由异种骨制备的多相钙磷陶瓷肌内降解性能的研究[J].医学研究生学报,2004,17(3):210-221.
- [21] Song HX, Li FB, Shen HL, et al. Repairing articular cartilage defects with tissue-engineering cartilage in rabbits. Chin J Traumatol.2006; 9(5):266-271.
- [22] Djouad F, Pience P, Bony C, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. J Dent Res.1996;75(4): 1045-1051.
- [23] Zheng D, Yang S, Li J, et al. Experimental study on allogenic decalcified bone matrix as carder for bone tissue engineering. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci.2004;24(2): 147-150.
- [24] Zhou Y,Chen S,Fan QY.Zhongguo Gu Zhongliu GB. 2008;7(6): 361-363.  
周勇,陈硕,范清宇.异体DBM骨粒复合rhBMP-2及骨水泥材料修复骨缺损的实验研究[J].中国骨肿瘤骨病,2008,7(6):361-363.
- [25] Li Q,Tang JC,Sun ZY.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008,12(45): 8943-8947.  
李强,唐际存,孙正义.同种异体脱钙松质骨基质材料复合自体骨髓间充质干细胞修复全层关节软骨缺损[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(45):8943-8947.
- [26] Sundar S, Pendegrass CJ, Blunn GW.Tendon bone healing can be enhanced by demineralized bone matrix: A functional and histological study. J Biomed Mater Res B Appl Biomater.2009; 88(1):115-122.
- [27] Vilalta M, Jorgensen C, Décano IR, et al.Dual luciferase labelling for non-invasive bioluminescence imaging of mesenchymal stromal cell chondrogenic differentiation in demineralized bone matrix scaffolds. Biomaterials.2009;30(28):4986-4995.
- [28] Katz JM, Nataraj C, Jaw R, et al. Demineralized bone matrix as an osteoinductive biomaterial and in vitro predictors of its biological potential. J Biomedical Materials Research.2009;89(1): 127-134.
- [29] Bigham AS, Dehghani SN, Shafiei Z, et al.Experimental bone defect healing with xenogenic demineralized bone matrix and bovine fetal growth plate as a new xenograft: radiological, histopathological and biomechanical evaluation.Cell tissue bank.2009;10(1):33-41.
- [30] Zhang X,Lin CB,Yang Y,et al.Guangxi Zhongyi Xueyuan Xuebao. 2009;12(4):4-6.  
张璇,林春博,杨溯,等.优化分离及培养骨髓间充质类成纤维样集落细胞的实验研究[J].广西中医学院学报,2009,12(4):4-6.

#### 来自本文课题的更多信息一

**基金资助:** 广西科技厅资助项目(桂科攻 0816004-15); 广西卫生厅资助项目(重 200863), 广西科技厅资助项目(桂科自 0832157), 广西科技厅资助项目(桂科攻 0592007-1G)。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**课题的创新点:** 实验以脱钙松质骨材料为实验对象, 研究了该组织工程支架材料的孔隙率、降解率及其生物相容性, 对其能否作为组织工程的支架材料进行评估。

**课题评估的“金标准”:** 由于支架材料一直处于摸索阶段, 目前没有公认的“金标准”。本实验的评估是根据国内外的评价主流设计评价项目。

**提供临床借鉴的价值:** 课题的成功实施能为骨组织工程修复骨缺损提供充分实验依据, 为临床运用脱钙松质骨复合种子细胞治疗骨缺损, 骨坏死等打下坚实的基础。