

# 异种松质骨修复兔桡骨节段性骨缺损\*\*

魏冀荣<sup>1</sup>, 章莹<sup>2</sup>, 林永亮<sup>3</sup>

## Xenogeneic cancellous bone for repairing segmental bone defects in rabbit radius

Wei Ji-rong<sup>1</sup>, Zhang Ying<sup>2</sup>, Lin Yong-liang<sup>3</sup>

### 文章亮点:

- ①应用了环氧化物固定专利技术制备生物型异种骨不仅能稳定去除材料抗原性, 还能最大程度保留骨胶原结构。
- ②主要根据解剖学观察、影像学观察及组织学观察评价生物型异种松质骨的骨修复作用。

### Abstract

**BACKGROUND:** Xenogeneic cancellous bone has a natural porous structure that facilitates the ingrowth of new bone. Besides, its antigenicity can be eliminated completely after treatment and cannot induce immune rejection. Moreover, it has good bone conduction.

**OBJECTIVE:** To evaluate the effect of xenogeneic bone on the repair of segmental bone defects in rabbit radius.

**METHODS:** Totally 36 rabbits (4-6 months old, 2.5-3.5 kg, no gender limitations) were randomly divided into three groups: experimental group, control group and blank group. A rabbit model of 15 mm-long segmental bone defects in the radius was established. Rabbits in the experimental group were implanted with biological xenogeneic bone, and those in the control group were implanted with deep frozen allogenic bone, while the blank group had no treatment. At weeks 4, 8 and 12 after operation, rabbits in the three groups were observed by general observation, anatomy observation, X-ray examination and histological examination.

**RESULTS AND CONCLUSION:** At weeks 4, 8 and 12 after operation, bone defects in the experimental and control groups were repaired gradually, but no repair was found in the blank group. The radiographic and histological scores were both higher in the experimental and control groups than the blank group ( $P < 0.05$ ). The radiographic and histological scores between the experimental and control groups had no significant difference. These results suggest that biological xenogeneic bone is good to repair bone defects; in addition, the repair effect of biological xenogeneic bone is the same as that of xenogeneic bone.

Wei JR, Zhang Y, Lin YL. Xenogeneic cancellous bone for repairing segmental bone defects in rabbit radius. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(29): 5379-5383. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 异种松质骨具有天然多孔结构, 有利于新骨长入, 经处理可完全消除抗原性, 不引起免疫排斥反应, 具有良好的骨传导性能。

**目的:** 评价异种骨修复兔桡骨节段性骨缺损的效果。

**方法:** 将 36 只新西兰白兔随机均分 3 组, 制作单侧 15 mm 桡骨节段性骨缺损模型, 实验组植入生物型异种骨, 对照组植入深冻兔自体骨, 空白组未植骨。术后 4, 8, 12 周进行一般情况、大体解剖、X 射线及组织学观察。

**结果与结论:** 术后 4, 8, 12 周实验组与对照组骨缺损逐步修复, 空白组骨缺损未修复, 实验组与对照组影像学和组织学评分均高于空白组( $P < 0.05$ ), 实验组与对照组影像学和组织学评分差异无显著性意义。表明生物型异种骨可较好修复骨缺损, 修复效果与自体骨相当。

**关键词:** 异种骨; 自体骨; 骨缺损; 再血管化; 骨愈合; 兔; 生物材料

魏冀荣, 章莹, 林永亮. 异种松质骨修复兔桡骨节段性骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(29):5379-5383. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

骨肿瘤、关节融合及各种创伤造成的骨缺损都需要植骨。生物型异种骨作为自体骨及异

体骨的替代材料备受关注, 谭新宇等<sup>[1]</sup>研究表明生物型异种骨钉具有良好的生物相容性和生物力学性能, 但生物型异种松质骨作为填充材料, 其促进骨缺损修复效果尚需进一步验证。本实验中, 作者将环氧固定技术制备的异种松质骨

<sup>1</sup>School of Graduated Student, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China;  
<sup>2</sup>Department of Traumatic Orthopedics, General Hospital of Guangzhou Military Command of Chinese PLA, Guangzhou 510510, Guangdong Province, China;  
<sup>3</sup>Department of Research and Development, Guangdong Guanbao Biological Technology Company, Guangzhou 510663, Guangdong Province, China

Wei Ji-rong\*, Master, Physician, School of Graduated Student, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China  
fimmtrumpet@qq.com

Corresponding author: Zhang Ying, Doctor, Master's supervisor, Chief physician, Department of Traumatic Orthopedics General Hospital of Guangzhou Military Command of Chinese PLA, Guangzhou 510510, Guangdong Province, China

Supported by: the Major Special Project of the Biological Industry in Guangzhou City in 2008, No. 2008A1-E4051\*

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.29.013

Received: 2012-03-22  
Accepted: 2012-05-01

<sup>1</sup>南方医科大学研究生院, 广东省广州市 510515; <sup>2</sup>解放军广州军区广州总医院骨科医院创伤骨科, 广东省广州市 510010; <sup>3</sup>广东冠昊生物科技有限公司研发部, 广东省广州市 510663

魏冀荣★, 男, 1985年生, 山西省太原市人, 汉族, 2012年南方医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事骨缺损修复方面研究。  
firmutrupet@qq.com

通讯作者: 章莹, 博士, 硕士生导师, 主任医师, 解放军广州军区广州总医院骨科医院创伤骨科, 广东省广州市 510010

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 2095-4344 (2012)29-05379-05

收稿日期: 2012-03-22  
修回日期: 2012-05-01  
(20120322010/GW · T)

植入兔桡骨节段性缺损模型, 观察不同时期解剖学、影像学及组织学变化, 并与深冻兔异体骨对比, 探讨此生物型异种骨修复节段性骨缺损的效果, 为进一步临床试验提供安全性和有效性依据。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 于2010-09/2011-09在广东冠昊生物科技有限公司动物中心完成。

**材料:**

**实验动物及分组:** 4~6月龄新西兰白兔36只, 体重2.5~3.5 kg, 雌雄不拘, 由广东冠昊生物科技有限公司动物中心提供。随机均分为实验组、对照组与空白组。

**实验仪器:**

仪器	来源
常规手术器械	广东冠昊生物科技有限公司动物中心
XD4-2型X射线机	上海华线医用核子仪器有限公司
OlympusBH2生物显微镜	美国
RM-2145型组织切片机	德国 Leica 公司

**骨修复材料:**

生物型异种松质骨: 由广东冠昊科技股份有限公司采用已获得美国专利授权(US6106555A, US6231614B1)的环氧交联固定技术制备。

深冻兔异体骨: 取新西兰大白兔(与实验白兔同批次)双侧桡骨加工成20 mm骨段, -70 °C深冻2周, 1:1氯仿甲醇浸泡除脂, 蒸馏水超声清洗, 使洗涤液pH值介于6.0~7.0, 冰冻干燥机干燥。

**实验方法:**

**模型制作与分组干预:** 于3组兔左侧桡骨截骨造成15 mm节段性骨缺损, 材料修整后植入卡紧, 实验组植入生物型异种骨, 对照组植入深冻兔异体骨, 空白组不植骨, 逐层缝合。

**术后观察与取材:** 术后一般观察包括动物饮食、活动、伤口等。术后4, 8, 12周从各组选4只动物处死, 取左侧桡骨行大体解剖观察, 摄X射线行影像学观察, 取实验组、对照组植骨

部位行组织学观察, 切片厚度4 μm, 并按Lane<sup>[2]</sup>影像学 and 骨移植组织学评分标准评分。

**Lane影像学评分标准:**

成骨程度	评分	连接程度	评分	骨髓腔改建程度	评分
无成骨	0分				
新成骨占缺损区的25%	1分	骨折线完全可见	0分	无改建迹象	0分
新成骨占缺损区的50%	2分	可见部分骨折线	2分	骨髓腔再通	2分
新成骨占缺损区的75%	3分	未见骨折线	4分	骨髓腔再通后形成皮质骨结构	4分
新成骨占缺损区的100%	4分				

**Lane骨移植组织学评分标准:**

连接情况	评分	松质骨	评分	皮质骨	评分
无连接	0分	无骨细胞活性	0分	无皮质骨形成	0分
纤维连接	1分	新骨早期聚集	1分	皮质骨生长的早期表现	1分
骨与类骨连接	2分	有活性的新骨聚集	2分	皮质骨正在形成	2分
骨连接	3分	松质骨正在改造	3分	大部分被改造	3分
骨干重建	4分	松质骨完全形成	4分	皮质骨完全形成	4分

**主要观察指标:** 各组兔骨缺损修复效果。

**统计学分析:** 由第一作者采用SPSS 13.0软件包进行统计分析。

## 2 结果

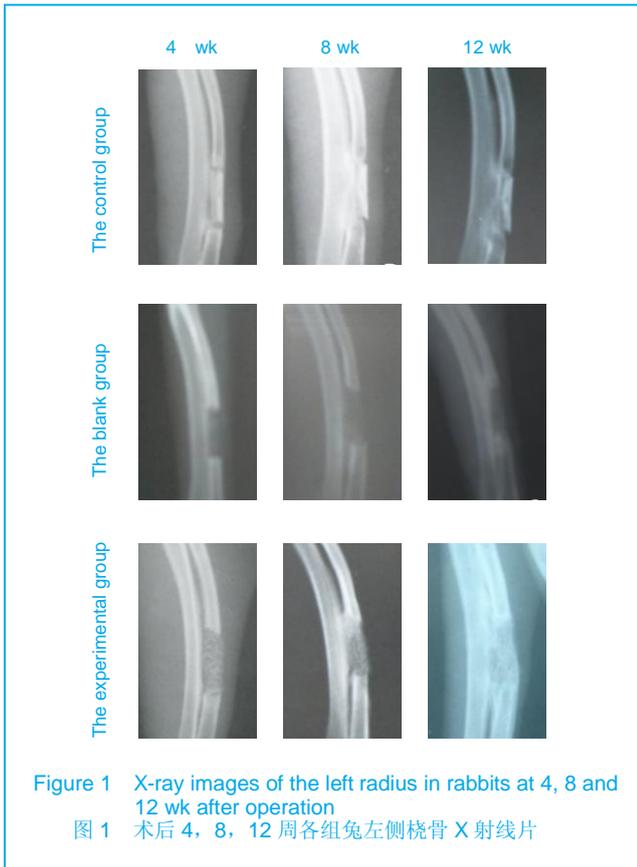
**2.1 实验动物数量分析** 36只兔均进入结果分析。

**2.2 动物术后一般情况** 术后第1天动物少量饮食, 第2天正常饮食, 活动少, 患肢呈保护性姿势, 1周左右饮食活动基本正常。切口术后前3 d轻度肿胀, 四五天逐渐消肿, 2周左右愈合。未见明显分泌物、感染及排斥反应。

**2.3 各组桡骨大体解剖观察结果** 实验组术后4周时材料完整, 材料内部及周围少量骨痂形成, 交界处开始模糊, 8周时材料基本完整, 较多骨痂, 有血管翳长入, 交界处融合; 12周时材料部分降解, 骨痂及血管翳增多, 交界处进

一步融合。对照组术后4周时材料完整, 色泽苍白, 仅交界处有少量骨痂, 折线尚清; 8周时材料部分碎化, 色泽苍白, 交界处骨痂增多, 折线可见; 12周时材料部分碎化, 骨痂增多, 未见血管翳, 交界处融合。空白组骨缺损始终未修复, 被软组织填充, 断端髓腔逐渐闭合。

#### 2.4 各组桡骨影像学观察结果 见图1。



由图1可见, 实验组术后4周时桡骨中段见低密度植入物影, 少量骨痂, 骨折端模糊, 骨折线可见; 8周时植入物外形可辨, 密度增高, 骨痂增多, 骨折线模糊; 12周植入物内部见高密度影, 新骨增多, 密度与临近皮质骨接近。对照组4周桡骨中段等密度植入物影, 少量骨痂, 折线清, 断端边缘模糊; 8周皮质骨轮廓仍可见, 周边少量骨痂, 骨折线模糊; 12周骨移植区可见骨痂包裹高密度轮廓, 骨折线模糊。空白组断段逐渐模糊, 骨缺损始终未修复。

2.5 各组桡骨影像学评分结果 整体采用3×3析因方差分析, 各组术后4, 8, 12周时影像学评分递增, 各观察点3组比较差异有显著性意义( $F=85.245$ ,  $P=0$ )。组间两两比较采用Bonferroni检验, 实验组与空白组, 对照组与空白组差异均有显著性意义( $P < 0.05$ ), 实验组与对照组差异无显著性意义( $P=0.851$ ), 见表1。

表1 各组桡骨 Lane 影像学评分结果  
Table 1 Lane radiographic scoring results of the radius in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )

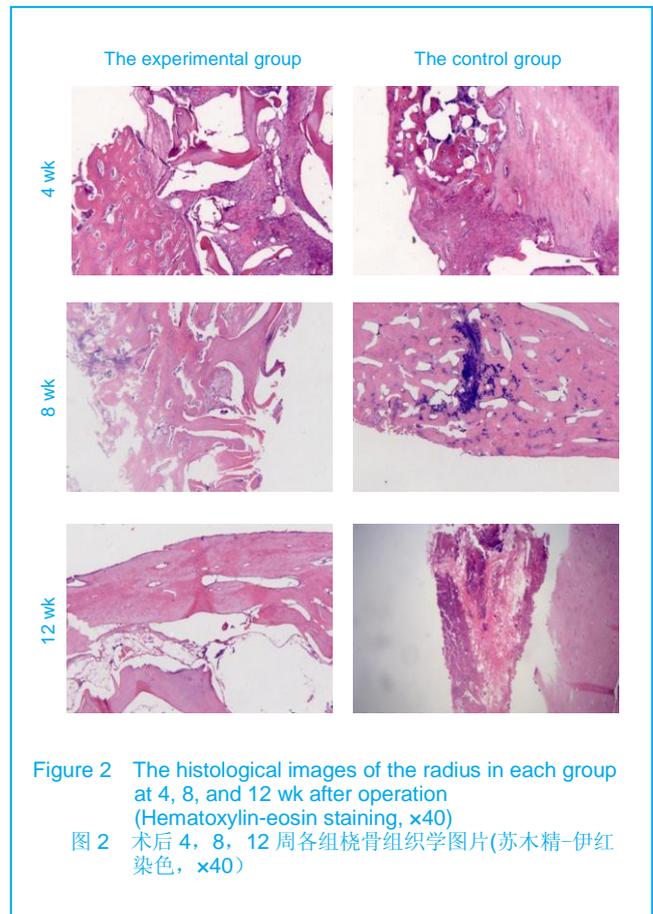
Group	4 wk	8 wk	12 wk
Experimental	3.25±0.96 <sup>a</sup>	5.00±0.82 <sup>a</sup>	7.75±1.50 <sup>a</sup>
Control	3.75±1.26 <sup>a</sup>	5.25±0.50 <sup>a</sup>	8.25±0.96 <sup>a</sup>
Blank	0.50±0.58	1.25±0.50	2.00±0.82

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. blank group

#### 2.6 各组组织学观察结果

**实验组:** 术后4周时材料内见毛细血管, 新骨及类骨组织沉积, 交界区形成骨连接; 8周时新生毛细血管及新骨增多, 可见成骨细胞、巨噬细胞、少量炎细胞; 12周时材料部分降解, 大量新骨形成骨小梁结构, 可见大量毛细血管。

**对照组:** 术后4周时见皮质骨结构, 无新生微小血管, 少量炎细胞聚集, 交界区见骨连接; 8周时材料为无活性皮质骨, 可见巨噬细胞、炎细胞活跃, 交界处融合; 12周时材料已碎化, 周边较多新生骨组织, 内部未见毛细血管, 见图2。



2.7 各组组织学评分结果 整体采用2×3析因方差分析, 术后4, 8, 12周时实验组与对照组组织学评分递增,

各观察点实验组与对照组评分差异无显著性意义 ( $F=0.194$ ,  $P=0.665$ ), 见表2。

Group	4 wk	8 wk	12 wk
Experimental	4.75±1.26	6.75±1.71	8.25±1.26
Control	4.50±1.29	7.25±1.50	8.75±1.26

### 3 讨论

**3.1 骨移植材料的再血管化与“爬行替代”** 骨移植材料植入后需经历时间长短不同的“爬行替代”，主要取决于宿主成骨速度及材料降解速度两方面，这两方面的共同基础是骨缺损区的血供情况。

Burkus<sup>[3]</sup>认为骨组织生成有5个基本条件：①成骨细胞或具有成骨细胞分化潜能的间充质细胞。②骨传导基质。③生物力学环境。④移植物再血管化。⑤骨诱导刺激物。其中移植物再血管化尤为重要。实验组材料术后4周时已有血管翳包裹，8，12周时血管翳持续增多，镜下可见材料内部局灶性新生骨组织与材料相交替，血管内皮细胞形成管腔样结构。综合各时间点解剖观察及组织学观察结果，在血管翳尚未长入实验组材料内部时，降解吸收和新骨形成主要发生在移植物表面，随着血管翳长入，移植物发生再血管化，材料内部出现了内皮样细胞，毛细血管为新骨再生和材料降解提供了良好的微环境，不仅带来更多巨噬细胞、间充质干细胞以及细胞因子，还带走降解产物，材料的降解吸收、再血管化、新骨形成在移植物不同部位同时进行。再血管化程度高的部位，新骨形成和材料降解都很活跃，未血管化的部位，虽然也接触到体内微环境，但却不主动降解，此特性保证了只在成骨活跃部位发生“爬行替代”，其他部位继续保持材料完整性，可始终提供力学支撑及“爬行替代”的支架，避免过早降解，发生植骨“丢失”。

朱肖奇等<sup>[4]</sup>研究也发现，天然松质骨在体外降解缓慢，植入体内后凭借良好的三维结构早期再血管化，宿主成骨细胞逐渐长入，并形成含骨源性生长因子的细胞外间质，诱导间充质细胞向软骨细胞或成骨细胞分化，形成新骨，骨源性生长因子可趋化破骨细胞、多核巨细胞聚集并降解材料。

**3.2 生物型异种松质骨修复骨缺损的效果** 本实验主

要根据解剖学观察、影像学观察及组织学观察评价生物型异种松质骨的骨修复作用。量化指标主要是影像学评分及组织学评分。研究发现，实验组与对照组在各时间点影像学评分差异无显著性意义，而与空白组差异均有显著性意义，表明两种材料均可促进骨缺损修复。骨修复作用主要包括骨生成，骨诱导，骨传导<sup>[5]</sup>。生物型异种松质骨是一种单纯支架材料，本身只具有骨传导作用，无成骨及骨诱导作用，但材料具有较好表面微环境，有利于材料在植入早期获得骨诱导能力。材料表面微环境主要是指材料表现特性，一般规律为表面粗糙、亲水性强、高表面自由能的材料有利于种子细胞黏附、铺展和生长<sup>[6]</sup>。

生物型异种松质骨孔隙率为72%~75%，具有天然三维结构，有利于营养物质弥散及再血管化，且制备过程中还将可黏附生长因子及细胞的多肽、糖胺聚糖偶联到材料表面，包括微孔内表面，使材料易于被种子细胞及细胞因子附着，从而在植入体内后获得诱导及促进新骨再生的生物活性。这可能是实验组再血管化及“爬行替代”较对照组快的原因。对照组所用的深冻兔异体骨取自兔桡骨，始终未见再血管化，“爬行替代”也相对缓慢，但由于兔个体间差异小，加之对照组材料为管状骨，有利于髓腔再通，因此也具有良好的骨修复作用。综合起来，生物型异种松质骨的骨缺损修复效果与兔异体骨相当，再血管化发生较早。

**3.3 异种骨移植的优势与展望** 胡蕴玉等<sup>[7]</sup>研究认为异种松质骨的优势有：①与异体骨相当的生物相容性。②天然多孔结构，有利于新骨长入。③降解产物与宿主骨质降解产物具有同源性。④经处理后基本可完全消除抗原性，不引起免疫排斥反应。⑤具有良好的骨传导及生物力学性能。其中免疫原性是异种骨移植首先须要克服的问题<sup>[8-9]</sup>。目前很多方法被用来去除异种材料的免疫原性，如深低温冷冻、煮沸、辐照、高温煅烧等<sup>[10-11]</sup>，但很多方法在消除抗原的同时，都不同程度破坏了材料的天然结构<sup>[12-13]</sup>，本实验所用的生物型异种骨在制备过程中应用了环氧化物固定专利技术。经环氧交联固定的生物型异种骨不仅能稳定去除材料抗原性，还能最大程度保留骨胶原结构<sup>[14]</sup>，加之其来源极其广泛，在解剖形状、组织结构等方面具有一定优越性，还可在进一步研究与种子细胞及细胞因子复合，因而具有十分广阔的应用前景。

致谢：感谢导师章莹教授的悉心指导，感谢广东冠昊生物科技股份有限公司及其动物中心对本实验提供资金和技术支持。

#### 4 参考文献

- [1] Tan XY,Liu DH.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.2009;13(51):10121-10124.  
谭新宇,刘德华,章莹.异种皮质骨作为骨折内固定材料:可自行吸收与初始力学性能的限制[J].中国组织工程与临床康复,2009,13(51):10121-10124.
- [2] Lane JM,Sandhu HS.Current approaches to experimental bone grafting.Orthop Clin North Am.1987;18(2):213.
- [3] Burkus JK.Surgical treatment of the painful motion segment: matching technology with indication. Spine (Phila Pa 1976). 2005;30(16 Suppl):715.
- [4] Zhu XQ,He YL,Ma XF,et al.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.2008;12(3):417-422.  
朱肖奇,贺用礼,马雪峰,等.生物衍生骨与骨髓间充质干细胞复合修复兔桡骨大段缺损[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(3):417-422.
- [5] Gao CY, Sun G, Hao DM. Zhongguo Zhuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.2009;13(3):475-478.  
高春阳,孙革,韩冬梅.异种骨支架材料的研制及相关表征[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(3):475-478.
- [6] Duda M,Pajak J.The issue of bioresorption of the Bio-Oss xenogeneic bone substitute in bone defects. Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med.2004;59(1): 269-277.
- [7] Hu YY,Lu YP,Liu W.Zhonghua Guke Zazhi. 1990;10(1):33-66.  
胡蕴玉,陆裕朴,刘伟.异种骨移植修复骨缺损实验研究[J].中华骨科杂志,1990,10(1):33-66.
- [8] Vanaclocha V,Bazan A,Saiz-Sapena N,et al.Use of frozen cranial vault bone allografts in the repair of extensive cranial bone defects.Acta Neurochir.1997;139(7):653-660.
- [9] Ellis E 3rd,Sinn DP.Use of homologous bone in maxillofacial surgery. J Oral Maxillofac Surg.1993;51(11):1181-1193.
- [10] Johnson GS,Mucalo MR,Lorier MA.The processing and characterization of animal-derived bone to yield materials with biomedical applications. Part I: Modifi able porous implants from bovine condyle cancellous bone and characterization of bone materials as a function of processing. J Mater Sci Mater Med.2000;11(7):427-441.
- [11] Guizzardi S,Martini D,Bacchelli B,et al.Effects of heat deproteinate bone and polynucleotides on bone regeneration: an experimental study on rat. Micron. 2007;38(7):722-728.
- [12] Nyman JS,Reyes M,Wang X.Effect of ultrastructural changes on the toughness of bone. Micron.2005;36(7-8):566-582.
- [13] Anderson IA,Mucalo MR,Johnson GS,et al.The processing and characterization of animal derived bone to yield materials with biomedical applications. Part III: material and mechanical properties of fresh and processed bovine cancellous bone. J Mater Sci Mater Med.2000;11(11):743-749.
- [14] Liu HH,Zhang Y. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(50):9946-9949.  
刘汉辉,章莹.肌腱损伤修复过程及粘连的预防[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(50):9946-9949.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金声明:** 广东冠昊生物科技股份有限公司及其动物中心对本实验提供资金和技术支持, 课题名称: 骨诱导型可降解吸收生物活性骨修复材料产业化, 项目类型: 2008 年度广州市生物产业重大专项项目 (2008A1-E4051)。

**作者贡献:** 第一作者进行实验设计与实验实施, 资料收集, 成文, 通讯作者对实验评估、审校, 并对文章负责, 第三作者协助实验实施。

**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。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

#### 文章概要:

**文章要点:** ①采用环氧化物固定技术制备的生物型异种骨。②评价异种骨修复兔桡骨节段性骨缺损的效果。

**关键信息:** ①异种松质骨具有天然多孔结构, 有利于新骨长入, 经处理可完全消除抗原性, 不引起免疫排斥反应, 具有良好的骨传导性能。②生物型异种松质骨孔隙率为 72%~75%, 具有天然三维结构, 有利于营养物质弥散及再血管化, 且制备过程中还将可黏附生长因子及细胞的多肽、糖胺聚糖偶联到材料表面, 包括微孔内表面, 使材料易于被种子细胞及细胞因子附着, 从而在植入体内后获得诱导及促进新骨再生的生物活性。

**研究的创新之处与不足:** 生物型异种骨修复骨缺损效果与异体骨相当, 更容易获得, 可通过环氧固定专利技术温和解决异种骨去抗原问题, 如能产业化将具有广泛的应用前景和良好的社会效益, 不足在于各组样本量较少, 有待进一步研究。