

硫酸钙作为微小颗粒骨载体的实验研究

刘欣¹ 贾广义¹ 闫景龙²

(1 哈尔滨市第一医院 150010 2 哈尔滨医科大学附属第一医院 150001)

摘要 目的: 研究硫酸钙作为微小颗粒骨载体, 解决微小颗粒骨的自身缺点的实际效果, 为其临床应用提供依据。方法: 将49只日本大耳白兔随机分成4组并通过手术造成双侧桡骨中段1.5cm骨缺损, 以植入硫酸钙为载体的自体微小颗粒骨为实验组, 同时设立单纯植入自体微小颗粒骨, 单纯植入硫酸钙和不植入任何物质的空白对照组。术后4周和8周分别行大体观察, X线摄片, 组织学观察, 骨生物力学测定。结果: 以硫酸钙为载体的自体微小颗粒骨组比单纯自体微小颗粒骨组及单纯硫酸钙组能更有效地修复骨缺损, 单纯颗粒骨组成骨效果优于单纯硫酸钙组。空白组无骨愈合迹象; 组织学观察示以硫酸钙为载体的自体微小颗粒骨实验组的成骨效果最好, 单纯自体微小颗粒骨组次之; 生物力学测定证明以硫酸钙为载体的自体微小颗粒骨实验组的力学强度优于单纯自体微小颗粒骨组及单纯硫酸钙组。结论: 硫酸钙是微小颗粒骨的优良载体, 以硫酸钙为载体的自体微小颗粒骨成骨速度快, 成骨量多, 质量高, 骨的机械强度高, 修复骨缺损的能力较单纯应用微小颗粒骨和硫酸钙强; 二者结合可充分发挥各自的优势。

关键词: 颗粒骨; 硫酸钙; 载体

中图分类号: R322.7 **文献标识码:** A

Study on calcium sulphate as the carrier of the autogenous micromorselized bone

LIUXin, JIA Guang-yi, YAN Jing-long

1 First hospital, Harbin, 150010

2 The first hospital affiliated to Harbin Medicine Science University, Harbin, 150001

ABSTRACT Objective: To probe the ability of the calcium sulphate as the carrier of the autogenous micromorselized bone, to solve the defects of micromorselized bone, and to provide the proof for the clinic. **Methods:** The animal models of bilateral radius bone defect were created by surgery in Japan white big ear rabbits, the experimental group was implanted the autogenous micromorselized bone whose carrier is calcium sulphate, while in the control groups, some was implanted the autogenous micromorselized bone, some was implanted the calcium sulphate, and others was implanted nothing. The bone defect were observed by gross examination, X-ray examination, histopathological examination and biomechanics' determination at 4, 8W. **Results:** The experimental group repaired the bone defect more effectually than the control group. In the control group, autogenous micromorselized bone did better than calcium sulphate and there is no phenomenon of healing in the group implanted nothing. The quality and rate of the new formation bone in the examination group was the best. The effect of biomechanics in the examination group was statistically significant different with the group implanted the autogenous micromorselized and the group implanted the calcium sulphate.

Conclusion: The calcium sulphate is the good carrier of the autogenous micromorselized bone. The autogenous micromorselized bone carried by calcium sulphate forms more bone, whose quality, rate and biomechanics is excellent, and has more ability of repairing the bone defect than the group implanted the autogenous micromorselized bone or calcium sulphate.

Key word: Autogenous micromorselized bone; Calcium sulphate; Carrier

前言

骨缺损的治疗一直是骨科的难点问题。具有成骨能力, 不发生免疫反应的自体骨, 尤其是自体微小颗粒骨是临床的首选^[1]。但自体骨来源有限, 颗粒骨结构松散、易溃散^[2]。这些都限制了自体骨的临床应用。

硫酸钙来源广泛, 塑形性良好, 在体内能够完全降解^[3]。将硫酸钙与自体微小颗粒骨按一定比例混合后治疗骨缺损, 是否可以发挥各自的优势呢?

基于此我们设计了本实验, 探讨将硫酸钙与自体微小颗粒骨结合是否可以发挥各自的优势, 提高骨缺损的修复效率。

1 材料与方法

1.1 动物模型的制备及分组:

作者简介: 刘欣, 男, (1972-), 医学硕士, 主治医师, 从事临床骨科疾病的诊疗工作。

(收稿日期: 2006-03-12 接受日期: 2006-04-30)

1.1.1 制备: 用3%戊巴比妥钠按1mg/kg体重行耳缘静脉注射麻醉, 常规术区消毒, 取双侧桡骨外侧纵行切口, 长约3.0cm, 逐层切开皮肤及皮下组织, 暴露桡骨中段, 切除1.5cm桡骨及骨膜, 造成骨缺损模型。

1.1.2 分组: 取健康成年日本大耳白兔49只(均为雄性), 体重2.0~2.5kg。将其随机分成4组: A组: 植入自体微小颗粒骨100毫克+硫酸钙100毫克。B组: 植入200毫克自体微小颗粒骨。C组: 植入200毫克硫酸钙。D组: 空白对照。(C组1只因切口局部化脓感染死亡。D组1只因腹泻死亡。)

1.2 实验方法

1.2.1 自体微小颗粒骨的制备: 切取兔的一侧胫骨, 去除骨膜及软骨, 置于0.9%生理盐水中。生理盐水完全浸泡胫骨, 以磨钻低速研磨。使胫骨在生理盐水中磨制成微小颗粒, 然后将混有此种骨粒的生理盐水用网孔直径为400 μ m的丝网进行筛选, 最后将混有微小骨粒的生理盐水在离心机中以3000r/min的速度离心5min, 使自体微小颗粒骨沉积于离心管底, 弃去上清液, 即可得到300~400 μ m微小颗粒骨。

1.2.2 自体微小颗粒骨与硫酸钙的复合: 取硫酸钙(CaSO₄·2H₂O)粉末100mg与自体微小颗粒骨100mg混合并适当加入生

理盐水搅拌均匀。约 5min 后呈橡皮泥状。按兔桡骨形态塑型并准备植入。

2 结果

2.1 大体观察:

A 组:4 周可见有较多骨痂生成,骨缺损区有连续骨痂通过,而且骨痂形状较均匀,表面光滑,可见少量硫酸钙颗粒未被吸收,表面有薄层纤维结缔组织包裹。8 周呈现管状骨结构,重建骨外形光滑,硫酸钙颗粒消失,无明显纤维包裹。

B 组:4 周后有较多骨痂生成,骨缺损区有连续骨痂通过,但是骨痂形状不规则,分布不均匀,表面较粗糙,表面无纤维结缔组织包裹。8 周呈现管状骨结构,重建骨外形粗糙不平整,无明显纤维包裹。

C 组:4 周后于骨断端与硫酸钙交接处有较多骨痂形成,且骨痂形状规整,但骨痂不连续,可见较多硫酸钙颗粒,外周可见大量纤维组织包裹。8 周可见连续骨痂,表面粗糙,周围有纤维组织包裹。

D 组:4 周无骨性愈合迹象,缺损处被纤维组织填塞。8 周空白对照组骨折断端之间被纤维组织充填,无骨性连接,髓腔封闭。

2.2 X 线观察:

A 组:4 周骨缺损断端已出现骨性连接,部分髓腔再通。8 周新生骨塑形改建,髓腔再通,基本恢复正常骨干结构。

B 组:4 周可见骨断端间有骨性连接但连接的骨薄弱、纤细。8 周骨缺损处已骨性连接,髓腔部分再通,新生骨塑形改建比 A 组差。

C 组:4 周于移植骨两端可见片状成骨影像,移植骨中部透过度较两周前增大。8 周成骨量增多,骨缺损断端基本骨性连接,部分髓腔形成。

D 组:4 周两骨断端有轻度硬化、增生。8 周可见骨断端完全硬化,髓腔封闭,骨缺损略缩小。

2.3 组织学观察

A 组:4 周骨缺损中大量编织骨形成,连接成片,原始髓腔形成。可见脱钙处理后,硫酸钙溶解所遗留的空隙。8 周新生骨已由编织骨转变成板层骨,骨缺损修复基本完成,塑形改建充分,髓腔再通。

B 组:4 周骨小梁形成较 A 组稀疏,形态不规则。8 周骨缺损处被新生编织骨填充,可见板层骨影像,骨髓腔部分再通。

C 组:4 周骨缺损间可大量硫酸钙颗粒(呈淡蓝色),填充物两端有少量编织骨形成,未见纤维结缔组织。8 周硫酸钙颗粒基本消失,骨缺损处有新生编织骨填充,仅见少量板层骨,髓腔未通。

2.4 生物力学测定:

8 周 A 组最大抗弯曲负荷,弯曲刚度值均高于 B 组($t_1=11.1>2.75, P_1<0.01$)($t_2=21.03>2.75, P_2<0.01$)有统计学意义。B 组最大抗弯曲负荷、弯曲刚度值高于 C 组($t_1=33.94>2.76, P_1<0.01$)($t_2=22.44>2.76, P_2<0.01$)亦有统计学意义。

3 讨论

骨缺损是临床常见的外科疾病,目前主要采用自体骨移植、异体骨移植、人工合成替代品移植等方法修复骨缺损^[4]。这些方法各有优缺点,都难以完全满足临床上修复骨缺损的需要。

3.1 自体微小颗粒骨的成骨优势及其缺陷

直径为 300–500 μ m 的微小颗粒骨在异位成骨过程中,可以释放多种生长因子,而且这些生长因子的释放量大,高峰提前且持续时间长,诱导的骨量多^[5]。

在实验中将自体骨制成 300–500 微米的微小颗粒骨,增加了表面积,使细胞易于得到营养,保留了更多的存活细胞。颗粒骨的孔隙众多易于小血管的长入,这些都将加快其成骨作用。研究表明成骨的早期,自体微小颗粒骨的成骨是以众多颗粒骨为中心的多点同时成骨,它以三种方式进行成骨,骨传导作用成骨,骨生成作用成骨,骨诱导作用成骨。微小颗粒骨具备的这些特点,使它可以很好的修复骨缺损^[6]。

自体微小颗粒骨仍有许多缺陷。它不具备良好的支架作用,力学强度差,松散易溃散,难于塑形,加之自体取骨量有限,这些都使其临床应用受到限制。找到颗粒骨的良好支架,将会更加充分地发挥自体微小颗粒骨的成骨优势,使其临床应用的前景更加广阔。

3.2 硫酸钙作为自体微小颗粒骨载体的成骨优势

“硫酸钙”又名“石膏”用作骨缺损填充修复材料已达百年之久,其具有遇水固化性,塑形性好,不溃散,同时具有良好的生物相容性,在体内能够完全被降解吸收,对周围组织不产生炎症和异物刺激作用。因而目前硫酸钙已广泛应用于矫形外科、五官科、齿科骨缺损的修复^[7]。硫酸钙固化后与骨质紧密相连,在硫酸钙自身被吸收的同时发生同位的新骨生成,也就是硫酸钙在原来的位置上被新生骨替代^[8],这种特性使硫酸钙能够成为颗粒骨的优良载体。同时硫酸钙来源广泛,价格便宜^[9],与同等量的胶原、磷酸钙骨水泥相比有明显价格优势。

以硫酸钙为载体的自体颗粒骨具有良好的塑形性,改善了颗粒骨的自身比较松散,缺少支架的固定,容易移位溃散,难于塑形的缺点,同时也发挥了硫酸钙的优良生物性能。同时硫酸钙的应用没有减弱或破坏自体微小颗粒骨的成骨性能。实验证明以硫酸钙为载体的自体微小颗粒骨成骨性能优于单纯的颗粒骨。

在本实验中通过大体标本观察发现硫酸钙能有效的粘附微小颗粒骨,使微小颗粒骨几乎不流失,因此产生的骨痂形状较均匀,且表面光滑。X 线检查显示以硫酸钙为载体的颗粒骨组成骨的数量、质量及外观均好于单纯颗粒骨组与单纯硫酸钙组。组织学检查结果显示 4 周时实验组已有大量成片编织骨出现,原始髓腔再通。8 周时板层骨形成良好,骨痂改造塑形基本完成,髓腔再通。其成骨速度明显快于颗粒骨组与硫酸钙组。生物力学测定结果也显示出实验组的最大抗弯曲负荷、弯曲刚度值高于其他两组。以上情况可能是积于以下原因:1、硫酸钙与颗粒骨均匀混合在一起后,能有效避免颗粒骨的溃散,减少种子细胞和生长因子的丢失,使有效的种子细胞和生长因子实际上比单纯的颗粒骨多。2、随着硫酸钙的分解吸收,使局部的钙离子浓度明显升高^[10],这为颗粒骨的成骨创造了有利的外部环境,为成骨细胞提供了充足的“生产原料”。3、早期硫酸钙与颗粒骨均匀混合凝固后,形成了较多孔隙,可能更有利于细胞的长入,以及毛细血管的长入。由于硫酸钙在体内代谢较快,大部分于 4 周时已降解吸收,其所遗留的孔隙于后期有利于细胞及毛细血管的进一步生长。4、硫酸钙与微小颗粒骨混合后形成相互物理遮挡,这可能对颗粒骨释放出的多种生长因子起缓释作用。同时颗粒骨的存在延缓了硫酸钙的降解速度,这对早期维持移植物的形态及局部长期有效的高钙环境是有利的。

(下转第 46 页)

表 4 所有样本不同基因型间临床特征的比较
Table 4 Comparison of clinical characteristics between the genotypes of all LPL

变量	组别			P
	P+ P+ 型	P+ P- 型	P- P- 型	
年龄(岁)	50.34±13.65	50.94±13.35	50.68±12.26	0.974
身高(cm)	164.71±7.23	163.96±8.35	163.11±7.59	0.676
体重(kg)	68.93±12.43	62.96±10.22	64.05±12.22	0.028
BMI(kg/m ²)	25.35±3.98	23.32±2.60	23.97±3.70	0.008
腰围(cm)	65.38±28.01	73.63±27.97	79.03±22.58	0.137
臀围(cm)	75.63±31.03	83.72±26.43	87.14±23.71	0.245
WHR	0.90±0.07	0.88±0.18	0.90±0.06	0.783
收缩压(mmHg)	132.72±21.12	132.54±21.81	132.03±21.81	0.991
舒张压(mmHg)	80.86±15.78	82.79±17.17	80.09±11.70	0.686
空腹血糖(mmol/L)	9.36±5.65	10.32±4.35	8.78±5.54	0.310

本研究首次采用两种实验设计方法探讨 LPL 基因 Pvu ⑤多态性与湖北汉族人群 T2DM 相关性,即以未受累同胞为对照进行同胞对设计以及随机病例-对照设计。由于同胞对在生活方式、遗传背景等方面相似,进行统计分析时,可避免人群混居和分层产生偏倚,而随机病例-对照设计可克服同胞研究的过度匹配,两种结果互相补充。我们发现 LPL 基因 Pvu ⑤酶切多态性的基因型频率和等位基因频率在 T2DM 病例组和对照组间无显著性差异,推测湖北地区汉族人群 LPL 基因 Pvu ⑤酶切多态性与 T2DM 无明显关联。但 T2DM 患者体重、BMI、血压等显著高于对照组,推测肥胖、高血压是 T2DM 的独立危险因素。

由于研究对象的种族、地域差异,选择标准的不同以及 T2DM 的遗传异质性,许多研究结果并不一致^[7-9]。目前认为,内含子上的突变不会造成 LPL 氨基酸顺序和蛋白质结构的改变。我们所研究的 Pvu ⑤多态性与 T2DM 无显著相关性,可能该位点多态性对 LPL 的功能没有影响,也可能是本研究的样本量太少,限制了统计的准确性。因此,有必要通过大样本量和更多的标记位点进一步研究 LPL 基因多态性的改变对 LPL 功能的影响,阐明 LPL 基因多态性与 T2DM 的关系。

参考文献

[1] King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: Prevalence, numerical estimates, and projections [J]. Diabetes

Care, 1998,21(9): 1414~ 1431

[2] Haffner SM, Miettinen H, Insulin resistance implications for type ⑤diabetes Mellitus and coronary heart disease[J]. Am J Med, 1997, 103(2): 152~ 162

[3] 杨涛,林青云,曾文和,等.中国人 2 型糖尿病合并高甘油三酯血症患者脂蛋白脂酶基因突变及功能分析[J].中国医学科学院学报,2003,25(2): 134~ 141

[4] 许曼音.糖尿病学[M].第一版.上海:上海科学技术出版社,2003: 17

[5] Peacock E, Hansten A, Peter NE, et al. Association between LPLgene polymorphism and plasma correlations of lipids, lipoprotein and lipase activities in young MI survivors and age- matched healthy individuals from Sweden[J]. Atherosclerosis, 1992, 97(2): 171~ 178

[6] Jemma R, Fumeron F, Poirier O, et al. Lipoprotein lipase gene: associations with myocardial infarction and lipoprotein levels, the ECTIM study [J]. J Lipid Res, 1995, 36(12): 2141~ 2146

[7] Wang X L, McGredie R M, Wilcken D E. Common DNA polymorphisms at the lipoprotein lipase gene: association with severity of coronary artery disease and diabetes[J]. Circulation, 1996, 93(7): 1339~ 1345

[8] 沈洪兵,俞顺章,徐耀初,等.2 型糖尿病患者脂蛋白脂酶基因 Pvu ⑤酶切多态性的观察[J].中华医学遗传学杂志,2000, 17(1): 24~ 27

[9] 向光大,王颖群,夏邦顺,等.2 型糖尿病患者脂蛋白脂酶基因多态性与冠心病关系的研究[J].中华内分泌代谢杂志,2001, 17(6): 368~ 369

(上接第 40 页)

本实验通过大体观察、X 线检察、组织学观察、以及生物力学测定得出结论:以硫酸钙为载体的自体颗粒骨比单纯颗粒骨或单纯硫酸钙能更有效地修复骨缺损。硫酸钙作为颗粒骨的载体,解决了颗粒骨自身比较松散,缺少支架固定,容易移位溃散,难于塑形等问题。

参考文献

[1] 夏景君,闫景龙,张志鹏,等.颗粒骨和块状骨对骨髓基质细胞作用的实验研究[J].哈尔滨医科大学学报,2003,36(2): 141~ 143

[2] 张滨.硕士研究生毕业论文.微小颗粒骨在异位成骨过程中 BMP 的表达[D].哈尔滨:哈尔滨医科大学,2003, 5: 51~ 61

[3] Hogset O, Bredberg G. Plaster of paris: Thermal properties and biocompatibility[J]. Acta otolaryngol, 1986, 101: 445~ 52

[4] 刘好源,董星杰,应可满,等.自身骨泥成骨活性的实验研究[J].中

国矫形外科杂志,1999, 6(6): 440~ 443

[5] 侯占江,闫景龙,付海亮,等.微小颗粒骨异位成骨过程中成纤维细胞生长因子的表达[J].中华创伤杂志,2003, 19(12): 734~ 737

[6] 王宏伟,闫景龙,张滨,等.微小颗粒骨在异位成骨过程中 TGF- β1 的表达[J].临床骨科杂志,2004, 7(2): 217~ 221

[7] Coetzee AS. Regeneration of bone in the presense of calcium sulphate[J]. Arch otolaryngol, 1980, 106: 405~ 409

[8] Pelier LF. The use of plaster of paris to fill defects in bone[J]. Clin orthop RelatRes, 1961,21: 27~ 31

[9] Sidqui M, Collin P, Vitte C, et al. Osteoblast adherence and resorption activity of isolated osteoclasts on calcium sulphate hemihydrat[J]. Biomaterials, 1995, 16(17): 1327~ 1332

[10] Bell WH. Resorption characteristics of bone and bone substitutes[J]. Oral Surg O- ral Med.Oral Pathol, 1964, 17: 650~ 57