

文章编号:1000-582X(2004)07-0040-05

## Kiel 骨理化性能的实验分析\*

何创龙,王远亮,杨立华,张军,曹阳,吴科达

(重庆大学生物工程学院生物力学与组织工程教育部重点实验室,重庆 400030)

**摘要:**对牛密质 Kiel 骨的理化性能进行了研究,分析了 Kiel 骨的理化性能和其临床应用之间的关系,以便对 Kiel 骨的性能进行改进并寻找异种骨材料加工的新方法。采用牛腿骨骨干根据 Salama 报道的方法制备了 Kiel 骨,并对材料进行红外光谱(FTIR)、X 射线衍射光谱(XRD)、差热扫描分析(DSC)、单轴拉伸力学性能测试。结果表明经过一系列处理后,Kiel 骨的无机成分主要是与人骨天然成分相同的羟基磷灰石,同时这种加工方法对有机成分的脱除并不彻底,经  $H_2O_2$  处理后,胶原蛋白只发生变性而并没有被脱除,这种结构变化使 Kiel 骨的力学性能下降。Kiel 骨由于脱除了主要的免疫原性物质,其它的弱抗原物质发生蛋白质变性,其免疫原性较弱,但由于蛋白质变性降低了它的力学强度,同时也影响了胶原蛋白的生理功能,使植入材料的成骨性能较差,影响了其在临床上的广泛应用,采用温和的脱蛋白剂替代强氧化剂能够改善 Kiel 骨的理化性能。

**关键词:** Kiel 骨;制备;理化性能

**中图分类号:** Q 819

**文献标识码:** A

寻找合适的骨修复材料一直是骨科和生物材料领域的一个研究热点,目前临床上使用的修复材料主要有自体骨、异体骨、合成材料等。各种材料都具有各自的优点,其中天然异种骨具有来源丰富、价格低廉和良好的生物相容性,成为骨修复材料的一个重要来源。用来作为异种骨修复材料的天然异种骨主要有牛骨、猪骨、鹿骨、绵羊骨等,其中猪骨和牛骨原料易得,是研究最多的异种骨材料,尤其是牛骨的尺寸和力学性能更符合移植骨的要求。

为了避免异种骨植入后引起的免疫排斥反应,必须脱除异种骨的免疫原性成分,因此,异种骨的加工方法至关重要。目前,异种骨的加工方法主要有高温煅烧、冻干、脱脂、脱蛋白和脱钙等。1957年, Martz 等<sup>[1-2]</sup>采用  $H_2O_2$  浸泡等方法脱除牛骨的蛋白成分,获得了一种称为 Kiel 骨的脱蛋白骨,随后的几十年里,Kiel 骨一直在临床上获得广泛的应用,但由于该方法并不能完全脱除异种骨的所有蛋白成分而可能引起免疫排斥反应,对它的临床应用效果还存在一定的争议。

关于 Kiel 骨的临床应用的文献报道较多<sup>[3-4]</sup>,笔者采用文献报道的方法制备了 Kiel 骨,并采用红外光谱、X 射线衍射光谱、差热扫描分析和单轴拉伸力学性能测试等方法对 Kiel 骨进行了理化性能研究,分析 Kiel 骨的理化性能和其临床应用效果之间的关系,以便对加工方法进行适当的改进。

### 1 实验

#### 1.1 Kiel 骨的制备

屠宰场获得的新鲜牛腿骨经充分去除软组织、软骨和骨髓后,洗净,干骺端分离,骨干锯成一定的尺寸,按照文献[3]的方法制备 Kiel 骨,将骨条放入 20% 过氧化氢溶液中(38℃)72 h,每 24 h 更换 1 次过氧化氢溶液。换液时,再次去除软组织残渣,用流水冲洗后乙醇脱脂 24 h,再用丙酮干燥。

#### 1.2 分析与检测

##### 1.2.1 红外光谱

Perkin Elmer 公司生产的 Spectrum GX 型傅里叶红外光谱仪用于红外光谱测试。将骨块研磨成骨粉,

\* 收稿日期:2004-03-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270395,19872082)

作者简介:何创龙(1971-),男,江西九江人,重庆大学博士研究生,从事生物材料和组织工程的研究。

KBr 压片, 获得分辨率为  $4.0 \text{ cm}^{-1}$  的  $4\,000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$  之间的红外扫描光谱图。

### 1.2.2 X 射线衍射光谱

骨粉干燥后采用日本理学电机株式会社生产的 D/MAX-1200 型 X 射线衍射光谱仪, 以  $\text{CuK}\alpha$  射线 ( $\lambda = 0.154\,05 \text{ nm}$ ) 为射线源, 工作电压为  $40 \text{ kV}$ , 工作电流为  $100 \text{ mA}$ , 扫描角度为  $10 \sim 90^\circ$ , 测试样品中无机成分的组成和晶体结构。

### 1.2.3 差热分析法

德国 NETZSCH 公司生产的 STA449C 综合热分析仪对试样进行热分析。称取  $10 \text{ mg}$  左右的试样, 仪器的温度以基准  $\text{Al}_2\text{O}_3$  来较准, 升温范围为  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  到  $400 \text{ }^\circ\text{C}$ , 升温速度为  $15 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ , 记录试样的 TG 曲线和 DSC 曲线。

### 1.2.4 含水量和其它成分的测定

采用 Broz 等<sup>[5]</sup>报道的方法测定骨块的含水量和其它成分含量。

### 1.2.5 胶原的测定

采用 Woessner 法<sup>[6]</sup>测定骨中的羟脯氨酸含量, 根据羟脯氨酸对总胶原蛋白的比率约为  $0.1$ , 计算总的胶原含量。Perkin Elmer MBA2000 分光光度计用于比色测定。

### 1.2.6 力学性能的检测

先将试样制成  $80 \text{ mm} \times 4 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$  的骨条, 再加工成哑铃形, 两个夹头中间的部位尺寸为  $25 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ , 采用 Instron 1011 力学性能测试仪, 将骨块放在加载平台上, 保持骨块长轴和加载平台垂直, 骨块上下平面与加载平台平面平行, 进行骨块拉伸实验, 记录载荷-变形曲线, 记录最大载荷, 计算骨块最大载荷极限。测试装置采用  $500 \text{ kN}$  的传感器, 设置横梁移动速度为  $5 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 红外光谱

图 1 是各种样品的红外光谱图, 其中 (a) 为商业化的羟基磷灰石 (HA); (b) 为未处理牛骨骨粉; (c) 为最终制备的 Kiel 骨粉。

从 Kiel 骨的红外谱图可以看出, 在  $3\,436 \text{ cm}^{-1}$  和  $1\,662 \text{ cm}^{-1}$  出现水的拉伸振动和弯曲振动吸收峰, 表明试样中含有少量水分; 在  $1\,452 \text{ cm}^{-1}$  和  $1\,409 \text{ cm}^{-1}$  是骨基质矿物质中  $\text{CO}_3^{2-}$  的一部分不对称振动吸收峰, 表明骨矿中含有部分碳酸盐; 在  $1\,032 \text{ cm}^{-1}$  处出现的强峰是  $\text{PO}_4^{3-}$  的 P-O 键的不对称拉伸振动峰, 而在  $562 \text{ cm}^{-1}$  和  $603 \text{ cm}^{-1}$  出现的中等强度峰是由  $\text{PO}_4^{3-}$  的 O-P-O 弯曲振动引起的, 在更低波数处还可分别观

察到磷酸盐的基本振动;  $871 \text{ cm}^{-1}$  还可观察  $\text{HPO}_4^{2-}$  的基本振动峰。在  $1\,400 \sim 1\,700 \text{ cm}^{-1}$  可观察到胶原相关键的振动, 并与其它峰部分重叠, 表明  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理并不能脱除异种骨的胶原蛋白, 只能使所含的蛋白质变性来降低或消除异种骨的抗原性, 这与罗卓荆等<sup>[7]</sup>的报道相近, 他们发现骨基质中的氨基酸总量随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理时间的延长并无明显降低, 而羟脯氨酸及脯氨酸在氨基酸总量中所占比例也未发生明显改变, 没有表现出大量去除蛋白的现象。未处理骨在  $2\,927 \text{ cm}^{-1}$  处由于骨粉中残留脂肪中的 C-H 键的拉伸振动有一尖锐峰, 表明原骨中含有一定量的脂肪, Kiel 骨经  $\text{H}_2\text{O}_2$  和乙醇处理后, 该峰已不明显, 表明 Kiel 骨中脂肪含量很低。

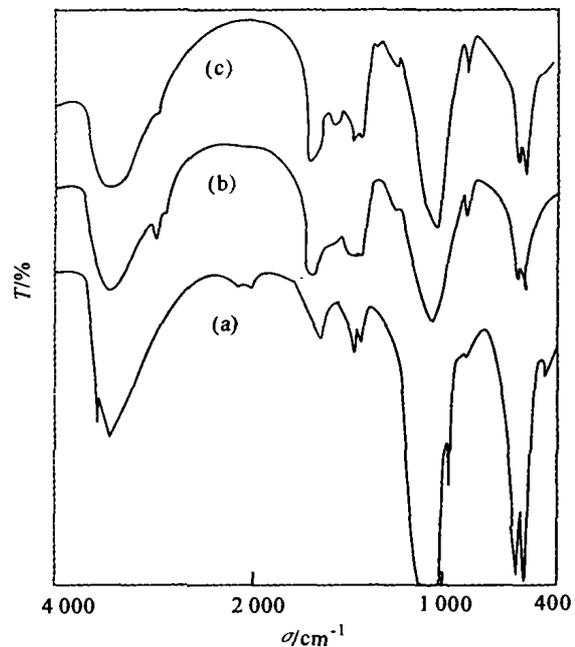


图 1 试样的红外光谱图

### 2.2 X 射线衍射分析

图 2 给出了不同样品的 XRD 衍射谱图, 其中 (a) 为商业化的 HA; (b) 为未处理牛骨骨粉; (c) 为 Kiel 骨粉。从衍射图谱可以看出由于含有胶原蛋白和微量脂肪等有机物质, 未处理骨和 Kiel 骨含有较多的非晶成分。其中羟基磷灰石的特征峰为 (211) (300) (210) (310) (112) 等, 与 JCPDS (9-432) 羟基磷灰石的衍射数据能较好符合, 表明材料中主要的晶相成分是羟基磷灰石, 结合红外光谱, 可以确定 Kiel 骨的骨矿成分主要是碳酸盐羟基磷灰石。

### 2.3 差热分析法

图 3 是 HA 的差热分析曲线。可以看出 HA 的差热曲线在实验温度范围内没有明显的变化, 近似一水

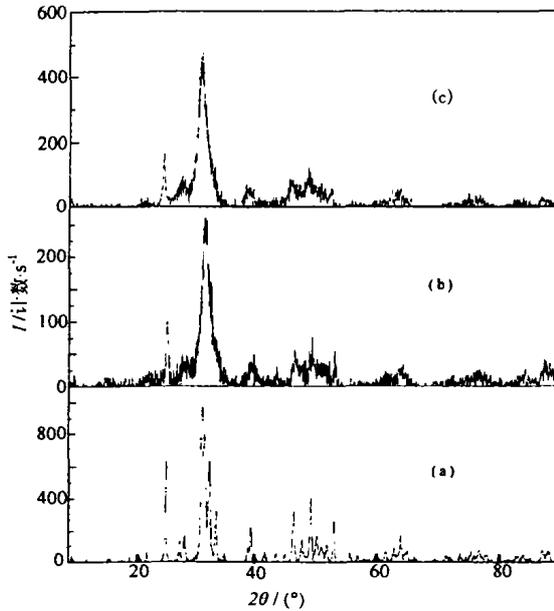


图2 试样的X射线衍射光谱图

平直线,表明它比较稳定。图4是Kiel骨的差热分析曲线和热重(TG)曲线。文献[8-9]报道在骨的差热分析中出现了三次明显的热变化。包括(1)从常温到130℃之间由于骨和胶原基质中水的逸出而出现的吸热峰;(2)在250~300℃为蛋白质和脂肪等有机物燃烧的放热峰;(3)600~900℃晶格中碳酸盐的分解导致晶相转变的吸热峰。在本文的实验温度范围内Kiel骨中有水逸出和有机物燃烧两个特征阶段,其中,106℃左右的吸热峰是由水逸出引起的,在300℃左右出现的放热峰是由胶原蛋白和残余脂肪燃烧引起的,从热重曲线可以看出,在实验温度范围内Kiel骨的失重为21.48%,初步可以确定其中非矿物成分的含量。表1给出了其它方法测得的各种成分的含量,由于采用的加热温度不同,结果也有一定的差别。

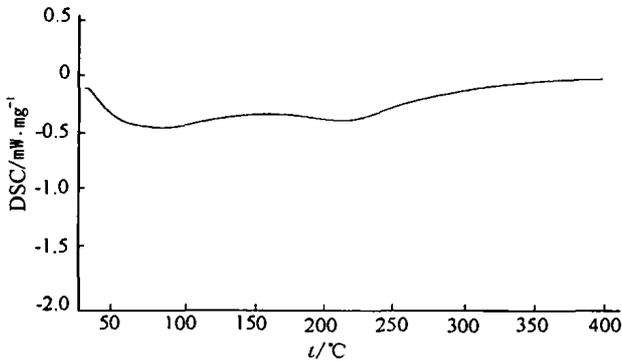


图3 HA的DSC曲线

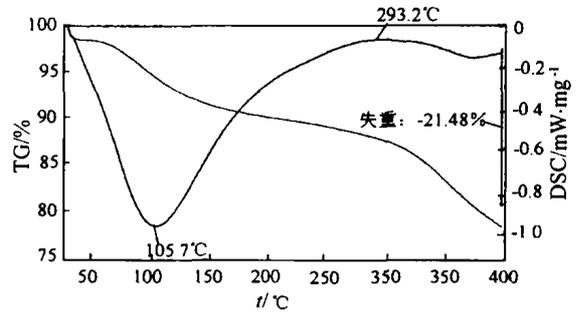


图4 Kiel骨的DSC曲线和TG曲线

#### 2.4 力学性能的检测

取6条Kiel骨哑铃形试件,在Instron 1011力学性能测试仪上进行单轴拉伸实验。

图5是对Kiel骨进行拉伸测试时典型的载荷(L)-位移(D)曲线。从曲线可以看出,Kiel骨在拉伸时经历了从线弹性区过渡到非线性弹性区的过程,然后再发生脆裂。

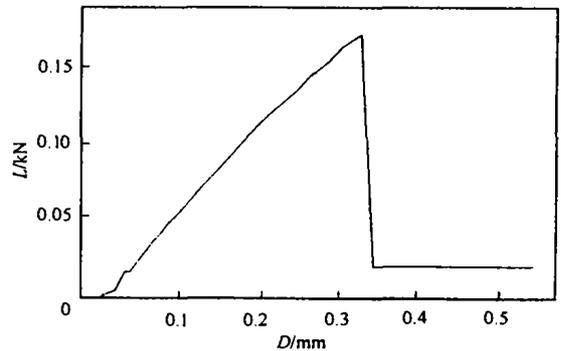


图5 Kiel骨的拉伸载荷-位移曲线

为了比较材料的力学性能和化学成分的关系,我们测定了Kiel骨中水分和胶原蛋白的含量。表1给出了样品中的一些成分和拉伸力学性能数据。

材料的杨氏模量反映材料的刚性,而其断裂时的应变大小反映材料的延展性。骨的弹性或韧性取决于骨中的胶原含量,其力学强度主要由无机成分决定。正常骨中含水量约为9%,胶原为20%,Ca、P等无机盐为69%,还有少量的氨基多糖、其它蛋白质、肽类和脂类<sup>[10]</sup>。Kiel骨在加工时经过强氧化剂 $H_2O_2$ 的长时间浸泡,虽然保留了原骨的主要无机成分,但其中的有机胶原成分已发生变性,因而与天然骨相比,其力学强度和韧性均有所下降。Catanese<sup>[11]</sup>等报道湿态天然牛肱骨密质骨的拉伸弹性模量为 $(16.2 \pm 3.4)$  GPa,笔者测得Kiel骨的弹性模量为4 696 MPa,表明 $H_2O_2$ 处理对骨块的力学强度破坏较大。

表1 Kiel骨的拉伸力学性能

胶原含量/%	含水率/%	杨氏模量/MPa	最大应力/MPa	最大应变/%	断裂负荷/kN
19.76 ± 0.69	9.22 ± 0.62	4 696 ± 947	54.7 ± 18.6	0.014 ± 0.01	0.196 ± 0.094

说明:表中所有值为均值 ± 标准偏差( $n=6, p < 0.05$ )

### 3 结论

异种骨能否大规模应用于临床,主要取决于它的力学强度和所含免疫原性物质的脱除程度,这两者之间又存在着一定的矛盾,要彻底脱除其免疫原性必须除去所有的有机成分,有机成分的完全脱除又大大降低了材料的力学强度,因此,在确保材料安全性的前提下保留适当的有机成分无疑是异种骨材料加工过程中的一个选择。实验表明,异种骨的免疫原性主要在于它的有机成分,其中的细胞成分、酸溶性蛋白和脂肪等具有较强的免疫原性,必须彻底脱除。骨基质中的I型胶原,由于有规整的螺旋结构,免疫原性较温和。在胶原分子中95%的氨基酸具有Gly-X-Y重复序列和三螺旋结构,在两端约5%的氨基酸不具有这种序列而不能形成螺旋结构,这些区域与胶原的免疫原性有密切关系,除掉这些“端肽”区域可以大大减小免疫原性。

通过对Kiel骨进行红外、XRD和DSC等各种理化性能测试,发现其无机成分主要是碳酸盐羟基磷灰石,与人骨的天然成分相同,因而具有较好的生物相容性。同时Kiel骨中有机成分的脱除并不彻底,脱蛋白和脱脂过程能够去除其中的细胞成分、酸溶性蛋白和脂肪等免疫原性较强的物质,但所含的胶原成分并没有被完全脱除,经 $H_2O_2$ 处理后,胶原蛋白发生变性而保留在骨块内部。胡永康等<sup>[12]</sup>对由牛密质骨制备的Kiel骨进行了氨基酸分析,测得其中芳香族氨基酸的含量为12.27 ng/mg,作者还对Kiel骨的免疫原性进行了检测,将Kiel骨植入Wistar大鼠的肌肉内,观察植入骨周围的炎症细胞和纤维增生情况,发现Kiel骨引起的组织学反应较轻,是较理想的异种骨植骨材料。有学者认为 $H_2O_2$ 消除异种骨抗原性的机制主要是使骨块内抗原物质发生蛋白质变性,改变了抗原决定簇的构向,从而减弱或消除其抗原性<sup>[7]</sup>。

Kiel骨的免疫原性虽然较弱,但其缺点也很明显。首先, $H_2O_2$ 处理对材料的力学强度造成很大的影响,罗卓荆等<sup>[7]</sup>报道了 $H_2O_2$ 处理时间与牛松质骨力学强

度的关系,发现经 $H_2O_2$ 处理后,其力学强度明显降低,处理24h其压缩极限强度降低43.7%,处理96h降低92.8%。其次, $H_2O_2$ 处理使骨块中的胶原蛋白发生变性,使胶原难以发挥正常的生理功能,必然影响植入材料的成骨诱导能力,胶原不仅能为细胞提供支持和保护作用,而且与细胞的粘附、生长、表型表达均有密切关系。I型胶原还对矿物沉积有重要的诱导作用。研究表明,I型胶原的天冬氨酸-甘氨酸-谷氨酸-丙氨酸(Asp-Gly-Glu-Ala,DGEA)多肽序列是一种特异性的细胞粘附域,能够与成骨细胞膜表面的 $\alpha_2\beta_1$ 整合素受体作用,促进细胞粘附,介导细胞外信号进入细胞,激活细胞内外的各种信号传递通路,影响细胞的分化与生长<sup>[13-14]</sup>。此外,由于Kiel骨的骨基质中还含有很多的蛋白质成分,在某种外界条件的诱导下,仍有潜在的抗原性。

总之,虽然Kiel骨具有天然的三维网状结构和低免疫原性等特点,在临床上获得了初步应用,但Kiel骨本身还存在力学强度低、成骨能力差和潜在的免疫原性等缺点,限制了它在临床上的广范应用,有必要对Kiel骨的加工方法进行改进以获得低免疫原性、高强度和高成骨能力的异种骨材料,满足临床的需要。作者采用生物酶脱蛋白等方法处理异种骨基质,在去除或减小免疫原性的同时,保持天然骨的骨矿成分和部分有机胶原结构,以增加移植骨的整体力学强度,并保留适当的成骨性能。实验结果将另文报道。

#### 参考文献:

- [1] MARTZ R. A new method of bone maceration[J]. J Bone Jt Surg, 1957, 39A: 153 - 166.
- [2] MARTZ R, LENZ W, GRAF R. Spongiosa test of bone grafts for transplantation[J]. J Bone Jt Surg, 1954, 36A: 721 - 731.
- [3] SALAMA R. Xenogeneic bone grafting in humans[J]. Clin Orthop, 1983, 174: 113 - 121.
- [4] SALAMA, GAZIT E. The antigenicity of Kiel bone in the human host[J]. J Bone Jt Surg, 1978, 60B: 262 - 265.
- [5] BROZ J J, SIMSKE S J, GREENBERG A R. Material and compositional properties of selectively demineralized cortical

- bone[J]. Journal of Biomechanics, 1995, 28 ( 11 ) : 1 357 - 1 368.
- [6] WOESSNER J F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this iminoacid [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1961, 93: 440 - 447.
- [7] 罗卓荆, 胡蕴玉, 侯德门, 等. 牛松质骨力学强度与去抗原处理时限的相关性实验 [J]. 第四军医大学学报, 1996, 17(6): 434 - 436.
- [8] FATTAH W I A, NOUR F A. Thermal expansion application to assess calcination of bovine hydroxyapatite [J]. Thermochimica Acta, 1993, 218: 465 - 475.
- [9] PETERS F, SCHWARZ K, EPPLE M. The structure of bone studied with synchrotron X - ray diffraction, X - ray absorption spectroscopy and thermal analysis [J]. Thermochimica Acta, 2000, 361: 131 - 138.
- [10] SUCHANEK W, YOSHIMURA M. Processing and properties of hydroxyapatite - based biomaterials for use as hard tissue replacement implants [J]. J Mater Res, 1998, 13(1): 94 - 117.
- [11] CATANESE J, FEATHERSTONE J D B, KEAVENY T M. Characterization of the mechanical and ultrastructural properties of heat - treated cortical bone for use as a bone substitute [J]. J Biomed Mater Res, 1999, 45 ( 4 ) : 327 - 336.
- [12] 胡永康, 安洪, 曹木珍. 四种脱蛋白骨组织学和生物力学比较研究 [J]. 中华创伤杂志, 1998, 14(5): 277 - 279.
- [13] MIZNO M, FUJISAWA R, KUBOKI. Type I Collagen - Induced Osteoblastic Differentiation of Bone - Marrow Cells Mediated by Collagen -  $\alpha_2\beta_1$  Integrin Interaction [J]. J Cell Physiol, 2000, 184: 207 - 213.
- [14] EMSLEY J, KNIGHT C G, FARNDAL R W, et al. Structural Basis of Collagen Recognition by Integrin  $\alpha_2\beta_1$  [J]. cell, 2000, 101: 47 - 56.

## Experimental Analysis on the Physicochemical Characterization of Kiel Bone

HE Chuang-long, WANG Yuan-liang, YANG Li-hua, ZHANG Jun, CAO Yang, WU Ke-da

(Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering Under the State Ministry of Education,  
College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** Xenograft bone such as Kiel bone has long been used as a grafting materials, but the results of Kiel bone application in clinic are still controversial due to its some drawbacks. To investigate the novel procession method of xenograft bone, the physicochemical characterization of Kiel bone and its relationship with the clinical application are studied. Kiel bone is prepared from bovine femoral cortical bone according to Salama's methods. The bone specimens are characterized with a number of physicochemical methods such as FTIR spectroscopy, X - ray diffraction spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC) and uniaxial tension mechanical tests. The result indicates that Kiel bone is composed of hydroxyapatite and organic component, and the deproteination of Kiel bone is incomplete, but processes with hydrogen peroxide, the collagen is denatured which reduce the mechanical properties of materials. The immunogenicity of Kiel bone is weakened since the main antigenic protein is removed and collagen is denatured, which not only weakens the strength of materials but influences on its physiological property, all make the osteoinductive properties of materials unideal. To overcome these problems, it is necessary to develop the novel procession method of the xenogeneic bone.

**Key words:** Kiel bone; preparation; physicochemical characterization

(编辑 李胜春)