

简报

皮肤和骨移植辐照生物效应的研究

孙世荃 刘赫臣 石占城 刘胜恩 孟宪钰
赵素色 王晨亮 尤占云 熊金莲 贺俊琦

(中国辐射防护研究院, 太原 030006)

摘要 辐照灭菌可以引起皮肤和骨移植中胶原和粘多糖的退变, 使其生物学稳定性和生物活性降低。选择最适辐照灭菌剂量需要权衡其对组织破坏作用的可容忍水平, 与其对微生物杀灭作用的可信赖程度。研究结果说明在尽量减少初始菌量的通常无菌操作条件下, 15 kGy 是可以同时满足上述两个要求的最适辐照剂量。皮肤和骨移植物的戊二醛预处理, 有助于改善辐照引起的真皮和骨基质的生物学不稳定性, 有助于减少辐照灭菌皮肤和骨移植临床应用中经常遇到的过度吸收现象。

关键词 辐照灭菌, 骨移植, 胶原, 皮肤, 戊二醛, 生物辐照效应

制备皮肤和骨移植物的一个重要步骤是灭菌。用⁶⁰Co γ 射线进行组织移植辐照灭菌已有数十年历史^[1], 与化学灭菌相比较, 它具有高效、穿透力强、无化学有毒物质残留、安全、价廉等优点。特别是冷冻干燥后辐照有助于降低同种移植物的免疫原性和实现常温保存。但大剂量辐照可以引起组织损伤, 影响组织移植物的质量和使用效果。本文报告辐照对皮肤和骨组织的生物损伤效应及其灭菌效果, 并探索降低组织辐照损伤的可行措施。

1 材料和方法

1.1 皮肤和骨样品

猪皮, 利用切皮机制成约 0.5 mm 厚度的真皮; 大鼠和人类骨骼按 Urist^[2]方法制备去抗原自溶同种骨(AAA)。皮肤和骨骼样品经冷冻干燥使含水量 < 5%, 封存塑料袋后经不同剂量⁶⁰Co γ 线照射, 剂量率 50 Gy/min。为试验戊二醛交联效果, 部分皮肤和骨样品在制备前先用不同浓度戊二醛水溶液处理。

1.2 氨基酸和胶原分析

皮肤样品剪碎、浸泡、用高效液相色谱 HPLC(日立 638-50)测定上清液中各种游离氨基酸含量。为了检查皮肤的化学和生物学稳定性, 利用热碱(0.1 mol/L NaOH, 60°C, 1 h)和胶原酶(IA Sigma)进行水解, 用氯氨 T 法测定不同方法处理后的样品在水解后的残余胶原含量。

1.3 细菌学检查

剪取不同制备阶段的皮肤和骨样品, 进行常规肉汤、沙氏和硫乙醇酸钠培养基检查需氧菌、真菌和厌氧菌的阳性率和单位面积皮肤或单位重量骨样品的需氧菌数目。

1.4 病理学检查

皮肤和骨骼样品的组织学切片进行常规和组织化学染色(胶原、粘多糖)。经临界点干燥, 用

国际原子能机构 IAEA 提供资助(1985—1991), 合同号 4289/RB

收稿日期: 1991-12-06

扫描电镜观察样品表面结构。为观察骨植入后的愈合效果,进行雄性大鼠颅骨钻孔移植实验:以直径 6 mm 角膜钻钻取圆形骨片,制成 AAA 骨,不同剂量辐照,植于同一角膜钻制成的颅骨缺损,2 个月后取出进行组织学检查。根据骨吸收、骨传导和骨诱导的程度(无、轻度、中度、重度)评为 0、1、2、3 分,计算平均分。

1.5 骨机械强度检查

从人类胫骨制备 AAA 骨,用 0.6 mol/L HCl 脱钙,时间为 4 和 24 h。取骨干骨皮质纵向骨片(10 mm × 5 mm × 3 mm)平放于 WE-30 液压式万能材料试验机测压台上,检查骨的破坏性应力(kg/cm²)。从相邻部位取骨片作为对照,观察 0 和 15—50 Gy 共 7 个剂量组的测定结果。每组 5 个样品。

2 研究结果

2.1 辐照对真皮胶原的作用

表 1 表示利用 HPLC 检查冷冻干燥辐照灭菌猪真皮,可见到组成胶原的脯氨酸、羟脯氨酸和甘氨酸增加,30 kGy 剂量照射后变化开始明显,120 kGy 时趋于严重。

Tab 1. Average contents ($\mu\text{g/g}$) of some free amino acids in lyophilized irradiated porcine derma with different doses of irradiation, 8 samples in each group

Amino acids	Radiation dose/ kGy			
	0	30	60	120
Proline	7.27(4.8)	28.06(25.7)	81.16(71.9)*	83.66(83.1)*
Hydroxyproline	7.03(5.6)	8.00(7.1)	10.60(8.2)	43.44(34.2)*
Glycine	11.18(8.6)	16.52(13.0)	16.30(13.1)	35.37(28.7)*

M(\pm SD) n = 8

*p < 0.05(与 0 Gy 相比较)

显微镜下检查辐照猪皮组织切片的胶原染色反应,发现经 60 和 120 kGy 高剂量辐照后,全部样品的 Van Gieson 胶原染色从正常时的红色转变为橙黄色,Masson 胶原染色从绿色变为棕红色。而 30 kGy 照射后只有大约半数样品出现轻度变色。冷冻干燥的猪皮样品经水浸泡后,用扫描电镜观察,未辐照的真皮由交错的纤细的胶原纤维构成,经 30 和 60 kGy 照射后出现融合的粗的条索,120 kGy 照射后呈片块状,失去纤维纹理。经辐照发生退变的胶原纤维容易被胶原酶和热碱所水解。

Tab 2. Average contents ($\mu\text{g/g}$) of some free amino acids in lyophilized irradiated AAA bone, 6 samples in each group

Amino acids	Before radiat. (after lyoph.)	Radiation dose/kGy		
		15	20	60
Proline	26.59(3.82)	28.67(6.23)	80.98(9.71)*	189.00(35.60)*
Hydroxyproline	9.92(0.65)	12.25(3.77)	12.76(1.79)*	64.53(13.64)*
Glycine	13.09(0.28)	13.80(1.05)	19.27(3.72)*	32.85(4.45)*

M(\pm SD) n = 8

*p < 0.05(与辐照前相比较)

2.2 辐照对同种骨移植物的作用

由表2可见冷冻干燥人类AAA骨受不同剂量 γ 线辐照后某些游离氨基酸的变化。结果与猪真皮一样,与胶原崩解有关的脯氨酸、羟脯氨酸和甘氨酸含量增加。明显增加的最低剂量组为20 kGy。

人类及大鼠肋软骨基质粘多糖甲苯胺兰着色能力于20 kGy辐照后变化不大,60和120 kGy辐照后开始减少。Alcian blue和高碘酸-Schiff (PAS)粘多糖染色的变化,只见于一部分60和120 kGy辐照的骨样品。骨破坏性应力检查结果表明,其应力随辐照剂量而下降,相关系数 $r = 0.93$,应力下降从15 kGy开始达到显著水平($P < 0.05$),这时骨片应力均值下降35%。脱钙4和24 h组间差别不明显。

表3是大鼠颅骨移植经2个月后对愈合效果进行评分的结果。

Tab 3. Averaged healing score of the implanted AAA bone in the trephine defect of rat skull. 5—7 rat in each group, "alc" is sterilized with alcohol

DM/h	Dose/kGy	Healing score		
		Resorption	Osteoconduction	Osteoinduction
24	(alc)	1.41(0.80)	0.72(0.40)	1.33(0.61)
24	25	1.44(0.32)	1.06(0.40)	1.40(0.33)
24	50	2.56(0.13)*	0.34(0.01)	0.18(0.20)*
4	15	0.87(0.35)	0.76(0.59)	1.37(0.43)
4	25	0.67(0.30)	0.44(0.27)	0.84(0.18)

M(\pm SD) n = 5—7

0 Gy组为用酒精灭菌作为对照

* 与0 kGy组相比较 $p < 0.05$

由表3所列平均分值得见,接受较长时间脱钙和较高剂量辐照的骨片,在植入后更易发生吸收现象,即吸收的分值较高。严重的吸收可表现为植入颅骨骨片的间断性或完全消失,致使骨传导失去从宿主颅骨缺损边缘向内侧伸延生长的支架。骨诱导即植入骨片本身通过间叶细胞增生成骨的现象也会受到大剂量辐照的影响。15 kGy辐照组与对照组(酒精灭菌)之间差别不明显。脱钙时间延长似可有利于骨诱导的进行。

Tab 4. Bacteriologic examination of pig skin after different steps of processing LIPD with different doses

Treatment	Positive/examined			Aerobic bacillus /cm ² skin	Test spore B pumilus
	Aerobic	Anaero	Fungus		
Washing	5/5	5/5	5/5	1.55×10^4	/
Cutting	5/5	5/5	5/5	9.25×10^2	/
Freeze drying	5/5	4/5	1/5	$1/50 \times 10^2$	/
Irradiation:					
1.0 kGy	1/5	0/5	0/5	25.0	+
2.5 kGy	1/5	0/5	0/5	0.5	+
5.0 kGy	0/5	0/5	0/5	0	+
15.0 kGy	0/5	0/5	0/5	0	-
25.0 kGy	0/5	0/5	0/5	0	-
35.0 kGy	0/5	0/5	0/5	0	-

2.3 辐照灭菌的效果

检查有菌条件下制备皮肤各工序后的菌量, 结果见表4。尽管辐照前的初始菌量很高, 所有样品均可于5 kGy照射后转为阴性。检查制备AAA骨各工序后菌量的结果与此相似。

2.4 戊二醛预处理对组织辐照稳定性的影响

表5是以热碱水解后猪真皮胶原残余量为指标, 观察戊二醛预处理对辐照的冷冻干燥猪皮(干照)和含水猪皮(湿照)的保护作用。

Tab 5. Residual collagen of GA pretreated and irradiated (in dry and wet state) porcine derma after hot-alkali hydrolysis, 4-7 samplaes in each group. Collagen is expressed as mg hydroxyproline/100 mg. Collagen in nonirradiated and nonhydrolytic control is 10.30 mg on the average

Irradiation state	Dosey /kGy	Concentration of GA/%				
		0	0.01	0.02	0.05	0.10
In dry	0	0.13(0.08)	7.36(0.32)*	9.72(0.22)*	10.40(0.21)*	9.59(0.33)*
	15	<0.10	0.85(0.49)*	7.17(1.29)*	9.65(0.41)*	10.20(0.53)
	25	<0.10	0.56(0.14)*	2.51(0.32)*	8.81(0.13)*	9.53(0.22)*
	50	<0.10	0.12(0.10)*	0.41(0.08)*	7.20(0.13)*	9.22(0.38)*
In wet	15	0.38(0.24)	6.29(0.94)*	9.31(0.94)*	10.50(0.31)	10.50(0.22)
	25	<0.10	5.47(0.51)*	8.73(0.35)*	10.80(0.17)*	10.60(0.27)
	50	<0.10	5.00(0.10)*	6.96(0.51)*	9.55(0.20)*	10.00(0.11)*

* 该戊二醛浓度与低一级浓度的结果相比较 $p < 0.05$ 。

表5结果表明: (1) 15 kGy剂量照射即可出现真皮胶原稳定性降低; (2) 戊二醛可以增加胶原的化学稳定性; (3) 辐照引起的胶原不稳定性可因戊二醛预处理而得到改善, 0.01%戊二醛即可奏效; (4) 湿照后的水解胶原残余量明显高于干照, 特别是经戊二醛预处理后。利用胶原酶水解的结果与热碱水解的结果相类似。戊二醛(0.01%和0.02%)预处理, 可使25 kGy辐照猪皮经胶原酶水解后的胶原含量增加到非辐照对照组的水平, 特别是湿照的样品。

戊二醛对胶原的保护作用, 还可以通过猪皮表面的扫描电镜观察来证实。未经水解的冷冻干燥辐照猪真皮由胶原纤维细丝和条索构成。浸泡入60℃热水25 min(水解对照)后呈现细蜂巢状结构。同样时间热碱水解后真皮纤维被消化形成一些大的孔洞。经戊二醛处理, 即使0.01%戊二醛, 热碱水解的破坏作用也会得到明显保护, 真皮的所见与水解对照样品相类似。利用胶原酶水解时得到与此相似的结果。

为观察用戊二醛交联后AAA骨的愈合效果, 利用大鼠颅骨钻孔移植模型进行研究。按表3方法对移植2个月后的骨吸收、骨传导、骨诱导结果进行评分。初步结果表明, 戊二醛(0.01%、0.10%和0.25%)预处理可以抑制辐照AAA骨的过度吸收。不同种类骨移植片的骨传导和骨诱导没有规律性的差别, 只是0.25%戊二醛组骨愈合分值较低, 大约为其它组的1/2, 可能与戊二醛浓度过高有关。0.01%戊二醛已足够增加辐照AAA骨的生物学稳定性, 而不伴有残余戊二醛可能产生的对成骨过程的不良影响。

3 讨 论

辐照是制备组织移植物的主要灭菌手段。但辐照又可使组织内胶原和粘多糖解聚, 导致机械性能和生物活性降低, 为了合理使用辐照, 需要在灭菌与组织破坏两者之间进行权衡。

研究说明辐照后皮肤和骨组织游离氨基酸显著增加, 组织化学反应明显变异和骨破坏应力显著降低的最低辐照剂量为 15—20 kGy。AAA 骨接受 15 kGy 辐射后的骨愈合能力与不照射骨片差别不大。超过 20 kGy 照射后组织破坏加重, 骨愈合能力减弱, 骨吸收现象增强。

辐照灭菌的程度取决于初始菌量。实验表明在有菌状态下制备猪皮和人类骨骼时辐照 5 kGy 即可使样品达到无菌。如尽量减少初始菌量, 则达到灭菌的辐照剂量还可以降低。这些结果支持了 Bright 等^[1]提出的观点, 15 kGy 是最适辐照剂量。说明在组织辐照灭菌中不需要一定遵照医疗用品灭菌经常使用的灭菌剂量(25 kGy), 而是需要根据实际操作状况和对移植物的性能要求来确定。当前常用的组织移植物的有效化学灭菌剂为环氧乙烷, 其同等灭菌剂量引起的骨诱导能力下降比 15 和 25 kGy 辐照严重得多^[3]。因此在现用各种组织移植植物灭菌手段中辐照是最可取的。

为了克服组织辐照损害, 除了减少初始菌量以降低所需灭菌剂量外, 还可以考虑增加组织移植物的稳定性, 增加其对辐照的抵抗能力。低浓度戊二醛可以通过胶原分子交联提高胶原稳定性^[4], 特别是含水照射时, 而不影响骨组织的愈合能力。因此这种方法有助于改善皮肤和骨移植物的质量, 减少临床中经常遇到的烧伤创面皮肤敷料和植入骨片的过早吸收现象。

参 考 文 献

- 1 Bright R W et al., Friedlaender G F et al., Osteochondral Allografts. Little Brown Co. Boston, 1983: 223—232
- 2 Urist M R; Urist M R. Fundamental and Clinical Bone Physiology. Philadelphia, Lippincott, 1980: 331—368
- 3 Aspenberg P et al., J. Bone Joint Surg., 1990, 72-B: 1036
- 4 Oliver R F; Lawrence J C. Smith & Nephew Ltd. Wound Healing Symposium, Ltd. UK: 1983: 15—24

STUDY ON THE BIOLOGICAL EFFECT OF RADIATION ON THE SKIN AND BONE GRAFTS

Sun Shiquan Liu Hechen Shi Zhancheng Liu Shengen Meng Xianyu Zhao Suse
Wang Chenling You Zhanyun Xiong Jinlian He Junqi
(China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006)

ABSTRACT Radiation sterilization will induce degradation of collagen and proteoglycans in the skin and bone grafts. Dose choice of radiation sterilization is decided by the balance of the reliable sterilization to the microorganisms and the tolerable destruction to the graft. The present research supports that 15 kGy is optimal dose to fulfill both the above requirements, provided that skin and bone grafts are prepared under sterile working condition with feasible caution to diminish the initial bioburden as far as possible. Glutaraldehyde pretreatment of skin and bone grafts was proposed for overcoming radiation induced degradation of dermal collagen and bone matrix and it is hopeful for restraining the exaggerated resorption of radiation sterilized AAA bones.

KEYWORDS Radiation sterilization, Bone transplantation, Collagen, Skin, Glutaraldehyde, Biological radiation effect