文章编号:1000-5404(2014)20-2061-04

论著

骨诱导膜活化灭活骨修复骨缺损的实验研究

汪小华[1],魏富达[1],喻胜鹏[1],李 伟[1],黄 科[1],董世武[2],谢 肇[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院骨科,国家地方联合工程实验室,全军矫形外科中心[1],生物工程学院生物医学材料学教研室[2])

[摘要] **目的** 构建骨缺损诱导膜模型,探讨骨诱导膜对灭活移植骨成骨诱导活性的作用。**方法** 32只新西兰大白兔一期在桡骨中段制造骨缺损模型,植入聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥诱导生物膜形成。第6、8周分别处死4只取出诱导膜检测骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein-2,BMP-2)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)含量并切片作HE染色,取同只兔皮下组织作为对照。其余24只兔在一期植入骨水泥后6周取出骨水泥进行二期手术,按随机数字表法分为实验组、模型组和对照组,每组8只。实验组保留诱导膜并在膜内植入灭活骨,模型组保留诱导膜不植骨,对照组去除诱导膜植入灭活骨。二期处理后第8、12周通过放射学和组织学评估新生骨形成情况。**结果** ELISA检测表明在第6、8周诱导膜中BMP-2含量[(437.40±20.75)、(346.67±30.05)pg/mL]、VEGF含量[(362.33±38.85)、(233.84±18.20)pg/mL]均高于皮下组织($P<0.05$),同时在诱导膜切片HE染色中观察到软骨内骨化;放射学检测可见二期处理后第8、12周实验组成骨优于模型组和对照组($P<0.01$),模型组有少许骨痂形成,对照组无成骨;第8、12周组织学观察实验组可见骨细胞和软骨细胞形成,成骨优于模型组和对照组($P<0.01$),对照组仅有纤维连接,未见骨细胞和软骨细胞。**结论** 骨诱导膜含有间充质干细胞和高浓度的细胞因子,从而促进灭活移植骨重建骨缺损。

[关键词] 诱导膜;骨重建;灭活骨;间充质干细胞
[中图法分类号] R-332;R364.3;R683 [文献标志码] A

Inactivated bone graft activated by bone induced membrane repairs bone defect in rabbits

Wang Xiaohua[1], Wei Fuda[1], Yu Shengpeng[1], Li Wei[1], Huang Ke[1], Dong Shiwu[2], Xie Zhao[1] ([1]Department of Orthopedics, National & Regional United Engineering Laboratory of Tissue Engineering, Center of Orthopaedics, Southwest Hospital, [2]Department of Biomedical Materials Science, School of Biomedical Engineering, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct a bone defect-induced membrane model and to discuss the osteogenic activity of the bone induced membrane on inactivated bone graft. **Methods** A radial defect model was built with 32 New Zealand rabbits. Polymethyl methacrylate (PMMA) bone cement spacer was inserted into the defect to induce membrane. After 6 and 8 weeks, 8 rabbits (4 for each time) were sacrificed and bone induced membranes were taken out to test bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels and to perform HE staining of sections, with rabbit subcutaneous tissue as control. Bone cement was taken out from the other 24 rabbits in 6 weeks after implantation for secondary operation, including 3 groups, an experimental group [keeping the induced membrane *in situ* and implanting autologous iliac inactivated with high temperature water (100 ℃ 30 min)], a model group (keeping the induced membrane *in situ*), and a control group (removing the induced membrane and implanting autologous iliac inactivated with high temperature water). Radiological and histological evaluation of the new bone formation was done at 8 and 12 weeks. **Results** (1) BMP-2 and VEGF levels in the induced membrane were 437.40±20.75 pg/mL and 362.33±38.85 pg/mL, respectively, at 6 weeks and 346.67±30.05 pg/mL and 233.84±18.20 pg/mL, respectively, at 8 weeks, higher than those of the subcutaneous tissue ($P<0.05$), while endochondral ossification was observed in induced membrane slice. (2) Radiological detection at 8 and

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30973065);创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放基金(SKLKF201313)
[通信作者] 谢 肇,E-mail:xiezhao54981@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140821.1511.034.html(2014-08-21)

12 weeks after the secondary operation indicated that bone formation was more in the experimental group than in the model group and the control group ($P<0.01$). There was a little callus formation in the model group, while the control group had no bone formation. (3) Histological detection at 8 and 12 weeks after the secondary operation indicated that bone formation was more in the experimental group than in the model group and the control group ($P<0.01$). Only fiber connection in the control group was observed, without bone cells and cartilage cells. **Conclusion** Bone induced membrane, providing mesenchymal stem cells and growth factors, can promote the reconstruction of bone defects by inactivated bone grafts.

[**Key words**] induced membrane; bone reconstruction; inactivation bone graft; mesenchymal stem cells

Supported by the General Program of National Natural Foundation of China (30973065) and the Open Found of State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury (SKLKF201313). Corresponding author: Xie Zhao, E-mail:xiezhao54981@163.com

四肢节段性骨缺损的重建是目前临床中常见难题之一,多由创伤、感染、肿瘤等因素导致[1-3]。理想的重建目标不仅要实现结构稳定,更要达到功能恢复。2000年Masquelet等[4]报道了使用聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate, PMMA)骨水泥结合自体松质骨移植的方法修复四肢骨缺损的新技术,叫做诱导膜技术。该技术分为2个阶段,首先对病变部位彻底清创,植入PMMA骨水泥诱导生物膜形成;6~8周取出骨水泥并在膜内植骨。该技术修复骨缺损成功率为88%~100%,能够成功修复长达25 cm的骨缺损[5-7]。目前认为,诱导膜能阻止周围组织侵入骨缺损部位,同时能防止移植骨被吸收,另外诱导膜含有丰富的血管组织,并且能分泌促进成骨和促进血管形成的细胞因子如骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等[8]。同时,诱导膜还可能含有间充质干细胞,可向成骨方向分化促进移植骨成骨过程[9-10],但目前还未得到证实。本研究通过在封闭的诱导膜内植入灭活移植骨材料对骨缺损进行重建,探讨其可行性,观察骨诱导膜是否含有间充质干细胞和高浓度的细胞因子从而促进灭活移植骨成骨,以期为进一步研究诱导膜技术修复骨缺损奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年新西兰大白兔32只,雌雄不限,体质量(2.35±0.12)kg,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供[动物合格证号SCXK(渝)2012-0005]。

1.2 主要试剂和仪器

10%多聚甲醛,5%硝酸,无水乙醇,HE染色所需试剂,戊巴比妥钠(Merck公司),BMP-2 ELISA检测试剂盒(Uscnk公司),VEGF ELISA检测试剂盒(Uscnk公司),显微镜成像系统(OLYMPUS)。

1.3 骨缺损-诱导膜模型构建和骨重建

24只实验兔耳缘静脉注射3%戊巴比妥钠1 mL/kg,麻醉后固定于手术台,左前肢常规剃毛,消毒,铺无菌巾,桡前外侧作弧形切口,分离桡骨中段,去除骨膜,锯断15 mm形成桡骨缺损,将PMMA骨水泥植入缺损部位,逐层缝合,肢体不做固定,术后0、24、48 h每只肌注青霉素20 000 IU/kg。常规条件喂养6周后按随机数字表法分为实验组、模型组、对照组,每组8只。实验组保留诱导膜植入经高温水浴(100 ℃ 30 min)灭活的自体髂骨,模型组保留诱导膜不植骨,对照组去除诱导膜后植入经高温水浴灭活(100 ℃ 30 min)的自体髂骨。逐层缝合手术切口,患肢不做固定,术后0、24、48 h给予青霉素20 000 IU/kg肌注,常规饲养条件喂养。

1.4 ELISA检测蛋白表达

8只实验兔按1.3方法植入骨水泥后6、8周分别处死4只兔子取出诱导膜和皮下组织用于检测BMP-2、VEGF的表达,将样品取出充分匀浆后置于离心机中离心10 min,取上清液并按说明书进行稀释。加入稀释好的标准品50 μL于反应孔,再加入待测样品50 μL、生物素标记的抗体50 μL,盖上封板膜,轻轻振荡混匀,37 ℃温育60 min。小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置30 s后弃去,重复5次,拍干。每孔先加入显色剂100 μL,轻轻振荡混匀,37 ℃避光显色10 min。每孔加终止液50 μL,终止反应。用酶标仪检测各孔的光密度值[$D(450)$],计算出对应的样品浓度。

1.5 放射学检测

实验兔二期处理后第8、12周X线检查统一曝光条件为40 kV、20 mA、0.12 s,按Lane-Sandhu X线评分标准评价。

1.6 HE染色

采集植入PMMA骨水泥后第6、8周诱导膜和二期处理后第8、12周移植骨标本,用10%中性甲醛溶液固定24 h,常规脱钙(5%硝酸)、再固定、脱水、透明、浸腊包埋、切片,常规脱蜡,梯度乙醇脱水;苏木精核染5 min,自来水冲洗2 min;盐酸乙醇分化30 s;自来水泡15 min;置伊红2 min;无水乙醇脱水;二甲苯透明,中性树胶封固。按Nilsson组织学评分标准进行评分。

1.7 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,对多个样本均数进行两两比较和Wilcoxon秩和检验。

2 结果

2.1 ELISA检测BMP-2、VEGF蛋白表达

在第6、8周诱导膜中的BMP-2、VEGF含量明显高于皮下组织($P<0.05$,表1)。

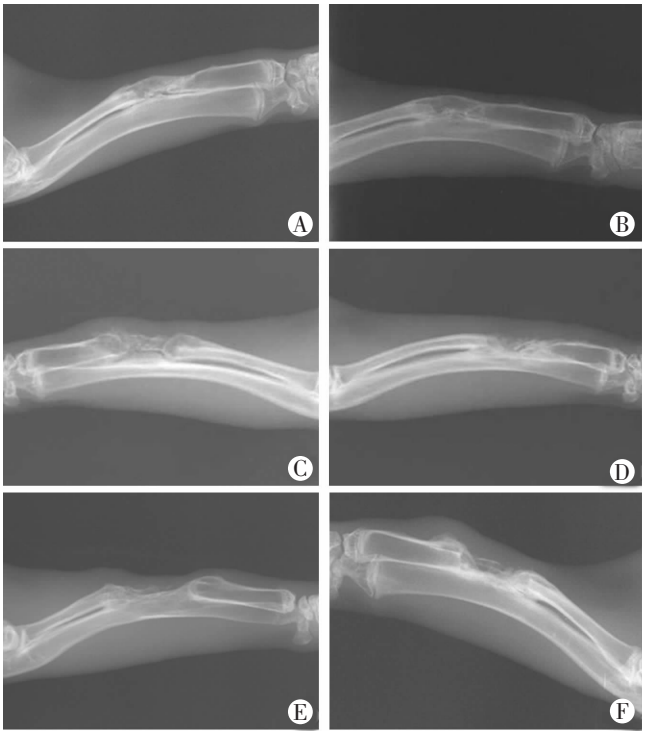
表 1　第 6、8 周诱导膜和皮下组织蛋白含量（pg/mL，$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

蛋白		第 6 周	第 8 周
BMP-2	诱导膜	437.40 ± 20.75[a]	346.67 ± 30.05[a]
	皮下组织	68.75 ± 10.60	55.24 ± 8.40
VEGF	诱导膜	362.33 ± 38.85[a]	233.84 ± 18.20[a]
	皮下组织	47.45 ± 9.55	49.22 ± 8.65

a：$P<0.05$，与对应皮下组织比较

2.2　X 线检查成骨情况

二期处理后第 8 周实验组可见新生骨形成，骨折线部分存在，模型组和对照组未见新生骨；第 12 周实验组骨缺损已基本重建完成，骨折线模糊，模型组可见少量骨痂形成，对照组两端呈硬化表现（图 1）。二期处理后第 8、12 周实验组骨缺损修复情况明显优于模型组和对照组（$P<0.01$），模型组成骨情况优于对照组（$P<0.05$，表 2）。



A、C、E：实验组、模型组、对照组第 8 周；B、D、F：实验组、模型组、对照组第 12 周

图 1　二期处理后第 8、12 周 X 线观察 3 组实验兔成骨情况

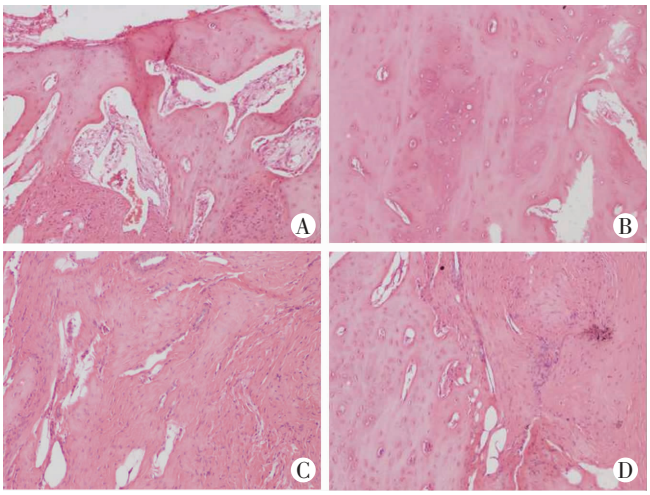
表 2　二期处理后第 8、12 周 3 组实验兔 X 线评分（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

组别	第 8 周	第 12 周
实验组	2.75 ± 0.40[ab]	4.15 ± 0.56[ab]
模型组	0.45 ± 0.41[b]	1.05 ± 0.71[b]
对照组	0.15 ± 0.50	0.30 ± 0.45

a：$P<0.01$，与模型组比较；b：$P<0.05$，与对照组比较

2.3　组织学观察

二期处理后 8 周实验组有编织骨形成，骨细胞和软骨细胞多见，模型组和对照组仅见纤维连接；第 12 周实验组见编织骨向板层骨转化，模型组可见纤维连接，断端分界明显，对照组仅可见纤维连接（图 2）。二期处理后第 8、12 周实验组骨缺损修复情况明显优于模型组和对照组（$P<0.01$），模型组成骨优于对照组（$P<0.05$，表 3）。



A、C：实验组、模型组第 8 周；B、D：实验组、模型组第 12 周

图 2　二期处理后第 8、12 周组织学观察 3 组实验兔成骨情况（HE ×100）

表 3　二期处理后第 8、12 周 3 组实验兔组织学评分（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

组别	第 8 周	第 12 周
实验组	3.07 ± 0.40[ab]	5.36 ± 0.56[ab]
模型组	1.33 ± 0.41[b]	1.90 ± 0.71[b]
对照组	0.53 ± 0.35	1.45 ± 0.60

a：$P<0.01$，与模型组比较；b：$P<0.05$，与对照组比较

2.4　诱导膜组织切片 HE 染色

第 8 周诱导膜组织切片 HE 染色观察到软骨内骨化（图 3）。

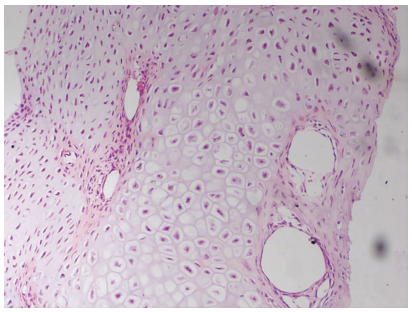


图 3　诱导膜组织切片病理学观察（HE ×100）

3　讨论

Masquelet 等报道的诱导膜技术受到广泛的关注，其不仅适用于四肢骨缺损的治疗，同时也在治疗跟骨骨折、先天性假关节等方面取得成功[11-13]。研究表明在诱导膜的切片上可见软骨内骨化，认为诱导膜中可能含有间充质干细胞[14]。有学者在老鼠皮下用聚氯乙烯材料诱导形成的膜内分离培养得到间充质干细胞[10]，诱导膜技术中采用 PMMA 骨水泥诱导形成的膜内也可能含有间充质干细胞并在植骨后转移到移植骨支架上分化成骨。

Masquelet 报道的诱导膜技术中两端骨髓腔被形成的诱导膜封闭，植骨时需要打通两端骨髓腔，其作用可能是在早期移植骨血管没有建立的情况下为移植骨提供营养。本研究不打通两端骨髓腔，自体髂骨经过

高温处理,其中的细胞和细胞因子失去活性成为灭活骨,此时的灭活骨不含有活性的细胞和细胞因子,植入后缝合诱导膜形成一个密闭的环境,最后发生成骨需要外来间充质干细胞和相关细胞因子才会变成现实。本研究结果在骨诱导膜的切片中观察到软骨化成骨区(图3),因此可认为骨诱导膜中含有间充质干细胞,同时实验组在诱导膜内植入灭活骨后有成骨发生,说明骨诱导膜能够为灭活骨提供间充质干细胞并分化成骨,模型组仅可见边缘少许骨痂形成,对照组因为没有诱导膜的保护,最后移植骨被吸收,没有成骨发生。蛋白检测提示诱导膜含有高浓度的BMP-2、VEGF。据报道VEGF可促进损伤部位的血管新生从而提高受损组织的血供,同时还参与动员骨髓间充质干细胞[15];BMP-2是间充质干细胞成骨分化的初始信号分子,不仅能诱导周围组织中的间充质干细胞发生迁移,同时能促进它向成骨方向分化[16];BMP-2与VEGF联合能够增强间充质干细胞向成骨方向分化能力[17]。所以我们认为本实验模型中骨诱导膜中的间充质干细胞在BMP-2、VEGF等细胞因子的动员下迁移到移植骨部位并在他们的作用下向成骨方向分化,同时高浓度的VEGF刺激新生血管形成,为新生组织提供丰富的血供,最后促进灭活骨的成骨发生。

骨诱导膜能够在两端骨髓腔封闭的情况下使灭活骨发生成骨,为诱导膜结合组织工程骨技术修复骨缺损奠定基础。组织工程骨技术修复大段骨缺损目前面临血管化的瓶颈,诱导膜含有丰富的血管且垂直于骨缺损表面,并且含有高浓度的BMP-2、VEGF等细胞因子[8],可能是解决组织工程骨血管化的突破口,诱导膜结合组织工程骨技术可能是未来骨缺损修复重建的发展方向。文献[18]报道用诱导膜技术修复恶性肿瘤切除术后骨缺损3例,最后发现移植骨被吸收,与诱导膜能阻止移植骨被吸收相矛盾。该作者认为发生这种情况是由于二期植骨时间太长导致诱导膜结构和功能发生改变,但有研究[5,19]报道二期植骨时间最短4周,最长可达19个月对骨缺损修复效果没有明显影响,关于诱导膜的更多功能还有待进一步研究。有学者合成了仿生诱导膜能够在体外具有快速血管化和成骨能力[20],但暂未能在体内研究对骨重建的影响,将来可就合成生物膜重建骨缺损进行深入研究。

参考文献:

[1] Patwardhan S, Shyam A K, Mody R A, *et al*. Reconstruction of bone defects after osteomyelitis with nonvascularized fibular graft: a retrospective study in twenty-six children[J]. J Bone Joint Surg Am, 2013, 95(9): e561 - e566, S1.

[2] Chotel F, Nguiabanda L, Braillon P, *et al*. Induced membrane technique for reconstruction after bone tumor resection in children: a preliminary study[J]. Orthop Traumatol Surg Res, 2012, 98(3): 301 - 308.

[3] Ayoub M A, El-Rosasy M A. Hybrid grafting of post-traumatic bone defects using beta-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix [J]. Eur J Orthop Surg Traumatol, 2014, 24(5): 663 - 670.

[4] Masquelet A C, Fitoussi F, Begue T, *et al*. Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft[J]. Ann Chir Plast Esthet, 2000, 45(3): 346 - 353.

[5] Masquelet A C, Begue T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects[J]. Orthop Clin North Am, 2010, 41(1): 27 - 37.

[6] Karger C, Kishi T, Schneider L, *et al*. Treatment of posttraumatic bone defects by the induced membrane technique[J]. Orthop Traumatol Surg Res, 2012, 98(1): 97 - 102.

[7] Masquelet A C. Muscle reconstruction in reconstructive surgery: soft tissue repair and long bone reconstruction [J]. Langenbecks Arch Surg, 2003, 388(5): 344 - 346.

[8] Pelissier P, Masquelet A C, Bareille R, *et al*. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration[J]. J Orthop Res, 2004, 22(1): 73 - 79.

[9] Taylor B C, French B G, Fowler T T, *et al*. Induced membrane technique for reconstruction to manage bone loss[J]. J Am Acad Orthop Surg, 2012, 20(3): 142 - 150.

[10] Patel J, Gudehithlu K P, Dunea G, *et al*. Foreign body-induced granulation tissue is a source of adult stem cells[J]. Transl Res, 2010, 155(4): 191 - 199.

[11] Pannier S, Pejin Z, Dana C, *et al*. Induced membrane technique for the treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia: preliminary results of five cases[J]. J Child Orthop, 2013, 7(6): 477 - 485.

[12] Begue T, Mebtouche N, Auregan J C, *et al*. External fixation of the thalamic portion of a fractured calcaneus: a new surgical technique [J]. Orthop Traumatol Surg Res, 2014, 100(4): 429 - 432.

[13] O'Malley N T, Kates S L. Advances on the Masquelet technique using a cage and nail construct[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2012, 132(2): 245 - 248.

[14] Aho O M, Lehenkari P, Ristiniemi J, *et al*. The mechanism of action of induced membranes in bone repair[J]. J Bone Joint Surg Am, 2013, 95(7): 597 - 604.

[15] Chen L, Tredget E E, Wu P Y, *et al*. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing[J]. PLoS One, 2008, 3(4): e1886.

[16] Weidemann A, Johnson R S. Biology of HIF-1alpha[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(4): 621 - 627.

[17] Lin Z, Wang J S, Lin L, *et al*. Effects of BMP2 and VEGF165 on the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Exp Ther Med, 2014, 7(3): 625 - 629.

[18] Accadbled F, Mazeau P, Chotel F, *et al*. Induced-membrane femur reconstruction after resection of bone malignancies: three cases of massive graft resorption in children[J]. Orthop Traumatol Surg Res, 2013, 99(4): 479 - 483.

[19] Apard T, Bigorre N, Cronier P, *et al*. Two-stage reconstruction of post-traumatic segmental tibia bone loss with nailing[J]. Orthop Traumatol Surg Res, 2010, 96(5): 549 - 553.

[20] Ren L, Kang Y, Browne C, *et al*. Fabrication, vascularization and osteogenic properties of a novel synthetic biomimetic induced membrane for the treatment of large bone defects[J]. Bone, 2014, 64: 173 - 182.

(**收稿**:2014-05-12;**修回**:2014-06-15)

(编辑 龙 亮)