DOI:10.16016/j.1000-5404.201502031

论著

PMMA骨水泥与磷酸钙骨水泥诱导成膜及其对成骨活性的差异

魏富达,汪小华,谢 肇 (400038 重庆,第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,组织工程国家地方联合工程实验室,重庆市再生重建医学工程技术研究中心,重庆市组织工程实验室)

[摘要] **目的** 比较PMMA骨水泥与磷酸钙骨水泥诱导周围形成膜的结构和成骨活性的差异。**方法** 32只健康成年新西兰大白兔按照随机数字表法分为PMMA组和磷酸钙组,每组16只,双侧桡骨制造15 mm骨缺损,分别植入PMMA和磷酸钙骨水泥,4、6周后每组选取2只兔子取出骨水泥周围包裹的诱导膜比较膜厚度及血管密度;第4周取出骨水泥并在膜内植入自体松质骨,植骨后8、12周分别通过放射学和组织学评估新生骨形成的情况。**结果** ①4、6周时PMMA骨水泥组诱导形成的膜厚度分别为(1 108±26)、(945±42)μm,磷酸钙骨水泥组诱导成膜厚度为(945±34)、(778±22)μm,两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。PMMA骨水泥诱导的膜血管密度分别为6、3个/cm^2,而磷酸钙骨水泥诱导形成的膜血管密度分别为2、2个/cm^2。②放射学检测可见植骨后第8、12周PMMA组成骨按Lane-Sandhu X线评分(2.84±0.36)、(4.22±0.54)优于磷酸钙组(1.98±0.15)、(3.16±0.23),两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。③第8、12周组织学观察PMMA组按Nilsson组织学评分标准进行评分(3.14±0.29)、(4.63±0.37),成骨优于磷酸钙组(2.10±0.18)、(3.59±0.21),两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 在新西兰兔桡骨骨缺损处PMMA骨水泥诱导形成的生物膜较磷酸钙骨水泥诱导形成的生物膜具有更强的促血管化和成骨活性。

[关键词] 诱导膜;PMMA骨水泥;磷酸钙骨水泥;骨重建
[中图法分类号] R318.08;R322.71;R329.3 [文献标志码] A

Osteogenic activity of PMMA bone cement-induced membrane with calcium phosphate bone cement-induced membrane

Wei Fuda, Wang Xiaohua, Xie Zhao (Department of Orthopedics, National and Regional United Engineering Laboratory of Tissue Engineering, Chongqing Research Center of Regeneration and Reconstruction Medical Engineering Technology, Chongqing Laboratory of Tissue Engineering, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To compare the structure and osteogenic activity between polymethyl methacrylate (PMMA) bone cement-induced membrane and calcium phosphate bone cement-induced membrane. **Methods** Totally, 32 healthy adult New Zealand white rabbits were randomly divided into a PMMA bone cement group and a calcium phosphate bone cement group, 16 rabbits in each group. Bone defects (15 mm) were formed on the bilateral radius of the rabbits, and then PMMA or calcium phosphate bone cement was implanted. In the 4th and 6th weeks, the induced membranes were taken out from 2 rabbits in each group to observe the film thickness and blood vessel density. The bone cement was removed in the 4th week and autogenous cancellous bone was implanted. In the 8th and 12th weeks, new bone formation was

[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.20150327.1434.032.html(2015-03-27)

evaluated by radiological and histological observation. **Results** The thickness of the induced membranes in the PMMA bone cement group was 1 108 ± 26 μm and 945 ± 42 μm in the 4th and 6th weeks, respectively, while that was 945 ± 34 μm and 778 ± 22 μm in the calcium phosphate bone cement group ($P < 0.05$). In the 4th and 6th weeks, the blood vessel density was 6/cm^2 and 3/cm^2 in the PMMA bone cement group, and 2/cm^2 and 2/cm^2 in the calcium phosphate bone cement group, respectively. The radiological observation showed that Lane-Sandhu X-ray scores (2.84 ± 0.36, 4.22 ± 0.54) of the PMMA bone cement group in the 8th and 12th weeks were better than those (1.98 ± 0.15, 1.98 ± 0.23) of the calcium phosphate bone cement group ($P < 0.05$). The histological observation showed that the Nilsson histological scores (3.14 ± 0.29, 4.63 ± 0.37) of the PMMA bone cement group in the 8th and 12th weeks were better than those (2.10 ± 0.18, 3.59 ± 0.21) of the calcium phosphate bone cement group ($P < 0.05$). **Conclusion** The PMMA bone cement-induced membrane shows better vascularization capability and osteogenic activity than the calcium phosphate bone cement-induced membrane.

[**Key words**] induced membrane; PMMA bone cement; calcium phosphate bone cement; bone reconstruction

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

通常,四肢大段骨缺损尤其是伴有严重软组织损伤的骨缺损患者只能施行截肢手术。随着保肢技术的进步,保肢手术越来越普遍[1]。但大段骨缺损的重建仍是骨科医师的一大难题,传统的经典骨重建方法包括自体松质骨移植技术[2]、带血管骨移植技术[3]及Ilizarov技术[4]。Ilizarov技术在下肢矫形与骨延长方面发挥了重要作用,但是该技术治疗周期长,患者在骨延长过程中非常痛苦,同时长时间佩戴大体积的外固定支架给患者生活带来诸多不便。其他比较常见的并发症还包括钉道感染、关节挛缩、再骨折、对接点骨不连等[5]。2000年Masquelet报道了诱导膜结合自体松质骨移植的技术治疗大段骨缺损,赢得了广泛的关注,被称为诱导膜技术[6-9]。Masquelet技术中填塞骨水泥不仅可以消灭死腔防止感染,最重要的是诱导形成了一层具有生物作用的膜,该膜主要由胶原蛋白,成纤维细胞等组成,内表面含有丰富的血管[10-11],能够分泌BMP-2、VEGF、Cbfα1、IL-6、COL-1等生长因子促进骨缺损的修复重建[6, 8, 12-13]。

诱导膜技术修复大段骨缺损表现出很好的临床效果,赢得了广泛的关注,诱导技术中目前主要研究PMMA骨水泥对膜形成的影响,很少涉及其他膜诱导材料。据报道PMMA骨水泥诱导形成的炎症反应较其他材料温和,使用硅胶会产生强烈的T细胞及巨噬细胞反应[14-15],从聚乙烯材料诱导形成的生物膜中VEGF等细胞因子含量增高,同时含有间充质干细胞[16]。在传统的骨缺损填充中,磷酸钙常常作为骨替代材料添加到自体骨中参与骨缺损的重建[17-18]。本研究旨在通过将磷酸钙骨水泥及PMMA骨水泥植入动物体内,观察两者诱导形成的膜的结构及分子组成,并观察两种膜对骨修复重建的差异。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年新西兰大白兔(5~6周龄)32只,体质量(2.47 ± 0.23)kg,雌雄不限,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂和仪器

无水乙醇,苏木精-伊红,5%硝酸,10%多聚甲醛等HE染色所需试剂,戊巴比妥钠(Merck公司),显微镜成像系统(OLYMPUS)。

1.3 骨缺损-诱导膜模型构建

将兔按随机数字表法分为PMMA组和磷酸钙组,每组16只,耳缘静脉按1 mL/kg剂量注射3%戊巴比妥钠,将麻醉后的兔子固定在手术台上,双前肢常规剃毛,消毒,铺无菌巾,桡前外侧作切口,分离桡骨中段,去除骨膜,锯断15 mm形成桡骨缺损,PMMA组在骨缺损部位植入PMMA骨水泥,磷酸钙组植入磷酸钙骨水泥,凝固后逐层缝合,肢体不做固定,术后0、24、48 h每只肌注青霉素15 000 IU/kg。常规饲养条件喂养。

1.4 Masson三色法染色

植入骨水泥后6、8周每组处死2只兔子取出诱导膜,将标本用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;经 Weigert 铁苏木精作用 8 min,流水稍洗,于 1% 盐酸酒精分化 2 min 后流水冲洗数分钟:再经丽春红酸性品红染色 8 min 后用蒸馏水稍洗,经磷钼酸溶液处理 5 min 后直接用苯胺蓝复染 5 min,再经 1% 冰醋酸处理 1 min,然后经 95% 乙醇、无水乙醇脱水,二甲苯透明,用中性树胶封片,于光镜下观察。

1.5　HE 染色

植入骨水泥后 4、6 周每组处死 2 只兔子取出诱导膜将标本。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。

1.6　蛋白含量检测

植入骨水泥后 4、6 周每组处死 2 只兔子取出诱导膜。将样品取出充分匀浆之后置于离心机中离心 10 min,取上清液并按说明书进行稀释。加入稀释好后的标准品 50 μL 于反应孔,加入待测样品 50 μL,然后加入生物素标记的抗体 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,如此重复 5 次,拍干。每孔先加入显色剂 100 μL,轻轻震荡混匀,37 ℃避光显色 10 min。每孔加终止液 50 μL,终止反应。以空白空调零,450 nm 波长依序测量各孔的光密度值[D(450)]。再计算出对应的样品浓度。

1.7　放射学检测

取自体松质骨进行植骨,植入骨水泥后 4 周取出骨水泥,植骨后第 8、12 周 X 射线检查统一曝光条件为40 kV、20 mA、0.12 s。结果按 Lane-SandhuX 射线评分标准进行评价。

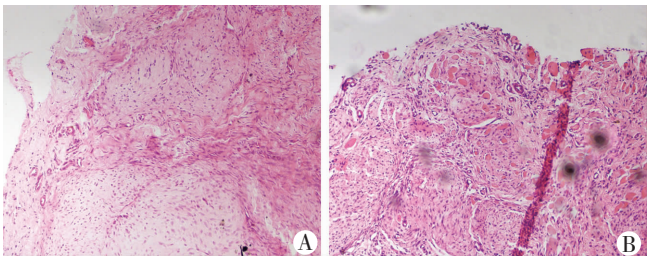
1.8　统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,采用 t 检验进行分析。

2　结果

2.1　PMMA 组和磷酸钙组兔诱导膜的比较

检测结果显示在第 4、6 周 PMMA 组膜的厚度为(1 108 ± 26)、(945 ± 42) μm。磷酸钙骨水泥组诱导成膜厚度为(945 ± 34)、(778 ± 22) μm (P < 0.05)。PMMA 骨水泥诱导的膜血管密度分别为 6、3 个/cm^2,而磷酸钙骨水泥诱导形成的膜血管密度分别为 2、2 个/cm^2(图 1)。



A:PMMA 组;B:磷酸钙组

图 1　两组新西兰大白兔桡骨骨缺损处诱导膜第 6 周变化(HE × 200)

2.2　PMMA 组和磷酸钙组兔诱导膜蛋白含量比较

ELISA 检测结果示在第 4、6 周 PMMA 诱导膜中 BMP-2、VEGF 含量明显高于磷酸钙骨水泥(P < 0.05,表 1)。

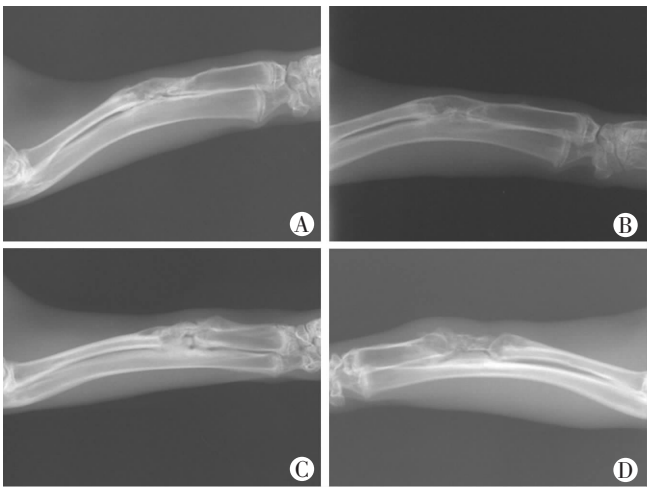
表 1　第 4、6 周两组新西兰大白兔诱导膜蛋白含量比较(n = 4, $\bar{x} \pm s$, pg/mL)

指标		第 4 周	第 6 周
BMP-2	PMMA 组	421.32 ± 18.60[a]	384.55 ± 24.16[a]
	磷酸钙组	184.79 ± 14.34	148.20 ± 11.44
VEGF	PMMA 组	384.59 ± 26.88[a]	233.84 ± 18.20[a]
	磷酸钙组	138.46 ± 19.00	89.64 ± 12.56

a:P < 0.05,与磷酸钙组比较

2.3　PMMA 组和磷酸钙组兔诱导膜放射学观察

植骨后第 8 周 PMMA 组可见新生骨形成,骨折线存在;磷酸钙组骨痂形成较少。植骨后第 12 周 PMMA 组骨质形成,皮质骨建立,骨折线模糊;磷酸钙组皮质骨形成欠佳(图 2)。统计学分析表明,第 8、12 周 PMMA 组修复情况明显优于磷酸钙组(P < 0.05)。

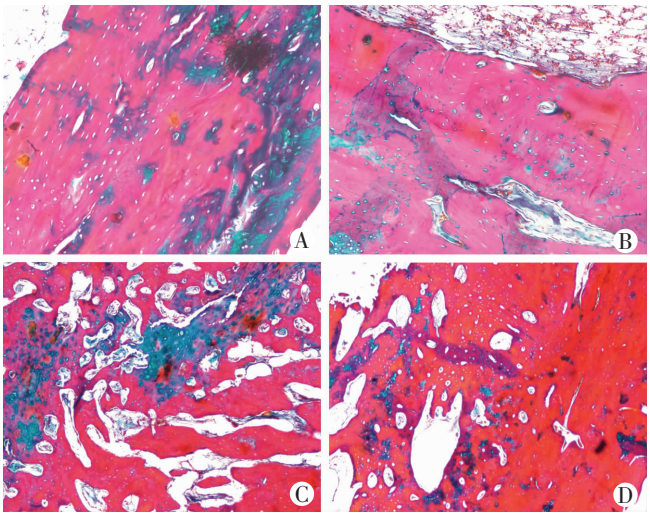


A:PMMA 组第 8 周;B:PMMA 组第 12 周;C:磷酸钙组第 8 周;D:磷酸钙组第 12 周

图 2　新西兰大白兔植骨后第 8、12 周 X 线片表现

2.4 MMA组和磷酸钙组兔诱导膜组织学观察

植骨后8周PMMA组可见编织骨形成,骨细胞和软骨细胞多见,磷酸钙组仅见纤维连接无骨细胞和软骨细胞。植骨后12周PMMA组见编织骨向板层骨转化,磷酸钙组骨痂形成较少(图3)。统计学分析表明,第8、12周PMMA组骨缺损修复情况明显优于磷酸钙组($P<0.05$)。



A:PMMA组第8周;B:PMMA组第12周;C:磷酸钙组第8周;D:磷酸钙组第12周

图3 新西兰大白兔植骨后第8、12周Masson染色观察 (×100)

3 讨论

2000年Masquelet等[6]在使用骨水泥填塞骨缺损时,发现纤维蛋白、层粘连蛋白等会迅速地在骨水泥表面富集,形成一种与人工生物降解膜相似的薄膜,二期在膜内植骨,35例骨缺损4~25 cm的患者全部在术后4个月获得了影像学骨愈合。这开启了膜诱导技术治疗骨缺损的新时代。诱导膜技术为大段骨缺损的重建带来了希望,但是目前关于膜形成的诸多方面尚不清楚。本研究旨在比较PMMA骨水泥与磷酸钙骨水泥诱导形成的膜的结构差异及成骨方面的影响。结果表明PMMA骨水泥和磷酸钙骨水泥均能诱导形成一个含有两层结构的诱导膜,内层为丰富血管,外层为纤维成分,这与文献报道结果相似[19]。早期研究认为诱导膜是富含血供丰富的纤维组织,其结构能保持很长时间不退化[20-21],但本研究表明诱导膜早期炎症反应严重,微细血管较多,随着时间延长,诱导膜厚度降低同时血管逐渐减少。说明诱导膜是一个随时间逐渐退化的类骨膜组织。

有研究认为BMP-2是间充质干细胞成骨分化的初始信号分子,不仅能富集骨祖细胞,同时也是促进骨祖细胞成骨方向分化的主要催化因子[22],VEGF可促进损伤部位的血管新生,同时还参与动员骨髓间充质干细胞,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[23-24]。我们检测到PMMA骨水泥诱导膜中两种生长因子浓度均高于磷酸钙骨水泥。文献[8-13,25]报道诱导膜BMP-2、VEGF的高峰浓度是第4周,我们检测到BMP-2、VEGF高峰浓度第4周高于第6周,这与文献报道的结果一致,同时在第8、12周PMMA骨水泥组成骨能力均较磷酸钙组强,除了我们检测到的与血管形成及成骨两种细胞因子含量较高有关,同时可能还有其他因子参与。

本研究是在小动物中进行的,跟人体试验结果可能有一定的差异,同时没有对机制方面进行更加深入的探索研究。早期认为最佳植骨时间为6~8周[6],随后认为在第4周植骨比较合适[8,13]。然而,这项技术在许多方面缺乏理论依据。在将来可否利用组织工程技术制备生长因子、骨诱导因子和细胞的改良支架或复合膜作为诱导膜和复合移植物,在处理无感染性骨缺损时可考虑单次手术取代传统两阶段手术,以促进骨形成和缩短治疗时间。

参考文献:

[1] Bosse M J, MacKenzie E J, Kellam J F, *et al*. An analysis of outcomes of reconstruction or amputation after leg-threatening injuries[J]. N Engl J Med, 2002, 347(24): 1924-1931.

[2] Keating J F, Simpson A H, Robinson C M. The management of fractures with bone loss[J]. J Bone Joint Surg Br, 2005, 87(2): 142-150.

[3] Pelissier P, Casoli V, Demiri E, *et al*. Soleus-fibula free transfer in lower limb reconstruction[J]. Plast Reconstr Surg, 2000, 105(2): 567-573.

[4] Gao Y S, Ai Z S, Yu X W, *et al*. Free vascularised fibular grafting combined with a locking plate for massive bone defects in the lower limbs: a retrospective analysis of fibular hypertrophy in 18 cases[J]. Injury, 2012, 43(7): 1090-1095.

[5] Dendrinos G K, Kontos S, Lyritsis E. Use of the Ilizarov technique for treatment of non-union of the tibia associated with infection[J]. J Bone Joint Surg Am, 1995, 77(6): 835-846.

[6] 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.

[7] Masquelet A C, Obert L. Induced membrane technique for bone defects in the hand and wrist[J]. Chir Main, 2010, 29 (Suppl 1): S221 – S224.

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

[10] 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.

[11] Woon C Y, Chong K W, Wong M K. Induced membranes--a staged technique of bone-grafting for segmental bone loss: a report of two cases and a literature review[J]. J Bone Joint Surg Am, 2010, 92(1): 196 – 201.

[12] Klaue K, Knothe U, Anton C, *et al*. Bone regeneration in long-bone defects: tissue compartmentalisation? *In vivo* study on bone defects in sheep[J]. Injury, 2009, 40(Suppl 4): S95 – S102.

[13] 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.

[14] Viateau V, Bensidhoum M, Guillemin G, *et al*. Use of the induced membrane technique for bone tissue engineering purposes: animal studies[J]. Orthop Clin North Am, 2010, 41(1): 49 – 56.

[15] Freund R, Wolff T W, Freund B. Silicone block interposition for traumatic bone loss [J]. Orthopedics, 2000, 23 (8): 795, 799, 802, 804.

[16] 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.

[17] Zwetyenga N, Catros S, Emparanza A, *et al*. Mandibular reconstruction using induced membranes with autologous cancellous bone graft and HA-betaTCP: animal model study and preliminary results in patients [J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2009, 38(12): 1289 – 1297.

[18] Catros S, Zwetyenga N, Bareille R, *et al*. Subcutaneous-induced membranes have no osteoinductive effect on macroporous HA-TCP *in vivo*[J]. J Orthop Res, 2009, 27(2): 155 – 161.

[19] Chang H, Knothe-Tate M L. Concise review: the periosteum: tapping into a reservoir of clinically useful progenitor cells[J]. Stem Cells Transl Med, 2012, 1(6): 480 – 491.

[20] Viateau V, Guillemin G, Calando Y, *et al*. Induction of a barrier membrane to facilitate reconstruction of massive segmental diaphyseal bone defects: an ovine model[J]. Vet Surg, 2006, 35(5): 445 – 452.

[21] 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.

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

[23] 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.

[24] 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.

[25] 汪小华, 魏富达, 喻胜鹏,等. 骨诱导膜活化灭活骨修复骨缺损的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36 (20): 2061 – 2064.

(**收稿**:2015-02-05;**修回**:2015-03-04)

(编辑 龙 亮)