基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0825-04

纳米羟基磷灰石复合物修复骨缺损实验研究的影像学评价

肖智博[1],吕富荣[1],蒋电明[2],欧阳羽[1],吕发金[1],李 杰[2]
(重庆医科大学附属第一医院 1. 放射科;2. 骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过磁共振成像(Magnetic resonance imaging,MRI)与 X 线方法检测纳米羟基磷灰石/聚酰胺(n-HA/PA66)复合材料应用于修复骨缺损实验研究,综合评价其成骨能力,为骨缺损修复后全面、准确的影像学评价提供理论依据。方法:30 只新西兰大白兔行一侧胫骨髁钻孔,并植入 n-HA/PA66 复合材料。术后 2、4、6、8、12 周各时相点摄 DR 片、MRI 及动态增强 MRI 检查,并取材进行组织学观察。结果:(1)MRI 显示 n-HA/PA66 复合材料与骨组织易于区分,术后第 4 周开始从材料内部逐步强化,周围软组织水肿逐步吸收,术后 12 周修复区强化明显,周围水肿基本吸收。(2)X 线显示术后第 8 周开始,缺损填修复区内的骨质增生开始,术后 12 周缺损区呈高密度骨质修复表现。(3)组织学显示术后 4 ~ 12 周,n-HA/PA66 复合材料被界膜分隔成小岛,界膜内可见大量间充质细胞、成纤维细胞及小血管,后形成破骨及成骨细胞,修复区内骨小梁逐步形成。结论:MRI 联合 X 线能够清楚显示 n-HA/PA66 复合材料修复过程,对早期骨移植的成功有很好预测作用,并兼顾术区周围关节及软组织的恢复显示,具有临床可操作性。

【关键词】骨移植;MRI;骨缺损;纳米羟基磷灰石 - 聚酰胺 66 复合物
【中国图书分类法分类号】R816.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-29

作者介绍:肖智博(1979-),女,硕士,
研究方向:骨骼系统及头部影像诊断。
通讯作者:吕富荣,男,主任医师,副教授,E-mail:lfr918@sina.com。

基金项目:国家 863 计划子课题(编号:2002AA326020)。

应用在 *H. pylori* 感染的防治策略中意义重大。

对 *H. pylori* 感染的研究表明,*H. pylori* 在胃内定植的关键环节是黏附,随着人们对黏附素[11~13]本质的认识不断加深和黏附素在 *H. pylori* 定植过程中的决定性作用,从黏附素出发寻找保护性抗原,从而在感染的初期就能通过阻断黏附防止感染而最终将 *H. pylori* 清除。黏附素能够成为 *H. pylori* 疫苗候选抗原具备以下几个优点:位于细菌表面而免疫反应活性高;具有较高的保守性;蛋白质成分能够通过基因工程大规模生产和纯化。Sebastian[8]等人从 *H. pylori* 的全基因组中挑选出 5 个可能编码膜蛋白的 ORF,分别在 E.coli BL21 中表达出带组氨酸标签的这 5 种蛋白,并发现 hp1188 基因编码的蛋白 Hp1188 具有黏膜结合特性,其包被的镍珠能够与人胃腺癌黏膜上皮细胞结合,结合能力与血型抗原结合黏附素相当,且 Hp1188 蛋白在 *H. pylori* 菌外表面表达量很高。hp1188 基因全长 810 bp,其氨基酸序列高度保守,为 *H. pylori* 所特有,所编码蛋白分子量约 30 600 Dalton。因此,研究 Hp1188 的功能以及作为抗 *H. pylori* 感染的保护性抗原都具有重要意义。

本文选择 *H. pylori* 的 hp1188 基因,将全长 hp1188 基因克隆入原核表达质粒 pQE30,成功构建了 pQE30-hp1188 重组载体,表达的蛋白具有良好的免疫活性,为进一步分析表达产物的特性、*H. pylori* 黏附的分子机制和免疫保护作用、制备防治 *H. pylori* 定植的疫苗等奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Penta R, De Falco M, Iaquinto G, et al. Helicobacter pylori and gastric epithelial cells: from gastritis to cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2005, 24(3): 337-345.

[2] Fireman Z, Trost L, Kopelman Y. Helicobacter pylori: seroprevalence and colorectal cancer [J]. Isr Med Assoc J, 2000, 2(1): 6-9.

[3] 吴利先,杨致邦,林姗姗,等. 幽门螺杆菌临床株粘附素 HpaA 基因的克隆表达及在诊断中的价值[J]. 中国人兽共患病杂志,2004,20(4):275-278.

[4] Odenbreit S, Faller G, Haas R. Role of the alpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of helicobacter pylori to human gastric tissue[J]. Int J Med Microbiol, 2002, 292(3-4): 247-256.

[5] Azevedo M, Eriksson S, Mendes N, et al. Infection by helicobacter pylori expressing the BabA adhesin is influenced by the secretor phenotype[J]. J Pathol, 2008, 215(3): 308-316.

[6] Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, et al. Helicobacter pylori infection in mice: Role of outer membrane proteins in colonization and inflammation[J]. Gastroenterology, 2002, 123(6): 1992-2004.

[7] Hennig E E, Mernaugh R, Edl J, et al. Heterogeneity among helicobacter pylori strains in expression of the outer membrane protein BabA[J]. Infect Immun, 2004, 72(6): 3429-3435.

[8] Rubinsztein-Dunlop S, Guy B, Lissolo L, et al. Identification of two new helicobacter pylori surface proteins involved in attachment to epithelial cell lines[J]. J Med Microbiol, 2005, 54(Pt 5): 427-434.

[9] 颜子颖,王海林,译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社,1998:22-435.

[10] 李 晶,张建中. 幽门螺杆菌黏附素及受体研究与疫苗发展[J]. 中国人兽共患病学报,2006,22(6):580-582.

[11] Aebischer T, Schmitt A, Walduck AK, et al. Helicobacter pylori vaccine development: facing the challenge[J]. Int J Med Microbiol, 2005, 295(5): 343-353.

[12] Odenbreit S. Adherence properties of Helicobacter pylori: impact on pathogenesis and adaptation to the host[J]. Int J Med Microbiol, 2005, 295(5): 317-324.

[13] Sugiyama T, Asaka M. Helicobacter pylori infection and gastric cancer [J]. Med Electron Microsc, 2004, 37(3): 149-157.

(责任编辑:关蕴良)

The study of radiology in the experiment of repairing bone defects with nano-hydroxyapatite and polyamide-66 composite

XIAO Zhi-bo, et al

(*Department of Radiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the MRI with X-ray in the ability of bony generation by the way of the experiment of repairing bone defects with n-HA/PA66. *Methods*: 30 New Zealand rabbits were avalued whose condyle of tibia in one side was performed boring which was 3mm diameter and 5mm depth with n-HA/PA66 composite implanting. The specimens were taken respectively in different times: 2nd 4th 6th 8th 12th week after surgery, and were examined by the methods of plain roentgenography、histology and magnetic resonance imaging. *Results*: (1)MRI and X-ray: From the 4th week, n-HA/PA66 composite had the poor defined border and the signal inter-material had become more variform, more obvious enhancement, at the same time in the X-ray, there were more and more bony generation. (2)The histology showed that a layer of interface membrane forming. From the 4th week, The interface membrane had been widest and the number of cells was increasing. Till the 12th week, there were some bone trabecula formed and the HA were separated into small islands, more osteoclasts appeared. *Conclusion*: The experimental results show that the perfect radiology technique is useful to predict the bone transplantation. Furthermore it is easy to operate in clinical setting, and the n-HA/PA66 Composite has the attribute of good biocompatility and osteoconductibity, which can be manifested by plain roentgenography and magnetic resonance imaging.

【Key words】Bone transplant; MRI; Bone defect; Nano-hydroxyapatite and polyamide-66 composite

因创伤、肿瘤造成的骨缺损修复问题一直是困扰国内外骨科界的难题，到目前为止还没有相应的系统综合的影像学检测评价，本实验着眼于临床骨缺损修复后的常用的 X 线及磁共振成像(Magnetic resonance imaging，MRI)监测方法，进行探讨。

骨移植后的 3 个基本过程是移植物血管化、骨再生及骨端融合，而移植物血管化是首要的关键环节。监测血管化对骨移植的预后尤其重要。MRI 是继普通 X 线、CT 之后的无创检查技术[1]。它具有独特的捕捉组织及其新陈代谢信号的能力[2]，动态增强磁共振已广泛应用于临床血管化骨移植的研究[3]。但对于实验动物骨移植后应用 MRI 成像技术的研究国内外尚未见到报到，作者采用此法与病理对照研究，从实验研究入手，探讨骨组织修复材料应用临床病人术后的无创全面检查方法，对该复合材料更广泛的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料为 20%纳米羟基磷灰石/聚酰胺复合材料(由四川大学国家纳米生物医用材料产业孵化中心提供)

1.2 动物分组

实验动物为 30 只同种系健康成年新西兰大白兔，体重(2.5 ± 0.5) kg (由重庆医科大学动物实验中心提供)。适应性饲养 1 周后，行一侧胫骨内上侧骨皮质钻孔，造成柱状骨缺损，并植入 n-HA/PA66 复合材料。

1.3 实验方法

速眠新 0.1 ml/kg 局部肌肉推注麻醉，取俯卧位，在无菌条件下，自髌内侧纵切口，打开关节囊，暴露胫骨内上侧骨皮质，钻 1 个直径 3 mm，深 5 mm 的圆柱状骨缺损，保留缺损处骨皮质。明胶海绵充分止血后，将调制好的填充材料用注射器注入到骨缺损处，使其完全充满骨缺损，并用原位骨皮质覆盖。术后立即肌注青霉素 40 万 U/只，连续 3 d，预防感染，不作外固定，分笼饲养。手术均由同一组人员完成。

1.4 检查项目和方法

1.4.1 光镜组织学观察 术后第 2、4、6、8、12 周用空气栓塞法各处死 6 只，做组织学观察。

1.4.2 DR 检查 不同时相点行 X 线摄片，观察填充材料的分布、与周围骨连接、新骨形成情况以及填充材料降解吸收情况，周围骨质疏松情况及邻近关节的改变情况。

1.4.3 MRI 检查 肌注速眠新 0.1 ml/kg，麻醉后固定，采用 GE signa 1.5T MR/i Hispeed plus 核磁共振成像系统，常规行 SE T1WI、GRE、FSPGR、3D FSPGR 及增强对比剂钆喷替酸葡甲胺(Gd-DTPA)1.5 ml/ 只，用腕部线圈，观察周围软组织水肿、植骨区内部和周边的改变以及骨髓腔信号的改变情况，增强扫描了解植入区有无强化及强化程度。在 MRI 工作站利用其统计学功能，感兴趣区选定在病变显示最佳与最大层面，分别测量植骨区中心和边缘区域的信号强度。根据相对信号强度增加公式计算 △SI，即 $\triangle SI(\%)=\frac{SIc-SI}{SI}\times 100\%$ 式中 SI 为增强前病灶信号强度，SIc 为增强后病灶信号强度。

1.4.4 统计学分析 各组实验指标的参数值用均数 ± 标准差表示。结果经 SAS 8.0 统计软件处理，数据用重复设计的方差分析，$P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 光镜组织学观察

术后 2 ~ 4 周，在填充材料与宿主骨交界处形成界膜，n-HA/PA66 侧材料内部呈均匀一片分布未见明显的细胞，周边部分材料被较厚的界膜包绕，其内可见大量间充质细胞、成纤维细胞及小血管(主要为新生毛细血管)(图 1)。

术后 6～8 周，n-HA/PA66 侧界膜宿主面可见膜内成骨征象，内部血管增多，可见环状的成骨细胞；原始骨小梁及成骨细胞层开始形成。

术后 12 周，n-HA/PA66 界膜内可见原始骨小梁形成，骨小梁表面为扁平状、排列整齐的成骨细胞，较多类骨质形成，纤维成分减少，材料被分隔成 HA 小岛(图 2)。

2.2 X 线摄片观察结果

术后 2～6 周，双侧骨缺损区的填充材料和周围骨之间可见透光带，n-HA/PA66 复合材料侧呈略低密度影，邻近关节无明显改变，未见明显的骨膜反应。

术后 8 周，n-HA/PA66 复合材料填充区可见类圆形较高密度影，界线不清；填充区密度逐步减低，小梁逐步伸入。

术后 12 周，n-HA/PA66 复合材料原来中等密度填充区内可见高密度影，与周围界线不清，附近骨膜反应明显。图 3。

2.3 MRI 平扫及 CE MRA 检查结果

n-HA/PA66 复合材料在 T_1WI 上呈稍高信号影，在 T_2*WI 上呈中等低信号影，术区周围髓内水肿(图 4)。

术后 2～4 周，周围软组织水肿区增强扫描呈明显强化，髓腔内也可见到片状不均匀强化区；在 n-HA/PA66 复合材料侧填充区周边强化高于正常髓内强化，在骨与材料交界区亦有中度强化，填充区内强化不明显。术后 6～8 周，平扫 n-HA/PA66 复合材料内部信号不均匀，与骨髓分界不清。在 T_1WI 上呈中高信号影，在 T_2*WI 上呈中等略低信号影。

增强扫描：周围软组织水肿进一步减轻，髓腔内也可见到片状不均匀强化区也减少，填充区边缘交界处的强化程度增加。术后 12 周，平扫 n-HA/PA66 复合材料植入区信号有所下降。增强扫描：填充区内强化较前有增高，髓内信号较均匀(图 5、6)。

2.4 MRI 信号强度增强率(△SI)的测定(见表 1)

材料中心在术后 4 周时的强化率最低，且低于术后 2 周时，以后呈逐步升高趋势；各时相之间有显著差异 $P<0.01$，植骨中心区与植骨周边组间有显著差异 $P<0.01$。

3 讨 论

本实验中结合了普通 X 线以及 MRI 技术，利用 X 线对



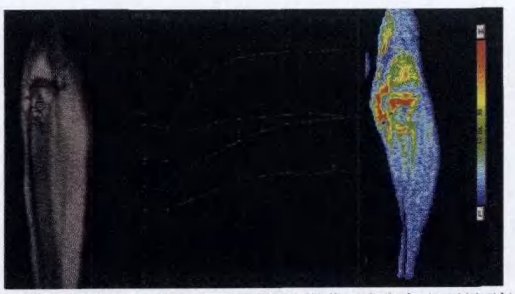
宿主骨小梁侧呈镶边状排列的成骨细胞层，界膜内较多间充质细胞(Masson×40)

图 1 植入第 4 周植入区 Masson 染色



箭头处的填充区域呈高密度影，有骨小梁伸入

图 3 植入第 12 周植入区 X 线摄片



周围软组织水肿区增强扫描呈明显强化，髓腔内也可见到片状不均匀强化区

图 5 术后 2 周增强曲线图及彩图



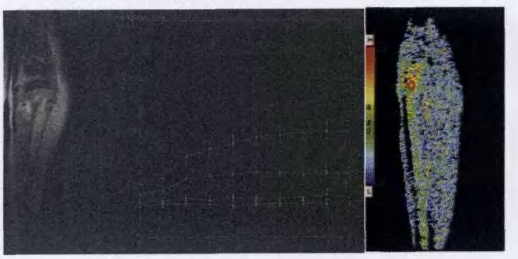
原始骨小梁大量形成，仅少许材料残留，被分隔(HE×100)

图 2 植入第 12 周植入区 HE 染色



复合材料在 T_1WI 上呈稍高信号影，在 T_2*WI 上呈中等低信号影；术区周围髓内水肿。

图 4 术后植入区 MRI 平扫



填充区内强化明显，髓内信号较均匀

图 6 术后 12 周增强曲线图及彩图

表 1 在规定时间点 MRI 信号强度增强率(△SI)的方差分析

	术后 2 周	术后 4 周	术后 6 周	术后 8 周	术后 12 周
植骨周边	85.379 ± 3.393	64.227 ± 3.344	122.111 ± 7.809	97.989 ± 8.215	26.225 ± 3.745
植骨中心	14.752 ± 1.853	8.954 ± 1.963	14.372 ± 1.237	19.144 ± 2.009	41.732 ± 3.867

各时相之间有显著差异 $P<0.01$;植骨中心区与植骨周边组间显著差异 $P<0.01$

于骨骼密度改变的反应来说明移植物和宿主的融合能力,又利用动态增强磁共振(DCE-MRI)进行检测,力图早期监测植骨区内血管生成情况,及周围软组织改变。

DCE—MRI 是在注射磁共振对比剂前、中和后连续获得一系列磁共振图像,可以全面描述对比剂进入和排出血流的动力学过程,因而提供了观察局部组织内在血管的可能[4]。目前该方法广泛用于监测多种肿瘤内部血管属性,区分其良恶性以及对其各种治疗效果(包括:化疗、激素调控、放疗以及新的治疗方法如抗血管生成药物),描述治疗所引起的肿瘤微血管结构与功能的变化[5]。同时也逐步应用于肿瘤血管生成的监测,邹煜等[6]研究就表明动态增强 MR 方法能较好反应肺癌血管的生成。同时,MRI 也用于兔眼眶植入羟基磷灰石义眼台血管化范围和程度的评价[7]。实验中,术后 2 周动态增强显示材料植入区周围有较髓内还明显的强化,且材料周围及中心的强化率高于 4 周时指标,这属于炎性反应范畴。术后第 4 周,材料内部强化值有所下降,结合组织学观察,是早期的炎症反应性强化过后,只有少量新生血管,材料内部血供下降造成的。4 周前,由于有纤维阻挡作用,成骨细胞通过传导长入则较困难,这时的血管密度并不高。对于材料内部的成骨细胞可能来源于间充质细胞,同时在材料宿主界面有膜内成骨征象。6 周开始,界膜内的间充质细胞向成骨细胞转化,以及膜内成骨增多,材料内部的血管生成随之增多,强化程度随之增加,至 12 周时,植骨中心区由于血管生成明显增多,内部强化超过植骨周边强化,两者有显著差异,说明植骨存活,可以用于缺损后骨的修复。

同时研究中发现,光镜下 n-HA/PA66 复合材料在与宿主交界区形成了界膜,并逐步形成成骨细胞,这与柴本甫[8]等实验一致,因为结缔组织中最常见的成纤维细胞能合成分泌Ⅰ型胶原和蛋白多糖,构成基质,并通过线粒体提供钙颗粒,参与钙化过程,具有明显的成骨作用。材料中的 HA 晶体能够刺激骨细胞活跃,并提供晶体核成为新骨形成的支架,发挥出骨引导作用[9],从而加速血管化过程,促进骨的生成,所以 n-HA/PA66 复合材料具有良好的生物相容性和骨传导性。与此同时,动态增强 MRI 在术后检测中显示修复区内逐步明显强化,由于增强明显强化区提示血管活性强,微血管密度(MVD)高;而强化较弱的区域提示血管活性较低,内部微血管较少[10~12],这与光镜下材料周围的界膜内微血管形成逐步增多一致,随着血供增多,骨小梁逐步形成;相对于 MVD 测定技术的有创性及测定方法的繁琐,且所得结果只能反映小区域血管生成情况,无法动态地对血管生成活性进行功能性评价[13],本研究表明动态增强 MR 可以无创性监测骨缺损修复新骨形成的骨基质中原始微血管的形成过程。

同时 n-HA/PA66 复合材料本身短 T_1、长 T_2 表现在修复中也可以清楚显示,材料周围的组织水肿及邻近关节腔的变化也清楚明了。

总之,用磁共振成像与 X 线结合,对于骨缺损修复植入区的血管化监测及植入材料的分辨效果较好;增强 MRI 扫描能够定性检测材料内部血管化,并对移植骨预后的进行监测。同时证明了 n-HA/PA66 复合材料具有良好的生物相容性和骨传导性,具有临床实用性。

参 考 文 献

[1] Hawighorst H, Libicher M, Knopp M V, et al. Evaluation of angiogenesis and perfusion of bone marrow lesion: role of semiquantitative and quantitive dynamic MRI[J]. J Magn Reson Imaging, 1999, 10(3): 286-294.

[2] Keen C L, Jue T, Tran C D, et al. Analytical methods: improvements, advancement and new horizons[J]. J Nutr, 2003, 133(5 Suppl 1): 1574S-1578S.

[3] Tan C F, Ng K K, Yem P S, et al. Viability of vascularized bone grafts; perfusion studies by dyanmic enchanced MRI and bone scan[J]. Transplant Proc, 2001, 33(1): 623-624.

[4] Lewandrowski K U, Tomford W W, Schomacker K T, et al. Improved osteoinduction of cortical bone allografts: a study of the effects of laser prforation and partial demineralization[J]. J Orthop Re, 1997, 15(5): 748-756.

[5] 赵京龙, 张贵祥. 动态增强 MR 成像在肿瘤血管生成功能成像中的应用[J]. 中国医学影像技术, 2004, 20(8): 1293-1295.

[6] 邹 煜, 张敏鸣, 王丽君, 等. MRI 动态增强模式和肿瘤微血管密度与肺癌淋巴结转移的关系[J]. 中华放射学杂志, 2006, 40(2): 176-180.

[7] 樊建中, 孔祥泉, 史河水, 等. 兔眼眶植入羟基磷灰石义眼台血管化的 MRI 评价[J]. 中华放射学杂志, 2007, 41(11): 1254-1257.

[8] 柴本甫, 汤雪明. 实验性骨折愈合的细胞生物学[J]. 中华骨科杂志, 1991, 11(3): 203-206.

[9] Weinlaender M. Bone growth around dental implants[J]. Dent Clin North Am, 1991, 35(3): 585-601.

[10] Buadu L D, Murakami J, Murayama S, et al. Patterns of peripheral enhancement in breast masses: correlation of findings on contrast medium enhanced MRI with histologic features and tumor angiogenesis[J]. J Comput Assist Tomogr, 1997, 21(3): 421-430.

[11] Matsubayashi R, Matsuo Y, Edakuni G, et al. Breast masses with peripheral rim enhancement on dynamic contrast-enhanced MR images: correlation of MR findings with histologic features and expression of growth factors[J]. Radiology, 2000, 217(3): 841-848.

[12] Yun-Woo C, Kui H K, Deuk L C, et al. Magnetic resonance imaging of breast cancer and correlation with prognostic factors[J]. Acta Radiol, 2009, 50(9): 990-998.

[13] George M L, Dzilk-Jurasz A S, Padhani A R, et al. Non-invasive methods of assessing angiogenesis and their value in predicting response to treatment in colorectal cancer[J]. Br J Surg, 2001, 88(12): 1628-1636.

(责任编辑: 冉明会)