维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)05-0484-05

复合 rhVEGF+rhBMP-2 的钙磷骨水泥促进犬异体脱蛋白骨关节移植的成骨研究

瞿向阳,蒋电明,安 洪,曹本珍

(重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨钙磷骨水泥(calcium phosphate cement,CPC)复合重组人血管内皮细胞生长因子(Recombinant human vascular endothelial growth factor,rhVEGF)+ 重组人骨形态发生蛋白 -2 (Recombinant human bone morphogenetic protein-2,rhBMP-2)与异体脱蛋白骨(Deproteinized bone,DPB)关节复合移植修复骨关节缺损的能力。方法:成年杂交犬 36 只,距关节面 30mm 切除右侧股骨下端制成半关节缺损模型,随机分成三组:A 组:CPC/rhVEGF/rhBMP-2/DPB 关节移植组;B 组:rhVEGF/rhBMP-2/DPB 关节移植组;C 组:单纯的 DPB 关节移植组。于术后 4、8、12、16 周行大体形态学观察及 X 线检查、组织学检查并做 I 型胶原免疫组织化学分析、透射电镜检查和生物力学测试,检测骨修复情况。结果:A 组在大体形态学观察、X 线片、组织学、电镜观察和生物力学测试,其成骨能力和质量均优于 B、C 两组,I 型胶原免疫组化图像分析和生物力学测试结果均优于 B、C 两组,差异有统计学意义 ($P<0.01$),B、C 组间在各时间点差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论:CPC/rh-VEGF/rh-BMP-2 可促进异体脱蛋白骨关节移植的成骨能力,可加速移植体与受体骨愈合。

【关键词】钙磷骨水泥;脱蛋白骨;血管内皮细胞生长因子;骨形态发生蛋白;骨关节移植

【中国图书分类法分类号】Q813;R687.34 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-10-17

Experimental study on ossification of deproteinized osteoarticular allograft with calcium phosphate cement containing recombinant human vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 in dogs

QU Xiangyang, et al

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

【Abstract】***Objective***: To explore the ability of osteo-articular allograft of variant deproteinized bone combining calcium phosphate cement with recombinant human vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 in repairing osteo-articular defect. ***Methods***: 36 adult mixtus dogs were constructed as semi-articular defect models through resecting 30mm right femur inferior extremity near articular facet, and they were randomly divided into 3 groups. In group A, material CPC/rh VEGF/rh BMP-2/DBP was transplanted into the semi-articular defect. In group B, material rhVEGF/rhBMP-2 /DBP was transplanted there. In group C, simple material DPB was transplanted there. At 4, 8, 12 and 16 weeks after operation, the effects were assessed by macro-morphology observation, X-ray examination, histologic examination as well as collagen type I immunohistochemistry analysis , transmission electron microscope examination and vitodynamic tests in order to observe bone reparation matter. ***Results***: The new bone formation observed by vitodynamic tests, macro- morphology observation, X-ray examination, histologic examination and transmission electron microscope examination in group A was significantly superior to that in group B and C. The results of collagen type I immunohistochemistry analysis and vitodynamic tests were significantly superior to that in group B and C ($P<0.01$). However there was not statistically significant difference between group B and C ($P>0.05$). ***Conclusion***: The materials CPC/ rh VEGF/rh BMP-2 can promote the new bone formation, achieve bone healing and make them become autologous tissue at last.

【Key words】Calcium phosphate cement; Deproteinized bone; Vascular endothelial growth factor; Bone morphogenetic protein; Osteoarticular allograft

外伤、感染与肿瘤等原因引起的大段骨关节缺损是矫形外科医生面临的一大挑战。自体吻合血管的骨关节移植效果最佳,但供区来源有限,并发症

作者介绍:瞿向阳(1976-),男,住院医师,博士,主要研究方向:骨修复与重建、骨科生物活性材料。

基金项目:重庆市科技攻关项目:渝科发计字 200138 号。

维普资讯 http://www.cqvip.com

多。金属、陶瓷或高分子材料假体都具有一个共同的问题:易折断、下沉、磨损与翻修等等。我们用钙磷骨水泥作为 rhVEGF 和 rhBMP-2 的载体复合同种异体脱蛋白骨关节移植,利用钙磷骨水泥生物降解的特性局部持续高浓度释放生长因子促进移植体的成骨和血供重建,以促进移植体与宿主骨达到早期骨性愈合。

1 材料与方法

1.1 材料的制备

1.1.1 人重组促血管内皮细胞生长因子(rhVEGF) 由北京博奥森生物技术有限公司提供。人重组骨形态发生蛋白 2(rh-BMP2):由广州市达晖生物技术有限公司提供。钙磷骨水泥(CPC):由上海瑞邦生物科技有限公司提供。

1.1.2 犬的股骨下端脱蛋白骨(DPB)关节移植体 选成年杂交犬处死后取其双侧股骨下段(含关节端)长 30mm,剔除骨膜及韧带软组织,经蒸馏水反复冲洗干净,以 20%的过氧化氢脱蛋白,乙醚循环脱脂,皮质骨散在钻孔,制成脱蛋白骨关节材料,冻干,环氧乙烷消毒,低温保存备用。

1.1.3 DPB/rh VEGF/rh BMP-2 移植体的制备 将 rhVEGF 和 rhBMP-2 冻干粉以重蒸水溶解,滴注于犬脱蛋白股骨下端髁间钻孔处和近段截骨处,冻干低温保存。

1.1.4CPC/DPB/rhVEGF/rhBMP-2 移植体的制备 将 rhVEGF 和 rhBMP-2 冻干粉用 CPC 液相溶液溶解混匀,再与 CPC 粉末充分调和,于脱蛋白骨表面涂层并髓腔内部分填塞。

1.2 实验分组和手术方法

1.2.1 实验分组 选取成年杂交犬 36 只,雌雄不限,体重 10±0.5kg,随机分成三组,每组 12 只。A 组:CPC/rhVEGF/rhBMP-2/DPB 关节移植组,B 组:rhVEGF/rhBMP-2 /DPB 关节移植组,C 组:单纯的 DPB 关节移植组。

1.2.2 手术方法 以速眠新麻醉成功后,侧卧位固定于手术台上,常规消毒铺巾,取膝关节外侧切口,暴露股骨远段和胫骨近端,切断前后交叉韧带及内外侧副韧带,U 型切开骨膜并翻向近侧,距关节面 30mm 处用线锯切断股骨,用交叉克氏针和钢丝将移植物固定于股骨断端,将翻向近端的骨膜拉下缝合覆盖移植物与断端结合部,复位膝关节修复关节囊,逐层缝合切口,分笼饲养,术后肌注青霉素 160 万 U,每日两次连用 3 天,用石膏外固定 2 周后去除。

1.3 观测方法

1.3.1 大体形态学观察及 X 线片检查 分别于术后 4、8、12、16 周处死实验动物取标本,观察局部炎症反应、骨愈合情况、局部粘连程度及内固定有无松动断裂等。

1.3.2 组织学检查 分别于 4、8、12、16 周取移植物常规石蜡切片,HE 染色,光学显微镜观察,并做 I 型胶原免疫组化分析:取上述石蜡切片,脱蜡,梯度乙醇脱水,3%过氧化氢消除内源性过氧化物酶,抗原修复液修复抗原,山羊血清封闭 20min,滴加抗 I 型胶原多抗 4℃孵育过夜,与二抗室温接触 20min,DAB 显色,核固红,苏木精复染。每张切片随机选择 5 个视野行图像分析计数,结果用面积积分光密度(OD)表示。

1.3.3 透射电镜检查 分别于 4、8、12、16 周取标本性透射电镜检查,行成骨及血供重建定性鉴定。

1.3.4 生物力学测试 3 组术后 16 周分别取骨关节缺损修复标本,自移植物远端及宿主骨干长约 60mm,去除内固定克氏针和钢丝,剔除软组织,测量骨缺损修复处外径,在生物力学测试系统(MTS 型 MTS 公司,美国)上行三点弯曲测试,以 0.5mm/s 加载,标本测试距离为 30mm,做三点弯曲最大载荷并计算弯曲应力。

1.3.5 统计学处理 所得数据以 SAS 统计软件包做方差分析,数据以均数±标准差表示,组间样本行完全随机设计方差分析,P 值 < 0.05 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 大体观察

A 组在术后 4 周可见移植物被薄层纤维组织包裹,断端间有纤维组织连接,涂层的钙磷骨水泥部分降解,内固定稳定,术后 8 周可见纤维组织较前增厚,骨断端可见有外骨痂形成,断端间有少量软骨痂形成,移植物表面仍可见少许未降解的钙磷骨水泥,12 周时可见骨断端骨痂形成逐渐增多,至 16 周时骨断端间被大量环形骨痂包绕,移植物与受体骨组织紧密愈着,界限模糊,剥离时可见散在的出血点,关节腔内有少量纤维组织粘连,移植物关节面可见少量软骨形成,保持光滑。

B 组 4 周时可见纤维组织形成,切开后有少量淡黄色液体渗出,未见有明显骨痂形成,8 周时可见有较多的纤维组织形成,骨折端有少许外骨痂形成,12 周时骨断端骨痂形成仍较少,16 周时骨断端间可见环形骨痂形成,但较 A 组明显减少,断端间有少许骨痂连接,关节腔内有纤维组织粘连,移植物关节面无明显软骨形成但仍保持光滑。

C 组术后 4 周见膝关节肿胀,移植物有较多的纤维组织包裹,切开后有淡黄色液体渗出,8 周时肿胀消退,大量纤维组织形成,没见到明显的骨痂形成,12 周断端有少量骨痂形成,16 周时断端间可见少许骨痂连接,移植物与受体的界限仍然可见,关节腔内纤维组织粘连同 A、B 组,关节面尚光滑,未见软骨形成。

B 组 1 例死亡,C 组有 2 例化脓性感染,1 例内

维普资讯 http://www.cqvip.com

固定松动。

2.2 X 线片观察

A 组:术后 4 周骨折线清晰,移植物密度较正常骨组织略高, 断端可见有少量骨痂形成,8、12 周时断端间骨痂形成增多, 骨折线趋于模糊,16 周可见大量环形骨痂形成,骨折线消失,达到骨愈合,移植物密度接近正常骨组织。

B 组:术后 4 周骨折线清晰可见,未见有明显骨痂形成,8 周时间有少量骨痂,12 周时骨痂量增多,16 周时骨折线模糊,断端可见骨痂形成,移植物密度仍较正常骨组织高。

C 组: 术后 4、8、12 周 X 线显示, 骨痂形成比 A、B 组时间延迟, 量较少, 至 16 周时仍可见骨折线,断端间骨痂形成较少,未见骨愈合,移植物密度与前比无明显变化。

2.3 组织学检查

2.3.1 HE 染色 A 组:术后 4 周移植物可见有大量的新生血管、间充质细胞及少量的炎性细胞出现,散在的成骨细胞和成软骨细胞团出现。8 周时可见成骨细胞成熟伴编织骨的形成。12 周时软骨细胞成团,大片编织骨向板层状骨组织转化,有骨的爬行替代现象。16 周时大量的板层状骨组织形成,移植物-受体介面无明显分界,达到骨愈合,靠近关节面处可见软骨细胞岛形成(图 1A)。

B 组:术后 4 周移植物内可见有新生血管、间充质细胞及较多的炎性细胞出现,未见有成骨活动。8 周时新生血管增多但明显较 A 组少,仍可见较多的炎性细胞,有散在的成骨细胞出现。12 周时可见有软骨细胞及编织骨的形成,16 周时编织骨形成增多,部分向板层状骨组织转化,移植物-受体分界线模糊,部分骨愈合,关节端未见有成软骨活动(图 1B)。

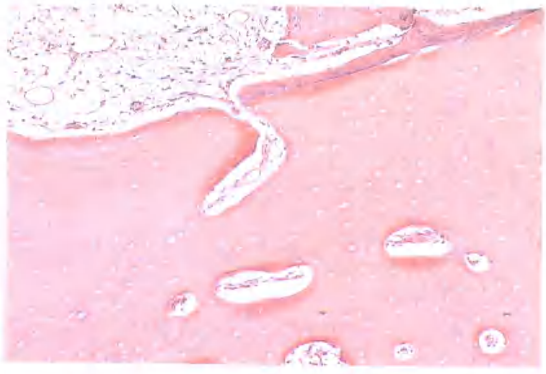
C 组: 术后 4 周可见间充质细胞及大量的炎性细胞浸润, 偶见有新生血管。8 周时炎性细胞仍较多,少量新生血管长入,未见成骨活动。12 周时炎性细胞较前减少,可见少量新生血管及散在的成骨细胞和成软骨细胞。16 周时成骨细胞和软骨细胞增生成团,部分形成编织骨,未见有明显的板层状骨组织, 移植物-受体界线仍然清晰可见, 未达到骨愈合,关节端未见有成软骨活动(图 1C)。

2.3.2 免疫组织化学图像分析 3 组术后 4、8、12、16 周 I 型胶原均被染成棕黄色 (图 2A,2B,2C),图像分析系统显示,术后 4、8、12 及 16 周 A 组 I 型胶原面积积分光密度值明显高于 B、C 组,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 1。

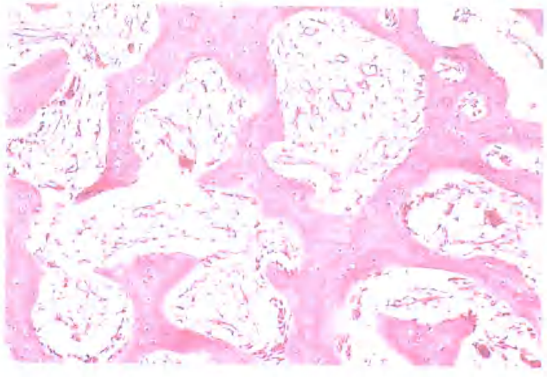
表 1 I 型胶原免疫组织化学图像分析($n=10$,IOD/μm^2,$\bar{x}\pm s$)

组别	4 周	8 周	12 周	16 周
A	0.27±0.09*	0.46±0.12*	0.57±0.08*	0.62±0.07*
B	0.11±0.10	0.29±0.09	0.33±0.11	0.38±0.05
C	0.08±0.07	0.19±0.12	0.26±0.06	0.29±0.09

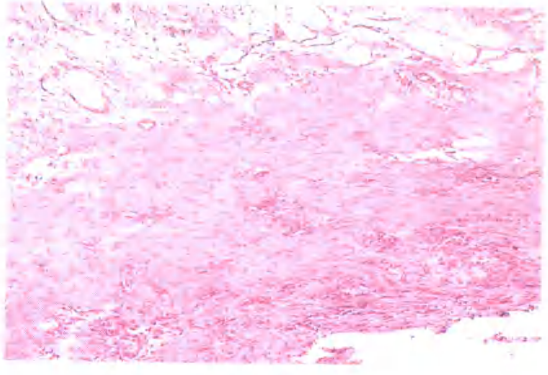
* 与 B、C 组相同时间点比较 $P<0.01$



A 组:16 周大量板层骨形成,骨愈合



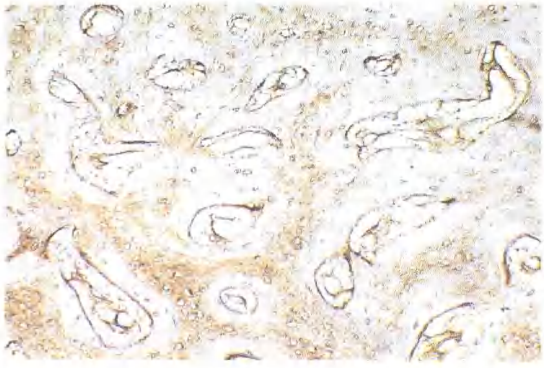
B 组:16 周较多编织骨形成,部分向板层骨转化



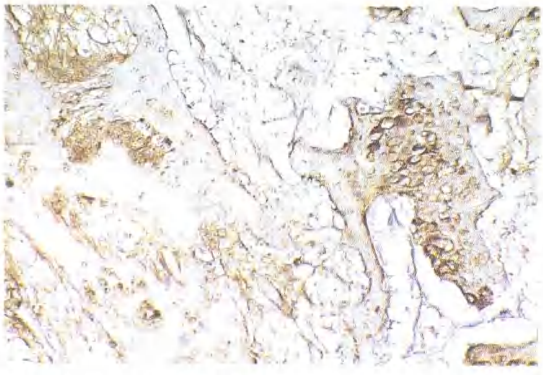
C 组:16 周编织骨形成较少,可见增生成团的成骨细胞

图 1 组织学观察(HE ×200)

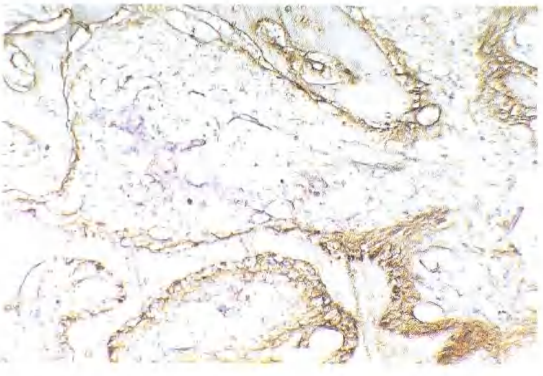
维普资讯 http://www.cqvip.com



A 组:16 周大量黄染的 I 型胶原附着于新生骨小梁



B 组:16 周新生骨小梁中黄染较少,增生的成骨细胞团周围黄染较多



C 组:16 周仅在骨小梁边缘成骨细胞较多处有少许黄染

图 2 I 型胶原免疫组织化学染色(×200)

2.4 透射电镜检查

A 组 4 周可见大量间充质细胞、新生血管,8、12 周时以成骨细胞和成软骨细胞居多,新生血管较多,管腔狭小,内皮细胞呈柱状,胞核大,常染色质均匀细密,异染色质少,胞质中富有细胞器,部分趋向成熟。16 周时细胞基本为成熟的骨细胞,部分已开始衰老,位于骨陷窝内,细胞核较大,核质染色深,核周围有薄层胞质,细胞器很少,细胞发出很长的胞质突起,深入骨小管中,细胞间质中主要为胶原纤维,仍可见较多的新生血管,B 组 4 周时可见较多的炎性细胞浸润和间充质细胞的聚集,可见新生血管生成,8、12 周时炎性细胞减少,新生血管较少,16 周时可见少量的骨细胞,但成骨细胞较多,其成骨细胞体积小,呈多边形或不规则形,核呈卵圆形,较大,偏位,胞质内可见较多的粗面内质网和线粒体,血管形成较少,偶见新生血管。C 组 4 周时以炎性细胞和间充质细胞为主,血管发生较少,8、12 周时可见血管发生及成骨活动,16 周时可见少量幼稚骨细胞,幼稚骨细胞多呈圆形,体积多较大,核位于细胞偏侧,胞内有较多的细胞器和粗面内质网,新生血管较少。

2.5 生物力学测试

各组术后 16 周三点弯曲应力结果,经统计分析,A、B、C 组三点弯曲应力结果分别为(246±6.32)N、(132±7.65)N 和(127±6.68)N。A 组三点抗弯曲应力负荷明显强于 B、C 组有统计学意义($P<0.01$),但 B、C 组间无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨 论

DPB 具有天然骨组织的网孔状结构和良好的机械强度,仅含少量非胶原蛋白,主要成分是由钙和磷组成的非结晶相羟基磷灰石[1],具有与宿主骨相似的生物组织,具有利于骨细胞附着的三维支架,有助于新生毛细血管的长入和间质细胞的迁入,同时可促进成骨细胞的分化和胞外基质的合成,易被受体破骨细胞接近清除[2]。同时 DPB 拥有良好的细胞相容性和组织相容性,是一种良好的骨移植材料[3]。

VEGF 具有强的促血管内皮细胞有丝分裂的作用,增加血管通透性及血管维持功能,有利于新生毛细血管的生成,为局部材料的降解及新骨的形成创造最佳微环境[4],还能提高成骨细胞的活性和软骨内成骨,从而促进骨形成,并且血管内皮细胞和成骨细胞之间还存在生长因子分泌和旁分泌的相互关系[5,6]。BMP 是一种高效的骨诱导生长因子,它能诱导血管周围的未分化间充质细胞和骨髓基质细胞分化为成软骨细胞和成骨细胞,已有研究发现 BMP 和 VEGF 在骨愈合中对成骨有相互依赖及调控的作用[7,8]。但 VEGF 和 BMP 蛋白在体内半衰期短,直接注入体内易降解,故外源性单纯给与上述

维普资讯 http://www.cqvip.com

蛋白的治疗效果有限,如果将上述蛋白与载体复合在体内达到缓慢持续释放可克服单纯蛋白治疗的缺点。

CPC 是一种新型的可降解的、非陶瓷型骨水泥,其理化特性具有可塑性,反应不产热且具有一定的力学强度和孔隙率。在生物学特性上具有如下优点:水化产物为羟基磷灰石,而后者是天然骨的主要成份;具有良好的骨诱导能力;可生物降解,能被新生骨以爬行替代的方式替代,其吸收速度和新骨形成具有一致性;无明显的毒副作用,无免疫原性和致癌作用[9-11]。CPC 已经广泛应用于临床修复骨缺损、治疗骨折、药物载体等,已有学者利用 CPC 作为 BMP、TGF-β、TNF 等生长因子的载体,利用其生物降解特性达到局部持续高浓度生长因子的释放,并能保持其固有的活性[12]。在实验中我们利用 CPC 作为 BMP 和 VEGF 的共同载体,从大体、X 线片、透射电镜、组织学及 I 型胶原免疫组织化观察到 A 组术后各期的成骨能力和血管化程度均明显优于 B、C 两组。这表明 CPC 作为 VEGF 和 BMP 共同的生物相容性载体,应用于 DPB,协同实现骨传导、骨诱导和血管化效应,可作为一种新型骨关节移植替代材料,有效修复骨关节缺损。长段大块骨关节移植,其血供来源不同于一般的骨移植,血管生成只能由宿主骨干一端向移植物生长,这个过程无疑是很缓慢的。我们利用 CPC 作为载体,以达到局部持续、有效的 VEGF 和 BMP 释放,促进移植物的早期血管化,为骨愈合带来丰富的靶细胞和生长因子,创造成骨的最佳微环境,达到移植体与受体早期骨性愈合。

本实验中,我们在移植材料上钻孔,用 CPC 在其表面涂层,可使部分 CPC 进入髓腔,达到"生物自锁",并且由于 CPC 无免疫原性,可使移植物达到早期免疫封闭作用,降低其免疫反应,而正是这种早期免疫封闭作用避免了手术创伤炎症反应和免疫反应高峰期的重合,降低了术后感染、骨不连的发生。结果表明,A 组动物无 1 例发生感染和死亡,早期炎症反应也明显较弱,B、C 组动物炎症反应较强,2 例发生化脓性感染,1 例死亡。在手术时,我们保留了受区骨膜,最大程度地保留了 VEGF 和 BMP 作用的靶细胞,有利于骨愈合。综上所述,CPC/rhVEGF/rhBMP-2/DPB 骨关节移植,促进了局部血管的早期形成和有利于新骨形成及愈合,并使移植物逐渐"活化"而最终成为受体自身组织,为骨关节缺损的治疗提供了一种有效的治疗手段。

参 考 文 献

[1] Cho,Gyunggoo Hui.Detection of Hydroxyl Ions in Bone Mineral by Solid-State NMR Spectroscopy[J].Science,2003;300(5622):1123-1127.

[2] Tapety FI,Amizuka N,Uoshima K,et al.A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis[J].Clin Oral Implants Res,2004;15(3):315-324.

[3] 李彦林,杨志明,解慧琪,等.生物衍生骨支架材料的组织相容性研究[J].中华整形外科杂志,2002;18(1):6-8.

[4] Saadeh PB,Mehrara BJ,Steinbrech DS,et al.Transforming growth factor-betal modulates the expression of vaseular endothelial growth factor by osteohlasts[J].Am J Physiol,1999;277:628-637.

[5] Wang S,Miura M,Demura H,et al.Anablic effects of 1.25-Dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and factors produce by endothelial cells[J].Endocrinology,1997;138:2953-2962.

[6] Street J,Bao M,deGuunan L,et al.VEGF stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover[J].PNAS,2002;99(15):9656-9661.

[7] Urist MR,Nilsson O,Rasmussun J,et al.Bone regeneration under the influence of a bone morphogenetic protein (BMP)bete tricalcium phosphate (TCP) composite in skull trephine defects in dogs[J].Clin Orthop,1987;214-295.

[8] Tombran,Tink J,Barnstable CJ.Osteoblasts and osteoclasts express PEDF,VEGF-A isoforms,and VEGF receptors:possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone[J].Biochem Biophys Res Commun,2004;316(2):573-579.

[9] Yoshimine Y,Sumi M,Isobe R,et al.In vitro interaction between tetracalcium phosphate-based cement and calvarial osteogenic cells [J].Biomaterials,1996;17(23):2241-2245.

[10] Yuan H,Li Y,De bruijn JD,et al.Tissue responses of calcium phosphate cement:a study in dogs [J].Biomaterials,2000;21 (12):1283-1290.

[11] Liu C,Wang W,Shen W,et al.Evaluation of the biocompatibility of a nonceramic hydroxyapatite[J].Endod,1997;23(8):490-493.

[12] Blom EJ,Klein-Nulend J,Klend CP,et al.Transforming growth factor-betel incorporated during setting in calcium phosphate cement stimulates bone cell differentiation in intro[J]. Biomed Mater Res,2000;50(1):67-74.