DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.031
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

文章编号:1000-5404(2002)05-0567-04

论著

BMP及TGF-β复合生物材料治疗股骨头坏死的组织学观察

周 强,石国华,杨 柳,谭祖键,戴 刚,唐康来 (第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038)

提 要:目的 观察吸附有BMP-2和TGF-β_1的PLLA/CPPf多孔材料植入股骨头坏死(Femur head necrosis,FHN)病灶清除区后的组织学变化,评价其诱导成骨活性及生物降解性,以探索FHN治疗的新方法。方法 在激素诱导性兔FHN模型上行坏死病灶清除术,以该种材料充填骨腔,行大体和组织学光镜观察。结果 ①大体观察,术后2周充填区周边出现反应带;6周周边反应带基本消失,有骨小梁长入充填区;12周骨小梁已布满充填区。②光镜观察,术后1周充填区周围间充质细胞大量增生,纤维肉芽组织形成,开始且持续呈网状长入充填区;2周周边有新骨产生,以后不断增加并向充填区中心延伸,材料逐渐降解,12周充填区广布相对较成熟的骨小梁。结论 PLLA/CPPf多孔隙材料是生长因子的良好吸附载体,具有较好的生物相容性和生物可降解性,适合活组织长入。吸附有BMP-2和TGF-β_1的PLLA/CPPf多孔隙材料具有较强的诱导成骨能力,能有效地提高在骨坏死病理条件下股骨头的骨修复能力。

关键词:股骨头坏死;生物材料;诱导成骨;骨形态发生蛋白;转化生长因子β
中图法分类号:R318.08;R392.11;R681.8 文献标识码:A

Histological observation on effects of degradable porous polymer with osteo-inducing factors in healing of femur head necrosis

ZHOU Qiang, SHI Guo-hua, YANG Liu, TAN Zu-jian, DAI Gang, TANG Kang-lai (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the histological changes after BMP-2/TGF-β_1-adsorbed PLLA(poly-L-lactic acid)/CPPf(calcium polyphosphate fiber) porous polymer being infilled into the necrotic areas of femoral heads, and evaluate their activity of osteoinduction and biodegradation in order to search a new therapy for femur head necrosis(FHN). Methods BMP-2/TGFβ_1-adsorbed PLLA/CPPf polymer was infilled into the necrotic areas of femoral heads after the nidus had been operatively cleared in glucocorticoid(GC)-inducing experimental model of femur head necrosis in rabbits. The gross and histopathologic changes were investigated in the femoral heads. Results 1) On the macrography, the reaction zone emerged around the polymer at the 2nd week. At the 6th week, the reaction zone disappeared and the bone trabecular formed and elongated into the filling areas. At the 12th week, the bone trabecular was distributed in all over the filling areas. 2) Under the microscope, a large quantity of mesenchymal cells proliferated, fibrous granulation tissue formed and began to elongate into the filling areas at the 1st week. At the 2nd week, new bone formed around the filling areas. Then its quantity continuously increased and the polymer was gradually degraded with the time passing. At the 12th week, the filling areas were full of mature trabecular. Conclusion PLLA/CPPf scaffold, as a fine carrier of growth factors, has sound biocompatibility and biodegradability in tissue growing. PLLA/CPPf—BMP—2/TGF—β1 has strong activity of osteoinduction and improves the ability of bone repair in the osteonecrotic areas of femoral heads. The therapy may become a new and effective choice of the treatment of femur head necrosis in future.

Key words: femur head necrosis; biomaterial; osteoinduction; bone morphogenetic protein; transforming growth factor-β

股骨头坏死(Femur head necrosis,FHN)是临床上常见的骨病,但目前尚缺乏理想的治疗方法[1]。成骨因子,如骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein,BMP)及转化生长因子β(Transforming growth factorβ1,TGF-β)等,在促进骨折愈合方面的作用已被近年来的大量研究所证实,但在联合应用治疗FHN方面尚鲜有报道。我们在以往研究中应用大剂量激素成功地诱导了FHN模型,较好地反映了FHN的病理发展过程,并发现股骨头坏死区骨修复能力差[2,3]。为增强坏死区骨修复能力,本实验将复合有BMP-2和TGF-β_1的可吸收多孔生物材料植入股骨头坏死病灶清除区,观察其在股骨头坏死病理微环境下的诱导成骨活性,以探索治疗FHN的新方法。

1 材料与方法

1.1 可吸收多孔生物材料的制备

按1∶1体积比将L-聚乳酸(Poly-L-lactic acid, PLLA)和聚磷酸钙纤维(Calcium polyphosphate fiber, CPPf)混均,以熔铸颗粒沥取法制成直径约2.5 mm、空隙率约60%、孔径100~200 μm的颗粒状多孔材料。

1.2 多孔材料的成骨因子吸附和成骨活性鉴定

多孔的PLLA/CPPf经乙醇逐级水化后,真空吸附rhBMP-2

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39830100);全军"十五"医药卫生科研基金资助重点项目(01Z072)
作者简介:周 强(1965—),男,河北省乐亭县人,博士,主治医师,讲师,主要从事组织工程及骨病方面的研究。电话:(023)68754164
收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-04-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(第四军医大学西京医院骨科研究所惠赠)和 TGF-β_1(本实验室自人血小板提取,纯度约 89%),环氧乙烷消毒,4℃保存。将其植入兔股四头肌中,3 周采集标本,行常规 HE 染色光镜观察。

1.3 动物模型的制作及手术术式

选用 8~14 个月龄的雌性、未孕的健康日本大耳白兔(由第三军医大学实验动物中心提供),体重为 3.5~4.5 kg,每天 1 次肌注 2.5 mg/kg 地塞米松,连续 8 周[2,3]。停药两周后,在 3%戊巴比妥静脉麻醉下,取右髋关节外侧切口,显露股骨颈前上部,在临股骨头关节软骨缘处以 2.5 mm 钻头钻孔,用自制小刮匙向内侧潜行刮除股骨头上部关节软骨下病灶区(以往对模型的观察表明此区骨坏死病变最严重[2,3]),造成一直径约4.0 mm 的骨腔,充填或不充填植入物。

1.4 动物分组

实验动物 54 只,随机分为 3 组,每组 18 只。A 组充填吸附有 BMP-2/TGF-β_1 的 PLLA/CPPf 多孔材料,每个股骨头植入约 BMP 5 mg、TGFβ 5 μg;B 组充填无因子的 PLLA/CPPf;C 组为空白对照,不作充填。均于术后 1、2、3、6、9、12 周分批处死。

1.5 标本处理及观察

切取实验侧股骨头,以 10%中性福尔马林固定。经脱钙后,行剖面大体观察照相,常规石蜡切片、HE 染色,光镜观察。

2 结果

2.1 吸附 BMP-2/TGF-β_1 多孔材料诱导成骨活性

植入肌肉 3 周即可见植入区已形成良好的编织骨,骨小梁呈网状分布,其间为骨髓组织,见图 1。

2.2 股骨头的大体及组织学观察

2.2.1 大体观察 A 组术后 2 周充填区界限清楚、其内有黄褐色物,周边有一明显的反应带、质地色泽与骨质相近;6 周,周边反应带基本消失,开始有骨小梁长入充填区;9 周充填区质地和色泽近似周围组织,无明显界限;12 周整个充填区已分布有骨小梁,但排列欠规则,见图 2。B 组术后 3 周充填区组织松散,周边有反应带;6 周后充填区为纤维组织;12 周充填区质地色泽与周围组织区别仍明显,界限清楚,周边有少许新生骨小梁。C 组术后 3 周病灶清除区为黄白相间的组织所充填,有反应带;6~12 周后中心部为纤维组织、无明显骨小梁长入。

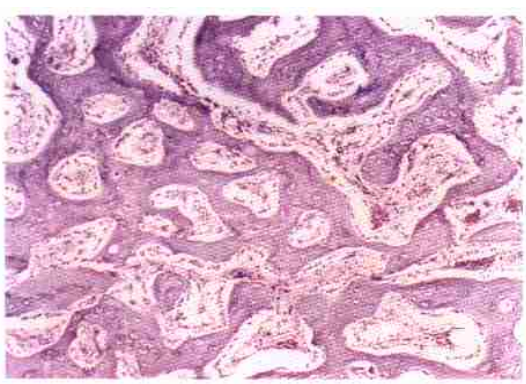


图 1 PLLA/CPPf-BMP-2/TGF-β_1 植入肌肉形成的编织骨 (HE× 100)

Fig 1 Woven bone from PLLA/CPPf-BMP-2/TGF-β_1 construct after being implanted in muscle (HE× 100)



图 2 A 组 12 周整个充填区(↑)布满骨小梁

Fig 2 Bone trabecular in all over the filling area at the 12th week in the group A

2.2.2 光镜观察 A 组术后 1 周,充填区周围有肉芽组织形成,间充质细胞大量增生,新生纤维肉芽组织开始呈网状长入充填物,其中的空隙是因 CPPf/PLLA 在切片脱蜡过程中被溶解而留下;2 周周边有明显的成骨反应,见图 3;3 周后则有较多的新骨形成,偶见少量的软骨出现,纤维肉芽样组织继续向中心部长入;6 周周边新骨带明显增宽,成骨反应向中心部推进,而中心部空腔面积明显减小;9 周整个充填区基本为幼稚的骨小梁所占据,表面有较多的成骨细胞,见图 4,仅中心残留少量空腔;12 周充填区广布相对较成熟的骨小梁,但较正常骨小梁粗、排列不够规则,表面仍有较多的成骨细胞。在观察过程中,材料逐渐降解,未见明显的异物反应。B 组术后 3 周,周边有少量成骨反应,新生组织向中心部长入;6 周周边有一定量骨形成,成骨明显比 A 组弱,中心部有大量纤维组织长入,可见异物巨细胞;9~12 周周边为骨形成带,中心部为纤维组织,仍可见异物巨细胞,而未见明显骨形成,见图 5。空腔面积明显比 A 组大得多。C 组术后 3 周,周边有新骨形成,中心部为疏松的纤维肉芽组织;6~12 周后周边为逐渐形成的骨壁,中心部为纤维组织,无骨组织充填。

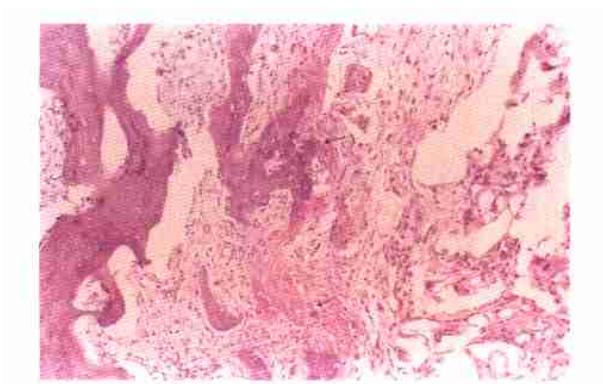


图 3 A 组 2 周充填区周边的成骨反应(↑),纤维肉芽组织向中心(右)长入 (HE× 100)

Fig 3 Osteogenesis around the filling area with fibrous granulation tissues elongating into the center (right of the picture) at 2nd week in group A (HE× 100)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图 4　A 组 9 周充填区内为幼稚的骨小梁, 表面有较多的成骨细胞(↑)　(HE× 100)

Fig 4　Immature bone trabecular in the filling area with many osteoblasts on surface at the 9th week in the group A　(HE× 100)

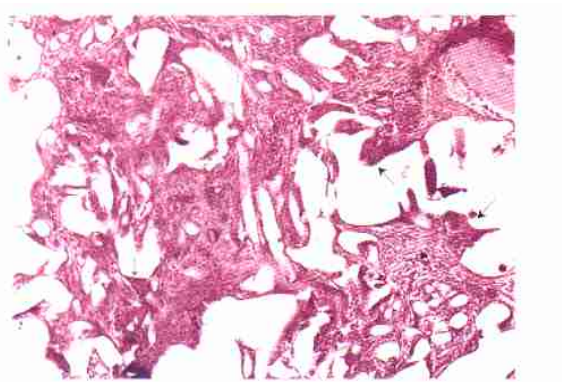


图 5　B 组 12 周中心部为纤维组织, 仍可见异物巨细胞(↑)　(HE× 100)

Fig 5　Fibrous tissue in the center of filling area with foreign body giant cells on the surface of the filling stuff in the group B　(HE× 100)

3　讨论

虽然国内外学者在不断探索治疗 FHN 的新方法, 如药物治疗、髓芯减压、旋转截骨、自体非血管及血管化的骨移植等, 但是疗效报道不一或操作复杂并增加新的创伤, 以致目前对 FHN 尚无较理想的疗法[1]。我们在激素诱导性 FHN 的实验研究中发现股骨头不仅存在明显的血循环障碍[3], 而且负重区骨修复能力低下[2]。所以, 当病损区发生微骨折以及死骨吸收时不能伴随有效的同步骨修复, 导致软骨下骨力学强度大大降低而关节面塌陷。因此, FHN 的治疗有必要从增强股骨头局部骨修复能力和在坏死得以很好修复前维持局部力学强度两方面着手, 本实验在这方面进行了初步的尝试性观察。

近几年来, 人们开始探索局部应用 BMP 治疗 FHN, 但缺乏吸附因子的良好载体, 影响成骨因子局部作用的发挥[1, 4~6]。本实验所制备的 PLLA/CPPf 复合多孔材料具有 60%孔隙率, 是成骨因子的良好吸附载体且适合新生组织的长入[7]; 另一方面, 这一复合材料以 CPPf 作为内支架提高了其力学强度[8, 9], 而通过这两种高分子材料不同分子量的选择, 可以调节复合多孔材料的力学强度和降解时间, 以利于发挥暂时性骨替代材料的力学支撑作用[10, 11]。BMP-2 是最重要的成骨诱导因子, 它可明显增加骨形成量, 提高骨折愈合强度和速度[12]。TGF-β_1 是重要的成骨调节因子之一, 它自身促进骨修复的能力虽弱, 但可以提高 BMP-2 的诱导成骨活性, 增加骨痂形成量并提高骨折愈合强度[13]。因此, 我们设计将 BMP-2 和 TGF-β_1 联合吸附于 PLLA/CPPf 多孔材料, 充填 FHN 模型病灶清除区, 观察其在骨股头局部病理环境中的诱导成骨活性。而另一方面, 病灶清除本身在局部给与了一个新的创伤刺激, 有利于骨股头循环的改善和重建。

实验结果表明, 吸附有 BMP-2 和 TGF-β_1 的 PLLA/CPPf 多孔材料在肌肉中有良好的异位诱导成骨能力。在植入股骨头术后 2 周即有明显的成骨反应和新骨形成, 比单纯 PLLA/CPPf 植入和空白对照组的成骨反应出现早且成骨能力大大提高。随着活组织的长入和材料的逐渐降解, 新骨形成不断向中心部延伸, 12 周基本修复了股骨头的骨缺损区。其成骨方式主要为膜内成骨, 极少见软骨内成骨, 因而提高了骨形成的质量且缩短了骨修复的生理过程。与 B 组相比, A 组在实验观察的各时相未见对 PLLA/CPPf 材料的明显异物反应, 这是否与材料表面吸附的两种细胞因子有关, 还有待于进一步研究。

实验观察的结果提示, 不断长入充填区的新生组织含有大量具有成骨潜能的细胞, 在材料表面的 BMP-2 和 TGF-β_1 作用下被诱导形成新骨; 随着不断降解, PLLA/CPPf 逐渐被形成的新骨所替代。说明这种吸附有 BMP-2 和 TGF-β_1 的 PLLA/CPPf 多孔隙材料不仅能有效地提高激素诱导性骨坏死病理条件下股骨头的骨修复能力, 同时适宜新生组织的长入并能很好地完成材料的骨替代过程。因此, PLLA/CPPf 多孔隙材料具有较好的生物相容性和生物可降解性, 有可能成为生长因子的良好吸附载体; 吸附有 BMP-2 和 TGF-β_1 的 PLLA/CPPf 多孔隙材料可能成为 FHN 病灶清除的新型骨替代材料, 但要应用于临床还需要进行更全面和深入的研究。

参考文献:

[1] Mont M A, Jones L C, Einhorn T A, *et al*. Osteonecrosis of the femoral head: Potential treatment with growth and differentiation factor[J]. Clin Orthop, 1998, 355S: S314—S335.

[2] 周　强, 李起鸿, 杨　柳, 等. 大剂量糖皮质激素诱导兔股骨头坏死的研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(3): 249—252.

[3] 周　强, 李起鸿, 杨　柳等. 糖皮质激素诱导性股骨头坏死模型的血管改化[J]. 中华外科杂志, 2000, 38(3): 212—215.

[4] Gastineau E A, Conklin J C, Einstein S E, *et al*. Quantitative analysis of serial MR images for the evaluation of avascular necrosis of femoral head following core decompression and adjuvant rhBMP-2 therapy or core decom-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

pression alone[J]. ARCO News Let, 1995, 7: 80—81.
[5] Scully S P, Rizk W A S, Seaber A V, *et al*. Augmentation of subchondral bone formation in AVN with rhBMP-2[J]. Tran Orthop Res Soc, 1995, 20: 495.
[6] Ferguson G M, Mutschler T A. Ovine osteonecrosis of the femoral head: The role of bone morphogenic protein[J]. Tran Orthop Res Soc, 1995, 20: 560.
[7] Meikle M C, Papaioannow S. Effect of Poly DL-lactide-co-glycolide implants and xenogeneic bone matrix-derived growth facters on calvarcal bone repair in the rabbits[J]. Biomaterials, 1994, 15(7): 513—521.
[8] 常 青, 石宗利, 李崇庵. 聚磷酸钙可降解纤维研究[J]. 环境科学, 1997, 18(2): 52—53.
[9] 石宗利, 戴 刚, 李崇庵等. 一种新型骨组织工程材料——CPP 纤维的制备和性能[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2001, 37(2): 47—51.
[10] 张国栋, 杨纪元, 冯新德等. 聚乳酸的研究进展[J]. 化学进展, 2000, 12(1): 89—102.
[11] Pilliar R M, Filiaggi M J, Wells J D, *et al*. Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications — in vitro characterization [J]. Biomaterials, 2001, 22(9): 963—972.
[12] Bostrom M P G, Camacho N P. Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing[J]. Clin Orthop, 1998, 355S: S274—282.
[13] Bostrom M P G, Asnis P. Transforming growth factor beta in fracture repair [J]. Clin Orthop, 1998, 355S: S124—S131.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)05-0570-01

宫颈癌误诊误治 5 例分析

Analyses on 5 cases of cervical cancer after misdiagnosis and mistreatment

常 青, 王 琳, 王 丹, 梁志清, 史常旭 (第三军医大学附属西南医院妇产科, 重庆 400038)

近两年我科共收治外院转入误诊误治的宫颈癌患者 5 例, 现分析如下。

1 临床资料

一般资料: 患者年龄为 25～38 岁, 均已婚。1 例为原发不孕, 余 4 例有孕产史。

5 例宫颈癌临床特征及治疗经过: 患者近 1～2 年有不规则阴道流血或宫颈接触性出血史。妇科查体发现 4 例宫颈中度糜烂, 1 例宫颈重度糜烂。3 例患者治疗前宫颈刮片Ⅰ～Ⅱ级。2 例患者检查结果不祥。均在院外作宫颈物理性治疗(电熨、微波 激光、波姆光)。其中 4 例因治疗后不规则阴道出血症状无改善而反复治疗。入我院时查体发现宫颈溃疡、肿大或出现赘生物。阴道镜活检确诊为宫颈鳞癌。术前分期 2 例为宫颈鳞癌Ⅱa, 2 例为宫颈鳞癌Ⅰb, 1 例为宫颈原位癌。4 例行子宫次广泛切除+淋巴清扫。2 例术后予以放疗+化疗。1 例失访。2 例宫颈鳞癌Ⅱa 期的患者术后第 11～15 月随访时发现盆腔包块、阴道硬结, CT 提示盆腔转移。其中 1 例第 2 次手术治疗, 术中发现肿瘤盆腔广泛转移。

2 讨论

子宫颈癌是全球妇女中仅次于乳腺癌的第 2 位最常见的恶性肿瘤, 在我国妇女中最常见。子宫颈癌的发生发展需要相对较长时间, 癌前病变时期持续时间长, 可达数年。积极合理的治疗癌前期病变可有效降低宫颈癌的发病率。本研究 5 例宫颈癌患者在近 1 年内有反复物理性治疗史, 推测物理性治疗前未能正确诊断宫颈病变。宫颈上皮内瘤变Ⅱ级、Ⅲ级及子宫颈原位癌宜采用宫颈锥切或子宫切除, 而不应采用物理性治疗[1]。从目前的临床观察看反复多次宫颈物理性治疗可能加速了宫颈癌前期病变病程的进展。分析误诊原因为: 宫颈刮片假阴性结果导致误诊。据报道, 目前在国外最权威的实验室, 对宫颈刮片诊断准确率不超过 70%。因此, 为提高诊断率, 目前除采用 TBS 分类、计算机超薄细胞检测法外, 建议常规阴道镜检查, 定点活检, 提高诊断的准确性[2]。另外, 目前仍有一些医生不作治疗前常规宫颈刮片则更易误诊。宫颈癌前期病变如未能及时、正确的诊断, 则导致治疗方法错误。目前宫颈的物理性治疗临床应用很广, 治疗后因宫颈创面痂皮脱落可出现阴道排液、出血, 少数患者宫颈出现活动性出血经填塞治疗无效时可局部电凝止血[3]。但当患者治疗后宫颈出现大面积深部溃疡、宫颈明显肿大、反复出血时需警惕是否为宫颈癌, 须重新评估宫颈病变, 不能盲目反复行宫颈物理性治疗。本组患者中有 2 例院外较短时间多次物理治疗, 因病情进一步加重才转入我院, 经活检后明确诊断, 但宫颈癌已属Ⅱa-Ⅱb, 其治疗效果及预后差。

总之, 为提高宫颈癌的治愈率, 及时早期正确诊断、治疗癌前期病变尤为重要。除常规宫颈细胞学涂片外, 阴道镜结合病理检查可明显提高诊断率。确诊的宫颈上皮内瘤变Ⅱ级、Ⅲ级时应采用宫颈锥切或子宫切除。不宜宫颈物理性治疗, 以免加速病变向恶性发展。

关键词: 宫颈癌; 误诊; 误治
中图法分类号: R737.33 文献标识码: B

参考文献:

[1] 变美璐, 刘树范 主编. 北京: 科学技术文献出版社, 2001. 41—212.
[2] 任玉香, 常 青, 史常旭. 阴道镜检查 115 例宫颈病变分析[J]. 重庆医药, 2001, 30(6): 533.
[3] 石一复 主编. 子宫颈疾病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 1—39.

(编辑 王 红)

作者简介: 常 青(1963—), 女, 湖南省长沙市人, 博士, 副主任医师, 副教授, 主要从事妇科内分泌、宫颈病变方面研究, 发表论文 13 篇。电话: (023)68754409

收稿日期: 2002-01-05; 修回日期: 2002-03-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net