

骨形态发生蛋白-7 复合纤维蛋白对大鼠 骨质疏松性椎体骨折愈合的影响

盛俊东¹, 顾九君², 刘兴炎³, 杜军旺¹, 刘瑾¹, 刘新成¹

(1 甘肃省天水市第一人民医院脊柱外科 741600; 2 甘肃省兰州市第一人民医院骨科 730050;

3 兰州军区总医院创伤骨科中心 730050 兰州市)

【摘要】目的:观察以纤维蛋白为载体的骨形态发生蛋白-7(BMP-7)对骨质疏松性椎体骨折愈合的影响,探讨局部应用 BMP-7 纤维蛋白复合物治疗骨质疏松性椎体骨折的可行性。**方法:**雌性 SPF 级 8 月龄 SD 大鼠 54 只,随机选取 36 只,经去除卵巢建立骨质疏松模型并随机分为 A、B 组,每组 18 只;另 18 只行伪手术,在背部卵巢周围切除等体积脂肪,作为对照组(C 组)。术后 3 个月所有动物采用 L5 椎体手术开窗刮除术区内松质骨方法建立骨折模型,A 组骨折区内放入含 BMP-7 24 μ g 和纤维蛋白 20mg 的凝胶状混合物,B 组和 C 组于同部位放入等体积小牛血清,盖好窗口骨瓣。建立骨折模型后 4、6、8 周,每组处死动物 3 只,取 L5 椎体切片行 HE 染色;6、8、12 周时每组处死动物 3 只,行 L5 椎体力学性能测试(载荷能力、弹性模量和最大应变量)。**结果:**骨折后 4 周 3 组骨折区均有纤维骨痂形成,但 B 组纤维骨痂量少于 A、C 组;6 周时 A、C 组有较多骨性骨痂形成,B 组仅有微量骨性骨痂;8 周时 A、C 组均为成熟小梁骨,骨折基本愈合,B 组骨性骨痂量少,仍以纤维骨痂为主,尚有部分骨缺损存在;各时间点 A 组与 C 组相似。骨折后 6、8、12 周 A、C 组 L5 椎体的最大载荷、弹性模量及 8、12 周时的最大应变均明显高于 B 组 ($P<0.05$ 或 0.01),B 组 6 周时的最大应变与 A、C 组比较无显著性差异 ($P>0.05$),各时间点 A 组与 C 组比较无显著性差异 ($P>0.05$)。**结论:**局部应用以纤维蛋白为载体的 BMP-7 能明显促进大鼠骨质疏松性椎体骨折的愈合,纤维蛋白可作为 BMP-7 的载体。

【关键词】骨形态发生蛋白-7;骨质疏松;骨折;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.04.08

中图分类号:683.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2010)-04-0291-04

Complex of bone morphogenetic protein 7 and fibrin protein on the healing of osteoporotic vertebral fracture/SHENG Jundong, GU Jiujun, LIU Xingyan, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(4): 291~294

【Abstract】 Objective:To investigate the effect and feasibility of local usage of complex of bone morphogenetic protein 7 and fibrin protein on the healing of osteoporotic vertebral fracture.**Method:**36 female SPF SD rats of 8 months old were subjected to ovary resection to establish osteoporotic model and were divided into group A and B randomly with each group of 18 animals, and other 18 animals experiencing the sham operation with only fat tissue dissection were regarded as control group (group C). L5 laminectomy was performed on all animals after 3 months to establish the fracture model. 24 μ g BMP and 20mg fibrin gelatin mixture was placed in group A, while same volume of calf serum in group B and C. 3 animals in each group were sacrificed at 4, 6 and 8 week respectively and L5 vertebral samples were harvested for immunohistochemical test. 3 animals in each group were sacrificed at 6, 8 and 12 week respectively to perform L5 vertebral biomechanical test (load, module and maximum strain). **Result:** Fibrous bone scar formation was evidenced in all groups at 4 week with group B less than group A and C; at 6 week more osseous formation was evidenced in group A and C than in group B which had only little bone formation; at 8 week mature trabecula formation was evidenced in group A and C, while group B had mostly fibrous osseum and partial defect. Group A presented same characteristics with group C. The maximum load and module for L5 vertebra of group A

第一作者简介:男(1975-),主治医师,医学硕士,研究方向:脊柱疾病

电话:(0938)8217234 E-mail:shengjd1108@163.com

and C at 6, 8 and 12 week was higher than in group B ($P < 0.05$ or 0.01), the maximum strain at 6 week for group B and A, C showed no significant difference ($P > 0.05$), and group A and C at each time point showed no significant difference ($P > 0.05$) either. **Conclusions:** Local usage of complex of bone morphogenetic protein 7 and fibrin protein can promote the healing of osteoporotic vertebral fracture and fibrin protein can be used as carrier.

【Key words】 Bone morphogenetic protein-7; Osteoporosis; Fracture; Rat

【Author's address】 The Spinal Surgery Department, Tianshui General Hospital, Gansu, 741600, China

骨质疏松性椎体骨折已成为影响绝经后妇女健康的主要问题^[1]。常规保守或手术治疗效果不佳,而且易继发骨折。骨形态发生蛋白-7(BMP-7)是转化生长因子家族成员之一,有明确的诱导活性和成骨活性^[2],在治疗骨质疏松性脊柱骨折中具有良好的应用前景,但目前其载体问题尚未解决。本研究以纤维蛋白为载体,观察其对骨质疏松性椎体骨折愈合的影响,探讨局部应用 BMP-7 治疗骨质疏松性椎体骨折的可行性,为临床治疗骨质疏松性骨折提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 BMP-7 与纤维蛋白复合物的制备

从血库贮存人新鲜冷冻血浆中提取纤维蛋白原,与等体积的凝血酶(250U/ml)混合制成纤维蛋白(100mg/ml)。取内径为 1.5mm、长 1.5cm 的圆柱形模具,加入 120 μ g BMP-7 和纤维蛋白 1ml,充分混合后生成凝胶,置 37 $^{\circ}$ C 保温 1h 备用(使用时用刀片平分 5 段,每段长 3mm,并用环氧乙烷消毒)。

1.2 动物模型制作与分组

选择 8 月龄雌性 SPF 级(无特定病原体动物)Sprague-Dawley (SD)大鼠 54 只(由兰州大学临床医学院实验动物中心提供,医学实验动物管理委员会合格证号 14-006),体重 240~260g。腹腔注射氯胺酮(0.1g/kg)麻醉后,36 只经双背侧手术切除卵巢,建立骨质疏松模型^[3],分为 A、B 组,每组 18 只;另 18 只行伪手术,在背部卵巢周围切除等体积脂肪,作为对照组(C 组)。术后 3 个月,所有动物在氯胺酮麻醉下,取侧卧位,消毒后于靠脊柱肋缘下至股骨大粗隆直线切开皮肤,并切开腹外斜肌和腹内斜肌,沿脂肪层和骶棘肌间隙钝性分离至骶棘肌根部与椎旁肌交界处,沿此间隙钝性分离两肌,见横突韧带、坐骨神经,保护神经,充分显露椎体,于 L5 椎体侧面中心行开窗术,面积为 1.5(宽) $\times$ 3.0(长)mm²,深度为椎体松质

骨直径,刮除术区内所有松质骨,用明胶海绵确切止血,A 组放入 1 段 3mm 长的备用 BMP-7 和纤维蛋白混合物,B、C 组注入等量小牛血清(购于兰州明海生物有限公司),盖好窗口骨瓣,逐层缝合切口。手术过程均在严格无菌条件下进行,术后饲养于完全清洁级环境中(兰州大学临床医学院实验动物中心清洁级动物室),自由进食消毒颗粒饲料,饮消毒水,室温控制于 23 $^{\circ}$ C,湿度 56%,每间隔 12h 照明,定期紫外线消毒与通风。实验期间及时补充死亡动物。

1.3 组织学检查

骨折模型建立后 4、6、8 周,每组各断颈处死 3 只大鼠,取出 L5 椎体随即放入 10%的多聚甲醛固定液中固定 24h,硝酸脱钙 4~5h,经自动脱水仪脱水 13h 后进行标本石蜡包埋。包埋块经修理后用切片机制备 5 μ m 厚的横断位脱钙切片。首先将 L5 椎体骨折部以骨折区长度中点为中心点横断位一分为二,再沿断面每个标本连续切取 3 张,在间隔 1mm 后再连续切取 3 张直至椎体软骨板端,共 12 张。将所有切取物分置于已上蛋白甘油的载玻片上,于 60 $^{\circ}$ C 烘箱 15min 进行 HE 染色。每只大鼠随机抽取骨折区的 4 张切片,在光学显微镜下观察骨小梁形成数量、连结、纤维性骨痂、骨性骨痂等骨折愈合情况。

1.4 力学性能测试

骨折模型建立后 6、8、12 周,每组各断颈处死 3 只大鼠,取出 L5,仔细剔除软组织、棘突、横突和关节突起,不损害椎体的皮质外壳,将椎体用粗砂纸打磨使骨表面平坦,制成长方形柱体,板厚千分尺测量椎体高度 6mm、厚度 3mm、宽度 3mm,计算相应应力面积 9mm²。将标本置于万能材料力学测试机(日本岛津 AG-IS I30104303404)上行椎体垂直压缩试验,加载速度为 2mm/min。记录最大载荷、弹性模量和最大应变。

1.5 统计学处理

数据均用 SPSS 13.0 软件处理系统处理,以

均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,显著性检验采用两样本均数比较的 t 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 组织学检查

骨折后 4、6、8 周 A、C 组骨折区骨组织形态基本相似,骨折后 4 周有软骨细胞、软骨岛及纤维形成,纤维与软骨细胞相连形成网状的类骨小梁结构即纤维骨痂(图 1、2);6 周时有较多骨性骨痂形成,但仍可见纤维骨痂;8 周时骨性骨痂经改建成熟,纤维骨痂消失,骨折基本愈合(图 3、4)。B 组骨折后 4 周亦有大量软骨细胞形成,甚至可见软骨岛,但新生纤维仅有少部分与软骨细胞连结成网状,结构紊乱(图 5);6 周时微量骨性骨痂形成,仍存在大量纤维骨痂;8 周时部分骨缺损存在,不见大量成熟骨痂,仍存在大量纤维骨痂,骨折愈合较 A、C 组明显延迟(图 6)。

2.2 骨折椎体力学性能测试

骨折模型建立后 6、8、12 周 3 组动物 L5 椎体的力学性能测试结果见表 1。骨折后 6、8、12 周 A、C 组 L5 椎体的最大载荷、弹性模量及 8、12 周时的最大应变均明显高于 B 组 ($P<0.05$ 或

0.01),6 周时的最大应变与 B 组比较无显著性差异($P>0.05$),各时间点 A 组与 C 组比较无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

绝经后骨质疏松性椎体骨折已严重危害患者的健康,而且其发病率比其它部位均高^[4],严重影响其生活质量。但到目前为止,治疗措施受到诸多因素限制^[4]。故临床上要求有治疗骨质疏松性椎体骨折的新措施。近年来,椎体成形术为椎体压缩骨折的治疗开辟了一条新途径,但骨水泥的应用尚存在争议^[5]。BMP-7 作为诱骨成骨因子在骨诱导、骨修复方面发挥着重要作用,所以 BMP-7 很快在修复骨缺损^[2]、促进骨折愈合^[6]、椎体融合、植骨内固定^[7]等领域应用。但单纯 BMP-7 的作用并不理想,究其原因,一是血流冲刷易使 BMP-7 丢失,二是无载体时 BMP-7 只能作用于十分有限的空间,不可能在大范围内起诱骨成骨作用^[8]。提高受区对 BMP-7 的敏感性与靶细胞的数量是目前最直接的办法。Kawamura 等^[9]将人纤维蛋白作为 BMP-7 载体局部应用于兔桡骨骨缺损处,发现诱导活性明显增加,加快了骨折的愈合。但至今尚无

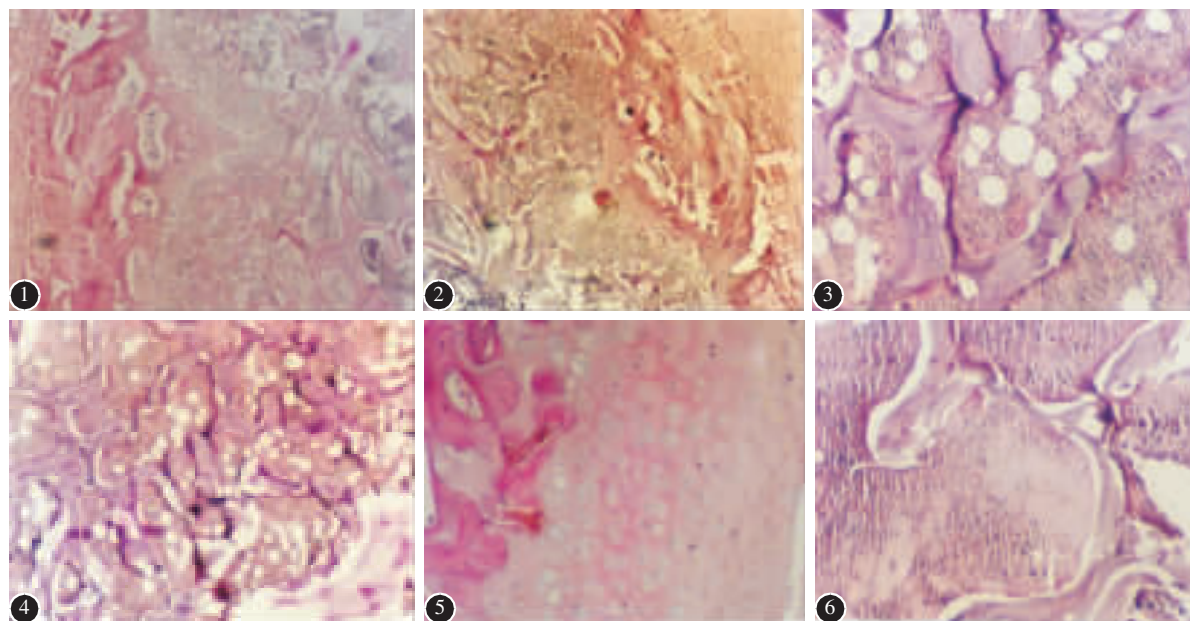


图 1 A 组骨折后 4 周骨折区有大量软骨细胞形成,可见软骨岛,纤维与软骨细胞相连形成网状(HE $\times 10$) 图 2 C 组骨折后 4 周骨折区亦有大量软骨细胞形成,可见软骨岛,纤维与软骨细胞相连形成网状(HE $\times 10$) 图 3 A 组骨折后 8 周骨性骨痂经改建成熟,骨痂结构致密,纤维骨痂消失(HE $\times 40$) 图 4 C 组骨折后 8 周骨折区骨性骨痂经改建成熟,骨痂结构致密,纤维骨痂消失(HE $\times 10$) 图 5 B 组骨折后 4 周骨折区亦有大量软骨细胞形成,可见软骨岛,但新生纤维仅有少部分与软骨细胞连结成网状,结构紊乱(HE $\times 10$) 图 6 B 组骨折后 8 周骨折区部分骨缺损存在(黑线箭头所示),成熟骨痂结构疏松(蓝箭头所示),仍有大量纤维骨痂(HE $\times 40$)

表 1 不同时间点 3 组大鼠 L5 椎体的力学性能测试结果

	骨折后 时间	最大载荷 (N/mm ²)	最大应变量 (N/mm ²)	弹性模量 (kN/mm ²)
A 组	6 周	47.33±1.81	10.99±1.55	50.72±0.59
	8 周	77.65±5.42	23.24±1.90	58.92±2.34
	12 周	110.12±7.14	28.73±1.35	66.01±2.09
B 组	6 周	30.59±2.30 ^①	7.83±2.86 ^③	24.07±1.57 ^②
	8 周	52.46±3.45 ^②	10.58±2.47 ^①	33.80±4.16 ^②
	12 周	65.19±4.57 ^②	15.99±0.94 ^①	49.72±6.12 ^①
C 组	6 周	51.98±1.34	12.10±2.71	50.63±0.78
	8 周	85.61±5.02	21.24±0.96	57.59±2.73
	12 周	111.42±6.51	26.73±1.94	66.96±6.15

注:与 A 组、C 组同时点同一指标比较^① $P<0.05$,^② $P<0.01$,
^③ $P>0.05$;各时间点同一指标 A 组与 C 组比较 $P>0.05$

用于临床治疗骨质疏松性椎体骨折的报道。纤维蛋白作为粘合剂已在外科临床得到广泛应用,并具有抗原性低、降解吸收好、促进血管化和骨传导等多种特性和生理功能^[10,11]。故本研究旨在观察 BMP-7 复合纤维蛋白的复合物对骨质疏松性骨折椎体愈合过程中成骨活性的影响。

本研究中,组织学检查结果显示,骨折后 4 周 3 组均有纤维骨痂形成,但 B 组纤维骨痂量较 A、C 组少;6 周时 A、C 组有较多骨性骨痂形成,B 组仅有微量骨性骨痂;8 周时 A、C 组均为成熟小梁骨,B 组骨性骨痂量少,仍以纤维骨痂为主,且有部分骨缺损存在;各时间点 A 组与 C 组相似。骨折后 8 周,A、C 组骨折部位均骨性愈合,B 组骨折愈合不良。椎体骨折愈合过程中力学性能检测结果显示,B 组最大载荷量、最大应变量、弹性模量较同时期 A、C 两组显著降低。表明经 MP-7 复合纤维蛋白的复合物治疗后骨质疏松性椎体骨组织变得紧密、骨小梁粗大,骨折愈合质量明显提高,致椎体的力学性能增加,骨小梁抗载荷能力提高,不易骨折,与正常椎体骨折愈合后无显著性差异。这与有些学者^[12]认为骨结构的变化对骨组织力学性能的影响更重要相符合。

本研究结果说明:(1)骨质疏松性椎体骨小梁纤细、稀疏,骨折后骨质愈合质量差,椎体的力学性能减退,骨小梁抗载荷能力下降,易于骨折。(2) BMP-7 复合纤维蛋白的复合物明显促进骨质疏松性椎体骨折愈合,使最大载荷、最大应变量、弹性模量显著提高,椎体抗载荷能力显著增强,与正常椎体骨折愈合特性相一致,骨折愈合质量明显增高。(3) BMP-7 复合纤维蛋白的复合物可明显促进软骨细胞改建成成熟骨细胞,加速骨小梁形

成及改建时间、增加骨小梁数量,使骨组织变得紧密、骨小梁粗大,促进骨质疏松性椎体骨折的愈合。(4) BMP-7 复合纤维蛋白的复合物治疗组虽然在早期存在机械性能较低,达不到理想的力学性能要求,但成骨后机械性能与正常椎体骨组织相似,具有恢复解剖结构的性能,达到椎体的生理特征,可望在临床前期研究评估后推广应用。

4 参考文献

- Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis [J]. Osteoporos Int, 2005, 16 (Suppl 2): S129-138.
- Nakashima M, Iohara K, Zheng L. Gene therapy for dentin regeneration with bone morphogenetic proteins [J]. Curr Gene Ther, 2006, 6(5): 551-560.
- 盛俊东, 刘兴炎, 白孟海, 等. 骨质疏松性椎体骨折模型的建立 [J]. 中国组织工程与临床康复杂志, 2007, 11(19): 3723-3726.
- 陈克明, 李旭升, 刘兴炎, 等. 骨形态发生蛋白复合纤维蛋白载体修复骨缺损的实验研究 [J]. 中华骨科杂志, 1998, 18(2): 68-70.
- Geiger M, Li RH, Friess W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2 [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55(12): 1613-1629.
- Calori GM, Tagliabue L, Gala L, et al. Application of rhBMP-7 and platelet-rich plasma in the treatment of long bone non-unions; a prospective randomised clinical study on 120 patients [J]. Injury, 2008, 39(12): 1391-1402.
- Giannoudis PV, Kanakaris NK, Dimitriou R, et al. The synergistic effect of autograft and BMP7 in the treatment of atrophic nonunions [J]. Clin Orthop Relat Res, 2009, 467(12): 3239-3248.
- 金丹, 裴国献, 王柯, 等. BMP7 基因转染修复骨缺损的实验 [J]. 中华骨科杂志, 2003, 23(12): 747-751.
- Kawamura M, Urist MR. Human fibrin is a physiologic delivery system for bone morphogenetic protein [J]. Clin Orthop, 1988, (235): 302-310.
- Lindsay R, Burge RT, Strauss DM. One year outcomes and costs following a vertebral fracture [J]. Osteoporos Int, 2005, 16 (1): 78-85.
- 盛俊东, 刘兴炎. 牛骨形态发生蛋白促进骨质疏松性椎体骨折愈合过程中局部血管内皮生长因子表达的作用 [J]. 中国组织工程与临床康复杂志, 2007, 11(14): 2695-2698.
- Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, et al. Bone morphogenetic proteins: development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects [J]. J Bone Joint Surg Am, 2005, 87(6): 1367-1378.

(收稿日期: 2009-08-31 修回日期: 2010-03-15)

(英文编审 蒋欣/郭万首)

(本文编辑 李伟霞)