

BMP 促进去神经后废用性骨质疏松骨折愈合的实验研究

徐栋梁 李佛保 于毅力 丘钜世

摘要 为了观察 BMP 对去神经后废用性骨质疏松性骨折愈合的作用,作者选用 6 月龄健康标准大鼠,严格配对分组,切除双侧坐骨神经后 3 周证实有明显骨质疏松。然后在胫骨人工骨折骨缺损处分别植入酸解胶状鼠尾胶原(对照)及 BMP 与胶原混和物(实验组)。通过血清钙浓度、碱性磷酸酶活性及骨组织形态计量学多项参数的观察,显示 BMP 对去神经后废用性骨质疏松骨折愈合有明显促进作用($P < 0.05 \sim 0.01$)

关键词 骨形态形成蛋白 废用性骨质疏松症 骨折愈合

**Experimental study about the effects of bone morphogenetic protein
on fracture healing of post-denerve disused osteoporosis**

Xu Dongliang, Li Fobao, Yu Yili, et al

(Department of Osteopaedics the First Affiliated Hospital, and
Pathology, Sun Yet-sen University of Medical Sciences)

Abstract In order to study the effects of bone morphogenetic protein (BMP) on the fracture healing of post-denerve disused osteoporosis, 20 six-month-old SD Rats had been chosen for sciatic neurectomy. Then the rat model of disused osteoporosis were established after 3 weeks. 3mm tibia draft defects were created between Segments of upper 1/3 and middle 1/3. Defects of 10 rats were implanted with digested colloid abstracted from collagen of rat tails as control. The other 10 rats were implanted with mixture of the colloid and BMP as experimental group. Through the investigation on sera concentration of calcium, activity of sera alkaline phosphatase, and some indices of bone histomorphometry in the region of callus, which included trabecular volums, osteoid volums, osteoid surfaces osteoblastic surfaces, mineralization rates, this study demonstrated that BMP could accelerated the bone fracture healing in post-denerve disused osteoporosis of rats.

Key words Bone morphogenetic protein Disused osteoporosis Bone fracture healing

支配某段躯干和肢体的神经完全损伤后,该神经所属骨骼肌逐渐出现萎缩瘫痪,相应骨出现废用性骨质疏松症;神经破坏后亦可直接引起骨代谢降低,骨质形成过程缓慢或停顿,进一步促进骨质疏松化,这种情况下并发及继发的骨折难以愈合^[1]。Sato 和 Prolo 等人先后报道了从骨中提取的骨形态形成蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)可诱导成骨过程^[2,3]。但是, BMP 是否可促进去神经后废用性骨质疏松骨折的愈合尚未见报道。本文作者将 BMP

直接植入该种骨质疏松骨折骨缺损处,观察 BMP 的成骨诱导作用。

1 材料和方法

选用 6 月龄健康 SD 大白鼠, 雄性, 共 20 只, 体重 $310 \pm 20g$, 以体重差小于 10g 进行配对, 随机一只作实验鼠, 另一只作对照鼠。将每只大鼠双侧大腿外侧剪毛, 消毒及麻醉, 切开股骨中段处皮肤, 钝性分离肌肉和坐骨神经, 切除长约 0.5~1.0cm 的坐骨神经, 缝合创口, 清洗消毒皮肤, 分笼饲养。3 周后证实有明显骨质疏松。然后在双侧胫骨上中 1/3 交界处用钢锉制成 3mm 高的骨缺损, 深度为前侧皮质与髓腔直径

之和。保留后侧皮质与腓骨起支承和固定作用。骨缺损内分别植入醋酸裂解等处理后呈胶状的鼠尾胶原(对照组)及鼠尾胶原与一定量 BMP 的混和物(实验组)。BMP 提取按郑启新法进行^[5]。分别于处死前第 10 天、第 3 天注射 30mg/kg 体重的盐酸四环素注射剂于腹腔。在 BMP 植入术后 28 天过量麻醉下股动脉取血 2ml。另取双侧胫骨置 70% 乙醇溶液中固定。然后将各种标本进行下述检查。

1.1 血生化检查 通过血清钙浓度和碱性磷酸酶活性了解植入 BMP 后骨代谢活动。血钙以澳大利亚产品 SpectrAA20 型原子火焰吸收分光光度仪测定。血清碱性磷酸酶则在 Monarch2000 型血生化分析仪上测定活性。

1.2 大体观察 对照观察两组鼠骨折部位植入物替代、骨缺损充填、骨痂形成等情况。

1.3 骨组织形态计量学检查(Bone histomorphometry) 将固定的胫骨用云石解机切下骨折部位约 1.5cm 长度,经梯度酒精、丙酮、二甲苯处理后,浸透并包埋于甲基丙烯酸甲酯、丁酯及过氧化苯乙醚提取物的聚合物中。在西德产 Leitz 重型切片机上将每个标本切片 15 张,厚度 4 μ m。随机选 5 张直接封固进行荧光观察。另 10 张脱塑后甲苯胺蓝染色。然后参照于顺禄等人方法^[6]检测下述骨组织学静态和动态参数。①骨小梁体积:指骨小梁占骨折缺损部位骨痂中的体积百分比;②平均骨小梁宽度;骨痂中各

骨小梁的平均宽度;③类骨质体积:指骨痂中类骨质所占体积百分比;④成骨细胞表面:指有成骨细胞覆盖的骨小梁表面占整个骨痂内骨小梁总表面积百分比;⑤矿化沉积率:先测量两次四环素标记线之间的平均距离,然后除以两次标记间的时间,本实验中标记时间间隔为 7 天。

1.4 统计学处理 两组间配对资料 *t* 检验。

2 结果

2.1 血生化检查结果 两组各 10 份血清标本,实验组血钙浓度和血碱性磷酸酶活性明显高于对照组。见附表。

2.2 大体观察 实验组鼠胫骨骨折处胶原和 BMP 的混和植入物已消失,全部为骨痂取代。骨折断端外亦有约 1mm 厚 1~4mm 纵轴长度的骨痂,突出于骨折段表面,与萎缩的肌肉组织粘连。对照组胶原亦被骨组织取代,骨痂少,其中 7 只鼠 11 例骨折缺损处骨痂或新骨未填满骨缺损。11 例中有 10 例无骨痂,与周围组织无粘连,易于剥离骨膜,属无骨痂的一期骨愈合。

2.3 骨组织形态计量学检查结果 荧光显微镜下,可见骨小梁周缘部的四环素荧光标记线,部分为单线,大部分为双线荧光。实验组双线荧光数量及距离比对照组大。生物显微镜下,实验组骨痂内骨小梁交织成密集的网,类骨质分布广。两组均已出现骨髓腔。对照组骨缺损处骨小梁网较稀疏,可见较多的骨小梁盲端。见附表。

附表 血生化及骨组织形态计量学观察结果

项 目	实验组	对照组	P 值
钙(mmol/L)	2.65 \pm 0.30(10)	2.47 \pm 0.15(10)	<0.05
碱性磷酸酶(U/L)	143.1 \pm 31.6(10)	117.4 \pm 36.6(10)	<0.05
骨小梁体积(%)	44.3 \pm 12.4(20)	32.7 \pm 16.7(20)	<0.01
骨小梁宽度(μ m)	114.7 \pm 71.9(20)	86.2 \pm 21.3(20)	<0.01
类骨质体积(%)	21.0 \pm 7.5(20)	14.6 \pm 8.2(20)	<0.01
成骨细胞表面(%)	80.1 \pm 15.2(20)	50.1 \pm 15.6(20)	<0.01
矿化沉积率(μ m/天)	1.5 \pm 0.7(20)	1.2 \pm 0.9(20)	<0.05

注:括号内数值为例数,其中血生化项目为 10 只鼠,其他项目为标本数

3 讨论

坐骨神经切断第 3 周后,胫骨即出现明显骨质疏松,与文献报道一致。在此基础上,人工造成骨折骨缺损模型,利用腓骨和一侧胫骨皮

质作支撑和固定,不需内固定或外固定,效果好。既避免了动物撕咬伤处及外固定物,保证实验观察顺利进行,又提供了明确的可定量的骨缺损量及修复的骨量,为骨组织形态计量学

研究提供了可比条件。所以,该实验模型具有较好的实用价值。在此模型基础上,将 BMP 直接植入主骨缺损处,BMP 以酸解鼠尾胶原作基质和缓释系统。文献证实鼠尾胶原无诱导成骨作用^[7]。28 天后检查结果表明,血清钙浓度上升,骨形成的标志物碱性磷酸酶活性升高。说明 BMP 参与了骨形成的代谢过程。

本实验的组织学、细胞学及骨组织形态计量学参数更进一步证实 BMP 的促进骨形成作用。Sato 和 Urist,Prolo 和 Rodrigo 先后报道了 BMP 可诱导具有潜在分化能力的血管周围间质细胞^[2]和骨髓内的间质细胞^[1]分化成为软骨细胞,进一步形成骨组织。并且,骨髓间质细胞对 BMP 的敏感性要比其他部位的间充质细胞高^[3]。BMP 与间充质细胞膜上表面受体结合后,产生电位变化,激活靶细胞内基因调节因子,使基因重组,以有利于软骨—骨细胞 DNA 的合成^[4]。本实验证实,在去神经支配的条件下,BMP 亦可促进上述细胞活动,直至成骨。Takagi 等人在成年大鼠的头颅骨上造成直径 8mm 的骨缺损,然后植入 BMP,4 周后即可见骨缺损修复,有血窦和板层骨形成^[4]。本实验中 BMP 是在去神经和骨质疏松的条件下发生作用的,其作用强度不如在正常组织缺损内所起

的作用大。这种差别可能与神经营养、骨代谢信号减少有关。

参 考 文 献

- 1 白希清主编. 病理学(下册). 第 2 版. 北京:科学出版社,1992,917
- 2 Sato K, and Urist MR. Bone morphogenetic protein induced cartilage development in tissue culture. J Clin Orthop, 1984; 183-180.
- 3 Prolo DJ, and Rodrigo JJ. Contemporary bone graft physiology and surgery. J Clin Orthop, 1985, 200; 322.
- 4 Takagi K, and Urist MR. The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. J Clin Orthop, 1982, 171-224.
- 5 郑启新,朱通伯. 牛骨形态形成蛋白的提取及异位诱导成骨的研究. 同济医科大学报, 1989, (2): 99.
- 6 于顺禄,魏典,叶伟胜,等. 实验家兔骨折愈合骨组织形态计量学研究. 中华骨科杂志, 1991, 11(4): 294.
- 7 吴祖尧. 骨形态形成蛋白的最近进展. 中华骨科杂志, 1991, 11(3): 211.
- 8 Urist MR, Delange RJ, Finerman GAM. Bone cell differentiation and growth factors. Science, 1983, 220: 680.