

局部应用 CPC/rhBMP-2 复合材料对骨质疏松大鼠骨折愈合的影响

闫楷忠 王宸 沈伟中

摘要:目的 研究磷酸钙骨水泥(Calcium Phosphate Cement, CPC)与重组人骨形态发生蛋白-2(Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2, rhBMP-2)复合材料对骨质疏松大鼠骨折愈合的影响。方法 取 4 月龄雌性清洁大鼠 106 只,随机分成实验组 96 只,对照组 10 只。实验组行双侧卵巢切除术,对照组行假手术。术后行双能 X 线骨扫描确定骨质疏松动物模型形成。然后将实验组 96 只大鼠制作右侧股骨远端松质骨骨折,将上述动物随机分成 3 组,每组 32 只(1)克氏针组,从髁间窝穿入直径 1 mm 克氏针固定;(2)CPC 组,将 CPC 从 12 号针头注入骨髓腔,手法固定至骨水泥凝固;(3)CPC-BMP 组,将 CPC 与 rhBMP-2 复合材料用 12 号针头注入骨髓腔,手法固定至骨水泥凝固。术后第 2、4、6、8 wk 三组各取 8 只动物处死,取手术侧股骨远端标本行压缩实验。结果 在上述 4 个时间点,CPC-BMP 组的骨折段最大载荷较克氏针组及 CPC 组增高($P < 0.05$),第 2 周 CPC 组骨折段最大载荷较克氏针组增高($P < 0.05$)。结论 (1)局部注射 CPC-BMP 复合材料可以促进骨质疏松大鼠骨折的愈合,提高骨折愈合后的强度;(2)CPC 局部应用可以对骨折起到即时固定作用。

关键词: 大鼠;骨质疏松症;骨折愈合;磷酸钙骨水泥;骨形态发生蛋白-2

Influence of local application of CPC/rhBMP-2 composition on the healing process of osteoporotic fracture in rats YAN Kaizhong, WANG Chen, SHEN Weizhong. The First People's Hospital of Taicang City, Taicang 215400, China

Abstract: **Objective** To evaluate the effects of the composition of calcium phosphate cement (CPC) and recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing process of osteoporotic fracture in rats. **Methods** Totally, 106 four-month-old female clean rats were divided into two groups: 96 in the ovariectomy group and 10 in the sham group. Ten weeks after ovariectomy, bone material density measure results, on sham group animals and 7 rats acquired randomly from ovariectomy group, showed that osteoporosis animal model was prepared. Fractures were created in the distal right femur cancellous in the 96 female osteoporotic rats which were divided into 3 groups (32 in each): 1) Kirschner wire group: Intramedullary Kirschner wires were inserted as inner fixator. 2) CPC group: Single dose of CPC was injected into bone medullar using 12[#] needle. The fracture parts were holded by hands until CPC hardened. 3) CPC-BMP group: The management was the same as CPC group, but with the composition of CPC/rhBMP-2. At 2nd, 4th, 6th and 8th week after treatment, 8 animals from each group were sacrificed, and the femora were obtained and prepared for compressive biomechanical testing. **Results** At these 4 time-points, the maximum compressive loads of femora in CPC-BMP group were higher than those from the other two groups ($P < 0.05$). The femoral maximum loads in CPC group were higher than that from Kirschner wire group at the 2nd week ($P < 0.05$). **Conclusions** Local injection of CPC/rhBMP-2 accelerates the healing process of osteoporotic fracture in the distal femoral fracture model in rats and increases the intensity during and after the bone healing, while local injection of CPC can temporarily fix the parts of fracture.

Key words: Rat; Osteoporosis; Fracture healing; Calcium phosphate cement; Recombinant human bone morphogenetic protein-2

基金项目: 江苏省科委指导性计划项目(2002319)

作者单位: 215400 江苏省太仓市第一人民医院骨科(闫楷忠、沈伟中); 东南大学附属中大医院骨科(王宸)

通讯作者: 闫楷忠, Email: ykzrdf@hotmail.com

随着人口的老龄化 ,骨质疏松症的发病率以及随之而来的骨折并发症逐年提高。骨折后由于骨皮质极薄 ,骨结构疏松 ,骨的脆性变大 ,采用通常的骨折治疗方法 ,难以达到骨折满意复位、可靠固定、良好愈合以及早期获得功能恢复的目的。为此 ,探讨新技术、新材料、新方法治疗此类骨折 ,就成为一个值得关注的重要课题。

1 材料和方法

1.1 实验动物

4 月龄雌性清洁大鼠 ,由东南大学医学院动物中心提供。

1.2 实验材料

CPC 系上海瑞帮生物材料有限公司生产 ,南京宇盛达公司敬赠 ,rhBMP-2 购自军事医学科学院。

1.3 骨质疏松动物模型建立及检测

取 4 月龄雌性清洁大鼠 106 只 ,体重 210 ~ 250 g。随机分成实验组 96 只 ,对照组 10 只。实验组用 2% 戊巴比妥钠 (2.3 ml/kg) 腹腔注射麻醉后 ,将其四肢绑缚 ,仰卧位固定于操作台 ,备皮刀剃尽腹部手术野体毛 ,碘伏消毒术野皮肤 3 遍 ,铺无菌洞巾。经下腹正中切口进腹 ,找到并完整切除双侧卵巢 ,切除物用 10% 甲醛固定 ,送病检 ,以便进一步确认切除组织的确为卵巢。对照组麻醉、消毒及进腹方式同实验组 ,找到卵巢但不切除 ,仅切除卵巢周围少许脂肪组织。术后每只动物腹腔注射青霉素 40 万单位 ,每日 1 次 ,连续 3 d。实验组有 5 只大鼠切口感染 ,经过局部双氧水冲洗后 ,感染控制 ,切口愈合 ,无动物死亡。所有动物均予本实验室自产全价饲料 (饲料中钙含量为 1.0% ~ 1.8% ,磷含量为 0.6% ~ 1.2% ,钙:磷为 1.2:1 ~ 1.7:1 ,为正常含量) 饲养 10 wk ,自由摄食、水。

术后 10 wk ,从实验组随机抽取 10 只大鼠 ,与对照组 10 只大鼠 ,应用配有小动物测量软件的 DPX-IQ 型双能 X 线骨吸收仪 (美国 Lunar 公司) 检测大鼠全身骨密度。每个标本测量 3 次 ,每次测量后均重新摆放体位 ,3 次测量结果取均值 ,测量值用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示 (见表 1) ,用 *t* 检验进行统计学分析 ,两组差异具有显著性意义 (*P* < 0.05) 。测量结果表明实验组骨质疏松动物模型已制备成功。

1.4 骨折动物模型建立

仍按前述方法麻醉、消毒后 ,取右侧膝关节外侧切口 ,切开皮肤、浅、深筋膜 ,钝性分离股外侧肌 ,显露股骨远端外侧及髁间窝。用厚度为 1.0 mm 的钢

锯在距离股骨远端 0.5 cm 处锯断骨干外侧 ,深度达 2 mm ,再轻轻折断内侧骨皮质 ,制作完全骨折动物模型。这样一方面可以使所有动物骨折一致 ,具有良好的可比性 ,另一方面避免直接锯断股骨而损伤股骨内后侧的重要结构。

表 1 术后 10 周实验组与对照组骨密度比较
(*n* = 10 , $\bar{x} \pm s$, g/cm²)

组 别	大鼠全身骨密度
对照组	0.238 ± 0.008
实验组	0.223 ± 0.007 [*]

注 :与对照组比较 * *P* < 0.05

1.5 动物分组与骨折治疗方法

将上述实验组 96 只大鼠随机分成 3 组 ,分别为 :克氏针内固定组 (以下简称克氏针组) ,CPC 治疗组 (以下简称 CPC 组) ,CPC-rhBMP-2 复合物治疗组 (以下简称 CPC-BMP 组) ,每组 32 只。克氏针组用直径 1 mm 克氏针从髁间窝穿入股骨髓腔 ,用力将克氏针插到底后 ,用持针器夹持克氏针与髁间窝的交界处 ,标记骨髓腔的深度 ,取出克氏针后用老虎钳剪到合适长短。再将剪短的克氏针从髁间窝置入髓腔中 ,针尾留在骨内。CPC 组先用克氏针从髁间窝穿入股骨髓腔 ,再拔出克氏针 ,将 CPC 固、液相按照说明书调和好后 (固相:液相 = 2 g:1 ml) ,用注射器 (配 12 号注射针头) 注入骨髓腔 ,一边注射一边向后退针头。注射完毕后 ,将溢出于骨髓腔外的 CPC 细心剔除干净。同时将剩余 CPC 置于操作台 ,待 15 min 左右操作台上的 CPC 固化后 ,逐层缝合切口。CPC-BMP 组操作步骤同 CPC 治疗组 ,只是将 CPC 换为 CPC/rhBMP-2 复合物 (CPC:rhBMP-2 = 2 g:1 mg) 。术后大鼠分笼饲养 3 d ,自由摄食水。每只大鼠腹腔注射 40 万单位青霉素 ,每天一次连续 3 d。所有大鼠切口愈合良好 ,术后 3 d 内大鼠活动迟缓 ,3 d 后逐渐恢复正常活动。

1.6 股骨生物力学检测

术后第 2、4、6、8 wk 上述 3 组各取 4 只动物 ,仍按照前述方法全麻后放血处死。迅速取下手术侧股骨 ,剔尽肌肉 ,用浸透生理盐水的纱布包裹标本 ,置于塑料袋中 ,封好口后放在 -20 ℃ 冰箱中保存。测试前常温解冻 ,截取股骨远端 1.4 cm 作为测量试件 (其中克氏针组取出髓腔内克氏针) 。然后用自凝牙托粉和牙托水混匀后 ,填于特殊的模具中 ,包埋股骨两端各 2 mm ,暴露中间测试段长度 1.0 cm ,骨折部位处在测量试件的中间。将上述制作好的标本置于 MTS-858 mini bionix[®] II 生物力学测试机 (美国 MTS 系统公司) 上进行垂直压缩试验。加载速度为 :

1 mm/min。最大位移设定 3 mm。每隔 0.1 s 记录 1 次数据 ,直至压力载荷持续下降(即骨发生断裂)或位移达到 3 mm。记录其最大载荷。

1.7 统计学处理

实验数据用 SPSS 11.5 软件进行统计学处理分析 ,测量值用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示 ,资料采用单因素方差分析 ,均数两两比较。以 $P < 0.05$ 作为显著性差异的标准。

2 结果

三组于术后不同时间点 ,股骨骨折段生物力学测定结果。在四个时间点 CPC-BMP 组的骨折段承受的最大载荷均较克氏针组和 CPC 组增加($P < 0.05$) ,而 CPC 组与克氏针组比较只在第 2 wk 时相差显著($P < 0.05$) (见表 2)。

随着术后时间的增加 ,三组的股骨骨折段承受最大载荷均逐渐增加 ,而 CPC-BMP 组承受最大载荷增加幅度最大 ,CPC 组与克氏针组承受最大载荷增加幅度比较平缓 ;在第 2~8 wk 时间段内 ,8 wk 与 2 wk 结果比较 ,CPC-BMP 组增大了 334.2 N ,克氏针组增大了 202.3 N ,CPC 组增大了 161.4 N。在实验中 ,2 周以下的大鼠标本骨折均发生于原来骨折部位 ,而 4、6、8 周 CPC-BMP 组标本及 6、8 周克氏针组、CPC 组标本呈现为一种广泛的压缩骨折 ,发生骨折部位与原来骨折部位无关。

表 2 三组术后不同时间点股骨骨折段承受最大载荷的比较($n = 8 \bar{x} \pm s n$)

组别	术后不同时间(wk)			
	2	4	6	8
克氏针组	108.6 ± 21.2	197.8 ± 29.1	245.2 ± 23.6	310.9 ± 40.0
CPC 组	149.4 ± 19.4**	214.7 ± 35.1	252.1 ± 41.1	310.8 ± 37.9
CPC-BMP 组	197.6 ± 29.2*	300.2 ± 41.3*	466.3 ± 47.3*	531.8 ± 48.5*

注 :CPC-BMP 组与克氏针组和 CPC 组比较* $P < 0.05$,CPC 组与克氏针组比较** $P < 0.05$

3 讨论

BMP 属于转化生长因子-β(transforming growth factor-β TGF-β)超家族成员 ,能有效地诱导未分化的间充质细胞定向分化为成骨细胞^[1] ,其中 BMP-2 与 BMP-4 是具有高效骨诱导活性的细胞因子 ,能诱导异位成骨 ,有效的促进骨折愈合 ,这一结论已经被国内外广大学者的研究证实。而且其骨诱导作用没有种属特异性^[2]。但 BMP 半衰期很短 ,在注入体内后 ,很快被组织液稀释及蛋白水解酶水解失活 ,不能长期有效的发挥其骨诱导作用。而增加给药浓度和

给药次数又会增加治疗费用和药物副作用。因而 ,只有将 BMP 与某种缓释载体结合在一起 ,使得 BMP 在骨折段局部持续释放才能更好的发挥其促进骨愈合的能力。而由于 BMP 是一种蛋白质 ,不能耐受 60℃ 以上的高温 ,这就决定了其载体不能大量产热。

CPC 是一种新型的自固化型骨水泥。其具有如下特点 (1)具有与骨相似的无机盐成分 ,具有很好的生物相容性 (2)可以在室温或体温下固化 ,不产热或微产热 ,自身温度几乎不升高 (3)可被注射到骨折部位 ,按照骨折部位的形态塑形 ,与骨折处骨小梁紧密贴合 ,充分发挥药物的作用 (4)其固化后的强度大于松质骨 (5)具有传导性成骨作用 ,可与骨形成真正的连接 (6)固化后形成大量的微孔结构 ,可以作为药物的缓释载体。已经有大量的试验研究证实 ,载药 CPC 的药物释放特性符合描述多孔缓释载体释放的 Higuchi 方程。是一种理想的可降解的缓释载体。

将 3 月龄以上雌性大鼠去卵巢后饲养 10 wk 是公认的骨质疏松动物模型。本实验采用 4 月龄雌性大鼠 ,去势后饲养 10 wk ,并随机抽样与假手术组行双能 X 线骨扫描 ,检测全身骨密度 ,两组骨密度有显著性差异 ,证实骨质疏松动物模型造模成功。

骨质疏松患者体内的 BMP-2 低于正常人群 ,而 BMP 抗体效价却比正常人群高^[3]。这一研究结果为 BMP 应用于骨质疏松症提供了依据。因此对于骨质疏松骨折补充 BMP 将较非骨质疏松骨折更有利于骨折愈合。BMP-2 诱导成骨作用与其浓度成正比 ,虽然目前尚未有 BMP-2 最佳浓度的报道 ,但大多骨诱导成骨实验中使用了(20~200) g/ml 浓度均获得明显的诱导成骨作用^[4,5]。本实验采用 1 mg rhBMP-2 与 2 g CPC 配比 ,观察到骨折愈合加快 ,愈合后骨强度增高 ,说明在动物实验中 ,这一配比可以促进骨折愈合。

当前多用测量骨密度的方法来研究骨质疏松的骨质量 ,然而骨密度与骨质量并非总是一致的。例如骨质疏松症患者或骨质疏松动物模型在接受雌激素治疗后 ,骨密度增加的同时骨质量也提高 ,骨折风险降低 ,而在用大剂量氟制剂治疗后 ,骨密度上升但骨脆性增大 ,骨折风险增加 ,骨质量下降^[6]。骨质量不仅与骨密度有关 ,而且与骨基质含量、骨结构等多种因素有关。骨生物力学指标是反映骨愈合质量的可靠指标 ,任何针对骨强度或骨质量的研究都应该以生物力学测试做为实验的终结。在本实验中 ,在 8 wk 内各时间点 CPC-BMP 组承受的最大载荷均高

于 CPC 组及克氏针组,差异具有显著性意义($P < 0.05$)。CPC-BMP 组在第 2 wk 时骨强度相当于其他两组第 4 wk 时的强度;在第 4 wk 时的骨强度接近其他两组第 8 wk 时骨强度。由此可见:骨质疏松骨折局部使用 CPC-BMP 后骨强度提高迅速。

由于工艺不同,CPC 的抗压强度差异较大,一般在 30~50 MPa 之间,介于松质骨与密质骨之间,不主张用于负重部位。本实验所使用的 CPC 强度不小于 35 MPa(见说明书)大于松质骨的强度。CPC 只有传导性成骨作用而没有骨诱导活性。Ishikawa K^[7]等将 CPC 置于流动的含钙 PBS 液中研究其降解特性,在 20 周后,CPC 的重量和扭转强度增加到原来的 1.5 倍。经扫描电镜,X-线衍射,红外线光谱分析等检测证实,这是由于 CPC 标本表面沉着了一层羟基磷灰石(Carbonate hydroxyapatite,OHAp)所致。进而分析:CPC 材料在植入机体骨组织或牙齿后,早期会由于上述组织中富含的 OHAp 会沉着于材料和骨之间,使材料与骨组织密切结合,从而加强材料与组织的黏合力,后期则随着 CPC 被机体降解其固定作用逐渐消失。在本实验中,第 2 周时,CPC 组较克氏针组所承受的最大载荷大($P < 0.05$)。而第 4、6、8 周时,CPC 组与克氏针组间最大载荷比较没有显著性差异($P > 0.05$)。分析可能系第 2 周时,CPC 组髓腔中的 CPC 对提高该组抗压强度可能起到了一定作用。而在骨折愈合过程中,由于 CPC 没有诱导性成骨作用,不能促进骨折愈合,在第 4 周后随着骨痂的增多,骨强度增高,以及 CPC 的降解,CPC 所起的支撑作用被掩盖所致。说明在合并骨质疏松的骨

折局部注射 CPC 后,早期可以在一定程度上增加骨折端的稳定性,起到即时固定作用。

综上所述,BMP 起骨诱导作用,CPC 起缓释载体作用与即时固定作用。将 CPC-BMP 联合应用于骨折局部,可以加速骨质疏松症骨折的愈合,提高骨质疏松骨折愈合后的骨强度。

【参 考 文 献】

- [1] Thies RS, Banduy M, Ashton BA, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology*, 1992, 130: 1318-1324.
- [2] Katagiri T, Yanaguchi A, Komaki M, et al. bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J cell biochem*, 1994, 52: 1755-1761.
- [3] Urist MR, Hudak RT, HUO YK, et al. Osteoporosis: a bone morphogenetic protein auto-immune disorder. *Prog Clin Biol Res*, 1985, 187: 77-96. Review.
- [4] Mackay AM, Beck SC, Murphy JM. Chondrogenetic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Engineering*, 1998, 4: 415-425.
- [5] Ohura K, Hamanishi C, Tanaka S, et al. Healing of segmental bone defect in rats induced by a beta-TCP-MCPM cement combined with rhBMP-2. *J Biomed Mater Res*, 1999, 44: 168-175.
- [6] Pak CYC, Sakhaee K, Adams-Huet B, et al. Treatment of postmenopausal osteoporotic woman: Extended observations and additional analysis. *J Bone Miner Res*, 1994, 9: 265-272.
- [7] Ishikawa K, Takagi S, Chow LC, et al. Behavior of a calcium phosphate cement in simulated blood plasma *in vitro*. *Dent Mater*, 1994, 10: 26-32.

(收稿日期:2006-03-20)