

# bBMP 复合纤维蛋白胶治疗绵羊脊柱骨质疏松的实验研究

吴子祥 胡蕴玉 雷伟 李丹 万世勇 王海强 李波 付索超

**摘要:** **目的** 探索能够在短期内有效提高骨质疏松椎体骨密度的局部治疗方法。**方法** 采用卵巢切除法(OVX)对 6 只成年雌性绵羊去势,低钙饲养 1 年后建立骨质疏松模型。采用拉丁方设计方案,通过经椎弓根注射途径,分别在每只动物的 L<sub>4</sub>、L<sub>5</sub>、L<sub>6</sub> 注射 3 种药物:实验组 A 20mg bBMP/FS,对照组 B 20mg bBMP,对照组 C 单纯 FS。术后 3 个月时采用双能 X 线吸收骨密度测量仪和 Micro-CT 进行测量分析。**结果** 拉丁方分析 BMD 显示:实验组 BMD(1.334 g/cm<sup>2</sup>)明显高于对照组 BMD(1.139 g/cm<sup>2</sup> 和 1.163 g/cm<sup>2</sup>)。Micro-CT 分析表明:实验组骨小梁的密度、连接率均显著高于对照组。**结论** bBMP 复合纤维蛋白胶可以促进骨小梁的改建,改善骨小梁的三维结构,增加椎体的骨质密度,因此可以作为局部治疗脊柱骨质疏松的新型方法之一。

**关键词:** 骨质疏松; 骨形态发生蛋白; 纤维蛋白胶; 显微 CT

## Use of bovine BMP combined with eibrin sealant in treatment of osteoporosis sheep: an experimental study

WU Zixiang, HU Yunyu, LEI Wei, et al. Institute of Orthopaedic Surgery & Department of Orthopaedics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

**Abstract: Objective** To investigate a local treatment which can improve the BMD in osteoporosis spine rapidly.

**Methods** Six sheep were ovariectomized (OVX) for one year. All sheep underwent BMD scan at the time of OVX and one year after OVX. After OP animal model was established one year later, bBMP/fibrin sealant (Experimental Group), bBMP (Control Group A) and FS (Control Group B) were injected into L<sub>4</sub>、L<sub>5</sub>、L<sub>6</sub> vertebra respectively.

The BMD and micro-architecture of vertebrae were measured by dural energy X-ray absorption meter and microCT 3 months later. **Results** The BMD (1.334 g/cm<sup>2</sup>) in experimental group was significantly higher than group A (1.139 g/cm<sup>2</sup>) and group B (1.163 g/cm<sup>2</sup>). The MicroCT reconstruction analysis also showed that the density and connectivity of trabecular bone in experimental group were higher than control groups. **Conclusion** Bovine BMP combined with fibrin sealant can improve the reconstruction of cancellous bone and increase the BMD in OP sheep spine. It can be used as local treatment of osteoporosis in spine.

**Key words:** Osteoporosis; BMP; Fibrin sealant; MircoCT

随着人口老龄化的发展,骨质疏松的发病率越来越高,其中又以脊柱骨质疏松最为多见和严重,常出现椎体塌陷、压缩骨折。后者治疗主要采用椎体成形术或口服药物进行治疗。但是,临床上更为多见的是骨密度下降严重、椎体尚未骨折塌陷却濒临骨折塌陷的“高危”患者群体,他们并不适用于椎体成型术治疗,仅能够采用药物治疗。然而,药物治疗周期长,见效慢,很难在短时间内迅速提高骨密度及

骨强度,患者常会在治疗期间即发生椎体塌陷。如何能在短期内迅速提高“高危”椎体的骨密度、骨强度,避免患者在治疗期间出现椎体骨折塌陷,就成为临床上急待解决的问题。此外,对于因脊柱退行性改变而需要行手术内固定治疗的患者,在其术后卧床期间,骨量丢失速度会大于药物提升骨量的速度,会导致骨质疏松进一步加重,使内固定松动失败的可能性大幅增加<sup>[1, 2]</sup>。因此,如何在术中即对“高危”椎体进行预处理,通过促进骨小梁自身改建来提高骨质强度,减少术后内固定松动,也成为外科医师的研究热点之一。

作者单位: 710032 西安,第四军医大学西京医院全军骨科研究所

通讯作者: 雷伟, Email: wuzixiang@hotmail.com

牛源骨形成蛋白 (bBMP, bovine bone

morphogenetic protein)是一种以 BMP-2、BMP-7 为主的成骨性细胞因子复合物,具有显著的促进骨形成的作用,已经临床用于修复骨缺损及促进植骨融合<sup>[3-5]</sup>。纤维蛋白胶(Fibrin Sealant, FS)是一种具有良好生物相容性的缓释载体,目前已经用于多种细胞因子的载体,并取得了良好的效果<sup>[6-8]</sup>。本研究拟将 bBMP 与 FS 复合后,采用经椎弓根注射方法将其注射至骨质疏松绵羊的椎体内,观察其对骨小梁改建过程的影响。

1 材料和方法

1.1 建立骨质疏松的动物模型

选取成年雌性绵羊 6 只,双能 X 线骨密度仪(美国 Lunar 公司)测定其腰椎骨质密度后,采用卵巢切除的方法进行去势处理。术后低钙饲养 1 年后,再次测定其腰椎骨质密度,测定所有绵羊腰椎骨质密度下降大于 1.5 SD,确定骨质疏松动物模型成功建立。

1.2 bBMP 和 FS 的复合及注射方法

A 组:在 FS (广州倍绣生物技术有限公司)的抑胰肽酶溶液内加入牛 BMP 冻干粉(第四军医大学西京医院全军骨科研究所综合骨库提供),bBMP 的浓度为 20 mg/mL。使用时分别将主体胶溶液和含 bBMP 的抑胰肽酶溶液添加入双腔注射管内,缓慢注射至椎体内。B 组:将 20mg bBMP 与适量蒸馏水混匀,加入注射器后用 11 号骨穿针注入椎体。C 组:根据 FS 产品说明书,按常规使用方法混合后注射。

1.3 实验动物分组

实验采用重复拉丁方设计,在 6 只绵羊的 L<sub>4</sub>、L<sub>5</sub>、L<sub>6</sub> 椎体上随机地给予 3 种不同处理:A 注射 bBMP/FS;B 单纯注射 20 mg 的 bBMP;C 单纯注射 1 mL 的 FS。分组情况见表 1。

表 1 实验动物处理分组情况

| 绵羊序号 | L <sub>4</sub> | L <sub>5</sub> | L <sub>6</sub> |
|------|----------------|----------------|----------------|
| 1    | A              | B              | C              |
| 2    | C              | A              | B              |
| 3    | B              | C              | A              |
| 4    | A              | B              | C              |
| 5    | C              | A              | B              |
| 6    | B              | C              | A              |

1.4 手术方法

采用速眠新 II 号麻醉动物。麻醉成功后,动物取侧卧位,常规消毒铺单,采用后正中切口,依次切开皮肤、皮下筋膜。骨刀剥离椎旁骶棘肌,显露 L<sub>4</sub>

至 L<sub>6</sub> 椎板、关节突及横突。根据同品系动物离体标本上所测得的进针点及进针角度,采用 11 号骨穿针经椎弓根注射途径穿刺至椎体。探针探索针道四壁,确保没有突破周围骨皮质后,将 3 种材料 1 mL 注射至椎体内,待纤维蛋白胶形成凝胶状固态,确保无胶体渗漏后,拔出针头。充分电凝止血并冲洗伤口后,逐层缝合。术前 2 h、术中及术后 3 d 内均给予头孢唑啉钠抗生素。

1.5 结果观察

术后进行大体的密切观察,观察术后动物饮食、活动及切口愈合情况,注意有无炎症反应。术后 3 月时,采用双能 X 线骨密度仪测量 L<sub>4</sub>、L<sub>5</sub>、L<sub>6</sub> 椎体的骨质密度。处死动物后,取下腰椎节段,切除 L<sub>4</sub>、L<sub>5</sub>、L<sub>6</sub> 椎体终板、后侧附件及椎体表面的骨皮质,仅保留椎体内部的松质骨部分。每只动物的 3 个椎体标本分为 1 组,共 6 组,18 个标本。分别将每组的 3 个标本放入 MicroCT(美国 GE 公司)样本杯中,在相同的条件下进行三维 CT 重建,分析其骨小梁数量、连接率及粗细程度,评价骨小梁改建情况。

2 结果

2.1 大体观察

术后所有动物手术切口出现不同程度的肿胀,2~4 d 后消失,切口愈合良好。动物没有出现跛行、截瘫等神经损伤症状,活动、进食情况基本正常。

2.2 骨密度检查结果

采用骨密度仪中脊柱正位测量模式(AP Spine Bone Density Analysis)测定所有动物去势前和去势后 1 年的腰椎总体骨密度,结果见表 2。

表 2 去势前后绵羊腰椎骨密度测量值及下降程度百分比

| 绵羊序号 | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 去势前  | 1.014 | 1.125 | 1.134 | 1.169 | 1.254 | 0.987 |
| 去势后  | 0.843 | 0.885 | 0.890 | 0.957 | 1.003 | 0.733 |
| 降低程度 | 17.1% | 21.4% | 21.5% | 18.1% | 20.1% | 25.7% |

结果表明,去势后,绵羊腰椎骨质密度有明显下降,下降程度均明显大于 1.5 SD。取出标本后,采用手动测量模式(Manual Bone Density Analysis)分别对绵羊腰椎的目标区域的局部骨密度进行测量(图 1),结果见表 3。

拉丁方结果表明,3 种不同处理组之间差异存在显著性( $P = 0.006$ ),处理组 A 的椎体骨质密度显著高于对照组 B、C( $P$  值分别为 0.03,0.06),而 B、C 组间骨密度没有明显差别( $P = 0.612$ )。拉丁方分析发现不同节段对骨密度没有明显影响( $P =$

0.941)。由于使用 2 种不同的 BMD 检测模式,因此,两种方法之间不能直接进行比较。

表 3 绵羊腰椎目标区域局部骨密度值

| 绵羊编号 | L <sub>4</sub> | L <sub>5</sub> | L <sub>6</sub> |
|------|----------------|----------------|----------------|
| 1    | 1.448          | 1.254          | 1.237          |
| 2    | 1.077          | 1.196          | 1.016          |
| 3    | 1.092          | 1.275          | 1.420          |
| 4    | 1.246          | 1.164          | 1.105          |
| 5    | 1.313          | 1.414          | 1.164          |
| 6    | 1.142          | 1.279          | 0.971          |

2.3 MicroCT 检测结果

表 4 Micro CT 检测结果

| 组别 | 相对骨体积<br>(BV/TV)% | 表面积体积比<br>(BS/BV)mm <sup>-1</sup> | 骨小梁厚度<br>(Tb.Th)mm | 骨小梁数目<br>(Tb.N)mm <sup>-1</sup> | 骨小梁间隙<br>(Tb.Sp)mm |
|----|-------------------|-----------------------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------|
| A  | 60.1 ± 12.8       | 6.97 ± 1.95                       | 0.39 ± 0.04        | 1.89 ± 0.29                     | 0.34 ± 0.10        |
| B  | 47.4 ± 12.9       | 10.08 ± 2.64                      | 0.30 ± 0.05        | 1.80 ± 0.17                     | 0.29 ± 0.09        |
| C  | 43.4 ± 14.3       | 10.88 ± 1.89                      | 0.28 ± 0.08        | 1.68 ± 0.17                     | 0.38 ± 0.15        |

统计结果显示,A 组的 BV/TV、BS/BV、Tb.Th 均显著高于 B、C 组(*P* 值分别为 0.031、0.017、0.034, *F* 值为 4.405、5.367、4.286),而 Tb.N、Tb.Sp 与对照组差异无显著性(*P* > 0.05)。在相同条件下进行重建的三维图像也直观地显示出实验组 A 的骨小梁密度及粗细程度均高于对照组(图 1,2)。

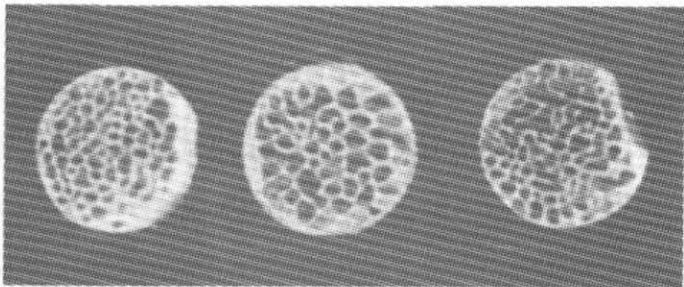


图 1 椎体松质骨重建二维图像

从左至右分别为 A、B、C 组。A 组骨小梁较 B、C 组明显稀疏,孔隙率增加,水平方向骨小梁减少,局部有较大的骨小梁空隙形成

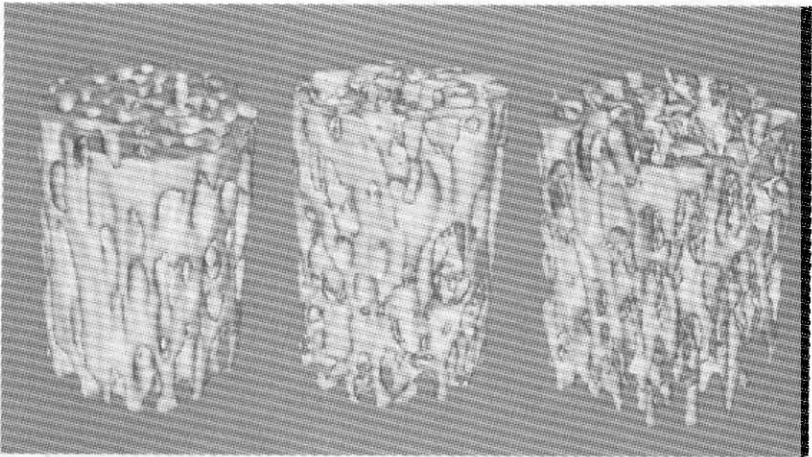


图 2 椎体松质骨重建三维图像

从左至右分别为 A、B、C 组。B、C 组骨小梁的连接率、孔隙率明显降低,骨小梁稀疏,三维构筑明显差于 A 组

脊柱的骨质疏松表现为椎体内骨小梁逐渐稀疏、变细、断裂,导致三维构筑改变,最终出现椎体骨折、塌陷。因此,在微观结构上,椎体的骨质疏松过程可以视为骨小梁出现骨折、骨缺损的动态过程。bBMP 是一种含有 BMP-2、BMP-7 的成骨性细胞因子复合物<sup>[3-5]</sup>。研究表明,BMPs 同时具有膜内成骨和软骨成骨的双重成骨特性,而且它们之间具有网状协同作用<sup>[4,9]</sup>。因此,含有多种 BMP 的 bBMP 已经临床用于修复骨缺损及促进骨折愈合等方面,并取得了良好的效果。最近,国外学者发现,通过静脉或腹膜内注射的方法将 BMP-6 或 rhBMP-2 注射至去势大鼠体内,同样可以提高松质骨的数量及质量<sup>[10]</sup>。因此,如果能够将 BMPs 复合至一种良好的缓释载体上,在较长时间内维持 BMPs 的浓度,避免被血液稀释,势必能够更好发挥其成骨效应。而 FS 是利用纤维蛋白原和凝血酶的反应制成具有强大黏合力的 FS 凝块,可在体内快速成型,避免了骨诱导因子的流失的问题,同时,FS 本身具有促进毛细血管形成的作用,可以加速创伤的愈合,目前已经成功用于 BMP 的载体治疗骨缺损,促进植骨融合<sup>[6-8]</sup>。因此,我们考虑将含有 BMPs 的 bBMP 复合至纤维蛋白胶上,将其注射至椎体内,用于治疗局部的骨质疏松。

3.2 骨密度测量

在测量绵羊腰椎骨密度时,本实验采用了两种测量模式。在评估去势动物模型建立的可靠性时,采用的是扫描时间较短,可以对腰椎节段进行整体 BMD 测量的脊柱正位测量模式。它的优点是能够快速扫描,避免了扫描时间过长,麻醉动物出现轻微活动导致扫描图像出现伪影、移位的现象,影响数据分析结果。在去势前后的两次扫描中,采用的是相同的扫描条件,这样就保证了结果的一致性,使得实验评估在相同水平进行。在处死动物后进行骨密度扫描时,采用的是手动测量模式。这种模式下,可以对椎体内特定的目标区域进行 BMD 测量。在测量时,我们采用大小相同的目标框,测量椎体中央松质骨部位的骨密度。由于绵羊椎体呈长柱状,而椎弓根基本处于椎体中段,注射的成骨材料难以分布至终板处;此外,终板部的骨密度明显高于椎体部,对骨密度的影响较大。因此,我们着重分析注射点附近、上下终板之间的椎体的骨密度,以客观的分析实验材料对骨密度的影响。实验结果表明,实验组的 BMD 显著高于两个对照组。

3.3 MicroCT 扫描

Hahn 的微构筑理论认为,除骨量因素外,骨小

3 讨论

3.1 bBMP 及 FS 对骨小梁的作用

梁的稳定性还取决于其三维构筑及小梁间的联结程度。因此,骨质疏松症的病理学改变包括质和量两方面。量变主要体现在 BMD 的下降<sup>[11]</sup>,而质变主要表现在骨小梁的生长状况、骨矿化程度、骨质的堆积范围、微损伤等区域性组织形态学改变,如小梁骨容量下降,骨小梁断裂、稀疏。大量的动物实验和临床研究表明,单纯增加 BMD,并不相应的增加骨强度,有时反而降低。因此,我们还采用了可以直接观察骨小梁形态、结构及三维构筑的 MicroCT 对椎体进行了重建分析,以评估 bBMP 对骨小梁的作用。结果表明,实验组骨小梁厚度、相对体积比和表面积体积比均明显高于对照组。

综上所述,以 FS 为载体复合 bBMP 的注射型骨修复材料具有强大的骨诱导能力,可以迅速有效地改善骨质疏松椎体骨小梁的三维构筑,提高其力学强度。因此,它可以用于强化濒临骨折塌陷的“高危”椎体,成为一种新型的生物可吸收的成型材料。

### 【 参 考 文 献 】

- [ 1 ] Uebelhart D, Bernard J, Hartmann DJ, et al. Modifications of bone and connective tissue after orthostatic bed rest. *Osteoporos Int*, 2000, 11(1): 59-67.
- [ 2 ] Nishimura Y, Fukuoka H, Kiriya M, et al. Bone turnover and calcium metabolism during 20 days bed rest in young healthy males and females. *Acta Physiol Scand Suppl*, 1994, 616:27-35.
- [ 3 ] Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine*, 2002, 27(Suppl):2-8.
- [ 4 ] Damien CJ, Grob D, Boden SD, et al. Purified bovine BMP extract and collagen for spine arthrodesis: preclinical safety and efficacy. *Spine*, 2002, 27(suppl): 50-58.
- [ 5 ] Boden SD, Grob D, Damien CJ, et al. Ne-osteo bone growth factor for posterolateral lumbar spine fusion: results from a nonhuman primate study and a prospective human clinical pilot study. *Spine*, 2004, 29:504-514.
- [ 6 ] Le Guehennec L, Layrolle P, Daculsi G, et al. A review of bioceramics and fibrin sealant. *Eur Cell Mater*, 2004, 13(8):1-10.
- [ 7 ] Urban K, Povysil C, Spelda S. Effect of fibrin on osseointegration of bioactive glass ceramic materials: experimental study. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*, 2001, 68(3):168-175.
- [ 8 ] Le Guehennec L, Goyenvalle E, Aguado E, et al. MBCP biphasic calcium phosphate granules and tissucol fibrin sealant in rabbit femoral defects: the effect of fibrin on bone ingrowth. *J Mater Sci Mater Med*, 2005, 16(1): 29-35.
- [ 9 ] Maire M, Chaubet F, Mary P, et al. Bovine BMP osteoinductive potential enhanced by functionalized dextran-derived hydrogels. *Biomaterials*, 2005, 26(24):5085-5092.
- [ 10 ] Simic P, Buljan Culej J, Orlic I, et al. Systemically administered bone morphogenetic protein-6 restores bone in aged ovx rats by increasing bone formation and suppressing bone resorption. *J Biol Chem*, 2006, 281:25509-25521.
- [ 11 ] Hahn M, Vogel M, Pompesivs-Kempa M, et al. Trabecular bone pattern factor: a new parameter for simple quantification of bone micro architecture. *Bone*, 1992, 13: 327-340.