

# rhBMP-2/CPC 对骨质疏松骨缺损的治疗作用的研究

刘兴炎 厉孟 刘旭东 郝晓东 葛宝丰

中图分类号: R683 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)01-00016-04

**摘要:**目的 探讨磷酸钙骨水泥复合 rhBMP-2 对骨质疏松骨缺损的治疗作用。方法 以卵巢切除法对 10 只成年山羊去势,低钙膳食 6 个月后建立骨质疏松模型,手术去除每只动物 L<sub>2</sub>、L<sub>4</sub> 椎体部分侧方骨质,造成约 5 mm × 10 mm × 10 mm 大小骨缺损,将动物随机分成 2 组,一组植入 rhBMP-2/CPC 作为实验组,另一组植入 CPC 作为对照组,术后 1 周、9 周分别采用双能 X 线吸收骨密度仪检测手术椎体骨密度、CT 三维成像观察骨缺损愈合情况,术后 9 周手术椎体进行生物力学检测,制作椎体不脱钙切片进行骨组织计量学分析。结果 术后骨密度检测实验组与对照组间差异无显著性,但实验组在骨缺损愈合状况、骨小梁微结构及骨生物力学性能等方面均显著优于对照组。结论 应用 rhBMP-2/CPC 能改善局部骨质疏松,促进骨质疏松骨缺损愈合,达到治疗骨质疏松骨折骨缺损的目的。

**关键词:** 骨缺损; 骨形成蛋白-2; 磷酸钙骨水泥; 骨质疏松

**Enhancement of bone defects healing by a local treatment with rhBMP-2/CPC in an osteoporotic goat** LIU Xingyan, LI Meng, LIU Xudong, et al. Department of Orthopedics, Lanzhou General Hospital of People's Liberation Army, Lanzhou 730050, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of a local treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2/calcium phosphate cement (rhBMP-2/CPC) in bone defects of an osteoporotic goat. **Methods** Ten mature goats underwent ovariectomy and were placed on low cation relative to anion diet. After six months, animals were randomly assigned to two groups (the experimental group or the control group), and a bone defect with dimensions of 5 mm × 10 mm × 10 mm were made in L<sub>2</sub>、L<sub>4</sub> of the goats. RhBMP-2/CPC or CPC were implanted into the defects of the experiment group or the control group respectively. After one or nine weeks, BMD were measured by dual energy X-ray absorption meter and healing of the defect was detected by CT scanning; Biomechanical test was applied to the vertebral body nine weeks later, micro architecture was also analyzed by bone histomorphometry. **Results** BMD had no difference between two groups, but bone defects of the experimental group healed more rapidly than the ones of the control group, and micro architecture and biomechanical property of the vertebral body were also improved in the experimental group. **Conclusion** Treatment with rhBMP-2/CPC can improve local osteoporosis and enhance the healing of an osteoporotic bone defect, so it may be used for the treatment of a bone defect or a fracture in osteoporosis.

**Key words:** Bone defect; Bone morphogenetic protein-2; Calcium phosphate cement; Osteoporosis

随着人口老龄化的发展,骨质疏松症已成为严重威胁老年人健康的疾病,骨质疏松极易导致骨折,并且此类骨折常常同时伴有骨缺损,单纯以内固定

或外固定方法进行治疗效果欠理想,固定 + 磷酸钙骨水泥(calcium phosphate cement, CPC)的方法治疗骨质疏松骨折骨缺损收到了较好的疗效<sup>[1,2]</sup>。但单纯的 CPC 无骨诱导性,不能加速骨折骨缺损的愈合,而复合骨形成蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)能使 CPC 具有骨诱导性,且明显促进大段骨缺损的愈合<sup>[3]</sup>。最近的研究表明在骨质疏松椎体内局部应用缓释性 BMP,可快速改善椎体骨微结

基金项目: 全军“十一五”医药卫生科研基金资助项目(06MA090); 甘肃省自然科学基金资助项目(0710RJZA068)

作者单位: 730050 兰州,兰州军区兰州总医院骨科(刘兴炎、厉孟、刘旭东、葛宝丰),CT 室(郝晓东)

构,增强椎体生物力学,从而达到治疗局部骨质疏松的目的<sup>[4,5]</sup>。CPC 复合 rhBMP-2 也能持续缓慢释放 rhBMP-2,故我们设想局部应用 rhBMP-2/CPC,能改善局部骨质疏松,促进骨质疏松骨缺损愈合,达到治疗骨质疏松骨折骨缺损的目的,本实验对此进行了深入研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要设备与实验材料

IX70 倒置显微镜(日本 Olympus 公司);AG-2000G 万能材料试验机(日本 Shimadzu 公司);Lunar prodigy 骨密度仪(美国 GE 公司);SP1600 锯式切片机(德国莱卡公司);C300-EBCI(美国 Imatron 公司);速眠新注射液(解放军农牧大学);CPC(上海瑞邦公司);rhBMP-2(上海瑞邦公司);钙黄绿素及四环素(美国 Sigma 公司);丽春红 S 等染色试剂均为上海生工产品;山羊由兰州生物制品研究所动物实验中心提供。

### 1.2 骨质疏松山羊模型的制备及实验材料的植入

骨质疏松山羊模型以经典的去势法制备:雌性山羊切除双侧卵巢后低钙膳食 6 个月,术前及术后 6 个月分别测定腰椎骨密度,选取骨密度有明显差异的动物进行下一步实验。磷酸钙骨水泥以固液比 2.5:1 进行固化,rhBMP-2 在固化前溶于固化液中,每个材料标本含骨水泥约 0.5 g,rhBMP-2 约 0.5 mg。骨质疏松山羊共 10 只,体重约  $(20 \pm 1.5)$  kg,将动物随机分成 2 组,一组植入 rhBMP-2/CPC 作为实验组,另一组植入 CPC 作为对照组;以速眠新(1 ml/10 kg)麻醉后,侧卧于手术台,经腹外侧入路暴露山羊腰椎,参考文献[4]方法,于 L<sub>2</sub>、L<sub>4</sub> 椎体侧方去除 5 mm × 10 mm 大小皮质骨,以刮匙去除骨松质,直至深约 10 mm,生理盐水清洗碎骨屑,纱条压迫约 5 min,未见活动性渗血后,植入材料。

### 1.3 局部治疗作用主要指标检测

材料植入后 1 周、9 周,分别进行腰椎 CT 扫描后以容积显示技术进行三维重建,同时测定骨密度(骨密度检查时去除高密度的材料影像)。术后 9 周处死山羊(处死前 14、13 及 4、3 d 分别于皮下注射钙黄绿素 5 mg/kg、四环素 25 mg/kg),收集 L<sub>2</sub>、L<sub>4</sub> 椎体标本,L<sub>2</sub> 椎体进行椎体压缩实验,L<sub>4</sub> 椎体乙醇逐级脱水后,塑料包埋,锯式切片机平行于椎体终板切取 2 张厚约 30 μm 的骨组织片(切片取自材料两端未损伤椎体),沿材料纵轴切取 1 张约 30 μm 切片,取 1 张平行终板切片经丽春红三色染色后于光镜下观察骨小梁微结构,运用 image pro plus 3.0 图像分析软件进行骨组织计量学分析,其余切片直接于荧光显微镜下观察荧光双标间距,计算平均矿化率。

### 1.4 统计学处理

数据以均数 ± 标准差表示,SPSS 13.0 进行统计分析,采用 *t* 检验进行比较, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 影像学检查及生物力学测定

材料植入后 1 周及 9 周的三维 CT 重建见图 1,rhBMP-2/CPC 组椎体手术处骨缺损均已全部愈合,几乎未再见到手术痕迹,单纯 CPC 组椎体缺损处也已大部分愈合,只在 L<sub>4</sub> 椎体仍可见一细微骨缺损,但愈合处骨组织明显较周围 CT 值稍低,仍隐约可见材料的大体形状。骨密度检查结果示椎体骨密度在术后 1 周及 9 周,两组之间差异无显著性(表 1)。术后 9 周,BMP-2/CPC 组椎体最大压缩强度为  $(4.2 \pm 1.2)$  MPa,明显高于 CPC 组  $(2.4 \pm 0.9)$  MPa ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 组织学观察及骨组织计量学测量

在材料周围及邻近区域,BMP-2/CPC 组的平均骨矿化率均明显高于 CPC 组(表 2,图 2)。丽春红三色染色可见 BMP-2/CPC 组骨小梁较密,游离末端少,



图 1 CT 三维图像 a、b 分别为 CPC 组术后 1 周、9 周,c、d 分别为 rhBMP-2/CPC 组术后 1 周、9 周

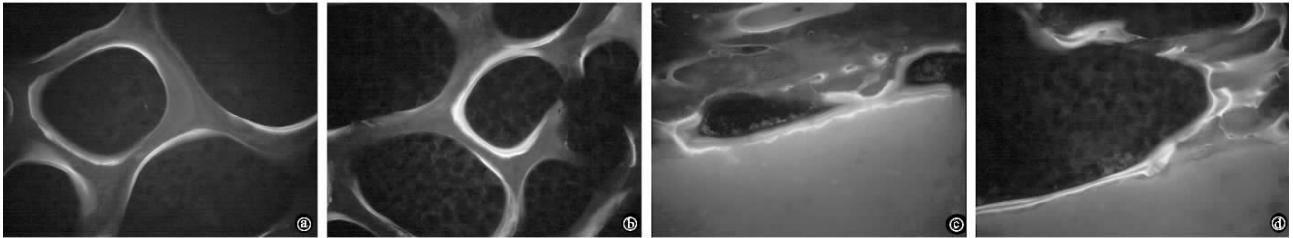


图 2 荧光双标图像 a、c 分别为 CPC 组材料邻近及周围区域 b、d 分别为 rhBMP-2/CPC 组材料邻近及周围区域 × 100

同时可见新生骨组织(图中染成蓝色的组织)正在修复部分微骨折的骨小梁结构,CPC 组骨小梁稀疏且较细长,游离末端较多(图 3)。骨组织计量学分析显示,BMP-2/CPC 组平均骨小梁厚度及密度、结点末端比明显高于 CPC 组,而平均骨小梁间距低于 CPC 组(表 3)。

表 1 两组山羊腰椎局部骨密度值

组别	术后 1 周		术后 9 周	
	L <sub>2</sub>	L <sub>4</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>4</sub>
对照组	0.70±0.10	0.79±0.10	0.68±0.09	0.80±0.12
实验组	0.66±0.08	0.81±0.09	0.69±0.07	0.83±0.11

表 2 两组山羊腰椎骨组织平均矿化率(μm/d)

组别	邻近区域	材料周围
对照组	1.60±0.27	2.41±0.24
实验组	2.29±0.15*	3.12±0.33*

注:与对照组比较,\*P<0.05

表 3 两组山羊椎体骨组织计量学分析结果

组别	相对骨小梁体积 (BV/TV)%	骨小梁厚度 (Tb.Th)mm	骨小梁间隙 (Tb.Sp)mm	结点末端比 (NTR)
对照组	39.3±4.0	0.25±0.03	0.44±0.04	2.11±0.57
实验组	49.9±4.8*	0.34±0.04*	0.35±0.03*	3.72±0.67*

注:与对照组比较,\*P<0.05

3 讨论

3.1 rhBMP-2/CPC 对局部骨质疏松的治疗

BMP-2 是一种广泛应用的骨生长因子,与骨质疏松有紧密联系,BMP-2 基因发生变异可引起家族性骨质疏松症,全身应用基因重组 BMP-2 可增强骨质疏松小鼠间充质干细胞的生物活性,进而抑制小鼠的骨流失,治疗其骨质疏松,在骨质疏松椎体局部应用缓释性 BMP-2,也能达到改善椎体骨微结构,加强椎体生物力学性能的作用<sup>[6,7]</sup>。磷酸钙骨水泥具有良好的缓释性能,体外实验表明复合 rhBMP-2 缓释时间较长,在早期没有释放高峰,因子释放的曲线平稳上升,这种曲线较适合促进骨生成,在体内发现 5 周后因子释放约 95% 左右<sup>[3,8]</sup>。在本实验中,实验组在材料邻近部位骨生长速度明显快于对照组,可

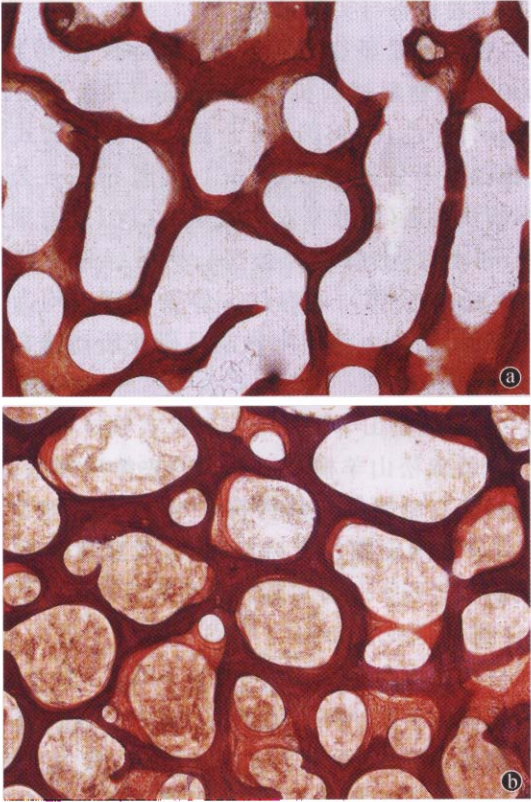


图 3 丽春红三色染色

a 为 CPC 组 b 为 rhBMP-2/CPC 组 × 50

见自复合物释放的 rhBMP-2 可达到邻近部位发挥作用,从而改善骨质疏松羊椎体的骨微结构,增强椎体的生物力学性能,显示了较好的局部抗骨质疏松作用。另一方面,磷酸钙骨水泥充填于骨质疏松局部时,能改变骨质疏松局部骨的破骨状态,抑制骨的大量吸收,改善局部骨质疏松,但其具体机制仍有待于进一步探索<sup>[9]</sup>。  
rhBMP-2/CPC 对局部骨质疏松还具有一定的机械加固作用。骨质疏松促使局部骨生物力学强度降低,骨折概率大大增加,CPC 的生物力学强度明显优于松质骨,接近于强度较低的皮质骨,局部应用可迅速加强骨质疏松局部骨生物力学性能,降低局部骨折的发生概率<sup>[10]</sup>。

### 3.2 rhBMP-2/CPC 对骨质疏松骨缺损的作用

磷酸钙骨水泥直接复合骨形成蛋白已被广泛用于治疗严重骨缺损病例,收到了良好的效果<sup>[3]</sup>。但在骨质疏松环境下,破骨细胞活性增强,骨吸收大于骨形成,新骨生成能力下降,研究表明骨质疏松羊胫骨骨缺损的愈合明显延迟,在各个时间段,新生骨痂的面积及密度均较正常组降低,愈合的胫骨其生物力学性能也明显低于正常组<sup>[11]</sup>。在这种情况下, rhBMP-2/CPC 能否达到预期加速骨缺损愈合的效果仍未可知。我们发现在 rhBMP-2/CPC 边缘新骨增长速度较 CPC 明显加快,且在各个时间段,CT 三维图像显示骨缺损的愈合也明显加速,可见复合 rhBMP-2 加强了 CPC 的骨诱导能力,明显促进骨质疏松椎体骨缺损的愈合。以往的研究表明,缓释性 BMP-7 能明显促进骨质疏松骨缺损的愈合,而以转基因技术在骨质疏松骨缺损周围的细胞中转入 BMP-2 基因,诱导这些细胞持续产生 BMP-2,也能显著加快骨缺损的愈合<sup>[4,12]</sup>。因此应用缓释性生长因子加速骨质疏松骨缺损的愈合是可行的, rhBMP-2/CPC 可作为治疗骨质疏松局部骨缺损的良好材料。

### 3.3 骨质疏松局部治疗效果的指标

骨密度及骨微结构是目前评价骨质疏松局部治疗作用的主要指标。骨密度的改变需要一个较长的时间,而且不是很敏感,大量的临床患者经抗骨质疏松治疗后也很少见到明显的骨密度增加,而当骨密度仅仅增加 2% 时,骨质疏松骨折发生率就明显减少,另一方面,在组织学上能发现的骨量增加与减少,骨密度检查不一定能发现<sup>[4,13]</sup>;而骨微结构能直接反应骨生物力学的强度,当骨微结构有改变时,骨的生物力学强度必定也发生变化<sup>[5]</sup>。骨质疏松羊椎体经含 0.5 mg rhBMP-2 的 CPC 局部治疗 9 周后,骨密度并无明显的变化,但骨微结构得到明显改善,骨的生物力学强度也明显增加,Phillips 等<sup>[4]</sup>以 0.37 mg 的缓释 BMP-7 局部治疗骨质疏松绵羊骨缺损,6 个月后骨缺损愈合,局部骨生物力学强度增加,但骨密度也无明显变化;而吴子祥等<sup>[5]</sup>用纤维蛋白胶复合 20 mg bBMP,局部治疗骨质疏松羊椎体 3 个月后发现骨密度、骨微结构及骨生物力学强度均明显改善。由此可见,只有运用较高浓度的骨生长因子,才能使骨质疏松骨的骨密度增加,而骨生长因子浓度较低时骨密度的变化不明显,但此时骨微结构已明显改善,骨生物力学性能增强,从而能降低骨折的发生概率。因此,骨微结构是评价骨质疏松治疗作用的良好指标,与骨密度相比更敏感更准确。

综上所述,磷酸钙骨水泥复合骨形成蛋白能改善局部骨微结构,增强局部骨生物力学,加速骨质疏松骨缺损愈合,从而达到治疗骨质疏松骨折骨缺损的目的。

### 【参 考 文 献】

- [1] Zimmermann R, Gabl M, Lutz M, et al. Injectable calcium phosphate bone cement Norian SRS for the treatment of intra-articular compression fractures of the distal radius in osteoporotic women. Arch Orthop Trauma Surg, 2003, 123(1): 22-27.
- [2] Nakano M, Hirano N, Ishihara H, et al. Calcium phosphate cement-based vertebroplasty compared with conservative treatment for osteoporotic compression fractures: a matched case-control study. J Neurosurg Spine, 2006, 14(2): 110-117.
- [3] Seeherman H, Li R, Bouxsein M, et al. rhBMP-2/calcium phosphate matrix accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model at multiple treatment times and concentrations. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(1): 144-160.
- [4] Phillips FM, Turner AS, Seim HB 3rd, et al. In vivo BMP-7 (OP-1) enhancement of osteoporotic vertebral bodies in an ovine model. Spine J, 2006, 16(5): 500-506.
- [5] 吴子祥, 胡蕴玉, 雷伟, 等. bBMP 复合纤维蛋白胶治疗绵羊椎体骨质疏松的实验研究. 中国骨质疏松杂志, 2007, 13: 410-413.
- [6] Styrkarsdottir U, Cazier JB, Kong A, et al. Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2. PLoS Biol, 2003, 1(3): E69.
- [7] Turgeman G, Zilberman Y, Zhou S, et al. Systemically administered rhBMP-2 promotes MSC activity and reverses bone and cartilage loss in osteopenic mice. J Cell Biochem, 2002, 86: 461-474.
- [8] Jansen JA, Vehof JW, Ruhé PQ, et al. Growth factor-loaded scaffolds for bone engineering. J Control Release, 2005, 101(1-3): 127-136.
- [9] Wang ML, Massie J, Perry A, et al. A rat osteoporotic spine model for the evaluation of bioresorbable bone cements. Spine J, 2007, 17(4): 466-474.
- [10] Hong SJ, Park YK, Kim JH, et al. The biomechanical evaluation of calcium phosphate cements for use in vertebroplasty. J Neurosurg Spine, 2006, 14(2): 154-159.
- [11] Lill CA, Hesseln J, Schlegel U, et al. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. J Orthop Res, 2003, 21(5): 836-842.
- [12] Egermann M, Baltzer AW, Adamaszek S, et al. Direct adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2 cDNA enhances fracture healing in osteoporotic sheep. Hum Gene Ther, 2006, 17(5): 507-517.
- [13] Marcus R, Wong M, Heath H 3rd, et al. Antiresorptive treatment of postmenopausal osteoporosis: comparison of study designs and outcomes in large clinical trials with fracture as an endpoint. Endocr Rev, 2002, 23(1): 16-37.