

rhBMP-2/CPC 强化骨质疏松椎体力学强度的实验研究

罗志强

中图分类号: R318.01 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)07-0600-05

摘要: 目的 观察人重组骨形态发生蛋白-2 复合磷酸钙骨水泥 (recombinant human bone morphogenetic protein-2/calcium phosphate cement, rhBMP-2/CPC) 强化骨质疏松绵羊腰椎生物力学强度的动态效果。方法 成年雌性绵羊 12 只行去势手术后饲养 1 年, 测量去势前后腰椎骨密度。取 L1-L6 为实验对象, 空白组不给予任何处理; CPC 组中, 经椎弓根向椎体内注射 CPC (2.0 ml); rhBMP-2/CPC 组中, 经椎弓根向椎体内注射 rhBMP-2/CPC (2.0 ml)。于术后 1 天、6 周、12 周和 24 周四个时间点各随机处死 3 只绵羊, 对椎体行压缩实验, 分别测量各组中椎体的最大压缩应力 (σ_{ult}) 和能量吸收值 (EAV), 对比分析同一时间点不同方法之间和同一方法的不同时间点之间的力学指标。结果 去势 1 年后绵羊腰椎骨密度显著下降, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 骨质疏松绵羊模型建立成功。在术后各时间点, CPC 组和 rhBMP-2/CPC 组的 σ_{ult} 和 EAV 均显著高于空白组 ($P < 0.05$); 术后 1 天、6 周和 12 周, rhBMP-2/CPC 组和 CPC 组之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 rhBMP-2/CPC 组中 24 周的 σ_{ult} 显著高于 CPC 组 ($P < 0.05$)。空白组和 CPC 组中 σ_{ult} 各时间点之间的差异均无显著性 ($P > 0.05$), 而 rhBMP-2/CPC 组中 24 周的 σ_{ult} 显著高于该组其他三个时间点 ($P < 0.05$)。结论 rhBMP-2/CPC 不仅能提高骨质疏松椎体的即时强度, 还能很好的维持椎体的动态力学强度和进一步提高椎体的远期强度, 为脊柱达到坚强骨性融合提供了良好的力学环境。

关键词: 人重组骨形态发生蛋白-2; 磷酸钙骨水泥; 骨质疏松椎体; 最大压缩应力 (σ_{ult}); 能量吸收值 (EAV)

The experimental study of the effect of rhBMP-2/CPC on biomechanical intensity for osteoporotic vertebrae LUO Zhiqiang. Department of Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China

Corresponding author: LUO Zhiqiang, Email: luozhiq20000@163.com

Abstract: **Objective** To observe the dynamic efficacy of recombinant human bone morphogenetic protein-2/calcium phosphate cement (rhBMP-2/CPC) on the augment of biomechanical intensity of the lumbar vertebrae in ovariectomized sheep. **Methods** Twelve adult female sheep were ovariectomized and raised for 1 year after the surgery. Bone mineral densities (BMD) of the lumbar vertebrae were measured before and after the surgery. L1-L6 were the experimental objects. The sheep in control group were offered no treatment. The sheep in CPC group were injected with CPC (2.0ml) via the transpedicular of the vertebra. The sheep in rhBMP-2/CPC group were injected with rhBMP-2/CPC (2.0ml) via the transpedicular of the vertebra. Every 3 sheep were randomly killed on day 1, week 6, week 12, and week 24 after the surgery. The vertebra compression test was performed. The ultimate compressive stress (σ_{ult}) and energy absorption value (EAV) of the vertebrae in every group were measured. The biomechanical indexes were compared and analyzed among different methods at the same time and among different time points using same method. **Results** BMD of the sheep vertebrae significantly decreased at 1 year after the surgery ($P < 0.05$). The osteoporotic sheep model was established successfully. The results of σ_{ult} and EAV of the CPC group and rhBMP-2/CPC group at any time points after the surgery were significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$). The differences between the CPC group and rhBMP-2/CPC group were not statistically

作者单位: 730050 兰州, 兰州军区总医院

通讯作者: 罗志强, Email: luozhiq20000@163.com

significant on day 1, week 6, and week 12 ($P > 0.05$). However, σ_{ult} in rhBMP-2/CPC group was significantly higher than that in CPC group on week 24 ($P < 0.05$). The differences of σ_{ult} between control and CPC group on each time point were not statistically significant ($P > 0.05$). However, σ_{ult} in rhBMP-2/CPC group on week 24 was significantly higher than that on other three time points in the same group ($P < 0.05$). Conclusion rhBMP-2/CPC not only improved the immediate mechanical strength of osteoporotic vertebrae, but also maintained the dynamic mechanical strength and further enhanced the long-term mechanical strength of osteoporotic vertebrae, which could provide an ideal mechanical condition for firm bone fusion of the spine.

Key words: Recombinant human bone morphogenetic protein-2; Calcium phosphate cement; Osteoporotic vertebrae; Ultimate compressive stress; Energy absorption value

随着人口老龄化的日益加重,骨质疏松的发病率越来越高,临床上因骨质疏松导致的椎体压缩性骨折越来越多^[1]。针对这一问题,目前临床上常用的治疗方法是经皮椎体成形术(percutaneous vertebroplasty, PVP)^[2],即经椎弓根向椎体内注射聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥(polymethylmethacrylate, PMMA),该方法可以恢复椎体的高度和力学强度、稳定骨折。但PMMA聚合反应放热,容易损伤周围组织;术中容易发生渗漏、压迫脊髓和神经根;PMMA难以降解,长期存在于骨质中容易发生异物反应。

人重组骨形态发生蛋白-2复合磷酸钙骨水泥(recombinant human bone morphogenetic protein-2/calcium phosphate cement, rhBMP-2/CPC)作为一种新型的骨替代复合材料,具有良好的生物相容性和机械强度,同时比磷酸钙骨水泥(calcium phosphate cement, CPC)具有更好的成骨性能,目前它已经成为研究PVP填充材料的研究热点^[3]。本研究旨在分析rhBMP-2/CPC在体内对椎体生物力学强度的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

健康成年雌性小尾寒羊12只(兰州大学医学院动物实验室提供),年龄(4.5~6.5)岁,平均(5.0±0.8)岁;体重(52~67)kg,平均(60±7.8)kg。PMMA由天津市合成材料工业研究所生产,CPC和rhBMP-2/CPC均是上海瑞邦生物材料有限公司产品,均为医用外科手术级。MTS生物材料试验机(858 Mini Bionix II, SYSTEM INC, Minneapolis USA)和双能量X线吸收骨密度仪(Lunar Corp, Madison, WI, USA)均由兰州军区总医院全军骨科中心研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 骨质疏松模型的建立:速眠新(0.1 ml/kg, 中国人民解放军农牧大学军事兽医研究所研制)麻醉成功后,绵羊取俯卧位,测量去势前腰椎骨密度(bone mineral density, BMD)。随后将绵羊仰卧于V型槽中,经腹腔切除去势组绵羊双侧卵巢。术前半小时及术后肌注头孢唑啉钠1.0 g肌注,2次/日,共3日。术后低钙饲养1年后,再次测定其腰椎BMD,所有绵羊腰椎BMD下降>2.5倍标准差,表明骨质疏松动物模型成功建立。

1.2.2 手术方法:骨质疏松模型建立成功后,速眠新(0.1 ml/kg)麻醉成功后将绵羊俯卧于手术台上,取腰部正中切口,切开棘上韧带,剥离两侧的骶棘肌,显露椎板、横突。取每一只绵羊的6个腰椎随机分为空白组、CPC组和rhBMP-2/CPC组,保证每只绵羊体内两组数量一样,且保证相邻椎体实施不同的处理。其中空白组不予任何处理;CPC组:在人字峰顶点处咬除局部骨皮质,将大号骨穿针经人字峰顶点与棘突约成40°角方向,经椎弓根途径进入椎体约20.0 mm,探针探察确保针道良好后,将CPC(2.0 ml)注射至椎体内,待材料凝固后拔出针头;rhBMP-2/CPC组:使用同样的方法经椎弓根向椎体内注射rhBMP-2/CPC(2.0 ml)。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1.0 g肌注。

1.2.3 标本制备:于术后1天、6周、12周、24周各随机选择3只实验动物处死,完整、无损伤取出腰椎(L1-L6),切除椎体终板、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,用自制环钻钻取长度约2.5 cm、直径约1.5 cm的圆柱状松质骨标本。在双层塑料袋保鲜下,于当日行力学测试实验。

1.2.4 压缩实验:在生物材料试验机MTS 858上对其进行轴向加压实验。测量时,将圆柱形的椎体骨块置于加压模具之间,以5 mm/min^[6]的加载速度逐渐施加轴向压力,直到骨质出现压缩骨折,实验中用

生理盐水喷洒骨质表面,保持湿润。取压力-应变曲线的峰值为松质骨最大压缩应力(ultimate compressive stress, σ_{ult}),曲线下面积为压缩能量吸收值(energy absorption value, EAV)。

1.3 统计学分析

测定指标用均数 $\pm$ 标准差表示,所有数据均输入 SPSS 13.0 软件分析。去势前后绵羊腰椎 BMD 的比较采用配对 t 检验,同一时间点各组中和同组中不同时间点之间的力学指标的比较采用方差分析和 SNK-q 检验。显著差异的标准为 $P < 0.05$ 。

2 结果

除即刻处死的 3 只外,其余实验动物手术切口均甲级愈合,未见软组织感染,也无脊髓、神经根损伤等并发症,功能正常。

2.1 去势前后腰椎骨密度(BMD)

术前绵羊腰椎 BMD 为 $(1.17 \pm 0.11) \text{ g/cm}^2$,去势一年后 BMD 的值为 $(0.85 \pm 0.08) \text{ g/cm}^2$ 。术后较术前腰椎的 BMD 值降低 27.4%,差异有显著性($t = 23.600, P = 0.000$),且 BMD 的下降程度均明显大于 2.5 倍标准差,表明骨质疏松绵羊模型建立成功。

2.2 最大压缩应力(σ_{ult})

如表 1 和图 1 所示:在术后各时间点,CPC 组和 rhBMP-2/CPC 组的 σ_{ult} 均明显高于空白组,差异均有显著性($P < 0.05$);术后 1 天、6 周和 12 周, rhBMP-2/CPC 组和 CPC 组之间的差异无显著性($P > 0.05$),而 rhBMP-2/CPC 组中 24 周的 σ_{ult} 显著高于 CPC 组,差异有显著性($P < 0.05$)。空白组和 CPC 组中 σ_{ult} 各时间点之间的差异均无显著性($P > 0.05$),而 rhBMP-2/CPC 组中 24 周的 σ_{ult} 显著高于其他三个时间点,差异有显著性($P < 0.05$)。

表 1 各时间点的最大压缩应力(σ_{ult} /MPa) ($n = 6$)

分组	1 天	6 周	12 周	24 周
空白组	505.4 $\pm$ 95.3	558.8 $\pm$ 114.2	596.9 $\pm$ 108.5	644.3 $\pm$ 131.6
CPC 组	954.3 $\pm$ 132.6 *	1047.5 $\pm$ 168.4 *	1153.5 $\pm$ 182.7 *	1205.8 $\pm$ 206.4 *
BMP/CPC 组	979.8 $\pm$ 128.3 **	1134.3 $\pm$ 168.4 **	1353.5 $\pm$ 170.5 **	1805.8 $\pm$ 233.6 ** Δ

注:与同一时间点的空白组比较 * $P < 0.05$;与同一时间点的 CPC 组比较 * $P > 0.05$;与同一时间点的 CPC 组比较 * $P < 0.05$;与同组的其他时间点比较 $\Delta P < 0.05$

表 2 各时间点的压缩能量吸收值(EVA/N $\cdot$ m) ($n = 6$)

分组	1 天	6 周	12 周	24 周
空白组	0.65 $\pm$ 0.21	0.81 $\pm$ 0.18	0.94 $\pm$ 0.25	1.03 $\pm$ 0.24
CPC 组	1.64 $\pm$ 0.28 *	1.83 $\pm$ 0.26 *	1.96 $\pm$ 0.30 *	2.05 $\pm$ 0.37 *
BMP/CPC 组	1.81 $\pm$ 0.30 **	2.02 $\pm$ 0.32 **	2.38 $\pm$ 0.41 **	3.26 $\pm$ 0.65 ** Δ

注:与同一时间点的空白组比较 * $P < 0.05$;与同一时间点的 CPC 组比较 * $P > 0.05$;与同一时间点的 CPC 组比较 * $P < 0.05$;与同组的其他时间点比较 $\Delta P < 0.05$

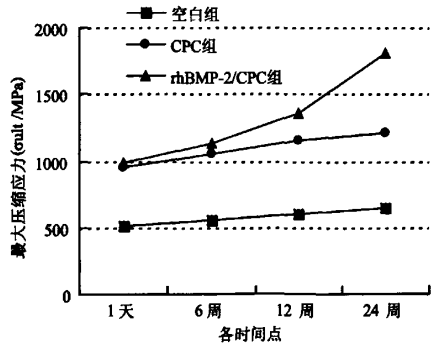


图 1 各时间点的最大压缩应力

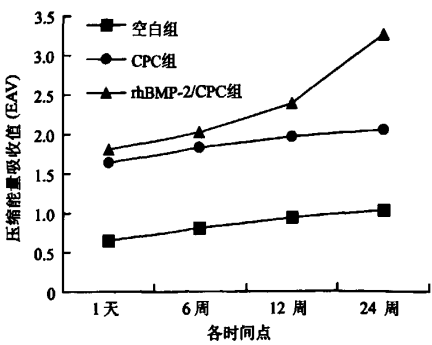


图 2 各时间点的能量吸收值

2.3 压缩能量吸收值(EVA)

如表 2 和图 2 所示:在术后各时间点,CPC 组和

rhBMP-2/CPC 组的 EAV 均明显高于空白组,差异均有显著性($P < 0.05$);术后 1 天、6 周和 12 周,

rhBMP-2/CPC 组和 CPC 组之间的差异无显著性 ($P > 0.05$), 而 rhBMP-2/CPC 组中 24 周的 EAV 显著高于 CPC 组, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。空白组和 CPC 组中 EAV 各时间点之间的差异均无显著性 ($P > 0.05$), 而 rhBMP-2/CPC 组中 24 周的 EAV 显著高于其他三个时间点, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。

3 讨论

目前, PVP 在国内外已被广泛应用于骨质疏松性椎体压缩性骨折、椎体血管瘤、椎体肿瘤以及多发性骨髓瘤等治疗, 均取得了良好的临床效果^[4,6], PMMA 以其突出的生物力学特性而成为 PVP 最常用的填充物。但是应用 PMMA 也存在一些问题: 生物相容性差, 难降解, 不能与骨生物连接, 最终不能被骨替代^[7]; 凝固时放热可损伤周围组织^[8]; 可引起术中低血压休克和肺栓塞等并发症^[9]; 远期异物反应可造成骨与骨水泥界面的溶解和吸收, 导致椎体的力学强度下降^[10]; PMMA 过高的强度使相邻节段的应力增高, 容易导致产生临近节段骨折^[11]。

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^[12], 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, 有效地促进骨折愈合。但 BMP 半衰期很短, 注入体内后很快被组织液稀释及蛋白水解酶水解失活, 不能长期有效地发挥其骨诱导作用。因此, 只有将 BMP 与某种缓释载体结合在一起, 使 BMP 在局部持续释放才能更好地发挥其促进骨愈合的能力。

CPC 作为一种新型的自固化型骨水泥具有如下特点: (1) 具有与骨相似的无机盐成分, 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) 可被注射到病变部位, 与骨小梁紧密贴合, 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, 也有利于新骨的长入。同时证实 CPC 又是 BMP 的良好载体^[13], 二者有机结合, 既加速和改善了椎体内骨质生成的速度和质量, 弥补了骨质疏松椎体矿化不足的缺陷, 又充填了损伤骨小梁的空隙^[14], 并瞬间和持久地恢复局部骨质的生物力学性能^[15]。

目前, 许多研究已经证明 rhBMP-2/CPC 强化椎体的效果^[16-17], 但是尚无动物体内观察其强化椎体

强度的动态效果。因此, 本研究通过去势法建立了骨质疏松绵羊模型, 使用 CPC 和 rhBMP-2/CPC 对绵羊腰椎进行了强化处理, 并设立具代表性的术后 1 天、4 周、12 周及 24 周四个时间点, 动态观察 rhBMP-2/CPC 在体内强化骨质疏松椎体强度的变化。结果表明: 和单独使用 CPC 的效果一样, rhBMP-2/CPC 可以在早期显著提高椎体的强度, 且随着其在体内的降解吸收, 椎体的强度保持平稳, 未见明显波动。这可能与 CPC 降解吸收的同时新骨的不断长入有关。更为重要的是 rhBMP-2/CPC 在远期 (24 周) 椎体的强度显著提高, 并且显著高于单独使用 CPC 的效果。这一结果可能与复合 rhBMP-2 有关, rhBMP-2 在体内促进局部骨质生长和骨小梁微观结构的改建, 从而进一步提高了椎体的远期力学强度, 其效果明显优于空白组和 CPC 组。

通过研究我们认为: rhBMP-2/CPC 不仅能提高骨质疏松椎体的即时强度, 还能很好的维持椎体的动态力学强度和进一步提高椎体的远期强度, 为脊柱达到坚强骨性融合提供了良好的力学环境。今后我们将对 CPC 在体内的降解吸收过程及椎体骨质微观结构的变化和组织学变化做进一步研究。

【参考文献】

- [1] Kanis JA, Johnell O, Oden A, et al. Ten year probabilities of osteoporotic fractures according to BMD and diagnostic thresholds. *Osteoporos Int*, 2001, 12(12): 989-995.
- [2] Serra L, Kermani FM, Panagiotopoulos K, et al. Vertebroplasty in the treatment of osteoporotic vertebral fractures: results and functional outcome in a series of 175 consecutive patients. *Minim Invasive Neurosurg*, 2007, 50(1): 12-17.
- [3] Li M, Liu X, Liu X, Ge B. Calcium phosphate cement with BMP-2-loaded gelatin microspheres enhances bone healing in osteoporosis: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res*, 2010, 468(7): 1978-1985.
- [4] Brunot S, Berge J, Barreau X, et al. Long term clinical follow up of vertebral hemangiomas treated by percutaneous vertebroplasty. *J Radiol*, 2005, 86(1): 41-47.
- [5] Tseng YY, Lo YL, Chen LH, et al. Percutaneous polymethylmethacrylate vertebroplasty in the treatment of pain induced by metastatic spine tumor. *Surg Neurol*, 2008, 70 Suppl 1:S1:78-83; discussion S1:83-84.
- [6] Masala S, Anselmetti GC, Marcia S, et al. Percutaneous vertebroplasty in multiple myeloma vertebral involvement. *J Spinal Disord Tech*, 2008, 21(5): 344-348.
- [7] Togawa D, Bauer TW, Lieberman IH, et al. Histologic evaluation of human vertebral bodies after vertebral augmentation with polymethylmethacrylate. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2003, 28(14): 1521-1527.

- [8] Belkoff SM, Molloy S. Temperature measurement during polymerization of polymethylmethacrylate cement used for vertebroplasty. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2003, 28(14): 1555-1559.
- [9] Krebs J, Aebli N, Goss BC, et al. Cardiovascular changes after pulmonary cement embolism: an experimental study in sheep. *Am J Neuroradiol*, 2007, 28(6): 1046-1050.
- [10] McAfee PC, Bohlman HH, Ducker T, et al. Failure of stabilization of the spine with methylmethacrylate: A retrospective analysis of twenty-four cases. *J Bone Joint Surg*, 1986; 68(8): 1145-1157.
- [11] Boger A, Heini P, Windolf M, et al. Adjacent vertebral failure after vertebroplasty: a biomechanical study of low-modulus PMMA cement. *Eur Spine J*, 2007, 16(12): 2118-2125.
- [12] Thies RS, Banduy M, Ashton BA, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein22 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology*, 1992, 130(3): 1318-1324.
- [13] Ginebra MP, Albuixech L, Fernandez-Barragan E, et al. Mechanical performance of acrylic bone cements containing different radiopacifying agents. *Biomaterials*, 2002, 23(8): 1873-1882.
- [14] Sun M, Hu Y, Lu R, et al. Preparation and osteogenic activity of combining calcium phosphate cement with bone morphogenetic protein composite as a bone graft material [Article in Chinese]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 2002, 40(12): 932-935.
- [15] 闫楷忠, 王宸, 沈伟中. 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. *中国骨质疏松杂志*, 2006, 12(6): 550-553.
- [16] 周英杰, 赵刚, 刘宏建, 等. 复合 BMP 的磷酸钙骨水泥应用于椎体成形术治疗骨质疏松性胸腰椎压缩骨折 15 例. *郑州大学学报(医学版)*, 2009, 44(5): 1101-1103.
- [17] 刘宏建, 杜靖远, 王义生, 等. 3 种充填材料应用于绝经后骨质疏松症山羊经皮椎体成形术后椎体的超微结构观察. *郑州大学学报(医学版)*, 2007, 42(1): 97-100.

(收稿日期: 2011-02-09)

(上接第 588 页)

研究, 可较为明显提高骨量改善患者骨质疏松程度, 降低骨折风险, 能有效提高绝经后骨质疏松症患者生活质量,^[8]甚至可降低死亡率。

【参 考 文 献】

- [1] Nguyen ND, Eisman JA, Nguyen TV. Anti-hip fracture efficacy of bisphosphonates: a Bayesian analysis of clinical trials. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(2): 340-349.
- [2] 刘忠厚. 骨质疏松学. 北京: 北京科学出版社, 1998: 142-162; 238-244.
- [3] Felsenberg D, Miller P, Armbricht G, et al. Oral ibandronate significantly reduces the risk of vertebral fractures of greater severity after 1, 2, and 3 years in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone*, 2005, 37(5): 651-654.
- [4] Bauer DC, Gamero P, Hochberg MC, et al. Pretreatment levels of

bone turnover and the antifracture efficacy of alendronate: the fracture intervention trial. *Bone Miner Res*, 2006, 21(2): 292-299.

- [5] Adachi JD, Rizzoli R, Boonen S, et al. Vertebral fracture risk reduction with risedronate in post-menopausal women with osteoporosis: a reanalysis of individual patient data. *Aging Clin Exp Res*, 2005, 17(2): 150-156.
- [6] Frieder B, Graham R, Russell G. Ibandronate in osteoporosis: preclinical data and rationale for intermittent dosing. *Osteoporos Int*, 2004, 15: 423-433.
- [7] Reid DM. Once-monthly dosing: an effective step forward. *Bone*, 2006, 38(4 Suppl 1): 18-22.
- [8] Lyles KW, Colón-Emeric CS, Magaziner JS, et al. Zoledronic acid and clinical fractures and mortality after hip fracture. *N Engl J Med*, 2007. [e-publication 10.1056/NEJMoA074941 at www.nejm.org]

(收稿日期: 2010-09-06)

rhBMP-2/CPC强化骨质疏松椎体力学强度的实验研究

作者: [罗志强, LUO Zhiqiang](#)
作者单位: [兰州军区总医院, 兰州, 730050](#)
刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)
年, 卷(期): 2011, 17(7)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201107012.aspx