

自体骨膜包裹肌腱复合松质骨匀浆及重组人骨形态发生蛋白2 体内成骨重建月骨*★

孟 钊¹, 胡成栋², 邵新中²

Reconstruction of lunar bone using autologous periosteum-wrapped tendon, spongiosa homogenate and recombinant human bone morphogenetic protein-2

Meng Zhao¹, Hu Cheng-dong², Shao Xin-zhong²

Abstract

BACKGROUND: Selection of optimal substitute to fill the gaps following lunar bone enucleation plays a key role in maintaining biomechanical properties and good wrist joint function.

OBJECTIVE: To study bone-forming mechanism of transplantation autologous periosteum-wrapped tendon, spongiosa homogenate and recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in joint cavity, and to explore the possibility of the compound as a substitute for the lunar bone.

METHODS: Forty-five New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups: periosteum group, rhBMP-2 group and control group. The three sorts of implants were placed into articular cavity of the knee respectively. The changes of bone formation and rhBMP-2 distribution of the implants were examined under optical microscope with hematoxylin-eosin staining and immunohistochemical staining and measured by CT at 3, 6 and 9 weeks after operation.

RESULTS AND CONCLUSION: The result of rhBMP-2 staining was negative after 3 weeks and positive in new cartilage cells after 9 weeks in periosteum group. The strong positive rhBMP-2 staining was observed in the composite group at 9 weeks, which mainly distributed in new bone cells and cartilage cells. And negative rhBMP-2 staining was observed every stage in control group. The quantitative CT bone mineral density values of 3 implants were analyzed, the difference was significant between the groups ($P < 0.01$), except that between periosteum group and control group at 3 weeks ($P > 0.05$). The above results demonstrated that the compound of autologous periosteum-wrapped tendon and spongiosa homogenate can produce bone and cartilage massively under the induction of periosteum and bone forming factors, such as rhBMP-2 in spongiosa homogenate and the compound can be considered as a preferred substitute to reconstruct lunare bone.

Meng Z, Hu CD, Shao XZ. Reconstruction of lunar bone using autologous periosteum-wrapped tendon, spongiosa homogenate and recombinant human bone morphogenetic protein-2. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(41):7613-7616. [<http://www.crter.cn> <http://en.zglckf.com>]

摘要

背景: 月骨摘除术后选择合适的月骨替代物填充遗留的空隙, 是维护腕关节生物力学特性和良好功能的关键。

目的: 探讨自体骨膜包裹肌腱复合重组人骨形态发生蛋白 2(recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2) 与松质骨匀浆植入自体关节腔后的成骨和骨化机制, 以及作为月骨替代物重建月骨的可行性。

方法: 按随机数字法将 45 只新西兰白兔分成 3 组: 骨膜包裹肌腱组、rhBMP-2 组、单纯肌腱球对照组。分别以骨膜包裹肌腱团, 1 mg rhBMP-2 与游离肌腱、肌腱团块置入兔腕上囊。置入后 3, 6 和 9 周取材, 测量定量 CT 骨密度值, 组织切片采用苏木精-伊红染色和免疫组织化学 ABC 法, 在光镜下观察 rhBMP-2 分布。

结果与结论: 移植骨植入后, 早期骨膜包裹肌腱组 rhBMP-2 染色阴性, 9 周时阳性, 之后呈阴性, 表明其骨化形成主要是在骨膜成软骨作用基础上的成骨过程, 而无 rhBMP-2 的作用; rhBMP 组显示 rhBMP-2 分布及骨化明显强于骨膜包裹肌腱组, 且随时间延长逐渐加强, 9 周时呈强阳性, 主要分布于新生骨细胞簇和新生软骨细胞簇及周围, 之后随骨细胞成熟量增多而逐渐减弱。单纯肌腱球对照组玻璃样变, 最终呈胶原状 rhBMP-2 染色始终阴性。各组各时间点定量 CT 骨密度值经统计学分析, 除 3 周时骨膜包裹肌腱组、单纯肌腱对照组间无显著性差异($P > 0.05$), 其余各组间差异均有显著性意义($P < 0.01$)。自体骨膜包裹肌腱复合 rhBMP-2 及松质骨匀浆植入在骨 rhBMP-2 及松质骨匀浆中 rhBMP-2 的诱导作用下可形成大量骨和软骨, 有较强支撑作用, 为其用作月骨替代物提供实验依据。

关键词: 月骨; 骨膜; 重组人骨形态发生蛋白 2; 松质骨匀浆; 修复重建

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.41.004

孟钊, 胡成栋, 邵新中. 自体骨膜包裹肌腱复合松质骨匀浆及重组人骨形态发生蛋白 2 体内成骨重建月骨[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(41):7613-7616. [<http://www.crter.org> <http://cn.zglckf.com>]

0 引言

月骨无菌性坏死(Kienbock's 病)是临床工作中遇到常见的、致残率较高和较难治疗的疾病, 其治疗方法多种多样, 极不统一。外科治疗月骨无菌性坏死的方法之一是月骨切除术后

的修复重建, 以减少腕关节的退变和病废^[1-2]。采用人工月骨假体置换、掌长肌腱和豆状骨移位等作为月骨替代物, 费用较高、创伤大, 易出现并发症, 疗效不确切^[3-7]。为探寻具有良好组织生物相容性和支撑强度的月骨替代物, 实验采用与以往不同的月骨替代物, 将自体骨膜的成骨、软骨、松质骨、重组人骨形态发生蛋

¹Department of Orthopaedics, Hebei Children's Hospital, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China;
²Department of Hand Surgery, Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

Meng Zhao★, Master, Master's supervisor, Chief physician, Professor, Department of Orthopaedics, Hebei Children's Hospital, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China
mz285@163.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Hebei Province, No. 301384B*

Received: 2010-04-13
Accepted: 2010-05-24

¹河北省儿童医院骨外科, 河北省石家庄市 050031; ²河北医科大学第三医院手外科, 河北省石家庄市 050051

孟钊★, 男, 1962年生, 辽宁省大连市人, 汉族, 1984年河北医学院毕业, 硕士, 硕士生导师, 主任医师, 教授, 主要从事小儿骨科和骨组织缺损的修复与再生研究。
mz285@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)41-07613-04

收稿日期: 2010-04-13
修回日期: 2010-05-24
(20100305010/YJ·Z)

白2(recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2)的骨诱导作用以及肌腱的韧性和被诱导成骨的载体作用结合起来, 对自体骨膜包裹肌腱复合rhBMP-2-松质骨匀浆体内成骨进行研究, 同时探讨其骨化机制和以此作为月骨替代物的可行性, 以选出组织生物学及生物力学特性最为符合月骨结构特点的植入物替代月骨治疗Kienbock's病, 为临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2007-02/2009-10在河北省儿童医院完成。

材料:

实验动物: 健康四五月龄新西兰白兔45只, 雌雄不拘, 清洁级, 体质量2.5~3.0 kg, 由河北医科大学实验动物中心提供。动物于温度20~25 °C, 湿度40%~70%环境中饲养。

实验过程符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[8]。

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
rhBMP-2 小鼠抗兔单克隆抗体	北京军事医学科学院 解放军第四军医大学 口腔医院病理科
SP 试剂盒, DAB 显色系统 日本岛津 4800 型 CT 机	美国 SANTA Cruz 公司 日本岛津公司

方法:

分组与建模: 按随机数字法将45只新西兰白兔分成3组: 骨膜包裹肌腱组、rhBMP-2组和单纯肌腱球对照组, 各15只。建立模拟月骨替代物模型^[9]: 在1%利多卡因局部麻醉下, 取膝关节内侧切口显露膝关节囊和胫骨近端, 切取部分股四头肌腱、胫骨骨膜(1.7 cm×2.1 cm)。用微型骨凿于胫骨近端开窗挖取松质骨, 置于无菌玻璃器皿中用圆头玻璃棒磨成松质骨匀浆状备用。骨膜包裹肌腱组用骨膜包裹股四头肌腱, 以7-0无创尼龙线缝合成球形。rhBMP-2组用骨膜包裹游离肌腱与松质骨匀浆和1 mg rhBMP-2, 以7-0无创尼龙线缝合成球形。单纯肌腱球对照组只在膝关节腔内置入单纯游离肌腱团块。各组的球形植入物均直径约6 mm, 分别置入各实验组兔膝关节腔髌上囊。兔实验侧

肢体可自由活动。

定量CT骨密度值测定: 在植入物组织形态学检查之前, 采用CT机对所有标本进行定量CT骨密度值测定^[7]: 将每组植入物标本按照术后3, 6和9周的时间顺序标号排列, 置于特制的检测盘中。CT机的扫描层厚度定为1 mm, 扫描后的数据进行统计学处理。

光镜观察: 替代物植入髌上囊后3, 6和9周, 各组分别随机处死5只动物, 取兔双膝关节内10个植入物标本(n=10)。切取标本厚5 mm。40 g/L多聚甲醛固定24 h, EDTA液脱钙三四周。石蜡包埋, 切片厚度5~7 μm。常规脱蜡, 梯度乙醇脱水, 流水冲洗后入Carazzis氏苏木精染液约11 min, 常规盐酸分色和流水蓝化, 0.5%伊红液复染1 min, 脱水、分色和透明。免疫组织化学染色采用ABC法^[9], 将石蜡切片于37~50 °C烤箱烘片, 二甲苯脱蜡和水化, Tris液洗3次, 胰蛋白酶消化后, Tris液3次, 滴加小鼠抗兔BMP单克隆抗体, Tris液洗3次后滴加第二抗体, 重复Tris液3次, 滴加DAB显色液, 最后盐酸乙醇分化, 自来水反蓝、脱水、透明和封固。

主要观察指标: 光镜下观察植入物骨化情况、rhBMP-2的分布及与骨化程度的关系。采用CT机对各标本进行定量CT骨密度值测定。

设计、实施、评估者: 研究设计、实施干预和评估均为全体作者。

统计学分析: 采用SPSS 11.0版统计软件包(美国SPSS公司)对CT骨密度值(Hu)进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 两两比较采用q检验, P < 0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验兔45只全部造模成功, 均进入最终结果分析, 没有脱落发生。

2.2 病理学观察

骨膜包裹肌腱组: 术后3周, 骨膜增厚, rhBMP-2染色呈阴性; 6周可见间充质细胞增生, 染色呈浅棕色弱阳性, 主要分布于新生软骨细胞, 周围成熟软骨细胞染色阴性, 见图1a, b。

rhBMP-2组: 术后3周有少量软骨化骨和骨小梁出现, rhBMP-2染色阳性; 6周染色加深, 主要分布于新生骨细胞和软骨细胞间, 周围少量成熟骨细胞和软骨细胞呈阴性; 9周呈强阳性, 后渐减弱, 见图1c, d。

单纯肌腱球对照组: 术后3~9周单纯肌腱球玻璃样变, 胶原纤维逐渐增粗, 最终呈胶原状; rhBMP-2染色始终呈阴性, 见图1e, f.

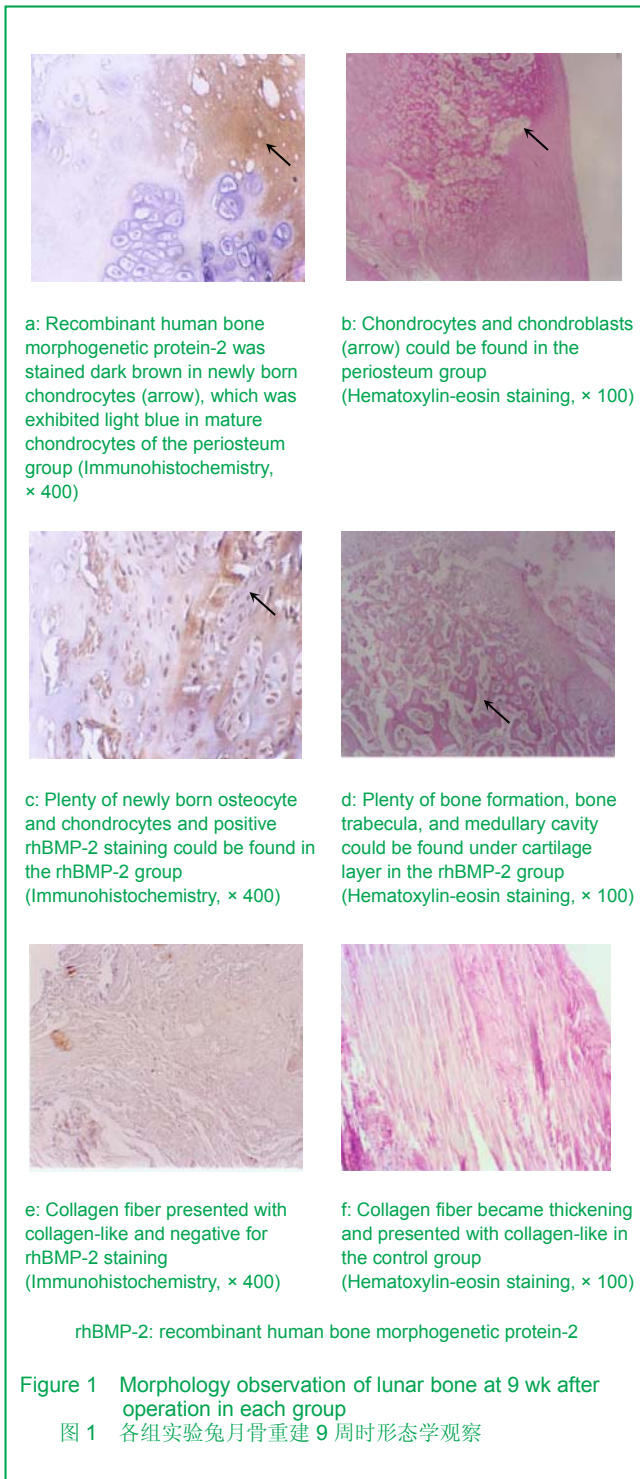


表1 术后各时间点各组定量CT骨密度值
Table 1 CT bone mineral density values of each group at different time points ($\bar{x} \pm s$, $n=10$, Hu)

Group	Time after operation		
	3 wk	6 wk	9 wk
Periosteum	145.16 \pm 6.42 ^a	432.11 \pm 5.95 ^{ab}	489.21 \pm 5.14 ^{ab}
rhBMP-2	319.31 \pm 5.72 ^b	648.58 \pm 4.23 ^b	701.67 \pm 4.91 ^b
Control	130.40 \pm 4.19 ^a	131.00 \pm 4.06 ^a	130.28 \pm 4.26 ^a

rhBMP-2: recombinant human bone morphogenetic protein-2; ^a $P < 0.01$, vs. rhBMP-2 group; ^b $P < 0.01$, vs. control group

3 讨论

有关外源性rhBMP-2对骨缺损修复与重建一直是相关学者的研究热点。已有的研究表明rhBMP-2是骨形成的启动因子, 能诱导未分化的间充质细胞不可逆地分化成软骨和骨, 并促进软骨和骨组织特异性标志物的形成。rhBMP-2是目前发现的唯一具有明确诱导未分化间充质细胞向成骨细胞方向转化、并能异位成骨的细胞因子, 作用无种属特异性^[9-11], 来源于骨及骨源细胞, 靶细胞为血管周围具有潜在分化能力的间充质细胞、骨髓基质干细胞和骨膜细胞, 能诱导机体内的间充质细胞定向分化为不同功能特点的骨细胞, 再通过软骨化骨和膜内化骨方式形成新骨^[12-18]。骨膜具有成骨和生成软骨的能力, 其不同分化衍变主要取决于局部血供及应力^[19-24]。肌腱既是良好的骨诱导结缔组织, 又是骨形态发生蛋白等细胞因子的生物性载体。

用骨膜包裹股四头肌腱移植兔在移植后3周, 骨膜增厚, 6周可见间充质细胞增生, 9周骨形态发生蛋白表达, 而用骨膜包裹游离肌腱与松质骨匀浆和rhBMP-2移植兔在3周时即表达, 出现少量软骨化骨和骨小梁, 9周时已有大量骨和软骨形成, 这时植入物已具有良好的几何形状和正常骨硬度, 表层光滑呈乳白色, 类似正常的关节软骨。而只置入单纯游离肌腱团块实验兔始终未出现rhBMP-2的表达, 单纯肌腱球玻璃样变, 胶原纤维逐渐增粗, 最终呈片状胶原, 无支撑作用。这一过程与rhBMP-2诱导成骨的时相变化一致, 提示松质骨匀浆中含有rhBMP-2, 并能在复合体中存活、增殖, 参与早、中期骨化, 而骨膜和松质骨中其他骨诱导成分如骨膜细胞、骨髓基质细胞及转化生长因子等协同作用促进后期的骨形成^[25-26]。CT扫描测定骨密度结果与组织学、免疫组织化学染色观察结果相符。

以上实验结果表明: rhBMP-2在骨膜包绕肌腱-松质骨匀浆的骨化过程中能与有生物学支架作用的肌腱团块相复合, 达到骨传导和骨诱导双重作用。联合骨膜成软骨和成骨的双重成骨作用, 明显提高骨化质量, 使其成为治疗月骨无菌性坏死月骨替代物。目前已在临床

2.3 各组定量CT骨密度值测定 骨膜包裹肌腱组和rhBMP-2组兔定量CT骨密度值手术后随时间延长而逐渐增加, 差异有非常显著性意义($P < 0.01$), 且骨膜包裹肌腱组增加更为显著, 差异有非常显著性意义($P < 0.01$), 而单纯肌腱球对照组无明显变化 ($P > 0.05$)。见表1。

初步应用, 其远期疗效尚待观察。

4 参考文献

[1] Li GX, Ji GH, Ji YD, et al. Zhongguo Xiufu Chongjian Waikē Zazhi. 2002;16(2):143.
李光宪, 纪桂花, 季永东, 等. 带蒂豌豆骨移位修复月骨缺血性坏死[J]. 中国修复重建外科杂志, 2002,16(2):143.

[2] Lu LJ, Wang YF. Zhongguo Xiufu Chongjian Waikē Zazhi. 1992;6(1):4-5.
路来金, 王玉发. 带蒂头状骨替代月骨[J]. 中国修复重建外科杂志, 1992,6(1):4-5.

[3] Lu LJ. Zhonghua Shouwaikē Zazhi. 1999;15(3):129-131.
路来金. 重视和提高腕月骨无菌性坏死整体诊治水平[J]. 中华手外科杂志, 1999,15(3):129-131.

[4] Li CM, Wang GZ, Wang YZ, et al. Zhongguo Gu yu Guanjie Sunshang Zazhi. 2008;23(2):129-130.
李春梅, 王桂芝, 王禹增, 等. 自体骨肌腱膜团填塞治疗月骨缺血性坏死[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2008,23(2):129-130.

[5] Chen XR, Zhou P, Sun WD, et al. Gu yu Guanjie Sunshang Zazhi. 2003;18(5):301-302.
陈雪荣, 周平, 孙文东, 等. 头状骨移植治疗月骨无菌性坏死[J]. 骨与关节损伤杂志, 2003,18(5):301-302.

[6] Shao XZ, Zhou JL, Meng Z, et al. Hebei Yiyao. 2003;25(2):101-102.
邵新中, 周君林, 孟钊, 等. 自体骨膜包裹肌腱-松质骨匀浆复合体作为月骨替代物的临床应用[J]. 河北医药, 2003,25(2):101-102.

[7] Liu JX, Zhang G, Sun J, et al. Zhongguo Yiliao Qixie Zazhi. 2001;25(3):130-131, 148.
刘景鑫, 张光, 孙晶, 等. 定量CT骨矿密度测量系统的研制[J]. 中国医疗器械杂志, 2001,25(3):130-131, 148.

[8] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions (Instructions) for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.

[9] Pan ZJ, Zhao YZ. Zhejiang Yixue. 2008;30(10):1150-1152.
潘志军, 赵云珍. 腕月骨无菌性坏死诊治研究进展[J]. 浙江医学, 2008,30(10):1150-1152.

[10] Alden TD, Pittman DD, Beres EJ, et al. Percutaneous spinal fusion using bone morphogenetic protein-2 gene therapy. J Neurosurg. 1999;90(1 Suppl):109-114.

[11] Bai MH, Liu XY, GE BF, et al. An implant of a composite of bovine bone morphogenetic protein and plaster of paris for treatment of femoral shaft nonunions. Int Surg. 1996;81(4):390-392.

[12] Hu YY. Zhonghua Waikē Zazhi. 1996;34(10):579-581.
胡蕴玉. 骨诱导及BMP的研究现状与展望[J]. 中华外科杂志, 1996,34(10):579-581.

[13] Bessho K, Carnes DL, Cavin R, et al. BMP stimulation of bone response adjacent to titanium implants in vivo. Clin Oral Implants Res. 1999;10(3):212-218.

[14] Boden SD, Moskovitz PA, Morone MA, et al. Video-assisted lateral intertransverse process arthrodesis. Validation of a new minimally invasive lumbar spinal fusion technique in the rabbit and nonhuman primate (rhesus) models. Spine (Phila Pa 1976). 1996;21(22):2689-2697.

[15] Boden SD, Martin GJ Jr, Morone MA, et al. Posterolateral lumbar intertransverse process spine arthrodesis with recombinant human bone morphogenetic protein 2/hydroxyapatite-tricalcium phosphate after laminectomy in the nonhuman primate. Spine (Phila Pa 1976). 1999;24(12):1179-1185.

[16] Bostrom MP, Camacho NP. Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. Clin Orthop Relat Res. 1998;(355 Suppl):S274-282.

[17] Bostrom M, Lane JM, Tomin E, et al. Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. Clin Orthop Relat Res. 1996;(327):272-282.

[18] Clement JH, Fettes P, Knöchel S, et al. Bone morphogenetic protein 2 in the early development of Xenopus laevis. Mech Dev. 1995;52(2-3):357-370.

[19] Qian JQ, Liao LY, Sun CJ. Zhonghua Guke Zazhi. 1997;17(11):

721-723.
钱金黔, 廖龙元, 孙材江. 骨形态发生蛋白及其免疫学研究[J]. 中华骨科杂志, 1997,17(11):721-723.

[20] Cook SD, Rueger DC. Osteogenic protein-1: biology and applications. Clin Orthop Relat Res. 1996;(324):29-38.

[21] Cook SD, Wolfe MW, Salkeld SL, et al. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. J Bone Joint Surg Am. 1995;77(5):734-750.

[22] Cook SD, Salkeld SL, Brinker MR, et al. Use of an osteoinductive biomaterial (rhOP-1) in healing large segmental bone defects. J Orthop Trauma. 1998;12(6):407-412.

[23] Cunningham BW, Kanayama M, Parker LM, et al. Osteogenic protein versus autologous interbody arthrodesis in the sheep thoracic spine. A comparative endoscopic study using the Bagby and Kuslich interbody fusion device. Spine (Phila Pa 1976). 1999;24(6):509-518.

[24] Gao T, Lindholm TS, Marttinen A, et al. Composites of bone morphogenetic protein (BMP) and type IV collagen, coral-derived coral hydroxyapatite, and tricalcium phosphate ceramics. Int Orthop. 1996;20(5):321-325.

[25] Zhu JM, Jin ZD. Zhonghua Waikē Zazhi. 1993;31(8):504-507.
朱建民, 金宗达. 细胞因子在骨形成和骨吸收中的作用[J]. 中华外科杂志, 1993,31(8):504-507.

[26] Zhang T, Wu QQ, Zhang XY, et al. Zhonghua Guke Zazhi. 1995;15(9):620-623.
张韬, 吴启秋, 张晓艳, 等. 游离骨膜移植修复关节软骨缺损的多因素实验研究[J]. 中华骨科杂志, 1995,15(9):620-623.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 河北省自然科学基金 (301384B), 课题名称: 外源性 BMP 对骨缺损/修复影响的研究。

致谢: 衷心感谢本实验研究中河北医科大学图书馆提供了方便的资料查询, 实验动物中心在实验动物保障方面作出的贡献, 河北医科大学第三医院骨科研究所刘瑞莹老师在组织切片制作方面给予的帮助。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的意义: rhBMP-2 在骨膜包绕肌腱-松质骨匀浆的骨化过程中能与有生物学支架作用的肌腱团块相复合, 达到骨传导和骨诱导双重作用, 明显提高骨化质量, 使其成为治疗月骨无菌性坏死月骨替代物。

课题评估的“金标准”: 定量 CT 方法, 对骨丢失和治疗反应十分敏感, 是目前测量骨密度的常用方法。

设计或课题的偏倚与不足: 本实验主要针对月骨替代物研究及其可行性, 而非直接替代动物的月骨, 即模拟了在类似腕关节月骨的环境下对自体骨膜包裹肌腱复合 rhBMP-2 松质骨匀浆体内成骨的实验研究。

提供临床借鉴的价值: 本实验方法推广应用将使月骨缺血性坏死患者得到根治, 恢复其劳动力, 具有巨大的经济效益和深远的社会意义。