

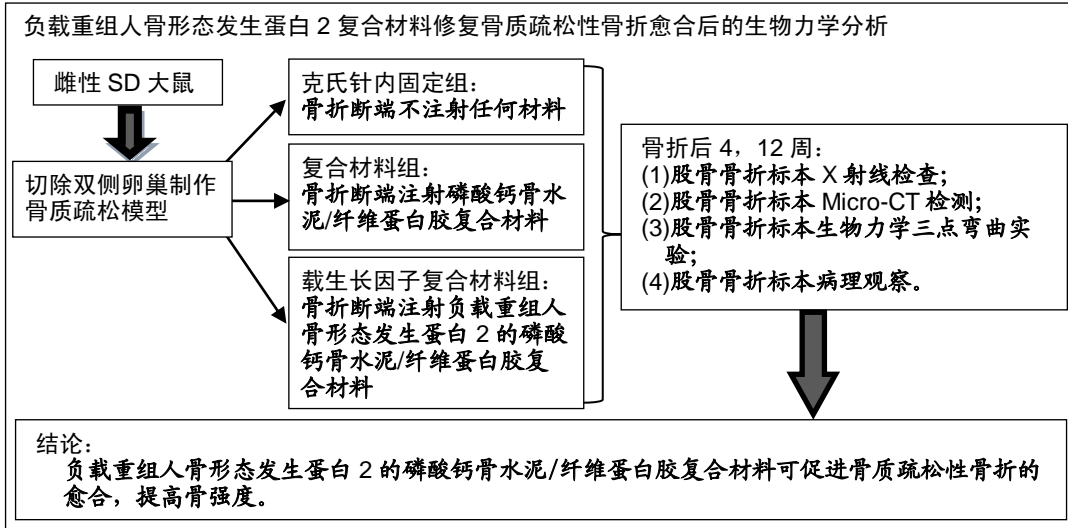
负载重组人骨形态发生蛋白2磷酸钙骨水泥与纤维蛋白胶复合材料促进骨质疏松性骨折的愈合

李浩亮¹, 王西彬², 左瑞庭³ (河南省中医院, ¹骨伤科, ²脊柱科, ³风湿骨病科, 河南省郑州市 450000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1665

ORCID: 0000-0003-3150-1855(李浩亮)

文章快速阅读:



李浩亮, 男, 1984 年生, 河南省驻马店市人, 汉族, 硕士, 主治医师, 主要从事骨科疾病相关方面研究。

文献标识码:A
稿件接受: 2018-12-26



文题释义:

磷酸钙骨水泥: 是一种塑形准确、生物相容性好、易降解吸收的骨修复材料, 可被注射到骨折部位, 具有传导性成骨作用, 可与骨形成较紧密的连接, 且固化后可形成大量的微孔结构, 可作为药物缓释载体。已有研究证实, 磷酸钙骨水泥可作为骨形态发生蛋白的载体, 缓慢释放骨形态发生蛋白, 促进新骨生长。

纤维蛋白胶: 是一种具有良好黏结作用和可注射性的低抗原生物大分子材料, 易于降解, 可塑性良好, 可促进组织再生, 已被证实可负载多种生长因子发挥缓释作用。有研究将纤维蛋白胶引入磷酸钙骨水泥中, 发现其克服了磷酸钙骨水泥脆性较大的不足, 同时又保留了磷酸钙骨水泥良好的骨传导作用。

摘要

背景: 骨形态发生蛋白 2 是目前研究最广泛与诱导成骨活性最强的骨形态发生蛋白之一, 但是单纯骨形态发生蛋白植入后会被组织液稀释及蛋白酶分解, 不能保持持久的药物浓度, 难以发挥有效的骨诱导作用。

目的: 实验以磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶复合材料作为骨形态发生蛋白 2 的载体, 观察其对骨质疏松性骨折的修复效果。

方法: 取 54 只雌性 SD 大鼠, 切除双侧卵巢制作骨质疏松模型, 3 个月后制作股骨中段骨折模型, 随机分成 3 组, 每组 18 只, 克氏针内固定组骨折断端不注射任何材料; 复合材料组骨折断端注射 0.5 mL 磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶复合材料, 载生长因子复合材料组骨折断端注射 0.5 mL 负载重组人骨形态发生蛋白 2 的磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶复合材料。骨折后 4, 12 周, 进行股骨骨折标本 X 射线检查、Micro-CT 检测、生物力学三点弯曲实验及病理观察。

结果与结论: ①载生长因子复合材料组骨折愈合评分高于克氏针内固定组、复合材料组($P < 0.05$); ②载生长因子复合材料组骨折后 4, 12 周的骨体积分数、骨小梁厚度及骨小梁数量均高于克氏针内固定组、复合材料组($P < 0.05$), 骨小梁分离度均低于克氏针内固定组、复合材料组($P < 0.05$); ③载生长因子复合材料组骨折后 4, 12 周的最大载荷、刚度均高于克氏针内固定组、复合材料组($P < 0.05$), 骨折后 4 周的弹性模量高于克氏针内固定组、复合材料组($P < 0.05$); ④克氏针内固定组骨折后 4 周主要可见纤维软骨骨痂, 骨折后 12 周骨痂重塑为板状骨, 硬骨痂含量较少; 复合材料组、载生长因子复合材料组骨折后 4 周可见明显的纤维性骨痂与软骨性骨痂, 载生长因子复合材料组硬骨痂含量较复合材料组多, 骨折后 12 周硬骨痂重塑为板状骨; ⑤结果说明, 负载重组人骨形态发生蛋白 2 的磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶复合材料, 可促进骨质疏松性骨折的愈合, 提高骨强度。

关键词:

骨质疏松性骨折; 磷酸钙骨水泥; 纤维蛋白胶; 复合材料; 重组人骨形态发生蛋白 2; 骨折愈合; 生物力学

主题词:

骨质疏松性骨折; 骨折愈合; 磷酸钙类; 骨形态发生蛋白质类; 生物力学; 组织工程

中图分类号: R459.9; R318.08

Li Haoliang, Master, Attending physician, Department of Orthopedics & Traumatology, Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Calcium phosphate cement/fibrin glue composite loaded with recombinant human bone morphogenetic protein 2 promotes osteoporotic fracture healing

Li Haoliang¹, Wang Xibin², Zuo Ruiting³ (¹Department of Orthopedics & Traumatology, ²Department of Spine, ³Department of Rheumatology, Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, Henan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Bone morphogenetic protein 2 is a most widely studied and osteogenic-inducing bone morphogenetic protein. However, simple bone morphogenetic protein can be diluted by tissue fluid and decomposed by protease after implantation, so it is difficult to maintain sustained drug concentration or play an effective role in bone induction.

OBJECTIVE: To observe the effect of repairing osteoporotic fracture through calcium phosphate cement/fibrin glue composite as the carrier of bone morphogenetic protein 2.

METHODS: Fifty-four female Sprague-Dawley rats were selected to remove bilateral ovaries for making osteoporosis models. Three months later, the middle femoral fracture models were made, and then randomized into three groups, with 18 rats in each group. Kirschner wire fixation group was injected nothing. The fracture end was injected with 0.5 mL calcium phosphate cement/fibrin glue (composite group) or calcium phosphate cement/fibrin glue loaded with recombinant human bone morphogenetic protein 2 (loaded group). At 4 and 12 weeks after fracture, X-ray examination, micro-CT examination, biomechanical three-point bending test and pathological observation were performed.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The fracture healing score in the loaded group was higher than that in the other two groups ($P < 0.05$). (2) The bone volume fraction, trabecular thickness and number of trabeculae at 4 and 12 weeks in the loaded group were higher than those in the other two groups ($P < 0.05$), and the trabecular segregation was lower than that in the other two groups ($P < 0.05$). (3) The maximum load and stiffness at 4 and 12 weeks in the loaded group were higher than those in the other two groups ($P < 0.05$), and the elastic modulus at 4 weeks after fracture was higher than that in the other two groups ($P < 0.05$). (4) Fibrocartilage callus was mainly seen at 4 weeks after fracture in the Kirschner wire fixation group, and the callus was reconstructed into lamellar bone at 12 weeks after fracture with less callus content. Obvious fibrocartilage callus appeared at 4 weeks after fracture in the composite and loaded groups, and the callus was reconstituted into a plate-like bone at 12 weeks. (5) These results imply that the calcium phosphate cement/fibrin glue composite loaded with recombinant human bone morphogenetic protein 2 can promote the healing of osteoporotic fracture and improve bone strength.

Subject headings: Osteoporotic Fractures; Fracture Healing; Calcium Phosphates; Bone Morphogenetic Proteins; Biomechanics; Tissue Engineering

0 引言 Introduction

骨质疏松是一种以骨量减少、骨微观结构发生变化、骨强度降低为特征的全身性骨骼疾病,其发病机制尚不明确^[1]。2010年中国流行病学调查显示,70岁以上男性骨质疏松患病率为14.2%–18.9%,女性为40.0%–59.3%^[2-3]。骨质疏松患者骨量减少后,骨强度降低、脆性增加,易发生骨折,其为骨质疏松最常见的严重并发症。国外报道显示,骨质疏松性骨折患者平均每年增加150万,其危害程度已超过糖尿病、脑卒中等疾病,致残率及致死率也较高^[4]。因此加强对骨质疏松性骨折的重视具有重要的社会意义。

研究已证实,骨形态发生蛋白是具有诱导成骨作用的生物活性因子,是骨组织形成过程中最关键的调节因子,可明显增加骨形成量,提高骨折愈合强度和速度^[5-8]。但是,单纯骨形态发生蛋白植入后会被组织液稀释及蛋白酶分解,不能保持持久的药物浓度,其在体内外促进成骨作用的发挥依赖于与适宜的载体系统结合^[9]。在载体方面,磷酸钙骨水泥和纤维蛋白胶构建的复合支架材料具有良好的力学性能,纤维蛋白胶的引入加速了磷酸钙在体内的降解代谢,增强了磷酸钙骨水泥的抗压强度^[10]。国内外采用磷酸钙骨水泥与纤维蛋白胶作为载体用于骨缺损或骨折已有较多的研究^[11-14],将骨形态发生蛋白2负载于磷酸钙骨水泥或纤维蛋白胶材料也有相关报道,但将骨形态发生蛋白负载于磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶复合材料的研究不多。因此,实验以磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶复合材料作为骨形态发生蛋白2的载体,观察其对骨质疏松性骨折的修复效果。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 对照观察,动物体内观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年1至12月在河南省中医院完成。

1.3 材料 InAlyzer小动物双能X射线骨密度仪(深圳柏安诺科技有限公司);磷酸钙骨水泥(上海瑞邦生物材料有限公司);纤维蛋白胶(广州倍绣生物技术有限公司);重组人骨形态发生蛋白2(艾美捷科技有限公司);小动物Micro CT扫描(上海软拓生物科技有限公司);戊巴比妥钠(湖北鸿运隆生物科技有限公司);生物力学试验机(HY-1080,上海衡翼精密仪器有限公司)。

实验动物: 4月龄雌性SD大鼠54只,清洁级,体质量(220.58±30.14) g,购自郑州大学实验动物中心。将54只大鼠随机分成3组,分别为克氏针内固定组、复合材料组与载生长因子复合材料组,每组18只。实验过程中对大鼠的处置严格依照动物伦理学要求进行。实验方案经郑州大学实验动物中心动物实验伦理委员会批准。

1.4 实验方法

1.4.1 制备负载生长因子的磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶复合材料 取重组人骨形态发生蛋白2,称质量后浸泡于纤维蛋白胶溶解液中,4 °C静置24 h,随后在玻璃匀浆器中研磨为混悬液,再加入生物胶主体中,制备重组人骨形态发生蛋白2/主体胶混悬液;另外制备催化剂溶液。将磷酸钙骨水泥的固相与液相按照10 mg : 1 mL的比例搅拌成膏状,随后注入相同体积的重组人骨形态发生蛋白2/主体胶

混悬液与催化剂溶液, 人骨形态发生蛋白2/主体胶混悬液与催化剂溶液的体积比为2:1。复合材料中重组人骨形态发生蛋白2的质量约为0.5 mg^[15]。

1.4.2 制作骨质疏松大鼠模型 取上述3组大鼠, 注射1%戊巴比妥钠(4 mL/kg)麻醉, 以仰卧位固定于手术台上, 腹部正中去毛并消毒处理, 在无菌条件下切开腹部, 逐层分离, 暴露输卵管并于其末端寻找卵巢, 切除双侧卵巢, 缝合皮肤, 包扎伤口。术后分笼饲养大鼠3 d, 每只大鼠腹腔注射 40×10^4 U青霉素, 预防感染。术后动物正常进食水。造模前及造模后3个月, 采用小动物双能X射线骨密度仪检测大鼠全身骨密度, 每个大鼠均测量3次, 最后取平均值, 确认造模是否成功。

1.4.3 制作大鼠骨折模型 骨质疏松造模3个月后, 取上述3组大鼠, 注射1%戊巴比妥钠(4 mL/kg)麻醉, 以仰卧位固定于手术台上, 暴露右侧股骨, 于股骨远端外侧做一切口, 逐层分离, 暴露股骨远端外侧, 切开膝关节囊, 暴露髌间窝, 采用1.0 mm厚度的钢锯锯断股骨中段, 建立骨折模型。

1.4.4 实验分组治疗情况 骨折造模成功后, 采用电钻从骨折端逆行向近端打入1根1 mm的克氏针, 将克氏针从髓腔自股骨近侧端穿出软组织, 复位骨折后, 将打入近端的克氏针顺行插入远端髓腔, 截断近端克氏针并保证远端埋入膝关节面下, 克氏针内固定组骨折断端不注射任何材料, 复合材料组骨折断端注射0.5 mL磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶复合材料, 载生长因子复合材料组骨折断端注射0.5 mL负载重组人骨形态发生蛋白2的磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶复合材料。术后分笼饲养大鼠3 d, 正常进食水。连续3 d每只大鼠每天注射 40×10^4 U青霉素, 预防感染。

1.5 主要观察指标

X射线检查: 骨折后4, 12周, 每个时间点每组选择9只大鼠, 拍摄股骨正位X射线片, 观察骨痂生成情况。同时进行X射线骨折线愈合评分, 评分包括骨折线距离大小、骨折线间骨痂、矿化组织含量3个部分, 每部分分为0, 1, 2分, 总分6分, 评分越高提示骨折愈合情况越好^[16]。骨折愈合评分由2名医师完成。X射线检查后, 取股骨造模处标本, 选择一部分进行后续骨形态计量参数检测与生物力学检测; 另一部分常规包埋切片, 苏木精-伊红染色行组织学观察。

骨形态计量参数检测: 骨折后4, 12周X射线检查完成后, 取股骨造模处标本, 剔除周围软组织, 40 g/L多聚甲醛固定, 保存于体积分数70%乙醇中, 进行Micro-CT扫描, 扫描方法: 旋转180°, 步长4°, 分辨率为12 μm, 曝光700 ms。选择一骨折线为中心的上下各200层作为感兴趣区, 进行图像二值化, 分析骨折断端新生骨痂情况, 观察指标包括骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数量与骨小梁分离度等。

生物力学三点弯曲实验: 以PBS浸泡标本30 min, 使标本保持湿润, 将标本置于生物力学试验机上, 上方压力

装置定位于骨折中心, 加载跨距为10 mm, 支点跨距20 mm, 加载速度设为2 mm/min, 直至标本断裂, 电脑记录载荷变形曲线, 计算最大载荷、弹性模量及刚度。

病理观察: 取脱钙标本, 沿股骨纵轴切片, 切片厚度5 μm, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明30 min, 石蜡包埋, 进行常规苏木精-伊红染色。

1.6 统计学分析 运用SPSS 22.0统计学软件进行分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表达, 进行定量数据t检验, 等级数据和方差不齐的计量数据采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 骨质疏松造模情况 54只SD大鼠造模前与造模后的骨密度值分别为(243.23±3.09), (183.49±6.28) mg/cm², 造模后的骨密度值明显低于造模前($P < 0.05$), 提示实验骨质疏松造模成功。造模过程中, 有6只大鼠造模失败, 采用相同方法再次造模, 保证实验大鼠数量为54只。

2.2 骨折愈合X射线评估 见图1。

X射线片显示, 克氏针内固定组、复合材料组、载生长因子复合材料组骨折后4周均可见清晰的骨折线, 克氏针内固定组、复合材料组骨痂量较少, 载生长因子复合材料组骨痂量较多; 至骨折后12周时, 3组骨折线较模糊或已消失, 骨痂密度已接近周围正常骨皮质。

骨折后4周时, 克氏针内固定组、复合材料组骨折愈合评分低于载生长因子复合材料组($P < 0.05$), 克氏针内固定组、复合材料组骨折愈合评分比较无差异($P > 0.05$); 骨折后12周时, 3组骨折愈合评分均较术后4周时明显升高($P < 0.05$), 克氏针内固定组、复合材料组骨折愈合评分低于载生长因子复合材料组($P < 0.05$), 克氏针内固定组、复合材料组骨折愈合评分比较无差异($P > 0.05$), 见图2。

2.3 Micro-CT检测结果 骨折后4周时, 载生长因子复合材料组骨体积分数、骨小梁厚度及骨小梁数量均高于克氏针内固定组、复合材料组($P < 0.05$), 骨小梁分离度低于克氏针内固定组、复合材料组($P < 0.05$); 克氏针内固定组与复合材料组骨体积分数、骨小梁厚度及骨小梁数量比较无差异($P > 0.05$)。骨折后12周时, 3组骨体积分数、骨小梁厚度及骨小梁数量均较骨折后4周时升高, 骨小梁分离度较骨折后4周时降低; 载生长因子复合材料组骨体积分数、骨小梁厚度及骨小梁数量均高于克氏针内固定组、复合材料组($P < 0.05$), 骨小梁分离度低于克氏针内固定组、复合材料组($P < 0.05$); 克氏针内固定组与复合材料组骨体积分数、骨小梁厚度及骨小梁数量比较无差异($P > 0.05$)。具体结果见表1。

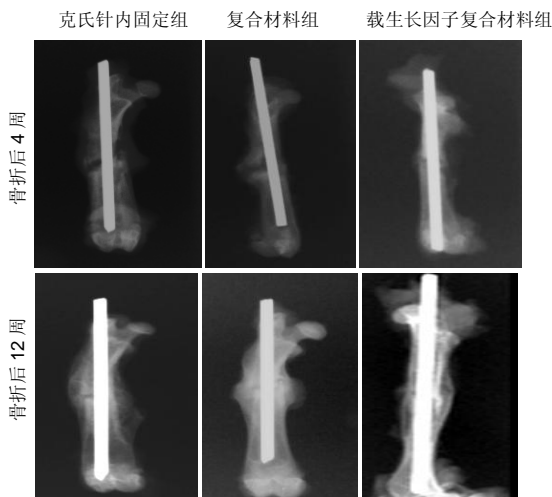
2.4 生物力学三点弯曲实验结果 骨折后4周, 载生长因子复合材料组最大载荷、弹性模量、刚度均高于克氏针内固定组、复合材料组($P < 0.05$); 复合材料组最大载荷、弹性模量均高于克氏针内固定组($P < 0.05$), 两组刚度比较无统

计学差异($P > 0.05$)。骨折后12周, 各组最大载荷、弹性模量、刚度均较骨折后4周时明显升高; 载生长因子复合材料组最大载荷、刚度均高于克氏针内固定组、复合材料组($P < 0.05$), 弹性模量与克氏针内固定组、复合材料组比较无差异($P > 0.05$); 克氏针内固定组与复合材料组最大载荷、弹性模量、刚度比较差异均无差异($P > 0.05$)。具体结果见表2。

表1 骨折后不同时间点各组骨痂结构参数的比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of structural parameters of callus in different groups at different time points after surgery

组别	骨体积分数 (%)	骨小梁厚度 (μm)	骨小梁数量 (mm)	骨小梁分离度 (mm)
骨折后 4 周				
克氏针内固定组	26.74 \pm 3.34	79.25 \pm 9.36	3.82 \pm 0.19	0.37 \pm 0.01
复合材料组	28.69 \pm 7.32	81.21 \pm 6.27	4.01 \pm 0.18	0.33 \pm 0.02
载生长因子复合材料组	40.83 \pm 4.21 ^a	91.78 \pm 3.31 ^a	5.78 \pm 0.19 ^a	0.25 \pm 0.01 ^a
骨折后 12 周				
克氏针内固定组	48.75 \pm 2.84	96.25 \pm 6.58	6.08 \pm 0.37	0.23 \pm 0.02
复合材料组	50.21 \pm 1.97	99.67 \pm 5.89	6.12 \pm 0.19	0.20 \pm 0.02
载生长因子复合材料组	63.84 \pm 2.24 ^a	119.24 \pm 3.28 ^a	7.12 \pm 0.39 ^a	0.16 \pm 0.02 ^a

表注: 与同时时间点克氏针内固定组、复合材料组比较, ^a $P < 0.05$ 。



图注: 克氏针内固定组、复合材料组、载生长因子复合材料组骨折后4周均可见清晰的骨折线, 克氏针内固定组、复合材料组骨痂量较少, 载生长因子复合材料组骨痂量较多; 至骨折后12周时, 3组骨折线较模糊或已消失, 骨痂密度已接近周围正常骨皮质。

图1 骨折后不同时间点各组股骨骨折标本X射线观察
Figure 1 X-ray observation of femoral fracture in each group at different time points after fracture

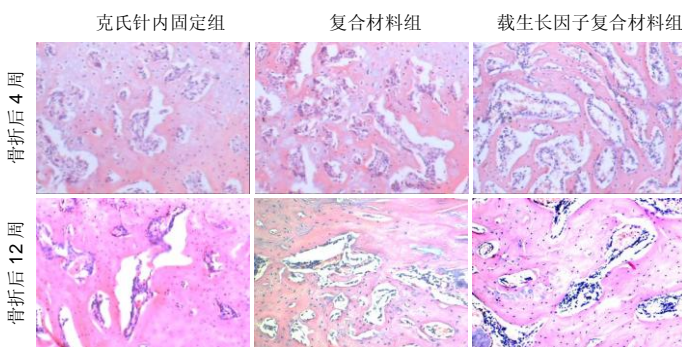
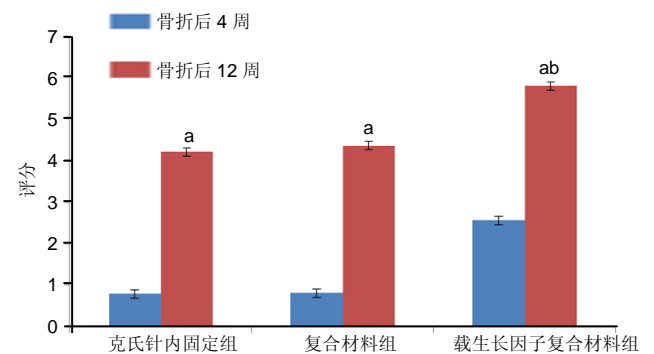


表2 骨折后不同时间点各组生物力学指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of biomechanical indexes of different groups at different time points after surgery

指标	克氏针内固定组	复合材料组	载生长因子复合材料组
骨折后 4 周			
最大载荷(N)	13.56 \pm 6.23	16.86 \pm 4.53 ^b	21.79 \pm 6.21 ^a
弹性模量(MPa)	178.30 \pm 22.81	398.46 \pm 45.67 ^b	486.85 \pm 49.91 ^a
刚度(N/mm)	8.45 \pm 2.42	9.74 \pm 3.15	15.19 \pm 3.41 ^a
骨折后 12 周			
最大载荷(N)	68.83 \pm 8.57	69.24 \pm 9.17	92.75 \pm 5.34 ^a
弹性模量(MPa)	698.51 \pm 25.17	700.84 \pm 19.47	709.25 \pm 18.69
刚度(N/mm)	99.34 \pm 12.66	103.58 \pm 9.85	162.75 \pm 5.32 ^a

表注: 与同时时间点克氏针内固定组、复合材料组比较, ^a $P < 0.05$; 与同时时间点克氏针内固定组比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.5 病理观察结果 苏木精-伊红染色显示, 克氏针内固定组骨折后4周主要可见纤维软骨骨痂, 骨折后12周骨痂重塑为板状骨, 硬骨痂含量较少; 复合材料组、载生长因子复合材料组骨折后4周可见明显的纤维性骨痂与软骨性骨痂, 并且载生长因子复合材料组硬骨痂含量较复合材料组多, 骨折后12周硬骨痂重塑为板状骨, 见图3。



图注: 与同组骨折后4周时间点比较, ^a $P < 0.05$; 与同时时间点克氏针内固定组、复合材料组比较, ^b $P < 0.05$ 。

图2 骨折后不同时间点各组股骨骨折标本愈合评分
Figure 2 Healing score of femoral fracture in each group at different time points after surgery

图注: 克氏针内固定组骨折后4周主要可见纤维软骨骨痂, 骨折后12周骨痂重塑为板状骨, 硬骨痂含量较少; 复合材料组、载生长因子复合材料组骨折后4周可见明显的纤维性骨痂与软骨性骨痂, 并且载生长因子复合材料组硬骨痂含量较复合材料组多, 骨折后12周硬骨痂重塑为板状骨。

图3 各组股骨骨折标本苏木精-伊红染色观察结果($\times 100$)
Figure 3 Hematoxylin-eosin staining results of femoral specimens in different groups ($\times 100$)

3 讨论 Discussion

骨形态发生蛋白由Urist于1965年发现的^[17], 目前已相继分离纯化出40多种骨形态发生蛋白, 其中骨形态发生蛋白2的诱导成骨活性最强, 也成为目前研究的热点。骨形态发生蛋白2主要具有两方面的生物学效应^[18-19]: 募集间充质干细胞, 诱导其分化为骨与软骨; 与其他生长因子共同参与骨组织的形成。在骨质疏松性骨折中, 骨重建速度明显减慢, 致使骨折难以愈合, 但在局部增加骨形态发生蛋白2的浓度则可促进骨折愈合, 其作用机制为: 骨形态发生蛋白2诱导间充质干细胞在骨组织形成区增殖、迁移并向成骨方向分化, 同时与其他成骨因子一起刺激成骨细胞增殖, 加速骨改建^[20-21]。因此, 在骨质疏松性骨折处适当增加其局部的骨形态发生蛋白2浓度, 将有助于骨质疏松性骨折的愈合。但是骨形态发生蛋白的半衰期较短, 发挥作用的时间较短, 并且由于体液的稀释与酶的降解, 使其很难有效发挥生物学效应。选择合适的载体对于骨形态发生蛋白生物学效应的发挥至关重要。

磷酸钙骨水泥是一种塑形准确、生物相容性好、易降解吸收的骨修复材料, 可被注射到骨折部位, 具有传导性成骨作用, 可与骨形成较严密的连接, 且固化后可形成大量的微孔结构, 可作为药物缓释载体^[22-24]。并且已有研究证实, 磷酸钙骨水泥可作为骨形态发生蛋白的载体, 缓慢释放骨形态发生蛋白, 促进新骨生长^[25-26]。但是磷酸钙骨水泥单独应用存在脆性较大的问题。纤维蛋白胶是一种具有良好黏结作用和可注射性的低抗原生物大分子材料, 易于降解, 可塑性良好, 可促进组织再生, 已被证实可负载多种生长因子发挥缓释作用^[27-29]。有研究将纤维蛋白胶引入磷酸钙骨水泥中, 发现其克服了磷酸钙骨水泥脆性较大的不足, 同时又保留了磷酸钙骨水泥良好的骨传导作用^[30]。因此, 实验选择磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶复合材料作为重组人骨形态发生蛋白2的载体。

研究通过切除4月龄雌性SD大鼠卵巢来建立骨质疏松性模型, 因去卵巢大鼠的代谢状况与绝经后妇女相似, 是目前研究骨质疏松最常用的模型^[31]。切除大鼠卵巢3个月, 双能X射线检测骨密度值分别为(243.23±3.09), (183.49±6.28) mg/cm², 造模后的骨密度值明显低于造模前($P < 0.05$), 提示实验骨质疏松造模成功。

骨折愈合受多种生长因子及力学因素影响的复杂过程, 主要分为纤维性骨痂、软骨骨痂及骨性骨痂^[32]; 骨折早期主要形成纤维及软骨性骨痂, 稳定骨折并逐渐被血管化, 后期主要是纤维软骨骨痂矿化形成硬骨痂并被重塑为板状骨痂, 因此组织学与形态学的恢复对骨折愈合尤为重要。此次研究X射线检查显示, 骨折后4周3组均可见清晰的骨折线, 克氏钉内固定组、复合材料组骨痂量较少, 载生长因子复合材料组骨痂量较多, 随着时间的延长, 至骨折后12周时, 3组骨折线已消失, 骨痂已重塑为皮质骨, 但是骨折愈合评分显示载生长因子复合材料组骨折愈合最

好。为了更加全面的分析负载重组人骨形态发生蛋白2磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶复合材料对骨质疏松性骨折的修复作用, 采用病理组织切片与Micro-CT进一步观察了松质骨骨小梁形态与结构。骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数量、骨小梁分离度是评估骨量的重要骨组织学形态参数, 可综合反映骨形成状态^[33-34]。Micro-CT检测结果显示, 载生长因子复合材料组骨折后4, 12周的骨体积分数、骨小梁厚度及骨小梁数量均高于克氏钉内固定组、复合材料组($P < 0.05$), 骨小梁分离度均低于克氏钉内固定组、复合材料组($P < 0.05$); 病理切片观察显示骨折后12周, 克氏钉内固定组骨痂重塑为板状骨, 但硬骨痂含量较少, 复合材料组、载生长因子复合材料组硬骨痂重塑为板状骨, 以上结果提示负载重组人骨形态发生蛋白2的磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶复合材料, 可加速骨小梁成熟速度, 促进骨折愈合。张君^[35]研究骨质疏松性骨折模型中, 在骨折局部注射慢病毒介导的骨形态发生蛋白2质粒, 证实慢病毒介导的骨形态发生蛋白2能促进骨形成, 促进骨折部位愈合, 对骨质疏松性骨折具有很好的治疗效果, 与此次实验结果一致。

修复骨折不仅要恢复骨形态的连续性, 更要重建骨的支撑性能, 恢复其力学强度。生物力学可直接反映骨质量变化, 是全面评估骨质量的可靠指标^[36-37]。三点弯曲实验显示, 复合材料组骨折后4周的最大载荷、弹性模量较克氏钉内固定组显著升高($P < 0.05$), 而骨折后12周时的最大载荷、弹性模量与克氏钉内固定组无统计学差异, 分析原因可能为: 在骨折早期, 磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶复合材料自身的机械性能提供了一定的力学支撑作用, 但后期复合材料降解, 至12周时骨的力学性能与克氏钉内固定组无差异。而在骨折后4, 12周, 载生长因子复合材料组最大载荷、刚度始终高于克氏钉内固定组、复合材料组($P < 0.05$), 分析原因可能为: 复合材料的网状微观结构更利于骨形态发生蛋白2的附着及其与靶细胞接触, 而复合材料强大的黏着力有利于骨形态发生蛋白2的缓慢释放, 因此随着复合材料的逐渐降解, 在植入材料周围形成了骨形态发生蛋白2释放浓度梯度, 增加了其与靶细胞的作用时间, 促进靶细胞的增殖与成骨活性, 促进材料的骨爬行替代。结果说明负载重组人骨形态发生蛋白2的磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶复合材料, 可促进骨质疏松性骨折的愈合, 并提高其力学强度。

作者贡献: 李浩亮进行实验设计, 实验实施为李浩亮、王西彬, 实验评估为左瑞庭, 资料收集及成文为李浩亮。

经费支持: 该文章未接受任何经费支持。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经郑州大学实验动物中心动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南: 本研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验

与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经河南省中医院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 陈琼.骨质疏松患者的营养治疗[J].医师在线,2018,8(16):40-41.
- [2] Miller PD. Management of severe osteoporosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2016;17(4):743-788.
- [3] Xie YM, Yuwen Y, Dong FH, et al. Clinical practice guideline of traditional medicine for primary osteoporosis. *Chin J Integr Med*. 2011;17(1):52-63.
- [4] Zhu H, Fang J, Luo X, et al. A survey of bone mineral density of healthy Han adults in China. *Osteoporosis Int*. 2010;21(5):765-772.
- [5] 杜增峰,贺耀耀,马晓磊,等.骨愈灵胶囊联合注射用骨肽治疗骨质疏松症的临床研究[J].现代药物与临床,2016,31(9):1382-1385.
- [6] 周锐,许建中,周华东.雌激素、维生素D和骨形态发生蛋白与骨质疏松症及心脑血管钙化的发生机制[J].中华解剖与临床杂志,2017,22(1):83-86.
- [7] 吴星,吴立忠,詹洋,等.高表达骨形态发生蛋白2小鼠骨髓间充质干细胞体系的构建及基因表达的研究[J].福建医药杂志,2018,40(1):113-116.
- [8] 张斌斌,高全文,李冰,等.间充质干细胞成骨分化过程中骨形态发生蛋白的作用研究[J].创伤外科杂志,2018,20(2):153-157.
- [9] 陈焯,张崢,马海棠,等.局部应用骨形态发生蛋白-7复合纤维蛋白治疗大鼠骨质疏松性椎体骨折的可行性[J].疑难病杂志,2018,17(4):400-404.
- [10] 黄田,郑南生,张育专,等.磷酸钙骨水泥/纤维蛋白胶复合材料填充桡骨缺损的生物相容性[J].中国组织工程研究,2016,20(52):7829-7835.
- [11] Xiu J, Fan J, Li J, et al. Different angiogenic abilities of self-setting calcium phosphate cement scaffolds consisting of different proportions of fibrin glue. *Biomed Res Int*. 2014;2014:785146.
- [12] Tao Z, Zhou W, Jiang Y, et al. Effects of strontium-modified calcium phosphate cement combined with bone morphogenetic protein-2 on osteoporotic bone defects healing in rats. *J Biomater Appl*. 2018;33(1):3-10.
- [13] Huang B, Wu Z, Ding S, et al. Localization and promotion of recombinant human bone morphogenetic protein-2 bioactivity on extracellular matrix mimetic chondroitin sulfate-functionalized calcium phosphate cement scaffolds. *Acta Biomater*. 2018;71:184-199.
- [14] Li Y, Li R, Hu J, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 suspended in fibrin glue enhances bone formation during distraction osteogenesis in rabbits. *Arch Med Sci*. 2016;12(3):494-501.
- [15] 刘兴炎,厉孟,刘旭东,等.rhBMP-2/CPC对骨质疏松骨缺损的治疗作用的研究[J].中国骨质疏松杂志,2009,15(1):16-19.
- [16] Silva BC, Leslie WD. Trabecular Bone Score: A New DXA-Derived Measurement for Fracture Risk Assessment. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2017;46(1):153-180.
- [17] Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science*. 1965;150(3698):893-899.
- [18] 周万琳,李琳琳,刘润喆,等.PDGF-BB/BMP-2影响种植体周围骨形成作用的组织学观察[J].中国实验诊断学,2018,22(2):325-328.
- [19] 贾鹏,徐又佳.骨硬化蛋白在骨重塑中作用的研究进展[J].中华创伤杂志,2017,33(4):371-376.
- [20] 李军,王云,鲍小明,等.rhBMP-2体外诱导骨质疏松大鼠BMSCs成骨及VEGF表达的研究[J].中国骨伤,2015,28(5):446-449.
- [21] 卫鹏斌,张民,李军,等.VEGF在BMP-2促进骨质疏松性成骨细胞过程中作用机制的研究[J].中国临床实用医学,2015,6(3):13-16.
- [22] 陈龙飞,王海涛,张翼,等.载阿仑膦酸钠的磷酸钙骨水泥修复兔股骨骨缺损的实验研究[J].河南医学研究,2018,27(4):591-594.
- [23] Shi M, Chen L, Wang Y, et al. Effect of Low-Frequency Pulsed Ultrasound on Drug Delivery, Antibacterial Efficacy, and Bone Cement Degradation in Vancomycin-Loaded Calcium Phosphate Cement. *Med Sci Monit*. 2018;24:797-802.
- [24] Shu X, Feng J, Feng J, et al. Combined delivery of bone morphogenetic protein-2 and insulin-like growth factor-1 from nano-poly (γ -glutamic acid)/ β -tricalcium phosphate-based calcium phosphate cement and its effect on bone regeneration in vitro. *J Biomater Appl*. 2017;32(5):547-560.
- [25] 凌泽莎,贾功伟,谭波涛,等.注射复合rhBMP-2骨水泥制作猕猴椎动脉型颈椎病模型[J].中山大学学报(医学科学版),2016,37(5):775-780.
- [26] 李侠,陆晴友,潘玉涛,等.可注射磷酸钙骨水泥联合骨形态发生蛋白-2治疗老年肱骨近端骨折疗效分析[J].实用骨科杂志,2015,21(10):883-886,887.
- [27] 全迪,任玉琦,王晓添.评价体外冲击波联合增强型纤维蛋白胶负载骨生长因子治疗骨不连的临床疗效[J].中国实用医药,2018,13(18):197-198.
- [28] 崔学文,张亮新,许艺荠,等.SHH缓释纤维蛋白支架移植促大鼠脊髓损伤的修复[J].神经解剖学杂志,2017,33(2):131-137.
- [29] Lv J, Xiu P, Tan J, et al. Enhanced angiogenesis and osteogenesis in critical bone defects by the controlled release of BMP-2 and VEGF: implantation of electron beam melting-fabricated porous Ti6Al4V scaffolds incorporating growth factor-doped fibrin glue. *Biomed Mater*. 2015;10(3):035013.
- [30] 董静静.自凝固磷酸钙/纤维蛋白协同诱导成骨机制的研究及成骨材料的研制[D].西安:第四军医大学,2013.
- [31] 沈蕴茹,郭海英,温肾固疏方干预绝经后骨质疏松药理研究[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(4):503-508.
- [32] 张立岩,王华,季瑞达,等.骨质疏松骨折的特点及治疗新进展[J].北华大学学报(自然科学版),2018,19(4):499-502.
- [33] 齐晓宇,赵磊,毕冬冬,等.右归饮对去势雌性小鼠骨质疏松的治疗作用[J].现代药物与临床,2017,32(11):2072-2076.
- [34] 史晓林,梁博程,吴鹏,等.淫羊藿总黄酮对去势大鼠骨折原始骨痂发生的影响及其机制[J].中国骨伤,2017,30(8):743-750.
- [35] 张君.慢病毒介导的骨形态发生蛋白-2治疗骨质疏松骨折的效果[J].西安交通大学学报(医学版),2016,37(5):669-672.
- [36] 张晓刚,赵希云,宋敏,等.骨质疏松性椎体压缩骨折的生物力学研究进展[J].医用生物力学,2017,32(2):199-204.
- [37] 陈饒如,徐克惠,乔林.结合雌激素对去势大鼠骨折愈合生物力学指标的影响[J].检验医学与临床,2015,12(5):622-624.