

重组人骨形成蛋白-2- 珊瑚复合人工骨 修复骨缺损的生物力学研究

张森林 毛天球 王会信 赵 明

摘要 将珊瑚与具有骨诱导特性的重组人骨形成蛋白-2(rhBM P-2)复合,制成 rhBM P-2- coral 复合人工骨,将其植入兔颅骨标准大小缺损,并与单纯珊瑚植入作对照。通过X线片、组织学和生物力学方法来评价此复合人工骨的骨修复能力。结果显示:rhBM P-2- coral 复合人工骨具有较强的骨修复作用,植入骨缺损后,材料被逐渐降解吸收,新骨不断形成,机械强度不断增大;12周后,植入物完全被成熟的骨组织取代,缺损区抗压强度接近正常的骨组织。该复合人工骨是一种较理想的骨移植替代材料。

关键词 重组人骨形成蛋白-2 珊瑚 人工骨 骨诱导 生物力学

珊瑚(coral)因其具有类似无机骨的微孔结构和组成成分而被作为植骨材料,并进行了大量的实验和临床应用研究^{1,2}。它有良好的生物相容性、生物降解性和骨引导活性,但无骨诱导活性,成骨能力有限,单独用于修复较大的骨质缺损时,难以得到完全的骨修复^{3,4}。因此,进一步研究提高珊瑚的骨修复能力有重要意义。作者将珊瑚与大肠杆菌表达的重组人骨形成蛋白-2(rhBM P-2)复合,制备出 rhBM P-2- coral 复合人工骨,小鼠肌袋植入实验,显示其具有良好的骨诱导活性,这方面内容将另文发表。本研究用该复合人工骨修复兔颅骨标准大小缺损,通过X线片、组织学和生物力学方法对其骨修复能力进行评价,为临床应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 rhBM P-2

军事医学科学院基础医学研究所利用基因工程技术在大肠杆菌中表达并经纯化的产物,冻干成粉状。

1.2 珊瑚人工骨的制备

将海南三亚的滨珊瑚加工成直径15mm、厚2mm的圆片,经5%次氯酸钠浸泡24h,流水冲洗24h,双蒸水超声清洗3次,每次1h,烘干,高压消毒备用。

1.3 rhBM P-2- coral 复合人工骨的制备

取一定量的 rhBM P-2 溶于适量 4 mol/L 盐酸胍溶液中,再放入一定数量的珊瑚圆片,负压抽低真空后,用蒸馏水透析,冻干,环氧乙烷消毒备用。本实验研制的复合人工骨中 rhBM P-2 和珊瑚的结合比例为 1:40(W/W)。

1.4 实验动物及手术方法

取健康新西兰兔60只,重2.5~3.0kg,随机分为复合人工骨组和珊瑚组,每组30只。在2%戊巴比妥钠静脉麻醉和无菌条件下,在兔顶骨用牙科用电钻去骨,造成直径15mm的圆形缺损,生理盐水冲洗后,分别植入复合人工骨或珊瑚人工骨圆片,分层缝合骨膜和皮肤。

1.5 观察指标

术后2,6,12周每组各处死10只动物,用金刚砂片切割,取下植入物及部分周边骨组织,摄X线片。然后取1/4标本,常规制成连续脱钙石蜡切片,垂直向切面,HE染色,光镜下观察。

取1/4标本,兔新鲜颅骨、珊瑚和复合人工骨制成2mm×3mm×4mm大小的测试样品各10个。用Instron 1195型电子拉力实验机进行抗压强度测试,加载速度 $V=1\text{ mm/min}$ 。

抗压强度数值用 t 检验进行统计学处理。

2 结 果

2.1 X线片观察结果

2周:复合骨组和珊瑚组均可见材料与骨床界线稍模糊,植入区无明显材料吸收影,珊瑚纹理清晰。两材料组间的X线阻射影无明显区别。

6周:复合骨组和珊瑚组植入区因部分珊瑚的降解而致阻射影变淡;材料与骨床界线模糊。复合

作者单位:210002 南京军区南京总医院口腔科(张森林),第四军医大学口腔医学院(毛天球),军事医学科学院基础医学研究所(王会信,赵 明)

骨植入区的 X 线阻射影明显强于珊瑚植入区。

12 周: 两材料组植入区的 X 线阻射影增强。复合骨植入区与骨床的 X 线密度一致, 界线不清; 而珊瑚植入区的 X 线阻射影仍低于周围骨床。

2.2 组织学观察结果

2 周: 复合骨组: 纤维结缔组织包绕在珊瑚表面并长入其孔洞内, 其中可见大量散在的局灶性编织骨形成; 在编织骨周围有时可见少量呈退行性改变的软骨组织。珊瑚组: 珊瑚孔洞主要由纤维结缔组织充填, 仅在近骨床端有少量新骨长入。

6 周: 复合骨组: 珊瑚孔洞内的新骨相互融合生长, 并改建为含骨髓的板层骨; 植入区的软组织和珊瑚占位明显缩小(图 1)。珊瑚组: 材料周边部孔洞内有新骨进一步长入, 但其中心部孔洞仍仅由软组织充填, 尚无骨组织成分; 珊瑚占位明显缩小(图 2)。

12 周: 复合骨组: 植入区材料被完全吸收, 为成熟的含骨髓的板层骨取代, 表现为内、外两层骨板, 中间为骨髓腔, 其形态结构与周围骨床相似; 植入区极少见软组织成分(图 3)。珊瑚组: 由骨床生长而来的新骨到达缺损中心区, 已连接成片, 并改建为成熟的含骨髓的板层骨; 珊瑚被完全吸收; 部分区域仍可见软组织占位(图 4)。

2.3 抗压强度测试结果

附表 两种材料植入前后的抗压强度($\bar{x} \pm s, N/mm^2$)

	植入前	植入后		
		2 周	6 周	12 周
复合骨组	18.5 ± 1.3	21.8 ± 1.6	34.9 ± 1.8	52.2 ± 2.0
珊瑚组	18.3 ± 1.5	14.7 ± 1.6	21.9 ± 2.2	37.1 ± 2.2
正常兔颅骨	52.5 ± 2.1			

n = 10

复合骨、珊瑚、正常兔颅骨的抗压强度测试结果见附表。结果表明: 在植入前, 两材料组间抗压强度无显著差异($P > 0.05$); 植入后, 复合骨组明显高于同期的珊瑚组($P < 0.01$); 复合骨植入后的抗压强度明显高于植入前; 珊瑚植入前的抗压强度明显高于植入后 2 周, 而低于植入后 6 周和 12 周; 两组材料在植入后, 随时间推移, 抗压强度逐渐增大($P < 0.01$); 复合骨植入后 12 周的抗压强度与正常兔颅骨无显著差异($P > 0.05$), 但明显高于同期植入的珊瑚($P < 0.01$)。

3 讨 论

珊瑚具有良好的生物相容性、生物降解性和骨引导活性^{5,6}, 目前已被颌面外科临床应用^{1,2}, 均取得了预期的治疗效果。但是, 珊瑚无骨诱导活性, 只能依靠骨床的骨组织长入, 以爬行替代的方式来完成骨缺损的修复, 成骨速度较慢; 而珊瑚在体内降解较快, 因此, 珊瑚快速降解留下的空间部分被软组织占据, 骨缺损就不能得到完全的骨修复^{3,4}, 这为本实验结果所证实。复合人工骨除了具有类似珊瑚的骨引导活性外, 还具有骨诱导活性, 在植入骨缺损后, 一方面, 引导骨床的骨组织长入, 另一方面, 以诱导成骨的方式产生新骨, 即以传导成骨和诱导成骨双重机制来完成骨缺损的修复。组织学观察显示: 复合骨在植入骨缺损后, 不仅在其周边部有骨组织长入, 而且在整个植入物内均有局灶性新骨形成, 即出现多中心成骨; 随后, 新骨相互融合生长, 术后 12 周, 植入物完全被成熟的骨组织取代, 缺损区得到完全的骨修复。

修复骨缺损不仅要恢复其形态的连续性, 更重要的是要重建骨的支撑功能, 这就需要修复区骨组织有一定的强度。骨组织的韧性取决于胶原, 硬度取决于无机盐, 两者的结合构成骨组织的生物力学强度。自体皮质骨移植后首先发生类似脱矿的过程, 并发生骨吸收, 随后在骨吸收的部位形成新骨。结果, 首先出现移植骨放射线阻射率降低, 机械强度减弱, 随着新骨逐渐替代移植骨后, 其强度逐渐恢复正常⁷。珊瑚修复骨缺损的过程与此类似。珊瑚成分的 99% 为碳酸钙, 有机物含量极少, 因而韧性差, 脆性大⁸, 其抗压强度仅为正常兔颅骨的 1/3。植入骨缺损的早期, 珊瑚逐渐降解而新骨尚未形成或仅在近骨床区有少量新骨长入, 因而出现植入区抗压强度的降低; 随着骨床的骨组织不断长入并改建为成熟的板层骨, 其抗压强度逐渐增强。由于珊瑚无骨诱导活性, 成骨能力较弱, 在骨缺损植入 12 周, 珊瑚完全降解吸收, 缺损的大部分由骨组织修复, 但仍有小部分由软组织充填, 因而修复区的抗压强度也只能恢复到正常骨的 3/4。与此相比, 复合人工骨植入的早期, 在材料降解吸收的同时, 植入区就有大量的新骨形成, 因而其抗压强度有所提高; 随后新生骨相互融合生长, 并在应力作用下, 新生骨的外周部分逐渐改建为皮质骨, 中央

部分改建为骨髓腔。这样,在形态结构上与骨床相似,其抗压强度也恢复到正常兔颅骨水平。因此,从生物力学角度来看,复合人工骨作为植骨材料明显优于珊瑚。

综上所述, rhBM P-2- coral 复合人工骨具有骨传导和骨诱导作用,成骨能力强,植入骨缺损后,材料逐渐被降解吸收,新骨不断形成,机械强度不断增大。12周时,复合人工骨完全为成熟的新骨取代,使缺损区恢复了正常的骨组织结构 and 生物力学性能。因此,可以认为此复合人工骨是一种较为理想的骨移植替代材料。

(本文图见中心插页 12)

4 参考文献

- 1 Papacharalambous SK, Anastasoff KI Natural coral skeleton used as onlay graft for contour augmentation of the face. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 1993, 22: 260
- 2 Souyris F, Pellequer C, Payrot C, et al Coral, a new

- biomedical material. *J Maxillofac Surg*, 1985, 13: 64
- 3 Dupoirieux L, Costes V, Jammet P, et al Experimental study on demineralized bone matrix (DBM) and coral as bone graft substitutes in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 1994, 23: 395
- 4 Ohgushi H, Okumura M, Yoshikawa T, et al Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res*, 1992, 26: 885
- 5 Pollick S, Shors EC, Holmes RE, et al Bone formation and implant degradation of coralline porous ceramics placed in bone and ectopic sites. *J Oral Maxillofac Surg*, 1995, 53: 915
- 6 Jammet P, Souyris F, Baldet P, et al The effect of different porosities in coral implants: an experimental study. *J Cranio Maxillofac Surg*, 1994, 22: 103
- 7 Narang V. Demineralization of bone transplants in vivo. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1973, 36: 291
- 8 Guillen G, Patat JL, Fournie J, et al The use of coral as a bone graft substitute. *J Biomed Mater Res*, 1986, 21: 557

(1996-08-22 收稿)

A Biomechanical Study on the Bone Repairing Ability of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2-Coral Composed Artificial Bone

Zhang Senlin, Mao Tianqiu, Wang Huixin, et al

Department of Stomatological, Nanjing General Hospital of PLA

Abstract

To improve bone repairing ability of coral, recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBM P-2)-coral composed artificial bone was obtained by combining coral with rhBM P-2 in this experiment. The composite was implanted into rabbit calvarial critical-size defects and coral alone was implanted as control. The bone repairing ability was assessed by radiography, histology and biomechanics. The results showed that implants were absorbed gradually after they were implanted into the defects. In the meantime, the new bone was formed and the mechanical strength was reinforced uninterruptedly in bone defect regions. At 12 weeks, the implants were replaced completely by bone, and the mechanical strength was entirely restored. These suggest that the composite possess a superior bone repairing ability and may be one of the most perfect bone graft substitutes currently available.

Key words: recombinant human bone morphogenetic protein-2 coral bone substitute carrier osteoinduction biomechanics