

骨水泥与骨形态发生蛋白对骨生长的影响

侯青青¹, 杨越², 徐景超²

(河南理工大学医学院¹, 骨科研究所², 河南 焦作 454000)

摘要:目的 研究骨水泥与骨形态发生蛋白对骨生长的影响。方法 制作骨水泥,选择新西兰家兔20只并随机分为4组,每组5只,分别在兔子左右股骨处进行填充,将左侧植入骨水泥复合骨形态发生蛋白材料设为实验组,右侧植入单纯羟基磷灰石骨水泥材料设为空白组。6周后拍摄X光片,分析两组骨水泥填充结果及骨组织切片结果。结果 兔子伤口愈合情况良好,体重较稳定,无异物无免疫排斥反应及其他感染现象发生。术后6周拍片结果显示,实验组骨缺损间隙模糊,材料体积变小,降解非常明显,新骨形成多,并且骨连接紧密;空白组部位有空隙存在,材料变化不明显。实验组新骨共计生成10个界限生成7个空白组新骨形成7个界限生成5个。骨切片结果显示,实验组染色较浅,另外有较多的新骨组织生成,降解明显;而空白组染色较深,新生骨形成较少,且降解不明显。结论 复合材料骨水泥对周围骨组织有促进生长的作用,且对周围骨组织无不良影响,无排斥反应。

关键词:骨水泥;骨组织切片;骨形态发生蛋白

中图分类号:R687.4

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.21.021

文章编号:1006-1959(2021)21-0084-04

Effect of Bone Cement and Bone Morphogenetic Protein on Bone Growth

HOU Qing-qing¹, YANG Yue², XU Jing-chao²

(School of Medicine¹, Institute of Orthopedics², Henan Polytechnic University, Jiaozuo 454000, Henan, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of bone cement and bone morphogenetic protein on bone growth. **Methods** Twenty New Zealand rabbits were randomly divided into four groups, with five in each group. The rabbits were filled in the left and right femurs, respectively. The left implanted bone cement composite bone morphogenetic protein material was set as the experimental group, and the right implanted hydroxyapatite bone cement material was set as the blank group. After 6 weeks, X-ray films were taken to analyze the results of bone cement filling and bone tissue sections in the two groups. **Results** Rabbit wound healing was good, weight was stable, no foreign body immune rejection and other infection. Six weeks after operation, the film results showed that the bone defect gap in the experimental group was fuzzy, the material volume was smaller, the degradation was very obvious, the new bone formation was more, and the bone connection was tight. There were gaps in the blank group, and the material changes were not obvious. In the experimental group, a total of 10 new bones were generated, and 7 boundaries were generated. The blank group formed 7 new bones and 5 boundaries. The results of bone sections showed that the staining in the experimental group was shallow, and there were more new bone tissues generated and degraded significantly, while the blank group had deeper staining, less new bone formation and no obvious degradation. **Conclusion** Composite bone cement can promote the growth of surrounding bone tissue, and has no adverse effect on surrounding bone tissue and no rejection reaction.

Key words: Bone cement; Bone tissue sections; Bone morphogenetic protein

骨水泥(bone cement)由白色粉末和无色带刺激气味的液体两部分制剂组成,其最初用于固定股骨假体,现已广泛用于治疗椎体和股骨颈等部位的骨质疏松^[1,2],最常用的材料为聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥,其可较好地增加椎体强度和缓解疼痛,但存在固化时发热、骨水泥渗漏、体内不能生物降解及骨整合等问题^[3]。而磷酸钙骨水泥具有生物相容性、骨传导性好和在局部能自凝固等特点^[4],但同时也存在早期力学性能差、脆性大、降解速度难以控制、不能与新骨生成速度匹配等。有研究表明^[5],羟基磷灰石性质相对比较稳定,具有良好的骨传导性能和生物活性,是一种理想的骨缺损修复材料。同时,纳米级羟基磷灰石更利于与骨组织的整合,骨传导性能、溶解性能以及力学性能更强,且植入动物体内没有物理损害。骨形态发生蛋白是一组具有类似结构的高度保守的功能蛋白,它可以刺激DNA的合成和细胞的复制,促进间充质细胞定向分化为成骨细胞,产生

新生骨,具有诱导成骨作用^[6,7]。本研究以纳米羟基磷灰石作为主要材料制作骨水泥,观察骨水泥对骨骼生长的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 骨水泥材料 纳米羟基磷灰石2g、BMP 60mg、聚酰胺1g、氢氧化镁5g、壳聚糖1g、六水合氯化镁5g、羟丙甲基纤维素1g、纳米二氧化硅1g、无水乙醇5g、丙酮2g。

1.1.2 实验材料 健康白色成年新西兰家兔20只,雌雄不拘,体质量为4.1~4.8kg,体温38.5℃~39.5℃,由河南理工大学医学院实验动物房提供提供。饲养室室温(20±3)℃,相对湿度50%~60%,昼夜光照节律12h:12h,兔粮每日食用量为400~500g,自由饮食水。兔台、灭菌锅、刮胡刀、布巾钳、镊子、刀片、刀柄、直剪、弯剪、止血钳、弯止血钳、纱布、电钻、Alice、针、线、水合氯醛、生理盐水、酒精、碘伏、青霉素。对实验动物的处理与实验目的符合人类的道德伦理标准和国际惯例,符合3R规则。

作者简介:侯青青(1997.5-),女,河南杞县人,专科,技术员,主要从事创伤骨科与新型生物材料的研究

1.1.3 骨组织切片的仪器及试剂 切片机(湖北伯纳医疗科技有限公司)、HS-1145 病理组织漂烘仪(金华市华速科技有限公司)、恒温干燥箱、通风橱、奥林巴斯荧光显微镜(奥林巴斯<深圳>工业有限公司)、HE 染色试剂、10%中性甲醛固定液、水杨酸脱钙液、改良 Jenkins 脱钙液、1 mol/L 氢氧化钠溶液、盐酸乙醇分化液、剃度乙醇溶液、二甲苯、石蜡、蒸馏水。

1.2 方法

1.2.1 骨水泥制作 分别称取羟基磷灰石 2 g、聚酰胺 1 g、氢氧化镁 5 g、壳聚糖 1 g、六水合氯化镁 5 g、羟丙甲基纤维素 1 g、纳米二氧化硅 1 g、无水乙醇 5 g、丙酮 2 g,放入研钵充分研磨,研磨充分之后取出放入烤箱 60 ℃下烘干,再在空气中进行晾晒,第 2 天基本上凝固成型,即可进行骨水泥填充。

1.2.2 兔子实验过程 选取家兔 20 只,每 5 只为 1 组,共分为 4 组。兔子左侧植入骨水泥复合骨形态发生蛋白材料设为实验组,另一侧植入单纯羟基

磷灰石骨水泥材料设为空白组。每只兔子过程相同,首先于术前禁食 3 d。配置麻醉药物,取水合氯醛 1 g,生理盐水 10 ml 混合均匀。将实验兔子放置在手术台,用刮胡刀剃毛,并用剃毛膏去除多余杂毛。在耳缘静脉注射 4 ml 麻醉药物,观察兔子反应,10 min 后,如家兔瞳孔仍有反射,补加麻药 4 ml,观察家兔瞳孔无反应后即麻醉完全。开始手术,在兔子左股骨手术部位用碘伏消毒,见图 1,再用手术刀和镊子接连划开皮肤、布膜、肌肉和骨膜,暴露出骨头,找到股骨,在股骨处钻孔,钻出半径约 2 mm 的孔,放入术前制作好的骨水泥,见图 2,然后用生理盐水冲洗伤口,并将生理盐水和青霉素混合注射进伤口周围的肌肉,注射 3~4 针。随后缝合,用小针缝合肌肉,用大针缝合皮肤,最后用碘伏消毒。实验结束后对兔子日常生活进行观察记录,6 周后进行 X 光片检查。



图1 股骨处碘伏消毒



图2 复合骨水泥填充

1.2.3 骨切片实验步骤 选取骨水泥手术的家兔,将家兔通过耳缘静脉推注空气致死,取出双侧股骨,剔除多余肌肉组织,放在 10%中性甲醛溶液中固定。选择水杨酸脱钙液、改良 Jenkins 脱钙液进行脱钙,接着在 10%中性甲醛中固定 24 h。固定之后选择 Jenkins 脱钙液(盐酸 4 ml、醋酸 3 ml、氯仿 10 ml 依次加入 10 ml 蒸馏水,再加进 73 ml 无水乙醇)进行脱钙,脱钙 4 d 之后用 1 mol/L 氢氧化钠溶液除酸。再用流水冲洗 10 min,之后再依次用 50%酒精脱水 1 h、75%酒精脱水 1 h、85%酒精脱水 1 h、95%酒精脱水 1 h、无水乙醇脱水 30 min 2 次。接着进行透明、浸蜡、包埋、切片、展片、捞片、烤片,即用刀片将包有组织的蜡块进行修剪,调试好切片机,装上蜡块,用切片机切成薄片,取较为完整的组织薄片,用镊子轻轻镊起平铺在 40 ℃~45 ℃的水面。待蜡片平展后将其捞至载玻片中段,倾掉多余的水,置于 60 ℃~65 ℃恒温箱内或漂烘仪烤箱处

烤片 15~30 min。以上实验结束后开始脱蜡,染色,最后脱水,封片。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,计数资料以(n)进行描述。

2 结果

2.1 骨水泥填充结果 兔子伤口愈合情况良好,体重较稳定,无异物无免疫排斥反应及其他感染现象发生。术后 6 周拍片结果显示,实验组骨缺损间隙模糊,材料体积变小,新骨形成多,并且骨连接紧密;空白组部位有空隙存在,材料变化不明显,见图 3。此外,实验组新骨共计生成 10 个,界限生成 7 个;空白组新骨形成 7 个,界限生成 5 个;从单个兔子移植骨 X 光片结果来看,实验组新骨最多生成 3 个,而空白组最多为 2 个,见表 1。

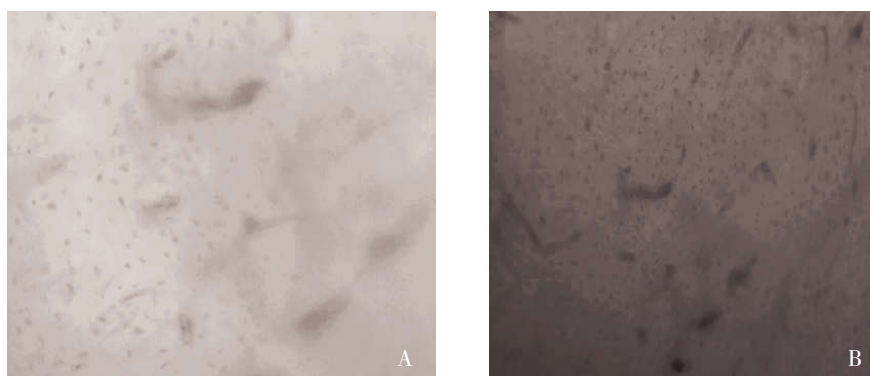
2.2 骨切片结果 实验组染色较浅,另外有较多的新骨组织生成,降解明显;而空白组染色较深,新生骨形成较少,且降解不明显,见图 4。



图 3 复合骨水泥 X 光片

表 1 两组术后 6 周移植骨 X 光片统计结果(个)

编号	实验组				空白组			
	新骨形成	界限	骨改建	总计	新骨形成	界限	骨改建	总计
1	2	1	0	3	1	1	0	2
2	3	2	0	5	2	1	0	3
3	3	2	0	5	2	2	0	4
4	2	2	0	4	2	1	0	3
合计	10	7	0	17	7	5	0	12



注:A:实验组;B:空白组

图 4 骨切片结果(HE×400)

3 讨论

骨植入材料作为生物材料的重要组成部分,受到临床广泛关注,其中羟基磷灰石因具有优良的生物相容性和生物活性,是一种非常具有潜力的骨植入材料。但有研究证明^[8],羟基磷灰石本身不具有促进成骨作用,单纯的羟基磷灰石很难发挥作用,做出来的材料很容易散^[9],需要填充其他物质相互混合来达到目的。骨形态发生蛋白(BMPs)是转化生长因子 β (TGF- β)家族中的一员,具有诱导骨形成的作用,与骨骼生物相容性好,亲和力高^[10]。据目前研究发现^[11,12],BMP-2、3、4、14等可用于骨修复,另外通过不同的填充材料,对骨修复的能力也会有不同的影响。BMPs不单单能单独介导促成骨生长,并且还能

与其他骨生长因子混合,以此来增强骨生长的效果。骨形态发生蛋白复合骨水泥与人体骨的构成较为相似,其组成的实验组材料可通过生物活性更好地形成新骨。骨形态发生蛋白骨水泥除了促进生物体的骨组织生长外,对生物体本身也不会造成危害,还具有较好的生物相容性、生物降解以及传导成骨活性,可迅速凝固,不会对机体产生刺激,也不会影响其他材料的生物活性^[13]。研究表明^[14,15],骨形态发生蛋白具有传导成骨的作用,而羟基磷灰石有诱导成骨作用,二者结合,相互弥补不足,又同时发挥着自身作用,使实验材料发挥最大的功效。同时,因骨形态发生蛋白具有降解性,最后会随着新骨的形成而被降解。本研究在兔子左右股骨处分别植入骨水泥复合

骨形态发生蛋白材料和单纯羟基磷灰石骨水泥材料,结果显示实验组骨缺损间隙模糊,材料体积变小,降解明显,且新骨形成多,骨连接紧密;此外,实验组在新骨和界限生成数量上大于空白组;骨组织切片结果也显示,实验组染色较浅,另外有较多的新骨组织生成,降解明显;而空白组染色较深,新生骨形成较少,且降解不明显,这可能与新骨形成速度与单纯材料降解速度不一致导致的,提示实验组的实验材料具有较高的诱导成骨的活性,使新骨形成的速度大于空白材料降解的速度,因此未有空隙产生。

综上所述,复合材料骨水泥对周围骨组织有促进生长的作用,且对周围骨组织无不良影响,无排斥反应。

参考文献:

- [1] 鲁良,刘亚龙.CBT置钉法与传统椎弓根螺钉固定联合骨水泥治疗骨质疏松性骨折的疗效对比分析[J].贵州医药,2021,45(2):259-260.
- [2] 夏利锋,裴少琨,张亚斌,等.骨水泥表面技术联合皮瓣在修复四肢骨与关节感染合并组织缺损中的应用效果[J].临床医学研究与实践,2020,5(10):48-49,52.
- [3] 刘锋,梁载明.钛材料和纳米羟基磷灰石修复大鼠骨缺损:对免疫调控的影响[J].中国组织工程研究,2018,22(10):1506-1510.
- [4] 陈俊兰,吴带生,吴纪楠,等.个体化假体复合人工骨移植修复兔下颌骨缺损的实验研究[J].中国医学创新,2020,17(24):22-27.
- [5] 赵灿灿.微纳米结构羟基磷灰石对骨髓间充质干细胞成骨分化的调控研究[D].北京:中国科学院大学(中国科学院上海硅酸盐研究所),2018.
- [6] 冷明昊,张卫华,陈东,等.红曲通过激活腺苷酸活化蛋白激酶上调骨形态发生蛋白2表达对去卵巢大鼠骨质疏松症的改善作用[J].中国中医骨伤科杂志,2021,29(3):7-11.
- [7] 郭雨晴.明胶-羟基磷灰石支架材料促进大鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化[D].合肥:安徽医科大学,2020.
- [8] 黄洪超,胡永成,刘凤松,等.骨形态发生蛋白载体的研究与应用[J].中国组织工程研究与临床康复,2007(14):2748-2751.
- [9] 史锐,朱振军,杨永波.高黏度骨水泥弥散程度对老年骨质疏松椎体压缩性骨折患者临床疗效的影响[J].临床医学工程,2020,27(2):187-188.
- [10] 何辉,李雯,刘娟,等.骨形态发生蛋白/维甲酸诱导的神经特异性蛋白3在丙戊酸钠诱导神经干细胞向神经元分化过程中的作用[J].解剖学报,2020,51(6):832-838.
- [11] 刘治军,刘少津,魏合伟,等.补肾健脾活血方干预去势大鼠肌肉骨骼转化生长因子 β /骨形态发生蛋白2信号通路的变化[J].中国组织工程研究,2021,25(14):2219-2223.
- [12] 张飞,党源,薛来恩,等.过表达骨形态发生蛋白4对兔骨髓间充质干细胞增殖与成软骨的影响[J].实验动物与比较医学,2020,40(2):87-94.
- [13] 孙明林,胡蕴玉,贾新斌,等.磷酸钙骨水泥/骨形态发生蛋白复合人工骨的生物相容性[J].第四军医大学学报,2001(11):1006-1009.
- [14] 邱旭升,陈一心,戚晓阳,等.诱导膜技术治疗感染性骨缺损的疗效分析[J].中国修复重建外科杂志,2017,31(9):1064-1068.
- [15] 王锦朝.调控钙含量及复合掺铈硅酸钙和多巴胺改性PLGA微球改进磷酸钙骨水泥的基础性能、成骨性能和可降解性的研究[D].广州:华南理工大学,2020.

收稿日期:2021-04-13;修回日期:2021-05-11

编辑/刘欢