

## rhBMP-2复合牛松质骨载体对兔同种异体眶骨移植愈合影响的实验研究

李春威 陈珺

**[摘要]** 目的 探讨重组人骨形态发生蛋白-2(rhBMP-2)/牛松质骨复合物局部应用对促进兔同种异体眶骨植入眶骨缺损愈合的影响。方法 选择日本大白兔60只,其中15只制备经深低温冷冻同种异体眶骨,45只通过手术造成眶上壁15 mm×5 mm×2 mm大小的骨缺损模型。随机分为实验组、对照组、空白对照组三组,各15只兔。实验组植入同种异体眶骨,同时在植入同种异体眶骨与宿主骨结合部位加入0.4 mg rhBMP-2/牛松质骨复合物,对照组其缺损处植入自体骨,空白对照组植入同种异体眶骨。在术后2周、4周、12周分别处死5只,进行眼眶组织的大体观察、CT检查、组织学检查。结果 三组兔眼眶骨结合部在术后第2、4周愈合情况未见明显差异。实验组和对照组在术后12周植入骨与宿主骨已成一整体。三组术后2周时植入骨与宿主骨结合部骨间隙清晰可见。实验组和对照组在4周时骨间隙已模糊。三组在12周时骨间隙均已消失。实验组在术后2周、4周和12周的植入眶骨与宿主骨结合部平均CT值均高于空白对照组,差异均有统计学意义( $t$ 分别=6.32、11.61、8.79,  $P$ 均 $<0.05$ ),与对照组比较,差异无统计学意义( $t$ 分别=8.46、25.45、2.87,  $P$ 均 $>0.05$ )。三组术后2周植入骨皮质周围的软组织内成纤维细胞大量增生;实验组和对照组在术后4周结合部有大量较成熟骨痂生长,周边可见较多生长活跃的骨细胞,实验组和对照组在术后12周形成新骨及大量成熟的骨小梁结构。结论 rhBMP-2/牛松质骨复合物局部应用对促进兔同种异体眶骨在眶骨组织缺损修复中与自体骨移植形成骨性愈合程度接近,在修复眶骨组织缺损中具有较好效果。

**[关键词]** 同种异体骨; 眶骨组织缺损; 骨移植; 重组人骨形态发生蛋白-2/牛松质骨复合物

**Experimental study of implanting orbital bone allografts with the compound of recombinant human bone morphogenetic protein -2 and cattle cancellous bone in rabbits** LI Chunwei, CHEN Jun. Department of Ophthalmology, Central Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of bone allografts with the compound of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and cattle cancellous bone as implanted materials for restoring orbital bone defect in rabbits. **Methods** Sixty Japanese white rabbits were selected, fifteen were the suppliers of bone allografts in deep cryopreservation, the other 45 Japanese white rabbits were established 15 mm×5 mm×2 mm bone defect models in the superior orbital wall. There were randomly divided into the experimental group, the control group and the blank control group, with 15 rabbits in each group. The experimental group was implanted orbital bone allografts with the compound of rhBMP-2 and cattle cancellous bone. The control group was implanted autogenous orbital bone. The blank control group was implanted orbital bone allografts. After surgery, gross specimen, CT scan, histological examinations were performed at 2 weeks, 4 weeks, 12 weeks respectively. **Results** After 2, 4 weeks, there was no different the degree of orbital bone healing in three groups. After 12 weeks, implanted bone connected with the host bone formed a whole body. After 2 weeks, the implant bone and host bone combined with bone gap clearly visible in the three groups. After 4 weeks, the bone gap has been blurred in the experimental group and the control group. After 12 weeks, the bone gap has been disappeared in the three groups. After 2 weeks, 4 weeks, 12 weeks, the implantation of orbital bone and host bone combined with the average

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2016.05.003

作者单位: 110024 辽宁沈阳, 沈阳医学院附属中心医院眼科

通讯作者: 陈珺, Email: chenjuneye@163.com

CT values in the experimental group were higher than those in the blank control group, differences were statistically significant ( $t=6.32, 11.61, 8.79, P<0.05$ ), there were no statistical significance compared with the

control group ( $t=8.46, 25.45, 2.87, P>0.05$ ). After 2 weeks, there were a lot of fresh callus in implanted bone connected with the host bone in three groups. After 4 weeks, the experimental group and the control group had a large number of mature bone callus growth, the surrounding visible more active bone cells. After 12 weeks, the experimental group and the control group formed new bone and a large number of mature trabecular bone structures. **Conclusion** The degree of forming bone healing between orbital bone allografts with the compound of rhBMP-2 and cattle cancellous bone and autogenous bone in repair of the orbital bone defect is similar, which is rather effective in repair of orbital bone defect in rabbits.

**[Key words]** bone allografts; orbital bone defect; bone transplantation; the compound of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and cattle cancellous bone

在临床上随着外伤、肿瘤增多,眶骨组织缺损日益多见,不仅造成容貌畸形,还会引起眼球功能异常。眼眶整形修复手术是治疗眶骨组织缺损直接而有效的方法,修复材料的选择至关重要,临床上用于修复眶骨组织缺损的材料有自体 and 异体骨组织及合成材料,如自体髂骨、低压冻干异体硬脑膜<sup>[1]</sup>、多孔高密度聚乙烯、钛网、聚乳酸异构体<sup>[2]</sup>等。目前,同种异体骨在长骨、脊椎骨缺损中有较广泛的基础研究和临床应用,而在眶骨缺损中少有研究报告。本次实验将以同种异体眶骨作为眶缺损修复材料,同时加入重组人骨形态发生蛋白-2(recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2)/牛松质骨复合物<sup>[3,4]</sup>用于眶骨组织缺损的修复中,本次实验探索 rhBMP-2/牛松质骨复合物局部应用对促进兔同种异体眶骨植入眶骨缺损愈合的影响。现报道如下。

## 1 材料与方 法

1.1 一般材料 本次实验研究时间为 2015 年 3 月至 2016 年 3 月,采用沈阳医学院实验动物中心提供的健康成年日本大耳白兔 60 只,雄性,体重 2~2.5 kg。随机分为对照组、空白对照组、实验组三组,对照组其缺损处植入自体骨,共 15 只;空白对照组缺损处植入同种异体眶骨,共 15 只;实验组缺损处植入同种异体眶骨,同时在植入同种异体眶骨与宿主骨结合部位加入 0.4 mg rh BMP-2/牛松质骨复合物,共 15 只。三组一般情况比较,差异均无统计学意义( $P$ 均 $>0.05$ )。

### 1.2 方 法

1.2.1 同种异体骨制备 15 只日本大耳白兔,空气栓塞处死。无菌条件下用钢锯条锯下双侧眶骨,去除软组织,0.9%氯化钠注射液冲洗,浸泡于每 100 ml 内含庆大霉素 4 万 U 的 0.9%氯化钠注射液中 30 min,放入无菌塑料袋内,用 60Co- $\gamma$  射线灭菌后,梯度降温,最后将其放入 -70℃深低温冰箱中保存 2 周以后备用。

1.2.2 rhBMP-2/牛松质骨复合物的制备 rhBMP-2 溶于适量 4 mol/L 盐酸胍溶液中,加入定量部分脱钙骨松质骨粒,充分混匀液体与固体成分,真空排气,-70℃冻干保存<sup>[4]</sup>。

1.2.3 眶骨缺损模型制备(手术由同一实验者完成) 兔子予以速眠新注射液 0.2 ml/kg 肌肉注射全麻,2%利多卡因 0.5 ml 眶缘局部皮下浸润麻醉。经兔眶上缘之间皮肤切口,暴露眶缘。切开皮下组织至眶骨膜,切除眶上壁约 15 mm $\times$ 5 mm $\times$ 2 mm 的骨块,制成眶骨缺损模型。

1.2.4 植入材料 对照组将取下的约 15 mm $\times$ 5 mm $\times$ 2 mm 的自体眶骨,重新复位于眶骨缺损处,两端嵌紧,将眶骨膜覆盖骨表面,以 6-0 可吸收缝线间断缝合骨膜及皮下组织,皮肤以 4-0 丝线间断缝合,消毒后,纱布包扎伤口。空白对照组将备用同种异体眶骨放入 37℃0.9%氯化钠注射液中复温 1 h,然后在相应部位取下与眶骨缺损相同大小的骨块,植入缺损处,植入缺损处,两端嵌紧,将眶骨膜覆盖骨表面,切口缝合同对照组。实验组将备用同种异体眶骨放入 37℃0.9%氯化钠注射液中复温 1 h,然后在相应部位取下与眶骨缺损相同大小的骨块,植入缺损处,在植入同种异体眶骨与宿主骨结合部位加入 0.4 mg rhBMP-2/牛松质骨复合物,两端嵌紧,将眶骨膜覆盖骨表面,切口缝合同对照组。

术毕将兔分笼喂养,待清醒后,全身应用庆大霉素 4 万 U 一次。每天切口换药,庆大霉素 2 万 U 肌注,每日二次,共 3 d。

1.3 术后观察 术后定期观察切口愈合情况,有无植入骨移位、感染等并发症。术后 2 周、4 周、12 周分别行 15 只兔眶 CT 检查后,空气栓塞处死,取标本分别检查:①大体标本观察:在新鲜状态下观察骨痂分布、结合部愈合情况。②CT 影像学检查:行眶冠状位 CT 扫描(16 排 CT)。在骨痂愈合区任意 3 点测量 CT 值并取其平均值,观察三组植入骨与宿主

骨结合部的密度差异,了解眶骨缺损处的愈合情况,行眶骨三维重建,观察三组植入骨与宿主骨整体衔接情况。③组织学检查:取出植入的骨组织,常规固定、脱钙、脱水、透明、石蜡包埋,5 $\mu$ m厚度切片。行苏木精-伊红染色,观察植入骨与宿主骨结合部组织变化。

1.4 统计学方法 采用SPSS 17.0统计软件对数据进行处理。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。计量资料比较采用独立样本 $t$ 检验。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 兔眼眶骨结合部大体标本观察结果 术后所有动物切口愈合良好,术后2周,实验组和对照组在均有骨膜包绕、新生血管长入,空白对照组同种异体骨与宿主骨结合疏松,压之有活动感。术后4周,对照组骨膜包绕紧密,植入骨与宿主骨结合紧密,周围可见少量骨痂,压之无活动感;空白对照组植入骨与宿主骨结合较紧密,周围可见少量骨痂。实验组植入骨与宿主骨结合紧密,周围可见少量骨痂,与对照组相似。术后12周,对照组和实验组植入骨与宿主骨结合非常紧密,骨痂塑形,愈合处界线模糊,融合成一整体,对照组好于实验组,空白对照组同种异体骨与宿主骨结合较紧密,周围骨痂少。实验组术后12周兔眼眶骨结合部骨痂分布、结合部愈合情况见封二图1。由封二图1可见,实验组在术后12周,植入骨与宿主骨结合紧密,融合成一整体。

2.2 兔眼眶骨结合部CT影像学检查 术后2周,三组兔眼眶植入骨与宿主骨结合部骨间隙清晰可见;术后4周,对照组和实验组骨间隙已模糊;术后12周,三组骨间隙均已消失。实验组CT三维重建图像显示术后4周移植骨与宿主骨对合良好,但界线清晰可见。实验组术后12周兔眼眶骨结合部CT三维重建图像见封二图2。由封二图2可见,实验组CT三维重建图像显示术后12周界线消失,植入骨与宿主骨已成一整体。

2.3 三组的入眶骨与宿主骨结合部平均CT值结果见表1

表1 植入眶骨与宿主骨结合部平均CT值结果比较

组别	术后2周	术后4周	术后12周
实验组	490.76 $\pm$ 20.97*	609.66 $\pm$ 9.77*	873.62 $\pm$ 19.28*
对照组	644.02 $\pm$ 34.66	786.91 $\pm$ 27.80	917.20 $\pm$ 27.98
空白对照组	437.52 $\pm$ 28.51	533.72 $\pm$ 12.21	705.16 $\pm$ 23.38

注: \*:与空白对照组比较, $P<0.05$ 。

由表1可见,实验组在术后2周、4周和12周的植入眶骨与宿主骨结合部平均CT值均高于空白对照组,差异均有统计学意义( $t$ 分别=6.32、11.61、8.79, $P$ 均 $<0.05$ )。与对照组比较,差异均无统计学意义( $t$ 分别=8.46、25.45、2.87, $P$ 均 $>0.05$ )。

2.4 兔眼眶骨结合部组织学检查 术后2周,三组兔眼眶植入骨皮质周围的软组织内成纤维细胞大量增生,其间可见大量炎细胞浸润;术后4周,对照组结合部有大量较成熟骨痂生长,周边可见较多生长活跃的骨细胞,内有破骨细胞活动。空白对照组结合部骨痂较少,实验组与对照组相似;术后12周,对照组形成新骨及大量成熟的骨小梁结构。空白对照组与实验组相比,结合部骨痂较少。实验组术后12周兔眼眶骨结合部苏木精-伊红染色图见封二图3。由封二图3可见,实验组术后12周植入骨与宿主骨结合部骨痂的结构致密,破骨吸收及成骨活动仍在进行。

## 3 讨论

同种异体骨是目前进行骨移植手术应用较多的骨移植材料<sup>[5]</sup>,采用深低温冷冻和 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照灭菌的方法制备兔同种异体眶骨,在深低温状态和15~25 kGy剂量辐照后<sup>[6]</sup>,酶的活性基本消失,免疫原性基本消失,有利于移植骨的愈合,而且力学强度保持不变。本次实验结果显示兔同种异体骨在眶骨组织缺损修复中与自体骨移植形成骨性愈合程度接近并取得良好的愈合效果,提示该方法处理同种异体骨是可行的。

本次实验大体观察结果显示,实验组和对照组移植骨愈合程度接近,植入骨与宿主骨融合成一整体,说明同种异体骨可以与宿主骨愈合。Vargas等<sup>[7]</sup>对17例患者采用同种异体骨全髋关节置换,随访60个月,通过临床和影像学评价取得令人满意结果。

本次实验的CT观察和测量骨痂愈合区愈合情况显示,术后早期对照组、空白对照组、实验组骨间隙可见,无明显差异。术后12周三组骨间隙消失。CT三维重建图像清晰地显示术后12周植入骨与宿主骨成一整体。实验组、对照组术后测得各期植入骨与宿主骨结合部平均CT值均高于空白对照组( $P$ 均 $<0.05$ ),12周时实验组和对照组骨结合部平均CT值相差最小( $P$ 均 $>0.05$ ),说明rhBMP-2/牛松质骨复合物能够促进同种异体骨与宿主骨3个月内在CT影像学上达到骨性愈合,但要达到自体骨移植的对照组CT值水平可能需要更长的时间。

本次实验组织学检查评价同种异体骨与宿主骨的愈合情况显示,术后4周三组植入骨与宿主骨结合部界线清晰。术后12周,实验组和对照组骨界线消失,说明实验组和对照组术后三个月已形成完全的骨性愈合,但要达到完全的骨性愈合仍需要更长的时间。Enneking等<sup>[8]</sup>对16例同种异体骨干或关节移植后4~65个月进行放射学和组织学观察,发现移植后5年,移植骨仅有20%被新骨替代。修复缓慢的主要原因是移植骨块大。本次实验移植骨块相对小,加之,颜面部血运丰富,有利于移植骨愈合。骨移植理论认为移植骨周围软组织条件的好坏及血运是否丰富影响愈合。Hurley等<sup>[9]</sup>在牛身上证实了覆盖在表面的软组织提供给植骨区营养源和生长因子。本次实验在植入同种异体眶骨与宿主骨结合部位加入rhBMP-2/牛松质骨复合物,就是起到提供给植骨区营养源和生长因子的作用。

目前已证实,当某一部位的骨组织受损时,局部成骨细胞和骨膜骨原细胞的骨生成能力增强且骨折断端在吸收过程中释放出骨基质中的骨形态发生蛋白,骨形态发生蛋白可诱导损伤区域内及周围组织中的未分化间充质细胞分化形成骨组织,以促进骨损伤愈合<sup>[10]</sup>。La等<sup>[11]</sup>实验证实rhBMP-2长期释放能有效地加强新骨形成。本次实验在植骨区加入rhBMP-2/牛松质骨复合物,长期释放rhBMP-2,结果显示实验组和对照组术后12周,移植骨与宿主骨愈合程度接近。

综上所述,rhBMP-2/牛松质骨复合物局部应用可促进兔同种异体眶骨与宿主骨愈合,可能是一种理想的促进同种异体眶骨移植愈合的生长因子。

#### 参考文献

- Iatrou I, Theologie-Lygidakis N, Angelopoulos A, et al. Use of membrane and bone grafts in the reconstruction of orbital fractures[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2001, 91(3): 281-286.
- Al-Sukhun J, Lindqvist C. A comparative study of 2 implants used to repair inferior orbital wall bony defects: autogenous bone graft vs bioresorbable poly-L/DL-lactide [P(L/DL)LA 70/30] plate[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2006, 64(7): 1038-1048.
- Aro HT, Govender S, Patel AD, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2: a randomized trial in open tibial fractures treated with reamed nail fixation[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2011, 93(9): 801-808.
- 胡蕴玉, 陆裕朴, 刘玮, 等. 重组合异种骨的实验研究与临床应用[J]. *中华外科杂志*, 1993, 31(9): 709-713.
- von Garrel T, Gotzen L. Allogeneic bone transplantation and bone banking [J]. *Unfallchirurg*, 1998, 101(9): 713-727.
- Hilmy N, Febrida A, Basril A, et al. Validation of radiation sterilization dose for lyophilized amnion and bone grafts[J]. *Cell Tissue Bank*, 2000, 1(2): 143-148.
- Vargas B, Caton J. Acetabular revision with freeze-dried irradiated and chemically treated allograft: a minimum 5-year follow-up of 17 cases[J]. *Inter Orthop*, 2009, 33(1): 35-39.
- Enneking WF, Mindell ER. Observations on massive retrieved human allografts[J]. *J Bone Joint Surg*, 1991, 73(8): 1123-1142.
- Hurley LA, Stinchfield FE, Bassett AL, et al. The role of soft tissues in osteogenesis: an experimental study of canine spine fusions[J]. *J Bone Joint Surg*, 1959, 41(A): 1243-1254.
- 胡蕴玉. 现代骨科基础与临床[M]. 人民卫生出版社, 2006. 119-120.
- La WG, Kang SW, Yang HS, et al. The efficacy of bone morphogenetic protein-2 depends on its mode of delivery[J]. *Artif Organs*, 2010, 34(12): 1150-1153.

(收稿日期 2016-07-17)

(本文编辑 蔡华波)