

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)02-0160-04

# 深低温冷冻对 rhBMP-2 诱导犬气管移植体软骨再生的影响

闫小龙, 李小飞, 刘勇, 卢强, 王律 (第四军医大学唐都医院胸外科, 陕西西安 710038)

## Effect of cryopreservation on rhBMP-2 induced regeneration of dog's tracheal cartilage

YAN Xiao-Long, LI Xiao-Fei, LIU Yong, LU Qiang, WANG Lu

Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

**【Abstract】** AIM: To confirm the validity and potential application of implanting the recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) with collagen into the cryopreserved tracheal allografts to induce the regeneration of dog's tracheal cartilage. METHODS: Thirty-two mongrel dogs were randomly and equally divided into 4 groups. Five-ring cervical tracheal segment was harvested as the allograft and all the grafts were wrapped with pedicled omentum. Group A was subdivided into group A1, in which RhBMP-2 with collagen as a carrier was injected into the soft tissues between cartilaginous rings of the grafts, and group A2—the blank group. Group B, in which the grafts were cryopreserved for two months before the operation, was also subdivided into group B1 and group B2. The animals were sacrificed 8 weeks postoperation. The postmortem specimens were examined grossly and histologically. Area of new cartilage was studied in each allografts. RESULTS: Structural integrity of the allografts was better in group B than in group A. In all the groups, new cartilage was induced in the rhBMP-2 injected area and more new cartilage was observed in group B1 than in group A1. CONCLUSION: rhBMP-2 has the ability to induce new cartilage formation in the cryopreserved tracheal allografts. Cryopreserved tracheal allografts have better new cartilage inducing effect than noncryopreserved tracheal allografts.

**【Keywords】** trachea; transplantation; cryopreservation; graft rejection; bone morphogenetic proteins

**【摘要】**目的: 研究应用重组人骨形态发生蛋白-2 (rhBMP-2) 胶原缓释系统诱导犬冷冻气管移植体软骨再生的作用。

收稿日期 2004-06-18; 修回日期 2004-09-06

基金项目 国家自然科学基金资助项目(39970707)

通讯作者 李小飞, Tel. (029) 83377437 Email. lxfchest@fmmu.edu.cn

作者简介 闫小龙(1976-), 男(汉族), 黑龙江省伊春市人, 硕士, Tel. (029) 83375437 Email. yxl.cn@163.com

方法: 将 32 只杂种犬随机等分为 4 组, 行 5 个颈部气管环原位异体移植, 带血管蒂大网膜包绕。A 组为未冷冻组, 气管环间植入 rhBMP-2/胶原组标记为 A1 组, 空白对照标记为 A2 组。B 组术前将移植体气管经深低温液氮保存 2 mo, 处理同 A 组, 分别标记为 B1、B2 两组。所有实验犬于术后 8 wk 处死, 行大体及病理学检查, 评测各组新生软骨面积。结果: B 组犬移植气管结构保持较好, 狭窄程度低。4 组均有软骨再生, B1 组新生软骨面积 1835.9(527.2) 高于 A1 组 1408.5(492.6) 及 B2 组 336.8(121.3), 各组新生软骨面积差异有显著性 ( $\chi^2 = 24.010$ ,  $df = 3$ ,  $P < 0.01$ )。结论: 应用 rhBMP-2 可刺激冷冻气管移植体软骨再生, 其刺激深低温冷冻犬气管移植体成骨效果优于未冷冻气管移植体。

**【关键词】** 气管移植; 低温保藏; 移植物排斥; 骨形态发生蛋白质类

**【中图分类号】** R734.2

**【文献标识码】** A

## 0 引言

气管置入保护液进行长期深低温冷冻保存, 可以明显降低气管的抗原性<sup>[1,2]</sup>, 避免了异体移植后的排斥反应, 术后可不用免疫抑制剂, 但在液氮中冷冻超过 2 mo 后气管软骨细胞数会降为原来的 65% ~ 75% 之间<sup>[3,4]</sup>, 且移植后由于缺血及轻微的慢性排斥反应, 气管移植体的软骨会被进一步损伤<sup>[5]</sup>。我们根据以往气管移植系统研究的思路<sup>[6,7]</sup>, 应用重组人骨形态发生蛋白-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2) 胶原缓释系统植入深低温冷冻的犬气管移植体诱导软骨再生, 试图抵抗冷冻对气管移植体的损伤, 从而最大程度保持冷冻移植体的生理结构和功能。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择西安地区健康成年杂种犬 32 只, 均为雄性, 体质量 15 ~ 20 kg。① rhBMP-2 由第四军医大学西京医院全军骨科研究所提供, 小鼠肌袋生物学活性试验证实 rhBMP-2 诱导成骨活性良好; ② 胶原的制备: 根据文献<sup>[8]</sup>方法, 用胃蛋白酶液消化新鲜牛腱, 经纯化后获得 I 型胶原溶液, 冻干保存备用; ③ rhBMP-2/胶原缓释系统的制备: 取 560 mg 胶原冻干品, 溶于适量 0.01 mol/L 盐酸溶液, 将 pH 值调至 5, 使其成为

较黏稠的液体。rhBMP-2 干粉 112 mg 溶于适量灭菌水后,将其倒入制备好的胶原溶液中,持续搅拌直至 rhBMP-2 与胶原充分混匀。再将此 rhBMP-2/胶原溶液均匀分成 28 份,冻干,冻干品呈白色海绵状。均用环氧乙烷消毒后,密封保存于 4℃ 下备用。使制备的每份复合物含 rhBMP-2 为 4 mg,胶原 20 mg ④ 冷冻保护液:以 RPMI 1640 培养液为培养基,在洁净工作台内配制冷冻保护液,其他成分和浓度分别为 200 g/L 胎牛血清,100 g/L 二甲基亚砷,100 000 U/L 青霉素,100 mg/L 链霉素和 200 mg/L 二性霉素 B。

## 1.2 方法

1.2.1 动物分组 将 32 只杂种犬随机等分为 4 组。A 组为未冷冻组,气管环间植入 rhBMP-2/胶原组标记为 A1 组,空白对照标记为 A2 组;B 组术前将移植体气管经深低温液氮保存 2 mo,处理同 A 组,即气管环间植入 rhBMP-2/胶原组标记为 B1 组,气管环间未植入 rhBMP-2/胶原组标记为 B2 组。

1.2.2 异体气管冷冻准备 切取犬颈部 5 个环的气管段,经生理盐水冲洗,并在 200 000 U/L 青霉素和 200 mg/L 庆大霉素溶液中浸泡 3 min 后用于即刻移植。B 组先将供体气管放入无菌生物冷冻袋,使气管浸没于冷冻保护液中,置于 4℃ 冰箱冷平衡 20 min,再于程控降温仪的冷冻箱中程序降温,降温速率 1℃/min,至 -80℃ 后投入液氮保存 2 mo。移植前将冷冻袋从液氮中取出,置于 37℃ 恒温水浴箱内,轻轻摇动,使气管段均匀快速解冻复温。

1.2.3 气管移植手术 速眠新(0.15 mg/kg) im 全身麻醉。仰卧位固定于手术台上,经口气管插管,自主呼吸。颈部正中纵形切口,长约 10 cm。分离皮下及肌肉组织显露颈段气管,切开气管前筋膜,切取 5 个环气管段。A1、A2 两组同时开始手术,术中交换气管移植体,行即刻移植。B 组供体气管复温后反复冲洗其上残留的冷冻保护液,各组供体气管移植前均经大量生理盐水冲洗 1 min,浸泡于 200 000 U/L 青霉素和 200 mg/L 庆大霉素混合溶液中 2 min。所有移植体各环间均匀植入 rhBMP-2/胶原载体复合物,方法见下述。用 3~0 无损伤缝合线于移植体与受体气管断端行褥式吻合,将其移植于缺损气管处。同时腹正中切口,游离大网膜,并将大网膜沿皮下隧道提至颈部,包绕气管移植体及上下吻合口。逐层缝合颈部及腹部切口。

1.2.4 rhBMP-2/胶原载体复合物植入方法 取上述 rhBMP-2/胶原载体复合物 1 份,用灭菌用水溶解至 4 mL,抽吸入 5 mL 注射器内。依据分组情况,采用多点环形注射方法,注射移植体各软骨环间隙内。4 个软骨环之间的软组织内各注射入 rhBMP-2/胶原载体复

合物 1 mL。

1.2.5 术后处理及取材时间 动物均于术后立即予青霉素 im,术后第 1 日起 im 青霉素 800 000 u,每日两次,共 7 d,并接受相同喂养。均于术后 2 mo 处死观察。

## 1.3 观察指标

1.3.1 动物存活情况 各组动物术后生存状况,如有无切口感染、呼吸困难等现象;各实验动物的存活时间,未达到预杀期动物的详细死亡原因。

1.3.2 大体改变 达到预杀期的 30 只实验犬处死后立即取材,40 g/L 甲醛溶液中固定,观察大网膜组织与移植体气管结合状况及移植体气管的生长状况。

1.3.3 组织学观察 将各组动物的气管移植体标本的软骨部纵形取材,经软骨脱钙、脱水、固定、石蜡包埋及切片,均行 HE 染色,光镜下观察。

1.3.4 定量组织学测定新生软骨面积 应用 HPIAS-1000 彩色病理图像分析仪测定移植体新生软骨的面积。取上述组织学切片,以 4 个 rhBMP-2/胶原载体复合物植入区为测定区。

统计学处理:用 Kruskal-Wallis 非参数检验方法(方差不齐)及多个独立样本两两比较的 Nemenyi 法检验,比较组间新生软骨面积, $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

2.1 生存状况和存活率 A1、B2 组中各有 1 只实验犬术后未存活至 2 mo,30 只实验犬存活达到预杀期。均未发生切口感染等并发症。A1 组中有 2 只犬,A2 组中有 3 只在达到预杀期前略有呼吸困难,其余各组犬无明显呼吸困难。

2.2 大体改变 B 组动物标本表现较 A 组好。4 组移植体外覆的大网膜血管丰富,网膜组织与移植体气管粘连紧密。A 组各犬移植体管壁增厚,管腔明显狭窄均超过 50%,B 组移植体管腔通畅,气管狭窄均未超过 50%(Fig 1A);轻微的狭窄均因吻合口瘢痕增生所致,各软骨环间肉眼下均未见到新生软骨组织。

2.3 病理学检查结果 A 组标本管腔内只有在距吻合口 0.5 cm 处见少量上皮分化为稀疏的柱状纤毛上皮,黏膜下层增厚明显,可见大量的肉芽组织增生,见大量软骨错位明显,软骨间见大量浸润的淋巴细胞和单核细胞,B 组标本管腔内布满密集的柱状纤毛上皮,两组黏膜下层及软骨层见少量淋巴细胞、单核细胞浸润,软骨层厚度轻度变薄,未见明显变形。A1、B1 组标本环间见大量间充质细胞聚集,并可见软骨及软骨岛形成(Fig 1B,1C,1D),而 A2、B2 组标本环间少

见间充质细胞聚集,无软骨及软骨岛形成。A组均有软骨膜下成骨,但未见质与量上明显差别。

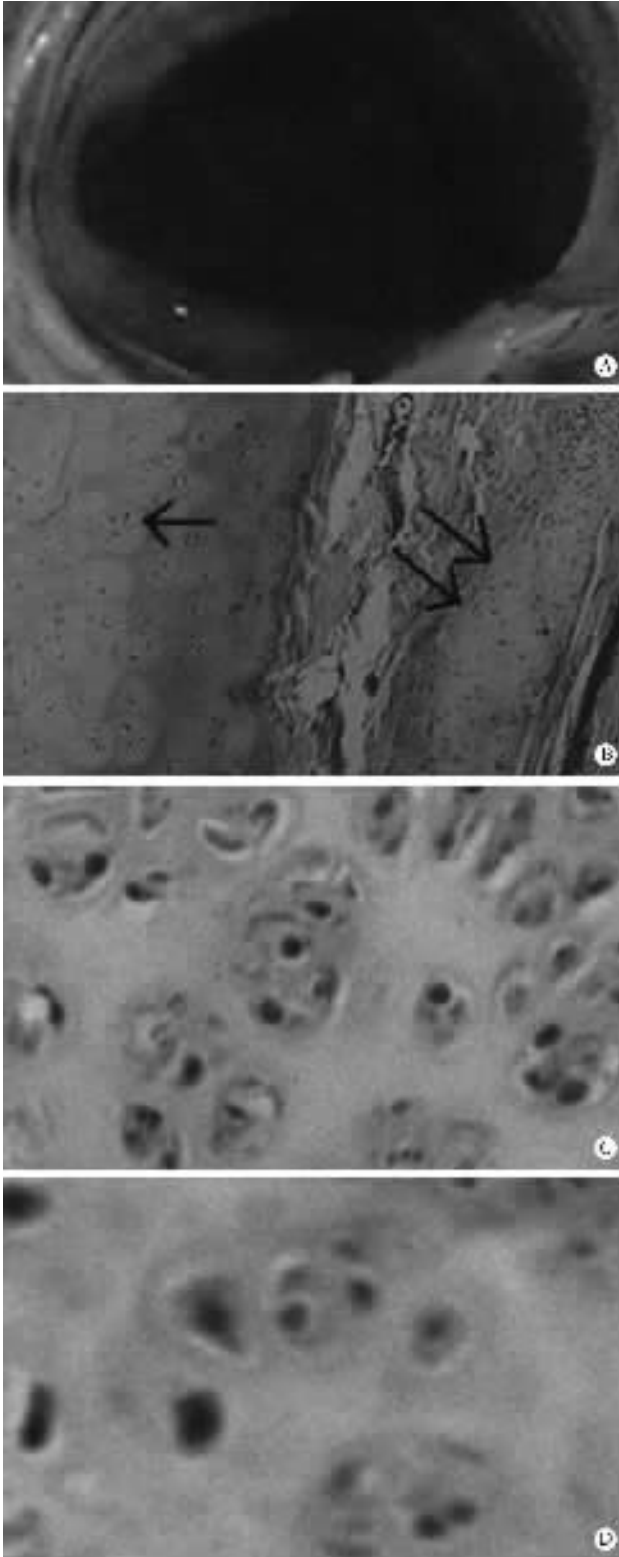


Fig 1 rhBMP-2 inducing cryopreserved tracheal allografts had normal appearance without obvious shrinkage or necrosis. B: New cartilage island in the cryopreserved tracheal allografts,  $\times 100$ ; C: New cartilage in the cryopreserved tracheal allografts,  $\times 400$ ; D: New cartilage in the noncryopreserved tracheal allografts  $\times 400$ .

图1 植入BMP气管移植术后大体及镜下情况

2.4 定量组织学结果 将各组织切片在统一的倍数下观察,计算各环间成软骨的像素面积。用 Kruskal-Wallis H 非参数检验(方差不齐)及多个独立样本两两比较的 Nemenyi 法检验,比较新生软骨面积(Tab 1)。4组间整体比较差别有显著性( $\chi^2 = 24.010$ ,  $df = 3$ ,  $P < 0.01$ )。两两比较:A1与A2、B1与B2有显著性( $\chi^2 = 29.312$ ,  $P < 0.01$ ,  $\chi^2 = 34.095$ ,  $P < 0.01$ )。而且A1组与B1组间比较差异有显著性( $\chi^2 = 12.558$ ,  $P < 0.05$ )。

表1 各组移植体处理情况及软骨新生情况

Tab 1 Treatment and area of new cartilage in each group

Group	Cryopreserved	BMP implanted	n	Area of new cartilage MD(QR)
rhBMP-2(A1)	\	4 mg	7	1408.5(492.6)
Control(A2)	\	\	8	313.1(132.7)
rhBMP-2(B1)	2 mo	4 mg	8	1835.9(527.2)
Control(B2)	2 mo	\	7	336.8(121.3)

### 3 讨论

冷冻气管移植虽然还主要处在动物实验的阶段,但动物实验结果<sup>[1,2,5,8,9]</sup>证实冷冻气管移植具有保持气管活性,降低免疫原性,可使气管移植体长期保存的优点,个别临床成功的报道,更使气管移植领域展现了乐观的前景。长段气管移植再血管化的完善,又为冷冻气管移植打下了一个坚实的基础。

软骨是对气管起结构支撑作用的组织,保持软骨结构的完整性在气管移植领域中至关重要。随着使移植体再血管化方法的成熟,软骨移植术后坏死、软化的几率已大大降低。冷冻气管移植抗原性的降低主要是以损伤部分气管组织活性为代价的, Moriyma H<sup>[10]</sup>等通过动物实验表明移植体在冷冻30 d后移植体软骨细胞数略有减少,冷冻60 d后移植体软骨细胞数只减少20%。Kushibe K等<sup>[4]</sup>通过 $Na_2^{35}SO_4$ 融合实验对大鼠气管移植体进行研究得出结论:热缺血对气管移植体软骨的影响大,6 h的热缺血时间使软骨细胞活性数降为新鲜气管软骨细胞数的一半,而12 h后软骨活性细胞数仅为原来的1/3。在液氮中冷冻2 mo后气管软骨细胞数会降为原来的65%~75%之间,后又证实冷冻1,2,3,6,9,12 mo后气管软骨细胞的活性均为原来的65%~75%之间。所以,对于更加有效促进上皮及软骨的再生的研究将是气管移植领域的重点,本课题设计利用BMP的成骨特性,

借助以往气管软骨再生的研究思路<sup>[6,7]</sup>,设计观察观察冷冻异体气管移植软骨的再生,针对冷冻损伤软骨这一事实,克服移植体气管的塌陷,异体气管移植体萎缩等现象。

我们在实验中观察到了异体移植后,BMP在冷冻异体移植组比在单纯异体气管移植中要多。其原因可能是与BMP所处的环境不同有密切关系。BMP虽具有良好诱导成骨活性,但是它所存在的成骨微环境却极大地影响着它的作用效果<sup>[11,12]</sup>。单纯异体移植后排斥反应明显,导致局部炎症反应较重,而冷冻异体移植组可以有效地降低气管移植体的排斥反应,为BMP的成软骨提供了较为理想的环境,从而更加有利于BMP的有效成骨。初步研究可证明BMP在深低温冷冻犬气管移植体内均可诱导软骨再生,而且其作用效果不同。深低温冷冻犬气管移植体成骨效果优于未冷冻组。

#### 【参考文献】

- [1] Mukaida T, Shimizu N, Aoe M, *et al.* Experimental study of tracheal allotransplantation with cryopreserved grafts [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1998 116(2): 262-266.
- [2] Tomohiro Murakawa, Jun Nakajima, Noboru Motomura, *et al.* Successful allotransplantation of cryopreserved tracheal grafts with preservation of the pars membranacea in nonhuman primates [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002; 123(1): 153-160.
- [3] Kushibe K, Tojo T, Sakaguchi H, *et al.* Assessment of cartilage viability in the cryopreserved tracheal allograft by measurement of Na<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub> incorporation [J]. *Transplant Proc*, 2000; 32(7): 1655-1656.
- [4] Kushibe K, Takahama M, Nezu K, *et al.* Assessment of cartilage viability in long-term cryopreserved tracheal allograft [J].

*Transplant Proc*, 2001 33: 625-626.

- [5] Nakanishi R, Onitsuka T, Yasumoto K, *et al.* The immunomodulatory effect of cryopreservation in rat tracheal allotransplantation [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2002 21(8): 890-898.
- [6] 李小飞,程庆书,王道喜,等. 自体气管移植软骨再生的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2003 20(9): 833-834.
- Li XF, Cheng QS, Wang DX, *et al.* Regeneration of autografted cartilage in dog's tracheal transplantation [J]. *Chin J Exp Surg*, 2003 20(9): 833-834.
- [7] 李小飞,程庆书,王道喜,等. 骨形态发生蛋白诱导的自体及异体气管移植体软骨再生的比较 [J]. *第四军医大学学报*, 2003; 24(3): 203-205.
- Li XF, Cheng QS, Wang DX, *et al.* A comparative study on cartilage regeneration of dog's auto- and allo-transplanted trachea induced by bone morphogenetic protein [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2003; 24(3): 203-205.
- [8] Tojo T, Niwaya K, Sawabata N, *et al.* Tracheal replacement with cryopreserved tracheal allograft: Experiment dogs [J]. *Ann Thorac Surg*, 1998 66: 209-213.
- [9] Kunachak S, Kulapaditharom B, Vajaradul Y, *et al.* Cryopreserved, irradiated tracheal homograft transplantation for laryngotracheal reconstruction in human beings [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2000 122: 911-916.
- [10] Moriyama H, Sasajima T, Hirata S, *et al.* Revascularization of canine cryopreserved tracheal allografts [J]. *Ann Thorac Surg*, 2000 69: 1701-1706.
- [11] Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, *et al.* Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2000 29(1): 62-66.
- [12] Grillo HC. Tracheal replacement [J]. *Ann Thorac Surg*, 2002 73(6): 1995-2004.

编辑 王小仲

#### · 期刊文摘 · 封闭负压引流技术对失感觉神经支配创伤愈合中 Bcl-2 与 NGF/NGFmRNA 表达的影响

[ 汤苏阳,陈绍宗,胡昭华,宋 玫,曹大勇,吕晓星. *中华整形外科杂志* 2004 20(2): 139-142 ]

目的:研究封闭负压引流技术(vacuum-assisted closure, VAC)对失感觉神经支配的创面愈合过程中 Bcl-2 与 NGF 表达的影响。方法:将 80 只 SD 大鼠随机分成 4 组(每组 20 只)即实验组(T 组):施加 VAC 的失去神经支配创面;对照组 1(C1):未施加 VAC 的失去神经支配的创面;对照组 2(C2):施加 VAC 的正常神经支配的创面;对照组 3(C3):未施加 VAC 的正常神经支配的创面。T、C2 组施加间断性 VAC 每日 3 次,负压 10.64 kPa。伤后 1、3、6、9、12 d 4 组同时取材,采用免疫组化和原位杂交检测各组各时间点 Bcl-2 与 NGF/NGF mRNA 表达。结果:在伤后 C2 组、C3 组 Bcl-2 与 NGF/NGF mRNA 表达明显,水平逐渐升高,至第 9 日达最高,然后降低,C2 组较 C3 组 Bcl-2 和 NGF/NGF mRNA 维持相对高的状态( $P < 0.05$ )。T、C1 组创缘和肉芽组织中 Bcl-2 与 NGF/NGF mRNA 表达相对 C2、C3 组处于较低水平( $P < 0.05$ )。结论:VAC 通过增强创面组织抑制凋亡相关基因蛋白的表达,影响内源性 NGF 表达,具有明显的促进创面愈合的作用。