

# rhBMP-2、胶原、珊瑚复合骨诱导骨形成生物活性的实验研究

马 秦 毛天球 刘宝林 戴毅敏 韩 亮

**摘要** 目的:研究珊瑚、胶原、rhBMP-2 复合骨异位诱导新骨形成的活性和载体在体内降解情况。方法:选择珊瑚和型胶原作为 rhBMP-2 的载体,采用肌袋异位成骨的动物模型,通过大体、组织学观察、组织测量等手段,研究复合骨诱导新骨形成的特点、珊瑚降解的过程。结果:rhBMP-2、珊瑚和胶原复合骨诱导骨组织形成,在一定范围内随作用时间延长新骨形成量持续增加,其中 rhBMP-2 含量高时,早期新骨形成快,成骨量大,珊瑚对照组中珊瑚降解较其他组快。结论:rhBMP-2、胶原、珊瑚复合骨具有骨引导性和骨诱导性,珊瑚和胶原在体内可降解。

**关键词** 诱导成骨 骨形成蛋白 骨组织

## The Experimental Study on the Activity of rhBMP-2, Coral and Collagen Composites Inducing Intramuscle Bone

Ma Qin, Mao Tianqiu, Liu Baolin, et al

College of Stomatology, the Fourth Military Medical University

### Abstract

**Objective:** To investigate the ectopic bone induction activity of the composite of coral, collagen and rhBMP2, and the degradation of the carriers of rhBMP2. **Methods:** The composites of rhBMP2, coral and collagen were implanted into the muscle pouches of mice. The mice were divided into the following four groups. Group H: each composite had 2 mg rhBMP2, Group L: each composite had 0.5 mg rhBMP2, Group J: each composite had only type collagen, Group C: only coral was implanted in the muscle of mouse. Each group had 20 mice. Every 5 mice in each group were killed postoperatively after 1, 2, 4 and 8 weeks. The ectopic osteoinductive activity was assessed with histology and histomorphometry. The point counting method was applied to measure the formation of new bone and cartilage and the degradation of coral in the composites. The data was analyzed statistically using *t* test. **Results:** There was no obvious morbidity in any of the animals in this study, and no wound infection, bleeding, or feeding difficulties postoperatively. The samples were examined histologically. Cartilage and bone induction occurred in Group H and L. After 1 Week, new bone was observed in Group H, and cartilage formation occurred mainly in Group L. After 2 weeks, both cancellous bone and bone marrow elements were present in Group H and L. New bone formation was not uniform throughout the specimen. Part of the coral in the composites was not absorbed between 2 to 4 weeks postoperatively. At the 8th week, the coral in the composite was absorbed completely. While in Group J and C there was not any new cartilage or bone formation. According to the statistical analysis, bone formation occurred 2 weeks earlier in Group H than in Group L after operation. From 4 postoperative weeks, no difference of the bone formation rate was observed between Group H and Group L. The degradation rate of coral in Group C was the fastest among the four groups. **Conclusion:** The composites of rhBMP-2, coral and collagen are degradable bone substitutes with bone induction and conduction, and induce dosedependent and time dependent amounts of intramuscle bone in mice during limited postoperative period. The coral in the composites could be absorbed completely.

**Key words:** bone induction BMP bone tissue

珊瑚作为一种可吸收的骨代用品,在临床上用

于修复骨缺损已有十多年,显示出良好的生物相容性和骨引导性,但珊瑚在体内吸收过快,新骨形成量不够,修复效果常不理想。为提高珊瑚的成骨

量,本研究将珊瑚、型胶原与重组人骨形成蛋白-2(rhBMP-2)复合,制成复合骨,选用小鼠股部肌袋异位成骨的动物模型,并以胶原珊瑚复合物和单纯珊瑚分别作为对照,观察研究 rhBMP-2、胶原、珊瑚复合骨诱导新骨形成的生物活性、成骨及珊瑚吸收过程。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要实验材料及制备

以海南产滨珊瑚为原料,制备成直径 5 mm,厚 1 mm 的圆片,放入 5%次氯酸钠溶液浸泡 72 h,流水冲洗 24 h,蒸馏水、无水乙醇超声清洗,置 80 °C 干燥箱内 24 h,孔径为 150~200 μm,高压消毒备用。

### 1.2 rhBMP-2、型胶原、珊瑚复合人工骨的制备

实验组分 2 组,低剂量 BMP 组(L 组):每个圆片与 0.5 mg rhBMP-2、0.1 ml 型胶原凝胶复合,真空抽干;高剂量 BMP 组(H 组):每个圆片与 2 mg rhBMP-2、0.1 ml 型胶原凝胶复合,真空抽干;对照组分 2 组,胶原珊瑚对照组(J 组):每个圆片与 0.1 ml 型胶原凝胶复合,真空抽干;珊瑚对照组(C 组):清洗后的珊瑚圆片。所有圆片于术前用环氧乙烷(EO)消毒。型胶原购自北京革瑞德生物制品公司,用牛肌腱制备;rhBMP-2 由北京军事医学科学院基础医学研究所提供<sup>1</sup>。

### 1.3 实验动物分组及手术

第四军医大学动物中心提供的昆明小鼠 80 只,雄性,8~10 周龄,平均体重 25 g ± 1.5 g,随机分为 4 组,H 组、L 组、J 组和 C 组。乙醚吸入麻醉后,左股部脱毛、消毒,切开皮肤、皮下,沿股部肌组织间隙钝性分离,按上述分组,分别将材料植人间隙,缝合伤口。小鼠按每笼 5 只饲养。术后 1、2、4 和 8 周各处死小鼠 5 只,取材,将标本固定于 10%福尔马林液中。

### 1.4 观测指标

标本大体观察。组织学观察,固定标本经脱钙液脱钙,脱水,石蜡包埋,切片作 HE 染色,光镜观察。组织学形态测量,采用点数法<sup>2</sup>(point counting),用显微测微尺 C5 型网格,在 40 倍光镜下测定 HE 染色标本中骨或软骨组织、材料所占比例。每标本选 2 张切片,从边缘至中心逐段测量,数据作团体 *t* 检验分析。

## 2 结果

### 2.1 肉眼观察

术后小鼠均存活,饮食正常,伤口无感染、裂开。1 周:标本均为纤维组织包裹,珊瑚无吸收,H 组、L 组植入物表面可见半透明的骨样结节,H 组标本血供更丰富,J、C 组标本未见骨样结节。2 周:

H、L 组标本呈骨组织样,J、C 组仍为纤维组织包裹的植入物。4 周:H、L 组标本呈骨块状,J、C 组为纤维组织包裹的植入物,珊瑚有部分吸收。8 周:H、L 组中,标本已完全为骨组织,J、C 组珊瑚及胶原均完全吸收,植入材料部位仅见到纤维结缔组织。

### 2.2 组织学观察

所有切片都可见未被吸收的珊瑚因脱钙溶解所占据的空间,空间中的纤维组织长入珊瑚孔洞内。1 周:H 组可见成骨细胞、骨基质、软骨细胞、软骨基质,新骨组织呈多个片状编织骨,主要位于珊瑚表面,少量骨组织和软骨组织长入珊瑚孔洞内(图 1);L 组所见主要是软骨组织,位于珊瑚表面(图 2);J、C 组可见珊瑚脱钙后,原孔洞为纤维组织占据。2 周:H 组骨组织分化成熟,可见大量板层骨、骨髓腔,未见软骨组织,部分珊瑚吸收,为骨组织替代;L 组可见大量编织骨组织,呈多个片状,珊瑚已有吸收;J、C 组未见矿化组织,珊瑚有吸收,孔洞内长满纤维结缔组织,4 周:H、L 组中可见大量成熟骨组织,进一步占据珊瑚吸收后遗留的空间(图 3);J、C 组珊瑚进一步吸收,C 组剩余珊瑚量少于 J 组,未见软骨或骨组织(图 4);8 周:H、L 组已完全为成熟骨组织,载体材料已全部吸收;J、C 组仅见到纤维结缔组织,材料完全吸收。各时间点,各组标本组织切片均未观察到组织排斥反应和过敏反应。

### 2.3 组织形态测量

组织学测量骨和软骨及材料所占比例见表 1、2。

表 1 组织学测量各组骨和软骨组织所占比例 ( $\bar{x} \pm s, \%, n=5$ )

时间点	H	L	J	C
1 周	26.3 ± 1.8 **	13.4 ± 1.4	0	0
2 周	44.7 ± 2.0 *	37.3 ± 2.2	0	0
4 周	61.8 ± 1.7	58.4 ± 1.1	0	0
8 周	100	100	0	0

4 个时间点 H 与 L 组间作 *t* 检验,  
\*\* *P* < 0.01, \* *P* < 0.05

表 2 组织学测量各组材料所占比例( $\bar{x} \pm s, \%, n=5$ )

时间点	H	L	J	C
1 周	37.6 ± 1.6	39.2 ± 1.1	41.2 ± 1.6	40.6 ± 1.7
2 周	31.3 ± 2.0	36.1 ± 1.3	37.7 ± 2.1	34.5 ± 1.4
4 周	24.7 ± 1.6	26.3 ± 1.7 *	28.8 ± 0.7 *	18.2 ± 1.0
8 周	0	0	0	0

每个时间点各组间作 *t* 检验,其中 L 与 C、J 与 C 组间相差显著 *P* < 0.05

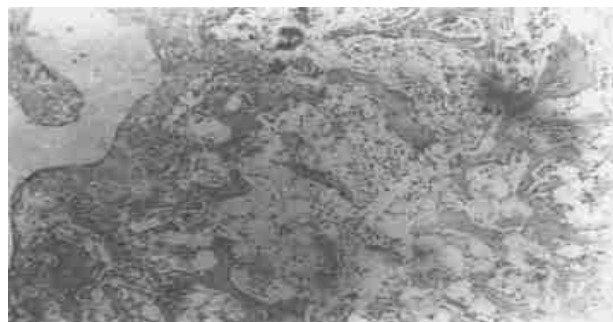


图1 H组小鼠肌组织中植入复合骨1周,可见骨、软骨组织及珊瑚占据的空间 HE ×40

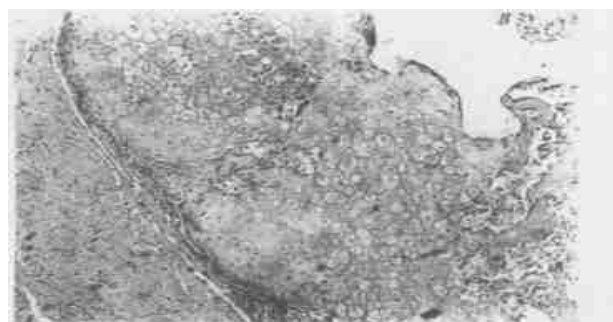


图2 L组小鼠肌组织中植入复合骨1周,可见大量软骨组织及珊瑚占据空间 HE ×40



图3 H组小鼠肌组织中植入复合骨4周,可见大量骨组织及珊瑚占据空间 HE ×40

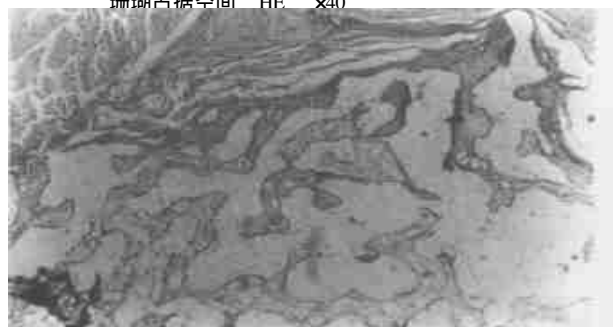


图4 单纯珊瑚对照组小鼠肌组织中植入珊瑚4周,仅见纤维组织和珊瑚占据的空间 HE ×40

### 3 讨 论

BMPs 是一类特殊的骨生长因子,在一定的环

境条件下,可诱导未分化间叶细胞、骨髓中的骨母细胞分化成为成软骨细胞和成骨细胞,进而诱导软骨和骨的形成。1988年国外有学者运用基因工程手段,在真核细胞中克隆获得人基因重组骨形成蛋白1~4,以后陆续克隆获得了BMP家族中的其它因子,rhBMP-2被认为是BMP家族中诱导骨形成活性很高的生长因子。1994年,中国学者在大肠杆菌中成功表达并获得了高活性的rhBMP-2<sup>1</sup>。本文作者在实验中,采用中国学者在大肠杆菌中表达并获得的高活性rhBMP-2,以珊瑚和型胶原为载体,在小鼠肌间隙植入后,诱导软骨和骨组织形成,证明了rhBMP-2的异位诱导骨形成的特性。

尽管BMP有独特的异位成骨的生物学活性,选择适当的BMP载体仍很重要。目前被选作BMP载体的生物材料有多种,无机类如羟基磷灰石、珊瑚转化的羟基磷灰石、石膏、生物活性玻璃、磷酸三钙及珊瑚等,其中磷酸三钙、珊瑚在体内可降解。有机类包括两类,生物类如非活性脱矿骨基质、胶原、纤维蛋白和去抗原的异体骨;合成类如聚乳酸类。珊瑚产于热带海域,资源丰富,主要成分是碳酸钙,几何结构呈多孔状,类似松质骨的结构,具有良好的生物相容性,易于塑形,在体内可逐步降解。自70年代末,有学者就开始研究珊瑚作为骨代用品的可行性,以后逐渐应用于临床治疗骨缺损。目前的BMP载体材料已有许多种,均有各自的优缺点。将多种材料合成,发挥优点,弥补不足,成为BMP的复合载体。王大章等<sup>3</sup>将羟基磷灰石(HA)和胶原复合,作为BMP的复合载体,修复兔的桡骨节段缺损,结果优于无BMP的载体组。羟基磷灰石起到支架作用,胶原一方面可防止HA移动,还可防止BMP过快吸收,起到缓释的作用。Gao等<sup>4,5</sup>分别采用型胶原与HA、型胶原与珊瑚作BMP的载体,修复麋鹿的胫骨缺损。

胶原是一种由动物细胞合成的高分子蛋白质,广泛存在于所有哺乳动物的皮肤、骨骼、肌腱和韧带中。胶原在临床应用已有多年,主要用于止血、促进伤口愈合、骨移植代用品等。胶原作为BMP的载体,可用于修复骨缺损。Zellin等<sup>6</sup>用胶原膜作rhBMP-2的载体,修复大鼠下颌骨缺损。笔者采用珊瑚和型胶原作为rhBMP-2的载体,在研究中发现,胶原可延缓珊瑚在体内降解的时间。另外,胶原凝胶在与珊瑚的抽干复合的过程中,形成的胶

原膜覆盖于粗糙的珊瑚微孔表面,有利于细胞的附着和组织的生长,利于新骨组织的形成。

从本文研究结果可见,rhBMP-2、型胶原和珊瑚复合人工骨在肌袋内诱导骨形成的过程是类似软骨成骨的过程。rhBMP-2作用1周时,可见软骨组织,高剂量的rhBMP-2在作用1周时,已可见到较多的骨组织,随着作用时间越长,形成的骨组织越多。说明它的异位诱骨的活性在一定范围存在对rhBMP-2的剂量依赖性,rhBMP-2量越大,能较早地诱导产生较成熟的骨组织,且成骨量大。

BMP与载体材料的复合方法,对于发挥BMP的生物学特性也是非常重要的。BMP与陶瓷类载体复合,通常是将BMP溶于有机溶剂,如盐酸胍等,或溶于生理盐水<sup>7</sup>。目前的BMP制剂不溶于水,所以一般都采用盐酸胍。但采用这种方法可能影响BMP的活性,而且不能准确把握材料中复合的BMP量。笔者利用胶原凝胶的粘性和抽干形成膜的特点,将BMP颗粒包裹于珊瑚表面和微孔中,不影响BMP的活性,能准确把握rhBMP-2的复合量。目前rhBMP-2的剂型是固体颗粒型,不易溶于水,不利于与载体材料复合,因此对rhBMP-2的剂型加以改进,以利于复合,对rhBMP-2的应用研究有重要意义。

## 参考文献

- 1 赵明,王会信,周廷冲.重组人骨形态发生蛋白-2成熟肽在大肠杆菌中的表达及其诱导成骨活性.生物化学杂志,1994,10(3):319~324
- 2 Eeden SP, Ripamonti U. Bone differentiation in porous hydroxyapatite in baboons is regulated by the geometry of the substratum: implications for reconstructive craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg*, 1994,93(5):959~966
- 3 王大章,费伟,刘松筠,等.高生物诱导活性复合人工骨整复骨缺损的实验研究.华西口腔医学杂志,1997,15(1):3~6
- 4 Gao J, Lindholm TS, Marttinen A, et al. Composites of bone morphogenetic protein (BMP) and type collagen, coral-derived coral hydroxyapatite, and tricalcium phosphate ceramics. *Int Orthop*, 1996,20(5):321~325
- 5 Gao J, Lindholm TS, Komonen B, et al. The use of a coral composite implant containing bone morphogenetic protein to repair a segmental tibial defect in sheep. *Int Orthop*, 1997,21(3):194~200
- 6 Zellin G, Linde A. Importance of delivery systems for growth stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes. An experimental study using rhBMP-2 in rat mandibular defects. *J Biomed Mater Res*, 1997,35(2):181~190
- 7 杨连甲主编.口腔和骨科的生物活性材料——材料·应用·进展.西安:陕西科学技术出版社,1993:258

(1998-10-23 收稿,1999-12-25 修回)

## 召开第三届全国口腔医学教育研讨会的通知

第三届全国口腔医学教育研讨会将于2000年8月在长春召开,由白求恩医科大学口腔医学院承办。会议将讨论以下内容:

高等口腔医学教育面临的挑战与对策,着重研究素质教育问题,口腔医学教育改革及高中等口腔医学专业课程体系与教学内容,教师素质与教师待遇,教学方法与教学管理,毕业后教育,研究生教育,教学评估体系,临床教学基地建设及其它。

来稿请寄130041吉林省长春市南关区自强街18-1号白求恩医科大学口腔医学院伊大海收,电话0431-8975518-3001, E-mail:shch@public.cc.jl.cn。

投稿截止日期2000年4月15日。

(中华医学会教育学会口腔医学教育学组)