

骨形态形成蛋白对老龄性骨质疏松后 骨缺损愈合的成骨促进作用^①

徐栋梁^② 李佛保 黄芝胜

(中山医科大学附属第一医院骨科; 广州, 510080)

摘要 为了观察骨形态形成蛋白对老龄性骨质疏松性骨折愈合的成骨促进作用,作者选用 24月龄老龄大白鼠,凿去双侧胫骨上中 1/3交界处相同部位的部分骨质,保留后侧骨皮质,以制成骨折缺损模型。严格配对后分成两组。一组骨缺损内注入小牛骨形态形成蛋白,另一组注入生理盐水作对照。通过对大鼠实验前后血清钙浓度、碱性磷酸酶活性、骨痂的数量和质量的观察,证实骨形态形成蛋白能刺激老龄鼠骨内成骨细胞活性,加快骨形成,提高骨质量,从而促进骨折缺损的愈合。

主题词 形态发生; 转化生长因子 治疗应用; 骨折愈合; 骨质疏松 药物疗法

中图分类号 R 681-33

老年人骨折愈合十分缓慢,甚至不愈合。电镜下可见骨细胞及其骨基质的退行性变化与年龄呈正相关关系,成骨细胞活性与年龄呈负相关关系^[1]。骨基质内促进骨形成的主要物质——骨形态形成蛋白随年龄增加,其含量和活性显著下降。所以老年人骨骼系统内骨质形成能力显著下降而骨吸收加速,逐渐出现骨质疏松化,骨脆性增加,极易导致骨折,严重影响老年人的生存寿命和生活质量。Nordin等^[2]人证实衰老后骨形成的诱导十分困难。Sato^[3]和 Prolo^[4]先后证实从牛骨中提取的骨形态形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)可诱导血管周围的间充质细胞和骨髓间质细胞分化为成软骨及成骨细胞,进而成骨。本研究则将牛 BMP注入老龄鼠骨折断端,以探讨 BMP对衰老骨组织的作用,报道如下。

1 材料与方 法

1.1 动物准备

选择 24月龄老龄 SD大白鼠 20只,雌雄各半,平均体重 465克±52克,以其体重差小于 10克,相同性别进行配对分组,随机分为实验鼠和对照鼠两组。

1.2 骨折模型制作

于双侧胫骨上中 1/3交界处,用小钢凿凿成 5 mm高的骨折缺损,其深度为前侧骨皮质厚度与

骨髓腔直径之和。保留后侧骨皮质和腓骨作负重和固定的支架(图 1)。生理盐水冲净骨屑后,缝合肌层,用注射器向骨折断端间注入 0.5 mg BMP,而对照组只注入等体积生理盐水。BMP的提取按 Urist 倡议的盐酸胍提取方法^[9]从小牛骨中抽取。然后再缝合皮肤。

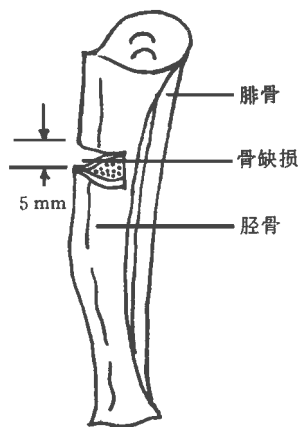


图 1 大鼠骨折模型

在胫骨上中段交界处制成 5 mm高缺损,以胫骨后侧骨皮质和腓骨起固定和支承作用

处死前第 10天、第 3天分别腹腔注射 30 mg/kg体重的盐酸四环素。术后 30 d股动脉取血 1.5 mL进行血生化检查,再取胫骨用 70%乙醇溶液固定。

① 中山医科大学科研基金资助课题; ② 第一作者, 1962年出生, 男, 博士, 主治医师

1.3 骨血生化检查

分离血清后,即通过 Monarch 2000型全自动血生化分析仪测定血清钙浓度和碱性磷酸酶活性,以检测 BMP对大鼠骨代谢的影响。

1.4 大体观察

对比观察使用 BMP后大鼠骨折断端间骨痂形成的数量和质量。

1.5 骨组织形态计量学检查 (bone histomorphometry)

用云石解机切取胫骨骨折部位 1.5 cm 长度,仔细剔除软组织,然后将标本经梯度酒精、丙酮、二甲苯处理后,浸透并包埋于纯化后的甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸丁酯和过氧化苯乙酰的聚合物中。用重型切片将每个标本切取 5张片,厚度 7 μ m。随机选 2张直接封固,在荧光显微镜下观察四环素标记线,以此了解矿化前沿骨形成钙化的动力学变化;另 3张片用二甲苯脱脂后用甲苯胺蓝染色以观察静力学参数。然后利用全自动图像分析仪 (Kontron IBAS 2.0型图像分析系统)主要检查以下参数的变

化:①骨小梁体积比:指新生骨小梁体积占骨折断端骨缺损体积百分比;②平均骨小梁宽度:骨痂内各骨小梁的平均宽度;③类骨质体积比:类骨质占骨痂总体积的百分比;④成骨细胞表面积比:指成骨细胞覆盖面积占整个骨痂内骨小梁总表面积的百分比;⑤矿化沉积率:将测量得到的两条四环素荧光标记线之间的平均距离除以两次标记间隔的时间,本实验中两次标记时间间隔为 7 d。

1.6 统计学处理方法

血生化和骨组织形态计量学则以配对计量资料 *t* 检验,大体观察骨痂的计数资料则用方差分析。

2 结 果

2.1 骨血生化检测

可见实验组大鼠血清钙浓度变化不明显,基本上维持平稳状态 ($P > 0.05$),而碱性磷酸酶活性明显高于对照组 ($P < 0.05$),详见表 1。

表 1 BMP对老龄鼠骨代谢及骨组织形态计量学参数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	实验组 (<i>n</i>)	对照组 (<i>n</i>)	<i>P</i> 值
血清钙 (mmol/L)	2.60 \pm 0.60 (10)	2.61 \pm 0.54 (10)	> 0.05
ALP (IU/L)	82.70 \pm 25.2 (10)	70.10 \pm 23.5 (10)	< 0.05
骨小梁体积比 (%)	42.60 \pm 15.3 (20)	33.50 \pm 16.8 (20)	< 0.05
骨小梁宽度 (μ m)	120.00 \pm 56.6 (20)	94.50 \pm 41.2 (20)	< 0.05
类骨质体积比 (%)	18.4 \pm 7.6 (20)	12.1 \pm 5.7 (20)	< 0.05
成骨细胞表面积比 (%)	63.4 \pm 24.5 (20)	57.8 \pm 18.9 (20)	< 0.05
矿化沉积率 (μ m/d)	1.4 \pm 0.8 (20)	1.1 \pm 0.9 (20)	< 0.05

2.2 大体观察

注入 BMP 1个月后,骨折断端充满骨痂,骨缺损口外的骨皮质表面覆盖了 0.2~0.5 mm (平均 0.9 mm)厚的骨痂。而对照组骨折断端骨痂量少,仅 11例 (55.0%)有较薄的骨表面骨痂,厚度 0.1~0.9 mm (平均 0.4 mm),4例 (20.0%)骨痂刚好填平骨折断端间,余下 5例 (25.0%)骨折断端尚未被骨痂所充满。

2.3 骨组织形态计量学检查

荧光显微镜下,可见各标本多为单条黄色四环素荧光标记线,部分骨小梁表面为双荧光线。实验组双荧光线标记者较多,标记线之间的平均距离比对照组宽。普通光学显微镜下,可见实验组骨折部位骨痂内骨小梁丰富,且多交织成网状结构,骨质量较高 (图 2);而对照组骨小梁较稀疏,未成网的孤立岛屿

状骨小梁较多,骨结构质量差 (图 3)。具体的计量学统计资料详见表 1。



图 2 BMP促进骨形成

注入 BMP 30 d,骨折断端骨痂内骨小梁丰富、粗大,相互联结成网状。图右为骨折断端 ($\times 20$)



图3 对照组

老龄性骨质疏松性骨折 30 d后,断端间骨痂内骨小梁稀疏,多呈未联结在一起的孤立岛屿状。骨质量差 ($\times 20$)

3 讨论

3.1 本实验骨折模型的科学性和实用性

骨折愈合过程形成的骨痂主要表现为骨痂数量和立体构筑上的差别。准确而又客观的骨组织形态计量学方法测量结果可比性最好。而以往的各种模型中,对骨折断端骨缺损的体积、断端间的距离及骨断端间的接触面积均不能准确地测算;骨折愈合过程中,形成的骨量也难以测算,尤其是固定不稳的情况下,既往定量的研究,其可比性较小。因为在固定欠稳时,并不是所有的骨痂是依照原应力线而形成的,无效骨痂会增多。于顺禄^[10]将家兔桡骨中上 1/3 交界处锯掉 3 mm 高的骨质,留下尺骨作支承和固定作用。该模型解决了以前骨折处不能定量的问题。但是,该模型中桡骨骨折断端间是分离的,而实际上骨折断端间往往是相接触的,临床上均需设法让断端接触以促进骨折愈合。另外,单纯用尺骨来起支承和固定作用是不够稳定的。

本实验中,在胫骨上中 1/3 交界处横断面上凿出高 5 mm,深度为 1 侧骨皮质厚度与骨髓腔直径之和的骨缺损,并利用余下的后侧胫骨皮质和腓骨起支承和固定作用,不需要其他内或外固定措施,其固定可靠。骨缺损量及骨形成量均可定量分析;留下的 1 侧骨皮质使两骨折断端密切联结,更符合实际情况,其联结的面积也一致,并可定量测算。本模型对难以施行内外固定的中小型动物尤为方便,所以,具有较强的科学性和较好的实用性。

3.2 BMP 促进骨质疏松骨折愈合

随着年龄的增加,BMP 的含量减少,活性下降,

BMP 对周围间质细胞的作用减弱。从骨质疏松的发生机制来看,作为骨组织内最主要的骨形成因子,BMP 活性下降可导致骨形成功能降低^[12]。Hosney 等人将含 BMP 的骨粉植入大鼠皮下人工囊内,发现受体鼠年龄越大,骨诱导活性越低,成骨越少^[6]。将含 BMP 的骨胶植入肌囊内亦表现如此^[7]。Jergesen^[8]等人将 3 月龄大鼠脱矿骨粉分别植入不同月龄的受体鼠皮下,又将不同月龄大鼠骨粉植入 3 月龄受体鼠皮下,对骨诱导活性观察,显示供体或受体鼠月龄越大,成骨潜伏期越长,成骨量越少,认为与老龄体内 BMP 含量减少有关。本实验将小牛 BMP 直接注入 24 月龄大鼠骨缺损外,30 d 后即可观察到骨缺损即被骨痂充填和覆盖,成骨活跃,矿化加快,显著地促进骨质疏松骨缺损的愈合,并且提高了骨质量。可能与植入的 BMP 能替代补偿老龄鼠体内 BMP 的含量和活性不足有关。

BMP 可与间充质细胞表面受体结合,激活靶细胞内基因调节因子,加快骨细胞内 DNA 的合成^[11]。BMP 对骨髓间质细胞的作用最强,可诱导其转化为软骨细胞及骨细胞。本实验显示,BMP 亦可促进老龄鼠成骨细胞的形成,数量增加,成骨细胞覆盖的骨小梁表面积增宽。碱性磷酸酶活性增加。

3.3 BMP 治疗骨质疏松的意义

老年人常有骨质疏松,易致骨折且难以愈合。由年龄增加而衰老引起的骨形成是一道难题^[8]。我们以前的研究表明,BMP 可以促进绝经后和废用性骨质疏松性骨折愈合^[13]。BMP 存在于人和动物的骨组织内,具有跨种骨诱导作用,从牛骨中提取的 BMP 可诱导人体内骨形成^[9],而其排斥反应轻,人体可以耐受。所以,我们认为这种来源广、使用方便的 BMP 用来治疗骨质疏松性骨折是有效和可行的。

参 考 文 献

- 1 Tonna EA. Electron microscopic study of bone surface changes during ageing, the loss of cellular control and biofeedback. *J Gerontol*, 1978, 33: 163
- 2 Nodin BEC, Need AG, Morris HA, *et al*. New approaches to the problems of osteoporosis. *Clin Orthop*, 1985, 200: 181
- 3 Sato K, Urist MR. Bone morphogenetic protein induced cartilage development in tissue culture. *Clin Orthop*, 1984, 183: 180
- 4 Prolo DJ, Rodrigo JJ. Contemporary bone graft phys-

- ology and surgery. Clin Orthop, 1985, 200: 322
- 5 Urist MR. Formation autoinduction. Science, 1965, 150(12): 893
 - 6 Hosney M, Urist MR. Osteoinducing in young and old rats using demineralized bone powder allografts. J Oral Maxillofac Surg, 1985, 43: 924
 - 7 Syftestad GT, Urist MR. Bone ageing. Clin Orthop, 1987, 162: 288
 - 8 Jørgensen HE, Chun J, Kao RT, *et al.* Age effects on bone inducing by demineralized bone powder. Clin Orthop, 1991, 268: 253
 - 9 Urist MR. Preparation and bioassay of bone morphogenetic protein and polypeptide fragments. Method Enzymol, 1987, 146: 294
 - 10 于顺禄,魏典,叶伟胜,等. 实验家兔骨折愈合骨组织形态计量学研究. 中华骨科杂志, 1991, 11(4): 294
 - 11 Urist MR, Delange R J, Finerman GAM, Bone, cell differentiation and growth factors. Science, 1983, 220: 680
 - 12 薛延. 影响骨形成和骨吸收的有关因子. 见: 刘忠厚主编. 骨质疏松症. 北京: 化学工业出版社, 1992. 118-127
 - 13 徐栋梁,李佛保,于毅力,等. BMP促进去神经后废用性骨质疏松骨折愈合的实验研究. 中国骨质疏松杂志, 1995, 1(2): 98

(1996-09-11收稿 1996-12-12修回)

OSTEOGENETIC EFFECTS OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN ON THE HEALING OF SENILE OSTEOPOROTIC FRACTURE

Xu Dongliang Li Fobao Huang Zhisheng

(Department of Orthopaedics, First Affiliated Hospital,
Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Twenty 24-month-old SD rats were used to investigate the effects of bone morphogenetic protein (BMP) on the healing of senile osteoporotic fracture in rats. The tibial draft defects were created between the upper 1/3 and the middle 1/3. BMP was injected into 20 defects of 10 rats, and normal saline solution was injected into the other 20 defects as control. Serum calcium concentration, activity of serum alkaline phosphatase before and after the injection were tested. The quantity of callus, bone histomorphometry of trabecular bone, osteoblastic surface, and mineralized trabecular surface ratio in the defects were measured correspondingly. The results showed that BMP could accelerate the healing of senile osteoporotic fracture in rats.

Subject headings morphogenesis; transforming growth factor/therapeutic use; fracture healing; osteoporosis/drug therapy