

[文章编号 1000-1182(2004)03-0186-03]

重组人骨形成蛋白 - 2 促进兔 下颌牵张成骨的研究

王志国, 胡 静, 邹淑娟, 李继华, 高占巍, 王文章

(口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 研究局部应用基因重组人骨形成蛋白-2(rhBMP-2)对兔下颌牵张成骨的影响。方法 在 12 只成年大耳白兔的双侧下颌骨前部行骨切开术,将 rhBMP-2 与胶原复合植入一侧下颌骨切开处,另一侧单纯植入胶原作对照。用自行研制牵张器延长双侧下颌骨 6 mm,在牵张结束后第 4 周处死动物,取双侧牵张区新生骨痂行组织学、扫描电镜及 Ca/P 元素测定。结果 下颌延长后两侧牵张间隙均有新骨形成,应用 rhBMP-2 的一侧牵张骨痂中的新骨组织比对照侧多而成熟,钙化程度较高。结论 基因重组人骨形成蛋白-2 可能有促进兔下颌牵张成骨的作用。

[关键词] 下颌骨牵张; 重组人骨形成蛋白-2; 新骨生成

[中图分类号] R 782.2 **[文献标识码]** A

Recombinant Human BMP-2 Accelerates Bone Formation of Mandibular Distraction Osteogenesis in Rabbits WANG Zhi-guo, HU Jing, ZOU Shu-juan, LI Ji-Hua, GAO Zhan-wei, WANG Da-zhang. (Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Objective To study the effects of rhBMP-2 on bone formation of mandibular distraction osteogenesis in rabbits. **Methods** Bilateral mandibular osteotomies were performed in 12 mature rabbits. 5 mg rhBMP-2 with the collagen carrier was implanted in the osteotomy site of one side of the mandibles. Only the collagen sponge was placed in the contra-lateral side as control. The mandibles of 8 rabbits were lengthened by 6mm using a custom-made distractor. At 4 weeks after the end of distraction, all animals were killed and the distracted calluses were harvested and processed for histological, scanning electron microscopic, as well as Ca/P ratio analysis. **Results** The regenerated bone was found in the distraction gap after mandibular lengthening. The mandibular side treated with rhBMP-2 had greater amounts of new bone formation and earlier mineralization than contra-lateral side (non-rhBMP-2 treated). **Conclusion** Recombinant human BMP-2 appears to be able to accelerate bone formation of mandibular distraction osteogenesis in rabbits.

Key words mandibular osteo-distraction; recombinant human BMP-2; new bone formation

目前关于骨生长因子对牵张成骨(distraction osteogenesis, DO)的调控以及导入外源性生长因子对骨牵张后新骨生成的影响是矫形外科和口腔颌面整复外科领域的一个研究热点。骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)作为一种高效骨诱导因子,在骨的形成和生长发育过程中起着至关重要的作用。本研究通过兔下颌牵张成骨实验动物模型,研究局部应用基因重组人骨形成蛋白(rhBMP-2)对牵张后新骨生成和钙化的影响,为探索有效途径促进牵张成骨和缩短 DO 疗程提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

兔下颌骨牵张器(口腔生物医学工程教育部重点实验室研制)。rhBMP-2 和 Ⅰ型胶原膜(美国匹兹堡 CMU 大学组织工程实验室张健英博士惠赠)。

1.2 实验方法

选健康成年大耳白兔 12 只,体重 3.0 ~ 3.5 kg,雌雄不限。在全麻下经颌下切口在双侧下颌骨前部行骨切开术并安置下颌牵张器,将胶原膜修剪成 5 mm × 5 mm 大小,再将 5 mg rhBMP-2 置于两层胶原膜之间呈“夹心”式复合后置于一侧下颌骨切开处,对侧放置单纯胶原膜作为对照,分层缝合伤口。经过 1 周的间歇期后,用牵张器按 1 mm/d (2 次/日,0.5 毫米/次,每次间隔 12 h)的速率向前缓慢延长双侧下颌骨。连续牵张 6 d,即延长下颌骨 6 mm 后固定牵张器。

[收稿日期 2002-07-12; 修回日期 2004-01-12]

[基金项目]教育部跨世纪优秀人才基金资助(教技函 2002-48)

[作者简介]王志国(1973-),男,山东人,现为上海第二医科大学口腔医学院博士研究生

[通讯作者]胡 静, Tel: 028-85502334

1.3 观察手段

在牵张结束后不同时间拍摄 X 线片了解下颌骨延长情况。在牵张结束后第 4 周处死所有动物,取双侧下颌骨牵张骨痂平均分为两块,上 1/2 新骨组织放入 10 %中性福尔马林溶液中固定 24 h,EDTA 脱钙,乙醇逐级脱水,石蜡包埋,作 5 μm 厚切片,HE 染色后光镜下观察。同时参照 Alberius 的组织学分级评价系统(histological grading system)对两侧牵张间隙内新骨组织的数量和成熟程度进行对比分析^{1,2}。下 1/2 新骨标本清洗后放入 2.5 %戊二醛中固定,液氮冷冻。经干燥镀膜后,在 KYKY-AMRAY1000B 扫描电镜(USA)上观察,并用 TN-500 型 X 线能谱仪测定新骨各个微区 Ca、P 原子个数比。每个标本选择 5 个微区进行测定,数据结果由机载电脑自动获取和处理。

2 结果

所有实验动物的双侧下颌骨均被成功延长,处死动物时见牵张间隙有新生骨痂形成和钙化,胶原膜完全被吸收,左右两侧牵张骨痂密度在 X 线片上无明显差异。组织学观察显示牵张间隙内有大量新生骨小梁生成,骨小梁排列方向与牵张力方向一致,应用 rhBMP-2 的一侧的骨小梁比对照侧成熟(图 1,2)。根据 Alberius 的新骨生成组织学分级标准,得出实验侧与对照侧新骨组织学平均分数(表 1),结果显示局部应用 rhBMP-2 后其新骨生成数量与对侧之比为 1.36 (4.9/3.6),说明实验侧的新骨生成多于对照侧。扫描电镜观察见新骨组织呈现“蜂巢样”结构,钙盐颗粒沉积在骨基质中,应用 rhBMP-2 侧新生骨小梁也比对照侧成熟(图 3,4)。rhBMP + 胶原侧新骨微区 Ca/ P 原子个数比为 1.38 ±0.06,而用单纯胶原侧新骨微区 Ca/ P 原子个数比为 1.26 ±0.07。两侧检测结果经统计学 t 检验显示有显著性差异(P < 0.05),表明应用 rhBMP-2 后新骨组织钙化程度比对照侧高。

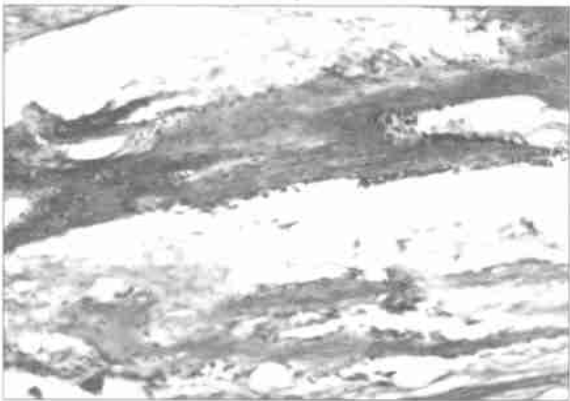


图 1 对照侧牵张间隙内幼稚骨小梁生成 HE ×100
Fig 1 Histological photomicrograph showed immature newly formed trabecular bone in the contralateral side HE ×100

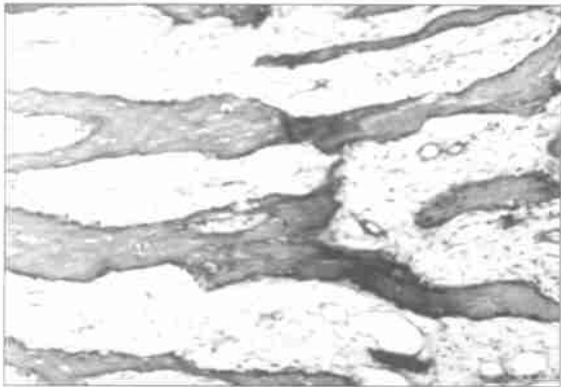


图 2 应用 rhBMP-2 侧新生骨小梁比对照侧成熟 HE ×100
Fig 2 The mandibular side treated by rhBMP demonstrated more mature trabecular bone formation than the contralateral side HE ×100



图 3 扫描电镜显示对照侧新骨生成情况 SEM ×100
Fig 3 SEM photograph showed new bone formation in the distraction gap of the contralateral side SEM ×100



图 4 应用 rhBMP 侧新骨钙化程度较高 SEM ×100
Fig 4 The mandibular side treated by rhBMP demonstrated earlier mineralization of the regenerate bone than the contralateral side SEM ×100

表 1 两侧下颌骨牵张间隙中新骨组织学评分结果
Tab 1 Results of grading of bone regeneration in the distraction gap of mandibular sides

牵张标本 (n = 12)	骨再生	骨髓形成	平均得分
rhBMP + 胶原侧	3.3(3-4)	1.6(1-2)	4.9
单纯胶原侧	2.5(2-3)	1.1(1-2)	3.6

注:括号内为 12 个标本的得分范围

3 讨论

骨形成蛋白是广泛存在于骨基质中的一种生长因子, BMP 家族所包含的蛋白质达 12 种以上, 其中 9 种已被证实可在体内可诱导异位成骨, 除 BMP-1 以外的各种 BMP 均为 TGF- β 超家族成员。BMP 能诱导间充质干细胞向成骨细胞分化^{3,4}。BMP 被看作为一种具有低抗原性和同源性的高效骨诱导因子, 但单纯 BMP 在体内容易扩散和被蛋白酶分解, 因此其生物学活性难以维持和充分发挥。胶原是细胞外基质的主要成分, 由于其良好的生物相容性、安全性和可降解性, 使胶原可以作为 BMP 的一种载体 (carrier), 而减缓 BMP 在组织中的快速扩散。

牵张成骨是一个在机械张力刺激下的特殊骨再生技术, 临床上可以用来整复骨量不足和缺损畸形。DO 涉及多种生长因子、细胞因子和激素的相互作用和网络调节。Rauch 等⁵ 通过兔胫骨牵张实验动物模型, 发现 BMP-2, 4, 7 在牵张过程中呈高水平表达, 主要见于骨膜内的间充质细胞、成骨细胞和软骨细胞, 提示 BMP 在牵张成骨过程中发挥着重要作用。目前, 牵张成骨较长的疗程和可能存在的骨再生不良是制约该技术在临床推广应用的一个主要原因。因此, 探索各种有效措施促进骨牵张后的新骨生成和钙化速度是获取高质量成骨效果和缩短治疗时间的重要途径, 局部导入外源性骨生长因子无疑是一种合理选择。

Okazaki 等⁶ 和笔者的前期实验⁷ 发现外源性碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 有促进兔肢体长骨和下颌牵张成骨的作用。本研究通过兔下颌牵张成骨动物模型, 结果显示局部应用外源性 BMP 有促进新骨生成和钙化的作用。将 rhBMP 与胶原膜复合, 可以有效地减缓 BMP 在体内扩散的速度, 使之更有效发挥诱导骨生成的活性。由于胶原膜在体内的降解

时间约为 3~4 周, 因此, 将胶原作为 BMP 的一种缓释剂和载体可能不会影响牵张后形成的新生骨痂的改建塑形。牵张成骨已应用于整复各种骨骼缺损畸形, 但 Holmes 等⁸ 最近发现 DO 不能有效地延长和整复放疗后患者的下颌骨, 说明放疗造成的局部血供障碍及骨生长因子缺乏将导致骨牵张治疗失败。本研究结果提示外源性骨生长因子如 rhBMP 的应用不仅可能通过增加牵张速率及固定期新骨钙化进程来缩短疗程, 而且为解决一些因局部成骨条件差或缺乏充足血供造成的临床问题提供了一种选择方法。

[参考文献]

- 1] Alberius P, Isaksson S, Klinge B, et al. Regeneration of cranial suture and bone plate lesions in rabbits J. J Cranio Maxillofac Surg, 1990, 18(8):271-279.
- 2] Hu J, Li J, Wang D, et al. Differences in mandibular distraction osteogenesis after corticotomy and osteotomy J. Int J Oral Maxillofac Surg, 2002, 31 (2):185-189.
- 3] Rosen V, Cox K, Hattersley G. Bone morphogenetic proteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, Eds. Principles of bone biology M. San Diego: Academic. 1996 :661-671.
- 4] Reddi AH, Cunningham NS. Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins J. J Bone Miner Res, 1993, 8 (Suppl):499-502.
- 5] Rauch F, Lauzier D, Croteau S, et al. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic protein-2, -4, -7 during distraction osteogenesis in rabbits J. Bone, 2000, 26 (6):611-617.
- 6] Okazaki H, Kurokawa T, Nakamura K, et al. Stimulation of bone formation by recombinant fibroblast growth factor-2 in callotasis bone lengthening of rabbits J. Calcif Tissue Int, 1999, 64 (6):542-546.
- 7] 胡 静, 王志国, 高占巍, 等. 成纤维细胞生长因子对兔下颌牵张成骨的影响 J. 临床口腔医学杂志, 2002, 18(1):6-7.
- 8] Holmes SB, Lloyd T, Coghlan KM, et al. Distraction osteogenesis of the mandible in the previously irradiated patient J. J Oral Maxillofac Surg, 2002, 60(3):305-309.

(本文编辑 王 晴)

国家级继续医学教育项目“颌面部血管瘤生长分子机制及治疗研究进展学习班”通知

为提高口腔颌面部血管瘤临床治疗和基础研究水平, 经全国继续教育委员会学科组第九次工作会议审定通过, 兹定于 2004 年 7 月 19~24 日在福建省福州市举办国家级继续医学教育项目“颌面部血管瘤生长分子机制及治疗研究进展国家级继续教育学习班”(编号 2003-08-02-002)。此学习班由四川大学华西口腔医学院主办, 福建医科大学协办, 培训对象为口腔颌面外科和头颈外科各级医师及相关基础研究人员。结业授予国家级继续教育一类学分 12 分。联系人: 四川省成都市人民南路三段 14 号四川大学华西口腔医院口腔颌面外科 华成舸 邮编: 610041 电话: 028-85501440, 85501428 传真: 028-85582167 Email: onrswcums@163.com