

不同充填材料应用于山羊经皮椎体成形术的组织学研究

刘宏建¹, 杜靖远², 王义生¹, 刘辉³, 韩松辉⁴, 郭建刚⁴

(1. 郑州大学第一附属医院骨科, 河南 郑州 450052; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院; 3. 河南科技大学第一附属医院; 4. 洛阳正骨医院正骨研究所)

【摘要】 目的: 研究聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA)、磷酸钙人工骨 (CPC) 和复合重组人骨形态发生蛋白-2 的磷酸钙人工骨 (rhBMP-2/CPC) 在羊骨质疏松症模型上行经皮椎体成形术 (PVP) 后的组织学表现。方法: 6~8 岁雌性山羊 8 只, 均行双侧卵巢切除术, 术后 4 个月建立骨质疏松症模型。在 C 形臂 X 线机监视下, 随机选取 8 只山羊的 L₂-L₆ 的两节椎体行 PVP, 分别充填 PMMA、CPC 和 rhBMP-2/CPC, 保证每只山羊的两节穿刺椎体的充填材料各不相同, 术后 4 个月处死所有动物, 取出椎体, 组织学观察。结果: 8 只山羊 16 个椎体的 PVP 均成功, 共出现 4 个椎体的渗漏。肉眼观察: PMMA 与松质骨界限清晰, 一个椎体取材时交界面出现破碎和脱落现象; 而 CPC 和 rhBMP-2/CPC 与椎体内松质骨界限不清, 互相融合生长。HE 染色光镜观察: PMMA 与骨小梁松散结合, 界限明显, 未见 PMMA 吸收和新生骨形成; CPC 均匀分布于骨小梁和骨髓组织内, 有 CPC 吸收现象, 同时可见有新生软骨样团块形成, 并有新生骨组织形成向其中心长入; rhBMP-2/CPC 除了 CPC 的表现外, 可见成骨活动活跃。结论: 在组织学上, rhBMP-2/CPC 和 CPC 均具有降解活性和骨传导活性, 优于 PMMA。rhBMP-2/CPC 还具有诱导成骨活性, 可能成为 PVP 中强化骨质疏松性椎体的首选充填材料。

【关键词】 骨质疏松, 绝经后; 山羊; 模型, 动物; 组织学; 经皮椎体成形术

Histological study of vertebral body after percutaneous vertebroplasty with different filling materials an experimental study in osteoporotic goats LIU Hong-jian^{*}, DU Jing-yuan, WANG Yi-sheng, LIU Hui, HAN Song-hui, GUO Jian-gang.

^{*} Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China

ABSTRACT **Objective** To investigate histological manifestation of vertebral body after percutaneous vertebroplasty (PVP) in osteoporotic goats with three different filling materials: polymethylmethacrylate (PMMA), calcium phosphate cement (CPC) and rhBMP-2/CPC. **Methods** Eight healthy ewes (from 6 to 8 years old) underwent ovariectomy of both sides (OVX). So the osteoporotic models were established 4 months after the OVX. Two vertebral bodies (L₂-L₆) of each ewe were randomly selected which were filled with PMMA, CPC and rhBMP-2/CPC respectively under fluoroscopic guidance. The filling materials were different in the two vertebrae of the same ewe. Sixteen vertebral bodies from eight ewes were histologically analyzed four months after filling. **Results** PVP was successfully performed in all the sixteen vertebral bodies and cement leakage was found in four vertebrae. The evaluation with naked eyes showed that PMMA was not in tight contact with the bone, and the phenomenon that PMMA fell to piece and broke off at the interface was found in one specimen. However, CPC and rhBMP-2/CPC were in tight contact with the bone. Light microscopic evaluation (HE staining) showed that PMMA was in loose contact with the bone trabecula. PMMA could not be resorbed and new bone could not be found. On the contrary, CPC was distributed evenly in the trabecula and CPC resorption and new bone formation can be discovered. Besides the same change as that of CPC mentioned above, the osteoinduction of rhBMP-2/CPC was active. **Conclusion** The results indicate that CPC and rhBMP-2/CPC have better activity of degradation and osteoacsis than PMMA. Besides rhBMP-2/CPC can induce ossification, which make it the first candidate material (as a bone substitute in the PVP) for the treatment of compression fracture of vertebral body caused by osteoporosis.

Key words Osteoporosis, postmenopausal; Goats; Model, animal; Histology; Percutaneous vertebroplasty

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(4): 230-232 www.zzgssz.com

经皮椎体成形术(PVP)是在影像引导下,将穿刺针经皮穿刺到病变椎体,注入充填材料,材料即在椎体内凝固成坚硬的固体,从而达到提高脊柱稳定性、缓解或消除疼痛的目的。由于PVP创伤小、效果好而且迅速,已成为脊柱微创介入治疗的又一热点^[1]。然而不同的充填材料其力学强度、黏滞性和可操作时间不同,因此充填材料性能的优劣直接关系到PVP的成败,我们在骨质疏松症山羊模型上行PVP,充填聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、可注射型的自固化磷酸钙人工骨(CPC)和复合重组人类骨形态发生蛋白-2(rhBMP-2)的CPC(rhBMP-2/CPC)3种材料,并分别对3种材料进行了光镜观察,为寻找理想的PVP充填材料提供组织学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 6~8岁豫西地区健康雌性山羊8只,体重(30±3)kg,由河南科技大学农学院提供,所有动物均证实达到骨质疏松症大动物模型标准^[2]。

1.2 实验方 法

1.2.1 PVP手术方 法 在每只山羊的L₂-L₆的5节椎体中,随机选取2节椎体分别行PVP,分别应用PMMA、CPC和rhBMP-2/CPC作为充填材料。8只山羊下腰背部褪毛,侧卧位,在C形臂X线机(岛津-2400DSA型)监视下,均采用单侧椎弓根穿刺法,术侧随机,穿刺点均在棘突旁开2.5~3cm处,在无菌条件下先在皮肤上刺1个约2.5mm小切口,插入13G穿刺针(美国COOK公司PVP专用针)直抵椎弓根骨膜,正位像证实穿刺针针尖位于椎弓根上方外上象限(与人类腰椎相比,羊有6~7节腰椎且椎体细高,椎弓根狭长),侧位沿椎弓根方向逐渐进针。若进针点骨皮质较硬,可用骨锤轻轻击打。当针尖抵达椎体中部,拔出针芯,建立工作通道。采用1ml注射器沿套管推注,当出现椎体旁和穿刺针处渗漏或推注阻力很大时则立即停止。注射后套管置留10min,待材料凝固后拔除套管,常规包扎,观察10min,术中每只羊静脉滴注生理盐水250ml内加青霉素320×10⁴U。术中1只羊出现呕吐,经持续低流量吸氧,症状缓解。

1.2.2 3种材料的调配和充填 PMMA为天津万康新材料发展有限公司的含钡骨水泥,粉剂20g×2袋,液剂10ml×2安剖,每袋钡剂含量为1.0g采用3:2的粉液比例,迅速调匀,待其进入黏稠阶段,迅速将其注入椎体。CPC为上海瑞邦生物材料有限公司提供,粉剂3.8g×2袋,粉液比为2.5~3.0 rhBMP-2/CPC(rhBMP-2由上海瑞邦生物材料有限公司提供),先用电子秤(上海凯士电子有限公司)称取rhBMP-2冻干剂,与CPC粉剂按1:200重量比混合,以2.5:1的粉液比加入CPC固化液。

1.2.3 术后观察 次日所有动物即行充填椎体的螺旋CT(日立PRIMA高速螺旋CT)检查。术后所有动物肌注青霉素,1次/d 160×10⁴U次,连用3d。术后4个月,在氯胺酮麻醉下活体取出所有山羊注射后的腰椎椎体共16个,将椎体夹具固定,用钢锯沿水平轴位锯成片状,每片厚约3mm,经充填材料与宿主骨交界处截成约3mm×3mm×3mm大小的骨标本,10%甲醛常规固定,脱钙、脱水后石蜡包埋,连续切片,厚度为5μm,HE染色,普通光镜观察。

2 结果

2.1 肉眼观察 8只山羊16个椎体的PVP均成功,术后均未发生瘫痪或死亡,进食和活动情况正常,伤口无渗液或红肿等。3种充填材料均呈团状分布于椎体内,从椎体的横截面观察,3种材料在椎体内的分布多少不一:2个充填PMMA的椎体、1个充填CPC的椎体和1个充填rhBMP-2/CPC的椎体分别在椎管前壁或后壁出现渗漏;PMMA与椎体内松质骨界限清晰,在锯取标本时1个层面的PMMA与椎体松质骨界面出现破碎和脱落;而CPC和rhBMP-2/CPC与椎体内松质骨界限不清,互相融合生长;未充填材料的椎体内和椎弓根处呈骨质疏松表现。

2.2 光镜观察 ①PMMA与骨小梁松散结合,界限明显,未见PMMA吸收和新生骨形成,PMMA周围和与骨小梁之间可见少量纤维组织相隔(图1)。②CPC均匀分布于骨小梁和骨髓组织内,在与骨小梁和骨髓交界处有CPC吸收现象,同时可见有新生软骨样团块形成(图2),并有新生骨组织形成向中心长入(图3)。CPC与骨小梁的边缘,有新骨形成,CPC逐渐被替代(图4)。③rhBMP-2/CPC分布于骨小梁和骨髓组织内,有成群的成骨细胞和粘合线的形成(图5),可见新生骨小梁和骨质团块(图6)。骨组织长入rhBMP-2/CPC内部,成骨活动活跃(图7)。

3 讨论

PVP对脊椎血管瘤、椎体溶骨性肿瘤等在缓解疼痛、增加脊柱强度、改善患者活动状况等方面取得了令人满意的临床效果。PMMA不含有足够的显影剂,在经皮注入过程中X线透视不能清晰显影,应用时需添加钡粉和造影剂等。其缺点还有聚合反应产生的局部热效应和释放的单体细胞毒作用。此外,PMMA无生物活性,因而不能促进骨的长入或再塑形。而且,一旦PMMA的聚合反应完成,放置其他的脊柱内固定物将非常困难,必须在其聚合反应之前进行操作方能成功^[3]。

新型骨水泥的发展应致力于解决现有PMMA存在的缺陷。CPC具有可吸收性,其成分与骨的矿物质成分十分相似,因此可以利用其成骨传导活性作为局部骨再生和塑形的支架结构^[4]。然而,当患者骨生成和修复处于病理状态时,这些再生是否能够产生仍有待评估。而且,CPC具有生物可降解性,当充填材料强化了骨质疏松性椎体压缩性骨折后出现快速吸收,而同时新骨尚未形成,将导致椎体强度下降,促进椎体进一步的塌陷,因此充填材料的降解和新骨形成应该同步进行。

CPC能够被骨吸收替代,显影清晰,固化时不放热或低放热,也降低了周围组织尤其是神经组织热损伤的危险性,将CPC和rhBMP-2/CPC粉末和固化液调匀后,可以较容易地注入椎体内,便于透视下监测注射情况,它固化时不放热,固化后可产生一定的生物力学强度,从而增加了脊柱前方的稳定性^[5]。本组PMMA充填的椎体在锯取标本时出现脱落和破碎,与PMMA应用于人工关节中假体远期松动类似^[6]。

本实验结果表明PMMA与椎体之间的结合是单纯的机械连接未能达到生物固定,这与Togawa等^[7]的观察一致,他对人体椎体PMMA强化后的组织学描述为:PMMA的周围有大量的巨噬细胞和纤维膜的包绕,虽然PMMA有产热反应,

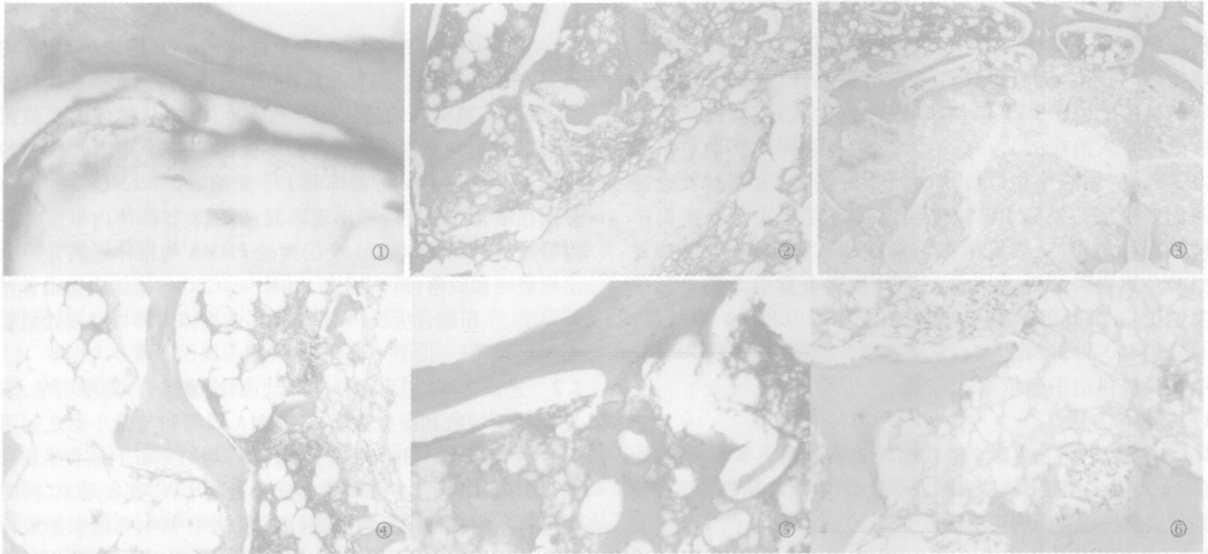


图1 HE染色(光学显微镜×50);PMMA与骨小梁界限明显,PMMA周围和与骨小梁之间可见少量纤维组织相隔 图2 HE染色(光学显微镜×25);CPC均匀分布于骨小梁和骨髓组织内,同时可见有新生软骨样团块形成 图3 HE染色(光学显微镜×10);CPC有吸收现象,并有新生骨组织形成向中心长入 图4 HE染色(光学显微镜×25);CPC与骨小梁的边缘有新骨形成,CPC逐渐被替代 图5 HE染色(光学显微镜×50);新生骨小梁和骨质团块,新骨生长旺盛,rhBMP-2/CPC逐渐被替代 图6 HE染色(光学显微镜×50);rhBMP-2/CPC分布于骨小梁和骨髓组织内,有成群的成骨细胞和黏合线形成,可见骨质新生 图7 HE染色(光学显微镜×50);新生的骨质团块,骨组织长入rhBMP-2/CPC内部,成骨活动活跃

Fig. 1 HE staining (light microscope ×50); PMMA was in loose contact with the bone trabecula, and was always surrounded by a thin fibrous capsule Fig. 2 HE staining (light microscope ×25); CPC was evenly distributed in bone trabecula and bone marrow, and the new cartilage formed Fig. 3 HE staining (light microscope ×10); at locations where CPC was resorbed and new bone was deposited Fig. 4 HE staining (light microscope ×25); CPC and bone trabecular was totally covered by a thin layer of new bone. CPC was substituted gradually Fig. 5 HE staining (light microscope ×50); besides same change as that of CPC mentioned above, the progressive osteoclast resorption of the cement and new bone formation resulted in that all of the rhBMP-2/CPC was replaced gradually Fig. 6 HE staining (light microscope ×50); osteoblasts, in contact with rhBMP-2/CPC, were more enriched, and the formation of some mature bone trabeculae could be found Fig. 7 HE staining (light microscope ×50); new bone was formed and the osteoinduction of rhBMP-2/CPC was active

但在其周围未见明显的骨质坏死。CPC与骨小梁之间的结合为生物连接,达到了生物机械固定的目的。Oms等^[8]在羊胫骨上造成骨缺损,分别植入PMMA和CPC,进行了24周的组织学对比观察,发现在PMMA的周围总是有一层纤维膜的包裹,而在CPC的标本上观察到CPC与宿主骨紧密连接,破骨细胞吸收CPC,而成骨细胞促使新骨形成,CPC逐渐被替代。他认为,CPC具有生物相容性、骨传导和骨运输特性,是一种可供选择的骨替代材料。

临床上使用CPC的PVP治疗疼痛性骨质疏松性椎体压缩骨折,同样达到了使用PMMA的缓解疼痛的目的^[9]。因此,在CPC上负载具有成骨诱导作用的rhBMP-2兼具骨传导和骨诱导的双重作用,将具有更广阔的应用前景。

参考文献

- 1 Linville DA. Vertebroplasty and kyphoplasty. South Med J 2002, 95 (6): 583-587
- 2 刘宏建,杜靖远,刘辉,等. 绝经后骨质疏松症山羊模型的建立及其意义. 中华实验外科杂志, 2005 22(10): 1266-1267.
- 3 Nussbaum DA, Gailloud P, Murphy K. The chemistry of acrylic bone cements and implications for clinical use in image-guided therapy. J Vasc Interv Radiol 2004, 15 121-126

- 4 Hoshikawa A, Fukui N, Fukuda A, et al Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction process of a calcium phosphate cement and its mechanical effect for screw fixation. Biomaterials 2003, 24 (27): 4967-4975
- 5 刘宏建,陈勇,杜靖远,等. 复合rhBMP-2的注射型磷酸钙人工骨应用于椎体成形术的体外生物力学评价. 中华物理医学与康复杂志, 2004 26(7): 392-395
- 6 Lew S G, Janna S, Carroll M. Effect of test frequency on the in vitro fatigue life of acrylic bone cement. Biomaterials 2003, 24 (6): 1111-1117
- 7 Togawa D, Bauer TW, Lieberman IH, et al Histologic evaluation of human vertebral bodies after vertebral augmentation with polymethylmethacrylate. Spine 2003, 28(14): 1521-1527
- 8 Oms EM, Wolke JC, van de Heuvel MT, et al Histologic evaluation of the bone response to calcium phosphate cement implanted in cortical bone. Biomaterials 2003, 24 (6): 989-1000
- 9 刘宏建,杜靖远,韩松辉,等. 经皮椎体成形术治疗疼痛性骨质疏松性胸腰椎压缩骨折. 华中科技大学学报(医学版), 2004 33(4): 481-484.

(收稿日期: 2006-09-05 本文编辑: 连智华)