

• 基础研究 •

# BMP 和 TGF-β 对兔尺骨骨缺损修复作用的研究

卢卫忠<sup>1</sup> 贺小兵<sup>1</sup> 唐康来<sup>2</sup> 杨柳<sup>2</sup> 朱庆和<sup>1</sup> 刘小冬<sup>1</sup> 何静<sup>3</sup> 许建中<sup>2</sup> 吴梅英<sup>2</sup>  
(1. 重庆市涪陵中心医院骨科, 重庆 408000; 2. 第三军医大学西南医院骨科; 3. 重庆市药剂学校)

**【摘要】** 目的 探讨外源性 BMP 和 TGF-β 对骨缺损的修复作用。方法 采用兔尺骨干 1.5 cm 缺损模型, 在骨缺损局部单独或联合应用 TGF-β 和 BMP, 在 4、8、12 周三个时相点进行大体形态观察、组织学、X 线片观察和在 12 周时进行生物力学测试, 对骨缺损修复效果进行评估。结果 BMP 和/或 TGF-β 治疗组骨缺损均已修复, 对照组骨缺损未修复, 联合应用 TGF-β 和 BMP 的修复效果明显优于单用 TGF-β 或 BMP, 而 BMP 又优于 TGF-β; 在生物力学方面, TGF-β 和 BMP 复合应用的力学强度与正常骨接近, 单独应用时明显弱于正常骨, TGF-β 弱于 BMP。结论 BMP 和 TGF-β 对骨缺损均具有一定的修复作用, BMP 的作用强于 TGF-β, 复合应用时, 二者作用进一步增强, 在修复骨缺损方面具有协同作用。

**【关键词】** 骨形态发生蛋白; 转化生长因子β; 骨缺损; 骨修复

**The effects of exogenous bone morphogenetic protein and transforming growth factor beta on repairing ulna defects in rabbits** LU Weizhong, HE Xiaobing, TANG Kanglai, et al. Department of Orthopaedics, Chongqing Fuling Central Hospital (Chongqing, 408000, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of exogenous bone morphogenetic protein (BMP) and transforming growth factor beta (TGF-β) on repairing bone defects **Methods** Adult rabbits were inflicted with the model of 1.5 cm segmental defect in the right ulna and treated locally with TGF-β and BMP, alone or in combination in the bone defect site. The repair capability was evaluated by gross, histological and radiographic examinations at the 4th, 8th and 12th week and by biomechanical tests at the 12th week after operation. **Results** The bone defects were all repaired in the treatment groups, which could not be found in the control group. The repair was better in combination treatment group with TGF-β and BMP than in treatment groups with TGF-β or BMP alone respectively, whereas BMP group was better than TGF-β group. The biomechanical strength of the ulna in the combination treatment group with BMP and TGF-β was approached to that of normal bone, whereas that of treatment alone with BMP or TGF-β was weaker than normal bone and TGF-β group was weaker than BMP group. **Conclusion** BMP and TGF-β could promote repair of segmental bone defects and the effect of BMP is better than that of TGF-β. It has been observed combination treatment with BMP and TGF-β can enhance further this effect and their interact with each other to modulate cooperatively and synergistically repairing bone defects.

**【Key words】** Bone morphogenetic protein (BMP); Transforming growth factor beta (TGF-β); Bone defect; Bone repair

骨形态发生蛋白(Bone Morphogenetic Protein, BMP)是骨生长的启动因子,能诱导间充质细胞分化为成骨细胞和骨细胞,促进钙化作用,产生钙化的骨基质<sup>[1,2]</sup>;转化生长因子β(Transforming Growth

Factor-beta, TGF-β)是调节骨形成的重要生长因子,与骨形成密切相关,在骨形成和修复过程中起着十分重要的作用<sup>[2,3]</sup>。关于 BMP 与各种载体及异体骨修复骨缺损的报道较多,但都存在着一定的缺陷与不足,这些研究主要是单用 BMP 一种生长因子,而将 BMP 和 TGF-β 复合用于治疗骨缺损的报道较少。本实验将 BMP 和 TGF-β 复合,观察其对骨

缺损的修复作用,为临床骨科利用 BMP 和 TGF-β 提供实验依据。

### 1 材料与方法

**1.1 材料制备** 本实验采用从人血小板提纯鉴定的 TGF-β<sup>[4]</sup>和从牛皮质骨中提纯鉴定 BMP<sup>[5]</sup>。参照 Miyamoto 等<sup>[6]</sup>的方法,以聚乳酸(Polylactic acid, PLA)为载体制备 TGF-β/PLA、BMP/PLA、TGF-β+ BMP/PLA 缓释系统,各缓释系统内,TGF-β 和 BMP 的含量分别为 100 μg 和 20 mg。

**1.2 动物实验模型及方法** 36 只日本大耳白兔,雌雄各半,兔龄 9 个月,骨成熟,体重 3.5~4.5 kg(由第三军医大学实验动物中心提供),3% 戊巴比妥钠静脉麻醉,无菌手术显露右尺骨中上段,用线锯切骨,造成尺骨中上段 1.5 cm 长的骨缺损模型(连同周围骨膜一并切除),随机分为空白对照、单用 TGF-β、单用 BMP 和 TGF-β+ BMP 4 组,每组 9 只。各组分别植入 PLA、TGF-β/PLA、BMP/PLA、TGF-β+ BMP/PLA 缓释系统。植入后不作内固定,逐层缝合伤口。术后肌注青霉素 400 000 U/d,共 3 d,不加外固定,动物分笼饲养,常规饮食,允许其自由活动。术后第 4、8、12 周每组各取 2 只动物处死取材行组织学检查;12 周各实验组取 3 只动物处死取材行生物力学测定。

### 1.3 观察指标

**1.3.1 X 线观察** 分别于术后当天、第 4、8、12 周摄右上肢正、侧位 X 线片,投照条件为 45 kV,50 mA,0.08 s,焦距 90 cm,日本岛津 400 mA X 线机下曝光,自动洗片机冲洗胶片。按 Delloye 等<sup>[7]</sup>的方法,根据 X 线片测量骨缺损区骨痂形成和骨连接情况。

**1.3.2 大体标本观察** 术后常规观察记录。处死动物后观察骨缺损区有无成骨和炎症反应。

**1.3.3 组织学观察** 尺骨标本经 1.33 mol/L 中性福尔马林液固定、脱钙,常规方法制备,沿尺骨纵轴的连续石蜡切片,厚度为 5 μm,HE 染色,每只动物取 3 张切片,普通光学显微镜下观察骨缺损愈合情况。用四川大学制 Mias-200 型图象分析系统分析新生骨的面积百分比(每组可得 6 个数据)。

**1.3.4 生物力学测定** 在 12 周取正常尺骨和右侧尺骨标本,用湿骨依次进行三点弯曲、轴向压缩及扭转破坏试验方法,其中仅扭转试验为破坏性,实验间隔时间为 2 h。分别测出标本的弯曲刚度、轴向压缩刚度、最大扭矩、扭转刚度和破坏能量。

**1.4 统计学处理** 实验结果用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,按析因设计的方差分析,用 SPSS 8.0 统计软件计算。

## 2 结果

**2.1 大体标本观察结果** 术后各组动物肢体均有不同程度的肿胀,1 周后消失。术后第 4 周,各组骨缺损区周围有少量纤维组织和血管长入。术后第 8 周,TGF-β 和 BMP 组骨缺损区内有骨痂形成,可见少量软骨,TGF-β+ BMP 组骨缺损区内骨痂形成较多,有较硬的骨软骨组织填充整个缺损处,对照组缺损区为纤维组织。12 周时,TGF-β+ BMP 组骨缺损区完全被骨痂包埋,与主骨界限消失,TGF-β 和 BMP 组大量骨痂填充骨缺损区,与主骨界限基本消失,而对照组缺损区为纤维瘢痕组织填充,无骨性连接,形成假关节。

### 2.2 X 线和组织学观察结果 (见表 1)

表 1 X 线和组织学观察结果

组别	4 周		8 周		12 周	
	X 线	组织学	X 线	组织学	X 线	组织学
TGF-β+ BMP	截骨端较多骨痂生长,四周少量新骨形成	骨缺损区内出现岛状生长的新生软骨和骨组织(图 1),骨端接触处明显	新骨形成量明显增加,截骨端模糊不清,有片状骨痂呈骨性连接	新生软骨和骨组织增多,融合成片,出现板层骨(图 2)	新生皮质骨结构清晰,与宿主皮质骨自然连接,髓腔再通,骨缺损已完全修复	骨缺损区已修复,被新生骨组织取代,形成正常骨干结构,髓腔再通,较规则(图 3)
BMP	截骨端少量骨痂形成	骨缺损区内有软骨和骨岛形成	截骨端骨痂形成增多,截骨端较多新骨形成并向中心生长,骨缺损范围缩小	软骨、编织骨、板层骨交织出现	骨缺损区被新生骨填充,髓腔部分再通	新生骨内骨髓腔出现,逐渐向板层骨结构改建但尚不完全(图 4),缺损大部分修复
TGF-β	新骨形成较少	截骨端有新骨形成	新骨形成量增加,截骨端骨痂形成较多	新骨形成增多并逐渐成熟	新生骨桥接截骨端,骨缺损区基本被新生骨填充,髓腔未再通。	骨缺损区被新生骨组织取代,骨改建不完全,新生骨髓腔形成(图 5)
对照组	截骨端清晰可见	有软骨细胞从断端向缺损区中央生长	截骨端仍未见骨痂形成	软骨细胞和类骨质仍局限在两端	截骨端硬化,髓腔封闭,形成骨不连	缺损中央被纤维结缔组织充填,血管少(图 6),未见成骨现象

**2.3 X 线和组织学定量检查结果** X 线和组织学定量检查结果是一致的。TGF-β+ BMP 组优于 TGF-β 和 BMP 组, 而 BMP 组又优于 TGF-β 组, 各治疗组明

显优于对照组(见表 2, 3)。表 2 是根据骨缺损通过 X 线所见骨痂形成和断端物理运动情况, 按相关标准记分<sup>[7]</sup>, 计算各组的相对值。

表 2 TGF-β 和 BMP 修复兔尺骨骨缺损 X 线定量检查结果( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	4 周			8 周			12 周		
	(n=9)	F	P	(n=7)	F	P	(n=5)	F	P
对照组	0.18±0.125	—	—	0.58±0.252	—	—	1.05±0.316	—	—
TGF-β	0.42±0.213	1.57	> 0.05	1.05±0.321	10.85	< 0.01	2.26±0.525	11.53	< 0.01
BMP	0.91±0.402	2.12	> 0.05	1.51±0.532	12.17	< 0.01	2.78±0.623	13.81	< 0.01
TGF-β+ BMP	1.32±0.562	2.51	> 0.05	2.21±0.612	17.26	< 0.01	3.73±0.822	21.63	< 0.01

表 3 TGF-β 和 BMP 修复兔尺骨骨缺损不同时相新生骨所占面积百分比(n=6,  $\bar{x} \pm s$ , %)

分 组	4 周	8 周	12 周	
对照组	5.65±0.18	15.56±0.26	21.53±0.30	
TGF-β	24.21±0.32	42.68±0.36	69.37±0.40	
BMP	33.56±0.38	53.28±0.42	81.63±0.46	
TGF-β+ BMP	42.76±0.41	65.25±0.45	92.32±0.48	
方差分析	F	2.53	12.67	19.38
	P	> 0.05	< 0.01	< 0.01

**2.4 生物力学测定结果** 生物力学测试结果表明, 术后 12 周, TGF-β+ BMP 组的最大扭矩、扭转刚度、三点弯曲刚度和轴向压缩刚度均明显强于单用 BMP 和 TGF-β 组, 与正常尺骨相比差异无显著性意义。BMP 组强于 TGF-β 组, 单用 BMP 和 TGF-β 明显低于正常尺骨。各治疗组之间及其与正常尺骨之间在破坏能量方面均无明显差别(见表 4)。

表 4 兔尺骨骨折愈合后生物力学参数的变化(n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	最大扭矩 (N m)	扭转刚度 (N m/du)	破坏能量 (J)	三点弯曲刚度 (N/mm)	轴向压缩刚度 (N/mm)	
正常尺骨	1.96±0.31	0.398±0.071	0.005±0.003	49.24±5.65	36.19±4.64	
BMP	1.68±0.27	0.321±0.056	0.005±0.003	43.28±4.32	31.91±3.28	
TGF-β	1.39±0.25	0.252±0.038	0.004±0.002	39.86±3.62	28.28±2.67	
TGF-β+ BMP	1.91±0.28	0.381±0.067	0.005±0.002	48.59±5.52	35.43±4.28	
方差分析	F	10.17	21.32	1.29	13.06	18.65
	P	< 0.01	< 0.01	> 0.05	< 0.01	< 0.01

**3 讨论**

单纯应用外源性 TGF-β 修复骨缺损的报道较多, Beck 等<sup>[8]</sup>将 TGF-β<sub>1</sub> 与甲基纤维素复合后植入成年兔颅骨 1.2 cm 的骨缺损区, 结果发现, TGF-β<sub>1</sub> 具有良好的骨修复作用, 缺损区的愈合速度与 TGF-β<sub>1</sub> 剂量呈正相关, 单用 TGF-β<sub>1</sub> 诱导骨形成具有剂量依赖性, 随剂量增加而增强。而将外源性 BMP 与各种载体复合治疗骨缺损的报道特别多, 多数研究表明<sup>[1,2]</sup>, BMP 可明显促进骨愈合, 具有较强的骨缺损修复作用。我们的结果也表明, 单用 BMP 和 TGF-β 对骨缺损均具有一定的修复作用, 单用 BMP 的作用强于单用 TGF-β。这可能是本实验模型已将缺损区内的骨膜全部去除掉, TGF-β 仅对骨膜间充质细胞作用, 不能诱导缺损区周围肌肉中间充质细胞的增殖和分化, 其成骨范围仅局限于骨折缺损区内<sup>[2,3]</sup>, 而 BMP 具有高效的异位诱导成骨作用, 可诱导缺损区周围肌肉中间充质细胞分化为成骨细胞和骨细胞<sup>[1,2]</sup>, 所以, BMP 修复骨缺损的作用

强于 TGF-β。以往研究表明<sup>[1,3]</sup>, BMP 和 TGF-β 的成骨作用均具有剂量依赖性, 我们选择的剂量为其单独作用时的最适剂量, 因此, 应具有一定的可比性。虽然, 目前市场上有大量的基因重组 BMP 和 TGF-β 产品供应, 但天然提取的 BMP 和 TGF-β 含有几种分子量的 BMP 和 TGF-β, 较基因重组的 BMP 和 TGF-β 成骨活性高。

本实验一个重要的特点是, BMP 和 TGF-β 复合应用时, 对骨缺损的修复作用明显增强。以往的文献曾有类似报道, Grobus 等<sup>[9]</sup>将 TGF-β 与重组人碱性成纤维细胞生长因子(recombinant human basic Fibroblast Growth Factor, rhbFGF) 复合, 发现有明显的协同作用。将猪 BMP 与牛血小板衍生生长因子(bovine Platelet-Derived Growth Factor, bPDGF) 联合应用修复桡骨骨缺损, 骨愈合率及修复骨的力学强度均明显高于单用 PDGF 或 BMP。而将牛 BMP 与 rhbFGF 复合后, 行小鼠肌袋实验, 21 d 时观察到复合组和单纯组均有新骨形成, 前者钙含量

是后者的 3 倍。这些研究结果与我们的结果均提示,骨生长因子复合应用比单用一种因子的作用强,它们之间有协同作用。体内研究表明, BMP 是骨生长的启动因子,能诱导未分化的间充质细胞不可逆地分化为软骨细胞和成骨细胞,通过钙盐沉积,导致新骨形成,启动骨生成,并具有高效的异位诱导成骨作用,但对已分化、成熟的成骨细胞和成软骨细胞无作用,它诱导新骨形成的过程需要一些生长因子(如 TGF- $\beta$ )的参与,这些因子虽不能直接诱导未分化的间充质细胞分化为软骨和骨,但可促进软骨细胞和成骨细胞的增殖和分化,并能诱导软骨和骨基质的合成,从而促进骨形成<sup>[1,2]</sup>。TGF- $\beta$ 的直接效应是促进骨膜中前成骨细胞的增殖,而非启动骨膜细胞向成骨细胞或软骨细胞的分化(这由 BMP 完成),它促进成骨细胞和成软骨细胞的增殖,在骨形成中的基本作用是补充其它生长因子(如 BMP)激活已分化的细胞,无异位成骨活性<sup>[2,3]</sup>。目前,大量研究证实, BMP 是唯一能够诱导异位成骨的生长因子<sup>[1]</sup>, TGF- $\beta$ 只有在 BMP 存在时,才能诱导异位成骨<sup>[10]</sup>。因此,当 TGF- $\beta$ 和 BMP 复合时, BMP 的异位骨诱导作用弥补了 TGF- $\beta$ 的不足,使 TGF- $\beta$ 的成骨能力增强,而 TGF- $\beta$ 能增加 BMP 的诱导能力<sup>[11]</sup>。它们之间相互作用、相互促进。由此可见,在修复骨缺损方面, TGF- $\beta$ 和 BMP 之间有良好的协同作用。

结果表明,单用 BMP 和 TGF- $\beta$ 对骨缺损均具有一定的修复作用, BMP 的作用强于 TGF- $\beta$ ,复合应用时,这种作用进一步增强,在修复骨缺损方面它

们具有协同作用。如何联合应用其它生长因子,使其在治疗骨不连、骨缺损中更好地发挥协同作用,尚需做更深入的研究。

(本文图 1-6 见后插页 2)

#### 参考文献

- Mundy GR. Regulation of bone formation by bone morphogenetic protein and other growth factors. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1996, 323: 24-28.
- Lind M. Growth factor stimulation of bone healing: An effect on osteoblasts, osteomyelitis and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl*, 1998, 283: 2-37.
- Joyce ME, Jingushi S, Bolander ME, et al. Transforming growth factor beta in the regulation of fracture repair. *Clin Orthop North Am* 1990, 21: 199-205.
- 唐康来,杨柳,卢卫忠,等. 人血小板中 TGF- $\beta$  的提取纯化及鉴定. *第三军医大学学报*, 1999, 21(9): 804-880.
- Urist MR, Lietze A, Mizutani H, et al. A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein (BMP) fraction. *Clin Orthop*, 1982, 162: 219-232.
- Miyamoto S, Takaoka K, Okada T, et al. Polylactic acid polyethylene glycol block copolymer. A new biodegradable synthetic carrier for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop*, 1993, 294: 333-345.
- Delbye C, Verhelmen M, Hemricourt J, et al. Morphometric and physical investigations of segmental cortical bone autografts and allografts in canine ulnar defects. *Clin Orthop*, 1992, 282: 272-292.
- Beck LS, Deguzman L, Lee WP, et al. TGF-beta, induces bone closure of skull defects. *Bone Miner Res*, 1991, 6: 1257-1265.
- Globus RK, Patterson Buckendahl P, Gosspodarowicz D. Regulation of bovine bone cells synthesize basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. *Endocrinology*, 1988, 123: 98-106.
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al. Transforming growth factor beta: Rapid induction of fibrosis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 4167-4176.
- McDonald BR, Gowen M. Cytokines and bone. *Br J Rheumat*, 1992, 31: 149-156.

(收稿: 2002-04-10 编辑: 李为农)

## 《脊柱外科杂志》即将创刊出版

经国家新闻出版署批准,由上海市医学会主办,第二军医大学附属长征医院骨科承办的《脊柱外科杂志》现已创刊,将于 2003 年 2 月在国内公开发刊。《脊柱外科杂志》的创办为广大脊柱外科工作者提供了学术交流的园地,将大力促进我国脊柱外科的学术发展。

《脊柱外科杂志》的办刊宗旨是为脊柱外科临床和科研服务,最终提高我国脊柱外科水平。《脊柱外科杂志》定位为高级学术刊物,为双月刊,大 16 开本,正文 64 页,全国发行。设置的主要栏目有论著、短篇报道、经验交流、综述、专题讲座、新技术新方法、学术争鸣、读者来信、消息报道等。读者对象为脊柱外科和相关学科的临床、教学和科研人员。本刊侧重于脊柱外科领域的基础理论、临床技术与新进展,对基础与临床研究方面的经验或教训均可报道。脊柱外科杂志编委会集中了几乎所有国内脊柱外科界的知名专家,对稿件将严格把关,作到高标准、高起点,力争反映和代表我国脊柱外科领域的最高学术水平,将杂志办成国内权威并具有一定国际影响的脊柱外科期刊。

欢迎广大骨科同道踊跃投稿(可网上投稿)和订阅本刊。2003 年度请向编辑部邮购,2004 年起从邮局订阅。

编辑部通信地址:上海市凤阳路 415 号,脊柱外科杂志编辑部,邮编:200003。电话:(021)63610109-8288,传真:(021)63520020, Email: chzhjzyk@online.sh.cn

## BMP 和 TGF- $\beta$ 对兔尺骨骨缺损修复作用的研究

(正文见 148 页)

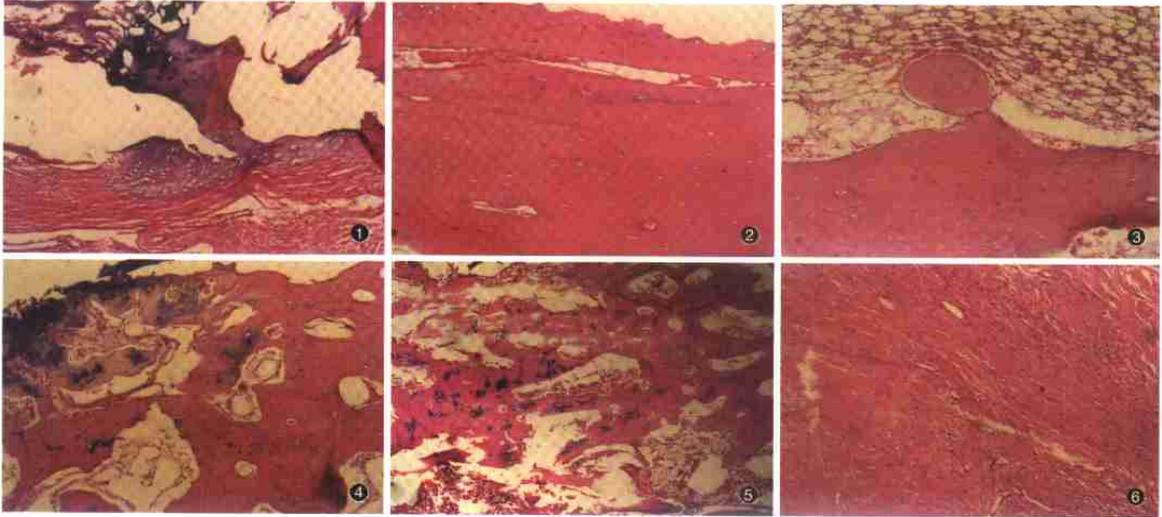


图1 TGF- $\beta$ +BMP组第4周, 缺损区内出现岛状生长的新生软骨和骨组织 HE  $\times$  100 图2 TGF- $\beta$ +BMP组第8周, 新生软骨和骨组织增多, 融合成片, 出现板层骨 HE  $\times$  40 图3 TGF- $\beta$ +BMP组第12周, 缺损区修复, 被新生骨组织取代, 形成正常骨干结构, 髓腔再通 HE  $\times$  40 图4 BMP组第12周, 新生骨内骨髓腔出现, 逐渐向板层骨结构改建但尚不完全 HE  $\times$  40 图5 TGF- $\beta$ 组第12周, 缺损区被新生骨组织取代, 骨改建不完全, 新生骨髓腔形成 HE  $\times$  40 图6 对照组第12周, 缺损中央被纤维结缔组织充填 HE  $\times$  40

## 脊髓损伤大鼠股骨松质骨超微结构的变化

(正文见 152 页)

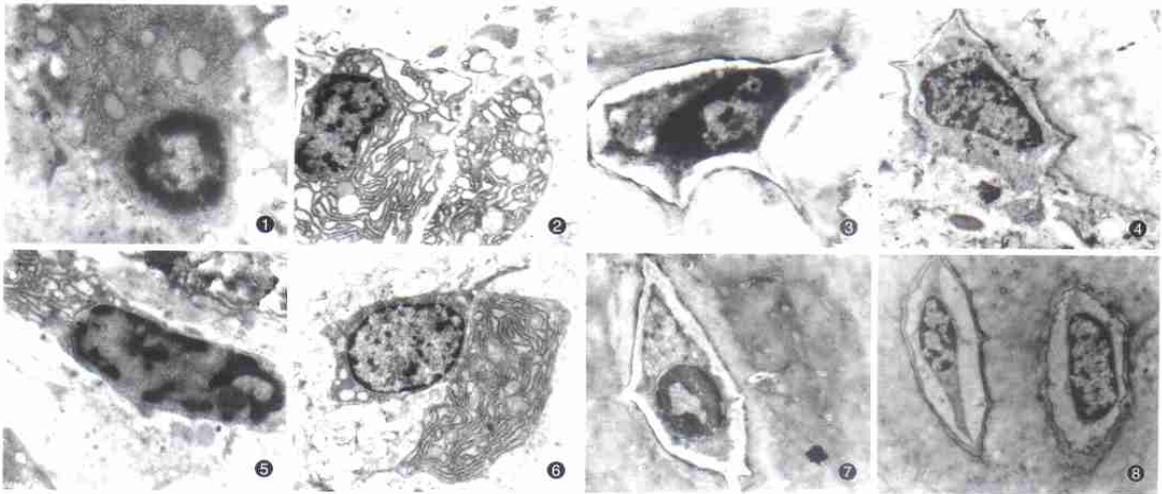


图1 SCI组1周时成骨细胞 透射电镜  $\times$  12K 图2 对照组1周时成骨细胞 透射电镜  $\times$  8K 图3 SCI组1周时成骨细胞 透射电镜  $\times$  10K 图4 对照组1周时成骨细胞 透射电镜  $\times$  8K 图5 SCI组3周时成骨细胞 透射电镜  $\times$  10K 图6 对照组3周时成骨细胞 透射电镜  $\times$  8K 图7 SCI组3周时成骨细胞 透射电镜  $\times$  8K 图8 对照组3周时成骨细胞 透射电镜  $\times$  6K