

猪骨-rhBMP-2 复合重组人工骨的研制及临床应用研究

李万民¹ 赵明² 徐杰¹ 刘农乐² 周丙怀¹ 王会信² 马立志¹ 赵怀川¹ 苏维成¹

(1. 濉溪县医院, 安徽 濉溪 235100; 2. 中国军事医学科学院基础医学研究所)

【摘要】 目的 选择猪骨作为 rhBMP-2 的载体, 经去抗原处理, 复合重组人工骨, 观察该种人工骨临床应用骨缺损修复, 促进骨折愈合及诱导成骨的能力。方法 选择猪骨经透析冻干法脱脂、脱蛋白及部分脱钙处理后与成品 rhBMP-2 按一定比例组成具有生物活性的猪骨-rhBMP-2 复合人工骨, 先行动物模型实验, 随后以自愿随机的原则, 临床应用 32 例, 术后 1, 4, 8, 12 周进行 X 线检查, 观察临床表现, 功能恢复情况。结果 临床 32 例, 34 块骨, 35 处植入。随访 31 例, 随访率 96.7%, 最长 24 个月, 最短 3 个月; 骨的愈合及缺损修复满意, 临床无不良反应。结论 经透析冻干法处理的猪骨能成为 rhBMP-2 的理想载体, 与 rhBMP-2 复合后具有良好的成骨诱导活性, 无免疫排斥反应, 具有广泛的临床应用前景。

【关键词】 骨移植 移植, 异种 基因

The preparation and clinical studies of artificial bone compounded and recombined with pig bone rhBMP-2
LI Wanmin, ZHAO Ming, XU Jie, et al. Suixi Hospital (Anhui Suixi, 235100)

【Abstract】 Objective Pig bones eliminated of the antigens were used for rhBMP-2 carriers to compound and reconstruct artificial bones. The ability of this artificial bone in repairing bone defects, promoting fracture healing and inducing bone formation were observed. **Methods** Pig bones with the fat separated albumen eliminated together with parts of calcium by means of dialysis lyophilization and then composed biology active artificial pig bones-rhBMP-2 with rhBMP-2 were composed in a certain proportion. The bones were applied in animal model experimental studies and then used clinically in 32 cases at random based on voluntary principle. Clinical manifestation and function recovery were observed by X rays examination in 1, 4, 8 and 12 weeks after operation. **Results** 32 cases of 34 bones with 35 insertion were used. 96.7% of the 31 cases were followed up from 3~24 months. The bone repair and the patient's recovery were satisfactory and there was no side reaction. **Conclusion** The processed pig bone is an ideal carriers of rhBMP-2 and has the action of inducing bone formation, without immunological rejection and it is of extensive prospects in clinical application.

【Key Words】 Bone transplantation Transplantation, heterologous Genes

自 1965 年 Urist 成功地用脱钙骨基质在肌肉内诱发异位成骨, 提出骨形态发生蛋白诱导成骨学说以来, 该课题已成为从根本上解决人体植骨材料来源的重点研究项目, 无论从 BMP 的提取及生物工程的合成或动物实验研究均取得了突破性进展, 近年来的实验研究证实 BMP 需与载体复合方具有临床应用价值, 故在国内外以往实验研究的基础上, 自 1997 年 9 月以来, 我院选用松质猪骨, 自行经透析冻

干法物理化学处理后作为载体与 rhBMP-2 成品(由中国军事医学科学院基础医学研究所提供)复合后, 应用临床, 作为新鲜、陈旧性骨折及良性骨缺损等的植骨材料, 取得了优良的效果, 现报道如下:

1 动物实验

1.1 材料 取 1 岁左右经防疫检验无疾的新鲜猪椎体骨或扁骨, 去除附着在其上的软组织及骨膜, 蒸馏水反复冲洗后, 劈成 3cm × 0.5cm × 0.5cm 大小骨块, 按以下顺序处理: 用 3mMNaN₃ 水溶液冲洗, 1:1 甲醇氯仿浸泡 4 小时, 0.6N 盐酸浸泡 48 小时, 0.5M EDTA 浸泡 4 小时, 30% 过氧化氢浸泡 24 小

时;蒸馏水反复冲洗,干燥,取 rhBMP-2 生理盐水稀释液每滴含 0.45mg,分别浸入每个 1 克骨块中,然后将骨块置于抽滤瓶中,抽出瓶内气体至真空状态,以便使 rhBMP-2 能均匀地浸入每个骨块中。在 -35℃低温下进行冷冻干燥后,分封装入袋中,环氧乙烷消毒后再放入冰箱中备用。

1.2 方法 成年兔 6 只,体重 1.8~2.2kg,分别取双后肢股骨中段纵切口,无菌操作,人为造成骨折后,重新内固定后其周围植入已制备消毒好的猪骨-rhBMP-2 人工复合骨 3 块,每块含 0.45mg;以对侧作为对照组,同样植入不含 rhBMP-2 的猪松质骨,4 周后处死,大体及切片观察。

1.3 结果 X 线片显示,2 周可见骨痂形成,4 周达临床愈合,对照组则无明显骨痂,骨折线清晰;4 周处死大体观察,含 rhBMP-2 植入侧,梭形骨痂,已达愈合;对照组侧假关节形成。切片观察,可见新生板层骨,未见有细胞生长,对照组侧为纤维结缔组织,无板层骨生长。

2 临床应用

2.1 一般资料 自 1997 年 9 月~2000 年 5 月,临床应用 32 例,34 块骨,35 处植入;其中男 24 例,女 8 例;年龄最大 67 岁,最小 8 岁,平均 34 岁;新鲜骨折全部选用闭合性骨折,其中胫骨骨折 12 例,1 例为多段骨折,2 处植入,前臂双骨折 2 例,4 块骨 4 处植入,股骨骨折 3 例,肱骨干骨折 3 例,舟状骨骨折 1 例,陈旧性骨折骨不连 6 例,其中孟氏骨折 1 例,股骨骨折 1 例,胫骨骨折伴骨缺损 2 例,胫骨骨折骨外露不连 1 例,先上外固定支架、局部旋转皮瓣的同时植入人工复合骨,桡骨骨折 1 例,股骨头缺血坏死 1 例,良性骨缺损 4 例;经术后病理检查证实,其中胫骨下端纤维结构不良 1 例,左股骨下端骨囊肿 1 例,跟骨骨囊肿 1 例,胫骨上端内生软骨瘤 1 例。

2.2 治疗方法 本着自愿随机的原则,新鲜骨折均在患者入院后 48 小时内无菌操作施行手术。方法是先复位,加压钢板固定,将植骨块剪成略粗于火柴杆大小的短条状放于庆大霉素液中浸泡约半分钟后,均匀地植入骨折周围,有骨块缺损者则填塞于骨腔。植骨量根据需为 2~6 块不等,含 rhBMP-2 为 0.9 至 2.7mg;陈旧性骨折骨不连者,先清除骨端纤维组织,打通髓腔,重新内固定,植骨方法同上,骨外露病人,上外固定支架,局部旋转皮瓣转移,覆盖创面后植骨;良性骨缺损病人,先将病灶彻底刮除后,用植骨块填塞于整个腔隙;股骨头坏死患者,在髋关

节外侧作小切口,自大转子下 1cm 处向股骨头方向中央部位开槽,直径 1~1.5cm,内填以人工复合骨。所有患者伤口均皮片引流,术后 48 小时去除,多数患者术后应用地塞米松 5~10mg,连用 3 天,常规抗生素应用 7~10 天。

2.3 治疗结果 每例患者术后观察全身表现,局部反应,X 线随访,随机选择部分病例的组织学观察及肢体功能恢复情况五部分;全身表现以 T、P、R 及肾功能为指标,局部反应以红、肿、痛,渗出及痒为指标,X 线随访均是术后一周内照片,常规正侧位,保留以便对比,观察骨折内固定尤其是植骨情况及新骨生成情况,随访采用门诊随访方式为主,即出院时向病人家属交待,其术后 30 天、60 天、90 天到门诊或就近医院照 X 线片;32 例患者中术后 30 天左右前来就诊者 24 例,占 75%;60 天随访者 28 例,占 82%,90 天随访者为 31 例,约占 96.7%。部分病例的组织学观察以骨折达骨性愈合去钢板时,取材做切片行组织学检查;肢体功能的恢复以关节活动,弃拐行走,恢复劳动能力为指标。

32 例获得不同时期的随访 31 例,随访率 96.7%。术后一周内 T37℃~38.3℃之间者 26 例,其余 T、P、R 及肾功能均正常;局部有痒感者 17 例,1 例局部皮瓣转移病人,切口延迟愈合,其余均 I 期愈合,平均拆线时间为 12 天,平均住院天数为 18 天。X 线检查显示:骨折病人 4~6 周新骨生成显著,8~10 周达临床或骨性愈合。骨缺损病人 4~6 周,所植上述块状制品变淡,间隙模糊,但仍分个清晰;8~10 周块状物呈蒙沙样模糊,分个不甚清晰;16~18 周块状物间无明显间隙,可见不同数量或密度的骨纹理穿过,有的已塑形完毕。2 例去钢板病人组织学检查呈板层骨样改变;31 例随访病人关节活动及肢体功能恢复满意。

2.4 结论 经透析冻干法处理的猪骨能成为 rhBMP-2 的理想载体,与 rhBMP-2 复合后具有良好的成骨诱导活性,无免疫排斥反应,具有广泛的临床应用前景。

3 讨论

3.1 植骨材料论述 植骨材料的来源有三:(1)自体骨;(2)同种异体骨;(3)异种骨。自体骨移植疗效可靠,无排斥反应,目前仍广泛应用于临床,但需另作切口,取材有限,尤其是对成长中的青少年来说,还影响其盆骨的发育。同种异体骨移植,目前仍受到传统习俗及法律条文的约束,在基层难以开展。

异种骨,取材方便,价格低廉,但因存在严重的免疫排斥反应,还未能完全解决,针对这一问题,几十年来医学界均在共同努力寻找解决既少排斥反应,又能加速骨生长的理想的植骨材料。Urist 于 1965 年首次用脱钙骨基质在肌肉内诱导异位成骨,提出了骨形态发生蛋白(BMP)诱导成骨的学说,其后又成功的提取了 BMP。BMP 的问世,给这一研究难题带来了光明,BMP 的诱导成骨作用已被世人所公认。现已证实,BMP 实际上是一组蛋白质,其组成不少于 13 种,分别为 BMP-1~13,其中以 BMP-2 的诱导成骨作用最强^[1];BMP 无种族特异性,具有跨种属诱导成骨的作用^[2]。1991 年 Yoh 将 DNA 重组技术成功地应用中国仓鼠卵细胞(CHO)表达了三种重组的人 BMP,分别为 rhBMP-2~4。现已证明,rhBMP-2 是一种 32KD 的多聚糖蛋白质,具有较高的骨诱导活性^[3]。但是,多年来的研究证明,BMP 的诱导成骨作用,需要有合适的载体材料才能发挥其很好的诱导成骨作用,如将 BMP 直接放于骨缺损处,会很快溶解随血液及组织液流动迅速减少,其诱导活性会大大减弱。而担当 BMP 的载体材料需具备如下要求:(1)无免疫排斥反应;(2)不影响 BMP 活性;(3)可被新生组织爬行替代^[3]。有人曾用陶瓷、胶原等作为 BMP 的载体的研究获得了一定的成功^[4]。作者多年来致力于异种骨移植材料的研究,制备了猪骨型羟基磷灰石并应用于临床^[5],但却使其丧失了生物活性。近几年来,胡蕴玉等医学专家提出异种骨分期处理的新思路。首先以理化方法消除或减弱抗原,以解决免疫排斥问题,制备成载体,而后与具有活性的 BMP 重新复合重组,使其既保留了传导成骨,又具有诱导成骨的活性,且无免疫反应发生。而有人提出了更为理想的载体要求应该是天然的多孔结构;微孔规则这适合 BMP 充填及间叶组织长入;其次异种骨作为一种生物组织和宿主骨骼具有同源性结构排列,易为受体组织细胞接近消除。我们采用了透析冻干法对猪骨松质骨进行了一系列理化处理,去除抗原,但仍保留骨的天然属性,具有良好的支架及骨传导作用,其上的微孔较人工陶瓷更适合于作为 BMP 的载体,在真空下处理,BMP 可均匀地吸附于其中。且不破坏 BMP 的生物活性,能在体内缓慢释放,以诱导新骨生成。而在这里我们所选用的 rhBMP-2 是军科院提供的通过大肠杆菌表达的具有高纯度的基因产品,可保证较强的诱导活性。二

者的复合,作为植骨材料,在成骨机制中既具有骨传导性,又具有生物活性。

3.2 应用与展望 本院经 32 例临床应用,未发现对人体发生不良影响的免疫排斥反应,除 1 例骨外露病人刀口延期愈合外,均一期愈合,骨折的愈合时间为 10~12 周,尤其是骨不连病人,均达到了促进愈合的目的。而少数病例局部出现痒感可能与异物反应有关。动物实验亦证明,使用以 rhBMP-2 的肢体侧,新骨生成多,骨折愈合快。良性骨缺损病人应用随访均可以看到,该植入材料吸收快,新骨生成替代满意,塑形期短等优点。因此,我们认为这是一种有广泛发展前景的植骨新材料,且猪骨取材方便,处理相对简单。应用研究证实具有广泛的推广应用价值。但研究是在 rhBMP-2 含量不多的情况下进行的,少的 1mg,多的也不过是 2.7mg,因此通过适当加大 rhBMP-2 的含量,还将会取得更好的效果。

3.3 适应证问题 众所周知骨移植材料是治疗各种良性骨缺损、骨不连及可能不愈合的各类骨折最常用的方法,理想的植骨材料应具备^[6]:(1)良好的组织相容性;(2)一定的支撑强度;(3)具有成骨诱导活性;(4)能够被吸收或替代;(5)易于成形或贮存。而猪骨-rhBMP-2 人工复合骨在解决了免疫源性问题的基础上,其它均符合上述条件,因此,这是一种良好的植骨材料,且从根本上解决了人体植骨材料的来源问题。本课题的应用研究病例选择是自愿随机的,因此就出现了骨折病人多,真正良性骨缺损相对较少的情况,但从另一个意义讲,它的适应证也得到了更为广泛的拓展。本文认为该种材料的临床适应证有:(1)四肢的良性骨缺损;(2)四肢陈旧性骨折骨不连;(3)考虑有发生延迟愈合或不愈合可能的新鲜骨折;(4)需要做植骨手术的融合部位的应用。

参考文献

- [1] 胡德志,付刚. BMP-2 的研究进展. 中国骨伤, 1998, 11(1): 47.
- [2] 孙玉鹏,张皖清. 生长因子与骨愈合. 中华骨科杂志, 1997, 17(5): 265.
- [3] 王丹,胡蕴玉. 可降解多孔 B-TCP/rhBMP-2 人工骨的骨诱导活性研究. 中华骨科杂志, 1998, 18(11): 691.
- [4] 唐六一,吴祖尧. 骨形态发生蛋白的载体及其释放系统. 中华骨科杂志, 1993, 13(3): 140.
- [5] 李万民,周丙怀,徐杰,等. 猪骨型羟基磷灰石的临床应用. 中国骨伤, 1998, 11(1): 56.
- [6] 孙正义,冯守诚,闵坤山,等. 骨缺损修复的实验力学观察. 中华骨科杂志, 1993, 13(8): 454.

(收稿:2000-10-17 修回:2001-01-10 编辑:李为农)