

DOI:10. 11798/j. issn. 1007-1520. 201501015

· 短篇论著 ·

rhBMP2 复合材料用于甲状软骨再生修复的研究

张龙城¹, 胡万青², 曹高翔³, 林文彪¹, 陆梦漪¹, 韦干观¹, 陈昊鹰¹

(1. 中国人民解放军第三〇三医院耳鼻咽喉头颈外科, 广西南宁 530021; 2. 马鞍山市人民医院耳鼻咽喉科, 安徽马鞍山 243000; 3. 广西大学材料科学与工程学院, 广西南宁 530004)

摘要: **目的** 运用组织工程学方法制作人工材料支架修复兔甲状软骨缺损, 寻求一种重建甲状软骨的新途径。**方法** 运用泡沫凝胶注模法制备多孔 HA, 以冷冻吸附法将 I 型胶原、rhBMP-2 沉淀于 HA 支架上形成 rh-BMP-2/ I 型胶原/HA 复合材料。实验动物分为两组, 实验组以 I 型胶原、HA、rhBMP-2 为材料, 对照组以 I 型胶原、HA 为材料, 分别进行甲状软骨缺损的原位修复, 观察并评估其修复效果。**结果** HA 体积分数为 50% 的多孔支架材料孔隙率为 $(50.54 \pm 3.02)\%$, 孔隙孔径为 $100 \sim 200 \mu\text{m}$ 。大体观察见术后 7 周时, 实验组支架材料降解完全, 被片状骨性组织所替代, 新生骨切面呈黄白色, 质地较硬, 且新生骨质与对侧未切除甲状软骨边缘紧密结合; 对照组支架仍只见纤维结缔组织包膜。组织学检查见实验组术后 3 周材料降解, 手术区域软骨母细胞增生伴成软骨区域形成; 术后 7 周可见软骨细胞增生及软骨骨质形成。对照组 3 周、7 周可见软骨缺损边缘软骨母细胞增生, 少量成熟软骨细胞聚集, 缺损中央区未见成熟软骨细胞。**结论** rhBMP-2/I 型胶原/HA 复合材料具有良好生物相容性, 是骨诱导和骨传导性好的材料, 可作为一种新型甲状软骨缺损的修复材料。

关键词: 重组人骨形态发生蛋白-2; I 型胶原; 羟基磷灰石; 再生; 甲状软骨

中图分类号: R653 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2015)01-0057-05

Application of rhBMP2 composites to regeneration
and repair of thyroid cartilage

ZHANG Long-cheng, HU Wan-qing, CAO Gao-xiang, LIN Wen-biao, LU Men-yi, WEI Guan-guan, CHEN Hao-yin
(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, No. 303 Hospital of PLA, Nanning 530021, China)

Abstract: **Objective** To explore a new method for in situ remediation of thyroid cartilage defects with artificial material scaffolds made by tissue engineering method. **Methods** Porous hydroxyapatite (HA) was prepared with foam gel injection molding method. And then collagen I and rhBMP-2 were precipitated on the HA scaffold by frozen vacuum adsorption method, forming collagen I/rhBMP-2/HA composite. Experimental animals were divided into two groups, collagen I, HA and rhBMP-2 were used for repair of thyroid cartilage defects in the experimental group while collagen I and HA in the control group. The remediation effects were assessed by general observation and histological examination. **Results** The bracket porosity in HA volume fraction of 50% was $50.54\% \pm 3.02\%$ and the pore diameters ranged from $100 \mu\text{m}$ to $200 \mu\text{m}$. Gross observation 7 weeks after surgery showed complete degradation of scaffold materials, which were replaced by sheets of indurated osseous tissue with yellowish-white section, in the experimental group. The new bone was integrated tightly with the edge of contralateral plate of thyroid cartilage. In the control group, there were only fibrous connective tissue capsules in the scaffolds. Histological examination at the 3rd week after surgery showed material degradation, chondroblastoma hyperplasia with formation of chondrogenic area in the surgical field in the experimental group. The examination at the 7th week after surgery showed visible chondrocyte hyperplasia and cartilage formation. While in the control group, examination at the 3rd and 7th week showed chondroblastoma hyperplasia with small aggregation of cartilage cells only at the border but not center of the defect. **Conclusion** With advantages of good biocompatibility, bone induction bone conductibility, Collagen I/rhBMP-2/HA composite material is a new material for repair of thyroid cartilage defect.

基金项目: 全军医药卫生科研课题(面上项目 06MA122); 广西自然科学基金项目(2011GXNSFA018209)。
作者简介: 张龙城, 男, 研究生, 主任医师。
通信作者: 张龙城, Email: zhanglongcheng_303@163.com

Key words: Recombinant human bone morphogenetic protein-2; Type I collagen; Hydroxyapatite; Regeneration; Thyroid cartilage

重组人骨形态发生蛋白-2, (recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2) 是一种高效骨、软骨生长因子,能够诱导骨、软骨的形成,但是其单独使用时具有一定的局限性。因此使用复合材料作为 rhBMP-2 的载体,不仅能高效的发挥 rhBMP-2 的诱导成骨作用,还能够减少其用量、减慢其被降解的速率。本实验将生物相容性好,具有骨传导活性的 I 型胶原和羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HA) 与 rhBMP-2 复合,观察其重建甲状软骨缺损的成骨效应,为今后的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 HA 支架的制备

将羟基磷灰石粉(平均直径为 $5.33\ \mu\text{m}$,比表面积为 $0.48\ \text{m}^2$,北京德科岛金科技有限公司提供)运用泡沫凝胶注模法制备多孔 HA 标准样件(直径 $10\ \text{cm}$ 、高 $10\ \text{cm}$ 圆柱体)。在常温常压下用生物力学测试系统进行 HA 标准样件抗压强度检测。以丙烯酸胺为单体,N-亚甲基双丙烯酸胺为交联剂,过硫酸铵为引发剂,柠檬酸铵为分散剂,四甲基乙二胺为催化剂,曲拉通 X-114(Triton X-114)为起泡剂,将单体、交联剂、分散剂与去离子水混合得到预混液,和 HA 粉末一起搅拌制得浆料,加入起泡剂,快速搅拌至体积为搅拌前的 $2\sim 3$ 倍,依次加入催化剂和引发剂,搅拌后注入通过 RP 技术建造的甲状软骨板样件模具,24 h 后开模,将模型 100°C 烘干 24 h,放入马弗炉中以 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度升温到烧结 1200°C ,保温 2 h,随炉冷却后制备 HA 体积分数为 50% 的多孔 HA 支架 30 个,取出 HA 支架。

1.1.1 HA 支架孔隙率测定 采用排液法测定 HA 支架的孔隙率:量取一定容积 (V_1) 无水乙醇,盛于量筒中,将制备好的 HA 支架放入其中并完全浸入无水乙醇中,密封量筒,静置 $10\ \text{min}$,支架表面无明显气泡时,记录此时的量筒读数 (V_2),将支架取出,再记录量筒中无水乙醇的读数 (V_3)。支架的孔隙率 K ,按照下列公式计算^[1]: $K = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3)$ 。

1.1.2 电镜扫描观察 支架样件表面喷金,用日本 HITACHI SU8020 电镜扫描以观察孔的形貌特征。

1.2 rhBMP-2/CHA 制备

rhBMP-2 由上海江莱生物科技有限公司提供,小鼠肌袋生物学活性试验证实其诱导成骨活性良好; I 型胶原(水溶性)由上海源叶生物科技有限公司提供。按照水溶性 I 型胶原冻干粉: HA 支架 = $1:2$ (质量比),通过冷冻吸附法使 I 型胶原沉淀于 HA 支架上,共制备 30 个 CHA 支架。其中 15 个 CHA 支架与溶于灭菌水中的 $50\ \mu\text{g}$ rhBMP-2 冻干粉制成的混合溶液通过冷冻吸附法制备成 rhBMP-2/CHA 复合支架。支架术前环氧乙烷消毒备用。

1.3 动物实验

新西兰大白兔 30 只(由广西医科大学动物实验中心购得)雌雄各半,雌兔月龄 $6\sim 10$ 个月,雄兔月龄 $8\sim 10$ 个月,体重 $2.5\sim 3\ \text{kg}$ 。随机将兔分为 2 组,每组 15 只。1% 戊巴比妥钠 $30\ \text{mg}/\text{kg}$ 兔耳缘静脉麻醉,颈部剃毛,常规消毒,纵行切开颈部正中皮肤,分离浅筋膜、颈前带状肌、甲状软骨外膜,暴露甲状软骨翼板,中线剪开并切除一整侧甲状软骨,保留甲状软骨内外膜。实验组植入 I 型胶原/HA/rhBMP-2 复合支架,对照组植入 I 型胶原/HA 复合支架,支架大小、形状与切除的兔一侧甲状软骨板一致。用医用耳脑胶粘连支架在缺损部位,缝合甲状软骨外骨膜进一步再固定支架,逐层缝合切口。术后肌肉注射庆大霉素,1 次/d, $0.5\ \text{mg}/\text{kg}$,连续 5 d。

1.4 术后观察及检查

分别于术后第 1、3、7 周随机处死动物,每组每批处死 5 只,作以下检测:

1.4.1 大体观察 术后动物的饮食、发声、活动及伤口反应。处死后取出兔喉部及其周围组织,大体观察植入体与周围组织结合、吻合口愈合、肉芽生长情况。

1.4.2 组织学观察 将兔喉部及其周围组织标本置于 10% 甲醛溶液固定 24 h,10% 硝酸脱钙 2 d,水洗,用 70%、80%、90%、95% 及无水乙醇梯度脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋,切片, $5\ \mu\text{m}$,烤片 (60°C) $30\ \text{min}$,HE 染色。光镜下观察缺损部位材料及其与宿主原有的甲状软骨结合部的组织学变化及成骨情况。

2 结果

2.1 HA 支架孔隙率

检测出 HA 体积分数为 50% 的多孔支架材料孔隙率为 $(50.54 \pm 3.02)\%$ 。

2.2 材料电镜扫描观察

电镜扫描观察发现,样件材料的外表面空洞因固化时未能形成对称性的球状,导致受力不均匀而变成多边形,而样件内部深处的孔隙未破坏气泡的球状结构而形成圆型联通小孔,孔隙孔径为 100~200 μm (图 1)。

2.3 一般情况

术后 30 只兔无意外死亡,术后一般情况良好,均当日清醒,发声正常,开始饮水,次日开始进食;术后切口 I/甲愈合,线结 10 d 左右自行脱落,切口无明显出血、红肿、渗出及感染、化脓等并发症,未见免疫排斥反应。

2.4 大体观察

术后 1 周,两组材料均被纤维结缔组织包裹,材料部分降解。术后 3 周,实验组支架材料降解完全,可见少量半透明状的骨性结节;对照组支架材料降解完全,创面较多纤维结缔组织生成,未见骨样组织覆盖。术后 7 周,实验组支架材料降解完全,被片状骨性组织所替代,新生骨切面呈黄白色,质地较硬,且新生骨质与对侧未切除甲状软骨边缘紧密结合;对照组支架仍只见纤维结缔组织包膜。

2.5 组织学检查

实验组:术后 1 周可见炎症反应明显,以中性粒

细胞浸润及单核样组织细胞为主,多见肉芽组织,可见新生的毛细血管,材料部分降解,手术区域软骨缺血性坏死,边缘区域软骨细胞反应性增生。术后 3 周可见炎症反应不明显,材料基本降解,伴有大量多核样组织细胞增生及吞噬,局部可见单核样组织细胞增生;手术区域软骨母细胞增生伴成软骨区域形成;手术区微血管增生伴肌性血管形成。术后 7 周可见除该组术后 3 周所见,还可见软骨细胞增生及软骨骨质形成 (图 2),新生软骨与宿主软骨完全融合。

对照组:术后 1 周可见炎症反应明显,以中性粒细胞浸润及单核样组织细胞为主,多见肉芽组织,可见新生的毛细血管,材料部分降解,材料周围多见幼稚的成纤维细胞增生,部分区域纤维细胞成熟。均未见软骨细胞及成熟骨细胞生成。术后 3 周可见炎症反应不明显,材料部分降解,伴有大量多核样组织增生及吞噬,局部可见单核样组织细胞增生,材料周围多见成熟的纤维细胞。支架材料中央区未见软骨细胞及成熟骨细胞生成。术后 7 周可见除该组术后 3 周所见,还可见部分纤维细胞玻璃样变,可见软骨缺损边缘软骨母细胞增生,少量成熟软骨细胞聚集,缺损中央区未见成熟软骨细胞 (图 3)。

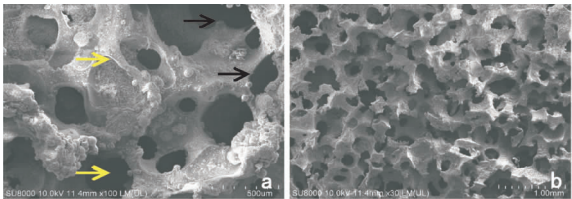


图 1 多孔 HA 支架电镜图 a:SEM × 2000;b:SEM × 300

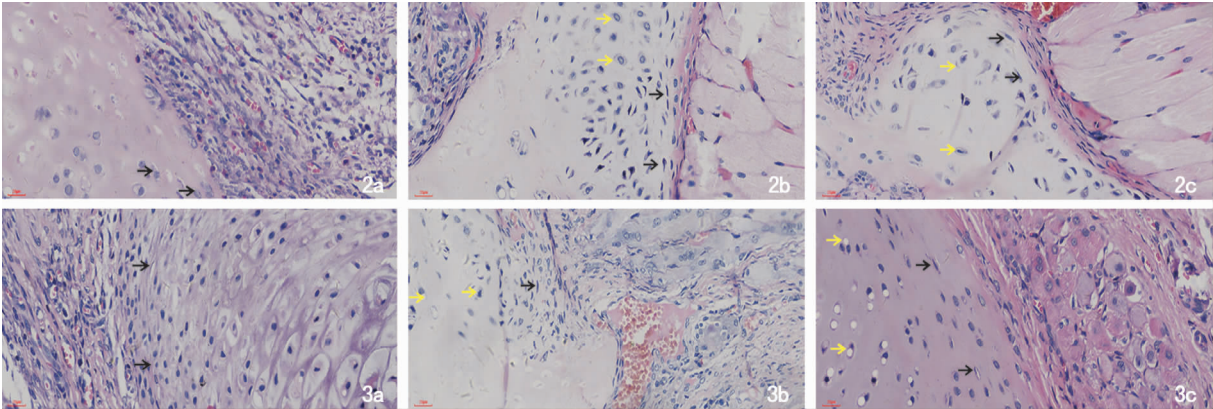


图 2 实验组病理学检查 (HE × 400) a:术后 1 周可见新生软骨形成,软骨母细胞增生 (黑色箭头);b:术后 3 周可见新生软骨形成,软骨母细胞增生 (黑色箭头) 及成熟软骨细胞聚集 (黄色箭头);c:术后 7 周箭头所示同 b

图 3 对照组病理学检查 (HE × 400) a:术后 1 周可见软骨缺损边缘软骨母细胞增生 (黑色箭头);b:术后 3 周可见软骨缺损边缘软骨母细胞增生 (黑色箭头),少量成熟软骨细胞聚集 (黄色箭头);c:术后 7 周箭头所示同 b

3 讨论

因创伤、感染、肿瘤切除等原因造成的甲状软骨缺损的支架重建治疗一直是临床医师面临的一大难题。自从20世纪90年代以来,骨组织工程在治疗软骨缺损方面展现了良好的应用前景。BMP是公认最强的、且唯一能够诱导异位成骨的细胞因子^[2]。目前应用骨形态发生蛋白2(BMP-2)基因结合骨组织工程的方法治疗修复软骨缺损成为一新的研究热点。BMP-2为BMP的一个亚型,也是已知的能够发挥良好的骨诱导活性、促进软骨及骨样组织生成的生长因子中作用最强的因子^[3]。BMP-2具有水溶性,半衰期比较短,存在容易弥散在体液中、效价低、持续时间短的缺点。因此BMP-2需要与其控释载体相结合,以保持蛋白质在充足的时间内在其应用位置引导骨生成^[4-5]。

BMP载体及其运载系统的研究开拓了其应用空间。但临床上可用的rhBMP2运载装置不甚理想,因为需要消耗大量的BMP才能达到预期的成骨效果^[6]。因此,探寻有效的运载系统,使其能够降低rhBMPs的消耗,保持一个稳定的释放模式,同时具有良好的骨引导性,是临床研究者努力的方向。多孔HA作为药物或生长因子的缓释载体已显示了较为广阔的应用前景^[7]。多孔HA植入人体后,其材料内部三维交通的孔隙结构不仅为BMP的吸附提供了充分的空间,而且有利于营养成分的渗透和血管化。载体的力学性能是必须考虑的重要因素。理想的载体力学性能应具备与植入点相匹配的力学属性,即从最初植入至最终自身组织重构完成的全程为细胞提供物理支撑作用^[8]。寻找力学性能与孔隙结构比例的合理平衡成为了载体制备的成败关键。一般将载体的孔隙率控制在45%~55%之间,以满足种植体在植入初期时临床力学性能对其的要求。本研究采用泡沫凝胶注模法制备内部联通的孔隙状HA支架,操作中能够形成更加稳定的起泡,气泡尺寸更趋于均匀,材料容易成型,同时可节省制作时间。制作HA体积分数不同的标准样件及人工材料支架,分别行抗压强度检查及孔隙率检测,发现随着HA体积分数的增高,其抗压强度逐渐增高,孔隙率则逐渐降低。为兼顾满足对支架在植入初期时临床力学性能的要求和较高的孔隙率,我们选择HA体积分数为50%的方案进行支架的制作。通过排液法我们测定出HA体积分数为50%支架的孔隙

率为 $(50.54 \pm 3.02)\%$,其抗压强度为 (2.50 ± 0.24) MPa,达到了支架材料的力学性能与孔隙结构比例的合理平衡的要求。扫描电镜观察支架呈多孔网状结构,孔隙尺寸为 $100 \sim 200 \mu\text{m}$,能够为骨组织细胞新陈代谢提供适宜通道,有利于营养的供给与废弃物的排泄,材料的表面化学性质有利于促进细胞的粘附与正常的繁殖和成骨破骨等生理活动的进行。本研究采用HA体积分数为50%的材料支架,结果显示:两组材料在术后3周基本降解,材料内部孔径会逐渐变大,更利于软骨样组织的长入;至术后7周材料完全降解,这种被加速的材料降解有利于新骨的长入和重塑,因而有利于骨缺损的修复^[9]。

I型胶原是一种较理想的组织工程支架材料,还具有低抗原性和生物可降解性。但将胶原作为单独骨移植时,存在易被机体短时吸收,机械性能差等缺点,很难达到骨修复材料的要求。目前,主要集中在对胶原复合材料的研究,将胶原和磷灰石复合制备出仿天然骨组成和性质的胶原-磷灰石复合材料^[10],成功用于骨损伤修复。为充分发挥BMP的骨诱导活性,本研究将I型胶原/多孔HA作为rhBMP-2的载体,通过冷冻吸附的方法将rhBMP-2完全并且均匀的复合在支架内部及表面,从而使得rhBMP-2能够缓慢而持久的发挥其诱导成骨的作用。从大体观察,实验组在术后3周和7周的成骨能力明显优于对照组,在7周时实验组不仅在缺损周边有新生骨,在缺损区中央亦有大量的新生骨,基本修复缺损部位,表明支架材料多孔结构为软骨组织细胞新陈代谢提供适宜通道。组织学观察,实验组7周后支架边缘及内部贯通区域均有软骨细胞出现,并在支架内部区域形成软骨骨质,其骨细胞发育更成熟且形成区域性的软骨结构;而对照组7周后仅在支架边缘与组织的连接区域出现少量成软骨细胞,在缺损中央区域只出现软骨细胞的初始形态,但细胞分化程度较缓慢未能找到成熟软骨细胞及软骨骨质,提示适宜剂量的rhBMP-2可以诱发更多的软骨组织^[11]。

本研究结果表明,rhBMP-2/I型胶原/HA复合支架具有良好的骨诱导活性和骨传导性,是组织工程学中一种新型替代骨组织的生物活性材料和支架材料。

参考文献:

- [1] Nilsson M, Fernandez E, Sarda S, et al. Characterization of a no-

(下转第64页)