

bFGF/BMP/ 胶原膜加速颌骨骨折愈合的大体及 X 线观察 *

陈建霖^{1#} 唐彦峰^{2,3#} 胡学清¹ 张继忠¹ 张彦¹ 白成志¹ 刘磊^{2△}

(1 灵武市人民医院口腔科 宁夏 灵武 750400 2 四川大学华西口腔医学院口腔颌面外科 四川 成都 610041 ;

3 包头中心医院口腔科 内蒙古 包头 014040)

摘要 目的:了解胶原膜作为生长因子缓释材料治疗颌骨骨折的应用前景。方法:将 100 μg 的 rhBMP-2 用 1 ml 的 bFGF 溶液完全溶解,用移液器移出 40 μl 的该溶液,滴加到面积为 0.5 cm×1 cm 的胶原膜组织块中,冻干后制成生长因子缓释系统,在 12 只新西兰大白兔两侧制成人工下颌骨骨折模型,左侧置放 bFGF/BMP/ 胶原膜,右侧均为空白对照,术后 2、4、12 周行临床大体观察及 X 线片观察。结果:实验组骨折愈合速度明显快于对照组。术后 2 周,X 线结果显示 bFGF/BMP/ 胶原膜组骨折断端边缘模糊。对照组骨折线明显。术后 4 周,X 线结果显示 bFGF/BMP/ 胶原膜骨折线基本不可见,骨折对位良好,断端边缘基本消失,骨折无错位。对照组骨折下缘可见纤维性骨痂形成,骨折线模糊。术后 12 周,各组 X 线结果无差异,骨折部位接近正常骨组织。结论:bFGF/BMP/ 胶原膜能加速骨折愈合,提高骨折愈合效果。

关键词: 下颌骨骨折;碱性成纤维细胞生长因子;骨形成蛋白-2;骨折愈合;胶原膜

中图分类号: Q95-3, Q819, R318, R329 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)09-1655-04

Prospect of bFGF/BMP/collagen Membrane as a Growth Factor Release Material for Jaw Fracture*

CHEN Jian-lin^{1#}, TANG Yan-feng^{2,3#}, HU Xue-qing¹, ZHANG Ji-zhong¹, ZHANG Yan¹, BAI Cheng-zhi¹, LIU Le^{2△}

(1 Lingwu People's Hospital, Lingwu 750400, China; 2 Department of Oral & Maxillofacial Surgery, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3 Baotou Central Hospital, Baotou 014040, China)

ABSTRACT Objective: To explore the possibility of collagen membrane to accelerate mandibular fracture healing. **Materials & Methods:** In this study, 100μg rhBMP-2 solution in 1ml bFGF, removed this study with pipette, dropped in area of 0.5cm×1cm of collagen membrane. Then it was dried in the freeze. 12 New Zealand rabbits were randomly divided into two groups, the mandibular fracture model on both sides were prepared. The left is bFGF / BMP / gelatin sponge group, whereas on the right is the control group. X-ray, HE staining, Masson staining and India ink staining were taken at the 2,4,12 week after surgery. **Results:** In the experimental group had significantly faster of fracture healing than the control group. After 2 weeks, X-ray showed that the group of bFGF / BMP / collagen membrane had blur edge of fracture fragments, the control group had obvious fracture lines. After 4 weeks, X-ray showed the group of bFGF / BMP / collagen membrane had unvisible fracture line of basic and better fracture healing. The control group showed that the procallus had form and fracture line was fuzzy. After 12weeks, every group had no difference in X-ray result. **Conclusion:** Based on these findings, bFGF / BMP / collagen membrane can accelerate fracture healing and improve fracture healing.

Key words: Mandibular fracture; Basic Fibroblast growth factor; Bone Morphogenetic protein-2; fracture healing; Collagen membrane

Chinese Library Classification: Q95-3, Q819, R318, R329 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)09-1655-04

前言

随着对骨折愈合机理的认识不断加深,学者们开始采用生长因子加速骨折愈合,并取得了一定成绩。然而,这些研究也发现,单纯生长因子的局部应用效果不佳,必须采用各种缓释材料与其复合,才能取得较理想的治疗效果。因此,生长因子缓释材料的选择已经成为这一研究方向的热点。目前常用的生长因

子缓释材料仍然具有价格昂贵、生物安全性不佳、可引发排斥反应、降解速度难以控制等缺点。针对上述问题,本实验采用胶原膜与 bFGF/BMP 复合,制备缓释系统,将其置于兔下颌骨骨折部位,观察骨折愈合情况,以明确该种生长因子缓释系统在颌面部骨折的应用前景。

1 材料和方法

* 基金项目:宁夏银川市科技攻关课题资助项目(2008061),教育部新世纪优秀人才支持计划基金资助项目(NCET-07-0578);

四川省杰出青年学科带头人培养基金资助项目(06-ZQ026-008)

作者简介:# 陈建霖和唐彦峰并列第一作者

陈建霖(1968-),男,副主任医师,主要研究方向:颌面部创伤诊治

唐彦峰(1983-),男,医学硕士,主要研究方向:颌面部创伤诊治

△通讯作者:刘磊,教授、博士生导师,电话:028-85503406,Email: drliulei@163.Com

(收稿日期:2011-02-06 接受日期:2011-02-28)

1.1 实验试剂和器材

人基因重组骨形成蛋白-2(rhBMP-2)冻干粉(中科物源生物技术有限公司,北京)、重组牛碱性成纤维细胞生长因子(rb-bFGF)液(亿胜生物制药有限公司,珠海)、胶原膜(新际生物活性胶原开发有限公司,成都)、钛板(康德钛制品科技有限公司,郑州)、50μl 移液器(Gilson,法国)、电热恒温鼓风干燥箱(BINDER 公司,德国)、H-4 恒温水浴箱(国华电器有限公司,常州)、组织学切片机(Leica 公司,德国)、光学显微镜(Nikon 公司,日本)。

1.2 生长因子缓释系统的制备

在超净工作台内按每 100 μg 的 rhBMP-2 用 1 ml 的 bFGF 液完全溶解;用 50 μl 移液器移出 40μl 的该溶液,滴加到等面积的明胶海绵(0.5 cm× 0.5 cm× 1 cm)和胶原膜(0.5 cm× 1 cm)上,置于-70℃冷冻干燥机内快速冻干,环氧乙烷消毒,4℃保存备用。

1.3 动物实验

1.3.1 实验动物 健康成年新西兰大耳白兔,由四川大学华西医学中心实验动物中心提供,2.5~2.7 kg,共 12 只。

1.3.2 实验动物操作过程 按 30 mg/kg 戊巴比妥钠给予兔耳缘静脉注射麻醉,在双侧下颌骨行人工骨折,均采用钛板固定,左侧在钛板下放置 bFGF/BMP/胶原膜(图 1),右侧为空白对照。术后 2、4、12 周处死动物。对于需做 HE 和 Masson 染色的动物,处死后直接取出双侧下颌骨,不剥离骨折端处骨膜,4%甲醛固定 1 周。对于做印度墨汁染色的动物,在处死动物前 1 h 通过兔耳缘静脉给予 5000 IU 肝素钠,使其血液快速肝素化;处死动物后,寻找兔双侧颈总动脉和颈外静脉血管,在加压的情况下,给予印度墨汁 30~40 ml 至同侧静脉回流为止,取双侧下颌骨,不剥离骨折端骨膜,置于 10%甲醛液固定 5 天。

1.4 观察方法

1.4.1 大体观察 观察动物术后饮食情况,术区创口反应;处死动物后,肉眼观察下颌骨骨折部位及周围软组织的生长情况。

1.4.2 X 线检查 对固定后的双侧下颌骨行 X 线片摄片观察。拍摄距离为 60 cm,电压为 42 kv,电流 100 mA,曝光时间 0.05

sec。观察骨折部位的愈合情况。

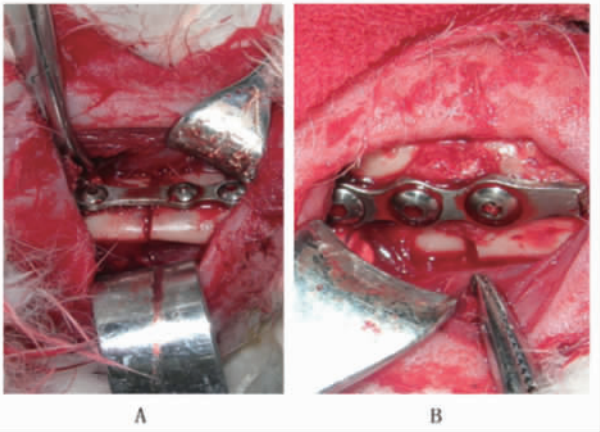


图 1 A:空白对照组 B:bFGF/BMP/胶原膜组

Fig. 1 A: control group B: bFGF/BMP/gelatin sponge group

2 结果

2.1 临床观察

术后所有动物生命体征平稳,术区无红肿、化脓。术后体重逐渐增加,手术创口均为一期愈合,无 1 例感染。动物均存活至预定取材时间,动物存活期间,创面未见红肿等炎性反应。

2.2 大体观察

术后 2 周 (1)空白对照组:骨折处可见少量新生软组织形成,骨折处活动度较大(图 2-A)。(2)bFGF/BMP/胶原膜组:骨折处可见大量新生软组织,骨折断端可活动。骨折表面处可见较多软组织覆盖(图 2-B)。

术后 4 周 (1)空白对照组:骨折处可见新生软组织存在,骨折下缘可见少量的骨痂形成,骨折断端活动度减小。(2)bFGF/BMP/胶原膜组:骨折表面和下缘处可见较多的骨痂覆盖,骨折愈合可,骨折无动度(图 2-C)。

术后 12 周 (1)空白对照组:骨折处有明显骨痂,骨折无动度,原骨折线可见线样凹陷。(2)bFGF/BMP/胶原膜组:骨折愈合良好,无动度,骨折线已完全消失(图 2-D)。

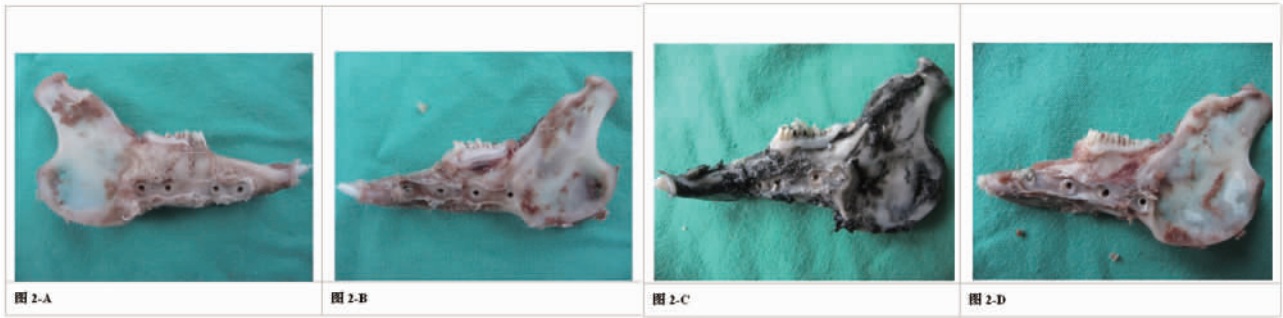


图 2 下颌骨术后形态

A: 对照组术后 2 周 B, C, D: 分别为 bFGF/BMP/胶原膜组术后 2 周、4 周、12 周

Fig. 2 Morphology of the mandibles after operation

A: 2 weeks(control group) B, C, D: 2 weeks, 4 weeks, 12 weeks(bFGF/BMP/gelatin sponge group)

2.3 X 线观察

术后 2 周各组均可见有明显的骨折线(如图 3-A,B),其中

bFGF/BMP/胶原膜组骨折断端边缘模糊。

术后 4 周 (1)空白对照组:骨折断端下缘模糊,下颌下缘

可见骨痂形成(如图 3-C)。(2)bFGF/BMP/ 胶原膜组:骨折线基本不可见,骨折对位良好,断端边缘基本消失,骨折无错位(如图 3-D)。

术后 12 周,各组骨折愈合良好,无明显骨折线(如图 3-E, F)。

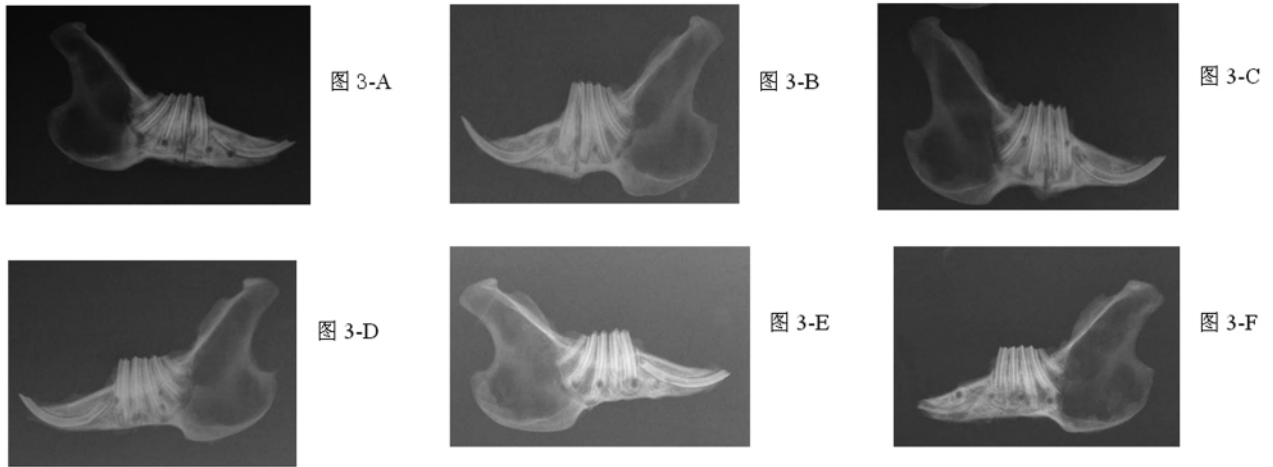


图 3 对照组和 bFGF/BMP/ 胶原膜组术后 X 线结果对比

A,C,E: 分别为对照组术后 2 周,4 周,12 周 B,D,F: 分别为 bFGF/BMP/ 胶原膜组术后 2 周,4 周,12 周

Fig. 3 Comparison of X-ray between control group and bFGF/BMP/gelatin sponge group after operation

A,C,E: 2 weeks,4 weeks, 12 weeks(control group) B,D,F: 2 weeks,4 weeks, 12 weeks(bFGF/BMP/gelatin sponge group)

3 讨论

3.1 骨折愈合的过程和影响因素

骨折愈合是一个复杂而连续的过程。从组织学和细胞学的变化,通常可将愈合过程划分为四个阶段,即血肿炎症机化期、初始骨痂反应期、软骨形成期和骨板形成改建期^[1,2]。在整个骨折愈合整个过程,包括了细胞迁移、血管生成和骨痂改建等生理过程,同时也包括多种细胞因子的骨诱导和分子信号传导作用,以及其对细胞分化和增殖的调控作用等,是一个多序列的修复过程^[3,4]。

骨折愈合是受多种因素影响的复杂过程。愈合过程的快慢与患者全身健康状况、骨折局部的血液供应、骨折局部是否感染和骨折断端有无软组织嵌入有关,也与骨折治疗方法有关。随着骨折愈合机制认识的深入,研究表明,在骨创伤愈合过程中,大量生物化学因子、生物生理因子和机械因子对骨折愈合都有重要作用^[5,6]。因此,只有在充分认识骨折愈合的机制的前提下,利用和发挥有利因素,避免和克服不利因素,才能促进骨折愈合,使加速骨折愈合成为可能。

本实验中动物骨折模型对位良好,采用钛板坚强内固定保证了骨折断端的紧密接触和骨折部位复位和稳定性,为骨折愈合提供良好环境;手术过程中尽量减少伤害骨折周围软组织,使用的缓释系统覆盖在骨折表面,尽量避免了骨折端软组织进入骨折断端的可能性的;局部使用的明胶海绵、胶原膜与钛板在临床应用中证实有较好的生物相容性好,很少出现感染和免疫反应。因此,减少和避免影响骨折愈合的不利因素,给骨折愈合创造了良好的局部因素。

术后实验证实,术后没有出现感染和排异反应,术后 12 周各组骨折部位愈合良好,实验组起到了加速骨折愈合的目的。

临床上对骨折观察最有效的方法是 X 线观察,本研究结

果也证明骨折在不同愈合时期的临床表现也不一样。

3.2 药物缓释系统的作用

药物缓释系统是将小分子药物或者生长因子与高分子载体材料通过物理或者化学的方法结合形成的^[7]。它在体内可以通过体内扩散、渗透等控制方式,将小分子药物或者生长因子以适当的浓度持续缓慢地释放出来,从而达到在局部充分发挥药物功效的目的。在缓释系统中,高分子材料作为阻滞剂或缓释剂骨架,能够控制局部药物或者生长因子,从而保持药物或者生长因子的结构和生物学活性的稳定,从而延长药物在局部的作用时间^[8,9]。在药物缓释体系中,药物或者生长因子释放时间与缓释系统中药物含量、载体的结构、载体的吸收能力,以及局部理化条件有关。药物缓释系统的优点主要表现为:1.局部维持较高的药物浓度。从而避免全身血药浓度较高引起的全身毒副作用;2.保持局部较长的药物作用时间和药物浓度的稳定;3.可人为的控制局部药物释放的速度^[10-13]。因而,药物缓释系统被广泛应用于多个生物医学领域。

作为药物缓释的载体材料,要求具有较好的生物相容性和生物降解性,即在体内可降解成小分子化合物,从而被机体代谢、吸收或排泄,对人体无毒副作用,并且在降解过程中发生的时机要合适^[14]。

目前较常用的药物缓释载体材料可分为无机材料、合成高分子材料和生物源性材料。无机材料主要成分是钙磷陶瓷,该类材料在生物体内不降解或降解时间较长,与局部骨折愈合速度不匹配,并且易在骨折外形成异位骨组织;合成高分子材料常见有聚乳酸、聚乙醇酸等,该类材料降解后多形成酸性产物,这种酸性环境不利于骨折愈合,有可能在局部引起无菌性炎症;生物源性材料包括胶原、脱钙骨基质、透明质酸钠、纤维蛋白、藻酸凝胶、琼脂、壳聚糖等,该类材料有难以控制降解速度、可能引发一定程度的免疫排斥反应等问题。此外,上述材料多

数都价格昂贵,在临床广泛应用仍受限制。因此,寻找具有高度生物安全性、价格低廉、易于临床的理想生长因子缓释系统仍具有重要的实践意义。

本研究选用的胶原膜作为药物缓释系统的载体材料,一方面是因为该材料都已有较久的临床应用历史,其生物安全性和临床操作性都已获得公认;另一方面,同其他材料相比,胶原膜价格相对低廉,在临床易于推广应用。

3.3 骨折愈合过程中生长因子的作用

骨折愈合是一个复杂的生理过程,在其过程中涉及到多种细胞和细胞因子的相互协同作用。骨相关生长因子是由骨细胞产生并存在于骨组织中,作用于特定的靶细胞。通过细胞内的信号传导系统将信息传到细胞核内,产生相应的生物学效应。如转化生长因子 β 超家族通过激活跨膜丝/苏氨酸激酶类受体传递信息,纤维细胞生长因子通过激活酪氨酸激酶类受体发挥作用^[23]。现已从骨基质和骨细胞和器官培养基中分离出多种骨生长因子,包括骨形态发生蛋白(BMP)、转化生长因子(TGF- β)、酸性和碱性成纤维细胞生长因子(aFGF和bFGF)、胰岛素样生长因子-和(IGF--和IGF-),神经生长因子(NGF)和血小板源性生长因子(PDGF)等。这些生长因子在骨折修复的不同时期和不同部位能被检测到,能在神经和内分泌系统的调节下,通过自分泌和旁分泌作用到靶靶,起到促进与骨形成有关细胞的丝分裂作用、分化作用、趋化作用和溶骨活性。因此可见,骨生长因子对于局部成骨有重要作用。

3.4 生长因子缓释系统在治疗骨折中的意义

颌面骨是人体颜面、呼吸道和消化道的重要组成部分,颌面部骨折后会给人的外观、功能和心理造成重大的打击,严重影响患者正常的生活和工作。然而骨折的愈合需要较长时间的钙化和改建过程,很难使患者满意。因而,加速骨折愈合就成为中外学者研究的一个热点问题。

随着对骨折愈合机制研究的深入,探明骨折愈合过程是多种生长因子、激素与局部组织的一个相互作用过程。骨相关生长因子作为局部调节因子,参与到软骨的骨生长代谢的各个时期,诱导骨折部位新骨的生成。在骨折愈合过程中,产生的内源性生长因子量较少,不能起到加速骨折愈合的作用,而局部注射外源性生长因子易被吸收降解,不能在较长时间在局部维持有效的药物浓度。而药物缓释系统正好弥补这些不足。

3.5 bFGF/BMP 缓释系统在加速兔下颌骨折中的作用

在本实验中,我们将bFGF与BMP复合后加入胶原膜中,制备缓释系统。放置在兔下颌骨骨折线表面,并用钛板进行坚强内固定。术后大体观显示2周后,实验组可见较多的纤维组织包裹骨折断端,骨折动度也小于对照组。4周后,bFGF/BMP/胶原膜组骨痂较好,空白对照组只有骨折下缘可见少量骨痂,实验组骨折动度均基本消失,对照组仍有活动度。12周后,大体观各组均已基本愈合。

术后结果表明bFGF/BMP/胶原膜组能加速骨折愈合速度。根据这些结果我们推测,胶原膜做为生长因子缓释系统的载体材料,能够加速骨折愈合,其原因有:(1)能够保护生长因子在体内的活性,并能使生长因子在局部缓慢释放,使其在局部持续维持较长时间的药物浓度;(2)胶原膜能够在局部起到膜引导骨再生(Guided tissue regeneration, GBR)作用,可以在引导局部骨形成的过程中,减少局部纤维组织长入骨折线内,

避免和减少了影响骨折愈合的不利因素,因而能发挥出更好的加速骨折愈合作用。(3)胶原膜有理想的生物相容性和降解性,不会引起并发症。

4 结论

本实验将两种生长因子与胶原膜结合,制成的bFGF/BMP/胶原膜,应用于治疗兔下颌骨骨折,通过临床大体观察和X线观察的研究证实,该生长因子缓释系统能够缓慢释放生长因子,并能在局部维持较稳定的药物浓度,能够加速骨折愈合,并提高骨折愈合的效果。提示胶原膜作为生长因子缓释载体在加速骨折愈合方面具有较好的临床应用前景。

参考文献(References)

- [1] HM Frost. The biology of fracture healing. An overview for clinicians Part I[J]. Clin Orthop, 1989, 248: 283-293
- [2] Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, et al. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing [J]. J Bone Miner Res, 2002, 5: 13
- [3] Rose FR, Oreffo RO. Bone tissue engineering: hope vs hype [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 14(7): 2921
- [4] Green DP, Bucholz RW. Fractures in adults [J]. Philadelphia Lippincott-Raven, 1996, 261-303
- [5] Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI. Gene expression during bone repair[J]. Clin Orthop, 1993, 289: 292-312
- [6] H Lo, S Kadiyala, SE Guggino, et al. Poly (L-lactic acid) foams with cell seeding and controlled-release capacity [J]. J Biomed Mater Res, 1996, 30: 475-484
- [7] W.M. van de Weert, L. Jorgensen, M.E. Horn, et al. Factors of importance for a successful delivery system for proteins [J]. Expert. Opin. Drug Deliv, 2005, 2(6): 1029-1037
- [8] N Fournier, CJ Doillon. Biological polyester: An in vivo angiogenesis study mole- cule-impregnated[J]. Biomaterials, 1996, 17: 1659-1665
- [9] 常津,刘海峰,姚康德.医用纳米控释系统的研究进展[J].中国生物医学工程学报,2000,19(4):42343
Chang Jin, Liu Hai-feng, Yang Kang-de. The progress on medical nano controlled release system [J]. Chinese Biomedical Engineering, 2000, 19(4): 42343
- [10] Bajpai PK, Benghuzzi HA. Ceramic systems for long-term delivery of chemicals and bio- logicals [J]. J Biomed Mater, 1988, 22 (12): 1245-1266
- [11] Benghuzzi HA, England BG, Bajpai PK, et al. In vivo delivery of estradiol from ceramic drug delivery devices [J]. Biomed Sci Instrum, 1991, 27: 181-187
- [12] Uchida A, Shinto Y, Araki N, et al. Slow release of anticancer drugs from porous calcium hydroxyapatite ceramic[J]. J Orthop Res, 1992, 10(3): 440-445
- [13] 石庭森.微球制剂药物控释研究进展[J].中国药学杂志,1996, 31(3): 131-134
Shi Ting-shen. The progress on micro-sphere drug controlled release [J]. J Chinese Drug, 1996, 31(3): 131-134
- [14] 计艳,胡勤刚.骨缺损修复中 BMP 载体材料的研究进展[J].口腔医学研究,2007,23(2): 211-213
Ji Yan, Hu Qin-gang. The progress on BMP carrier of repairing bone defects[J]. Stomatology Res, 2007,23(2): 211-213