

rhBMP-2 诱导异位软骨修复重建兔气管缺损的实验研究

王 兴 崔鹏程[△] 马瑞娜 罗家胜 许 莉 陈志峰

(第四军医大学唐都医院 陕西 西安 710038)

摘要 目的 探讨重组人骨形成蛋白-2(rhBMP-2)作为激活物诱导异位软骨修复并重建兔气管缺损的可行性。方法 取 24 只新西兰大白兔,制备气管前壁软骨 1/3 缺损模型。随机分为 A、B 组,每组 12 只,A 组为实验组,在气管缺损处前壁颈前肌肉修补,多点注射 rhBMP-2,B 组于气管软骨缺损部位直接颈前肌群修补。术后观察动物一般情况,于 4、8、12 周取材进行大体观察、HE 染色观察重建区域情况。结果 术后 A 组动物均存活至实验完成,B 组因气道感染及气道分泌物堵塞管腔致实验兔死亡,其余动物出现皮下气肿、呼吸不畅等情况。组织学观察 A 组有明显的新生软骨细胞及少量软骨样组织,可见结缔组织包绕,周围肌肉组织完整,排列整齐,未见明显坏死组织,有少量淋巴细胞浸润。B 组未见软骨组织生成,可见大量肉芽组织增生,结缔组织排列紊乱,伴少量坏死组织,大量淋巴浸润。结论 rhBMP-2 可通过注射到颈前肌肉修补肌群中诱导软骨细胞和软骨样组织生成,减轻炎症反应,联合颈前肌瓣修复重建气管缺损能充分维持修复重建后的气道形态,具有减少术后皮下气肿、气管狭窄的作用,有望用于临床修复重建气管组织缺损。

关键词 气管缺损 移植 重组人骨形成蛋白-2 肌瓣 硅胶管

中图分类号 Q95-3 R655.3 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)10-1838-03

Effect of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein -2 in Inducement of Ectopic Cartilage Repair and Reconstruction of Tracheal Defects in Rabbits

WANG Xing, CUI Peng-cheng[△], MA Rui-na, LUO Jia-sheng, XU Li, CHEN Zhi-feng

(Department of Otolaryngology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the feasibility of using recombined human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) to induce regeneration of ectopic cartilage and to reconstruct rabbit tracheal defect. **Methods:** 24 New Zealand rabbits were used in this experiment. A 1/3 defect of cartilage in the anterior ward of the trachea of the animal was created. Rabbits were randomly divided into two groups (n=12). The tracheal defect was repaired by anterior cervical muscle and injected with rhBMP-2 and absolute alcohol separately. The specimens were procured at 4, 6, 12 weeks for general observation and HE staining in order to evaluate the reconstruction. **Results:** Rabbits of the experimental group are all survived. In control group, some animal were died of infection and ischesis, while subcutaneous emphysema and choking were observed in other rabbits. **Conclusion:** rhBMP-2 can reconstruct rabbit tracheal defect and maintain the tracheal shape, consequently decrease the incidence of subcutaneous emphysema and choking and has potential clinical application.

Key words: Tracheal defect; Transplantation; RhBMP-2; muscle flap; Silicane tube

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R655.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)10-1838-03

前言

临床上由于外伤或肿瘤造成气管软骨全部或部分缺失,导致气管前壁塌陷及气道狭窄,造成呼吸道阻塞,严重的更是危及生命,给患者和社会造成很大负担。传统治疗多采用黏膜下瘢痕切除、气管扩张术、气管狭窄切除端端吻合或自体或者异体组织喉气管重建。但是有些病人颈前皮肤瘢痕过于严重,摇门式肌皮瓣无法采用,通过体外培养增殖的种子细胞种植于三维支架上共同培养移植修复软骨缺损^[1,2],往往由于细胞支架存

在或多或少的缺陷,无法达到使用的要求。本研究应用组织工程原理与方法,在缺失气管前壁使用颈前肌瓣复合 rhBMP-2^[3,4]诱导异位软骨再生,从而加宽,支撑,修复缺损的气管前壁, rhBMP-2 使肌瓣强度增加,从而支撑起气管塌陷,通畅气道。为使自体气管缺损修复早日应用于临床提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及主要试剂、仪器

重组人骨形态发生蛋白-2(rhBMP-2)由美国 Peprotech 公司生产,白色干粉剂。速眠新 号(盐酸赛拉嗪注射液),吉林省花牧动物保健品有限公司。

1.2 实验动物分组及模型制备

24 只新西兰大白兔,体重 1.8~2.0 kg,由第四军医大学实验动物中心提供。实验兔以速眠新 (0.15mL/kg,im)麻醉。仰卧位固定,术野备皮,常规消毒、铺单。在环状软骨与胸骨间沿颈正

作者简介: 王兴(1981-2),男,硕士研究生,医师,主要研究方向:喉,气管损伤与修复,电话:15110030070,

E-mail: wangxingmail@foxmail.com

△通讯作者: 崔鹏程,电话:029-84777446,

E-mail: cuipc@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2011-02-05 接受日期:2011-02-28)

中线作一切口,长约 10cm,分离并显露颈段气管,正中切开 3-5 气管环长约 1.5cm,切取气管第 3-5 环的前 2/3 气管环及粘膜,放入硅胶管支撑(长约 2cm,管腔直径 0.5cm),固定缝合硅胶管(左下侧)(图 1)。模型制备完毕后,根据实验设计的实验材料不同,随机分为 2 组。每组 12 只。A 组肌瓣复合 rhBMP-2 包裹修复缺损,牵拉右侧肌瓣到对侧,覆盖气管环缺损面,褥式缝合 3 针,双侧胸骨舌骨肌-胸骨甲状肌联合肌内交叉注射 rhBMP-2 溶液(图 2),用左侧肌瓣,完全覆盖右侧肌瓣,褥式缝合,消毒皮肤,皮肤对位缝合,确保局部无漏气。术后及术后一周内分别给予肌肉注射青霉素 80 万单位抗感染。B 组在模型制备模型的基础上,直接对位缝合,未作处理,为空白对照组。

1.3 观察指标

1.3.1 一般情况观察 术后观察实验兔一般情况,呼吸、进食、排便、活动以及手术切口愈合情况,是否有皮下气肿、哮喘音、呼吸困难,是否生存到实验结束。分别于 4、8、12w 处死兔子,观察实验动物的重建区域有无塌陷,管腔变形及肉芽生成,硅胶管是否脱落。

1.3.2 组织学观察 在大体观察以后,兔耳缘静脉注射 10ml 空气栓塞处死。在缺损修复, rhBMP-2 注射处,切取材料 2 份,一份用于光镜观察,观察肌瓣的生长情况,有无诱导出异位软骨,软骨的生长情况,周围组织的具体情况。另外将标本于 4%多聚甲醛固定 24h, 0.5 mol/L EDTA 脱钙,常规制成 5 μ m 厚切片。将上述切片做 HE 染色,光镜观察软骨生成情况。

2 结果

2.1 一般情况观察结果

A 组:全部存活到预杀期。B 组:B 组于术后第 4d、10d 因气道感染及气道分泌物堵塞管腔致实验兔死亡,其余存活到预杀期,实验动物在前 2 周普遍出现呼吸道刺激症状,第 3、5 周 2 只实验兔出现呼吸困难,喘鸣音等症状,但是一般情况尚可,除死亡的 2 只,还有 1 只出现严重的呼吸困难。

2.2 大体改变

A 组(rhBMP-2 修复组) 术后 2 周可见气管重建处管壁形态基本正常,无明显塌陷,吻合端紧密融合,硅胶管无松动脱落;气管管腔通畅,无分泌物滞留及肉芽增生;管腔内表面光滑,表面被一层白色黏膜覆盖。8 周时气管黏膜红润。12 周时重建区域气管黏膜外观与周围正常气管无异。对照组:1 只动物 18 d 死亡之后大体观察见吻合端无松动脱离,气管壁无明显塌陷,重建气管周径较两端正常气管明显变小,8 周时重建区域气管黏膜较修复组苍白;12 周时重建区域气管黏膜外观接近正常气管。

2.3 组织学

A 组可见明显的新生软骨细胞及少量软骨样组织,周围可见结缔组织包绕,周围肌肉组织完整,排列整齐,未见明显坏死组织,可见少量淋巴细胞浸润。B 组对照组,未见软骨组织生成,可见大量肉芽组织增生,结缔组织排列紊乱,伴少量坏死组织,大量淋巴浸润。(见图 3)

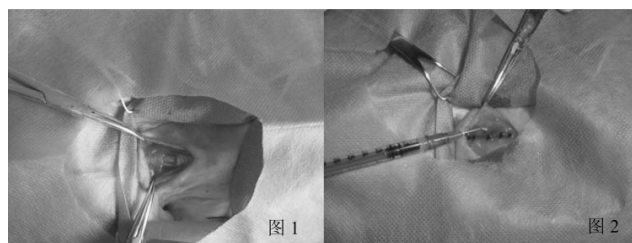


图 1 气管前壁缺损模型的制备

图 2 双侧胸骨舌骨肌-胸骨甲状肌联合肌内交叉注射 rhBMP-2 溶液

Fig.1 The preparation of defective model in tracheal anterior wall.

Fig.2 The tracheal defect was repaired by hibateral sternohyoid muscle and sternothyroid muscle combined with intramuscular rhBMP-2 injection

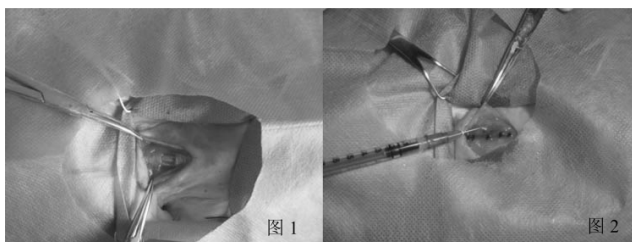


图 3 手术后 12 周气管重建区域组织学观察 A 实验组 为新生软骨样组织 B 对照组 图示为新生肉芽组织

Fig.3 Histological examination of the tracheal repaired region at the 12nd postoperative week. A: Neoformative chondroid tissue (black arrow) can be found in experimental group. B: Granulation tissue can be seen in control group

3 讨论

喉气管狭窄是临床上比较棘手的问题之一,而由于肿瘤、外伤等原因造成的气管前壁狭窄目前尚无理想的解决办法。传统的方法如有气管端端吻合、肌膜瓣修复、自体游离组织修复、金属钛合金网修复及人工气管移植等,但都因有一定的缺陷,限制了它们的使用^[5]。气管主要是一个由软骨、粘膜和结缔组织构成的管腔,具有一定的支撑性和韧性。大多数学者认为,理想的气管重建材料应该具有良好的生物相容性,质地坚韧而富有弹性,可无张力地与周围气管壁紧密缝合,并能抵抗呼吸道压力变化,不塌陷,并能提供永久性支架作材料的气道面有正常黏膜覆盖^[6]。

近年来,随着生物工程学的不断发展,关于其分子机制的研究也不断深入,BMP^[7]在牵引成骨或软骨研究已成为热点。BMP 是一种疏水性糖蛋白,广泛存在于骨基质中,是唯一能单独诱导间充质细胞向骨组织方向分化的生长因子,是骨组织形成过程中最关键的调节因子。可诱导未分化的间充质细胞向骨及软骨细胞分化,从而促进骨再生和骨愈合^[8]。BMP 可与不同类型细胞的特异性表面受体结合,具有化学趋化及促进增生的作用,不仅作为信号蛋白,在骨与肌腱的形成和修复中起重要的作用,而且在如身体发育和疾病过程中的神经突触调节功能,脑膜中的表达和信号传导及在肿瘤细胞中所发挥的各种重要作用^[9-14]。

BMP-2 是目前已知的唯一能单独诱导间充质细胞向软骨细胞和成骨细胞方向分化的生长因子。也是现阶段研究最为广泛、诱导成骨活性最强的 BMP 之一^[15-18]。1988 年, Wozne25 首

次纯化分离出天然 BMP-2,这是一种碱性降解糖蛋白质其分子量约为 30 kDs,降解产物的分子量分别为 30、18、16kDs。其中 30kDs 的分子是以二聚体形式存在,是自然 BMP-2 的主要形式。目前,人们已经利用基因重组技术已经表达出人类基因重组 BMP-2 即 rhBMP-2,并且已经成功的在原位和异位诱导出骨细胞。

我们研究发现单纯的气管前壁肌群的修补由于肌肉缺乏一定的支撑性,会导致呼吸不畅,大量炎性物无法排出,导致动物肺部感染死亡。而 rhBMP-2 注射后的前壁肌群,由于 rhBMP-2 与周围组织生物相容性好,能够刺激软骨细胞和周围间质细胞进行细胞外基质合成,与气管前壁肌复合可构建出有良好的支撑作用的软骨管腔结构。动物实验大体观察表明复合 rhBMP-2 进行气管前壁肌修补可明显改善单纯前壁修复由于修复区域软化造成的气道狭窄,改善气道通气,提高动物生存质量。组织学结果显示,未植入 rhBMP-2 的对照组缺损区可见纤维结缔组织填充,未见明显的新生软骨,缺损区临近的软骨环可见部分软化吸收。而植入 rhBMP-2 的实验组,缺损区可见纤维结缔组织中新生的软骨组织,不均匀的软骨基质中可见新生的软骨细胞聚集。气管损伤以前壁缺损较为多见,因此我们制备了气管前壁缺损模型,气管前壁肌群的修复可以诱导出较多的新生血管,维持缺损部位的血供,可避免断段残留软骨的坏死和软化。

我们认为, rhBMP-2 可通过注射到颈前肌肉修补肌群中诱导气管损伤后软骨的再生,所诱导的新生软骨有助于维持损伤部位气管的大体形态,具有操作简便,易于掌握,支撑力强,对于较大范围的气管缺损,尤其是气管前壁的缺损,是一种可供选择的修复材料。

参考文献(References)

- [1] Sittin ger M, Burmester GR. Can engineered cartilage transplants be used for treating rheumatic diseases [J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006, 2(4):172-173
- [2] Ikada Y. Challenges in tissue engineering [J]. J R Soc Interface, 2006, 3(10):589-601
- [3] YAMAGIWA H, ENIXN, TOKUNAGA K, et al. In vivo bone forming capacity of human marrow derived stromal cells is stimulated by recombinant bone morphogenetic protein-2 [J]. Bone miner metab, 2001, 19(1):20-28
- [4] 谈伟强,徐靖宏,刘友山,等.胶原蛋白/BMP 复合材料的制备和成骨性能研究[J].生物工程学报,2008,02 25;24(2),272-277
Weiqiang Tan, Jinghong Xu, Youshan Liu, et al. Preparation and Osteoinduction Capacity of Collagen/Bone Morphogenetic Protein Composites[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 02 25;24(2),272-277
- [5] 刘志,陈文弦,崔鹏程,等.带蒂胸锁乳突肌锁骨膜瓣在喉气管缺损修复中的应用 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2009, 09(23):821-823
LIU zhi, CHEN Wenxian, CUI Pengcheng, GAO Pengfei, et al. Reconstruction of laryngotracheal defect using the musculo-periosteum flap of the sternocleidomastoideus with clavicular periosteum[J]. Journal of

Clinical Otorhinolaryngology, 2009, 09(23):821-823

- [6] Manjubala I, Sastry TP, Kumar RV. Bone in growth induced by biphasic calcium phosphate ceramic in femoral defect of dogs [J]. J Biomater Appl, 2005, 19(4):341-360
- [7] Urist m R. Bone formation by autoinduction[J]. Science, 1965, 150:893
- [8] Riley EH, Lane JM, Urist MR et al. Bone morphogenetic protein-2: biology and applications [J]. Clin Orthop, 1996, 324:39. Biomed Mater Res, 2002, 61(3):440-449
- [9] 赵宇,胡平,陆应麟,等.带血管肌筋膜包埋促进细胞载体复合成骨效应与预构骨肌皮瓣的实验研究[J].中华整形外科杂志,2004,20(2):132-135
ZHAO Yu, HU Ping, LU Ying-ling, GAO Feng, et al. Re-growth of induced osseous tissue encapsulated in muscular fasciae for prefabrication of an osteomusculo-cutaneous flap[J]. Chinese Journal of Plastic Surgery, 2004, 20(2):132-135
- [10] Lanrent D, Christine M, Sabine M, et al. Identification of BMP-9 and BMP-10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. Blood, 2007, 109(5):1953-1961
- [11] Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, et al. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84(8):2744-2750
- [12] Hahn G V, Cohen R B, Wozney J M, et al. A bone morphogenetic protein subfamily: chromosomal localization of human genes for BMP5, 6 and 7[J]. Genomics, 1992, 14:759-762
- [13] Choi SS, Omenetti A, Witek RP, et al. Hedgehog pathway activation and epithelial-to-mesenchymal transitions during myofibroblast transformation of rat hepatic cells in culture and cirrhosis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 297(6):G1093-G1106
- [14] 刘培培,陈园园,郑华,等. BMP-4 在视网膜与视神经中的分布及对少突胶质前体细胞分化的影响[J].神经解剖学杂志, 2010, 26(5):459-464
Liu Peipei, Chen Yuanyuan, Zheng Hua, The distribution of BMP-4 in rat retina and optic nerve and its effects on the differentiation of oligodendrocyte precursors [J]. Chinese Journal of Neuroanatomy, 2010, 26(5):459-464
- [15] Rodeo SA, Suzuki K, Deng XH, et al. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to enhance tendon healing in a bone tunnel[J]. Am J Sports Med, 1999, 27(4):476-488
- [16] He T C. Distinct osteogenic activity of BMPs and their orthopaedic applications. J Musculoskeletal Neuronal Interactions, 2005, 5(4):363-366
- [17] Koh J T, Zhao Z, Wang Z, et al. Combinatorial gene therapy with BMP2/7 enhances cranial bone regeneration [J]. J Dent Res, 2008, 87(9):845-849
- [18] Upon PD, Davies RJ, Richard C, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP10 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(23):15794-15804