

# 重组转化生长因子 $\beta$ 复合同种异体骨移植修复骨缺损的实验研究

赵广民<sup>1</sup> 刘强<sup>2</sup> 孙振军<sup>1</sup> 乔栓杰<sup>1</sup>

(1. 太原市第 264 医院, 山西 太原 030001; 2. 山西医科大学第一医院, 山西 太原)

**【摘要】** 目的 评价重组转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )复合同种异体骨移植修复骨缺损的效果。方法 用基因重组的方法提取 TGF- $\beta$ , 与同种异体骨复合后植入兔桡骨缺损区, 采用同体双侧对照方法, 进行 X 线摄片、组织学及放射性核素骨扫描检查。结果 术后 8~12 周, 复合物移植侧移植骨与桡骨断端全部连接, 成骨活跃, 单纯植骨侧移植骨与桡骨断端无连接, 成骨差。结论 重组 TGF $\beta$  复合同种异体骨移植修复缺损效果良好。

**【关键词】** 脊柱损伤 中药疗法 受体, 氨基酸 神经毒素类

**Experimental study of bone grafting for the treatment of bone defect using transforming growth factor $\beta$  combined with homologous bone** ZHAO Guangmin, LIU Qiang, SUN Zhenjun, et al. The 264 Hospital of Taiyuan (Shanxi Taiyuan, 030001)

**【Abstract】 Objective** To evaluate the effects of bone grafting for the treatment of bone defect using transforming growth factor $\beta$ (TGF- $\beta$ ) combined with homologous bone. **Methods** TGF $\beta$  was extracted by gene recombination and homologous bone was implanted into the defect area of rabbit's radius. The contralateral radius of the same animal were used as controls. The examinations of X-ray, histology and radionuclide bone scanning were done. **Results** After 8~12 weeks, the results showed that grafting bone and radius connected completely on the side of compound grafting with active osteogenesis, while on the side of pure bone grafting, no connection can be observed of the grafted bone with radius and the osteogenesis was poor. **Conclusion** Grafting of transforming growth factor $\beta$ (TGF $\beta$ ) combined with homologous bone is a good method for the treatment of bone defect.

**【Key Words】** Spinal injury Chinese medicine treatment Recipient, amino acid Neurotoxins

转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )是近年来被证明具有促进骨生长的一种有效的诱导因子。作者采用基因重组的方法提取 TGF $\beta$ , 将其与同种异体骨复合修复兔桡骨缺损, 效果良好。

## 1 材料与与方法

**1.1 重组转化生长因子 $\beta$ 的基因表达** 将含有完整的 TGF $\beta$  核苷酸序列的基因片段 PBS<sup>KS</sup>-TGF $\beta$  与表达载体质粒 PBV<sub>220</sub> 分别经限制性内切酶 EcoR I、PST I、Sma I 消化后, 再用 RNA 酶和 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 DH<sub>5 $\alpha$</sub>  和 JM109, 得到了 TGF $\beta$  的高效表达, 再经纯化得到 TGF $\beta$  纯品<sup>[1]</sup>。

**1.2 TGF $\beta$  纤维蛋白凝胶复合物的制备** 纤维蛋白凝胶据 Durham 报道的方法制备<sup>[2]</sup>, 将 100 $\mu$ g TGF $\beta$  加入纤维蛋白凝胶制成复合物植入实验侧移植骨中, 等量纤维蛋白凝胶植入对照侧移植骨中。

**1.3 同种异体骨的制备** 采用无菌操作, 取兔桡骨后立即在 -70 $^{\circ}$ C 下低温冷冻, 然后置于真空容器中 (10Pa) 升华脱水, 直至残余水分分为 2%~5%, 然后将异体骨预包装后进行  $\gamma$  射线

辐照灭菌, 剂量为 20KGY, 然后置于 -30 $^{\circ}$ C 低温环境下保存备用。

**1.4 动物实验模型** 成年健康新西兰大白兔 20 只, 雌雄不限, 体重 1.5~2.0kg。采用左右两侧同体对照。3% 戊巴比妥钠耳缘静脉麻醉, 无菌环境下手术, 暴露桡骨中段, 连同骨膜锯断桡骨 1.5cm, 造成骨缺损。取准备好的同种异体骨, 截成长约 1.5cm 的骨段, 掏空髓腔, 随机决定左右侧肢体, 于髓腔中植入 TGF $\beta$  和纤维蛋白复合物, 作为实验侧, 于对侧髓腔中植入单纯等量纤维蛋白作为对照侧。将植骨块嵌入骨缺损, 用 4 号丝线将其绑扎固定于相邻尺骨上, 冲洗伤口后, 缝合肌膜、皮肤, 术后肌注青霉素, 每日 1 次, 连续 1 周, 常规饮食, 分笼专人饲养。

## 1.5 观察指标

**1.5.1 术后分阶段 X 线摄片观察** 术后 8 周、12 周由专人摄 10 只兔双前肢侧位 X 线片, 控制条件为 60kV, 0.10s, 10mA, 80cm, 专人冲洗, 观察植骨的连接、骨痂生成及髓腔再通情况。

1.5.2 放射性核素  $\gamma$  骨显像检查 术后 4 周、8 周分别在 3% 戊巴比妥钠静脉麻醉下每只动物(共 10 只)耳缘静脉注射  $^{99m}\text{Tc}$  甲基二磷酸盐( $^{99m}\text{Tc}$  MDP) 5 $\mu\text{Ci}$ , 3h 后,用 APEX-SP 4HR  $\gamma$  照相机测免双前肢放射性分布情况。

1.5.3 组织学检查 术后 2 周、4 周各处死 5 只动物,分别取材于同体双侧植骨块和宿主骨连接处,10% 中性福尔马林固定,脱钙,石蜡包埋,切片,HE 染色。

2 结果

2.1 X 线观察 术后 8 周:10 只动物中有 5 只的实验侧桡骨近端已与植骨块连接,无明显外骨痂,髓腔模糊(图 1),余 5 只的实验侧桡骨近端与植骨块间骨折线模糊;对照侧 10 个桡骨移植块均明显,骨折线清晰,无外骨痂(图 2)。术后 12 周:8 只动物的实验侧桡骨移植块两端已与宿主骨连接,部分髓腔再通,无明显外骨痂(图 3),余 2 只实验侧桡骨移植块与宿主骨近端连接,远端未连接;10 个对照侧桡骨移植块均明显,骨折线清晰,但 6 只有明显外骨痂趋于包裹(图 4),而余 4 只未形成包裹。

2.2 放射性核素  $\gamma$  骨显像检查 术后 4 周和 8 周,10 只动物均可见实验侧植骨区放射性较对照侧浓聚。

2.3 组织学观察 术后 2 周:取材于 5 只动物实验侧桡骨植骨块和宿主骨间的标本均可见大量的软骨形成(图 5);对照侧同部位取材未见成软骨现象(图 6)。术后 4 周:5 只动物实验侧桡骨植骨块和宿主骨间的标本均可见软骨已向骨小梁过渡(图 7);而对照侧均无成骨现象(图 8)。

3 讨论

目前关于骨移植的修复过程的理论,主要有以下五个概念:直接愈合(direct healing);混合结合(incorporation);爬行替代(creeping substitution);传导成骨(osteoconduction)和诱导成骨(osteinduction)。直接愈合主要指带血管的骨移植,因为有其良好的血供、活的成骨细胞,同时有骨生成诱导因子发挥作用,其骨愈合过程由传统的爬行替代转化为一般的骨愈合过程,故有“活骨移植”之称<sup>[3]</sup>。而其他三种骨移植修复,即是没有血供的骨条块移植,其移植骨必须经过“死而复生”,通过混合结合后的爬行替代、传导成骨更替死骨,因此,骨愈合过程缓慢,成功率较低。

同种异体骨的爬行替代与自体骨相似,不同的是异体骨所有成骨细胞全部来自宿主骨床而不是移植体。同种异体移植主要依靠血管长入移植体并使血管化来提供间充质细胞,后者再分化为成骨细胞并产生基质而成骨。转化生长因子 $\beta$ 被认为在创伤愈合、新骨形成、骨组织的修复和重建中都起重要作用<sup>[4]</sup>。它可以诱导骨膜间充质细胞增殖、分化成成骨细胞和成软骨细胞,刺激 I 型胶原的合成,因此,如果能够提供分子水平的各种骨诱导因子,足量的成骨前体细胞及其他促进成骨的因素,使传导成骨、诱导成骨同时进行,加速血管化和替代过程,将使移植骨更具有生物活性。

本实验采用基因重组提取 TGF- $\beta$  解决了其来源问题,将其与同种异体骨复合移植修复骨缺损,既提供了一种良好的生物相容性支架,同时又提供了足量的外源诱导因子,因此使传导成骨、诱导成骨同时进行,加速了爬行替代过程使骨缺损修复加快。

兔桡骨中段 10mm 缺损是公认的骨不愈合动物模型,本实验造成兔桡骨中段 15mm 骨缺损作为实验模型。从实验结果看,重组 TGF- $\beta$  与同种异体骨复合植入侧移植块与宿主骨连接,组织学检查和放射性核素骨扫描检查均证明实验侧移植区成骨活性均明显高于对照侧,且在 12 周时 X 线片示实验侧骨缺损在大部分动物中即完全愈合,而对照侧仅在连接处包裹骨痂,而骨折线清晰,无愈合征象。此实验证明,此种方法修复骨缺损是切实可行的,有其临床实际意义。

(本文图 1~8 见插图 4)

参考文献

- [1] 赵广民,刘强,陈君长.重组转化生长因子 $\beta$ 促进骨折愈合的实验研究.骨与关节损伤杂志,1999,14(4):249-251.
- [2] Durham LH, Wilatt DJ. A method for preparation of fibrin glue. Laryngotology, 1987, 101(10):1182-1186.
- [3] Urist MR. Bone transplants and implants. In: Urist MR. Fundamental and clinical bone physiology. Philadelphia: Lippincott, 1980. 311-386.
- [4] 孙玉鹏,胡蕴玉. $\beta$ 转化生长因子研究进展.中华骨科杂志,1994,14(8):505-507.

(收稿:1999 10 25 修回:2000 02 15 编辑:房世源)

## 九江专修学院本科、专科及中专招生

赣教社证字(98)036号 赣教社广字[2001]第023号

本院是国家教育部备案的高等教育学历文凭考试院校,环境幽雅,设施齐全,师资雄厚,常年面向社会招收应往届初、高中毕业生及在职人员,年龄地区不限。层次分本科、大专、中专及初中起点的大专预科班。学习形式分两种:业余函授和全日制住校脱产学习。

一、学院开设医药、理工、文科等专业 30 多个,专业设置:临床医学、中西医结合、中医、针灸、口腔、药学、护理、医影像、医检验、计算机应用及管理、经管、法律、英语、公文文秘、市场营销、会计、旅游、装潢设计、工民建、服装、电子、国贸、金融、行管、机电、广告、小学教育、中文、教育管理、幼师、工商管理、新闻等。

二、教学、发证及学费:①函授生在职自学,考试成绩合格,发给省教委验印,国家承认学历的本科、大专、中专毕业证;②另类函授生在职自学,考核合格者发学院加盖钢印的本科、大专学业毕业证书,可申请提前毕业,学院建立学籍档案,可向有关人事部门寄发。本科学费 800 元、专科 700 元,免试入学随报随读;③全日制住校生免试入学,考试成绩合格发国家承认学历的本科、专科、中专毕业证,并推荐安置就业,可签订就业保障协议及办理农转非户口。秋季班 9 月上旬开学,春季班 3 月上旬开学,可随时接收插班生,每年学费 3000 元。

三、报名方法及地址:邮汇报名费 6 元,即寄报名登记表、详细招生简章。汇款时请用正楷写清详细地址、邮编,并在汇单上写明学习专业,不必另外再来信。汇款及来函请寄:江西九江市老马渡 88 号付 A16 号九江学院招办孙武平老师收 邮编:332000 咨询电话:0792-8130039 手机:013507066206 传真:0792-8130269 此广告长年有效,欢迎来校参观考察。

另:本院欲在全国各地设招生代办点,待遇优,也接洽有关人员及单位搞联合办学,有意者来函来电洽谈。

# 重组转化生长因子- $\beta$ 复合同种异体骨移植修复骨缺损的实验研究

(正文见 277 页)

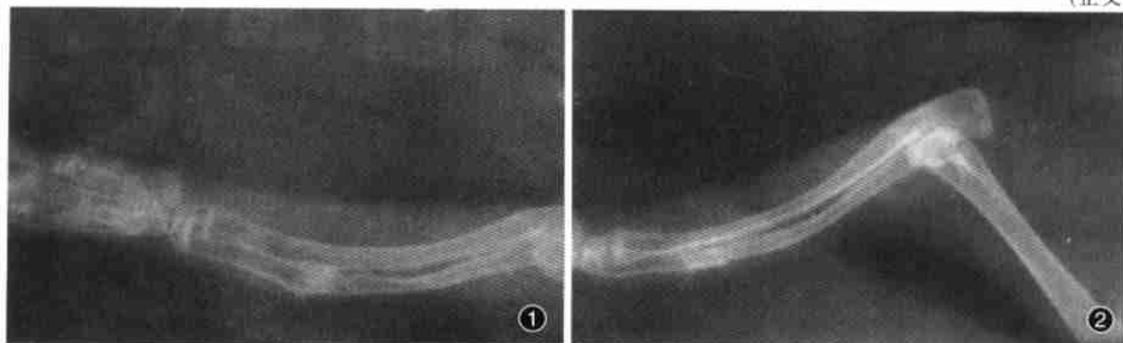


图 1 术后 8 周实验侧桡骨 X 线片: 桡骨近端已与植骨块连接, 髓腔模糊。图 2 术后 8 周对照侧桡骨 X 线片: 桡骨断端未与植骨块连接。

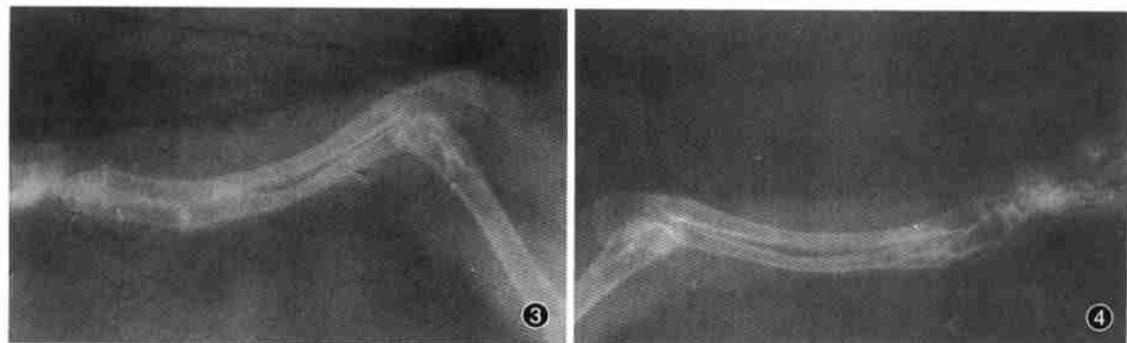


图 3 术后 12 周实验侧桡骨 X 线片: 桡骨断端已与植骨块连接, 髓腔再通。图 4 术后 12 周对照侧桡骨 X 线片: 移植块明显, 外骨痂包裹。

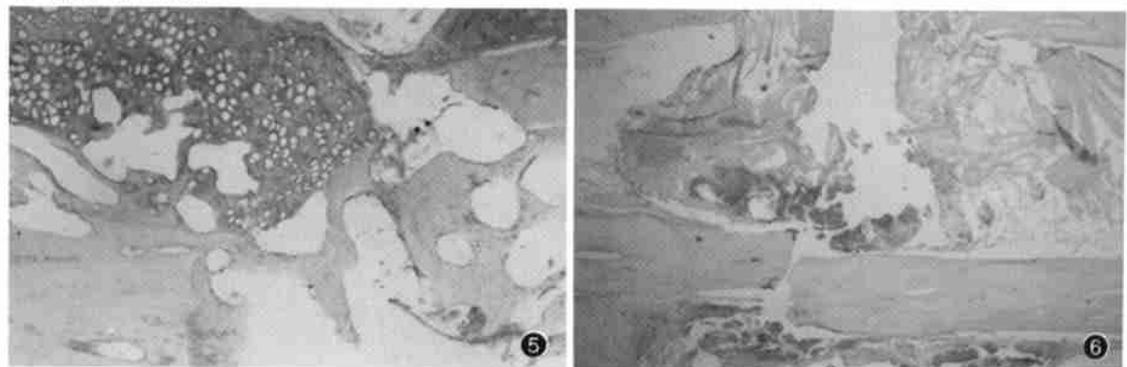


图 5 术后 2 周实验侧植骨块与宿主骨连接处组织切片: 大量软骨形成。HE  $\times 200$  图 6 术后 2 周对照侧植骨块与宿主骨连接处组织切片: 未见软骨形成。HE  $\times 100$

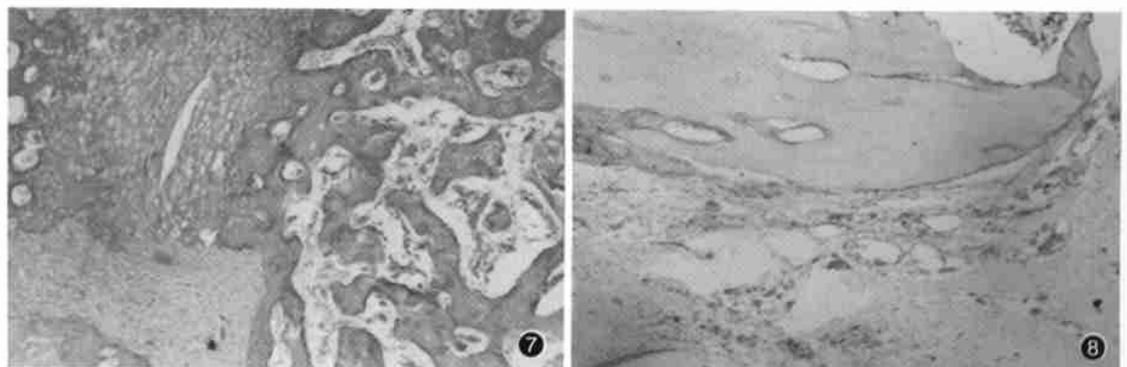


图 7 术后 4 周实验侧植骨块与宿主骨连接处组织切片: 软骨已向骨小梁过渡。HE  $\times 200$  图 8 术后 4 周对照侧植骨块与宿主骨连接处组织切片: 无明显成骨现象。HE  $\times 100$