

辛伐他汀复合聚乳酸修复颅骨极限缺损的实验研究^{*}

王晶莹 宋泉生 朱静琳 韩晓光 杨燕琳^① 陈 栋^① 李 旭 宋纯理^{**}

(北京大学第三医院骨科, 北京 100191)

【摘要】 目的 观察辛伐他汀与聚乳酸复合物修复颅骨极限缺损的效果。**方法** 健康雄性 SD 大鼠 20 只, 体重 (150 ± 10) g。制备直径为 10 mm 的颅骨全层极限缺损模型。实验动物随机分成 2 组, 每组 10 只。对照组缺损区单纯植入聚乳酸 40 mg; 实验组缺损区植入辛伐他汀 20 mg, 聚乳酸 40 mg。术后 4 周、8 周通过大体观察、X 线摄片比较颅骨缺损区新骨形成面积占总缺损面积百分比、不脱钙骨组织切片甲苯胺蓝染色观察颅骨缺损的修复情况。**结果** X 线片显示术后 8 周, 实验组大部分骨缺损区显示为不规则的高密度阴影, 对照组大部分缺损区域仍为低密度透光影。各组 ($n = 5$) 颅骨缺损区新骨形成面积占总缺损面积百分比, 对照组为 27.33% ± 2.54%, 实验组为 74.63% ± 2.42%, 两组比较差异有显著性 ($t = -30.148, P = 0.000$)。不脱钙骨组织切片甲苯胺蓝染色显示, 术后 4 周实验组骨缺损区有少量新骨形成, 术后 8 周实验组骨缺损区被大量骨组织充填; 对照组骨缺损区为剩余材料与纤维组织充填, 仅在缺损周边有少量新骨形成。**结论** 局部应用辛伐他汀有显著促进成骨的作用, 对修复骨缺损具有良好的应用前景。

【关键词】 骨缺损修复; 辛伐他汀; 聚乳酸

中图分类号: R-332

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2009)12-1148-04

Effect of Simvastatin-Polylactic Acid Compound on Critical Calvarial Defect Wang Jingying, Song Quansheng, Zhu Jinglin, et al. Department of Orthopedics, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of simvastatin-polylactic acid compound on critical calvarial defects in rats. **Methods** Twenty male SD rats (150 g ± 10 g), were used to establish critical cranial defect (10 mm in diameter) model. The animals were randomly divided into control and experiment groups (10 in each). In the control group, 40 mg of polylactic acid were implanted into the defect area; whereas in the experiment group, simvastatin-polylactic acid compound were used (20 mg simvastatin and 40 mg polylactic acid). Four and eight weeks after the implantation, the defect area of the rats was observed by X-ray and toluidine blue staining. **Results** Eight weeks after the operation, X-ray examination showed high-density regions in the defect area in the experiment group, while low-density regions in the control group. The radiopacity of cranial defects were 27.33% ± 2.54% in the control group, and 74.63% ± 2.42% in the experimental group ($n = 5, t = -30.148, P = 0.000$). Toluidine blue staining showed a few new bone tissues at 4 weeks and fully filled bone defect at 8 weeks in the experiment group. Meanwhile, in the control group, only a small quantity of new bone tissue could be seen on the edge of the cranial defects. **Conclusion** Locally implanted simvastatin-polylactic acid compound is a promising method for the treatment of bone defect owing to its high osteogenic ability.

【Key Words】 Bone defect repair; Simvastatin; Polylactic acid

骨缺损一直以来都是骨科研究的热点和难点问题之一, 虽然骨组织具有一定的自我修复潜能, 但较大的骨缺损却不能完全自行修复。传统骨移植一直是重建和修复骨缺损的主要常用方法, 但存在供体骨来源不足或免疫排斥反应等诸多局限性。之前发现他汀类药物具有体内外成骨作用。本实验将辛伐他汀与聚乳酸复合, 植入大鼠颅骨极限缺损模型, 通过观察辛伐他汀修复骨缺损的效果, 检测其促进成骨能力, 并为辛伐他汀局部植入修复骨缺损提供实

验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

1.1.1 试剂 辛伐他汀, 购自美国 Merk 公司; 聚乳酸 (polylactic acid, PLA, 相对分子质量 4×10^6), 购自山东医疗器械研究所。

1.1.2 设备 X 线摄片机 (HITACHI, 日本); 环钻 (HILTI, 日本)。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300352, 30772200)

** 通讯作者

① (北京大学第三临床医学院骨科, 北京 100191) 中心实验室

1.1.3 实验动物 健康雄性 SD 大鼠, 体重 (150 ± 10) g, 共 20 只。购买并饲养于北京大学医学部实验动物中心, 饲养级别一级。

1.2 实验方法

1.2.1 辛伐他汀/聚乳酸植入薄饼的制备 常温用 2.5 ml 丙酮将 PLA 400 mg、辛伐他汀 200 mg 充分溶解并混匀, 或用 2.5 ml 丙酮将 PLA 400 mg 充分溶解并混匀。分别取 250 μ l 上述溶液放入自制直径为 10 mm 的圆形模具中, 放入通风橱内, 待丙酮完全蒸发后, 将药物载体复合物或单纯载体加工成直径 10 mm 的圆盘状薄饼 (各 10 枚), 使每个薄饼中均含辛伐他汀 20 mg + PLA 40 mg (实验组) 或 PLA 40 mg (对照组), ^{60}Co 辐照消毒备用。

1.2.2 大鼠颅骨极限骨缺损模型的制备 腹腔内注射 1% 戊巴比妥钠 (0.45 ml/kg) 麻醉实验动物。术前备皮, 手术野常规消毒, 铺无菌孔巾。沿颅骨正中中线做舌形切口, 依次切开皮肤、皮下至骨膜表面, 显露颅盖骨, 剥离颅骨表面的骨膜。

使用环钻在颅骨上制备直径为 10 mm 的圆盘状颅骨全层缺损, 持续用 4 $^{\circ}\text{C}$ 无菌生理盐水冲洗, 注意保护硬脑膜。手术中注意将颅骨表面的内外骨膜一并完整切除。随机分为 2 组, 每组 10 只, 骨缺损区内植入薄饼。对照组缺损区单纯植入 PLA 40 mg; 实验组缺损区植入辛伐他汀 20 mg, PLA 40 mg。局部皮肤消毒后缝合。

1.2.3 治疗效果观察 分别在手术后 4 周、8 周, 每组各 5 只大鼠 1% 戊巴比妥钠腹腔内注射, 过量麻醉致死, 取材。切取原颅骨缺损处及周围骨组织, 仔细剔除多余软组织, 进行 X 线及组织学观察。

(1) 大体观察: 去除标本周围软组织, 肉眼观察骨缺损区修复情况。

(2) X 线摄片观察: 摄片条件电压 40 kV, 电流 1.6 mA, 投照距离约为 50 cm。采用 Auto CAD 图像处理软件, 对每组动物颅骨标本缺损区进行 X 线阻射面积占总缺损面积百分比 (即新骨形成面积占原缺损面积百分比) 的比较, 以观察各组间骨缺损修复效果的差异。

(3) 硬组织切片, 甲苯胺蓝染色: X 线摄片后, 硬组织包埋, 不脱钙组织切片。切片时垂直于颅骨板, 沿大鼠颅骨缺损的正中冠状面切片, 切片厚度 5 μm , 甲苯胺蓝染色。

1.2.4 数据处理与统计学分析 实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS15.0 统计软件进行处理。组间新骨形成面积百分比采用成组 t 检验进行差异性分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 术后实验动物一般情况及大体观察

动物均无死亡。手术后大鼠颅骨切口除 2 例 II 期愈合外, 其余愈合良好, 无红肿感染, 无移植植物排出。大鼠颅骨组织取材后, 大体观察, 实验组与对照组颅骨缺损均有纤维结缔组织覆盖, 实验组缺损部位有质硬颗粒。

术后 4 周: 对照组骨缺损区植入物周围孔隙内充满纤维组织, 缺损区界限清晰。实验组骨缺损区大部分被质地较硬的组织所充填, 厚度不均匀, 植入物边缘与周边骨质有明显骨融合。

术后 8 周: 对照组骨缺损区孔隙内充满纤维组织, 周边可见少量硬组织形成。实验组骨缺损区被血红色较均匀的硬组织充填, 厚度均匀, 植入物边缘与周边骨质有明显骨融合。

2.2 X 线片观察

术后 4 周: 对照组骨缺损区内阻射影像呈絮状, 主要位于缺损区周边, 密度不均匀, 亦低于周围骨组织, 缺损部位为低密度透光影。实验组骨缺损区内有少量点状、块状的阻射影像, 透光带和阻射带呈参差不齐的排列征象, 密度低于周围骨组织。

术后 8 周: 对照组骨缺损区内阻射影像呈絮状, 主要位于缺损区周边, 密度不均匀, 亦低于周围骨组织。缺损大部分区域仍为低密度透光影 (图 1)。实验组大部分骨缺损区显示为不规则的高密度阴影, 密度比较均匀, 与缺损边缘结合部位大部分呈现阻射影 (图 2)。

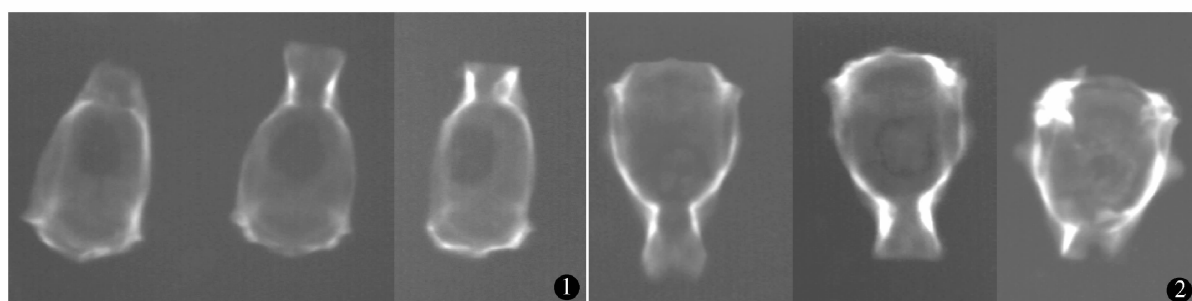
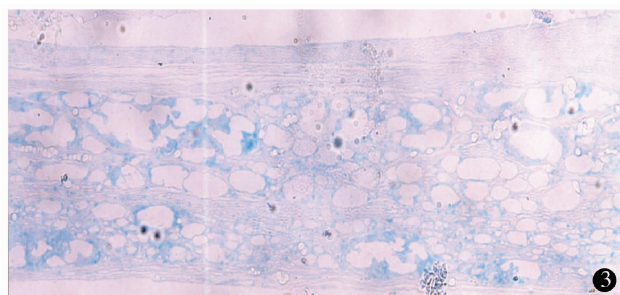


图 1 对照组 (PLA) 8 周颅骨 X 线摄片, 原颅骨缺损区基本仍为低密度透光影 图 2 实验组 (辛伐他汀 + PLA) 8 周颅骨 X 线摄片, 原颅骨缺损区大部分区域显示为不规则的高密度影

2.3 组织学切片

不脱钙骨组织切片,显微镜下观察。对照组术后 8 周骨缺损区仅见到纤维结缔组织增生,没有骨形成(图 3)。实验组术后 4 周,骨缺损部位纤维结



缔组织增生,局部有中性粒细胞浸润,纤维结缔组织中局部有灶性成骨,术后 8 周,实验组局灶性成骨增多(图 4)。

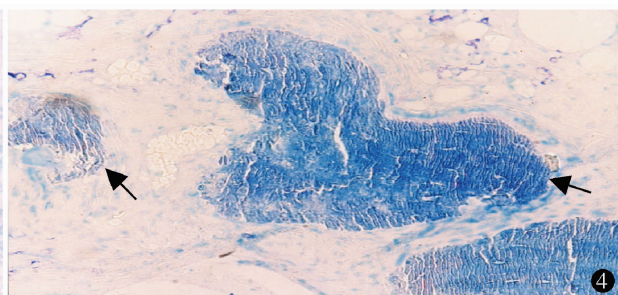


图 3 对照组植入 8 周,骨缺损部位仅见纤维结缔组织增生,没有骨形成(甲苯胺蓝染色 $\times 200$) 图 4 实验组植入 8 周,骨缺损部位局灶性成骨增多,如箭头所示(甲苯胺蓝染色 $\times 200$)

2.4 统计学分析

术后 8 周各组颅骨缺损区新骨形成面积占总缺损面积百分比($n=5$),对照组为 $27.33\% \pm 2.54\%$,实验组为 $74.63\% \pm 2.42\%$, $t = -30.148$, $P = 0.000$ 。

3 讨论

骨极限缺损(critical size defects, CSDs)最早由 Schmitz 等^[1]提出,是指在特定骨骼上造成的终生不能自行修复的最小缺损。在骨缺损修复的动物实验研究中,建立骨极限缺损的实验模型是必要的前提。大鼠颅骨的 CSDs 为一直径 > 8 mm 的圆形全层颅骨缺损,即当直径 > 8 mm 时,缺损终生不能自行修复。目前该模型已被大量应用于评价各种骨替代材料的修复效果^[2]。本实验中使用的环钻直径为 10 mm,在颅骨造成了全层的缺损,手术中并注意将颅骨表面的内外骨膜一并完整切除。

他汀类药物是胆固醇合成的限速酶 3-羟基 3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶的抑制剂,目前临床上广泛应用于降低血清胆固醇和预防心血管疾病。在研究中观察到他汀类药物在体外或体内实验中均表现出不同程度的成骨作用。宋纯理等^[3]证实辛伐他汀可在体外促进大鼠骨髓基质干细胞的成骨分化。宋纯理等^[4]还观察到辛伐他汀不仅可以促进成骨细胞 BMP-2 的高表达,还可以促进骨髓基质干细胞 BMP-2 及雌激素受体 α (ER α) 的高表达,说明其刺激成骨的作用机制还与 ER α 高表达有关。Sibel 等^[5]观察到辛伐他汀对大鼠的骨折愈合具有显著作用。辛伐他汀处理组骨母细胞的形成和分化增加,新的毛细血管和钙化形成的增加说明骨折愈合速度加快。Oxlund 等^[6]以较高剂量(20 mg/kg,每天 2 次)辛伐他汀干扰去卵巢大鼠 3

个月,观察到辛伐他汀在促进大鼠骨形成、增加密质骨骨密度的同时,可抑制松质骨骨量的丢失。

但是由于用药途径的不同所产生的治疗效果也有相当大的差异。Gutierrez 等^[7]将他汀应用于大鼠,局部用药的成骨效果大约是口服用药的 50 倍。他汀类药物促进骨形成的传统给药方式为口服或系统给药,但有关局部用药的国内外相关报道较少。故本实验旨在研究局部应用辛伐他汀修复大鼠颅骨极限缺损的作用效果。

从本实验结果来看,对照组(单纯 PLA)术后 8 周 X 线显示颅骨缺损明显存在,边缘光滑,缺损部位为低密度软组织影。不脱钙骨组织切片显微镜下观察证实仅纤维结缔组织填充,无成骨现象。表明在去除骨膜的情况下,颅骨自身修复能力差,一旦缺损范围过大,仅靠周围组织提供的成骨细胞爬行替代远不足以修复缺损。而实验组术后 8 周 X 线显示颅骨缺损被高密度阴影填充;不脱钙骨组织切片显微镜下观察证实,骨缺损区域有局灶性成骨。辛伐他汀、PLA 复合物的成骨表现为全方位成骨,而不是只有材料与骨缺损相接处出现爬行替代成骨,从而使该材料的骨修复能力明显增强。

本实验中 PLA 与辛伐他汀复合后与颅骨缺损周边骨质形成骨界面较早,在大约 4 周时已有少量新骨形成,8 周用药组骨缺损修复效果显著。分析原因可能为:辛伐他汀和 PLA 均为脂溶性的,两者能均匀混合;PLA 具有三维立体多孔结构,具有良好的生物相容性,能提供骨细胞生长和黏附的空间;PLA 的较缓慢降解速率使得辛伐他汀在体内得到缓释,药物在局部长期维持较高浓度,可长期稳定发挥作用^[8]。辛伐他汀诱导缺损区周围正常骨组织提供的干细胞或成骨细胞,爬行替代修复缺损;辛伐他汀或许能诱导远处骨髓中含量丰富的干细胞迁移归

巢到缺损部位,定向分化增殖以发挥修复作用。

本实验表明:辛伐他汀复合聚乳酸后局部植入骨缺损区具有良好的促进骨形成作用。然而有关辛伐他汀的具体成骨机制至今尚未完全阐明,有待于进一步深入探讨和研究。

参考文献

- 1 Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop, 1986, 205: 299 - 308.
- 2 de Oliveira RC, de Oliveira FH, Cestari TM, et al. Morphometric evaluation of the repair of critical-size defects using demineralized bovine bone and autogenous bone grafts in rat calvaria. Clin Oral Implants Res, 2008, 19(8): 749 - 754.
- 3 宋纯理, 郭昭庆, 马庆军, 等. 辛伐他汀促进骨髓基质细胞的成骨分化. 北京大学学报(医学版), 2003, 35(5): 533 - 536.
- 4 Song CL, Wang JY, Song QS, et al. Simvastatin induces estrogen

receptor-alpha (ER- α) in murine bone marrow stromal cells. J Bone Miner Metab, 2008, 26: 213 - 217.

- 5 Sibel SR, Esra ED. New addition to the statin's effect. J Trauma, 2007, 63: 187 - 191.
- 6 Oxlund H, Dalstra M, Andreassen TT, et al. Statin given perorally to adult rats increases cancellous bone mass and compressive strength. Calcif Tissue Int, 2001, 69: 299 - 304.
- 7 Gutierrez GE, Lalka D, Garrett IR, et al. Transdermal application of lovastatin to rats causes profound increases in bone formation and plasma concentrations. Osteoporos Int, 2006, 17: 1033 - 1042.
- 8 Ko EK, Jeong SI, Rim NG, et al. In vitro osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and in vivo bone formation in composite nanofiber meshes. Tissue Eng Part A, 2008, 14(12): 2105 - 2119.

(收稿日期: 2009 - 06 - 01)

(修回日期: 2009 - 09 - 10)

(责任编辑: 王惠群)