

超声造影评估重组人骨形态发生蛋白 2 移植骨 早期血管化的实验研究

钮培玉, 金琳, 王迎春

上海健康医学院附属嘉定区中心医院超声科, 上海 201800

摘要: 目的 探讨超声造影(CEUS)技术在评估移植骨早期再生血管化中的应用价值。**方法** 25 只 SD 级雄性大鼠,于左侧后肢近股骨头处肌间隙内植入重组人骨形态蛋白 2/磷酸钙骨水泥(rhBMP-2/CPC)复合材料(rhBMP-2 组),右侧后肢同水平肌间隙内植入普通 CPC(普通组),建立大鼠肌内异位成骨模型,分别于建模后 3、7、14、21、28 d 对各 5 只大鼠进行超声检查及病理学检测,通过二维超声、CEUS 评估两组骨生成及新生血管形成情况,并与病理学结果对照。**结果** 病理学检查示,建模后随时间推移,两组移植骨内均可见不同程度的新生血管自外向内逐渐增加,rhBMP-2 组新生血管百分数建模后 14 d 达最大值,普通组 21 d 达最大值,28 d 时 rhBMP-2 组外周新生骨明显较普通组成熟。CEUS 检测时间-强度曲线分析结果示,建模后 21、28 d rhBMP-2 组到达时间(AT)较普通组提早;建模后 7、14、21、28 d rhBMP-2 组达峰强度(PI)较普通组增强,达峰时间(TTP)较普通组提早,同一时间点两组间差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。rhBMP-2 组的 PI 与新生血管百分数呈显著正相关($r = 0.888$, $P < 0.05$),AT、TTP 与时间呈显著负相关($r = -0.839$, -0.902 , P 均 < 0.05)。CEUS 评估结果与病理学结果一致。**结论** CEUS 技术可实时动态检测早期骨再生的血管化及不同移植材料间的差异性,可为临床早期无创评估不同移植材料内早期骨再生的血管化情况提供有价值的诊断依据。

关键词: 超声造影; 血管化; 磷酸钙骨水泥; 骨形态蛋白; 大鼠; 异位成骨

中图分类号: R-33 R 445.1 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2020)07-0875-04

Contrast-enhanced ultrasound in the evaluation of early vascularization of recombinant human bone morpho genetic protein-2 bone graft

NIU Pei-yu, JIN Lin, WANG Ying-chun

Department of Ultrasound, Affiliated Jiading District Central Hospital of Shanghai University
of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201800, China

Corresponding author: JIN Lin, E-mail: jinlin205@163.com

Abstract: Objective To explore the clinical value of contrast-enhanced ultrasound (CEUS) in evaluating the early vascularization of bone grafts. **Methods** Ectopic bone formation models were established in 25 male SD rats and implanted with recombinant human bone morpho genetic protein-2 (rhBMP-2) and calcium phosphate cement (CPC) composite material in the left posterior leg proximal femoral head muscle space (rhBMP-2 group) and CPC grafting material in the right posterior leg proximal femoral head muscle space (common group). At 3-, 7-, 14-, 21- and 28-day after operation, ultrasound examination were carried out, and samples were taken in 5 rats at each time point. **Results** Pathological examination showed that the number of neovascularization increased with time gradually from the outside to the inside after modeling. The percentage of new blood vessels reached the maximum on the 14-day after modeling in rhBMP-2 group and on the 21-day in common group. On the 28-day, the peripheral new bone formation was more mature in rhBMP-2 group than that in common group. The time-intensity-curve (TIC) analysis of CEUS showed that arrival time (AT) and time to peak (TTP) in rhBMP-2 group were earlier than those in common group on the 21- and 28-day after modeling, peak intensity (PI) in rhBMP-2 group was stronger than that in common group on the 7-, 14-, 21- and 28-day after modeling, and there were statistical differences in them at the same time point between two groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In rhBMP-2 group, PI

was positively correlated with the percentage of neovascularization correlated with time ($r = -0.839, -0.902, \text{all } P < 0.05$). In evaluating the early vascularization of bone grafts, CEUS results are consistent with pathological diagnosis. **Conclusion** Neovascularization of early bone regeneration can be dynamically displayed with CEUS which can provide a valuable diagnostic evidence for early non-invasive evaluation of vascularization of early bone regeneration with different bone grafting materials.

Key words: Contrast-enhanced ultrasound; Vascularization; Calcium phosphate cement; Recombinant human bone morphogenetic protein-2; Rats; Ectopic osteogenesis

Fund program: Scientific Research Project of Agricultural and Social Undertakings in Jiading District, Shanghai (JDKW-2017-W14); Scientific Research Project of Health and Family Planning Commission in Jiading District, Shanghai (2018-QN-06)

由创伤、感染、肿瘤或导致骨骼发育异常的固有遗传疾病引起的骨缺损的再生是临床面临的一项挑战^[1]。骨移植材料是目前治疗骨缺损的一种有效方法,重组人骨形态发生蛋白 2/磷酸钙骨水泥 (recombinant human bone morphogenetic protein-2/calcium phosphate cement, rhBMP-2/CPC) 复合材料在临床上得到了广泛的应用^[2],但其成活率取决于早期骨移植材料的新生血管化程度^[3-4]。超声造影 (contrast-enhanced ultrasound, CEUS) 技术可实时显示微血管和血流灌注情况并定量分析,可用于检测新生血管^[5]。本研究通过建立骨再生模型,采用 CEUS 观察早期 CPC 和 rhBMP-2/CPC 再生新生血管形成情况,旨在探讨 CEUS 在早期骨再生过程中用于评估不同骨移植材料血管化的价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂 SD 级大鼠 25 只,雄性,4 周龄,体质量 $150 \sim 200 (173.80 \pm 12.92)$ g,购自昭衍 (苏州) 新药研究中心有限公司。造影剂选用 SonoVue (Bracco 公司),rhBMP-2 复合自固化磷酸钙人工骨材料由上海瑞邦生物材料有限公司提供。

1.2 模型建立 实验动物于左侧后肢脱毛,碘伏消毒,铺无菌手术单。左侧后肢后外侧切口,经皮肤、皮下,分开肌肉,将已经制备好的 rhBMP-2/CPC 复合材料植入左侧后肢近股骨头处肌间隙内,普通 CPC 植入右侧后肢相同水平肌肉间隙内,逐层缝合切口,正常喂养。

1.3 实验观察时间点 术后 3、7、14、21、28 d 进行超声检查并取材,每个时间点各 5 只。以左侧后肢 rhBMP-2/CPC 植入处及取材为 rhBMP-2 组,以右侧后肢普通 CPC 植入处及取材为普通组。

1.4 超声检查 使用东芝 Aplio 400 彩色超声诊断仪,随机配备 CUES 成像软件,14-L5 探头,频率 14 MHz,机械指数 0.1,显像深度 2 cm,焦点位于植入材料下方,CEUS 检测时,SonoVue 使用前向瓶内注入

5 ml 生理盐水,用力振摇直至冻干粉完全分散,造影剂使用剂量为 0.1 ml/kg,通过尾静脉快速注入,之后注射 1 ml 生理盐水。注射造影剂后同时启动计时器,检查时保持探头不动,连续观察 2 min,并存储动态影像。每次超声检查时仪器条件包括探头频率、焦点位置、显像深度为同一标准。二维超声观察移植骨大小、形态、边界、内部回声。CEUS 分别观察 rhBMP-2 组和普通组移植骨内血流灌注情况,分析时间-强度曲线,获取到达时间 (AT)、达峰时间 (TTP) 和达峰强度 (PI)。

1.5 病理学检测 术后 3、7、14、21、28 d 取两组移植骨及其周边肌肉组织,取材后置入 10% 甲醛溶液中固定,石蜡包埋、切片 (厚约 3 μm),行 HE 染色,于光镜下观察移植骨内新生血管及成骨情况。计算新生血管百分数,用切片下新生血管的面积占切片总面积的百分比表示。

1.6 统计学分析 使用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多时点组不同移植材料间比较采用随机区组方差分析;Pearson 相关性分析时间与 AT、TTP 的关系及新生血管百分数与 PI 的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 超声检查

2.1.1 二维超声 二维超声显示各时间组两种移植骨材料大小及形态未见明显改变。术后 3 d,两种移植骨材料呈高回声,内可见多发筛孔样结构,筛孔样结构清晰,分布较均匀;术后 7、14 d,两种移植骨材料回声较前增强,但筛孔样结构仍清晰可见;术后 21、28 d,两种移植骨材料回声增强,后方衰减较前明显,其内筛孔样结构较前模糊。

2.1.2 CEUS CEUS 显示,建模后 3 d rhBMP-2 组及建模后 7 d 普通组周边可见点状造影剂灌注,内部无明显造影剂灌注;建模后 14 d,两组移植骨周边及内部均见造影剂明显灌注;建模后 21 d 及 28 d,两组

移植骨周边及内部造影剂灌注量明显降低, 两组各时间点间可见明显差异。见图 1。时间 - 强度曲线分析结果可见, AT、TTP 值随时间的推移而减小, 建模后 21、28 d rhBMP-2 组 AT 较普通组提早; 建模后 7、14、21、28 d rhBMP-2 组 PI 较普通组增强, TTP 较普通组提早, 同一时点两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。Pearson 相关性分析显示, rhBMP-2 组的 AT、TTP 值与时间呈显著负相关 ($r =$

新生血管百分数呈显著正相关 ($r = 0.888, P < 0.05$)。

2.2 病理检查 HE 染色显示, 建模后 3d rhBMP-2 组及建模后 7 d 普通组移植骨周边可见少量炎性细胞浸润和极少的新生血管; 随着时间的推移, 两组间新生血管从移植骨周边逐步向中央长入, 新生血管数量较前增多, 新生血管百分数 rhBMP-2 组建模后 14 d

表 1 CEUS 分析两组移植骨材料内新生血管各参数 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

移植骨材料	新生血管参数	3 d 组	7 d 组	14 d 组	21 d 组	28 d 组
rhBMP-2 组	AT(s)	4.22 ± 1.10	3.24 ± 0.90	2.44 ± 0.40	2.06 ± 0.05	1.46 ± 0.11
普通组	AT(s)	5.16 ± 0.67	4.12 ± 0.46	2.80 ± 0.23	2.42 ± 0.27	2.32 ± 0.28
F/P 值 _{组间}		4.218/0.045				
F/P 值 _{区组}		21.596/0.000				
rhBMP-2 组	TTP(s)	20.74 ± 3.92	16.88 ± 1.09	13.12 ± 1.07	11.62 ± 1.04	9.22 ± 1.10
普通组	TTP(s)	25.18 ± 4.18	22.48 ± 2.39	18.06 ± 1.93	15.10 ± 1.74	12.88 ± 2.33
F/P 值 _{组间}		10.984/0.002				
F/P 值 _{区组}		23.798/0.000				
rhBMP-2 组	PI (dB)	0.46 ± 0.06	2.18 ± 0.26	3.08 ± 0.40	1.01 ± 0.16	0.56 ± 0.11
普通组	PI (dB)	0.34 ± 0.06	0.64 ± 0.09	1.26 ± 0.19	1.63 ± 0.42	1.00 ± 0.20
F/P 值 _{组间}		4.214/0.046				
F/P 值 _{区组}		71.156/0.000				

表 2 rhBMP-2 组和普通组 HE 染色新生血管百分数 ($n = 5, \%, \bar{x} \pm s$)

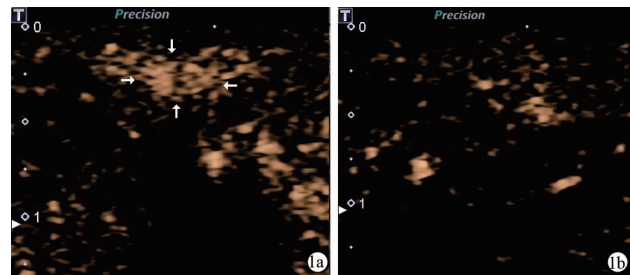
时间	rhBMP-2 组	普通组
3 d	5.40 ± 1.82	3.00 ± 1.58
7 d	20.00 ± 6.12	14.40 ± 2.70
14 d	37.00 ± 9.75	23.20 ± 4.87
21 d	17.60 ± 2.51	31.60 ± 3.78
28 d	6.00 ± 3.08	15.60 ± 3.84

时达最大值, 普通组 21 d 达最大值, 之后, 两组间造血组织及骨组织逐步形成, 新生血管数量减少, 28 d 时 rhBMP-2 组外周新生骨明显较普通组成熟。见表 2、图 2。CEUS 评估结果与病理学结果一致。

3 讨论

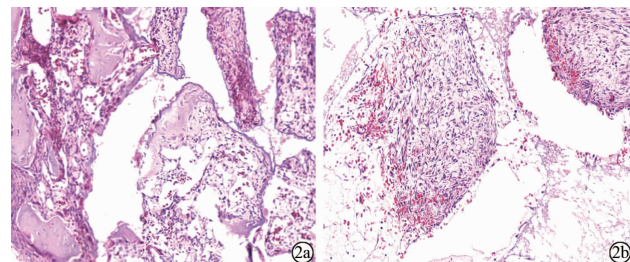
寻找理想的骨移植替代物修复骨缺损一直是临床的一个重要课题。在多种移植材料中, CPC 由于其与骨矿物的化学相似性通常具有良好的生物相容性、骨传导性、低成本和容易获得, 且无需加工即可适应复杂的腔体形状, 成为最受欢迎的骨替代品, 但其骨诱导能力有限^[1]。骨形态发生蛋白 (BMPs) 是转化生长因子 - β 超家族的成员, 因其具有较强的成骨活性而被广泛用于促进骨生成。其中 BMP-2 可促进骨和软骨细胞的增殖和形成, 是影响骨骼发育最有效的因素^[6]。目前, rhBMP-2 被广泛应用于增强骨替代物的成骨诱导。使用 CPC 作为运送的 rhBMP-2 载体有助于在骨折部位保持足够浓度的 rhBMP-2, 使骨形成细胞能够迁移到该区域, 并增殖和分化^[7]。

骨血管系统在骨发育、再生和重塑过程中起着重要作用。血管网络除了在骨形成过程中提供各种营养物质外, 还在骨与邻近组织的沟通中发挥作用。新生血管作为骨再生的前提, 在整个过程中起着至关重要的作用, 直接影响骨活性^[8-9]。血管化不足将导致营养物质的摄取减少及代谢产物的排出障碍^[10]。从而导致延迟愈合甚至不愈合。因此, 再血管化是骨再



注: 1a: rhBMP-2 组, 移植骨周边及内部造影剂灌注较普通组明显增强; 1b: 普通组, 移植骨周边及内部造影剂灌注。

图 1 两组移植骨建模后 14 d CEUS 图像



注: 2a: rhBMP-2 组移植骨周边及内部均可见大量新生血管; 2b: 普通组移植骨新生血管数量较 rhBMP-2 组少。

图 2 两组建模后 14 d 光镜下病理图 (HE 染色, $\times 100$)

参

生的关键,评估移植骨的再血管化在骨再生过程中显得尤为重要。目前可用于检测血管化的影像学方法包括骨显像、CT 灌注成像及对比增强核磁共振成像。其中放射性骨显像及 CT 灌注成像由于辐射性较大,限制了其在临床的应用。在临床中,对比增强 MRI 被广泛应用于评估植入物的血管化,但这种检查有一定的局限性,如检查时间长、费用高等^[11]。

CEUS 是近年发展起来的一项技术,已广泛应用于器官的血管化评估^[12-13]。本研究应用 CEUS 动态观察 CPC 及 CPC/rhBMP-2 移植后的早期新生血管形成情况并定量分析,结果显示,建模后 3 d, rhBMP-2 组移植骨周边有少量造影剂灌注,而普通组在建模后 7 d 移植骨周边才出现少量造影剂灌注;建模后 14 d, rhBMP-2 组移植骨周边及内部均见造影剂明显灌注,PI 值较强。病理结果同样显示,随着时间的推移,建模 14 d rhBMP-2 组移植骨周边及内部新生血管密度最高,达到最大值,普通组于建模后 21 d 达最大值,提示 rhBMP-2 组再血管化较普通组活跃,这与 Yang 等^[14]研究显示 BMP-2 可诱导血管内皮生长因子的表达从而促进新生血管形成的结果相符。建模后 21 d rhBMP-2 组及建模后 28 d 普通组,移植骨周边及内部造影剂灌注量明显降低,同时 AT、TTP 值随着时间的推移而减小。可能与移植骨内成骨细胞增多而血管退化有关,而二维超声显示移植骨内回声增强,后方衰减较前明显,其内筛孔样结构较前模糊,表明移植骨内已有新生骨形成,与病理结果显示两组间造血组织及骨组织逐步形成,新生血管数量减少一致。建模后 28 d 病理结果提示, rhBMP-2 组外周新生骨明显较普通组成熟。这与 Lin 等^[15]的研究发现与传统的 CPC 治疗相比, CPC/rhBMP-2 治疗骨折愈合时间平均缩短 0.5~2 个月的结果相符。上述研究结果表明, CEUS 可动态观察不同时期 CPC/rhBMP-2 及 CPC 血管化过程,发现 CPC/rhBMP-2 血管化较 CPC 血管化更为活跃,且结果与组织病理学检测高度一致, CEUS 联合常规超声可观测不同骨移植物的骨化过程。但 CEUS 仍存在不足,超声波无法穿透高密度骨界面,从而造成骨成熟后的显像困难。

综上所述, CEUS 可动态观察 CPC/rhBMP-2 及 CPC 两移植骨致骨内新生血管的形成,可为临床早期无创评估不同移植材料内早期骨再生的血管化情况提供有价值的诊断依据。随着超声技术的发展, CEUS 技术将在骨组织工程中展现出更加良好的临床应用前景。

- [1] García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration[J]. *Bone*, 2015, 81:112-121.
- [2] Zheng YX, Wang J, Lin HT, et al. Reconstruction of orbital defect in rabbits with composite of calcium phosphate cement and recombinant human bone morphogenetic protein-2[J]. *Chin Med J*, 2010, 123(24):3658-3662.
- [3] Zhao MD, Zhou J, Li XL, et al. Repair of bone defect with vascularized tissue engineered bone graft seeded with mesenchymal stem cells in rabbits[J]. *Microsurgery*, 2011, 31(2):130-137.
- [4] Alan H, Farahani E, Tunik S, et al. The histological study of osseous regeneration following implantation of various bone graft biomaterials[J]. *Niger J Clin Pract*, 2016, 19(4):517-522.
- [5] Müller S, Gosau M, Strobel D, et al. Assessment of bone microcirculation by contrast-enhanced ultrasound (CEUS) and ¹⁸F-positron emission tomography/computed tomography in free osseous and osseocutaneous flaps for mandibular reconstruction: preliminary results[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2011, 49(1/4):115-128.
- [6] Luo GM, Huang YL, Gu FF. RhBMP2-loaded calcium phosphate cements combined with allogenic bone marrow mesenchymal stem cells for bone formation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 92:536.
- [7] Seeherman H, Wzney J, Li R. Bone morphogenetic protein delivery systems[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2002, 27(16 Suppl 1):S16.
- [8] Leunig M, Demhartner TJ, Sckell A, et al. Quantitative assessment of angiogenesis and osteogenesis after transplantation of bone: comparison of isograft and allograft bone in mice[J]. *Acta Orthop Scand*, 1999, 70(4):374-380.
- [9] Kang ML, Kim JE, Im GI. Vascular endothelial growth factor-transfected adipose-derived stromal cells enhance bone regeneration and neovascularization from bone marrow stromal cells[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017, 11(12):3337-3348.
- [10] Harris GM, Rutledge K, Cheng QS, et al. Strategies to direct angiogenesis within scaffolds for bone tissue engineering[J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(19):3456-3465.
- [11] Parmar R, Redfern DR, Hill JC. Comments on: role of bone scintigraphy[J]. *Ann R Coll Surg Engl*, 2006, 88(5):516-517.
- [12] Müller HF, Viacoz A, Kuzmanovic I, et al. Contrast-enhanced ultrasound imaging of carotid plaque neo-vascularization: accuracy of visual analysis[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2014, 40(1):18-24.
- [13] Mouterde G, Aegerter P, Correas JM, et al. Value of contrast-enhanced ultrasonography for the detection and quantification of enthesitis vascularization in patients with spondyloarthritis[J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2014, 66(1):131-138.
- [14] Yang Y, Jin GL, Cao X, et al. In vitro evaluation of rhBMP-2-induced expression of VEGF in human adipose-derived stromal cells[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(1):222-230.
- [15] Lin D, Zhang J, Bai F, et al. Fabrication and clinical application of easy-to-operate pre-cured CPC/rhBMP-2 micro-scaffolds for bone regeneration[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(3):1379-1396.