

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 38/18

A61K 38/19 A61K 48/00

A61K 9/16 A61P 41/00



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00813621.1

[45] 授权公告日 2004 年 12 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 1180841C

[22] 申请日 2000.9.29 [21] 申请号 00813621.1

[30] 优先权

[32] 1999.9.30 [33] US [31] 09/408,804

[86] 国际申请 PCT/JP2000/006781 2000.9.29

[87] 国际公布 WO2001/022989 英 2001.4.5

[85] 进入国家阶段日期 2002.3.29

[71] 专利权人 科研制药株式会社

地址 日本东京都

共同专利权人 米田正始 田畑泰彦

[72] 发明人 米田正始 田畑泰彦

审查员 徐益君

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

代理人 李 悦

权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 13 页

[54] 发明名称 胸骨切开术后促进胸骨愈合的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种在取出或不取出至少一条胸动脉的胸骨切开术后促进胸骨治疗的方法，该方法包括在胸骨切开术后向该胸骨或在该胸骨周围施用一种用于治疗胸骨的活性剂的步骤，其中所述的活性剂包括选自血管发生因子、骨发生因子及其类似物诸如 bFGF、aFGF、TGFβ、VEGF、HGF、BMP、PDGF、TGFα，其它细胞因子或基因的至少一种作为有效组分和一种用于该方法的活性剂；一种胸骨切开术后促进胸骨愈合或治疗的包括上述活性组分的活性剂和该活性剂的用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1.一种活性剂在制备用于在不良胸骨愈合条件下在取出至少一条胸廓
5 内动脉的胸骨切开术后促进胸骨愈合的药物中的应用,其中所述的药物为
水凝胶的形式,所述的水凝胶是一种交联的水凝胶,它包括碱处理的具有
4.9 等电点的明胶或酸处理的具有 9.0 等电点的明胶以及一种交联剂,所述
的活性剂包括选自血管发生因子和骨发生因子组成的组的至少一种作为
有效组分。

10 2.权利要求 1 的应用,其中所述的血管发生因子、骨发生因子是碱性
成纤维细胞生长因子。

3.一种活性剂在制备用于在不良胸骨愈合条件下在取出至少一条胸廓
内动脉的胸骨切开术后使胸骨处的骨再生的药物中的应用,其中所述的药
物为水凝胶的形式,所述的水凝胶是一种交联的水凝胶,它包括碱处理的
15 具有 4.9 等电点的明胶或酸处理的具有 9.0 等电点的明胶以及一种交联剂,
所述的活性剂包括选自血管发生因子和骨发生因子组成的组的至少一种
作为有效组分。

4. 权利要求 3 的应用,其中所述的血管发生因子、骨发生因子是碱性
成纤维细胞生长因子。

20 5.一种活性剂在制备用于在不良胸骨愈合条件下在取出至少一条胸廓
内动脉的胸骨切开术后使胸骨周围血管化的药物中的应用,其中所述的药
物为水凝胶的形式,所述的水凝胶是一种交联的水凝胶,它包括碱处理的
具有 4.9 等电点的明胶或酸处理的具有 9.0 等电点的明胶以及一种交联剂,
所述的活性剂包括选自血管发生因子和骨发生因子组成的组的至少一种
25 作为有效组分。

6. 权利要求 5 的应用,其中所述的血管发生因子、骨发生因子是碱性
成纤维细胞生长因子。

胸骨切开术后促进胸骨愈合的方法

5

发明领域

本发明涉及一种使用含有血管发生因子的活性剂在诸如心脏直视手术或冠状动脉手术这样的手术中的胸骨切开术（即切开接近心脏的胸骨）后促进胸骨愈合的方法，所述的胸骨切开术包括取出至少一条胸廓内动脉
10 （下文有时称作“ITA”）的胸骨切开术。

背景技术

在大多数情况下，胸骨切开术在对诸如冠心病这样的各型心脏病实施手术的过程中始终是必不可少的，所述的冠心病包括心肌梗塞及其人工引
15 起的并发症、心脏瓣膜病、主动脉病和先天性心脏病。然而，使胸骨愈合需要时间且有时不能充分愈合。

胸骨愈合缓慢或不良愈合是胸骨切开术后进行心脏手术的难题之一。愈合缓慢延长了患者的住院时间且显著增加了健康护理成本并延缓了患者重返工作岗位或社会活动。胸骨不良愈合是通过胸骨切开进行的心脏
20 手术后的严重问题之一且通常导致胸骨伤口的深度感染，尽管加强了昂贵的护理，但是这种感染仍然会使死亡率和发病率增加。目前的研究记载了胸骨不良愈合的危害因素如下：肥胖、慢性阻塞性肺病（诸如慢性支气管炎或肺气肿）、老龄化、外周血管疾病、重复手术、糖尿病、应用胸廓内动脉（ITA）导管、手术时间、心输出量降低、人工换气时间和出血用再
25 探查。因上述危害因素而使患者数量增加且胸骨愈合缓慢/不良愈合甚至成为更严重的问题。胸骨愈合缓慢/不良愈合通常限制了两侧胸廓内动脉（下文有时称作“BITA”）在冠状动脉分流术、尤其是证实得益于 BITA 移植术的糖尿病患者的心脏中进行的冠状动脉分流术中的应用，这是因为糖尿病患者通常发展为胸骨坏死（即胸骨死亡）、特别是在取出 BITA 后
30 （即以便制成心脏用移植物）因缺乏供血的胸骨坏死。

已经报导了碱性成纤维细胞生长因子（下文有时称作“bFGF”）不仅是一种强血管发生（即生成新血管并增加对胸骨的供血量）促分裂原、而且还可以刺激骨形成。诸如 aFGF、VEGF、TGF β 这样的其它生长因子在通过其血管发生作用促进胸骨愈合方面具有不同程度的有益作用。

5 本发明人中的某些人已经在 EP-A-0 493 737 中提出了含有 bFGF 的活性剂在治疗骨疾病中的用途且在 EP-A-0 702 959 中提出了含有 bFGF 的交联明胶的凝胶制剂。即本发明人中的某些人已经在 EP-A-0 493 737 中提出了使用含有 bFGF 的活性剂治疗骨疾病且在 EP-A-0 702 959 中提出了含有 bFGF 的交联明胶的凝胶制剂。在 EP-A-0 493 737 中，一种新型的活性剂
10 用于：治疗骨疾病，诸如各种创伤性骨折、各种疲劳骨折、病理性骨折，包括伴随骨质疏松、骨软化症、恶性肿瘤、多发性骨髓瘤等的骨折；伴随如上所述的各种疾病的骨强度的降低；和伴随如上所述的各种疾病的骨形成的抑制。在 EP-A-0 702 959 中公开了一种增加血红蛋白浓度的作用、增加骨矿物含量的作用等。他们已经证实混入了 bFGF 的明胶的水凝胶可在
15 体内促进血管发生作用和骨再生。

此外，本发明人中的某些人已经在《神经外科学杂志》（J. Neurosurg.）第 86 卷第 871—875 页（1997）中报导了使用家兔模型进行的在可生物降解的水凝胶中混入的 bFGF 在头颅骨再生中的潜在作用且在《生物物质》（Biomaterials）第 19 卷第 807—815 页（1998）中报导了使用与可生物降
20 解的水凝胶复合的 bFGF 对头颅骨缺陷实施在临床上被认为几乎是不可能的骨再生。然而，在上述参考文献中，没有记载有关在包括取出 ITA 的胸骨切开术在内的胸骨切开术后使胸骨愈合的信息。胸骨具有与头颅骨或长骨不同的形状和供血量（即不同的供血动脉）；在胸骨切开术（即几乎始终是纵切而非横切）后这种差异更为明显。

25

发明概述

本发明的一个目的是提供一种在包括取出 BITA 的胸骨切开术在内的胸骨切开术后促进胸骨愈合的方法，该方法可以缩短患者的住院时间并可以减少与胸骨不良愈合相关的并发症且由此降低健康护理成本、有利于患者
30 重返工作岗位并有助于提高他们的生产能力。本发明可以通过使用含有

血管发生或骨发生因子的活性剂而使胸骨有效愈合。

在克服胸骨切开术后胸骨愈合缓慢或不良愈合的难题的尝试中，本发明人已经开发了几种如下所述的促进胸骨愈合的方法。简单地说，本发明对胸骨或周围的组织施用了一种或多种上述血管发生因子或其基因而用于促进血管发生，从而补偿对胸骨的供血不足或帮助骨发生（即帮助生成胸骨的骨组织）以便使胸骨稳定和帮助胸骨愈合。

即本发明涉及一种在取出或不取出至少一条胸动脉的胸骨切开术后增强胸骨愈合或治疗的方法，该方法包括在胸骨切开术后施用一种用于治疗胸骨的活性剂到该胸骨或其周围的步骤，其中所述的活性剂包括选自血管发生因子、骨发生因子及其类似物组成的组的至少一种作为有效组分。

本发明还涉及一种在胸骨切开术或在取出或不取出至少一条胸廓内动脉的胸骨切开术后使胸骨处的骨再生的方法，该方法包括在胸骨切开术后施用一种用于治疗胸骨的活性剂到该胸骨或其周围的步骤，其中所述的活性剂包括选自血管发生因子、骨发生因子及其类似物组成的组的至少一种作为有效组分。

本发明进一步涉及一种在胸骨切开术或在取出或不取出至少一条胸廓内动脉的胸骨切开术后使胸骨周围血管化的方法，该方法包括在胸骨切开术后施用一种用于治疗胸骨的活性剂到该胸骨或其周围的步骤，其中所述的活性剂包括选自血管发生因子、骨发生因子及其类似物组成的组的至少一种作为有效组分。

此外，本发明涉及一种在取出或不取出至少一条胸廓内动脉的胸骨切开术后治疗骨折部位的方法，该方法包括在胸骨切开术后应用一种用于治疗骨折部位的活性剂使其直接接触肋骨或软骨或其连接处的骨折部位的步骤，其中所述的活性剂包括选自血管发生因子、骨发生因子及其类似物组成的组的至少一种作为有效组分。

此外，本发明涉及一种在取出或不取出至少一条胸动脉的胸骨切开术后促进胸骨愈合或治疗的活性剂，所述的促进胸骨愈合或治疗通过在胸骨切开术后施用用于治疗的该活性剂到该胸骨或其周围来进行，其中所述的活性剂包括选自血管发生因子、骨发生因子及其类似物组成的组的至少一种作为有效组分。

本发明还涉及一种在胸骨切开术或在取出或不取出至少一条胸廓内动脉的胸骨切开术后使骨再生的活性剂,所述的使骨再生通过在胸骨切开术后施用用于治疗胸骨的该活性剂到该胸骨或其周围来进行,其中所述的活性剂包括选自血管发生因子、骨发生因子及其类似物组成的组的至少一种作为有效组分。

本发明进一步涉及一种在胸骨切开术或在取出或不取出至少一条胸廓内动脉的胸骨切开术后使胸骨周围血管化的活性剂,所述的使胸骨周围血管化通过在胸骨切开术后施用用于治疗胸骨的该活性剂到该胸骨或其周围来进行,其中所述的活性剂包括选自血管发生因子、骨发生因子及其类似物组成的组的至少一种作为有效组分。

此外,本发明涉及一种在取出或不取出至少一条胸廓内动脉的胸骨切开术后治疗骨折部位的活性剂,所述的治疗过程通过在胸骨切开术后施用用于治疗骨折部位的活性剂使其直接接触肋骨或软骨或其连接处的骨折部位来进行,其中所述的活性剂包括选自血管发生因子、骨发生因子及其类似物组成的组的至少一种作为有效组分。

此外,本发明涉及一种活性剂在取出或不取出至少一条胸廓内动脉的胸骨切开术后促进胸骨愈合或治疗中的用途,其通过在胸骨切开术后施用用于治疗胸骨的该活性剂到该胸骨或其周围来进行,其中所述的活性剂包括选自血管发生因子、骨发生因子及其类似物组成的组的至少一种作为有效组分。

本发明还涉及一种活性剂在胸骨切开术或在取出或不取出至少一条胸廓内动脉的胸骨切开术后使骨再生中的用途,其通过在胸骨切开术后施用该用于治疗胸骨的活性剂到该胸骨或其周围来进行,其中所述的活性剂包括选自血管发生因子、骨发生因子及其类似物组成的组的至少一种作为有效组分。

本发明进一步涉及一种活性剂在胸骨切开术或在取出或不取出至少一条胸廓内动脉的胸骨切开术后使胸骨周围血管化中的用途,其通过在胸骨切开术后施用该用于治疗胸骨的活性剂到该胸骨或其周围来进行,其中所述的活性剂包括选自血管发生因子、骨发生因子及其类似物组成的组的至少一种作为有效组分。

此外，本发明涉及一种活性剂在取出或不取出至少一条胸廓内动脉的胸骨切开术后治疗骨折部位中的用途，所述的用途通过在胸骨切开术后施用一种用于治疗骨折部位的活性剂使其直接接触肋骨或软骨或其连接处的骨折部位来进行，其中所述的活性剂包括选自血管发生因子、骨发生因子及其类似物组成的组的至少一种作为有效组分。

附图简述

附图 1 是表示三组中与手术前水平相比胸骨周围的血流量；

附图 2A—2C 是手术后 4 周胸骨周围的结缔组织的显微照片，其中附图 2A 是 A 组（bFGF）、附图 2B 是 B 组（对照组）且附图 2C 是 C 组（假拟组）；

附图 3 是表示三组中胸骨周围血管数量的比较的示意图；

附图 4A 和 4B 是分别表示三组中骨矿物含量和骨矿物密度的比较的示意图，其中 A 组是 bFGF 组、B 组是对照组且 C 组是假拟组；

附图 5 是表示手术后 2 周或 4 周三组中新骨形成的面积的比较的示意图。

附图 6A—6C 是显示手术后 2 周获自胸骨的组织横切面的示意图，其中 A 组是 bFGF 组、B 组是对照组且 C 组是假拟组；

附图 7A—7C 是显示手术后 4 周获自胸骨的组织横切面的显微照片，其中 A 组是 bFGF 组、B 组是对照组且 C 组是假拟组；

附图 8A 和 8B 是显示手术后 4 周获自胸骨的骨闪烁图的照片，其中 A 组是 bFGF 组且 B 组是对照组；

附图 9 是表示手术后 4 周两组中从给予 $^{99m}\text{Tc-MPD}$ 开始 30 分钟和 60 分钟后骨闪烁图比较的示意图；

附图 10A 和 10B 是显示手术后 4 周胸骨的 X 光照片，其中 A 组是 bFGF 组且 B 组是对照组；且

附图 11A 和 11B 是表示手术后 4 周胸骨的骨量和骨密度的比较的示意图，其中 A 组是 bFGF 组且 B 组是对照组。

优选实施方案的描述

下文具体地描述本发明。

在本发明用于包括取出 BITA 的胸骨切开术在内的胸骨切开术后促进胸骨愈合的方法中,施用于胸骨或胸骨周围的促进胸骨愈合的活性剂含有 bFGF 或某些其它血管发生因子, 诸如: 碱性成纤维细胞生长因子(下文有时称作“bFGF”)、酸性成纤维细胞生长因子(下文有时称作“aFGF”)、血管内皮生长因子(下文有时称作“VEGF”)、组织生长因子- β (下文有时称作“TGF β ”)、肝细胞生长因子(下文有时称作“HGF”)、骨形态发生蛋白(下文有时称作“BMP”)、血小板衍生生长因子(下文有时称作“PDGF”)、组织生长因子- α (下文有时称作“TGF α ”)、其它生长因子; 和可以使用诱发血管发生和/或骨发生的蛋白质、核酸和基因。在这些血管发生因子中, 从使胸骨愈合的角度来看, bFGF 可能是最有效的, 部分原因是 bFGF 既具有血管发生(即生成新血管并增加对血管的供血量)的作用又具有骨发生(即帮助生成胸骨的骨组织)的作用。然而, 在某些诸如轻度的胸骨局部缺血等这样的情况下也可以使用其它诸如 VEGF 等这样的血管发生因子。

可以以包含诸如 bFGF 这样的血管发生/骨发生因子、生理盐水或其它常规助剂(葡萄糖、蔗糖、缓冲液等)的溶液、使用所述溶液的注射剂或喷雾剂、含有上述溶液的软膏剂或包括水凝胶在内的凝胶的形式使用所述的血管发生/骨发生因子或其类似物。在它们中, 本发明的活性剂特别优选的形式是水凝胶, 这是因为这种凝胶在靶区域上停留数周并持续提供血管发生/骨发生因子至胸骨愈合为止。水凝胶的形状可以是片状、糊状、颗粒状、管状、盘状或微球体状。本发明的活性剂可以采取局部或非局部的施用途径, 不过优选局部施用, 因为局部施用对患者身体的其它部位几乎没有影响、更少的并发症的机会且对靶区域(即胸骨)的作用更为明显。

当使用水凝胶形式的至少一种血管发生/骨发生因子时, 通过分子间作用力使所述的血管发生/骨发生因子以物理方式固定入所述的水凝胶, 且在体内伴随该水凝胶(hydrogen)生物降解, 血管发生/骨发生因子逐步释放出来。作为物理方式的固定可提及的有: 例如离子键、配位键、疏水作用等。所述血管发生/骨发生因子的缓释作用仅受水凝胶生物降解速率的控制, 但不受因所述血管发生/骨发生因子单纯扩散而导致的缓释作用

的控制。水凝胶的生物降解速率受到水凝胶中水含量的控制。当水分含量高时，水凝胶的生物降解速率提高，而当水分含量低时，水凝胶的生物降解速率下降，使得缓释期延长。

当使用例如水凝胶形式的本发明活性剂时，可以通过将 bFGF 作为活性组分混入缓释交联的明胶凝胶的方式来制备它。对作为用于本发明的交联明胶凝胶的原料的明胶凝胶没有特别限制且可以选自一般获得的明胶。明胶的实例可以包括：例如碱处理的具有约 4.9 等电点的明胶（获自 Nitta Gelatin Inc., Japan）和酸处理的具有约 9.0 等电点的明胶（获自 Nitta Gelatin Inc., Japan）。作为明胶，不仅可以使

5 用一种类型的明胶，而且可以根据所用目的的不同而使用在诸如溶解度、分子量、等电点和材料方面不同的明胶的混合物。作为这类明胶，可以使用例如 EP-A-0 702 959 中记载的那些明胶。作为用于制备本发明水凝胶的其它物质，可以使用例如胶原蛋白、透明质酸、藻酸、淀粉、果胶、甲壳质、脱乙酰壳多糖或这些多糖类的衍生物。

10

15 本发明中使用的用于交联明胶的交联剂可以选自对活体无毒性的物质。对于这类交联剂可以提及的例如有：戊二醛；水溶性碳化二亚胺，诸如 1-乙基-3-(3-二甲氨基-丙基)碳化二亚胺盐酸盐和 1-环己基-3-(2-吗啉代乙基)碳化二亚胺-metho-对甲苯磺酸盐、双环氧化合物和福尔马林。在它们中，特别优选戊二醛和 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐。

20 通过热处理或用紫外线照射可以使明胶交联而获得具有不同生物降解性的水凝胶。以明胶水凝胶片的总重为基准，明胶水凝胶片中的水分含量优选 85%—99%（重量）、更优选 90%—98%（重量）、特别优选 92%—97（重量）。

在血管发生/骨发生因子中，如上所述，用作胸骨切开术后、尤其是采集 BITA 后用于促进胸骨愈合的活性剂的有效组分的 bFGF 是众所周知的血管发生/骨发生因子或生长因子。例如，在 EP-A-0 493 737 中，且其存在在人、牛、小鼠、大鼠等中得到了证实。基本上，来自任意动物来源的 bFGF 在体内具有相同的活性。然而，在用于本发明在胸骨切开术后促进胸骨愈合的活性剂中，根据抗原性/骨发生性而优选使用与在人体中产生的 bFGF（人 bFGF）具有相同氨基酸序列的 bFGF。除 bFGF 和上述血管

25

30

发生/骨发生因子外，还可以使用如 EP-A-0 493 737 中所述的 bFGF 的类似物。

可以将本发明的活性剂施用于胸骨表面；作为骨蜡或胶的部分单独施用于胸骨内侧或施用于杆或钉或铰链型装置的表面；使之直接与肋骨或软骨（即软骨）或其连接处接触；或施用于胸廓内动脉的床上。

在本发明中，特别可以提及几种胸骨切开术后促进胸骨愈合的方法。

第一种方法是喷雾或涂抹(oint)至少一种血管发生因子/骨发生因子诸如 bFGF、aFGF、TGF β 、VEGF、HGF、BMP、PDGF、TGF α 、其它细胞因子或制备上述物质的基因到胸骨边缘（和因冠状动脉分流术而采集了 ITA (s) 的患者的 ITA 床）。

第二种方法是注射含有至少一种血管发生因子/骨发生因子诸如 bFGF、aFGF、TGF β 、VEGF、HGF、BMP、PDGF、TGF α 、其它细胞因子或制备上述物质的基因的溶液到胸骨边缘或周围组织（和因冠状动脉分流术而采集了 ITA (s) 的患者的 ITA 床）。

第三种方法是使用我们开发的可生物降解的水凝胶，该水凝胶包含能够使至少一种血管发生因子/骨发生因子诸如 bFGF、aFGF、TGF β 、VEGF、HGF、BMP、PDGF、TGF α 、其它细胞因子或制备上述物质的基因在作用部位释放延长的时间期限的酸性明胶。可以将该水凝胶施用于胸骨的后（即内侧）表面、也可以将该水凝胶施用于胸骨的前（即外侧）表面；可以将该水凝胶施用于 ITA (s) 床以便恢复从胸壁对胸骨的供血。

第四种方法是插入含有至少一种血管发生因子/骨发生因子诸如 bFGF、aFGF、TGF β 、VEGF、HGF、BMP、PDGF、TGF α 、其它细胞因子或使上述物质的基因的材料到胸骨骨髓（即内部）。可以将这第四种方法与上述方法结合使用以便进一步促进胸骨愈合（即从内部和外部）。

本发明胸骨切开术后促进胸骨愈合的活性剂的有效剂量随患者的疾病程度、年龄或健康状况等的不同而改变。但就骨折的情况而言，作为有效组分的所述剂量一般在约 0.1 μ g—10mg/胸骨切开部位的范围。为了加速愈合，一般优选的施用途径是给药活性剂使其直接与胸骨切开部位接触：（1）从外侧接触（即在胸骨表面）；（2）从内侧接触（即在胸骨或胸骨骨髓内）；和（3）施用于 ITA 床上（即 ITA 及其蒂位于的区域）。

本发明的上述活性剂对胸骨切开术后使胸骨处的骨再生或胸骨切开术后使胸骨周围血管化也是有效的。因此，为了使胸骨切开术后胸骨处的骨再生或胸骨切开术后使胸骨周围血管化，可以对患者应用与如上所述相似的方法。

5

实施例

下文参照实施例描述本发明。

实施例 1

10 对通过在大鼠中实施胸骨切开术并取出 BITA 后局部使用 bFGF 评价本发明在促进胸骨愈合中的作用。

通过碱法使用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 从牛骨胶原蛋白 (Nitta Gelatin Co., Osaka, Japan) 中分离具有 4.9 等电点的明胶。当通过凝胶过滤色谱法与聚乙二醇标准样品对照测定时，该明胶的重均分子量为 99000。具有 9.6 等电点的人重组 bFGF 由 Kaken Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan 提供。

15

(i) 混有 bFGF 的明胶水凝胶片的制备

在 25°C 下使 10wt% 的明胶水溶液以化学方式与不同量的戊二醛交联而制备具有不同交联度的片。简单地说，将 4.5ml 含有戊二醛的明胶水溶液浇铸入特氟隆 (Teflon) 塑模 ($5 \times 5\text{cm}^2$, 1.8mm 深)。在 25°C 下持续 12 小时的交联反应后，在 37°C 下将所得的水凝胶片浸入 50mM 甘氨酸水溶液中 1 小时以便使戊二醛的残余醛基封端；用双蒸水、100% 乙醇和高压灭菌的双蒸水冲洗以便获得无菌的片。将它们冻干、随后用含有 100 μg 的 bFGF 的水溶液浸渍而获得混入了 bFGF 的明胶水凝胶。由此制备的水凝胶片为矩形 ($1 \times 10\text{mm}$) 且厚度为 0.7mm。所有实验过程均在无菌条件下进行。

20

(ii) 动物实验

给重 300g—400g 的 15 只雄性 Wistar 大鼠在用乙醚麻醉后经口腔插管并给它们在体积循环的小动物通风器 (Rodant 通风器型号 683, HARVARD, USA) 上通风。在手术过程中使用 1%—2% 的异氟烷维持麻醉状态。在 30 仰卧位置上实施中线皮肤切开后，将两侧主要的胸肌与胸骨的连接处分隔

开并暴露两侧的肋间肌。使用显微冲击仪谨慎实施中线胸骨切开术。使用骨蜡（NESTOR, Nippon Shoji, Japan）使骨髓中的出血停止。除用电凝固器破坏 BITA 外, 还用 6-0 号聚丙烯缝合线将 BITA 的开始端与远端分枝连接。放置混有 bFGF 的明胶水凝胶片（100 μ g/片）并用 6-0 号聚丙烯缝合线固定而不使 BITA 缺损。作为对照组, 我们单独实施中线胸骨切开术并以相同方式取出 BITA。在施用正内呼吸压使肺完全膨胀后, 通过用 4 根胸骨周围中断的缝合线与 4-0 号 Nespolene 缝合线封闭胸骨。用 4-0 号尼龙单丝线仔细将肌层与皮肤缝合。在皮肤封闭后立即经肌内给予链霉素（50mg/大鼠）。

10 将 15 只大鼠分成三组: A 组取出 BITA 并在中线胸骨切开术后将混有 bFGF 的明胶水凝胶片施用在胸骨上、B 组仅取出 BITA、C 组具有完整的 BITA（每组 5 只动物）。将 2 只因手术后心包内出血、2 只呼吸衰竭或 1 只感染而死亡的 5 只动物排除出本研究。在手术后 4 周通过静脉内给予超剂量的戊巴比妥钠处死大鼠。取出胸骨并用 10wt% 甲醛的 PBS 溶液固定
15 4 天以便评价骨再生的情况。

(iii) 胸骨周围血流量的测定

在胸骨闭合后和手术后 2 或 4 周使用非接触性激光流量计（ALF21N, Advance, Tokyo, Japan）测定胸骨周围的血流量。该装置可瞬时测定毛细血管血液灌注参数（血流量、体积和速度）。在本研究中仅监测血流量并记录（mL/分钟/100g）。使激光束通过光学纤维定向于具有 3.0mm 直径的测定探头。将该探头放置在单独接近胸骨的直线距离为 10mm 的肋间肌内, 使得所研究的测定区域约为 5mm 直径和 1mm 深度。然后将 He-Ne 光切换到二极管激光（2mW, 780nm）以便测定胸骨周围的血流量, 使用多普勒位移计算血流量。所述探头包括两种光学纤维: 一种用于激光照明, 而另一种用于接收反射光和发散光。在获得稳定的基线后记录每次测定的三个读数并取平均值。

(iv) 血管发生的组织学评价

统计用苏木精-伊红和氮烷染色的标本中的小动脉。从胸骨内侧的胸骨周围区域中随机选择 5 个区域（5mm \times 5mm）。我们通过使用目镜测微尺（Olympus, Tokyo, Japan）以 \times 400 放大倍数统计 5 个随机选择的单位面积
30

(500 μm ×500 μm) 上的平均血管数量来估计每个 5mm×5mm 区域中的小动脉密度。统计 25 个单位面积 (5 个区域, 每个区域中有 5 个单位面积) 上血管的总数。

(v) 骨形成的评价

- 5 通过双能量 X 射线吸收法 (DEXA) 和组织学检查法评价血管周围骨形成的情况。在对三组实施中线胸骨切开术后 4 周时通过 DEXA、使用骨矿物分析仪 (Dichroma Scan 600, Aloka Co., Tokyo, Japan) 测定血管周围的骨矿物密度 (BMD)。用虚拟的已知矿物含量校准仪器。以 20mm s^{-1} 的速度进行每次扫描且扫描长度为 1mm。在每个实验组中对限制到第三至第六肋骨的胸骨进行 DEXA 测定。

- 10 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下使骨的样本在 10wt%EDTA 溶液中去矿化 3 天、包埋入石蜡并切成 10 μm 厚度的切片。在手术后 2 和 4 周时制备切成分为 4 个等部分的胸骨的切片并用苏木精-伊红 (HE) 染色。使用带有与图象分析系统连接的图象照相机的显微镜 (SP-1000, Olympus, Tokyo, Japan) 分析组织切片。以 2×放大倍数测定每个切片中胸骨内新骨的面积。

(vi) 统计学分析

通过单向 ANOVA 分析全部数据以便评价实验组之间的统计显著性。将实验结果表示为平均值±标准误差。在 95% 的置信区间下与对照组进行显著性检验。

- 20 (vii) 胸骨周围的血流量

- 将结果概括在附图 1 中。附图 1 是每组中手术前后胸骨周围的血流量的示意图。在 A 组中 (施用 bFGF 和水凝胶), 胸骨周围的血流量大于 B 组 (对照组, 不使用 bFGF、也不使用水凝胶) 和 C 组 (假拟组, 不使用 bFGF、而使用水凝胶) 中胸骨周围的血流量。这一结果提示施用在胸骨后 (即内侧) 表面和胸廓内动脉床上的含有 bFGF 的水凝胶有助于胸骨上/周围的血管发生。手术前胸骨周围的血流量 (PBF) 为 8.6±0.6 (平均值±SD) ml/分钟/100g。尽管单独进行中线胸骨切开术后的 PBF 没有显著改变, 但是在取出 BITA 后该值被显著降低至 8.5±0.6 ml/分钟/100g。手术后 4 周时在 A 组、B 组或 C 组中的 PBF 分别为 9.7±1.2 ml/分钟/100g、6.5±0.6 ml/分钟/100g、8.2±0.5 ml/分钟/100g。在三组中观察到了显著性差异

($p < 0.001$)。

(viii) 血管发生的组织学评价

对胸骨周围的血管发生进行的组织学研究证实了血管数量增加。在 A 组中胸骨周围的毛细血管和小动脉 (10–50 μm 直径) 比 B 组和 C 组中胸骨周围的毛细血管和小动脉多 (附图 2A–2C)。附图 2A、2B 和 2C 显示了手术后 4 周胸骨周围的结缔组织的显微照片。在 A 组 (施用 bFGF 和水凝胶) 中, 观察到了大量血管发生 (附图 2A), 而在 B 组 (对照组, 不使用 bFGF、也不使用水凝胶, 附图 2B) 和 C 组 (假拟组, 不使用 bFGF、而使用水凝胶, 附图 2C) 中几乎没有观察到血管发生。这一结果强烈提示附图 1 中观察到的 A 组胸骨周围血流量的增加是由血管发生导致的。附图 3 表示三组中胸骨周围小动脉和毛细血管/单位面积的数量。即附图 3 表示各组中胸骨周围的血管数量。在 A 组 (施用 bFGF 和水凝胶) 中的胸骨周围的结缔组织中观察到了更大量的血管。另一方面, 在 B 组 (对照组, 不使用 bFGF、也不使用水凝胶) 和 C 组 (假拟组, 不使用 bFGF、而使用水凝胶) 中观察到了显著更少的血管数量。在 A 组中胸骨周围小动脉和毛细血管/单位面积的数量明显多于其它两组 (A 组: 30.5 ± 3.2 , B 组: 15.8 ± 2.7 , C 组: 12.3 ± 1.5 血管/单位面积, $p < 0.01$)。

(ix) 骨形成的评价

附图 4A 和 4B 分别表示不同手术后 4 周大鼠胸骨的 BMC (骨矿物含量) 和 BMD (骨矿物密度) 的测定结果。即附图 4 表示各组中骨矿物含量 (附图 4A) 和骨矿物密度 (附图 4B)。在 A 组 (施用 bFGF 和水凝胶) 中, 骨矿物含量高于 B 组 (对照组, 不使用 bFGF、也不使用水凝胶) 和 C 组 (假拟组, 不使用 bFGF、而使用水凝胶); 这一结果提示 A 组的胸骨再生 (即愈合) 更多。在全部组中, 骨矿物密度处于相同的水平; 这一结果提示 A 组中已经再生出了具有正常质量的胸骨。

A 组中的 BMC 为 $65.5 \pm 15.7\text{mg}$, 这一数值显著高于 B 组和 C 组 (B 组: $47.6 \pm 6.4\text{mg}$; C 组: $41.3 \pm 17.5\text{mg}$)。另一方面, 在三组中 BMD 均没有显著改变 (A 组: $51.1 \pm 8.1 \text{ mg/mm}^2$; B 组: $50.0 \pm 6.1 \text{ mg/mm}^2$; C 组: $43.7 \pm 8.5\text{mg/mm}^2$)。

附图 5 表示不同手术后 2 和 4 周所有组中胸骨的新骨形成面积的结

果。附图 5 表示手术后 2 周和 4 周新骨形成的面积。手术后 2 周, A 组(施用 bFGF 和水凝胶)倾向于具有比 B 组(对照组, 不使用 bFGF、也不使用水凝胶)和 C 组(假拟组, 不使用 bFGF、而使用水凝胶)形成更多的骨, 且这种差异在 2 周后(即手术后 4 周)变得更大和更为显著。手术后 2 周, A 组的新骨形成面积倾向于大于 B 组和 C 组, 而在三组中没有显著性差异(A 组: $1.79 \pm 1.22 \text{mm}^2$; B 组: $0.87 \pm 0.70 \text{mm}^2$; C 组: $1.37 \pm 0.92 \text{mm}^2$)。另一方面, A 组在手术后 4 周新骨形成的面积显著地大于其它两组(A 组: $5.13 \pm 2.82 \text{mm}^2$; B 组: $2.17 \pm 0.91 \text{mm}^2$; C 组: $2.01 \pm 0.89 \text{mm}^2$)。

附图 6A—6C 和 7A—7C 分别显示了不同手术后 2 和 4 周胸骨的组织切片。即附图 6A、6B 和 6C 是手术后 2 周来自胸骨横切面的显微照片。在 A 组(施用 bFGF 和水凝胶, 附图 6A)和 C 组(假拟组, 不使用 bFGF、而使用水凝胶, 附图 6C)中, 胸骨已经开始愈合。另一方面, 在 B 组(对照组, 不使用 bFGF、也不使用水凝胶, 附图 6B)中胸骨没有开始愈合。此外, 附图 7A、7B 和 7C 是手术后 4 周来自胸骨横切面的显微照片。在 A 组(施用 bFGF 和水凝胶)中, 胸骨几乎愈合完全且不存在胸骨的不良或过度愈合(附图 7A)。另一方面, 在 B 组(对照组, 不使用 bFGF、也不使用水凝胶, 附图 7B)和 C 组(假拟组, 不使用 bFGF、而使用水凝胶, 附图 7C)中胸骨愈合不充分。手术后 2 周, 在 A 组和 C 组中观察到原始胸骨周围出现一些软骨骨化, 而在 B 组中没有观察到这一现象。手术后 4 周, B 组和 C 组在原始胸骨周围出现部分软骨骨化。相反, A 组具有几乎完全愈合的胸骨, 其中充满了再生的骨组织。

在本发明中, 可以提供在包括取出 BITA 后的胸骨切开术在内的胸骨切开术后促进胸骨愈合的几种方法。根据本实验中获得的数据, 通过胸骨和周围组织的血管发生并通过骨发生导致胸骨愈合得到促进; 通过局部施用的血管发生/骨发生因子(例如在本实验中是 bFGF)既可以诱发血管发生也可以诱发骨发生。

实施例 2

在小猎犬 (beagle dog) 中通过在实施胸骨切开术并取出 BITA 后局部使用 bFGF 评价本发明对促进胸骨愈合的作用。

(i) 混有 bFGF 的明胶水凝胶片的制备

按照与实施例 1 的 (i) 相同的方式, 在 25°C 下使具有 4.9 等电点的碱处理的明胶以化学方式与戊二醛交联而制备无菌的片。将它们冻干、随后用含有 100 μ g 的 bFGF 的水溶液浸渍而获得混入了 bFGF 的明胶水凝胶。由此制备的水凝胶片为矩形 (1 \times 10mm) 且厚度为 0.7mm。相应的水凝胶片的水分含量为 95%。所有实验过程均在无菌条件下进行。

(ii) 动物实验

给重 10kg—12kg 的 8 只小猎犬在用乙醚麻醉后经口腔插管并在仰卧位置上实施中线胸骨切开术, 且使用电手术刀以有蒂方式将每条狗的两侧胸廓内动脉从原始位置上剥离至剑突炎的高度。将剥离的两侧胸廓内动脉完全分离并使用 1-0 号丝线在中侧和边侧上切断并取出。

将这 8 条狗分成 2 组: A 组取出 BITA 并在中线胸骨切开术后使混有 bFGF 的明胶水凝胶粘合在胸骨上, 而 B 组仅取出 BITA (每组 4 只动物)。通过以化学方式使具有 4.9 等电点的碱处理的明胶与戊二醛交联来制备明胶水凝胶片。以明胶水凝胶片的总重为基准, 该明胶水凝胶中含有的水分按重量计为 95%。

(iii) 骨形成的评价

通过骨闪烁图 (使用亚甲基二膦酸锝 99; 下文缩写为“Tc-99-MDP”)、胸骨的 X 射线照相术和双能量 X 射线吸收法 (DEXA) 评价血管周围骨形成的情况。

(iv) 骨闪烁图的分析

对手术 4 周后相应的狗经静脉内给予 Tc-99-MDP 并在给药 60 分钟后拍摄狗的骨闪烁图。结果如附图 8A (A 组) 和 8B (B 组) 中所示。正如从这些照片中观察到的, 显然可以认为 A 组中 Tc-99-MDP 在胸骨处的累积多于 B 组中 Tc-99-MDP 在胸骨处的累积。

此外, 将胸骨分成三组作为有兴趣的区 (ROI) 且基于作为参比区 (ref-ROI) 的前纵隔部分的计算相应区域中的阴影部分的比例以便进行定量评估。结果如附图 9 中所示, 在给予 Tc-99-MDP 30 分钟后, A 组为 234.9 \pm 31.0%, 而 B 组为 176.2 \pm 39.0%; 且在给予 Tc-99-MDP 60 分钟后, A 组为 282.7 \pm 22.9%, 而 B 组为 174.2 \pm 27.2%。因此, 在这些组中观察到

了显著性差异 ($p<0.001$)。

1 (v) 胸骨的 X 射线照相术

通过 X 射线照相术来评价手术 4 周后胸骨周围骨的再生情况。结果如附图 10A (A 组) 和 10B (B 组) 中所示。

- 5 在 A 组中, 可认为在所有部分中均有足够的骨再生, 而在 B 组中, 存在许多骨再生不充分的部分且有些部分是部分分离的。

(vi) 双能量 X 射线吸收法 (DEXA)

- 10 为了定量地评价胸骨再生的情况, 将具有 $0.1\text{cm}\times 1.0\text{cm}$ 大小的有兴趣的区 (ROI) 设在胸骨切口部分且通过使用 DEXA 测定该部分处的骨密度。测定部分是两侧胸骨内第一与第六肋之间的胸骨切口部分。结果如附图 11 中所示。正如从附图 11 中观察到的, A 组中骨量为 $21.4\pm 11.1\text{mg}$, 而 B 组中骨量为 $8.6\pm 7.4\text{mg}$; 且 A 组中骨的密度为 $125.8\pm 70.5\text{mg}/\text{mm}^2$, 而 B 组中骨的密度为 $66.7\pm 44.3\text{mg}/\text{mm}^2$ 。因此, 可以理解的是 A 组表现出显著高于 B 组的数值, 由此在这些组中观察到了显著性差异
- 15 ($p<0.001$)。

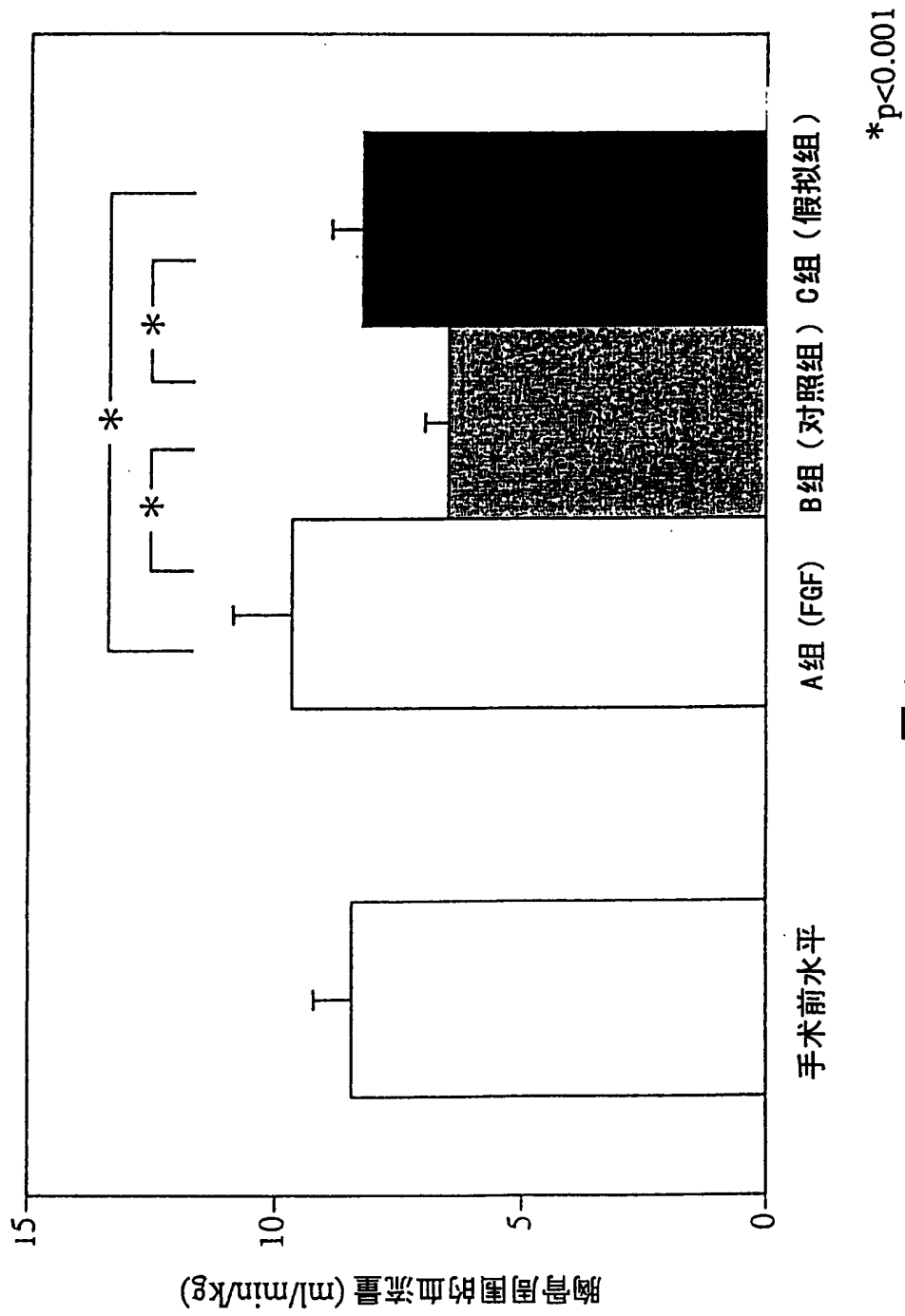
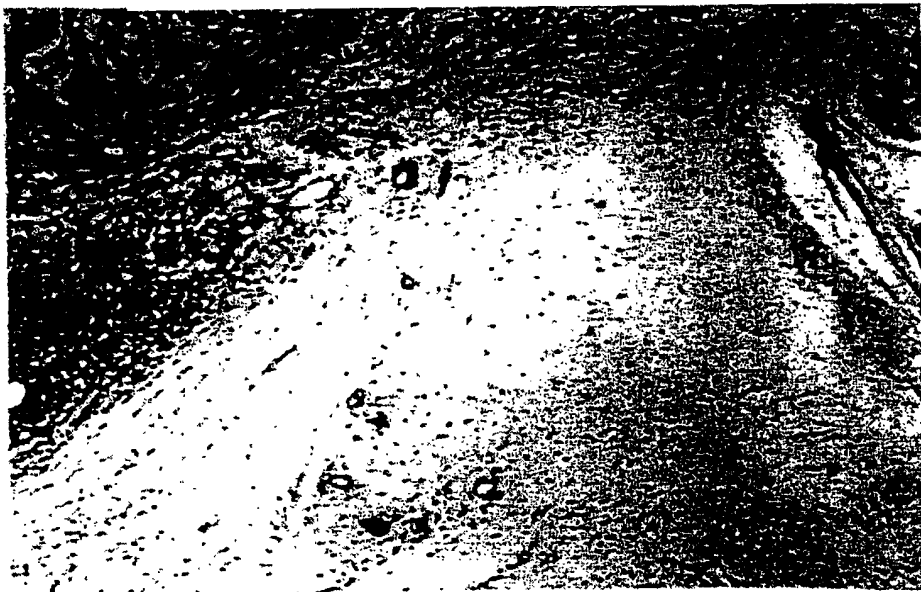


图 1



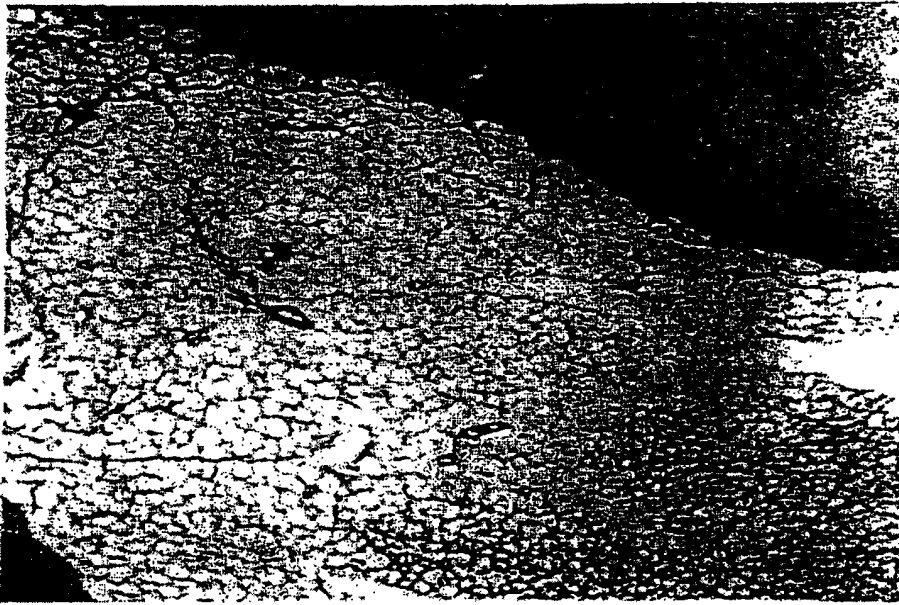
A组 (bFGF)

图 2A



B组 (对照)

图 2B



C组（假设组）

图 20

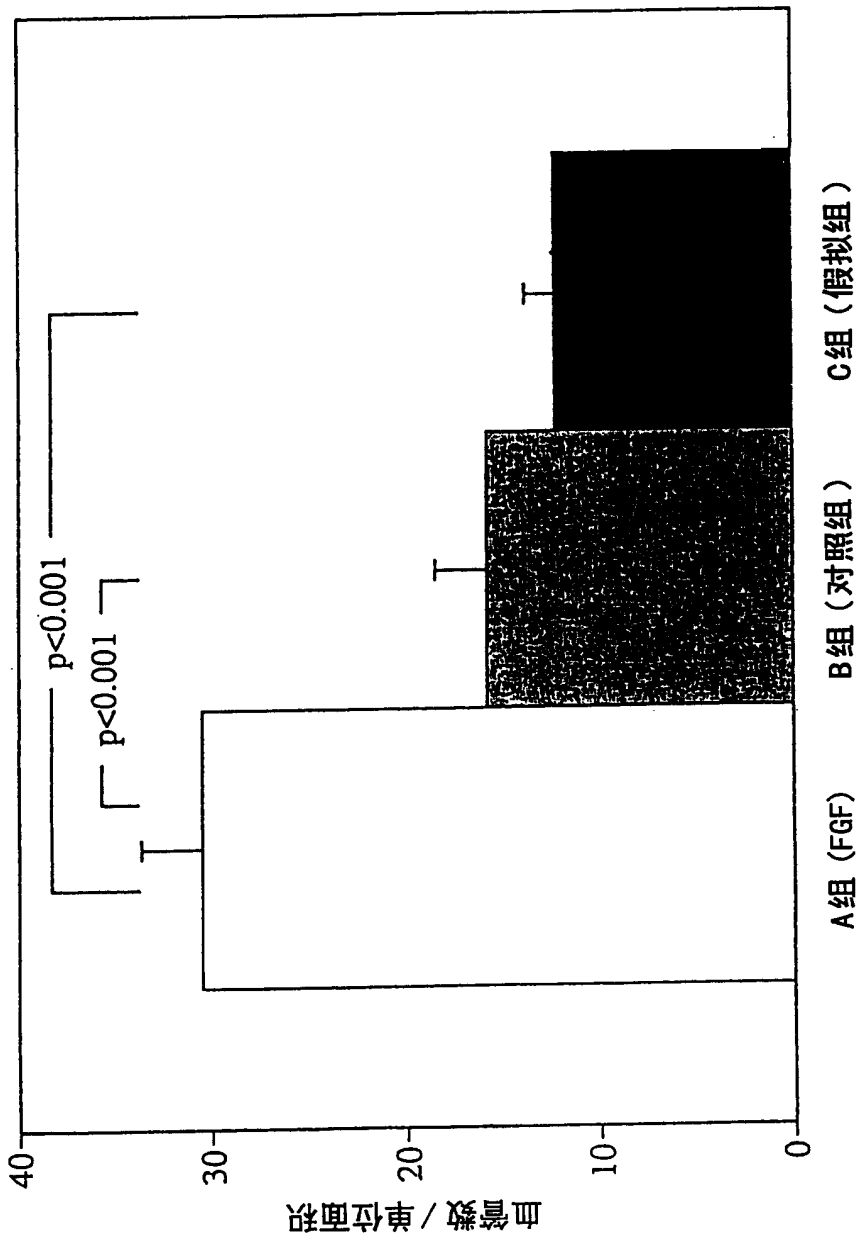


图 3

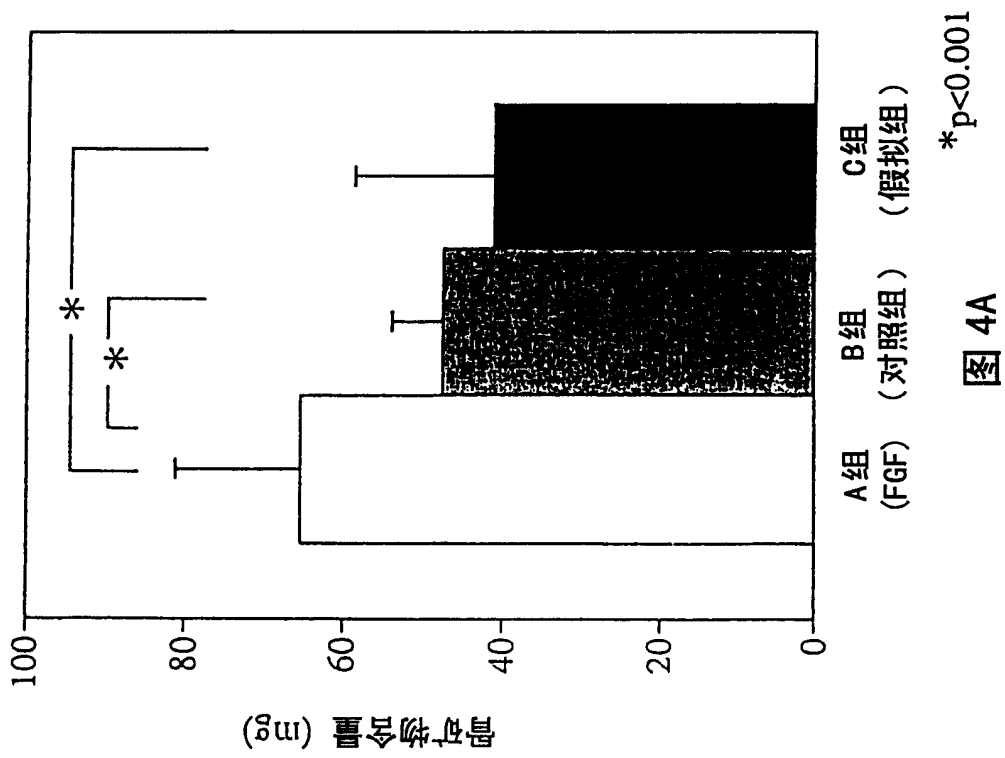


图 4A

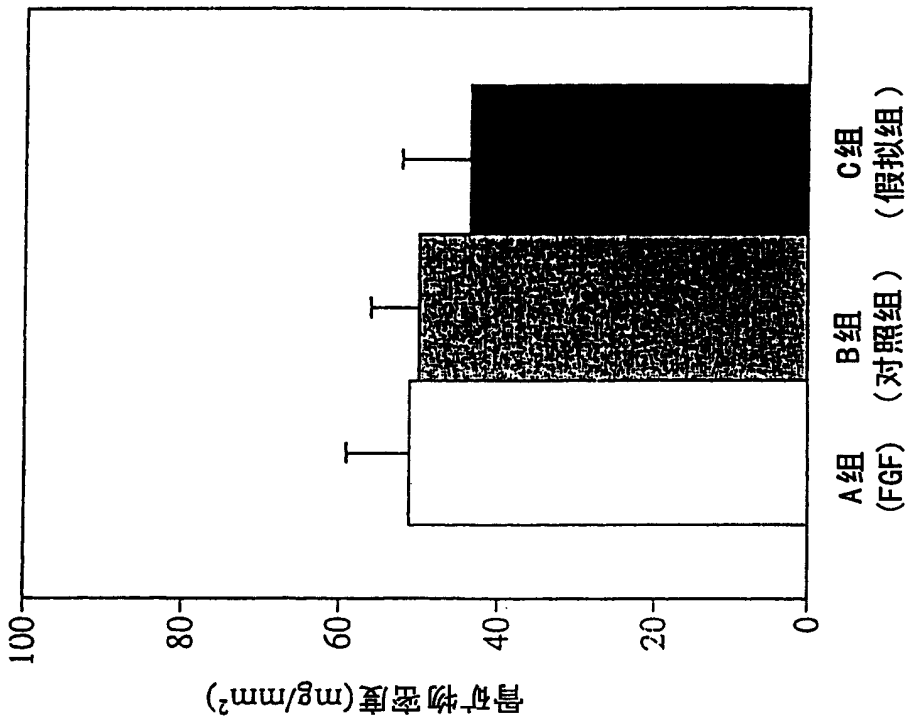


图 4B

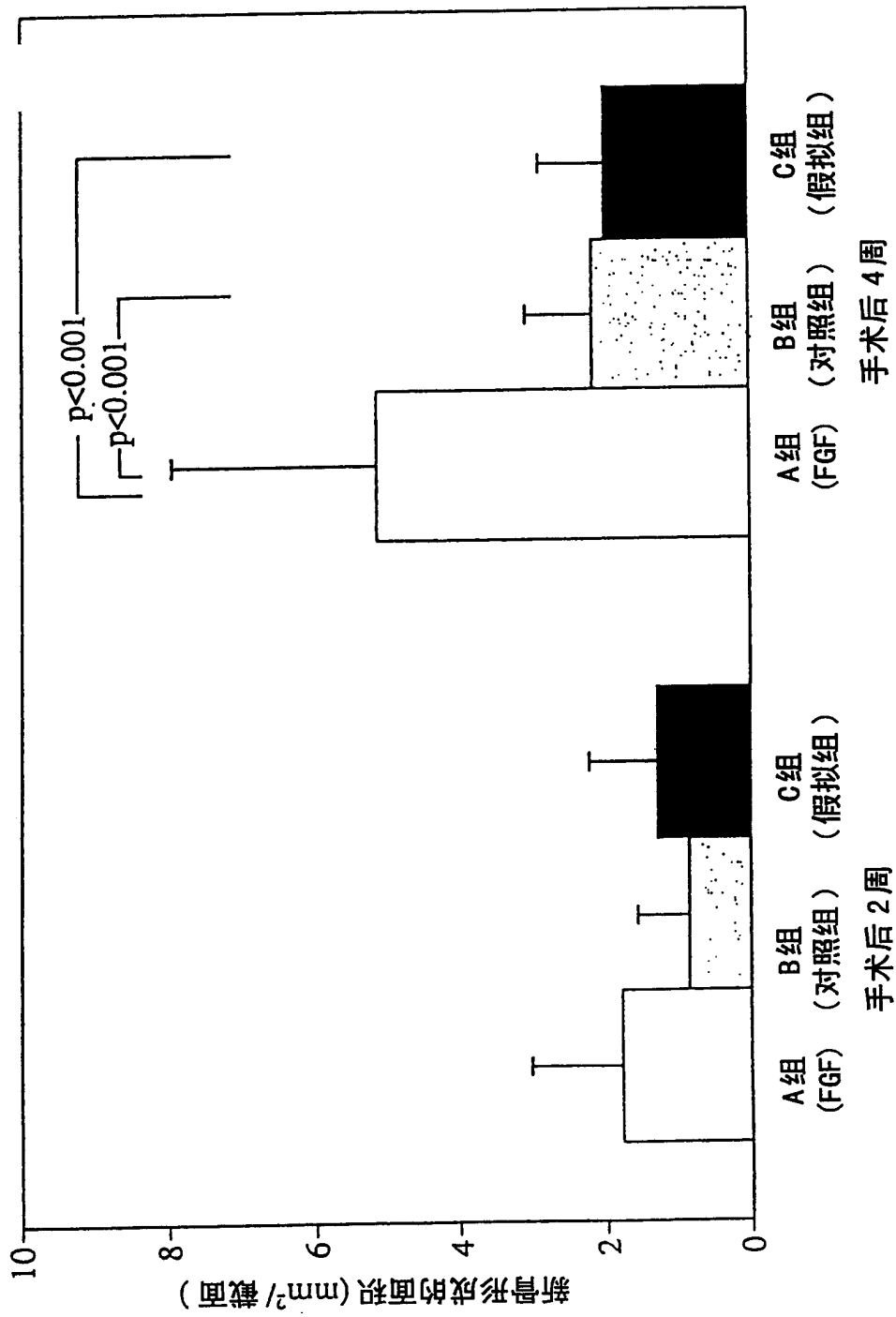


图 5



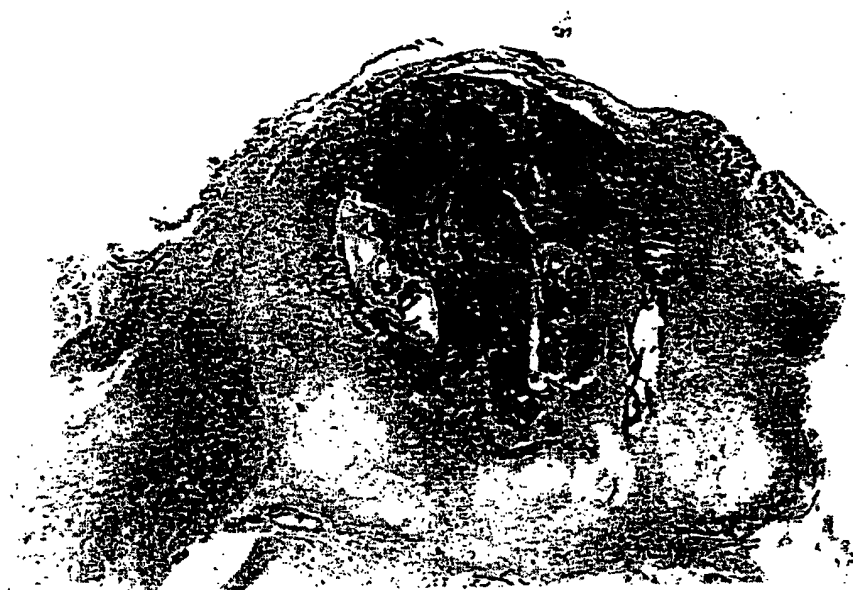
A组 (bFGF)

图 6A



B组 (对照组)

图 6B



C组(假拟组)

图 6C



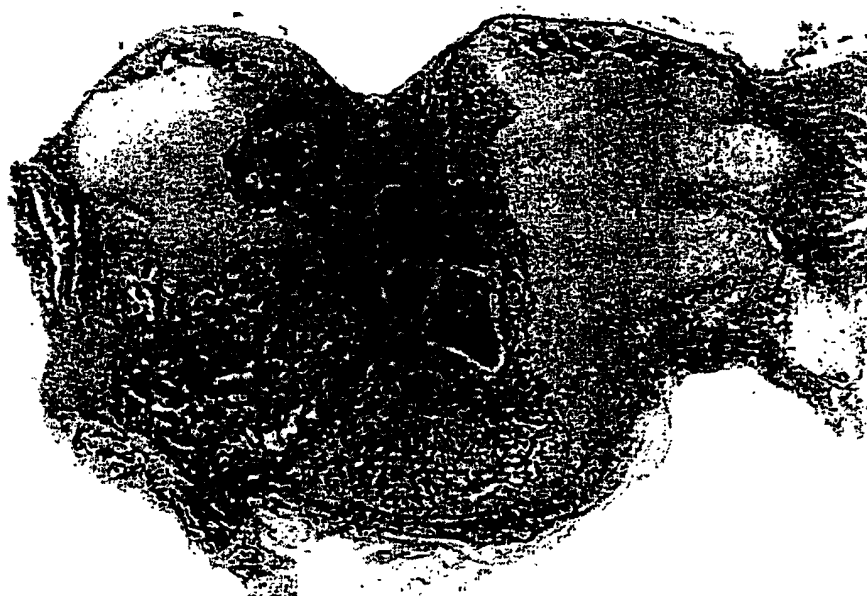
A组(bFGF)

图 7A



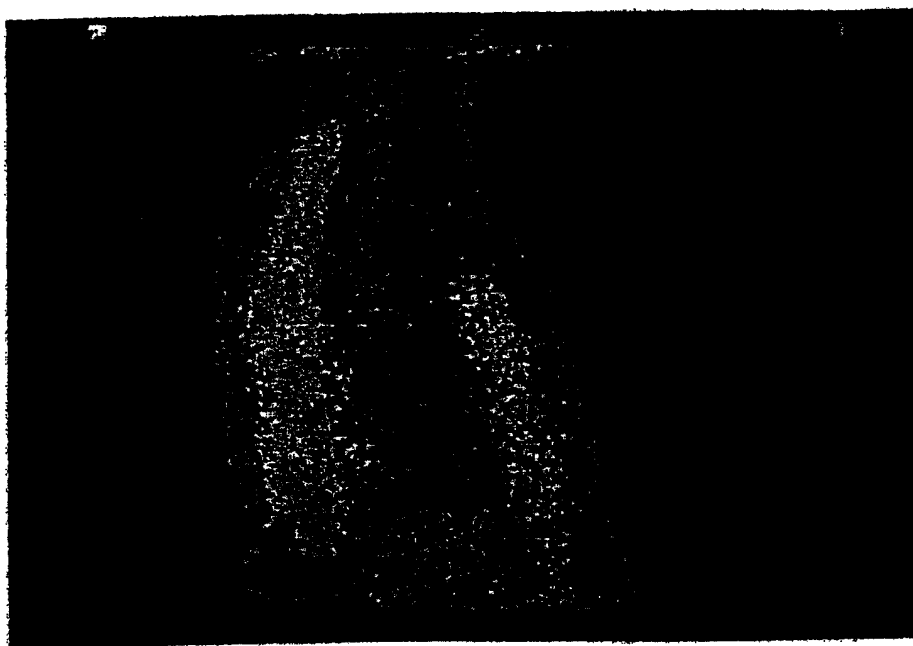
B组 (对照组)

图 7B



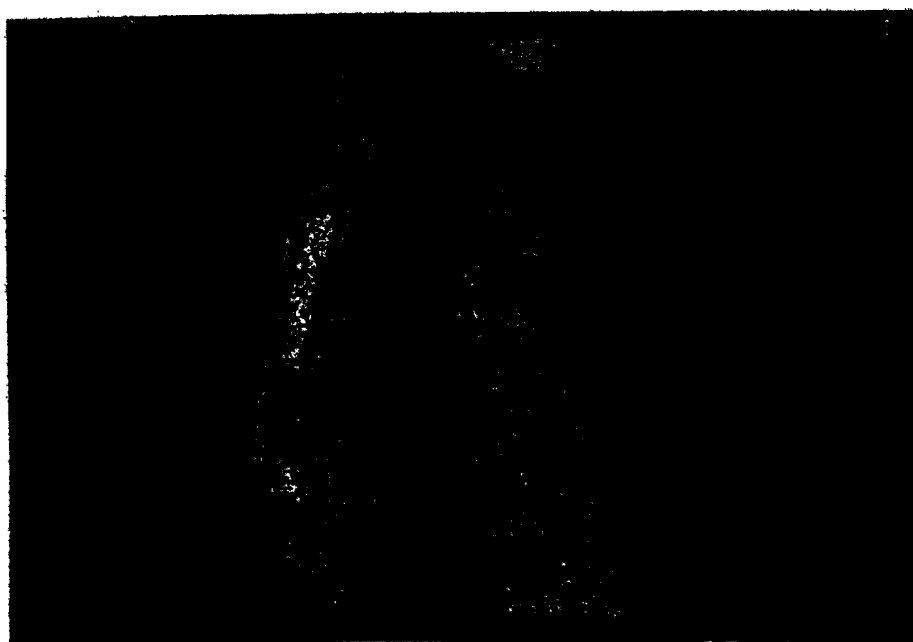
C组 (假拟组)

图 7C



A组 (bFGF)

图 8A



B组 (对照图)

图 8B

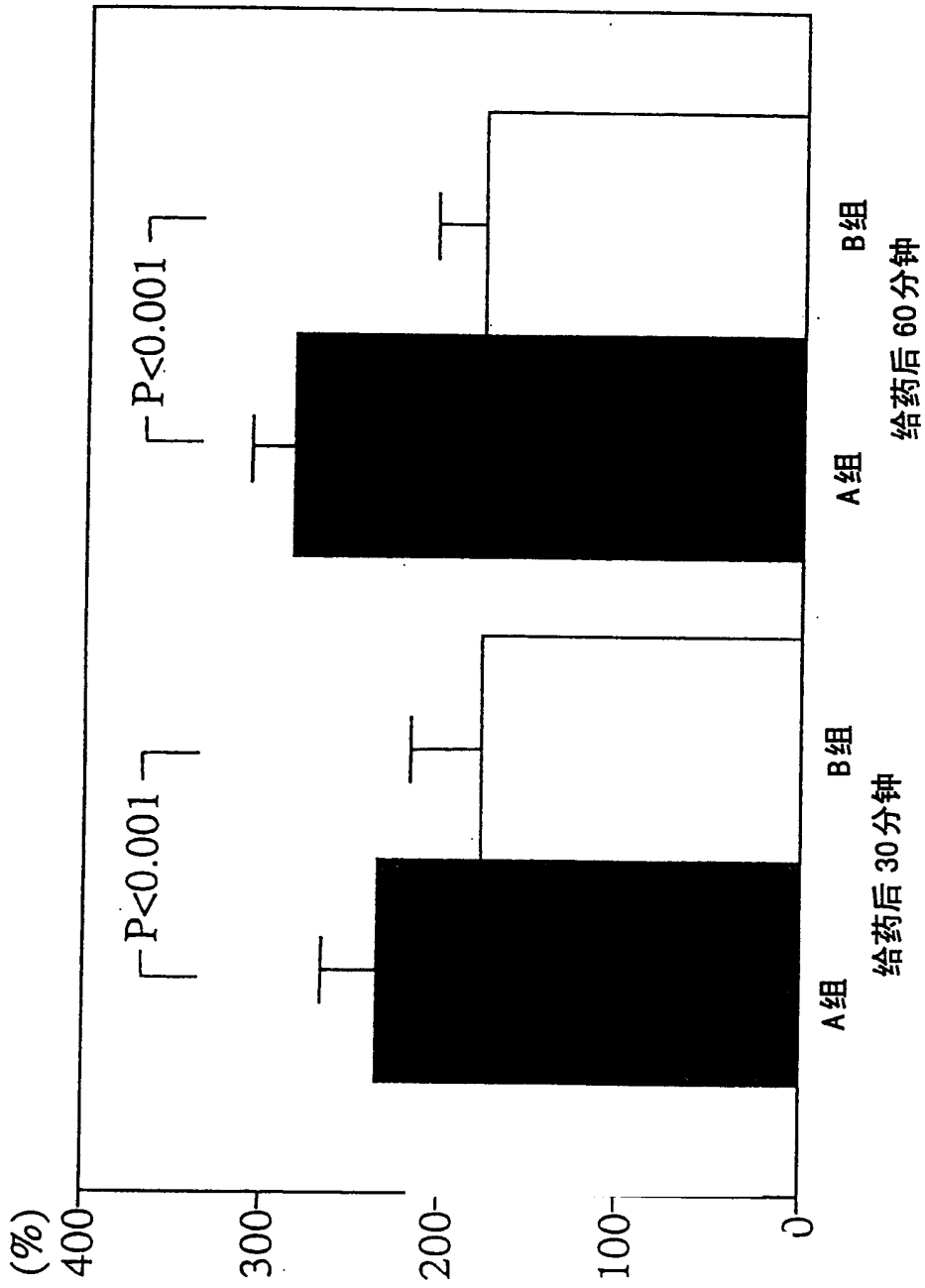
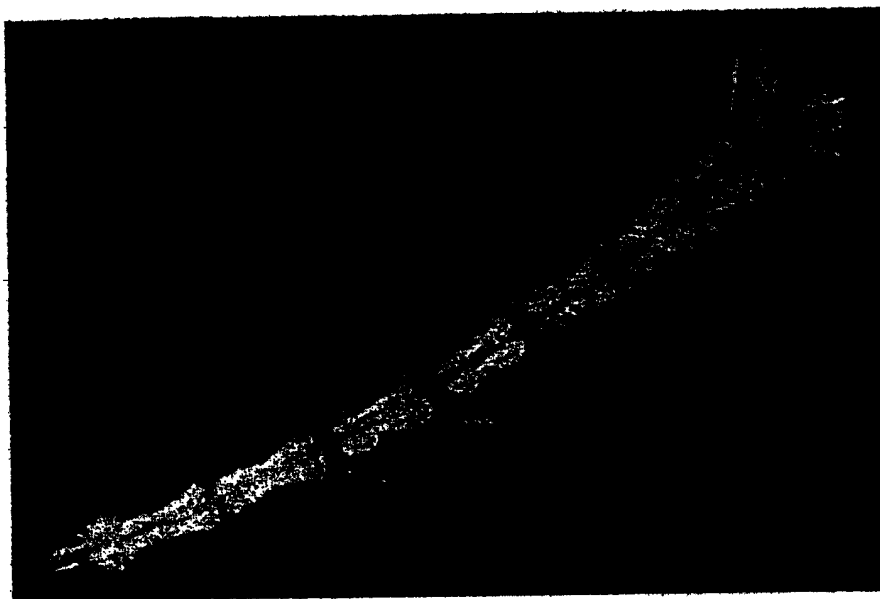
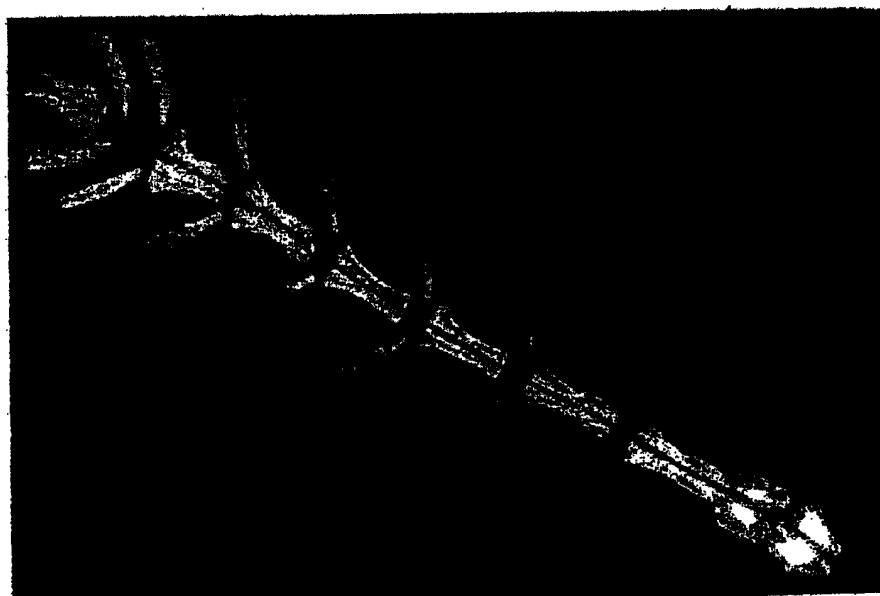


图 9



A组 (bFGF)

图 10A



B组 (对照组)

图 10B

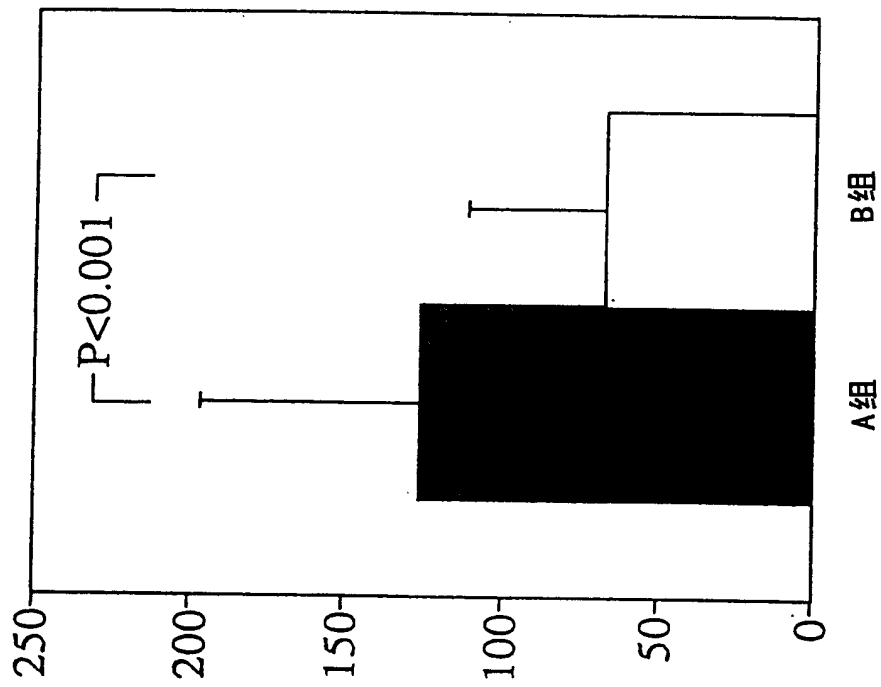


图 11B

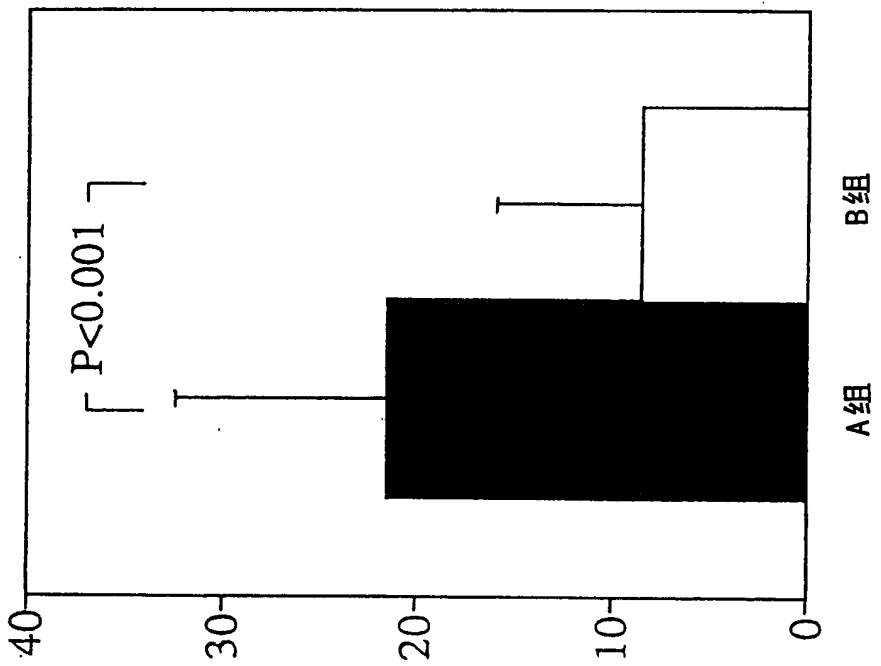


图 11A