

带部分松质骨小牛皮质骨支架复合兔骨髓间充质干细胞植入兔体内血管内皮细胞生长因子的表达☆

刘 锐, 张湘生, 雷 霆, 黄 辉

Expression of vascular endothelial growth factor after rabbit bone marrow mesenchymal stem cells combined with calf cortical bone scaffold with partial cancellous bone implanted into rabbits

Liu Tang, Zhang Xiang-sheng, Lei Ting, Huang Hui

Abstract

BACKGROUND: Currently xenogeneic cancellous bone is more common as tissue engineering materials, but cortical bone is restricted due to degrading difficulty and low porosity. However, cortical bone is inferior to cancellous bone, such as bio-mechanics, how to develop the use of cortical bone is the focus of the research.

OBJECTIVE: To observe the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) after rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and cortical bone scaffold with partial cancellous bone were implanted into rabbits.

METHODS: Four healthy 1-month-old New Zealand white rabbits were used for stem cell extraction, and 60 3-month-old New Zealand rabbits were implanted with BMSCs induced osteogenic composite calf bone, simple bone xenograft group and autogenous iliac bone into ala of ilium. The expressions of VEGF were detected by RT-PCR at post-operative 4, 8, 12, 24 weeks.

RESULTS AND CONCLUSION: The VEGF expression in simple bone xenograft group was lower than that in BMSCs induced osteogenic composite calf bone group and autogenous iliac bone group at all time points ($P < 0.05$). At postoperative 4 weeks, the BMSCs induced osteogenic composite calf bone group had lower expression than autogenous iliac bone group ($P < 0.05$), but with no significant differences at postoperative 8, 12, 24 weeks ($P < 0.05$). Rabbit BMSCs combined with calf cortical bone scaffold with partial cancellous bone implanted into New Zealand rabbits have good angiogenesis capacity.

Liu T, Zhang XS, Lei T, Huang H. Expression of vascular endothelial growth factor after rabbit bone marrow mesenchymal stem cells combined with calf cortical bone scaffold with partial cancellous bone implanted into rabbits. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(34):6287-6292. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前异种松质骨作为组织工程材料较为多见, 而皮质骨因其难以降解, 孔隙率低等原因限制了其使用。但皮质骨具有许多松质骨不具备的优越性, 如生物力学方面, 如何开发利用皮质骨是课题研究的重点。

目的: 观察兔骨髓间充质干细胞复合带部分松质骨小牛皮质骨支架材料植入兔体内后血管内皮细胞生长因子表达。

方法: 健康 1 月龄新西兰大白兔 4 只用于干细胞提取; 3 月龄新西兰大白兔 60 只, 在髂骨翼分别植入骨髓间充质干细胞成骨诱导后复合异种骨, 单纯异种骨, 自体髂骨。术后 4, 8, 12, 24 周取材 RT-PCR 检测血管内皮细胞生长因子的表达。

结果与结论: 血管内皮细胞生长因子的表达情况: 在各时间点, 单纯异种骨组低于骨髓间充质干细胞成骨诱导后复合异种骨组和自体髂骨组($P < 0.05$)。术后第 4 周时, 骨髓间充质干细胞成骨诱导后复合异种骨组低于自体髂骨组($P < 0.05$), 在术后第 8, 12, 24 周时, 两组差异无显著性意义($P > 0.05$)。提示兔骨髓间充质干细胞复合带部分松质骨的小牛皮质骨支架材料植入新西兰兔体内具有较好的血管生成能力。

关键词: 成骨诱导; 骨髓间充质干细胞; 带部分松质骨小牛皮质骨; 血管内皮细胞生长因子; 骨科生物材料

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.34.005

刘锐, 张湘生, 雷霆, 黄辉. 带部分松质骨小牛皮质骨支架复合兔骨髓间充质干细胞植入兔体内血管内皮细胞生长因子的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(34):6287-6392. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

复合骨组织材料的构建在组织工程学中有良好的发展前景^[1]。但是目前对复合体的构建尚无成熟技术, 本实验以新西兰大白兔作为研究对象, 将同种异体骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSCs)复合带部分松质骨的小牛皮质骨支架体外定向成骨诱导后植入新西兰大白兔髂骨, 观察血管内

皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)表达, 为骨组织工程植骨材料的研究提供实验依据。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2007-10/2009-01在中南大学湘雅二医院动物实验室与中心实验室完成。

材料: 健康1月龄新西兰大白兔4只, 体质量

Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Liu Tang☆, Doctor, Physician, Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China liutang1204@126.com

Correspondence to: Huang Hui, Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China xmrong168@163.com

Received: 2010-06-26
Accepted: 2010-07-18

中南大学湘雅二医院, 湖南省长沙市 410011

刘锐☆, 男, 1981年生, 湖南省汉寿县, 2009年中南大学湘雅医学院毕业, 博士, 医师, 主要从事骨不连、骨组织工程研究。liutang1204@126.com

通讯作者: 黄辉, 中南大学湘雅二医院, 湖南省长沙市 410011 xmrong168@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)34-06287-06

收稿日期: 2010-06-26
修回日期: 2010-07-18
(201006026005/M · Y)

(0.7 ± 0.2) kg; 3月龄新西兰大白兔60只, 初始体质量(1.7 ± 0.2) kg, 中南大学湘雅二医院动物实验中心提供。随机数字表法分为3组: BMSCs/异种骨组, 单纯异种骨组和自体髂骨组, 每组20只, 分4, 8, 12, 24周时间点, 每个时间点5只; 所有动物均选取左侧髂骨为实验部位。实验过程中对动物处置符合动物伦理学要求^[2]。

异种骨由湖南株洲天健科技开发有限公司提供, 见图1。

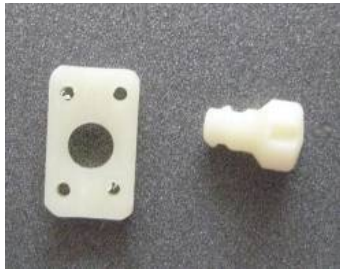


Figure 1 Calf cortical bone with partial cancellous bone
图1 带部分松质骨的小牛皮质骨材料

实验方法:

BMSCs的获取: ①兔BMSCs的分离与培养: 取1月龄新西兰大白兔处死后, 体积分数为70%的乙醇浸泡消毒20~30 min, 取股骨和胫骨(去除骨上附着的软组织和骨骺端), 参照Yao等^[3]的实验方法进行原代培养。②参照田志逢等^[4]的实验方法, 取出第3代BMSCs, 弃去培养液, PBS冲洗3次。0.25%胰酶-EDTA消化液消化并收集细胞, 调整细胞悬液浓度为 $3.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 应用微量移液器将细胞悬液接种在异种骨松质骨面, 每块支架滴加50 μL 细胞悬液, 随后放置于37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数为5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中孵育4 h以利于细胞和支架的进一步黏附, 小心加入含体积分数为10%胎牛血清的低糖DMEM培养基, 1 d后更换为成骨诱导培养基(无酚红的低糖DMEM培养基, 体积分数为10%胎牛血清, 10^{-8} mol/L 地塞米松, 10 mmol/L β -甘油酸磷钠和50 mg/L的抗坏血酸, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存)进行成骨诱导, 1周后备用。

手术方法: 3%戊巴比妥钠1 mg/kg做静脉麻醉。沿兔髂棘下缘做一弧形切口, 逐层切开皮肤, 分离皮下组织, 暴露臀肌。沿髂棘缘肌肉附丽处切开肌肉, 予以剥离, 暴露髂骨翼, 于左、右髂骨做同样处理。随即植入制备好的不同材料。各组材料植入完毕后, 分层严密缝合肌肉, 皮下组织和皮肤。术后予以青霉素 $80 \times 10^4 \text{ U}$ 肌注3 d预防感染。

苏木精-伊红染色: 术后4, 8, 12, 24周处死动物, 取材, 石蜡块包埋, 切片行苏木精-伊红染色, 行组织学观察。

免疫组织化学检测: 分别于术后4, 8, 12, 24周处死

动物, 带周围软组织完整取下整个植入材料标本, 采用免疫组织化学方法检测组织细胞VEGF的表达判断异种骨的血管化。

RT-PCR检测: 术后4, 8, 12, 24周取植入材料处骨痂组织100~150 mg存入液氮内备用 → Trizol试剂盒分别提取各组标本总RNA → 反转录合成cDNA → 聚合酶链式反应 → 琼脂糖凝胶电泳, 采用RT-PCR检测VEGF表达。引物设计参考文献[5]报道, 经查询GeneBank验证确定, 利用Primer Premier软件设计引物。由上海生物技术有限公司合成。

兔BMSCs细胞RT-PCR所用引物及其序列:

引物名称	引物序列
VEGF(+)	5' TGA CCA CGT CCT CGA TCG AA 3'
VEGF(-)	5' TCG GCA CAG ACC ATA TTG AC 3'
β -actin(+)	5' TGC TGA CCG TAT GCA GAA AG 3'
β -actin(-)	5' GCC ACC AAT CCA GAC AGA GT 3'

设计、实施、评估者: 实验由第一、二作者设计, 所有作者参与实施与评估。

统计学分析: 由第一作者使用SPSS 13.0软件采用多样本均数的两两比较的 q 检验进行方差分析。数据均用 $\bar{x} \pm s$ 来表示。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 所有动物在术后2 h完全清醒, 术侧跛行, 饮食比先前减少, 术后1 d, 跛行消失, 饮食基本正常。伤口无红肿、渗出现象, 1周后伤口一期愈合。实验过程中, 有5只新西兰大白兔因胃肠道疾病死亡, 死亡动物予以补充重复实验。

2.2 兔BMSCs体外培养情况 兔BMSCs原代接种初始可见大量的圆形细胞悬浮和红细胞碎片, 原代培养后24 h可见微少贴壁细胞, 初起为小圆形, 见图2; 48 h后所有细胞沉淀在瓶底, 可见短梭形、梭形、多角形贴壁细胞, 有初起克隆集落形成, 并可见细胞分裂相; 3 d后可见梭形类成纤维细胞明显增多, 见图3。5 d左右进入对数生长期, 增殖明显加快, 细胞排列具有一定方向性, 更换培养液时倒去红细胞, 见图4; 10~12 d单层细胞融合接近90%, 呈漩涡样生长, 漩涡中心细胞呈多层分布, 可能是矿化结节, 细胞界限不清, 细胞形态成多角形或圆形, 见图5。

1:3传代的细胞1 h后观察, 可见大量悬浮细胞, 核透亮, “满天星”样分布, 少量细胞开始贴壁, 细胞由圆形向梭形转化, 不随培养基晃动; 2 h后明显的贴壁细胞散在分布; 一般12 h左右完成贴壁, 生长增快, 多为类成纤维细胞, 圆形细胞逐渐减少, 见图6, 六七天细胞即可单层融合, 传3代以后细胞形态均一, 呈长

梭形, 接近融合状态时可呈漩涡样生长, 见图7。

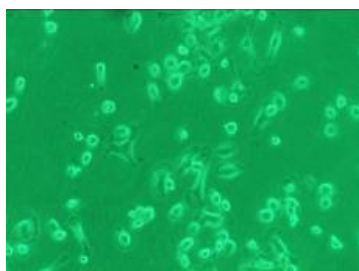


Figure 2 At 24 h after primary culture of bone marrow mesenchymal stem cells, few cells adhered, initially spherical and some fusiform ($\times 100$)
图 2 骨髓间充质干细胞原代培养后 24 h 可见微少贴壁细胞, 初起为小圆形, 部分为短梭形($\times 100$)

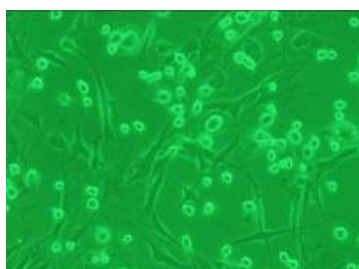


Figure 3 At 3 d after primary culture of bone marrow mesenchymal stem cells, fusiform-shape fibroblasts increase ($\times 100$)
图 3 骨髓间充质干细胞原代培养 3 d 后可见短梭形类成纤维细胞明显增多($\times 100$)

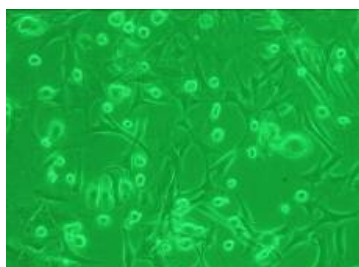


Figure 4 At 5 d after primary culture, bone marrow mesenchymal stem cells entered logarithmic phase, proliferated rapidly, and arranged directly ($\times 100$)
图 4 骨髓间充质干细胞原代培养后 5 d 进入对数生长期, 增殖明显加快, 细胞排列具有一定方向性($\times 100$)

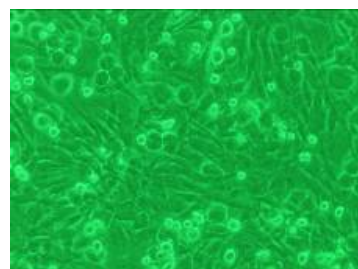


Figure 5 At 10-12 d after primary culture of bone marrow mesenchymal stem cells, monolayer conjugation was 90%, in whirlpool-shape growth ($\times 100$)
图 5 骨髓间充质干细胞原代培养 10 ~12 d 后单层细胞融合接近 90%, 呈漩涡状生长($\times 100$)



Figure 6 Bone marrow mesenchymal stem cells at 2 passage were uniform fusiform, round-like cells decrease ($\times 100$)
图 6 骨髓间充质干细胞传 2 代培养细胞呈形态均一的长梭形, 类圆形细胞减少($\times 100$)



Figure 7 Bone marrow mesenchymal stem cells at 2 passage were uniform fusiform ($\times 100$)
图 7 骨髓间充质干细胞传 3 代培养, 细胞呈形态均一的长梭形($\times 100$)

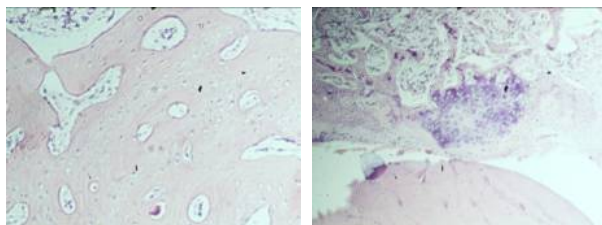
2.3 苏木精-伊红染色结果

BMSCs/异种骨组: 术后4周, 可见异种骨周围有大量软组织紧密粘贴, 与宿主骨结合处形成骨痂。异种骨载体内部及边缘可见大量的间充质细胞、成纤维细胞和软骨细胞, 表面有较多骨吸收陷窝, 内有破骨细胞活动。骨痂内仍可见肥大、固缩、空白陷窝明显的发生退行性变的软骨细胞, 以及不同发育阶段的软骨细胞, 表现为

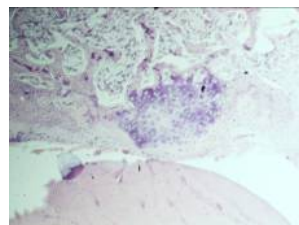
软骨化骨的过程。载体内可见新生毛细血管, 内含有血细胞, 管壁上可见衬垫细胞, 皮质骨内少量扩大的哈佛氏管, 但哈佛管周围新骨形成较少; 术后8周, 可见较多血管生成, 异种骨周围及与宿主骨结合处骨痂比较成熟, 可见编织骨, 成熟骨小梁, 见图8a; 术后12周, 在异种骨周围及与宿主骨结合处有大量的骨痂包围, 可见类骨组织、编织骨等。异种骨的内外表面有多量的陷窝, 内含有骨细胞、破骨细胞等。横截面可见多量的扩大的哈佛氏管, 其中参与成骨的细胞排列成“镶边状”; 毛细血管增多、变粗。术后24周, 在异种骨和宿主骨连接处可见大量的骨小梁形成, 内外表面吸收陷窝继续增加, 皮质骨内可见扩大的哈佛氏管继续增加, 成骨及破骨活动更加活跃, 有些部位见新形成板状骨和一些未吸收完全的异种骨。

单纯异种骨组: 术后4周, 异种骨表面可见少量的软组织贴附, 且不够紧密, 载体边缘可见成纤维细胞、少量软骨细胞, 载体内偶尔可见新生的毛细血管; 术后8周, 异种骨的表面见少量的骨吸收陷窝, 皮质骨内部哈佛管无明显变化, 见图8b; 术后12周, 可见较多软骨细胞, 未见类骨组织、编织骨, 见新生毛细血管; 术后24周, 皮质骨内部结构变化不明显, 类编织骨出现, 新生骨尚不成熟。

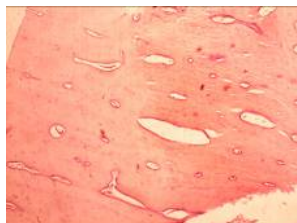
自体髂骨组: 术后4周, 8周与BMSCs/异种骨组类似, 见图8c。术后12周, 移植自体髂骨与宿主骨基本愈合。术后24周, 移植自体髂骨与宿主骨完全融合。



a: Vascularization was visible at 8 wk after bone xenograft combined with BMSCs was implanted



b: Cartilage could be seen at 12 wk after bone xenograft was implanted



c: A great quantity of angiogenesis generated at 8 wk after autogenous iliac bone was implanted

Figure 8 Histological observation of various materials implanted (Hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)
图8 各种材料植入后组织学观察(苏木精-伊红染色, $\times 100$)

2.4 VEGF免疫组化结果

BMSCs/异种骨组:

术后4周, 异种皮质骨扩大的哈佛管内衬垫细胞、破骨细胞、成骨细胞强阳性表达。接合部骨痂内除成骨细胞、破骨细胞、骨细胞阳性表达外, 间充质细胞、软骨细胞也呈较强阳性表达, 骨质淡染。新生毛细血管内皮细胞阳性表达, 见图9a。

术后8周, 异种骨周围及与宿主骨结合处骨痂内骨细胞阳性表达, 见图9b。

术后12周, 异种骨周围及与宿主骨结合处骨细胞阳性表达。皮质骨内部, 扩大的哈佛管内形成的新骨中可见骨细胞呈阳性表达, 新骨中央的管状结构阳性染色。

术后24周, 皮质骨内部扩大的哈佛管、吸收的骨陷窝、正在发育中的骨单位、扩大哈佛管周边的骨细胞阳性染色, 成熟的外骨痂和接合部骨痂阳性表达的骨细胞数量减少。

单纯异种骨组:

术后4周, 少量软骨细胞和载体内偶见的新生毛细血管内皮细胞呈阳性表达。

术后8周, 异种骨的骨吸收陷窝内细胞及毛细血管内皮细胞呈阳性表达, 见图9c。

术后12周, 异种骨周围及与宿主骨结合处骨细胞阳性表达。软骨细胞和载体内偶见的新生毛细血管内皮细胞呈阳性表达。

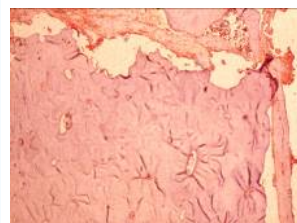
术后24周, 皮质骨内部扩大的哈佛管、吸收的骨陷窝、扩大哈佛管周边的骨细胞阳性染色。

自体髂骨组:

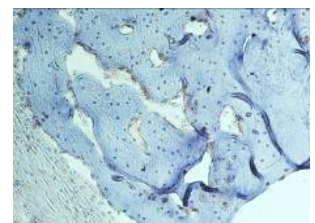
术后4周, 8周与BMSCs/异种骨组类似, 但阳性表达明显较BMSCs/异种骨组强。

术后12周, 移植自体髂骨与宿主骨基本愈合。

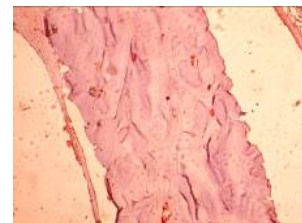
术后24周, 移植自体髂骨与宿主骨完全融合。



a: Vascularization could be seen and VEGF expressed positively at 4 wk after bone xenograft combined with BMSCs was implanted (AEC coloration, $\times 100$)



b: Vascularization could be seen and VEGF expressed positively at 8 wk after bone xenograft combined with BMSCs was implanted (DAB coloration, $\times 100$)



c: VEGF staining at 8 wk after bone xenograft was implanted (AEC coloration, $\times 100$)

BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; VEGF: vascular endothelial growth factor

Figure 9 Immunohistological observation of various materials implanted

图9 各种材料植入后免疫组织学检测

2.5 RT-PCR检测VEGF表达 术后4, 8, 12, 24处死动物, 取材行RT-PCR检测各组VEGF表达。VEGF的DNA片段大小为561 bp, β -actin为200 bp DNA片段, 与预期结果吻合。在骨移植术后4, 8, 12, 24周各组均可见VEGF的mRNA表达带出现, 其中在4周时, 各组表达均成弱阳性, 在8周时表达最强。并且BMSCs/异种骨组和自体髂骨组各项表达均强于单纯异种骨组。12周和24周BMSCs/异种骨组和自体髂骨组VEGF mRNA表达也明显强于单纯异种骨组。见图10, 表1。

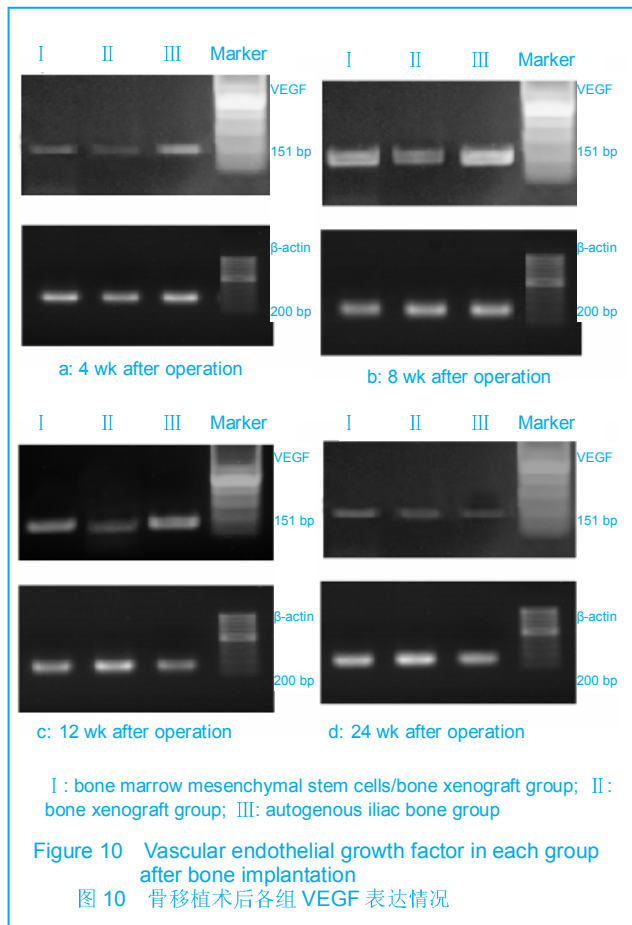


表 1 术后 4, 8, 12, 24 周各组 VEGF 的 mRNA 表达灰度比值
Table 1 Grey value of VEGF mRNA expression in each group at postoperative 4, 8, 12, 24 wk ($\bar{x} \pm s$)

Group	Time points (wk)	Sample (n)	VEGF/ β -actin mRNA grey value ratio
BMSCs/bone xenograft	4	5	0.60 $\pm$ 0.05
	8	5	1.32 $\pm$ 0.04
	12	5	0.87 $\pm$ 0.03
	24	5	0.66 $\pm$ 0.09
Bone xenograft	4	5	0.23 $\pm$ 0.02
	8	5	0.78 $\pm$ 0.16
	12	5	0.51 $\pm$ 0.06
	24	5	0.38 $\pm$ 0.03
Autogenous iliac bone	4	5	1.02 $\pm$ 0.06
	8	5	1.36 $\pm$ 0.11
	12	5	0.95 $\pm$ 0.13
	24	5	0.68 $\pm$ 0.07

BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; VEGF: vascular endothelial growth factor

从表1可以得出: VEGF在单纯异种骨组与BMSCs/异种骨组; 单纯异种骨组与自体髂骨组之间相比, 在各时间点, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。BMSCs/异种骨组与自体髂骨组比较, 在术后第8、12、24周时, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 术后第4周时, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论

异种骨作为一种生物组织, 骨源丰富, 目前异种松质骨应用较为多见, 皮质骨因其难以降解, 孔隙率低等原因限制了其使用。但皮质骨具有许多松质骨不具备的优越性, 如生物力学方面, 如何开发利用皮质骨是本课题研究的重点。国内的李莹等^[6]用深低温冷冻皮质骨板移植在兔体内提示: 异种皮质骨板主要靠宿主骨痂包绕其边缘而愈合, 异种骨板与宿主相接内侧被替代, 具有新骨生长; 汤亭亭等^[7]用家兔做实验探讨不同力学环境下同种皮质骨移植生物力学性能的变化呈较快下降再缓慢上升, 生理载荷的刺激有利于同种异体皮质骨生物力学的恢复和改善。本实验采用带部分松质骨的小牛皮质骨作为支架材料, 经过脱脂、脱蛋白处理, 然后在松质骨面复合骨髓间充质干细胞, 取得了实验成功。

骨修复与血管形成密切相关^[8]。血管的形成和生长是生殖、胚胎发育、器官形成、伤口愈合和组织再生过程中的重要环节, 根据形成的方式不同分为血管生成和血管形成^[9-10]。血管生成是指邻近的毛细血管通过出芽的方式长出新血管的过程, 包括血管扩张、基底膜降解、内皮细胞迁移和增生、毛细血管的管样结构形成、新生血管的基底膜形成, 血管周细胞和血管平滑肌细胞聚集在基底膜外形成成熟的血管。而血管形成主要由未分化的内皮细胞聚集分化形成, 在胚胎发育时期, 中胚层卵黄囊内的血管母细胞先分化形成血管丛, 进而再形成原始的血管。包括5个步骤, 血管母细胞分化出内皮细胞; 内皮细胞相互聚集; 极化的内皮细胞形成早期的血管腔, 进而组成新生的毛细血管网; 血管周细胞和血管平滑肌细胞聚集在基底膜外形成成熟的血管。

促进血管生成和血管形成的因子可分为直接诱导因子和间接诱导因子, 其中 VEGF是强有力的直接血管诱导因子^[11]。VEGF是Ferrara等^[12]1989年在牛垂体星状细胞培养分离出的一种糖蛋白。因其在体内外均可特异性地作用于血管内皮细胞, 促进其增殖和血管生成, 并可增加血管通透性而得名。也被称为血管调理素和血管渗透因子。初同伟等^[13]观察到VEGF的表达贯穿于骨折愈合的全过程, VEGF表达的高峰期与骨折愈合过程中的血管重建期极其吻合, 说明VEGF在骨折愈合过程中和骨折端血管生成有关。

VEGF作为促使内皮细胞增殖、趋化的特异性细胞

因子,对骨修复过程的血管再生发挥着重要作用^[11-14]。本实验观察到,异种骨移植后与宿主骨愈合过程中的不同部位、不同阶段的各种细胞VEGF表达呈阳性,证实VEGF参与了异种骨移植后的“爬行替代”过程。VEGF在骨折修复过程的高表达期与血供重建期一致^[13],VEGF在异种骨移植后“活化重建”过程的阳性表达,同样意味着VEGF的表达与异种骨移植后的“血供重建”有关。实验结果表明:在移植后的4周,异种骨的血运来源主要是由于外周的软组织和骨膜血管的侵入,成骨活动主要发生在外表面及与宿主骨结合部。在移植皮质骨内部,阳性表达的细胞数量逐渐开始增多,24周时成骨活动仍然活跃,外表面和接合部骨痂阳性表达的细胞数量于8~12周后减少。异种骨内部和外表面、接合部骨痂VEGF表达的时相并不一致,说明皮质骨内部主要的血运来源与外周不同。另外,实验结果显示:种植BMSCs的异种骨,VEGF的阳性表达更强,新生血管密度更高。术后处死动物,行RT-PCR检测VEGF表达情况:各组均有VEGF的mRNA表达带出现,其表达量是呈现先升高后降低,其峰值出现在移植后第8周。BMSCs做为骨组织工程的较为理想的种子细胞,其不仅可分化为成骨细胞而且还可分泌VEGF。体外实验证实^[15],如同血管内皮细胞可以产生骨形成蛋白一样,BMSCs可以产生VEGF,通过将BMSCs与内皮细胞共培养,发现BMSCs可通过分泌VEGF促进EPC和内皮细胞的增殖与分化。提示若将BMSCs随支架材料植入体内,同样具有直接促进血管生成的作用^[16]。结合第一部分的实验结果显示,体外培养兔BMSCs的VEGF表达呈弱阳性,诱导为成骨细胞后,VEGF表达增强,其中诱导后的第1周表达最强。说明BMSCs在体内分化成骨过程中,可能参与诱导血管形成的过程。有研究表明,人BMSCs在体外被诱导为成熟的成骨细胞时,成骨细胞VEGF121和VEGF165单体表达明显升高,而诱导地塞米松是促进成骨细胞表达VEGF121和VEGF165的重要因素^[17]。VEGF121是骨形成早期阶段的血管生成的关键因子,VEGF和VEGF受体结合后,促进内皮细胞增殖和血管形成^[18]。

结论:兔BMSCs复合带部分松质骨的小牛皮质骨支架材料植入新西兰兔体内具有更好血管生成能力。

4 参考文献

- [1] Hwang NS, Elisseeff J. Application of stem cells for articular cartilage regeneration. J Knee Surg. 2009;22(1):60-71.
- [2] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.

- [3] Yao J, Radin S, Reilly G, et al. Solution-mediated effect of bioactive glass in poly (lactic-co-glycolic acid)-bioactive glass composites on osteogenesis of marrow stromal cells. J Biomed Mater Res A. 2005; 75(4):794-801.
- [4] Tian ZF, Qin JS, Wang RF, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(15):2801-2805.
田志逢,秦俭书,王瑞芳,等. 骨髓间充质干细胞复合异种骨基质明胶修复大鼠桡骨缺损[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(15): 2801-2805.
- [5] Fiedler J, Leucht F, Waltenberger J, et al. VEGF-A and PIGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. Biochem Biophys Res Commun. 2005;334(2):561-568.
- [6] Li Y, Zhang H, Rong GW, et al. Zhonghua Waikexi Zazhi. 2004;42(2): 107-109.
李莹,张洪,荣国威,等. 股骨近端异种皮质骨板组织学及生物力学实验研究[J]. 中华外科杂志, 2004, 42(2): 107-109.
- [7] Tang TT, Gu DY. Zhonghua Waikexi Zazhi. 1998;36(5):272-274.
汤亭亭,顾冬云. 同种异体皮质骨移植的生物力学研究[J]. 中华外科杂志, 1998, 36(5): 272-274.
- [8] Lee DY, Cho TJ, Kim JA, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis. Bone. 2008; 42(5): 932-941.
- [9] Roguin A, Levy AP. Angiogenesis—an update. Pediatr Endocrinol Rev. 2005;2(3):391-398.
- [10] Schierling W, Troidl K, Troidl C, et al. The role of angiogenic growth factors in arteriogenesis. J Vasc Res. 2009;46(4):365-374.
- [11] Semenza GL. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. J Cell Biochem. 2007;102(4):840-847.
- [12] Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 1989;161(2):851-858.
- [13] Chu TW, Wang ZG, Zhu PF, et al. Zhonghua Chuangshang Zazhi. 2001;17(6):344-346.
初同伟,王正国,朱佩芳,等. 骨折愈合过程中血管内皮生长因子及其受体的表达[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(6): 344-346.
- [14] Liao SS, Cui FZ, Zhu Y. Osteoblasts adherence and migration through three-dimensional porous mineralized collagen based composite: nHAC/PLA. Journal of Bioactive and Compatible Polymers. 2004;19(3): 117-130.
- [15] Kaigler D, Krebsbach PH, Polverini PJ, et al. Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells. Tissue Eng. 2003;9(1):95-103.
- [16] Wijelath ES, Rahman S, Murray J, et al. Fibronectin promotes VEGF-induced CD34 cell differentiation into endothelial cells. J Vasc Surg. 2004;39(3):655-660.
- [17] Furumatsu T, Shen ZN, Kawai A, et al. Vascular endothelial growth factor principally acts as the main angiogenic factor in the early stage of human osteoblastogenesis. J Biochem. 2003;133(5):633-639.
- [18] Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. Endocrinology. 2002;143(4):1545-1553.

来自本文课题的更多信息一

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 首次将带部分松质骨的皮质骨作为组织工程材料进行研究。

课题评估的“金标准”: 本课题的金标准是自体骨材料移植,在文章中已经应用。

设计或课题的偏倚与不足: 带干细胞的异种骨移植后,检测指标过于局限。

提供临床借鉴的价值: 异种骨移植目前在临床有所应用,但松质骨强度不够,皮质骨再血管化能力较差,探讨带部分松质骨的皮质骨作为组织工程材料,有望应用于临床。