

双基因活化纳米骨浆的体内成骨

张一, 孙立, 简月奎, 胡如印, 田晓滨, 李波, 韩伟(贵州省人民医院骨科, 贵州省贵阳市 550002)

文章亮点:

与以往研究相比, 实验的创新在于采用体内被动方式将 pIRES-BMP2/VEGF165 双基因表达质粒转染至纳米骨浆, 构建骨形态发生蛋白 2/血管内皮生长因子双基因活化纳米骨浆缓释系统, 并通过实验证实纳米骨浆经骨形态发生蛋白 2/血管内皮生长因子质粒或骨形态发生蛋白 2 质粒活化后, 在体内具有了一定的成骨能力。

关键词:

生物材料; 骨生物材料; 基因活化基质; 纳米材料; 骨缺损; 骨形态发生蛋白 2; 血管内皮生长因子; 国家自然科学基金

主题词:

生物相容性材料; 纳米粒; 基因; 骨形态发生蛋白类

基金资助:

国家自然科学基金(81060145); 贵州省科技攻关项目(SY[2010]3057); 贵州省特助基金项目(TZJF-2011-34); 贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金([2011]30); 贵州省科学技术厅基金(SYC2010J3113)

摘要

背景: 前期实验构建了骨形态发生蛋白 2/血管内皮生长因子双基因活化纳米骨浆。

目的: 观察骨形态发生蛋白 2/血管内皮生长因子双基因活化纳米骨浆在动物体内成骨的基因表达和骨形成效果。

方法: 取昆明小鼠 24 只, 在其中 12 只右侧大腿后群肌袋内注入骨形态发生蛋白 2/血管内皮生长因子+纳米骨浆, 左侧大腿后群肌袋内注入空白质粒+纳米骨浆或纳米骨浆; 在剩余 12 只小鼠右侧大腿后群肌袋内注入骨形态发生蛋白 2+纳米骨浆, 左侧大腿后群肌袋内注入空白质粒+纳米骨浆或纳米骨浆。术后 2, 4 周取材作影像学检查、组织学观察和分子生物学检测。

结果与结论: 术后各时间点骨形态发生蛋白 2/血管内皮生长因子+纳米骨浆组、骨形态发生蛋白 2+纳米骨浆组均有骨样组织形成; 骨形态发生蛋白 2/血管内皮生长因子+纳米骨浆组局部有明显骨形态发生蛋白 2 和血管内皮生长因子的 mRNA 表达, 并且碱性磷酸酶水平、成骨速度及新生骨量明显优于骨形态发生蛋白 2+纳米骨浆组($P < 0.05$); 空白质粒+纳米骨浆组、纳米骨浆组无明显成骨表现。表明纳米骨浆经骨形态发生蛋白 2/血管内皮生长因子质粒或骨形态发生蛋白 2 质粒活化后, 在体内具有了一定的成骨能力, 且前者在成骨速度和质量方面较后者明显增强。

张一, 孙立, 简月奎, 胡如印, 田晓滨, 李波, 韩伟. 双基因活化纳米骨浆的体内成骨[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(3):329-334.

In vivo osteogenesis by implanting dual gene activated nanobone putty

Zhang Yi, Sun Li, Jian Yue-kui, Hu Ru-yin, Tian Xiao-bin, Li Bo, Han Wei (Department of Orthopedics, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China)

Abstract

BACKGROUND: The bone morphogenetic protein 2 (BMP2)/vascular endothelial growth factor (VEGF) dual gene activated nanobone putty has been constructed in the previous experiments.

OBJECTIVE: To investigate the effects of osteogenesis and osteogenic gene expression in mice by implanting BMP2/VEGF dual gene activated nanobone putty.

METHODS: Twenty-four Kunming mice (48 sides) were randomly divided into four groups. Animals in each group (12 samples) were injected different materials into the right thigh muscle pouches: nanobone putty+hBMP2/VEGF plasmid; nanobone putty+hBMP2 plasmid; blank plasmid+nanobone putty; nanobone putty only. The effects of osteogenesis were evaluated by radiography, histology and molecular biology analysis in 2, 4 weeks after operation.

RESULTS AND CONCLUSION: Bone-like tissues were observed in groups of nanobone putty+hBMP2/VEGF plasmid and nanobone putty+hBMP2 plasmid after operation. There was apparent BMP2 and VEGF mRNA expression in group of nanobone putty+hBMP2/VEGF plasmid. Group of nanobone putty+hBMP2/VEGF plasmid was significantly better than group of nanobone putty+hBMP2 plasmid in the alkaline phosphatase levels, the speed of osteogenesis and amount of new bone ($P < 0.05$). Groups of blank plasmid+nanobone putty and nanobone putty had no obvious osteogenesis performance. Either BMP2/VEGF dual gene activated nanobone putty or BMP2 gene activated nanobone putty had the osteogenic ability *in vivo*. And the former was significantly enhanced in the speed and quality of osteogenesis.

张一, 男, 1978 年生, 山西省运城市人, 汉族, 2012 年解放军第三军医大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事骨软骨修复重建方面的研究。

通讯作者: 田晓滨, 主任医师, 贵州省人民医院骨科, 贵州省贵阳市 550002

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.03.001
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)03-00329-06

稿件接受: 2013-11-01

Zhang Yi, M.D., Associate chief physician, Department of Orthopedics, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

Corresponding author: Tian Xiao-bin, Chief physician, Department of Orthopedics, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

Accepted: 2013-11-01

Subject headings: biocompatible materials; nanoparticles; genes; bone morphogenetic proteins

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81060145; the Scientific Tackle Key Program of Guizhou Province, No. SY[2010]3057; the Special Assistance Fund of Guizhou Province, No. TZJF-2011-34; the Special Fund for Excellent Young Scientific Talents in Guizhou Province, No. [2011]30; the Fund of Guizhou Provincial Science and Technology Bureau, No. SYC2010J3113

Zhang Y, Sun L, Jian YK, Hu RY, Tian XB, Li B, Han W. In vivo osteogenesis by implanting dual gene activated nanobone putty. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(3):329-334.

0 引言 Introduction

随着骨组织工程和医学材料研究的发展, 具有高度仿生特性的骨支架材料被用于骨缺损修复^[1-6]。纳米骨浆将结构仿生和材料仿生相结合, 其主要成分是纳米结晶羟基磷灰石和磷酸钙, 是一种可注射、可吸收、具有高度生物相容性的骨替代材料。体外研究表明这一材料具有与骨组织相似的化学成分和晶体结构, 易于被宿主骨吸收利用, 可为细胞提供与天然骨相类似的微环境, 有助于骨系细胞的黏附、增殖及功能发挥^[7-8]。作者在前期实验中将纳米骨浆与人骨形态发生蛋白2基因真核表达质粒相复合, 形成一个基因局部释放系统, 即基因活化基质, 称之为骨形态发生蛋白2基因活化纳米骨浆。实验结果表明其“原位生物反应器”的作用能够有效地修复较小的骨缺损, 但临床工作中6 cm以上的大段骨缺损并不少见, 要求骨替代材料具备更强的成骨效能和更佳的成骨质量。因此, 在原有实验基础上构建了骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子双基因活化纳米骨浆缓释系统, 对其体内成骨性能进行了初步评价。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 体内成骨对照动物实验。

时间及地点: 于2011年6月至2012年6月在华中科技大学同济医学院实验动物中心及贵州省人民医院中心实验室完成。

材料:

双基因活化纳米骨浆体内成骨实验的试剂与仪器:

试剂与仪器	来源
HiPure Plasmid DNA Purification Kits 去内毒素大提试剂盒	Invitrogen 公司
Trizol 试剂、PCR 引物	上海生工生物工程技术服务有限公司
反转录试剂盒	Fermentas 公司
兔抗人 BMP2 抗体、兔抗人 VEGF ₁₆₅ 抗体	武汉博士德公司
丙烯酰胺、N, N'-亚甲基双丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)	Gibco 公司
硝酸纤维素膜	Sigma 公司
碱性磷酸酶测试盒	南京建成生物工程研究所
Image-Pro® Plus 6.0 图像分析软件	美国 Media Cybernetics 公司
SPSS12.0 软件	SPSS Inc., Chicago, IL, USA

实验动物: 4周龄SPF级昆明种小鼠24只, 体质量(20±2) g, 雌雄不拘, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供, 许可证号: SYXK(鄂)2005-0033。

纳米骨浆: 购自Cem Ostetic™, Berkeley Advanced Biomaterials公司, 是一种磷酸钙和纳米级羟基磷灰石晶粒(20-550 nm)的混合物, 与一定比例的水混和后呈浆状, 可通过注射器植入体内, 5 min左右固化。该材料pH值呈中性, 具有高度生物相容性, 动物实验表明植入材料在体内可被完全吸收^[7]。

piRES-hBMP2/VEGF₁₆₅及piRES-hBMP2真核表达载体: 为华中科技大学同济医学院分子生物中心实验室构建^[9], 质粒的大量制备采用HiPure Plasmid DNA Purification Kits去内毒素大提试剂盒, 提取的质粒经紫外分光光度计定量后, 无菌蒸馏水稀释后按一定浓度保存于-70 °C, 注射前将灭菌纳米骨浆粉末与含有质粒的无菌蒸馏水按一定比例的体积比混和, 使纳米骨浆中含piRES-hBMP2/VEGF₁₆₅质粒、piRES-hBMP2质粒和piRES空质粒的浓度相等。

实验方法:

动物分组与纳米骨浆注入: 取昆明小鼠腹腔注射氯胺酮麻醉后, 俯卧位固定, 双侧股部去毛, 碘伏消毒。随机选取12只小鼠右侧大腿后群肌袋内注入0.3 mL骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子+纳米骨浆(双基因活化组), 6只左侧大腿后群肌袋内注入0.3 mL空白质粒+纳米骨浆(空白质粒组), 6只注入0.3 mL纳米骨浆(纳米骨浆组); 剩余12只小鼠右侧大腿后群肌袋内注入0.3 mL骨形态发生蛋白2+纳米骨浆(单基因活化组), 左侧大腿后群肌袋内6只注入0.3 mL空白质粒+纳米骨浆, 6只注入0.3 mL纳米骨浆。然后分笼饲养。纳米骨浆注入后2, 4周各处死6只小鼠取材。

大体观察: 纳米骨浆注入后进食情况, 肢体活动和注射局部的表现。

影像学检查: 纳米骨浆注入后2, 4周, 在38 kV、100 mA、0.12 s、60 cm投射条件下摄片, 观察局部成骨情况。使用Image-Pro® Plus 6.0图像分析软件对术后4周各组X射线片进行图像分析, 测量后肢具有明显边界的高密度区面积, 对比观察小鼠大腿后群肌袋内新生骨形成情况。

RT-PCR检测骨形态发生蛋白2及血管内皮生长因子165 mRNA的表达: 取标本组织加适量Trizol制成匀浆后,

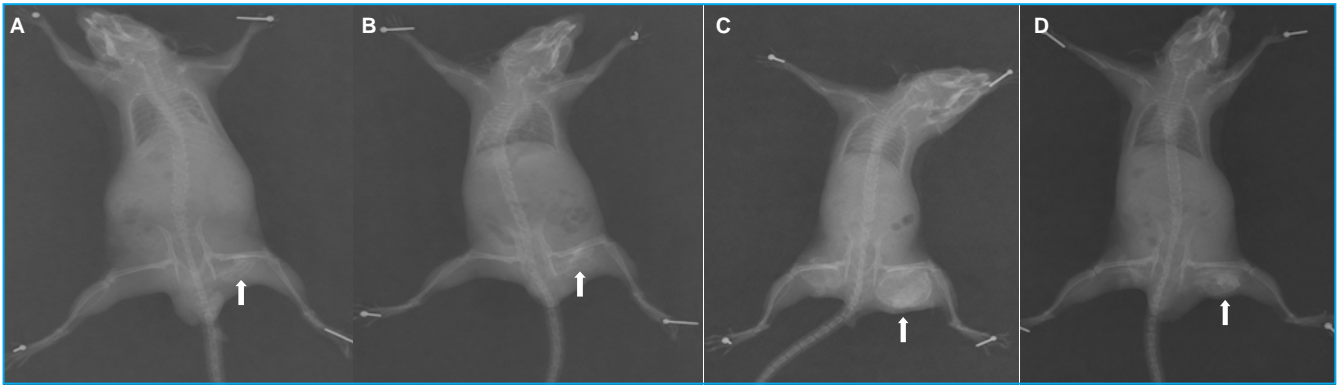


图1 将不同材料植入小鼠大腿后群肌袋内2, 4周的X射线片

Figure 1 X-ray films at 2 and 4 weeks after implantation of different materials into the thigh muscle pouches

图注:

(1) 图中A为右侧植入骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子+纳米骨浆2周, 左侧植入空白质粒+纳米骨浆2周。

B为右侧植入骨形态发生蛋白2+纳米骨浆2周, 左侧植入纳米骨浆2周。

C为右侧植入骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子+纳米骨浆4周, 左侧植入空白质粒+纳米骨浆4周。

D为右侧植入骨形态发生蛋白2+纳米骨浆4周, 左侧植入纳米骨浆4周。

(2) 右侧骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子+纳米骨浆组、骨形态发生蛋白2+纳米骨浆组植入2周可见类圆形高密度影, 见箭头示; 左侧两组可见稀疏的高密度影。右侧骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子+纳米骨浆组、骨形态发生蛋白2+纳米骨浆组植入4周高密度影较植入2周时进一步增大、增强, 见箭头示; 左侧两组高密度影弥散、无明显边界。

按说明书提取组织总RNA, 紫外分光光度计定量后取2 μg RNA反转录合成cDNA, 然后再以此cDNA为模板行PCR扩增骨形态发生蛋白2及血管内皮生长因子165基因, 同时以 β -actin基因作为内参照。引物根据基因库中的序列设计(具体基因序列参照NCBI主页<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。扩增产物经质量分数1.5%琼脂糖电泳, SensiAnsys凝胶图像分析系统扫描。

组织学观察: 术后2, 4周各组标本用体积分数10%中性甲醛固定后, 10%乙二胺四乙酸脱钙, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 常规石蜡包埋, 5 μm 切片, 行苏木精-伊红染色和固绿-蕃红O染色, 光镜下观察。

碱性磷酸酶定量检测: 取约0.5 g标本组织, 加入1 mL去离子水研磨成匀浆, 吸入离心管中, 用1 mL去离子水洗匀浆2次, 均吸入同一离心管, 4 000 r/min离心10 min, 离心半径8 cm。取上清液检测碱性磷酸酶活性(U/mg)。

主要观察指标: 纳米骨浆注入后2, 4周各组影像学检查、组织学观察和分子生物学检测结果。

统计学分析: 统计学处理由第一、二作者完成。采用SPSS 12.0软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间差异行方差分析, 得出差异有统计学意义后再行两两比较 t 检验, 各组术后不同时间点的比较采用配对 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 大体观察 纳米骨浆注入后第2天, 动物进食即恢复正常, 后肢不能负重, 跛行; 纳米骨浆注入后第3天恢复正常活动; 术后1周右侧(实验侧)股后部隆起并逐渐增大; 2周时可触及类圆形包块, 质韧; 4周时包块有不同程度增大, 质硬。左侧(对照侧)注射部位术后无明显变化。纳米骨浆

注入后所有实验动物均存活, 注射处均无红肿、破溃等表现。

2.2 各组影像学检测结果

纳米骨浆注入后2周: 实验侧(右侧)有大小不等的类圆形高密度影, IPP 6.0图像分析软件测量高密度区面积, 双基因活化组稍大于单基因活化组, 但差异无显著性意义($P > 0.05$); 对照侧(左侧)可见稀疏的高密度影(表1, 图1A, B)。

纳米骨浆注入后4周: 实验侧的高密度影进一步增大、增强, 且双基因活化组的变化更加明显, 其高密度区面积明显大于单基因活化组($P < 0.05$); 对照侧的高密度影弥散、无明显边界, 提示骨浆被组织吸收, 局部无成骨反应(图1C, D)。

表1 骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子+纳米骨浆或骨形态发生蛋白2+纳米骨浆植入小鼠大腿后群肌袋内后2, 4周的成骨高密度区面积测量结果

Table 1 The measurements of high-density osteogenesis area at 2 and 4 weeks after implantation ($\bar{x}\pm s, n=6, \text{mm}^2$)

组别	2周	4周	P
骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子+纳米骨浆组	13.445 \pm 0.648	212.128 \pm 7.003	< 0.05
骨形态发生蛋白2+纳米骨浆组	11.887 \pm 0.405	73.812 \pm 2.415	< 0.05
P	> 0.05	< 0.05	

表注: 纳米骨浆经骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子质粒或骨形态发生蛋白2质粒活化后, 在体内具有了一定的成骨能力, 且前者在成骨速度和质量方面较后者明显增强。

2.3 RT-PCR检测各组骨形态发生蛋白2及血管内皮生长因子165 mRNA的表达 RT-PCR结果显示, 经骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子双基因活化的纳米骨浆注射后2

周, 小鼠标本组织扩增出1 200 bp和592 bp两条带, 表明pIRES-hBMP2/VEGF₁₆₅质粒被动转染小鼠局部组织细胞成功, 并有骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子 mRNA的表达(图2)。

2.4 各组组织学观察结果 见图3。

纳米骨浆注入后2周实验侧可见大量软骨样组织和散在分布的骨样组织, 软骨细胞呈现不同发育阶段的表现, 部分形成软骨陷窝(图3A1, A2, A4, A5); 术后4周, 实验侧可见大量骨样组织, 其中双基因活化组的成骨反应更加明显, 较之单基因活化组有更成熟的骨小梁结构(图3B1, B2, B4, B5)。对照侧可见骨浆周围大量纤维结缔组织增生, 随着骨浆的吸收纤维组织逐渐增多, 局部无成骨反应(图3A3, A6, B3, B6)。

2.5 各组碱性磷酸酶检测结果 纳米骨浆注入后2, 4周实验侧组织碱性磷酸酶含量均明显高于对照侧组织($P < 0.05$)。2周时双基因活化组碱性磷酸酶含量略高于单基因活化组, 但差异无显著性意义; 4周时双基因活化组碱性磷

酸酶含量明显高于单基因活化组($P < 0.05$)。组内术后2, 4周间进行比较, 双基因活化组明显增高($P < 0.05$), 而单基因活化组无明显变化($P > 0.05$); 对照侧碱性磷酸酶含量亦无显著变化($P > 0.05$, 表2)。

3 讨论 Discussion

骨缺损是临床常见的病症, 感染、肿瘤、创伤、骨髓炎手术清创^[10], 以及各种先天性疾病都会导致骨缺损的发生。自体骨是传统的也是目前最有效的骨移植材料, 与其他骨移植材料相比, 自体骨具有生物相容性好、成骨能力强、骨诱导活性高等优点, 是目前临床最常用的治疗骨缺损的材料。但自体骨也存在一定的缺点^[11]: 额外增加手术创伤和手术时间, 可供骨源有限, 移植骨的形态、大小等方面不易满足要求, 取骨区常出现感染、疼痛等并发症。此外, 临床上有一些患者无法取到足够的自体骨, 如骨代谢疾病、骨肿瘤患者。因此, 选择合适的骨替代物成为必然。随着材料学、分子生物学等学科的发展, 通过骨组织工程学的办法

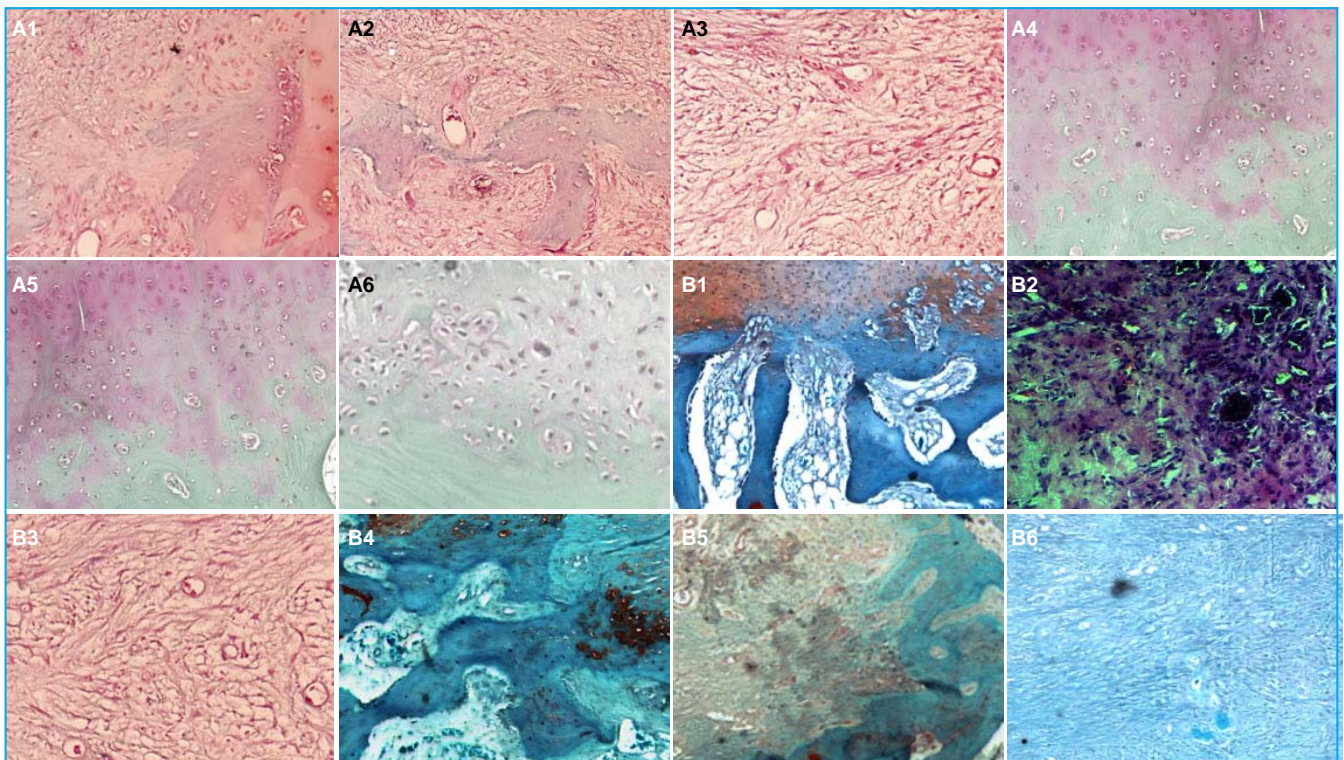


图3 将不同材料植入小鼠大腿后群肌袋内2周和4周的组织学观察结果($\times 100$)

Figure 3 Histological observation 2 weeks and 4 weeks after implantation of different materials into the thigh muscle pouches ($\times 100$)

图注:

(1) 图中A1为骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子+纳米骨浆组2周苏木精-伊红染色; A2为骨形态发生蛋白2+纳米骨浆组2周苏木精-伊红染色; A3为空白质粒+纳米骨浆或纳米骨浆组2周苏木精-伊红染色; A4为骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子+纳米骨浆组2周固绿-蕃红O染色; A5为骨形态发生蛋白2+纳米骨浆组2周固绿-蕃红O染色; A6为空白质粒+纳米骨浆或纳米骨浆组2周固绿-蕃红O染色; B1为骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子+纳米骨浆组4周苏木精-伊红染色; B2为骨形态发生蛋白2+纳米骨浆组4周苏木精-伊红染色; B3为空白质粒+纳米骨浆或纳米骨浆组4周苏木精-伊红染色; B4为骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子+纳米骨浆组4周固绿-蕃红O染色; B5为骨形态发生蛋白2+纳米骨浆组4周固绿-蕃红O染色; B6为空白质粒+纳米骨浆或纳米骨浆组4周固绿-蕃红O染色。

(2) 右侧植入骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子+纳米骨浆或骨形态发生蛋白2+纳米骨浆, 左侧植入空白质粒+纳米骨浆或纳米骨浆。植入2周时, 右侧可见大量软骨样组织和散在分布的骨样组织; 左侧可见大量纤维组织。植入4周时, 右侧可见大量骨样组织, 其中骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子+纳米骨浆组的成骨反应更加明显, 较之骨形态发生蛋白2+纳米骨浆组有更成熟的骨小梁结构; 左侧可见大量纤维结缔组织增生, 局部无成骨反应。

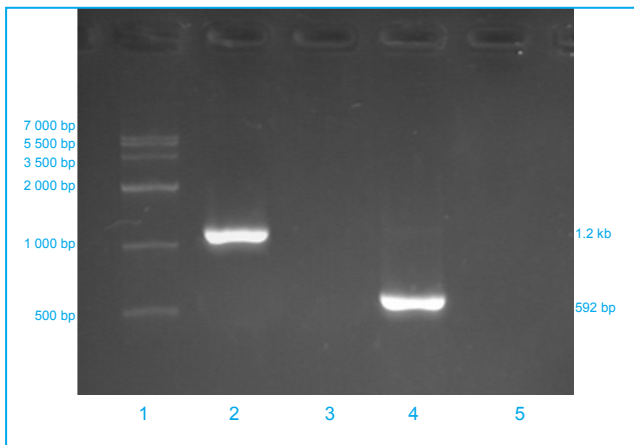


图2 RT-PCR 检测骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子+纳米骨浆或空白质粒+纳米骨浆植入小鼠大腿后群肌袋内2周的骨形态发生蛋白2和血管内皮生长因子165的表达

Figure 2 The RT-PCR test of the bone morphogenetic protein 2 (BMP2) and vascular endothelial growth factor 165 (VEGF₁₆₅) expression in mice 2 weeks after implantation of nanobone putty+hBMP2/VEGF plasmid or blank plasmid+nano bone putty

图注:
(1) 图中1为Marker; 2为骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子+纳米骨浆组骨形态发生蛋白2表达; 3为空白质粒+纳米骨浆组骨形态发生蛋白2表达; 4为骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子+纳米骨浆组血管内皮生长因子165的表达; 5为空白质粒+纳米骨浆组血管内皮生长因子165表达。

(2) pIRES-hBMP2/VEGF₁₆₅质粒被动转染小鼠局部组织细胞成功,并有骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子 mRNA 的表达。

表2 将不同材料植入小鼠大腿后群肌袋2, 4周后的碱性磷酸酶检测结果

Table 2 The alkaline phosphatase test of all groups at 2 and 4 week after implantation ($\bar{x} \pm s, n=6, U/mg$)

组别	2周	4周
骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子+纳米骨浆组	0.847±0.020 ^{bc}	1.436±0.058 ^{abc}
骨形态发生蛋白2+纳米骨浆组	0.808±0.019	0.824±0.023
空白质粒+纳米骨浆组	0.224±0.018	0.247±0.019
纳米骨浆组	0.237±0.025	0.214±0.019
F	1 648.786	1 741.190
P	< 0.05	< 0.05

表注: pIRES-BMP2/VEGF₁₆₅双基因表达质粒与纳米骨浆复合后具有明显的异位诱导成骨作用。与骨形态发生蛋白2+纳米骨浆组比较, ^aP<0.05; 与空白质粒+纳米骨浆组比较, ^bP<0.05; 与纳米骨浆组比较, ^cP<0.05。

构建具有骨修复作用的人工植骨材料是目前研究的热点^[12-16]。支架材料是骨组织工程的重要组成部分,研究表明,具有高度仿生特性的纳米骨浆可提供适宜的微环境促进胶原和矿物的沉积以及成骨细胞的黏附,其有助于细胞和材料间的相互作用,从而诱导成骨细胞向骨细胞分化,即所谓的“键合型骨发生”^[17]。该纳米生物材料已通过美国FDA批准,成为第一批供临床使用的纳米人工骨产品。但单纯纳米骨浆在骨缺损修复过程中缺乏有效的骨诱导能力。为此,在先前

的研究中将纳米骨浆与含有成骨基因骨形态发生蛋白2的真核表达质粒相复合,形成骨形态发生蛋白2基因活化纳米骨浆。在材料植入体内后,内源细胞长入基质材料接触并吞噬编码骨形态发生蛋白2的质粒,在此质粒的真核表达系统作用下合成所编码的细胞因子-骨形态发生蛋白2,在植入局部产生相应的生物学效应,成为原位生物反应器。实验发现质粒与细胞结合后,目的基因的表达时间可持续2-6周,符合组织修复在一定时期内对细胞因子的需要,同时避免了目的基因过久和过强表达带来的不良影响,而且自体细胞合成并修饰的细胞因子具有更多可识别的配体,能更有效地同细胞表面受体结合,比使用外源性细胞因子具有更好的生物学效应^[18]。与传统的体外主动转染种子细胞转入目的基因方式不同,实验采用体内被动方式转染基因,其操作简单,能节省费用和减少对患者的额外损伤,在促进局部组织损伤修复方面有明显的优势。实验表明,与单纯纳米骨浆比较,骨形态发生蛋白2基因活化纳米骨浆具有一定的骨诱导能力^[19]。

骨修复是一个复杂的受多种细胞因子调控的过程,尤其对大段骨缺损的修复而言,要求成骨的能力更强、质量更好,血管形成是其中非常重要的环节。因此,单一的细胞因子并不符合骨修复的生理过程。研究证实,血管内皮生长因子对软骨内成骨及骨折愈合过程中的血管增生发挥重要作用。Deckers等^[20]发现在骨缺损修复和骨折愈合过程中,血管内皮生长因子和骨形态发生蛋白2的表达是一对偶联过程,二者相互促进,起到级联放大效应。骨形态发生蛋白2可以使成骨细胞高表达血管内皮生长因子,从而促进骨缺损局部的血管生成;同样血管内皮生长因子也可以促进成骨细胞的分化。Bouletreau等^[21]也证实血管内皮生长因子可上调成骨细胞骨形态发生蛋白2的表达,加速骨愈合。实验中构建了pIRES-BMP2/VEGF₁₆₅双基因表达载体,其含有内部核糖体结合位点(internal ribosome entry sites, IRES)序列,具有内核糖体进入位点的功能,可通过IRES连接在一起的骨形态发生蛋白2和血管内皮生长因子165基因同时转录成一条单链mRNA,再各自独立的进行翻译和表达,保证了IRES上下游基因共同的高表达。实验显示,术后2周右侧两组小鼠大腿肌袋内即有团块状骨样组织生成,且体积相当,而左侧两组无类似组织;术后4周右侧两组的骨样组织均有不同程度地增大,左侧两组仍无实质性的新生物,且双基因活化组新生组织较单基因活化组体积更大、质地更硬、密度更高。说明单一的骨形态发生蛋白2在动物体内难以长时间地高表达,从而不能持续地支持骨的形成;而同时将血管内皮生长因子基因引入后,由于二者的偶联、协同作用,成骨反应显著增强,特别是其“后发优势”非常明显,能够在较长的时间内促进骨的形成及成熟。

实验结果表明, pIRES-BMP2/VEGF₁₆₅双基因表达质粒能在体内同时表达两种细胞因子,与纳米骨浆复合后具

有明显的异位诱导成骨作用, 其成骨作用较骨形态发生蛋白2单基因活化纳米骨浆强而持久; 组织学检查也表明双基因活化系统在术后4周可产生更多、更成熟的骨小梁结构, 为下一步应用骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子双基因活化纳米骨浆修复动物大段骨缺损奠定了实验基础。

致谢: 感谢华中科技大学同济医学院实验动物中心及贵州省人民医院中心实验室老师们的大力支持和帮助。

作者贡献: 第一、二作者进行实验设计, 实验实施为第一、二、三、四作者, 实验评估和资料收集为第一、二、三、四、五、七作者, 第一、二作者成文, 第五、六作者审核, 第五作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 纳米骨浆-将结构仿生和材料仿生相结合, 其主要成分是纳米结晶羟基磷灰石和磷酸钙, 是一种可注射、可吸收、具有高度生物相容性的骨替代材料。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 陈红卫,赵钢生,叶键.自固化磷酸钙人工骨修复不同病因骨缺损94例[J].中国组织工程研究与临床康复, 2008,12(19): 3779-3781.
- [2] Semino CE. Self-assembling peptides: from bio-inspired materials to bone regeneration. *J Dent Res*. 2008;87(7): 606-616.
- [3] Garreta E, Gasset D, Semino C, et al. Fabrication of a three-dimensional nanostructured biomaterial for tissue engineering of bone. *Biomol Eng*. 2007;24(1):75-80.
- [4] Reves BT, Bumgardner JD, Haggard WO. Fabrication of crosslinked carboxymethylchitosan microspheres and their incorporation into composite scaffolds for enhanced bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013; 101(4):630-639.
- [5] Li B, Yoshii T, Hafeman AE, et al. The effects of rhBMP-2 released from biodegradable polyurethane/microsphere composite scaffolds on new bone formation in rat femora. *Biomaterials*. 2009;30:6768-6779.
- [6] Zou D, Guo L, Lu J, et al. Engineering of bone using porous calcium phosphate cement and bone marrow stromal cells for maxillary sinus augmentation with simultaneous implant placement in goats. *Tissue Eng Part A*. 2012;18:1464-1478.
- [7] 罗萍,张阳德,彭健,等.具有自塑能力可吸收注射型纳米骨浆[J].中国现代医学杂志, 2003,13(18):1-6.
- [8] 王明海,董有海,洪洋,等.纳米组织工程骨对骨缺损修复区骨密度及生物力学的影响[J].中国临床医学杂志,2007,14(5):678-680.
- [9] 田晓滨,孙立,杨述华.克隆并构建人骨形成发生蛋白2真核表达载体[J].中国修复重建外科杂志,2006,20(2):112-115.
- [10] Parsons B, Strauss E. Surgical management of chronic osteomyelitis. *Am J Surg*. 2004;188:57-64.
- [11] Sasso RC, Williams JI, Dimasi N, et al. Postoperative drains at the donor site Of iliac-crest bone graft. *J Bone and Joint Surg [Am]*. 1998;80(5):631-635.
- [12] Kohara H, Tabata Y. Enhancement of ectopic osteoid formation following the dual release of bone morphogenetic protein 2 and Wnt1 inducible signaling pathway protein 1 from gelatin sponges. *Biomaterials*. 2011;32(24):5726.
- [13] Keibl C, Füll A, Zanoni G, et al. Human adipose derived stem cells reduce callus volume upon BMP-2 administration in bone regeneration. *Injury*. 2011; 42(8):814.
- [14] Sawyer AA, Song SJ, Susanto E, et al. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials*. 2009; 30: 2479-2488.
- [15] Zhao J, Shen G, Liu C, et al. Enhanced healing of rat calvarial defects with sulfated chitosan-coated calcium-deficient hydroxyapatite/bone morphogenetic protein 2 scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2012;18:185-197.
- [16] Crouzier T, Sailhan F, Becquart P, et al. The performance of BMP-2 loaded TCP/HAP porous ceramics with a polyelectrolyte multilayer film coating. *Biomaterials*. 2011; 32:7543-7554.
- [17] Grauer JN, Beiner JM, Kwon BK, et al. Bone graft alternatives for spinal fusion. *BioDrugs*. 2003;17:391-394.
- [18] Bonadio J. Tissue engineering via local gene delivery: update and future prospects for enhancing the technology. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;44:185-194.
- [19] 田晓滨,孙立,杨述华,等.基因活化纳米骨浆异位诱导成骨能力的实验观察[J].中华骨科杂志,2007,27(8):604-608.
- [20] 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.
- [21] Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, et al. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg*. 2002;109(7):2384-2397.