

磷酸三钙填充骨缺损后骨形态发生蛋白2和血管内皮生长因子的变化

徐俊, 殷潇凡, 谷辉杰, 秦强(上海市闵行区中心医院骨科, 上海市 201199)

文章亮点:

1 治疗骨缺损及骨不连常用的方法是植骨, 目前使用最广泛的是磷酸三钙人工骨植骨, 然而对于磷酸三钙的植骨效果仍有争议, 有学者认为磷酸三钙具有骨诱导性, 而另有学者认为磷酸三钙仅有传导性而无诱导活性, 也有学者认为磷酸三钙与细胞复合物修复骨缺损效果较好。因此, 对于磷酸三钙治疗骨缺损的机制尚无详细报道。

2 实验通过制作小鼠股骨中段骨缺损模型, 并填充磷酸三钙进行修复, 分不同时间段观察骨形态发生蛋白2和血管内皮生长因子的浓度及骨愈合情况, 发现磷酸三钙植骨治疗可通过上调骨形态发生蛋白2和血管内皮生长因子的表达, 促进骨愈合。

关键词:

生物材料; 骨生物材料; 磷酸三钙; 骨缺损; 骨形态发生蛋白2; 血管内皮生长因子

主题词:

磷酸钙类; 骨形态发生蛋白类; 血管内皮生长因子类

基金资助:

上海市闵行区科委, 闵行区自然科学研究课题(2013MHZ002)

摘要

背景: 目前治疗骨缺损以植骨为主, 其中磷酸三钙是目前广泛使用的人工骨材料, 但对于磷酸三钙的植骨效果仍有争议, 其治疗骨缺损的机制尚无详细报道。

目的: 观察磷酸三钙植骨填充于骨缺损区后, 局部骨形态发生蛋白2和血管内皮生长因子的浓度变化及骨愈合情况。

方法: 取 C57 小鼠 48 只, 随机均分为实验组与对照组, 切除右侧股骨干中部 2 mm 长的骨干和骨膜制作单侧股骨缺损模型, 实验组于骨缺损处植入磷酸三钙, 对照组不植入任何物质。术后 1-4 周拍摄 X 射线片观察骨愈合情况, 随后处死动物, 植骨区取材, 通过 Elisa 法测定样本中骨形态发生蛋白2、血管内皮生长因子的水平。

结果与结论: X 射线显示, 实验组术后 2 周时骨折大部分愈合, 小部分骨皮质未完全愈合, 3 周时骨折基本愈合, 仍有少量磷酸三钙残留, 4 周时骨折完全愈合, 周围骨痂生长明显, 磷酸三钙基本吸收; 对照组术后一二周时仍可见骨折线, 第 3 周时可见骨折线模糊, 第 4 周时骨折部分愈合, 部分骨皮质未愈合。实验组不同时间点骨形态发生蛋白2、血管内皮生长因子水平均高于对照组($P < 0.05$)。结果表明磷酸三钙植骨治疗可通过上调骨形态发生蛋白2和血管内皮生长因子的表达, 促进骨愈合。

徐俊, 殷潇凡, 谷辉杰, 秦强. 磷酸三钙填充骨缺损后骨形态发生蛋白2和血管内皮生长因子的变化[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(43):6959-6965.

Variation of bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor after bone defect filled with tricalcium phosphate

Xu Jun, Yin Xiao-fan, Gu Hui-jie, Qin Qiang (Department of Orthopedics, Shanghai Minhang District Central Hospital, Shanghai 201199, China)

Abstract

BACKGROUND: Currently, bone graft is mainly used for repair of bone defects, and tricalcium phosphate is the most used artificial bone material. But the effectiveness of the tricalcium phosphate bone graft is still controversial, and there is also no detailed report about its function during the healing of bone defect.

OBJECTIVE: To observe the concentration changes of bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor as well as bone healing after tricalcium phosphate graft in bone defects.

METHODS: Forty-eight C57 mice were randomly divided to experimental group and control group. A 2-mm-long diaphyseal segment and periosteum from the middle of the right femur was cut to prepare unilateral bone defect models. Tricalcium phosphate bone graft was used in the experimental group, and no bone graft in the control group. During the following 4 weeks, X-ray examination was done once a week to observe the bone healing, and then the animals were executed for collecting samples in the graft area. The concentrations of bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor in samples which were taken from the bone graft area were determined by using ELISA assay.

RESULTS AND CONCLUSION: X-ray films showed that 2 weeks later, bone fracture healed mostly in the

徐俊, 男, 1981年生, 江苏省江阴市人, 汉族, 2006年上海交通大学医学院毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事创伤骨科及组织修复研究。

通讯作者: 殷潇凡, 主任医师, 上海市闵行区中心医院骨科, 上海市 201199

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.43.012

[http://www.crter.org]

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2014)43-06959-07

稿件接受: 2014-09-13

Xu Jun, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, Shanghai Minhang District Central Hospital, Shanghai 201199, China

Corresponding author: Yin Xiao-fan, Chief physician, Department of Orthopedics, Shanghai Minhang District Central Hospital, Shanghai 201199, China

Accepted: 2014-09-13

experimental group except a small part of cortical bone; 3 weeks later, bone fracture was basically healed, and only a small amount of tricalcium phosphate remained; 4 weeks later, bone fracture was completely healed, and the callus grew obviously, and the tricalcium phosphate was nearly absorbed. In the control group, the fracture line was still visible at 1–2 weeks, but it became vague at 3 weeks; then, the fracture was healed at 4 weeks except some of the cortical bone. The levels of bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor were significantly higher in the experimental group than in the control group at different time points ($P < 0.05$). These results suggest that tricalcium phosphate bone graft can up-regulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor and accelerate bone healing.

Subject headings: calcium phosphates; bone morphogenetic proteins; vascular endothelial growth factors

Funding: the Natural Science Research Project of Minhang District of Shanghai, No. 2013MHZ002

Xu J, Yin XF, Gu HJ, Qin Q. Variation of bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor after bone defect filled with tricalcium phosphate. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(43):6959-6965.

0 引言 Introduction

骨缺损是临床骨科中较难处理的疾病之一^[1], 目前治疗方法以植骨为首选, 其中磷酸三钙是目前广泛使用的人工骨材料^[2-4]。但对于磷酸三钙的植骨效果仍有争议, 其治疗骨缺损的机制尚无详细报道。目前多数学者认为骨愈合的条件包括骨折区域活性的重建和成骨活性物质的植入, 主要有3方面的要求: 固定充分可靠, 诱导成骨的因素, 骨折端良好的血运^[5]。近年来随着内固定技术的发展, 内固定材料已趋于完善, 各种解剖型钢板及髓内钉也应运而生, 然而对于骨折及骨缺损修复却仍存在一定的不愈合概率。因此目前促进骨愈合的关键在于增强诱导成骨的因素和提供良好的血供。

本课题组通过前期实验观察发现, 磷酸三钙植入胫骨平台、胫骨远端等松质骨缺损区, 能促进骨形成及愈合。组织学检查发现骨折后局部骨小梁紊乱、破损, 磷酸三钙植骨愈合后骨小梁结构整齐, 骨基质完整, 可见大量骨细胞及新生血管。而磷酸三钙如何促使骨细胞增生和血管形成却无法检测, 仅推测磷酸三钙具有骨传导性和生物相容性^[6]。那么磷酸三钙促进骨愈合仅仅是其支架结构的作用, 还是其他性能所致? 在临床工作中, 常常发现有些骨折即使对位良好、无骨缺损, 仍然导致不愈合、骨不连, 这也说明保持骨结构的连续不是骨愈合的首要条件。

骨生长愈合是一个非常复杂的过程, 受多种全身及局部生长因子调控, 其生长因子包括成纤维细胞生长因子、血小板衍生生长因子、转化生长因子 β 、骨形态发生蛋白、白细胞介素1、前列腺素、血管内皮生长因子等。其中以血管内皮生长因子、骨形态发生蛋白最为重要。钱剑等^[7]研究表明, 体内的微量元素可对生长因子的表达产生影响, 并可定量检测。那么是否可通过检测植骨后不同时期磷酸三钙材料内生长因子的表达情况, 分析其是否具有对生长因子的调控作用, 是延迟还是提早, 是表达增强还是减弱, 更进一步分析有无诱导作用。通过磷酸三钙植骨后微环境的改变来分析其植骨的效果, 有利于解开其促进骨生长、骨愈合的机制, 并且发现其不足之处。

本实验通过制作小鼠股骨中段骨缺损模型, 并填充磷酸三钙进行修复, 分不同时间段观察生长因子的浓度, 分

析磷酸三钙对骨缺损修复过程的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机分组对照动物实验。

时间及地点: 于2014年1至6月在上海市第十人民医院动物实验室完成。

材料:

实验动物: 8周龄雄性健康C57小鼠48只, 体质量20–25 g, 由上海市第十人民医院动物实验中心提供, 由中心实验室动物房饲养, 光照昼夜交替, 房间温度20–26 °C, 湿度低于80%。将C57小鼠随机分为实验组与对照组, 每组24只。

磷酸三钙填充骨缺损后生长因子变化实验的材料与试剂:

材料与试剂	来源
戊巴比妥钠、肌注青霉素	上海市第十人民医院动物实验室
磷酸三钙	上海辰翔贸易商行
elisa 试剂盒	上海迪奥生物科技有限公司

实验方法:

动物骨缺损模型制作: 采用单侧股骨缺损模型(右下肢), 用0.5%戊巴比妥钠按照15 mg/kg剂量腹腔注射麻醉实验小鼠, 常规术区备皮、碘伏消毒, 采取俯卧位, 将小鼠固定在操作台上, 右侧肢体屈膝90°, 于右侧膝关节上偏外侧做一长约1.5 cm的纵行切口, 切开皮肤、皮下组织, 显露肌肉白线, 沿着白线从股直肌和半腱肌肌间隙钝性分离进入, 充分显露股骨中段(包括大转子), 注意尽量不要剥离大转子上附着的肌肉群。在股骨干中部切除2 mm长度的骨干和骨膜, 应用1.2 mm克氏针自制的髓内钉固定骨折, 实验组按计划于骨缺损处植入磷酸三钙, 将磷酸三钙制作成长2 mm、宽1 mm左右的颗粒状, 围绕克氏针于骨缺损处的后内、后外及前侧各放置1块, 共计3块颗粒状人工骨; 对照组不植骨, 利用附近的筋膜等软组织封闭结合部可能存在的缝隙。术毕生理盐水冲洗伤口后缝合肌膜和皮肤, 术后连续3 d碘伏消毒切口, 肌注青霉素 20×10^4 U, 1次/d。小鼠苏醒后同一条件单独置于笼中饲养, 室温维持

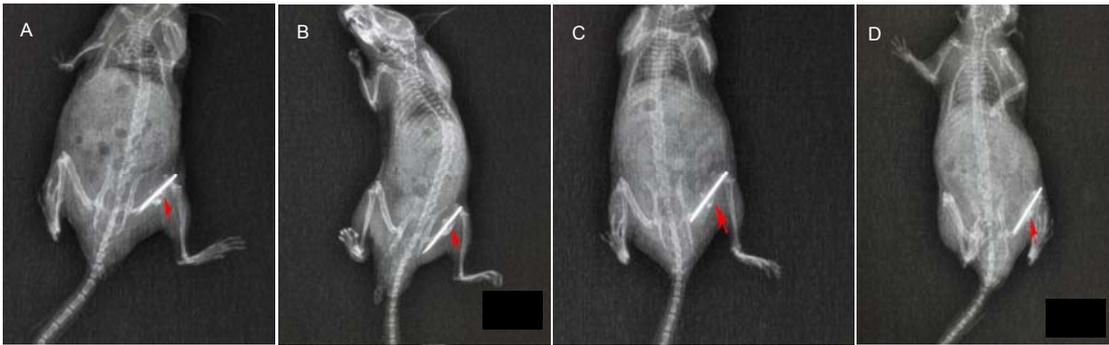


图1 X射线观察实验组术后不同时间点骨愈合情况

Figure 1 X-ray observation of bone healing in the experimental group at different time points after operation

图注: 图中A-D分别为磷酸三钙植入后1, 2, 3, 4周时的X射线照片。第1周时, 断端骨折线已开始模糊; 第2周时骨折大部分愈合, 小部分骨皮质未完全愈合(箭头所指处); 第3周时骨折基本愈合, 仍有少量磷酸三钙残留; 第4周时骨折完全愈合, 周围骨痂生长明显, 磷酸三钙基本吸收。

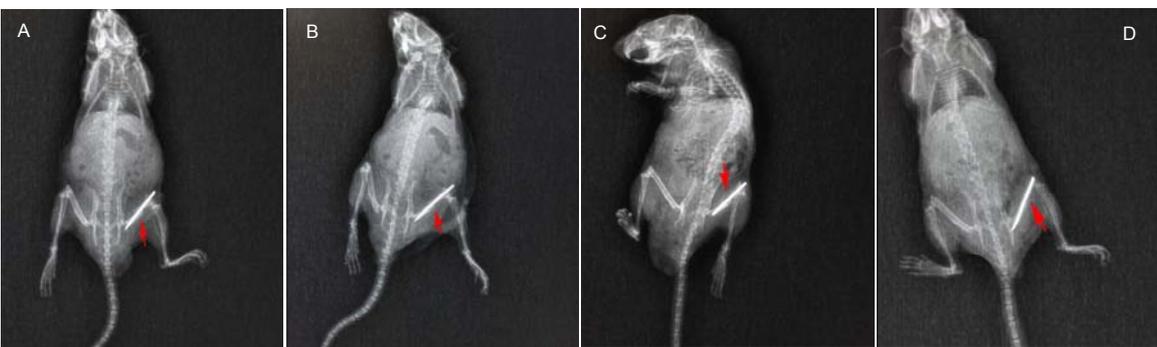


图2 X射线观察对照组术后不同时间点骨愈合情况

Figure 2 X-ray observation of bone healing in the control group at different time points after operation

图注: 图中A-D分别为术后1, 2, 3, 4周时的X射线照片。第1周及第2周时仍可见骨折线, 骨折端无模糊影; 第3周时可见骨折线模糊; 第4周时骨折部分愈合, 部分骨皮质未愈合(箭头所指处)。



图3 实验组术后不同时间点骨缺损处大体观察

Figure 3 Gross observation of bone defects in the experimental group at different time points after operation

图注: 图中A-D分别为磷酸三钙植入后1, 2, 3, 4周时取材的大体照片。第1周骨折断端已有连接, 取出内固定后, 断端无分离; 第2周时骨折端已基本连接; 第3周骨折端愈合良好, 取出内固定后仍有一定的负荷能力; 第4周时骨愈合良好, 骨折端明显增粗, 骨化明显, 抗负荷能力良好。

在(25±2) °C, 右侧下肢呈保护性制动, 自制小夹板外固定, 可进行自由活动以及进食和饮水。

主要观察指标: 分别于术后1, 2, 3, 4周进行相关检测, 每次检测实验组小鼠及对照组小鼠各6只。①X射线摄片检查: 观察骨愈合情况。②骨形态发生蛋白2及血管内皮生长因子浓度: 摄片后处死实验动物, 按原切口暴露股骨干, 以缺损区域中心点向远近端各5 mm处截断股骨, 取出克氏针, 将样本平均分为2份, 应用elisa试剂盒检测生长因子浓度。

统计学分析: 采用方差分析与t检验, 运用统计学软件SPSS 20.0进行统计学分析。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 48只小鼠均进入结果分析。

2.2 实验动物骨缺损愈合结果 通过X射线显示, 实验组小鼠第1周时, 断端骨折线已开始模糊; 第2周时骨折大部分愈合, 小部分骨皮质未完全愈合(箭头所指处); 第3周时骨折基本愈合, 仍有少量磷酸三钙残留; 第4周时骨折完全

表1 实验与对照组骨愈合过程中不同时间点骨形态发生蛋白2及血管内皮生长因子的质量浓度

Table 1 Concentration of bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor at different time points in the process of bone healing in the experimental and control groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	骨形态发生蛋白2($\mu\text{g/L}$)			
	1周	2周	3周	4周
实验组	11.56 \pm 0.19	12.84 \pm 0.14	13.22 \pm 0.11	11.52 \pm 0.18
对照组	8.88 \pm 0.09	10.19 \pm 0.13	10.45 \pm 0.18	9.81 \pm 0.13
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

组别	血管内皮生长因子(ng/L)			
	1周	2周	3周	4周
实验组	185.81 \pm 2.89	171.68 \pm 1.10	156.68 \pm 1.19	149.14 \pm 2.27
对照组	146.33 \pm 1.35	140.72 \pm 1.07	131.25 \pm 2.24	122.30 \pm 1.80
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

表注: 随着时间的推移, 骨形态发生蛋白2的质量浓度逐渐增加, 至第3周之后开始下降, 磷酸三钙植入后使得骨形态发生蛋白2质量浓度明显升高; 随着时间的推移, 血管内皮生长因子的质量浓度逐渐降低, 磷酸三钙植入后使得血管内皮生长因子的质量浓度得到显著升高。

愈合, 周围骨痂生长明显, 磷酸三钙基本吸收(图1)。而对对照组第1周及第2周时仍可见骨折线, 骨折端无模糊影; 第3周时可见骨折线模糊; 第4周时骨折部分愈合, 部分骨皮质未愈合(箭头所指处)(图2)。

大体标本同样可见, 实验组第1周骨折断端已有连接, 取出内固定后, 断端无分离; 第2周时骨折端已基本连接; 第3周骨折端愈合良好, 取出内固定后仍有一定的负荷能力; 第4周时骨愈合良好, 骨折端明显增粗, 骨化明显, 抗负荷能力良好(图3)。而对对照组第1周及第2周骨折端无连接, 取出内固定后立即分离; 第3周时骨折断端有少量连接, 取出内固定后, 部分粘连, 一旦承受负荷立即分离; 第4周时骨折端已有连接, 取出内固定, 承受部分应力后断端部分骨质再次折断(图4)。

2.3 骨形态发生蛋白2与序贯内皮生长因子质量浓度的相对变化

骨形态发生蛋白2: 在骨组织样本中, 成骨的关键生长因子骨形态发生蛋白2随着时间的推移而增长, 最高峰出现在第3周左右, 随后开始降低。实验组术后1, 2, 3, 4周骨形态发生蛋白2质量浓度均明显高于对照组同期质量浓度($P < 0.01$)。同时横向比较, 实验组组内第1周与第2周, 第2周与第3周, 第3周与第4周, 骨形态发生蛋白2质量浓度均值比较差异均有显著性意义($P < 0.01$); 对照组组内第1周与第2周, 第2周与第3周, 第3周与第4周, 骨形态发生蛋白2质量浓度均值比较差异均有显著性意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 见表1。

血管内皮生长因子: 同样在骨样本检测中, 血管生成的关键因子血管内皮生长因子随着时间的推移逐步降低, 高峰出现在第1周。实验组术后1, 2, 3, 4周时血管内皮生长因子质量浓度均明显高于对照组($P < 0.01$)。横向比较可见, 实

验组组内第1周与第2周, 第2周与第3周, 第3周与第4周, 血管内皮生长因子质量浓度比较差异有显著性意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 对照组组内第1周与第2周, 第2周与第3周, 第3周与第4周, 血管内皮生长因子质量浓度比较差异有显著性意义($P < 0.01$), 见表1。

3 讨论 Discussion

骨缺损是骨科常见疾病之一, 如处理不当易导致肢体畸形、功能障碍等并发症^[8-9]。治疗骨缺损及骨不连常用的方法是植骨, 目前使用最广泛的是磷酸三钙人工骨植骨, 然而对于磷酸三钙的植骨效果仍有争议, 有学者认为磷酸三钙具有骨诱导性, 而有学者认为磷酸三钙仅有传导性而无诱导活性, 也有学者认为磷酸三钙与细胞复合物修复骨缺损效果较好^[10]。因此, 对于磷酸三钙治疗骨缺损的机制尚无详细报道。

既往研究中, 多数学者认为磷酸三钙因提供了支架的桥接作用, 并且生物相容性好, 使得骨愈合较好。实验中通过X射线摄片发现, 实验组小鼠在术后1周即有骨生长表现; 术后2周时骨折大部分愈合; 第3周时骨折基本愈合, 少量磷酸三钙残留; 第4周时骨折完全愈合, 周围骨痂生长明显。而对对照组第1周及第2周时骨缺损未见明显生长; 第3周时可见骨折线模糊; 第4周时骨折部分愈合。大体标本同样可见, 实验组第1周骨折断端已有连接, 周缘可见少量骨痂, 取出内固定后, 断端无分离; 第2周时骨折端已基本连接, 骨痂明显; 第3周骨折端愈合良好, 可见大量骨痂, 有一定的负荷能力; 第4周时骨愈合良好, 骨折端明显增粗, 骨化明显, 抗负荷能力良好。而对对照组前2周内骨折端无连接; 第3周时骨折断端有少量连接, 一旦承受负荷立即分离; 第4周时骨折端已有骨性连接, 承受部分应力后断端部分骨质再次折断, 这充分表明实验组骨愈合明显优于对照组, 不仅愈合时间减少, 而且骨量也明显增加, 新生骨强度也较高, 结果既往研究相似^[11-12]; 同时骨愈合的加速也说明磷酸三钙的疗效无法仅仅用桥接作用来解释。

众所周知, 骨折后成骨细胞在充足的血供下生成新骨^[13], 同时在骨形成的过程中, 众多细胞因子起了关键作用, 其中骨形态发生蛋白2是最主要调节骨形成的信号蛋白, 用以诱导未分化的间充质细胞分化形成软骨和骨, 其表达水平的高低直接影响间充质骨细胞的分化和骨量产生水平^[14]。血管内皮生长因子则是促进血管形成, 为骨折修复提供充足的血供^[15]。通过实验中对生长因子的检测可以发现, 成骨的关键生长因子骨形态发生蛋白2随着时间的推移而增长, 最高峰出现在第3周左右, 随后开始降低; 而血管生成的关键因子血管内皮生长因子随着时间的推移逐步降低, 高峰出现在第1周, 随后浓度逐渐降低。由此可以看出, 关键生长因子大多在愈合前期表达且时间短。骨形态发生蛋白2活性高, 但量少, 容易稀释、分解、吸收, 无法长久刺激靶细胞。徐建强等^[16]将聚乳酸聚乙醇酸-磷酸三

钙-骨形态发生蛋白2复合物填充植入绵羊桡骨缺损区, 结果发现骨折愈合良好, 而未植骨组未生长, 其指出聚乳酸聚乙醇酸使骨形态发生蛋白2达到缓释的作用, 使得缺损区骨形态发生蛋白的2在一个较长时间段内维持较高浓度。同样, 陆梦漪等^[17]也指出骨缺损后一定时间内, 新生血管会出现不同程度的衰减, 这与血管内皮生长因子无法长期持续稳定释放有一定的关系, 其利用血管内皮生长因子混合I型胶原-磷酸三钙植入骨缺损区, 4周时出现明显血管减少, 由此可见, 骨缺损的愈合, 关键在于这些关键生长因子的表达浓度和表达时间, 各类研究均通过复合生长因子, 利用缓释效应达到提高生长因子浓度, 延长作用时间的效果^[18-19]。

实验中通过对生长因子的检测可以发现, 实验组于各阶段骨形态发生蛋白2质量浓度均明显高于对照组, 同样实验组血管内皮生长因子质量浓度均明显高于对照组。通过实验可知, 磷酸三钙植入骨缺损后, 使得在骨生长阶段骨形态发生蛋白2和血管内皮生长因子的质量浓度明显升高, 有效促进了骨的生长愈合。即使在术后1个月, 骨折愈合, 实验组的最低质量浓度仍高于对照组浓度的峰值, 这也意味着生长因子的在“相对较长”的时间段内有高于正常的表达, 使得更多的成骨细胞生成新骨变为可能, 相当于起到了缓慢释放高浓度生长因子的作用。董黎强等^[20]研究指出骨形态发生蛋白2在伤后7-14 d开始表达, 强度较高, 3周达峰值后开始回落。曾中华等^[21]、叶永成^[22]也分别指出, 血管内皮生长因子可在短期内明显增加骨折端的血流量, 促进骨愈合, 在7-28 d内为表达的高峰期, 且一直呈下降趋势, 随后与正常水平无显著区别。本实验结果符合既往研究, 但同时也可发现磷酸三钙虽提高了生长因子的浓度, 但表达的达峰及回落时间却未延长, 与对照组同步。磷酸三钙无诱导活性, 即无法诱导生长因子提前发生、推迟回落或者长期保持高浓度水平。磷酸三钙如何使得生长因子浓度升高? 是其结构的仿生效应还是对微环境的调节?

有文献报道, 大鼠股骨中段骨缺损模型中, 缺损外周区骨形态发生蛋白2的相对表达量高于中心区^[23], 14 d左右达峰后开始下降。推测骨折、骨缺损形成后1-3 d内未见骨形态发生蛋白2表达的原因, 可能由于损伤后组织、血运破坏等因素激活机体细胞信号传导系统, 但修复尚不明显; 而3-7 d内, 外周区有组织和营养支持, 微循环可建立, 而中心区组织、血供破坏, 缺乏新生血管和成骨细胞; 7 d后外周区依赖骨外膜, 成骨效应明显, 骨形态发生蛋白2明显升高, 而中心区部分软组织和血管生长及细胞因子由外周区向中心区弥散, 使得骨形态发生蛋白2开始表达。由此可说明, 骨缺损发生后, 能否修复依赖于生长因子表达和局部组织的支持。也就是说, 在骨生长关键的3周内, 如此阶段生长因子充足, 骨组织完整, 骨膜完整, 便于生长, 但缺损区缺乏骨组织, 生长因子也无法富集, 极易稀释、分解, 导致对照组骨折愈合不佳。而实验组虽无法恢复骨

外膜等组织, 但生长因子浓度较高, 且相对较长时间内都高于对照组, 使得骨缺损愈合良好。磷酸三钙的存在填补了骨膜缺损的不足, 同时使生长因子浓度升高, 而其本身无类似聚乳酸等材料对生长因子的缓释、延缓分解等作用, 因此推测, 磷酸三钙植入后上调了生长因子的表达。同样, 有研究表明血管内皮生长因子使骨折端血流量增加, 而骨折愈合过程中血管内皮生长因子表达障碍导致血管内皮生长因子缺乏是造成骨折不愈合的重要因素之一^[24]。更有研究证实, 血管内皮生长因子转染的间充质干细胞可在体内异位成骨, 说明了血管内皮生长因子的重要性, 即使没有骨膜, 未植入血管束, 仍可以成骨^[25]。而本实验中, 局部组织缺失, 骨膜剥除, 实验组仍有较高浓度的血管内皮生长因子, 说明磷酸三钙不仅起了桥接作用, 使得缺损区得以连接, 血管内皮生长因子在缺损区得以表达, 更是因上调了血管内皮生长因子的表达, 起到了促进血管形成的作用, 因此骨愈合良好。王箭等^[26]研究表明, 血管化组织工程骨在血管束植入早期即可在骨缺损区局部形成较高表达量的血管内皮生长因子, 随着时间增加, 血管化程度也会增加, 不仅骨愈合好, 新生血管也明显增加。作者在既往研究中也发现, 磷酸三钙植骨后新生血管明显增加, 而术中并未植入血管束。Lindhorst等^[27]将载入血管内皮生长因子的 β -磷酸三钙及多孔聚乙烯支架植入小鼠背部, 研究其血管化效应, 结果显示载入血管内皮生长因子的 β -磷酸三钙支架在同等条件下较多孔聚乙烯支架更能促进血管生成。由此可见, 磷酸三钙植骨后, 首先上调了血管内皮生长因子的表达, 增加了血管形成, 血管形成促进了血管内皮生长因子的表达, 而与材料的支架作用可能无特别关联。

磷酸三钙植骨不仅提供了桥接作用, 更是因上调了生长因子的表达, 使得骨愈合良好, 这是以往未发现的。由此进一步联想, 以往临床上植骨治疗对于骨缺损大多有效, 而对于骨不连却效果不佳。骨不连常常发生于术后二三个月, 此时生长因子表达基本停止, 即使植入磷酸三钙或磷酸三钙/细胞复合物也无法上调生长因子, 使其达到骨生长要求的水平。因此磷酸三钙/细胞复合物修复大段骨缺损的报道较多, 修复骨不连的报道鲜见。王昌兴等^[28]也提出骨形态发生蛋白2在2周达峰值, 4周明显降低, 新骨生长明显减少, 血管内皮生长因子随时间推移而减少, 新生血管减少, 如无诱导因素存在则生长几近停止。单纯骨髓移植(等同于磷酸三钙+骨髓干细胞移植)作用不明显。由此可以证实: 磷酸三钙修复骨缺损的机制是, 骨折后局部生长因子开始表达, 磷酸三钙使得其表达上调, 同时也延长了生长因子相对高浓度的时间, 本身作为连接骨折端的桥梁, 为各类细胞的滞留提供了良好环境, 使得骨生长良好。而无法修复骨不连是因为目前已知的元素中仅Si元素具有骨诱导性, 且尚在研究中, 其他各类生物材料均无法诱导生长因子发生, 使得骨不连的微环境缺少必要的生长因子,

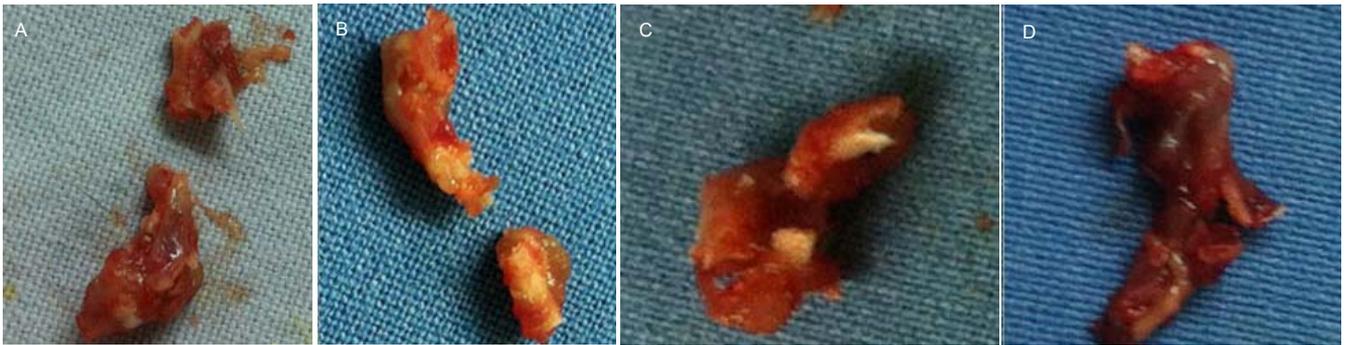


图4 对照组术后不同时间点骨缺损处大体观察

Figure 4 Gross observation of bone defects in the control group at different time points after operation

图注: 图中A-D分别为术后1, 2, 3, 4周时取材的大体照片。第1周及第2周骨折端无连接, 取出内固定后立即分离; 第3周时骨折断端有少量连接, 取出内固定后, 部分粘连, 一旦承受负荷立即分离; 第4周时骨折端已有连接, 取出内固定, 承受部分应力后断端部分骨质再次折断。

即使植骨填充了缺损区及存在正常血供仍无法成骨。因此可以假设, 治疗骨缺损可以使用磷酸三钙植骨, 大段缺损可补充生长因子, 而治疗骨不连则至少应该采用磷酸三钙+生长因子, 同时可补充细胞复合物。对于此假设, 还有待课题组进一步论证。一旦得到证实, 则可进一步应用于临床, 为临床植骨提供可靠依据, 同时也使得目前治疗骨缺损、骨不连等复杂的组织工程技术得以简化, 即多种材料+细胞+各类生长因子的组合, 简化为单一材料+特定的生长因子组合, 或联合基因修饰等方式^[29-31], 使临床应用变得可能。王庆等^[29]探讨人工合成 β -磷酸三钙复合骨形态发生蛋白2与骨形态发生蛋白7联合基因修饰的人鼠脂肪来源干细胞构建组织工程骨的可行性。实验取SD大鼠脂肪来源干细胞, 传至第3代随机分为4组培养: 骨形态发生蛋白2组、骨形态发生蛋白7组、骨形态发生蛋白2+骨形态发生蛋白7组、对照组。以 $3.3 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 的浓度接种于 β -磷酸三钙, 进行体复合培养, 采用碱性磷酸酶定域检测细胞碱性磷酸酶活性, 通过茜素红染色、荧光定量聚合酶链式反应检测复合物的成骨活性, 并进行体内组织工程骨的研究。结果显示细胞接种后0-14 d, 4组细胞的DNA量变化趋势一致。与对照组相比, 骨形态发生蛋白2组、骨形态发生蛋白7组和骨形态发生蛋白2+骨形态发生蛋白7组复合物体外培养14 d后钙化结节的数目明显增多, 其中骨形态发生蛋白2+骨形态发生蛋白7组钙化结节数目最多, 呈片状分布。骨形态发生蛋白2+骨形态发生蛋白7组碱性磷酸酶、骨桥蛋白、骨钙素mRNA表达量及骨桥蛋白、骨钙素的蛋白表达明显高于对照组、骨形态发生蛋白2组及骨形态发生蛋白7组 ($P < 0.05$)。体内成骨结果显示, 术后6周X射线片示骨形态发生蛋白2+骨形态发生蛋白7组大鼠骨缺损基本愈合, 而其他3组大鼠骨缺损未完全恢复; 苏木精-伊红染色示骨形态发生蛋白2+骨形态发生蛋白7组产生了完整的皮层骨和骨髓, 而其他3组仅产生了少量骨小梁、皮层骨及骨髓, 索命联合应用骨形态发生蛋白2和骨形态发生蛋白7可明显促进组织工程骨的成骨效应, 为应用骨组织工程科技修复骨缺损提供了初步实验依据。

综上所述, 磷酸三钙植骨治疗不仅仅提供了骨生长的微环境和支架结构, 更是上调了生长因子骨形态发生蛋白2和血管内皮生长因子的表达, 促进骨细胞分化、骨量形成和血管形成, 促进骨愈合。对于骨缺损的修复, 磷酸三钙植骨具有明显疗效。

致谢: 感谢课题组所有成员对本实验的帮助。

作者贡献: 第一作者徐俊为实验设计者和负责人并实施实验, 收集资料, 分析数据, 整理成文, 并对文章负责。殷潇凡为实验指导, 对于实验进行评估分析, 对文章进行审校。秦强副主任医师参与实验评估和协助审校。谷辉杰医生参与实验合作, 帮助收集资料。

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动物伦理学要求。

学术术语: 骨形态发生蛋白-是1963年美国的Marshall R.Urist教授发现的。骨形态发生蛋白能够诱导动物或人体间充质细胞分化为骨、软骨、韧带、肌腱和神经组织, 是与胚胎骨骼形成有关的蛋白质, 在骨形成的数个阶段均起作用, 由形态发生的早期阶段开始, 并延续至出生后。在中枢神经的发生中也起着关键作用。“骨形态发生蛋白”在临床的价值无可限量。近年来基因重组的骨形态发生蛋白2和骨形态发生蛋白7的安全性和有效性得到了充分的证实, 美国FDA也于2002年7月批准重组骨形态发生蛋白2用于脊柱融合。基于骨形态发生蛋白的安全性和高效诱导成骨活性被越来越多的实验所证实, 在一些国家骨形态发生蛋白已进入大规模的临床实验阶段。

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] Liu Y, Lim J, Teoh SH. Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnol Adv.* 2013; 31(5):688-705.
- [2] Yin X, Li J, Xu J, Huang Z, et al. Clinical assessment of calcium phosphate cement to treat tibial plateau fractures. *J Biomater Appl.* 2013; 28(2):199-206.

- [3] Seebach C, Henrich D, Kähling C, et al. Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto beta-TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats. *Tissue Eng Part A*. 2010; 16(6):1961-1970.
- [4] 钱成雄,叶毓森,吴坤南,等.生物陶瓷(β -TCP人工骨)治疗四肢骨折22例临床研究[J]. *中国当代医药*, 2010, 17(10):37-38.
- [5] Raghunath M, Singh N, Singh T, et al. Defect nonunion of a metatarsal bone fracture in a cow: successful management with bone plating and autogenous cancellous bone graft. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2013; 26:233-237.
- [6] 何晨光,赵莉,林柳兰,等.基于快速成形的磷酸钙多孔陶瓷成骨性能初步研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2010, 24(7): 792-796.
- [7] 钱剑,刘国文,王哲.微量元素铜对软骨细胞胰岛素样生长因子 mRNA 基因表达的影响[J]. *中国兽医科技*, 2005, 35(7):565-569.
- [8] Liu Y, Chan JK, Teoh SH. Review of vascularised bone tissue-engineering strategies with a focus on co-culture systems. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012. doi: 10.1002/term.1617. [Epub ahead of print]
- [9] Thitiset T, Damrongsakkul S, Bunaprasert T, et al. Development of collagen/demineralized bone powder scaffolds and periosteum-derived cells for bone tissue engineering application. *Int J Mol Sci*. 2013; 14:2056-2071.
- [10] 张路,赵文志.不同生物支架材料修复骨缺损的性能与评价[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(51):9679-9682.
- [11] 殷潇凡,罗从凤,张晓阳,等.应用多孔磷酸三钙植骨治疗胫骨平台骨折的组织学特性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(21):4165-4168.
- [12] 李剑勇,殷潇凡,徐俊.磷酸三钙植骨治疗胫骨远端骨缺损后的骨组织变化[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(38): 7037-7041.
- [13] 王亦璠.骨与关节损伤[M]. 4版.北京:人民卫生出版社, 2007: 196-199.
- [14] Fujioka-Kobayashi M, Ota MS, Shimoda A, et al. Cholesteryl group- and acryloyl group-bearing pullulanogel to deliver BMP2 and FGF18 for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2012; 33:7613-7620.
- [15] Gao W, Qiao X, Ma S, et al. Adipose-derived stem cells accelerate neovascularization in ischaemic diabetic skin flap via expression of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Cell Mol Med*. 2011; 15:2575-2585.
- [16] 徐建强,周密,张树明,等.复合骨形态发生蛋白-2的人工骨结合带血供组织修复羊桡骨大段骨缺损的实验研究[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2012, 14(8):697-702.
- [17] 陆梦漪,任毅,胡万青,等.血管内皮生长因子混合 I 型胶原修饰 β -磷酸三钙多孔支架的血管化[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(12):1839-1845.
- [18] Peng LH, Wei W, Qi XT, et al. Epidermal Stem Cells Manipulated by pDNA-VEGF165/CYD-PEI Nanoparticles Loaded Gelatin/beta-TCP Matrix as a Therapeutic Agent and Gene Delivery Vehicle for Wound Healing. *Mol Pharm*. 2013; 10(8):3090-3102.
- [19] Yang P, Huang X, Wang C, et al. Repair of bone defects using a new biomimetic construction fabricated by adipose-derived stem cells, collagen I, and porous beta-tricalcium phosphate scaffolds. *Exp Biol Med*. 2013; 238(12):1331-1343.
- [20] 董黎强,尹航,王昌兴,等.不同手术时间对骨折愈合过程中骨形态发生蛋白-2表达的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(3):682.
- [21] 曾中华,余黎,龚玲玲,等.骨折愈合过程中BMP-2和VEGF的表达[J]. *武汉大学学报:医学版*, 2005, 26(4):467-469.
- [22] 叶永成. EGF和VEGF在创伤性骨折愈合中的变化与意义[J]. *中国医药指南*, 2012, 9(10):412-414.
- [23] 李阳,钱栋,马鹏,等.大鼠股骨骨不连模型不同位点骨形态发生蛋白2基因的表达[J]. *江苏大学学报:医学版*, 2010, 20(2):141-144.
- [24] 初同伟,王正国,朱佩芳,等.血管内皮生长因子在骨折愈合中的作用[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2002, 16(2):75-78.
- [25] 高全文,柳春明,宋慧锋,等.血管内皮生长因子165基因转染的骨髓基质细胞异位成骨的初步观察[J]. *中国美容医学*, 2009, 18(1): 69-71.
- [26] 王筋,覃俊君,陈思园,等.血管束植入组织工程骨修复兔股骨缺损对血管内皮生长因子表达的影响[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2009, 11(6):540-545.
- [27] Lindhorst D, Tavassol F, Von See C, et al. Effects of VEGF loading on scaffold-confined vascularization. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 95(3):783-792.
- [28] 王昌兴,刘琦,董黎强,等.浓缩自体骨髓移植结合金葡液局部注射对骨质疏松性骨折愈合过程中BMP-2和VEGF表达的调控[J]. *浙江中医药大学学报*, 2014, 38(2):188-195.
- [29] 王庆,陈光兴,郭林,等.骨形态发生蛋白-2和7联合基因修饰构建组织工程骨的实验研究[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2013, 15(11): 984-989.
- [30] Bai Y, Leng Y, Yin G, et al. Effects of combinations of BMP-2 with FGF-2 and/or VEGF on HUVECs angiogenesis in vitro and CAM angiogenesis in vivo. *Cell Tissue Res*. 2014. [Epub ahead of print]
- [31] Nillesen ST, Geutjes PJ, Wismans R, et al. Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. *Biomaterials*. 2007; 28(6):1123-1131.