

· 研究原著 ·

重组人类骨形态发生蛋白2复合纤维蛋白凝胶与血管内皮生长因子进行的脊柱融合

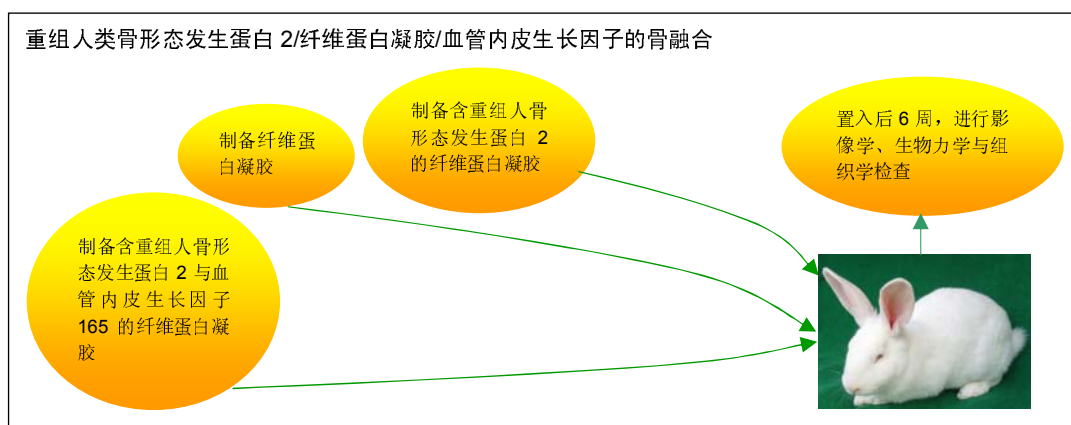
田野¹, 朱悦², 仲涛³(¹沈阳市红十字会医院骨外科, 辽宁省沈阳市 110013; ²中国医科大学附属第一医院骨外科, 辽宁省沈阳市 110013; ³大连市第三人民医院骨外科, 辽宁省大连市 116033)

引用本文: 田野, 朱悦, 仲涛. 重组人类骨形态发生蛋白2复合纤维蛋白凝胶与血管内皮生长因子进行的脊柱融合[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(25):3699-3705.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.25.008

ORCID: 0000-0003-1429-2641(朱悦)

文章快速阅读:



田野, 男, 1977年生, 辽宁省辽阳市人, 满族, 硕士, 副主任医师, 主要从事脊柱脊髓损伤研究。

通讯作者: 朱悦, 中国医科大学附属第一医院骨外科, 辽宁省沈阳市 110013

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)25-03699-07

稿件接受: 2016-02-25

文题释义:

纤维蛋白凝胶: 是由纤维蛋白原与凝血酶反应后形成的立体网状结构、低抗原生物大分子材料, 可塑性好, 其在体内逐渐降解过程为药物缓慢均匀释放提供了良好条件, 立体网状结构也允许新生毛细血管长入。以往的实验表明, 纤维蛋白凝胶是骨形态发生蛋白2的良好载体, 可以满足骨形态发生蛋白缓慢均匀释放的需要, 避免其被血流很快冲走, 并且骨形态发生蛋白与纤维蛋白凝胶复合后, 骨诱导活性有所提高。

脊柱融合材料: 主要包括自体骨、异体骨、人工骨材料, 其中自体骨移植被公认为植骨融合的金标准。在脊柱融合内固定手术中, 植骨融合是脊柱的长期稳定是根本方法, 内固定无论如何发展, 都只是一种短期内维持脊柱稳定的方法, 所以植骨融合有非常重要的意义, 而决定植骨融合效率的主要因素之一是脊柱融合材料。

摘要

背景: 骨形态发生蛋白2具有骨诱导作用, 血管内皮生长因子对骨形成及修复起正性调节作用, 那么二者用于骨融合的效果如何呢?

目的: 观察重组人类血管内皮生长因子165和重组人类骨形态发生蛋白2复合纤维蛋白凝胶进行脊柱横突间融合的效果。

方法: 将30只日本大耳白兔随机分3组, 每组10只, 实验组于L₅₋₆横突间置入重组人类血管内皮生长因子165/重组人类骨形态发生蛋白2/纤维蛋白凝胶复合材料, 对照组于L₅₋₆横突间置入重组人类骨形态发生蛋白2/纤维蛋白凝胶复合材料, 空白对照组于L₅₋₆横突间置入纤维蛋白凝胶材料。置入后6周, 进行影像学、生物力学与组织学检查。

结果与结论: 实验组、对照组横突间成骨融合, 且实验组成骨效果优于对照组, 空白对照组无成骨。实验组成骨融合强度高于对照组($P < 0.01$)。实验组成骨融合标本可见大量软骨细胞、骨细胞、成熟骨组织与胶原组织, 对照组成骨融合标本可见大量软骨细胞、骨细胞及骨组织。结果表明, 重组人类血管内皮生长因子165和重组人类骨形态发生蛋白2联合应用有助于促进成骨融合。

关键词:

生物材料; 骨生物材料; 脊柱融合; 血管内皮生长因子; 人重组骨形态发生蛋白2; 纤维蛋白组织黏着剂

Tian Ye, Master, Associate
chief physician,
Department of
Orthopaedics, Red Cross
Hospital of Shenyang,
Shenyang 110013,
Liaoning Province, China

Corresponding author: Zhu
Yue, Department of
Orthopaedics, the First
Affiliated Hospital of China
Medical University,
Shenyang 110013,
Liaoning Province, China

主题词:

脊柱融合术; 血管内皮生长因子; 骨形态发生蛋白质类; 组织工程

缩略语:

人重组骨形态发生蛋白2: recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2; 血管内皮生长因子: vascular endothelial growth factor, VEGF

Fibrin glue combined with vascular endothelial growth factor and recombinant human bone morphogenetic protein 2 applied in spinal fusion

Tian Ye¹, Zhu Yue², Zhong Tao³ (¹Department of Orthopaedics, Red Cross Hospital of Shenyang, Shenyang 110013, Liaoning Province, China; ²Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110013, Liaoning Province, China; ³Department of Orthopaedics, the Third Hospital of Dalian, Dalian 116003, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Bone morphogenetic protein 2 possesses osteoinduction, and vascular endothelial growth factor plays a positive regulatory role in osteogenesis and bone repair. So what will happen if both of them are used for spinal fusion?

OBJECTIVE: To investigate the effects of fibrin glue combined with vascular endothelial growth factor 165 and recombinant human bone morphogenetic protein 2 on intertransverse process fusion.

METHODS: Thirty Japanese white rabbits were randomized into three groups ($n=10$ per group): rabbits underwent intertransverse process fusion at the level of L₅₋₆ with vascular endothelial growth factor 165/recombinant human bone morphogenetic protein 2/fibrin glue in experimental group, recombinant human bone morphogenetic protein 2/fibrin glue in control group, and fibrin glue in blank control group, respectively. At 6 weeks after implantation, observations of biomechanics, X-ray imaging and histology were performed.

RESULTS AND CONCLUSION: Osteogenic fusion between transverse processes could be found in experimental and control groups except for the blank control group, which was better in the experimental group. The strength of osteogenic fusion in the experimental group was significantly stronger than that in the control group ($P < 0.01$). Besides, abundant chondrocytes, osteocytes, mature bone tissues and collagens could be found in the osteogenic fusion specimen of the experimental group, and numerous chondrocytes, osteocytes and mature bone tissues observed in the osteogenic fusion specimen of the control group. In conclusion, fibrin glue combined with vascular endothelial growth factor 165 and recombinant human bone morphogenetic protein 2 can promote osteogenic fusion.

Subject headings: Spinal Fusion; Vascular Endothelial Growth Factors; Bone Morphogenetic Proteins; Tissue Engineering

Cite this article: Tian Y, Zhu Y, Zhong T. Fibrin glue combined with vascular endothelial growth factor and recombinant human bone morphogenetic protein 2 applied in spinal fusion. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(25):3699-3705.

0 引言 Introduction

一直以来, 传统的脊柱横突融合均采用自体髂骨作为移植物, 但自体骨移植存在很多限制因素^[1-2], 促使人们寻找一种理想的可替代自体骨移植材料。骨形态发生蛋白是一种具有骨诱导活性的多肽生长因子, 可诱导间充质细胞分化成软骨细胞或成骨细胞, 进而产生新骨。其基因重组产品人重组骨形态发生蛋白2(recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2)在FDA批准临床试验中取得满意效果, 并于2007年7月被FDA正式批准应用于临床腰椎椎体间脊柱融合中。尽管已证实rhBMP-2具有诱导新骨形成的作用, 但成骨过程

还包括几种不同的因子, 通过不同的途径与rhBMP-2协同作用完成, 诱导未分化的间充质细胞分化成软骨细胞或骨细胞, 产生新生骨。在成骨形成过程最重要的便是血管化作用^[3]。而血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)目前被认为是诱导血管生成的因子中作用最强、特异性最高的因子, 已有研究证实它对骨形成及修复起正性调节作用^[4]。并且VEGF165与rhBMP-2还可相互促进分泌和表达^[5]。那么VEGF165联合rhBMP-2用于骨融合的效果如何呢? 因此作者通过VEGF165联合rhBMP-2进行脊柱横突间融合, 来观察VEGF165与rhBMP-2复合纤维蛋白凝胶是否

可以协同诱导、促进成骨生成,为组织工程化骨提供新的实验材料。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年5至8月在中国医科大学实验动物中心完成。

1.3 材料

脊柱融合实验的主要试剂:

试剂	来源
VEGF	美国Peprotech公司
凝血酶	珠海经济特区生物化学制药厂
冻干人纤维蛋白原	上海莱士血制品有限公司
rhBMP-2	美国Sigma公司

实验动物: 12月龄健康日本大耳白兔30只,雌雄不拘,体质量3 790–4 120 g,由中国医科大学实验动物中心饲养提供。所有动物在戊巴比妥钠麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。将30只兔随机分为实验组、对照组、空白对照组,每组10只。

1.4 实验方法

横突间植骨替代材料的制备: 在37 °C水浴中加入10 mL无菌三蒸水及纤维蛋白原(500 mg),预热1 h,制备溶液 I。以2 mL无菌CaCl₂溶液(40 mmol/L)溶解凝血酶(500 U)用,即得溶液 II,浓度为250 U/mL。将溶液 I 与溶液 II pH值调整至7.0–7.2,置于4 °C冰箱中备用。术前1 h,依次加入500 μL溶液 I、500 ng VEGF165、300 ng rhBMP-2、500 μL溶液 II,即得到含有rhBMP-2和VEGF165的块状纤维蛋白凝胶,其规格为长2 cm×宽1.5 cm×高0.5 cm,作为横突间融合植骨的替代材料。同样方法制备含有rhBMP-2的纤维蛋白凝胶。

分组干预: 2%戊巴比妥钠耳缘静脉注入实验动物,麻醉后充分暴露兔左侧L₅₋₆横突。磨去两横突背侧骨皮质至松质骨,实验组、对照组、空白对照组分别将VEGF165/rhBMP-2/纤维蛋白凝胶、rhBMP-2/纤维蛋白凝胶、纤维蛋白凝胶置于两横突背侧的植骨床,庆大霉素溶液反复冲洗预防感染,逐层缝合。术后给予注射用青霉素20×10⁴ U,1次/d,连续7 d。分笼饲养6周后取材。

1.5 主要观察指标

大体观察: 置入后6周取标本,2名骨科医生盲取触

摸植入物区域,检查L₅₋₆腰椎活动度。观察L₅₋₆横突间情况,判断是否有成骨、成骨量及是否融合。脊柱融合标准为2人均认为有成骨形成(植入物区域可触摸到连续骨痂)及腰椎无活动。

影像学检测: 置入后6周取标本,采集标本X射线正位片,观察标本左侧L₅₋₆横突间融合情况。由2位骨科医生盲法观察,判定为脊柱融合:有连续骨小梁通过横突间为融合。

生物力学检测: 生物力学检测标本均为影像学判定为融合的标本。切断标本椎间盘,咬掉关节突。保留L₅及L₆椎体及左侧横突间膜与融合物。混合搅拌均匀牙托粉和牙托水,注入自制模具中(规格为1.5 cm×1.5 cm×5 cm),包埋L₅椎体上端和L₆椎体下端,待混合物凝固后,从模具中取出。

将标本两端的凝固块固定在自制夹具中,在生物力学机上将夹具固定,进行非破坏性生物力学检测(前屈、后伸、左侧弯曲、右侧弯曲、左侧扭转、右侧扭转),在矢状面和冠状面以3 mm/min恒定的速度移动3 mm;以10 (°)/min的角速度恒定在水平面移动10°(左右旋转)。运动后的第6秒记录抗弯曲力(N)和抗旋转力(N•mm),每间隔6 s记1次,共10次。

组织学检查: 生物力学检测后,立即将标本(包括未融合标本)的横突及横突间组织块切下,进行脱钙后苏木精-伊红染色,观察组织块内成骨情况。

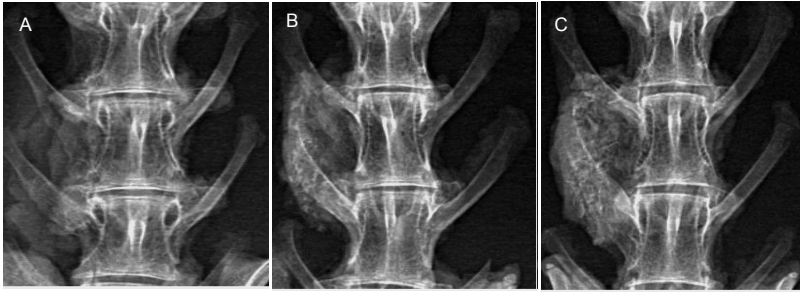
1.6 统计学分析 应用SPSS 11.5软件处理数据。用Fisher's精确概率检验进行率的比较,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 30只兔均进入结果分析。

2.2 各组大体标本观察结果 实验组有7个判断为融合的标本,其余3个标本虽然在L₅₋₆间触及大小不等坚硬块状物,但检查腰椎仍有活动度;对照组4个标本达到融合,但融合块与实验组比较薄且小,其余标本虽未达到融合,也观察到在腰椎横突间有硬块形成;空白对照组均未观察到有坚硬块状物形成,更无融合发生,见表1。

2.3 各组影像学检查结果 实验组有7个标本左侧L₅₋₆横突间呈现高密度影,有连续骨小梁通过两横突间,判定为成骨融合;对照组有4个标本判定为融合,有6个而未达到完全融合;空白对照组所有标本均融合,无骨小梁通过,见图1。

图1 各组 L₅₋₆ 横突间 X 射线正位片检查结果Figure 1 X-ray posteroanterior films of L₅₋₆ intertransverse process fusion in each group

图注: 图中 A 为空白对照组, 标本成骨融合, 无骨小梁通过; B 为对照组, 标本成骨融合, 有连续通过的骨小梁; C 为实验组, 成骨融合, 有连续骨小梁通过。

表1 各组大体标本手法检查结果

Table 1 Manual test of the specimen in each group

组别	<i>n</i>	成骨数(<i>n</i>)	融合数	融合率(%)
实验组	10	10	7	70
对照组	10	9	4	40
空白对照组	10	0	0	0

表注: 实验组与对照组融合率比较差异无显著性意义。

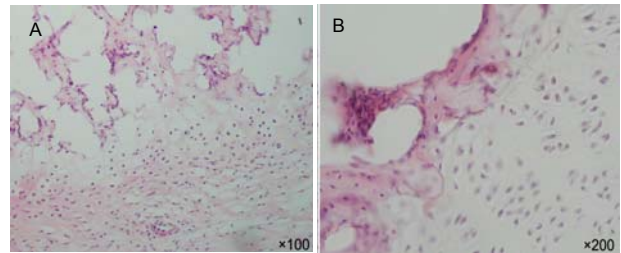


图2 实验组骨融合标本的苏木精-伊红染色

Figure 2 Hematoxylin-eosin staining of the specimen in the experimental group

图注: 图中 A 显示有增生的血管、软骨细胞、成熟骨组织、成熟的骨小梁及髓腔; B 显示有大量软骨细胞群及软骨基质。

表2 各组 L₅₋₆ 横突间标本灰度值及成骨面积比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparisons of gray value and osteogenic area during L₅₋₆ intertransverse process fusion among groups

组别	灰度值	成骨面积
实验组	150.6±33.8	9 078.5±5 315.8
对照组	116.1±36.0	3 443.8±2 458.7
空白对照组	21.00±8.71	0
<i>F</i>	25.9	9.8
<i>P</i>	0.00	0.00

表注: 实验组灰度值与成骨面积显著高于对照组($t=2.2$, $P < 0.01$; $t=3.04$, $P < 0.01$)。

成骨图像灰度和面积测定显示, 各组间比较差异有显著性意义($P < 0.01$), 实验组成骨效果优于对照组, 空白对照组无成骨, 见表2。

2.4 各组骨融合标本生物力学检测结果 对7个融合的实验组标本、4个融合的对照组脊柱标本进行6个受力方向的生物力学检测, 结果显示两组标本的6组数据比较差异均有显著性意义($P < 0.01$), 见表3。因此要想有同样的位移, 实验组脊柱标本比对照组脊柱标本需要更多的力量, 可见, 实验组融合强度大于对照组。

2.5 各组标本组织学观察结果 苏木精-伊红染色后, 实验组所有标本均可见大量的软骨细胞、骨细胞、成熟骨组织、胶原组织, 移植处未见多核巨细胞、吞噬细胞及淋巴细胞出现, 组织相容性良好, 未出现明显抗原性;

表3 实验组与对照组骨融合标本生物力学检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Biomechanics of the osteogenic fusion specimen in the experimental and control groups

受力方向	实验组(<i>n</i> =7)	对照组(<i>n</i> =4)	<i>t</i>	<i>P</i>
前屈(N)	4.24±0.11	3.85±0.22	4.90	0
后伸(N)	3.99±0.07	3.51±0.17	8.34	0
左侧弯曲(N)	4.71±0.15	4.27±0.05	8.70	0
右侧弯曲(N)	4.68±0.08	4.02±0.10	16.06	0
左侧扭转(N·mm)	133.35±3.23	125.53±0.65	7.51	0
右侧扭转(N·mm)	157.45±1.32	141.45±1.02	30.29	0

对照组中有9个标本可以观察到大量的软骨细胞和骨细胞及骨组织, 而空白对照组所有标本均未见骨细胞成分, 见图2。

3 讨论 Discussion

在研究自体骨移植替代材料的过程中, 组织工程化骨成为目前骨科领域研究的热点, 它包括3个基本要素^[5-6]: 诱导成骨因子; 合适的生物材料载体; 间充质类种子细胞。

骨形成过程受到体内多种因子的影响^[7]。其中骨形态发生蛋白是研究最为广泛的诱导成骨因子, 其成骨作用主要是通过促进细胞的趋化、有丝分裂和细胞的分化^[8], 诱导具有成骨潜能的未分化间充质细胞分化成软骨细胞

或骨细胞,进而在原位或异位产生新生骨^[9-10]。诱导成骨的方式以软骨内化骨为主,也以膜化骨方式进行。2002年,美国的食物与药品管理局(FDA)批准 rhBMP-2 成为第 1 个可以用于脊柱融合的移植骨完全替代物。Schimandle 等^[11]首次将 rhBMP-2 用于后外侧横突间脊柱融合动物模型中,所有 rhBMP-2 组达到 100%坚强脊柱融合,生物力学检测显示 rhBMP-2 组融合强度和硬度均超过自体骨组,组织学观察骨生成数量多而迅速。Boden 等^[12]研究认为,在使用骨形态发生蛋白进行脊柱融合时,多能间叶干细胞的迁移主要有两个来源:去皮质的横突骨髓中;周围软组织中。关于 rhBMP-2 的作用机制,Morone 等^[13]从分子水平探讨了兔腰椎横突间脊柱融合过程,认为 rhBMP-2 增加整个融合块中骨相关基因的表达水平,刺激横突间融合块骨形态发生蛋白 2 的 mRNA 表达,避免了中央部位的延迟愈合,降低了脊柱不融合的发生率。愈合的机制与自体骨移植愈合机制不同, rhBMP-2 能够从周围肌肉中吸引骨祖细胞,提供早期的稳定壳并逐渐向中心产生骨组织,自体骨移植愈合则完全依靠宿主骨去皮质来提供成骨细胞。目前, Park 等^[14-15]在灵长类动物实验的基础上,已成功地将 rhBMP2 应用于人体后外侧脊柱融合,用以替代髂骨移植的临床实验,报道了极佳的临床疗效。

血管化作用在成骨过程中扮演着重要角色,骨组织内或周围血运不良会导致骨形成和骨量的减少^[16]。VEGF165 是体内促进血管生长最重要的生长因子,是由血小板、巨核细胞、内皮细胞和成骨细胞等分泌的多功能细胞素,其表达水平直接影响到以后成骨的供血,影响成骨形成速度和质量^[17]。抑制 VEGF 的表达会抑制成骨部位血管的爬行,减少小梁骨的形成,以及软骨的重吸收^[18]。Street 等^[19]研究了骨折愈合过程,认为 VEGF 能够增加组织中的碱性磷酸酶,并存在剂量依赖性。VEGF165 在骨形成与代谢中的作用主要体现在 3 个方面:①通过促进内皮细胞增殖、血管生成参与骨发育形成。VEGF165 可通过受体 VEGFR1-3、硫酸乙酰肝素黏多糖及神经菌膜蛋白选择性地作用于血管内皮细胞,具有促进微静、小静脉通透性增加,血管内皮细胞分裂、增殖及诱导血管生成的作用。骨组织和其他组织再生一样,依赖于血管再生。首先由毛细血管长入骨痂或骨周组织,形成型的微循环网,同时带入成骨细胞,形成新骨^[20]。②作为旁分泌因子参与骨形成与代谢。Wang 等^[21]发现 VEGF165 可促进血管内皮细胞分泌胰岛素样生长因子 1 及内皮素 1,而这些细胞因子刺激成骨细

胞生长。③通过作用于成骨细胞强表达的 flt-1 受体,增加成骨细胞移动和分化功能^[22-23]。④在血肿形成、局部缺氧等情况下也可以加速 VEGF165 的分泌,加强局部血管增生、渗入,增加局部血流量,从而加速骨形成及修复过程^[24]。

近年来,国内外大量研究发现,VEGF165 与骨形态发生蛋白 2 在骨形成过程中具有协同促成骨的作用^[25-27]。骨形态发生蛋白 2 能够促进成骨细胞的凋亡^[28],而外源性 VEGF 可拮抗其诱导的成骨细胞凋亡,维持细胞存活,同时增加干细胞的募集,加速软骨重吸收和形成,促进新骨形成和骨折愈合。VEGF165 可刺激内皮细胞分泌骨形态发生蛋白 2,促使内皮细胞合成骨形态发生蛋白 2 mRNA 增高两三倍^[29]。另一方面,骨形态发生蛋白 2 可对 VEGF165 的表达起正相调节作用。用骨形态发生蛋白 2 作用于大鼠成骨细胞细胞前体样细胞系 KS483,可以增高其骨钙素 mRNA 的合成,同时也增加 VEGF165 的分泌量,而且血管发生作用明显增加,如果给予 VEGF165 抗体,则无论是否由骨形态发生蛋白 2 调控的血管生成都会受到抑制,说明骨形态发生蛋白 2 可通过刺激 VEGF165 的合成增加而促进血管发生^[30-31]。

实验选用纤维蛋白凝胶作为 rhBMP-2 和 VEGF165 的载体。纤维蛋白凝胶是由纤维蛋白原与凝血酶反应后形成的立体网状结构、低抗原生物大分子材料,可塑性好,其在体内逐渐降解过程为药物缓慢均匀释放提供了良好条件,立体网状结构也允许新生毛细血管长入。以往的实验表明,纤维蛋白凝胶是骨形态发生蛋白 2 的良好载体,可以满足骨形态发生蛋白缓慢均匀释放的需要,避免其被血流很快冲走,并且骨形态发生蛋白与纤维蛋白凝胶复合后,骨诱导活性有所提高^[6, 32-37]。在预实验中选择了 3, 4, 5, 6 周作为观察点,发现 3 周后无成骨形成,6 周时实验组与对照组的成骨形成出现显著差异,因此实验选择了 6 周作为观察点。作者此次实验结果显示,该条件下制备的纤维蛋白凝胶是 rhBMP-2 单独应用及 rhBMP-2 和 VEGF165 联合应用的良好载体,6 周后无残留;并且组织学检查移植处未见多核巨细胞、吞噬细胞及淋巴细胞出现,组织相容性良好,未出现明显抗原性。

实验中放射学、组织学观察及生物力学检测结果显示,各组成骨和融合效果为:实验组>对照组>空白对照组。因此认为 VEGF165、rhBMP2 联合纤维蛋白凝胶构建的横突间脊柱融合体,其成骨及融合效果要优于单用 rhBMP-2/纤维蛋白凝胶,可成为有效的自体骨移植

替代物。实验中,两种外源性生长因子的联合应用不但增强了诱导、促进成骨作用,同时降低了各自的剂量,也就降低了不良反应,使组织工程化骨疗法最大限度地适用于不同患者,尽管在6周的实验过程中,所有动物均未观察到有不良反应出现,但实验中所选因子及细胞对动物的远期作用仍不得而知。相信通过广大医学生物工作者及相关行业研究人员的共同努力,将会对不同生长因子的成骨作用,以及在成骨过程中各因子的协同作用,特别是远期作用,有更加深入的了解。骨组织工程技术必将在脊柱融合方面有更为广阔的应用前景。

作者贡献: 感谢中国医科大学骨科!感谢朱悦导师!

作者贡献: 田野、朱悦进行实验设计,实验实施为田野、仲涛,实验评估为田野,资料收集为田野,田野成文,朱悦审校。

利益冲突: 所有作者共同均认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家审核,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者、通讯作者对于研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Younger EM,Chapman MW.Morbidity at bone graft donor site.Orthorp Trauma.1989;3:192-195.
- [2] Gerstenfeld LC,Cullinanes DM,Barnes GL.Fracture healing as a postnatal developmental process: molecular,spatial,and temporal aspects of its regulation.J Cell Biochem.2003;88:873-884.
- [3] Suárez-González D, Lee JS, Diggs A,et al. Controlled multiple growth factor delivery from bone tissue engineering scaffolds via designed affinity.Tissue Eng Part A.2014; 20(15-16):2077-2087.
- [4] Samee M,Kasugai S,Kondo H,et al.Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) transfection to human periosteal cells enhances osteoblast differentiation and bone formation.J Pharmacol Sci. 2008;108(1):18-31.
- [5] Peng H,Wright V,Usas A,et al.Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4.J Clin Invest. 2002;110(6):751-759.
- [6] Kawamura M,Urist MR.Human fibrin is a physiological delivery system for bone morphogenetic protein.Clin Orthop.1988;235:302-310.
- [7] Mandracchia VJ,Nelson SL,Barp EA.Current concepts of bone healing.Clin Podiatr Med Surg. 2001;18:55-77.
- [8] David SM,Gruber HE,Meyer RA.Lumbar spine fusion using recombinant human bone morphogenetic protein in the canine.Spine (Phila Pa 1976). 1999;24: 1973-1979.
- [9] Laffargue P,Hildebrand HF,Rtimate M.Evaluation of human recombinant bone morphogenetic protein-2-loaded tricalcium phosphate implants in rabbits' bone defects.Bone.1999;25(2 Suppl):55S-58S.
- [10] Irie K,Alpaslan C,Takahashi K. Osteoclast differentiation in ectopic bone formation induced by recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2).J Bone Miner Metab. 2003;21(6):363-369.
- [11] Schimandle JH,Boden SD,Hutton WC.Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2.Spine (Phila Pa 1976). 1995; 20(12):1326-337.
- [12] Boden SD,Schimandle JH,Hutton WC.1995 Volvo Award in basic sciences:The use of an osteoinductive growth factor for lumbar spinal fusion.Part II:Study of dose,carrier,and species.Spine (Phila Pa 1976).1995; 20(24):2633-2644.
- [13] Morone MA,Boden SD,Hair G,et al.Gene expression during autograft lumbar spine fusion and the effect of bone morphogenetic protein-2.Clin Orthop. 1998;351: 252-265.
- [14] Park DK,Kim SS,Thakur N,et al.Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 with local bone graft instead of iliac crest bone graft in posterolateral lumbar spine arthrodesis.Spine (Phila Pa 1976). 2013; 38(12):E738-747.
- [15] Barnes B,Boden SD,Louis-Ugbo J,et al.Lower dose of rhBMP-2 achieves spine fusion when combined with an osteoconductive bulking agent in non-human primates.Spine (Phila Pa 1976).2005;30(10): 1127-1133.
- [16] Glowacki J.Angiogenesis in fracture repair.Clin Orthop. 1998;355(Suppl.):S82-89.
- [17] Nakagawa M,Kaneda T,Arakawa T.Vascular endothelial growth factor(VEGF) directly enhance osteoclastic bone resorption and survival mature osteoclasts.FEBS Lett.2000;4473:161-164.

- [18] Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.* 1999;5:623-628.
- [19] Street J, Bao M, deGuzman L, et al. Vascular endothelial growth factor stimulate bone repair by promoting angiogenesis bone turnover. *Proc Natl Sci USA.* 2002; 99(15): 9656-9661.
- [20] Streeten EA, Brandt ML. Biology of bone endothelial cells. *Bone Miner.* 1990;10:85-94.
- [21] Wang S, Miura M, Demura H, et al. Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. *Endocrinology.* 1997; 138:2953-2962.
- [22] Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T. Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhance osteoclastic bone resorption and survival mature osteoclasts. *FEBS Lett.* 2000;4473:161-164.
- [23] Niida S, Kaku M, Amano H. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med.* 1999;190:293-298.
- [24] Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin Orthop Relat Res.* 2000;(378):224-237.
- [25] Peng H, Wright V, Usas A, et al. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest.* 2002; 110(6):751-759.
- [26] Xiao C, Zhou H, Liu G, et al. Bone marrow stromal cells with a combined expression of BMP-2 and VEGF-165 enhanced bone regeneration. *Biomed Mater.* 2011; 6(1):015013.
- [27] Sukul M, Nguyen TB, Min YK, et al. Effect of Local Sustainable Release of BMP2-VEGF from Nano-Cellulose Loaded in Sponge Biphasic Calcium Phosphate on Bone Regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2015;21(11-12):1822-3186.
- [28] Hay E, Lemonnier J, Fromiguet O. Bone morphogenetic protein-2 promotes osteoblast apoptosis through a Smad-independent, protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Biol Chem.* 2001;276: 29028-29036.
- [29] 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):2348.
- [30] Deckers MM, van Benzonijen RL, van der Horst G, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology.* 2002;143(4): 1545-553.
- [31] Matsubara H, Hogan DE, Morgan EF, et al. Vascular tissues are a primary source of BMP2 expression during bone formation induced by distraction osteogenesis. *Bone.* 2012;51(1):168-180.
- [32] Zhang G, Drinnan CT, Geuss LR, et al. Vascular differentiation of bone marrow stem cells is directed by a tunable three-dimensional matrix. *Acta Biomater.* 2010;6(9):3395-403.
- [33] Ohira S, Doi K, Yaku H. Sutureless Technique to Fix the Great Saphenous Vein along the Atrioventricular Groove Using Fibrin Glue in Off-Pump Coronary Artery Bypass Grafting. *Heart Surg Forum.* 2016;19(2): E074-076.
- [34] Sakaguchi Y, Tsuji Y, Fujishiro M, et al. Triamcinolone Injection and Shielding with Polyglycolic Acid Sheets and Fibrin Glue for Postoperative Stricture Prevention after Esophageal Endoscopic Resection: A Pilot Study. *Am J Gastroenterol.* 2016;111(4):581-583.
- [35] Hong KP, Kim DK, Kang KH. Staple Line Coverage with a Polyglycolic Acid Patch and Fibrin Glue without Pleural Abrasion after Thoracoscopic Bullectomy for Primary Spontaneous Pneumothorax. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg.* 2016;49(2):85-91.
- [36] Liu Z, Zhu Y, Zhu H, et al. Enhancement of posterolateral lumbar spine fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2 and mesenchymal stem cells delivered in fibrin glue. *J Biomater Appl.* 2016. pii: 0885328216643854. [Epub ahead of print]
- [37] Cho AB, Paulos RG, Bersani G, et al. A reinforcement of the sutured microvascular anastomosis with fibrin glue application: A retrospective comparative study with the standard conventional technique. *Microsurgery.* 2016. doi:10.1002/micr.30054. [Epub ahead of print]