

成骨细胞移植促进老龄鼠骨质疏松性骨折愈合过程中 VEGF 的动态变化

曾敬 徐栋梁 丘钜世 吴惠茜 张萌 梁惠珍

【摘要】 目的 动态观察在幼龄成骨细胞移植促进骨质疏松性骨折愈合过程中, VEGF 在不同时相的表达及其生物学意义。方法 通过建立老龄骨质疏松 SD 大鼠骨折的动物模型, 并将体外培养的 SD 雄性乳鼠成骨细胞移植到 SD 雌性鼠老年骨质疏松性骨缺损部位, 利用免疫组化及原位杂交检测骨折愈合过程中不同时相的移植标本 VEGF、VEGFmRNA 的表达, 并作图像分析, 绘出其动态变化图。结果 实验组 VEGF、VEGFmRNA 均在 7 d 左右可见有阳性表达的细胞, 14 d 有分泌高峰, 其中以软骨细胞中阳性最强, 21 d 分泌量开始下降, 56 d 后基本消失。而对照组未见明显分泌高峰。结论 成骨细胞移植促进老龄鼠骨质疏松性骨折愈合, 其机制可能是通过促进 VEGF 的转录和表达, 从而促进骨折部位建立良好的血液循环, 加速骨形成。

【关键词】 骨质疏松; 骨折愈合; VEGF; 成骨细胞

Activity of vascular endothelial growth factor during the process of osteoblast grafts to accelerate fracture healing in osteoporotic rats ZENG Jing, XU Dongliang, QIU Jushi, et al. Department of Pathology, Tumor Hospital, Sun Yatsen Memorial Medical University, Guangzhou 510060, China

【Abstract】 **Objective** To study the biological function and behavior of vascular endothelial growth factor (VEGF) during the process of osteoblast grafts to accelerate fracture healing in osteoporotic rats. **Methods** Fracture models of osteoporotic rats were set up and osteoblast grafts were performed. Immunohistochemistry was used to detect the expression of VEGF during different periods of fracture healing, *in situ* hybridization was used to study the expression of VEGF mRNA, and image analysis was done. **Results** In the experimental group, VEGF was positive 7 days after osteoblast grafting, and there was peak secretion of chondrocytes about 14 days post-transplantation, which began to decline at 21 days, and disappear at 56 days. In contrast, there was no peak secretion in the control group. **Conclusion** VEGF not only plays an important role in bone formation, but also enhances blood circulation in fractured site. It can accelerate fracture healing in osteoporotic rats.

【Key words】 Osteoporosis; Fracture healing; Vascular endothelial growth factor; Osteoblasts

老年骨质疏松性骨折愈合困难, 甚至不愈合, 目前的治疗方法疗效不尽理想。近年来, 成骨细胞同种异体移植^[1], 促进骨折愈合的研究正引起重视。本文应用 SD 雄性乳鼠颅骨骨膜分离培养成骨细胞, 移植到老龄雌性鼠的实验性骨缺损处, 观察促进骨缺损修复的作用, 并应用分子生物学技术观察血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在骨折不同阶段的表达。

材料和方法

1. 实验动物: 由本校实验动物中心提供。SD 大鼠 (清洁级), 雌性, 15~18 月龄, 体重 400~450 g, 以体重差小于 20 g 配对, 80~90 只, 分笼饲养。

2. 动物模型建立: 无菌技术和麻醉状态下 (3% 戊巴比妥钠, 40 mg/kg 体重腹腔内注射)。用骨科钻在单侧胫骨中上段钻取直径 3 mm 的骨缺损, 其深度为一侧骨皮质与骨髓直径之和, 逐层缝合骨缺损表面的骨膜和肌肉层。

3. 成骨细胞移植: ①成骨细胞培养: 参阅文献 [2]; ②细胞悬液的制备: 胰酶消化、收集于离心管内, 离心 $1000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min; 弃上清, 用无血清培养液洗 2 次, 离心 $1000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min; 弃上清, 加入无血清培养液打散细胞团, 计数细胞数, 吸入注射器备

基金项目: 广东省重点科技攻关项目资助 (9622050-03)

作者单位: 510060 广州, 中山医科大学肿瘤医院病理科 (曾敬), 中山医科大学附一院骨科 (徐栋梁), 中山医科大学病理教研室 (丘钜世、吴惠茜、张萌、梁惠珍)

移植用;在实验组注入成骨细胞 2×10^6 个/0.2 ml;对照组注入等量无血清培养液。

4. 标本的收集和处理:手术后 3、7、10、14、21、28、56、84 d 处死(每次处死实验组及对照组大鼠各 5 只),取胫骨,于 10% 福尔马林中固定 24 h,先行 X 射线摄片,记录结果。后硝酸脱钙 4~5 h,石蜡包埋,作 $5 \mu\text{m}$ 连续切片。HE 染色、免疫组化及原位杂交。

5. 免疫组化染色(SP 法)及原位杂交,所用试剂:兔抗 VEGF 购于北京中山公司,浓度 1:50,SP、DAB 试剂盒购于福建迈新公司,VEGF 探针、原位杂交试剂盒购于武汉博士德生物制品公司。

6. VEGF mRNA 原位杂交:VEGF 寡核苷酸探针来源于:人基因 NM003376 GI4507884-①65-95(探针系列-CGAGA TGGAG GTGGT ACGGT CCGAC-);②大鼠基因 541-575(探针系列-GCTGC AACTC AATTT GCTTG CATGA ACGTC CCCAC-);③ AA924335 GI234475 121-155(探针系列-TTTGA CGAGATCTCT GTTC TGCAC TACAA TTATA-)。人和小鼠、大鼠有较高的同源性。原位杂交的具体步骤:①常规脱蜡水化(冰冻切片从②步开始);②3% H_2O_2 , 室温 15 min;③胃蛋白酶消化,37℃ 15 min;④PBS 洗 5 min \times 3 次;⑤杂交:每张切片加 20 μl 含地高辛标记探针的原位杂交液。37℃ 杂交过夜;⑥ $2 \times \text{SSC}$ 5 min \times 3 次; $0.2 \times \text{SSC}$ 5 min \times 3 次;⑦封闭液室温 20 min;⑧加抗地高辛抗体 37℃ 60 min;⑨PBS 洗 5 min \times 3 次;⑩加羊抗兔 IgG;37℃ 30 min;⑪PBS 5 min \times 3 次;⑫加 SABC,37℃ 30 min;⑬PBS 5 min \times 3 次;⑭DAB 显色,复染,封固。原位杂交所设置的对照包括:①阳性对照(肝癌);②同一阳性切片的连续切片先经 RNA 酶消化 37℃ 1 h 后再进行原位杂交;③自身空白对照,同一阳性切片的连续切片,平行操作,以预杂交液代替杂交液。

7. 观察摄片:用显微镜观察实验组与对照组阳性细胞形态及分布,并从取材不同时相观察细胞阳性产物的动态变化,进行真彩色图像分析(德国 Koutron 公司 IBAS 真彩色图像分析仪,见表 2)。数据处理:图像分析结果的处理根据申洪推荐^[3]的方法,算出阳性单位值(Pu)。
$$\text{Pu} = 100 \times |G_a - G_n| / (1 - A_n) \times G_{\text{max}}$$
 (G_n 、 G_a 分别为不考虑灰度设定方法时 A 区域及 A 区域中阳性反应产物 a 的灰度级。 A_n 为 a 在 A 区中的面积密度, G_{max} 为仪器的最大灰度分级。

结 果

1. X 射线和组织学显示:实验组:术后 7 d 纤维骨痂形成,有软骨岛出现;术后 14 d 软骨性骨痂形成并取代纤维性骨痂,出现网状的类骨小梁结构,有钙盐沉着,并与软骨相连;术后 21 d 新生骨组织与旧骨组织出现融合,骨小梁结构增加并日趋成熟;术后 28 d 成熟的骨小梁组织形成网状;术后 56~84 d 软骨性骨痂已逐渐被骨性骨痂取代,小梁状骨经改建成熟,与主应力方向一致,骨折部位髓腔再通,出现成熟板层骨,骨折基本愈合。对照组:术后 7 d 有血肿部分机化,未见典型纤维性骨痂,软骨岛几乎不见;术后 14 d 可见有少量软骨岛出现,偶见孤立的骨小梁样结构;术后 21 d 新生骨组织大都游离与孤立存在,与旧骨组织相连者少;术后 28 d 骨小梁仅有少部分连成网状;术后 56~84 d 部分骨缺损存在,不见成熟板层骨,可见部分编织骨,大部分髓腔不通,骨折愈合延迟。

2. 免疫组化结果:VEGF 阳性为胞浆内棕色颗粒(图 1)。在骨折修复过程中,VEGF 的表达有动态规律性(如表 1)。

3. 免疫组化图像分析结果

表 1 VEGF 在骨折不同时相免疫组化结果

术后天数(d)	实验组	对照组
3	在骨缺损处,有血肿形成,可见大量血细胞及少许炎症细胞,几乎未见阳性细胞,有少量细胞外阳性信号	基本未见阳性细胞和细胞外阳性信号
7	肉芽组织及纤维性骨痂组织中出現部分阳性细胞,阳性程度稍强	肉芽组织出现,有少量阳性细胞,阳性程度弱
10~14	出现软骨岛及新生骨小梁,有大量阳性细胞,阳性程度强,阳性细胞的类型有:间充质细胞、吞噬细胞、新生血管内皮细胞、软骨细胞等,其中软骨细胞的阳性最强,阳性细胞数目最多	有少量软骨岛出现,未见明显骨小梁形成,阳性细胞少见,阳性程度弱
21	持续有阳性细胞存在,以新生血管内皮细胞阳性强	阳性细胞存在,阳性程度稍强
28	阳性细胞数下降,肌细胞内残存少量阳性信号,阳性程度减弱	阳性程度减弱
56~84	阳性细胞已基本消失	阳性细胞已基本消失

表2 VEGF骨折愈合不同时相的免疫组化图像分析结果 (Pu ± △s)

组别	3d	7d	10d	14d	21d	28d	56d	84d
实验组	114.59	282.15	450.98	569.11	520.90	268.76	122.20	67.52
	± 5.12	± 3.17	± 2.12	± 4.32	± 6.78	± 10.9	± 8.17	± 6.43
对照组	68.25	148.95	167.01	169.65	237.02	190.84	99.81	84.44
	± 5.34	± 4.56	± 7.13	± 3.67	± 6.01	± 12.7	± 9.14	± 7.11



图1 实验组术后14 d软骨细胞中 VEGF(+) (IHC) 200×

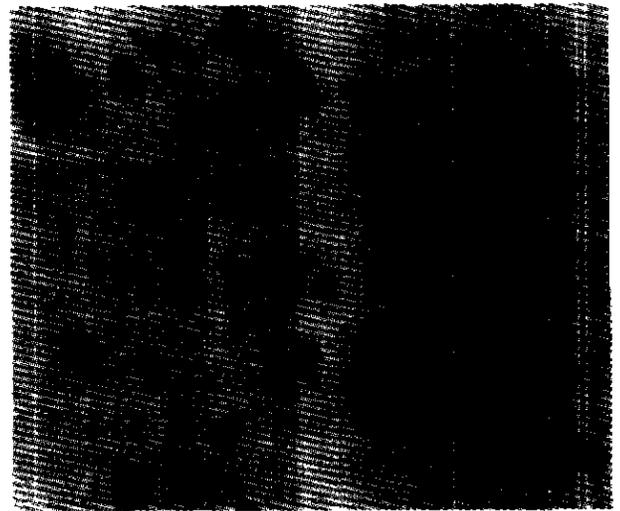


图2 实验组术后14 d软骨细胞中 VEGFmRNA(+) (ISH) 400×

4. 原位杂交结果: VEGFmRNA 阳性信号为胞浆内棕色颗粒(主要分布在胞浆内, 图2)。

实验组骨折3 d时, VEGFmRNA 为阴性。7 d时开始出现 VEGFmRNA 阳性, 阳性细胞主要为纤维骨痂中的成纤维细胞和血管内皮细胞。VEGFmRNA 在14~21 d时处于最旺盛合成分泌时期, 此期阳性细胞主要位于软骨性骨痂中的软骨细胞, 软骨细胞增殖活跃。以后逐渐减弱, 到84 d时, 已完全消失。对照组骨折3 d时, VEGFmRNA 为阴性, 7 d时开始出现 VEGFmRNA 弱阳性信号, VEGFmRNA 在14~21 d时阳性信号较强, 但不见明显分泌高峰, 以后逐渐减弱消失。所设置对照: 阳性对照呈阳性, 阴性及空白对照为阴性。

讨 论

本实验中, 实验组的成骨细胞移植后, 可在受体骨折部位局部生存, 生长繁殖, 其纤维性骨痂、软骨岛形成出现时间早(术后7 d), 生长快。而对照组软骨岛出现时间晚(术后14 d), 骨小梁成熟者少, 骨痂内多为岛屿状孤立骨小梁, 同种异体成骨细胞移植可促进骨质疏松性骨折愈合。VEGF(血管内皮生长因子)是1989年 Ferrara^[4]等人从牛垂体滤泡星状细胞体外培养液首先分离纯化出来的。VEGF最重要

的生物学活性就是特异地作用于内皮细胞, 促其增殖和生长血管^[5]。本实验结果显示: 骨折3 d时, VEGFmRNA 为阴性, 在细胞外间质中有少量 VEGF, 7 d时开始出现 VEGF 与 VEGFmRNA 阳性, VEGF 与 VEGFmRNA 在14~21 d时处于最旺盛合成分泌时期, 与骨折愈合过程中骨形成时间同步。因此, 我们可推想, VEGF 首先来自血肿中血小板和坏死细胞的释放, 然后由自身细胞开始合成, 并释放发挥作用。实验组比对照组 VEGF 含量增高, 时间与骨形成时间一致, 有利于骨折部位血管网络的建立, 促进骨折缺损区的新陈代谢, 加速骨折愈合。对照组 VEGF 和 VEGFmRNA 两者含量均低, 这说明对照组 VEGF 含量低与低转录有关, 而与蛋白质的翻译无关。要提高组织中蛋白质的含量, 应着眼于提高细胞基因转录, 从而促进相应蛋白的翻译合成。可见, 移植的成骨细胞促进了 VEGF 的合成分泌, 对促进骨折愈合有积极意义。研究证实 VEGF 在骨形成和代谢中的作用主要是: 通过促血管生成参与骨发育形成^[6]; 如骨质疏松其骨组织中存在血流下降和窦状微血管缺损^[7]。VEGF 可特异作用于内皮细胞, 发挥其生理调节作用。VEGF 作为旁分泌的因子参与

骨形成与代谢; VEGF 促进内皮细胞增生参与骨愈合, 无论在纤维性骨痂软骨骨痂和骨性骨痂, 内皮细胞形成毛细血管, 把营养带入并带走代谢产物。软骨骨痂的软骨成骨过程中, 尤其依赖新生血管的长入, 随着软骨细胞的死亡, 血管连同成骨细胞侵入软骨骨痂, 然后使软骨骨痂演变为骨性骨痂。因此 VEGF 可作为一种生物制剂, 用于骨折、骨缺损、骨不连、骨质疏松等伤、病的治疗, 在促进骨修复方面的前景非常广阔。

目前关于导致骨不连的确切机制虽然还不完全明了, 但已经知道骨的再生修复需要 3 个基本过程^[8]: ①创伤部位成骨细胞的募集: 骨折部位成骨细胞的聚集是骨形成的基础; ②诱导骨形成: 在诱导骨形成的各生长因子诱导下, 细胞增殖分化及基质合成, 对骨折修复的启动、调控及塑形起重要作用; ③创伤部位血管网络的建立: 创伤部位毛细血管长入的速度和深度, 为组织的修复带人必须的营养, 促生长因子及足量的钙质, 对加强创伤部位与周围组织的信息传导沟通, 物质交换有重要意义。骨折断端周围未分化间充质细胞的分化方式取决于局部的血供因素和应力因素^[9]。目前我们知道 VEGF 与这一作用密切相关。异体骨移植中, 其新骨替代逊于自体骨移植, 也与初期的血管阻塞变性、坏死造成的血供重建延迟有关^[10]。因此, 促进骨折愈合过程中, 对该环节的重视应是非常必要的。在骨折愈合的过程中, 这 3 个环节相互依赖, 相互协调, 相互重叠地作用。透彻地了解诸多生长因子与三者的网络关系, 对揭示骨折愈合的机制有重要意义。

在本实验中, 从骨再生修复的 3 个基本过程来看, 成骨细胞移植首先为骨形成募集了一定的细胞数, 参与成骨作用, 对老年性骨质疏松因成骨细胞能力下降, 而导致的骨不连具有特殊意义; 其次, 细胞

移植后可见 VEGF 分泌量增加, 出现高峰与对照组相比, 峰值增高, 时相提前, 对骨诱导起积极作用; 再者, 由于 VEGF 促血管内皮和毛细血管生成作用, 对建立良好的血液循环网络, 促进骨形成有积极作用。从移植细胞的远期效应及转归来看, 未见明显不良反应。因此, 幼龄成骨细胞移植可考虑作为促进老年骨质疏松性骨折愈合的一个有效手段。它具有非常广阔的应用前景和临床价值。

参 考 文 献

- 1 Uchida A, Kikuchi T, Shimomura Y. Osteogenic capacity of cultured human periosteal cells. *Acta Orthop Scand*, 1988, 59:29.
- 2 曹敬, 丘钜世, 徐栋梁, 等. 成骨细胞培养及冻存复苏后生物学特性比较. *临床与病理学杂志*, 2000, 2:137-140.
- 3 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究(Ⅲ). *中国组织化学与细胞化学杂志*, 1995, 4(1):89-91.
- 4 Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 161:851-862.
- 5 Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, et al. Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblast *in vitro*. *Plast Reconstr Surg*, 1999, 104:738-747.
- 6 Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, et al. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells *in vitro*. *Plast Reconstr Surg*, 2000, 106:1049-1061.
- 7 Bunkhardt B, Kettner G, Bokm W, et al. Changes in trabecular bone: hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia. Primary osteoporosis and old age. *Plast Reconstr Surg*, 1983, 72:572-675.
- 8 Cornell CN. Newest factors in fracture healing. *Clin Orthop*, 1992, 277:297.
- 9 Anders H. Current concepts of fracture healing. *Clin Orthop Rel Res*, 1989, 249:265-284.
- 10 Eppley BL, Doucet M, Connolly D, et al. Enhancement of angiogenesis by β -FGF in mandibular bone graft healing in the rabbit. *J Oral Maxillofac Surg*, 1988, 46:391.

· 消息 ·

我国首部《骨细胞图谱与骨细胞体外培养技术》出版

建立骨细胞体外培养技术是开展骨细胞生物学、骨代谢分子生物学机制和骨质疏松症防治药物研究的基础。复旦大学医学院(原上海医科大学)骨代谢研究室王洪复教授主编、由上海科技出版社出版的《骨细胞图谱与骨细胞体外培养技术》一书展示了成骨细胞、破骨细胞在生理、病理过程中及药物处理后的形态、功能表达和代谢反应, 并介绍了骨细胞体外培养实验技术和常用试剂配制、骨片制作方法, 内容新颖、图像清晰, 具有形态和功能相结合和全面、实用等特点。对从事骨代谢基础研究和代谢性骨病临床工作者是一本难得的参考工具书。

每本 48 元, 10 本以上九折优惠。 联系地址: 上海市斜土路 2094 号, 邮编 200032