

· 论 著 ·

BMP-2/VEGF 双基因活化纳米骨浆对提高骨质疏松椎体强度的实验研究

杨震 吴兴林 李建扬 潘伟 简月奎 李波*

贵州省人民医院, 贵州 贵阳 550002

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 12-1531-05

摘要: **目的** 证明 BMP-2/VEGF 双基因活化纳米骨浆是椎体成形术(PVP)的理想填充材料。**方法** 首先构建并验证了 BMP-2/VEGF 双基因活化纳米骨浆构建成功,然后由生物力学测试分析注射入椎弓根和已有骨质坍塌的椎体 BMP-2/VEGF 双基因活化纳米骨浆后椎体的最大载荷。随后,应用双侧卵巢切除术构建山羊骨质疏松模型,研究与对照相比注射 BMP-2/VEGF 双基因活化纳米骨浆前和后山羊血清的碱性磷酸酶、骨钙素、最大载荷、椎体的骨密度和微观三维结构的改变。**结果** BMP-2/VEGF 双基因活化纳米骨浆可以明显增加椎体的最大压缩载荷和最大压缩应力明显增加($P=0.039, 0.010$),同时注射入已有骨质坍塌的最提椎体 BMP-2/VEGF 双基因活化纳米骨浆后椎体的最大压缩载荷和最大压缩应力明显增加($P<0.001, P=0.030$);山羊骨质疏松模型中,碱性磷酸酶和骨钙素明显下降($P=0.018, P<0.001$),骨密度明显下降,骨小梁明显稀疏。注射入 BMP-2/VEGF 双基因活化纳米骨浆后山羊骨密度明显增加,最大压缩载荷增加($P=0.0072$),最大压缩应力增加($P=0.0024$);椎骨小梁更加致密,孔隙率降低。**结论** 本实验证明了 BMP-2/VEGF 双基因活化纳米骨浆是椎体成形术(PVP)的理想填充材料,可以提高椎体的骨密度和强度。

关键词: 骨质疏松;双基因活化纳米骨浆;椎体成形术;动物实验;山羊

An experimental study of BMP-2/VEGF dual gene activated nanobone putty on improving the strength of osteoporotic vertebrae

YANG Zhen, WU Xinglin, LI Jianyang, PAN Wei, JIAN Yuekui, LI Bo*

Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China

Corresponding author: LI Bo, Email: Libo3@medmail.com.cn

Abstract: **Objective** To evaluate whether BMP-2/VEGF dual gene activated nanobone putty is an ideal filler for vertebroplasty (PVP). **Methods** Firstly, we established and validated VEGF dual gene activated nanobone putty. Then, biomechanical analysis was used to observe the maximum loading in centrum pedicle and collapsed vertebral body injected with the BMP-2/VEGF dual gene activated nanobone putty. Finally, goat bilateral oophorectomy was used to established a model of osteoporosis and explore the change in goat serum alkaline phosphatase and osteocalcin, microscopic three-dimensional structure, maximum loading and structure of the trabecular bone before and after injecting the BMP-2/VEGF dual gene activated nanobone putty compared with the negative controls. **Results** BMP-2/VEGF dual gene activated nanobone putty could increase the maximum loading and compression stress of the vertebral body significantly ($P=0.039, 0.010$). The maximum loading and compression stress increased significantly in the collapsed vertebral body after injecting the BMP-2/VEGF dual gene activated nanobone putty ($P<0.001, P=0.030$). In the goat osteoporosis model, serum alkaline phosphatase and osteocalcin levels increased ($P=0.018, P<0.001$), and bone mineral density and trabeculae number reduced. Injection of the BMP-2/VEGF gene activation double putty increased bone mineral density and maximum loading ($P=0.0072$), maximum compression stress ($P=0.024$) and lowered porosity. **Conclusion** The study findings revealed that the BMP-2/VEGF dual gene activated nanobone putty is an ideal filler for vertebroplasty (PVP) and increases vertebral bone density.

Key words: Osteoporosis; Dual gene activated nanobone putty; Vertebroplasty; Animal experimentation; Goats

基金项目: 贵州省科学技术基金(黔科合 J 字[2010]2184 号, gzwkj2009-1-003)

* 通讯作者: 李波, Email: Libo3@medmail.com.cn

骨质疏松中最常见的是脊柱骨质疏松^[1-2]。早期脊柱骨质疏松的治疗主要以药物为主和佩戴支具治疗^[3]。然而,药物治疗骨质疏松见效慢,很难在发病期间迅速提高骨强度而使患者更易发生骨折坍塌的危险。因此,寻找能迅速改善骨密度,防止出现骨折坍塌的治疗手段迫在眉睫。

随着材料工程和骨组织功能的发展,纳米骨浆是将结构仿生和材料仿生相结合从而体现出高度仿生特性的材料^[4]。纳米骨浆的主要成分是那马结晶羟基磷灰石和磷酸钙,可以替代骨组织,具有吸收性好和高度生物相容性的优势^[5-6]。最近的研究发现,将纳米骨浆与 BMP-2 真核表达质粒相融合,可以形成基因局部释放系统具有更强的成骨效能和更高的骨质量^[7-8]。然而,单纯增强骨诱导对于骨修复的效果仍然需要进一步改善。研究构建了 BMP-2/VEGF 双基因纳米骨浆系统,试图证明 BMP-2/VEGF 双基因活化纳米骨浆是椎体成形术(percutaneous vertebro plasty, PVP)的理想填充材料。

1 材料方法

1.1 实验动物

取健康中年雌性山羊 16 只,平均年龄(6.38 ± 0.68)岁,平均体重(39 ± 2)kg,行卵巢切除手术后建立骨质疏松模型。

1.2 纳米骨浆

购自 Cem Osteic™, Berkeley Advanced Biomaterials 公司。

1.3 pIRES-hBMP2/真核表达载体的构建

为华中科技大学同济医学院分子生物中心实验室构建,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 ℃,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。

1.4 血液生化指标检测

取山羊血清加入到含有促凝剂的生化采血管中交由贵州省人民医院检验科检测血清的碱性磷酸酶和骨钙素水平。

1.5 Micro CT 扫描

将山羊脊椎分离为单个椎体,去除周围肌肉、韧带及椎间盘组织。采用 1.5 cm 的环钻,钻取山羊椎体松质骨。皮质骨扫描分析方法:将椎体制成环形

皮质骨块,每 5 个样本为一组进行扫描。感兴趣区(region of interest, ROI)取一侧的椎体全层厚度进行重建分析。所有标本扫描分辨率设置为 21 μm。

1.6 生物力学测试

采用轴向加压实验测量椎体及股骨髁部松质骨的力学强度。测量时,将圆柱形的椎体骨块置于加压模具之间,逐渐施加轴向压力压缩到椎体长度的 50%。取压力曲线达到的峰值为松质骨最大抗压载荷,将最大载荷除以松质骨截面积即为最大抗压强度。采用 3 点弯曲实验测量皮质骨的力学强度。

1.7 数据统计

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 表示差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 BMP-2 和 VEGF 双基因活化骨浆的构建

选购于华中科技大学的 BMP-2 和 VEGF 双基因活化骨浆进行 RT-PCR 验证。结果如图 1 所示, BMP-2 和 VEGF 双基因活化骨浆的 BMP-2 和 VEGF 表达水平增强,符合实验要求。

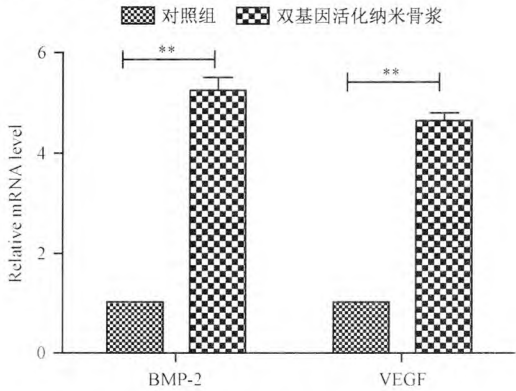


图 1 BMP-2 和 VEGF 表达水平增强

Fig.1 The expression level of BMP-2 and VEGF was enhanced

2.2 双基因活化纳米骨浆可以显著增加椎体的最大载荷

选取 10 具脊柱标本(T₉-T₁₂),经 Micro CT 扫描测试 40 个椎体的骨密度后显示所有椎体的骨密度一致。将 40 个椎体随机分为 3 组:I 组为空白对照组(*n* = 20);II 组为纳米骨浆组(*n* = 10);III 组为双基因活化骨浆组(*n* = 10)。在 C 形臂 X 线机监视

下,II、III 组经双侧椎弓根分别填充纳米骨浆和基因活化纳米骨浆。而后,在万能材料实验机上将所有椎体压缩至原始高度的 50% 后发现 II、III 组的椎骨最大载荷和最大压缩应力增加,III 组增加更加显著 ($P < 0.05$),见表 1。因此,基因活化纳米骨浆可以明显增加压缩后椎体的最大载荷。

表 1 不同骨浆组脊椎椎体的最大压缩载荷和最大压缩应力

Table 1 The maximum loading and compression stress of spinal vertebral body in different bone putty group						
组别	最大压缩载荷(N)	<i>t</i>	<i>P</i>	最大压缩应力(N/cm ²)	<i>t</i>	<i>P</i>
空白对照组(<i>n</i> = 20)	1076 ± 278			956 ± 198		
纳米骨浆组(<i>n</i> = 10)	1198 ± 81			984 ± 48		
双基因活化骨浆组(<i>n</i> = 10)	1382 ± 245	2.25	0.039	1052 ± 57	2.89	0.010

随后,在 I 组中选取 15 个椎体,分为 IA、IB 和 IC 组,每组 5 个椎体,压缩后分别填充纳米骨浆和基因活化纳米骨浆,将所有椎体压缩至原始高度的 50% 后检测椎体的最大载荷和最大压缩应力。结果如表 2 所示,在填充基因活化纳米骨浆后,最大压缩载荷和最大压缩应力显著升高 ($P < 0.001$)。

表 2 不同骨浆组压缩后椎体的最大压缩载荷和最大压缩应力

Table 2 The maximum loading and compression stress of spinal vertebral body in different bone putty group after compression						
组别	最大压缩载荷(N)	<i>t</i>	<i>P</i>	最大压缩应力(N/cm ²)	<i>t</i>	<i>P</i>
IA(<i>n</i> = 5)	2158 ± 564			1269 ± 168		
IB(<i>n</i> = 5)	2216 ± 102			1356 ± 251		
IC(<i>n</i> = 5)	300 ± 245	16.14	< 0.001	1587 ± 211	2.64	0.030

2.3 山羊模型中,双基因活化纳米骨浆对椎体骨密度、骨小梁微观结构及力学强度的作用

取 6~7 岁健康中年雌性山羊 16 只,使用 Micro CT 扫描显示所有山羊骨密度一致。随后,将山羊随机分为 3 组:I 组为正常组(*n* = 4);II 组为假手术组(*n* = 4,开腹后缝合切口);III 组为双侧卵巢切除术

组(*n* = 8,切除山羊双侧卵巢)。术前和术后 6 个月分别检测血清中的碱性磷酸酶和骨钙素。3 组为双侧卵巢切除术组的骨质疏松模型中生化指标一致。与假手术组相比,双侧卵巢切除术模型组碱性磷酸酶和骨钙素明显下降。见表 3。

表 3 不同组别碱性磷酸酶检测结果

Table 3 The detection results of alkaline phosphatase in different treatment groups						
组别	碱性磷酸酶(U/mg)	<i>t</i>	<i>P</i>	骨钙素(μg/L)	<i>t</i>	<i>P</i>
正常组(<i>n</i> = 4)	0.241 ± 0.020			5.812 ± 0.175		
假手术组(<i>n</i> = 4)	0.214 ± 0.031			5.230 ± 0.826		
双侧卵巢切除术组(<i>n</i> = 8)	0.165 ± 0.027	2.83	0.018	3.268 ± 0.241	6.47	< 0.001

II、III 组术后 6 个月各组取 2 只动物测定骨密度并观察骨小梁结构。Micro CT 扫描结果如图 2 所示,双侧卵巢切除手术组的骨密度明显下降,骨小梁明显稀疏。

2.4 山羊模型中,双基因活化纳米骨浆对骨质疏松的治疗效果观察

随后,笔者随机取每只羊的 L₂-L₆ 中的两节椎体在分离麻醉下通过椎弓根注射途径分别填充纳米骨浆、双基因活化骨浆双基因活化纳米骨浆,4 个月后处死动物,取出椎体检测骨密度和结构力学强度。与纳米骨浆相比,注射双基因活化纳米骨浆后椎体

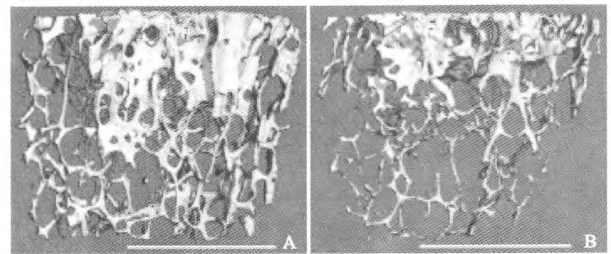


图 2 对照组和双侧卵巢切除手术组的三维重建图像。A:对照组;B:双侧卵巢切除手术组

Fig.2 3D reconstruction image of the control group and the bilateral ovaries removed group. A: Control group; B: Bilateral ovarian resection group

的骨密度明显增加,最大压缩应力明显增加,椎骨小梁更加致密,孔隙率降低。见图 3、表 4。

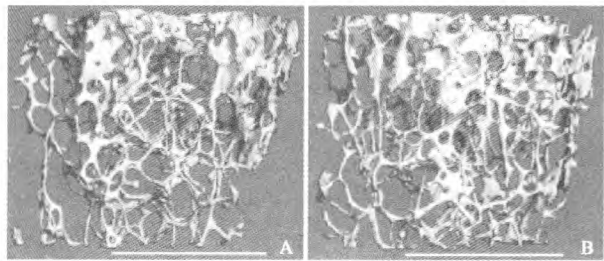


图 3 纳米骨浆组和双基因活化骨浆组的三维重建图像。A:纳米骨浆组;B:双基因活化骨浆组

Fig.3 3D reconstruction image of Nano bone putty group and double gene activation bone putty group. A: Nano bone paste group; B: Dual gene activated bone paste group

3 讨论

骨质疏松是临床常见的病症,其主要改变是骨质减少、骨小梁减少及其间隙增宽。由于骨小梁减少,所以骨质疏松症患者极容易出现骨折^[10]。

双基因纳米骨浆是由从纳米骨浆发展而来的基因纳米骨浆的延续,主要是通过构建双基因的真核表达载体与纳米骨浆混合后,使骨质填充物同时拥有纳米骨浆和基因表达的优势^[11]。纳米骨浆具有高度仿生的特性,既可以提供适宜的微环境促进胶原和矿物质沉积,促进成骨细胞的粘附,又可以促进细胞和生物材料之间的相互作用,诱导成骨细胞的分化^[12]。而应用分子生物学技术的真核表达 BMP-2/VEGF 载体可以在植入局部组织后产生生物学效应,具有诱导成骨细胞的生成能力^[13]。

表 4 山羊模型中不同骨浆组脊椎椎体的最大压缩载荷和最大压缩应力

Table 4 The maximum loading and compression stress of spinal vertebral body in different bone putty group in the goat osteoporosis model

组别	最大压缩载荷(N)	t	P	最大压缩应力(N/cm ²)	t	P
对照组(n=4)	561±56			563±96		
纳米骨浆组(n=4)	769±68			743±83		
双基因活化骨浆组(n=4)	945±129	4.00	0.007	874±28	2.99	0.024

在本实验中,笔者构建了纳米骨浆和 BMP-2/VEGF 载体混合的双基因纳米骨浆并通过 RT-PCR 验证该混合纳米骨浆构建成功。同时将骨密度一致的椎体分为向椎弓根注射空白对照组、纳米骨浆组和双基因纳米骨浆组,观察不同处理因素对椎骨的最大载荷的影响。通过生物力学分析检测发现,双基因纳米骨浆组的椎骨最大负荷明显增加。也就是说注射双基因纳米骨浆后椎骨对承受外界压力的能力明显增强。随后,将已经压缩的椎体注射纳米骨浆和双基因纳米骨浆观察双基因纳米骨浆对已经发生坍塌的椎体的负荷的影响。此时,与对照组相比,纳米骨浆对椎体的负荷没有影响,而双基因纳米骨浆可以大大提高椎体的负荷能力。

同时,笔者应用双侧卵巢切除的雌性山羊骨质疏松模型,模型构建成功后分别向椎体注射纳米骨浆和双基因纳米骨浆观察双基因纳米骨浆对山羊骨质疏松的椎体强度的影响。术后 6 个月后,发现双基因纳米骨浆组的山羊碱性磷酸酶和骨钙素明显增加,骨密度下降,骨小梁稀疏,可以说明骨质疏松模型构建成功。最后,笔者将对照组、纳米骨浆和双基因纳米骨浆注入山羊椎体观察双基因纳米骨浆对骨

质疏松椎体强度的影响。结果发现注射入双基因纳米骨浆后椎体的骨密度明显增加,最大压缩应力明显增加,椎骨小梁更加致密,孔隙率降低。

【参 考 文 献】

[1] Uebelhart D, Bernard J, Hartmann DJ, et al. Modifications of bone and connective tissue after orthostatic bed rest. Osteoporos Int, 2000, 11(1): 59-67.

[2] Nishimura Y, Fukuoka H, Kiriya M, et al. Bone turnover and calcium metabolism during 20 days bed rest in young healthy males and females. Acta Physiol Scand Suppl, 1994, 616(5): 27-35.

[3] Vaccaro AR, Chiba K, Heller JG, et al. Bone grafting alternatives in spinal surgery. Spine J, 2002, 2(3): 206-215.

[4] Durrieu MC, Pallu S, Guillemot F, et al. Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion. J Mater Sci Mater Med, 2004, 15(7): 779-786.

[5] 罗萍,张阳德,彭健,等.具有自塑能力可吸收注射型纳米骨浆.中国现代医学杂志,2003, 13(18):1-6,10.

Luo P, Zhang YD, Peng J, et al. Bioresorbable self-setting injectable nanobone putty. China Journal of Modern medicine, 2003, 13(18): 1-6, 10. (in Chinese)

(下转第 1544 页)

- and B12) supplementation on osteoporotic fracture and bone turnover markers: a meta-analysis. *Med Sci Monit*, 2015, 21(8): 75-81.
- [25] 黄武, 廖二元, 刘幼硕, 等. 血清总同型半胱氨酸、叶酸、维生素 B12 与老年男性骨密度的关系. *中国老年学杂志*, 2006, 26(3): 287-289.
- Huang W, Liao EY, Liu YS, et al. Serum total homocysteine, folic acid, vitamin B12 and elderly male bone density relationship. *Chinese Journal of Gerontology*, 2006, 26(3): 287-289. (in Chinese)
- [26] Cagnacci A, Ragni B, Zini A, et al. Relation of folates, vitamin B12 and homocysteine to vertebral bone mineral density change in postmenopausal women. *Bone*, 2008, 42(2): 314-320.
- [27] Cagnacci A, Baldassari F, Rivolta G, et al. Relation of homocysteine, folate, and vitamin B12 to bone mineral density of postmenopausal women. *Bone*, 2009, 16(2): 14-20.
- [28] Gjesdal CG, Vollset SE, Ueland PM, et al. Plasma total homocysteine level and bone mineral density: the Hordaland homocysteine study. *Arch Intern Med*, 2006, 166(1): 88-94.
- [29] Luckock M. Folic acid nutritional biochemistry molecular biology and role in disease processes. *Mol Genet Metab*, 2000, 71(1): 21-38.
- [30] Agnacci A, Baldassari F, Rivolta G, et al. Relation of homocysteine folate and vitamin B12 to bone mineral density of postmenopausal women. *Bone*, 2003, 33(33): 956-959.
- [31] Carmel R, Lau W, Baylink D, et al. Cobalamin and osteoblast-specific proteins. *New England Journal of Medicine*, 1988, 319(2): 70-75.
- [32] Vaes BLT, Lute C, Blom HJ, et al. Vitamin B(12) deficiency stimulates osteoclastogenesis via increased homocysteine and methylmalonic acid. *Calcif Tissue Int*, 2009, 84(5): 413-422.
- [33] Herrmann M, Widmann T, Colaianni G, et al. Increased osteoclast activity in the presence of increased homocysteine concentrations. *Clin Chem*, 2005, 51(12): 2348-2353.
- [34] Kim GS, Kim CH, Park JY, et al. Effects of vitamin B12 on cell proliferation and cellular alkaline phosphatase activity in human bone marrow stromal osteoprogenitor cells and UMR106 osteoblastic cells. *Metabolism-clinical & Experimental*, 1996, 45(12): 1443-1446.
- [35] Vaes BLT, Lute C, Woning SPVD, et al. Inhibition of methylation decreases osteoblast differentiation via a non-DNA-dependent methylation mechanism. *Bone*, 2010, 46(2): 514-523.
- [36] Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, de Groot LC, et al. Homocysteine and vitamin B12 status relate to bone turnover markers, broadband ultrasound attenuation, and fractures in healthy elderly people. *Bone Miner Res*, 2005, 20(6): 921-929.
- [37] 廖祥鹏, 张增利, 张红红, 等. 维生素 D 与成年人骨骼健康应用指南(2014 年标准版). *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(9): 1011-1030.
- Liao XP, Zhang ZL, Zhang HH, et al. A guide for the application of vitamin D and bone health in adults (2014 Standard Edition). *Chinese Journal of osteoporosis*, 2014, 20(9): 1011-1030. (in Chinese)

(收稿日期: 2016-05-08; 修回日期: 2016-06-26)

(上接第 1534 页)

- [6] 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. *中国临床医学杂志*, 2007, 14(5): 678-680.
- Wang MH, Dong YH, Hong Y, et al. The experimental study on bone mineral density and biomechanics in bone defects after the application of the Nano tissue-engineered bone. *Clinical Medical Journal of China*, 2007, 14(5): 678-680. (in Chinese)
- [7] Parsons B, Strauss E. Surgical management of chronic osteomyelitis. *Am J Surg*, 2004, 188(Suppl): 57-64.
- [8] Chu TM, Sargent P, Warden SJ, et al. Preliminary evaluation of a load-bearing BMP-2 carrier for segmental defect regeneration. *Biomed Sci Instrum*, 2006, 42: 42-47.
- [9] 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.
- [10] Durrieu MC, Pallu S, Guillemot F, et al. Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion. *J Mater Sci Mater Med*, 2004, 15(7): 779-786.
- [11] Keibl C, Fögl 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.
- [12] 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. *中华骨科杂志*, 2007, 27(8): 604-608.
- Tian XB, Sun L, Yang SH, et al. Experimental investigations of the effect of the gene activated nanobone putty in inducing ectopic bone formation. *Chin J Orthop*, 2007, 27(8): 604-608. (in Chinese)
- [13] 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.

(收稿日期: 2016-07-20; 修回日期: 2016-09-08)