论著

文章编号:1000-5404(2007)05-0406-04

钙磷骨水泥复合 rhVEGF 与 rhBMP-2 促进异体大段骨移植再血管化的实验研究

瞿向阳,蒋电明,安 洪,梁 勇 (重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨钙磷骨水泥(calcium phosphate cement,CPC)复合重组人血管内皮细胞生长因子(recombinant human vascular endothelial growth factor,rhVEGF)+重组骨形态发生蛋白-2(recombinant human bone morphogenetic protein-2,rhBMP-2)促进大段异体脱蛋白骨(deproteinized bone,DPB)移植再血管化的能力。**方法** 成年杂交犬36只,距关节面30 mm切除右侧股骨下端制成半关节缺损模型,分成CPC/rhVEGF/rhBMP-2/DPB移植组(A组);rhVEGF/rhBMP-2/DPB移植组(B组);单纯的DPB移植组(C组)3组。于术后4、8、12、16周行X线检查、组织学检查、透射电镜检查、墨汁灌注微血管分析、放射性核素骨显像(ECT)检测,观察血管发生和新骨形成情况。**结果** A组在各时间点X线及组织学,其成骨能力和血管生成均优于B、C两组,血管墨汁灌注图像分析和ECT检测动脉灌注情况均优于B、C两组($P<0.01$),B、C组间在各时间点差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** CPC/rhVEGF/rhBMP-2/DPB可促进异体大段骨移植的成骨能力及局部血管早期形成,使移植体最终达到骨愈合成为自身组织。

关键词:钙磷骨水泥;脱蛋白骨;血管内皮细胞生长因子;骨形态发生蛋白;骨移植

中图法分类号:R318.08;R364.3;R687.34 **文献标识码**:A

Calcium phosphate cement with rhVEGF and rhBMP-2 promotes revascularization of big section bone allograft in dogs

QU Xiang-yang, JIANG Dian-ming, AN Hong, LIANG Yong (Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To explore the ability of revascularization of big section deproteinized bone (DPB) allograft combining calcium phosphate cement (CPC) with recombinant human vascular endothelial growth factor (rhVEGF) and bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). **Methods** Totally 36 adult hybrid dogs were inflicted to demi-articular defect models by exsecting 30 mm right femur inferior extremity near articular surface, and then randomly divided into 3 groups, group A, receiving material CPC/rhVEGF/rhBMP-2/DPB transplantation into the demi-articular defect, group B, material rhVEGF/rhBMP-2/DPB transplantation, and group C with simple material DPB transplantation. At 4, 8, 12 and 16 weeks after operation, vasculogenesis and new bone formation were assessed by X-ray examination, histological examination, transmission electron microscopy, vas capillare analysis by vaso-filling with ink and radionuclide bone imaging examination (ECT). **Results** The bone formation and vascularization was significantly superior in group A to that in group B and C. The results of vaso-filling examination with ink and arterial perfusion of ECT examination were both significantly superior to that in group B and C ($P<0.01$). But there was no significant difference between group B and C. **Conclusion** The materials CPC/rhVEGF/rhBMP-2/DPB can promote the bone formation and early formation of local blood vessels, even achieve bone healing and become autologous tissue.

Key words: calcium phosphate cement; deproteinized bone; vascular endothelial growth factor; bone morphogenetic protein; bone allograft

外伤、感染与肿瘤等原因引起的大段骨缺损是矫形外科医生面临的一大挑战。自体吻合血管的骨移植效果最佳,但供区来源有限,并发症多。本研究用钙磷骨水泥作为重组人血管内皮细胞生长因子(recombinant human vascular endothelial growth factor,rhVEGF)和重组骨形态发生蛋白-2(recombinant human bone morphogenetic protein-2,rhBMP-2)的载体复合大段同

基金项目:重庆市科技攻关项目[渝科发计字(2001)38号]
Supported by the Foundation for the Sci & Tech Research Project of Chongqing (2001)

作者简介:瞿向阳(1976-),男,四川省渠县人,博士研究生,医师,主要从事骨修复与重建、骨科生物活性材料方面的研究。电话:13193195695,E-mail:drqxy04090@126.com

通讯作者:蒋电明,电话:(023)89011212,E-mail:jdm571026@vip.163.com

收稿日期:2006-08-30;**修回日期**:2006-11-22

种异体脱蛋白骨移植，利用钙磷骨水泥生物降解的特性局部持续高浓度释放生长因子促进移植体的成骨和血供重建，使移植体与宿主早期达到骨愈合并最终“活化”成为自身组织。

1　材料与方法

1.1　材料的制备

1.1.1　人重组促血管内皮细胞生长因子（rhVEGF）　由北京博奥森生物技术有限公司提供。人重组骨形态发生蛋白 2（rhBMP-2）：由广州市达晖生物技术有限公司提供。钙磷骨水泥（CPC）：由上海瑞邦生物科技有限公司提供。

1.1.2　犬的股骨下端脱蛋白骨（DPB）　选成年杂交犬处死后取其双侧股骨下段（含关节端）长 30 mm，剔除骨膜及韧带软组织，经蒸馏水反复冲洗干净，以 20% 的过氧化氢脱蛋白，乙醚循环脱脂，皮质骨散在钻孔，制成脱蛋白骨关节材料，冻干，环氧乙烷消毒，低温保存备用。

1.1.3　DPB/rhVEGF/rhBMP-2 的制备　将 rhVEGF 和 rhBMP-2 冻干粉以重蒸水溶解，与脱蛋白骨股骨下端髁间孔钻孔处和近段截骨处进行滴注，冻干低温保存。

1.1.4　CPC/DPB/rhVEGF/rhBMP-2 的制备　将 rhVEGF 和 rhBMP-2 冻干粉以 CPC 固化液溶解混匀后，再与 CPC 粉末充分调和，在脱蛋白骨表面涂层并髓腔部分填塞。

1.2　实验分组与方法

1.2.1　实验分组　选取成年杂交犬（由重庆医科大学实验动物中心提供）36 只，雌雄不限，体质量（10 ± 0.5）kg，分成 3 组：A 组：CPC/rhVEGF/rhBMP-2/DPB 移植组；B 组：rhVEGF/rhBMP-2/DPB 移植组；C 组：单纯的 DPB 移植组。每组 12 只。

1.2.2　手术方法　以速眠新麻醉犬成功后，侧卧位固定于手术台上，常规消毒铺巾，取膝关节外侧切口，暴露股骨远段和胫骨近端，切断前后交叉韧带及内外侧副韧带，U 型切开骨膜并翻向近侧，距关节面 30 mm 处用线锯切断股骨，用交叉克氏针和钢丝将移植物固定于股骨断端，将翻向近端的骨膜拉下缝合覆盖移植物与断端结合部，复位膝关节修复关节囊，逐层缝合切口，分笼饲养，术后肌注青霉素 160 万 U，每日 2 次连用 3 d，用石膏外固定 2 周后去除。

1.2.3　观测方法

1.2.3.1　X 线检查　分别于术后 4、8、12、16 周摄 X 线，观察骨愈合情况、内固定有无松动断裂等，间接判断移植物的血管再生和成骨情况。

1.2.3.2　组织学检查　分别于 4、8、12、16 周取移植物与股骨近端结合部常规石蜡切片，HE 染色，光学显微镜观察成骨和血管生成情况。

1.2.3.3　透射电镜检查　分别于 4、8、12、16 周取标本行透射电镜检查，行成骨及血供重建定性鉴定。

1.2.3.4　墨汁灌注微血管分析　分别于 4、8、12、16 周取实验动物行股动脉插管，以肝素、生理盐水冲洗干净后用墨汁灌注，制成透明切片镜下观察，每张切片随机选择 5 个视野行图像分析进行计数分析，结果用面积积分光密度表示。

1.2.3.5　膝关节动脉灌注血流量的观察　分别于 4、8、12、16 周做动物骨同位素显像。采用美国 GEstarcom400Ac SPECT 仪，以锝亚甲基二磷酸盐（$^{99}Tc^{m}$-MDP）为示踪剂，剂量 18.10 MBq/kg，探头距双膝关节 10 cm，血流相矩阵 64 × 64，经足背浅静脉快速注入，同时开始采样，速度 1 帧/2 s，时间 3 min，膝关节血流量以手术侧峰值放射性计数与健侧相应部位峰值放射性计数之比表示。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SAS 8.2 统计软件行单因素方差分析。

2　结果

2.1　X 线观察

A 组：术后 4 周骨折线清晰，移植物密度较正常骨组织略高，断端可见有少量骨痂形成，8、12 周时断端间骨痂形成增多，骨折线趋于模糊，16 周可见大量环形骨痂形成，骨折线消失，达到骨愈合，移植物密度接近正常骨组织。

B 组：术后 4 周骨折线清晰可见，未见有明显骨痂形成，8 周时有少量骨痂，12 周时骨痂量增多，16 周时骨折线模糊，断端可见较多骨痂形成，移植物密度仍较正常骨组织高。

C 组：术后 4、8、12 周骨痂形成比 A、B 组时间延迟，量较少。至 16 周时仍可见骨折线，未见骨愈合，移植物密度与前比无明显变化，可见内固定的松动。

2.2　组织学检查

A 组：术后 4 周，移植物可见有大量的新生血管、间充质细胞及少量的炎性细胞及散在的成骨细胞和成软骨细胞。8、12 周时可见新生血管进一步增多，成骨细胞成熟伴编织骨的形成，大片编织骨向板层状骨组织转化，有骨的爬行替代现象（图 1）。16 周时大量的板层状骨组织形成，移植物-受体界面无明显分界，达到骨愈合，靠近关节面处可见软骨细胞团形成。

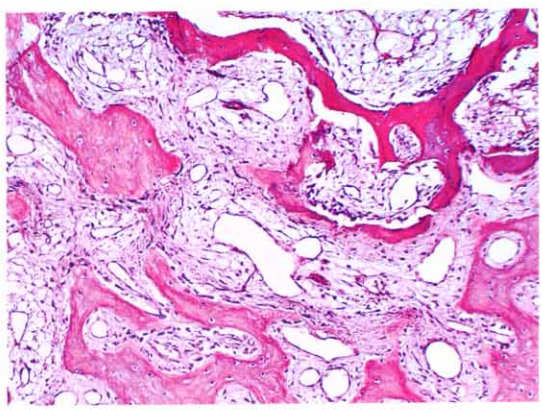


图 1　CPC/rhVEGF/rhBMP-2/DPB 移植组术后 8 周光镜观察　（HE × 200）

B 组：术后 4 周移植物内可见有新生血管、间充质细胞及较多的炎性细胞，未见有成骨活动。8 周时新生血管增多但明显较 A 组少，仍可见较多的炎性细胞，有散在的成骨细胞出现。12 周时可见有软骨细胞及编织骨的形成，16 周时编织骨形成增多，部分向板层状骨组织转化，移植物-受体分界线模糊，部分骨愈合，关节端未见有成软骨活动。

C 组：术后 4 周可见间充质细胞及大量的炎性细胞浸润，

偶见有新生血管。8 周时炎性细胞仍较多，少量新生血管长入，未见成骨活动。12 周时炎性细胞较前减少，可见少量新生血管及散在的成骨细胞和成软骨细胞。16 周时成骨细胞和软骨细胞增生成团，部分形成编织骨，未见明显的板层状骨组织，移植物-受体界线仍然清晰可见，未达到骨愈合，关节端未见有成软骨活动。

2.3 透射电镜检查

A 组 4 周可见大量间充质细胞、新生血管，8、12 周时以成骨细胞和成软骨细胞居多，新生血管较多，管腔狭小，内皮细胞呈柱状，细胞核大，常染色质均匀细密，异染色质少，胞质中富有细胞器，部分趋向成熟。16 周时细胞基本为成熟的骨细胞，部分已开始衰老，位于骨陷窝内，细胞核较大，核质染色深，核周围有薄层胞质，细胞器很少，细胞发出很长的胞质突起，深入骨小管中，细胞间质中主要为胶原纤维，仍可见较多的新生血管。

B 组 4 周时可见较多的炎性细胞浸润和间充质细胞的聚集，可见新生血管生成，8、12 周时炎性细胞减少，新生血管较少，16 周时可见少量的骨细胞，但成骨细胞较多，其成骨细胞体积小，呈多边形或不规则形，核呈卵圆形，较大，偏位，细胞质内可见较多的粗面内质网和线粒体，血管形成较少，偶见新生血管。

C 组 4 周时以炎性细胞和间充质细胞为主，血管发生较少，8、12 周时可见血管发生及成骨活动，16 周时可见少量幼稚骨细胞，幼稚骨细胞多呈圆形，体积多较大，核位于细胞偏侧，细胞内有较多的细胞器和粗面内质网，新生血管较少。

2.4 墨汁灌注微血管分析

A 组术后各期移植物内新生血管较多，部分趋向成熟，与 B、C 组比较均有统计学意义（$P<0.01$）。见表 1。

表 1 微血管图像分析（IOD/μm^2，$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	术后时间（t/周）			
	4	8	12	16
A	0.27±0.05	0.38±0.04	0.46±0.06	0.41±0.03
B	0.14±0.03[a]	0.21±0.05[a]	0.24±0.05[a]	0.23±0.04[a]
C	0.09±0.04[a]	0.12±0.05[a]	0.19±0.04[a]	0.22±0.03[a]

a：$P<0.01$，与 A 组相同时间点比较

2.5 膝关节动脉灌注血流量分析

术后 4 周时各组手术侧膝关节较对侧血流量均增高，但 A 组显著增高，8 周时进一步增高，12 周时达到顶峰，16 周时略有下降，但仍较 B、C 组高，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。见表 2。

表 2 膝关节动脉灌注血流量分析（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

组别	术后时间（t/周）			
	4	8	12	16
A	1.96±0.07	2.09±0.05	2.14±0.08	1.83±0.05
B	1.24±0.06[a]	1.31±0.07[a]	1.28±0.05[a]	1.14±0.08[a]
C	1.17±0.08[a]	1.25±0.09[a]	1.23±0.06[a]	1.16±0.07[a]

a：$P<0.01$，与 A 组相同时间点比较

3 讨论

DPB 具有天然骨组织的网孔状结构和良好的机械强度，主要成分是由钙和磷组成的非结晶相羟基磷灰石[1]，是一种具有与宿主骨相似的生物组织，是骨发生细胞附着的有利三维支架，有利于新生毛细血管的长入和间质细胞的迁入，同时可促进成骨细胞的分化和胞外基质的合成，易被受体破骨细胞接近清除[2]。而且 DPB 拥有良好的细胞相容性和组织相容性，是一种良好的骨移植材料[3,4]。

VEGF 具有强的促血管内皮细胞有丝分裂的作用，增加血管通透性及血管维持功能，它几乎参与了血管形成的全过程，有利于新生毛细血管的生成，为局部材料的降解及新骨的形成创造最佳微环境[5]，还能提高成骨细胞的活性和软骨内成骨，从而促进骨形成，并且血管内皮细胞和成骨细胞之间还存在生长因子分泌和旁分泌的相互关系[6,7]。BMP 是一种高效的骨诱导生长因子，能诱导血管周围的未分化间充质细胞和骨髓基质细胞分化为成软骨细胞和成骨细胞。已有研究表明 BMP 和 VEGF 在骨愈合中对成骨有相互依赖及调控的作用[8]。但 VEGF 和 BMP 蛋白在体内半衰期短，直接注入体内易降解，故外源性单纯给予上述蛋白的治疗效果有限，如果将上述蛋白与载体复合在体内达到缓慢持续释放可克服单纯蛋白治疗的缺点。

CPC 是一种新型的可降解的、非陶瓷型骨水泥，其理化特性具有可塑性，反应不产热且具有一定的力学强度和孔隙率。在生物学特性上具有如下优点：反应不产热，水化产物为羟基磷灰石，而后者是天然骨的主要成份；具有良好的骨诱导能力；可生物降解，能被新生骨以爬行替代的方式替代，其吸收速度和新骨形成具有一致性；无明显的毒副作用，无免疫原性和致癌作用[9-11]。CPC 已经广泛应用于临床，修复骨缺损，治疗骨折，药物载体等，已有学者利用 CPC 作为 BMP、TGF-β、TNF 等生长因子的载体，利用其生物降解特性达到局部持续高浓度生长因子的释放[12]。本实验利用 CPC 作为 BMP 和 VEGF 的共同载体，从 X 线、透射电镜、组织学、墨汁灌注微血管分析和放射性核素骨显像膝关节动脉灌注血流量分析观察，A 组术后各期移植物的再血管化和成骨能力均明显优于 B、C 组，这表明 CPC 作为 VEGF 和 BMP 共同的生物相容性载体，应用于 DPB，协同实现骨传导、骨诱导和血管化效应，可作为一种新型骨移植替代材料，有效修复大段骨缺损。长段大块骨关节移植，其血供来源不同于一般的骨移植，血管生成只能由宿主骨干一端向移植物生长，这个过程无疑是很缓慢的。我们利用 CPC 作为载体，以达到局部持续、有效的 VEGF 和 BMP 释放，促进移植物的早期血管化，为骨愈合带来丰富的靶细胞和生长因子，创造成骨的最佳微环境，达到移植体与受体早期骨性愈合。

本实验中，我们在移植材料上钻孔，用 CPC 在其表面涂层，可使部分 CPC 进入髓腔，达到“生物自锁”，并且由于 CPC 无免疫原性，可使移植物达到早期免疫封闭作用，降低其免疫反应，而正是这种早期免疫封闭作用避免了手术创伤炎症反应和免疫反应高峰期的重合，降低了术后感染、骨不连的发生。结果表明，A 组动物无 1 例发生感染和死亡，早期炎症反应也明显较弱，B、C 组动物炎症反应较强，2 例发生化脓性感染，1 例死亡。在手术时，我们保留了受区骨膜，最大程度地保留了 VEGF 和 BMP 作用的靶细胞，有利于再血管化和骨愈合。综上所述，CPC/rhVEGF/rhBMP-2/DPB 大段异体骨移植，促进了局部血管的早期形成，有利于新骨形成及愈合，并使移植物逐渐“活化”而最终成为受体自身组织，为大段骨缺损的治疗提供了一种有效的治疗手段。

参考文献：

[1] Cho G, Wu Y, Ackerman J L. Detection of hydroxyl ions in bone mineral by solid-state NMR spectroscopy [J]. Science, 2003, 300 (5622): 1123 - 1127.

[2] Tapety F I, Amizuka N, Uoshima K, *et al*. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis[J]. Clin Oral Implants Res, 2004, 15(3): 315 - 324.

[3] 李彦林，杨志明，解慧琪，等. 生物衍生骨支架材料的体外细胞相容性实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志，2001，15(4)：227 - 231.

[4] 李彦林，杨志明，解慧琪，等. 生物衍生骨支架材料的组织相容性研究[J]. 中华整形外科杂志，2002，18(1)：6 - 8.

[5] Furumatsu T, Shen Z N, Kawai A, *et al*. Vascular endothelial growth factor principally acts as the main angiogenic factor in the early stage of human osteoblastogenesis[J]. J Biochem (Tokyo), 2003, 133(5): 633 - 639.

[6] Wang D S, Miura M, Demura H, *et al*. Anablic 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[J]. Endocrinology, 1997, 138(7): 2953 - 2962.

[7] Street J, Bao M, Deguzman L, *et al*. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(15): 9656 - 9661.

[8] Tombran-Tink J, Barnstable C J. Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316(2): 573 - 579.

[9] Yoshimine Y, Sumi M, Isobe R, *et al*. *In vitro* interaction between tetracalcium phosphate-based cement and calvarial osteogenic cells[J]. Biomaterials, 1996, 17(23): 2241 - 2245.

[10] Yuan H, Li Y, De-Bruijn J D, *et al*. Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs[J]. Biomaterials, 2000, 21 (12): 1283 - 1290.

[11] Liu C, Wang W, Shen W, *et al*. Evaluation of the biocompatibility of a nonceramic hydroxyapatite[J]. J Endod, 1997, 23(8): 490 - 493.

[12] Blom E J, Klein-Nulend J, Klein C P, *et al*. Transforming growth factor-beta1 incorporated during setting in calcium phosphate cement stimulates bone cell differentiation *in vitro*[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 50(1): 67 - 74.

（编辑　龙　亮）

（上接 405 页）

术后心电图变化较大，S-T 段改变在各时相点分别为 10、6、2 例，提示术后早期即有变化，但显著改善还是出现在 1 年之后；室性心动过速在术后 1 周时 13 例，较术前 12 例增加 1 例，目前认为手术应激及部分靶点的毁损使交感-肾上腺髓质系统兴奋性增高，儿茶酚胺释放增多加上住院压力大、精神紧张，导致手术后短期内快速心律失常增加；而术后 6 个月及 1 年时分别为 1、2 例，该比率显著减少（$P<0.05$）；而传导阻滞及一部分不可逆损伤所致 ECG 异常在术后 1 年左右也没有明显改变。总患病率在术后 1 年时心电图异常者仅有 8 例，与术前比较有显著性差异（$P<0.01$）。

近年来基于脑内奖赏系统以及多巴胺投射通路等理论的成瘾手术一般对杏仁核、伏隔核、扣带回进行毁损，国内报道 1 年不复吸率在 75.9% ~ 89%[3]。顾建文等[4]发现在术中一定频率的电刺激可以诱发类毒品的欣快感，同时伴随心率加快；血液动力学研究显示，当药物滥用者出现急性戒断时会出现明显的心动过速；从阿片类受体激动剂的药理学角度来说，其常见不良反应包括胸闷、气促、一过性心动过速等，70 例患者中 12 例出现快速性心律失常，为并发缓慢性心律失常者的 3 倍，说明药物滥用所产生的心律失常主要为快速心律失常改变，但随着应激的解除、术后药物的戒除、停止吸食毒品终止了对心血管系统的继续损害，心肌缺血、室性心律失常等变化逐渐恢复。

我们认为，术后停止吸食海洛因从而终止药物对心血管的继续损害是心电图变化最重要的原因，同时从另一个角度说明了立体定向手术是一种有效治疗海洛因药物依赖的方法。

关键词：立体定向手术；药物依赖；心电图

中图法分类号：R749.61　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Lester J, Leyva A, Hoyos L, *et al*. Brain vasculitis associated with drugs[J]. Rev Neurol, 2005, 40(12): 736 - 738.

[2] Sonne C, Stemple H E, Klauss V, *et al*. Intravascular ultrasound-guided percutaneous coronary intervention in a human immunodeficiency virus-positive patient with cocaine-associated acute myocardial infarction: case report and review[J]. Heart Lung Circ, 2005, 14(3): 197 - 200.

[3] 贺伟旗，曹凡俊，李　汛，等. 立体定向治疗海洛因心理依赖临床报道[J]. 立体定向和功能性神经外科杂志，2005，18(3)：145 - 146.

[4] 顾建文，郑崇勋，杨文治，等. 术中电刺激杏仁及伏隔核诱发类海洛因欣快感的临床观察[J]. 中华神经医学杂志，2005，4(10)：1015 - 1017.

（编辑　王小宾）