文章编号:1000-5404(2011)02-0145-03

论著

胰岛素样生长因子-Ⅰ活化组织工程骨修复骨缺损的实验研究

邓 江,黄文良,阮世强,苑 成,佘荣峰 (563002 贵州 遵义,遵义医学院第三附属医院骨科)

【摘要】 **目的** 探讨胰岛素样生长因子-Ⅰ(IGF-Ⅰ)对羟基磷灰石(HA)及自体红骨髓(ABM)复合物成骨诱导活性的作用。**方法** 在36只兔桡骨中1/3上制造骨缺损模型后,按随机数字表法分为4组,每组9只,空白组缺损不做任何处理,HA/ABM组、IGF-Ⅰ活化HA组、IGF-Ⅰ活化HA/ABM组组织工程骨分别植入骨缺损处。术后于不同时间点分别行血清碱性磷酸酶(ALP)活性测定、扫描电镜检测评价成骨情况。**结果** ①血清ALP活性2、4、8、12周时,IGF-Ⅰ/HA/ABM组血清ALP活性显著高于其他各组($P<0.05$),且其他组间比较有统计学意义($P<0.05$)。②扫描电镜结果:12周时,IGF-Ⅰ/HA/ABM组仅见少量材料,骨缺损区被成熟板层状骨组织充填,材料与正常骨质间已分不清界限,骨缺损大部分修复,其成骨作用明显优于各组。**结论** IGF-Ⅰ对以HA为支架材料组织工程骨的成骨诱导作用明显增强。

【关键词】 胰岛素样生长因子-Ⅰ;组织工程骨;骨缺损;成骨诱导
【中图法分类号】 R318.08;R314;R683.05 【文献标志码】 A

IGF-Ⅰ activated tissue engineered bone complex repairs bone defect in rabbits

Deng Jiang, Huang Wenliang, Ruan Shiqiang, Yuan Cheng, She Rongfeng (Department of Orthopaedics, Third Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563002, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the osteoinductive effect of insulin-like growth factor-Ⅰ (IGF-Ⅰ) in tissue engineered bone complex of hydroxyapatite (HA)/autogenous red bone marrow (ABM). **Methods** The animal model of bone defect of one thirds bilateral radius was made on 36 rabbits. The animals were randomly divided into 4 groups. Their defects were repaired with no implant for the blank control group, with HA/ABM implant for HA/ABM group, with implant 400 ng/ml IGF-Ⅰ pre-added HA for IGF-Ⅰ/HA group, and with IGF-Ⅰ/ HA/ABM implant for IGF-Ⅰ/HA/ABM group. Gross observation, X-ray examination and scanning electronic microscopy were used to study the repair of defect before and in 1, 2, 4, 8 and 12 weeks after the repairing. Serum level of alkaline phosphatase (ALP) was detected. **Results** Serum level of ALP was significantly higher in IGF-Ⅰ/HA/ABM group than in other groups in 2, 4, 8 and 12 weeks after repairing ($P<0.05$), and the difference of serum ALP had statistical significance among these groups ($P<0.05$). Scanning electronic microscopy showed that there was a few amount of complex in the defect of IGF-Ⅰ/HA/ABM group in 12 weeks, and the defect was filled by mature lamellar bone which having no distinguished difference with normal bone. Better repairing was seen in IGF-Ⅰ/HA/ABM group than in other groups. **Conclusion** IGF-Ⅰ exerts significantly osteoinductive effect on tissue engineering bone of HA as scaffold material.

【**Key words**】 insulin-like growth factor-Ⅰ;tissue engineered bone;bone defect;osteoinduction

Supported by the Project of Science and Technology Development Foundation of Zunyi City (2007-15). Corresponding author: Deng Jiang, E-mail: DJ30666@126.com

胰岛素样生长因子-Ⅰ(insulin-like growth factor-Ⅰ, IGF-Ⅰ)在骨改建偶联中发挥重要作用,能刺激成骨细胞和成骨前体细胞的增殖、分化和基质合成,并通过介导作用调节破骨细胞的分化形成和功能活性,是一种具有多种生物学活性的骨生长调节因子[1]。本研究旨在应用IGF-Ⅰ活化羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)/自体红骨髓(autogenous red bone marrow, ABM),以提高组织工程骨的成骨诱导活性,促进成骨细胞形成,为骨组织工程提供良好的种植体。

1 材料与方法

1.1 材料准备

1.1.1 HA准备 HA(上海睿星基因技术有限公司)多孔生物材料,孔隙率为60%~80%,孔径为100~300 μm,大小为2.0 cm×0.5 cm×0.5 cm,经环氧乙烷灭菌后备用。

【基金项目】 遵义市科技社会发展项目(2007-15)
【通信作者】 邓 江,E-mail:DJ30666@126.com

1.1.2 IGF-Ⅰ/HA的制备 参照文献[2]方法,无菌条件下将IGF-Ⅰ(上海麦莎生物科技有限公司,进口分装)以浓度400 ng/ml与HA混合,负压抽吸使IGF-Ⅰ溶液进入材料孔隙内,4 ℃放置48 h后备用。

1.1.3 IGF-Ⅰ/HA/ABM和HA/ABM的制备 无菌条件下,用16#骨穿针从兔股骨大转子穿刺,用肝素预湿后空针抽吸骨髓约2 ml,摇匀后分别接种于HA/IGF-Ⅰ和HA各1 ml,充分吸附0.5 h[3]。

1.2 模型制备及分组

选用遵义医学院实验动物中心提供成年健康中国家兔36只,体质量2.5 kg,按随机数字表法分为4组,每组9只,以3%戊巴比妥钠(1 ml/kg)静脉麻醉家兔,备皮、消毒铺巾,切开皮肤逐层分离,充分暴露前臂桡骨中1/3段,制作约2 cm的桡骨全层缺损模型,生理盐水冲洗伤口后分别移植相应材料。空白组缺损不做任何处理,HA/ABM组、IGF-Ⅰ活化HA组(IGF-Ⅰ/HA组)、IGF-Ⅰ活化HA/ABM组(IGF-Ⅰ/HA/ABM组)。逐层缝合伤口,伤口纱布包扎,不用外固定,前3天每只肌注庆大霉素2×10^4U/d,同术前喂养方法分别单笼喂养[4]。

1.3 检测指标

1.3.1 大体观察及ALP检验 观察家兔术后精神状态、进食、活动和伤口愈合情况;分别于修复前,修复后1、2、4、8、12周取各组动物耳缘静脉采血,按碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒说明书操作测定血清ALP活性。

1.3.2 扫描电子显微镜观察 将截取的4组植入物用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,2%戊二醛固定,PBS漂洗,1%四氧化锇固定后,乙醇、丙酮梯度脱水,乙酸异戊酯置换,真空临界点干燥,表面喷金,然后在扫描电子显微镜(日立,S-3400N)下观察材料降解、材料内新骨生成及材料与骨端连接情况。

1.4 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,行多个样本均数的两两比较(F检验)。

2 结果

2.1 大体标本观察

术后各组一般情况较好,伤口12 d愈合,无红肿、渗液及流脓。在各个时期各组动物均未见植入物排出或脱出现象。

2.2 血清ALP活性检测

术后1周HA/ABM组和IGF-Ⅰ/HA/ABM组之间比较无统计学意义($P>0.05$),术后2、4、8、12周各组间比较差异有统计学意义,且IGF-Ⅰ/HA/ABM组血清ALP活性显著高于其他各组($P<0.05$,表1)。

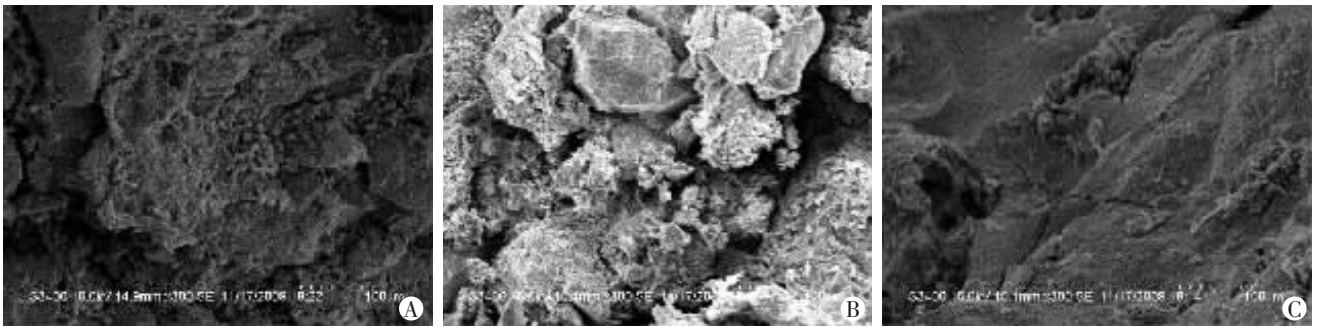
2.3 扫描电镜观察

空白组术后4、8周及12周缺损均为纤维组织填充。HA/ABM组术后4周,材料部分降解,与骨质间存在微小间隙,材料和骨质间有接触性结合,间隙内有少量骨痂充填,结构疏松;术后8周,骨质与材料部分区域结合,随着材料的降解吸收,骨质与材料间隙已不明显,间隙内骨痂增多;术后12周,材料部分降解,新生板状骨长入材料的孔隙,骨缺损部分修复。IGF-Ⅰ/HA组术后4周,材料未见降解,与骨质间存在间隙,间隙内未见异常组织,材料和骨质间有接触性结合,结构较疏松;术后8周,骨质与材料部分降解,骨质与材料间隙有微小间隙,间隙内有少量骨痂充填;术后12周,材料仅少部分降解,少量新生板状骨长入材料的孔隙,中部结构仍疏松,骨缺损部分修复。IGF-Ⅰ/HA/ABM组4周时材料出现降解,材料与正常骨质间出现间隙,间隙内有骨痂产生充填;8周:材料进一步降解,但材料与正常骨质附着紧密,其间产生大量新生类骨组织;12周时,仅见少量材料,骨缺损区被成熟板层状骨组织充填,材料与正常骨质间已分不清界限,骨缺损大部分修复(图1)。

表1 手术前后各组血清ALP活性(U/ml,$\bar{x}\pm s$)

组别	术前	术后1周	术后2周	术后4周	术后8周	术后12周
空白组	38.2±3.8	61.3±2.6	72.1±3.3^{abc}	90.1±7.2^{abc}	89.4±8.1^{abc}	82.2±7.4^{abc}
HA/ABM组	39.4±4.3	82.1±4.0	91.4±4.1^{ab}	128.8±5.7^{ab}	137.1±7.8^{ab}	128.1±6.7^{ab}
IGF-Ⅰ/HA组	40.1±3.7	71.4±5.4	82.2±5.3^{a}	112.7±8.4^{a}	120.4±9.2^{a}	112.9±4.2^{a}
IGF-Ⅰ/HA/ABM组	38.9±3.9	83.9±4.1	102.1±4.0	143.9±6.4	153.8±9.4	141.5±7.9

a:$P<0.05$,与IGF-Ⅰ/HA/ABM组比较;b:$P<0.05$,与IGF-Ⅰ/HA组比较;c:$P<0.05$,与HA/ABM组比较



A:HA/ABM组;B:IGF-Ⅰ/HA组;C:IGF-Ⅰ/HA/ABM组

图1 术后12周各组扫描电镜观察 (×300)

3 讨论

近年来骨组织工程应用于骨缺损研究备受关注，但至今尚未研制出一种较理想的组织工程骨应用于骨缺损的修复。因此，构建高活性的组织工程骨仍然是诸多研究者致力解决的难题。骨缺损修复的关键是细胞活化和成骨信号释放，而细胞因子是促使细胞向成骨细胞分化的信号分子[5-6]。在骨骼中，胰岛素生长因子是含量最丰富的信号分子。研究发现成骨量的增加和减少，最有希望的调控机制因子可能是生长激素或是胰岛素生长因子[7]。我们采用 IGF-Ⅰ提高 HA/ABM 成骨诱导活性，增加成骨细胞合成，促进骨缺损模型的修复。动物模型选用兔长骨干无需固定法骨缺损模型，即兔前臂桡骨中 1/3 段缺损模型。本模型对动物肢体功能影响小，术后恢复快，给术后观察和饲养带来方便，而且操作简便，重复性好[8]。与其他模型相比，此骨缺损模型较理想，是实验研究中应用较多的动物模型。

本研究检测了 ALP 水平。ALP 的活性是成骨细胞的早期指标，反映了细胞的成骨活性，其作用是水解有机磷酸酶释放出无机磷，用于羟基鳞灰石的形成，是骨形成的特异酶[9]。IGF-Ⅰ/HA/ABM 组中 ALP 明显高于其他各组，HA/ABM 组次之，空白组 ALP 水平最低，各组间比较有统计学意义（$P<0.05$）。说明胰岛素生长因子在促进细胞增殖的同时，也能促进其进一步分化成熟。再结合血清 ALP 检测及扫描电镜观察结果：IGF-Ⅰ/HA/ABM 组成骨作用优于其他各组，表明 IGF-Ⅰ对 HA/ABM 成骨作用有促进作用；HA/ABM 组成骨作用仅次于 IGF-Ⅰ/HA/ABM 组；而 IGF-Ⅰ/HA 组与 IGF-Ⅰ/HA/ABM 组相比，成骨作用有显著差异，表明了单纯吸附 IGF-I 的 HA 并不能显著提高 HA 的成骨效果，通过 ABM 提供种子细胞才能发挥 IGF-Ⅰ骨诱导的生物学效应。

利用 IGF-Ⅰ活化 HA/ABM，三者复合构建具有较高生物活性的组织工程骨，充分体现骨再生、骨诱导及骨传导 3 种机制，基本具备了理想移植材料所应有的特性。但 IGF-Ⅰ系统是骨重建的一个环节，有许多问题有待于进一步研究[10-11]。如 IGF-Ⅰ活化条件、剂量及安全性，自体骨髓仅能提供极少成骨干细胞细胞等问题。随着体外干细胞培养技术[12]及组织工程技术的不断提高[13-14]，相信这些难题也将会得到解决。另外，IGF-Ⅰ对更大型动物及动物不同部位骨缺损模型骨诱导活性疗效仍需进一步探索，为能更好运用于临床治疗提供实验依据。

参考文献：

[1] Yao W, Zhong J, Yu J, *et al*. IGF-I improved bone mineral density and body composition of weaver mutant mice[J]. Growth Horm IGF Res, 2008, 18(6): 517 - 525.

[2] Zambonin G, Grano M, Greco G, *et al*. Hydroxyapatite coated with insulin-like growth factor 1 (IGF1) stimulates human osteoblast activity *in vitro*[J]. Acta Orthop Scand, 1999, 70(2): 217 - 220.

[3] 黄文良，邓江，苑成，等. 组织工程化人工骨种植体修复兔骨缺损效果研究[J]. 山东医药，2010，50(20)：45 - 47.

[4] 邓江，黄文良，韩小松，等. 体红骨髓接种复合人工骨修复兔桡骨缺损的实验研究[J]. 实用医学杂志，2010，26(18)：3302 - 3305.

[5] 蓝旭，梁军，葛宝丰，等. 表面修饰羟基磷灰石修复骨缺损骨形态发生蛋白-2 的表达[J]. 生物医学工程与临床，2008，12(1)：1 - 4.

[6] Madry H, Kaul G, Cucchiarini M, *et al*. Enhanced repair of articular cartilage defects *in vivo* by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I) [J]. Gene Ther, 2005, 12(15): 1171 - 1179.

[7] 朱国强，吴织芬，王勤涛，等. IGF-1 对骨髓基质细胞分泌 BMP-2 和 VEGF 的影响[J]. 临床口腔医学杂志，2004，20(4)：215 - 217.

[8] 胡蕴玉. 现代骨科基础与临床[M]. 北京：人民卫生出版社，2006：698 - 699.

[9] Parsons P, Butcher A, Hesselden K, *et al*. Platelet-rich concentrate supports human mesenchymal stem cell proliferation, bone morphogenetic protein-2 messenger RNA expression, alkaline phosphatase activity, and bone formation *in vitro*: a mode of action to enhance bone repair[J]. J Orthop Trauma, 2008, 22(9): 595 - 604.

[10] Kawai M, Rosen C J. Insulin-like growth factor-I and bone: lessons from mice and men[J]. Pediatr Nephrol, 2009, 24(7): 1277 - 1285.

[11] Yao W, Zhong J, Yu J, *et al*. IGF-I improved bone mineral density and body composition of weaver mutant mice[J]. Growth Horm IGF Res, 2008, 18(6): 517 - 525.

[12] 刘杰，吴雪晖，罗飞，等. 自体间充质干细胞构建组织工程骨修复人长骨缺损的临床观察[J]. 第三军医大学学报，2008，30(9)：851 - 854.

[13] 侯天勇，许建中，吴雪晖，等. 藻酸盐微球的制备及其对共培养的 MSCs 的影响[J]. 第三军医大学学报，2007，29(3)：199 - 202.

[14] Kim Y J, Kim H J, Im G I. PTHrP promotes chondrogenesis and suppresses hypertrophy from both bone marrow-derived and adipose tissue-derived MSCs[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 373(1): 104 - 108.

（收稿：2010-09-15 修回：2010-10-18）

（编辑 王小宴）