维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)04 - 0505 - 04

VEGF 基因转染结合脱蛋白骨修复股骨头坏死的实验研究

曹 凯[1],黄 伟[1],安 洪[1],蒋电明[1],黄 路[2]

(1.重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016;2.重庆医科大学附属儿童医院肾脏免疫科,重庆 400014)

【摘 要】目的:构建 pcDNA3.1/VEGF165 质粒及联合脱蛋白骨基因治疗早期股骨头缺血性坏死。方法:将含人 VEGF165 全长 cDNA 序列的克隆载体 pUC18/VEGF165 与 pcDNA3.1(+)载体构建成重组真核表达质粒 pcDNA3.1/VEGF165;69 只 AVNFH 造模成功后的新西兰大白兔随机分成 3 组。第一组,将脱蛋白骨复合 pcDNA3.1/VEGF165 质粒植入坏死的股骨头内;第二组植入 DPB;第三组仅在股骨头内钻一隧道。股骨头标本术后 3 天,1,2,4,8 和 16 周获取。RT - PCR 检测 VEGF165mRNA 的表达,Western blot 检测 VEGF165 蛋白的表达,组织形态学分析血管发生和股骨头修复。结果:成功构建 pcDNA3.1/VEGF165;第一组 VEGF165 mRNA 和蛋白表达术后 1 周达到高峰,时间持续超过 3 周。血管形成术后 2,4 周增加,骨形成术后 2,4 和 8 周增加,与另两组相比差异呈显著性($P<0.01$)。结论:VEGF165 基因转染可促进局部血管的早期形成,DPB - VEGF 复合物可增加骨形成。脱蛋白骨联合 VEGF165 基因治疗为骨坏死的修复提供了理论基础。

【关键词】脱蛋白骨;血管内皮生长因子;基因治疗;股骨头缺血坏死

【中国图书分类法分类号】R681.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 02 - 22

Experimental study of VEGF gene transfer combined with deproteinized bone to repair avascular necrosis of the femoral head

CAO Kai, et al

(*Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To reconstruct pcDNA3.1/VEGF165 and combine it with deproteinized bone(DPB) to repair avascular necrosis of the femoral head (AVNFH). *Methods*: Clone plasmid pUC18/VEGF165 containing the whole cDNA sequence of VEGF165 was combined with pcDNA3.1(+) to reconstruct pcDNA3.1/VEGF165. Sixty - nine AVNFH model New Zealand adult rabbits with a mean weight of 2.8 kg were randomly divided into three groups. In group 1, DPB combined with the reconstructed plasmid pcDNA3.1/VEGF165 was implanted in the drilled channel of the necrotic femoral head. In group 2, only DPB was implanted. In group 3, only channel was drilled without DPB or plasmid implanted. Femoral head specimens were obtained 3 days, 1, 2, 4, and 8 weeks after operation. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) was examined by RT - PCR, Western blotting techniques. Angiogenesis and repair of the femoral head were observed by histological and histomorphometric analysis. *Results*: pcDNA3.1/VEGF165 was reconstructed successfully. In group 1, the expression of VEGF was detected in the femoral head implanted by DPB - VEGF compound. VEGF165 mRNA and protein detected went up to apex 1 week postoperatively and lasted more than 3 weeks. The femoral head implanted by DPB - VEGF compound showed a significant difference in vascularization 2 and 4 weeks after operation and a significant difference in bone formation 2, 4 and 8 weeks after operation from those in other groups on histomorphometric analysis ($P<0.01$). *Conclusion*: Transfection of VEGF165 gene enhances local angiogenesis in early time and DPB - VEGF compound improves bone formation. Deproteinized bone combined with VEGF gene provides a potential method for treatment of osteonecrosis.

【Key words】Deproteinized bone; Vascular endothelial growth factor; Gene therapy; Avascular necrosis of the femoral head

股骨头缺血性坏死(avascular necrosis of the femoral head,AVNFH)是一种发生在髋关节的棘手疾病。年轻患者的发病率呈进行性的增加,而过早进行全髋关节置换会带来不少更困难的问题[1]。因此,在股骨头塌陷之前寻求一种改善血供,修复股骨头的方法是有意义之举。本实验探索用 VEGF 复合脱蛋白骨(deproteinized bone,DPB)植入坏死股骨头以诱导血管的发生,促进股骨头的修复。

作者介绍:曹 凯(1975 -),男,讲师,主治医师,博士,主要研究方向:脊柱创伤,关节疾病。

基金项目:重庆市卫生局项目(编号:002010)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 材料

含人 $VEGF_{165}$ 全长 cDNA 序列的克隆载体 pUC18/$VEGF_{165}$ 由北京中日友好医院邹海波博士惠赠；pcDNA3.1(+)真核表达载体购自 Invitrogen 公司；E. coli DH5α 为本室保存；ECV304(人脐静脉内皮细胞系)由江西医学院第二附属医院王小中博士提供；脂质体(LipofectinR Reagent)购自 Invitrogen 公司，限制性内切酶(EcoR Ⅰ，*Xba* Ⅰ)购自 TaKaRa 公司，Marker (pBR322DNA/*Alu* Ⅰ)、Marker (λDNA/*EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ)购自 Ferments 公司，TRIZOL、Taq DNA 聚合酶购自上海生工，M-MLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂、Olig DT 购自 Promega 公司，PCR 引物由上海生工合成，马血清购自 PAA 公司，一抗小鼠抗人 VEGF 单克隆抗体、山羊多抗 actin 购自 Santa Cruz 公司，二抗辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG，辣根酶标记马抗山羊 IgG 购自北京中山公司，VEGF ELISA 试剂盒购自深圳晶美公司。

1.2 pcDNA3.1/VEGF165 的构建及生物活性鉴定

小量抽提质粒 pUC18/VEGF165，*EcoR I* 和 *Xba I* 双酶切后电泳胶回收并纯化 VEGF165 片段，同样步骤完成 pcDNA3.1 的质粒抽提和胶回收，将 pcDNA3.1 和 hVEGF165 按 0.03pmol:0.1～0.3pmol 混合，T4DNA 连接酶连接，反应液转化细菌，摇菌后小量抽提重组质粒，重组质粒行酶切鉴定，PCR 鉴定和 DNA 序列分析。PCR 鉴定引物上游：5'-GTGGAATTC-GAGCTCGGTACCG-3'，下游：5'-CCCTCTA-GAAGCTTTCACCGCCTCGG-3'，扩增目的片段长 617bp。参照 lipofectin Reagent 说明书转染操作步骤完成重组质粒对 ECV304 细胞的转染，转染 48h 后换无血清培养基，继续培养 24h 后收集培养上清液，实验组、对照组和空白组各取 5 孔，按照 ELISA 试剂盒说明书测定各组上清 VEGF 蛋白含量。

1.3 动物模型的制作和 DPB-VEGF 的置入

SDS 碱裂解法大量制备质粒 pcDNA3.1/VEGF165，聚乙二醇差异沉淀法纯化质粒。过氧化氢乙醚法制备同种异体兔脱蛋白松质骨，DPB 制成直径 3.0mm 的小棒，环氧乙烷消毒后每条 DPB 复合 500μg pcDNA3.1/VEGF165 质粒，无菌条件下晾干。使用马血清静脉注射和地塞米松腹腔注射联合诱导 AVNFH，经 MRI 筛选动物模型。69 只 AVNFH 造模成功后的新西兰大白兔随机分成 3 组，平均体重 2.8kg，每组 23 只。第一组，在双侧股骨近端外侧大转子下 1cm 沿股骨颈钻一直径 3.0mm 的隧道，DPB-VEGF 沿隧道植入。第二组植入 DPB。第三组仅钻一隧道。股骨头标本术后 3 天，1，2，4，8 和 16 周获取。

1.4 DPB-VEGF 置入后骨髓组织 RT-PCR、Western blot 检测

取术后 3 天，1，2 和 4 周标本骨髓组织。RT-PCR 检测：TRIZOL 提取标本组织 100mg 总 RNA，逆转录成 cDNA。PCR 扩增反应参数：95℃ 5min，94℃ 60s，62℃ 60s，72℃ 45s 和 72℃ 5min 30 个循环。VEGF165 引物序列：上游 5'-GAGGGCAGAATCATCACGAAGT-3' 下游 5'-TCCTAT-GTGCTGGCCTTGGTGA-3'，扩增片段长为 257bp。内参照为 GAPDH：上游 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3'，下游 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'，扩增片段长为 195bp。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳。Western blot 检测：悬浮裂解液 1ml 冰上匀浆 200mg 标本组织 30min，裂解物 4℃，4000g 离心 10min 取上清进行蛋白定量。聚丙烯酰胺凝胶电泳后将蛋白转移至硝酸纤维膜上。将含 5% 脱脂奶的 PBS 封膜 2h 后与一抗 4℃ 孵育过夜，actin 为内参照。二抗室温结合 1h 后 DAB 显色。

1.5 墨汁灌注微血管分析

取术后 1，2，4 和 8 周动物，麻醉后，腹主动脉插管，先注入肝素 12500U，用生理盐水灌洗，从下腔静脉放血，待灌洗至双下肢肌肉和甲床变白，下腔静脉流出液变清亮后，再灌入中国墨汁至下肢肌肉和甲床变为深黑色，结扎腹主动脉和下腔静脉，取下股骨头标本放置在 4℃ 冰箱中冷藏 24h。标本固定后脱钙制成透明切片，镜下观察，每个透明标本随机取 5 个视域，用图像分析仪进行分析，结果用面积积分光密度表示(阳性积分光密度/统计场面积)。

1.6 HE 染色组织形态学分析

取术后 1，2，4，8 和 16 周股骨头标本制成 HE 切片，镜下观察新骨形成。

1.7 统计学处理

采用 SAS 8.2 软件，进行完全随机设计的方差分析和 Tukey 检验，显著性差异 α 取 0.05，数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，结果用 F 和 P 值表示。

2 结 果

2.1 pcDNA3.1/VEGF165 的鉴定和动物模型的建立

EcoR Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 双酶切后电泳显示 pcDNA3.1(约 5.4kb) 和 VEGF165(约 600bp)两条条带，与预期相符；PCR 鉴定结果显示在 521bp 与 656bp 之间出现一特异性条带，与预期相符；DNA 测序结果显示所插入的 VEGF165 基因序列与 GenBank 序列一致，由此表明 pcDNA3.1/VEGF165 重组质粒构建成功。ELISA 结果发现转染 pcDNA3.1/VEGF165 的 ECV304 细胞 72h 后分泌 VEGF 蛋白的量为 962.26 ± 131.24pg/ml，空载组为 211.18 ± 56.37pg/ml，空白对照组为 198.10 ± 78.28pg/ml。pcDNA3.1/VEGF165 组与空载组结果差异呈显著性($P < 0.01$)，表明构

维普资讯 http://www.cqvip.com

建的 peDNA3. 1/VEGF165 表达载体具有生物活性。所有被筛选动物 MRI Stir 序列下显示股骨头内为不均质高信号,提示股骨头早期缺血坏死,模型建立成功。

2.2 股骨头髓腔内 VEGF165 mRNA 和蛋白的表达

第一组髓腔组织 RT－PCR 扩增出产物为 257bp 的 VEGF165 目的条带和 195bp 的 GAPDH 条带。术后 3 天即有 VEGF165 mRNA 的表达,术后 1 周达到高峰,表达时间超过 3 周。其余组没有 VEGF165 mRNA 的表达。Western blot 结果显示第一组有 VEGF165 蛋白的表达,术后 1 周达到高峰,术后第 4 周检测不到目的蛋白的表达。其余组没有 VEGF165 蛋白的表达。

2.3 术后新生微血管的形成

第一组术后 2 周(图 1)和 4 周,在修复区内存在大量的新生血管,数量与其它组相比有显著性差异($P<0.01$),但术后 1 和 8 周各组无显著性差异($P>0.05$)(表 1)。

2.4 术后新骨的形成

术后 1 周各组股骨头隧道内充满了骨髓细胞和红细胞,同时第一组植入区周围有肉芽组织形成,间充质细胞大量增生,有少量纤维组织围绕 DPB;术后 2 周第一组可见胶原纤维和新骨附着于 DPB 和死骨。隧道及髓腔内充满增生的间充质细胞和纤维母细胞。第二组可见胶原纤维附着于 DPB 和死骨,新骨的形成明显比第一组弱。第三组仅见少量胶原纤维。

表 1 微血管图像分析结果(面积积分光密度 IOD/μm^2,$\bar{x} \pm s$)

组别	术后 1 周	术后 2 周	术后 4 周	术后 8 周
第一组	0.07±0.04	0.33±0.10*	0.57±0.16△	0.56±0.11
第二组	0.05±0.04	0.17±0.09	0.35±0.08	0.48±0.12
第三组	0.06±0.04	0.18±0.08	0.22±0.09	0.48±0.18

* 与二、三组同期比较 $P<0.01$;△ 与二、三组同期比较 $P<0.01$

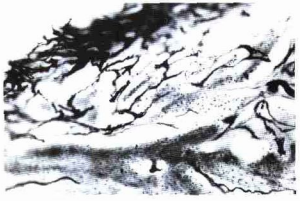


图 1 第一组术后 2 周股骨头微血管墨汁灌注修复区内存在大量的新生血管。 (×100)

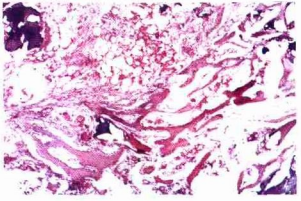


图 3 第二组术后 8 周股骨头隧道内新生骨小梁发生并附着、替代部分 DPB 和死骨,DPB 开始吸收。 (HE×40)

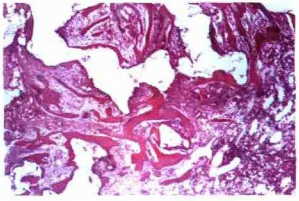


图 2 第一组术后 8 周股骨头大量较成熟骨小梁形成,部分替代了 DPB 和死骨,骨小梁表面有较多的成骨细胞附着,同时可见部分 DPB 已被吸收。 (HE×40)

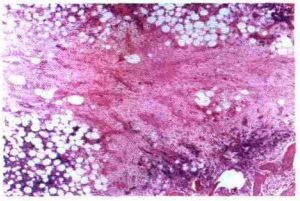


图 4 第三组术后 8 周股骨头新生骨组织和胶原纤维充满髓腔。 (HE×40)

维普资讯 http://www.cqvip.com

术后 4 周第一组隧道内可见大量伴有成骨细胞围绕的新生幼稚骨小梁,同时 DPB 和死骨表面也有大量新生的幼稚骨小梁,未见明显的异物反应。第二组修复组织主要为胶原纤维和早期骨样组织,DPB 和坏死骨边缘可见早期骨样组织开始生长。第三组隧道内见到丰富的胶原,增生的纤维母细胞和间质细胞较术后 2 周明显增多。

术后 8 周,第一组可见大量较成熟骨小梁伴随新生骨小梁和胶原形成,骨小梁部分替代了 DPB 和死骨,同时可见部分 DPB 已被吸收。第二组可见隧道内新生骨小梁发生并附着、替代部分 DPB 和死骨,DPB 开始吸收。第三组见到新生骨组织和胶原纤维充满髓腔。(图 2～4)

术后 16 周,第一、二组可见到包括各种骨髓细胞和成熟骨小梁在内的正常股骨头髓内结构,DPB 大部分已被吸收。而在第三组,成骨明显,但骨组织充满骨髓腔,缺少排列有序的成熟骨小梁结构,髓内结构欠正常。

3 讨 论

在 AVNFH 自发的修复过程中存在血管发生和新骨形成缓慢,而坏死骨小梁吸收迅速这一矛盾,所以,在 AVNFH 早期的治疗中,促进微血管的增生和新骨的形成显得特别重要。

DPB 具有天然的密集微孔系统,有利于微血管的长入,较好的机械强度,一定的骨诱导作用,适合作为骨移植材料。笔者在实验中观察到在植入的 DPB 周围有大量的广泛分布的新骨形成,术后 8 周 DPB 开始吸收降解(图 2)。我们以前的临床试验少部分失败病例提示 DPB 的"活化"有赖于周围新生血管和间质细胞的迁入[4]。新生血管形成可能与多种生长因子诱导有关,包括碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、转化生长因子 β(transforming growth factor - beta, TGF - β)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)和血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等。其中 VEGF 的优势在于既可刺激血管形成又可促进骨的形成和改建。另外,多数骨诱导因子促进骨修复可能是通过刺激 VEGF 的产生来实现的[5]。有实验证实 DPB 复合 VEGF 蛋白后,可增加局部微血管的形成,能增进 DPB 与受体骨愈合[6]。但 VEGF 蛋白半衰期短,注入体内易稀释,故外源给予 VEGF 蛋白质进行治疗效力有限,VEGF 基因治疗可克服单纯蛋白质治疗的缺点。

VEGF 不但通过促血管生成作用在骨的发生中扮演了重要的角色,它还通过促进骨转换,抑制软骨细胞和成骨细胞的凋亡而影响骨发生[7]。本实验观察到 DPB - VEGF 组术后 2 周和 4 周新生血管明显多于其它组($P<0.01$),新骨形成比其它组也更早(图 1,2)。活体直接转基因术是把重组载体直接注入体内起治疗作用。与回体转基因术相比省时、操作方便。从安全应用角度出发,质粒更适合用于治疗临床疾病。虽然质粒 DNA 的转染效率低,但与病毒载体相比,受体对高剂量的质粒更为耐受。同时,质粒 DNA 载体特别适合用于承载产物为分泌型蛋白的目的基因[8]。而 VEGF165 为分泌型蛋白,故 pcDNA3.1/VEGF165 是改善缺血组织灌注的较理想工具。

Wolff 首次将表达荧光素酶的裸 DNA 质粒注射到小鼠的骨骼肌内,结果发现荧光素酶表达时间持续了 2 个月。Tsurumi 发现 VEGF 基因转染缺血骨骼肌后 mRNA 表达超过 14 天,在缺血骨骼肌中的转染效率是正常骨骼肌的 6 倍[9]。Yang 的实验显示坏死股骨头内转基因后两周仍可检测到 VEGF165 mRNA 的表达[10],但实验中以胶原作为承载体可能不利于 VEGF165 基因的转染以及 VEGF165 蛋白分泌后的扩散。本实验中 VEGF165 mRNA 和蛋白在兔缺血坏死股骨头内表达持续时间超过 3 周,说明置入局部的 VEGF 质粒可持续作用较长时间。

综上所述,VEGF165 基因转染可促进局部血管的早期形成,DPB - VEGF 复合物可增加骨形成,促进 AVNFH 的修复。本实验用 DPB - VEGF 复合物植入坏死股骨头以诱导血管的发生,促进早期坏死股骨头的修复与现有的治疗方法相比较,其优点有:较单纯髓芯转孔减压、非血管化骨瓣移植成血管成骨更早,本实验第一组早期血管形成较第二和第三组多,结果具有显著性差异(表 1),早期成骨较后两组多,骨转换较后两组快,术后远期可恢复股骨头髓内正常结构;较血管化骨瓣移植操作更简单,创伤更小,无需进行血管显微吻合,操作过程与髓芯转孔减压相似;更无截骨术造成的生理和解剖结构的改变。

(下转第 547 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

250HU,造影持续时间达 2.5～12h,24h 恢复正常,因此,尽管 HL-2 联合 HIFU 损伤肝组织存在灰阶超声实时监控的困难,但乳化碘油的共同特点使其在肝脏肿瘤的 HIFU 治疗上存在潜在的巨大价值,本研究结果只证明了乳化碘油联合 HIFU 损伤正常兔肝脏组织的有效性和增效性,有关其在治疗超声(HIFU)领域的安全性、可控性和实时监控的方法以及对肿瘤的治疗效果、尚值得进一步研究。

参 考 文 献

[1] Ward BA, Miller DL, Frank JA, et al. Prospective evaluation of hepatic imaging studies in the detection of colorectal metastases: correlation with surgical findings[J]. Surgery, 1989; 105(2Pt 1): 180-187.

[2] Stude RA, Hedlund LW, Johnson GA, et al. Contrast enhancement of the liver. Evaluation by automated contiguous pixel search[J]. Invest-Radiol, 1987; 22(2): 132-136.

[3] G ter Haar, I Rivens, L Chen, et al. High intensity focused ultrasound for the treatment of rat tumors[J]. Phys Med. Biol, 1991; 36: 1495-1501.

[4] 刘宝琴,熊树华,王智彪,等. 体外不同频率高强度聚焦超声的生物学焦域[J]. 中国超声医学杂志, 2002; 6: 417-420.

[5] Sibille A, Prat F, Chapelon JY, et al. Characterization of extracorporeal ablation of normal and tumor-bearing liver tissue by high intensity focused ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol, 1993; 19(9): 803-813.

[6] 邹建中. HIFU 高强度聚焦超声治疗肿瘤的超声定位、实时监控及疗效评价[J]. 临床超声医学杂志, 2001; 3(增刊), 23-29.

[7] Yang R, Sanghvi NT, Rescorla FJ, et al. Extracorporeal Liver Ablation Using Sonography-Guided High-Intensity Focused Ultrasound[J]. Invest Radiol, 1992; 27(10): 796-803.

[8] Shu Qun Cheng, XD Zhou, Zhao You Tang, et al. High-intensity focused ultrasound in the treatment of experimental liver tumour[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1997; 219-223.

[9] 许乙凯,乔东访,刘杏元,等. 乳化碘油作为静脉注射肝脾特异性造影剂的实验研究[J]. 中国医学计算机成像杂志, 1999; 2(5): 135-137.

[10] 王鸿儒,主编. 医用物理学概论[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993; 146.

[11] Cheng SQ, Zhou XD, Tang ZY, et al. Iodized oil enhances the thermal effect of high intensity focused ultrasound on ablating experimental liver cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1997; 123: 639-644.

(上接第 508 页)

(现作者在江西医学院第一附属医院骨科工作)

参 考 文 献

[1] Drescher W, Furst M, Hahne HJ, et al. Survival analysis of hips treated with flexion osteotomy for femoral head necrosis [J]. J-Bone-Joint-Surg-Br, 2003; 85(7): 969-974.

[2] Stulberg BN. Osteonecrosis: what to do, what to do[J]! J-Arthroplasty. 2003; 18(3 Suppl 1): 74-79.

[3] 杨志明,李彦林,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.

[4] 蒋电明,安 洪,吴祖尧. 异体脱蛋白骨关节移植的初步实验与临床应用[J]. 伤残医学杂志, 1998; 6(1): 5-8.

[5] Street J, Bao M, de Guzman L, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002; 99(15): 9656-9661.

[6] 孟纯阳,安 洪,蒋电明,等. 带蒂骨膜包裹脱蛋白骨、血管内皮细胞生长因子复合体修复关节端缺损的实验研究[J]. 中华创伤杂志, 2003; 19(7): 413-415.

[7] Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, et al. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development[J]. Development, 2004; 131(9): 2161-2171.

[8] Symes JF. Gene therapy for ischemic heart disease: therapeutic potential[J]. Am J Cardiovasc Drugs, 2001; 1(3): 159-166.

[9] Tsurumi Y, Kearney M, Chen D, et al. Treatment of acute limb ischemia by intramuscular injection of vascular endothelial growth factor gene[J]. Circulation, 1997; 96(9S): II-382-388.

[10] Yang C, Yang S, Du J, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair of avascular necrosis of the femoral head of rabbit[J]. Chin Med J(Engl), 2003; 116(10): 1544-1548.