

共表达腺病毒载体构建鉴定及其转染骨髓间充质干细胞观察

李千会¹, 孟纯阳², 麻凤玉², 张聪³

(1. 东南大学附属中大医院老年科, 江苏 南京 210009; 2. 济宁医学院附属医院脊柱外科, 山东 济宁 272000; 3. 东南大学附属中大医院脊柱外科, 江苏 南京 210009)

【摘要】 目的: 构建并鉴定绿色荧光蛋白标记的人骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP)2 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)165 双基因共表达的重组腺病毒, 为研究该双基因对骨髓间充质干细胞成骨方向诱导和体内骨缺损修复作用奠定基础。方法: 从 cDNA 文库中 PCR 扩增 BMP2 和 VEGF165 目的基因, 并将其插入腺病毒穿梭质粒 pAd-MCMV-GFP 的多克隆位点, 将构建的重组穿梭质粒 pAd-MCMV-BMP2-VEGF165 和腺病毒辅助质粒 pHGloxΔE1, 3Cre 共转染细胞 HEK293 细胞内, 经历腺病毒基因重组及出毒后收集细胞, 多次冻融离心获取病毒溶液 (Ad-BMP2-VEGF165)。进一步纯化并测定病毒滴度, 随后通过转染兔骨髓间充质干细胞并检测 BMP2 和 VEGF165 双目的基因表达和倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达。结果: 基因测序、菌落 PCR、Western blotting、Real-time PCR、绿色荧光蛋白表达均表明载体 Ad-BMP2-VEGF165 构建成功, 可稳定转染骨髓间充质干细胞内并稳定表达, 经测定腺病毒载体滴度达到 1×10^{10} PFU/ml。结论: 携带人 BMP2 和 VEGF165 双基因共表达重组腺病毒载体构建成功, 并能获得高滴度的病毒感染液。

【关键词】 骨形态发生蛋白; 血管内皮生长因子; 腺病毒载体; 骨髓间充质干细胞

中图分类号: R34

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2021.07.017

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Construction and identification of recombinant adenovirus vector and observation of its transfecting rabbit bone marrow mesenchymal stem cells LI Qian-hui, MENG Chun-yang, MA Feng-yu, and ZHANG Cong*. Department of Spine Surgery, Zhongda Hospital of Southeast University Medical School, Nanjing 210009, Jiangsu, China

ABSTRACT Objective: To construct and identify adenovirus vector co-expressing hBMP2 and hVEGF165 fusion protein which labeled with green fluorescence protein, and laying the foundation of the effect of hBMP2 and hVEGF165 gene inducing BMMSCs differentiation to osteoblast and bone defect repaired in the body. **Methods:** BMP2 and VEGF165 gene was amplified from cDNA library by PCR and inserted to the polyclonal site of adenovirus shuttle plasmid pAd-MCMV-GFP. Ad-BMP2-VEGF165 was recombinated and propagated in HEK293 cells by co-transfecting with the constructed recombinant shuttle plasmid pAd-MCMV-BMP2-VEGF165 and adenovirus helper plasmid pHGloxΔE1, 3Cre. The recombinant adenovirus was purified and virus titer was determined, and then to research GFP expression and to calculate the adenovirus transfection rate in rabbit BMMSCs. **Results:** The recombinant adenovirus vector Ad-BMP2-VEGF165 was successfully constructed by the methods of gene analyzing, colony PCR, Western blotting and observing GFP expression, and the titer of the adenovirus was 1×10^{10} PFU/ml. **Conclusion:** Recombinant adenovirus vector containing hBMP2 and hVEGF165 gene was successfully constructed and its high titer was obtained.

KEYWORDS Bone morphogenetic protein; Vascular endothelial growth factor; Adenovirus vector; Bone marrow mesenchymal stem cells

骨缺损常由创伤、肿瘤切除、先天畸形、骨骼疾病和植入物周围无菌性松动引起, 骨缺损的重建对

骨科医生和科研工作者来说都是一个巨大的挑战, 因为骨缺损修复是必不可少的, 并且对应大段缺损不能完全自我修复^[1-3]。人工骨材料多种多样, 已显示出良好的应用价值, 但是因为骨缺损造成骨组织和微血管的缺失, 即使使用人工骨或同种异体骨移植修复往往需要较长的时间, 且存在愈合率低和排斥反应高等风险。自体骨的使用仍然被视为黄金标准, 但是该方式具有许多缺点, 例如血管丢失、微血

基金项目: 中央高校基本科研业务专项资金 (编号: 2242020K40156); 国家自然科学基金 (编号: 81871810)

Fund program: Fundamental Research Funds for Central Universities (No. 2242020K40156)

通讯作者: 张聪 E-mail: zhangcong19@hotmail.com

Corresponding author: ZHANG Cong E-mail: zhangcong19@hotmail.com

管重建障碍、供体部位感染、无法预测的治愈和吸收以及取材部位和取材数量的局限性等,因此不能有效满足临床的切实需求^[4-5]。在这种情况下,组织工程骨方法正在迅速发展,作为自体骨移植程序的可靠的有前途的替代方法。对于组织工程骨的成功结局,选择合适的骨诱导和(或)血管生成生长因子,合适的递送方法和合适的材料支架至关重要;另外,血管生成对于组织工程骨构建体的存活和整合以及有效的骨愈合至关重要。随着基因治疗技术的飞速发展,多种生长因子已被证明可以增加骨再生,特别是血管生成和骨形成的生长因子,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP),其中 VEGF165 和 BMP2 是促进骨修复的两个最常用和最有效的细胞因子^[6-7]。

本实验中,选择使用腺病毒作为载体共表达 BMP2 和 VEGF165,获得骨缺损修复微环境下有效生长因子,以期实验提供一种新型组织工程骨基因载体,并转染种子细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)观察活性表达。然而,共表达 BMP2 和 VEGF165 参与骨缺损修复病理生理过程中是否存在协同效应和加速骨生长,且是否优越于单基因载体的修复效果将在今后的动物实验来进一步证实。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

pAd-MCMV-GFP、cDNA 文库购自上海汉恒生物科技有限公司,骨架质粒 pBHGloxΔE1,3Cre 购自 Microbix Biosystems 公司,限制性内切酶(BamH I, Not I, EcoR I, Pst I),T4 连接酶购自南京凯基生物公司,小鼠抗人 VEGF165、BMP2、β-actin 抗体购自 Abcam 公司,SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate 显影购自 Thermo Scientific 公司。

1.2 骨髓间充质干细胞分离培养及鉴定

新西兰大白兔行髂骨穿刺抽吸骨髓,将骨髓液

与 PBS 等比例混匀加入含 Percoll 分离液的离心管中,3 000 r/min 离心 30 min,吸取含单个核细胞的乳白色界面层至另一试管,PBS 洗涤 2 次,接种 10% FBS DMEM/F12 培养基中,待细胞生长至 80% 融合时传代。取生长旺盛的第 3 代细胞进行表型鉴定,流式细胞仪进行检测 CD14、CD34、CD29、CD44 抗体。

1.3 观察指标与方法

1.3.1 目的基因扩增 取 hcDNA 文库分别对目的基因 VEGF165、BMP2、T2A 扩增,各自引物及酶切位点见表 1,将目的基因提取,琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3.2 穿梭质粒 pAd-MCMV-BMP2-T2A-VEGF165 的构建 取 PCR 扩增的目的基因 VEGF165、BMP2 和 T2A 与相应限制性内切酶充分混合,移液器轻轻吹打,振荡器震荡数秒,放入恒温水浴锅内酶切消化。pAd-MCMV-GFP 载体质粒经 PstI、NotI 酶切,消化酶切产物经电泳跑胶,轻轻选取目的片段切下,回收提取酶切产物。将载体与所得目的基因片段混合,移液器轻轻吹打,配制 20 μl 体系下 4 ℃ 过夜。

1.3.3 穿梭质粒 pAd-MCMV-BMP2-T2A-VEGF165 的筛选与鉴定 离心管、培养皿、移液枪头等经高压灭菌处理,防止外源性 DNA 及 DNA 酶污染。化学法制备感受态细胞,将质粒转化到感受态细胞 DH5α 中,细胞离心收集,接种含氨苄抗性培养基内进行抗性筛选。1 d 后温箱内取出并肉眼观察菌落生长,取挑菌环酒精灯上灼烧消毒,挑取菌落进行 PCR 鉴定和基因测序。

1.3.4 重组腺病毒 Ad-BMP2-VEGF165 的包装 载体质粒 pAd-MCMV-BMP2-T2A-VEGF16 和骨架质粒 pBHGloxΔE1,3Cre 与脂质体 Lipofetmiane 2000 混匀共转染 HEK293 细胞,参照转染说明书要求进行混合转染,每日观察细胞毒性效应。当倒置显微镜下观察到部分细胞开始脱落,相互融合一起类似葡萄样或串珠样时,胰酶消化并冻融 3 次,高速离心获得的上清液即是第 1 代(P1)腺病毒 Ad-BMP2-

表 1 引物序列

Tab.1 Primers used in the real-time PCR

基因名称	引物序列(5'-3'含酶切位点)
β-actin	正向:GGGACCTGACTGACTACCTC 反向:TCATACTCCTGCTTGCTGAT
BMP2	正向:TCTCGAGATGCTGGAAGGACCCGCTGTCTTC-3(Pst I) 反向:TGGATCCCTAGCGACACCCACAACCCCTCCACA-3(BamH I)
T2A	正向:GATCCGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAAT (BamH I) 反向:AATCCTCCCGGAAGGGCCGGATTCTCCTCCACGTCACCGCATGTTAGAAG (EcoR I)
VEGF165	正向:TAATCCATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTGC(EcoRI) 反向:TGCGGCCGCTCACCGCCTCGCTTGTACATCTG(Not I)

VEGF165,使用病毒专用离心管收藏于-80℃冰箱内。

1.3.5 重组腺病毒 Ad-BMP2-VEGF165 的扩增与纯化 取 P1 腺病毒感染 293 细胞,当发生细胞毒性效应时收集细胞与培养基,按照上述方法取上清液进行纯化。最后通过超速离心将病毒上清液与 CsCL 混合。经过 2 次超速离心后,吸出蓝白条下的病毒溶液透析 3 遍,并且每小时更换溶液。最后测量腺病毒滴度并保存在-80℃生物冰箱内。

1.3.6 重组腺病毒 Ad-BMP2-VEGF165 的滴度测定 293 细胞接种 96 孔板内,12 h 后可转染。取 10 μl 腺病毒原液按 10 倍比例稀释,稀释不同梯度,感染 96 孔板中细胞,每孔加入 100 μl 病毒稀释液,每天观察细胞病变现象,计算重组腺病毒 Ad-BMP2-VEGF165 的滴度测定。

1.3.7 验证重组腺病毒 Ad-BMP2-VEGF165 过表达效果 预实验获取最佳的感染复数 (MOI=100),裂解收集蛋白上清液电泳,孵育目的蛋白一抗二抗,采用 Thermo Scientific 公司生产的 SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate 显影,参试剂盒说明书以 1:1 的比例混合 A 液和 B 液,选择自动曝光参数显影目的蛋白条带。

同时,提取转染后细胞的全基因行目的基因 Real-time PCR 检测,打开 LightCycler 96 机器和软件,设置参数,依据每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系,利用已知起始拷贝数的标准品制作标准曲线,测定未知的 Ct 值即可计算出该样品的起始拷贝数,重复实验 3 次,每组 3 个复孔,计算对照组和实验组的 Ct 值,各组目的基因相对表达量经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算得出。

1.3.8 腺病毒转染骨髓间充质干细胞效率测定 取上述第 3 代 BM-SCs,重组腺病毒 Ad-BMP2-VEGF165 室温融化按照不同 MOI 值 (70、90、100 和 120) 转染,12 h 后更换完全培养基,细胞培养箱内继续培养 48 h,倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况,计算腺病毒转染效率 (绿色荧光蛋白阳性细胞数/细胞总数×100%)。

1.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件处理,实验至少重复 3 次,定量资料用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,两组比较采用两独立样本 t 检验,多个样本均数间的比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),方差不齐时使用 Tamhane T2 检验,方差齐时使用 Bonferroni 进行多重比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 鉴定结果

第 3 代 BMSCs 行流式细胞术检测细胞表面分

子标志的结果显示:细胞表面表达 CD29 (99.82%), CD44 (94.14%) 不表达 CD14 (3.11%), CD34 (0.34%)。表明分离培养获得的细胞符合 MSCs 基本特征。

2.2 BMP2 和 VEGF165 基因片段 PCR 产物电泳鉴定

通过 PCR 技术从 cDNA 文库中扩增出 BMP2 和 VEGF165 基因,电泳结果可清晰显示出 BMP2 和 VEGF165 的碱基片段分别为 1191bp 和 576bp,与人 CDS 结构域相同 (图 1)。

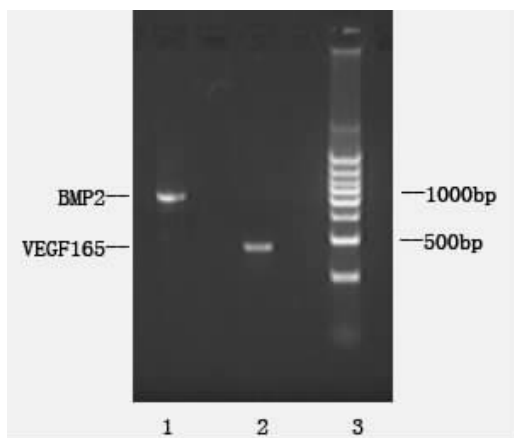


图 1 琼脂糖凝胶电泳检测 BMP2 和 VEGF165 目的基因片段 (1.BMP2;2.VEGF165; 3.Marker)

Fig.1 Agarose gel electrophoresis for detection of BMP2 and VEGF165 interesting gene (1.BMP2;2.VEGF165; 3.Marker)

2.3 BMP2 和 VEGF165 基因片段及 pAd-MCMV-GFP 酶切产物电泳鉴定

质粒 pAd-MCMV-GFP 裂解酶切后的目的基因 VEGF165、BMP2 基因片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,从凝胶电泳图中可以观察到各自相应的目的片段,符合对应的片段范围大小 (图 2)。

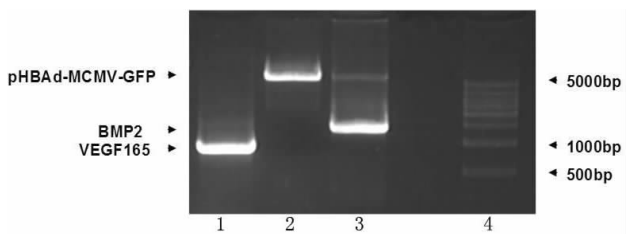


图 2 琼脂糖凝胶电泳检测 pHBAd-MCMV-GFP、VEGF165、BMP2 酶切后片段 (1.BMP2;2. pHBAd-MCMV-GFP;3.VEGF165;4.Marker)

Fig.2 Agarose gel electrophoresis was used to detect fragments of pHBAd-MCMV-GFP, VEGF165 and BMP2 after enzyme digestion (1.BMP2; 2. pHBAd-MCMV-GFP;3.VEGF165;4.Marker)

2.4 pAd-MCMV-BMP2-T2A-VEGF165 菌落 PCR 鉴定与测序

培养箱内取出 LB 培养基并用接种环轻轻提取

单克隆菌落，进行菌落 PCR 鉴定，结果表明克隆 3 和克隆 9 (Clone3 和 Clone9) PCR 阳性，表明成功构建了腺病毒穿梭质粒载体 (图 3)。测序结果表明 VEGF165、BMP2 基因已成功插入载体质粒 pAd-MCMV-GFP。送至测序结果显示与基因库数据库中人 VEGF165 和 BMP2 基因 mRNA 完全一致。

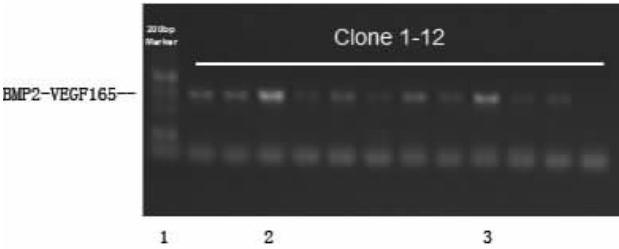


图 3 腺病毒穿梭质粒载体经琼脂糖凝胶电泳鉴定菌落 PCR (1.Marker; 2.Clone 3; 3.Clone9)

Fig.3 Adenovirus shuttle plasmid vector was used to identify colony PCR by agarose gel electrophoresis (1.Marker; 2.Clone 3; 3.Clone9)

2.5 Ad-BMP2-VEGF165 过表达蛋白水平和基因水平验证

Ad-BMP2-VEGF165 转染 Hela 细胞 72 h 后提取细胞蛋白，Western Blotting 验证目的蛋白表达水平，检测结果观察到在 24KD 和 13KD 附近出现目的条带，其蛋白分子量与 BMP2 和 VEGF165 吻合，且与阴性对照组相比蛋白表达显著增加 (见表 2)，表明重组腺病毒转染细胞后成功表达目的蛋白 (图 4a, 4b)。于此同时，两组间 BMP2 和 VEGF165 基因表达也具有明显差异 (图 4c)。

2.6 Ad-BMP2-VEGF165 的滴度测定

对 P1 腺病毒进行反复扩增和纯化，获得高滴度复制缺陷型重组腺病毒 Ad-BMP2-VEGF165，根据滴度公式进行测定 $T=1 \times 10^{10}$ PFU/ml，该浓度完全可

表 2 两组腺病毒目的蛋白和目的基因间比较

Tab.2 Comparison of adenovirus interesting protein and gene between two groups

组别	复孔数	蛋白水平		基因水平	
		BMP2	VEGF165	BMP2	VEGF165
Ad-GFP	3	0.29±0.05	0.56±0.05	0.37±0.06	0.41±0.10
Ad-BMP2-VEGF165	3	0.56±0.07	0.84±0.11	0.56±0.09	0.60±0.04
t 值		-5.133	-10.021	-3.834	-2.848
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

以用于后续细胞和动物实验。

2.7 Ad-BMP2-VEGF165 转染 BM-MSCs 的转染率测定

放置在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白在不同视野下的表达，计算转染效率，获取最佳 MOI 值。结果表明：腺病毒载体转染兔骨髓间充质干细胞 48 h，MOI 从 70 到 120 时表达绿色荧光蛋白的细胞数量逐渐增加，当 MOI=120 时细胞开始变圆、脱落、死亡；当 MOI=100 时，转染效率可达 90% 以上 (图 5)。

3 讨论

本实验选用 AdMax 腺病毒包装系统，原理是基于通过腺病毒穿梭质粒 (携带外源基因片段) 和包装质粒 (腺病毒基因组框架) 共转染 HEK293 细胞，并细胞内利用其 Cre/LoxP 剪接系统作用进行重组^[8]。在两种质粒共转染前，科研人员不需要将质粒线性化，直接细胞内重组产生重组腺病毒，其与 Adeasy 系统相比，合成病毒的成功率更高。本实验使用的 AdMax 系统，由于骨架质粒上 E3 区域编码产物的缺失导致宿主免疫无应答，减少宿主排斥反应，且利用 T2A 自我加工能力蛋白酶，翻译表达出互不影响的两种目的蛋白。

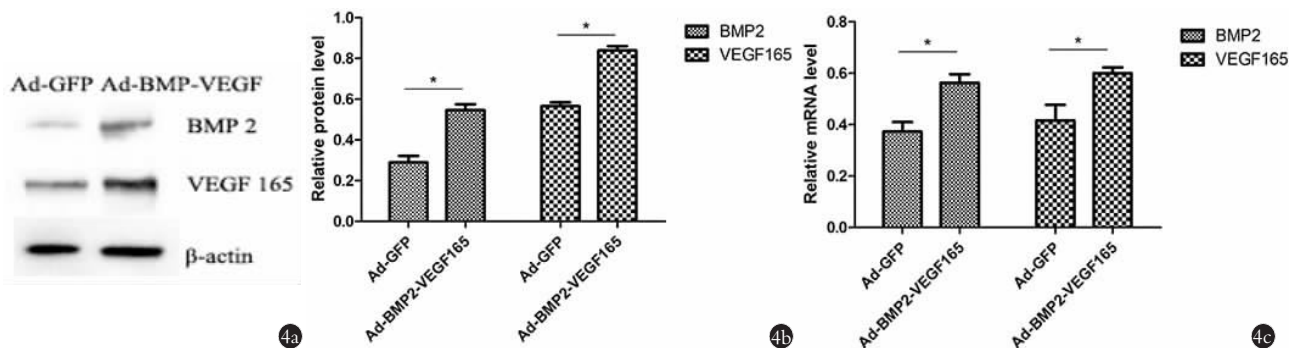


图 4 Ad-BMP2-VEGF165 腺病毒转染细胞后可成功表达外源性目的基因及蛋白 4a, 4b. Western Blotting 检测 BMP2、VEGF165 蛋白过表达 4c. Real-time PCR 检测 BMP2、VEGF165 过表达水平。柱状图显示目的蛋白及基因平均值相对内参 GAPDH 表达量 (*P<0.05)

Fig.4 Ad-BMP2-VEGF165 can successfully express exogenous gene and protein 4a, 4b. Western blotting was used to detect the protein overexpression of BMP2 and VEGF165 4c. Real-time PCR was used to detect the overexpression of BMP2 and VEGF165. The histogram showed that the average value of interesting protein and gene relative to the loading control GAPDH (*P<0.05)

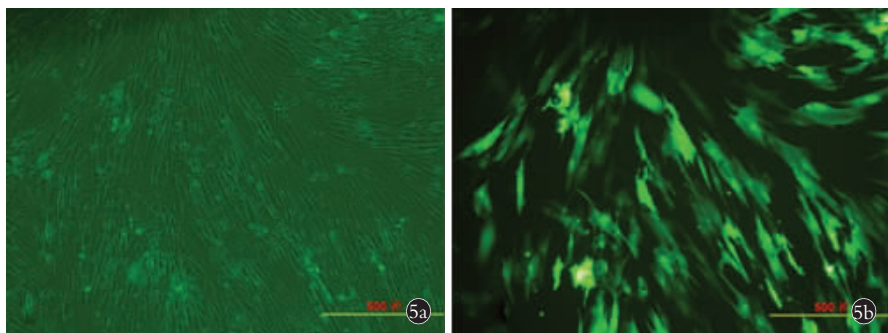


图 5 Ad-BMP2-VEGF165 转染 BMMSCs 后形态观察及转染效率测定 5a. 腺病毒转染细胞 48 h 后细胞形态大体观察 5b. 腺病毒转染细胞 48 h 后镜下观察并计算绿色荧光蛋白蛋白表达(MOI=100 时的转染效率,与图 5a 为相同视野)

Fig.5 Morphological observation and transfection efficiency determination of Ad-BMP2-VEGF165 transfected BMMSCs 5a. The cell morphology was observed after adenovirus transfection 48 hours 5b. The

expression of GFP was observed and calculated under the microscope after adenovirus transfection 48 hours (MOI=100, the same field of view as Fig. 5a)

组织工程骨的出现为骨缺损的治疗提供了一种良好的方法,但在植入后加速骨缺损的修复速度取决于缺损处是否长期存在微血管生长因子和成骨诱导因子,以及后期通过在缺损处有效血管化和成骨细胞的增殖、矿化骨修复缺损,两者缺一不可。众所周知,多向分化潜能干细胞、良好生物相容性支架材料及调节成骨细胞分化的生长因子是构建组织工程骨的 3 个基本要素^[9-10]。VEGF165 可从骨髓中募集血管内皮细胞,上调其他血管生成因子促进血管生成和新血管的形成过程。若缺乏将使血管向正常组织输送氧气和营养的能力将受到严重干扰,从而抑制了正常组织的愈合和再生能力。BMP2 属于 TGF-β 超家族,具有诱导间充质细胞分化为成骨细胞,从而在形成新骨的过程中发挥重要作用^[11]。Cakir-Ozkan 等^[12]报道不同组别之间骨修复差异,其中外源性植入 BMP2 组加速骨生长愈合,而 VEGF165 组微血管形成相对较多,而含有 BMP2 和 VEGF165 组在促进新骨重建方面效果最好。Moser 等^[13]研究显示,与单独使用 BMP2 相比,骨形态发生蛋白 BMP2 和 VEGF 在不同剂量组合中的联合使用并未增强异位骨形成数量。VEGF165 使用后一般会在 4 周后上调 Runx2,这可能会延迟骨愈合进程。合适比例的使用可获得植入生物支架上更均匀的骨形成分布,而更高数量的 VEGF165 则没有这种作用。同样 Huang 等^[14]研究报道与单独使用 BMP2 或 VEGF165 相比,BMP2 和 VEGF165 的联合使用已显示出更好的骨再生和血管生成,早期即可获得骨缺损处的大量成骨细胞分化及微血管化。同时,骨髓间充质干细胞是近年来骨组织工程领域替代损伤或病变骨细胞的重要外源性细胞来源,因为它具有取材较为便捷、良好增殖能力、多向分化潜能、低免疫源性等优点。在临床研究中已证明,骨髓间充质干细胞可有效治疗骨不连骨折和骨缺损,并增强牵引条件下成骨作用^[15]。然而对于老年患者或血液肿瘤患者,自身骨髓间充质干细胞来源有限,干细胞活性降低。研究证实,来

自老年骨质疏松患者的骨髓间充质干细胞的成骨分化能力降低,这可能导致延迟愈合或骨不连,必须依靠外源性输入骨缺损部位^[16]。

因此,构建协同释放 VEGF165 和 BMP2 生长因子腺病毒并转染间充质干细胞是骨缺损再生修复方法的良好治疗选择。本实验成功构建重组腺病毒 Ad-BMP2-VEGF165,转染并共表达双基因蛋白,且具有良好的病毒浓度和转染效率,可为将来进一步观察 BMP2 和 VEGF165 双基因腺病毒载体转染骨髓间充质干细胞修复骨缺损提供良好的理论和实验基础。

参考文献

[1] Alluri R, Song X, Bougioukli S, et al. Regional gene therapy with 3D printed scaffolds to heal critical sized bone defects in a rat model[J]. J Biomed Mater Res A, 2019, 107(10):2174-2182.
 [2] Tan J, Zhang M, Hai Z, et al. Sustained release of two bioactive factors from supramolecular hydrogel promotes periodontal bone regeneration[J]. ACS Nano, 2019, 13(5):5616-5622.
 [3] Xia P, Wang S, Qi Z, et al. BMP-2-releasing gelatin microspheres/PLGA scaffolds for bone repairment of X-ray-radiated rabbit radius defects[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1):1662-1673.
 [4] Cheng A, Krishnan L, Tran L, et al. The effects of age and dose on gene expression and segmental bone defect repair after BMP-2 delivery[J]. JBMR Plus, 2019, 3(2):e10068.
 [5] Hu T, Naidu M, Yang Z, et al. Bone regeneration by controlled release of bone morphogenetic protein-2: a rabbit spinal fusion chamber molecular study[J]. Tissue Eng Part A, 2019, 25(19-20):1356-1368.
 [6] Wang C, Tanjaya J, Shen J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma knockdown impairs bone morphogenetic protein-2-induced critical-size bone defect repair[J]. Am J Pathol, 2019, 189(3):648-664.
 [7] Lin Z, J Wang S, Lin L, et al. Effects of BMP2 and VEGF165 on the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Exp Ther Med, 2014, 7(3):625-629.
 [8] Lin JQ, Lin CZ, Lin XZ, et al. Construction of a bicistronic recombinant adenoviral vector for human interleukin-10 and enhanced green fluorescent protein expression in bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(1):102-108.

- [9] Wan Z, Zhang P, Liu Y, et al. Four-dimensional bioprinting: Current developments and applications in bone tissue engineering[J]. *Acta Biomater*, 2020, 101: 26–42.
- [10] Kim HD, Amirthalingam S, Kim SL, et al. Biomimetic materials and fabrication approaches for bone tissue engineering[J]. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6(23).
- [11] 范少鹏, 李晓辉, 时彩霞, 等. 慢病毒介导 BMP-2 过表达质粒转染骨髓间充质干细胞联合丝素蛋白支架向成骨细胞转化的实验研究[J]. *中国骨伤*, 2019, 32(9): 853–860.
FAN SP, LI XH, SHI CX, et al. Lentivirus mediated BMP-2 over-expression plasmid transfection into bone marrow mesenchymal stem cells combined with silk fibroin scaffold for osteoblast transformation[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2019, 32(9): 853–860. Chinese with abstract in English.
- [12] Cakir-Ozkan N, Egri S, Bekar E, et al. The use of sequential VEGF- and BMP2-releasing biodegradable scaffolds in rabbit mandibular defects[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2017, 75(1): 221 e1–221 e14.
- [13] Moser N, Goldstein J, Kauffmann P, et al. Experimental variation of the level and the ratio of angiogenic and osteogenic signaling affects the spatiotemporal expression of bone-specific markers and organization of bone formation in ectopic sites[J]. *Clin Oral Investig*, 2018, 22(3): 1223–1234.
- [14] Huang B, Yao Q, Huang Y, et al. Combination use of BMP2 and VEGF165 promotes osseointegration and stability of titanium implants in irradiated bone[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 8139424.
- [15] Hadjiargyrou M, O'Keefe RJ. The convergence of fracture repair and stem cells: interplay of genes, aging, environmental factors and disease[J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(11): 2307–22.
- [16] D'Ipollito G, Schiller PC, Ricordi C, et al. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow[J]. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(7): 1115–1122.

(收稿日期: 2020-08-18 本文编辑: 王玉蔓)

· 临床研究 ·

桡骨远端“T”形钢板结合缝合锚钉治疗 Neer II b 型锁骨远端骨折

王进, 王志旭, 李自才, 蒲彦川, 王虎林, 苗生龙, 毕虎, 王冬, 徐栋林, 徐志斌
(武威市人民医院骨一科, 甘肃 武威 733000)

【摘要】 目的: 比较桡骨远端“T”形钢板结合缝合锚钉与锁骨远端解剖锁定钢板联合缝合锚钉治疗 Neer II b 型锁骨远端骨折的临床疗效。方法: 回顾分析自 2014 年 6 月至 2018 年 6 月收治 42 例 Neer II b 型锁骨远端骨折患者的临床资料, 根据手术方式的不同, 分为桡骨远端“T”形钢板结合缝合锚钉组(观察组)及锁骨远端解剖锁定钢板联合缝合锚钉(对照组)。其中观察组 22 例, 男 13 例, 女 9 例; 年龄 22~70(45.78±14.44)岁; 左侧 12 例, 右侧 10 例; 车祸伤 8 例, 摔倒 14 例。对照组 20 例中, 男 12 例, 女 8 例; 年龄 24~66(44.17±15.58)岁; 左侧 13 例, 右侧 7 例; 车祸伤 6 例, 摔倒 14 例。比较两组患者手术时间、术中出血量、骨折愈合时间, 并采用 Constant-Murley 评分评定肩关节功能。结果: 两组患者术后均获得随访, 时间 18~24(20.96±2.02)个月, 两组患者术后切口均 I 期愈合, 末次随访时两组病例骨折端均骨性愈合。两组患者在手术时间、术中出血量、骨折愈合时间方面比较差异均无统计学意义($P>0.05$); 术后 3 个月两组肩关节功能比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论: 两种方法治疗 Neer II b 型锁骨远端骨折均可获得满意的疗效, 尤其适用于锁骨远端粉碎性骨折或骨质疏松患者; 应用桡骨远端“T”形钢板结合缝合锚钉治疗 Neer II b 型锁骨远端骨折临床效果满意, 给临床提供了另外一种可行的治疗方案。

【关键词】 锁骨; 骨折; 骨折固定术, 内
中图分类号: R638.41

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2021.07.018

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Case-control study on T-plate combined with suture anchors for the treatment of Neer II b clavicle fractures WANG Jin, WANG Zhi-xu, LI Zi-cai, PU Yan-chuan, WANG Hu-lin, MIAO Sheng-long, BI Hu, WANG Dong, XU Dong-lin, and XU Zhi-bin. Department of Orthopaedics, Wuwei People's Hospital, Wuwei 733000, Gansu, China

通讯作者: 蒲彦川 E-mail: softface007@126.com

Corresponding author: PU Yan-chuan E-mail: softface007@126.com