

# 应用血管内皮生长因子基因治疗股骨头缺血性坏死的实验研究

刘日光<sup>1</sup>, 杨述华<sup>2</sup>, 易诚青<sup>2</sup>, 刘建湘<sup>2</sup>, 杨操<sup>2</sup>

(1. 贵阳医学院附属医院骨科, 贵州 贵阳 550004; 2. 华中科技大学同济医学院协和医院)

**摘要** 目的:通过建立犬股骨头缺血坏死模型,探讨应用脱蛋白骨复合转染血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)基因骨髓基质细胞植入治疗股骨头缺血坏死的可行性。方法:实验选取 36 只成年犬,随机分为 3 组,每组 12 只。A 组为脱蛋白异体骨复合转染 VEGF 基因的自体骨髓基质细胞;B 组为脱蛋白异体骨复合未转染基因的自体骨髓基质细胞;C 组单纯植入脱蛋白骨材料。采用液氮冷冻法制作狗股骨头缺血坏死模型,将细胞骨材料复合物植入缺血坏死股骨头内。应用微循环灌注方法了解股骨头内的血运情况,组织形态学观察坏死股骨头的修复情况,免疫组化方法检测 VEGF 的表达,骨密度仪测定股骨头的骨密度。结果:A 组 4 周后股骨头内有 VEGF 表达,12 周后股骨头内有大量的树枝状血管生成,大量新骨形成,骨密度增高;B、C 组均无 VEGF 基因表达,B 组有部分新骨及血管生成,C 组仅见少量类骨质形成,血管再生不明显。结论:利用脱蛋白骨复合转染 VEGF 基因的骨髓基质细胞可促进新骨形成与血管再生,有利于促进坏死骨的修复。

**关键词** 血管内皮生长因子; 基因疗法; 组织工程; 股骨头缺血性坏死; 动物,实验

**Treatment of avascular necrosis of the femoral head with VEGF<sub>165</sub> gene** LIU Ri-guang<sup>\*</sup>, YANG Shu-hua, YI Cheng-qing, LIU Jian-xiang, YANG Cao. <sup>\*</sup> Department of Orthopaedics, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China

**Abstract Objective:** To explore possibility of a new therapy for avascular necrosis of the femoral head using deproteinized bone (DPB) delivery of marrow stromal cells (MSCs) transfected with VEGF<sub>165</sub> gene. **Methods:** 36 adult dogs were evenly randomized into three groups according to the materials for implantation. Group A was implanted with DPB delivery of MSCs transfected with VEGF<sub>165</sub> gene; group B was implanted with DPB delivery of MSCs without transfection of VEGF<sub>165</sub> gene; group C was implanted with DPB only. The avascular necrosis model was made on left femoral head by use of liquefied nitrogen. The expression of VEGF<sub>165</sub> gene was examined by immunohistochemical method. Angiogenesis of the femoral head was detected by the method of microcirculatory perfusion. Repairing of the femoral head was observed by histological method and bone density of the femoral head was determined by bone-density-measuring machine. **Results:** The expression of VEGF<sub>165</sub> gene was detectable in the group A, but not in the other two groups, 4 weeks after the operation. Three branch-shaped angiogenesis was more abundant and bone density was higher in the group A than those in the other two groups 12 weeks after the operation. Bone repairing was also much quicker in the group A as compared with the other two groups. **Conclusion:** DPB delivery of MSCs transfected with VEGF<sub>165</sub> gene can not only augment angiogenesis and improve microcirculation, but also accelerate bone repairing. This therapy is hopeful for the treatment of avascular osteonecrosis.

**Key words** Vascular endothelial growth factor; Gene therapy; Tissue engineering; Avascular necrosis of femur head; Animals, laboratory

股骨头缺血坏死常因发展至股骨头塌陷而并发骨性关节炎

炎而导致肢体残疾。对本病采用全髋置换术治疗在一定程度上提高了患者的生活质量,但目前的假体使用寿命仍不能达到患者的预期寿命,尚需再次手术翻修,因而寻求尽量保存股骨头,阻断或减缓病程发展以避免或推迟进行全髋置换的治疗手段仍然迫切需要。随着生物技术、组织工程技术与基因

基金项目:国家自学科学基金项目(编号:30170945)

通讯作者:刘日光 Tel:0851-6855119-3380 E-mail:liuriguang5629519@tom.com

转染技术的发展,治疗性血管生成有可能给股骨头缺血坏死的治疗带来新希望。本实验试用转染人 VEGF<sub>165</sub>基因的犬自体骨髓基质细胞(marrow stromal cells, MSCs)复合脱蛋白自体骨植入坏死股骨头,促进血管的再生与血运的重建,加速股骨头的修复进程。

1 材料与方法

1.1 脱蛋白自体骨的制备 按文献方法<sup>[1]</sup>进行。

1.2 骨髓基质细胞的提取与培养 按文献方法<sup>[1]</sup>进行。

1.3 VEGF<sub>165</sub>基因转染 MSCs 及表达测定 按文献方法<sup>[1]</sup>进行。

1.4 骨髓基质细胞在脱蛋白骨上的种植 按文献方法<sup>[2]</sup>进行。

1.5 股骨头缺血坏死模型的制作与细胞骨材料植入 随机选取 14 月龄成年犬(同济医学院实验动物中心提供)36 只,用戊巴比妥静脉麻醉,剪除左侧髋关节周围的皮毛,严密消毒后,作髋关节后外侧切口,暴露股骨头并使其脱位。参考文献<sup>[3]</sup>倒入液氮维持 1~2 min,造成坏死模型。用生理盐水复温后,用直径 3.5 mm 电钻从股骨头颈交界处纵向钻一孔到关节软骨下方,然后植入种植自体骨髓基质细胞的脱蛋白骨材料,术后连续 7 d 每日肌注青霉素 8 × 10<sup>4</sup> U/只预防感染。实验共分为 3 组,每组 12 只。A 组为脱蛋白自体骨复合转染 VEGF 基因自体细胞;B 组为脱蛋白自体骨复合自体细胞;C 组钻孔单纯植入脱蛋白骨材料。于术后 4、8、12 周分批处死。处死前在静脉麻醉下打开腹腔,结扎腹主动脉近心端,于恒定压力下向腹主动脉远心端灌注低分子右旋糖酐与印度墨水混合液(3:1)至双下肢发黑,再行空气栓塞致死。

1.6 组织学观察 取股骨头标本先行大体观察其外形、关节面色泽与钻孔部位的骨痂生长情况。然后用 4%多聚甲醛固定,15%EDTA 脱钙,纵向取材,石蜡包埋切片,100~200 μm 的切片以冬清油制作透明标本,低倍光镜下观察血管情况;厚 5 μm 的切片作 HE 染色及免疫组化检测。

1.7 免疫组化检测 把石蜡切片置于多聚赖氨酸包埋的载玻片上。经二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水后,采用 SABC 法检测 VEGF<sub>165</sub>基因的表达。抗为鼠抗人 VEGF<sub>165</sub> IgG 单克隆抗体,按 1:30 滴度加在玻片上,37 反应 20 min 后,加入 SABC,37 反应 1 h 后,再按 1:100 加抗(生物素化兔抗鼠 IgG),37 反应 20 min 后加入 SABC,37 反应 20 min, PBS 洗 2 次, DAB 显色,苏木素轻度复染、脱水、透明、封片。

1.8 骨密度测定 将股骨标本除去软组织后置于 DMS-Challenger 8.0.7 骨密度仪上,测定股骨头骨密度。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 10.0 软件包进行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 VEGF 表达免疫组化检测结果 A 组治疗 4 周后,免疫组化检测股骨头内大部分细胞染成棕黄色,说明转染的骨髓基质细胞在体内增殖并表达 VEGF 蛋白,8 周后股骨头内未见细胞显色,证明 8 周后已无 VEGF 的表达。B、C 两组术后 4、8 周检测均未见细胞显色,证明无人 VEGF 蛋白质的表达。

2.2 组织学观察结果 术后 4 周时 A 组可见植入物周围有大量的间充质细胞与成骨细胞,邻近钻孔周缘未分化间充质细胞及毛细血管开始增殖,并迅速充满坏死股骨头骨髓间隙;

B 组可见植入物周围有大量的间充质细胞及成骨细胞,周围骨髓腔内有少量间充质细胞增生,血管生成较少;C 组股骨头钻孔内有少量间充质细胞及成纤维细胞填充,孔周围骨小梁坏死,可见骨陷窝空虚,骨细胞与骨髓细胞坏死。术后第 8 周时 A 组股骨头有大量血管、成纤维细胞、间充质细胞增生,周围骨小梁可见有骨吸收,成骨细胞增生,有明显的新骨形成,髓腔中见大量的间充质细胞及血管,股骨头墨染面积明显增多;B 组可见股骨头有大量成纤维细胞、间充质细胞增生,成骨细胞增生,可见到新骨形成,髓腔有大量的间充质细胞,但血管生成少,其股骨头墨染面积增多不明显;C 组可见孔内有大量间充质细胞、成纤维细胞,未有新骨形成,股骨头墨染面积非常少。术后 12 周时 A 组股骨头表面可见有新生的交织骨形成,坏死骨小梁表面覆盖大量新骨,坏死骨小梁大部分吸收,被大量的新生骨所替代,有破骨细胞吸收和清除死骨,髓腔内毛细血管增生旺盛,可见到树状血管充盈;B 组可见股骨头有大量成纤维细胞、间充质细胞增生,周围骨小梁可见有骨吸收,有明显的新骨形成,髓腔中见大量的间充质细胞,其股骨头墨染面积较 8 周时墨染程度增多,呈团状分布;C 组可见孔内有大量间充质细胞、成纤维细胞,有少量新骨形成,股骨头墨染很少,呈散点状分布。

2.3 股骨头骨密度检测结果 见表 1,8 周后 B、C 两组与 A 组比较股骨头骨密度均有明显降低,差异有显著性(P < 0.01)。3 组进行方差分析, F = 62.48, P < 0.01;组间 t 检验, A 组与 B、C 组比较, P < 0.05。

表 1 股骨头骨密度情况比较(g/cm<sup>2</sup>)

Tab. 1 Comparison of bone density of femoral head (g/cm<sup>2</sup>)

Groups	4 weeks	8 weeks	12 weeks
A	0.34 ± 0.03	0.44 ± 0.06 *	0.53 ± 0.12 *
B	0.35 ± 0.07	0.37 ± 0.02	0.40 ± 0.09
C	0.32 ± 0.06	0.35 ± 0.05	0.41 ± 0.13

注: P < 0.01, \* P < 0.05

Note: P < 0.01, \* P < 0.05

3 讨论

血管生成在骨组织重建及修复过程中具有十分重要作用。在正常生理情况下,骨改建过程是由成骨细胞实施,但成骨细胞总是沿着新生毛细血管方向进行增殖扩张的,首先由破骨细胞进行骨吸收,然后毛细血管长入,并带入成骨细胞,围绕血管形成新的骨单位。Brighton 等<sup>[4]</sup>研究发现在骨折修复过程中,由成骨细胞所致的成骨也是同新生血管侵入骨痂联系在一起的;在软骨成骨过程中,新生血管侵入未钙化与钙化的软骨,从而导致软骨消失而被骨组织所代替。近来研究表明,软骨下的血管内皮细胞是产生影响软骨细胞分化的生长因子发源地,软骨细胞的分化与血管内皮侵入是互相控制才能使软骨内化骨正常进行<sup>[5]</sup>。在股骨头缺血坏死的自然修复过程中,也首先是血管再生然后再进行骨再生<sup>[6]</sup>。

血管生成是受很多生长因子所调控,VEGF 是其中最为重要的一种上调血管生成的细胞因子,与骨组织修复重建关系密切。Wang 等<sup>[7]</sup>研究发现,VEGF 可促进血管内皮细胞分泌胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 及内皮素-1 (ET-1) 刺激

成骨细胞生长。Gerber 等<sup>[8]</sup>研究表明阻断内源性 VEGF 的活性,骨形成与骨吸收就终止。Miday 等<sup>[9]</sup>报道,VEGF 能直接刺激成骨细胞 ALP 活性,并促进成骨细胞的迁移与分化。Niida 等<sup>[10]</sup>发现 VEGF 可促进破骨细胞的聚集迁移。Nakagawa 等报道<sup>[11]</sup>VEGF 促进破骨细胞骨吸收与成熟破骨细胞的存活。

由于 VEGF 特异的促血管生成作用,人们考虑用 VEGF 治疗心肌或肢体缺血性疾病,Takeshita 等<sup>[12]</sup>将 VEGF<sub>165</sub>注射到缺血下肢的髂动脉内,血管造影及组织切片发现较对照组侧支循环增加。由于 VEGF 蛋白质在体内很快被降解,不能持续发挥作用,因此 Baumgartner 等<sup>[13]</sup>利用含 VEGF<sub>165</sub>的真核表达质粒转染机体治疗下肢缺血性疾病,取得良好效果,发现侧支循环增加,血液动力学明显改善。本实验通过转染 VEGF 基因 MSCs 进行体外培养、扩增后,然后将其复合脱蛋白异体骨植入坏死股骨头内,探讨 VEGF 基因促股骨头缺血性坏死的修复作用,研究结果表明 VEGF 基因能有效促进骨组织内血管再生,进而促进骨再生,加速坏死骨的修复,进一步提示 VEGF 基因治疗骨坏死性疾病具有一定的应用前景。

**参考文献**

- 1 刘日光,尹培荣,杨述华,等.人 VEGF<sub>165</sub>基因在狗骨髓基质细胞中的表达.中国矫形外科杂志,2004,12(19):1476-1478.
- 2 刘日光,尹培荣,杨述华,等.自制脱蛋白骨与狗骨髓基质细胞的生物相容性研究.中华创伤骨科杂志,2004,5(11):785-788.
- 3 沈冯君,刘日光,张雅丽.活血化瘀汤治疗股骨头缺血坏死的实验研究.中国骨伤,2000,13(3):149-150.
- 4 Brighton CT, Hunt RM. Early histological and untrastructural changes in medullary fracture callus. J Bone Joint Surg (Am), 1991, 73: 832-847.
- 5 Garcia-Ramirez M, Toran N, Andaluz P, et al. Vascular endothelial

- growth factor is expressed in human fetal growth cartilage. J Bone Mineral Res, 2000, 5(3):534-540.
- 6 Takaoka T, Yoshioka T, Hosoya T, et al. The repair process in experimentally induced avascular necrosis of the femoral head in dogs. Arch Orthop Traumat Surg, 1981, 99:109-115.
- 7 Wang DS, Miura M, Demura H, et al. Anabolic effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. Endocrinol, 1997, 138:2953-2962.
- 8 Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. Nat Med, 1999, 5:623-628.
- 9 Miday V, Plouet J. Vasculotropin/vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 199(1):380-386.
- 10 Niida S, Kaku M, Amano H, et al. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. J Exp Med, 1999, 190(2):293-298.
- 11 Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. FEBS Lett, 2000, 473(2):161-164.
- 12 Takeshita S, Zheng LP, Kearney M, et al. Therapeutic angiogenesis: A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindlimb model. J Clin Invest, 1994, 93(2):662-670.
- 13 Baumgartner I, Pieczek A, Schinfeld R, et al. Constitutive expression of phVEGF<sub>165</sub> after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. Circ, 1998(12):1114-1123.

(收稿日期:2005-03-16 本文编辑:李为农)

**征 订 启 事**

1. 《中西医结合学报》由上海市中西医结合学会和上海长海医院主办,辟有院士笔谈、结合医学论坛、临床论著、实验论著、经验交流、医案医话、综述、学术讲座、中医英译研究等栏目。《中西医结合学报》于 2003 年创刊,是国家科技部中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、上海市科协系统优秀科技期刊。已被美国《医学索引》(Index Medicus/ MEDLINE/ PubMed)、美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、美国《国际药文摘》(International Pharmaceutical Abstracts, IPA)和俄罗斯《文摘杂志》(VINITI Abstracts Journal)等国际著名数据库收录。该刊为双月刊, A4 开本, 110 页, 插图彩印, 装帧精美。CN 31-1906/R; ISSN 1672-1977。邮发代号:4-746。全国各地邮局订阅, 每期定价 15 元。也可直接汇款至杂志社订阅, 免收邮资费。杂志社地址:上海市长海路 174 号科技楼 1105 室。邮编:200433。电话/ 传真:021-25074637; E-mail:jcim@smmu.edu.cn。网址:www.jcimjournal.com。

2. 《中医外治杂志》是以突出“中医外治”为特色的中医药学术期刊。本刊内容丰富, 质量高, 容量大, 是广大基层临床工作者、中医爱好者的良师益友, 亦是普通家庭的参考用书。中医外治疗效独特、作用迅速、历史悠久, 具有简、便、廉、验之特点。包括针灸、按摩、熏洗、针刀、敷贴、膏药、脐疗、足疗、耳穴疗法、物理疗法等百余种方法。治疗范围遍及内、外、妇、儿、骨伤、皮肤、五官、肛肠等科。广大中医工作者若能掌握一定的外治理论和方法, 则在常规治疗之外又增一技, 定能开阔思路, 提高临床疗效。自 2005 年始, 本刊设立经皮给药基础研究专栏, 发表重点项目研究课题。本刊为双月刊, 自 2006 年开始进行全新改版, 容量更大, 质量更高, 每期定价 6.00 元, 全年 36.00 元。邮发代号:22-126 全国各地邮政局(所)均可订阅 国外代号:BM4605 国外总发行:中国国际图书贸易总公司 编辑部地址:山西省晋城市南大街周元巷 邮编:048001 电话(传真):0356-2630030 E-mail:zywzzz@163.net http: www.zywzzz.com