

骨碎补总黄酮促进大鼠诱导膜中 VEGF、BMP-2 表达的实验研究

王庆丰, 王孝辉*, 张彩丽, 丁 强, 王 雷, 张海龙, 秦晓飞, 韩 志

河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院) 手显微骨科, 河南 洛阳 471002

摘要: **目的** 观察骨碎补总黄酮对大鼠诱导膜中血管内皮生长因子(VEGF)、骨形态发生蛋白-2(BMP-2)表达的影响。**方法** 60只3月龄SD大鼠,随机分为3组:模型组、填充组和填充+TFDR组,每组20只,建立大鼠长段骨缺损模型,模型组骨缺损处仅克氏针固定,填充组及填充+TFDR组骨缺损处用抗生素骨水泥填充,并用克氏针固定;填充+TFDR组给予TFDR(67.5 mg/kg),模型组及填充组给予等量生理盐水,每天给药1次,连续6周。给药结束后,处死大鼠,切取骨水泥周围包裹的白色膜状物,模型组切取对应阶段的瘢痕组织,Elisa定量及免疫组化法观察诱导膜中BMP-2、VEGF表达变化。**结果** 填充组BMP-2、VEGF表达水平显著高于模型组,填充+TFDR组BMP-2、VEGF表达水平均显著高于填充组和模型组,各组间差异均有统计学意义($P < 0.05$);免疫组化检测结果显示相同趋势。**结论** TFDR促进Masquelet技术诱导膜中BMP-2和VEGF表达。

关键词: 骨缺损; 骨碎补总黄酮; Masquelet技术; 血管内皮生长因子(VEGF); 骨形态发生蛋白-2(BMP-2)

中图分类号: R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)07-1220-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.07.010

Effects of total flavonoids of *Drynariae Rhizoma* on expression of VEGF and BMP - 2 in rat induced membrane

WANG Qingfeng, WANG Xiaohui, ZHANG Caili, DING Qiang, WANG Lei, ZHANG Hailong, QIN Xiaofei, HAN Zhi

Hand Microscopic orthopaedic, Luoyang Orthopedic Hospital of Henan Province, Luoyang 471002, China

Abstract: **Objective** To observe the effects of total flavonoids of *Drynariae Rhizoma* (TFDR) on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein (BMP-2) in rat Masquelet-induced membrane. **Methods** Sixty SD rats aged 3 months were randomly divided into three groups: model group, filling group, and filling + TFDR group with 20 rats in each group. Rat long segment bone defect model was established. The bone defects in model group were fixed only by Kirschner wire, and were filled with antibiotic bone cement in filling group and filling + TFDR group. Rats in filling + TFDR group were given TFDR (67.5 mg/kg), the model group and the filling group were treated with equivalent saline, once a day for six weeks. The rats were sacrificed after administration, and bone cement and scar tissue in model group were removed. The expression of BMP-2 and VEGF in the induced membrane was observed by immuno-histochemical analysis of the filling tissue and the induced membrane. **Results** The positive expression of BMP-2 and VEGF in filling group were higher than model group by Elisa quantitative detection, which of the filling + TFDR group were significantly higher than model group and filling group, the difference was statistically significant by statistical analysis ($P < 0.05$). Immuno-histochemical analysis showed the same trend. **Conclusion** TFDR can promote the expression of BMP-2 and VEGF in Masquelet-induced membrane.

Key words: bone defect; total flavonoids of *Drynariae Rhizoma*; Masquelet technique; VEGF; BMP-2

临床上,各种原因造成的大段骨缺损一直是骨科医生治疗的难题,其疗程长、花费大,给医患双方带来较大的困扰。自2000年Masquelet^[1]报道采

用一期抗生素骨水泥填充、二期植骨治疗大段骨缺损效果优良以来,此法作为一种操作简单、效果优良的治疗手段,逐渐受到临床医师的关注,但其治

收稿日期: 2017-11-20

基金项目: 河南省中医药科学研究专项课题资助项目(2015ZY02062)

第一作者: 王庆丰, (1978—), 男, 甘肃, 博士, 主要从事骨组织工程研究。E-mail: 1484541@qq.com Tel: 15090180750

*通信作者: 王孝辉, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事骨与软组织缺损修复重建研究。E-mail: 963099784@qq.com Tel: (0379)63546783

疗中也存在治疗时间长、骨质塑性慢等问题。骨碎补作为中医骨科的常用药,其提取物骨碎补总黄酮(Total flavonoids of *Drynariae Rhizoma*, TFDR)促进骨祖细胞的分化及骨折愈合的作用已有研究证实^[2],但其对 Masquelet 技术中诱导膜的作用未见文献报道。因此,本研究采用 TFDR 对大鼠长段骨缺损诱导膜模型进行干预,检测诱导膜中 BMP-2、VEGF 表达情况,以观察能否将此类药物和 Masquelet 技术结合,以缩短疗程、增加疗效。

1 材料

1.1 实验动物

60 只健康 SPF 级 SD 大鼠,3 月龄,雌雄不限,体质量(250±10)g,适应性饲养 1 周后开始实验。河南省实验动物中心提供,实验动物生产许可证号为 SYXK(豫)2015-0001。

1.2 药品及主要试剂

TFDR(质量分数>99%),购自陕西大田生物科技有限公司,取 TFDR 5 g,加注射用水适量稀释备用。

1.3 试剂与仪器

抗生素骨水泥(美国强生有限公司);血管内皮生长因子(VEGF)、骨形态发生蛋白-2(BMP-2)抗体、VEGF 和 BMP-2 Elisa 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 大鼠长段骨缺损诱导膜模型的制作

大鼠 ip 4%水合氯醛溶液 0.8 mL/100 g 麻醉,麻醉后仰卧位固定于手术台上。碘伏消毒铺巾后,于膝关节下缘前侧做一长约 1.5 cm 的纵行手术切口,逐层切开分离,显露胫骨结节下骨质,分离周围肌肉组织,用手外科电动摆锯截取长约 6 mm 骨质,将 1 cm 的克氏针由骨缺损远近端插入胫骨髓腔,将处于拉丝期的万古霉素抗生素骨水泥填充胫骨缺损。待骨水泥完全变硬后冲洗伤口,4-0 缝线逐层缝合筋膜、皮肤切口。术后 ip 给予青霉素钠 8 万 U/只,连续注射 3 d。

2.2 动物分组

60 只 SD 大鼠按随机数字表法分为 3 组:模型组、填充组、填充+TFDR(67.5 mg/kg)组,每组 20 只。所有大鼠均制作左侧胫骨上段长段骨缺损诱导膜模型,模型组不做抗生素骨水泥填充,仅克氏针固定,填充组及填充+TFDR 组骨缺损处抗生素骨水泥填充并用克氏针固定。

2.3 给药方案

给药剂量相当于人骨折时服用的 TFDR 剂量(参照强骨胶囊,规格 0.25 g/粒,北京歧黄医药股份有限公司),根据“人和大鼠体表面积折算的等效剂量比率表”计算得出大鼠的 TFDR 用药等效剂量为 67.5 mg/kg。将 TFDR 按比例溶于 100 mL 蒸馏水中配置溶液,4℃冰箱中保存备用,每天 ig 给药 1 次,连续 6 周。模型组及填充组予以等量生理盐水。

2.4 Elisa 定量

6 周后再次手术将填充组及填充+TFDR 组左下肢抗生素骨水泥取出,切取骨水泥周围包绕的白色膜状物,模型组切取对应阶段的瘢痕组织,组织裂解液裂解,使用 Elisa 试剂盒定量检测 BMP-2 和 VEGF 的表达情况。

2.5 免疫组化染色

取“2.4”项中白色膜状物和瘢痕组织,将组织块处理后石蜡包埋切片,进行免疫组化染色,观察各组组织内 BMP-2 和 VEGF 的表达情况。

2.6 统计学处理

应用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析,BMP-2、VEGF 含量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *F* 检验。

3 结果

3.1 大鼠一般状况及模型部位观察

各组骨缺损模型造模均获得成功,术后 1 d 大鼠可正常进食,术后 3 d 可行走,伤口愈合,抽检部分大鼠,拍片显示,胫骨近端骨缺损处骨水泥充填、克氏针固定良好。术后 6 周取材时,模型组可见缺损区为瘢痕组织充填,填充组和填充+TFDR 组可见薄透明白色薄膜形成,部分区域可见微血管。

3.2 Elisa 定量

填充组 BMP-2 及 VEGF 的表达显著高于模型组,填充+TFDR 组 BMP-2 及 VEGF 的表达均显著高于填充组和模型组,各组间经统计学分析,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 1。

3.3 免疫组织化学染色结果

模型组瘢痕组织 BMP-2 表达的棕色颗粒较少,填充组可见 BMP-2 阳性表达,填充+TFDR 组 BMP-2 表达的棕色颗粒较填充组和模型组棕色颗粒明显增多;VEGF 的免疫组化结果显示相同趋势,与 Elisa 定量,结果一致。见图 1、2。

表1 各组大鼠诱导膜中 BMP-2、VEGF 表达情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

Table 1 Expression of BMP-2 and VEGF in induced membrane of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	BMP/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	VEGF/ ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
模型	—	1.76 $\pm$ 0.20	102.61 $\pm$ 10.85
填充	—	5.41 $\pm$ 1.46*	176.53 $\pm$ 20.41*
TFDR	67.5	7.56 $\pm$ 0.90*#	211.54 $\pm$ 27.70*#

与模型组比较: * $P < 0.05$; 与填充组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group; # $P < 0.05$ vs filling group

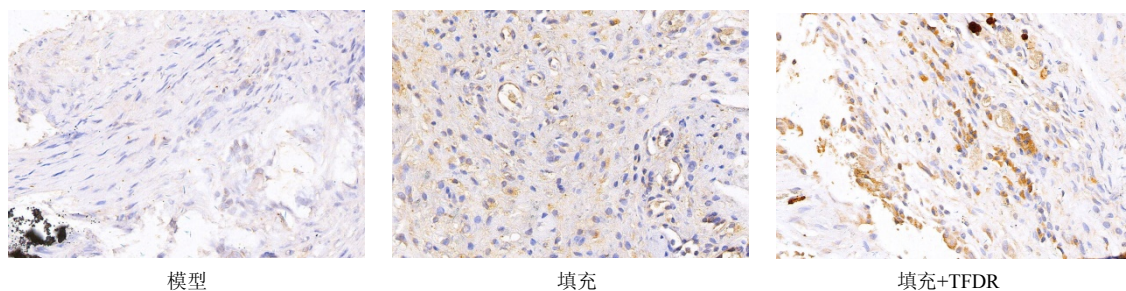


图1 术后各组 BMP-2 的免疫组织化学染色结果 (20 $\times$)

Fig. 1 Immunohistochemical staining of BMP-2 after operation in each group (20 $\times$)

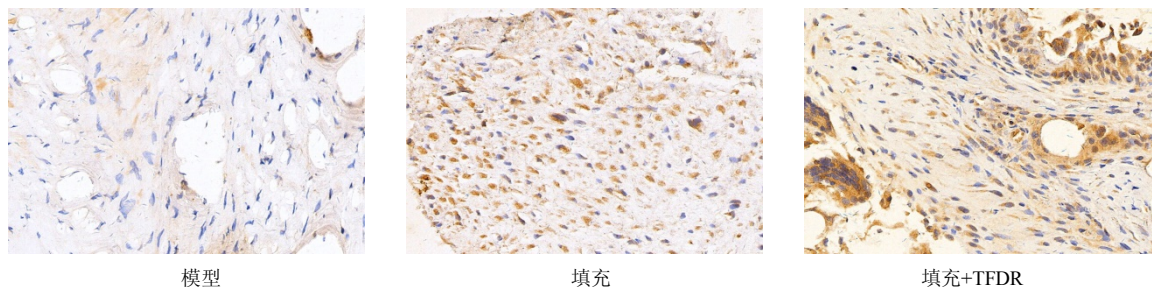


图2 术后各组 VEGF 的免疫组织化学染色结果 (20 $\times$)

Fig. 2 Immunohistochemical staining of VEGF after operation in each group (20 $\times$)

在需骨量多、软组织条件好、缺损愈合慢、移植骨裂解和骨移植骨折等问题^[9]。

研究表明^[10], 诱导膜中有较多成骨因子、生长因子表达, 支持骨髓基质细胞的迁移转化及成骨。这些因子中诱导成骨能力强的 BMP^[11]和促进血管增生生活性最强的 VEGF 尤为重要, BMP 可诱导骨髓基质细胞分化、增殖和转化^[12], 且 BMP-2 的剂量-效应呈正相关, 而 VEGF 可诱导骨髓间充质干细胞 (BMSC) 向病变部位迁移^[13-14], 促进其分化、增殖和转化^[15]。

骨碎补作为补肾接骨类中药, 在中医骨伤科方面有悠久的历史, 其主要活性成分为 TFDR^[16]。研究表明^[17], 骨碎补及提取物在骨折愈合时, 可显著促进 BMP-2 mRNA 和人转化生长因子- α (TGF- α)

4 讨论

4.1 治疗方法选择及药物选择依据

长段骨缺损是指大于 5 cm 的位于长骨的骨缺损^[3], 可发生于创伤、骨髓炎、骨肿瘤术后, 是临床治疗的难题。目前, 治疗长段骨缺损的方法有带血管的自体骨移植、Ilizarov 技术、Cylindrical mesh 技术、组织工程技术、成骨蛋白 (BMPS)、可延长髓内钉技术及 Masquelet 技术, 各种技术都有其优缺点^[4-7], 近年来 Masquelet 诱导膜技术受到了较大的关注, 有报道^[8]其成功率高达 90%, 但此法也存

mRNA 的表达, 同时促进牵拉成骨过程中新骨的生成与钙化^[2], 而此药未见应用在 Masquelet 技术中, 且其对诱导膜的作用尚未见报道, 因此我们选择 TFDR 对诱导膜技术进行干预, 从而提高局部生长因子浓度, 促进骨质愈合以减少并发症。

4.2 研究结果分析

本实验通过骨碎补活性成分 TFDR ig 干预大鼠骨缺损诱导膜模型发现: 经 TFDR 干预的诱导膜, VEGF 表达增高, 提示其可通过促进诱导膜血管生成, 从而促进骨髓基质干细胞向病变部位迁移; BMP-2 表达增高, 进而促骨髓基质干细胞的分化、增殖, 在 Masquelet 技术二期手术植骨后促进骨愈合, 进而缩短疗程。本研究仅对骨碎补干预下的诱

导膜生长因子表达情况进行分析,对二期植骨术后的愈合情况尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Masquelet A C, Fitoussi F, Begue T, et al. Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft [J]. Annales De Chirurgie Plastique Et Esthétique, 2000, 45(3): 346-353.
- [2] 高怡加, 黄培镇, 李悦, 等. 骨碎补总黄酮对牵张成骨过程中骨形态发生蛋白-2 和转化生长因子- β 1 表达的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(5): 679-683.
- [3] 殷渠东, 孙振中, 顾三军. 应用 Masquelet 技术修复骨缺损的研究进展 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2013, 27(10): 1273-1276.
- [4] 郑欣, 朱彦丞, 邱旭升, 等. 诱导膜技术应用于骨缺损治疗的研究进展 [J]. 中华创伤杂志, 2016, 32(2): 189-192.
- [5] 潘朝晖, 王剑利, 薛山, 等. 旋髂浅动脉蒂髂骨骨瓣重建足踝部复杂骨缺损的回顾性分析 [J]. 中华显微外科杂志, 2016, 39(2): 156-159.
- [6] 孙效虎, 袁景, 张宇, 等. 功能型骨组织工程支架修复结核性骨缺损 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(30): 4539-4546.
- [7] 王建超, 蔡锦方, 曹学成, 等. Ilizarov 骨搬运技术修复胫骨创伤性骨髓炎大段骨缺损 [J]. 实用骨科杂志, 2016, 22(4): 324-327.
- [8] Kaveh K, Ibrahim R, Mohd Zuki A B, et al. Bone grafting and bone graft substitutes [J]. J Animal Veterin Advances, 2010, 9(6): 1055-1067.
- [9] Giannoudis PV, Faour O, Goff T, et al. Masquelet technique for the treatment of bone defects: tips-tricks and future directions [J]. Injury, 2011, 42(6): 591-598.
- [10] Pelissier P, Masquelet A, Bareille R, et al. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration [J]. J Oahop Res, 2004, 22(1): 73-79.
- [11] 胥少汀, 葛宝丰, 徐印坎. 实用骨科学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2012: 2311-2312.
- [12] Fujioka-Kobayashi M, Ota M S, Shimoda A, et al. Cholesteryl group- and acryloyl group-bearing pullulan nanogel to deliver BMP2 and FGF18 for bone tissue engineering [J]. Biomaterials, 2012, 33(33): 7613-7620.
- [13] 张戎, 张勉, 李成华, 等. 碱性成纤维细胞生长因子和血管内皮生长因子对人牙周膜干细胞体外增殖、迁移和黏附的影响 [J]. 中华口腔医学杂志, 2013, 48(5): 278-284.
- [14] Ball S G, Shuttleworth C A, Kielty C M. Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors [J]. J Cell Biol, 2007, 177(3): 489.
- [15] 崔斌, 黄岚, 谭虎, 等. 血管内皮生长因子调节内皮祖细胞生物学功能 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2009, 8(3): 265-268.
- [16] 钱茜. 骨碎补化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(3): 186-188.
- [17] 董福慧, 郑军, 程伟. 骨碎补对骨愈合过程中相关基因表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(7): 518-521.