

不同剂量骨碎补总黄酮对大鼠 Masquelet 技术诱导膜中 BMP-2 和 VEGF 表达的影响

王雷¹ 王孝辉^{2△} 张海龙² 张彩丽² 丁强²

[摘要] 目的:观察不同剂量的骨碎补总黄酮对大鼠 Masquelet 技术诱导膜中骨形成蛋白-2(Bone Morphogenetic Protein,BMP-2)和血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor,VEGF)表达的影响。方法:选取 48 只 3 月龄 SD 大鼠,雌雄不限,按随机数字表法分为 4 组:空白对照组、低剂量组、中剂量组及高剂量组,每组 12 只。所有大鼠均建立左侧胫骨长段骨缺损模型,并予以抗生素骨水泥填塞。术后低、中、高剂量组分别给予骨碎补总黄酮 67.5、202.5 和 607.5 mg/(kg·d)灌胃,空白对照组给予等量蒸馏水灌胃,连续灌胃 6 周后取出骨水泥,切取诱导膜,检测诱导膜中 BMP-2 和 VEGF 的表达情况。结果:灌胃 6 周后,各组 BMP-2 和 VEGF 表达组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$);各组两两比较,低、中、高剂量组 BMP-2 和 VEGF 表达均显著高于空白对照组,且高剂量组表达最明显,中剂量组次之,低剂量组再次之,呈剂量依赖关系,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:不同剂量的骨碎补总黄酮均可促进大鼠 Masquelet 技术诱导膜中 BMP-2 和 VEGF 的表达,且呈剂量依赖关系,高剂量组最明显。

[关键词] 骨碎补总黄酮;诱导膜;Masquelet 技术;骨形成蛋白-2;血管内皮生长因子

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)04-0001-04

Effects of Different Dose of Rhizoma Drynariae on Expression of BMP-2 and VEGF in Membrane of the Rats Induced by Masquelet Technology

WANG Lei¹ WANG Xiaohui^{2△} ZHANG Hailong² ZHANG Caili² DING Qiang²

¹Hunan University of Traditional Chinese Medicine,Changsha 410000,China;

²Luoyang Orthopedic Hospital of Henan Province/Orthopedic Hospital of Henan Province,Luoyang 471002,Henan China.

Abstract Objective: To observe the effects of different dose of rhizoma drynariae on the expression of bone morphogenetic protein(BMP-2)and vascular endothelial growth factor(VEGF)in membrane of rat which induced by masquelet technology. **Methods:** Forty-eight SD rats without limitation of sex were randomly divided into four groups:control group,low dose group,middle dose group and high dose group. All rats were established with long tibial long bone defect model,and antibiotic bone cement was filled. The low,medium and high dose groups were given 67.5,202.5 and 607.5 mg/(kg·d) of the total flavonoids. The expression of BMP-2 and VEGF in the induced membrane and the growth of the blood vessel were measured after 6 weeks of continuous administration. **Results:** After 6 weeks of intragastric administration,the expression of BMP-2 and VEGF had compared each other,the difference were statistically significant($P<0.05$). All groups multiple comparison,the expression of BMP-2 and VEGF in the low,middle and high dose groups was significantly higher than that in the blank control group. And the highest expression was in the high dose group,the second was in the middle dose group,and the third was in the low dose group. There was a dose-dependent relationship,and the differences were statistically significant($P<0.05$). **Conclusion:** Different doses of total flavonoids of rhizoma drynariae can promote the expression of BMP-2 and VEGF in membrane of rat which induced by masquelet technology in a dose-dependent manner.

Keywords: total flavonoids of rhizoma drynariae;induced membrane;masquelet technique;BMP-2;vascular endothelial growth factor(VEGF)

基金项目:河南省中医药科学研究专项课题资助项目

(2015ZY02062)

¹ 湖南中医药大学(长沙,410000)

² 河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)

[△]通信作者 E-mail:963099784@qq.com

临床上各种原因导致的大段骨缺损一直是骨科医生面对的难题。Masquelet 等^[1]首次报道利用诱导膜和自体骨移植相结合的方法治疗大段骨缺损的新技术,被称为“诱导膜技术”或“Masquelet 技术”。该技术主要分两个阶段:第一阶段,彻底清创后,选择合适固定方式固定,再用聚甲基丙烯酸甲酯(Polymethyl Methacrylate,PMMA)骨水泥植入骨缺损部位;第二

阶段,在骨水泥植入 6~8 周后,手术切开诱导膜,取出骨水泥,植入适量自体松质骨后关闭诱导膜。Masquelet 技术操作简便、并发症少、对受区要求低,对于各类型、各部位的骨缺损,尤其是感染性和肿瘤性骨缺损的疗效显著,备受临床医生青睐。但临床应用中也发现此技术存在的问题,如诱导膜的骨诱导能力有限、骨质塑性相对较慢、治疗时间长等^[2]。如何进一步提高诱导膜内成骨因子表达水平、促进骨细胞增殖、缩短治疗时间,是 Masquelet 技术进一步发展需要解决的问题。中药骨碎补是中医骨伤科常用药物,也是治疗跌扑损伤、筋断骨折的要药。现代药理研究表明^[3],骨碎补总黄酮可有效促进成骨细胞增殖、分化及成骨因子表达,从而加速骨折愈合。因此,本研究通过调节干预大鼠长段骨缺损诱导膜模型的骨碎补总黄酮剂量,观察其对诱导膜中 BMP-2 和 VEGF 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级 3 月龄 SD 大鼠 48 只,雌雄不限,体质量(250±10)g,由河南省实验动物中心提供[实验动物质量合格证编号为 SYXK(豫)2015-0001],适应性饲养 1 周后开始实验。

1.2 药物与试剂

骨碎补总黄酮(陕西大田生物科技有限公司),青霉素钠(华北制药),抗生素骨水泥(美国强生有限公司),BMP-2 和 VEGF 抗体、抗体试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 实验仪器

离心机(湖南湘仪 TG16-WS),移液器(Eppendorf),酶标仪(biotec H1),37℃ 恒温箱(上海一恒),显微镜(日本 Olympus 公司),其他外科手术器械均由河南省正骨研究院实验室提供。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组 将 48 只大鼠按随机数字表法分为 4 组:空白对照组、低剂量组、中剂量组及高剂量组,每组 12 只,所有大鼠均制作左侧胫骨上段长段骨缺损模型,并用抗生素骨水泥填充、克氏针固定。

1.4.2 大鼠长段骨缺损模型制作 术前 30 min 给予青霉素钠 8×10^4 U/只腹腔注射。麻醉后,碘伏消毒、

铺巾,于左膝关节下缘胫骨结节以下做一长约 1 cm 的纵行手术切口,逐层暴露胫骨结节下骨质,用微型电动摆锯截断胫骨,截取长约 6 mm 骨质,将长约 1 cm 克氏针插入髓腔行髓内固定,再用万古霉素骨水泥填塞缺损处。待骨水泥完全变硬后清洗伤口,4-0 缝线逐层缝合筋膜、皮肤切口。术后给予青霉素钠 8×10^4 U/只腹腔注射,连续注射 3 d。

1.4.3 给药方法 将骨碎补总黄酮和蒸馏水按不同比例配制药液,置于 4℃ 冰箱中保存备用。根据“人和大鼠体表面积折算的等效剂量比率表”,并参照强骨胶囊(规格为 0.25 g/粒,厂家为北京歧黄医药股份有限公司)的服用剂量,计算大鼠药等效剂量为 67.5 mg/(kg·d)。低剂量组予以骨碎补总黄酮 67.5 mg/(kg·d)灌胃;中剂量组予以骨碎补总黄酮 202.5 mg/(kg·d)灌胃;高剂量组予以骨碎补总黄酮 607.5 mg/(kg·d)灌胃;空白对照组予以等量蒸馏水灌药。所有大鼠均术后第 1 天开始灌胃,每天灌胃 1 次,每次灌胃药液 4 mL,连续灌胃 6 周。

1.4.4 样本采集和检测 按原手术方法暴露骨缺损部位,可见抗生素骨水泥表面一层透明生物膜,即诱导膜。切开生物膜后小心取出抗生素骨水泥和诱导膜,置于磷酸盐缓冲溶液(Phosphate Buffer Saline, PBS)和蛋白酶抑制剂混合物中,于离心机中 12 000 r/min,离心 5 min 后取上清液,行酶联免疫吸附测定法(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)测定(检测方法根据 ELISA 试剂盒使用说明书按步骤进行操作),观察各组组织 BMP-2 和 VEGF 的表达水平。观察组和对照组切取骨水泥外的诱导膜,空白组切取对应部位的瘢痕组织。

1.4.5 统计学方法 应用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

大鼠造模成功,麻醉清醒后可站立取食、跛行,3 d 后跛行消失,伤口均甲级愈合,饮食、饮水正常,未见腹泻等异常情况,均健康存活至实验结束。大鼠骨缺损造模见图 1。

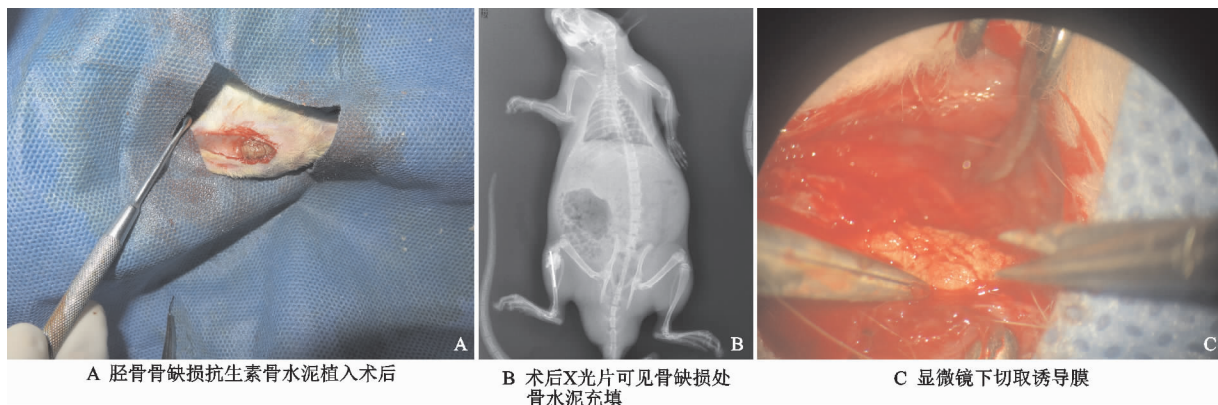


图 1 大鼠骨缺损造模影像

2.2 各组 BMP-2 免疫组化表达比较

灌胃 6 周后,各组 BMP-2 表达组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1;两两比较,低、中、高剂量组 BMP-2 表达均显著高于空白对照组,且高剂量组表达最明显,中剂量组次之,低剂量组再次之,呈剂量依赖关系,差异均有统计学意义($P<0.05$)。各组 BMP-2 免疫组化染色见图 2。

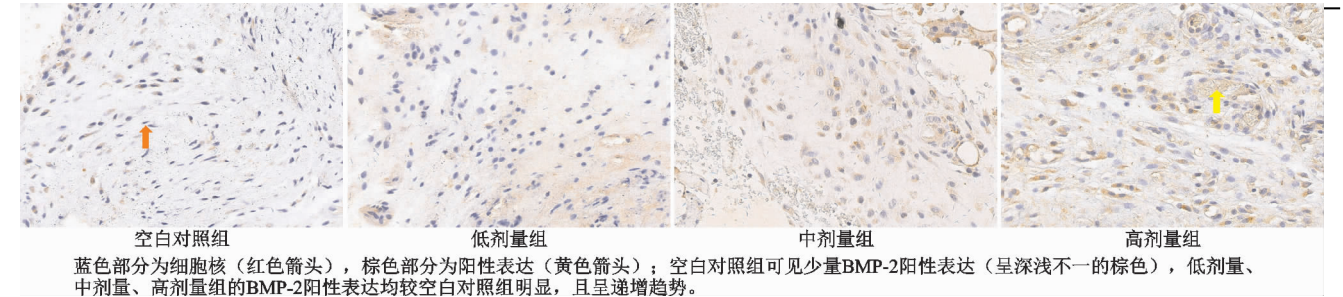


图 2 各组 BMP-2 免疫组化染色结果(20×)

2.3 各组 VEGF 免疫组化表达比较

灌胃 6 周后,各组 VEGF 表达组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2;两两比较,低、中、高剂量组 VEGF 表达均显著高于空白对照组,且高剂量组表达最明显,中剂量组次之,低剂量组再次之,呈剂量依赖关系,差异均有统计学意义($P<0.05$)。各组 VEGF 免疫组化染色见图 3。

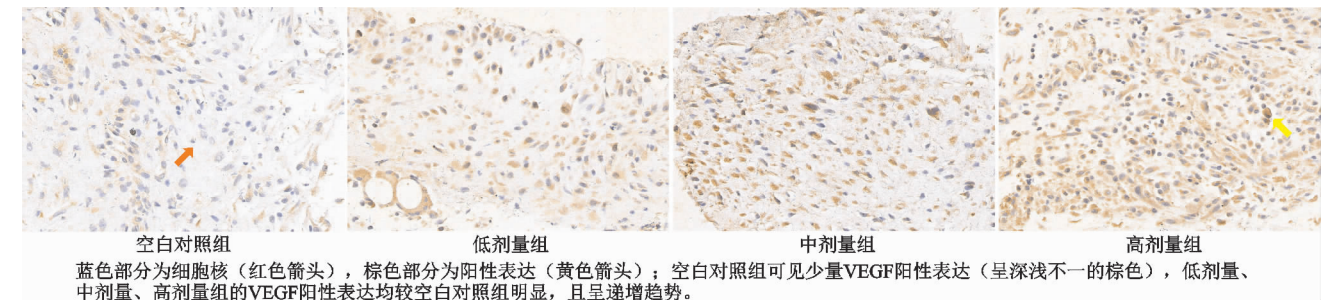


图 3 各组 VEGF 免疫组化染色结果(20×)

3 讨论

临床中当骨缺损大于 4~5 cm 时,存在移植骨被吸收、受区血供差、感染发生率高等问题,其治疗相对较难^[4]。目前常用的治疗方法有带血管的自体骨移植、Lizarov 骨搬移技术和 Masquelet 技术。带血管的自体骨移植可重塑骨皮质,骨吸收少且骨愈合时间较快,但其对显微外科技术要求高,受区易发生应力性骨折、感染、软组织粘连等问题^[5]。Lizarov 骨搬移技术对于合并软组织缺损和感染的骨缺损疗效肯定,但当骨缺损大于 8 cm 时,再骨折风险明显增高^[6],且愈合时间长,常需多次手术,易发生钉道感染或松动、关节僵硬、骨不连等并发症^[7,8]。Masquetet 等于 2000 年首次报道应用“Masquetet 技术”治疗 35 例长骨骨干缺损,骨缺损长度为 4~25 cm,术后 4 个月影像学检查显示骨缺损全部愈合。自此,Masquetet 技术为大

表 1 各组 BMP-2 免疫组化表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	BMP-2(ng/mL)
空白对照组	12	5.73±0.12
低剂量组	12	6.42±0.64
中剂量组	12	7.35±0.15
高剂量组	12	8.22±0.55
<i>F</i>		155.317
<i>P</i>		<0.001

表 2 各组 VEGF 免疫组化表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	VEGF(ng/mL)
空白对照组	12	155.40±7.63
低剂量组	12	190.59±2.58
中剂量组	12	203.09±2.56
高剂量组	12	221.29±5.60
<i>F</i>		361.145
<i>P</i>		<0.001

段骨缺损治疗带来了新的曙光,在以后的发展中又将其应用于骨髓炎、骨肿瘤等原因所致的骨缺损,均获得满意疗效。Rezzouk 等^[9]应用 Masquelet 技术治疗 18 例慢性骨髓炎骨缺损患者,骨缺损长度为 5~17 cm,术后 6 个月左右所有患者均达到骨愈合完全。Biau 等^[10]应用 Masquelet 技术治疗 1 例右侧股骨 Ewing 肉瘤瘤体切除后股骨干大段缺损,其缺损长达 16 cm,术后 3 年随访,右下肢仅较左侧短缩 1 cm,疗效满意。

此外,近些年来 Masquetet 技术的动物研究也取得一定进展,阐述了该技术的细胞学及分子生物学机制,为其临床应用提供了科学依据。Masquetet 技术的关键之处是诱导膜的形成。动物实验表明^[11-14],经免疫组化分析,诱导膜由 I 型胶原组成,内有密集排列的小血管系统及大量成纤维细胞样细胞,还可分泌 VEGF 及 BMP-2 等成骨因子,从而形成类似骨膜的生

物属性。其中, VEGF 是活性较强的促血管增生因子, 通过其特异性受体作用于血管内皮细胞, 促进血管内皮增生和新血管形成, 进而促进新骨形成^[15]; BMP-2 是目前认为最有效的具有促进成骨细胞分化和异位诱导成骨能力的生物活性因子, 可促进骨细胞形成、分化和增殖, 加快细胞外基质钙化等。而且, BMP-2 能上调骨细胞中 VEGF 表达, 两者结合在成骨细胞和血管内皮细胞之间形成桥梁, 进一步促进成骨和血管化^[16]。除此之外, 诱导膜有一定的机械强度, 植入松质骨后关闭诱导膜, 形成的封闭性膜结构可保持移植骨的体积, 减少松质骨吸收, 防止纤维结缔组织长入骨缺损部位, 又可避免骨祖细胞、成骨因子等流失, 保持一个相对稳定的成骨环境, 进一步加速骨缺损修复。

传统医学认为骨的生长、代谢、修复与肾有十分密切的关系。《医经精义》曰“肾藏精, 精生髓, 髓生骨, 故骨者肾之所合也”。所以, 临床上治疗骨折延迟愈合或不愈合也多从肾论治。骨碎补, 味苦性温, 入肝肾经, 具有活血续伤、补肾强骨的作用, 是治疗跌扑损伤、筋断骨折的要药。现代研究表明, 骨碎补的主要活性成分骨碎补总黄酮可增强成骨和破骨细胞活性、加快骨损伤修复^[3], 并且可显著促进 BMP-2 mRNA 和 VEGF 等成骨因子表达^[15,17]。高怡加等^[18]研究发现, 骨碎补总黄酮可加速牵拉成骨治疗中新生骨质生成与钙化, 缩短成骨时间。

骨碎补总黄酮对 Masquelet 技术中诱导膜内成骨因子表达有上调作用, 但其表达水平与骨碎补总黄酮剂量的关系尚不能确定。因此本研究通过调节骨碎补总黄酮的浓度, 观察其对诱导膜内成骨因子表达水平的影响。实验结果显示, 经过 6 周灌胃后, 低、中、高剂量组 BMP-2 和 VEGF 表达均显著高于空白对照组, 且高剂量组表达最明显, 中剂量组次之, 低剂量组再次之, 呈剂量依赖关系, 差异有统计学意义。综上所述, 不同剂量骨碎补总黄酮均可有效促进 Masquelet 技术诱导膜中 BMP-2 和 VEGF 表达, 并且呈现出剂量依赖关系, 高剂量组最明显, 从而促进骨细胞增殖、分化, 缩短骨缺损修复时间。

参考文献

- [1] Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, et al. Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft[J]. *Ann Chir Plast Esthet*, 2000, 45(3): 346-353.
- [2] Han W, Shen J, Wu H, et al. Induced membrane technique: advances in the management of bone defects[J]. *Int J Surg*, 2017, 42: 110-116.
- [3] 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.

- [4] 赵文博, 刘雷. 长骨大段骨缺损治疗方式的研究进展[J]. *现代临床医学*, 2014, 40(3): 230-232.
- [5] 张开, 高尚武, 田力升, 等. 探讨胫骨创伤后节段性骨缺损治疗方法[J]. *中外医学研究*, 2011, 9(19): 110-111.
- [6] 殷渠东, 孙振中, 顾三军, 等. 骨搬运与骨短缩-延长治疗胫骨骨缺损合并软组织缺损的疗效比较[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2014, 28(7): 818-822.
- [7] 王振山, 程鑫葵, 侯福山, 等. 诱导膜技术治疗大段骨缺损的研究进展[J]. *实用骨科杂志*, 2015, 21(2): 140-144.
- [8] 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.
- [9] Rezzouk J, Leclerc J, Leger O, et al. Bone reconstruction with induced membranes and cancellous autograft: results in 18 cases of osteitis[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2005, 113(4): 235.
- [10] Biau DJ, Pannier S, Masquelet AC, et al. Case report: reconstruction of a 16-cm diaphyseal defect after Ewing's resection in a child[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2009, 467(2): 572-577.
- [11] Masquelet AC, Begue T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects[J]. *Orthop Clin North Am*, 2010, 41(1): 27-37.
- [12] Henrich D, Seebach C, Nau C, et al. Establishment and characterization of the Masquelet induced membrane technique in a rat femur critical-sized defect model[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2016, 10(10): E382-E396.
- [13] Pelissier P, Masquelet AC, Bareille R, et al. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration[J]. *J Orthop Res*, 2004, 22(1): 73-79.
- [14] Klaue K, Knothe U, Anton C, et al. Bone regeneration in long-bone defects: tissue compartmentalisation? In vivo study on bone defects in sheep[J]. *Injury*, 2009, 40(Suppl 4): S95-102.
- [15] 上官文姬, 李鹤, 汤璐敏. 骨碎补总黄酮对大鼠成骨细胞 VEGF 和 FGF-2 表达的影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2014, 16(8): 38-41.
- [16] 张攀, 白钰, 李云裳, 等. BMP-2 在骨组织再生和修复上的作用研究进展[J]. *中国实用医药*, 2011, 6(20): 226-227.
- [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.
- [18] 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.

(收稿日期: 2017-09-06)