

## · 基础研究 ·

# VEGF165 基因修饰脂肪干细胞对糖尿病大鼠骨缺损的修复研究

王洪君<sup>1</sup>, 蔡波<sup>2</sup>, 赵星宇<sup>3</sup>, 李叔强<sup>3</sup>, 冯卫<sup>3</sup>, 刘建国<sup>3</sup>, 李冬松<sup>3</sup>

(1. 敦化市医院骨科, 吉林 敦化 133700; 2. 解放军 208 医院特诊科, 吉林 长春 130062; 3. 吉林大学第一医院骨关节外科, 吉林 长春 130021)

**【摘要】** 目的: 探讨采用基因转染大鼠脂肪干细胞构建血管化组织工程的方法对糖尿病骨质疏松性骨缺损的修复效果。方法: 选取雄性 Wistar 大鼠 78 只, 体重 180~220 g, 其中 72 只通过化学药物(STZ)诱导法建立糖尿病动物模型, 成模大鼠血糖值均  $\geq 16.7$  mmol/L。将实验动物随机分为 5 组, 正常对照组 6 只, 其他实验组各 18 只。正常对照组: 在正常大鼠骨缺损内植入经 VEGF165 基因修饰的脂肪干细胞; 糖尿病组: 单纯糖尿病骨缺损大鼠; 生长因子组: 在糖尿病大鼠骨缺损内单纯植入 VEGF 生长因子; 干细胞组: 在糖尿病大鼠骨缺损内单纯植入脂肪干细胞; 实验组: 在糖尿病大鼠骨缺损内植入经 VEGF165 基因修饰的脂肪干细胞。将  $5 \times 10^6$  个 VEGF165-ADSCs 细胞与凝胶海绵结合后, 植入到糖尿病大鼠骨缺损模型中, 在植入后第 4 周时, 采用光学显微镜观察缺损修复组织大体形态; 采用免疫组化 SP 法测定骨缺损区修复后局部微血管密度; 应用美国 IRIS Intrepid II XSP 电感耦合等离子体发射光谱仪对修复骨痂内钙/磷含量和碱性磷酸酶(ALP)含量测定; 统计分析上述测量结果验证 VEGF165-ADSCs 对糖尿病大鼠骨缺损的修复作用。结果: 荧光染色结果显示, VEGF165 表达定位于 ADSCs 的细胞浆, 表达率在 87% 以上; 大体组织学观察结果显示: 实验组修复区内骨痂生成范围和质量接近正常组, 糖尿病组、生长因子组、干细胞组修复效果欠佳。植入后第 4 周, 实验组单位体积的修复组织钙、磷含量和 ALP 含量明显高于生长因子组、干细胞组 ( $P < 0.05$ ), 与正常对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 第 4 周时, 实验组修复局部的血管密度低于正常对照组 ( $P < 0.05$ ), 而显著高于其他组 ( $P < 0.05$ )。结论: VEGF165 基因修饰的脂肪干细胞在糖尿病大鼠体内具有良好的成骨及成血管作用, 有望成为修复糖尿病特定骨质条件下骨缺损的一种有效手段。

**【关键词】** 糖尿病; 动物, 基因修饰; 干细胞; 大鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2017.06.012

**Repairing diabetic rats with bone defect by VEGF165 gene modified adipose-derived stem cells** WANG Hong-jun, CAI Bo, ZHAO Xing-yu, LI Shu-qiang, FENG Wei, LIU Jian-guo, and LI Dong-song\*. \*Department of Bone and Joint, No.1 Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin, China

**ABSTRACT Objective:** To explore repairing results of VEGF165 gene modified adipose-derived stem cells for diabetic rats with bone defect. **Methods:** Seventy-eight male Wistar rats weighted 180 to 220 g were selected, 72 rats were established diabetic animal models by streptozotocin induction method, blood glucose level was more than 16.7 mmol/L. Experimental animals were randomly divided into 5 groups, 6 rats in normal group and each 18 rats in other groups. VEGF165 gene modified adipose-derived stem cells were implanted into normal group with bone defect; single diabetic rats with bone defect were named as diabetic group; vascular endothelial growth factor implanted into single diabetic rats with bone defect named as growth factor group; adipose-derived stem cells implanted into diabetic rats with bone defect names as stem cell group; VEGF165 gene modified adipose-derived stem cells implanted diabetic rats with bone defect named as experimental group. After combination of VEGF165-ADSCs ( $5 \times 10^6$ ) cells combined with gel sponge, implanted into diabetic rats with bone defect. On the fourth week, general form of defect repairing tissue were observed by optical microscopy; local density of micro-vessel were detected by immunohistochemistry method; content of Ca, P and ALP of repairing callus were detected by IRIS Intrepid XSP inductively coupled plasma emission spectrometer. Efficacy of the VEGF165-ADSCs repairing function was evaluated by SPSS statistic software. **Results:** Fluorescent staining results showed that expression of VEGF165 located on cytoplasm of ADSCs, expression percentage was more than 87%; general histology results showed that callus formation and quality was near to

基金项目: 国家教育部博士点基金资助项目 (编号: 20120061120086)

Funding program: National Education Department Doctoral Funding Project (No. 20120061120086)

通讯作者: 李冬松 E-mail: armstrong586@163.com

Corresponding author: LI Dong-song E-mail: armstrong586@163.com

normal group, repairing results in diabetes group, growth factor group and stem cell group were poor. On the fourth week after implantation, content of Ca, P and ALP of repairing callus in experimental group were higher than those in growth group and stem cell group, and without significant differences compared with normal group; blood vessel density in experimental group was lower than normal group, but higher than other groups. **Conclusion:** VEGF165 gene modified adipose-derived stem cells for repairing diabetic rats with bone defect has advantages of osteogenesis and angiogenesis, and should be one of the effective method for repairing diabetic rats with bone defect.

**KEYWORDS** Diabetes mellitus; Animals, genetically modified; Stem cells; Rats

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2017, 30(6): 545-551 www.zggszz.com

糖尿病环境下多存在微小血管病变,加上高糖、糖基化终末产物(AGEs)等不利条件的影响,多使修复区血供不良和(或)植入物建立血管化过程延长<sup>[1]</sup>。尽早建立植入物的良好血运、解决工程骨与自体骨长入的界面障碍显得尤为重要。本实验将经 VEGF165 基因修饰的脂肪来源干细胞(ADSCs)植入到糖尿病大鼠骨缺损模型体内,通过对实验动物标本的形态学观察、修复骨痂内钙、磷和碱性磷酸酶(ALP)含量测定、植入区界面间血管再生情况的检测来证实是否 VEGF165 基因修饰的脂肪干细胞对糖尿病环境下骨缺损的修复具有积极的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

3 周龄 Wistar 小鼠(用以提取鼠脂肪干细胞) 5 只及 78 只雄性 Wistar 大鼠(实验动物),平均体质量为 203.5 g(180~220 g)。胎牛血清(FBS-DMEM,上海哈灵生物科技有限公司,批号:HLA0101,规格 200 ml); $\beta$ -磷酸甘油(成都麦卡希试剂有限公司,批号为 CAS819830,规格为 25 g);地塞米松(成都麦卡希试剂有限公司,批号: CAS50022,规格: 100 mg);抗坏血酸(美国 Sigma 公司,批号: A5960,规格: 25 g);链脲佐菌素(美国 Sigma 公司,批号: S0130,规格: 100 mg);8%硫化钠溶液(上海化学试剂总厂,批号: CAS: 1313-82-2,规格: 500 g/瓶);10%水合氯醛(长春农牧大学兽医研究所,批号: R00635);青霉素(天津新丰制药有限公司,批号: H15140-122,规格: 40 万 U);医用孵箱(北京福意联电器有限公司,型号: 106792);Fluview1000 激光扫描共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司,型号: OLS4100/4500);电动高速牙科钻头(日本日立公司,型号: OR-E3302);医用无菌凝胶海绵(广州市快康医疗器械有限公司,型号: MHC-3,规格: 6 cm $\times$ 2 cm $\times$ 0.5 cm);光学解剖显微镜(日本 Olympus 公司,型号 DSY4100);电热恒温箱(北京福意联电器有限公司,型号: FYL-YS);医用酶标仪(美国芬兰雷勃,型号: MultiskanFC)。

### 1.2 脂肪干细胞的提取与转染

脂肪标本来自 3 周龄 Wistar 小鼠(吉林大学基础动物实验室提供)腹股沟处,根据 Iwashima 等<sup>[2]</sup>方

法获取脂肪干细胞。使用细胞计数板计数细胞,并调整细胞密度至  $1 \times 10^5$  个细胞/ml,以 10 ml/瓶接种至底面积 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶内,在 37 °C 5%CO<sub>2</sub> 医用孵箱中培养。传代少于 5 代的细胞经荧光免疫染色后利用激光扫描共聚焦显微镜鉴定 CD 44 表面抗原。

采用 pAdShuttle 重组腺病毒构建 VEGF165 载体,pAd-VEGF 和 pAd-BMP 大量扩增并纯化,PacI 线性化后,转染 293 细胞,产生病毒。取第 3 代培养的 ADSCs,当细胞生长至 70%融合时,弃去上清,加入无血清的 DMEM 培养基,以不同浓度( $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$  vp/ml)的重组腺病毒作用细胞 1 h 后,转移到成骨条件培养基中(10% FBS-DMEM 含 10 mmol/L  $\beta$ -磷酸甘油、0.1  $\mu$ mol/L 地塞米松和 50  $\mu$ mol/L 抗坏血酸)继续培养,48 h 后固定细胞,进行 VEGF165 免疫荧光染色,通过计数 VEGF 的阳性细胞数与总细胞数的比值,确定重组腺病毒的转染效率。免疫荧光染色结果显示,VEGF 表达定位于 ADSCs 的细胞浆,表达阳性率在 87%以上。

### 1.3 糖尿病大鼠模型的建立

雄性 Wistar 大鼠 72 只,按 50 mg/kg 体重经腹腔注射链脲佐菌素,24 h 后测血糖,血糖值  $\geq 16.7$  mmol/L,并可维持 1 周以上认为建模成功,继续饲养大鼠 2 个月。在此 2 个月间,每 2 周对大鼠进行一次血糖测定。此期间血糖值恢复正常的将排除在试验组外。

### 1.4 实验动物骨缺损模型的建立

建立大鼠股骨骨缺损模型,术前 1 d 将各组大鼠右下肢剪毛,8%硫化钠溶液脱毛,清水冲洗。用 10%水合氯醛按 0.1 ml/20 g 腹腔注射进行麻醉后,将大鼠仰卧固定于手术台上。消毒铺孔巾,在无菌操作下,切开大鼠右股骨外侧皮肤,长约 3.0 cm。钝性分开股骨前外侧肌肉,显露股骨中段并推开骨膜组织。用电动高速牙科钻头安放小圆钻头,以 20 000 r/min 在股骨中下段钻孔(直径 0.4 cm),以此造成糖尿病大鼠骨缺损模型。

### 1.5 组织工程构件体内置入

以医用无菌凝胶海绵为载体,无菌条件下制成大小相同的立方体(0.5 cm<sup>3</sup>)。用 0.25%胰蛋白酶-

0.02% EDTA 消化诱导成骨培养 7 d 的 ADSCs 以及 VEGF 165 重组腺病毒转染的 ADSCs 3 min, 收集悬浮细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用冰冷 PBS 冲洗, 细胞计数板计数。取  $5 \times 10^6$  个 ADSCs 加入到 L-DMEM+FBS 培养基中吹打混匀。用生理盐水纱布清理骨缺损区血凝块, 将凝胶海绵 ( $0.5 \text{ cm}^3$ ) 完全浸入到含有  $5 \times 10^6$  个 ADSCs 的培养基中, 将凝胶海绵取出后植入到骨缺损处, 并使凝胶海绵与骨缺损两端紧密嵌合, 完全充填整个缺损孔隙; 缝合肌肉、肌膜和皮肤全层, 消毒术区, 术中肌注青霉素 40 万 U。术后单只分笼饲养、保温, 注意观察动物基本情况及伤口愈合情况。每日肌注青霉素 40 万 U, 连续 3 d。

### 1.6 实验动物分组

实验雄性 Wistar 大鼠共 78 只, 6 只非糖尿病大鼠设为正常对照组, 将其余 72 只 STZ 诱导的糖尿病大鼠随机分为: 糖尿病组、生长因子组、干细胞组、实验组, 每组各 18 只。正常对照组: 在非糖尿病大鼠骨缺损内植入经 VEGF165 基因修饰的脂肪干细胞。糖尿病组: 单纯糖尿病骨缺损大鼠。生长因子组: 在糖尿病大鼠骨缺损内单纯植入 VEGF 生长因子; 干细胞组: 在糖尿病大鼠骨缺损内单纯植入脂肪干细胞。实验组: 在糖尿病大鼠骨缺损内植入经 VEGF165 基因修饰的脂肪干细胞。

### 1.7 观察指标及检测方法

**1.7.1 骨缺损修复区大体形态学观察** 在组织工程构件植入体内的第 4 周, 将各组中 6 只大鼠随机行过量麻醉处死, 仔细解剖显露右侧股骨骨缺损修复区域, 光学解剖显微镜, 光镜  $\times 4$  倍下观察植入区植入物的成骨情况。

**1.7.2 修复区内骨钙、磷及 ALP 含量检测** 构件植入后第 4 周的大体观察结果显示, 糖尿病组骨缺损区域内基本无修复组织形成, 因此仅对第 4 周时, 正常对照组、生长因子组、干细胞组和实验组修复区域内的钙、磷及碱性磷酸酶含量进行了检测。随机处死各实验组内 6 只大鼠沿修复区域边缘, 切取修复组织, 分别称湿重, 利用阿基米德原理测定样本的体积, 然后经  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  电热恒温箱烘干至恒重后进行骨的干重测定(重量精确到  $0.0001 \text{ g}$ )。每份样本分别置于消解罐中并加入 1 ml 去离子水、2 ml 30% 过氧化氢、5 ml 浓硝酸, 密闭后置微波消解仪中消化 2 h, 样本最后定容至 25 ml, 借用电感耦合等离子体发射光谱仪, 光谱系为  $178.2 \text{ nm}$  条件下测定骨钙、骨磷含量, 求单位体积骨钙磷含量的平均值。ALP 测定: 样本取材后称湿重, 应用改良 Reddi 法, 放入到匀浆机内加入预冷的生理盐水 2 ml 匀浆, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液  $100 \text{ }\mu\text{l}$ , 加  $1 \text{ mmol/L}$  PNPP

$50 \text{ }\mu\text{l}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 15 min, 加入  $1 \text{ mmol/L}$  的 NaOH  $50 \text{ }\mu\text{l}$  中止反应, 借用酶标仪, 选择波长  $405 \text{ nm}$  的条件下, 测定 OD 值, 计算单位体积 ALP 的平均值。

**1.7.3 修复区周围微血管密度定量分析** 构件植入后的第 4 周, 完整切取植入物区域骨, 置入 4% 多聚甲醛固定。蒸馏水冲洗两遍后浸入 70% 乙醇固定 2 h, EDTA 脱钙。每周更换 1 次脱钙液, 3~4 周至脱钙完全。蒸馏水冲洗, 以乙醇逐级脱水, 二甲苯透明 12 h。渗透液浸透, 软石蜡包埋, 沿取出物纵向连续切片, 厚度为  $6 \text{ }\mu\text{m}$ , 将切片粘帖于经 10% 多聚赖氨酸包被的载玻片上,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  烤箱烘烤 12~24 h。每个标本取 2 张行 HE 染色, 其余部分备用。用 SP 法进行微血管密度的测定: 在 HE 染色切片中, 判定血管结构依照以下标准: 存在内皮细胞、形成管腔并且管腔中有红细胞存在。在 200 倍镜下进行血管计数, 单位为血管数/孔隙面积 (vessels/ $\text{mm}^2$ )。

### 1.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。对组织工程构件植入后 4 周各组大鼠骨缺损修复区域内的 Ca、P、ALP 含量和 MVD 值进行单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-*q* 检验。检验水准取  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 大体组织观察结果

植入后第 4 周时, 正常对照组(图 1a) 缺损孔隙完全修复, 周围大量骨痂包绕; 糖尿病组(图 1b) 骨缺损孔隙未间骨性修复迹象; 生长因子组(图 1c) 缺损孔隙被胶冻状物质充填, 但无类骨样物质生成; 干细胞组(图 1d) 缺损孔隙虽被类骨样物质充填, 但与孔隙间连接不牢固仍未能达到骨性愈合; 实验组内(图 1e) 缺损孔隙完全修复, 周围少量骨痂包绕, 与自体骨结合紧密。实验组成骨修复情况与正常对照组基本一致, 均达到骨性愈合, 但正常对照组在骨痂形成量上大于实验组。观察结果表明: 正常对照组的成骨能力要强于实验组, 而实验组缺损区内的成骨修复能力要强于其他组。

### 2.2 修复区内骨钙、磷及 ALP 含量检测

在 VEGF165 基因修饰的脂肪干细胞植入到骨缺损区域后的第 4 周, 对各组大鼠 Ca、P 及 ALP 的含量分别进行比较, 差异有统计学意义。实验组大鼠骨缺损修复区单位体积内 Ca、P 及 ALP 的含量均高于生长因子组和干细胞组。正常对照组大鼠骨缺损修复区单位体积内 Ca、P 及 ALP 的含量均高于生长因子组和干细胞组。而实验组大鼠骨缺损修复区单位体积内的 Ca、P 及 ALP 含量与正常对照组比较, 差异无统计学意义。见表 1。

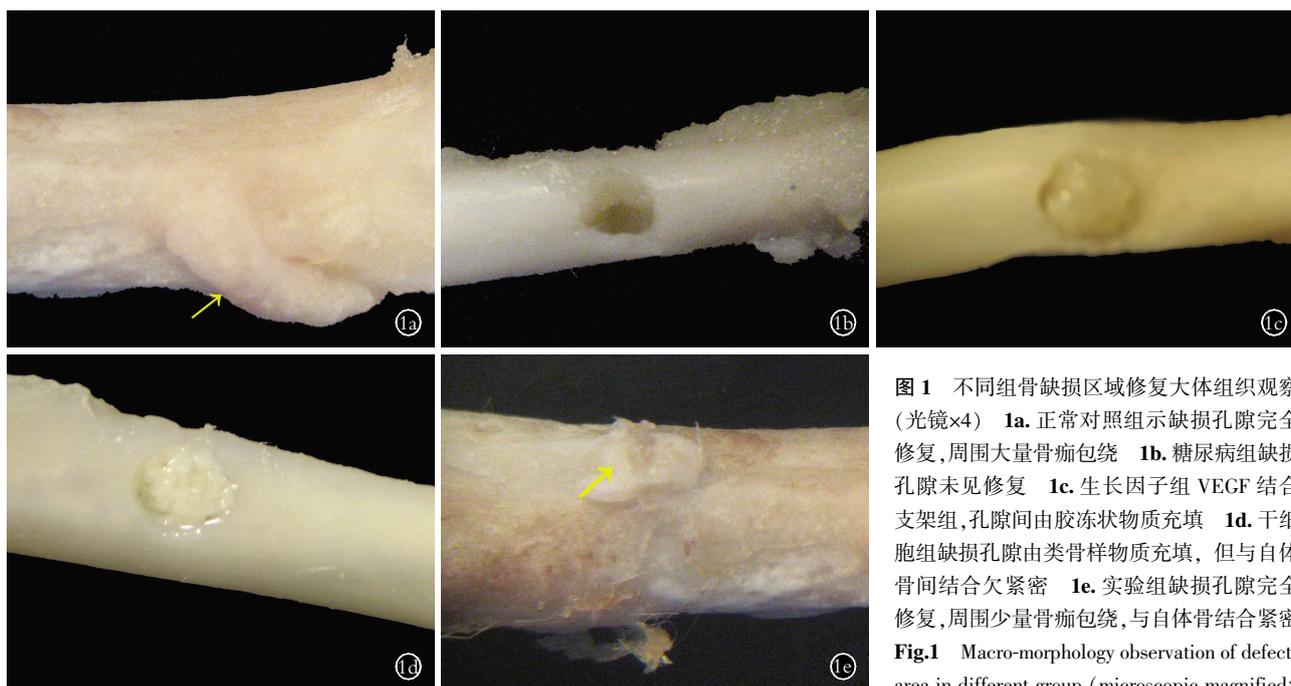


图 1 不同组骨缺损区域修复大体组织观察 (光镜×4) 1a. 正常对照组示缺损孔隙完全修复,周围大量骨痂包裹 1b. 糖尿病组缺损孔隙未见修复 1c. 生长因子组 VEGF 结合支架组,孔隙间由胶冻状物质充填 1d. 干细胞组缺损孔隙由类骨样物质充填,但与自体骨间结合欠紧密 1e. 实验组缺损孔隙完全修复,周围少量骨痂包裹,与自体骨结合紧密

4) 1a. Normal group showed the bone defect was completely repaired and large amount callus was around the repair area 1b. No repair in bone defect of diabetic group 1c. VEGF group showed the bone defect area was filled with gel substances 1d. ADSCs group showed the bone defect was filled with bone-like substances, which has a loose inter-growth with self bone 1e. VEGF+ADSCs group showed the bone defect was completely repaired and a less amount callus was around the repair area

表 1 各组修复区内单位体积修复组织的钙、磷及 ALP 含量检测结果( $\bar{x}\pm s$ )

Tab.1 Detection results of Ca<sup>2+</sup>, P and ALP level of repair tissue among different groups at 4 weeks after implantation( $\bar{x}\pm s$ )

组别	鼠数(只)	Ca(mg.cm <sup>-3</sup> )	P(mg.cm <sup>-3</sup> )	ALP(U.cm <sup>-3</sup> )
正常对照组	6	0.237±0.170 <sup>□1</sup>	0.153±0.012 <sup>◇2</sup>	13.843±0.960 <sup>○3</sup>
生长因子组	6	0.219±0.009 <sup>▽1</sup>	0.210±0.019 <sup>▽2</sup>	12.175±0.864 <sup>▽3</sup>
干细胞组	6	0.217±0.014 <sup>△1</sup>	0.219±0.098 <sup>△2</sup>	12.670±0.771 <sup>△3</sup>
实验组	6	0.238±0.008 <sup>□1</sup>	0.164±0.111 <sup>□2</sup>	13.722±0.853 <sup>□3</sup>
F 值	-	4.950	37.348	5.298
P 值	-	0.010	0.000	0.007

注: □<sup>1</sup> 与 □<sup>1</sup> 比较,  $t=5.571, P<0.05$ ; □<sup>1</sup> 与 △<sup>1</sup> 比较,  $t=3.670, P<0.05$ ; □<sup>1</sup> 与 □<sup>1</sup> 比较,  $t=4.023, P<0.05$ ; □<sup>1</sup> 与 △<sup>1</sup> 比较,  $t=4.188, P<0.05$ ; □<sup>1</sup> 与 □<sup>1</sup> 比较,  $t=-0.039, P>0.05$ ; □<sup>2</sup> 与 □<sup>2</sup> 比较,  $t=-5.673, P<0.05$ ; □<sup>2</sup> 与 △<sup>2</sup> 比较,  $t=-12.286, P<0.05$ ; □<sup>2</sup> 与 □<sup>2</sup> 比较,  $t=-7.946, P<0.05$ ; □<sup>2</sup> 与 △<sup>2</sup> 比较,  $t=-11.870, P<0.05$ ; □<sup>2</sup> 与 □<sup>2</sup> 比较,  $t=-1.394, P>0.05$ ; □<sup>3</sup> 与 □<sup>3</sup> 比较,  $t=2.875, P<0.05$ ; □<sup>3</sup> 与 △<sup>3</sup> 比较,  $t=3.901, P<0.05$ ; □<sup>3</sup> 与 □<sup>3</sup> 比较,  $t=3.877, P<0.05$ ; □<sup>3</sup> 与 △<sup>3</sup> 比较,  $t=3.580, P<0.05$ ; □<sup>3</sup> 与 □<sup>3</sup> 比较,  $t=0.114, P>0.05$

Note: □<sup>1</sup> compared with □<sup>1</sup>,  $t=5.571, P<0.05$ ; □<sup>1</sup> compared with △<sup>1</sup>,  $t=3.670, P<0.05$ ; □<sup>1</sup> compared with □<sup>1</sup>,  $t=4.023, P<0.05$ ; □<sup>1</sup> compared with △<sup>1</sup>,  $t=4.188, P<0.05$ ; □<sup>1</sup> compared with □<sup>1</sup>,  $t=-0.039, P>0.05$ ; □<sup>2</sup> compared with □<sup>2</sup>,  $t=-5.673, P<0.05$ ; □<sup>2</sup> compared with △<sup>2</sup>,  $t=-12.286, P<0.05$ ; □<sup>2</sup> compared with □<sup>2</sup>,  $t=-7.946, P<0.05$ ; □<sup>2</sup> compared with △<sup>2</sup>,  $t=-11.870, P<0.05$ ; □<sup>2</sup> compared with □<sup>2</sup>,  $t=-1.394, P>0.05$ ; □<sup>3</sup> compared with □<sup>3</sup>,  $t=2.875, P<0.05$ ; □<sup>3</sup> compared with △<sup>3</sup>,  $t=3.901, P<0.05$ ; □<sup>3</sup> compared with □<sup>3</sup>,  $t=3.877, P<0.05$ ; □<sup>3</sup> compared with △<sup>3</sup>,  $t=3.580, P<0.05$ ; □<sup>3</sup> compared with □<sup>3</sup>,  $t=0.114, P>0.05$

### 2.3 缺损修复区血管化镜下观察结果

植入后第 4 周时, 各组缺损修复区血管化镜下大体观察结果所见: 正常对照组(图 2a)修复区域间可见血管穿梭生长; 糖尿病组(图 2b)修复区内骨质断裂, 缺损孔隙未见修复, 缺损区域内未见血管生长; 生长因子组(图 2c)内孔隙间修复不完整, 由胶冻状物质充填, 仅内有少量血管生长; 干细胞组(图

2d)内缺损孔隙由类骨样物质充填, 类骨填充物中存在大量空隙, 未见血管长; 实验组内(图 2e)缺损孔隙完全修复, 修复组织与自体骨结合紧密, 内有血管穿梭生长。观察结果表明: 第 4 周时, 正常对照组和实验组修复区域内可见血管生成, 而糖尿病对照、干细胞组内无血管生成, 经 VEGF165 基因修饰的脂肪干细胞在植入后具有促血管再生的作用。

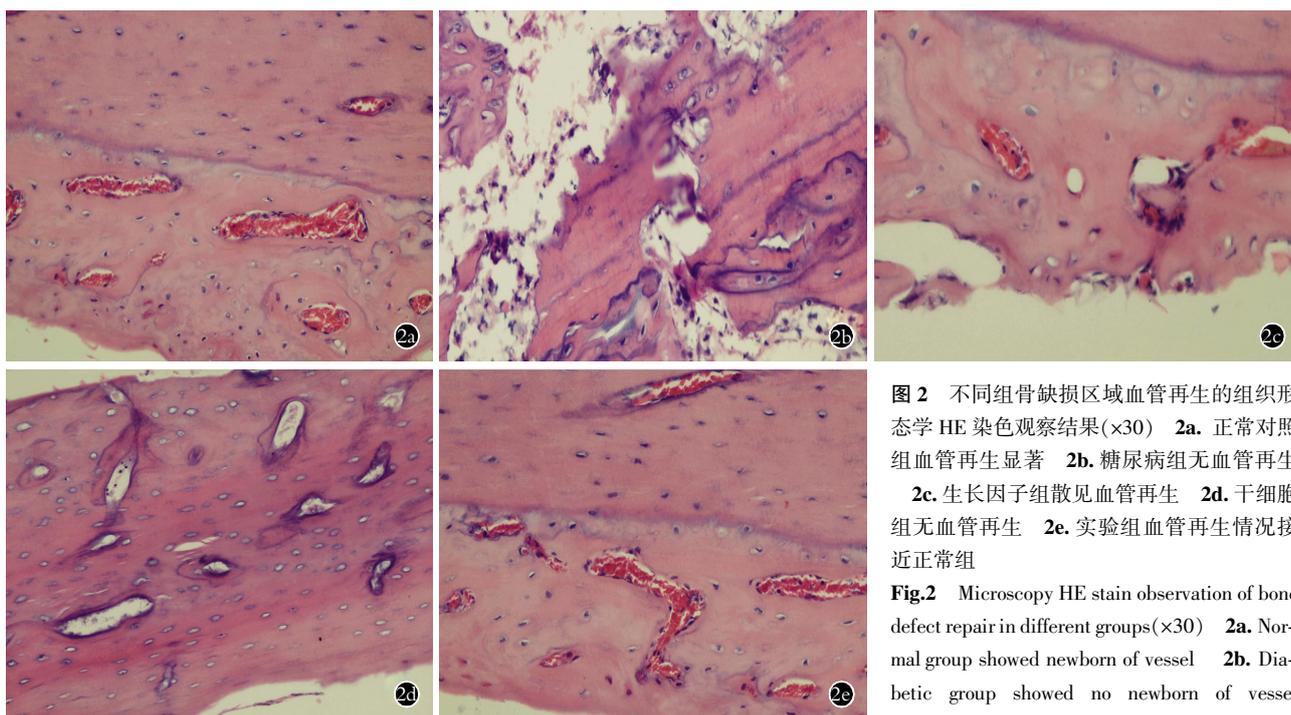


图 2 不同组骨缺损区域血管再生的组织形态学 HE 染色观察结果( $\times 30$ ) 2a. 正常对照组血管再生显著 2b. 糖尿病组无血管再生 2c. 生长因子组散见血管再生 2d. 干细胞组无血管再生 2e. 实验组血管再生情况接近正常组

Fig.2 Microscopy HE stain observation of bone defect repair in different groups( $\times 30$ ) 2a. Normal group showed newborn of vessel 2b. Diabetic group showed no newborn of vessel 2c. Growth factor group showed newborn of vessel 2d. Stem cell group showed no newborn of vessel 2e. Experiment group showed station of newborn of vessel was near to normal group

fat sporadic 2d. Stem cell group showed no newborn of vessel 2e. Experiment group showed station of newborn of vessel was near to normal group

脂肪干细胞植入后第 4 周, 对各组大鼠缺损修复区域周围血管密度进行比较, 差异有统计学意义 ( $F=25.209, P<0.01$ ), 其中, 实验组大鼠缺损修复区域内微血管密度低于正常对照组 ( $P<0.05$ ); 实验组大鼠缺损修复区域内微血管密度高于糖尿病对照组、生长因子组和干细胞组 ( $P<0.05$ )。实验组和生长因子组大鼠缺损修复区域周围血管密度均高于糖尿病对照组 ( $P<0.05$ )。干细胞组大鼠缺损修复区域周围血管密度与糖尿病对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表 2。

### 3 讨论

因糖尿病环境会导致骨质疏松, 骨小梁结构松散, 同时多存在微小血管病变, 再加上体外构建的组织工程骨是细胞与材料的复合体, 本身无营养来源, 植入体内后, 需血液-细胞间液提供细胞营养<sup>[3-5]</sup>。当植入区血供不良时, 植入物建立血管化过程延长, 附着细胞将因缺乏营养, 代谢紊乱, 细胞的增殖、分化及分泌功能受损甚至死亡, 最终使植入物失效。因此, 尽早建立血运完成血管化的进程尤为重要, 组织工程方法中一个基础性的原则就要保证新形成的组织中有足够的血液供应来支持其生长<sup>[6-8]</sup>。

#### 3.1 构建组件的再血管化作用

VEGF 在血管生成过程中起到重要的作用, 是目前已知诱导血管生成作用最强的细胞因子<sup>[9-11]</sup>。随着基因工程技术的发展, 利用 VEGF 基因促进局部血管再生成为较有前途的手段。目前, 利用 VEGF 促

表 2 各组缺损修复区域周围血管密度定量分析结果 ( $\bar{x}\pm s, \text{mm}^2$ )

Tab.2 the quantitative results of micro-vessel density around the repair region in different group at 4 weeks ( $\bar{x}\pm s, \text{mm}^2$ )

组别	鼠数(只)	血管密度	F 值	P 值
正常对照组	6	118.45 $\pm$ 7.49 <sup>▽</sup>	25.209	0.000
糖尿病组	6	82.21 $\pm$ 4.08 <sup>□</sup>		
实验组	6	103.45 $\pm$ 9.72 <sup>#</sup>		
生长因子组	6	92.32 $\pm$ 5.13 <sup>◇</sup>		
干细胞组	6	89.15 $\pm$ 6.76 <sup>*</sup>		

注: <sup>#</sup>与<sup>▽</sup>比较,  $t=-2.584, P<0.05$ ; <sup>#</sup>与<sup>□</sup>比较,  $t=3.955, P<0.05$ ; <sup>#</sup>与<sup>◇</sup>比较,  $t=7.684, P<0.05$ ; <sup>#</sup>与<sup>\*</sup>比较,  $t=3.855, P<0.05$ ; <sup>□</sup>与<sup>◇</sup>比较,  $t=-7.150, P<0.05$

Note: Compare <sup>#</sup>with<sup>▽</sup>,  $t=-2.584, P<0.05$ ; compare <sup>#</sup>with<sup>□</sup>,  $t=3.955, P<0.05$ ; compare <sup>#</sup>with<sup>◇</sup>,  $t=7.684, P<0.05$ ; compare <sup>#</sup>with<sup>\*</sup>,  $t=3.855, P<0.05$ ; compare<sup>□</sup>with<sup>◇</sup>,  $t=-7.150, P<0.05$

进局部再血管化较多的是采用体内基因转染或与载体复合后带人体内方法, 且多数实验证实了该方法能更好地解决组织工程骨植入体内后血运快速重建的问题<sup>[12-15]</sup>。但对于在糖尿病条件下利用 VEGF 促进局部再血管化的研究迄今尚不多见。在本实验中, 笔者在体外构建成 VEGF 基因修饰的 ADSCs, 将其与载体结合后移植入糖尿病大鼠骨缺损模型体内, 通过对植入后 4 周各组缺损修复区血管环境下

观察及 MVD 定量分析发现: VEGF 基因修饰的组织工程骨在植入体内后, 有明显的促血管生成作用。微血管密度在前 4 周增加尤为突出, 实验组修复区内的微血管密度高于组糖尿病对照组、生长因子组和干细胞组。结果说明在糖尿病环境下, 经 VEGF165 基因修饰的脂肪干细胞在植入后具有促进血管再生的作用。由于植入体内后及时建立了有效的血供, 使种子细胞的成活、增殖、分化和分泌功能得以正常发挥, 因此使得实验组修复区内的成骨作用要强于其他两组, 而干细胞组虽也能发挥较好的成骨作用, 但由于缺乏 VEGF 局部血管化作用, 最终其成骨作用减弱; 生长因子组由于无成骨种子细胞, 缺乏骨诱导作用, 周围组织血管的长入还需依靠肉牙组织和纤维结缔组织将血管带入, 因而其成骨能力滞后更多; 实验结构表明在糖尿病环境下, 经 VEGF165 基因修饰的脂肪干细胞在植入后具有促进血管再生的作用, 为缺损区的成骨修复提供了必要的保证。

### 3.2 VEGF165 基因修饰脂肪干细胞对成骨作用的影响

新骨形成的过程是成骨细胞移入到非矿化的基质小泡当中, 同时伴有对钙、磷离子的趋化作用, 以增强骨的矿化密度。在细胞水平上, 磷酸盐转运的蛋白分子会演变为羟基磷灰石晶体, 是真正骨矿化的前体结构。Ca、P 及 ALP 在新骨的形成过程中具有重要的作用<sup>[16]</sup>。修复组织单位体积内中 Ca、P 及 ALP 的含量是反映缺损区成骨状态的指标, Ca、P 及 ALP 的含量高, 表明成骨作用强<sup>[8]</sup>。在通过 VEGF 建立良好血运情况下, 各组修复区大体观察结果显示: 植入后 4 周时, 正常对照组和实验组缺损区域达到了骨性修复, 而其他组缺损区域骨性修复效果欠佳, 此结果表明: 实验组缺损区内的成骨修复能力要强于其他组, 与正常对照组接近。对修复组织内的钙、磷及碱性磷酸酶含的测量结果显示: 生长因子组、干细胞组修复组织单位体积内的 Ca、P 及 ALP 的含量均低于正常对照组和实验组 ( $P < 0.05$ ), 而实验组和正常对照组间上述各检测指标比较无统计学差异。此结果表明: 实验组与正常组的成骨作用要强于其他组。以上结果表明在糖尿病环境下, 经 VEGF165 基因修饰的脂肪干细胞成骨性优于单纯生长因子组和脂肪干细胞植入组, 成骨能力与正常对照组基本一致。

综上所述, 本实验结果与以往非糖尿病环境下转染 VEGF165 修饰干细胞成骨修复研究结果基本一致<sup>[17-20]</sup>, 但进一步证实在糖尿病环境下 VEGF165 基因修饰 ADSCs 组织工程构件在植入体内 4 周时, 修复内血管再生明显, 修复组织内单位体积的 Ca、P 及 ALP 的含量增高, 修复区骨质密度明显提高, 自

体骨与构件之间产生明显的骨化融合带, 成骨作用优良。进而证实应用 VEGF165 基因修饰 ADSCs 组织工程移植方法在糖尿病环境下仍然具有良好的成骨修复作用, 是修复糖尿病骨质疏松性骨缺损的一种有效手段。

### 参考文献

- [1] Jackuliak P, Payer J. Osteoporosis, fractures, and diabetes[J]. *Int J Endocrinol*, 2014, 12(14): 1-10.
- [2] Iwashima S, Ozaki T, Maruyama S, et al. Novel culture system of mesenchymal stromal cells from human subcutaneous adipose tissue[J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(4): 533-543.
- [3] Chang PC, Chien LY, Yeo JF, et al. Progression of periodontal destruction and the roles of advanced glycation end products in experimental diabetes[J]. *J Periodontol*, 2013, 84(3): 379-388.
- [4] Armas LA, Akhter MP, Drincic A, et al. Trabecular bone histomorphometry in humans with Type 1 Diabetes Mellitus[J]. *Bone*, 2012, 50(1): 91-96.
- [5] Jain HV, Moldovan NI, Byrne HM. Modeling stem/progenitor cell-induced neovascularization and oxygenation around solid implants[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012, 18(7): 487-495.
- [6] 常祺, 刘建, 胡蕴玉, 等. rhBMP-2 对兔骨髓基质细胞 VEGF 表达及成骨潜能的影响[J]. *中国骨伤*, 2004, 17(8): 471-473. CHANG Q, LIU J, HU YY, et al. The effects of rhBMP-2 on VEGF expression and osteogenesis ability of rabbit bone marrow stromal cells[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2004, 17(8): 471-473. Chinese.
- [7] 刘日光, 杨述华, 易诚青, 等. 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[J]. *中国骨伤*, 2005, 18(10): 604-606. LIU RG, YANG SH, YI CQ, et al. The Experiment of application of VEGF in treating avascular necrosis of femoral head[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2005, 18(10): 604-606. Chinese.
- [8] Chung JC, Shum-Tim D. Neovascularization in tissue engineering[J]. *Cells*, 2012, 1(4): 1246-1260.
- [9] Sergeeva A, Kolonin MG, Mollndrem JJ, et al. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58(15): 1622-1654.
- [10] Dai J, Rabie AB. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification[J]. *J Dental Res*, 2007, 86(10): 937-950.
- [11] Moore NM, Lin NJ, Gallant ND, et al. Synergistic enhancement of human bone marrow stromal cell proliferation and osteogenic differentiation on BMP-2-derived and RGD peptide concentration gradients[J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(5): 2091-2100.
- [12] Zanetti AS, Sabliov C, Gimble JM, et al. Human adipose-derived stem cells and three-dimensional scaffold constructs: a review of the biomaterials and models currently used for bone regeneration[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2013, 101(1): 187-199.
- [13] Ong WK, Sugii S. Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(6): 1083-1086.
- [14] Liu L, Gao J, Yuan Y, et al. Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential

via secretion of increased VEGF and bFGF[J]. Cell Biol Int, 2013, 37(6):551-560.

[15] Sándor GK. Tissue engineering of bone: Clinical observations with adipose-derived stem cells, resorbable scaffolds, and growth factors [J]. Ann Maxillofac Surg, 2012, 2(1):8-11.

[16] Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, et al. Angiogenesis in bone regeneration[J]. Injury, 2011, 42(6):556-561.

[17] Murata M, Yudoh K, Masuko K. The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage; how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2008, 16(3):279-286.

[18] Senger DR. Vascular endothelial growth factor; much more than an angiogenesis factor[J]. Mol Biol Cell, 2010, 21(3):377-379.

[19] Khosla S, Westendorf JJ, Mödder UI. Concise review: Insights from normal bone remodeling and stem cell-based therapies for bone repair[J]. Stem Cells, 2010, 28(12):2124-2128.

[20] Lau WL, Kalantar-Zadeh K. Towards the revival of alkaline phosphatase for the management of bone disease, mortality and hip fractures[J]. Nephrol Dial Transplant, 2014, 29(8):1450-1452.

[21] Fayaz HC, Giannoudis PV, Vrahas MS, et al. The role of stem cells in fracture healing and nonunion[J]. Int Orthop, 2011, 35(11):1587-1597.

[22] Reumann MK, Nair T, Strachna O, et al. Production of VEGF receptor 1 and 2 mRNA and protein during endochondral bone repair is differential and healing phase specific[J]. J Appl Physiol (1985), 2010, 109(6):1930-1938.

(收稿日期:2016-08-09 本文编辑:李宜)

## 广告目次

1. 云南白药气雾剂(云南白药集团股份有限公司) ..... (封2)
2. 曲安奈德注射液(昆明积大制药股份有限公司) ..... (对封2)
3. 金乌骨通胶囊(贵州盛世龙方制药股份有限公司) ..... (对中文目次1)
4. 青鹏软膏(西藏奇正藏药股份有限公司) ..... (封底)