

发挥抗肿瘤药效;另外,也有可能是纳米粒整体被细胞吞噬,经细胞内酶解释放出姜黄素发挥药效,其确切机制还有待深入研究。

研究表明,mPEG-PLGA 载体材料所制备的纳米粒具有肝组织靶向性,而肝脏也是脂质代谢中心,为此,本文研究为进一步探讨该姜黄素纳米粒肝靶向性及姜黄素浓度与体内药效之间关系奠定了良好基础。

# 参考文献

- 1 鲍华英,陈荣华.姜黄素的研究进展[J].国外医学:儿科学分册,2003,30(5):254
- 2 刘国信.良好的天然色素研究[J].中草药,2000,22(3):140-143
- 3 Chun KS, Keum YS, Han SS, *et al.* Curcumin inhibits phorbol ester-induced expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through suppression of extracellular signal-regulated kinase activity and NF- $\kappa$ B activation[J]. Carcinogenesis,2003,24(9):1515

- 4 许实波,唐孝礼.姜黄素的药理作用研究概况[J].中草药,2003,20(3):140-141
- 5 余美容,蒋福升,丁志山.姜黄素的研究进展[J].中草药,2009,5(40):828-831
- 6 蒋福升,徐秀玲,金波,等.水溶性姜黄素前药制备及其体外抗肿瘤实验研究[J].中国药理学杂志,2009,44(19):1492-1496
- 7 Matthews B, Nigel W. Tumor targeting by covalent conjugation of a natural fatty acid to paclitaxel[J]. Clinical Cancer Research,2001,7(8):3229-3238
- 8 Marina A. Dobrovolskaia, parag aggarwal. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution[J]. Mol Pharm,2008,5(4):487-495
- 9 Jean CP. Drug transport to brain with targeted nanoparticles[J]. Experimental Neuro Therapeutics,2005,2(12):108-119

(收稿:2011-12-01)

(修回:2012-04-16)

## rhBMP-2 对兔下颌骨放疗后骨延长的影响

麻益可 沈国芳 王丽珍

**摘要** 目的 兔下颌骨放射后骨延长的新生骨形成受到轻微抑制,本研究旨在初步了解 rhBMP-2 对其促进成骨疗效。**方法** 50Gy 组(对照组)和 rhBMP-2 组(实验组)各兔 6 只,均在术前 1 个月接受 50Gy 放射,间歇 8 天后,以 0.4 毫米/次、2 次/天的速度进行牵引,固定期 6 周。实验组在截骨线内同期置入 2.0mg rhBMP-2。**结果** 标本和 X 线均显示两组成骨均良好,与周围骨质无明显的界限;HE 组织学切片可见两组骨小梁稀疏、细小,并存在成片状致密纤维结缔组织。图像分析软件结果是:50Gy 组和 BMP 组的骨小梁面积比分别为  $0.445 \pm 0.054$  和  $0.459 \pm 0.036$ 。经方差分析,两组间差异无统计学意义。**结论** 本研究中的 rhBMP-2 不能促进兔下颌骨放射后骨延长的新生骨形成。

**关键词** 骨延长 兔 放射治疗 下颌骨 BMP-2

**Effect of rhBMP-2 on Bone Lengthening in Irradiated Rabbit Mandible.** Ma Yike, Shen Guofang, Wang Lizhen. Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

**Abstract Objective** To study the effect of rhBMP-2 on new bone formation of bone lengthening which was impaired by radiation in irradiated rabbit mandible. **Methods** A total of 12 rabbits were randomly divided into 2 groups: An rhBMP-2 group ( $n=6$ ) and a 50Gy group ( $n=6$ ). Each rabbit received irradiation of 50Gy. One month after irradiation, the operations were completed. The 2.0mg rhBMP-2 was implanted in the rhBMP-2 group at the same time. After a latency of 8 days, distraction was activated at a rate of 0.4mm, twice a day. The mandibles were harvested 6 weeks after consolidation. **Results** The specimens and radiographs showed good bone formation. However, the HE stain histology found the sparse, thin bone trabecula and the dense fibrous connective tissue. The bone trabecula area ratio of the rhBMP-2 group was  $0.459 \pm 0.036$  and the 50Gy group was  $0.445 \pm 0.054$  ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The rhBMP-2 could not promote new bone formation in this study.

**Key words** Bone lengthening; Rabbit; Radiotherapy; Mandible; BMP-2

基金项目:上海市重点学科(优势学科)建设项目(Y0203)

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院口腔科(麻益可);上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面外科(沈国芳、王丽珍)

通讯作者:沈国芳,教授,博士生导师,电子信箱:maxillofacsur@163.com

自 Urist 首先发现了 BMP, 以后的研究发现 BMP 具有促进成骨作用。在 BMP 家族中, BMP-2、BMP-4、BMP-7 的成骨能力最强。rhBMP-2 已经被证实有促进成骨作用<sup>[1,2]</sup>。Wurzler 等<sup>[3]</sup>发现 rhBMP-2 可以促进大鼠放射后颅骨缺损的修复, 尽管修复的骨量仍然低于为放射组。目前, 尚无 rhBMP-2 作用于放射后颌骨骨延长的研究和报道。通过先期的研究表明, 放射后兔下颌骨骨延长的新生骨形成受到了抑制。本研究的目的在于在截骨间隙置入 rhBMP-2 以观察其能否促进新生骨的形成。

### 材料与方法

1. 材料: 本研究置入材料核心成分是 rhBMP-2, 载体材料是药用明胶、大豆卵磷脂及羟基磷灰石, 由杭州华东基因技术研究所赞助提供。牵引器由浙江慈北医疗器械公司提供, 依据兔下颌骨定制的手控式内置式牵引器, 由牵引杆、牵引体和固定脚组成, 牵引螺距为 0.40mm/360°, 最长牵引长度为 15.0mm。

2. 实验动物入选标准及分组: 雄性新西兰大白兔, 约 6 月龄, 体重 2.0~3.0kg, 共 12 只兔。兔入圈圈养 1 周, 随机化实验分为两组, 每组各 6 只, 具体如下: ①对照组: 术前接受 50Gy 放射剂量, 间歇 1 个月后进行骨延长; ②rhBMP-2 组: 与对照组的差别仅在术中置入骨优导, 其他均一致。

3. 放射处理: 由上海交通大学附属第九人民医院口腔颌面外科放疗室提供专业放射人员和 Therathon 780-C 型<sup>60</sup>Co 远距离治疗机 (AECL medical, 加拿大), 照射方式是外照射。随机确定实验放射侧, 放射在全麻下进行。以第 1 前磨牙前缘中点为放射中心, 照射野大小为 3.0cm × 3.0cm, 源皮距为 80cm, 表面覆盖一层等效物。放射方案为: 每次 5.6Gy, 每天照射 1 次, 连续照射 5 天 (根据 TDF 表, 上述放射方案相当于常规放射的 25 次 50Gy)。

4. 手术: 术前无需禁食, 肌肉注射速眠新 II 液 0.1ml/kg 和氯氨酮 0.1ml/kg, 麻醉生效后, 双侧颌下、面部和颈部备皮, 剪除兔毛。侧卧于手术台, 四肢固定, 常规消毒铺巾。手术部位加以 0.5% 利多卡因皮下局部注射, 以加强麻醉效果。对照组: 切口于放射侧下颌下, 切开皮肤及皮下组织, 长约 2.0cm, 寻及面动静脉予以结扎、剪断, 以减少出血。暴露下颌骨颊侧, 横行切开骨膜并剥离骨膜, 显露下颌骨骨质、颊孔和下牙槽神经, 剪断下牙槽神经, 推开。剥离时保护颊侧牙龈附着, 避免与口腔相通。舌侧骨膜不予剥离, 以尽量保留下颌骨血供。截骨于第 1 前磨牙前和颊孔间。于下颌角切开长约 3mm 皮肤切口, 牵引杆穿过皮下层和该切口, 放置于其后方, 预安置牵引器, 各骨段 2 枚自钻螺钉固定, 拆除牵引器。以  $\phi 1$ mm 小球钻以 2000r/min 的速度逐层去除颊侧骨皮质、骨松质, 同时予无菌生理盐水冲洗、冷却; 舌侧骨皮质以骨凿轻轻凿断。伸入骨凿于截骨线, 以能完全撬动两侧骨段为截断标准, 原位

复位牵引器。创口冲洗, 充分止血, 常规缝合关创。于对侧相同位置以相同方法截断下颌骨, 不安置牵引器, 逐层关创。术中根据需要, 可适时追加麻醉药物初次剂量的半量。rhBMP-2 组与对照组的差别在于: 试牵引成功后, 复位; 创口冲洗, 充分止血后将 rhBMP-2 填入截骨间隙。待兔完全苏醒, 送回笼中, 与精饲料为主, 卷心菜为辅喂养。术后当天开始肌肉注射 30000U 青霉素, 每天 2 次, 连续注射 7 天。

5. 牵引方案: 间歇 8 天后开始牵引, 每天 0.4mm, 每天 2 次, 连续牵引 10 天, 固定期 6 周。

6. 观察和评价指标: (1) 活体观察: 术后观察兔的进食、创口愈合等情况。固定期 6 周结束时, 处死后取得两侧下颌骨离体标本。观察新生骨的外形和质地, 测量新生骨的长度。(2) X 线片评价: 分别于牵引结束次日、固定期 3 周和固定期 6 周时在拍摄下颌骨横断咬合 X 线片以观察牵引间隙是否有效形成、牵引间隙内骨质状况等。(3) HE 组织学: 离体标本拍好 X 线后立即锯取新生骨, 以 10% 中性缓冲甲醛液固定, 由上海交通大学附属第九人民医院口腔颌面外科病理室完成脱钙、脱水、石蜡包埋、切片和 HE 染色等, 切片切面为下颌骨横断面。

随机取每个标本最中央且放大倍数为  $4 \times 10$  的图片 4 张, 应用 Image-Pro Plus 4.5.1 图像分析软件进行组织学半定量分析, 分别测量新生骨骨小梁总面积和视野总面积, 并计算骨小梁面积比, 记平均值。计算公式: 骨小梁面积比 = 骨小梁面积总面积 / 视野总面积。数据用统计软件分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 活体观察: 所有动物都完成了实验, 有效形成牵引间隙并存活到固定期 6 周。牵引完成后, 下颌明显偏向对侧, 上下前牙均处于空咬状态。上下前牙随时间推移而伸长, 并造成下颌口腔黏膜的创伤性溃疡, 但均不影响进食。

2. 大体标本观察: 实验组和对照组的螺钉均与骨组织固定牢固。实验侧下颌骨新生骨均呈直线延长, 延长长度  $6.7 \pm 1.1$ mm。所有舌侧、上下端及颊侧骨皮质与周围骨质无明显的界限, 连续性完好, 难以区分原有骨质与新生骨的界限。颊舌侧骨质均致密, 质硬 (图 1)。两组在大体标本上无明显差别。对侧的截骨部位也可见临床正常愈合, 未见骨段间的错位愈合, 难以分辨出截骨线。

3. X 线检查: 牵引结束次日, 均可见牵引间隙有效形成; 牵引间隙内为低密度软组织透光区, 截骨边缘锐利清晰, 无骨质形成迹象。骨优导透射 X 线, 未能显影。固定期 3 周时, 均可见整个牵引间隙内较均匀、密度略低于正常的阻射影, 呈细条带排列, 方向与牵引力方向一致, 截骨边缘模糊不清, 骨皮质影隐约

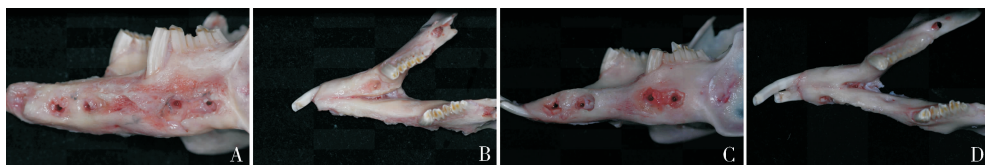


图 1 兔下颌骨新生骨图

A. rhBMP-2 组侧面相; B. rhBMP-2 组俯视图相; C. 50Gy 组侧面相; D. 50Gy 组俯视图相

可见,但是未见典型的骨小梁结构和中央区。rhBMP-2 组牵引间隙内,可以区分出骨皮质。50Gy 组未见明显的骨皮质高密度影。固定期 6 周时,牵引间隙内充满高密度影,密度与周围骨质相似,原截骨边缘消失;可见骨小梁,均匀分布于新生骨内,排列方向与牵引方向一致。颊舌侧骨皮质致密。分辨不出两组间的差别(图 2)。

4. 组织学观察:HE 染色两组均可见形成新生骨组织,密质骨和松质骨均可见带状浅蓝色类骨质,骨小梁排列方向均与牵引方向相同。两组的骨小梁均较稀疏、细小,分布较均匀;密质骨和骨小梁内含有丰富的骨细胞,骨细胞核呈圆形,骨陷窝周围被环形类骨质包裹;大部分骨小梁边缘可见大量为柱状或立方

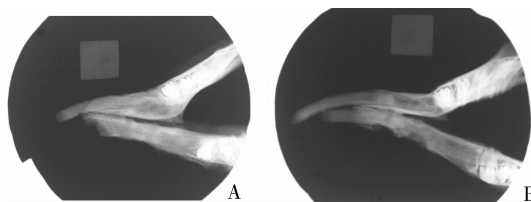


图 2 X 线图

A. rhBMP-2 组固定 6 周; B. 50Gy 组固定 6 周

状成行紧密排列的成骨细胞,排列整齐;未见哈佛氏系统和破骨细胞,骨髓均为脂肪性骨髓。两组中均未见软骨形成。所有 12 个标本的骨小梁间都可以见到成片状致密纤维结缔组织(图 3)。

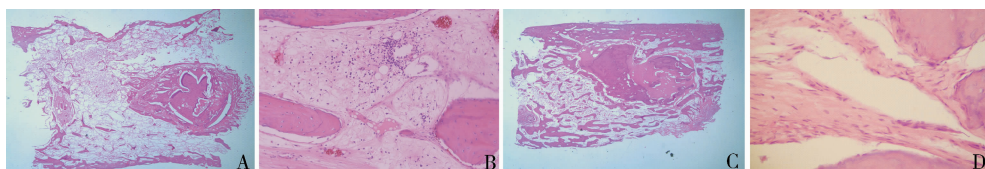


图 3 HE 染色组织学表现

A. 50Gy 组( $\times 10$ ); B. 50Gy 组( $\times 200$ ); C. rhBMP-2 组( $\times 10$ ); D. rhBMP-2 组( $\times 200$ )

5. 统计学结果:rhBMP-2 组和 50Gy 组骨小梁面积比分别为  $0.459 \pm 0.036$ ,  $0.445 \pm 0.054$ 。经过统计学分析, $P = 0.61$  ( $> 0.05$ ),两组之间差异无统计学意义。

## 讨 论

BMP 是一种疏水性糖蛋白,现已发现 BMP-1~13,其中起重要作用是 BMP-2、BMP-4、BMP-7。BMP 能促进细胞的有丝分裂和转化,能诱导未分化的间充质细胞分化为成骨细胞和成软骨细胞,从而促进成骨<sup>[4~6]</sup>。研究还表明 rhBMP-2 具有强大的促进成骨作用,而且 rhBMP-2 诱导形成的新骨,经组织学、生物力学和放射影像学证实,与正常骨质无差别<sup>[7,8]</sup>。Wurzler 等<sup>[3]</sup>研究发现 rhBMP-2 可以促进大鼠放射后颅骨缺损的修复,但是形成的新骨仍不如未放射者。在本研究中 rhBMP-2 组和 50Gy 组的新

生骨颊舌侧骨皮质均致密、质硬。在牵引结束后、固定期 3 周、6 周的 X 线片,都显示相似的成骨表现。组织学可见两组的骨小梁密度均较稀疏、细小,骨小梁间存在致密纤维结缔组织。这些均提示, rhBMP-2 未能促进兔下颌骨放射后骨延长的新生骨形成。

研究表明,新生骨的形成量和骨密度与局部置入的 rhBMP-2 初始浓度和持续时间正相关。rhBMP-2 单独局部使用效果并不理想,主要原因是 rhBMP-2 作为多肽生长因子在局部很容易被稀释、分解和吸收,不能长久有效的刺激靶细胞。因此,具有缓释性能的 rhBMP-2 产品更有利于成骨<sup>[9]</sup>。本研究术中同期置入的核心和主要成分是二聚体 rhBMP-2,纯度在 95% 以上,且其中含有具有缓释性能的少量卵磷脂作为载体,在 2~3 周内缓慢完全释放。

众多研究表明 rhBMP-2 也可以在骨延长中可

以促进成骨。诸多等研究表明 rhBMP-2 对骨延长有明显的促进新生骨形成作用<sup>[10,11]</sup>。研究发现, rh-BMP-2 最佳局部浓度与动物种属级别正相关;犬类下颌骨最佳浓度约为人类下颌骨 1/2。由此可以推断,兔下颌骨的用量应该更少。根据本研究者测得,人体下颌骨体部的冠状截面积约为  $2.7\text{cm} \times 1.2\text{cm}$ ;兔本实验的截骨部位处截面积约为  $1.0\text{cm} \times 0.6\text{cm}$ ,为前者的 1/5.4。以此可以推断,兔局部下颌骨截骨处的 rhBMP-2 用量应该少于人的 1/10。本研究中骨延长的截骨间隙仅约 2mm,而且兔下颌骨体部短小,仅能容纳约 2.0mg 的 rhBMP-2 复合材料。该剂量约为厂商人体推荐用量的 1/10,而且也有研究证实 1.5mg 的 rhBMP-2 完全能促进新骨形成<sup>[11]</sup>。因此,术中同期置入量是合理的。

Wurzler 等<sup>[3]</sup>研究还发现在促进大鼠放射后颅骨缺损的修复时, rhBMP-2 剂量高效果较剂量低者好。在本部分研究中,两组的新生骨没有明显的差别。是 2.0mg rhBMP-2 不足以促进成骨? 或者是 rhBMP-2 本身对放射后骨延长新生骨的形成没有促进作用? 这尚需要进一步的研究。

#### 参考文献

- 1 Simon Y, Zarana SP, James DK, *et al.* Dose effect of dual delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 on bone regeneration in a rat critical-size defect model[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(9):2347-2362
- 2 Hamilton DK, Smith JS, Reames DL, *et al.* Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as an adjunct for instrumented

- posterior arthrodesis in the occipital cervical region: an analysis of safety, efficacy, and dosing [J]. *J Craniovertebr Junction Spine*, 2010, 1(2):107-112
- 3 Wurzler KK, DeWeese TL, Sebald W, *et al.* Radiation-induced impairment of bone healing can be overcome by recombinant human bone morphogenetic protein-2 [J]. *J Craniofac Surg*, 1998, 9(2):131-137
- 4 Li HW, Dai KR, Tang TT, *et al.* Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2 [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2007, 356(4):836-842
- 5 郭勇, 张西正, 武继民, 等. 人骨形成蛋白 2 基因成骨诱导作用研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2006, 21(7):579-581
- 6 孙健, 余优成, 顾章愉, 等. BMP-2 对大鼠骨髓间充质干细胞成骨作用的影响 [J]. *上海口腔医学*, 2011, 20(4):26-31
- 7 Gerard KJ, Harvinder SS, James F. Bone morphogenetic proteins: applications in spinal surgery [J]. *HSS J*, 2005, 1(1):110-117
- 8 Ghodadra N, Singh K. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the treatment of bone fractures [J]. *Biologics*, 2008, 2(3):345-354
- 9 Lssa JP, do Nascimento C, Iyomasa MM, *et al.* Bone healing process in critical-sized defects by rhBMP-2 using poloxamer gel and collagen sponge as carriers [J]. *Micron*, 2008, 39(1):17-24
- 10 Norine A, René St-A, Dominique L, *et al.* Are endogenous BMPs necessary for bone healing during distraction osteogenesis? [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2009, 467(12):3190-3198
- 11 田璐鸣, 王稚英. 重组人骨形态发生蛋白 2 在下颌骨牵引成骨过程中的作用 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(15):2670-2674

(收稿:2011-09-22)

(修回:2011-10-27)

## 晚期糖基化终产物引起内皮细胞 connexin43 表达上调

章顺荣 高 越 封 菲 洪鸣鸣

**摘 要** **目的** 研究晚期糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGEs) 对体外培养的人脐静脉内皮细胞缝隙连接蛋白 (gap junction protein) connexin43 基因表达的影响。**方法** D-葡萄糖孵育牛血清白蛋白制备糖基化牛血清白蛋白作为晚期糖基化终产物。体外常规培养的人脐静脉内皮细胞分为 4 组, 分别为对照组, 100、200 和 400mg/L AGEs 干预组, 干预 24h 后通过 RT-PCR 方法检测各组 connexin43 基因 mRNA 的表达有无差别; 通过免疫荧光方法检测对照组和 200mg/L AGEs 干预组之间 connexin43 蛋白的表达水平有无差别。**结果** 不同浓度 (100、200、400mg/L) 的 AGEs 干预 24h 均能引起人脐静脉内皮细胞 connexin43 基因 mRNA 的表达上调 ( $P < 0.01$ ); 200mg/L 的 AGEs 干预 24h 引起人脐静脉内皮细胞 connexin43 基因的蛋白表达上调 ( $P < 0.01$ )。**结论** AGEs 体外短期干预可引起人脐静脉内皮细胞 connexin43 基因的 mRNA 和蛋白表达水平上调。

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2008B145)

作者单位: 310006 杭州市第一人民医院老年医学科

通讯作者: 高越, 电子信箱: gy9821@sina.com.cn