

载 VEGF 和 BMP-2 的 PDLLA 涂层螺钉治疗股骨颈骨折的实验研究

韩 宁 刘小翠 丁佳骏 刘圣珺 梁素萍 徐佳依 李增春

摘 要 **目的** 探讨载血管内皮生长因子(VEGF)和骨形成蛋白 2(BMP-2)PDLLA 涂层螺钉生物相容性和促进新西兰大白兔股骨颈骨折愈合的作用。**方法** 体外释放实验检测直径 3.5mm 载 VEGF 和 BMP-2 的 PDLLA 涂层钛合金螺钉的 VEGF 和 BMP-2 的释药能力,提取涂层浸提液行体内全身急性毒性检测、热原反应、溶血实验和体外细胞毒性实验。12 只体重 2.5 ~ 3.9kg 健康成熟新西兰大白兔双侧股骨颈骨折,右侧以载 VEGF 和 BMP-2 的 PDLLA 涂层螺钉固定,左侧以无涂层螺钉固定行自身对照。术后 12 周进行 X 线、micro-CT 和组织学分析。**结果** VEGF 和 BMP-2 在最初 8h 内释放剧增,随后持续和稳定释放 12 周。全身急性毒性检测、热原反应、溶血实验和细胞毒性实验符合 GB/T 16886 和 ISO 10993 标准。术后 12 周,右侧骨折已愈合,左侧对照尚未愈合。右侧微血管数目、骨密度、骨体积分数、骨小梁厚度和数目较左侧明显增加($P < 0.01$),骨小梁间距较左侧降低($P < 0.01$)。**结论** 载 VEGF 和 BMP-2 的 PDLLA 涂层螺钉生物相容性好,持续稳定释放 VEGF 和 BMP-2 促进股骨颈骨折愈合。

关键词 血管内皮生长因子 骨形成蛋白 2 聚消旋乳酸 股骨颈骨折 生物学评价

中图分类号 R681

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.06.025

Effect of PDLLA Coating Screw Carrying VEGF and BMP-2 on Femoral Neck Fracture. Han Ning, Liu Xiaocui, Ding Jiajun, et al. Traumatology Department, Shanghai East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China

Abstract **Objective** To assess the biocompatibility of PDLLA coating screw carrying vascular endothelial growth factor(VEGF) and Bone morphogenetic protein 2(BMP-2) and explore the treatment of the coating screw on femoral neck fracture in rabbits. **Methods** PDLLA coated titanium alloy screws with 3.5mm diameters carrying VEGF and BMP-2 were prepared and received in vitro release experiment to evaluate the amounts of VEGF and BMP-2. The coating extracts underwent in vivo systemic acute toxicity test, pyrogen test, hemolysis test and in vitro cytotoxicity test. Bilateral femoral neck fracture were made in the 12 healthy mature New Zealand white rabbits weighed 2.5 ~ 3.9kg. The right femoral neck fracture was fixed with the PDLLA coating screws carrying VEGF and BMP-2. The left was fixed with the screws without coating. At the end of the 12th week, all rabbits were euthanasized and received X-ray, Micro-CT and histological study. **Results** VEGF and BMP-2 were significantly released in the initial 8 hours, and then were releasing continuously and stably in the next 12 weeks. The results of in vivo systemic acute toxicity test, pyrogen test, hemolysis test and in vitro cytotoxicity test met GB/T 16886 and ISO 10993 standard. At the end of the 12th week, the right femoral neck fractures healed and the left did not. The number of microvessel, bone mineral density, BV/TV, Tb.Th and Tb.N in the right were higher than those in the left($P < 0.01$). Tb.Sp in the right were lower than that in the left($P < 0.01$). **Conclusion** The PDLLA coating screw carrying VEGF and BMP-2 showed excellent biocompatibility. VEGF and BMP-2 were releasing continuously in the 12 weeks, which accelerated the fracture healing of femoral neck.

Key words Vascular endothelial growth factor; Bone morphogenetic protein 2; PDLLA; Femoral neck fracture; Biological assessment

股骨颈骨折约占全部骨折总数的 3.58%,且发生率日益增高,预计到 2025 年,全球股骨颈骨折数量将突破 400 万例^[1]。而股骨颈骨折临床治疗中的骨折不愈合和股骨头缺血坏死,常导致患者病残^[2,3]。

目前,解剖复位股骨颈骨折并加压固定骨折端已经形成共识^[1]。早期骨折复位有助于恢复因骨折而扭曲的残存股骨头血供;牢固的内固定可避免骨折端再次移位造成血供破坏,为微血管的再生爬行提供良好环境^[4,5]。但股骨颈骨折术后骨折不愈合发生率仍高达 10% ~ 30%,股骨头缺血性坏死发生率约为 15% ~ 30%^[6]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种特异性促血管内皮

基金项目:上海市浦东新区卫生局青年基金资助项目(PW2015B-6)
作者单位:200120 上海,同济大学附属东方医院急诊创伤骨科
通讯作者:李增春,电子信箱:smztm@ hotmail.com

细胞增生及血管生成因子,对血管再生起着关键性作用^[7,8]。骨形成蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) 被认为是活性最强的唯一能单独诱导成骨的因子,在骨的生长和损伤修复中发挥重要作用^[8]。因此,笔者在内固定表面制备具有生物活性的 BMP-2 和 VEGF 涂层,诱导股骨颈骨折端和股骨头内微血管和新骨形成,促进股骨颈骨折愈合避免股骨头缺血坏死。

材料与方法

1. 材料:新西兰大白兔和昆明小鼠由同济大学动物中心提供。高糖 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自以色列 Beit Haemek 有限公司,含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),人重组 VEGF 和人重组 BMP-2 标准品(美国 Sigma 公司),培养瓶,24 孔板(美国 Corning 公司),紫外分光光度计(德国 Eppendorf 公司)。

2. PDLLA 涂层的体外释放检测:聚消旋乳酸 [poly(D, L-lactide), PDLLA] 以 50mg/ml 的浓度在室温下溶解在有机溶剂乙酸乙酯中。100 μ g 人重组 VEGF 和 100 μ g 人重组 BMP-2 标准品分别混匀于 5ml PDLLA 溶液中,充分浸泡无菌直径 3.5mm 不同长度的钛合金螺钉并在无菌层流条件下风干,此过程重复两次。⁶⁰Co 辐照灭菌,无菌包装备用。

配制 VEGF 和 BMP-2 对照品液,以磷酸盐缓冲液(PBS)为空白,紫外分光光度计在 200~700nm 范围内分别确定 VEGF 和 BMP-2 的最大吸收波长。分别精密称取 VEGF 和 BMP-2 对照品 0.05g 置 100ml 容量瓶中,以 PBS 定容,得到 500 μ g/ml 的溶液,然后分别稀释,得到浓度分别为 400、300、200、100、50、20、10 μ g/ml 一系列标准溶液。分别用紫外分光光度计测定吸光度值,制备标准曲线。

将载 VEGF 和 BMP-2 的 PDLLA 涂层钛合金螺钉,浸入含 20ml 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 值=7.4)的培养瓶中,于 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡(60r/min)水浴中,在预定的时间间隔点(1h、4h、8h、12h、1 天、14 天、28 天、56 天、84 天)各取出 100 μ l。用紫外分光光度计测定释放液吸光度,对照标准曲线,计算 VEGF 和 BMP-2 的含量。每个样品分别测定 3 次。

3. 载 VEGF 和 BMP-2 的 PDLLA 涂层螺钉的生物相容性:DMEM 高糖培养液(含 10% 小牛血清)浸提 VEGF 和 BMP-2 的 PDLLA 涂层钛合金螺钉(依照 GB/T 16886 和 ISO 10993,材料质量与浸提介质体积比 1g:5ml),浸提条件为 37 $^{\circ}$ C, 72h,后以 1200r/min

离心 5min,吸取上清液并经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌,即得实验用样品的浸提液备用。

4. 体内全身急性毒性检测、热原反应和溶血实验:依据 GB/T 16886 和 ISO 10993 医疗器械生物学评价规定,进行体内全身急性毒性检测、热原反应和溶血实验。

(1) 全身急性毒性检测:选用健康昆明小鼠 12 只,6 周龄,雌雄各半,体质量 15~26g。将小鼠随机分实验组和对照组两组,每组 6 只。实验组小鼠腹腔注射样品浸提液,每只小鼠注射剂量为 50ml/kg;对照组腹腔注射无菌 0.9% NaCl 注射液 50ml/kg,于注射后即刻及 24、48、72h 观察和记录实验组和对照组动物一般状态、毒性表现和死亡动物数。于注射前及注射后 24、48、72h 称重并记录两组动物的体质量变化。

(2) 热原反应:选用健康成熟新西兰大白兔 12 只,雌雄不限,体质量 2.2~2.5kg,随机分实验组和对照组 2 组,每组 6 只。自实验组新西兰大白兔耳缘静脉注射温度为 38 $^{\circ}$ C 的样品浸提液(10ml/kg),对照组耳缘静脉注射温度为 38 $^{\circ}$ C 的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液(10ml/kg)。注射后每隔 1h 测量体温 1 次(测体温时用精确肛温计插入新西兰大白兔肛门约 6cm 左右,测温时间 1.5min),共 3 次,3 次体温中最高的 1 次减去注射前体温即为体温升高值。若体温升高 < 1.4 $^{\circ}$ C 说明没有致热源物质存在。

(3) 溶血实验:选用新西兰大白兔 6 只,雌雄不限,体质量 2.2~2.5kg。抽取健康新西兰大白兔静脉血 10ml,加入 2% 草酸钾 0.5ml,以 0.9% 生理盐水 10ml 稀释制备新鲜稀释兔血。将实验组(样品浸提液)、阴性对照组(生理盐水)、阳性对照组(双蒸水)各组试液 10ml 分别置于 50ml 三角瓶中,37 $^{\circ}$ C 水浴 30min。加入新鲜稀释兔血 0.2ml 摇匀,37 $^{\circ}$ C 水浴 60min,以 2000r/min 离心 5min 取上清,紫外分光光度计于波长 545nm 测吸光度,实验组和对照组吸光度均取 3 瓶平均值。溶血程度用溶血率(%)表示,为[(实验样品的吸光度值 - 阴性对照的吸光度值)/(阳性对照的吸光度值 - 阴性对照的吸光度值)] $\times$ 100%。若实验组溶血率 > 5% 为阳性反应,表示有溶血现象。

5. 体外细胞毒性实验:(1)骨髓间充质干细胞培养及传代扩增:密度梯度离心联合差速贴壁法分离新西兰大白兔的骨髓间充质干细胞(bone marrow - de-

rived mesenchymal stem cells, BMSC)。于新西兰大白兔髂骨穿刺获得骨髓重悬于 DMEM 高糖完全培养液(含 10% 胎牛血清, 100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素), 充分混匀后叠加到 10ml percoll 分离液($d = 1.073\text{g/ml}$)上层液面, 900 $\times g$ 离心 20min。PBS 洗涤中间单核细胞层两次, 单细胞悬液以 $5 \times 10^8/\text{ml}$ 接种于 25 cm^2 培养瓶。置 37 $^\circ\text{C}$ 、相对体积分数为 5% CO_2 、饱和湿度的细胞孵箱培养 48 ~ 72h 后全量换液, 弃去未贴壁细胞, 以后每 2 ~ 3 天换液 1 次。生长至 80% 融合后以含 0.02% EDTA 的 0.25% 的胰蛋白酶消化传代。取 2×10^4 个/毫升第 3 代 BMSC 细胞悬液备用。(2) 细胞毒性实验: 96 孔板内设实验组、阳性对照组和阴性对照组, 每组 6 复孔。每孔接种 100 μ l 第 3 代 BMSC 细胞悬液后, 置于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养, 24h 后弃去原培养液, PBS 冲洗。实验组加入 200 μ l 材料浸提液, 阳性对照组加入 200 μ l 含 0.64% 苯酚和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 阴性对照组加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液。置于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中继续培养。分别于培养 24、48 和 72h 后各取一块培养板, 各孔加入 20 μ l 的 5% MTT, 继续培养 4h 后弃去孔内液体并加入 150 μ l 二甲基亚砷(DMSO), 振荡 10 ~ 15min, 波长 490nm 处自动酶标检测仪测吸光度。根据 6 级毒性评级标准计算各组相对增殖率(relative proliferation rate, RGR), $\text{RGR} = \text{实验组吸光度值} / \text{阴性对照组吸光度值}$ 。

6. 新西兰大白兔股骨颈骨折动物模型的建立和分组: 健康成熟新西兰大白兔 12 只, 一级动物, 雌雄各半, 体质量 2.5 ~ 3.9kg。将兔的右后肢作为实验侧, 左后肢作为自身对照侧。实验侧应用直径 3.5mm 载 VEGF 和 BMP-2 的 PDLLA 涂层螺钉固定; 而对照侧以直径 3.5mm 螺钉固定。10% 戊巴比妥钠 25mg/kg 静脉注射麻醉, 开通静脉补液通道。新西兰大白兔俯卧位, 常规备皮, 消毒铺巾。取双侧髋关节外侧弧形切口, 长约 5cm, 依次切开皮肤、皮下、深筋膜, 内旋下肢切断外旋肌群, 保护坐骨神经, 十字切关节囊, 显露股骨颈, 微型摆锯于股骨颈基底部横行截断股骨颈, 直视下复位, 经股骨矩向股骨头钻孔、测深并置入直径 3.5mm 载 VEGF 和 BMP-2 的 PDLLA 涂层螺钉 1 枚固定。重新消毒铺巾, 相同技术制作左侧股骨颈骨折, 经股骨矩向股骨头钻孔、测深并置入 3.5mm 普通螺钉 1 枚固定作为对照组。术后允许自由活动, 自由饮食。术后

3 日内每日予青霉素 80 万单位肌内注射。术后两周拆线。

7. 检测方法: (1) 髋关节 X 线检测: 术后 12 周, 取俯卧位摄髋关节 X 线片, 所有摄片均采用同批底片, 曝光条件相同(电压 55kV、电流 55mA, 曝光时间 0.3s, 焦距 90cm), 观察股骨颈骨折愈合过程及股骨头密度变化。(2) micro-CT 检测: 术后 12 周, 麻醉状态下处死新西兰大白兔将双侧股骨近端完整取出, 去除固定螺钉, 各组标本行体外高分辨率 micro-CT 扫描。球管电压 80kV, 电流 80mA, 曝光时间 3000ms, 分辨率 14 μm , 旋转角度 360 $^\circ$, 旋转角度增量 0.5 $^\circ$ 。使用美国 GE 公司配套软件对标本进行三维重建, 在股骨颈和股骨头内以直径 3mm, 高 6mm 圆柱形区域作为感兴趣(ROI)。分析骨密度(BMD)、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁间距(Tb. Sp)、骨小梁数量(Tb. N)和骨体积分数(BV/TV)。

8. 组织学分析: 甲醛固定标本, 流水冲洗过夜, 10% EDTA 溶液脱钙 2 周。标本流水冲洗过夜, 乙醇梯度脱水、透明、浸蜡、包埋、切片, 切片厚约 5 μm , 常规 HE 染色, 光镜下观察术后 12 周骨折的愈合、股骨头缺血反应及修复。用计算机辅助图像分析系统以 5 个随机 200 倍视野血管的均数表示该组织的微血管密度, 检测股骨头内微血管变化。

结 果

1. PDLLA 涂层的体外释放检测: 取 20 $\mu\text{g/ml}$ 含 VEGF 和 BMP-2 的 PDLLA 溶液 5ml, 将直径 3.5mm 皮质骨螺钉充分浸泡, 并在无菌层流条件下风干螺钉, 此过程重复两次。VEGF 和 BMP-2 在最初的 8h 内药物是爆发性的释放, 随后是比较持续和稳定的释放, 并且释放可以持续 12 周。术后 1h、4h、8h、12h、1 天、14 天、28 天、56 天和 84 天 PDLLA 涂层螺钉中 VEGF 缓释量分别为 1.16 ± 0.10 、 2.28 ± 0.44 、 15.99 ± 1.41 、 19.09 ± 0.98 、 19.51 ± 0.80 、 19.87 ± 0.75 、 21.20 ± 0.63 、 34.84 ± 1.22 、 $47.62 \pm 1.46\text{mg/L}$ 。术后 1h、4h、8h、12h、1 天、14 天、28 天、56 天、84 天 PDLLA 涂层螺钉中 BMP-2 缓释量分别为 1.21 ± 0.36 、 2.50 ± 0.41 、 17.51 ± 0.70 、 19.28 ± 0.59 、 19.46 ± 0.62 、 20.43 ± 0.55 、 21.37 ± 0.33 、 32.04 ± 0.89 、 $40.72 \pm 2.01\text{mg/L}$ 。

2. 载 VEGF 和 BMP-2 的 PDLLA 涂层螺钉的生物相容性: (1) 体内全身急性毒性检测、热原反应和溶血实验: 在 72h 观察期内, 对照组和实验组小鼠一般情况良好, 活动、食欲正常, 呼吸平稳, 无惊厥、腹

泻、瘫痪和动物死亡等毒性反应。实验组(0.40 ± 0.22)和对照组(0.40 ± 0.26)体温升高,两组比较差异无统计学意义,且体温升高值 $<1.4^{\circ}\text{C}$,该样品符合热原检查的规定。浸提液溶血率 0.96% ,低于 GB/T 16886 和 ISO 10993 规定的 5% ,符合溶血实验的规定。(2)体外细胞毒性实验:实验组(0.31 ± 0.02 、 0.52 ± 0.07 、 0.77 ± 0.05)和阴性对照组(0.30 ± 0.02 、 0.53 ± 0.07 、 0.79 ± 0.10)在 24、48 和 72h 的 A 值均明显高于阳性对照组(0.19 ± 0.02 、 0.21 ± 0.03 、 0.28 ± 0.06 , $P < 0.01$),实验组与阴性对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验组在 24、48 和 72h 的 RGR(1.01 、 0.99 和 0.97)均显著高于阳性对照组(0.62 、 0.40 和 0.36)。

3. 新西兰大白兔股骨颈骨折动物模型的建立和分组:制作 12 只新西兰大白兔股骨颈骨折模型,右侧作为实验侧置入 3.5mm 载 VEGF 和 BMP-2 的 PDLLA 涂层螺钉 1 枚固定,左侧置入 3.5mm 螺钉作为自身对照侧。术后 12 周内所有实验兔活动逐渐恢复正常。切口愈合良好,均于术后 2 周拆除切口缝线,无明显炎性反应、切口裂开及关节脱位发生。

4. 髋关节 X 线检查:术后 12 周显示双侧股骨颈骨折解剖复位,内固定坚强,采用涂层螺钉固定的右侧股骨颈骨折已愈合,采用普通螺钉固定的左侧股骨颈骨折处尚未完全愈合(图 1)。



图 1 术后 12 周髋关节 X 线检查

置入复合 VEGF 和 BMP-2 涂层螺钉的右侧股骨颈骨折愈合,置入普通螺钉固定的左侧股骨颈骨折尚未完全愈合(白色箭头)

5. micro-CT:实验侧股骨近端 BMD($323.42 \pm 43.31\text{mg}/\text{mm}^3$)、BV/TV(0.32 ± 0.072)、Tb. Th($0.16 \pm 0.074\text{mm}$)和 Tb. N($2.15 \pm 0.43/\text{mm}$)均较对照侧明显增加($P < 0.01$),Tb. Sp($0.30 \pm 0.12\text{mm}$)较对照侧($0.78 \pm 0.31\text{mm}$)降低($P < 0.01$),详见表 1。

表 1 股骨近端 micro-CT 检测 ($\bar{x} \pm s$)

侧别	BMD(mg/mm^3)	BV/TV	Tb. Th(mm)	Tb. N(1/mm)	Tb. Sp(mm)
对照侧	272.79 ± 55.24	0.29 ± 0.072	0.13 ± 0.062	1.67 ± 0.33	0.78 ± 0.31
实验侧	$323.42 \pm 43.31^*$	$0.32 \pm 0.072^*$	$0.16 \pm 0.074^*$	$2.15 \pm 0.43^*$	$0.30 \pm 0.12^*$

与对照侧比较, * $P < 0.01$

6. 组织学分析:术后 12 周,涂层螺钉和骨接触界面多由血管化的新生骨组织构成,而非涂层侧钛合金和骨组织间为纤维组织层。实验侧钉道周边微血管较对照侧增多稠密。实验侧股骨近端每 $\times 400$ 视野微血管数目(39.17 ± 14.27)均较对照侧(19.50 ± 6.97)明显增加($P < 0.01$)。双侧均未检出股骨头坏死的组织学改变。

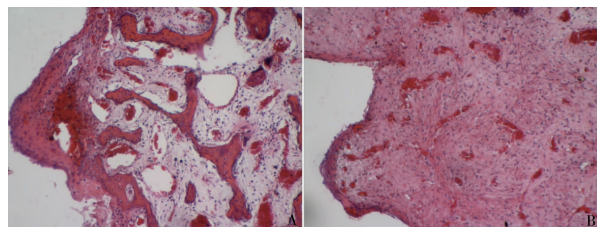


图 2 HE 染色观察股骨颈骨折愈合($\times 400$)

A. 实验侧钉道周边骨小梁增粗增多,微血管密度增加;

B. 对照侧钉道周围纤维组织增生,骨化和微血管密度明显下降

讨 论

股骨头颈部的滋养动脉主要来自于股骨远端,股骨颈骨折几乎等同于将股骨头颈的血液供应完全切断,易导致股骨颈骨折不愈合和股骨头坏死。本研究应用载 VEGF 和 BMP-2 的 PDLLA 涂层螺钉固定新西兰大白兔股骨颈骨折,促进骨折端微血管形成,股骨颈和股骨头内骨小梁增粗致密,加速股骨颈骨折愈合。而及早恢复股骨头的血供,减少股骨头缺血的时间,是降低股骨头坏死发生率的关键^[8-10]。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种特异性促血管内皮细胞增生及血管生成因子,对血管再生起着关键性调控作用^[8,9]。本研究也证实涂层螺钉释放的外源性 VEGF 显著增加股骨颈和股骨头内微血管数量。VEGF 诱导的血管生成能增加骨折端血流量,促进软组织内成骨及骨修复,加速骨折愈合;拮抗 VEGF 作用骨折端完

全由纤维组织取代,抑制骨折愈合,X 线提示骨折端出现肥大的不连续骨痂或无骨痂^[10]。BMP-2 被认为是活性最强的唯一能单独诱导成骨的因子,促进未分化间充质细胞和成骨细胞前体细胞分化为成骨细胞,促进骨缺损修复和骨折愈合^[8]。联合应用 BMP-2 与 VEGF 既能诱导成骨,又能刺激血管再生,使新生的骨组织快速完成血管化^[8]。本研究通过 PDLLA 将 VEGF 和 BMP-2 附着于内固定螺钉,显著促进股骨颈和股骨头内骨小梁增粗增多,使股骨颈骨折愈合加快,进一步证实了 VEGF 和 BMP-2 在骨折修复中的关键作用。

目前 BMP-2 或 VEGF 应用方式主要为附着于固态人工骨局部置入或液态载体局部注射于骨折端^[11,12]。但目前股骨颈骨折的治疗多采用闭合复位技术,术中不显露骨折端,牵引床复位后经股骨外侧 3~5cm 小切口置入直径 6.5mm 或 7.3mm 半螺纹空心钉,经长约 70~100mm 钉道对股骨颈骨折端进行加压固定。因此,往往难以将 BMP-2 或 VEGF 固态载体经狭长钉道置入骨折断端,临床操作困难。有研究者构建 BMP-2 或 VEGF 可注射性载体并在空心螺钉上靠近骨折端的部位打孔,便于 BMP-2 和 VEGF 有效作用于骨折断端。但此种技术会导致螺钉力学性能下降,甚至疲劳折断^[13,14]。本研究将 BMP-2 和 VEGF 附着于内固定螺钉表面,在钉道全长均匀释放发挥生物学作用,增加微血管数量、骨小梁数量和厚度,促进股骨颈骨折愈合。

自 20 世纪 60 年代以来,以 PDLLA 为代表的可降解性材料在医学界就引起了关注。由于 PDLLA 为非晶态,无迟发性组织反应,生物相容性好,对骨修复干扰小,且降解吸收时间短,广泛应用于生物降解医用材料领域^[15]。本研究中,PDLLA 涂层螺钉的全身急性毒性检测、热原反应、溶血实验和体外细胞毒性实验也证实了其良好的生物相容性。由于 PDLLA 呈多孔态结构,有较高的孔隙率且孔隙间相互沟通,是一种具有良好生物相容性的可降解缓释骨架,也是 BMP-2 和 VEGF 的常用控释载体^[16,17]。本研究应用 PDLLA 负载商品化的具有活性的 VEGF 和 BMP-2,获得至少 12 周的 VEGF 和 BMP-2 持续释放。李绍良等^[18]应用 PDLLA 负载庆大霉素附着于钛制克氏针表面进行涂层稳定性实验,证明 PDLLA 涂层具有较强的机械稳定性,在置入髓腔的过程中绝大部分无脱失,并且可以保持 PDLLA 涂层在内固定表面均匀分布。因此,借助 PDLLA 负载 BMP-2 和 VEGF

固着于内固定螺钉表面治疗股骨颈骨折,并显著促进了股骨颈骨折愈合,有力证明了 PDLLA 涂层能够提供足够机械稳定将 VEGF 和 BMP-2 释放至骨折端发挥生物学效应,为微血管和新生骨的再生提供良好环境。

另一方面,空心螺钉采用滑动加压原理,螺杆提供滑动轴,将应力转化为轴向压应力,加压骨折断端,即使骨折修复过程中发生骨吸收块,仍能保持骨折块间紧密接触^[19]。这一特性在有力保护骨折的愈合环境的同时,可能导致股骨颈短缩,有研究发现空心螺钉固定后股骨颈短缩率达 30%~42%,降低临床疗效^[20,21]。本研究发现涂层螺钉和骨接触界面多由血管化的新生骨组织构成,而非涂层侧钛合金和骨组织间为纤维组织层,表明复合 VEGF 和 BMP 涂层有助于增加空心螺钉把持力,同时 BMP-2 和 VEGF 促进骨修复的生物学效应可能有助于避免骨折断端骨吸收所致的股骨颈短缩,改善临床疗效。虽然本研究中双侧均未发现股骨头坏死,但涂层侧股骨近端骨小梁增粗增多致密、骨密度升高、微血管数量增加,具有抑制股骨头坏死的作用。

综上所述,载 VEGF 和 BMP-2 的 PDLLA 涂层生物相容性好,能够牢固附着于钛合金螺钉表面,促进股骨近端微血管增生和新生骨形成,加速股骨颈骨折愈合。该涂层制作简便,生物学效应显著,在股骨颈骨折治疗领域具有广阔的应用前景。

参考文献

- 1 马文辉,张英泽. 股骨颈骨折:问题及对策[J]. 中国组织工程研究,2014,18(9):1426-1433
- 2 危杰,吴晓亮,王满宜. 老年股骨颈骨折的内固定治疗[J]. 中华创伤骨科杂志,2009,11(4):319-321
- 3 张长青,曾炳芳,邵雷,等. 闭合复位加空心钉固定治疗股骨颈骨折回顾性分析[J]. 中华创伤杂志,2003,19(4):238-240
- 4 Li T, Zhuang Q, Weng X, et al. Cemented versus uncemented hemiarthroplasty for femoral neck fractures in elderly patients: a Meta-analysis[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68903
- 5 田野,白伦浩,付勤. 股骨颈骨折空心钉内固定术后骨折不愈合与股骨头缺血坏死相关因素比较[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2009, 24(5): 399-402
- 6 Elmi A, Tabrizi A, Rouhani A, et al. Long-term follow-up results of delayed fixation of femoral neck fractures in adults[J]. Trauma Mon, 2013, 18(1): 8-11
- 7 王维军,李肆生,牛东生,等. 股骨头缺血性坏死骨质含量与 VEGF、bFGF、BMP-2 mRNA 表达的相关性研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2011, 25(8): 984-991
- 8 Cui Q, Dighe AS, Irvine JN Jr. Combined angiogenic and osteogenic factor delivery for bone regenerative engineering[J]. Curr Pharm

- Des, 2013, 19 (19) : 3374 – 3383
- 9 Li S, Yuan H, Pan J, *et al.* The treatment of femoral neck fracture using VEGF – loaded nanographene coated internal fixation screws [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (11) : e0187447
 - 10 张先龙, 戴克戎. 血管内皮生长因子在骨形成与代谢中的作用 [J]. *中华骨科杂志*, 1998, 18 (2) : 113 – 115
 - 11 Wagner ER, Parry J, Dadsetan M, *et al.* VEGF – mediated angiogenesis and vascularization of a fumarate – crosslinked polycaprolactone (PCLF) scaffold [J]. *Connect Tissue Res*, 2018, 7 : 1 – 8
 - 12 Pan Y, Chen J, Yu Y, *et al.* Enhancement of BMP – 2 – mediated angiogenesis and osteogenesis by 2 – N, 6 – O – sulfated chitosan in bone regeneration [J]. *Biomater Sci*, 2018, 6 (2) : 431 – 439
 - 13 Licheng Z, Lihai Z, Meng X, *et al.* Autologous uncultured bone marrow – derived mononuclear cells and modified cannulated screw in repair of femoral neck fracture [J]. *J Orthop Res*, 2013, 31 (8) : 1302 – 1307
 - 14 史定伟, 干耀恺, 梁栋科, 等. 生物型空心松质骨螺钉的力学强度研究 [J]. *医用生物力学*, 2013, 28 (5) : 574 – 579
 - 15 Annunziata M, Natri L, Cecoro G, *et al.* The use of Poly – d, l – lactic acid (PDLLA) devices for bone augmentation techniques: a systematic review [J]. *Molecules*, 2017, 22 (12) : E2214
 - 16 Wildemann B, Lange K, Strobel C, *et al.* Local BMP – 2 application can rescue the delayed osteotomy healing in a rat model [J]. *Injury*, 2011, 42 (8) : 746 – 752
 - 17 Schmidmaier G, Lucke M, Schwabe P, *et al.* Collective review: bioactive implants coated with poly (D, L – lactide) and growth factors IGF – I, TGF – beta1, or BMP – 2 for stimulation of fracture healing [J]. *J Long Term Eff Med Implants*, 2006, 16 (1) : 61 – 69
 - 18 李绍良, 鲁谊, 陈大福, 等. 骨折内固定表面抗生素涂层的体外观察研究 [J]. *中华骨科杂志*, 2008, 46 (7) : 518 – 521
 - 19 Weil YA, Qawasm F, Liebergall M, *et al.* Use of fully threaded cannulated screws decreases femoral neck shortening after fixation of femoral neck fractures [J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2018, 138 (5) : 661 – 667
 - 20 Chen X, Zhang J, Wang X, *et al.* Incidence of and factors influencing femoral neck shortening in elderly patients after fracture fixation with multiple cancellous screws [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23 : 1456 – 1463
 - 21 Zielinski SM, Keijsers NL, Praet SF, *et al.* Femoral neck shortening after internal fixation of a femoral neck fracture [J]. *Orthopedics*, 2013, 36 (7) : e849 – e858

(收稿日期: 2018 – 05 – 05)

(修回日期: 2018 – 05 – 18)

新型肿瘤标志物 TSGF 和 Hsp90 α 与非小细胞肺癌的临床相关性分析

郑 爽 金 毅 王 振

摘 要 目的 探讨非小细胞肺癌 (non – small cell lung cancer, NSCLC) 患者血清和肿瘤组织中肿瘤特异性生长因子 (TSGF) 和热休克蛋白 90 α (heatshock protein 90, Hsp90 α) 的表达水平, 并分析其临床相关性。**方法** 收集经笔者医院病理科确诊的 120 例 NSCLC 患者、50 例肺部良性病变患者和 30 例正常健康体检者的血清标本, 采用用酶联免疫吸附法对患者血清中 Hsp90 α 和 TSGF 水平进行监测。同时, 收集 120 例 NSCLC 患者的肺部病变标本, 采用免疫组化染色法对其 Hsp90 α 和 TSGF 的表达情况进行检测, 分析患者临床特点相关性。**结果** NSCLC 患者的血清 Hsp90 α 和 TSGF 水平显著高于肺部良性病变患者 ($P < 0.01$); 二者均高于正常健康体检者 ($P < 0.05$); TSGF 的水平与 NSCLC 的临床分期和淋巴结 (LN) 转移密切相关 ($P < 0.05$); TSGF 和 Hsp90 α 的水平与患者的术后生存期有关 ($P < 0.05$); TSGF 水平与 Hsp90 α 的水平呈正相关 ($P < 0.05$)。**结论** NSCLC 中 TSGF 和 Hsp90 α 的水平与 NSCLC 的临床症状和预后具有密切的相关性, 二者的联合检测对非小细胞肺癌的诊断、预后具有重要临床意义。

关键词 Hsp90 α TSGF 非小细胞肺癌 (NSCLC) 相关性分析

中图分类号 R734.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.06.026

Clinical Relationship of New Tumor Markers TSGF and Hsp90 α with Non – small Cell Lung Cancer. Zheng Shuang, Jin Yi, Wang Zhen. *Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China*

Abstract Objective To investigate the expression of TSGF and Hsp90 α in non – small cell lung cancer (NSCLC) and their clinical relation – ships. **Methods** ELISA assay was used to detect the level of serum TSGF and Hsp90 α of 120 cases of non – small cell cancer

作者单位: 100029 北京中医药大学 (郑爽、金毅); 100048 北京, 中国人民解放军总医院第一附属医院肿瘤一科 (王振)