

血管内皮生长因子和骨形态发生蛋白 2 在非创伤性股骨头坏死不同区域的表达

周勇¹, 任菲菲¹, 丰凡翔², 徐祖健²

(1. 四川省双流县中医医院, 四川 双流 610200;

2. 泸州医学院附属中医医院, 四川 泸州 646000)

摘要 目的:探讨血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein 2, BMP-2)在非创伤性股骨头坏死不同区域的表达情况。**方法:**将从单侧人工髋关节置换术中取得的 40 个非创伤性坏死股骨头沿冠状面自正中用摆锯剖开,分别在坏死区、交界区和正常区各凿取 1 块约 1 cm × 1 cm × 0.4 cm 的骨块,制成石蜡切片,采用免疫组织化学法测定不同区域 VEGF 和 BMP-2 的表达情况。**结果:**①VEGF 表达结果。3 个区域 VEGF 阳性面积百分比比较,差异有统计学意义[(6.25 ± 2.61)%, (19.30 ± 4.56)%, (11.63 ± 4.12)%; $\chi^2 = 81.100, P = 0.000$];坏死区阳性面积百分比小于交界区和正常区($\chi^2 = 81.040, P = 0.000$; $\chi^2 = 22.200, P = 0.000$),交界区大于正常区($\chi^2 = 18.410, P = 0.000$)。3 个区域 VEGF 表达平均灰度比较,差异有统计学意义(86.30 ± 6.84, 31.85 ± 4.89, 73.93 ± 5.78; $F = 939.984, P = 0.000$);坏死区平均灰度大于交界区和正常区($P = 0.000$; $P = 0.000$),交界区小于正常区($P = 0.000$)。②BMP-2 的表达结果。3 个区域的 BMP-2 阳性面积百分比比较,差异有统计学意义[(5.20 ± 2.46)%, (17.43 ± 4.77)%, (10.03 ± 4.32)%; $\chi^2 = 76.450, P = 0.000$];坏死区阳性面积百分比小于交界区和正常区($\chi^2 = 76.320, P = 0.000$; $\chi^2 = 21.950, P = 0.000$),交界区大于正常区($\chi^2 = 27.400, P = 0.000$)。3 个区域 BMP-2 表达平均灰度比较,差异有统计学意义(88.65 ± 6.61, 41.25 ± 5.00, 76.80 ± 5.33; $F = 751.985, P = 0.000$);坏死区 BMP-2 表达平均灰度大于交界区和正常区($P = 0.000$; $P = 0.000$),交界区小于正常区($P = 0.000$)。**结论:**VEGF 和 BMP-2 在非创伤性股骨头坏死交界区表达强度高于坏死区和正常区,交界区可能是影响股骨头坏死预后的关键区域。

关键词 股骨头坏死;血管内皮生长因子类;骨形态发生蛋白质 2;免疫组织化学

Expressions of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein 2 in different zones of femoral head with non-traumatic osteonecrosis

ZHOU Yong¹, REN Feifei¹, FENG Fanxiang², XU Zujian²

1. Shuangliu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shuangliu 610200, Sichuan, China

2. The affiliated hospital of traditional Chinese medicine of Luzhou medical college, Luzhou 646000, Sichuan, China

ABSTRACT Objective: To explore the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in different zones of femoral head with non-traumatic osteonecrosis. **Methods:** Forty non-traumatic necrotic femoral head achieved via unilateral artificial hip replacement were split along the median coronal plane by using swing saw, and a 1.0 × 1.0 × 0.4 cm specimen was fetched from the necrotic zone, junctional zone and normal zone respectively and was made into paraffin sections. Then the expressions of VEGF and BMP-2 were detected by using immunohistochemical method. **Results:** There was statistical difference in the positive area percentage of VEGF between the 3 zones (6.25 ± 2.61, 19.30 ± 4.56, 11.63 ± 4.12%; $\chi^2 = 81.100, P = 0.000$), and the necrotic zone was inferior to the junctional zone and normal zone ($\chi^2 = 81.040, P = 0.000$; $\chi^2 = 22.200, P = 0.000$) while the junctional zone surpassed the normal zone ($\chi^2 = 18.410, P = 0.000$). There was statistical difference in the average gray value of VEGF expression between the 3 zones (86.30 ± 6.84, 31.85 ± 4.89, 73.93 ± 5.78; $F = 939.984, P = 0.000$), and the necrotic zone surpassed the junctional zone and normal zone ($P = 0.000$; $P = 0.000$) while the junctional zone was inferior to the normal zone ($P = 0.000$). There was statistical difference in the positive area percentage of BMP-2 between the 3 zones (5.20 ± 2.46, 17.43 ± 4.77, 10.03 ± 4.32%; $\chi^2 = 76.450, P = 0.000$), and the necrotic zone was inferior to the junctional zone and normal zone ($\chi^2 = 76.320, P = 0.000$; $\chi^2 = 21.950, P =$

基金项目:四川省卫生厅科研项目(100238)

通讯作者:徐祖健 E-mail: xuzujian@21cn.com

0.000) while the junctional zone surpassed the normal zone ($\chi^2 = 27.400, P = 0.000$). There was statistical difference in the average gray value of BMP-2 expression between the 3 zones ($88.65 \pm 6.61, 41.25 \pm 5.00, 76.80 \pm 5.33; F = 751.985, P = 0.000$), and the necrotic zone surpassed the junctional zone and normal zone ($P = 0.000; P = 0.000$) while the junctional zone was inferior to the normal zone. **Conclusion:** The expression intensity of VEGF and BMP-2 of the junctional zone of non-traumatic femoral head necrosis is higher than that of necrotic zone and normal zone, therefore the junctional zone may be the key zone which will influence the prognosis of femoral head necrosis.

Key words femur head necrosis; vascular endothelial growth factors; bone morphogenetic protein 2; immunohistochemistry

股骨头坏死是骨科领域比较常见,且难以治愈的疾病^[1],目前对其病因和发病机制尚未达成共识,已有的有关其病因、病机的学说包括脂肪代谢紊乱、血管内凝血、骨髓内压力升高、骨质疏松及二次撞击等^[2-3]。本研究将人工关节置换手术中取出的股骨头定位,分别取其坏死区、交界区和正常区的骨组织,采用免疫组织化学法测定不同区域血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein 2, BMP-2)的表达情况,现报告如下。

1 材料与仪器

1.1 材料 成人股骨头 40 个,来源于 2011 年 12 月至 2013 年 12 月在泸州医学院附属中医医院因非创伤性股骨头坏死接受单侧人工髋关节置换术的 40 例患者。男 31 例,女 9 例;年龄 24~74 岁,中位数 49.5 岁;病程 14 d 至 2 年,中位数 6 个月;酒精性坏死 29 例,激素性坏死 3 例,特发性坏死 8 例;ARCO III 期 29 例,IV 期 11 例。试验方案经过医院医学伦理委员会审核通过。

1.2 试剂 兔抗人 VEGF 抗体、兔抗人 BMP-2 抗体、链霉亲和素-生物素复合物(strept avidin-biotin complex, SABC)免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程公司),浓盐酸、40% 甲醛、 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.2~7.6)、30% H_2O_2 (泸州医学院附属中医医院病理科提供)。

1.3 仪器 Histocentre 3 石蜡包埋机(Shandon 公司),PHY-III 病理组织冷冻台(常州中威电子仪器厂),常规切片染色机(Gomini 公司),Eclipse 高倍光学显微镜(Nikon 公司)。

2 方法

2.1 股骨头标本的制作 用摆锯将股骨头沿冠状面自正中剖开,在坏死区(主要为负重区的软骨下骨质及部分关节软骨)、交界区(即股骨头标本所见的硬化带周边)和正常区(股骨头远端正常骨质)各凿取 1

块约 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 0.4 \text{ cm}$ 的骨块并做好标记和分组。将所取骨块置于 30% 盐酸福尔马林液(浓盐酸 30 mL、40% 甲醛 5 mL,加蒸馏水至 100 mL)中脱钙 5~10 d。待骨组织脱钙完全后(以针刺无阻力为准),流水冲洗 4 h 以上,常规石蜡包埋、切片,切片厚度为 5~6 μm 。

2.2 VEGF 和 BMP-2 表达的免疫组化检测 按照石蜡切片免疫组织化学 SABC 法操作规程进行,以棕褐色反应产物代表抗原的定位,运用 IMAGE-EX 自动图像分析系统对切片进行观察,以 Image-Pro Plus 5.1 图像分析软件及 Smartscape 2002 生物显微图像分析软件测定整个视野的平均灰度值和阳性染色面积百分比,取它们的算术平均数作为每张切片的平均灰度值和阳性面积百分比。

2.3 数据统计分析 采用 SPSS17.0 软件进行数据统计分析,3 个区域 VEGF 面积百分比和 BMP-2 阳性面积百分比的组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,组间两两比较采用 Nemenyi 检验;3 个区域 VEGF 表达平均灰度和 BMP-2 表达平均灰度的组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 VEGF 的表达结果 3 个区域的切片均可见到阳性细胞,为棕褐色颗粒。坏死区较少见,在破骨细胞、软骨细胞中有少量表达;交界区表达最强,在血管内皮细胞、间质细胞、成纤维样细胞、成骨细胞及少量骨细胞中均有表达;正常区在骨髓及间质的小血管中有表达(图 1)。3 个区域 VEGF 阳性面积百分比比较,差异有统计学意义;坏死区阳性面积百分比小于交界区和正常区($\chi^2 = 81.040, P = 0.000; \chi^2 = 22.200, P = 0.000$),交界区大于正常区($\chi^2 = 18.410, P = 0.000$)。3 个区域 VEGF 表达平均灰度比较,差异有统计学意义;坏死区平均灰度大于交界区和正常区($P = 0.000; P = 0.000$),交界区小于正常区($P =$

0.000)。见表 1。

3.2 BMP-2 的表达结果 BMP-2 阳性表达细胞多分布在骨小梁周边,为棕褐色颗粒,分布在胞浆内,呈梭形或椭圆形。在坏死区的软骨细胞和血管内皮细胞中有一定表达;交界区表达较强烈,主要见于成骨细胞、纤维细胞和骨细胞;正常区的骨髓细胞亦有阳性表达(图 2)。3 个区域的 BMP-2 阳性面积百分

比比,差异有统计学意义;坏死区阳性面积百分比小于交界区和正常区($\chi^2 = 76.320, P = 0.000; \chi^2 = 21.950, P = 0.000$),交界区大于正常区($\chi^2 = 27.400, P = 0.000$)。3 个区域 BMP-2 表达平均灰度比较,差异有统计学意义;坏死区 BMP-2 表达平均灰度大于交界区和正常区($P = 0.000; P = 0.000$),交界区小于正常区($P = 0.000$)。见表 1。

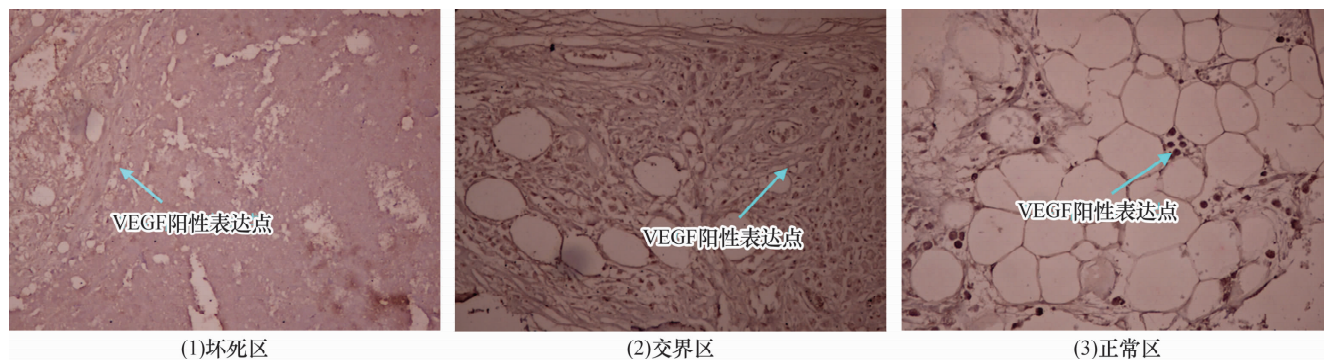


图 1 非创伤性股骨头坏死不同区域 VEGF 表达情况 (免疫组化染色 $\times 100$)

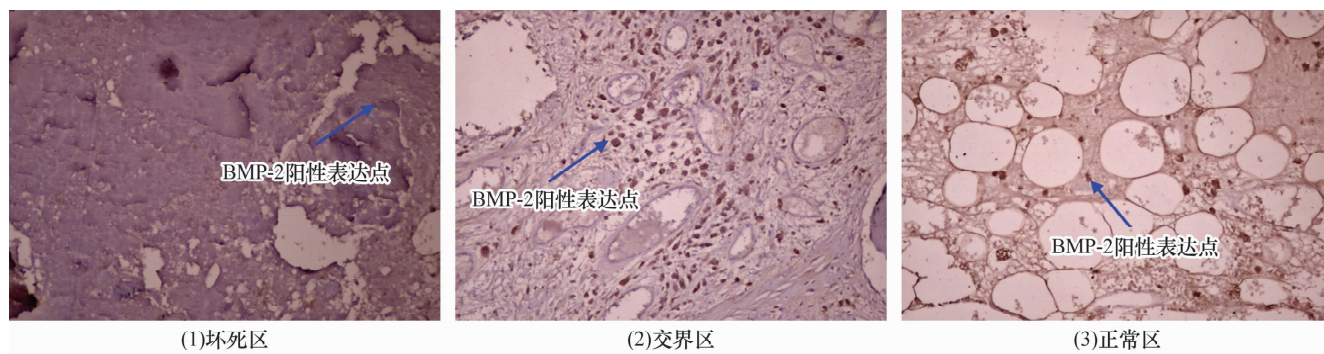


图 2 非创伤性股骨头坏死不同区域 BMP-2 表达情况 (免疫组化染色 $\times 100$)

表 1 非创伤性股骨头坏死不同区域 VEGF 和 BMP-2 表达情况 $\bar{x} \pm s$

区域	样本量(个)	VEGF 表达情况		BMP-2 表达情况	
		阳性面积百分比	平均灰度	阳性面积百分比	平均灰度
坏死区	40	(6.25 \pm 2.61) %	86.30 \pm 6.84	(5.20 \pm 2.46) %	88.65 \pm 6.61
交界区	40	(19.30 \pm 4.56) %	31.85 \pm 4.89	(17.43 \pm 4.77) %	41.25 \pm 5.00
正常区	40	(11.63 \pm 4.12) %	73.93 \pm 5.78	(10.03 \pm 4.32) %	76.80 \pm 5.33
检验统计量		$\chi^2 = 81.100$	$F = 939.984$	$\chi^2 = 76.450$	$F = 751.985$
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

4 讨论

VEGF 是机体内促进血管生长最重要的生长因子,能特异性作用于血管内皮细胞,促进内皮细胞分裂、增生,诱导血管形成、增加血管通透性,尤其在软骨内成骨及骨折愈合过程中,能显著促进新生血管形成^[4-5]。Wang 等^[6]的研究表明,VEGF 可通过促进血管内皮细胞分泌胰岛素样生长因子-1 和内皮素-1 刺激成骨细胞生成。Hiltunen 等^[7]研究发现,VEGF 可显著增加成骨细胞数量,从而促进骨组织及骨样组织

形成。Miday 等^[8]报道,VEGF 能增加成骨细胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的活性,并且具有促进成骨细胞分化和迁移的作用。股骨头坏死的发病本质在于血供中断或受损,导致骨细胞凋亡^[9]。我们的研究表明,VEGF 在非创伤性股骨头坏死交界区表达面积和强度最高,可能为骨细胞生成提供良好的微环境,还可能通过分泌细胞因子促进新生骨形成,抑制骨细胞凋亡,对坏死骨组织的修复发挥重要作用。

BMP 是目前唯一能够单独诱导间充质细胞向成

骨细胞分化,从而促进骨组织生长的细胞生长因子,也是骨组织形成过程中最关键的调节因子。其中 BMP-2 在动物实验中已经被证实可以诱导异位骨形成,主要是通过诱导间充质细胞分化为成骨细胞和成软骨细胞发挥成骨作用,具有促进坏死骨组织和关节软骨修复的作用^[10]。BMP-2 能够快速诱导骨细胞转化,实验发现经 BMP-2 作用 8~10 d 后,可明显促进骨髓基质细胞形态转变,同时增强 ALP 活性^[11]。我们的研究发现,BMP-2 在交界区同样有高强度表达的特点,说明其可能与 VEGF 有着类似的作用,可诱导骨形成,在坏死股骨头的交界区为新骨生长提供适合的微环境,并且二者还可能通过协同作用共同促进坏死骨组织的修复与重建。

本研究的结果提示,VEGF 和 BMP-2 在非创伤性股骨头坏死交界区表达强度高于坏死区和正常区,交界区可能是影响股骨头坏死预后的关键区域。由于本试验所得结论是基于病理检查,且选择的标本均为中晚期坏死股骨头,临床上能否使用无创性检查,比如 MRI,以 VEGF、BMP-2 为中介通过 MRI 信号的改变来推测股骨头坏死的病理改变可能是未来研究的方向。

5 参考文献

- [1] 中华医学会骨科分会显微修复学组,中国修复重建外科专业委员会骨缺损及骨坏死学组. 成人股骨头坏死诊疗标准专家共识(2012 年版)[J]. 中华骨科杂志,2012,32(6):606-610.
- [2] Mont MA, Etienne G, Ragland PS. Outcome of nonvascularized bone grafting for osteonecrosis of the femoral head[J]. Clin Orthop Relat Res, 2003, (417):84-92.
- [3] Fuchs B, Knothe U, Hertel R, et al. Femoral osteotomy and iliac graft vascularization for femoral head osteonecrosis[J]. Clin Orthop Relat Res, 2003, (412):84-93.
- [4] Bragdon B, Thinakaran S, Moseychuk O, et al. Casein kinase 2 beta - subunit is a regulator of bone morphogenetic protein 2 signaling[J]. Biophys J, 2010, 99(3):897-904.
- [5] Karbanová J, Soukup T, Suchánek J, et al. Osteogenic differentiation of human dental pulp-derived stem cells under various ex-vivo culture conditions[J]. Acta Medica (Hradec Kralove), 2010, 53(2):79-84.
- [6] Wang DS, Miura M, Demura H, et al. Anabolic effects of 1, 25 - dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells[J]. Endocrinology, 1997, 138(7):2953-2962.
- [7] Hiltunen MO, Ruuskanen M, Huuskonen J, et al. Adenovirus-mediated VEGF - A gene transfer induces bone formation in vivo[J]. FASEB J, 2003, 17(9):1147-1149.
- [8] Midy V, Plouët J. Vasculotropin/vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 199(1):380-386.
- [9] Battaglia Parodi M, Iacono P, Verbraak FD, et al. Antivascular endothelial growth factors for inflammatory chorioretinal disorders[J]. Dev Ophthalmol, 2010, 46:84-95.
- [10] 许心弦, 温宏, 吕杨训, 等. 信号传导及转录激活因子 1 诱导骨细胞凋亡在激素性股骨头坏死过程中的作用[J]. 中医正骨, 2014, 26(2):3-7.
- [11] 蔡林鸿. BMP-2 在股骨头坏死中的研究进展[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2010, 25(10):958-960.

(2015-05-08 收稿 2015-07-17 修回)

· 简 讯 ·

《中医正骨》2016 年征订启事

《中医正骨》杂志[CN 41-1162/R, ISSN 1001-6015]是由国家中医药管理局主管、河南省正骨研究院与中华中医药学会联合主办的中医骨伤科学学术性期刊,也是《中国学术期刊影响因子年报》统计源期刊、全国中医药优秀期刊、波兰《哥白尼索引》收录期刊,由我国中医药界首位“白求恩奖章”获得者、首批国家级非物质文化遗产项目——中医正骨疗法的代表性传承人之一、洛阳平乐郭氏正骨第六代传人郭维淮主任医师担任主编,创刊于 1989 年。

《中医正骨》具有中医特色突出、临床实用性强、办刊定位准确、发行量大、图文并茂等特点,办刊宗旨是:突出中医骨伤特色,反映学术进展,交流新经验,报道新成果,传递新信息,为促进中医骨伤科现代化服务。

该刊为月刊,大 16 开本,84 页,国内外公开发行人,每月 20 日出版,铜版纸彩色印刷,每期定价 RMB 15.00 元,全年定价 RMB 180.00 元。国内读者请继续到当地邮局订阅,邮发代号:36-129;国外读者请与中国国际图书贸易集团有限公司联系(邮政编码:100048,北京 399 信箱,国外代号:M 4182)。创办近 30 年的《中医正骨》杂志将继续坚持办刊宗旨,为广大读者、作者提供更加充足、快捷的科技信息。

编辑部地址:河南省洛阳市启明南路 82 号 邮政编码:471002
http://www.zygzgz.cn http://www.zygzgz.com

联系电话:0379-63551943 或 63546705
E-mail:zyzg1989@126.com

欢 迎 订 阅

欢 迎 投 稿