血管重建相关细胞因子与骨折修复关系的研究进展

张元斌[1],罗程[1],童培建[2]

(1. 浙江中医药大学,浙江　杭州　310053;2. 浙江省中医院,浙江　杭州　310006)

摘　要　骨折的修复是一个极其复杂的过程,断端血管重建是骨折修复的关键环节,也对避免发生骨不连、骨延迟愈合等并发症至关重要。新生血管可为修复区域提供相关营养物质并运输代谢废物,为新骨再生、代谢提供积极的微环境。骨折发生后短期内局部组织会释放多种与血管重建相关的细胞因子,直至修复后期仍有多种细胞因子产生,这些细胞因子协调互补,共同促进血管的形成。本文从血管重建的过程、影响骨修复的血管重建相关细胞因子、血管重建组织工程在骨修复中的应用 3 个方面进行了综述。

关键词　骨折;血管;骨修复;血管重建;细胞因子类;综述

骨折的修复主要是指恢复骨的连续性和完整性,主要通过膜内成骨和软骨内成骨两种方式完成[1]。骨折的修复是一个非常复杂的过程,合并大量血管损伤的骨折患者比一般骨折患者发生骨延迟愈合或骨不连的概率高 36%[2],所以促进损伤区域新生血管形成是骨折修复的关键。新生血管可为修复区域提供相关营养物质、运输废物,为新骨再生、代谢提供积极的微环境。骨折发生后短期内局部组织会释放多种血管重建相关性细胞因子,直至修复后期,仍有多种细胞因子产生,这些细胞因子协调互补,共同促进新血管的形成[3]。现就血管重建相关细胞因子与骨折修复关系的研究进展进行综述。

1　血管重建的过程

血管重建是一系列复杂的工程,包括激活期、进展期和成熟期 3 个基本过程。在激活期,大量血管新生因子会产生,通过这些因子激活血管内皮细胞(endothelial cell,EC),使血管内皮舒张,血管的通透性增加,血浆蛋白渗出,为血管新生提供营养。在进展期,血管部位细胞外基质改变、基膜降解,EC 芽生、增殖和迁移,形成血管芽;血管芽增值后,产生细胞条索样结构,随后形成管状毛细血管襻及管腔;与此同时细胞条索分化,形成中空的管腔,多个管腔结构融合成网状管腔[4]。最后进入成熟期,新生血管管腔贯通,初级管状结构通过内皮血管部位细胞外基质沉积、基膜形成,EC 聚集周围的间质细胞,形成紧密的血管结构[4-5]。

通讯作者:童培建　E-mail:tongpeijian@163.com

2　影响骨修复的血管重建相关细胞因子

2.1　低氧诱导因子　骨折发生后,断端骨膜和血管损伤,局部血供减少甚至中断,导致骨折部位呈低氧状态;而处于低氧环境中的骨组织能通过启动低氧/低氧诱导因子(hypoxia - inducible factor - 1α,HIF - 1α)通路,上调 HIF - 1α 水平,从而激活 HIF/血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)信号通路,参与骨折断端的血管重建,加快骨折愈合的进程[6]。在含氧量正常时,细胞质内的 HIF - 1α 受氧敏感的脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylases,PHDs)修饰、降解、固定,基本维持低水平[7]。当缺氧条件下,对氧敏感的 PHDs 的活性降低,使得 HIF - 1α 水平明显上升,HIF - 1α 从胞质转移到细胞核,并与核内持续表达的结构亚基 HIF - 1β 结合,形成异二聚体 HIF - 1。而 VEGF 基因转录起始点上游大约 1 kb 的 5′侧翼区域有 286bp 的低氧反应元件(hypoxia response element,HRE),HRE 区域内存在 HBS 5′ATCGTGGG3′和 HIF - 1 结合的辅助序列 5′CACAG3′[8]。稳定表达的 HIF - 1α 与 VEGF5′端增强子结合,增加了 VEGF 的转录,上调 VEGF 表达,并激活其受体,启动 VEGF 信号通路,使之调控成血管性细胞增殖、迁移、存活、凋亡和通透性,促进骨折断端血管重建,加快骨折愈合。

2.2　VEGF　VEGF 是一个以二硫键或非共价键联接的同源二聚体的糖蛋白,是一种特异性的促进血管 EC 生长及血管形成的生长因子,是机体内最主要的血管生成因子[9]。VEGF 通过与血管 EC 特异性受体结合,经一系列分子生物学效应使血管 EC 增殖分

化、迁移、活性和血管通透性增加,促进骨折断端新血管的生成,最终促进骨折愈合。VEGF 能通过调节成血管性细胞的增殖,为血管内皮的生成提供基础。骨折发生后,水平上调的 VEGF 可以通过细胞膜上血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2,VEGFR - 2)将细胞外信号传递到胞内,激活下游信号通路,把信号传递到细胞核内启动 DNA 合成,促进 EC 的增殖[10]。而 EC 的迁移也是血管新生的重要环节。VEGF 通过蛋白酶水解的基底膜促进 EC 的迁移,并顺着 VEGF 和其他生长因子的浓度梯度迁移至骨折断端,从而促进血管重建[11]。VEGF 特异性与 VEGFR - 2 结合,激活 VEGF 信号通路下游,间接地影响细胞凋亡,调控相关蛋白的活性和 EC 的存活。整合蛋白 αvβ3 对新生血管存活具有重要的作用,VEGFR - 2 和整合蛋白 αvβ3 结合可以增加 VEGFR - 2 的活性[12]。VEGF 可以通过活化内皮型一氧化氮合酶生成一氧化氮,从而增加血管通透性的变化。血管通透性的增加能使血浆蛋白在细胞基质中沉积,为血管 EC 的长入提供临时基质,同时也有利于促进细胞的迁移[13]。

2.3 成纤维细胞生长因子 成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)是由垂体和下丘脑分泌的一种多肽,EC 和成纤维细胞是其主要靶细胞[14]。FGF 参与骨折愈合过程中血管重建活动,调控 VEGF、VEGFR 和 FGF 受体的表达,间接通过 VEGF/VEGFR 通路参与血管重建;同时还能影响 EC 的增殖、迁移和黏附因子的表达[15]。另外,FGF 配体也参与骨修复过程。FGF - 9 在骨折愈合血管重建中具有不可替代的作用[15-16]。FGF 参与血管重建活动的机制可能与核转录因子 kappa B(nuclear transcription factor kappa B,NF - κB)有关[17]。通过鼠抗人 Ki - 67(一种细胞"生长分数"标志物)单克隆抗体检测 FGF 对细胞周期的影响,发现 FGF 可促进人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVEC)核内 Ki - 67 的表达,刺激 HUVEC 由静止期进入增殖期,加速细胞周期;FGF 也能刺激 EC 增生[18]。此外,FGF 可直接作用于组织修复细胞增殖周期,缩短细胞周期转换时间,加速细胞的分裂与增殖[18]。静息状态下,经典的 NF - κB(p50/p65)与核因子 κB 抑制蛋白(inhibitor kappa B,Iκ - B)相结合,以无活性二聚体的形式留在胞质内。细胞受刺激后,Iκ - B 迅速被磷酸化,经过修饰后被蛋白酶降解。游离的 NF - κB则进入细胞核内,结合于特定基因的 κB 序列,启动基因转录[17]。此外,杜培娟[19]研究认为,FGF 也可通过膜受体酪氨酸蛋白激酶信号传递途径调控细胞增殖,通过磷脂酰肌醇 3 - 激酶信号通路调控细胞存活。

2.4 胎盘生长因子 胎盘生长因子(placental growth factor,PIGF)是一种属于 VEGF 家族的血管新生蛋白。在骨折发生后的缺血缺氧环境中,PIGF 对于骨折的愈合是不可或缺[20]。PIGF 能直接或间接地促进血管新生相关细胞的增殖、迁移及存活,促进血管新生与成熟[21]。PIGF 能增加 VEGF 的活性,通过覆盖平滑肌细胞刺激新的动脉形成和血管成形[22]。同时与 VEGF 相比,PIGF 刺激产生的新血管无异常的生理改变,使新生血管不会产生水肿和低血压等不良反应;但 PIGF 的过度表达却可导致表皮血管在分支、数量、大小和通透性上持续增加[20]。而 PIGF 参与骨折修复中的血管重建活动主要是通过 VEGF/VEGFR 通路。此外,PIGF 还可上调血管重建相关细胞因子,如 FGF - 2、血小板衍生生长因子 b、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs)等协同血管重建活动[23]。

2.5 促血管生成素 促血管生成素(angiopoietin,ANG)是 VEGF 之外又一个新血管生成的重要调控因子。ANG - 1 可使 VEGF 诱导的未成熟血管成熟并维持血管结构,促进 EC 的稳定,抑制凋亡[24]。此外,ANG - 1 能促进 EC 迁移、管状结构的形成,诱导纤溶酶释放、降解细胞外基质,促进新血管的生成[25]。ANG - 1 还具有吸引血管周细胞和内皮平滑肌细胞的作用,增强血管 EC 间连接,从而维持血管壁完整,促进血管重塑、稳定血管、防止渗漏的作用。此外,ANG - 1 对血管 EC 有趋化作用,可诱导 EC 出芽[24]。适当地提高 ANG - 1 的浓度,可以增强其促增殖作用[25]。ANG - 2 在 VEGF 的协同下具有增加毛细血管管径、重建基膜以及促 EC 增生和迁移的作用,从而刺激新生血管出芽[26]。卢秀珍等[27]研究结果显示,当 VEGF 与 ANG - 1 联合应用时,可大大提高大鼠血管 EC 迁移与增殖能力;透射电镜可见细胞间连接增强,细胞分泌与代谢功能均旺盛;这表明 VEGF 与 ANG - 1 联合应用,可发挥促血管生成的作用。

2.6 其他细胞因子 血管的生成是一个非常复杂的

过程,HIF－1α、VEGF、FGF、ANG－1、ANG－2 均参与其中,协调互补,共同促成新血管的生成,加快骨折愈合。此外,有研究通过体外培养鼠成骨细胞发现,骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein,BMP)可诱导成骨细胞表达 VEGF－A,使骨形成过程中的新生血管数量加倍,加快骨折的愈合[28]。转化生长因子β(transtorming growth factor－β,TGF－β)和血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor,PDGF)等可通过增强 VEGF 的表达,间接地促进血管生成。MMPs 通过降解基底膜糖蛋白及细胞外基质成分,启动 EC 的激活与迁移。MMP9 基因敲除小鼠在骨折修复过程中丧失了招募细胞的能力,血管重建进程缓慢,骨折延迟愈合;而骨折延迟愈合并不是因为 VEGF 及其受体表达水平下降造成的,而是因为 MMP9 能通过提高 VEGF 的生物利用度进行代偿[29]。此外,肿瘤坏死因子－a(tumor necrosis factor,TNF－a)也参与骨折修复早期的血管重建,主要通过刺激其他的血管重建细胞因子如 PEDF、ANG－2 等的表达[30]。此外,整合素家族也可以结合不同配基,介导血管 EC 的迁移和集聚,促进新生血管的成熟和稳定。

3　血管重建组织工程在骨修复中的应用

目前,临床应用较为成熟的血管重建相关组织工程技术主要是围绕 VEGF 而展开的,将 VEGF 和 BMP 或 PDGF 联合复合到支架材料上,辅助人工骨的骨化和血管重建[31]。目前已设计出 VEGF 与 PDGF、VEGF 与 FGF－2、VEGF 与 TGF－β 以及 VEGF 与 BMP 等多种细胞因子联用方案,来模拟机体新血管生成过程中多细胞因子协同参与的微环境。此外,还有基因工程方案,即运用基因工程技术将表达 VEGF 的目的基因片段转染种子细胞,待细胞随组织工程骨植入骨折断端后表达和分泌 VEGF,促进血管化[32]。VEGF 基因载体主要有质粒和脂质体 DNA 等非病毒类和逆转录病毒以及腺病毒等病毒类载体。细胞移植方案是将血管 EC 或其前体细胞与骨组织工程的种子细胞黏附在体外构建的组织工程骨上,植入机体后 EC 分泌 VEGF,从而促进工程骨血管重建[33]。

4　小　结

在骨折愈合过程中,断端血管重建对其修复至关重要。骨折发生后,机体释放多种细胞因子如 VEGF、HIF－1α、FGF、ANG－1、ANG－2 等,这些因子相互协调,共同促进骨折断端血管新生,加快骨折的愈合,其中 VEGF 是机体内最主要的血管生成因子。详细了解骨折愈合过程中影响血管重建的各种细胞因子的作用,可以更好地利用促血管重建相关组织工程技术,为骨折愈合创造适宜的微环境,避免骨延迟愈合、骨不连等并发症发生。但是在骨折修复的研究中,除 VEGF 外,其他各因子在骨折局部是如何参与血管新生的研究尚不深入,且各种细胞因子间的相互协同机制也未明确,这些均有待今后进一步研究。此外,在血管生成的不同阶段,由于对不同浓度、不同细胞因子的需求不尽相同,所以临床上应充分考虑给予剂量、时间、方式及细胞因子间的相互作用等因素,采取更为精确的缓释方案和技术,制定出合理、有效的治疗方案,促进骨折更好的愈合。

5　参考文献

[1] FAZZALARI NL. Bone fracture and bone fracture repair[J]. Osteoporos Int,2011,22(6):2003－2006.

[2] STEGEN S,VAN GASTEL N,CARMELIET G. Bringing new life to damaged bone:the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration[J]. Bone,2015,70:19－27.

[3] CHIM SM,TICKNER J,CHOW ST,et al. Angiogenic factors in bone local environment[J]. Cytokine Growth Factor Rev,2013,24(3):297－310.

[4] CARMELIET P,JAIN RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis[J]. Nature,2011,473(7347):298－307.

[5] PEPPER MS. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,1997,17(4):605－619.

[6] 章静茹. Notch/D114 和 VEGF 信号通路在急性髓性白血病血管新生中的交互作用及机制研究[D]. 济南:山东大学,2013.

[7] SEMENZA GL,RUE EA,IYER NV,et al. Assignment of the hypoxia－inducible factor 1alpha gene to a region of conserved synteny on mouse chromosome 12 and human chromosome 14q[J]. Genomics,1996,34(3):437－439.

[8] 王苹苹,孔繁平,陈学群. 低氧细胞应激的 HIF－1 信号通路[J]. 浙江大学学报(医学版),2011,40(5):559－566.

[9] FERRARA N. Binding to the extracellular matrix and proteolytic processing:two key mechanisms regulating vascular endothelial growth factor action[J]. Mol Biol Cell,2010,21(5):687－690.

[10] TAKAHASHI T,UENO H,SHIBUYA M. VEGF activates protein kinase C－dependent,but Ras－independent Raf－

MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells[J]. Oncogene,1999,18(13):2221 - 2230.

[11] 康从民,王大伟,吕英涛. 血管内皮生长因子受体 - 2 所介导信号通路的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展,2009,36(10):1267 - 1274.

[12] SOLDI R,MITOLA S,STRASLY M,et al. Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor - 2[J]. EMBO J,1999,18(4):882 - 892.

[13] LEE IS,KIM YS,JUNG SH,et al. Lignans from the stems and leaves of Brandisia hancei and their effects on VEGF - induced vascular permeability and migration of HRECs and DLAV formation in zebrafish[J]. Biosci Biotechnol Biochem,2015,79(4):581 - 586.

[14] LI E,HRISTOVA K. Role of receptor tyrosine kinase transmembrane domains in cell signaling and human pathologies[J]. Biochemistry,2006,45(20):6241 - 6251.

[15] OURA H,BERTONCINI J,VELASCO P,et al. A critical role of placental growth factor in the induction of inflammation and edema formation[J]. Blood,2003,101(2):560 - 567.

[16] BEHR B,LEUCHT P,LONGAKER MT,et al. Fgf - 9 is required for angiogenesis and osteogenesis in long bone repair[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2010,107(26):11853 - 11858.

[17] 吕威力,邢雪松,董玉兰,等. 成纤维细胞生长因子促内皮细胞增生作用及其机制[J]. 中华创伤杂志,2004,20(6):363 - 366.

[18] HOSHI S,GOTO M,KOYAMA N,et al. Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation by nuclear factor - κB and its inhibit or IκB[J]. Biol Chem,2000,275:883 - 889.

[19] 杜培娟. 成纤维细胞生长因子及其受体抑制剂的研究进展[J]. 化学与生物工程,2014,34(12):4 - 8.

[20] RIBATTI D. The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis:a historical review[J]. Angiogenesis,2008,11(3):215 - 221.

[21] CARMELIET P,MOONS L,LUTTUN A,et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions[J]. Nat Med,2001,7(5):575 - 583.

[22] AUTIERO M,WALTENBERGER J,COMMUNI D,et al. Role of PlGF in the intra - and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1[J]. Nat Med,2003,9(7):936 - 943.

[23] MARCELLINI M,DE LUCA N,RICCIONI T,et al. Increased melanoma growth and metastasis spreading in mice overexpressing placenta growth factor[J]. Am J Pathol,2006,169(2):643 - 654.

[24] KIM I,KIM HG,SO JN,et al. Angiopoietin - 1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3' - Kinase/Akt signal transduction pathway[J]. Circ Res,2000,86(1):24 - 29.

[25] LAM DS,CHAN CK,MOHAMED S,et al. Intravitreal triamcinolone plus sequential grid laser versus triamcinolone or laser alone for treating diabetic macular edema:six - month outcomes[J]. Ophthalmology,2007,114(12):2162 - 2167.

[26] KASTRUP J,JØRGENSEN E,RÜCK A,et al. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor - A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double - blind placebo - controlled study:the Euroinject One trial[J]. J Am Coll Cardiol,2005,45(7):982 - 988.

[27] 卢秀珍,毕宏生,崔彦. 血管内皮生长因子与促血管生成素 1 对大鼠血管内皮细胞的作用[J]. 中国组织工程研究,2012,16(2):247 - 251.

[28] ZHANG C,WANG KZ,QIANG H,et al. Angiopoiesis and bone regeneration via co - expression of the hVEGF and hBMP genes from an adeno - associated viral vector in vitro and in vivo[J]. Acta Pharmacol Sin,2010,31(7):821 - 830.

[29] COLNOT C,THOMPSON Z,MICLAU T,et al. Altered fracture repair in the absence of MMP9[J]. Development,2003,130(17):4123 - 4133.

[30] LEHMANN W,EDGAR CM,WANG K,et al. Tumor necrosis factor alpha(TNF - alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing[J]. Bone,2005,36(2):300 - 310.

[31] ZHAO W,HAN Q,LIN H,et al. Improved neovascularization and wound repair by targeting human basic fibroblast growth factor (bFGF) to fibrin[J]. J Mol Med (Berl),2008,86(10):1127 - 1138.

[32] 刘保一,赵德伟. 血管内皮细胞生长因子体外修饰骨髓基质干细胞关节镜下回植治疗兔股骨头坏死的研究[J]. 中华医学杂志,2009,89(37):2629 - 2633.

[33] ZHANG B,YANG S,ZHANG Y,et al. Co - culture of mesenchymal stem cells with umbilical vein endothelial cells under hypoxic condition[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci,2012,32(2):173 - 180.

(2016-10-19 收稿 2016-12-29 修回)