

# 血管内皮生长因子对临界下颌骨缺损 纳米骨块移植的影响



扫码阅读电子版

杜兵<sup>1</sup> 刘伟珍<sup>2</sup> 杜钺<sup>3</sup><sup>1</sup>佛山第二人民医院口腔医学中心 528000; <sup>2</sup>南方医科大学附属口腔医院牙周科,广州 511400; <sup>3</sup>大连医科大学基础医学院病理学教研室 116044

通信作者:杜钺, Email:13889681419@163.com

**【摘要】 目的** 研究血管内皮生长因子(VEGF)对临界下颌骨缺损块状骨移植骨愈合的影响。**方法** 4只比格犬,于每侧下颌骨建立4个标准化临界骨缺损。利用半口对照设计将单纯纳米羟基磷灰石珊瑚骨块(nHA/coral)和复合VEGF的nHA/coral植于缺损中,VEGF/nHA/coral组为实验组,nHA/coral组为对照组。3、8周后处死动物,通过Masson和vWF免疫组化染色观察新生血管和骨组织生长情况;通过双荧光标记观察钙化骨组织新生情况。采用SPSS 18.0统计分析软件,对vWF免疫组化染色的新生血管密度和荧光标记的钙化新生骨面积比数据进行独立样本 $t$ 检验统计分析。**结果** 3周时,Masson染色可见蓝染的胶原蛋白表达活跃,结构尚未成熟,与nHA/coral组相比,VEGF/nHA/coral组新生骨胶原纤维相对成熟整齐,局部可见骨陷窝、有钙盐沉积的骨细胞以及与伴行的血管系统。8周时,两组均可见蓝色的骨细胞和骨样组织以及成熟的骨性胶原纤维排列整齐而致密,新生骨胶原分布均明显增宽增多,有编织骨形成,红蓝相间。免疫组化染色结果显示:3周时,nHA/coral组和VEGF/nHA/coral组的新生血管密度分别为 $(105 \pm 31)$ 和 $(146 \pm 33)$ 个/ $\text{mm}^2$ ,实验组明显高于对照组( $P < 0.05$ )。8周时,两组的新生血管数量均有显著增加至 $(269 \pm 67)$ 和 $(341 \pm 71)$ 个/ $\text{mm}^2$ ,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。荧光标记组织形态测量结果显示:3周时,nHA/coral组和VEGF/nHA/coral组的钙化新生骨面积比分别为 $(0.79 \pm 0.21)\%$ 和 $(1.08 \pm 0.29)\%$ ,组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );8周时,两组的钙化新生骨面积比分别为增长至 $(4.25 \pm 1.13)\%$ 和 $(5.21 \pm 1.07)\%$ ,组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 局部应用血管内皮生长因子可在骨愈合早期阶段显著提高血管新生和新生骨矿化程度。

**【关键词】** 骨移植; 组织工程; 血管新生; 荧光标记**基金项目:**广东省自然科学基金(2016A030310240);佛山市科技攻关项目(2018AB002711)**引用著录格式:**杜兵,刘伟珍,杜钺.血管内皮生长因子对临界下颌骨缺损纳米骨块移植的影响[J/CD].中华口腔医学研究杂志(电子版),2020,14(5):294-301.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2020.05.004

## The effect of vascular endothelial growth factor on the healing of nano block bone grafting in critical-sized mandibular defects

Du Bing<sup>1</sup>, Liu Weizhen<sup>2</sup>, Du Yue<sup>3</sup><sup>1</sup>Center of Stomatology, The Second People's Hospital of Foshan, Foshan 528000, China; <sup>2</sup>Department of Periodontics, Affiliated Stomatological Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 511400, China; <sup>3</sup>Department of Pathology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

Corresponding author: Du Yue, Email:13889681419@163.com

**【Abstract】 Objective** To study the effect of vascular endothelial growth factor on the healing of nano block bone grafting in critical-sized mandibular defects. **Methods** Four critical-sized defects in each side of mandible of four Beagle dogs were built. There were two groups in our study, i.e., the VEGF/nHA/coral group acted as the experimental group, and the nHA/coral group as the control group. Pure nano-hydroxyapatite/coralline blocks and VEGF-coated blocks were implanted into the above defects in a split-mouth design. In three and eight weeks, the animals were euthanized, and the angiogenesis and bone

regeneration in both groups were histologically observed by Masson's trichrome and vWF staining technique. Newly formed calcified bone was evaluated by two fluorescents labeling technique. Neovascular density of vWF immunohistochemical stained blood vessels and the percentage of fluorescent marked calcified new bone area were statistically analyzed in two independent sample *t*-test in SPSS 18.0. **Results** At three weeks in two groups, from the Masson stained images, newly formed trabecular bone was obvious with immature collagen fibers disorderly arranged and blue stained. Compared to the newly-formed bone in nHA/coral group, collagen fibers in VEGF/nHA/coral group were relatively more mature and regular arranged; Osteoblasts were surrounded by osteoid bone, which evolved into bone cells and bone lacuna; Calcium salt deposited bone cells and bone lacuna structure were blue stained. At eight weeks in both groups, blue stained bone cells and mature bone with better aligned and wider collagen fibers were observed; Mature collagen matrix secretion was significantly increased, and some woven bone formation can be easily found. In addition, immunohistochemical analysis revealed that compared to the nHA/coral samples ( $105 \pm 31$  vessels/mm<sup>2</sup>), the VEGF/nHA/coral samples showed an increase in the neovascular density ( $146 \pm 33$  vessels/mm<sup>2</sup>) at three weeks, with a significant difference between the two groups ( $P < 0.05$ ). At eight weeks, with the increasement of bone healing time, the quantity of new blood vessels in the two groups significantly increased. The neovascular density innHA/coral group and VEGF/nHA/coral group increased to  $269 \pm 67$  and  $341 \pm 71$ , respectively, without significant difference ( $P > 0.05$ ). Fluorescence analysis results indicated that at three weeks, the percentage of calcified new bone area was  $(0.79 \pm 0.21)\%$  for the nHA/coral group and  $(1.08 \pm 0.29)\%$  for the VEGF/nHA/coral group, with a significant difference between two groups ( $P < 0.05$ ). At eight weeks, fluorescence labeled new bone in periphery and internal of scaffolds was significantly increased, and yellow tetracycline fluorescence can be easily observed in the different parts of blocks in two groups. PMBF in both groups increased to  $(4.25 \pm 1.13)\%$  and  $(5.21 \pm 1.07)\%$ , respectively, with no significant difference ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The local delivery of VEGF can significantly improve neovascularization and mineralization of newly formed bone at the early stage of block bone healing in this dog implantation model.

**【Key words】** Bone transplantation; Tissue engineering; Neovascularization; Fluorescence labeling

**Fund programs:** Natural Science Foundation of Guangdong Province (2016A030310240); Medical and Technological Key Project of Foshan (2018AB002711)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2020.05.004

损伤、肿瘤等常造成较大范围颌骨缺损,虽然牙槽骨组织具有再生能力,但一旦骨缺损达到临界尺寸时通常无法自行愈合,需要进行骨移植。自体骨移植一直公认为是骨组织再生的金标准,但是需要开辟二次术区,创伤较大。颗粒状人工骨具有良好的骨再生能力,但空间维持能力较差,难以获得理想的骨缺损形态重塑。与自体移植块相比,人工骨块来源广泛,尺寸不受限制,甚至可以个性化定制,重塑缺损形状。然而,块状人工骨移植存在成骨效能低下、血运不足等问题,一直未能实现广泛的临床应用。

众所周知,骨组织工程三要素为支架、细胞和生长因子;骨组织缺损修复是个复杂的系列过程,它涉及到血块机化、成骨细胞和巨噬细胞向伤处迁移、增殖、分化以及血管和编织骨生成,其中血管新

生是骨缺损修复早期的关键环节。血管内皮细胞生长因子(vasculare endothelial growth factor, VEGF)是一种强效血管内皮生成因子,可以通过刺激内皮细胞的迁移和增殖,促进血管生成,支架复合VEGF是骨组织工程中提高成骨效能的重要手段。此外,支架作为细胞和生长因子的载体,其结构、形貌、理化性能对血管、骨组织新生影响也是临界骨缺损组织工程研究的重要部分。因此,本研究将VEGF与nHA/coral骨块复合,然后植入比格犬临界下颌骨缺损中,研究局部应用VEGF纳米骨块移植的愈合早期的血管生成和骨再生的影响。

## 材料与amp;方法

### 一、材料和实验动物

#### 1. 支架及理化性能检测设备:纳米羟基磷灰石/

珊瑚骨块(nano-hydroxyapatite/coralline, nHA/coral, 规格6 mm×9 mm×12 mm,北京意华健科贸有限公司),已 $\gamma$ 射线消毒(图1A)。Jeol JSM-6300F扫描电镜(SEM,日本)下观察骨块表面形貌和羟基磷灰石晶体直径(电压20 kV),nano measurer 1.2.5粒径分析软件(复旦大学)测量的多孔结构孔径大小。



图1 纳米羟基磷灰石珊瑚骨块的外貌和规格

2. 实验动物:选用4只健康的雄性比格犬,12~13月龄,平均重量( $12.2 \pm 0.3$ ) kg,由广东省医药研究总院比格犬种质资源研究开发中心提供(许可证号:SYXK粤2008-0007);采用独立笼中圈养,饲养1周适应后进行实验,术中及术后对动物的处置符合动物伦理学要求。

3. nHA/coral骨块物理吸附血管内皮生长因子:参照国外文献[1]报道,于室温下超净工作台上,将nHA/coral骨块独立平放于无菌培养皿中。通过移液器向支架内缓慢注入0.25 mL的无菌磷酸盐缓冲液(PBS);将预先配置的0.25 mL的VEGF/PBS溶液缓慢注入支架内,静置0.5 h( $3 \mu\text{g rhVEGF}_{165}$ /骨块)。

## 二、实验设计与分组方法

实验分为两组,VEGF/nHA/coral组为实验组,nHA/coral组为对照组。观察时间为3周。实验动物采用随机数字表法进行随机标号,并于每只动物每侧下颌骨建立4个标准化临界慢性骨缺损<sup>[2]</sup>,利

用半口对照设计,随机将VEGF/nHA/coral骨块植于一侧缺损中,将nHA/coral骨块植于另一侧。

## 三、骨缺损模型建立

1. 第一阶段手术(拔牙和临界慢性骨缺损制备):术前24 h禁食,严格按外科的无菌操作方法,速眠新肌注镇静(0.2 mL/kg),3%戊巴比妥那溶液(0.3 mL/kg)静脉注射全身麻醉,麻醉成功后,将实验动物以侧卧位固定于手术台上。消毒铺巾,必兰麻1 mL下颌手术区局部浸润麻醉。采用分根法拔除双侧下颌第二、三、四前磨牙及第一、二磨牙,沿牙槽嵴顶纵向切开黏骨膜,翻瓣,0.9%氯化钠溶液冷却下于双侧下颌骨的颊侧使用裂钻、小球钻定位并切透骨皮质,使用骨凿劈开骨皮质块,用碳化硅磨头打磨塑形,分别制备出4个标准化箱型临界骨缺损( $n=8$ ),大小6 mm×9 mm×12 mm(颊舌向距离为6 mm,牙龈向距离9 mm,近远中向距离为12 mm),缺损间隔4 mm(图2A);完整保留舌侧骨板,黏骨膜瓣复位,丝线间断缝合,愈合周期为2个月。术后注射青霉素( $80 \times 10^6$  U/d)7 d,进软食。

2. 第二阶段手术(骨块移植):全身麻醉同前,重新沿牙槽嵴顶纵向切开黏骨膜,翻瓣(图2B),对箱型骨缺损进行重新塑形,按照半口对照设计,将8块nHA/coral骨块和8块VEGF/nHA/coral骨块组分别植入骨缺损内(图2C),制作减张切口,黏骨膜瓣复位,丝线间断缝合,愈合3周。术后注射青霉素( $80 \times 10^6$ 单位/d)7 d,进软食。

## 四、荧光标记及样本处理

骨块植入第3、8周,过量麻醉处死动物。处死前13、14 d皮下注射10 mg/mL盐酸四环素荧光剂(30 mg/kg体重),处死前3、4 d皮下注射10 mg/mL钙黄绿素荧光剂(10 mg/kg体重)。用金刚砂切片切取完整骨块和周围2 mm骨组织,标本经0.9%氯化钠溶液反复冲洗干净后,放入4%中性缓冲甲醛溶



图2 临界慢性兔下颌骨缺损模型建立及纳米羟基磷灰石/珊瑚(nHA/coral)骨块植入骨缺损过程 A:全麻加局麻下采用分根法拔除兔双侧下颌第二、三、四前磨牙以及第一和第二磨牙(P2-M2),分别在双侧下颌骨制备出4个标准化箱型临界慢性骨缺损;B:一期手术后8周获得的慢性骨缺损颊面观;C:对箱型骨缺损进行重新塑形,将nHA/coral骨块和血管内皮细胞生长因子(VEGF)/nHA/coral骨块组分别植入骨缺损内

液中于4℃恒温冰箱内固定7d。在0.9%氯化钠溶液冷却下使用金刚砂超薄切片于正中部位将固定的标本颊舌向切割为两半,一半逐级乙醇脱水,树脂包埋,制作50μm厚度非脱钙硬组织切片;另一半10%乙二胺四乙酸(EDTA)溶液脱钙,乙醇脱水,浸蜡,包埋,制作5μm厚度脱钙切片。

## 五、组织学观察、免疫组化分析和荧光标记观察

1. 脱钙切片组织学观察、vWF免疫组化染色和定量分析:每个样本制作3个5μm厚度连续切片,分别进行Masson和vWF染色,利用Masson染色进行新生骨的胶原蛋白分泌情况的组织学观察,利用vWF免疫组化染色进行新生血管的定量分析。免疫组化染色过程均按照生产商的说明方案操作,使用兔抗犬的vWF一抗(1:1500)和抗兔IgG试剂盒(Dako,德国),然后进行苏木精复染。采用双盲法显微镜下放大20倍观察,利用IPP软件(Media Cybernetics,美国)测量并计算出新生血管密度。

新生血管密度=支架内新生血管数量/支架面积

2. 非脱钙硬组织切片荧光标记分析:将硬组织切片放置于LSM 510激光共聚焦显微镜下,盐酸四环素标记的钙化新生骨呈现为橙黄色荧光带,钙黄绿素标记的钙化新生骨呈现为亮绿色荧光带,观察两种荧光条带标记的新生骨,利用ZEN 2009 Light Edition软件(Zeiss,德国)清晰分辨出骨块、荧光标记新骨不同灰度值(图3A~3B)。采用双盲法,由3位病理学专业医生使用IPP软件测量支架内荧光标记的钙化新生骨组织面积和支架面积(图3C~3D)。钙化新生骨面积比由以下公式计算得出。

钙化新生骨面积比(%)=支架内荧光标记的钙化新生骨组织面积/支架面积×100%

## 六、统计学处理方法

应用SPSS 18.0软件对数据进行统计分析。所

有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本量为8。先对组织形态学测量数据进行Kolmogorov-Smirnov正态性检验,然后用Levene's test检查方差是否齐性。当满足正态分布且方差齐性时,采用两独立样本t检验对进行整体的均数比较;当不满足正态分布或方差不齐性时,采用两独立样本t'检验,比较组间新生血管密度以及钙化新生骨面积比的差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、纳米羟基磷灰石/珊瑚骨块理化性能检测结果

SEM结果显示,nHA/coral骨块具有三维多孔结构,独立孔结构的孔径为62~164μm,相互连通孔结构的直径为107~550μm。羟基磷灰石晶体均匀分布在骨块表面,直径71~99nm(图4A~4E)。

### 二、组织学观察、组织形态测量、免疫组化分析和荧光标记观察结果

1. 大体观察:术后比格犬均无死亡,活动均正常,下颌骨移植术区无红肿、化脓,无骨块暴露等并发症。

2. 组织学观察和组织形态测量结果:Masson染色切片组织学观察结果显示,3周时两组蓝染的胶原蛋白表达活跃,与nHA/coral组相比,VEGF/nHA/coral组新生骨胶原纤维相对成熟整齐,局部可见类骨质包绕成骨细胞形成骨细胞,形成骨陷窝呈现蓝染以及相伴行的血管系统;8周时两组均可见蓝色的骨细胞和骨样组织以及成熟的骨性胶原纤维排列整齐而致密,成熟的新生骨组织胶原分布均明显增宽增多,有部分编织骨形成(图5A~5D)。

3. 免疫组化染色和组织形态测量结果:vWF阳性着色区域位于血管内皮细胞的基底膜,代表新生血管(图6A~6B)。

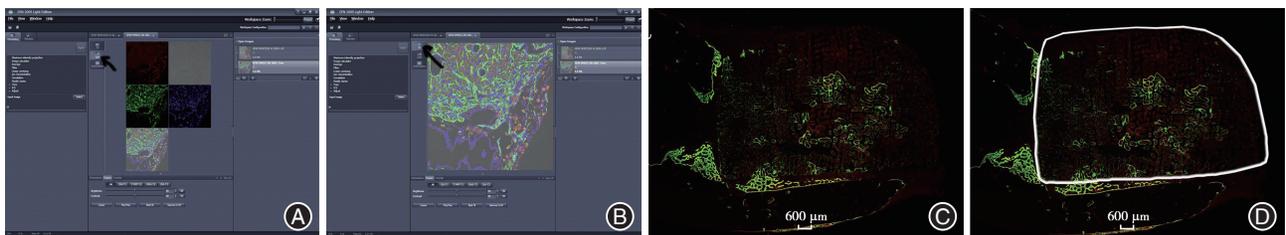
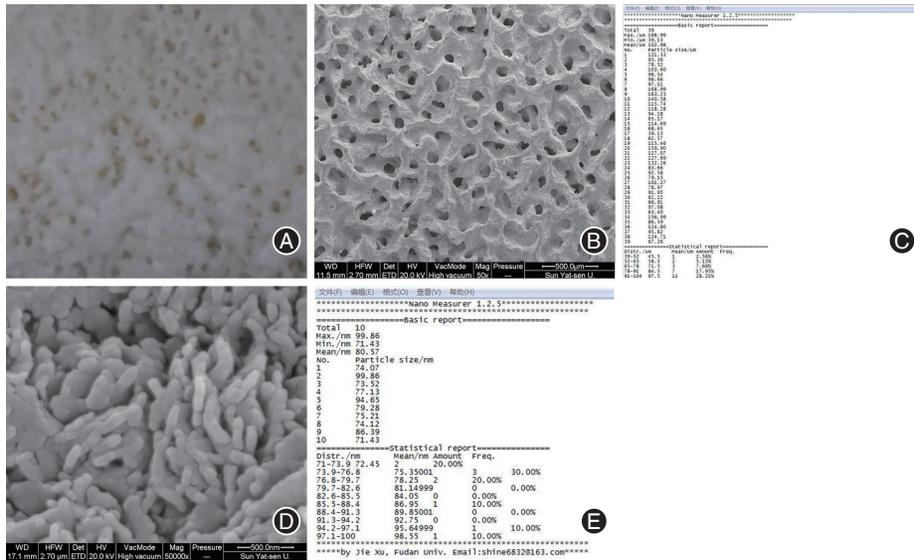
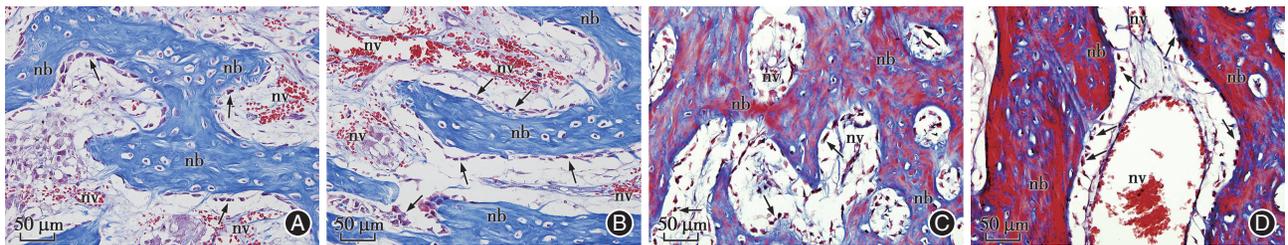


图3 骨块-骨组织样本不脱钙切片荧光标记的新生骨的ZEN 2009 Light Edition软件测量和分析示意图 A:通过ZEN 2009 Light Edition软件打开图片,此界面为split界面,展示不同通道所有图片;B:点击2D所呈现的界面;C:纳米羟基磷灰石/珊瑚(nHA/coral)和血管内皮细胞生长因子(VEGF)/nHA/coral骨块-骨组织样本颊舌向切割并制作不脱钙硬组织切片,激光共聚焦显微镜下拍摄数码整体图;D:使用IPP软件测量支架总面积和钙化新生骨组织面积,白线代表支架边框



**图4** 纳米羟基磷灰石/珊瑚(nHA/coral)骨块的大体观察和表面形貌观察分析 A:nHA/coral 骨块大体观察表面晶体和多孔结构;B:nHA/coral 骨块具有和天然珊瑚一样的不规则连通多孔结构,且表面呈灰白色,利用 nano measurer 软件画出孔结构横切直径(SEM);C:利用 nano measurer 软件查看报告,并导出测量的孔径数据;D:nHA/coral 骨块表面均匀排列着指状纳米级白色晶体,部分晶体在基底部融合为一体,利用 nano measurer 软件画出纳米羟基磷灰石晶体横直径(SEM);E:利用 nano measurer 软件查看报告,并导出测量的晶体直径数据



**图5** 不同时间点两组样本 Masson 染色脱钙切片的组织学观察 A:3周时纳米羟基磷灰石/珊瑚(nHA/coral)组可见新骨生成,蓝染的胶原蛋白表达活跃;B:3周时血管内皮细胞生长因子(VEGF)/nHA/coral 组可见蓝染骨髓陷窝,相伴行的血管系统较为丰富;C:8周时 nHA/coral 组可见蓝色的骨细胞和骨样组织以及成熟的骨性胶原纤维排列整齐而相对致密;D:VEGF/nHA/coral 组8周时成熟的新生骨组织胶原分布均明显增宽增多,钙盐沉积明显,红蓝相间;蓝染结构为骨基质胶原,nv代表新生血管,nb代表新生编织骨,黑色箭头所示为线性排列的成骨细胞

3周时,nHA/coral 组和 VEGF/nHA/coral 组的 vWF 阳性表达区域均主要分布在骨块-宿主骨交界处,呈现大小不一的椭圆形,棕褐色着色;而在骨块内部棕褐色阳性表达明显减少,在中央部位几乎未见 vWF 阳性表达。VEGF/nHA/coral 组的阳性表达区域略多,nHA/coral 组则相对较少。

8周时,随着骨愈合时间增加,两组的新生血管数量均有显著增加,不仅是在骨块外周区域,而且在支架内部也明显发现阳性表达区域的增加。nHA/coral 组则较少,而 VEGF/nHA/coral 组的阳性表达区域则相对较多。

组织形态学测量结果显示,3周时,VEGF/nHA/coral 组的新生血管密度为(146 ± 33)个/mm<sup>2</sup>,明显高于 nHA/coral 组(105 ± 31)个/mm<sup>2</sup>,差异有统计学意义( $t = 2.56, P < 0.05$ );8周时,nHA/coral 组和

VEGF/nHA/coral 组的新生血管密度分别增至(269 ± 67)和(341 ± 71)个/mm<sup>2</sup>,差异无统计学意义( $t = 2.098, P > 0.05$ ,图6C)。

4. 荧光标记观察和组织形态测量结果:3周时,nHA/coral 组绿色钙黄绿素荧光明显呈现网状,主要分布在支架周边尤其是近宿主骨-支架界面处,而在骨块内部也不均匀的分布有少量绿色荧光。在近宿主骨-支架界面处见少量黄色四环素荧光呈条带状;而 VEGF/nHA/coral 组绿色钙黄绿素荧光带相对较多,骨块内部明显可见分布不均的绿色荧光。绿色荧光带不仅包裹于网孔结构的材料表面,还有部分进入到网孔状空间内(图7A ~ 7B)。8周时两组黄色和绿色荧光标记的新骨在支架周边和内部均明显增多,黄色四环素荧光在支架内不同部位均有显现。相比之下,VEGF/nHA/coral 组的荧光带明显多

于nHA/coral组。两组的支架形态仍较规则,除了在支架的孔壁结构中发现气泡状的二级孔结构改变之外,基本未发现明显的支架形态改变(图7C~7D)。

组织形态学测量结果见表1。3周时,nHA/coral组和VEGF/nHA/coral组的钙化新生骨面积比分别为(0.79±0.21)%和(1.08±0.29)%,Levene's test检查: $F=0.911$ ,方差齐性;独立样本 $t$ 检验结果为: $t=2.199$ , $P=0.045$ ;8周时,VEGF/nHA/coral组和nHA/coral组的钙化新生骨面积比分别为(4.25±1.13)%

和(5.21±1.07)%,统计数据符合正态分布,Levene's test检查: $F=0.000$ ,方差齐性;独立样本 $t$ 检验结果为: $t=1.725$ , $P=0.107$ 。nHA/coral组内3和8周钙化新生骨面积比统计数据符合正态分布,Levene's test检查: $F=9.776$ ,方差不齐;独立样本 $t'$ 检验结果为: $t'=8.430$ , $P<0.001$ 。VEGF/nHA/coral组内3和8周钙化新生骨面积比统计数据符合正态分布,Levene's test检查: $F=12.413$ ,方差不齐;独立样本 $t'$ 检验结果为: $t'=10.497$ , $P<0.001$ 。

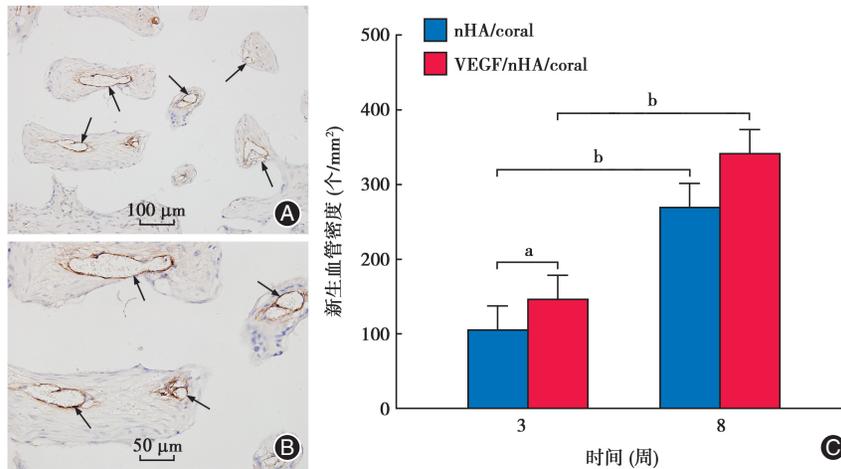


图6 vWF染色免疫组化脱钙切片的组织学观察和组织形态测量分析 A:vWF染色的脱钙切片;B:vWF染色的脱钙切片放大;C:vWF免疫组化染色的新生血管密度对比分析( $\bar{x}\pm s$ , $n=8$ ), $^aP<0.05$ , $^bP<0.01$ ;箭头所指的深棕色着色结构为vWF染色阳性的新生血管

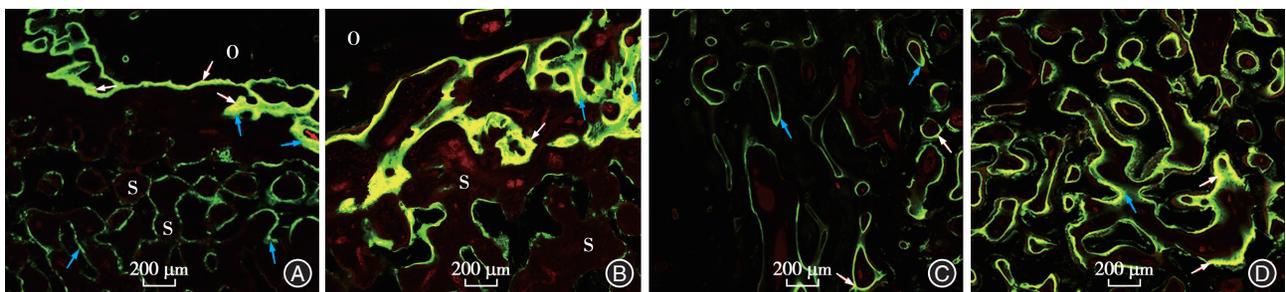


图7 双荧光标记的硬组织切片激光共聚焦观察 A:纳米羟基磷灰石/珊瑚(nHA/coral)组绿色钙黄绿素荧光明显呈现网状,主要分布在支架周边尤其是近宿主骨-支架界面处;B:3周时血管内皮细胞生长因子(VEGF)/nHA/coral组绿色钙黄绿素荧光带相对较多,部分进入到网孔状骨块内部;C:8周时nHA/coral组黄色和绿色荧光标记的新骨在支架周边和内部均有明显显示;D:8周时VEGF/nHA/coral组的荧光带尤其是黄色荧光明显更多。蓝色箭头所指的是钙黄绿素标记的绿色荧光带,白色箭头所指的是盐酸四环素标记的黄色荧光带,O代表宿主骨(旧骨),S代表支架(骨块)

表1 不同时间点钙化新生骨面积比的组间比较( $\%,\bar{x}\pm s$ )

组别	样本量	3周	8周	合计	$t'$ 值	$P$ 值
nHA/coral组	8	0.79±0.21	4.25±1.13	2.52±1.95	8.430	<0.001
VEGF/nHA/coral组	8	1.08±0.29	5.21±1.07	3.15±2.26	10.497	<0.001
合计		0.94±0.29	4.73±1.18	2.23±2.10	178.214	<0.001
$t$ 值		2.199	1.725	4.749		
$P$ 值		0.045	0.107	0.038		

## 讨 论

目前,块状骨移植因为骨再生不均匀、成骨效能低等不足未能得到广泛应用。在骨组织工程中,血管新生是保障氧气、营养、废物运输的关键环节<sup>[3]</sup>。有研究显示,当缺损达到或超过临界尺寸,容易出现营养和氧气的输送不足,造成缺损中心部位氧浓度的明显下降,直接影响块状骨移植材料内细胞增殖和分化从而影响新骨形成。本研究通过组织学和免疫组化分析观察到了新骨形成和血管分布不均一现象。两组的新形成的骨和血管均主要分布于支架的外周,而中心内部明显很少;此外,局部应用 VEGF 可在骨移植愈合早期获得更多的血管和钙化骨组织新生。上述实验发现可能归因于骨块周边和中心部位不同的血供和微环境。在本实验建立的缺损模型中,颊骨板吸收明显,仅于舌侧保留了 1~2 mm 骨皮质。故此,局部的血供相对较差。另外,在骨缺损模型的建立过程中,无张力缝合过程中骨膜切开、神经和血管的损伤,均导致局部血供不足。因此本研究认为:此临界骨缺损模型更能模拟临床常见的刃状骨的骨块移植的手术方式,更适用于血运欠佳的较大范围骨缺损的块状人工骨移植研究,分布不均匀现象以及局部应用 VEGF 的试验结果更加证实,促血管新生、提高血液供应对骨组织工程非常关键和必要。

理想的支架应该具有理想的多孔结构,可以允许成骨细胞向支架内爬行成长,并利于内向新生组织的血管化<sup>[4]</sup>。孔隙是细胞和营养运输通道,支架的孔径大小对于骨组织工程至关重要,支架孔径越大则表面面积越大,越有利的用于支架与体液接触,利于细胞的黏附和增殖。然而,孔径过大会造成新骨生长缺乏材料的支架作用,反而降低成骨速度<sup>[5]</sup>。在本研究中使用的骨移植支架为多孔纳米羟基磷灰石/珊瑚骨块材料,正如 SEM 图像所示,骨块具有高度多孔连通性,孔径为 107~550  $\mu\text{m}$ ,可以允许细胞向支架内部爬行生长。在 Masson 染色脱钙切片和荧光标记的硬组织切片中,未复合 VEGF 的单纯骨块移仍可见骨基质包绕孔结构的表面,并通过相互连通的多孔路径向内生长,大量的内皮细胞和成骨细胞从外周向支架内部爬行。

荧光标记是一种有效监测新骨形成的技术。在活体内,荧光剂可以与钙离子发生螯合反应,沉积在矿化位点,从而在整个骨愈合过程中标记不同

时间的新骨形成,记录不同骨愈合阶段骨组织生成和重塑的细节。钙黄绿素和四环素荧光发出不同的颜色,当在不同的时间两种荧光剂的应用可以提供连续的骨组织生长信息<sup>[6]</sup>。因此,在本研究中,四环素标记的新的钙化骨(黄线)为骨移植 8 d 后生成的新骨,而钙黄绿素标记的钙化新生骨为植入 18 d 后形成的新骨。纳米羟基磷灰石/珊瑚骨块移植来说,植入 8 d 后新骨形成主要是在支架的周边,中心部位非常少见;复合 VEGF 后钙化新骨生成有所增加,中心部位仍然较少。骨块植入 18 d 时,2 个荧光标记的钙化新骨在两组支架内部均可以发现,黄色荧光较少,以绿色荧光为主。有研究表明,活性玻璃陶瓷支架复合 VEGF 不能直接促进骨源细胞分化和提高新骨的生成,而是通过促进内皮细胞有丝分裂而间接参与骨愈合过程中血管生成和骨组织钙化成熟<sup>[7]</sup>,这与本研究的上述发现相一致。本实验的荧光标记分析表明,通过复合 VEGF 的局部应用可以通过加速的 nHA/coral 骨愈合早期的矿化过程,促进新骨生成。

骨组织再生与血管化过程息息相关,局部复合生长因子是骨组织工程的最为常见和实用的方法之一<sup>[8]</sup>。本研究结果表明,nHA/coral 骨块理想多孔结构和 nHA 晶体对细胞的迁移、增殖以及新骨和血管内向生长发挥了重要作用。此外,复合 rhVEGF165 能在愈合早期提高 nHA/coral 骨块移植的血管新生和骨组织矿化。然而,对于支架复合血管生成生长因子仍有许多复杂问题尚未能得到解决,如不同剂量的单一或组合的生长因子的作用和生长因子释放系统等等<sup>[9-10]</sup>。在后续的研究中,本课题组将深入研究包括 nHA/coral 骨块和其它可生物降解的载体的多层次复合释放系统、优化生长因子的剂量、种类和缓释顺序等等。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] Schwarz F, Rothamel D, Herten M, et al. Lateral ridge augmentation using particulated or block bone substitutes biocoated with rhGDF-5 and rhBMP-2: an immunohistochemical study in dogs [J]. Clin Oral Implants Res, 2008, 19(7): 642-652. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2008.01537.x.
- [2] Schwarz F, Sager M, Ferrari D, et al. Influence of recombinant human platelet-derived growth factor on lateral ridge augmentation using biphasic calcium phosphate and guided bone regeneration: a histomorphometric study in dogs [J]. Periodontol, 2009, 80(8):

- 1315-1323. DOI:10.1902/jop.2009.090034.
- [3] Hayashi K, Kishida R, Tsuchiya A, et al. Honeycomb blocks composed of carbonate apatite,  $\beta$ -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite for bone regeneration: effects of composition on biological responses[J]. *Mater Today Bio*, 2019, 4: 100031. DOI: 10.1016/j.mtbio.2019.100031.
- [4] 张海鸽, 索海瑞, 王玲, 等. 基于3D打印的双相磷酸钙胶原改性支架[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(30): 4780-4786. DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1421.
- [5] 胡超然, 邱冰, 周祝兴, 等. 3D打印聚己内酯/纳米羟基磷灰石复合支架与骨髓间充质干细胞的体外生物相容性[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 24(4): 589-595. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.1880.
- [6] 刘洋, 陈珺, 翟玉莹, 等. 阿魏酸钠治疗糖皮质激素性骨质疏松的实验研究[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(3): 394-398. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2016.03.019.
- [7] Leach JK, Kaigler D, Wang Z, et al. Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(17): 3249-3255. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.033.
- [8] 徐方方, 殷丽华. 富血小板纤维蛋白对干细胞增殖及成骨分化的研究进展[J]. *口腔医学研究*, 2019, 35(8): 527-530. DOI: 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.06.005.
- [9] Miller MQ, McColl LF, Arul MR, et al. Assessment of hedgehog signaling pathway activation for craniofacial bone regeneration in a critical-sized rat mandibular defect [J]. *JAMA Facial Plast Surg*, 2019, 21(2): 110-117. DOI: 10.1001/jamafacial.2018.1508.
- [10] Bao X, Zhu L, Huang X, et al. 3D biomimetic artificial bone scaffolds with dual-cytokines spatiotemporal delivery for large weight-bearing bone defect repair [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7814. DOI: 10.1038/s41598-017-08412-0.

(收稿日期:2020-06-14)

(本文编辑:王嫚)