

文章编号: 1008- 5572(2003)01- 0031- 03

血管内皮生长因子与骨折愈合

陈 明, 夏仁云

(华中科技大学同济医学院附属同济医院, 湖北 武汉 430030)

中图分类号: Q 813.5 文献标识码: B

骨折愈合是一个复杂的过程, 涉及多种细胞的增殖、分化和细胞外基质的合成与钙化等修复过程。随着分子生物学技术的发展, 现已发现骨折位点存在多种生长因子, 它们在骨折修复中的作用正引起人们的广泛关注。血管的重建贯穿骨折修复的全过程, 多种细胞因子和生长因子参与新血管的形成, 如成纤维细胞生长因子、转化生长因子 α β 、血小板生长因子、前列腺素E、血管内皮细胞生长因子、肿瘤坏死因子等。其中血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)是最有力的血管生长因子, 它通过与血管内皮上的特异性受体结合, 发挥强大的促内皮增殖、促血管生成作用。其他促血管生成因子的血管生成作用是通过增强VEGF的表达及生成来实现的¹。近年国内外的许多研究表明, 血管内皮生长因子同骨折愈合有着十分密切的关系。

一、VEGF及其受体的生物学作用

血管内皮生长因子是由两个相同的分子量23kD的亚基经二硫键连接的二聚体糖蛋白, 分子量为34~45kD。人的VEGF基因位于染色体的6p21.3, 全长28kb, 编码VEGF的基因长约14kb, 由8个外显子和7个内含子交替构成²。VEGF蛋白就是由其信使核糖核酸(mRNA)以不同的方式剪切形成的系列产物。目前发现有6种单体, 根据氨基酸的长短依次命名为VEGF206(包含所有外显子及部分第7内含子)、VEGF189(包含8个外显子)、VEGF165(缺少外显子6)、VEGF145(缺少外显子7)、VEGF121(缺少外显子6和7)和VEGF183³。这几种VEGF亚型的同二聚体具有基本相同的生物活性, 但各单体本身则无活性。一般认为VEGF有两种经典的受体: VEGFR-1(flt-1)和VEGF-2(KDR/flk-1), 它们均属于III酪氨酸激酶受体, 主要位于血管内皮细胞。另外, 成骨细胞、晶状上皮细胞、单核细胞、黑色素瘤细胞等也发现了VEGF的结合位点。VEGF的这两种受体是同源性跨膜蛋白, 包含7个细胞外免疫球蛋白样的功能区和一个细胞内酪氨酸激酶功能区。VEGF和其受体有极高的亲和力, 可引起胞浆内Ca²⁺浓度短暂性升高, 刺激三磷酸肌醇

(IP3)积聚, 通过磷酸肌酸特异性的磷脂酶C完成自身磷酸化, 促进内皮细胞的分裂、迁移和增殖⁴⁻⁶。此外, VEGF通过旁分泌机制, 刺激体内新生血管的生成, 增加血管通透性, 对维持血管的正常状态和完整性具有重要意义⁷。

二、骨折愈合过程中VEGF及其受体的表达

已有实验发现VEGF表达贯穿于骨折愈合的始终, 且在骨折愈合不同阶段骨痂中VEGF表达的程度不同, 参与表达的细胞也不同。骨折早期(炎症反应期, 约1周)骨膜、骨及邻近软组织血管破裂出血形成血肿, 引起骨折局部血供破坏, 组织细胞坏死, 为炎症细胞反应, 局部渗出、水肿等使血流中断, 在此期间VEGF表达很弱, 主要在骨细胞内。接下的3周为骨折修复期, 随着骨折的修复, 肉芽组织长入血肿, 软骨细胞及成骨细胞侵入发生软骨内骨化及膜内骨化, 这一阶段, 组织修复耗氧, 骨折局部低氧张力强烈诱导VEGF表达⁸。除成骨细胞外, 炎性细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞内均可检测到大量的VEGFmRNA及VEGF表达。因而, 骨折后1~3周为VEGF表达的高峰期。从第五周开始(改造塑形期), 在VEGF及其他血管生成因子共同作用下, 血管内皮细胞增殖分化及增生, 血管形成, 低氧状态改善, VEGFmRNA及蛋白表达减弱, 此阶段主要是骨细胞与成骨细胞表达VEGF。8周以后, 仅发现破骨细胞表达VEGFmRNA及VEGF。骨折愈合过程中, VEGF的两种受体均有表达, 但表达的时间规律明显不同, flt1受体在骨折愈合的过程表达, 1~3周达高峰, 与VEGF表达同步, 伤后3周骨折端VEGF-flt1受体表达主要在新生毛细血管内皮细胞, 伤后5周骨折端软骨细胞内flt1受体阳性, 而flk1受体见于骨折后3天~3周的内皮细胞及3周的软骨细胞内, 表明两者均参与骨折愈合⁹。John Street等在骨折病人的血清及骨折部位的血肿中均发现VEGF升高, 且血肿中VEGF显著高于血清中的含量, 将血肿转移至鼠的皮下, 当血肿吸收后, 有新生血管形成, 因而认为血管形成是由血肿中高浓度的VEGF所介导的, 骨折部位的血肿具有潜在引导血管形成的作用, 在骨折愈合过程中, 可作为一个血管生成因子的储存库而发挥促进

血管再生的作用¹⁰。

三、骨折修复中影响VEGF表达的因素

(一) 缺氧: 骨折时局部缺血缺氧对VEGF的表达有重要调节作用。Douglas⁸发现骨折部位存在氧梯度, 低氧状态下, 多种细胞分泌VEGF增强, 通过外培养成骨细胞并检测缺氧条件下VEGFmRNA及其蛋白的表达, 发现二者均明显增加, 且VEGF的表达与缺氧呈剂量依赖关系, 低氧状态抑制成骨细胞的增殖, 但促进成骨细胞的分化。因而认为, 成骨细胞存在氧感受机制, 低氧张力可调节VEGF的表达及成骨细胞的增殖分化, 通过VEGF的表达, 引起血管再生, 增加血流量, 加速骨折愈合。Levy等用放线菌素D和放线菌酮分别阻断转录过程和蛋白合成, 证实缺氧对VEGFmRNA的表达调节是在转录和转录后水平, 而且低氧可增加VEGFmRNA的低半衰期¹¹。Brogi等指出缺氧时KDR上升13倍, 而KDR与VEGF的亲合力不变, 说明低氧不仅可产生VEGF, 而且也通过旁分泌诱导VEGF受体调节VEGF的功能¹²。

(二) 局部微环境: Spector¹³等认为成骨细胞表达VEGF是由胞外微环境调节的。pH降低, 在氧张力正常或低氧张力下, 乳酸和pH均可独立影响VEGF及其蛋白的表达。骨折时血管损伤, 导致骨折部位缺血缺氧, 局部代谢使乳酸聚集, pH降低, 当pH降至7.0时VEGF的表达比pH为7.4时明显降低。因为此时VEGFmRNA降解率没有变化, 所以作者认为二者是在转录水平影响VEGF的表达。另外, 骨折早期血肿内部的钾离子浓度升高, 当钾的浓度高过9mmol/L时, 会严重阻碍内皮细胞分裂, 此时尽管血肿中VEGF的浓度升高, 但对内皮细胞分裂无作用, 只有血肿吸收, 钾浓度降至正常后VEGF的作用才能发挥¹⁰。

(三) 其他细胞因子及生长因子: 细胞因子对VEGF的表达也有调节作用。成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor, FGF)、转化生长因子(Transforming growth factor, TGF)、肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF- α)、血小板生长因子(PDGF)血管生成素和L-8及促血管血细胞生成素(Angiopoietins)均是促进VEGF表达, 而栓粘素、催乳素N末端片段生长激素纤维蛋白溶酶片段和肌网硬蛋白片段对VEGF的表达有抑制作用¹⁴。

(四) 其他因素: 骨折时过多的放射线照射会使成骨细胞表达VEGF减少, 因为电离辐射会抑制成骨细胞活性, 减少VEGF的表达。这被看作是骨放射病及放射后骨折难愈合的机制¹⁵。另外有人发现尼古丁也会阻碍骨愈合中VEGF的表达¹⁶。某些激素也影响VEGF的表达, Schlaeppi等发现地塞米松减少成骨细胞VEGF的表达, 而1, 2-(OH) D_2 刺激成骨细胞的VEGF表达¹⁷。

四、VEGF与骨折愈合的关系

目前认为, 血管形成, 恢复骨折端供血是骨折修复的前提, 我国传统医学也认为“血不通, 则骨不接。”可见血管生成在骨折愈合中起着至关重要的作用。VEGF作为血管生成的最重要因素, 理所当然在骨折愈合中扮演举足轻重的角色。血管再生是一个极期复杂的过程, 涉及内皮细胞的分裂, 血管基底膜及细胞外基质的降解及内皮细胞的迁移等。VEGF可直接或间接影响血管再生的各个环节: VEGF通过自分泌或旁分泌与血管内皮细胞表面受体结合, 促进内皮细胞增殖, 诱导新生血管形成。新生血管的建立, 对骨折段供血, 提供营养物质, 运输代谢废物, 为局部骨再生及代谢提供有利的微环境。其次, 成骨细胞上有VEGF的flt-1受体, VEGF通过作用于成骨细胞强表达的flt-1受体而使其发生趋化作用, 这样, 成骨细胞聚集在骨折部位, 在VEGF作用下, 成骨细胞分化, 碱性磷酸酶活性增强, 局部钙盐沉积, 促进骨折愈合。Midy¹⁸发现VEGF对体外培养的成骨细胞无增殖的作用, 但能引发成骨细胞的迁移及分化, 且引起成骨细胞迁移及分化所需的浓度比骨形态发生蛋白(BMP-2)还低100倍, 从而推测VEGF在骨折愈合中可能起重要作用, 并提出有必要进一步研究VEGF在骨折修复中的作用。此外, VEGF通过改善骨折周围软组织的血供促进软组织修复间接促进骨折愈合。

五、VEGF在骨折治疗中的前景及存在问题

临床上存在一些难治性骨折, 比如老年人骨折、股骨颈骨折、胫骨中下段骨折以及合并有软组织严重损伤甚至软组织缺损的骨折等, 这些骨折血供很差, 难以愈合。另外, 治疗中不适当的复位固定加重血供损伤, 以及代谢遗传疾病使骨折发生骨延迟愈合乃至骨不连, 此时, 如能改善骨折局部的血供, 则为骨折加速愈合提供了可能。VEGF能够促进内皮细胞增殖及血管形成, 从而有利于恢复骨折部位血供。基于这一前提, 使用VEGF治疗骨折为临床提供了新的途径。目前利用生长因子治疗疾病主要有两种: 一种是外源性生长因子直接作用于病变局部发挥治疗作用, 另一种是利用生长因子基因转染来获得病变局部表达进行治疗。两者各具优缺点, 前者方法简单, 操作方便, 可将VEGF直接用于骨折局部, 但存在半衰期短、所需剂量大以及可能产生毒副作用等而限制临床应用; 应用基因转染治疗, 其优点在于持续分泌生长因子且维持一定的浓度, 从而有效的促进骨折的愈合。这种促进骨折愈合的转基因疗法目前正成为骨科的研究热点。Mehrra等¹⁹将TG β 及Lac基因转入成骨细胞及体内骨组织, 发现成骨细胞及骨组织VEGF的表达均明显增高, 而且骨骺区增厚, 钙化, 表明基因治疗骨折正成为可能。如果

将VEGF基因转染成骨细胞或者骨髓基质细胞,然后再将细胞转至骨折部位,或者VEGF的表达质粒直接转染骨折部位,则局部表达的VEGF就有可能通过促血管生成而促进骨折愈合。不过,虽然骨折的基因疗法初步实验结果振奋人心,展现出广阔的应用前景,但是也应该看到,影响骨折愈合的因子众多,VEGF只是其中之一,虽然理论上它可促进骨折愈合,但VEGF作为单独的作用因子对骨折愈合究竟有多大的作用还有待进一步研究,而且如何控制VEGF基因表达、何时表达,以多大强度表达目前都不得而知,另外,基因疗法的致瘤可能性也应引起实验者的关注。尽管如此,利用VEGF治疗骨折毕竟为难治性骨折的治疗提供了一种理论上可行的方法。

参考文献:

- 1 Zhan QX, Magovern CJ, Mack CA, et al Vascular endothelial growth factor angiogenesis[J]. J Surg Res, 1997, 67: 147- 154
- 2 Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, et al Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21. 3 J. Circulation, 1996, 93(8): 1493 - 1495
- 3 Lei J, Jiang A, Pei D. Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth factor: VEGF183 J. Biochem Biophys Acta, 1998, 1443(3): 4000- 4006
- 4 Dvorak HF, Brown LF, Detmar, et al Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypervascularity, and angiogenesis[J]. Am J Pathol, 1995, 146: 1029- 1039
- 5 Breier G, Albrecht D, Sterrer S, et al Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation[J]. Development, 1992, 114: 521- 532
- 6 Severinghaus JW. Hypothetical roles of angiogenesis osmotic swelling, and ischemia in high- altitude cerebral[J]. J Appl Physiol, 1995, 79: 375- 379
- 7 Shifren TL, Doldi N, Ferrara N, et al In the human fetus vascular endothelial growth factor is expressed in epithelial cells and myocytes, but not vascular endothelium: Implications for mode of action[J]. J Clin Endocrinol, Metab, 1994, 79(7): 316- 322
- 8 Steinbrech DS, M ehrara BJ, Saadeh PB, et al Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblast in vitro[J]. Plast Reconstr Surg, 1999, 104: 738- 747.
- 9 初同伟, 王正国, 朱佩芳, 等 骨折愈合过程中血管内皮生长因子及其受体的表达[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(6): 344- 346
- 10 John S, Desmond W, Jiang H W, et al Is human fracture hematoma inherently angiogenic[J]. Clinical Orthopaedics And Related Research, 2000, 378: 224- 237.
- 11 Levy A P, Levy N S, Goldberg M A. Posttranscriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia[J]. J Biol Chem, 1996, 271: 2746- 2653
- 12 Brogi E, Schatteman G, Wu T P, et al Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression[J]. J Clin Invest, 1996, 97(2): 469- 476
- 13 Spector JA, M ehrara BJ, Greenwald JA, et al Osteoblast expression of vascular endothelial growth factor is modulated by the extracellular microenvironment[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 280(1): C72- 80
- 14 Ferrar N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis[J]. Kidney Int, 1999, 56: 794- 814
- 15 Dudziak M E, Saadeh P B, M ehrara B J, et al The effects of ionizing radiation on osteoblast- like cells in vitro[J]. Plast Reconstr Surg, 2000, 106(5): 1049- 1061.
- 16 Theiss S M, Boden S D, Hair G, et al The effect of nicotine on gene expression during spine fusion[J]. Spine, 2000, 25(20): 2588- 2594
- 17 Schlaeppli J M, Gutzw iller S, Finken zeller G, et al 1, 25- Dihydroxyvitamin D3 induces the expression of vascular endothelial growth factor in osteoblastic cells[J]. Endocr Res, 1997, 23(3): 213- 229
- 18 M ehrara B J, Saadeh P B, Steinbrech D S, et al Adenovirus- mediated gene therapy of osteoblasts in vitro and in vivo[J]. J Bone Miner Res, 1999, 14(8): 1290 - 1301.

收稿日期: 2002-04-30

作者简介: 陈 明(1972-), 男, 1995年毕业于同济医科大学, 现博士在读

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅 !