

文章编号:1004-7220(2015)06-0547-06

血管内皮生长因子对尾吊大鼠后肢胫骨骨丢失的影响

王宇星¹, 刘天亚^{1*}, 樊瑜波^{1,2}

(1. 北京航空航天大学 生物与医学工程学院, 教育部生物力学与力生物学重点实验室, 国际植介入医疗器械转化研究中心, 北京 100191; 2. 国家康复辅具研究中心, 北京 100176)

摘要: **目的** 探究血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)对废用性骨丢失的影响。**方法** 建立尾吊大鼠的动物模型,并随机平均分为尾吊盐水组、尾吊 VEGF 组、对照盐水组、对照 VEGF 组。实验过程中,每周两次对大鼠右腓肠肌注射 VEGF 或者等量的生理盐水,4 周后通过 micro-CT 对大鼠胫骨近端进行扫描,以松质骨和皮质骨骨密度(bone mineral density, BMD)、骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb. N)、骨小梁间距(Tb. Sp)和结构模型指数(SMI)等松质骨微结构参数以及皮质骨厚度作为评价指标,探讨 VEGF 对尾吊大鼠后肢胫骨骨丢失的影响。**结果** 与对照组大鼠相比,尾吊组大鼠松质骨表观 BMD、BV/TV、Tb. N 以及皮质骨厚度均显著降低,Tb. Sp 与 SMI 显著升高,尾吊会造成大鼠的骨丢失,而注射 VEGF 能够缓解尾吊大鼠松质骨的骨丢失。**结论** 血供的改变可能与骨重建之间存在着一定的联系,改善血供有助于对抗废用性的骨丢失。

关键词: 血管内皮生长因子; 骨丢失; 尾吊; CT 扫描

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2015.06.547

Effects of vascular endothelial growth factor on bone loss of the proximal tibia in tail-suspended rats

WANG Yu-xing¹, LIU Tian-ya^{1*}, FAN Yu-bo^{1,2} (1. Key Laboratory for Biomechanics and Mechanobiology of Ministry of Education, International Research Center for Implantable and Interventional Medical Devices, School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China; 2. National Research Center for Rehabilitation Technical Aids, Beijing 100176, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on disused bone loss. **Methods** Tail-suspended (TS) rat models were established and evenly divided into TS + Saline group, TS + VEGF group, CON + Saline group and CON + VEGF group. During the experiment, VEGF or equivalent amount of saline was injected into the gastrocnemius muscle of the rats' right tibia twice a week for each rat. After four weeks, the proximal tibia of the rats was scanned by micro-CT. The bone mineral density (BMD) of the trabecular bone and cortical bone, micro-structure parameters of the trabecular bone, such as bone volume per trabecular volume (BV/TV), tabecular number (Tb. N), trabecular spacing (Tb. Sp), structure model index (SMI), and cortical thickness were used as evaluation indices to study the influence of VEGF on bone loss in the proximal tibia of tail-suspended rats. **Results** Compared with the control rats, in tail-suspended groups, the apparent BMD, BV/TV, Tb. N, SMI of trabecular bone and the cortical thickness all decreased significantly, while the Tb. Sp and SMI significantly increased, which showed that tail suspension would cause bone loss, while the injection of VEGF would alleviate the loss of trabecular bone in tail-suspended rats. **Conclusions** There might exist some relationship between the status of blood supply and bone remodeling process, and by improving the status of vascular system, the disused bone loss can be alleviated.

Key words: Vascular endothelial growth factor (VEGF); Bone loss; Tail suspension; CT scan

收稿日期:2015-01-21; 修回日期:2015-03-04

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2011CB710901), 国家自然科学基金项目(11120101001, 11421202)。

通信作者:樊瑜波, 教授, E-mail: yubofan@buaa.edu.cn。

* 为共同第一作者

力学刺激对于维持骨骼生长与吸收的动态平衡具有非常重要的作用。在失重、卧床等情况下,外界力学载荷的缺失会引发废用性的骨丢失,即缺乏力学刺激所引起的骨量降低与骨微结构改变。骨丢失能产生许多不利的影响,例如宇航员经过一段时间的太空飞行后,会因为骨量的严重丢失而增加骨折风险,进而限制其在低重力环境下的工作时间。长期卧床患者也会因为运动不足而发生骨丢失,增加康复的难度,并有可能在其下地后造成骨折。运动锻炼是缓解此类骨丢失的常用措施。然而,有研究表明,尽管锻炼可以在一定程度上减轻宇航员与卧床病人骨丢失的程度,但并不能将其完全消除^[1-2]。动物实验也发现,振动等力学刺激可以有效减轻但不能完全消除大鼠因尾吊而引起的废用性骨丢失^[3-4]。此外,值得注意的是,无论是在日常生活还是在太空飞行、长期卧床等情况下,颅骨都不承重,但是颅骨骨密度(bone mineral density, BMD)却在这些情况下有所增加^[2]。上述研究表明,除了外界的力学载荷,还有其他因素影响失重环境下的骨重建。因此,为了更好地对抗骨丢失,有必要对这些因素进行研究。

太空及卧床情况下血液的重分布可能是上述骨量变化的原因之一。Revell等^[5]通过结扎大鼠后肢静脉使后肢得到更多的血液分布,并发现静脉结扎能够促进骨生长并加速骨愈合。Burgula等^[6]采用该方法也成功地降低了尾吊大鼠的骨丢失。虽然这些研究在一定程度上揭示了血供和骨丢失之间的关系,但是静脉结扎不可避免地会引起创伤等问题,以此为基础的应用空间有限。因此,需要在无创情况下,进一步研究改变血供和对抗骨丢失之间的关系。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是血管内皮细胞特异性的分裂刺激剂,可以促进血管生长,从而增加局部血供。由于VEGF的促血管作用,有学者开始研究VEGF对骨折愈合的作用。动物实验发现,使用VEGF可以明显促进骨损伤修复^[7]。而细胞学实验发现,应用VEGF同样会明显促进骨生成^[8]。而当抗体阻滞VEGF受体时,血管再生受到抑制,骨生成也会降低^[9]。此外,使用VEGF能够增加成骨细胞的迁移和分化^[10],与VEGF有关的基因表达能够诱导骨生成^[11]。

上述研究提示,VEGF对于骨组织的修复具有促进作用。但是,目前尚不清楚VEGF是否也有助于对抗力学刺激不足所引起的骨丢失。尾吊(tail suspension, TS)大鼠是一种典型的模拟废用性骨丢失的动物模型,能够在无创条件下,使大鼠后肢骨产生明显的骨丢失。因此,本课题组采用该动物模型,以micro-CT扫描得到的大鼠胫骨近端BMD和微结构参数作为评价指标,研究VEGF对废用性骨丢失的对抗作用。

1 材料与方法

选用40只雄性Sprague-Dawley鼠,7~8周鼠龄,体重209~253g。本实验由北京航空航天大学动物实验伦理委员会批准。

大鼠自购买之日起在实验室正常饲养5d后,随机分为尾吊组和对照组。其中,尾吊盐水组(TS + Saline)10只,组内大鼠进行连续尾吊并注射生理盐水;尾吊VEGF组(TS + VEGF)10只,组内大鼠进行连续尾吊并注射VEGF;对照盐水组(CON + Saline)10只,正常饲养并注射生理盐水;对照VEGF组(CON + VEGF)10只,正常饲养并注射VEGF。所有大鼠均在相同的灯光和温湿度条件下独笼饲养,并饲喂标准鼠粮和饮水。实验中尾吊大鼠自由进食,每天记录其进食数量,并据此采用配对饲养法控制对照组的能量摄入。尾吊的具体操作沿用本课题组之前研究中所采用的方法^[12]。实验过程中,每周两次对大鼠右腓肠肌注射2.8 mg/L的VEGF或者等量的生理盐水,每次注射0.1 mL,并在第4周结束时采用micro-CT(SkyScan1076,比利时)对其胫骨近端进行扫描。两个对照组中各有1只大鼠未能完成实验,两个尾吊组中大鼠均完成实验。

采用micro-CT对大鼠胫骨近端进行扫描时,大鼠水平置于样品腔中,后肢用泡沫塑料固定,沿着身体长轴方向扫描。扫描参数为70 kV、140 μ A,分辨率为18.79 μ m。对大鼠进行扫描前,先扫描0.25和0.75 g/cm³羟基磷灰石标准件,以便对BMD分析进行校准。

松质骨的分析域开始于1、2级松质骨的分界处,并从该分界线所在的图像层开始,向骨干方向延伸80层(1.503 mm)。在横截面图上,沿着皮质骨边界描画出松质骨所在区域作为分析域。在选取同

一样本的皮质骨分析域时, 为保证数据分析的一致性, 仍以 1、2 级松质骨分界处为基准, 向骨干方向延伸的第 300 层为起始层, 再延伸至第 350 层为结束层。在横截面图上, 沿皮质骨描画出皮质骨分析域 (见图 1)。

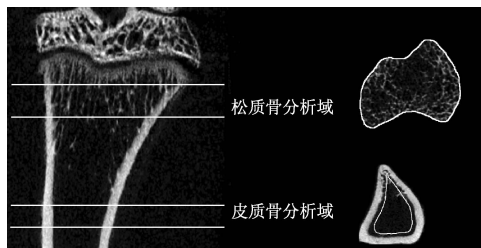


图 1 松质骨、皮质骨分析域示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the region of interest for trabecular bone and cortical bone

确定松质骨分析域之后, 对图像进行二值化, 选取灰度为 75 ~ 255 的部分作为松质骨。采用 CT Analyzer 软件计算松质骨 BMD 与微结构参数。根据羟基磷灰石标准件的扫描结果, 标定图像灰度与 BMD 之间的关系后, 计算分析域内表观 BMD (apparent BMD) 和骨质 BMD (material BMD)。表观

表 1 实验开始和结束时每组中大鼠平均体重

Tab. 1 The average body weight of rats in each group in the beginning and at the end of the experiment

时间	体重/g			
	TS + Saline 组	TS + VEGF 组	CON + Saline 组	CON + VEGF 组
实验开始时	232.71 ± 4.31	224.00 ± 2.75	232.03 ± 4.00	226.96 ± 2.65
实验结束时	284.24 ± 3.81	281.20 ± 5.95	289.18 ± 6.40	280.40 ± 11.66

BMD 为分析域内全部骨量除以分析域体积, 是表征骨丢失的一个重要参数; 骨质 BMD 为骨质本身的平均密度, 表征骨的材料属性。利用 Analyzer 软件 3D 分析工具, 计算松质骨的微结构参数: 骨体积分数 (BV/TV)、骨小梁数量 (Tb. N)、骨小梁间距 (Tb. Sp) 和结构模型指数 (SMI)。其中, BV/TV 与 Tb. N 是表征松质骨体积以及骨小梁数量的重要参数, BV/TV 可以反映松质骨中棒状骨与板状骨的相对比例, 而 Tb. Sp 则对尾吊大鼠的骨丢失具有较高敏感性^[13]。对于皮质骨, 分析其平均厚度 (cortical thickness) 和骨质 BMD。

所有数据用均值 ± 标准差表示。采用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析 (One-way ANOVA)。P < 0.05 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

实验末, 各组内的大鼠体重均有所增加, 组间差异不显著 (见表 1)。

图 2 所示为各组大鼠分析域内骨小梁的三维结构。两个尾吊组大鼠松质骨出现明显的骨丢失, 且 TS + Saline 组骨丢失最为严重。

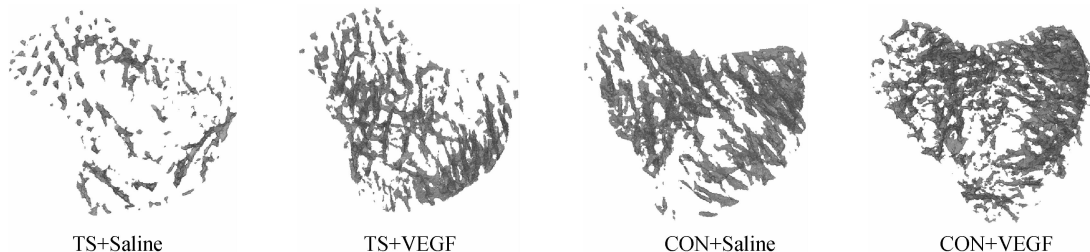


图 2 实验结束时各组分析域内骨小梁的三维视图

Fig. 2 The 3D visualization of the trabecular structure within the region of interest at the end of experiment

图 3 所示为松质骨 BMD 与微结构参数的统计结果。与对照组相比, 两个尾吊组均出现明显的骨丢失, 但 TS + VEGF 组的表观 BMD 显著高于 TS +

Saline 组, 这与图 2 中的定性结果相一致; 而 4 组间的骨质 BMD 无显著性差异, 说明骨丢失主要是由结构变化引起, 骨质本身的骨矿材料变化不明显。在

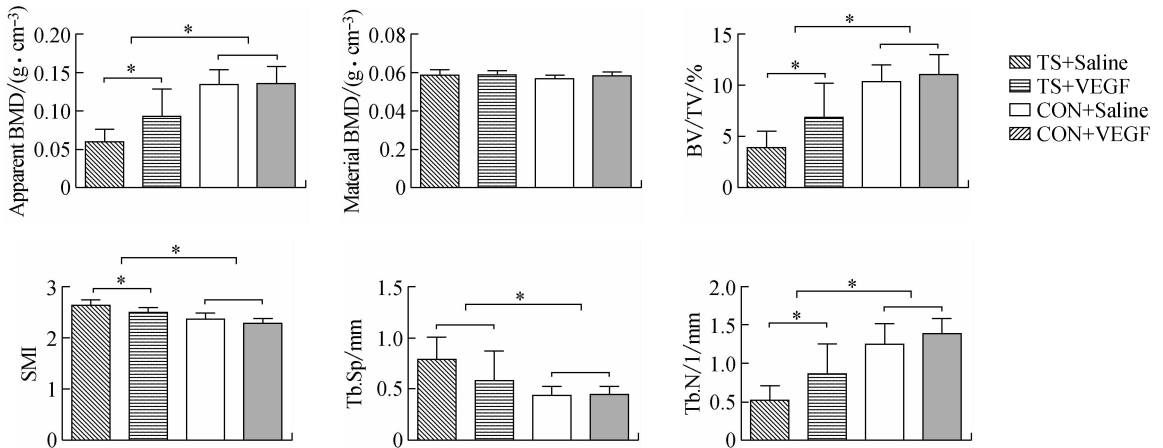


图3 松质骨 BMD 和微结构参数的统计分析 ($P < 0.05$)

Fig. 3 Statistical analysis of the trabecular BMD and micro-structure parameters at the end of experiment

微结构参数上,两个尾吊组之间 BV/TV、Tb. N、SMI 存在显著性差异,且尾吊组与对照组相比,各参数均存在显著性差异,但 CON + VEGF 组与 CON + Saline 组之间无显著性差异。

图4所示为皮质骨厚度与骨质 BMD 的统计结果。对于皮质骨而言,尾吊使得皮质骨厚度出现显著性降低,但 TS + Saline 组与 TS + VEGF 组之间皮质骨厚度没有显著性差异。皮质骨的骨质 BMD 组间差异同松质骨类似,也不存在显著性差异。由于在图像上皮质骨和松质骨骨质的灰度不同,故计算得到的皮质骨的骨质 BMD 大于松质骨的骨质 BMD。

4 讨论

本研究分析了 VEGF 对尾吊大鼠后肢废用性骨丢失的对抗作用,以探索血液循环系统对骨重建的影响。根据 micro-CT 扫描图像,计算得到胫骨近端松质骨表观 BMD、骨质 BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Sp 和 SMI 等参数以及胫骨骨干处皮质骨厚度与骨质 BMD。实验结果表明,VEGF 能够缓解尾吊大鼠松质骨的骨丢失,但对皮质骨的骨丢失作用不显著。不论是对于松质骨还是皮质骨,各组间骨质 BMD 都没有显著性变化。因此,尾吊大鼠的骨丢失主要体现在结构的变化上。另外,在正常饲养情况下,VEGF 对骨生成并没有显著的促进作用。

有关 VEGF 对抗废用性骨丢失的机制,分析如下:首先,VEGF 作为血管生成的诱导剂,能够促进血管生成。新生血管促进营养物质的供应和废物的清除,从而提高骨组织的代谢活动。在尾吊情况下,大鼠的血液发生了重分布,下肢供血减少^[6],新生血管的物质输运效果就相对而言显得较为重要。其次,VEGF 可能通过提高血管的渗透性影响骨细胞周围的流体动力学环境。众所周知,骨细胞浸润在骨间隙液里。骨间隙液来源于毛细血管的动脉端,流过骨陷窝及骨小管网络,最终汇入静脉或外周淋巴系统^[14]。这种骨间隙液流可能是骨细胞感受力学刺激的一个机制^[15-18]。随着血管渗透性的增加,骨间隙液的流速可能会增加,流量也可能会增大。虽然这种渗流的幅值小于外界载荷引发的流动幅

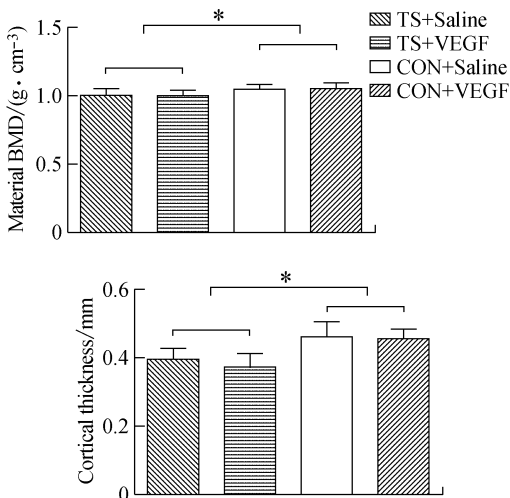


图4 皮质骨骨质 BMD 及厚度的统计分析 ($P < 0.05$)

Fig. 4 Statistical analysis of material BMD and thickness of the cortical bone at the end of experiment

值^[19-20],在正常情况下渗流并不发挥主要作用,但是在不承载情况下,由外界力学刺激所引起的骨间隙液流会减小甚至消失,此时由于渗透性改变所产生的渗流变化的影响就可能比较突出地显现出来。这与本实验中 VEGF 可以对抗尾吊引起的骨丢失但在正常饲养情况下却没有显著性影响的结果相一致。最后,虽然 VEGF 是血管内皮细胞的特异性生长刺激剂,但是其对成骨细胞^[7,10]和破骨细胞^[21]的转移和分化也会产生一定影响,其具体的机制目前尚不明确。但从本实验的结果可以看出,缺少外界力学刺激并不会阻断 VEGF 的作用。

此外,虽然外界力学刺激的缺失并不会阻断 VEGF 对抗骨丢失的作用,但是却会影响 VEGF 的表达。已有研究发现,尾吊大鼠的骨髓及骨膜内 VEGF 表达会降低^[22]。另外,在保持后肢不负重情况下,肌肉内 VEGF 受体的表达受到抑制^[23]。由于肌肉不是关注的重点,本文没有进行定量的分析,但根据已有文献可知,尾吊可以引起肌肉的萎缩^[24]。因此,血流环境的变化与肌肉的适应性改变也值得后续开展研究。

本研究存在一定的局限性。首先,因实验条件限制,血管渗透性等参数未能直接测量,虽然相关数据可以参考已有文献,如果有实际测量的数据,无疑能更有效地说明问题。其次,虽然证实了 VEGF 对废用性骨丢失具有对抗作用,但该对抗作用对于年龄以及激素变化引起的骨丢失是否仍然有效还有待进一步研究。并且需要注意的是,与太空特殊力学环境下的骨丢失不同,对于临床上常见的骨质疏松病人而言,椎体松质骨的骨丢失最为明显,故血供对椎体骨丢失的影响也需要更多的研究才能说明,后续可以通过四环素或者钙黄绿素进行标记而更好地分析骨重建的过程。此外,虽然证实了 VEGF 对废用性骨丢失的对抗作用,但并未阐明其机制,无法说明这种对抗作用是因为改变了骨细胞周围的力学微环境,还是因为 VEGF 及其相关产物对骨细胞造成了刺激。进一步说明这一问题,将有助于更好地了解血液循环系统与骨重建之间的关系。最后,实验中的分析域为手工描画,这是因为自动识别技术通常存在参数高估的问题,如果能够有可靠的软件对数据进行自动分析,将有助于提高数据的准确性。

综上所述,本研究发现 VEGF 能够缓解尾吊大

鼠的废用性骨丢失,提示血管系统及其血供可能对骨重建有重要作用。VEGF 对尾吊组的影响显著,但对对照组的影响不显著,其原因还有待进一步研究。此外,未来还需要分析在不承载情况下 VEGF 对抗骨丢失的机制。

参考文献:

- [1] Collet P, Uebelhart D, Vico L, et al. Effects of 1- and 6-month spaceflight on bone mass and biochemistry in two humans [J]. *Bone*, 1997, 20(6): 547-551.
- [2] Leblanc AD, Schneider VS, Evans HJ, et al. Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest [J]. *J Bone Miner Res*, 1990, 5(8): 843-850.
- [3] Sun LW, Luan HQ, Huang YF, et al. Effects of local vibration on bone loss in tail-suspended rats [J]. *Int J Sports Med*, 2014, 35(7): 615-24.
- [4] 高甲子, 宫赫, 方娟, 等. 利用生物力学方法评价振动在骨质疏松康复过程中的作用[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(4): 315-320.
Gao JZ, Gong H, Fang J, et al. Biomechanical assessment for effects of vibration on the rehabilitation process of osteoporosis [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(4): 315-320.
- [5] Revell WJ, Brookes M. Haemodynamic changes in the rat femur and tibia following femoral vein ligation [J]. *J Anat*, 1994, 184 (Pt 3): 625-633.
- [6] Bergula AP, Huang W, Frangos JA. Femoral vein ligation increases bone mass in the hindlimb suspended rat [J]. *Bone*, 1999, 24(3): 171-177.
- [7] Street J, Bao M, deGuzman L, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover [J]. *PNAS*, 2002, 99(15): 9656-9661.
- [8] Bai XF, Zhang X. Adenovirus-mediated VEGF gene therapy to improve bone healing: A comparison of *in vivo* and *ex vivo* approaches [J]. *J Hard Tissue Biol*, 2013, 22(1): 89-94.
- [9] Jacobsen KA, Al-Aql ZS, Wan C, et al. Bone formation during distraction osteogenesis is dependent on both VEGFR1 and VEGFR2 signaling [J]. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(5): 596-609.
- [10] Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts [J]. *Bone*, 2002, 30(3): 472-477.
- [11] Hiltunen MO, Ruuskanen M, Huuskonen J, et al. Adeno-

- virus-mediated VEGF-A gene transfer induces bone formation *in vivo* [J]. *FASEB J*, 2003, 17(9): 1147-1149.
- [12] Sun LW, Fan YB, Li DY, *et al.* Evaluation of the mechanical properties of rat bone under simulated microgravity using nanoindentation [J]. *Acta Biomater*, 2009, 5(9): 3506-3511.
- [13] Luan HQ, Sun, LW, Huang YF, *et al.* The application of micro-CT in monitoring bone alterations in tail-suspended rats *in vivo* [J]. *Advances in Space Res*, 2014, 53(11): 1567-1573.
- [14] Cowin SC. *Bone mechanics handbook* [M]. 2nd ed. New York: CRC Press, 2001: 22-23.
- [15] Piekarski K. Transport mechanism operating between blood supply and osteocytes in long bones [J]. *Nature*, 1977, 269(5623): 80-82.
- [16] Qin YX, Kaplan T, Saldanha A, *et al.* Fluid pressure gradients, arising from oscillations in intramedullary pressure, is correlated with the formation of bone and inhibition of intracortical porosity [J]. *J Biomech*, 36(10): 1427-1437.
- [17] Wang Y, McNamara LM, Schaffler MB, *et al.* A model for the role of integrins in flow induced mechanotransduction in osteocytes [J]. *PNAS*, 2007, 104(40): 15941-15946.
- [18] 关俊杰, 汪泱, 张长青, 等. 初级纤毛在骨组织力学信号传导中的作用[J]. *医用生物力学*, 2013, 28(5): 580-584.
- Guan JJ, Wang Y, Zhang CQ, *et al.* The role of primary cilium in bone tissue mechanotransduction [J]. *J Med Biomech*, 2013, 28(5): 580-584.
- [19] Tate MLK, Steck R, Forwood MR, *et al.* *In vivo* demonstration of load-induced fluid flow in the rat tibia and its potential implications for processes associated with functional adaptation [J]. *J Exp Biol*, 2000, 203(18): 2737-2745.
- [20] Li W, Gardinier JD, Price C, *et al.* Does blood pressure enhance solute transport in the bone lacunar-canalicular system? [J]. *Bone*, 2010, 47(2): 353-359.
- [21] Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, *et al.* Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones [J]. *J Cell Biol*, 2000, 151(4): 879-889.
- [22] Vico L. VEGF and bone formations: New perspectives [J]. *Eur Cells Mater*, 2007, 14(Suppl1): 32.
- [23] Wagatsuma A. Effect of hindlimb unweighting on expression of hypoxia-inducible factor-1 α vascular endothelial growth factor, angiopoietin, and their receptors in mouse skeletal muscle [J]. *Physiol Res*, 2008, 57(4): 613-620.
- [24] 但建波, 蒋文涛, 刘展, 等. 压力和尾吊对大鼠骨骼肌生长的影响[J]. *医用生物力学*, 2013, 28(2): 189-194.
- Dan JB, Jiang WT, Liu Z, *et al.* Effect of pressure and tail suspension on the growth of rat skeletal muscle [J]. *J Med Biomech*, 2013, 28(2): 189-194.