

· 临床研究论著 ·

血管内皮生长因子和骨形态发生蛋白-2 在糖尿病病人骨组织内表达水平的研究

张艳¹ 李莹¹ 张雪松²

【摘要】 目的 探讨血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)在糖尿病病人胫骨组织内的表达水平。**方法** 在胫骨高位截骨术中,分别获取糖尿病病人(8例)和非糖尿病病人(8例)术部骨组织,从骨组织中提取总蛋白及RNA,用Western blot、RT-PCR检测骨组织中VEGF、BMP-2的表达水平。**结果** 糖尿病病人骨组织中VEGF、BMP-2蛋白和mRNA表达水平均明显低于非糖尿病病人。**结论** 糖尿病病人骨组织中VEGF、BMP-2因子表达低于正常水平,VEGF、BMP-2因子可能是影响糖尿病病人骨质及骨愈合的重要因素之一。

【关键词】 糖尿病;胫骨高位截骨术;血管内皮生长因子;骨形态发生蛋白-2

Expression of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 in bone tissue of diabetic patients. ZHANG Yan¹, LI Ying¹, ZHANG Xue-song². ¹Department of Rehabilitation, Tangshan Second Hospital, Tangshan 063000, China; ²Department of Joint, Tangshan Second Hospital, Tangshan 063000, China

Corresponding author: ZHANG Xue-song, E-mail: yysw1122@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in the tibia of diabetic patients. **Methods** In the high osteotomy of the humerus, the bone tissues of diabetic patients (8 cases) and non-diabetic patients (8 cases) were obtained respectively. Total protein and RNA were extracted from bone tissue, and VEGF and BMP-2 in total bone tissue were detected by Western blot/RT-PCR. **Results** The expression levels of VEGF, BMP-2 mRNA and protein in bone tissue of diabetic patients were significantly lower than those in non-diabetic patients. **Conclusion** The expression of VEGF and BMP-2 in bone tissue of diabetic patients is lower than normal level. VEGF and BMP-2 may be one of the important factors affecting bone and bone healing in diabetic patients.

【Key words】 Diabetes; High osteotomy; Vascular endothelial growth factor; Bone morphogenetic protein-2

在我国,一些慢性病如糖尿病的发病率越来越高。而由糖尿病引起的并发症对人类的危害也越来越严重。糖尿病病人高位截骨术后难愈合的问题一直困扰着病人。骨愈合是骨组织的自我修复过程,机制复杂,虽然骨再生能力强,但是临床上骨折不愈合率仍很高^[1]。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)属于转化生长因子- β 超家族成员,主要参与骨折愈合过程的因子有BMP(s, e, g, 2, 7),其中BMP-2是成骨作用最强的因子。BMP-2不仅可以促进成骨细胞及其前体细胞的增殖、促进骨

细胞钙化,并且能够促进成骨细胞分化,进而发挥成骨细胞的成骨作用,增加骨量,修复骨损伤,在骨愈合机制中起到重要作用。血管生成是伤口愈合、癌症以及各种局部缺血和炎症疾病的标志。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种促使血管生长的因子,能与血管内皮细胞特异性地结合,促使新血管生成^[2-4]。本研究主要探讨了糖尿病病人骨组织中VEGF、BMP-2的表达水平,为后续临床治疗提供理论基础。

资料与方法

一、病例选择

选择2017年1月至12月于我院骨科进行高位截骨术治疗的病人,分为糖尿病组和非糖尿病组。糖尿病组选择条件为:①年龄在40~70岁;②2型糖

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2019.06.009

作者单位:1. 唐山市第二医院康复内科,河北唐山 063000; 2. 唐山市第二医院关节一科,河北唐山 063000

通信作者:张雪松, E-mail: yysw1122@163.com

尿病史 2~20 年;③无高血压、高血脂、严重肝肾功能不全、恶性肿瘤。非糖尿病组选择条件为:①年龄在 40~70 岁;②无糖尿病病史;③无高血压、高血脂、严重肝肾功能不全、恶性肿瘤。

经过以上标准共筛选出 8 例糖尿病病人,平均年龄为 51.78 岁,其中病史 2~5 年共计 2 例,6~20 年共计 6 例;非糖尿病病人 8 例,平均年龄为 55.43 岁。本研究经唐山市第二医院医学伦理委员会批准(2017-0134),获取骨组织经过病人本人及家属知情并签署同意书,在不影响手术效果的前提下获取部分骨组织开展研究,对病人无任何伤害。两组病人间性别、年龄、身体质量指数(body mass index, BMI)、空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)的差异均无统计学意义($P > 0.05$, 表 1)。

二、试剂和仪器

一抗 VEGF、BMP-2、 β -actin(Proteintech 公司,美国),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,中国),蛋白提取及定量试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,中国),Trizol、氯仿(重庆化学试剂厂,中国),ECL 发光液(北京普利莱基因技术有限公司,中国);逆转录试剂盒、转染试剂盒(TRANS 公司,美国),收集的标本均保存于 $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱(海尔公司,中国)。Western blot 分析仪 C400 曝光仪(AZURE 公司,美国),Western blot 电泳、转膜系统(Bio-Rod 公司,美国),冷冻高速离心机(HERMLE 公司,德国)。

三、方法

(一)骨组织总蛋白提取

将获取的骨组织用 PBS 冲洗干净,再用锡纸包裹骨组织,先将骨组织置于 $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置 12 h,再放入液氮中保存,待收集的骨组织达到一定数量后开始提取蛋白。采用单纯研磨法将骨组织磨成粉末状,将粉末状骨组织收集到 1.5 ml 的 EP 管中,随后向 EP 管中加入蛋白裂解液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min,其中每隔 10 min 震荡 30 s,移至新的 EP 管中, $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$

$4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,将上清液吸到新的 EP 管中放置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暂存。用 BCA 法测定蛋白浓度并进行定量分装保存至液氮中待用。

(二)Western blot 检测 VEGF、BMP-2 蛋白表达

配置 12% 的分离胶和 5% 浓缩胶,加入 $100\ \mu\text{g}$ 蛋白, $80\ \text{mV}$ 电泳一段时间后, $120\ \text{mV}$ 电泳至结束。 $300\ \text{mA}$ 转膜 30~60 min,用 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h,封闭结束后放入一抗孵育盒,室温孵育 3~4 h,用 PBST 洗膜液洗膜 3 次,每次 10 min,放入二抗孵育盒室温孵育 1 h,用 PBST 洗膜液洗膜 3 次,每次 10 min,吸干膜上液体加入 ECL 发光液,放入曝光仪检测结果保存数据。

(三)RT-PCR 检测骨组织中 VEGF、BMP-2 mRNA 转录水平的表达

将获取的骨组织研磨至粉末状后加入 Trizol,随后加入氯仿,混匀后室温放 5 min。 $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,转移上层水相并加入异丙醇,混匀静置后 $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,用无水乙醇洗 3 次,干燥后加入焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水,测其浓度后储存。引物序列:BMP-2 上下游引物序列分别为 $5\text{'-CTTCTAGCGTTGCTGCT-3'}$ 和 $5\text{'-AGTGCCTGCGATACAGGTCT-3'}$; VEGF 上游引物: $5\text{'-GGCAGCTTGTAACGAAC-3'}$; 下游引物: $5\text{'-TGGTGACATGGTTAATCGGTC-3'}$,均由美国 Invitrogen 公司合成提供。通过 RT-PCR 检测其 mRNA 表达水平,进行相对定量,实验结果重复 3 次以上。

四、统计学分析

数据使用 SPSS 19.0 统计软件(IBM 公司,美国)分析,计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。数据满足正态分布且方差齐性,两组间计量资料比较用独立样本 t 检验,不满足则作非参数秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、Western blot 检测 BMP-2、VEGF 蛋白的表达如图 1、2 所示,与非糖尿病组比较,糖尿病组

表 1 两组病人基线资料比较

| 组别 | 例数 | 性别 (男/女,例) | 年龄 ($\bar{x}\pm s$,岁) | BMI ($\bar{x}\pm s$, kg/m^2) | FPG ($\bar{x}\pm s$, mmol/L) |
|---------------|----|---------------|----------------------------|--|--|
| 糖尿病组 | 8 | 3/5 | 51.78 \pm 6.95 | 23.61 \pm 1.21 | 6.25 \pm 1.11 |
| 非糖尿病组 | 8 | 4/4 | 55.43 \pm 8.39 | 23.19 \pm 0.89 | 6.13 \pm 1.01 |
| $t(\chi^2)$ 值 | - | 1.120 | 0.728 | 0.199 | 0.159 |
| P 值 | - | 0.574 | 0.479 | 0.845 | 0.876 |

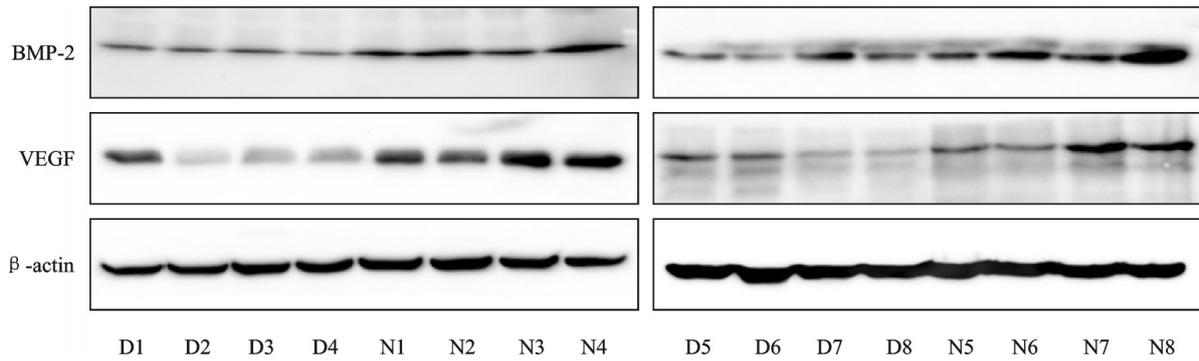


图 1 Western blot 检测骨组织中蛋白表达水平(D1~D8 为糖尿病组, N1~N8 为非糖尿病组)

BMP-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), VEGF 蛋白表达量也明显减少 ($P < 0.05$)。实验结果提示, 糖尿病病人胫骨骨组织中 BMP-2、VEGF 蛋白表达水平较非糖尿病病人明显降低。

二、RT-PCR 检测骨组织中 VEGF、BMP-2 mRNA 的表达水平

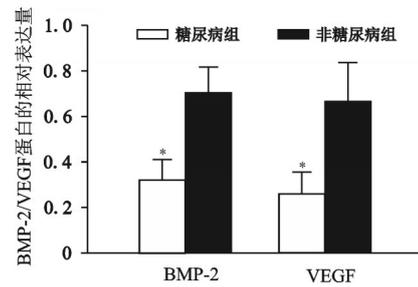
以糖尿病高位截骨术病人和非糖尿病高位截骨术病人的 cDNA 为模板, 通过 RT-PCR 检测骨组织中 VEGF、BMP-2 mRNA 表达水平, 结果如图 3、4 所示, 与非糖尿病组比较, 糖尿病组 BMP-2 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), VEGF mRNA 表达量明显减少 ($P < 0.05$)。结果提示, 糖尿病病人胫骨骨组织中 BMP-2、VEGF mRNA 表达水平较非糖尿病病人明显降低, 结果与蛋白检测一致。

三、X 线检查

通过 Western blot、RT-PCR 实验结果, 我们筛选出结果较为明显的 4 例病人, 调出 X 线片, 如图 5 所示, 糖尿病组骨质疏松程度明显高于非糖尿病组。

讨 论

糖尿病是一类由遗传、环境、社会压力、肥胖、胰岛素不足、肠道菌群异常等多种因素相互作用引起的一种慢性疾病^[5,6]。近年来研究表明, 糖尿病不仅能够引起人体内各脏器的异常、骨代谢异常、增加创伤引发感染的风险, 而且还普遍存在骨愈合困难、创面愈合困难等问题。以往的治疗方法集中在控制血糖水平、加强创面外科处理及抗感染等方面, 不能彻底解决骨愈合困难、创面愈合困难的问题^[7-9]。随着分子生物技术的发展, 一些生长因子对骨折后愈合、创面愈合的影响受到了国内外众多学者的关注。因此, 从生长因子的角度研究骨愈合困难、创面愈合困难的作用机制, 为如何防治、解决骨愈合困难及创面愈合困难奠定基础, 也为如何防



注: 与非糖尿病组比较, * $P < 0.05$

图 2 Western blot 检测骨组织中 BMP-2、VEGF 蛋白表达水平

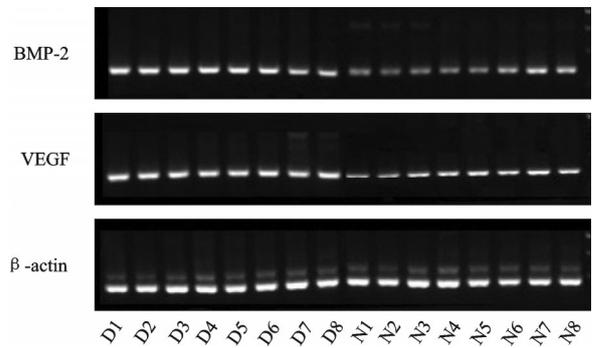
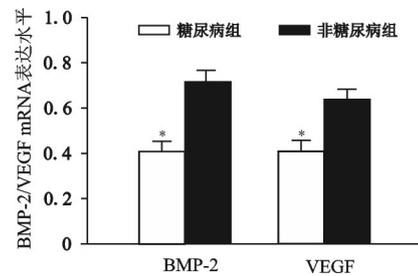


图 3 RT-PCR 检测骨组织中 BMP-2 和 VEGF mRNA 表达(D1~D8 为糖尿病组, N1~N8 为非糖尿病组)



注: 与非糖尿病组比较, * $P < 0.05$

图 4 RT-PCR 检测骨组织中 BMP-2 和 VEGF mRNA 的表达水平

治、解决骨愈合困难及创面愈合困难提供了新的思路, 与此同时也为后续临床治疗提供理论基础。

目前研究较多的生长因子主要有 VEGF、成纤维



图5 两组病人手术前后X线片资料,糖尿病组胫骨平台骨小梁较非糖尿病组稀疏 a,b:糖尿病病人(女);c,d:糖尿病病人(男);e,f:非糖尿病病人(女);g,h:非糖尿病病人(男)

细胞生长因子-β(fibroblast growth factor-β, FGF-β)、转化生长因子、BMP-2等。VEGF是促血管生长因子,也是内皮细胞的高度特异性促分裂原。研究表明,VEGF与多种血管形成性疾病有关,在增殖性糖尿病视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、微血管病变、糖尿病肾病、血管合并症中均起到重要作用^[10-13]。Neufeld等^[14]研究发现VEGF的7个家族成员(VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F和PLGF)中所共有的结构是VEGF同源性结构域,这些VEGF与其相应的受体结合后发挥增加血管通透性,刺激内皮细胞增殖、迁移和体内血管生成等生物学功能。VEGF通过结合其受体后能够激活多种信号通路,如促分裂原活化蛋白激酶、磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B, Rac信号通路等参与成骨分化及骨修复^[15]。骨折后血管再生对骨折的愈合起到重要作用,创伤后血管生成可有多种生长因子诱导,但只有VEGF特异作用于内皮细胞,促进其增殖和血管生成,并可增加血管通透性。微血管在骨折的愈合过程中不仅提供了必要的营养和生物学环境,而且直

接参与成骨作用^[16]。BMP蛋白是多功能蛋白,在机体生长发育过程中发挥着重要作用,研究报道BMPs通过结合BMP受体I和II从而激活下游Smad1/5/8,激活状态的Smad1/5/8通过与Smad4结合形成共聚体,继而与下游转录因子结合从而启动信号传导,从而调控细胞的增殖和分化^[17]。BMP-2是成骨作用最强的因子,BMP-2能够诱导未分化的间充质细胞不可逆地分化为成软骨细胞和成骨细胞,促进新骨形成。BMP-2不仅可以促进成骨细胞及其前体细胞的增殖、促进骨细胞钙化,并且能够促进成骨细胞分化,进而发挥成骨细胞强大的成骨作用,增加骨量,修复骨微损伤,在骨愈合机制中起到重要作用^[18,19]。但是对于VEGF、BMP与骨愈合、创面愈合之间的关系及分子机制目前还有待进一步研究^[20,21]。

本研究通过获取糖尿病和非糖尿病高位截骨术病人的骨组织,提取蛋白和RNA通过Western blot以及RT-PCR分别测定BMP-2、VEGF的蛋白和mRNA的表达水平,研究结果(图1~4)显示糖尿病组与非糖尿病组相比,BMP-2、VEGF在蛋白和

mRNA 水平的表达量均明显降低,且差异具有统计学意义,说明 BMP-2、VEGF 因子影响骨愈合。同时,我们选取年龄相近(均低于 55 岁)的糖尿病病人以及非糖尿病病人,查阅病历获取其 X 线片,结果显示糖尿病病人骨质疏松较为明显,非糖尿病病人无明显的骨质疏松症状。我们分析认为糖尿病引起的高血糖状态能激活碱性磷酸酶,导致氧化应激和炎症反应的发生,从而使炎症因子如白细胞介素-6 及肿瘤坏死生长因子- α 表达增加,使血管内皮细胞功能发生紊乱,VEGF、BMP 表达降低,最终影响微血管的形成,不能为局部组织提供必需物质,影响骨折愈合^[22-24]。糖尿病病人长期低表达 BMP-2、VEGF,影响骨质,导致病人出现骨质疏松,易出现骨折。与此同时本研究也存在不足之处,不能连续性检测在骨愈合过程中 BMP-2、VEGF 在不同时期变化水平,待后续继续深入研究。

综上所述,糖尿病病人骨组织内 BMP-2、VEGF 因子含量较正常人群表达量明显减少。我们推断糖尿病病人胫骨高位截骨术后骨愈合及创面愈合缓慢一定程度上受 BMP-2、VEGF 因子表达量的影响,具体机制有待后续深入研究。

参 考 文 献

- [1] 李莹,刘娜,张艳,等.不同降糖方法对糖尿病患者胫骨高位截骨术的影响[J].中国综合临床,2017,33(12):1071-1075.
- [2] 徐建民,王兆朋,王恒孝.骨形态发生蛋白-2 在兔骨折愈合过程中的作用[J].中国矫形外科杂志,2016,24(10):920-925.
- [3] 齐鹏鹏,于士洋,吴梓齐,等.血管内皮生长因子的研究进展[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2016,26(6):381-384,368.
- [4] Xu MT, Sun S, Zhang L, et al. Diabetes mellitus affects the biomechanical function of the callus and the expression of TGF- β 1 and BMP2 in an early stage of fracture healing[J]. Braz J Med Biol Res, 2016, 49(1): e4736.
- [5] Kolb H, Martin S. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes[J]. BMC Med, 2017, 15(1): 131.
- [6] 张国荣,刘海鸿,陶柯衡,等.肠道菌群与糖尿病的研究进展[J].中国微生态学杂志,2018,30(1):121-124.
- [7] García-Martín A, Rozas-Moreno P, Reyes-García R, et al. Circulating levels of sclerostin are increased in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(1): 234-241.
- [8] Azuma H, Kido J, Ikedo D, et al. Substance P enhances the inhibition of osteoblastic cell differentiation induced by lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*[J]. J Periodontol, 2004, 75(7): 974-981.
- [9] 芦浩,徐海林,姜保国,等.老年糖尿病患者踝关节骨折手术治疗的效果分析[J].中华骨与关节外科杂志,2016,9(4):283-286.
- [10] Huppertz B, Kingdom J, Caniggia I, et al. Hypoxia favours necrotic versus apoptotic shedding of placental syncytiotrophoblast into the maternal circulation[J]. Placenta, 2003, 24(2-3): 181-190.
- [11] Tomanek RJ, Ishii Y, Holifield JS, et al. VEGF family members regulate myocardial tubulogenesis and coronary artery formation in the embryo[J]. Circ Res, 2006, 98(7): 947-953.
- [12] Yonekura H, Sakurai S, Liu X, et al. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis[J]. J Biol Chem, 1999, 274(49): 35172-35178.
- [13] Simó R, Carrasco E, García-Ramírez M, et al. Angiogenic and anti-angiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy[J]. Curr Diabetes Rev, 2006, 2(1): 71-98.
- [14] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors[J]. FASEB J, 1999, 13(1): 9-22.
- [15] Koch S, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011, 2(7): a006502.
- [16] 王沫楠.基于血液供给条件和力学环境的骨折愈合仿真[J].自动化学报,2018,44(2):240-250.
- [17] Reddi AH, Reddi A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(5-6): 341-342.
- [18] 陈晓佩,吴天凤,郑和昕,等.骨折风险评估工具(FRAX)对中老年 2 型糖尿病患者骨折风险的预测价值[J].中华老年医学杂志,2015,34(2):168-170.
- [19] 周健强,付昆,李洪潮,等.糖尿病对股骨粗隆骨折患者围术期发生并发症影响的研究[J].重庆医学,2015,44(3):407-409.
- [20] Azad V, Breitbart E, Al-Zube L, et al. rhBMP-2 enhances the bone healing response in a diabetic rat segmental defect model[J]. J Orthop Trauma, 2009, 23(4): 267-276.
- [21] 张超,路坦,周迎峰.氧甾酮 133 和重组人骨形态发生蛋白-2 对兔后外侧腰椎模型中腰椎融合率的比较[J].中华实验外科杂志,2016,33(3):747-749.
- [22] 蔡龙,向川.1 型糖尿病对骨折愈合影响的研究进展[J].中华老年多器官疾病杂志,2018,17(10):797-800.
- [23] Domingueti CP, Dusse LM, Carvalho Md, et al. Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications[J]. J Diabetes Complications, 2016, 30(4): 738-745.
- [24] 康燕蓉,顾佩莉.2 型糖尿病、骨质疏松症、2 型糖尿病并发骨质疏松症患者血清胰岛素样生长因子-1 的检测及意义[J].海南医学院学报,2016,22(18):2097-2100.

(收稿日期:2019-03-11)

(本文编辑:龚哲妮)