

# 血管内皮细胞生长因子对兔异体重建后交叉韧带血管再生的影响\*



孙英华,王 莉,焦兆德

# Effect of vascular endothelial growth factor on vascular regeneration of reconstructed posterior cruciate ligament allograft transplantation in rabbits

Sun Ying-hua, Wang Li, Jiao Zhao-de

#### Abstract

**BACKGROUND:** Currently, the research of posterior cruciate ligament (PCL) construction mainly focuses on the surgical technique or graft selection. However, studies on vascular regeneration after construction are few, especially those on allograft construction. **OBJECTIVE:** To observe the effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on vascular regeneration of reconstructed PCL with femur-anterior cruciate ligament (ACL)-tibia allograft in rabbits.

**DESIGN, TIME AND SETTING:** The factorial design experiment was performed at the Orthopedics Laboratory of the Third Affiliated Hospital of Weifang Medical College from March 2006 to September 2007.

MATERIALS: Sixty-eight adult female Japanese white rabbits, weighing (3.3±0.1) kg, were adopted. Twenty-three of them were used to excide the femur-ACL-tibia complexes to establish the animal model of PCL reconstruction with allograft.

METHODS: Forty-five rabbits were randomly divided into 3 groups, 15 rabbits in each group. In the control group, no additional treatments were applied. In the phosphate-buffered saline (PBS) group, 0.2 mL of PBS was injected into the knee joint. In the VEGF group, 30 μg VEGF mixed with 0.2 mL PBS was injected into the knee joint.

MAIN OUTCOME MEASURES: The immunological rejection of allograft was observed after reconstruction. Five rabbits were randomly selected in each group at 3, 6, 12 weeks, respectively, for immunohistochemistry staining; and the microvessel density of the medio-one-third ligament part of allograft was evaluated with the Chalkley scoring method.

**RESULTS:** Forty-five rabbits were involved in the result analysis. There were no hydrops articuli or aneretic cartilage when every rabbit's knee joint was opened. The gross morphology of the grafts was similar to normal posterior cruciate ligament. Immunological rejection, such as degeneration, necrosis, dilapsus or defluxion was not appeared. Plenty of good vascular tissue in the arthrosis could be seen in the VEGF group, but could not be found in the control group or in the PBS group. The microvessel density score of the allograft in the VEGF group was higher than that in the control group and PBS group (P < 0.01). The microvessel density score of the allograft at 6 weeks was higher than that at 3 weeks and 12 weeks (P < 0.01), and at 12 weeks was lower than that at 3 weeks (P < 0.05). There was no interaction between groups and times in the microvessel density score.

**CONCLUSION:** Local administration of VEGF could greatly accelerate the vascular regeneration of reconstructed PCL with femur-ACL-tibia allograft in rabbits.

Sun YH, Wang L, Jiao ZD. Effect of vascular endothelial growth factor on vascular regeneration of reconstructed posterior cruciate ligament allograft transplantation in rabbits. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu 2008;12(42): 8225-8229(China) [www.zglckf.com/zglckf/ejournal/upfiles/08-42/42k-8225(ps).pdf]



**背景**: 膝关节后交叉韧带重建的研究目前大多集中在手术技巧和移植物材料的选择上,而对重建后移植物血管再生情况的相关报道不多,尤其对异体移植物血管再生情况的相关研究更少。

目的: 拟观察应用血管内皮细胞生长因子对兔异体重建后交叉韧带血管再生的影响。

设计、时间及地点: 析因设计,于 2006-03/2007-09 在潍坊医学院第三附属医院骨科实验室完成。

材料: 68 只成年雌性日本大白兔,体质量(3.3±0.1) kg,其中23 只用于切取股骨-前交叉韧带-胫骨复合体以建立兔后交叉韧带异体重建动物模型。

方法: 45 只兔随机分为 3 组,每组 15 只。对照组不作任何处理;磷酸盐缓冲液组向患膝关节腔内注入 0.2 mL 磷酸盐缓冲液;血管内皮细胞生长因子组向患膝关节腔内注入 30 μg 血管内皮细胞生长因子(溶于 0.2 mL 磷酸盐缓冲液)。

**主要观察指标:** ①重建后移植物的免疫排斥情况。②第 3,6,12 周每组各随机选 5 只兔取标本作免疫组织化学染色,Chalkley 计数法对移植物韧带部分的中 1/3 处微血管密度计数。

结果: 45 只兔均进入结果分析。每只兔切开关节后未见积液及软骨破坏,移植物大体形态接近正常后交叉韧带,无变性坏死及融解脱落等免疫排斥表现。血管内皮细胞生长因子组实验兔关节内可见大块血运丰富的组织,而对照组和磷酸盐缓冲液组没有。3 组各时间点移植物微血管密度相比,血管内皮细胞生长因子组高于对照组和磷酸盐缓冲液组 (P < 0.01); 第 6 周高于第 3 周和第 12 周 (P < 0.01),第 12 周低于第 3 周 (P < 0.05);微血管密度计数中组别与时间无交互效应。

结论: 局部应用血管内皮细胞生长因子对兔异体移植重建后交叉韧带移植物血管再生具有明显促进作用。

关键词: 血管内皮细胞生长因子; 重建; 后交叉韧带; 血管再生

孙英华,王莉, 焦兆德. 血管内皮细胞生长因子对兔异体重建后交叉韧带血管再生的影响[J].中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(42):8225-8229 [www.zglckf.com/zglckf/ejournal/upfiles/08-42/42k-8225(ps).pdf]

Department of Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 262500, Shandong Province, China.

Sun Ying-hua★, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 262500, Shandong Province, China qzydsyh@163.com

Correspondence to: Jiao Zhao-de, Chief physician, Professor, Department of Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 262500, Shandong Province, China yiduh@163.com

Received: 2008-01-23 Accepted: 2008-07-22

潍坊医学院第三 附属医院骨外科, 山东省潍坊市 262500

qzydsyh@163. com

通讯作者:焦兆德,主任医师,教授,潍坊医学院第三附属医院骨外,山东省潍坊市262500 yiduh@163.com

中图分类号:R392 文献标识码:A 文章编号:1673-8225 (2008)42-08225-05

收稿日期: 2008-01-23 修回日期: 2008-07-22 (08-50-1-645/WL·Z)



#### >>本 文 异 读 <<

课题背景:后交叉韧带重建已成为其断裂后的常规治疗方法,其重建后血管再生情况是影响手术效果的重要因素之一。血管内皮细胞生长因子在血管再生过程中起重要调节作用,其局部应用可能会促进移植物纤维的再血管化,从而加快其成熟过程。本实验通过建立兔同种异体前交叉韧带移植重建后交叉韧带的动物模型,旨在观察局部应用血管内皮细胞生长因子对术后异体移植物血管再生的影响。

同行评价: 关于血 管内皮细胞生长因子 与新生血管形成方面 的论述已较广泛,但对 于其在韧带修复及移 植中的作用研究则相 对较少,文章在这一点 上有所新意,具有研究 价值。 偏倚或不足:实验仅用单一剂量 30 μg 血管内皮细胞生长因子在实验组进行 1 次关节腔内注射,未对其他剂量对移植物血管再生的影响作进一步研究,也未对注射后关节内的药物浓度作进一步测量。如果能设不同剂量组,并对注射后关节内药物浓度的改变作有效测量,可能会使结果更加丰满。

## 0 引言

后交叉韧带(Posterior cruciate ligament,PCL)重建术已成为其断裂后的常规治疗方法。重建移植物的作用如同生物支架,为细胞增殖提供胶原网架,并最终形成韧带样结构,其血管再生情况是影响手术效果的重要因素之一。目前研究大多集中在手术技巧和移植物材料的选择上,而对重建后移植物血管再生情况的相关报道不多,尤其对异体移植物血管再生情况的相关研究更少。

目前临床上最常用的异体移植物材料有跟腱、髌腱、半腱肌、股薄肌、胫前肌腱、胫后肌腱等肌腱组织,而韧带组织作为移植物材料的相关研究报道很少。肌腱组织与韧带组织在组织学方面有明显区别,兔前交叉韧带(Anterior cruciate ligament,ACL)、后交叉韧带同属特殊韧带组织,与其他韧带也有明显区别。本实验采用兔股骨-前交叉韧带-胫骨复合体移植重建后交叉韧带,为同组织学特性的韧带移植物之间的重建。已有研究证实<sup>[1]</sup>,同组织学特性在移植物成熟过程中起重要作用,使成纤维细胞更容易长入,新生胶原纤维与细胞构架关系更合理,不仅加快了成熟过程,而且避免了成熟障碍,使移植物成熟快且彻底。

血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)是一种人属二聚蛋白信号肽,在血管再生和骨组织再生过程中起重要调节作用<sup>[2]</sup>。已有研究证实,VEGF具有特异性促内皮细胞分裂原的作用,可刺激内皮细胞增殖,促进新生血管生长<sup>[3]</sup>。Ju等<sup>[4]</sup>报道,局部应用VEGF可促进冷冻-解冻兔前交叉韧带损伤动物模型前交叉韧带血管再生。尽管进入移植物的炎性细胞能分泌内源性VEGF,但这对移植物早期血管再生的促进作用是不够的,故局部应用VEGF作为外源性补充是非常必要的。

本实验通过建立兔后交叉韧带损伤同种异体前交 叉韧带移植重建后交叉韧带的动物模型,观察局部应用 VEGF对术后异体移植物血管再生的影响,旨在为今后 临床工作提供实验依据。

#### 1 材料和方法

设计: 析因设计。

时间及地点:实验于2006-03/2007-09在潍坊医学院 第三附属医院骨科实验室完成。

材料: 68只成年雌性日本大白兔,体质量(3.3±0.1) kg,由山东省实验动物中心提供(动物合格证号:鲁动质字20051022),实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准<sup>[5]</sup>。

主要试剂	来源
LSAB 试剂盒与 DAB 显色试剂盒 VEGF 与小鼠抗人 CD31 单克隆抗体	福州迈新生物技术开发公司 武汉博士德生物工程 有限公司

#### 实验过程:

供体手术: 以空气栓塞法处死23只成年雌性日本大白兔,无菌条件下取异体兔股骨-前交叉韧带-胫骨复合体45条。切取胫骨止点骨块时,由下止点向外后方取胫骨外髁平台皮质骨部分,注意向后角度不应过大,在保证长度的情况下尽可能维持水平方向,宽度与下止点基本一致; 切取股骨止点骨块时,取向后下方沿股骨外髁内侧皮质走行的皮质骨部分。将所有骨块均用骨锉修成直径2.0~3.0 mm,长度3.0~4.0 mm 的骨柱。各标本均装入双层无菌塑料袋,分别标记取材兔子体质量及左右膝,~80 ℃ 保存14 d 以上备用。

受体手术: 45只兔每只术前均予20%氨基甲酸乙酯 5 mL/kg 耳缘静脉注射及氯胺酮0.1 g肌肉注射行全身麻醉。投币方式决定手术侧,术区备皮,消毒,取膝前内侧弧形切口,沿髌骨内侧打开关节腔,显露膝关节内前方结构,见关节腔内无明显积液及滑膜炎表现,切断后交叉韧带股骨止点,术中做后抽屉试验发现胫骨后向明显失稳。沿膝内侧皮下向后游离,直达膝内后方,在内侧副韧带后方切开关节囊,显露后交叉韧带胫骨止点,显露并切除后交叉韧带。用骨钻打磨成型髁间窝,



注意保护前交叉韧带。在自制点对点定位器引导下,用 2.5 mm 骨钻经股骨内髁内后侧打骨道,方向指向外前, 止于后交叉韧带股骨止点处;同样经胫骨结节内下向后 上打骨道,止于后交叉韧带胫骨止点处,方向水平。按 照取材动物与实验动物体质量基本一致及取材肢体与 重建肢体相反的原则,选取体质量相匹配的对侧移植物 放入40 ℃ 生理盐水中融化15 min,移植物恢复弹性后 置庆大霉素溶液(40万单位/L)中漂洗5~10 min,再用 生理盐水漂洗,并用0.8 mm 克氏针在两端骨块上打孔, 穿入1-0涤纶编织线固定,备用。移植物股骨骨块自胫骨 骨道后上方入口循引线拉入骨道内, 胫骨骨块自股骨内 髁骨道外前方入口循引线拉入骨道内, 此时可见移植后 的韧带形成前外束和后内束,与原解剖结构基本一致。 在股骨内髁骨道内后侧入口旁边植入1枚门形钉,牵引 线穿入后打结固定上止点; 在胫骨骨道下方胫骨上横行 打孔,牵引线穿入后打结固定下止点。关节内用稀碘伏 冲洗后,再用大量生理盐水冲洗,以1号丝线逐层紧密 缝合切口以防关节液渗出。

实验分组:实验分为3组,每组15只。对照组不作任何处理; PBS组向患膝关节腔内注入0.2 mL PBS; VEGF组向患膝关节腔内注入30 μg VEGF(溶于0.2 mL PBS)。无菌敷料包扎刀口。每只实验动物术后肌注青霉素3次[80万单位/(次・d)],笼内饲养,自由负重。

指标检测: ①大体观察: 第3,6,12周时每组各随机 选5只兔处死,切开关节后观察关节有无积液及软骨破 坏,移植物有无变性坏死及融解脱落,各组关节内有无 血运丰富的组织。②组织学观察:将处死兔的移植物复 合体取下,在体积分数为0.1的中性缓冲甲醛溶液中固定 48 h, 经脱钙、脱水、透明、浸蜡、包埋等处理后制成 切片,以CD31单克隆抗体作免疫组织化学染色,血管 内皮细胞胞膜或胞浆染色呈棕黄色(CD31阳性),形状 常呈环状(横切面)或条状(纵切面),此为移植物中 "新生血管"的标志。2个独立观察者分别用Chalkley计 数法对重建后移植物韧带部分的中1/3处微血管密度 (Microvessel density, MVD) 计数。每例选取具有代表 性的组织切片,先在低倍镜(×50)下观察并确定每张 切片有效观察范围内3个MVD最高的区域(热点区域), 然后在中倍镜(×200)下分别计数每个热点区域的 MVD,将2个人计数结果平均后所得单位区域值作为该 例标本的MVD值。Chalkley显微镜目镜网格共有25个随 机点,在中倍镜下调整目镜以使尽可能多的随机点落在 有效观察范围内微血管轮廓明显的区域内或边缘上,将 这些随机点的数目作为Chalkley计数的数值,即MVD 值。

主要观察指标: ①重建后移植物的免疫排斥情况。 ②各组不同时间移植物韧带部分的中1/3处MVD的表 达。 **设计、实施、评估者**:实验设计、干预实施及评估均为本文作者,经过正规培训,未采用盲法评估。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 13.0软件完成统计处理,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用3×3析因设计资料的方差分析检验实验数据,P<0.05为差异有显著性意义。

### 2 结果

- 2.1 实验动物数量分析 纳入日本大白兔 45 只,均进入结果分析,无脱落。
- 2.2 标本大体观察 每只兔取标本前均无跛行及关节红肿,后抽屉试验阴性。切开关节后未见积液及软骨破坏,重建移植物分为前外侧束和后内侧束,大体形态接近正常后交叉韧带,无变性坏死及融解脱落等免疫排斥表现。VEGF 组实验兔关节内可见大块血运丰富的组织,而对照组和 PBS 组没有。

#### 2.3 光镜下标本组织学观察

### 对照组和PBS组:

第3周极少见到CD31阳性血管内皮细胞, 而第6周和第12周在重建移植物浅层区域可见此类细胞。

#### VFGF组

第3,6,12周均可见此类细胞分布在移植物各区域。

#### 对照组和PBS组、VEGF组:

各组均以第6周此类细胞分布最多。

各组不同时间点均未见移植物有明显的淋巴细胞和单核细胞浸润 等免疫排斥反应表现。

#### 2.4 各组动物不同时间点移植物MVD计数 见表1

表 1 各组动物不同时间点移植物 MVD 计数 Table 1 The microvessel density score of the allograft at different time points in each group  $(\bar{x}\pm s, n=5)$ 

Group	3 weeks	6 weeks	12 weeks
Control	1.86±0.75 <sup>abc</sup>	3.52±1.04 <sup>a</sup>	1.39±0.51 <sup>ab</sup>
PBS	2.12±0.73abc	3.12±1.35 <sup>a</sup>	1.19±0.33ab
VEGF	3.39±0.91 <sup>bc</sup>	5.06±0.99	$2.59\pm0.78^{b}$

PBS: phosphate-buffered saline; VEGF: vascular endothelial growth factor;  ${}^aP < 0.01$ , vs.VEGF group;  ${}^bP < 0.01$ , vs.the 6 weeks;  ${}^cP < 0.05$ , vs.the 12 weeks

#### 3 讨论

兔交叉韧带的解剖学特点和生物力学特性是本实验建立动物模型进行相关研究的基础。兔前交叉韧带、后交叉韧带大体形态与人类基本相同,在大体解剖学方面两者相似,前者的平均长度和横截面积分别为后者的154%和128%<sup>[6]</sup>。交叉韧带重建移植物在塑形再生过程中强度明显下降,在重建时必须按照"以强代弱"的原则进行。生物力学测定显示,兔前交叉韧带在结构力学



方面明显强于后交叉韧带,前者的强度、硬度、最大拉伸长度和最大载荷能量分别为后者的160%、120%、145%、221%<sup>[6]</sup>,说明兔前交叉韧带重建后交叉韧带符合"以强代弱"的原则。在材料力学特性方面两者很相近,前交叉韧带的最大应力、弹性模量和最大应变分别为后交叉韧带的104%、103%和112%<sup>[6]</sup>。以上研究提示,可以利用兔股骨-前交叉韧带-胫骨复合体重建后交叉韧带,以探讨交叉韧带重建规律。

在交叉韧带异体重建过程中,移植物与骨隧道的愈合决定了手术成败,而移植物纤维的再血管化和塑形决定了手术成功的程度。在本课题中突出了以下几个特点:①移植物与骨隧道均为骨-骨愈合,优于骨-腱愈合。②为同组织学特性的韧带组织重建韧带组织,在组织塑形过程中优于肌腱组织重建韧带组织。③移植物经深低温冷冻处理,大大降低了其免疫原性。④加入外源性VEGF促进移植物纤维的再血管化,加快移植物成熟过程。实验通过建立兔后交叉韧带损伤同种异体前交叉韧带移植重建后交叉韧带的动物模型,对局部应用VEGF对移植物血管再生的影响作了重点观察。

移植物的免疫排斥反应是关系实验成败的重要因 素之一。深低温冷冻处理的移植物基本被看作是极轻度 或无免疫原性,受体可以接受,而不易产生明显的排斥 反应。其机制是:深低温冷冻处理改变或破坏了移植物 细胞表面的抗原结构, 也杀死了对低温敏感的抗原递呈 细胞 (Antigen presenting cell, APC), 使其抗原性大大 降低的同时,也使免疫反应得以减弱。异体移植物外膜, 组织间质内的淋巴管, 微血管内的树突状细胞、淋巴细 胞、巨噬细胞、血管内皮细胞在冷冻处理过程被杀死 或受损,这意味着异体移植物组织中不含APC。APC 具有免疫刺激性,可提高异体移植物的免疫原性。已 有研究证实, 异体移植物的免疫排斥反应是在供体 APC直接刺激或受体APC间接刺激两条途径下由受体 T细胞介导的<sup>[7]</sup>。主要组织相容性抗原复合体(Major histocompatibility complex, MHC) 在同种异体移植免疫 排斥反应中亦发挥重要作用, 抗宿主反应主要由异体移 植物细胞表面的MHC-I、II类抗原引起的, 而移植物 胶原中并没有MHC, 故深低温冷冻处理破坏移植物细胞 表面的抗原结构后, 其抗原性大大降低, 从而减轻甚至 消除免疫排斥反应。

无论自体或异体移植物,植入重建交叉韧带后都有一个移植物坏死、细胞增殖、再血管化和胶原纤维塑形的过程。移植物的再血管化由髌下脂肪垫和包绕移植物表面滑膜的血管组织发展而来,随着移植物的再血管化,细胞的增殖、移植物的塑形也逐步向深部发展<sup>[8]</sup>。因移植物最初是通过周围分泌滑液的组织和组织间滑液的扩散来实现营养供给的,故术后移植物缺血坏死区域往往见于中间部分,而血管再生则起始于外周区域。

王健等<sup>[9]</sup>对兔后交叉韧带重建术后肌腱移植物的组织学研究证实,术后3周时移植物中心为坏死组织,而韧带周边可见长入的成纤维细胞及血管;6周时韧带组织基本被新长入的成纤维细胞替代,仅在中心部有少量坏死组织。可见,移植物的再血管化是其成熟过程中必不可少的一个重要环节。

VEGF具有多功能细胞素作用,一方面能促使微血管周围内皮细胞增生、迁移并改变基因表达,另一方面能改变血管通透性,促使血浆蛋白渗出,形成富含纤维素并有利于新血管形成的细胞外基质。Petersen等[10]报道,羊前交叉韧带重建术后6个月的自体肌腱移植物中可见VEGF表达。Corral等[11]报道,应用VEGF不仅能促进血管再生,而且能加快兔皮肤伤口愈合。Zhang等[12]用鼠动物模型证实,术后1周时,用10 μg VEGF<sub>165</sub>治疗的切开伤口组的皮肤张力明显高于未作治疗的缺血皮瓣伤口组。同时,他们也报道用VEGF作修复治疗的缺血伤口MVD比未作治疗的普通伤口和缺血伤口明显高。这些研究表明,VEGF是移植物血管再生的重要介质,能加快失活软组织的重塑进程。

在体外试验中, VEGF能够刺激内皮细胞迁移、增 殖和形成管状物,它是作为内源性刺激因子在血管再生 和提高血管渗透性方面发挥作用的,且对于缺血性损伤 的反应是增效的。例如, VEGF在增殖的血管中表达, 且只在内皮细胞中发现它的受体[13]。Nissen等[14]也报道 过,VEGF是在伤口愈合的增殖阶段调节血管增殖活性 的。Corral等[11]发现,在缺血性损伤诱导下VEGF mRNA 的表达比基本纤维原细胞生长因子增加6倍,由此得出 在缺血性损伤愈合期间VEGF比基本纤维原细胞生长因 子更重要的结论。Ishii等[15]报道,外科手术开放后氧气 注入可使交叉韧带里VEGF mRNA的表达降低。已有研 究证实[16],来自血液系统的内源性炎性细胞对肌腱组织 造成损害的同时,对其修复也起到必需的弥补作用。 Maher等[17]报道,根据基因表达的研究证明,异体移植 物中调节血管再生的内源性VEGF等因子明显不足。由 此可见,外源性VEGF可作为促进移植物血管再生,加 速移植物成熟进程的有益补充。

移植物血管化作用减小可使组织修复滞后,导致移植物术后阶段变质或微结构破坏,但某些移植物内特殊区域血管过度增生也可造成肌腱坏死和继发结构破坏。Shrive等<sup>[18]</sup>报道,大量快速增生的新生血管会在移植物中产生软组织"裂隙"效应,导致移植物机械应力削弱。Ju等<sup>[4]</sup>报道,在兔冷冻-解冻前交叉韧带损伤动物模型中,30 μg VEGF<sub>165</sub>虽显著提高了移植物血管再生,但却没有影响它的机械性能。Petersen等<sup>[10]</sup>报道羊前交叉韧带重建术后6周肌腱移植物中可见VEGF表达,但术后52周时减少。另有研究证实,机械应力在体外试验中可促进VEGF在交叉韧带纤维原细胞中的表达<sup>[19]</sup>。因此,



本实验通过局部应用VEGF刺激所引起的后交叉韧带移 植物血管再生是否会降低移植物的机械性能还有待进 一步研究。

<u>血小板内皮细胞黏附分子</u>1(Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1) 又名CD31, 是一种重 要的黏附分子,属于免疫球蛋白超家族C2亚群,是相对 分子量为130 000的跨膜糖蛋白。CD31分子表达于血管 内皮细胞、血小板、循环中的单核细胞、中性粒细胞及 部分淋巴细胞亚群表面。在内皮细胞连接处表达密度最 高(可达到 $10^6$ 个分子水平),与血管内皮细胞的 $Ca^{2+}$ 依 赖性黏附分子共同作用形成内皮细胞的黏附连接, 是血 管内皮细胞层屏障的重要结构基础。Loges等[20]在应用 即时定量PCR技术测定食道癌MVD的研究中证实CD31 可在免疫组织化学染色中有效标记微血管。 Melero-Martin等[21]在活体人血内皮祖细胞血管化潜能 的重要研究中,以CD31单克隆抗体作免疫组织化学染 色,以研究微血管的细微特征。因此,CD31与血管形 成关系密切,可作为血管内皮细胞特异的标记物,以 CD31单克隆抗体与之结合,从而对微血管进行计数。

上述研究结果显示局部应用VEGF对兔异体前交叉 韧带移植重建后交叉韧带术后异体移植物血管再生具 有明显促进作用,但VEGF对术后移植物机械性能究竟 有多大影响仍不清楚。因此,在VEGF临床应用到交叉 韧带重建之前,还需作更多的研究。

#### 参考文献

- Liu P,Ao YF,Hu YL,et al. Zhongguo Yundong Yixue Zazhi
  - 刘平,敖英芳,胡跃林,等.兔异体前交叉韧带移植重建后交叉韧带的组 织学研究[J] 中国运动医学杂志,2006,25(1):9-11
- Liu BL,Zhang XQ. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu Yu Linchuang Kangfu 2007;11(46):9242-9245 刘伯龄,张锡庆.hVEGF165基因转染后骨髓间充质干细胞蛋白分泌 功能及成骨活性的检测[J].中国组织工程研究与临床康
- 复,2007,11(46):9242-9245 傅重洋,洪光祥,王发斌血管内皮生长因子受体在大鼠脊髓组织中的表达与分布[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(23): 4638-4641
  - Fu CY, Hong GX, Wang FB. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in rat spinal cord tissue. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu 2007;11(23):4638-4641

- Ju YJ, Tohyama H, Kondo E, et al. Effects of local administration of vascular endothelial growth factor on properties of the in situ frozen-thawed anterior cruciate ligament in rabbits. Am J Sports Med 2006;34(1):84-91
- The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory 2006-09-30[2006-03-01]. http://www.most.gov.cn/zfwj/zfwj2006/200512/t20051214\_54389.htm. 中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意 见.2006-09-30[2006-03-01].http://www.most.gov.cn/zfwj/zfwj2006/200 512/t20051214\_54389.htm.
- Liu P,Ao YF. Zhongguo Yundong Yixue Zazhi 2005;24(3):326-328 刘平,敖英芳.兔交叉韧带解剖学及生物力学特性研究[J].中国运动医学杂志,2005,24(3):326-328 Callaghan CJ,Rouhani FJ,Negus MC,et al. Abrogation of antibody-mediated allograft rejection by regulatory CD4 T cells with
- indirect allospecificity. J Immunol 2007;178(4):2221-2228
- Ma L, Wang H. Zhongguo Jiaoxing Waike Zazhi 2007;15(10):749-751 马亮,王洪.同种异体肌腱移植修复膝关节交叉韧带损伤进展[J].中国 矫形外科杂志,2007,15(10):749-751 Wang J,Ao YF, Zhonghua Guke Zazhi 2006;26(1):47-50
- 王健,敖英芳.后十字韧带重建后移植物组织学与胶原表型的变化[J]. 中华骨科杂志,2006,26(1):47-50
- 10 Petersen W,Unterhauser F,Pufe T,et al. The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during the remodeling of free tendon grafts 2003:123(4):168-174 in sheep. Arch Orthop Trauma
- Corral CJ, Siddiqui A, Wu L, et al. Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing. Arch Surg 1999;134(2):200-205
- Zhang F,Lei MP,Oswald TM,et al. The effect of vascular endothelial growth factor on the healing of ischaemic skin wounds. Br J Plast Surg 2003;56 (4) :334-341
- Nicosia RF,Lin YJ,Hazelton D,et al. Endogenous regulation of 13 angiogenesis in the rat aorta model. Role of vascular endothelial growth factor. Am J Pathol 1997;151(5):1379-1386
- Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, et al. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. Am J Pathol 1998;152(6):1445-1452
- Ishii Y,Ushida T,Tateishi T,et al. Effects of transcutaneous topical injection of oxygen on vascular endothelial growth factor gene into the healing ligament in rats. J Orthop Res 2003;21(6):1113-1117
- Fenwick SA, Hazleman BL, Rilev GP. The vasculature and its role in the 16
- damaged and healing tendon. Arthritis Res 2002;4(4):252-260 Maher SA,Hidaka C,Cunningham ME,et al. What's new in orthopaedic 17
- research. J Bone Joint Surg Am 2006;88(10):2314-2321 Shrive N,Chimich D,Marchuk L,et al. Soft-tissue "flaws" are associated 18 with the material properties of the healing rabbit medial collateral ligament. J Orthop Res 1995;13(6):923-929
- Yoshino H, Morita I, Murota SI, et al. Mechanical stress induces production of angiogenic regulators in cultured human gingival and periodontal ligament fibroblasts. J Periodontal Res 2003;38(4):405-410
- Loges S,Clausen H,Reichelt U,et al. Determination of microvessel density by quantitative real-time PCR in esophageal cancer:correlation with histologic methods, angiogenic growth factor expression, and lymph node metastasis. Clin Cancer Res 2007;13(1):76-80
- Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A, et al. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. Blood 2007;109(11):4761-4768