

# 骨碎补对骨愈合过程中相关基因表达的影响\*

董福慧 郑 军 程 伟

**摘要** 目的:观察中药骨碎补对骨愈合过程中相关基因表达的影响。方法:通过在大鼠胫骨打孔的方法建立单因素干扰模型,在不同时间点,采用原位杂交方法检测骨愈合过程中 I、II、III 型前胶原 mRNA、转化生长因子(TGF)- $\beta_1$  mRNA、骨形态发生蛋白(BMP)-2 mRNA 及血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 表达的动态观察。结果:I、II、III 型前胶原 mRNA、TGF- $\beta_1$  mRNA、BMP-2 mRNA 及 VEGF mRNA 在正常组各时间点均无阳性表达,模型组在不同时间点的不同细胞中表达强度不同;与模型组比较骨碎补组在 TGF- $\beta_1$  mRNA、BMP-2 mRNA 和 I 型前胶原 mRNA 的表达上有显著变化,骨碎补组不同基因的作用不同,作用时间点不同,作用强度不同。结论:在骨愈合过程中,骨碎补对 TGF- $\beta_1$  mRNA、BMP-2 mRNA 基因表达具有有益的调节作用。

**关键词** 骨碎补 骨愈合 基因表达 原位杂交

**Influence of Rhizoma Drynariae on Related Gene Expression of Bone Repairing** DONG Fu-hui, ZHENG Jun, CHENG Wei *Institute of Orthopedics Traumatology, China Academy of TCM, Beijing (100700)*

**Objective:** To explore the influence of Rhizoma Drynariae (RD) in intervening the process of bone repairing, understanding its regulatory target to seek for the pathway of TCM genomics creation, through observing dynamically the changes of mRNAs of procollagen I, II and III, transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF). **Methods:** Single factor interference model of bone injury was set up in SD rat by means of tibia drilling, and the changes of above-mentioned mRNAs in different times in the model animal were observed by adopting situ hybridization method. **Results:** All the mRNAs in the normal group showed no significant positive expression at various time points. The expression intensity of mRNAs revealed in the model group varied depending on the time and the kind of cells, the changes in the RD treated group were higher than those in the untreated model group. The functional strength of RD for various genes was in different functional time points. **Conclusion:** In the course of promoting bone repairing, RD has favorable influence in regulating mRNAs of TGF- $\beta_1$ , BMP-2 and VEGF gene expression.

**Key words** Rhizoma Drynariae, bone repairing, gene expression, in situ hybridization

骨愈合是一个复杂的过程,其在细胞水平已得到了较好的研究与描述。但在分子生物学水平,人们还所知不多。中药在骨愈合过程中是否对其相关基因表达存在调节作用,调节的时空性、调节水平、强度、机制如何均属未知。为此,通过中药骨碎补对骨愈合过程中 I、II、III 型前胶原 mRNA、转化生长因子(TGF)- $\beta_1$  mRNA、骨形态发生蛋白(BMP)-2 mRNA、血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 表达的动态观察,揭示骨碎补在此过程中对骨愈合的干预作用,了解骨碎补的调节

靶点,探索建构中基因组学的途径<sup>[1]</sup>。

## 材料与方法

1 动物模型的建立 13~14 周 SD 雌性大鼠,体重 260~280g,由中国医学科学院实验动物中心提供。用浓度为 3% 戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔内注射麻醉。将动物固定后,左下肢脱毛,皮肤消毒,无菌条件下自胫骨结节下端起,沿胫骨走行,做纵行切口(长 1cm),切开皮肤、皮下筋膜,剥开胫前肌,显露胫骨。在胫骨结节下端 2mm 处,自胫骨外侧向胫骨内侧打第一个孔,直径为 0.8mm,钻透皮质深达髓腔,但不触及对侧皮质。在该孔下沿胫骨纵轴方向依次再打两个孔,每两个孔的间距为 2mm。用生理盐水冲洗,逐层缝合切口<sup>[2]</sup>。分笼饲养,自由活动及进食。饲料(普通鼠 II 号

\* 国家中医药管理局资助项目(No. 97A205);该项研究获 2002 年度北京市科学技术进步二等奖

中国中医研究院骨伤科研究所(北京 100700)

通讯作者:董福慧;Tel:010-64014411 转 2521;E-mail:Fuhuidong

@263.net 万方数据

料)由北京实验动物研究中心提供,含钙 0.8% ~ 1.8%,含磷 0.6% ~ 1.2%,维生素 A 7000U/kg,维生素 D 1000U/kg。

2 药物的制备 中药骨碎补购于北京同仁堂北城药材批发中心。粉碎后过 120 目筛,临用时加蒸馏水制成口服液(28g 生药/100ml),低温保存备用,临用时摇匀。

3 动物分组、给药与取材 将大鼠随机分为正常组、模型组和骨碎补组,每组 50 只。模型组和骨碎补组均按上述模型制作方法打孔,打孔术后第 2 天,骨碎补组开始灌胃给药。用药量根据人体常用剂量(25g/70kg),按人/鼠体表面积比率换算等效计量法计算后,每只每次 0.56g/2ml,每天 2 次。模型组及正常组灌服等容量的蒸馏水。分别于术后 4、7、14、21、28 天无菌条件下取胫骨、处死,共 5 批,每批 30 只(每组每批 6 只)。所取胫骨为整段,包括 3 个圆孔约 10mm 长,经生理盐水冲洗后立即置于液氮中暂存。

4 杂交切片的制备及原位杂交 骨标本置于 4% 多聚甲醛(PBS:pH 7.4, 137mmol/L NaCl, 27mmol/L KCl, 82mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 15mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3% 葡聚糖)中,于 4℃ 固定 24h,于 15% 的 EDTA(含 0.5% 多聚甲醛、3% 葡聚糖)中,4℃ 脱钙 28 天。酒精逐级脱水(70%、80%、95%、100%)。二甲苯透明,低熔点石蜡包埋,连续 5μm 切片,置于经酸泡、硅烷化处理后涂有 3-Aminopropyltriethoxysilane 的 superfrost 玻片上,于 42℃ 干燥 2h,室温保存。

探针标记应用寡核苷酸探针,由北京奥科生物技术有限公司合成。其序列如下:

TGF-β<sub>1</sub>mRNA: 5' > TGGCACTGCTTCCCCGAA-TGTCTGACGTAT < 3'

BMP-2mRNA: 5' > CCACTCATTTCTGAAAG-TTCCCTCGATGGC < 3'

VEGFmRNA: 5' > GAACATTTACACGTCTG-CGGATCTTGG < 3'

I 型前胶原 mRNA: 5' > GACCCTTAGGC-CATTGTGTATGCAG < 3'

II 型前胶原 mRNA: 5' > TGAAGTGAAGC-CGCCGTTTCATGGT < 3'

III 型前胶原 mRNA: 5' > ATCATCCCCG-TAATATGGTGAAAAGC < 3'

探针采用同位素 Dig 标记,杂交及显色检测均采用 Boehringer Mannheim 公司 Dig 标记检测试剂盒所附说明及有关文献方法操作<sup>[3-6]</sup>,简述如下:切片常规

脱蜡、梯度酒精脱水至 PBS。室温下置于 0.2mol/L HCl 去蛋白 20min,并用蛋白酶 K(20μg/ml)于 37℃ 消化 30min,消化后在 0.1mmol/L 甘氨酸 PBS 中浸泡 5min。玻片置于 4% 多聚甲醛中固定 10min,脱水、空气干燥。切片在含有探针(40μg/片)的杂交液中孵育,杂交液含终浓度为 50% 的去离子甲酰胺,600mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris·HCl(pH 7.6), 1mmol/L EDTA(pH 8.0) 1×Denhardt's 液、0.25% SDS, 200μg/ml 酵母 tRNA、10μg/ml 鲑精 DNA。封片后,于 45℃ 湿盒中杂交 16~20h。移去盖玻片后,以缓冲液漂洗(50% 甲酰胺,5×标准柠檬酸盐),再于 45℃ 冲洗 2 次,每次 20min(50% 甲酰胺,2×标准柠檬酸盐)。RNaseA(1U/ml)于 37℃ 处理 30min,然后以 2×标准柠檬酸盐冲洗两次,再以 0.2×标准柠檬酸盐于 45℃ 冲洗 20min。切片脱水、空气干燥,按药盒说明显色,HE 复染,拍照。杂交液中不加标记探针作为杂交反应的阴性对照,在检测系统中用 PBS 取代地高辛抗体作为检测的阴性对照。染片的细胞中深紫蓝色为阳性表达。每只鼠按对角线选 10 个视窗,计数深紫蓝色斑点。1~5 为 0.5 个计量单位,6~10 为 1 个计量单位,以此类推折算量化,模型组最高值为 2。

5 统计学方法 使用 SPSS 软件计算,采用 t 检验。

## 结 果

1 3 组不同时间 TGF-β<sub>1</sub>mRNA 的表达比较 见图 1。正常组各时间点均无阳性表达。模型组 4 天时,有较高表达,主要存在于间充质细胞、成纤维细胞及肉芽基质中,7 天时(在软骨细胞中有较高表达),14 天时(在成熟的软骨细胞、成骨细胞中均有高表达)达到峰值,21 天时(主要在新生骨表面成骨细胞中)仍有较高表达,而成熟骨质区表达量很低,28 天时,表达量很低。骨碎补组各时间点 TGF-β<sub>1</sub>mRNA 表达程度与模型组类同,但前 3 周与模型组比较差异有显著性(P<0.05)。

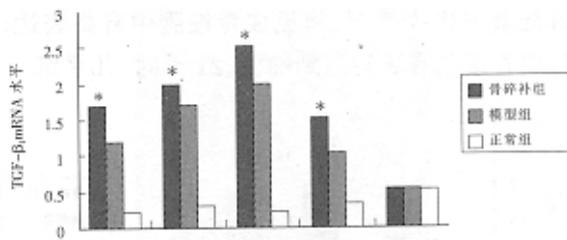


图 1 3 组 TGF-β<sub>1</sub>mRNA 表达水平比较

注:与模型组比较,\*P<0.05,下同

2 3 组不同时间 BMP-2mRNA 的表达比较 见图 2。正常组各时间点均无阳性表达。模型组 4 天达

到较高水平,主要存在于间充质细胞,7 天达到峰值(主要存在于早期的软骨细胞);14 天时,主要在早期的成骨细胞中有高表达;21 天时,在成骨细胞中有表达,表达强度已呈下降趋势;28 天时,接近正常组水平。骨碎补组各时间点 BMP-2mRNA 表达程度与模型组类同,但前 1 周与模型组比较,差异有显著性( $P < 0.05$ )。

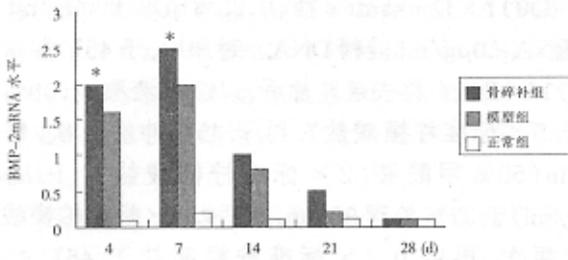


图 2 3 组 BMP-2mRNA 表达水平比较

3 3 组不同时间 VEGFmRNA 的表达比较 见图 3。正常组各时间点均无阳性表达。模型组 4 天时,表达于间充质细胞、成纤维细胞,表达强度较弱;7 天时,于软骨细胞、早期的成骨细胞中有高表达,并达到峰值;14 天时,在血管内皮细胞、成熟及肥大的软骨细胞、成骨细胞均有较高程度表达;21 天时,主要在成骨细胞、血管内皮细胞仍有表达;28 天时,在成骨细胞中仍有表达。骨碎补组各时间点 VEGFmRNA 表达程度与模型组相同,两组间比较,差异无显著性。

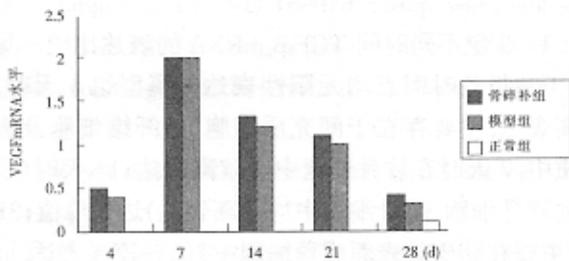


图 3 3 组 VEGFmRNA 表达水平比较

4 3 组不同时间 I 型前胶原 mRNA 的表达比较 见图 4。正常组各时间点均无阳性表达。模型组 4 天时,有低量表达;7 天时,可见成骨细胞中有高表达;14 天时,成骨细胞有表达达到峰值;21 天时,几乎维

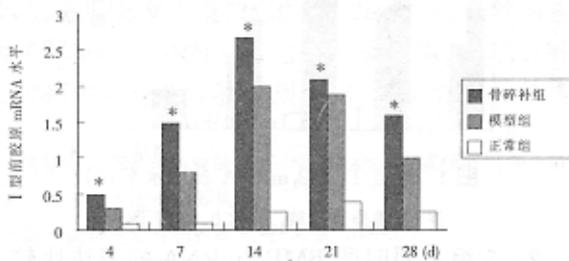


图 4 3 组 I 型前胶原 mRNA 表达水平比较

持于峰值水平;28 天时,骨小梁表面成骨细胞表达量下降。骨碎补组各时间点表达程度与模型组类同,但全过程两组差异均有显著性( $P < 0.05$ )。

5 3 组不同时间 II 型前胶原 mRNA 的表达比较 见图 5。正常组各时间点均无阳性表达。模型组 4 天时,表达于软骨细胞中,呈中等强度;7 天时,表达于成熟软骨细胞中,并达到峰值;14 天时,在成骨细胞中表达强度下降;21 天时,表达量极低;28 天时,几乎探测不到。骨碎补组各时间点表达程度与模型组类同,与模型组比较,前 1 周差异有显著性( $P < 0.05$ )。

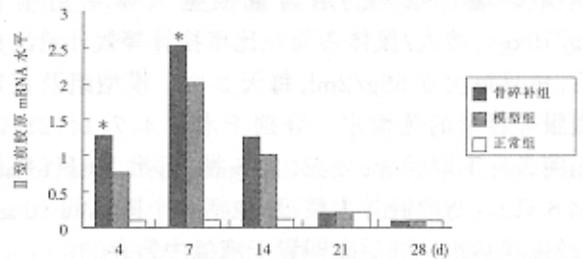


图 5 3 组 II 型前胶原 mRNA 表达水平比较

6 各组不同时间 III 型前胶原 mRNA 的表达比较 见图 6。正常组各时间点均无阳性表达。模型组 4 天时,表达于间充质细胞、成纤维细胞,并已达到峰值;7 天时,表达量已明显下降;14、21 天时表达量极低。28 天时未探测到。骨碎补组表达趋势与模型相似,两组间比较差异无显著性( $P > 0.05$ )。

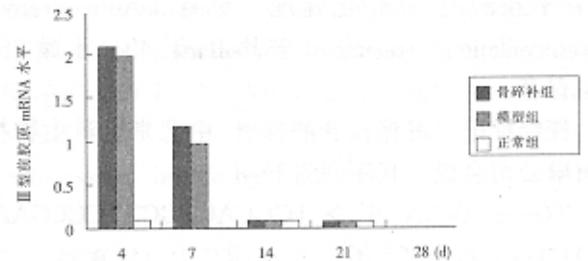


图 6 3 组 III 型前胶原 mRNA 表达水平比较

### 讨 论

最常用于研究骨愈合的动物是兔及犬。最近有研究表明大鼠也是研究骨愈合的理想模型<sup>[7]</sup>。人们甚至规范了通过手术造成骨折的“标准”模型以及闭合骨折的“标准”模型。骨折模型术后通常应用钢板或髓内针固定。本实验观察中药对骨折愈合相关基因表达影响,实验动物的骨损伤形式、程度必须保持“量化”意义上的均一性,因为修复方式及程度决定基因表达的量变及质变,因此闭合骨折模型是不合适的。内固定模型尽管可以取得相对意义上的均一性结果,但由于机体对内固定物的异物炎性反应与骨折早期的修复性炎

性反应相重叠,而两种反应的病理生理学意义是存在本质上的差别,且反应程度也无法做量化意义上的比较。因此,所得结果难以保证是源于药物的“单一性”药理作用。为此,我们设计了本实验的大鼠骨损伤模型,打孔直径为 0.8mm,相当于大鼠胫骨周径的 1/6~1/5,对大鼠胫骨“日常生活”意义上的生物力学性质无重大影响。该模型可以满足单因素干扰的实验设计要求。

骨碎补(*Drynaria fortunei*(Kunze) Sm.)为槲蕨科植物及中华槲蕨的干燥根茎。归肾、肝经,功效补肾强骨,续伤止痛。主治肾虚腰痛,耳鸣耳聋,牙齿松动,跌扑闪挫,筋骨折伤。本实验结果表明,骨碎补在骨修复早期,促进了 BMP-2mRNA 的表达,说明其与间充质细胞分化有关。但 III 型前胶原 mRNA 表达水平并无明显改变,而之后 II 型前胶原 mRNA 及 I 型前胶原 mRNA 表达水平显著上升。TGF- $\alpha_1$ mRNA 表达水平在软骨形成期及软骨内骨化期亦明显上升。据此推测,骨碎补对细胞表型分化有调节作用,能促进间充质细胞向成骨细胞系及成软骨细胞系分化,并能增进其合成活性,而对成纤维细胞无影响。从这一点上看,成软骨细胞、成骨细胞并非源于成纤维细胞的演化,或者是骨碎补对细胞表型分化的调节作用主要发生于炎症期后。一般认为,细胞表型分化主要与骨折部的力学环境及局部含氧量、pH 值、细胞因子等微环境有关。骨碎补的作用机制尚有待进一步研究。我们还注意到,VEGFmRNA 表达量无明显变化,说明骨碎补促进骨化的机制与血管生成量无关。此外,II 型前胶原 mRNA 在达到峰值之后迅速下降,表明软骨性基质吸

收加快,结合 VEGFmRNA、I 型前胶原 mRNA、TGF- $\beta_1$ mRNA 表达量变化特征,骨碎补对破骨细胞的功能可能有促进作用,并且这种作用不是单向的,而是与成骨细胞功能相耦合的。

在促进骨愈合的意义上,骨碎补对 TGF- $\beta_1$  mRNA、BMP-2mRNA 基因表达具有有益的调节作用。补肝肾强筋健骨类中药是否具有相似的调节靶点、调节强度、量效关系及其依时间变化的动态曲线,值得进一步深入研究。

#### 参 考 文 献

- 1 董福慧,郑军.在人类基因组学基础上建构骨折治疗的基因中药谱系的设想.中医正骨 2000;13(2):45—46.
- 2 郑军,董福慧.骨内膜成骨动物模型.中国骨伤 2000;13(2):522—523.
- 3 Brunner G, Nguyen Hm, Gabrilove J, et al. Basic fibroblast growth factor expression in human bone marrow and peripheral blood cell. Blood 1993;3:631—638.
- 4 Beck LS, De Guzman L, Lee WP, et al. TGF- $\beta_1$  induces bone closure of skull defects. J Bone Miner Res 1991;6:1257—1265.
- 5 Bonewald LE, Dallas SL. Role of active and latent transforming growth factor  $\beta$  in bone formation. J Cell Biochem 1994;55:350—357.
- 6 Bostrom MPG, Lane JM, Berberian WS, et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. J Orthop Res 1995;13:357—361.
- 7 Henricson A. The cartilaginous fracture callus in rat. Acta Orthop Scand 1987;58:223—224.

(收稿 2002-10-15 修回 2003-03-20)

### 《陈可冀医学选集——七十初度》一书出版

《陈可冀医学选集——七十初度》一书已由北京大学医学出版社正式出版。大 16 开本,265 万余字,订价 180.00 元,每册另加邮寄费 18.00 元,欢迎订阅。书款可由邮局或银行汇至本刊邮购部,开户银行:中国工商银行北京分行海淀支行海淀分理处,帐号 04509004609872,本刊地址北京西苑操场 1 号,中国中西医结合杂志社,邮编:100091。