

伤科接骨片对兔下颌骨缺损修复中骨保护素及配体基因表达的影响

翁春辉¹ 赖晓宇¹ 詹春华¹ 戴丽冰² 钟志勇³

摘要 **目的** 探讨伤科接骨片在下颌骨缺损修复中的作用机制。**方法** 健康雄性新西兰兔 72 只,随机分为正常对照组(24 只)、模型组(24 只)和伤科接骨片组(24 只),建立下颌骨缺损模型。正常对照组、模型组动物给予正常饲料,伤科接骨片组动物给予伤科接骨片饲料。分别于建模后第 7、14、28、56 天处死相同例数动物($n=6$),收集下颌骨缺损处骨组织块。采用 RT-PCR 技术检测骨保护素(osteoprotegerin, OPG)、骨保护素配体(osteoprotegerin ligand, OPGL)基因表达,免疫组化检测骨组织染色强度和面积。**结果** 与正常对照组比较,模型组兔下颌骨组织 OPG mRNA 表达在建模后第 7 天显著上调($P<0.05$),OPGL mRNA 表达在建模后第 14 天显著上调($P<0.05$);与模型组比较,伤科接骨片组建模后第 14、28、56 天 OPG mRNA 表达均上调明显($P<0.05$),骨组织阳性染色更强,面积更广,建模后第 14 天 OPGL mRNA 表达下调明显($P<0.05$),骨组织阳性染色更弱,面积更小,OPG mRNA/OPGL mRNA 比值在建模后第 14、28、56 天明显上调($P<0.05$)。**结论** 伤科接骨片促进下颌骨缺损修复的作用可能与其调节 OPG mRNA、OPGL mRNA 表达水平有关。

关键词 下颌骨缺损;伤科接骨片;骨保护素;骨保护素配体;基因表达

Effects of Shangke Jiegu Tablet on the Gene Expressions of Osteoprotegerin and Osteoprotegerin Ligand in the Repairing Process of Mandibular Defect Rabbits WENG Chun-hui¹, LAI Xiao-yu¹, ZHEN Chun-hua¹, DAI Li-bing², and ZHONG Zhi-yong³ 1 Fourth Affiliated Hospital, Medical College of Jinan University; Department of Stomatology, Guangzhou Red Cross Hospital, Guangzhou (510220), China; 2 Fourth Affiliated Hospital, Medical College of Jinan University; Department of Stomatology, Guangzhou Red Cross Hospital, Guangzhou; Institute of Traumatic Surgery, Guangzhou (510220), China; 3 Lab for Comparative Medicine, Guangdong Provincial Experimental Center of Medical Animals, Guangzhou (528248), China

ABSTRACT **Objective** To explore the mechanism of Shangke Jiegu Tablet (SJT) in repairing the mandibular defect. **Methods** Totally 72 healthy male New Zealand rabbits were randomly divided into the normal control group ($n=24$), the model group ($n=24$), and the SJT group ($n=24$). Then the mandibular defect model was established. Animals in the normal control group and the model group were fed with normal forage, while those in the SJT group were fed with SJT forage. On the day 7, 14, 28, and 56 after model establishment, 6 rabbits were killed in each group. The bone was collected from the mandibular defect. The gene expressions of osteoprotegerin (OPG) and osteoprotegerin ligand (OPGL) were detected by means of RT-PCR. The positive dyeing strength and area of the bone tissue were detected by means of immunohistochemical technique. **Results** Compared with the normal control group, the degree of OPG-mRNA expression was remarkably up-regulated on day 7 after model establishment ($P<0.05$) and the degree of OPGL mRNA expression was remarkably up-regulated on day 14 after model establishment ($P<0.05$) in the model group. Compared with the model group, the degree of OPG mRNA expression was remarkably up-regulated ($P<0.05$), and the positive dyeing strength and area of bone tissue were stronger and broader on day 14, 28, and 56 after model establishment in the SJT group. The degree of OPGL mRNA expression was remarkably down-regulated ($P<0.05$), and the positive dyeing strength and area of bone tissue were weaker and smaller on day 14 after model establishment in the SJT group.

基金项目:广东省中医药局建设中医药强省基金资助项目(No. 2010022)

作者单位:1.暨南大学医学院第四附属医院,广州市红十字会医院口腔科(广州 510220); 2.暨南大学医学院第四附属医院,广州市红十字会医院,广州市创伤外科研究所(广州 510220); 3.广东省医学动物实验中心比较医学实验室(广州 528248)

通讯作者:翁春辉, Tel:13602857030, E-mail:chunhui_weng@126.com

The ratio of OPGmRNA/OPGLmRNA was remarkably up-regulated on day 14, 28, and 56 after model establishment ($P < 0.05$). Conclusion The effect mechanism of promoting mandibular defect repairing by SJT may be correlated to regulating the expressions of OPGmRNA and OPGLmRNA.

KEYWORDS mandibular defect; Shangke Jiegu Tablet; osteoprotegerin; osteoprotegerin ligand; gene expression

颌骨缺损在临床上较为常见。颌骨缺损修复过程复杂,是由许多复杂细胞因子所调控,其中成骨细胞与破骨细胞的动态平衡是维持骨骼完整性的关键。成骨细胞通过调节破骨细胞的分化成熟,参与骨吸收^[1,2]。在对破骨细胞的调节中,骨保护素(osteoprotegerin, OPG)和骨保护素配体(osteoprotegerin ligand, OPGL)起到关键的核心作用^[3,4]。伤科接骨片具有活血化瘀、消肿止痛、续筋接骨、补骨壮骨的功能^[5]。但其促进骨缺损修复的细胞信号途径未明。本实验通过观察伤科接骨片干预前后兔下颌骨缺损修复过程中 OPG、OPGL 基因表达的动态变化,探讨伤科接骨片促进骨缺损修复的作用机制。

材料与方法

1 动物 健康雄性新西兰兔 72 只(广东省医学实验动物中心提供,实验动物质量合格证明编号:0053678),体重(2.5 ± 0.5)kg。新西兰兔饲养在广东省医学实验动物中心普通级动物房,单笼饲养,自由饮水、进食,实验室温度为 $16 \sim 26^\circ\text{C}$,湿度为 $40\% \sim 80\%$ 。

2 药物 将 528 片伤科接骨片(以海星为主,配以鸡骨、三七、血竭、红花、没药、虻虫、自然铜、乳香、马钱子等组成的纯中药制剂,大连美罗中药厂有限公司,批号:201008123,0.35 g/片)磨碎成粉状,加入 14 kg 全价颗粒饲料混匀,磨成粉状,制成 1.32% 伤科接骨片饲料。

3 试剂和仪器 DRR041S Real-time PCR 试剂盒和 DRR019A RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本);LightCycler II 实时定量 PCR 扩增仪(Roche 公司,美国);Trizol Reagent(Life Technologies, 美国);逆转录试剂盒(批号:K1621, Fermentas, 美国);DNA marker (DGL-2000, 北京天为时代公司);引物(上海生物工程公司);OPG 兔多抗(批号:bs-0431R, 北京博奥森生物技术有限公司);OPGL 兔多抗(批号:bs-0747R, 北京博奥森生物技术有限公司);DAB 显色试剂盒(批号:AR1022, 博士德生物技术有限公司);FUSION FX7 凝胶成像分析仪(VitberTourmat 公司,法国);HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统(武汉千屏影像技术有限责任公司)。

4 方法

4.1 分组方法 采用耳内标记法,使用油性笔对新西兰兔进行编号,在新西兰兔双耳耳廓内书写不同的阿拉伯数字,以示不同号码。以新西兰兔耳内标记和笼具双重编号标记识别。72 只动物按体重随机分为正常对照组、模型组、伤科接骨片组,每组 24 只,各组又按建模时间细分为 7、14、28、56 天 4 个亚组,每组 6 只。实验期间,每周测量体重 1 次,每天观察动物外观体态,着重观察下颌部愈合情况并作相应记录,若有死亡动物应及时解剖,并观察内脏各器官形态变化。

4.2 兔下颌骨缺损模型的建立 取新西兰兔,3%戊巴比妥钠 40 mg/kg 耳缘静脉麻醉,联合速眠新 II 0.25 mL/kg 肌肉注射麻醉。将模型组、伤科接骨片组兔固定于实验台,消毒,沿左下颌骨下缘作 3 cm 长切口,暴露下颌骨体中段,用带直径 2 mm 钻头电钻,以 1 000 r/min 速度,于下颌角前 0.5 cm 处,打 3 个直达骨髓腔小孔,钻孔过程同时用 4°C 生理盐水冷却;把小孔连接成 1 个 $3\text{ mm} \times 8\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ 沟槽,不折断下颌骨,撒青霉素粉,分层缝合伤口;正常对照组兔只暴露下颌骨,不损伤骨体。按 40 万 U/只兔肌肉注射青霉素 3 天。

5 给药 正常对照组、模型组每只动物给予正常饲料 40 g/天,伤科接骨片组每只动物给予伤科接骨片饲料 40 g/天(约含伤科接骨片 0.528 g),直至处死。

6 标本采集 分别在建模后第 7、14、28、56 天处死相应动物,取兔左下颌骨缺损处(以骨缺损为中心上下约 0.5 cm)的骨组织块。

7 检测指标与方法

7.1 免疫组化检测兔下颌骨组织染色强度和面积 标本制片,形成石蜡包埋块后连续切片,按标准步骤行免疫组化染色,阴性对照片不加一抗,用 PBS 对照,胞浆棕黄色染色为阳性,显示结果进行定位及使用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统进行处理。

7.2 RT-PCR 检测 OPGmRNA、OPGLmRNA 取下颌骨骨折处的骨组织块液氮中迅速研磨至粉末状,再加入 2 mL Trizol,氯仿分离,水相层经异丙醇沉淀,RNA 产物溶解于 DEPC 处理的双蒸水中。取总 RNA 1 μg ,按 TaKaRa 公司 DRR019A 试剂盒要求

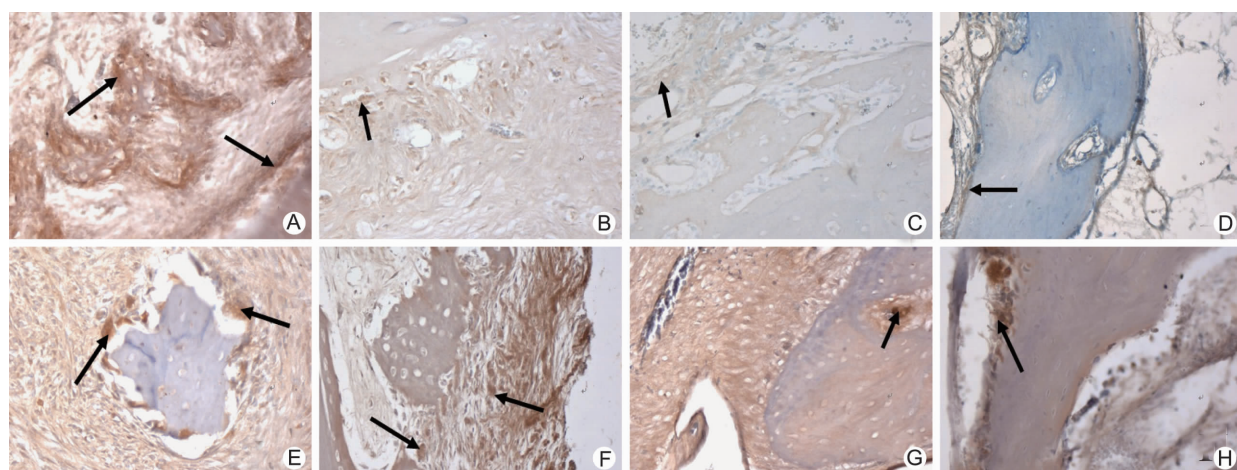
配制反转录反应液 10 μL , 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 min, 30 $^{\circ}\text{C}$ 放置 5 min, 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 灭活逆转录酶, 低温保存。配制 PCR 反应液: SYBRPremix Ex Taq 10 μL , 上、下游引物各 0.5 μL , RNase Free dd H_2O 8 μL 。分别取 1 μL 反转录产物加入含 3 种基因引物的 PCR 反应液中, 按以下条件反应: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 8 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 11 s 扩增, 循环 40 次; 绘制熔解曲线。以双 ΔCt 值法计算两组各时间点 OPG、OPGLcDNA 模板数与 GAPDH 模板数比值。

8 统计学方法 使用 SPSS 16.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析比较, 两两比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

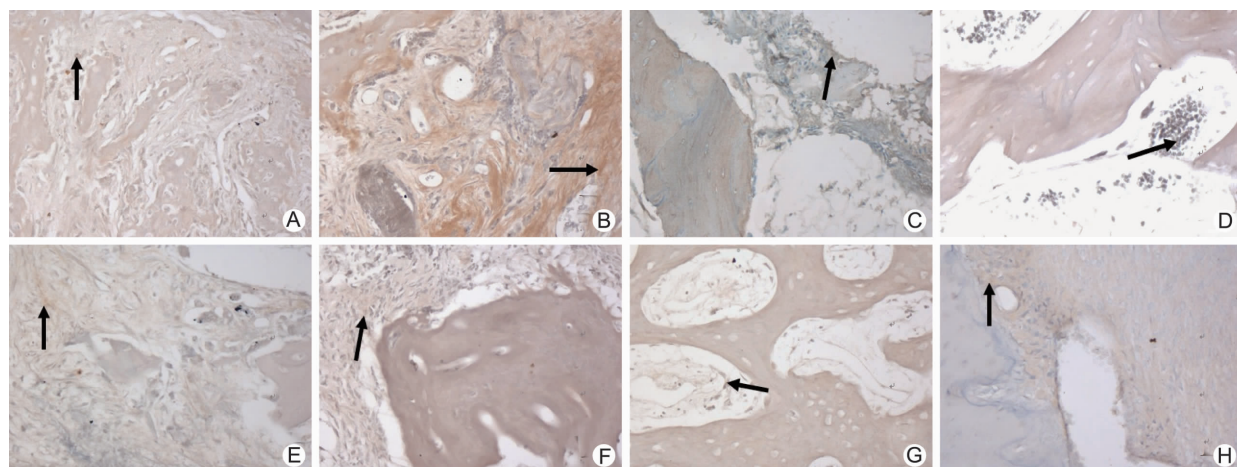
1 各组兔下颌骨缺损骨组织 OPG 染色比较 (图 1) 骨缺损后 7 天, 相当于骨痂形成早期, 伤科接骨片组与模型组阳性染色强度和面积相当 (图 1A、E); 骨缺损后 14、28、56 天, 相当于骨痂形成后期及临床愈合期, 伤科接骨片组呈强阳性染色, 面积广 (图 1F、G、H), 而模型组呈弱阳性染色, 面积小 (图 1B、C、D)。

2 各组兔下颌骨缺损骨组织 OPGL 染色比较 (图 2) 骨缺损后 14 天, 相当于骨痂形成后期, 模型组呈强阳性染色, 面积广 (图 2B), 而伤科接骨片组呈弱阳性染色, 面积小 (图 2F); 骨缺损后 7、28、56 天, 相当于骨痂形成早期及临床愈合期, 伤科接骨片组与模型组阳性染色强度和面积相当 (图 2A、C、E、G、D、H)。



注: A、B、C、D 分别为模型组建模后第 7、14、28、56 天 OPG 染色; E、F、G、H 分别为伤科接骨片组建模后第 7、14、28、56 天 OPG 染色。黑色箭头示染色骨细胞

图 1 各组兔下颌骨缺损骨组织 OPG 染色比较 (DAB 染色, $\times 400$)



注: A、B、C、D 分别为模型组建模后第 7、14、28、56 天 OPGL 染色; E、F、G、H 分别为伤科接骨片组建模后第 7、14、28、56 天 OPGL 染色。黑色箭头示染色骨细胞

图 2 各组兔下颌骨缺损骨组织 OPGL 染色比较 (DAB 染色, $\times 400$)

3 伤科接骨片干预前后兔下颌骨缺损骨组织 OPGmRNA 相对表达量变化比较(表 1) 与正常对照组比较,模型组兔下颌骨组织 OPG mRNA 表达在建模后第 7 天上调显著($P < 0.05$),第 14 天略有下调,第 28、56 天下调明显($P < 0.05$);与模型组比较,伤科接骨片组兔下颌骨组织 OPG mRNA 表达在建模后第 14、28、56 天上调显著,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 伤科接骨片干预前后兔下颌骨缺损骨组织 OPGmRNA 相对表达量变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OPGmRNA			
		7 天	14 天	28 天	56 天
正常对照	6	1.24 ± 0.03	1.22 ± 0.03	1.23 ± 0.02	1.21 ± 0.01
模型	6	1.85 ± 0.06 *	1.03 ± 0.04	0.91 ± 0.03 *	0.84 ± 0.02 *
伤科接骨片	6	1.81 ± 0.04	2.23 ± 0.05 [△]	1.84 ± 0.02 [△]	1.76 ± 0.03 [△]

注:与正常对照组同期比较,* $P < 0.05$;与模型组同期比较,[△] $P < 0.05$;表 2 同

4 伤科接骨片干预前后兔下颌骨缺损骨组织 OPGLmRNA 相对表达量变化比较(表 2) 与正常对照组比较,模型组兔下颌骨组织 OPGL mRNA 表达在建模后第 14 天显著上调($P < 0.05$),其他时间点上调不明显。与模型组比较,伤科接骨片组兔下颌骨组织 OPGLmRNA 表达在建模后第 14 天显著下调,差异有统计学意义($P < 0.05$),其他时间点与模型组比较,差异无统计学意义。

表 2 伤科接骨片干预前后兔下颌骨缺损骨组织 OPGLmRNA 相对表达量变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OPGL mRNA			
		7 天	14 天	28 天	56 天
正常对照	6	0.82 ± 0.02	0.91 ± 0.03	0.84 ± 0.01	0.79 ± 0.01
模型	6	0.86 ± 0.04	1.42 ± 0.05 *	0.95 ± 0.03	0.82 ± 0.02
伤科接骨片	6	0.98 ± 0.03	1.03 ± 0.04 [△]	0.92 ± 0.02	0.84 ± 0.01

5 伤科接骨片干预前后兔下颌骨缺损骨组织 OPG mRNA/OPGL mRNA 比值变化比较(表 3) 与正常对照组比较,模型组兔下颌骨组织 OPG mRNA/OPGLmRNA 比值在建模后第 7 天上升,第 14、28、56 天比值下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$);

表 3 伤科接骨片干预前后兔下颌骨缺损骨组织 OPG mRNA/OPGL mRNA 比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OPG mRNA/OPGL mRNA			
		7 天	14 天	28 天	56 天
正常对照	6	1.50	1.33	1.45	1.54
模型	6	2.13	0.71	1.01	1.04
伤科接骨片	6	1.95	2.17 *	2.02 *	2.10 *

注:与模型组同期比较,* $P < 0.05$

与模型组比较,伤科接骨片组兔下颌骨组织 OPG mRNA/OPGL mRNA 比值在建模后第 14、28、56 天显著上升($P < 0.05$)。

讨 论

颌骨缺损在临床上较为常见,可引起面部畸形、咬合异常。颌骨缺损修复过程复杂,是由许多复杂细胞因子所调控,其中成骨细胞与破骨细胞的动态平衡是维持骨骼完整性的关键。成骨细胞通过调节破骨细胞的分化成熟,参与骨吸收^[1,2]。在对破骨细胞的调节中,OPG/OPGL 环路起到核心作用^[3,4]。OPG 属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员,以分泌蛋白的形式发挥作用,主要功能是抑制破骨细胞的分化和形成,抑制成熟破骨细胞的骨吸收活性并诱导其凋亡。OPGL 为 OPG 的同源配体,通过结合破骨细胞表面的另一种肿瘤坏死因子受体超家族成员转录因子 NF- κ B 受体活化剂(receptor activator of NF- κ B, RANK),直接激发破骨细胞的分化和活性;OPG 通过与 OPGL 结合,抑制 OPGL 与 RANK 的结合间接抑制破骨细胞的分化和活性,因此 OPG/OPGL 环路是调节破骨细胞分化与活性的主要信号通路^[6]。OPG 还可通过抑制成熟破骨细胞 f-肌动蛋白环形成抑制骨吸收,或干扰基质细胞与破骨细胞之间的相互作用,诱导破骨细胞凋亡^[7],说明 OPG 通过两种途径抑制破骨细胞。OPGL 和 OPG 均在成骨细胞高度表达,并受许多细胞因子和激素调节^[8],如转化生长因子 β (TNF- β)及其超家族成员各种骨形态蛋白等可上调 OPGmRNA 表达^[9],糖皮质激素、前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)等则下调其表达;而甲状旁腺、PGE₂ 等因子却上调 OPGLmRNA。

伤科接骨片是以海星为主,配以鸡骨、三七、血竭、红花、没药、麝虫、自然铜、乳香、马钱子等组成的纯中药制剂,它通过改善血液循环、促进血肿吸收和机化、促进成骨细胞分化与增殖、促进骨折部位胶原合成及钙盐沉积而促进骨痂矿化等作用,而发挥其活血化瘀、消肿止痛、续筋接骨、补骨壮骨的功能^[5]。但作用机制未明。张继平等研究推测:伤科接骨片可能通过促进骨缺损中期膜内成骨的骨矿化和骨形成,从而促进骨缺损修复^[10],且肾组织转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)亦参与其作用过程^[11];姚晖等^[12]实验提示:伤科接骨片是通过增加骨缺损修复过程中骨小梁的数量和促进骨小梁结构致密而发挥作用的。本实验观察了伤科接骨片干预前后兔下颌骨缺损修复过程中 OPGmRNA、OPGLmRNA 表达的动态变化。实验显示与模型组比较,兔下颌骨缺损模型建立后第 14、28、56 天,伤科接

骨片组 OPG 阳性染色强度明显增强,面积更广;而两组 OPGL 染色阳性染色强度和面积相当,甚至于建模后第 14 天,伤科接骨片组 OPGL 阳性染色强度显著减弱,面积显著减小,显示伤科接骨片干预后骨缺损修复以成骨为主。同时实验发现与模型组比较,伤科接骨片组建模后第 14、28、56 天兔下颌骨组织 OPGmRNA 相对表达量显著上升 ($P < 0.05$),而 OPGLmRNA 相对表达量变化不大,甚至于第 14 天显著降低 ($P < 0.05$),提示伤科接骨片主要通过刺激 OPG 表达而发挥作用,而对 OPGL 表达抑制作用不明显,其作用机制可能是通过调节 OPG/OPGL 环路而促进骨缺损修复。此外, Yanfei LM 等^[13] 研究显示 OPG mRNA/OPGL mRNA 比值很大程度上可反映成骨细胞介导能力,比值越大,介导能力越强,本研究中伤科接骨片组 OPGmRNA/OPGL mRNA 比值在第 14、28、56 天较模型组明显增大 ($P < 0.05$),提示伤科接骨片可促进骨缺损愈合。

综上所述,伤科接骨片可能通过 OPG/OPGL 环路的信号途径促进骨缺损修复,为临床应用伤科接骨片治疗骨缺损提供了实验依据。但在骨缺损修复过程中,OPG 是通过与 OPGL 结合,间接抑制破骨细胞的分化和活性,抑或同时通过抑制成熟破骨细胞 f-肌动蛋白环形成抑制骨吸收,以及伤科接骨片对成熟破骨细胞 f-肌动蛋白环的影响等,则有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Kim JB, Leucht P, Luppen CA, et al. Reconciling the roles of FAK in osteoblast differentiation, osteoclast remodeling, and bone regeneration [J]. Bone, 2007, 41(1): 39–51.
- [2] Caetano Lopes J, Canhao H, Fonseca JE, et al. Osteoblasts and bone formation [J]. Acta Reumatol Port, 2007, 32(2): 103–110.
- [3] Cao JJ, Wronski TJ, Iwaniec U, et al. Aging increases stromal/osteoblastic cell-induced osteoclastogenesis and alters the osteoclast precursor pool in the mouse [J]. J Bone Miner Res, 2005,

20(9): 1659–1668.

- [4] Pivonka P, Zimak J, Smith DW, et al. Model structure and control of bone remodeling: a theoretical study [J]. Bone, 2008, 43(2): 249–263.
- [5] 宫丽, 张继平. 伤科接骨片促进骨折愈合的研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(5): 92–94.
- [6] Kadow RA, Hoffmann JE, Duda G, et al. Effect of mechanical stimulation on osteoblast – and osteoclast-like cells *in vitro* [J]. Cells Tissues Organs, 2009, 190(2): 61–68.
- [7] Lacey DL, Tan HL, Lu J, et al. Osteoprotegerin-ligand modulates murine osteoclast survival *in vitro* and *in vivo* [J]. Am J Pathol, 2000, 157(2): 435–448.
- [8] Hakeda Y, Kobayashi Y, Yamaguchi H, et al. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 251(3): 796–801.
- [9] Wan M, Shi X, Feng X, et al. Transcriptional mechanisms of bone morphogenetic protein-induced osteoprotegerin gene expression [J]. J Biol Chem, 2001, 276(13): 10119–10125.
- [10] 张继平, 宫丽, 邱建文, 等. 伤科接骨片对家兔骨折模型骨形态计量学动态参数的影响 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2008, 14(1): 47–50.
- [11] 张继平, 张奋耿, 宫丽, 等. 伤科接骨片对家兔骨折模型肾组织转化生长因子- β_1 表达的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2008, 25(4): 316–318.
- [12] 姚晖, 宫丽, 张继平, 等. 伤科接骨片对家兔骨折模型骨形态计量学静态学参数的影响 [J]. 中医正骨, 2008, 20(3): 3–5.
- [13] Yanfei LM, Rick LC, David LH, et al. Catabolic effects of continuous human PTH (1–38) *in vivo* is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation [J]. Endocrinology, 2001, 142(9): 4047–4054.

(收稿: 2012–04–07 修回: 2012–10–15)