

双膦酸盐对骨形成蛋白诱导骨吸收抑制作用的研究

宫琳 唐伟华 宫宁

摘要: **目的** 研究双膦酸盐 (bisphosphonate YM 175) 对骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, 简称 BMP) 诱导骨吸收的抑制作用。**方法** 42 只大白鼠背部植入 BMP, 诱导出异位骨后, 将大白鼠分成 2 组, 即投药组和对照组。投药组在 BMP 植入后第 3w 至第 7w, 双膦酸盐 (YM 175) 每周投药 3 次, 剂量 1 ($\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{d}$)。对照组按同样的方式给予等量的生理盐水。在 BMP 植入第 3w、4w、7w 和 10w, 将 BMP 诱导骨取出, 采用 TRAP 和 cathepsin K 染色方法来观察双膦酸盐对破骨细胞的作用。**结果** BMP 诱导骨 3w 时 (即未投双膦酸盐药前), 在 BMP 植入体周边形成编织骨 (woven bone), 大量破骨细胞出现在新生骨组织表面。在 4 w 时, 双膦酸盐投药组和对照组, 新生骨组织均向 BMP 植入体内生长, 但双膦酸盐投药组的破骨细胞较对照组有减少。在 10 w 时, 双膦酸盐投药组和对照组均可观察到骨细胞变小并且有规律地排列的板层状骨 (lamellar bone) 的特征。而双膦酸盐投药组, 破骨细胞死亡, 与对照组比较, 破骨细胞数目明显减少。**结论** 双膦酸盐对破骨细胞性骨吸收有明显的抑制作用。

关键词: 骨形成蛋白; 双膦酸盐; 破骨细胞

Effect of bisphosphonate YMI75 inhibition on bone resorption of ectopic bone induced by bone morphogenetic protein 2 GONG Lin, TANG Weihua, GONG Ning. Department of Stomatology, The Central Hospital of China Aerospace Corporation, Teaching Hospital of Beijing University, Beijing 100039, China

Abstract: **Objective** To determine the inhibited effects of bisphosphonate YM175 on bone resorption induced by bone morphogenetic protein (BMP). **Methods** Ectopic bones were induced by recombinant human BMP-2 implanted subcutaneously on the back of 42 rats. Bisphosphonate YM175 1 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{d}$ was administered to the rats three times per week, from the 3rd to 7th week after implantation (bisphosphonate group). Aliquots of phosphate buffered saline were administered in the same protocol without bisphosphonate to the control group. On the end of 3rd, 4th, 7th or 10th week, the BMP-induced bones were removed and observed by enzyme histochemistry for tartrate-resistance acid phosphatase (TRAP) and immunohistochemistry for cathepsin K. **Results** Before bisphosphonate being administered, woven bones had formed in the periphery of the BMP pellets, while osteoclasts were attached to these bones. At the end of 4th week, bone formation advanced to the implanted bones in both groups. But few osteoclasts were observed in the bisphosphonate group than that in the control at the 4 and 10 weeks. Both groups showed the characteristics of lamellar bones. **Conclusions** Osteoclast-mediated bone resorption was inhibited by the bisphosphonate administration.

Keywords: Bone morphogenetic protein; Bisphosphonate; Osteoclast

1965 年, Urist^[1]首先在小牛长管状骨内提取出骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, 简称

BMP), 并且发现 BMP 能够在活体组织内诱导出软骨和骨组织。1988 年 Wozney 等^[2]利用克隆技术成功地克隆了多种 BMP, 称为 BMP 家族 (BMPs)。所以, 基因重组 BMPs 已经做为一种药物用来治疗先天性、外伤性和肿瘤性骨缺损疾病。但是, 由于 BMP 植入体内易被吸收而消失。所以, 一种 BMP 缓慢释放系统即 BMP 载体是必

作者单位: 100039 北京航天中心医院口腔科 (宫琳、唐伟华); 中国人民解放军总参 316 医院 (宫宁)

通讯作者: 宫琳, Email: xhao920331@yahoo.com.cn, Tel: 13521521139, 68766744.

要的。BMP 载体能够使 BMP 诱导巨噬细胞向成骨转化^[3]。许多学者^[4-7]就 BMP 载体进行了大量的研究,如胶原、骨基质、纤维蛋白、多聚酸等^[8-10]。研究发现 BMP 和其载体构成的 BMP 植入体能够诱导形成与植入体大小相同的诱导骨。但是,这种 BMP 诱导骨会发生骨转换 (bone turnover) 及快速骨吸收,表现出骨质疏松。因此,解决 BMP 诱导骨骨吸收的问题就成为 BMP 应用于临床急待解决的问题之一。双膦酸盐 (bisphosphonate) 具有抑制破骨细胞性骨吸收的作用。动物实验表明,双膦酸盐有预防骨吸收等作用^[11]。在临床上,双膦酸盐被应用于治疗由于骨代谢紊乱所致的疾病,如 Paget's 病、肿瘤所致的骨吸收及低钙血症等^[12]。根据以上的结论,设想双膦酸盐也可能对 BMP 诱导骨的骨吸收有抑制作用。选用双膦酸盐 (bisphosphonate YMI75) 投药于 BMP 诱导骨,投药期为 BMP 植入后第 3 周到第 7 周。因为在这个期间,骨形成已经开始,并且形成了诱导骨。根据实验的设计,取 BMP 诱导骨采用 TRAP 和 cathepsin K 染色方法进行观察。

1 材料和方法

1.1 BMP 植入体制备

人类基因重组 BMP (rhBMP) 由日本山之内制药株式会社提供。在 0.4 ml I 型胶原 (小牛新鲜皮肤中提取) 溶液中,溶解 5 μ g rhBMP-2。在本研究中, I 型胶原做为 rhBMP-2 的载体。将 rhBMP-2 和 I 型胶原的混合液用冻干机冻干后,制成直径为 3 mm 的球状体备用^[13]。

1.2 实验设计

42 只 Wistar 大白鼠 (4 周龄,雄性,体重 40 ~ 50 g) 用戊巴比妥钠 (5 mg/100 g) 麻醉下,将 BMP 植入体植入到大白鼠背部后,将大白鼠分成两组即投药组和对照组。投药组,从 BMP 植入后 3w 到 7w 期间,按 1 (μ g/)(kg. d) 剂量进行腹腔注射双膦酸盐 YMI75,每周 3 次。在 BMP 植入后 4、7 和 10w 时,每次处死 6 只大白鼠。对照组,按上述方法给予等量生理盐水,在 BMP 植入后 3、4、7 和 10w 时,每次处死 6 只大白鼠。

1.3 组织化学法

在乙醚吸入麻醉下,将 Wistar 大白鼠固定在

手术台上,用 4% 的多聚甲醛 0.1md/L 二甲胍酸缓冲液 200 ml 进行灌流固定。20 min 后,将 BMP 诱导骨及周围组织切除,标本用 10% EDTA 在 4℃ 下脱钙,石蜡包埋、进行连续切片,4 μ m 切片采用血浆抗酒石酸盐酸性磷酸酶 (Tartrate-resistant acid phosphatase 简称 TRAP) 染色法^[14]和 Inaoka^[23]的兔破骨细胞组织蛋白酶 K (cathepsin K) 免疫标记法进行观察。

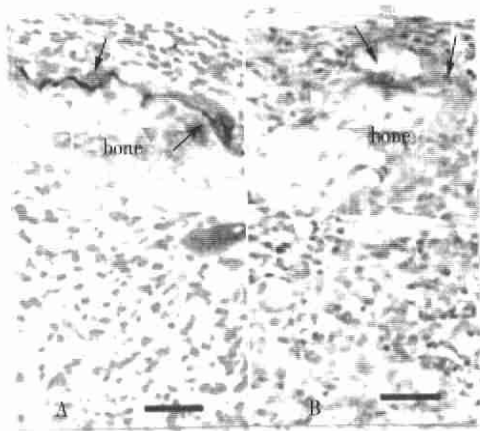
2 结果

对照组 3w 时,在钙化的骨基质中骨细胞陷窝不规则地排列,呈现出编织骨 (woven bone) 结构^[15]。在新生骨组织表面有许多 TRAP 阳性多核细胞 (图 1A)。在连续切片中,这些 TRAP 阳性多核细胞 cathepsin K 免疫标记法在相同区域也被标记。这些阳性细胞被证实是破骨细胞 (图 1B)。对照组 4w 时,钙化的骨基质区域内不规则排列的骨细胞变得较大,渐渐地这些骨细胞变得排列有序,形成板层状骨 (lamellar bone) 结构^[15]。TRAP 阳性多核细胞在 BMP 诱导骨表面和内部均可见。对照组 7w 时,TRAP 阳性破骨细胞充分地标记在相对肌肉面的骨表面和骨髓内。对照组 10w 时,脂肪化骨髓形成,破骨细胞的数目减少 (图 2A)。

投药组 4w 时,TRAP 阳性破骨细胞与对照组对比变得较小。TRAP 阳性破骨细胞这种形态的变化在双膦酸盐投药组的每个阶段都是很明显的 (图 2B)。与同时期的对照组比较,双膦酸盐投药组,破骨细胞数目明显减少。

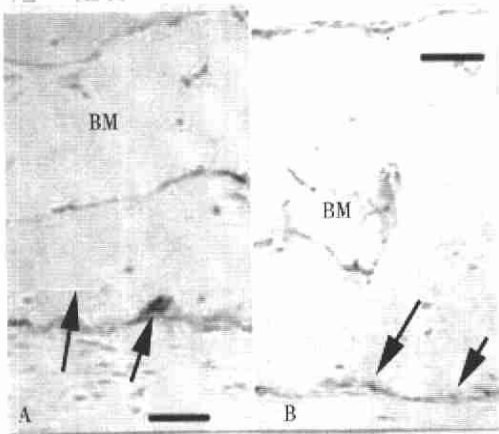
3 讨论

在本研究中,BMP 植入 3w 时许多 TRAP 阳性破骨细胞附着在 BMP 植入体周边新生编织骨 (woven bone) 的表面,cathepsin K 免疫标记也显示阳性。这表明破骨细胞对非成熟骨有骨吸收作用^[16]。以后,在对照组中骨组织逐渐成熟,由编织骨向板层状骨转化,并可见骨髓形成。相比之下双膦酸盐投药后,与对照组比较,破骨细胞的数目明显地减少。研究结果表明,双膦酸盐干扰成熟破骨细胞在骨表面的募集;抑制破骨细胞波状缘 (Ruffled Border) 的形成和破骨细胞的激活;影响破骨



A 在新生骨组织 (bone) 表面 TRAP 阳性多核细胞可见 (箭头所示) B 在 TRAP 阳性多核细胞区域 cathepsin K 免疫标记也显示阳性 (箭头所示), 证实是破骨细胞

图 1 对照组 3 周时的骨质改变 (×100)



A 对照组 10 周, TRAP 阳性破骨细胞在骨髓内和新生骨组织表面被观察。(箭头所示为 TRAP 阳性细胞) B 投药组 10 周, 破骨细胞的数目明显减少。BM: 骨髓 (箭头所示凋亡破骨细胞)

图 2 第 10 周时对照组与投药组破骨细胞变化情况 (×100)

细胞的形成和活化, 减少破骨细胞的数量^[17,18]。动物实验表明, 骨内动态平衡是通过不断地骨重建 (bone remodeling) 来维持^[19-22]。骨重建是成熟骨组织的一种替换机制, 包括骨组织的形成和骨组织的重吸收两方面的变化。在骨重建过程中, 破骨细胞起着非常重要的作用, 破骨细胞的骨吸收先于成骨细胞的骨形成, 破骨细胞-成骨细胞的偶联代谢被推测为破骨细胞吸收骨组织, 然后释放镶嵌在骨基质中的各种生长因子。这些生长因子激活成骨细胞并促进骨基质的形成。在骨生成的早期阶段, 骨形成占据着优势, 但破骨细胞在骨生成的早期阶段起着促进骨形成的作用。本研究结果表明, 双膦酸盐 (YM 175) 作用于破骨细胞, 使破骨细胞凋亡,

破骨细胞数目减少, 对破骨细胞性骨吸收活性有明显地抑制作用。

【参 考 文 献】

[1] Urist MR. Formation by autoinduction. Science, 1965, 150: 893-899.

[2] Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science, 1988, 242: 1528-1534.

[3] Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, et al. Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. Clin Orthop Rel Res, 1988, 234: 250-254.

[4] Kawamura M, Urist MR. Human fibrin is a physiologic delivery system for bone morphogenetic protein. Clin Orthop Rel Res, 1988, 235: 302-310.

[5] Kenley R, Marden L, Turek T, et al. Osseous regeneration in the rat calvarium using novel delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). J Biomed Mater Res, 1994, 28: 1139-1147.

[6] Miyamoto S, Takaoka K, Okada T, et al. Poly(lactic acid-poly(ethylene glycol) block copolymer. Clin Orthop Rel Res, 1993, 294: 333-343.

[7] Paralkar VM, Nandedkar AKN, Pointer RH, et al. Interaction of osteogenin a heparin binding bone morphogenetic protein with type IV Collagen. J Biol Chem, 1990, 265: 17281-17284.

[8] Sato M, Grasser W, Endo N, et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. J Clin Invest, 1991, 88: 2095-2105.

[9] Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. Endocr Rev, 1998, 19: 80-100.

[10] Fleisch H. New bisphosphonates in osteoporosis. Osteoporosis Int, 1993, 3 (Suppl2): 15-21.

[11] Guy JA, Shea M, Peter CP, et al. Continuous alendronate treatment throughout growth, maturation, and aging in the rats results in increases in bone mass and mechanical properties. Calcif Tissue Int, 1993, 53: 283-288.

[12] Fleisch H. Bisphosphonates, pharmacology and use in the treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. Drugs, 1991, 42: 919-942.

[13] Takaoka K, Kozuka M, Nakahara H. Telepeptide-depleted bovine skin collagen as a carrier for bone morphogenetic protein. J Orthop Res, 1991, 9: 902-907.

[14] 郭世波, 主编. 骨质疏松基础与临床. 天津: 天津科学技术出版社, 2001. 503-505.

[15] Fawcett DW. Bone. A Textbook of Histology. 1986. 199-238.

[16] Littlewood EA, Kokubo T, Ishihashi O, et al. Localization of cathepsin K in human osteoclasts by in situ hybridization and immunohistochemistry. Bone, 1997, 20: 81-86.

- [7] Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. Endocrine Reviews, 1996, 17: 308-332.
- [8] Hsu H, Lacey D, Dunstan C, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 3540-3545.

收稿日期: (2004-08-01)