

纤维蛋白胶复合 BMP 对去卵巢山羊骨密度和松质骨中 OPG 表达的影响

李强 袁志 刘建 孟国林 杨鹏 姜文雄

摘要：目的 了解纤维蛋白胶(Fibrin sealant , FS)复合 BMP₂ 局部成骨机制 ,为其临床应用提供实验依据。方法 将 9 只 2 岁雌性山羊施行卵巢切除术 ,以每个山羊桡骨远端为一个实验单位 ,共 18 个单位 ,随机分为 :生理盐水组(NS)、纤维蛋白胶组(FS)、实验组(FS + BMP₂) ,每组 6 个单位。术后 6 个月 ,分别在各组桡骨远端一次性注射生理盐水、纤维蛋白胶和纤维蛋白胶复合 BMP₂。注射 5 周后 ,应用双能 X 线吸收仪(DEXA)测量各组山羊桡骨远端的骨密度(BMD) ,在桡骨远端取活组织 ,利用免疫组织化学染色及图像分析方法对组织切片进行图像分析 ,观察纤维蛋白胶复合 BMP₂ 对去势山羊松质骨骨保护素(OPG)表达的影响。结果 ①与 NS 组比较 FS + BMP₂ 组桡骨远端 BMD 明显升高($P < 0.01$) ,FS 组 BMD 变化不明显($P > 0.05$) ,FS + BMP₂ 组 BMD 明显高于 FS 组和 NS 组($P < 0.01$)。②FS + BMP₂ 组灰度值明显低于 NS 组和 FS 组($P < 0.01$) ,NS 组和 FS 组灰度值差别不明显($P > 0.05$)。结论 局部注射纤维蛋白胶复合 BMP₂ 具有高效的骨诱导活性 ,对局部骨质疏松骨折具有预防作用。
关键词：骨质疏松 ; 骨形态发生蛋白 ; 骨矿密度 ; 骨保护素

Influence of fibrin sealant as a carrier of bone morphogenetic protein on expression of OPG in cancellous bone and its bone mineral density in ovariectomized goats Li Qiang , YUAN Zhi , LIU Jian , et al . Institute of Orthopedics of Chinese PLA Xijing Hospital ,The Fourth Military Medical University ,Xi'an 710032 , China

Abstract : Objective To study the influence of fibrin sealant as a carrier of bone morphogenetic protein on expression of OPG in cancellous bone and its bone mineral density(BMD) in ovariectomized(OVX) goats , and provide experimental foundation for the clinical application in the future. **Methods** Nine 2-year-old female goats were ovariectomized. Each distal radial as a experimental unit ,18 units were randomized in three groups($n = 6$) , including NS , FS and FS + BMP₂ group. 6 months later , normal sodium(NS) ,fibrin sealant(FS)and fibrin sealant + BMP₂ were injected respectively into distal radials of NS , FS and FS + BMP₂ group. The biopsy was collected 5 weeks later. BMD of distal radials were measured by dual energy-x-ray absorptiometry(DEXA) ; SABC immunohistochemistry and Image Analysis was used to detect the expression of OPG in distal radial of each group. **Results** ①The grayscale of cancellous bone in NS group and FS group was significantly higher than that in FS + BMP₂ group($P < 0.01$). ②BMD of FS + BMP₂ increased more significantly than NS group and FS group($P < 0.01$). **Conclusions** Fibrin sealant as a carrier of bone morphogenetic protein has a very good activity in inducing bone formation , and can prevent fracture caused by osteoporosis after menopause. **Key words :** Osteoporosis ; Bone morphogenetic proteins ; Bone mineral density ; Osteoprotegerin

骨形态发生蛋白(BMPs)具有诱导成骨作用 ,但是由于缺乏理想的载体 ,其在实际中的应用受到很大限制。单纯 BMPs 植入人体后 ,会被组织也稀释及蛋白酶所分解 ,在局部能保持有效浓度的时间非

常有限 ,因此要发挥其骨诱导作用 ,需要有合适的载体 ,但目前尚未发现理想的 BMPs 载体。各种激素和细胞因子调节破骨细胞形成的终末因素骨保护素(OPG)在骨髓微环境中 ,是成骨细胞和骨髓基质细胞调控破骨细胞分化活化的重要分子机制^[1-3]。本实验用去卵巢山羊建立绝经后骨质疏松模型^[4,5] ,桡骨远端注射纤维蛋白胶复合 BMP₂ ,应用免疫组织化学方法检测桡骨远端松质骨中 OPG 的表达 ,为纤维

作者单位 : 710032 陕西西安 ,第四军医大学西京医院全军骨科研究所
通讯作者 : 刘建 ,Email :ljreny@fmmu.edu.cn

蛋白胶复合 BMP₂ 临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

关中山羊(第四军医大学实验动物中心提供),纤维蛋白胶(广州倍绣生物技术有限公司提供),牛BMP冻干粉(bBMP,从新鲜牛皮质骨中提取,第四军医大学西京医院全军骨科研究所综合骨库提供),兔抗山羊 OPG 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),SABC 免疫组化试剂盒及 DAB 显色剂(武汉博士德公司),DPX-IQ 型双能 X 线吸收仪(DEXA)及中小动物软件系统(Lunar 公司,美国),LEICADMLA 显微镜及 Leica Q-Win Stander V 2.3 全自动图像分析系统(Leica 公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 分组和处理 选用 2 岁左右健康雌性关中山羊 9 只,体重 32.5 ± 4.2 kg。所有山羊均在无菌条件下用动物专用麻药 846(中国人民解放军农牧大学军事兽医研究所出品)肌注麻醉,经腹腔切除双侧卵巢。术后用青霉素肌注预防感染。所有动物均在相同环境中饲养,自由摄水摄食(饲料由第四军医大学实验动物中心提供)。以每只山羊一侧桡骨远端为一个实验单位,共 18 个实验单位,随机分为 3 组(每组 6 个单位):生理盐水组(NS)、纤维蛋白胶组(FS)、实验组(FS + BMP₂)。根据文献报道,山羊卵巢切除术后 6 个月,骨质疏松动物模型建立成功^[4,5]。一次性注射 NS 组桡骨远端注射生理盐水 1 ml,FS 组注射纤维蛋白胶 1 ml,FS + BMP₂ 组注射纤维蛋白胶 1 ml + BMP₂ 30 mg。纤维蛋白胶配制方法:主体溶解液和催化剂溶解液各 0.5 ml 用专用注射器吸取后,注入生物胶主体瓶和催化剂瓶内,溶解后分别抽取,同时注射。纤维蛋白胶复合 BMP₂ 配制方法:配制前将 30 mg BMP₂ 粉末倒入催化剂溶解液注射器内,抽取催化剂溶解液,混匀。其余步骤同纤维蛋白胶配制方法。

1.2.2 标本采集制备方法 3 组均在注射后 5 周测量桡骨远端骨密度,在消毒麻醉条件下取桡骨远端骨组织活检,大小 1 cm × 1 cm(底面直径 × 高),置于 4% 的多聚甲醛溶液 4℃ 环境下固定 48 h,再放入 15% EDTA 溶液中脱钙 2 周,每 3 天更换 1 次脱钙液,脱钙完成后,标本经梯度酒精逐级脱水后,石蜡包埋、切片,进行免疫组化染色。

1.2.3 免疫组织化学染色 桡骨远端松质骨免疫组

织化学染色过程:①切片浸入二甲苯、梯度酒精脱蜡、脱水,在室温 20℃ 下置于 3 ml/L H₂O₂ 溶液中灭活内源性过氧化酶,蒸馏水清洗 3 次;②切片浸入 0.01 M 枸橼酸盐缓冲液,用电炉加热至沸腾后熄火,间隔 6 min 后再反复加热 2 次,冷却后 PBS 清洗 2 次,滴加 5 ml/L BSA 封闭液,室温下孵育 20 min,甩去多余的液体;③滴加 1:200 兔抗山羊 OPG 多克隆抗体(I 抗),在室温下孵育 2 h 后用 0.01 mmol/L PBS 清洗 3 min × 3 次;④滴加 1:200 生物素化鼠抗兔 IgG(II 抗),在室温下孵育 20 min,0.01 mmol/L PBS 溶液冲洗 2 min × 3 次;⑤滴加 SABC 试剂,室温下 20 min,0.01 mmol/L PBS 清洗 5 min × 3 次;⑥DAB 显色,显微镜下观察有棕黄色物质出现时停止;⑦蒸馏水冲洗,苏木素复染细胞核,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.4 骨密度测量 使用 DPX-IQ 型 7040 双能 X 线吸收测量平台(Lunar 公司,美国),通过计算机中小动物软件系统测量桡骨远端 BMD 值。

1.2.5 图像分析 骨组织形态学及骨免疫组织化学观察采用 LEICA DM LA 显微镜及 Leica Q-Win Stander V 2.3 全自动图像分析系统(Leica 公司,德国)。每次均在开机 20 min 后,在 40 倍物镜下采集图像。每次采集都将采图的各项设置包括光源、光圈大小、白平衡、曝光强度、对比度等改为手动设置且固定,以保证每次取图的设置值一样,使各组的图片采集的灰度值具有可比性。以细胞内呈棕黄色颗粒者为阳性。对各组切片细胞中 OPG 表达的灰度值进行分析。判定方法:免疫组织化学反应的强弱与灰度值成反比关系。灰度值越小,阳性染色越强,表明免疫反应性越高。结果进行统计学处理。

1.3 统计学处理

采取 SPSS 11.5 软件进行统计分析,所有参数均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采用 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 骨密度测量

注射 5 周后,与 NS 组相比,FS 组 BMD 变化不明显($P > 0.05$),FS + BMP₂ 组 BMD 升高($P < 0.01$),见表 1。

表 1 各组 BMD 测定值比较($\bar{x} \pm s$, g/cm²)

时间 \ 部位	NS	FS	OVX + CCP
注射 5 周后	1.8069 ± 0.022	1.8103 ± 0.021*	1.9326 ± 0.017 [△]

注:与 NS 组比较,* $P > 0.05$,[△] $P < 0.01$

2.2 免疫组化染色显微镜下观察

桡骨远端松质骨中 OPG 主要分布在骨小梁周围成骨细胞、破骨细胞及骨髓中未分化的间充质细胞中;NS 组山羊松质骨中 OPG 阳性反应与 FS 组比较无统计学意义;FS + BMP₂ 组 OPG 阳性表达高于 NS 组和 FS 组,且染色加深。图 1~3 为 NS 组、FS 组、FS + BMP₂ 组桡骨远端松质骨注射 5 周后 OPG 免疫组织化学染色(×400)。

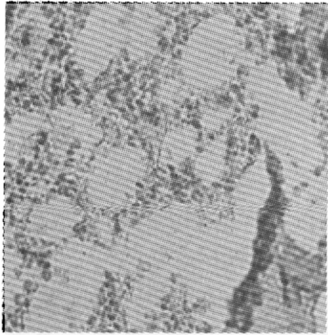


图 1

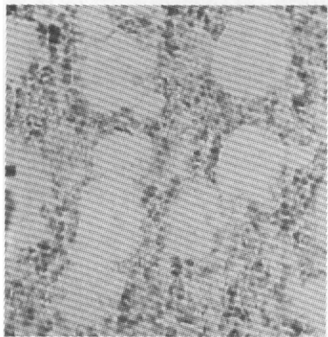


图 2

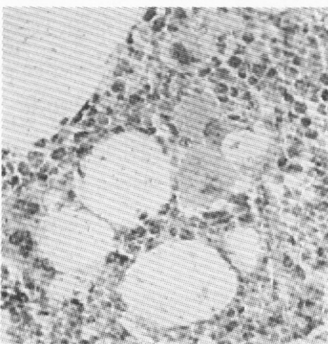


图 3

2.2 图像分析

FS 组与 NS 组相比较,OPG 阳性细胞灰度值差异无统计学意义($P > 0.05$),而 FS + BMP₂ 组 OPG 阳性细胞灰度值低于 NS 和 FS 组($P < 0.01$),见表 2。

表 2 各组松质骨中 OPG 阳性细胞灰度值对比($\bar{x} \pm s$)

组别	NS	FS	FS + BMP ₂
灰度值	155.46 ± 9.32	156.76 ± 6.07*	145.24 ± 4.77 [△]

注:与 NS 组比较 * $P > 0.05$, [△] $P < 0.01$

3 讨论

骨形态发生蛋白(BMP)的诱导成骨作用已经得到国内外众多学者的实验证明,这也是骨科学和生命科学界不争的事实。但 BMP 在临床的应用尚未得到相应的认可和推广。主要原因有:①BMP 的纯度或活性不足;②在应用 BMP 的过程中,使用技巧、剂量掌握等方面的差异对 BMP 的诱导成骨活性的发挥也有重要影响;③缺乏适合 BMP 的活性发挥的载体,其中作为载体除了本身作为植入材料应具有的良好生物性能外,其首要的性能之一就是能对 BMP 有良好的缓释作用^[6]。纤维蛋白是一种低抗原的生物大分子材料,易于降解,可塑性良好,在多方面符合 BMP 载体的理想条件。Kawamura 等^[7]报道,BMP 与纤维蛋白复合后骨诱导活性显著提高。因此,本实验以纤维蛋白胶作为 BMP₂ 的载体,研究其在局部成骨机制,为临床应用于骨质疏松骨折的预防提供实验依据。

OPG 又称为破骨细胞形成抑制因子,骨组织中系由成骨及骨髓基质细胞分泌产生,为肿瘤坏死因子受体超家族新成员。OPG 通过与其天然配体 OPGL 竞争性结合,封闭 OPGL 与破骨细胞表面膜受体核因子 Kappa B(RANK)的结合,阻断破骨细胞的分化及活化,从而发挥其拮抗破骨细胞骨吸收的生理作用;或干扰骨髓基质细胞与破骨细胞之间的相互作用而诱导破骨细胞的凋亡^[1,3]。OPG 过度表达的转基因大鼠可出现类似石骨症的表现^[8],而删除编码 OPG 基因的大鼠则出现严重的骨质疏松^[3]。

本实验发现,注射纤维蛋白胶复合 BMP₂ 5 周后 FS + BMP₂ 组去势山羊松质骨 OPG 表达阳性灰度值较 NS 组和 FS 组明显降低($P < 0.01$),表明 FS + BMP₂ 组山羊松质骨中骨小梁周围及髓腔内 OPG 表达阳性细胞数增多,提示去势后山羊成骨作用增强有其分子生物学基础,这与因雌激素水平降低引起骨骼系统高转换最终导致骨质疏松的机制一致;经 FS + BMP₂ 注射后 5 周的去势山羊,BMD 明显大于生理盐水注射组和单纯纤维蛋白胶注射组($P < 0.01$);本研究显示,去势山羊桡骨远端局部注射纤维蛋白胶复合 BMP₂ 后 BMD 得到较大提高,而未经纤维蛋白胶复合 BMP₂ 注射的 NS 组和 FS 组山羊

BMD 却呈降低趋势,说明纤维蛋白胶复合 BMP₂ 对低雌激素水平下的骨密度有较好的提升作用。

纤维蛋白胶(FS),生物相容性良好、易于被人体吸收,可促进组织再生,而且具有良好的黏结作用和可注射性,已广泛用于许多外科领域^[9],临床上多将纤维蛋白胶用于手术过程术野渗血及小静脉的局部出血,封闭缺损组织,防止组织黏连,促进创伤愈合。国内有报道以纤维蛋白胶为载体的注射型骨修复材料具有异位诱导成骨的作用^[10]。但是有关纤维蛋白胶作为 BMP₂ 载体是否促进骨质疏松成骨的文献报道却不多。本次实验,我们就针对这种现状采用纤维蛋白胶作为 BMP₂ 的载体,应用局部注射的方法,观察纤维蛋白胶复合 BMP₂ 对去卵巢山羊骨质疏松形成过程中骨密度和松质骨中 OPG 表达的影响,通过实验中免疫组化、BMD 检测结果,说明了纤维蛋白胶复合 BMP₂ 在松质骨局部具有良好的诱导成骨作用,对雌激素缺乏引起局部骨质疏松性骨折具有预防作用。纤维蛋白胶复合 BMP₂ 对去卵巢山羊成骨作用是否存在剂量依赖效应以及对骨吸收是否具有抑制作用还有待进一步研究。

【参 考 文 献】

[1] Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation

of bone resorption. J Bone and Miner Res 2000 ,15(1) 2-12.

- [2] Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, et al. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. Endocrinology ,2000 ,141(9):3478-3484.
- [3] Aubin JE, Bonnelly E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. Osteoporosis International 2000 ,11(11) 905-913.
- [4] Siu WS, Qin L, Cheung WH. A study of trabecular bones in ovariectomized goats with micro-computed tomography and peripheral quantitative computed tomography. BONE 2004 ,35 21-26.
- [5] 李良, 陈槐卿, 陈孟诗, 等. 建立骨质疏松山羊模型初探. 中国骨质疏松杂志, 1998 ,4(2):122-161.
- [6] Winn SR, Uludag H, Hollinger JO. Carrier system for Bone Morphogenetic Proteins. Clin Orthop ,1999 ,367 :95-106.
- [7] Kawamura M, Urist MR. Human fibrin is a physiological delivery system for bone morphogenetic protein. Clin Orthop ,1988 ,235 :302-310.
- [8] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell , 1997 ,89(2) 309-319.
- [9] Hattori T. Experimental investigations of osteogenesis and chondrogenesis by implant of BMP-fibrin glue mixture, Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi , 1998 ,64(9):824-828.
- [10] 雷伟, 崔庚, 胡蕴玉, 等. 以纤维蛋白胶为载体的注射型骨修复材料对兔桡骨骨缺损修复的实验研究. 骨与关节损伤杂志 2004 ,11(19):752-756.

(收稿日期:2006-08-03)