

# 特异性抑制 ATP6i 慢病毒治疗局部骨质疏松的实验研究

童培建 肖鲁伟 孙益

中图分类号: R714.257 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)05-0322-05

**摘要:**目的 观察体外筛选出的带有 siRNA 片断的具有高效抑制破骨细胞表达 ATP6i 的慢病毒颗粒对大鼠局部骨质疏松是否具有治疗作用。方法 健康雌性 SD 大鼠 40 只,体重 180~220 g,随机分为 4 组,分别为(+)病毒治疗组、(-)病毒对照组、生理盐水对照组和空白组,每组 10 只。进行局部骨质疏松造模,13 周造模检测成功后,开始给药。阳性病毒治疗组用(+)慢病毒颗粒  $1.5 \times 10^8$  TU/ml 右侧股骨髓腔内注射 3 次,每次 0.1 ml,阴性病毒对照组用(-)慢病毒颗粒  $1.5 \times 10^8$  TU/ml 右侧股骨髓腔内注射 3 次,每次 0.1 ml,生理盐水对照组用生理盐水右侧股骨髓腔内注射 3 次,每次 0.1 ml,空白组予假手术处理。给药后 12 周,处死取血清及双侧股骨,分别测定血清指标:血 Ca、血 P、ALP,双侧股骨近端骨密度,并切片处理后,显微镜下作骨形态计量学检测。结果 给药后各组血清指标数据比较差异无明显统计学意义,右侧股骨近端骨密度测定显示治疗组与对照组比较差异有统计学意义。骨形态计量学检测显示治疗组与对照组相比骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁间距都具有统计学意义。结论 体外筛选出的带有 siRNA 片断的具有高效抑制破骨细胞表达 ATP6i 的慢病毒颗粒对大鼠局部骨质疏松具有一定的治疗作用。

**关键词:** 破骨细胞抑制剂; 骨质疏松; 骨形态检测; 骨密度

**Experimental study of specific inhibit ATP6i gene lentivirus anti local osteoporosis** TONG Peijian, XIAO Luwei, SUN Yi. Chinese Medicine Hospital in Zhejiang Province, Hangzhou 310053, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of specific osteoclast cell inhibition anti-rat local osteoporosis.

**Methods** 40 SD female rats, weighing 180~220 g, were divided into four groups: (+) virus control group, (-) virus control group, normal saline control group and blank group, each with 10. An osteoporosis model was established through ovary resection. Treatment began after 13 weeks, (+) virus control group used (+) lentivirus  $1.5 \times 10^8$  TU/ml, (-) virus control group used (-) lentivirus  $1.5 \times 10^8$  TU/ml, normal saline control group used normal saline 0.1 ml, all treatment groups used intra-bone marrow injection at right femurs for 3 times, blank group did not have ovary resection, after 12 weeks, bone mineral density (BMD) and biochemical indicator correlated with bone metabolism and bone histomorphometry were measured. **Results** The differences of Biochemical indicators correlated with bone metabolism are not statistically significance. (+) virus control group compared with the (-) virus control group, normal saline control group, blank group, bone mineral density (BMD), bone histomorphometry have statistical significance. **Conclusion** Specific osteoclast cell inhibition anti-rat local osteoporosis.

**Key words:** Osteoclast cell inhibition; Osteoporosis; BMD; Bone histomorphometry

骨质疏松症(Osteoporosis)是由多种原因引起的一种骨骼疾病,是以低骨量和骨组织的微结构损伤,并最终导致骨强度的降低和骨折危险性增加为特征的一种疾病。目前认为主要与骨形成、骨吸收两者

失衡有关,即机体的骨重建失衡,其中破骨细胞(Osteoclast, OC)主要行使去除旧骨即骨吸收的功能,而成骨细胞(Osteoblast, OB)主要行使形成新骨即骨形成的作用,故其发病机制主要是由于骨质吸收的速度超过骨质形成速度所致<sup>[1]</sup>。本研究即采用带有目的基因的慢病毒颗粒即特异性破骨细胞抑制剂进行局部注射治疗,通过对血清指标、骨密度、骨形态

计量学的检测来验证其是否具有抑制局部破骨细胞的破骨作用,从而逆转局部骨重建失衡。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验动物及药物

动物:健康雌性SD大鼠40只(由浙江省中医药大学实验中心提供),体重在180~220g。药物:(-/+ )慢病毒颗粒,由上海吉凯基因化学技术有限公司根据GeneBank Atp6i基因已知序列(基因编号:GI 206429)按siRNA序列原则设计(+ )慢病毒颗粒所携带的目的基因序列为5'-CAG UUC CCU AUG GUG AAC ATT(- )慢病毒颗粒所携带的目的基因序列为5'-CUC UCA GUG CUA AUA GUG ATT;并已在体外证实具有抑制破骨细胞骨吸收作用<sup>[3]</sup>。

### 1.2 仪器与试剂

DPX-L型双能X线骨密度仪:美国LUNAR公司。Krumdieck硬组织切片机,浙江省中医药大学实验中心提供。计算机自动图像处理系统(Image-Pro Plus 5.0)。全自动生化分析仪(德国拜耳)。

### 1.3 造模与分组

按照随机数字表法将40只健康雌性SD大鼠分成4组,分别为(+ )病毒治疗组、(- )病毒对照组、生理盐水对照组和空白组,每组10只。3%戊巴比妥钠40mg/kg,腹腔内注射麻醉,常规无菌操作,从下腹部正中切开,结扎后切除双侧卵巢,滴注长效青霉素40万单位2ml,逐层缝合。空白组以假手术处理。各组普通饲料饲养13周后开始给药。

### 1.4 给药方法

阳性病毒治疗组用(+ )慢病毒颗粒 $1.5 \times 10^8$  TU/ml右侧股骨大粗隆下1cm髓腔内注射3次,每次0.1ml,阴性病毒对照组用(- )慢病毒颗粒 $1.5 \times 10^8$  TU/ml右侧股骨髓腔内注射3次,每次0.1ml,生理盐水对照组用生理盐水右侧股骨髓腔内注射3次,空白组不用任何药物,各组用药时间为12周。

### 1.5 处死及标本获取

用药前摘眼球取血,用药12周后,摘另一侧眼球取血后处死<sup>[9]</sup>,分离血清,并取双侧股骨作进一步分析测定。

### 1.6 大鼠血清Ca、P、ALP的测定

血清Ca、P、ALP的测定均使用全自动生化分析仪。

### 1.7 大鼠BMD的测定

游离大鼠双侧股骨干,去除软组织。用装有动物骨密度测量软件的双能X线骨密度测量仪(DXA)分别沿A(大粗隆上切线)、B(A线与C线的中线)、C(小粗隆下切线)3线测量双侧股骨干骺端骨密度,并取其平均值。骨形态计量学检测:取双侧股骨干骺端骨组织A-C线范围,置于10%中性甲醛固定。脱钙1周后,常规脱水,石蜡包埋,行5 $\mu$ m切片,HE染色,在低倍(10 $\times$ 10倍)视野下测定,以相同的间隔移动切片,使所有有效的显微视野均经数码相机拍摄等量的照片,输入计算机自动图像处理系统(Image-Pro Plus 5.0)处理,设置参数计算各指标:骨体积分数(BV/TV)= $100 \times B.ar/T.ar$ ;骨小梁厚度(Tb.Th)=( $B.ar/B.pm$ )( $\pi/2$ );骨小梁间距(Tb.Sp)=( $1000 \times T.ar - B.ar$ ) $B.pm$ <sup>[8]</sup>。

### 1.8 统计学处理

采用SPAS 13.0软件处理数据,以均数标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,样品均数比较用t检验,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血清Ca、P、ALP变化

各组血清钙、磷含量均在正常范围,组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );而各模型组ALP含量明显高于空白组( $P < 0.05$ ),而用药前后同组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果见表1。

表1 血清Ca、P、ALP的变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	用药前			用药后		
	Ca (mmol/L)	P (mmol/L)	ALP (U/L)	Ca (mmol/L)	P (mmol/L)	ALP (U/L)
空白对照组	3.15 $\pm$ 0.129	2.02 $\pm$ 0.168	66.9 $\pm$ 13.674	3.12 $\pm$ 0.124	2.12 $\pm$ 0.251	64.7 $\pm$ 19.236
生理盐水对照组	3.12 $\pm$ 0.117	2.06 $\pm$ 0.167	164.2 $\pm$ 38.588*	3.13 $\pm$ 0.118	2.06 $\pm$ 0.006	187.1 $\pm$ 37.987*
(+ )病毒治疗组	3.11 $\pm$ 0.166	1.94 $\pm$ 0.182	158.6 $\pm$ 60.812*	3.12 $\pm$ 0.167	2.03 $\pm$ 0.175	182.1 $\pm$ 34.148*
(- )病毒对照组	3.12 $\pm$ 0.120	2.04 $\pm$ 0.159	151.2 $\pm$ 46.189*	3.09 $\pm$ 0.118	2.20 $\pm$ 0.135	195.3 $\pm$ 40.833*

注:与空白组比较\* $P < 0.05$

## 2.2 大鼠 BMD 的测定结果

(+)病毒治疗组、(-)病毒对照组、生理盐水对照组与空白组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); (+)病毒治疗组与(-)病毒对照组、生理盐水对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );对于(+)病毒治疗组右侧股骨干骺端 BMD 结果为( $0.359 \pm 0.056$ )  $g/cm^2$ 、(+)病毒治疗组左侧股骨干骺端 BMD 结果为( $0.263 \pm 0.343$ )  $g/cm^2$ , 两侧比较差异亦有统计学意义( $P < 0.05$ )结果见表 2。

表 2 特异性破骨细胞抑制剂对大鼠右侧股骨干骺端 BMD 的影响 ( $\bar{x} \pm s$   $g/cm^2$ )

组别	大鼠数	BMD
空白对照组	10	$0.394 \pm 0.054$
生理盐水对照组	10	$0.300 \pm 0.042$
(+)病毒治疗组	10	$0.359 \pm 0.056^{**}$
(-)病毒对照组	10	$0.299 \pm 0.044$

注:与空白组比较\*  $P < 0.05$ ;与(-)病毒对照组比较\*\*  $P < 0.05$

## 2.3 骨形态计量学检测结果

光镜观察结果显示空白组骨小梁排列密集,互连接成网状结构,骨小梁的厚度大,其间距小;(-)病毒对照组、(+)病毒治疗组左侧与生理盐水对照组骨小梁明显稀少,同样倍数下骨小梁的连接中断点多,骨小梁明显变细,间距加宽,甚至在部分区域出现较大的空白区域。(+)病毒治疗组右侧比对照组骨小梁排列密集,之间的连接明显增加,厚度增宽,间隙变窄,三维结构恢复,与空白组的表现类似(图 1~5)。



图 1 (+)病毒治疗组右侧 HE  $\times 100$

对骨形态计量学检测可以发现(+)病毒治疗组右侧与(+)病毒治疗组左侧、(-)病毒对照组、生理盐水对照组相比有统计学意义( $P < 0.05$ )的指标为 BV/TV、Tb. Th、Tb. Sp,但(+)病毒治疗组与空白组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )的指标只有

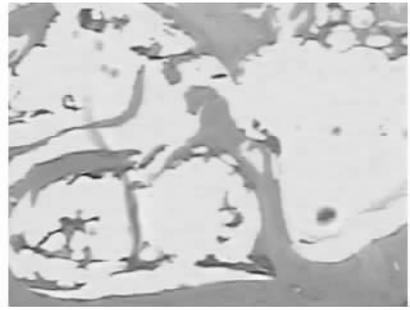


图 2 (+)病毒治疗组左侧 HE  $\times 100$

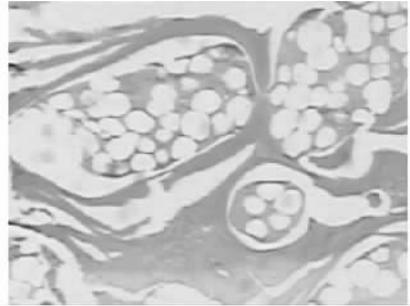


图 3 (-)病毒治疗组右侧 HE  $\times 100$

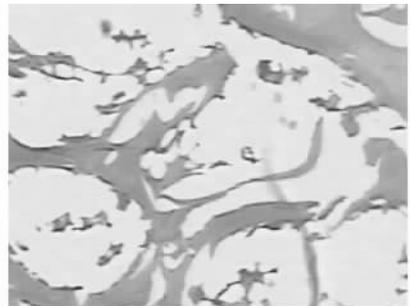


图 4 生理盐水组右侧 HE  $\times 100$

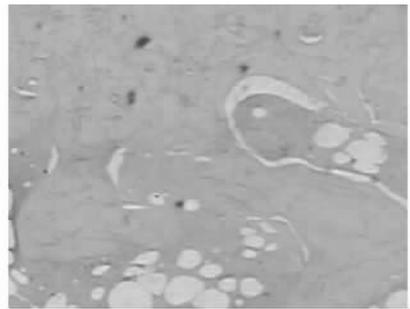


图 5 空白对照组右侧 HE  $\times 100$

Tb. Sp。结果见表 3、4。

## 3 讨论

### 3.1 特异性破骨细胞抑制剂的作用机理

目前认为骨质疏松主要与骨形成、骨吸收两者

表3 骨形态计量学检测( $\bar{x} \pm s$ )

组别	BV/TV(%)	Tb.Th( $\mu\text{m}$ )	Tb.Sp( $\mu\text{m}$ )
空白对照组	34.30 ± 3.69	67.44 ± 3.01	145.97 ± 21.14
生理盐水对照组	22.48 ± 3.82	56.65 ± 2.77	221.04 ± 42.63
(+) 病毒治疗组	33.28 ± 4.54	65.38 ± 4.01	157.55 ± 10.01**
(-) 病毒对照组	22.02 ± 5.48	56.77 ± 5.13	232.98 ± 49.83*

注:与空白组比较\*  $P < 0.05$ ;与(-)病毒对照组比较\*\*  $P < 0.05$

表4 (+)病毒治疗组左、右侧骨形态计量学检测( $\bar{x} \pm s$ )

组别	BV/TV(%)	Tb.Th( $\mu\text{m}$ )	Tb.Sp( $\mu\text{m}$ )
(+) 病毒治疗组(右侧)	33.28 ± 4.54	66.12 ± 0.35	157.55 ± 10.01*
(+) 病毒治疗组(左侧)	23.47 ± 1.98	54.94 ± 2.41	243.28 ± 22.38

注:与(+)病毒治疗组(左侧)比较\*  $P < 0.05$

失衡有关,即机体的骨重建失衡,其中破骨细胞(Osteoclast, OC)主要行使去除旧骨即骨吸收的功能,而成骨细胞(Osteoblast, OB)主要行使形成新骨即骨形成的作用,故其发病机制主要是由于骨质吸收的速度超过骨质形成速度所致<sup>[1]</sup>,故抑制破骨细胞的破骨作用已成为治疗骨质疏松的重要途径。Li等<sup>[2]</sup>通过差异筛选的方法首次克隆了破骨细胞特异性质子泵亚基ATP6i,其分子量为116 kDa的蛋白,是空泡型质子泵跨膜部分之一,通过将ATP6i基因敲除,在小鼠中观察了该基因在破骨细胞骨吸收中的作用。结果表明,所有的ATP6i突变纯合体(-/-)小鼠生长迟缓,出现了骨建造及再造缺失的骨质硬化,牙齿解体,出生后大约4周龄死亡。酶组化分析表明,纯合突变子小鼠长骨生长异常,主要缺乏骨质孔腔,生长面扩大,钙化软骨区域延伸。-/-型小鼠的破骨细胞数目正常,可以附着在骨上但是不能形成吸收陷窝。-/-型小鼠破骨样多核细胞不能形成细胞外酸化腔,也不能使骨去矿物化。这些结果表明ATP6i基因是破骨细胞特异质子泵的基本组成部分。该专一性质子泵ATP6i为破骨细胞在周围产生一个酸性的环境的重要结构,为其溶解骨的无机成分,此后分泌组织蛋白酶K,分解骨的主要有机成分I型胶原蛋白<sup>[4]</sup>的重要环节。随着基因工程的迅速发展, Lee等<sup>[5]</sup>发现siRNA(microRNA)能通过碱基配对的方式结合到靶mRNA(targetmRNA)上,从而导致靶基因的表达沉默,基于该原理,利用慢病毒载体即特异性破骨细胞抑制剂,携带有能表达特异性ATP6i-siRNA的目的基因,转染靶细胞即破骨细胞,

从而抑制ATP6i的表达,使破骨细胞破骨作用失效,达到逆转局部骨重建失衡,实现治疗骨质疏松的目的。该特异性破骨细胞抑制剂已在体外证实能特异性的转染离体破骨细胞,并能抑制破骨细胞的破骨作用,其为本研究的基本作用机理。

### 3.2 制备局部骨质疏松模型的实验依据

成年雌性大鼠有一个规则的发情期,发情期动物体内雌二醇水平处于峰值,每4天有18h的雌二醇峰值时间。当不出现雌二醇的峰值时,标志“绝经”松质骨丢失发生加快,特别在腰椎及股骨干骺端骨量的丢失尤为明显。本实验取成年的雌性SD大鼠,卵巢切除以后,松质骨的骨量减少,骨强度下降。这种特性较好地模仿了人高转换型骨质疏松发生时的骨量丢失状态,而骨质疏松为一种全身性的骨量丢失,包括本实验研究的局部右侧股骨干骺端的骨量丢失,并且处于一种高转换状态,即破骨细胞的功能亦活跃,使特异性破骨细胞抑制剂具有一定的作用基础。从本研究的结果可以发现,非去势的空白组与去势的生理盐水组比较在ALP、右侧股骨干骺端BMD、骨形态计量学检测的各项比较中差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明本实验按经典的去势造模<sup>[6]</sup>法制备局部骨质疏松是成功的。

### 3.3 特异性破骨细胞抑制剂对局部骨质疏松的作用

特异性破骨细胞抑制剂实质上是带有能表达特异性ATP6i-siRNA的目的基因从而抑制ATP6i的表达的慢病毒载体,慢病毒载体是由慢病毒改建而来的,因其高效而稳定的基因转移效率成为近来研究者的常用选择。目前已有相关文献报道慢病毒载体直接应用于动物实验中的基因治疗研究,并取得了大的突破。本实验即利用能表达特异性ATP6i-siRNA的目的基因的慢病毒载体即特异性破骨细胞抑制剂,该载体已在体外证实具有抑制破骨细胞骨吸收作用,本实验将其直接注射到造模后的SD大鼠右侧股骨髓腔内,其载体滴度为 $1.5 \times 10^8$  TU/ml,共注射3次,之后通过对SD大鼠右侧股骨干骺端骨密度(BMD)的测定及骨形态计量学检测,并与(-)病毒对照组即不带有表达特异性ATP6i-siRNA的目的基因的慢病毒载体和生理盐水对照组、(+)病毒对照组左侧相比较来评价该特异性破骨细胞抑制剂的治疗效果。骨密度(BMD)是评价骨丢失程度和药物防治效果的关键指标<sup>[7]</sup>,通过对大鼠右侧股骨干骺端进行双能X线扫描,以测定骨密度。实验结果表明(+)病毒治疗组右侧与(+)病毒治疗组左侧、

(- )病毒对照组、生理盐水对照组比较有统计学差异( $P < 0.05$ );从而说明特异性破骨细胞抑制剂具有减少骨丢失的作用,从而能反应出其抑制破骨,治疗局部骨质疏松的作用。而与空白组骨密度比较未见有统计学差异( $P > 0.05$ )。骨形态计量学检测也是评价局部骨组织结构反应骨丢失程度的重要指标<sup>[8]</sup>,对于骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁间距三个指标的检测表明(+)病毒治疗组比对照组骨小梁排列密集,之间的连接明显增加,厚度增宽,间隙变窄,三维结构恢复,与空白组的表现类似,均有有统计学差异( $P < 0.05$ ),其进一步说明了特异性破骨细胞抑制剂的作用,但其作用的途径是否与体外验证的是否一致,还需要进一步考证。

此外本实验在用药前后对大鼠血清  $Ca$ 、 $P$ 、 $ALP$  的全身性的骨代谢基本指标进行了检测,表明除了而各模型组  $ALP$  含量明显高于空白组( $P < 0.05$ ),各组血清钙、磷含量均在正常范围,组间比较无统计学差异( $P > 0.05$ ),说明特异性破骨细胞抑制剂对全身性的骨代谢水平未见明显影响,也显示出该药物的局限性。

### 3.4 小结

从本实验可以得出体外筛选出的带有 siRNA 片断的具有高效抑制破骨细胞表达 ATP6i 的慢病毒颗粒对大鼠局部骨质疏松具有一定的治疗作用。为临床上治疗因局部骨质丢失而引起的疾病提供了新的

治疗思路,如治疗局部骨不连,锁骨 pages 病等。但由于应用慢病毒载体作为媒介,具有其一定的局限性,其应用前景和意义有待商讨。

### 【参 考 文 献】

- [ 1 ] Raisz LG. Mechanisms and regulation of bone resorption by osteoclastic cells. *J Bone Miner Res* 2005, 79( 2 ) 287.
- [ 2 ] Li YP, Chen W, Liang Y, et al. Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nature Genet*, 1999, 23 :447-451.
- [ 3 ] 童培建,肖鲁伟. 特异性阻断诱导培养的大鼠破骨样细胞 Atp6i 基因的表达. *中国骨质疏松杂志*, 2007, 13( 3 ) :169-170.
- [ 4 ] Deon A, Rodan T, John M. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000, 289 :1508-1514.
- [ 5 ] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. et al. *Elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Science*, 1993, 75( 5 ) :843-854.
- [ 6 ] Baron R. Evidence of sequential remodeling in rat trabecular bone : morphology, dynamic histomorphometry and changes during skeletal maturation. *Aria Rec*, 1994, 208 :137.
- [ 7 ] Teegarden D, Proul WR, Martin BR. Peak bone mass in young women. *J Bone Miner Res*, 1995, 10( 5 ) :711.
- [ 8 ] Parfit AM. Bone histomorphometry : standardization of nomenclature symbols and units. *J Bone Miner Res*, 1997, 2 :595.
- [ 9 ] 刘庆鑫,谢玉树. PSP94-TNF $\alpha$ D11a 质粒 DNA 注射体内表达规律. *解放军医学杂志*, 2001, 26( 1 ) :60-61.

( 收稿日期 :2008-11-06 )