

骨形态发生蛋白 5 (BMP₅) 基因在骨折愈合中的定位研究

马真胜 胡蕴玉 吕荣 刘新平 柴玉波 顾广玉 张传山 高辉
(第四军医大学西京医院骨科研究所, 陕西 西安 710032)

【摘要】 目的 应用骨形态发生蛋白 5 (BMP₅) cDNA 探针检测骨折愈合过程中外骨痂内 BMP₅ 基因表达的定位与分布, 探讨 BMP₅ 基因表达在闭合性骨折愈合外骨痂形成中的作用。方法 以 64 只健康 SD 大鼠, 制备闭合性胫骨骨折动物模型。骨折后分别于 12 小时、1、3、5、7、9、14 及 28 天取材。取材后行恒冷切片, 用地高辛素标记的 BMP₅ cDNA 探针进行原位杂交, 设立对照。结果 骨折后 12 小时及 1 天, 骨折周围血肿内细胞及肌肉中新出现的间充质细胞内 BMP₅ 检测为阳性信号。结论 本实验表明创伤激活 BMP₅ cDNA 的表达, 并呈区域性参与骨折的修复, 也说明骨折血肿及周围软组织在骨折愈合过程中具有非常重要的地位。

【关键词】 骨折愈合 基因 胫骨骨折

Demonstration and location on express of bone morphogenetic protein (BMP₅) in fracture healing MA Zhen-sheng, HU Yur-yu, LU Rong, et al. Xijing Hospital, The Forth Military Medical University (Shanxi Xi'an, 710032)

【Abstract】 Objective To determinate the location and distribution of bone morphogenetic protein (BMP₅) gene express in lateral bony callus during the course of fracture healing by using BMP₅ cDNA probe, and to study the role of BMP₅ gene express in the formation of lateral bony callus after closed fracture **Methods** 65 SD rats were provided to establish models of closed fracture of tibia. 8 animals were sacrificed at 12 hours, 1st, 3rd, 5th, 7th, 9th, 14th and 28th days after fracture. The specimens were cut into 7 μ m serial sections. The slides were in situ hybridized with Dig-11-d UTP labeled cDNA probe and the results were compared with control group. **Results** At 12 hours and 1 day, the detection of BMP₅ in cells of hematoma around fracture and newly produced mesenchymal cells in muscle were positive. **Conclusion** The results revealed that wound activated the express of BMP₅ cDNA which took part in fracture healing in a specific callus-forming regions. The results also showed that hematoma and surrounding soft tissue around fracture was very beneficial for fracture healing.

【Key Words】 Fracture healing Gene Tibial fracture

骨折愈合是一个复杂的组织学变化过程, 涉及一系列不同的细胞活动。自 1965 年 Urist 提出骨诱导学说, 并相继提纯骨形态发生蛋白 (BMP) 以来, 对骨的再生修复均有了进一步的认识。骨折愈合的组织学、生化学及细胞学研究已有较多文献报道, 但其分子生物学研究报道则较少。近年来, 随着重组 DNA 技术的发展, 以及骨愈合过程中调节细胞代谢、分裂和分化的各种生长因子及细胞因子的发现与克隆, 使得骨折愈合的分子生物学研究成为可能^[1]。部分生长因子及细胞因子在骨折愈合过程中的基因表达已有报道^[2~10], 但到目前为止, BMP₅ 基因在骨折愈合过程中的表达, 尚未见相关文献报道。

1 材料与方法

1.1 动物模型 健康 SD 大鼠 64 只, 雌雄不拘, 体重 100 ~

200 克, 随机分为 8 组, 每组 8 只。1% 戊巴比妥钠 (400mg/kg 体重, 肌注) 全麻下, 经双侧胫骨结节处导入一根 0.6mm 医用不锈钢丝行胫骨髓内固定, 手法折断胫骨中段。

1.2 标本制备 术后 12 小时、1、3、5、7、9、14 及 28 天处死动物。取材包括骨折断端及周围软组织 (术后 12 小时、1 及 3 天) 和外骨痂 (术后 5、7、9、14 及 28 天), 取材后 4% 多聚甲醛固定 1 小时, OCT 包埋, 锡铂纸包裹后液氮内冻存。冻存组织进行连续冰冻切片, 厚 7 μ m, 贴于去污去酶之载玻片。

1.3 原位杂交 玻片经 4% 多聚甲醛固定 5 分钟, 0.01M pH7.4 PBS 洗, 0.2N 盐酸封闭内源性碱性磷酸酶, 蛋白酶 K 消化, 预杂交后用地高辛素标记的 BMP₅ cDNA 探针进行杂交 (BMP₅ cDNA 片段质粒由美国遗传研究所 Wozney 博士馈赠; Dig-11-dUTP 及标记检测试剂合购自德国宝灵曼公司),

杂交后进行显色,番红花 O 衬染。未骨折组动物的胫骨及其周围软组织为正常对照组, Lambda DNA 替代 BMP₅ cDNA 探针以及杂交前 RNA 酶消化为阴性对照。

2 结果

骨折后 12 小时,骨折周围肌纤维间血肿形成,间充质细胞、炎性细胞浸润,骨骼肌纤维走向发生紊乱。术后 1 天,大量成纤维细胞、间充质细胞增生、聚集,骨骼肌纤维退变,纤维肉芽组织开始形成。术后 3~5 天,新生肉芽组织内毛细血管长入,间充质细胞继续增多。术后 7 天,肉芽组织机化,软骨岛形成。术后 9 天,新生软骨量增多,软骨细胞肥大、退变、钙化,以软骨内成骨方式形成编织骨。第 14 天,骨小梁基质内的成骨细胞向骨细胞分化。骨小梁间的纤维组织富含毛细血管。第 28 天,成熟板层骨形成。原位杂交结果显示骨折后 12 小时及 1 天,骨折周围血肿内细胞及肌肉中新出现的间充质细胞内 BMP₅ mRNA 检测为阳性信号(见图 1),其它时间组及对照组均为阴性反应。

3 讨论

1965 年以前,绝大多数学者认为成骨细胞是骨愈合的关键,亦是骨愈合问题之所在,不论这些问题是否由于无效的治疗、疾病、局部感染、药物或一些未知因素所引起。那时的实验研究方向主要是成骨细胞与药物、激素、疾病、无机离子、营养以及其它因素之间的关系。自 1965 年 Urist 提出骨诱导学说及 BMP 概念以后,人们对骨愈合有了新的认识。现在已知,骨愈合不仅需要成骨细胞,而且需要更多其它因素的参与,包括通过骨折部位组织内局部细胞调节机制,产生与传递特定的物理及生物化学信息。骨折发生时,已存在的不同阶段的成骨细胞及破骨细胞数量以及它们所合成的细胞间质远不能满足骨折愈合的需求。局部细胞调节机制(包括前体细胞、间充质细胞、其它协同细胞、毛细血管、淋巴、神经支配以及生长因子的自分泌和旁分泌作用)产生足够数量的成骨细胞以及破骨细胞。

随着重组 DNA 技术的发展,使得其在治疗领域中的应用成为可能。例如生长因子及其它一些调节肽用于调节骨愈合过程中的细胞代谢、分裂及分化。在骨折愈合过程部分参与软骨形成的生长因子和细胞因子的研究已有文献报道^[2~10]。1990 年 Celeste 等^[1]克隆出 BMP₅ cDNA,使得此研究成为可能。

在本实验中,我们用 BMP₅ cDNA 探针检测骨折修复过程中 BMP₅ mRNA 的表达与定位,以期探讨它们在骨折愈合中的作用。实验发现:骨折早期(骨折后 12 小时至 1 天)即出现 BMP₅ mRNA 的表达; BMP₅ 基因主要在骨折早期血肿内细胞及骨折周围软组织内新出现的间充质细胞内表达。这些血肿内的细胞可能来源于骨髓基质,是具有成骨细胞潜

力的干细胞,即成骨前体细胞(DOPC),而新出现于肌肉组织内的阳性细胞则为可诱导的成骨前体细胞(IOPC),即间充质细胞。

实验结果表明,创伤激活 BMP₅ 基因的表达,并呈现一定的区域性,即局限于骨折周围骨痂形成区的软组织内。局部应用外源性基因重组表达产物 BMP₅ 能够在正常软组织内异位诱导骨组织的形成,因而认为,局部 BMP₅ 基因的表达使骨折血肿具有成骨能力,是骨折愈合过程中骨痂形成的非常重要的因素,也说明骨折血肿及周围软组织在骨折愈合过程中具有非常重要的地位。BMP₅ 在启动正常骨骼形成以及某些软组织发育中起非常重要的信号作用,如果其序列发生畸变,则可导致发育畸形^[11,12]。

(本文图 1 见插页 3)

参考文献

- [1] Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, et al. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone inductive protein purified from bovine bone. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(24):9843-9847.
- [2] Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, et al. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. J Bone Miner Res, 1994, 9(5):651-659.
- [3] 刘建, 胡蕴玉, 马真胜. 骨折愈合过程中 BMP₃ 基因表达. 中华外科杂志, 1996, 34(10):585.
- [4] 马真胜, 胡蕴玉, 吕荣, 等. 骨形态发生蛋白在闭合性骨折愈合外骨痂形成中的作用——免疫组化研究. 第四军医大学学报, 1996, 17(4):304.
- [5] 马真胜, 胡蕴玉, 王臻, 等. 骨形态发生蛋白 4(BMP₄) 基因表达在骨折愈合过程中的定位研究. 中华骨科杂志, 1997, 17(8):517.
- [6] 马真胜, 胡蕴玉, 吕荣, 等. 骨形态发生蛋白在闭合长骨骨折愈合中的作用. 中华实验外科杂志, 1997, 14(1):50.
- [7] 马真胜, 胡蕴玉, 吕荣, 等. 骨形态发生蛋白在骨折愈合中的作用. 中国矫形外科杂志, 1997, 4(3):216.
- [8] Bostrom MP. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. Clin Orthop, 1998, (355 Suppl):S116-123.
- [9] Yaoita H, Orimo H, Shirai Y, et al. Expression of bone morphogenetic proteins and rat distal-less homology genes following rat femoral fracture. J Bone Miner Metab, 2000, 18(2):63-70.
- [10] Bax BE, Wozney JM, Ashhurst DE. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. Calcif Tissue Int, 1999, 65(1):83-89.
- [11] Pathi S, Rutenberg JB, Johnson RL, et al. Interaction of Ihh and BMP/ Noggin signaling during cartilage differentiation. Dev Biol, 1999, 209(2):239-253.
- [12] Storm EE, Kingsley DM. GDF₅ coordinates bone and joint formation during digit development. Dev Biol, 1999, 209(1):11-27.

(收稿:2001-01-17 编辑:李为农)

北京天东电子医用器材厂供货信息

北京天东电子医用器材厂是多年生产口腔正畸材料、骨科器械及小针刀系列产品的专业厂家。审批文件:京药器监(准)字 96 第 214038 号。京医械广审(文) —000007 号。现办理小针刀邮购业务, 售价: 型(20 支装)每套 120 元; ~ 型(10 支装)每套 90 元。每套加 10 元包装邮资, 款到发货。地址:北京天东电子医用器材厂 北京崇文区东花市斜街 50 号(北京第 59 号东侧)。邮编:100062。联系人:杨宝萍。电话:010-67126137, 67159054 13701184760。

骨骼肌缺血再灌注损伤及发病机制初探

(正文见 667 页)

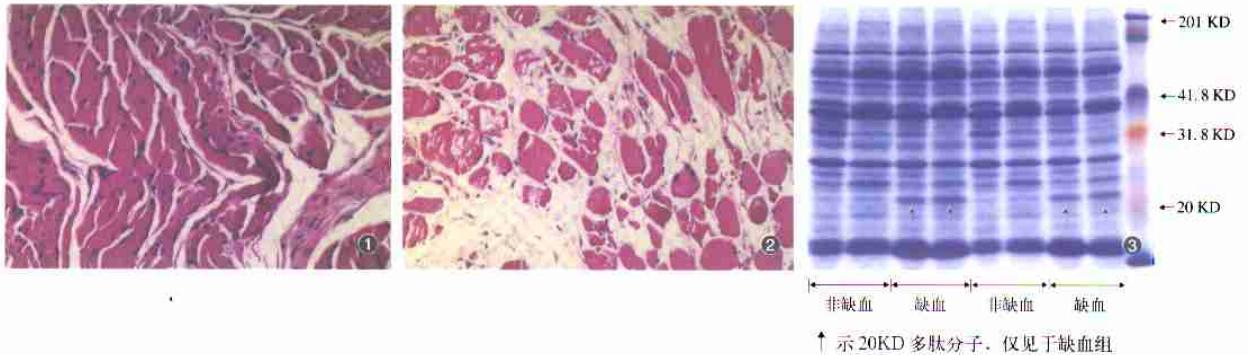


图1 大鼠注射PBS正常提睾肌(不缺血)肌细胞排列紧密、整齐、肌细胞间隔规则 HE × 400

图2 大鼠注射PBS缺血再灌注后的提睾肌肌细胞碎裂,间隔大且不规则 HE × 400

图3 凝胶蛋白电泳,“↑”标示20KD多肽分子,仅见于缺血组

骨形态发生蛋白与(BMP₃)基因在骨折愈合中的定位研究

(正文见 671 页)

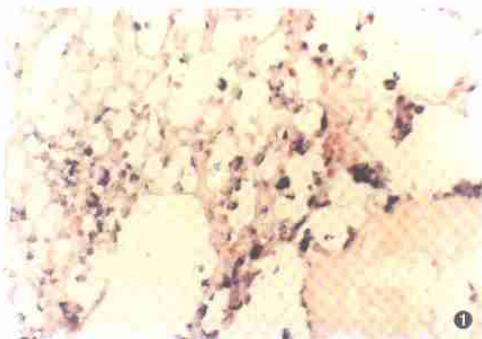


图1 骨折后1d,骨折周围血肿内细胞及肌肉中新出现的间充质细胞内BMP₃mRNA为阳性信号,原位杂交,×400

腰椎滑脱症的MRI诊断价值

(正文见 675 页)

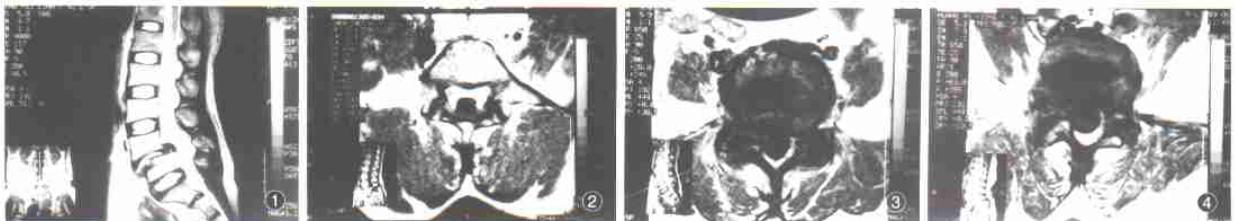


图1 L₄椎体II度滑脱,L₄-₅椎间盘变性,相对性后膨出、硬膜囊前缘受压,L₅椎体前上部骨质硬化。图2 L₅椎两侧椎弓峡部断裂。图3 “双关节征”,同时见L₄-₅两侧关节突关节骨质硬化、间隙狭窄、关节面软骨部分消失,L₄-₅椎间盘相对性后膨出。图4 “夹心征”,同时见L₅S₁右侧关节突关节间隙消失,骨赘形成。