论著

文章编号:1000-5404(2005)10-0988-03

失神经支配兔下颌骨骨折愈合过程中CGRP对OPG/RANKL表达的影响

徐 琳,谭颖徽,王建华,张 纲 (第三军医大学新桥医院口腔科,重庆 400037)

提 要: 目的 明了失神经支配兔下颌骨骨折愈合过程中CGRP对OPG/RANKL表达的影响及其调节骨折愈合的机制。**方法** 40只新西兰白兔随机分为:单纯下颌骨骨折组及下齿槽神经离断+下颌骨骨折组。分别于骨折术后7、14、21、28 d处死,取骨痂标本行HE及免疫组织化学染色。**结果** 单纯骨折组骨折后7 d骨痂中即可见到降钙素基因相关肽(CGRP)阳性神经纤维,沿血管分布,14、21 d在编织骨边缘有大量的CGRP阳性神经纤维,28 d仍较多。同时骨折后7 d骨保护素(OPG)强阳性表达,以后逐渐下降,但均保持较高水平的表达。破骨细胞分化因子(RANKL)的表达高峰则在骨折后第14天;而失神经骨折组除7 d骨痂中见CGRP阳性表达外,7 d后骨痂中仅有极低水平的CGRP表达。同样,OPG在骨折后7 d在骨痂中阳性表达以后持续弱阳性表达。RANKL则持续强阳性表达。**结论** 在骨折愈合过程中,CGRP能够上调OPG/RANKL的表达量的比值,从而参与骨折愈合过程的调节,失神经支配失去了CGRP对OPG/RANKL表达的调节作用,不利于骨折愈合。

关键词: 降钙素基因相关肽(CGRP);骨保护素(OPG);破骨细胞分化因子(RANKL) 失神经支配;下颌骨骨折
中图法分类号: R341.6; R782.402 **文献标识码:** A

Study of changes of OPG and RANKL expression in denervated rabbits

XU Lin, TAN Yin-hui, WANG Jian-hua, ZHANG Gang (Department of Stomatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of the expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator nuclear factor kappa B ligand (RANKL) during the healing of mandibular fracture after the transection of the inferior alveolar nerve (IAN) in rabbits. **Methods** Forty rabbits were randomly divided into 2 groups and each group consisted of 20 animals. The rabbits of the first group underwent mandibular fracture and transection of IAN and those of the second group underwent mandibular fracture only. The rabbits were killed at 7, 14, 21, 28 day after fracture. The callus tissue of the rabbits was collected and paraffin sections of the callus tissue were prepared. The callus sections were subjected to HE staining. The effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on the expression of OPG and RANKL were observed with immunohistochemical staining. **Results** There were only a few CGRP immunoreactive nerve fibers at day 7 after IAN section. Low level of OPG expression was found throughout the repair process but RANKL was intensively expressed in the rabbits of the first group. **Conclusion** CGRP can up-regulate the expression ratio of OPG/RANKL and promote the healing process of fracture. The loss of CGRP is unfavorable to bony healing.

Key words: calcitonin gene-related peptide; osteoprotegerin; receptor activator nuclear factor kappa B ligand; mandibular fracture

降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是骨组织中分布最为广泛的一种感觉神经肽,主要分布于骨代谢活跃的部位,CGRP直接或间接地调节成骨细胞和破骨细胞分化及活性,影响骨折愈合[1]。而OPG/RANKL信号途径在骨折愈合过程中起到重要的作用。本研究的目的是明确CGRP对OPG/RANKL表达的影响及其调节骨折愈合的作用。

基金项目: 第三军医大学回国人员启动基金资助项目(XG200364)
Supported by the Starting Funds for Personnel Returning From Overseas of Third Military Medical University (XG200364)
作者简介: 徐 琳(1972-),女,山东省潍坊市人,硕士研究生,主治医师,主要从事颌面创伤愈合方面的研究。电话:(023)68774801
通讯作者: 谭颖徽,电话:(023)68755632,E-mail: tanyh1962@yahoo.com.cn
收稿日期: 2005-03-28; **修回日期:** 2005-04-15

1　材料与方法

1.1　试剂

兔抗 CGRP 多克隆抗体(美国 Sigma 公司),兔抗 OPG 和 RANKL 多克隆抗体(武汉博士德公司),S-P 免疫组化试剂盒和 DAB 显色盒(北京中山生物公司)。

1.2　动物分组及模型

成年新西兰白兔 40 只,体质量(2.0 ± 0.7) kg,雌雄不限,由第三军医大学新桥医院实验动物中心提供。实验动物分为:单纯左下颌骨骨折组(20 只);左下齿槽神经横断 + 左下颌骨骨折组(20 只)。各组分为 7、14、21、28 d 小组,每小组 5 只。

1.3　方法

1.3.1　失神经下颌骨骨折模型建立　　无菌条件下暴露下颌骨体,于下颌角上 2 cm 处,用裂钻磨开颊侧骨皮质,暴露下齿槽神经并切断,自远端撕脱,防止断端再生接合。术中不伤及下齿槽血管。于下颌角前切迹前方约 1 cm 处下颌骨体下缘,用金刚砂片在冷水连续喷注下,制作 0.5 cm × 0.2 cm 贯穿颊舌侧的不完全性骨折,冲洗后逐层缝合。术后分别于 7、14、21、28 d 行 4% 多聚甲醛左侧颈总动脉灌注处死,制作骨痂标本,所有标本愈合良好,经 4% 多聚甲醛固定液 4 ℃固定 24 h 后, 10% 乙二胺四乙酸钠(EDTA, pH 7.2)脱钙,脱钙充分后,常规脱水,透明,沿骨折的纵向长轴进行包埋,做连续 5 μm 切片附着于多聚赖氨酸处理的载玻片上。

1.3.2　HE 染色　　采用常规方法。

1.3.3　CGRP、OPG 及 ANKL 免疫组织化学染色　　免疫组化采用 S-P 法。切片脱蜡至水, 3% H_2O_2 室温孵育 10 min,复合消化液消化 20 min 后加正常山羊血清封闭 30 min。加一抗 4 ℃过夜。次日复温至 37 ℃,1 h,滴加二抗工作液 37 ℃,30 min,滴加链霉卵白素 37 ℃,30 min, DAB 显色。以上步骤间均用 0.01 mol/L PBS 洗涤 5 min × 3 次。苏木精复染,常规脱水,透明,封片。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3.4　图像分析　　采用真彩色医学图像分析软件(Midia Cybernetics 公司 image-proplus 4.5)对免疫组化结果进行半定量分析。所有玻片均在同一放大倍数(× 400)、同一光强度下分析。每个指标 5 张玻片,各测相同面积。测量指标:平均光密度(AOD) = lg225 − lgA, A 代表测量灰度值。

1.4　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件,组间差异性比较用 t 检验及单因素方差分析。

2　结果

2.1　组织学观察

单纯骨折组术后 7 d,骨痂中新生骨小梁较多,呈条索状,其外周可见成骨细胞。14 d 骨小梁变粗大,致密,排列成栅栏状,其中有些骨组织吸收而出现吸收空腔。21 d 时骨小梁已相互连续,但排列尚不规则,第 28 天新骨连接成片,基本将骨缺损部填满,排列规则,骨小梁间间隙缩小。失神经骨折组各时间点骨小梁稀疏且排列不规则,骨吸收空腔较多。

2.2　免疫组织化学观察

2.2.1　免疫组化检测 CGRP 的表达结果　　单纯骨折组 7 d 骨痂中即可见到 CGRP 阳性神经纤维,沿血管分布,14、21 d 在编织骨边缘有大量的 CGRP 阳性神经纤维,28 d 仍较多;而失神经骨折组除第 7 天骨痂中见 CGRP 阳性表达外,7 d 后骨痂仅有极低水平的 CGRP 表达。其中 14、21 d 两组间 CGRP 表达量有非常显著性差异($P < 0.01$)。

2.2.2　免疫组化检测 OPG 及 RANKL 的表达结果　　OPG 及 RANKL 阳性表达定位于胞浆,呈棕黄色。表达部位在骨痂中成骨细胞,成纤维细胞、骨衬里细胞及骨陷窝内的破骨细胞。单纯骨折组骨折后 7 d OPG 强阳性表达,14 d 时表达强度明显下降,28 d 时略有回升;失神经骨折组 7 d OPG 阳性表达,以后持续弱阳性表达。其中 7、14 d 的表达量与对照组有显著性差异($P < 0.05$)。单纯骨折组骨折后 7 d RANKL 阳性表达,第 14 天达到高峰,以后逐渐下降,第 28 天降至最低点;失神经骨折组 RANKL 持续强阳性表达,其中 14、21 d 表达量两组间有显著性差异($P < 0.05$)。

表 1　CGRP 免疫组化染色的平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Average optical density of CGRP expression in callus ($\bar{x} \pm s$)

Parameters	CGRP			
	7 d	14 d	21 d	28 d
Treatment group	0.121 4 ± 0.016	0.098 8 ± 0.012*	0.103 1 ± 0.019*	0.116 9 ± 0.017
Control group	0.142 2 ± 0.021	0.155 4 ± 0.009	0.149 5 ± 0.012	0.135 8 ± 0.025

*: $P < 0.01$, *vs* control group

表 2　OPG 免疫组化染色的平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Average optical density of OPG expression in callus ($\bar{x} \pm s$)

Parameters	OPG			
	7 d	14 d	21 d	28 d
Treatment group	0.141 2 ± 0.023*	0.129 5 ± 0.010*	0.127 5 ± 0.014	0.128 4 ± 0.013
Control group	0.172 6 ± 0.026	0.159 5 ± 0.019	0.143 6 ± 0.021	0.148 5 ± 0.011

*: $P < 0.05$, *vs* control group

表 3　RANKL 免疫组化染色的平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

Tab 3　Average optical density of RANKL expression in callus ($\bar{x} \pm s$)

Parameters	RANKL			
	7 d	14 d	21 d	28 d
Treatment group	0.148 6 ± 0.018	0.203 7 ± 0.020*	0.180 9 ± 0.026*	0.125 8 ± 0.017
Control group	0.151 1 ± 0.014	0.174 5 ± 0.022	0.148 2 ± 0.022	0.121 8 ± 0.019

*: $P < 0.05$, *vs* control group

3　讨论

研究表明,CGRP 在体外培养中抑制破骨细胞样细胞的形成及成熟破骨细胞活性[2],在体内实验中也

发现骨折能够诱导神经再生长入骨折部位，胫骨骨折后7 d，骨痂内即可检测到CGRP阳性的感觉神经纤维[3]。在我们的研究中，单纯骨折组7 d骨痂中即可见到CGRP阳性神经纤维，沿血管分布，14、21 d在编织骨边缘有大量的CGRP阳性神经纤维，28 d仍较多；而失神经骨折组除7 d组骨痂中见CGRP阳性表达外，7 d后骨痂仅有极低水平的CGRP表达。这可能因为下齿槽神经横断引起其末梢纤维退化，并从神经元分离，神经肽释放减少所致。并且这种退化出现在神经横断大约20 h后[4]。说明本实验建立的下颌骨失神经支配骨折模型是成功的。

骨折愈合过程中成骨细胞与破骨细胞的协调的相互作用是维持骨骼完整性的关键。其中OPG/RANKL系统是成骨细胞调节破骨细胞分化和功能的主要信号通路。骨保护素(osteoprotegerin，OPG)是近年来发现的肿瘤坏死因子超家族受体成员，不但能够抑制破骨细胞的分化、成熟还能抑制其骨吸收活性并诱导其凋亡[5]。核因子-κB受体活化因子配体(receptor activator of nuclearfactor-κB ligand，RANKL)可与OPG结合并且对抗OPG抑制破骨细胞的作用。最近的研究还证实，RANKL能直接作用于破骨细胞金属蛋白酶-9(MMP-9)及金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)，上调MMP-1/ TIMP-1表达的比率。而金属蛋白酶是破骨细胞发挥骨吸收活性及启动骨吸收过程的关键因素[6]。因此骨微环境中OPG/RANKL表达量的相对比值对骨折愈合过程有重要的影响。免疫组化研究显示，RANKL和OPG被共表达在几乎所有的组织中[7]。OPG在非骨折骨组织中作为构成性的表达，但在骨折愈合过程中表达水平显著增强，其表达高峰在骨折后24 h和第7天[8]。本实验显示，单纯骨折组OPG表达高峰在骨折后7 d，以后逐渐下降。而失神经骨折组术后7 d OPG呈阳性表达，以后持续弱阳性表达；本实验同时显示，在单纯骨折组骨折后7 d RANKL呈阳性表达，第14天达到高峰，以后逐渐下降。而失神经骨折组骨痂组织中各时间点RANKL均为持续强阳性表达。以上结果提示，骨折愈合过程中CGRP表达趋势与OPG呈正相关而与RANKL呈负相关。失神经支配后，CGRP分泌量显著减少，使OPG/RANKL表达量的相对比值减小，破骨细胞活性增强，骨痂正常重建受到影响，骨小梁稀疏且排列不规则，骨吸收空腔较多。因此，正常的神经支配是骨折愈合所必需的。

本实验证实，骨折愈合过程中CGRP能够上调OPG/RANKL表达量的相对比值，可能通过调节破骨细胞分化、活性，间接的参与骨折愈合过程的调节。然而，复杂的骨折愈合过程中还存在其他的许多正性和负性调节因子，对这些分子及其下游信号的进一步研究可能为骨代谢疾病及促进骨折愈合提供分子基础，在颌骨及牙槽骨骨吸收、骨折及正畸治疗中可能具有一定的临床价值。

参考文献：

[1] Konttinen Y, Imai S, Suda A, *et al*. Neuropeptides and the puzzle of bone remodeling State of the art[J]. Acta Orthop Scand, 1996, 67(6): 632-639.

[2] Akopian A, Demulder A, Ouriaghli F, *et al*. Effects of CGRP on human osteoclast-like cell formation: a possible connection with the bone loss in neurological disorders[J]? Peptides, 2000, 21(4): 559-564.

[3] Hukkanen M, Konttinen Y T, Santavirta S, *et al*. Rapid proliferation of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves during healing of rat tibial fracture suggests neural involvement in bone growth and remodelling [J]. Neuroscience, 1993, 54(4): 969-979.

[4] Berger R L, Byers M R, Calkins D F, *et al*. Dental nerve regeneration in rats. I. Electrophysiological studies of molar sensory deficit and recovery [J]. Pain, 1983, 15(4): 345-357.

[5] Shiotani A, Takami M, Itoh K, *et al*. Regulation of osteoclast differentiation and function by receptor activator of NFkB ligand and osteoprotegerin [J]. Anat Rec, 2002, 268(2): 137-146.

[6] Wittrant Y, Theoleyre S, Couillaud S, *et al*. Regulation of osteoclast protease expression by RANKL[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 310(3): 774-778.

[7] Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, *et al*. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) /osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis[J]. Am J Pathol, 2003, 163(5): 2021-2031.

[8] Kon T, Cho T J, Aizawa T, *et al*. Expression of osteoprotegerin receptor activator of NF-B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(6): 1004-1014.

(编辑 汪勤俭)

血压计量单位恢复mmHg表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神，血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg)，但首次使用时应注明mmHg与千帕[斯卡](kPa)的换算系数。

本刊编辑部