维普资讯 http://www.cqvip.com

386:196
13.Bethell GS,et al. J Biol Chem,1979; 254:2672
14.Finlay TH,et al. Anal Biochem,1978; 87:77
15.Fornstedt N,et al. FEBS Lett,1975; 57:187
16.Porath J,et al. J Chromatogr,1970; 51:187
17.Inman JK. Methods Enzymol,1974; 3:30
18.Frost RG,et al. Biochim Biophys Acta,1981; 670:163
19.Nillson K,et al. Biochem Biophys Res Commun,1981; 102:449
20.Ngo TT. Bio/Technology,1986; 4:134
21.Buttner W,et al. Biotechnol Bioeng,1989; 33:26
22.Hill M,et al. J Chromatogr,1992; 589:101
23.Domen PL,et al. J Chromatogr,1990; 510:293
24.Lobb RR,et al. J Immunol,1991; 147:124
25.Hoffman WL,et al. J Immunol Methods,1988; 112:113
26.Antonsen KP,et al. Biotechnol Prog,1991; 7:159
27.Koelsch R,et al. Enzyme Microb Technol,1984; 6:31
28.Leckband K,et al. Biotechnol Bioeng,1991; 37:227
29.Beer DJ,et al. J Immunol Methods,1994; 173:103
30.Kowal R,et al. Anal Biochem,1980; 102:72
31.Goldberg M,et al. Bioconjugate Chem,1991; 2:275
32.Beer DJ,et al. Bioseparation,1995; 5:241
33.Feng WK, et al. Biomed Chromatogr,1993; 7:319
34.Gingras D,et al. J Bio Chem,1996; 271:12807
35.Calvo C,et al. Hybridoma,1995; 14:603
36.Haldar S,et al. Arch Biochem Biophy,1994; 315:483
37.Vannier B,et al.Biochemistry,1996; 35:1358
38.陈华标,等.药物生物技术 1997; 4:9
39.Bove JR. Transfusion,1989; 28:603
40.顾方舟,等.生物技术的现状与未来.北京:北京医科大学 中国协和医科大学联合出版社 1990; 102

(收稿日期 1998－09－15)

长骨干骺端生长板发育的调控

儿科学院儿保科 王松艳* 综述 黎海芪 杨锡强 审校

中图分类号 R336

长骨的生长主要经过软骨内成骨,长骨干骺端生长板的发育过程即软骨内成骨过程,生长板软骨的排列、增殖、分化、生化合成紊乱及矿化过程异常均要引起长骨生长发育障碍.现已知多种细胞生长因子和激素对软骨内成骨过程起作用,调控生长板的发育、矿化过程。本文主要阐述长骨干骺端生长板发育中多种细胞生长因子、激素对该过程的调控作用。

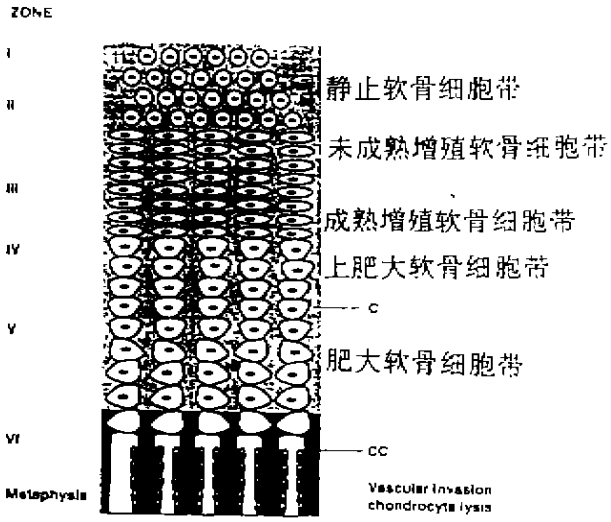
1 软骨内成骨过程

长骨的胚基最初由间叶细胞聚集,形成软骨雏形。在长骨骨干中段,围绕软骨雏形,骨外膜新骨形成骨领而被吸收,两端发生骺软骨(干骺端生长板软骨)。在骺软骨,软骨细胞排列成柱,软骨细胞不断分裂增殖,由骨端朝向骨干依次出现静止区、增殖区、肥大区、钙化区和成骨区。随软骨细胞肥大,周围基质钙盐沉着。软骨细胞退化死亡,钙化软骨基质被由骨髓腔来的血管及结缔组织侵入,破坏形成纵行隧道。成骨细胞在残留的钙化软骨基质表面生成骨组织,形成骨小梁。随着骨干两端软骨细胞继续生长,初级骨化中心的成骨过程也从骨干中部逐渐向两端推移,骨的长度逐渐增加。骨的塑建过程中,骨长度不断增加的同时骨髓腔也不断增宽,骨干增粗。

2 生长板结构

* 女, 1964－06出生,讲师

维普资讯 http://www.cqvip.com



C=软骨基质
CC=骨化基质
图1 生长板结构图

长骨干骺端生长板是长骨生长起始部位,也是软骨骨化的重要位置,其结构由以下几部份组成。1.分为不同带的软骨成份,由静止软骨细胞带→未成熟增殖软骨细胞带→成熟增殖软骨细胞带→上肥大软骨细胞带→肥大软骨细胞带。除软骨细胞外,软骨组织中含有丰富的软骨基质,主要由蛋白聚糖组成。2.干骺端的骨组织。3.围绕生长板的纤维组织[1]。

干骺端各带的组织特点:

Ⅰ带 被称为静止带,细胞单个或成对存在,周围有大量细胞外基质,增殖率低,蛋白聚糖(proteoglycan)和ⅡB型胶原合成少[2]。不转录ⅡA型胶原(ⅡA型胶原是前软骨细胞的标志,该标志说明细胞已分化为软骨细胞),不再是生发层的"软骨母细胞"[2]。

Ⅱ带 被描述为上增殖区或柱状区。软骨细胞呈扁平,排列成柱状,增殖细胞带的功能是产生基质和细胞分裂长骨生长。这层是生长板真正的生发层,Ⅱ型胶原合成及mRNA的表达增加,XI型胶原和聚糖(aggrecan)也增加[2]。

Ⅲ带 成熟增殖区,形态上和Ⅱ带没有区别,但DNA合成降低,Ⅱ型胶原合成仍高。对人生长板的研究显示这带细胞Ⅱ型胶原的mRNA水平最高。

Ⅳ带 即上肥大细胞带。在这里细胞体积突然增加,柱的排列稍不规则。尽管不增生,肥大带的细胞仍保留有完整的细胞器。光镜下细胞空泡增加,肥大软骨细胞是代谢活跃的细胞,平均每个细胞的基质合成较增殖带增加大约3倍,主要合成的基质成份是Ⅱ型,X型胶原和聚糖。

Ⅴ带 即终末肥大软骨细胞带。这带的末端有完整的横向软骨间隙而分界清楚。基质钙化发生在纵轴的软骨细胞柱之间。此带含有高水平的碱性磷酸酶。过去多认为上述细胞代谢非常不活跃,不断增加的空泡区域表明缺氧所致的死亡。现认为该带细胞有明确合成Ⅱ型和X型胶原的活性。最近新的研究表明,终末肥大软骨细胞形态学在大多数时间里是与生长板近端的肥大软骨细胞无区别的,这些肥大软骨细胞有一部分是通过凋亡消亡,尚有一部分化为成骨细胞。凋亡可能经骺脉管系统触发[3]。

Ⅵ带 是生长板与干骺端的连接处。是软骨转变成骨的区域。通过空泡被血管内皮细胞襞侵蚀,软骨细胞溶解。Ⅰ型胶原是成骨细胞表型的标志。Ⅱ型和X型胶原限制性定位于海绵骨中钙化的软骨小梁残骸区域[3]。新形成的骨骺网状骨逐渐被板层骨代替。

3 生长因子及细胞因子对生长板软骨的调节

细胞间信息传递的局部因子分为细胞因子和生长因子,细胞因子即细胞分泌的可溶性低分子物质。通常以旁分泌的方式影响局部其它细胞的活性,也可以以自身分泌的方式作用于分泌细胞自身,或释放入血,作用于远距离的细胞。后一种方

维普资讯 http://www.cqvip.com

式象—个典型的内泌器官。而生长因子是那些必定要进入矿化部位起作用的因子和破骨细胞/破软骨细胞在溶解基质时释放的因子。如:胰岛素样生长因子(IGFs),转化生长因子(TGFα,和TGFβ),骨形态发生蛋白(BMPs)和成纤维细胞生长因子(FGFs)等。近年来体内体外实验证实有大量的生长因子和细胞因子调节软骨细胞的增殖和分化,有一些细胞因子和生长因子被认为在骨生长和发育中尤其重要。

3.1 生长因子与骨生长

3.1.1 胰岛素样生长因子(IGF-Ⅰ、Ⅱ)

在所有生长因子中,IGFs对生长骨组织的作用最强,全身大多数组织都有IGF-ⅠmRNA表达,主要由肝脏合成,软骨细胞自身也合成IGF[1]。IGFs在循环中结合运载蛋白。调节IGF血浆浓度的主要因素是生长激素,甲状腺素和营养摄入。IGF肽有两种不同的形式:IGF-Ⅰ(70aa)和IGF-Ⅱ(67aa),其氨基酸序列有70%的同源性。新生鼠组织IGF-Ⅱ是主要的IGF,而IGF-Ⅰ表达在成年鼠组织中占主导地位。IGF—Ⅰ是生长板软骨细胞的强丝裂原。最近的研究表明鸡软骨细胞合成IGF—Ⅰ有特定的时间和部位[4],在早期至中期结束的鸡胚软骨细胞存在IGF—Ⅰ,随后消失,而在孵出前1—2天再次出现。在骨发育不良的鸡胚有该因子出现部位和时间的异常。在人骨基质中IGF-Ⅱ浓度是IGF-Ⅰ的10至15倍。IGF-Ⅰ和IGF-Ⅱ均有刺激软骨细胞增生和控制软骨细胞表型功能。甲状旁腺激素(PTH)在骨的合成代谢作用可能部分是通过改变局部IGFs的合成。许多研究表明生长激素增加IGF—ⅠmRNA水平。表皮生长因子(EGF)能增加软骨细胞对IGF—Ⅰ的反应[6]。因此,它参与生长板软骨细胞的活化、增殖、分化。并与其他因子共同调节软骨细胞的发育。

3.1.2 转化生长因子(TGFs)

TGFs对细胞生长和分化作用是多种多样的,TGF—β由多种细胞产生。骨基质是TGF-β1和TGF—β2最丰富的来源之一。新生儿长骨生长板表达高水平的TGF—βmRNA。TGF—α和TGF—β在早期鸡胚软骨细胞中表达,免疫标记发现TGF—β逐渐移到软骨基质,直到鸡胚后期和孵出后才在肥大软骨细胞中出现。在发育中的鼠骨骼TGF—β被免疫定位于软骨内骨化位置[4]。体外实验表明:TGF—β调节生长板软骨细胞合成胶原,增加Ⅰ和Ⅱ胶原合成。它能通过调节肥大软骨细胞的分化来控制骨矿化,故TGF—β在骨形态发生中主要调节软骨内骨化和骨重塑。

3.1.3 骨形态发生蛋白(BMPs)

BMPs是至今发现的唯一在体内独立诱导软骨内骨化的分子。TGF-β1和TGF—β_2增加BMPs的骨诱导特性。人重组BMP2引起静止带软骨细胞剂量依赖性的细胞数增加和DNA合成,对生长带细胞无作用。BMP2刺激静止带软骨细胞碱性磷酸酶活性增强,增加静止带和生长带胶原酶消化蛋白和非胶原酶消化蛋白的产量[6]。BMP2在鸡肢芽培养中促使软骨形成[7]。BMP2和BMP4的重组成份诱导异位骨形成。且BMP2通过软骨内成骨过程治愈骨皮质缺陷。BMP6在前肥大软骨细胞和肥大软骨细胞中表达[8]。BMPs在体外刺激生长软骨的生长和分化,成骨细胞表面显示有BMP的高亲合力结合蛋白。它对软骨细胞和成骨细胞均有作用。

3.1.4 成纤维细胞生长因子(FGF)

FGF以两种形式存在,酸性FGF(aFGF)和碱性FGF(bFGF),它们有55%的同源性。FGFs是成骨细胞软骨细胞和内皮细胞的强丝裂原[9],bFGF增加胶原合成[10],使发育中肢体的间充质细胞增生导致肢体过份生长。越来越多的证据表明bFGF在骨生长晚期尤为重要[11]。在无血浆培养的鸡生长板软骨细胞的生长中,FGF和IGF—1是必不可少的生长因子[12]。

3.1.5 肝细胞生长因子(HGF)

HGF是软骨细胞的自分泌因子。软骨细胞能表达HGF并能对它起反应。mRNA编码的HGF受体(c-met)mRNA表达于生长的软骨和分离培养的软骨细胞中。HGF浓度增高时,软骨细胞的Ⅱ型胶原mRNA和碱性磷酸酶活性增强。HGF和1·25-$(OH)_2$ VitD3有协调增强碱性磷酸酶活性的作用。HGF能调节软骨细胞在增殖、分化和/或调亡中对激素的敏感性[13]。

3.2 细胞因子与骨生长

维普资讯 http://www.cqvip.com

在众多细胞因子中,目前已知对生长板软骨细胞有较明确作用的是白细胞介素1(IL-1)。IL-1 mRNA定位于生长板矿化软骨带。在体内同BMP一起有增加异位骨形成作用。因IL-1能抑制软骨细胞增殖和胶原蛋白聚糖(proteoglycan)合成及降低Ⅱ型和Ⅸ型胶原合成的作用,故它抑制了软骨细胞肥大表型[14]。3.3 其它 甲状旁腺素相关蛋白(PTHrP)是一种与PTH密切相关的蛋白,由正常组织产生。PTHrP对骨的作用与PTH相似,它们分享共同的受体—PTH/PTHrP受体。在调节恶性肿瘤所致血钙过高中起重要作用,在骨骼发育中也扮演了重要角色,目标基因和分裂实验提示PTHrP是一个发育调节分子。调节软骨内骨发生。缺乏PTHrP的鼠有多发性骨发育异常[15]。而鼠软骨细胞中PTHrP过份表达导致一种新的软骨发育不良,其特征为短肢侏儒和软骨内的骨化延迟。PTHrP亦是一种软骨分化的抑制因子。PTHrP剂量依赖性抑制X型胶原基因的表达,而对Ⅱ型胶原mRNA无作用。PTHrP刺激软骨细胞增生,抑制其成熟[16-17]。PTHrP能增加抗凋亡基因bcl-2基因的表达,Bcl-2是一种控制程序性死亡的蛋白质,使体内和体外生长板软骨细胞向肥大软骨细胞成熟和凋亡过程延缓。Bcl-2表达减少,导致软骨细胞凋亡的加速和长骨变短,故Bcl-2参与调控软骨细胞成熟和骨发育过程[18]。在转基因小鼠中控制在Ⅱ型胶原启动基因下的PTHrP过分表达导致骨骼发育的明显延迟[19]。

4 激素对生长板发育的调控

4.1 **生长激素** 许多激素对生后骨正常生长是必须的,但只有生长激素是剂量依赖性刺激长骨生长,出生时新生儿的生长激素水平较高,随后逐渐降低至青春期血浆生长激素浓度又升高,并有性别的差异。过去认为生长激素只是间接刺激骨生长,它先刺激IGF-1在肝中产生,IGF-1再刺激长骨骨生长。缺乏生长激素的成人骨矿含量降低[20]。近来研究证实,生长板软骨显示有生长激素受体,表明生长激素也直接刺激长骨生长,但生长激素对不同细胞层软骨细胞的作用尚不清。有实验表明,生长激素刺激静止/生发带软骨细胞变为增殖型,使增殖带软骨细胞总数量增加。在新生兔的干骺端生长板生长细胞层未发现生长激素受体,而后20-50天的兔,其生长激素受体染色阳性,这表明生长激素受体是逐渐发育起来的。在1987年生长激素受体被克隆,在鼠的大多数组织如肝,软骨生长板,肌肉,心脏和皮肤都有生长激素受体mRNA的表达[21]。在体内和体外,生长激素能增加生长激素受体mRNA的水平。长骨生长是生长板软骨细胞增殖分化的结果,生长激素刺激长骨生长。

4.2 **甲状腺素** 甲状腺素对最佳骨生长是很重要的。现已证实甲状腺素刺激长骨生长可能有三种不同的机制:(1).在体内研究显示甲状腺素刺激生长激素分泌;(2).增加切除垂体大鼠的IGF-1 mRNA水平,刺激灌注鼠肝脏IGF-1的产生,表明甲状腺素增加循环IGF-1水平;(3).甲状腺素对生长板有直接作用,在切除垂体的大鼠,甲状腺素刺激长骨生长,且它对正常鼠肥大软骨细胞的形成是必须的。最新的研究表明甲状腺素直接作用于上肥大细胞层的未成熟软骨细胞,诱导其早期成熟带软骨细胞肥大直到基质钙化[22]。

4.3 **性类固醇** 性激素在长骨生长上有直接和间接的作用机制。人和大鼠的性类固醇影响生长激素分泌。性类固醇刺激人干骺端软骨细胞胶原蛋白聚糖(proteoglycan)合成及人成骨细胞IGF-1的产生。

4.4 **维生素D** VitD不仅是种维生素,也是一种激素前体。其活性代谢产物就是一种内分泌激素。代谢产物中生物活性最强的是1,25-$(OH)_2D_3$,它在骺软骨细胞的成熟过程中是很重要的。VitD受体在骺生长板已被证实。培养的软骨细胞中,VitD刺激分化和成熟。高剂量1,25-$(OH)_2D_3$有一个抗生长板软骨细胞增生的作用,而低剂量1,25-$(OH)_2D_3$则刺激软骨细胞增生[23]。在人VitD缺乏的特征是增殖的软骨细胞堆积,而生长板矿化不足。1,25-$(OH)_2D_3$以浓度依赖的方式调节鸡生长板软骨细胞TGF-β分泌及mRNA表达[24]。这种相互作用在调节软骨代谢和软骨内骨生长可能是重要的。此外,有文献报道,VitD通过其受体活化细胞内信号系统,通过细胞G0/G1期阻滞,下调Bcl-2表达,诱导乳腺癌细胞凋亡。而VitD与生长

维普资讯 http://www.cqvip.com

板软骨细胞凋亡的关系尚不清楚。

综上所述,长骨干骺端生长板发育受细胞生长因子、激素、VitD多种因素的调控。尽管结构不同,细胞生长因子间有交叉活性。每个细胞生长因子可能有一个广泛的生物学活性,每一特定的作用可能存在多种调节机制。细胞生长因子受体在全身许多细胞中被发现。因而细胞生长因子对生长板软骨发育的调控可能发生在细胞表面受体的水平。激素对生长板的调控存在直接和间接两种机制。间接作用通常是通过调节生长因子分泌来实现。尽管各种因素对生长板的作用研究较多,但各因素间怎样共同来调控生长板发育,其机制如何尚不清楚。

参 考 文 献

1.Price JS, et al. European Journal of Clinical Nutrition 1994; 48(suppl.1):S131
2.Sandell LT,et al. J Orthop. Res. 1994 Jan,12(1):1
3.Farnum CE& Wilsman NJ. J. Orthop. Res. 1989; 7:654
4.Ren P,et al. J Comp. Pathol. 1997 ,116:3,303
5.Bonassar LJ, et al. Exp.Cell Res. 1997 ,234(1):1
6. Erickson DM, et al. J Orthop. Res. 1997 ,15:371
7. Duprez DM, et al. Dev. Biol. 1996, 174:448
8. Erlebacher Q, et al. Cell 1995; 80:371
9. Niswander L& Martin GR. Nature 1993; 361:68
10. Hill DJ, et al. Endocrinol 1992; 133:363
11. Trippel SB, et al. J. Orthop. Res. 1992; 10:638
12. Leach RM& Rosselot GE. J. Nutr. 1992; 122(S3):802
13. Grumbles RM,et al. Bone 1996,Sep.19:255
14. Ikebe T, et al. J Immunol. 1988; 140:827
15. Karaplis V,et al. J. Bone Miner. Res. 1992; 7(Suppl.1), S93
16. Lanske B,et al. Science 1996; 273,663
17. Weir EC, et al. Pro. Natl. Acad. Sci. 1996; 93:240
18. Amling M, et al. J. Cell Biol, 1997 13, 136(1),205
19. Vortkamp A, et al. Science, 1996 , 273:5275, 613
20. Rosen T, et al. Acta Endocrinol. 1993; 129: 201
21. Carlsson B,et al. Acta Paediatr. Scand., 1991 (Suppl.), 379,.70
22. Alini M, et al. J Bone Miner Res. 1996 , 11:105
23. Farquharson C, et al. J Endocrinol, 1996 , 149(2), 277
24. Klaus G, et al. Kidney Int, 1997 ,52:45

(收稿日期 1998－09－25)