DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.010
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

文章编号:1000-5404(2002)05-0521-03

论著

BMP诱导成骨过程中胶原生成及TGF-β_1的促进作用

谭祖键[1],李起鸿[1],许建中[1],杨 柳[1],曹 佳[2],潘 峰[3],孙 玮[3] (第三军医大学:[1]附属西南医院骨科;[2]预防医学系分子毒理学教研室;[3]高原军事医学系中心实验室;重庆 400038)

提 要:目的 探讨骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)诱导成骨过程中骨胶原氨基酸的变化规律及转化生长因子β_1(Transforming growth factorβ_1, TGF-β_1)对骨胶原生成的影响,进一步阐明BMP的诱导成骨机制和TGF-β_1对骨损伤修复的调节机制。方法 实验采用日本大耳白兔左尺骨中上段12mm骨缺损实验模型,随机分为实验组、对照组及空白组,缺损内分别植入BMP/TGF-β_1/载体、BMP/载体及单纯载体。分别于术后第1、2、3、4、5周检测各组缺损区胶原羟脯氨酸(Hydroxyproline, HP)及羟赖氨酸(Hydroxylysine, HL)量的变化,并作胶原VG染色图像分析、组织学及电镜观察。结果 实验组较同期对照组及空白组胶原HP生成量增加,成骨细胞数量增多,Ⅰ型胶原生成时间提前、生成量增加,胶原总量也明显增加,骨损伤修复时间缩短。结论 TGF-β_1可使骨胶原在BMP诱导成骨过程中生成增加。TGF-β_1通过促进成骨细胞生成使Ⅰ型胶原分泌能力增强,并抑制Ⅱ型胶原产生使软骨期缩短,骨损伤修复提前。BMP、TGF-β_1两者在骨损伤修复中相互加强,具有协同作用。

关键词:骨形态发生蛋白;转化生长因子β_1;羟脯氨酸;羟赖氨酸
中图法分类号:R322.71;R329.2;R392.11 文献标识码:A

Formation of collagen in osteogenesis induced by bone morphogenetic protein and the promoting effect of transforming growth factor β_1 in the event

TAN Zu-jian, LI Qi-hong, XU Jian-zhong, YANG Liu, CAO Jia, PAN Feng, SUN Wei (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the change rules of hydroxyproline(HP) and hydroxylysine(HL) in osteogenesis induced by bone morphogenetic protein (BMP) and the effect of transforming growth factorβ_1(TGF-β_1) in the collagen secretion for the mechanism of osteogenesis induced by BMP and the regulative mechanism of TGF-β_1 in bone reparation. Methods An experimental model of 12 mm defect in the left ulna of rabbits was adopted. The rabbits were divided into experimental group, control group and blank group at random. BMP/TGF-β_1/carrier(experimental group), BMP/carrier(control group) and carrier only(blank group) were implanted into bone defect respectively. Contents of HP and HL in the defect area were measured in the 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th week after implantation. VG staining for collagen, histological image analysis and electron microscopy observation were performed. Results Comparing with control group and blank group, more HP, shorter chondrogenesis time, more osteoblasts, earlier appearance of type Ⅰ collagen and obviously higher total osteogenic collagen contents were observed in experimental group. Conclusion TGF$_{\beta_1}$ plays a role in improving bone formation in the courses of BMP inductive osteogenesis. It also shortens chondrogenesis time and stimulates bone healing through promoting osteoblast differentiation and proliferation, elevating type Ⅰ collagen secretion as well as inhibiting the synthesis of type Ⅱ collagen of chondrocytes. BMP and TGF-β_1 might have synergic effect in bone repair.

Key words: bone morphogenetic protein; transforming growth factor beta 1; hydroxyproline; hydroxylysine

不同组织内胶原含量和类型不一样,虽然骨、软骨基质的基本成分都是胶原,但骨基质以Ⅰ型为主,而软骨基质主要为Ⅱ型胶原。因此,在骨损伤修复早期,检测损伤部位Ⅰ、Ⅱ型胶原的含量和类型不仅可以反映骨损伤的修复能力,还可以反映骨的生成方式。由于羟赖氨酸(Hydroxylysine, HL)与羟脯氨酸(Hydroxyproline, HP)的比值及HP的含量在Ⅰ、Ⅱ型胶原中相对恒定,故通过检测组织中HP含量及HL/HP的比值可直接反映胶原量及类型的变化。本研究通过检测骨缺损部位HL及HP的含量及比值来观察骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)诱导成骨过程中骨胶原类型及量的变化,以及转化生长因子β_1(transforming growth factorβ_1, TGF-β_1)对骨胶原生成量及类型的影响。

1 材料与方法

BMP为本科实验室按Urist方法并改进提取的牛BMP(bBMP)粗提物,小鼠肌袋实验证明有良好的诱导成骨活性[1]。TGF-β_1由美国马里兰州国家癌症中心化学防护实验室Michael B Spom教授提供,载体用经脱钙、脱蛋白后高温、高压(121 ℃, 0.11 MPa)消毒灭活的牛松质骨基质颗粒。复合方法:将bBMP 200 mg用0.2 g/dL的盐酸胍溶液溶解后,对水透析除去盐酸胍,分成两等份,分别加入适量载体(供10只兔使用),其中一份再加入TGF-β_1 100 μl(BSA稀释,含TGF-β_1 100 μg),充分混匀、室温下放置2 h,真空冻干,环氧乙烷消毒2 h备用。

实验动物选用月龄8~12个月、体重2~3 kg的日本大耳白兔30只(雌雄不拘),3 g/dL戊巴比妥钠静脉麻醉(30 mg/kg体重),无菌条件下手术造成左尺骨中上段12 mm骨缺损实验模型(连同骨膜一并切除,保持桡骨完整以使骨折端相对稳定),随机分为实验组、对照组及空白组,每组10只。实验组植

作者简介:谭祖键(1963—),男,重庆市人,博士,副教授,主要从事关节外科、骨组织工程方面研究,发表论文9篇。电话:(023)65349812
收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-04-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

入 bBMP 10 mg/TGF-β_1 10 μg/ 载体，对照组植入 bBMP 10 mg/ 载体，空白组仅植入载体。分别于术后第 1、2、3、4、5 周各组取 2 只动物缺损部位组织进行处理，采用美国 Beckman 6300 黄金系统高效氨基酸分析仪检测 HP 及 HL 含量，并作胶原 VG 染色图像分析、组织学及电镜观察，并进行统计学处理，采用 t 检验。

2 实验结果

检测结果示实验组各期 HP 含量均高于同期对照组及空白组。各组不同时相缺损内 HP、HL 含量及 HL/HP 比值，见表 1。

表 1 各组不同时相缺损内组织羟脯氨酸、羟赖氨酸含量(μg/mg)

Tab 1 Contents of hydroxylysine and hydroxyproline in the defect areas of each group at difference time points (μg/mg)

	1 week			2 weeks			3 weeks			4 weeks			5 weeks		
	HP	HL	HL/HP	HP	HL	HL/HP	HP	HL	HL/HP	HP	HL	HL/HP	HP	HL	HL/HP
Experimental group	18.23	2.82	0.15	19.22	4.17	0.22	38.55	4.72	0.12	42.49	4.85	0.11	53.17	4.97	0.09
Control group	16.35	2.65	0.16	17.44	4.68	0.27	22.63 *	5.74	0.25	25.27 *	5.80	0.23	36.08 *	5.90	0.16
Blank group	10.10	1.39	0.14	10.77	1.55	0.14	12.56X **	2.16	0.17	13.61 **	3.17	0.23	14.64 **	4.22	0.29

*: $P<0.05$ *vs*, **: $P<0.01$ *vs* experimental group

2.2 胶原 VG 染色及图像分析

各组不同时期均见有胶原生成，胶原量随时间逐渐增多。3 组术后第 5 周缺损内组织胶原 VG 染色组织学观察分别见图 1、2，第 3、4、5 周每组各间隔取连续横切片中 6 张切片图像分析胶原在每个视野中所占面积，结果见表 2。

表 2 术后 3、4、5 周 3 组缺损内胶原含量($n=6$, $\bar{x}\pm s$ μm²/μm²)

Tab 2 Contents of collengen in the defect area of each group in 3, 4 and 5 weeks after operation ($n=6$ $\bar{x}\pm s$ μm²/μm²)

	3 weeks	4 weeks	5 weeks
Experimental group	0.339±0.012	0.473±0.010	0.642±0.014
Control group	0.213±0.015 *	0.308±0.012 *	0.352±0.011 *
Blank group	0.133±0.011 **	0.146±0.013 **	0.155±0.010 **

*: $P<0.05$ *vs* experimental group, **: $P<0.01$ *vs* experimental group

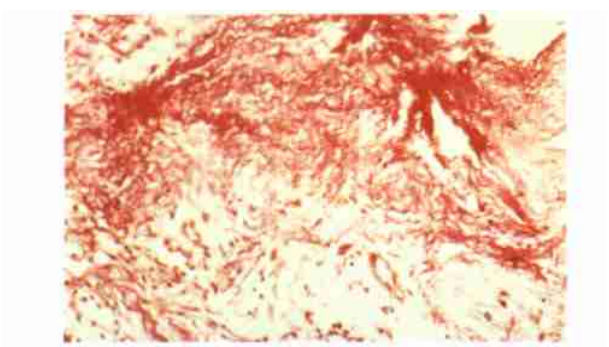


图 1 实验组术后第 5 周，大量的胶原纤维生成 (VG×250)

Fig 1 Massive collagen fibers in experimental group in 5 week after operation (VG×250)

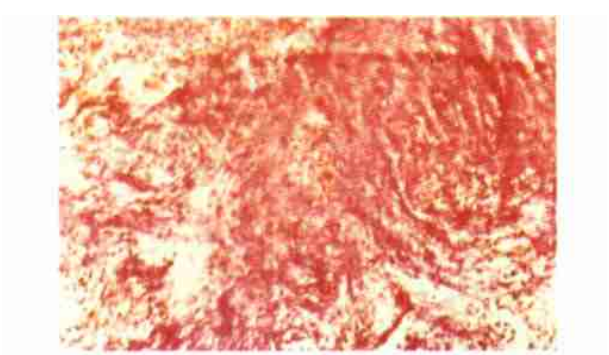


图 2 对照组术后第 5 周，VG 染色有较多胶原纤维生成 (VG×250)

Fig 2 Rich collagen fibers in control group in 5 week after operation (VG×250)

2.3 组织学观察

术后第 1 周缺损内主要为血肿及纤维组织，第 2 周实验组及对照组均可见大量软骨细胞生成，第 3 周后实验组见大量成骨细胞，伴有骨样基质形成，见图 3，对照组仍为软骨细胞及软骨样基质，见图 4，空白组为大量纤维组织。

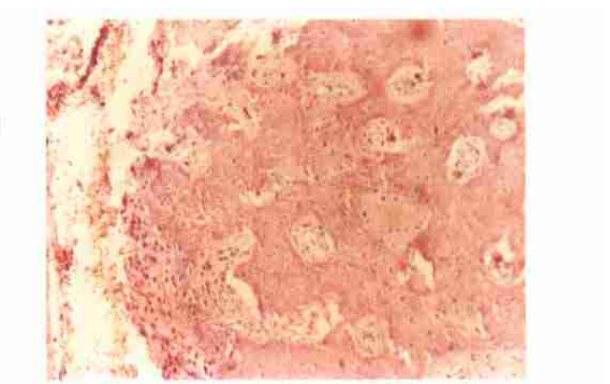


图 3 实验组第 3 周，缺损内大量的成骨细胞及骨样基质生成 (HE×250)

Fig 3 Many osteoblasts and osteoid matrices in the defect area of experimental group in 3 week after operation (HE×250)

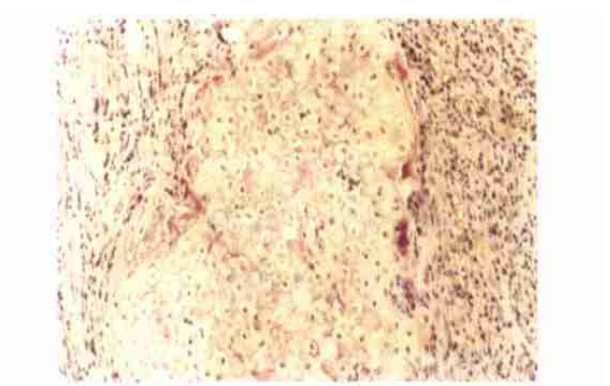


图 4 对照组第 3 周，缺损内有大量软骨细胞生成 (HE×250)

Fig 4 Many chondrocytes in the defect area of control group in 3 week after operation (HE×250)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4　电镜观察

3 组术后 3 周均见少量排列紊乱的胶原原纤维, 实验组较对照组更丰富, 空白组胶原原纤维较少。4 周实验组和对照组胶原原纤维增多, 但排列不规则, 空白组变化不明显。5 周实验组和对照组胶原原纤维明显增加, 实验组较对照组更为明显, 且呈平行排列, 空白组仅见少量排列紊乱的胶原原纤维。

3　讨论

人体内胶原种类至少在 15 种以上, 但不同组织胶原含量及类型是不一样的。骨和软骨基质的基本成分是胶原和蛋白多糖, 以胶原为主。骨基质含有Ⅰ、Ⅴ、Ⅻ、Ⅵ、Ⅷ型胶原, 以Ⅰ型为主, 软骨基质含有Ⅱ、Ⅺ、Ⅸ、Ⅵ、Ⅹ型胶原, 以Ⅱ型为主。研究表明: 在胶原构成比例上, HL/HP 比值在Ⅰ、Ⅱ型胶原较恒定, Ⅰ型为 0.13 左右, Ⅱ型为 0.26 左右[2]。HP 在骨胶原中所占的比重也较恒定, 约为胶原总量的 10%[2]。故本研究通过检测骨缺损修复不同时期缺损内组织 HP 及 HL 的含量及比值, 可反应 BMP 的诱导成骨能力及 TGF-β_1 对 BMP 诱导成骨方式的影响(软骨内或直接成骨)。

研究发现: ①缺损修复早期 HP 含量随时间逐渐增加, 这是因随着成骨细胞和成软骨细胞不断生成, Ⅰ、Ⅱ型胶原生成增加, 因 HP 在胶原中所占的比重较恒定, 故其含量也相应增加, 即使在无成骨因子的空白组, 由于机体对创伤的自我修复, 缺损内组织 HP 含量也逐渐增加, 但其生成量远远少于 BMP、TGF-β_1 刺激组。②各组术后第 1 周缺损内组织 HL/HP 均表现为Ⅰ型胶原特征, 这系创伤早期缺损内纤维增生的表现, 检测增生纤维组织内的 HL/HP, 其比值均在 0.15 左右。

根据实验结果认为: 本研究对照组骨缺损修复的组织衍化方式为: 纤维组织→Ⅱ型胶原→Ⅰ型胶原, 即通过软骨内骨化方式完成骨损伤修复, 软骨期持续时间约 3 周左右, 之后随着成骨细胞的大量生成, Ⅰ型胶原生成增多, 表现为Ⅰ型胶原的特征。至于成熟的Ⅱ型胶原能否在 BMP 作用下向Ⅰ型胶原转化有待进一步研究。

实验组缺损内组织 HL/HP 比值仅术后第 2 周大于 0.2, 表现为Ⅱ型胶原特征, 之后均表现为Ⅰ型胶原特征, 且 HP 含量均高于同期对照组和空白组, 统计学处理有显著性差异, 说明 TGF-β_1 不仅可增强 BMP 的诱导成骨能力, 而且可以改变 BMP 的软骨内成骨方式, 使骨缺损以直接成骨方式完成。实验研究表明: TGF-β_1 主要通过以下途径来调节骨损伤的修复: ①增加骨缺损部位 BMP 诱导成骨的靶细胞: TGF-β_1 的促细胞分裂增殖作用, 使间充质细胞和成纤维细胞大量分裂增殖[3,4], 从而为 BMP 提供丰富的靶细胞。②抑制软骨细胞产生Ⅱ型胶原表型[6]: 虽然 TGF-β_1 能使软骨细胞大量增殖, 但却抑制软骨细胞产生Ⅱ型胶原, 软骨基质生成减少, 缩短了骨损伤修复的软骨形成期, 本研究也发现实验组Ⅱ型胶原表型明显降低。③促进成骨细胞的分裂增殖及Ⅰ型胶原表型: TGF-β_1 的促分裂增殖作用不仅使成骨细胞数量大量增加, 而且还有促进成骨细胞产生Ⅰ型胶原的能力[7], 本研究发现实验组仅术后第 2 周表现为Ⅱ型胶原特征, 之后均表现为Ⅰ型胶原特征、胶原含量也明显高于同期对照组。根据研究结果笔者认为: BMP 和 TGF-β_1 两者具有协同作用, TGF-β_1 为 BMP 提供丰富的靶细胞, BMP 诱导生成的成骨细胞又被 TGF-β_1 的促分裂作用大量增殖, 因而两者联合应用取得了满意的骨损伤修复效果。

虽然 TGF-β 是一种重要的骨损伤调节因子, 可协同其它成骨因子完成骨损伤修复[8], 但其单独应用成骨能力则较弱, 仅能引起局部骨膜增生及少量骨形成[9]。

对照组因不含成骨因子, 胶原生成能力大大弱于实验组及对照组, 早期缺损部组织主要为纤维增生表现, 但至第 4 周时, HL/HP 比值为 0.23, 表现为Ⅱ型胶原特征, 说明机体自身对骨损伤有通过软骨内骨化方式进行修复的调节机制。

参考文献:

[1] 马生斌, 杨　柳, 胡蕴玉, 等. 工艺改进对骨发生形态蛋白提取产量时间和活性的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2001, 8(6): 576－578.

[2] 刘智广, 马海燕. 胶原特异性氨基酸快速测定方法的研究及应用[J]. 氨基酸杂志, 1994, 3(1): 8－10.

[3] Johnson R G. Biochemical analysis of rabbit articular cartilage using an amino acid analyzer[J]. Clin Orthop, 1980, 146: 216－219.

[4] Einhorn T A. Enhancement of fracture-healing[J]. J Bone Joint Surg, 1995, 77Am(6): 940－956.

[5] Mustoe T A, Pierce G F, Thomason A, *et al*. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta[J]. Science, 1987, 237(4 820): 1 333－1 336.

[6] Clark D A, Coker R. Transforming grouth factor-beta (TGF-beta)[J]. . Int J Biochem Cell Biol, 1998, 30(3): 293－298.

[7] Sporn M B. Polypeptide transforming growth factor: isolation form bovine sources and use for wound healing *in vivo*[J]. Science, 1983, 219(4 590): 1 329－1 331.

[8] Carrington J L, Roberts A B, Foanders K C, *et al*. Accumulation localization and compartmentalization of transforming growth factor β during endochondral bone development[J]. J Cell Biol, 1988, 107(5): 1 969－1 975.

[9] Roberts A B, Anzano M A, Wakefield L M, *et al*. Type-beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(1): 119－123.

（编辑　王　红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net