DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.029
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
686 2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)06-0686-03

骨质疏松骨折愈合过程中IGF-I mRNA的基因表达

张胜利,王全平 (第四军医大学西京医院全军骨科研究所,西安 710033)

提 要:目的 探讨骨质疏松性骨折愈合过程中IGF-I mRNA基因表达的细胞定位及基因表达模式。方法 利用去势SD大鼠造成I型骨质疏松及其骨折模型,通过原位杂交及斑点杂交的方法,检测正常及骨质疏松性骨折骨痂局部IGF-I mRNA的基因表达。结果 骨质疏松骨折与正常骨折愈合过程中IGF-I mRNA基因表达的细胞定位无差别;骨质疏松骨折愈合过程中IGF-I mRNA表达在骨折后第9天,且较正常组高。结论 IGF-I在骨质疏松骨折愈合中起重要的调节作用。

关键词:骨质疏松症;骨折;胰岛素样细胞生长因子;核酸杂交
中图法分类号:R392.13;R683.42 文献标识码:A

Expression of IGF-I mRNA in the healing process of osteoporotic fracture in rats

ZHANG Sheng-li, WANG Quang-ping (Institute of Orthopaedics of PLA, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China)

Abstract: Objective To assess the change of gene expression of the insulin-like growth factors-I (IGF-I) in the process of the healing of the osteoporotic fracture. Methods The change of gene expression of IGF-I in the healing process of the osteoporotic fracture was detected by *in situ* and dot blot hybridization in ovariectomized female SD rats model of type I osteoporosis and osteoporotic fracture. Results There was no difference of the cellular localization in IGF-I gene expression between the process of normal and osteoporotic bone healing by *in situ* hybridization. The level of their expression were higher in osteoporotic bone healing than that in the normal. Conclusion The increased expression of IGF-I mRNA might be related to augmented bone formation and play an important role in the healing process of osteoporotic bone.

Key words: osteoporosis; fracture; insulin-like growth factor-I; nuclear hybridization

现已证实:骨组织内有多种细胞生长因子,它们不仅可通过旁/自分泌机制参与骨代谢的重建偶联过程,介导骨质疏松的发生和发展,而且在骨折愈合过程中促进细胞增生,刺激骨和软骨形成中起重要的调节作用[1,2]。胰岛素样生长因子I(Insulin-like growth factor I, IGF-I)是其中主要的生长因子之一,其在骨代谢及正常骨折愈合过程中的作用已有较多研究报道,而且,最近有报道大鼠骨形成作用的降低与IGF-I基因表达的下降有关[3]。但关于在骨质疏松骨折愈合过程中作用的研究较少。我们利用去势SD雌性大鼠作为I型骨质疏松及其骨折模型,通过原位杂交、斑点杂交,对骨质疏松性骨折骨痂局部IGF-I mRNA基因表达的细胞定位和表达模式进行了研究,这有助于从基因表达水平深入了解骨质疏松骨折愈合的病生机制。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立

所有实验动物选用纯种Spraque-Dawley(SD)雌性大鼠,质量在250~450 g(本校实验动物中心提供),年龄在6~9月龄,共120只,随机分为骨质疏松组(Vox)及假手术对照组(Sham),每组随机分为骨折组及非骨折对照组;骨折组以骨折后1、4、9、13及28 d又各分为5组,每组均10只。10 mg/L戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔麻醉下经背侧切口,Vox组行双则卵巢切除术,Sham手术组做双侧卵巢暴露,即关闭切口。术后2月,骨折组动物腹腔麻醉下,采用与Bourque相似的方法[4],先用0.5 mm齿科钢丝行胫骨髓腔内固定术,后用专用大鼠骨折器,于大鼠双侧胫骨中段造成闭合性骨折。分别于1、4、9、13及28 d时间段无菌条件下取材,一侧标本多聚甲醛固定、复合脱钙液脱钙、石蜡包埋,0.5 μm切片用于原位杂交;另侧标本直接放入液氮冷冻保存,用于总RNA提取。取材范围包括两骨折端及其间组织。

1.2 原位杂交

TGF-β1 cDNA探针购于北京医科大学免疫学教研室,探针标记按地高辛标记及检测试剂盒(宝灵曼公司)说明进行。组织切片脱蜡,0.2 mol/L盐酸处理5 min,蛋白酶K(10 g/L)消化10 min,杂交探针浓度为300~500 μg/L,42 ℃恒温杂交10~16 h。1∶5 000封闭液稀释酶标地高辛抗体2 h,显色10 min,蒸溜水冲洗2 min,封片镜检。

1.3 总RNA的提取

组织块质量(1 g),捣碎加盐酸胍组织裂解液10 ml,加5 ml/L十二烷基肌氨酸钠匀浆1 min,离心收上清入新管,加入0.1体积3 mol/L醋酸钠,加等体积水平衡酚及0.2体积氯仿异戊醇,12 000 r/min离心10 min,加入0.6体积异丙醇10 min,12 000 r/min离心10 min,700 ml/L乙醇洗涤真空抽干,100 μl DEPC水溶解,取6 μl加水至600 μl,紫外分光光度计测定RNA含量。

1.4 斑点杂交

硝酸纤维素膜8 cm×10 cm 2张,铺膜于真空抽吸打点仪上,加等体积RNA变性液于RNA液中(RNA浓度1 μg/μl)变性1 h,点膜,每一标本样品为一个点,每点总RNA量为4 μg,室温干燥,80 ℃干烤2 h,冷却至室温,将2张硝酸纤维素膜分别装入塑料袋,倒入预杂交液10 ml,42 ℃预杂交16 h,按浓度15~

作者简介:张胜利(1966—),男,河南省洛阳市人,博士研究生,主治医师,主要从事骨质疏松方面的研究。电话:(029)8097178

收稿日期:2001-03-27;修回日期:2001-05-08

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

60 μg/L 加入变性的 Dig 标记 TGF-β_1 cDNA 探针, 42 ℃杂交 20 h, 1∶5 000封闭液稀释酶标地高辛抗体 10 ml 孵育 30 min, 显色液中显色 16 h, 薄层扫描仪扫描半定量测定。

1.5　实验对照

正常对照: 采用正常及骨质疏松非骨折组动物的胫骨及其周围软组织切片进行杂交反应; 空白对照: 采用未加探针杂交液进行杂交反应。

1.6　统计学处理

骨折组同一时间点组间数据及同组不同时间点数据通过 SPSS 统计软件进行方差分析(ANOVA), 非骨折组 Vox 与 Sham 组间数据进行均数 t 检验。

2　结果

2.1　原位杂交结果

正常骨折与骨质疏松性骨折愈合过程中 IGF-I 基因表达的细胞定位无差别, 且表达模式基本相似。IGF-I mRNA 主要定位于软骨细胞、成骨细胞、以及间充质细胞。在骨折愈合过程中, 急性创伤反应期: IGF-I 未见表达; 骨膜下成骨期: IGF-I mRNA 在膜下成骨内的成骨细胞和间充质细胞内均有表达, 见图 1A; 软骨形成期: 软骨细胞、成骨细胞内 IGF-I mRNA 均有表达, 且呈峰值表达, 见图 1B; 软骨钙化期: IGF-I mRNA 在钙化前缘两侧的软骨细胞和成骨细胞内均有表达, 见图 1C。

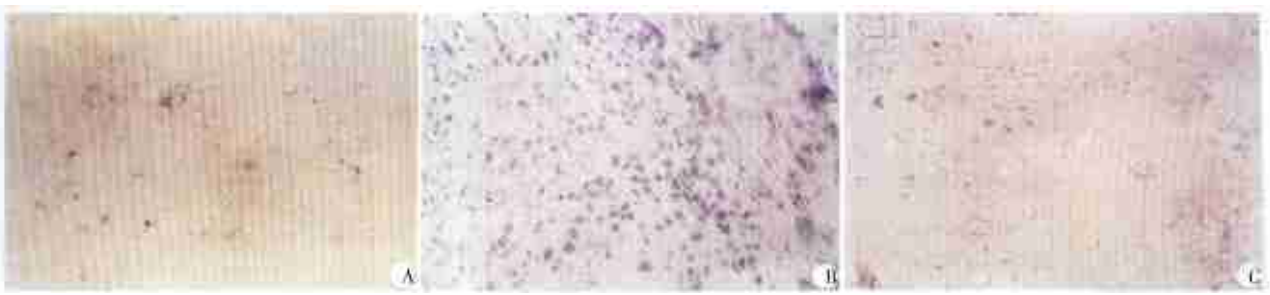


图 1　骨折后 **IGF-I mRNA** 表达阳性　(原位杂交, × 200)

A: 第 4 天; B: 第 9 天; C: 第 13 天

Fig 1　IGF-I mRNA expression positive after fracture　(*In situ* × 200)

A: 14 d; B: 9 d; C: 13 d

2.2　斑点杂交结果

正常及骨质疏松骨折愈合的斑点杂交结果, 见图 2。根据薄层扫描仪扫描所得光密度值($\bar{x} \pm s$)每个样本 mRNA 含量按如下公式计算: 每个样本 mRNA 含量= 斑点光密度值× 每个样本 mRNA 总量(μg)

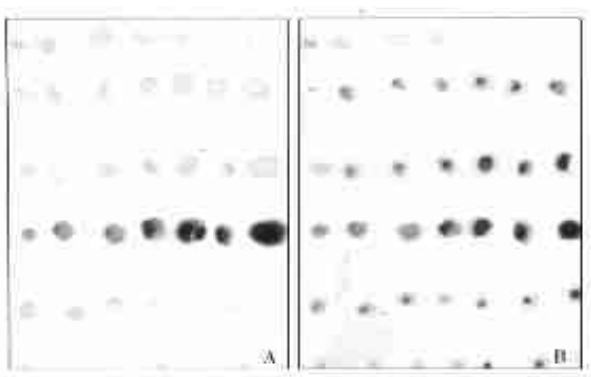


图 2　斑点杂交结果

A: 正常骨折组; B: 骨质疏松骨折组

Fig 2　Result of dot bloting hybridization

A: Normal fracture group; B: Osteoporotic fracture group

在骨质疏松性骨折愈合中两种细胞因子基因表达的变化模式与正常骨折愈合过程相似。与正常骨折愈合过程相比, IGF-I mRNA 骨折后即开始升高, 骨折第 4 天也开始明显升高并在第 9 天达到高峰, 其峰值与正常相比有显著性差异($P < 0.05$), 然后下降, 但第 13 天仍明显较正常组高, 至第 28 天维持在比正常较高的水平。IGF-I mRNA 无论从表达模式还是表达量上与正常组均相似, 其峰值也出现在骨折后第 13 天, 其峰值与正常相比差异无显著性($P > 0.05$), 见表 1。

表 1　对照组与 **Vox** 组不同时间段的光密度值(μg, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Values of optical density of the normal and osteoporotic group of IGF-I mRNA at different time points (μg, $\bar{x} \pm s$)

Group	Time after fracture (d)					Non-fracture
	1	4	9	13	28	
Sham	9.8±1.8[a]	12.5±2.2[a]	18.7±1.1	11.2±1.8[a]	9.8±2.3[a]	9.1±2.0[a]
Vox	13.5±2.0[a]	16.7±2.2[a]	32.6±2.2[b]	18.8±1.4[a]	13.6±0.9[a]	9.9±0.9[a]

a: $P < 0.05$ *vs* 9 d group by ANOVA test; b: $P < 0.05$ *vs* sham group at the same time point by ANOVA test

3　讨论

Urist 于 1943 年最早从组织形态学方面对骨折的愈合过程进行了描述。根据细胞类型、细胞外基质、以及它们出现时间的不同, 骨折愈合过程在组织学上表现出 4 个阶段[5]: ①急性创伤反应期。②膜内成骨期。③软骨形成期。④软骨内钙化阶段。关于正常骨折愈合过程中 IGF-I mRNA 的基因表达, 已有相关研究[6,7]。Andrew[8] 等发现人正常骨折愈合的早期骨痂组织中, 内皮细胞、间充质细胞中有 IGF-Ⅱ mRNA 的表达, 在软骨形成阶段, 幼稚软骨细胞, 成骨细胞中均有 IGF-I、IGF-Ⅱ mRNA 的表达, 在骨痂改建阶段, 一些破骨细胞中有 IGF-Ⅱ mRNA 的表达。Tanaka[3] 在对大鼠股骨骨髓抽吸损伤所诱发的骨修复过程的研究中发现: 骨髓

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

抽吸损失后第 3 天，IGF-I mRNA 的表达达到高峰，然后快速下降，至第 6 天恢复到正常水平，这与本实验中 IGF-I mRNA 的表达高峰在骨折后第 9 天不同。其原因可能与两者动物的选择以及损失程度、损失部位不同有关。前者使用的是 12 个月老龄大鼠，而非型骨质疏松模型鼠，另外，骨髓抽吸损伤的部位主要在髓腔内的小梁骨，并不涉及皮质骨及周围的软组织，且不同的损失程度所激发的骨折修复反应的程度不同，因此两者的愈合模式应有差别。通过原位杂交我们发现，IGF-I mRNA 表达的细胞定位主要在间充质细胞、软骨细胞、成骨细胞，这与 Andrew 研究结果相一致[8]。

虽然在正常骨折愈合过程中 IGF-I 的作用已有研究[3]，但有关骨质疏松性骨折愈合过程中 IGF-I 基因表达变化的研究资料较少。我们的实验发现，骨质疏松骨折愈合过程中，IGF-I mRNA 的基因表达均有不同程度的增高，虽然其变化模式与正常骨折愈合的变化模式相似，但 IGF-I mRNA 在峰值期的表达均明显高于正常组（$P<0.05$）。由于 IGF-I mRNA 在骨折后第 4 天明显升高，此期正是膜内成骨期，成骨细胞活性也正在增强；第 9 天达到高峰，这一时期是软骨细胞形成的高峰期，因此提示，IGF-I mRNA 基因的高表达与 I 型骨质疏松骨折愈合过程中骨形成作用的增强相关，可能参与了骨质疏松骨折愈合的病生过程，并发挥了重要的调节作用。

参考文献：

[1] Tanaka H, Quarto R. *In vivo* and *in vitro* effects of insulin-like growth factor on femoral mRNA expression in old rats[J]. Bone, 1994, 15(3): 647—653.

[2] Mochizuki H, Hakeda Y, Wakatsuki N, *et al*. Insulin-like growth factor-I supports formation and activation of osteoclasts[J]. Endocrinology, 1992, 131(3): 1 075—1 080.

[3] Tanaka H, Barnes J. Effect of age on the expression of insulin-like growth factor-I, interleukin-6, and transforming growth factor-β mRNAs in rat femurs following marrow ablation[J]. Bone, 1996, 18(5): 473—477.

[4] Bourque W T, Michael G. A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair[J]. Lab Anim Sci, 1992, 42(4): 369—374.

[5] Joyce M E, Jingushi S, Bolander M E. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair[J]. Orthop Clin North Am, 1990, 21(2): 199—209.

[6] Hock J M, Centrella M. Insulin-like growth factor-I has independent effects on bone matrix formation and cell replication[J]. Endocrinology, 1988, 122(11): 254—260.

[7] Spencer E M, Liu C C. *In vivo* actions of insulin-like growth factor-I on bone formation and resorption in rats[J]. Bone, 1991, 12(4): 21—26.

[8] Andrew J G, Hoyland S M, Andrew S M. Demonstration of IGF-ImRNA in situ hybridisation in human fracture callus[J]. J Bone Joint Surg (Br), 1993, 75(16): 281.

（编辑 张大春）

（上接 685 页）

强直，失去功能。

药浴的方法及作用：① 方法：将祛风除湿，舒筋活络、活血化瘀的中药煎煮制成洗剂，按 1 剂汤剂 2 次的比例加入 45～50 ℃的温水中配成中药浴液。置于药浴室自动循环与多孔冲浪式特制搪瓷浴缸内，让患者全身或病变患肢浸泡于药液中[2]，每次 30 min，每日 2 次，15 d 为一疗程。② 作用：中药药浴疗法属外治范围，借助水的温热及药物本身的功效，作用于全身肌肤，并经吸收，循环经络血脉，内达脏腑，由表及里产生效应，可发汗退热，祛风除湿，温经散寒、通经活络，温运气血，祛瘀生新，消肿止痛，调整阴阳、扶正祛邪；药物的有效成分对肌肤产生刺激和透入作用，改善血液循环，加速皮肤代谢，消除或减轻局部病灶，还可提高血液中某些免疫球蛋白的含量，增强肌肤的弹性和活力[3]，同时人体在浸浴时，借药液的浮力及多孔水浪的冲力按摩，有利于肢体主动或被动的功能锻炼。

药浴前的护理及准备：对将药浴的患者进行健康宣教，介绍药浴的目的、作用及浴中注意事项，如是全身浸浴，注意关好门窗，几个人同时药浴，各浴池间用屏风遮挡，调节水温至 45～50 ℃，检查多孔循环冲浪水道是否通畅，并备齐有关急救器材药品：如氧气、针灸针、肾上腺素及糖水、衣被置于防湿易取处。

药浴中的护理：经常巡视、询问患者有何不适，检查水温并使其恒定在 45～50 ℃之间，防止温度过高烫伤皮肤，过低受凉感冒，并注意多孔冲浪管道是否循环通畅，协助患者轻轻按摩病变关节，若患者出现胸闷、心慌、头晕、口渴等缺氧症状时，轻者适当开窗通风，减少浴液容量，降低冲浪水压，重者停止浸浴，平卧、保暖、吸氧、针刺内关、人中等对症处理。

病变关节的功能锻炼：浸浴 30 min 后，病变关节、周围的肌腱韧带、肌肉等处于松弛状态，软组织粘连均得到明显缓解，此时，用干浴巾擦净全身或患肢浴液，穿好衣裤适当保暖，将患肢关节放平，医护人员一手平放于受累关节处，先轻轻按摩，然后逐渐增加力量，待局部肌肉完全松弛后以抚、抖、摇、伸等动作活动受累关节，用另一手慢慢轻拉屈曲肢体，活动量由小到大，以患者能坚持为度，使之伸展到正常位置，每个关节按摩 10～15 min，一般患肢关节腔均有发热的感觉。轻患者，可根据关节病变情况自己伸展关节。活动肢体，但强度避免过大，过量，而加重病情。此外，药浴后还可用电动按摩器，轻轻按摩病变关节或用电脑低中频治疗仪对病变关节进行理疗，效果会更显著。

药浴的禁忌症及注意事项：药浴前仔细检查，并询问病人有关病情，有以下情况者：各种皮肤病、性病或疑有性病者、恶性肿瘤、女性患者月经期，各种急性炎症，特别是有急性渗出物且渗出过程尚未停止时，患有出血性倾向疾病，严重心功能不全及血压较高者均禁止药浴。

关键词：中药药浴；类风湿关节炎；护理
中图法分类号：R248 文献标识码：B

参考文献：

[1] 王少杰. 中药药浴治疗类风湿关节炎 52 例[J]. 辽宁中医杂志，1997, 24(7): 305—309.

[2] 王德全. 藏医规模化药浴的现代设备与管理[J]. 中国民族医药杂志，1996, 2(4): 43.

[3] 马玉琛，田在本，傅连江. 热控中药透皮法治疗类风湿性关节炎效果观察[J]. 人民军医，2000, 43(1): 48—49.

（编辑 薛国文）

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