DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.030
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
66 2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)01-0066-03

实验性骨延长区 TGF-β_1 的基因表达和细胞定位

杨 柳[1],李起鸿[1],谭祖键[1],周 强[1],周仲安[1],曹 佳[2] (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实验室,重庆 400038)

提 要:目的 了解骨延长过程中TGF-β_1基因在骨延长区组织细胞的表达和定位,从分子水平探讨延长区骨修复的机制。方法 采用胫骨上干骺端截骨延长(1.0 mm/d)动物模型,14只山羊分7个时相点取材。通过延长区组织冰冻切片,TGF-β_1地高辛标记的cDNA探针原位杂交。结果 延长早期延长区阳性表达细胞逐渐增加(15 d)至最高峰,此阶段主要定位于增生的纤维细胞和血管内皮细胞;以后细胞阳性表达率迅速下降,定位于延长区骨小梁边缘的成骨细胞。结论 TGF-β_1在延长区骨修复过程中具有重要作用,提高和维持延长区TGF-β_1基因高水平有效表达,可能对促进和加快延长区骨愈合具有重要的意义。

关键词:骨延长;转化生长因子-β_1;基因表达
中图法分类号:R392.13;R687.3 文献标识码:A

Expression and localization of TGF-β_1 gene in the lengthened segment of goat tibia during the experimental lengthening after metaphysiotomy

YANG Liu, LI Qi-hong, TAN Zu-jian, ZHOU Qiang, ZHOU Zhong-an, CAO Jia (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and localization of TGF-β_1 gene in the lengthened segment for the mechanism of the bone repairing during bone lengthening at a molecular level. Methods After 14 mature goats were inflicted with metaphysiotomy in their upper tibiae, bone lengthening was carried out at a rate of 1.0 mm/d for 30 d. Samples of lengthened bone tissue were collected from the lengthened segment in all animals at 7 different time points and frozen sections were made. The expression of TGF-β_1 mRNA in the sections was detected with *in situ* hybridization (ISH). Results TGF-β_1 mRNA gene positive rate was increased gradually and reached a peak on the 15th d after lengthening. During this period, the gene was localized in proliferated fibroblasts and vascular endothelial cells. From the 20th d, its expression began to decrease rapidly and it was mainly localized in the osteoblasts around bone trabecula in lengthened bone segments. Conclusion TGF-β_1 plays an important role in the bone repairing of lengthened segment. To raise and maintain the expression of TGF-β_1 mRNA in a high level might be a significant route to enhance and promote bone healing in lengthened segment.

Key words: bone lengthening; TGF-β_1; gene expression

众多研究表明:转化生长因子-β(Transforming growth factor-beta, TGF-β)在骨发育、诱导和修复中起主要调节作用[1,2]。其中TGF-β_1在骨组织中含量最多,生物学作用最强[1~4],因此认识和了解骨延长区TGF-β_1在骨延长过程中基因的表达水平和变化规律,对我们认识延长区骨修复的分子学机制具有重要的理论和临床意义。本实验通过山羊胫骨上干骺端截骨延长动物模型,采用TGF-β_1 cDNA探针原位杂交(ISH)技术,初步观察了在骨延长过程中延长区TGF-β_1基因阳性表达和细胞定位。

1 材料与方法

1.1 动物模型

选用1~2岁健康杂种青山羊14只,雌雄不分,体重14~25 kg。按切取延长区标本时间(延长3,5,7,10,15,20,30 d)分为A~G 7组。术后4 d开始延长,1.0 mm/d分2次进行。

1.2 实验用主要试剂

TGF-β_1 cDNA探针质粒(美国新奥尔良大学Presscott Deininger博士惠赠)。*EcoR*Ⅰ和*Hand*Ⅲ限制性内切酶(华美公司)。Lambda DNA-*Hind*Ⅲ Maker(华美公司)。地高辛标记DNA试剂盒(德国Boehringer Marheims公司)。

1.3 延长区标本制备

按实验计划切取出延长区标本,放入4%多聚甲醛缓冲液,4 ℃固定4~6 h后,转入用4%多聚甲醛缓冲液配制的30%蔗糖溶液过夜,然后行30 μm冰冻切片,将切片置于4%多聚甲醛缓冲液备用。

1.4 原位杂交

以捞片法中行原位杂交实验,具体步骤参照蔡文琴[5]原位杂交技术方法。

2 结果

本实验观察发现,在整个延长过程中延长区组织细胞均有TGF-β_1 mRNA表达。典型TGF-β_1表达阳性细胞胞核无染色呈空泡样,胞质内充满紫蓝色颗粒,而未加入标记探针的阴性对照和空白对照胞质和胞核均不显色,见图1~4。

作者简介:杨 柳(1963—),男,山西省运城市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肢体延长、骨修复重建方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68754164

收稿日期:2000-02-18;修回日期:2000-09-30

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

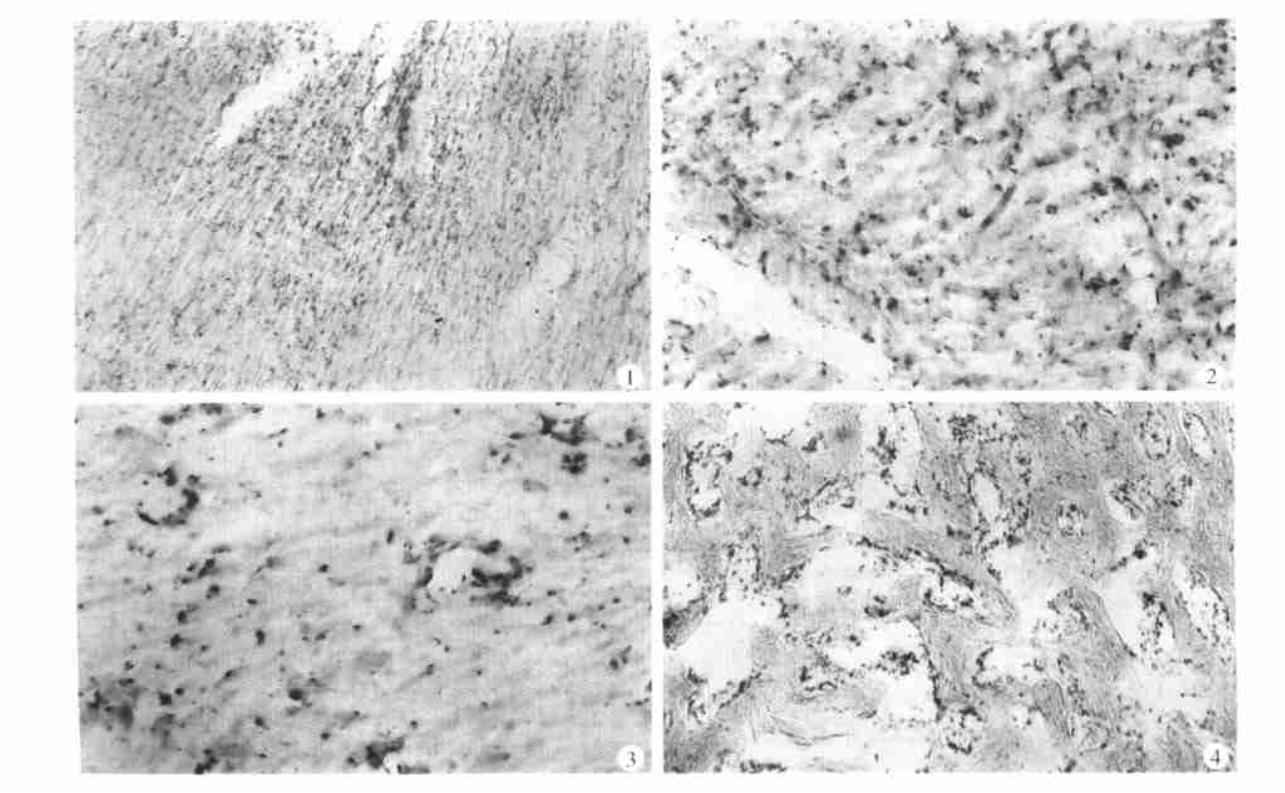


图 1　延长 10 d 时, 纵切片显示延长区 TGF-β_1 mRNA 表达阳性细胞沿牵伸方向排列 （ISH× 40）

Fig 1　Positive expression of TGF-β_1 mRNA in cytoplasm of osteocyte arranged along the traction direction in lengthening zone at 10th day after lengthening (longitudinal section) （ISH× 40）

图 2　延长 15 d 时, 横切片显示延长区 TGF-β_1 mRNA 表达阳性细胞, 典型表达胞质呈紫黑色颗粒样沉淀物, 胞核不染色 （ISH× 100）

Fig 2　Positive expression of TGF-β_1 mRNA with typical purple granular precipitates in cytoplasm of osteocyte in lengthening zone at 15th day after lengthening (cross-setion) （ISH× 100）

图 3　延长 10 d 时, 横切片显示延长区血管内皮细胞 TGF-β_1 mRNA 表达呈强阳性 （ISH× 100）

Fig 3　Strong positive expression of TGF-β_1 mRNA in endothelial cell of blood vessel in lengthening zone at 10th day after lengthening (cross-section) （ISH× 100）

图 4　延长 30 d 时, 横切片显示延长区网状骨痂小梁边缘成骨细胞 TGF-β_1 mRNA 表达呈强阳性 （ISH× 100）

Fig 4　Strong positive expression of TGF-β_1 mRNA in cytoplasm of osteocyte in margin of lengthening zone at 30th day after lengthening (cross-section) （ISH× 100）

观察中发现, TGF-β_1 mRNA 表达主要定位于成纤维细胞, 血管内皮细胞和成骨细胞, 并随着骨延长不同阶段而有所变化。在延长早期阶段(1～15 d), 延长区 TGF-β_1 mRNA 表达阳性细胞主要为成纤维细胞和血管内皮细胞。延长 15 d 以后, 随着延长区新生骨小梁形成, 骨小梁周边成骨细胞明显增多, 其胞浆内 TGF-β_1 mRNA 的表达呈强阳性。而成纤维细胞和血管内皮细胞 TGF-β_1 表达则有所减弱。

400 倍光镜下各时相点原位杂交切片中选择 10 个视野对 TGF-β_1 mRNA 表达阳性细胞进行计数, 骨延长过程中阳性表达水平的变化, 见表 1。

统计学单因素方差分析表明: 除 D 组外($P>0.05$), E 组显著高于各组($P<0.05$); 另外 G 组与 B、C、D、E、F 组间差异亦有显著性($P<0.05$), 而 A、B、C、D 组之间, A、F、G 组之间差别则不显著($P>0.05$)。

表 1　延长区 TGF-β_1 mRNA 表达阳性细胞率($\bar{x}\pm s$, 400 倍)

Tab 1　mRNA of TGF-β_1 gene positive rate in the lengthened zone ($\bar{x}\pm s$, × 400)

	A	B	C	D	E	F	G
Positive rate	134.2±21.63	157.7±17.58	161.7±28.82	181.2±32.71	225.2±46.80	139.7±26.23	102.9±19.85

3　讨论

人正常长骨和颅骨的发育过程中, TGF-β_1 mRNA 定位于破骨细胞和成骨细胞[6,7]。Seyedin 等[8] (1986) 已证实, 先前从软骨组织中分离出的软骨诱导因子(CIF)A 和 B 与 TGFβ1 和β2 相同。近年来骨科研究最

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

热门之一的骨形态发生蛋白 BMP 和成骨蛋白(OP-1)均属 TGF-β 超族成员,其基因表达基本一致[9]。近年文献报道表明,目前研究的热点已开始转移到 TGF-β。TGF-β 在骨发育、骨诱导、修复中起主要的调节作用,其作用主要是通过促进细胞增殖;调节细胞分化;促进细胞外基质合成来实现的[1~4]。

目前国外对 TGF-β_1 在骨折愈合过程中的作用已有相当深入的研究。Sandberg 等[10](1991)发现,骨折后2周骨痂中 TGF-β_1 mRNA 水平最高;主要定位于增生的间充质细胞、骨细胞和软骨细胞;而在肥大的软骨细胞中表达极低,但发现在其周围基质中免疫组化显示TGF-β_1 呈强阳性。Erebacher 等[2] 实验证实 TGF-β 抑制破骨细胞分化,促进骨祖细胞增殖,增加成骨细胞数量,加速组织矿化。Andrew 等[11](1993)从20例临床骨折患者中采集了骨折后1周到15周的骨痂标本,进行TGF-β_1 原位杂交发现其中2例延迟愈合患者骨痂中TGF-β_1 mRNA 表达水平极低,这表明 TGF-β_1 与骨不连或延迟愈合可能存在分子病理学基础,而非单纯医源性因素,并从另一方面说明了 TGF-β_1 在骨折愈合中具有重要作用。Lind 等[12](1993)采用皮下泵连续注射 TGF-β_1 至骨折部位6周(1μg/d、10μg/d 和对照共3组),发现接受 TGF-β_1 治疗组骨痂增多,骨强度明显提高,与 Nielsen 等的结果一致。Schmitt 等[13] 实验亦证实外源性TGF-β 可刺激骨软骨形成,并发现在骨折端固定牢稳情况下,TGF-β 刺激骨痂生成,反之则刺激软骨生成。综上所述,TGF-β_1 在骨折修复过程中具有重要作用,但对 TGF-β_1 在骨延长区修复过程中的作用尚不清楚,TGF-β_1 mRNA 表达的研究尚未见报道。

本实验观察发现,TGF-β_1 mRNA 的阳性显色主要定位于胞浆,光镜下呈蓝色颗粒样。TGF-β_1 mRNA 表达主要集中在成纤维细胞、内皮细胞和成骨细胞等。可见延长区骨修复早期TGF-β_1 mRNA 表达主要集中于血管内皮细胞和成纤维细胞,随着骨延长的进行,延长区靠截骨端两侧开始出现骨小梁样结构,沿小梁边缘出现较多成骨细胞,细胞胞浆内出现 TGF-β_1 mRNA 表达阳性染色。实验已证实,延长区组织学骨修复过程在延长早期(2周左右)延长区为富含沿牵伸方向排列的胶原纤维组织,主要为大量的成纤维细胞和血管内皮细胞,以后延长区逐渐出现骨小梁组织,开始进行骨修复、矿化,并按长骨组织的生物学要求,适应性改建为骨皮质和髓腔。研究表明,在骨折愈合的六个阶段,碰撞、诱导、炎症、软骨痂、硬骨痂以及改建阶段中,各种骨生长因子主要在前五个阶段发挥重要的生物学效应,尤其是在诱导、炎症阶段。实验中发现,延长区骨修复过程与骨折愈合具有许多相似之处,在延长早期(3~15 d),相当于骨折愈合的诱导、炎症、软骨痂阶段,延长区 TGF-β_1 mRNA 表达阳性计数逐渐增高,到延长2周达到高峰,以后开始减少,干骺端截骨延长区骨修复和骨折愈合过程中 TGF-β_1 mRNA 的表达基本一致。这一方面表明延长区骨修复和骨折修复具有相似之处,另一方面说明延长区在延长结束后骨愈合迟缓,可能与TGF-β_1 mRNA 的表达减少有密切关系。由于骨延长区不断的被缓慢延长扩大,其延长区骨痂随延长不断增加,与骨折愈合相比,又有其特殊性。因此,若能使延长区各种骨生长因子的表达水平提高,并维持更长时间,或应用外源性骨生长因子,可促进延长区骨修复,这还有待进一步的研究探讨。

总之,骨折愈合和延长区骨修复都是一个十分复杂的过程,如何提高和维持其局部高水平的TGF-β_1,对于加速骨愈合和改建,缩短治疗时间,具有十分重要的临床意义。

参考文献:

[1] Sloheim E. Growth factors in bone[J]. Int Orthop, 1998, 22(6): 410—416.

[2] Erebacher A, Filvaroff E H, Ye J Q, *et al*. Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling[J]. Mol Biol Cell, 1998, 9(7): 1 903—1 918.

[3] Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies and implants fixation[J]. Acta Orthop Scand Suppl, 1998, 283: 2—37.

[4] TaKai H, Kanematu M, Yano K, *et al*. Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cell[J]. J Biol Chem, 1998, 273(42): 27 091—27 096.

[5] 蔡文琴,王伯祥云. 实用免疫细胞化学及核酸分子杂交技术[M]. 成都:四川科学技术出版社, 1994. 406—414.

[6] Si X, Jiu Y, Yang L, *et al*. Expression of BMP-2 and TGF-beta1 mRNA during healing of the rabbit mandible[J]. Eur J Oral Sci, 1997, 105(4): 325—330.

[7] Gao J, Symons A L, Bartold P M. Expression of transforming growth factor-beta1(TGF-beta1) in the developing peridontium of rats[J]. J Dent Res, 1998, 77(9): 1 708—1 716.

[8] Seyedin S M, Thompson A Y, Bentz H, *et al*. Cartilage inducing factor. Apparent identity to transforming growth factor-beta[J]. J Biol Chem, 1986, 261: 5 693—5 695.

[9] Khalsa O, Yoon J W, Torres-schumann-S, *et al*. TGFβ/BMP Superfamily members, Gbb-60A and Dpp, cooperate to provide pattern information and establish cell identity in the Drosphilia wing[J]. Development, 1998, 125(14): 2 723—2 734.

[10] Sandberg M M. Matrix in cartilage and bone development; current views on the function and regulation of major organic com-ponents[J]. Ann Med, 1991, 23(3): 207—217.

[11] Andrew J G, HoyLand J, Andraw S M, *et al*. Demostration of TGFβ1 mRNA by in situ hybridization in normal human fracture healing[J]. Calcif Tissue Int, 1993, 52(2): 74—78.

[12] Lind M, Schumacker B, Saballe K, *et al*. Transforming growth factor enhances fracture healing in rabbit tibiae[J]. Acta Orthop Scand, 1993, 64(5): 553—556.

[13] Schmitt J M, Buck D, Bennett S, *et al*. Assessment of an experi-mental bonewax polymer plus TGF-beta1 implanted into calvarial defects[J]. J Biomed Mater Res, 1998, 41(4): 584—592.

(编辑 薛国文)

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