

大鼠胫骨骺板软骨细胞 P 物质的表达

李靖 王全平 陶惠人 吕荣 范宏斌 王哲
(第四军医大学西京医院全军骨科研究所,陕西 西安 710033)

【摘要】 目的 研究 P 物质(SP)在大鼠胫骨骺板软骨细胞中的表达及其在长骨纵向生长中的意义。方法 应用免疫组化技术检测 8 周龄大鼠胫骨骺板不同组织学层次软骨细胞的 SP 表达状况。结果 骺板静止及增殖期软骨细胞未见 SP 免疫阳性染色,肥大区及钙化区软骨细胞可见 SP 免疫组化阳性染色。结论 骺板肥大区及钙化区软骨细胞可以表达 SP,提示 SP 在长骨的纵向生长中可能起调节作用。

【关键词】 胫骨; 骺软骨; 免疫组织化学

Expression of substances P in chondrocyte of rat's tibia epiphyseal plate LI Jing, WANG Quan-ping, TAO Hui-ren, et al. Xijing Hospital of the 4th Military University (Shanxi Xi'an, 710033)

【Abstract】 Objective To observe the expression of substances P(SP) in chondrocyte of rat's tibia epiphyseal plate and it's significance in longitudinal growth of long bone **Methods** To detect the expression of substances P(SP) in chondrocyte of 8 weeks old rat's tibia epiphyseal plate of different histology level with immunohistochemical technique. **Results** The expression of SP were positive in maturing and calcifying chondrocyte and negative in static and proliferative phase. **Conclusion** SP were expressed in hypertrophic chondrocytes of epiphyseal plate. SP may regulate the bone modeling, especially in longitudinal growth of long bone.

【Key words】 Tibia; Epiphyseal cartilage; Immunohistochemistry

P 物质(Substance P, SP)作为一种神经肽在信号传导以及痛觉产生机制中起重要作用。近年研究表明 SP 对骨代谢有一定调节作用,体外研究发现 SP 对破骨代谢起促进作用^[1]。本研究应用免疫组化技术对生长期大鼠胫骨骺板中 SP 表达的细胞定位进行分析以探讨 SP 在骨代谢中的意义。

1 材料与方法

1.1 材料 8 周龄 SD 大鼠 5 只,雌雄不拘,由第四军医大学实验动物中心提供。混合脱钙液由本科实验室配制(生理盐水 900ml,甲醛 100ml,甲酸 70ml,盐酸 80ml,结晶氯化铝 60g,冰醋酸 20ml)。APES 与多聚赖氨酸购自宝泰克公司。免疫组化一抗为兔抗鼠 SP 单克隆抗体(即用型, Sigma 公司),二抗以及显色系统为 DAKO En Vison™ system 试剂盒(即用型, DAKO 公司)。

1.2 方法 大鼠断颈处死后迅速取双侧胫骨近端置于 10% 中性福尔马林固定 16h,混合脱钙液脱钙 72h,常规脱水,透明,石蜡包埋后沿胫骨纵轴进行包埋。每例标本制作非连续的厚度为 5μm 切片 3 张附着于 APES 与多聚赖氨酸双重处理的载玻片上行免疫组化操作。免疫组化染色采用 SP 法,操作过程如下:切片脱蜡至水,3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶 10min,胰酶消化 10min 后加正常羊血清封闭非特异性结合点 15min。加一抗后 4 过夜。次日复温至 37℃ 1h,滴加二抗 37℃ 孵育 30min, DAB 显色。以上步骤间均用 PBS 洗 5min × 3 次。显微镜下观察到棕黄色物质时停止显色反应。

用 PBS 代替一抗作为阴性对照。苏木精复染,常规脱水,透明,封片。

2 结果

SP 免疫反应物质呈棕黄色,所有切片骺板处的免疫阳性物质均存在于趋于钙化带的肥大软骨细胞以及钙化带软骨细胞;而处于静止期、增殖期的软骨细胞均未见 SP 免疫阳性着色。阳性染色定位主要在胞浆中,胞膜以及胞核也可见免疫阳性颗粒,阳性细胞轮廓清楚,对比反差强烈。所有阴性对照切片骺板区域均未见着色。小梁骨及皮质骨中的骨细胞、成骨细胞、破骨细胞以及骨髓基质细胞均未见免疫阳性着色。

3 讨论

骨组织塑形受诸多方面因素的影响与调节,神经肽类物质对骨代谢的影响已成为近年研究的热点。SP 是由 11 个氨基酸组成的速激肽,骨组织中的 SP 主要由脊髓后根节产生,通过轴浆运输至支配骨组织的感觉神经末梢调节骨组织代谢。有研究表明神经细胞以外的其它细胞也有分泌神经肽的功能,但关于是否骨与软骨细胞也可以分泌神经肽以及相关生物学作用尚未见报道。

长骨塑形包括纵向增长与横向增粗两个方面。纵向生长在骺板处进行。骺板在组织学上是由逐渐移行的静止带、增生带、肥大带以及钙化带组成。骺板在成年之前始终不断进行着以骺侧向干侧的软骨内成骨过程。长骨的纵向生长主要由骺板软骨细胞的不断增殖、成熟、退化、钙化、骺板骨干侧软

骨吸收以及继之而来的成骨细胞的成骨作用共同完成。多种细胞因子参与软骨细胞的分裂增殖,如不同软骨细胞区可以表达 BMPs, BMPR-A, BMPR-B, BMPR- 以及表皮生长因子 EGF,提示软骨细胞以自分泌或旁分泌的方式调节细胞的分裂与增生^[2,3]。但目前对于最终破骨性软骨吸收的分子机制尚不十分清楚。本研究发现生长期大鼠骺板软骨细胞可以表达 SP,其表达定位与骺板软骨细胞组织学层次有关。其中处于静止期、增殖期以及早期肥大样软骨细胞 SP 呈阴性表达,趋于钙化带的肥大软骨细胞以及钙化带的软骨细胞可以表达 SP。

SP 的信号传导 (signal transduction) 是通过其受体-神经激肽-1 受体 (neurokinin-1 receptor, NK1-R) 活化来完成。有学者应用免疫电镜方法证实骨细胞、成骨细胞以及破骨细胞内均有 NK1-R 的存在,该受体在破骨细胞中呈强表达,而在骨细胞以及成骨细胞中表达则极少^[4]。体外研究发现 SP 促进培养中新生鼠颅盖骨的破骨性骨吸收^[5]。陷窝形成分析实验表明 SP 增强兔破骨细胞的骨吸收活性,而 SP 受体拮抗剂可以阻止这种作用^[1]。上述诸研究表明破骨细胞可能是 SP 作用的主要靶细胞,SP 可以通过结合破骨细胞上的 NK1-R 而提高破骨细胞的活性,最终促进骨吸收。根据我们的实验发现并结合以往的研究结果推测:骺板肥大区及钙化区软骨细胞以旁分泌方式产生 SP,在骺板骨干侧造成局部高浓度

SP。SP 通过与骨干侧破骨细胞上的 NK1-R 结合提高该区域破骨细胞的活性,从而最终促进骺板骨干侧软骨吸收发生。因此,骺板肥大区以及钙化区软骨细胞旁分泌 SP 可能是干骺侧软骨吸收的分子机制之一。此外,骨的塑形主要发生于骨的生长阶段,而作为骨组织的重建则持续终生。因此是否 SP 参与在生长期干骺端骨组织的改建有待进一步研究。

参考文献

- 1 Mori T, Ogata T, Okumura H, et al. Substance P regulates the function of rabbit cultured osteoclast; increase of intracellular free calcium concentration and enhancement of bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 262(2): 418-422.
- 2 Tajima Y, Yokose S, Takenoya M, et al. Immunohistochemical demonstration of epidermal growth factor in chondrocytes of mouse femur epiphyseal plate. *J Anat*, 1993, 182(2): 291-293.
- 3 Yazaki Y, Matsunaga S, Onishi T, et al. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic proteins and the receptors in epiphyseal growth plate. *Anticancer Res*, 1998, 18(4): 2339-2344.
- 4 Goto T, Yamaza T, Kido MA, et al. Light and electron microscopic study of the distribution of axons containing substance P and the localization of neurokinin-1 receptor in bone. *Cell Tissue Res*, 1998, 293(1): 87-93.
- 5 Sherman BE, Chole RA. A mechanism for sympathectomy-induced bone resorption in the middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1995, 113(5): 569-581.

(收稿:2001-05-31 编辑:房世源)

短篇报道

不剥离或有限剥离骨膜方式内固定手术 117 例

杨春雷 朱登峰 高真国 柯继锋 李小双 王建军
(黄陂区人民医院,湖北 武汉 430300)

骨膜下手术一直是内固定手术原则之一,骨膜对骨折愈合有着重要的作用,许多的内固定手术后出现的骨折不愈合或延迟愈合及并发症都与内固定手术时的不恰当操作处理有关。自 1998 年以来,我们在内固定手术中有意识地采取不剥离或有限剥离骨膜及骨膜外软组织手术方式对 117 例四肢骨折进行了内固定手术,取得了良好的疗效。

1 临床资料

股骨骨折内固定 32 例,胫骨 22 例,尺骨或桡骨 27 例,肱骨 6 例,掌骨及指骨 6 例,跖骨 4 例,锁骨 20 例;年龄 4~76 岁。临床观察结果:骨痂生长速度及内固定拆除时间均在正常范围之内,无一例出现延迟愈合或因延迟愈合而造成的并发症。

2 治疗原则及方法

2.1 遵循“微创”操作原则,尽量选择解剖入路,沿肌间隙进入,动作准确轻柔,防止粗暴“失手”失误。

2.2 熟悉局部解剖结构,可不在直视下的操作则不需作扩大显露;对有知名及重要的神经血管等组织结构的部分,如有必要则事先作显露、游离、保护。

2.3 选择应用止血带、高频电刀、局部止血剂等,控制出血,

保持术野清晰,操作有序。

2.4 骨膜及骨膜外软组织的处理,从肌间隙进入,骨膜外无肌肉、肌腱、韧带等附着的,多较疏松,将软组织推开后可直接在骨膜外操作固定;在近关节处等骨膜外有肌腱韧带附着的,在骨膜下作有限剥离,显露手术部位;在手术部位有致密的肌肉韧带附着的如股骨粗隆等处,不必切开骨膜直接用电刀剥离肌肉。上述显露骨膜及骨膜外软组织一般剥离范围在 1/3~1/2 周径以内即可。

2.5 应用现有或自制辅助手术器械进行手术,如用各式卡钳提拉、固定骨头骨块;钢丝导引器穿钢丝;用自制的自动牵开器牵引复位骨折端等,均可使操作简化。

3 讨论

内固定手术骨膜下进行的原则首先是基于安全的考虑,其次是为了操作的方便。那么随着内固定手术的普及,解剖的熟悉及各种手术入路的相对固定,医师操作技巧的提高及各种手术辅助器械的完备,骨膜下手术的原则是可以不提倡的,特别是那种切开骨膜后沿其周径作大部分或全部剥离的方式更应是禁忌,包括骨膜外软组织的剥离亦是如此。

(收稿:2002-01-14 编辑:李为农)