

胶原蛋白与骨折愈合的关系

The relationship between collagen and fracture healing

姜福全 赵铁军 沈洪兴

JIAN G Fu-quan, ZHAO Tie-jun, SHEN Hong-xing

【关键词】骨折愈合；胶原蛋白 【Key Words】Fracture healing； Collagen

1 胶原蛋白在骨和体内其他组织中的分布

到目前为止人们已经发现了 19 种基因编码不同的胶原蛋白,各种类型的胶原按其发现顺序用罗马数字标记,按照它们的结构特点的不同又可分组^[1,2]。

胶原 I、II、III、IV 是连接纤维形成胶原。I、II 型胶原是在结缔组织基质中发现的主要胶原。I 型胶原主要存在于肌腱、韧带、骨、器官被膜、皮肤、纤维软骨和筋膜中。II 型胶原主要存在于透明软骨和弹性软骨中,它被作为软骨细胞的标志。I 型胶原在许多组织中都有分布,包括动脉、肝、脾、肉芽组织等,它可以构成大量的纤维间的横向连接。由 I 型胶原构成的分子间的二硫键横向连接在体内有着重要作用。因为二硫键连接可以很快生成,所以 I 型胶原在愈合过程中最早产生,它们对新合成的基质提供机械力量^[3]。

相对地, V、VI 到 VIII 型胶原不构成纤维。IX、X、XI 和 XII 型胶原不单独构成超分子结构,而通常与其它胶原一起构成纤维^[4]。它们的结构为短的非三维螺旋结构,起到分隔体内各种三维螺旋结构物质的作用。其他胶原类型形成非胶原聚集体,如板层(XIII、XIV 型胶原),串珠样微丝(XV 型胶原),辅助基底膜连接的定位纤维(XVI 型胶原)。I、II 和 III 型胶原的特征是在正常胶原三维结构区内广泛间断。胶原家族中其他已知胶原如 VII、VIII 型胶原是由单链构成。

在不同个体间,各种胶原的分布也不尽相同,随年龄、性别等有差异。Wang 等^[5]研究了 33 名不同性别和年龄人的股骨样本后发现年龄主要可以影响骨组织中变性胶原的数量、骨折强度、骨折能量及弹性系数;而性别则对骨折强度、弹性系数等有影响。进一步研究发现变性胶原的比例与骨强度负相关,而与其弹性系数正相关;而矿化成分则与骨强度及其弹性系数皆正相关。Alvarez 等^[6]研究了不同年龄大鼠胫骨中胶原基质表达的差异。结果发现胶原基质和 I 型胶原酶在软骨细胞分化的特异时期表达,并与动物生长速度相关。在软骨细胞分化的过程中 I 型、II 型胶原及 I 型胶原酶表达的与基因表达的一系列改变相关。

2 胶原蛋白在骨折愈合中的时空表达

胶原超家族中被认为在骨修复中起到直接作用的胶原为 I、II、III、IV、V、VI 型胶原等。

I 型胶原占全部胶原的 90%,它有着广泛的分布。I 型胶原在骨中增加了大量的机械力量。Martin 等^[7]发现在牛的皮质骨中,纵向排列的胶原纤维的数量是骨强度的最好预测指标。同时,骨的胶原纤维也是骨质矿化的部位。

骨折修复中产生的胶原类型可因组织修复的需要而变化。Lane 等^[8]证实大鼠胫骨只有 I 型胶原在成熟骨中广泛存在,II 型胶原和 III 型胶原仅在骨痂中有其特殊定位。胶原在骨折愈合三个过程中的生成有时间上的顺序性:炎症期供应骨膜、骨膜下骨及周围的结缔组织的血管破裂从而导致血肿形成和细胞坏死,坏死组织的趋化作用可吸引原始间质成分分化成成熟的细胞成分,如软骨细胞和成骨细胞,这些细胞随后产生 II 型胶原和 III 型胶原;在修复期 I 型胶原纤维基质沿骨膜表面分泌,作为骨原细胞和毛细血管生长的底物,也可作为较松散的可延伸的支架,在其基础上纤维可以定向。接着,II 型胶原在纤维组织中作为骨生发的小梁,最后,在软骨内骨化中产生 I 型胶原作为修复过程,I 型胶原的表达依赖于骨折愈合的机械类型。只有不稳定型骨折才通过软骨内骨化愈合。

Moro 等^[9]发现近干骺端和骨干的海绵骨与远干骺端的海绵骨 I 型胶原蛋白中羟脯氨酸、羟赖氨酸、糖基化的羟赖氨酸等的比例皆有所差异。从而肯定了骨功能对胶原的影响作用。

接着,人们又在基因水平对骨愈合过程中的胶原表达做了进一步研究,Scandberg 等^[10]在大鼠骨折骨痂中使用原位杂交技术定位产生 I 型和 II 型胶原。发现第一个检测到的是 I 型胶原 mRNA,它在第 5 天时已在靠近皮质骨的细胞中有表达。这些软骨细胞也有 I 型胶原 mRNA 的表达,提示它们是由新生骨膜细胞分化而来的。因为外骨痂的总数在第 7 天至第 15 天没有改变,所以作者提出软骨的发生主要来自间质细胞的分化,而不是软骨细胞的增殖。在软骨基质沉积之后,II 型胶原 mRNA 明显下降。在骨折愈合的第 15 天至第 28 天间,在每一骨折骨痂单位内检测到的 I 型胶原的 mRNA 数量达到最高峰,这与成骨细胞将软骨转化为编织骨相一致。

Hiltunen 等^[11]从大鼠正常胫骨和骨折后外骨痂中提取出全部胶原蛋白的 RNA,使用特殊的 cDNA 探针进行 Northern 杂交,发现 I 型胶原的合成在骨折后 5 天的炎症期达到高峰,此后逐渐下降,在第 28 天时已非常少,正常骨组织中有低水平

但仍可检测到的 I 型胶原 mRNA。数种软骨特异性的基因在第 7 到第 9 天时上调。当软骨形成活跃时,机体有高水平的 I 型胶原 mRNA 与 II 型胶原 mRNA。这两种胶原的表达相一致。而在第 28 天骨痂和正常骨中未见 I 型胶原 mRNA 与 II 型胶原 mRNA 表达。I 型胶原仅在软骨骨化时的肥大软骨细胞中有表达,它在骨折后第 9 天达到高峰,在软骨生成上稍晚于 II 型胶原和 III 型胶原。I 型胶原在所有时间皆有表达,在第 14 到 28 天间最高,这与骨形态学上活跃的新骨生成和骨塑形相一致,正常骨组织中 I 型胶原 mRNA 水平非常低^[12]。

3 胶原蛋白在骨折愈合中表达的调控

3.1 胶原蛋白间的相互调节

胶原蛋白在骨折愈合中的表达具有一定顺序性,而且相互之间还具有调节作用。在众多的胶原分子中, I 型胶原是在软骨生成中最受重视的。但最近,小纤维胶原如 III 型胶原和 IV 型胶原也被研究。I 型胶原和 II 型胶原有着非常相近的结构,在不同的组织中有着相同的作用。已有研究表明这些小胶原在软骨组织和非软骨组织中调节 I 型胶原和 II 型胶原的生长和定向。对这两种胶原基因表达的研究发现:在骨折愈合过程中 I 型胶原在软骨痂和硬骨痂中皆有表达,从内生骨痂生成开始一直持续到整个塑形期。在进行膜间骨化的骨膜下骨痂中 I 型胶原表达得最多^[13]。最近,对软骨痂中的软骨组织的研究发现:表达较强胶原 A1 信号的增殖软骨细胞同时表达 A 型信号。随着组织的分化软骨细胞的分化, A 胶原信号迅速消失,在肥大软骨细胞和钙化处软骨细胞中检测不到。A1 胶原阴性的细胞皆不表达 A1 基因。

在软骨生成缺陷的实验模型中,转基因鼠其 I 型胶原基因的外显子 7 和内含子 7 被敲除,发现骨折骨痂处软骨细胞内 I 型胶原和 II 型胶原水平较正常鼠低,并且其骨痂生成受到抑制^[13]。进一步验证了 I 型胶原和 II 型胶原与 I 型胶原间密切的调解关系。尚无其他种胶原间相互调节的研究报道。

3.2 病理情况对胶原蛋白表达的影响

临床医生早就观察到,在某些病理状态下,如糖尿病,骨折愈合明显受到影响。现在研究表明,这与胶原蛋白有密切关系。Macey 等^[13]报道糖尿病鼠骨折后骨痂胶原合成减少,伴随着骨痂机械强度的下降。Topping 等^[14]发现正常大鼠骨痂中 I 型胶原在骨折后第 14 天达到最高,而在糖尿病大鼠中则下降了 54%~70%,其原因可能是糖尿病大鼠骨痂中软骨全部受抑制的结果,从而解释了糖尿病大鼠骨折愈合缺陷的原因。Spanheimer 等^[15]报道糖尿病大鼠的关节软骨和骨组织在体外总胶原的合成量下降,并且使用糖尿病大鼠的血清也使正常大鼠的软骨胶原合成量减少。而在给糖尿病大鼠使用胰岛素治疗后再取其血清,则没有抑制作用,这提示存在一种循环因子介导糖尿病对结缔组织的作用,但具体的机制正在研究之中。

3.3 骨折类型对胶原蛋白形成的影响

Roman 等^[16]总结了稳定型和不稳定型骨折愈合过程中胶原的不同。稳定型骨折主要是 I 型胶原,也有 II 型胶原和 III 型胶原。形成支架支持软骨骨痂,随后进行软骨内骨化。而不稳定型骨折则情况不同。骨折后 3 天 I 型胶原和 II 型胶原就覆盖在骨膜表面。骨折后 5~7 天起初的纤维基质就被 I 型胶原和 II 型胶原代替。

仅在靠近正常骨质的外周发现 I 型胶原。并且两者在 I 型胶原和 II 型胶原的相对数目上存在较大差异。因为 I 型胶原主要是在愈合早期起作用,故而它的差异可以导致延迟愈合或不愈合。在实验性骨不连模型中,胶原合成延迟至 7 周才达到稳定状态,而骨痂矿化在最初的 3 周后已停止,在第 12 周时仍未发现桥接骨痂;相反,正常的骨痂愈合 3 周时是胶原合成的高峰,此后矿化渐增。在这种实验性骨不连模型中骨折愈合可能是被持续性的不稳定状态抑制或处于可逆状态,从而在第 12 周时骨折处的纤维骨痂组织仍在生成。

3.4 物理机械因素的影响

机械负重可以在各种物理位置影响胶原表型。同样,制动后组织底物本身也可发生变化。这些改变包括新合成胶原数目的减少,而增加了分子间可复位胶原的横向连接。这些不成熟的胶原更易弯曲,其坚硬程度降低。它们以自由方式排列,所以对外力的抵抗力差。这些组织改变与下降的机械性能相关。而由于锻炼所产生的形态学改变不同于制动,它可以使胶原纤维增厚,这些增厚的胶原纤维可以抵抗更强的外力,而胶原的排列也沿着外力的方向,这样也可以抵抗锻炼中过度压力所可能引起的变形。

在骨科手术后,使用外固定所引起的逐渐发生的骨脱位是延长断骨和改正成角畸形的越来越普遍的方法^[17]。Vauhkonen 等^[18]用羊来研究在骨脱位最初 4 周内新合成的骨基质胶原,结果提示脱位骨生成不像骨痂愈合或软骨下骨化,它不经历 I 型胶原产生期或 II 型胶原成分泌期,而仅仅是由 I 型胶原所构成的成熟纤维有机基质合成。

国内,邓廉夫等^[19]用生理性电刺激周围神经,发现早期骨痂内胶原蛋白合成量增加,基质钙化迅速、完全,骨性骨痂发生早,骨转化过程缩短。并据此认为,周围神经功能性电刺激可作为促进骨修复的辅助手段。但未进一步研究胶原蛋白的种类及出现顺序。

3.5 细胞因子对胶原蛋白表达的调控

体外实验发现生长因子可以调节胶原的合成。另外,在骨折愈合部位也发现了许多生长因子。在骨细胞、软骨细胞、软骨内骨及关节软骨中都存在。这种多功能生长因子被认为在调节软骨基质及骨塑形中有重要作用。它可增加成骨细胞中 I 型胶原的合成及人皮肤成纤维细胞中 I 型胶原和上皮角质细胞中 II 型胶原的合成^[17]。关于 TGF- β 1 对软骨中 I 型胶原的调节有不一致的结果。TGF- β 1 可减少新生大鼠长骨中成软骨细胞和胚胎鸡胸骨软骨细胞中 I 型胶原的产生,却增加了兔关节软骨细胞中 I 型胶原的产生^[20]。在牛的骨膜细胞中 TGF- β 1 可增加 I 型胶原的合成,使这些细胞产生了软骨细胞的表型^[21]。

TGF- β 1 的 mRNA 已在骨修复期内增殖间质组织、骨、软骨中发现^[22]。在骨折血肿处细胞和分化的软骨细胞中也有低水平的表达^[22]。TGF- β 1 由血小板和炎症细胞释放后在间质增殖的早期调节骨折愈合^[23]。在整个愈合过程中成骨细胞和软骨细胞合成这种因子,直至编织骨骨塑形期作用才消失^[22,23]。另外,在大鼠和兔骨折处使用 TGF- β 1 已证实可以增加骨痂形成和愈合 6 周时的骨强度^[24]。

其他 2 个在胶原合成中有作用的生长因子是胰岛素样生长因子和 IGF-1^[17]。在骨骼肌肉系统中,胰岛素样生长因子可刺激骨、肌腱和成纤维细胞中的胶原合成;胰岛素样生长因

子可刺激骨细胞中Ⅱ型胶原的合成。应用原位杂交技术, Andrew 等^[22]在人的骨折修复过程中定位了这两种生长因子的 mRNA。胰岛素样生长因子Ⅰ mRNA 早期由内皮细胞和间质细胞在肉芽组织阶段表达。这两种生长因子都可在骨和软骨形成时期在成骨细胞和非肥大软骨细胞中检测到。在编织骨塑形期一些成骨细胞内仍有胰岛素样生长因子Ⅰ的 mRNA。

在骨细胞培养中发现了血小板来源的生长因子(PDGF)也可促进Ⅱ型胶原的合成。在早期骨修复过程中,这种因子存在于靠近骨膜的巨噬细胞中^[25]。在兔骨折愈合的前 4 周应用 PDGF 可以增加骨痂的强度和体积,这在放射影像学上已得到证实。另外,使用这种生长因子也可促进成骨分化。

Longobardi 和 Wallace 等^[26,27]就生长激素(GH)对骨的各种生化标志物及胶原的影响进行了多中心、随机、双盲研究。结果发现在使用生长激素 21 天后骨中Ⅱ型胶原及Ⅰ型胶原和其他一些骨生化标志物皆有所增加,并且这种效应与剂量相关,并有性别差异。

4 小结与展望

虽然 19 种基因不同的胶原已被发现,但就每一种胶原的机械性能尚少见报道。研究已经发现,根据骨承重性质的不同,胶原纤维的物理安排也会发生变化^[17]。胶原纤维的随机排列不能抵御较强的外力;而沿力的方向排列规则的胶原纤维有着更好的生物机械性能。目前,就每一种胶原蛋白的生物物理强度尚不清楚。应用各种类型的胶原抗体进行免疫组化、Northern 分析、原位杂交和进行生物机械研究等才可能研究清每一种胶原的作用及特定的外力条件下诱导何种胶原类型。而只有当以上问题都研究清楚后才有可能控制条件以产生更符合需要的新型胶原。

参考文献

- Burgeson RE, Nimni ME. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. Clin Orthop, 1992, 282:250-272.
- Rehn M, Pihlajaniemi T. Alpha1(Ⅱ), a collagen chain with frequent interruptions in the collagenous sequence, a distinct tissue distribution and homology with type Ⅱ collagen. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(10):4234-4238.
- Cheng DT, Dicesare P, Benya PD, et al. The presence of intermolecular disulfide crosslinks in type Ⅱ collagen. J Biol Chem, 1993, 258(11):7774-7778.
- Mayne R, Brewton RG. New members of the collagen superfamily. Curr Opin Cell Biol, 1993, 5(5):883-890.
- Wang X, Bank RA, Tekoppele JM, et al. Effect of collagen denaturation on the toughness of bone. Clin Orthop, 2000, 371:228-239.
- Alvarez J, Balb M, Santos F, et al. Different bone growth rates are associated with changes in the expression pattern of types Ⅱ and Ⅲ collagens and collagenase 3 in proximal growth plates of the rat tibia. J Bone Miner Res, 2000, 15(1):82-94.
- Martin RB, Ishida J. The relative effects of collagen fiber orientation, porosity, density and mineralization on bone strength. J biomech, 1989, 22(5):419-426.
- Lane JM, Suda M, von der Mark K, et al. Immunofluorescent localization of structural collagen types in endochondral fracture repair. J Orthop Res, 1986, 4(3):318-329.
- Moro L, Romanello M, Favia A, et al. Posttranslational modifications of bone collagen type Ⅱ are related to the function of rat femoral regions. Calcif Tissue Int, 2000, 66(2):151-156.
- Scandberg M, Aro H, Multimaki P, et al. In situ localization of collagen production by chondrocytes and osteoblasts in fracture callus. J Bone Joint Surg (Am), 1989, 71(1):69-77.
- Hiltunen A, Aro HT, Vuorio E. Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. Clin Orthop, 1993, 297:23-27.
- Hiltunen A, Metsaranta M, Virolainen P, et al. Retarded chondrogenesis in transgenic mice with a type Ⅱ collagen defect results in fracture healing abnormalities. Dev Dyn, 1994, 200(4):340-349.
- Macey LR, Kana SM, Jingshi S, et al. Defects of early fracture healing in experimental diabetes. J Bone Joint Surg (Am), 1989, 71(5):722-733.
- Topping RE, Bolander MK, Balian G. Type Ⅱ collagen in fracture callus and the effects of experimental diabetes. Clin Orthop, 1994, 308:220-228.
- Spanheimer RG, Umpierrez GE, Stumpf V. Decreased collagen production in diabetic rats. Diabetes, 1988, 37(4):371-376.
- Roman AH, Brighton CT, Esterhai JL. Pathophysiology of delayed healing. Clin Orthop, 1998, 335s:31-41.
- Liu SH, Yang RS, Shaikh RA, et al. Collagen in tendon, ligament and bone healing. Clin Orthop, 1995, 318:265-278.
- Vauhkonen M, Peltonen J, Karaharju E, et al. Collagen synthesis and mineralization in the early phase of distraction bone healing. Bone Miner, 1990, 10(3):171-181.
- 邓廉夫, 李敬山, 张青, 等. 周围神经功能性电刺激对实验性骨痂中胶原蛋白代谢及基质钙化的影响. 济宁医学院学报, 1997, 20(1):1-4.
- Galera P, Viven D, Pronost S, et al. Transforming growth factor-beta 1 up-regulation of collagen type Ⅱ in primary cultures of rabbit articular chondrocytes involves increased mRNA levels without affecting mRNA stability and procollagen processing. J Cell Physiol, 1992, 153(3):596-606.
- Lzumi T, Scully SP, Heydemann A, et al. Transforming growth factor-1 stimulates type Ⅱ collagen expression in cultured periosteum derived cell. J Bone Miner Res, 1992, 7(1):115-121.
- Andrew JG, Hoyland J, Freemont AJ, et al. Demonstration of TGF-beta1 mRNA by in situ hybridization in normal human fracture healing. Calcif Tissue Int, 1993, 52(2):74-78.
- Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. Proc Soc Exp Biol Med, 1992, 200(2):165-170.
- Nash TJ, Howlett CR, Martin C. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. Bone, 1994, 15(2):203-208.
- Borque WT, Gross M, Hall BK. Expression of four growth factors during fracture repair. Int J Dev Biol, 1993, 37(4):573-579.
- Longobardi S, Keay N, Ehrnborg C, et al. Growth hormone (GH) effects on bone and collagen turnover in healthy adults and its potential as a marker of GH abuse in sports: A double blind, placebo-controlled study. The GH-2000 Study Group. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(4):1505-1512.
- Wallace JD, Cuneo RC, Lundberg PA, et al. Responses of markers of bone and collagen turnover to exercise, growth hormone (GH) administration and GH withdrawal in trained adult males. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(1):124-133.