

水蛭对骨愈合相关基因表达影响

郑军 董福慧 程伟

(中国中医研究院骨伤科研究所, 北京 100700)

【摘要】 目的 通过对骨愈合过程中 I、II、III 型前胶原 mRNA、TGF- β_1 mRNA、BMP-2 mRNA、VEGF mRNA 表达的动态观察, 揭示中药水蛭在此过程中对其的干预作用, 了解水蛭的调节靶点, 为中药基因组学的建构提供理论与实验依据。方法 通过在大鼠胫骨打孔的方法模拟骨 II 期愈合的理想力学环境, 在不同时间点, 采用原位杂交方法检测上述各类 mRNA 的变化。结果 正常组 VEGF mRNA 在各时间点均无显著意义的阳性表达; 模型组在不同时间点的不同细胞中表达强度不同; 水蛭组较模型组有显著变化, 水蛭对不同基因的作用不同, 作用时间点不同、作用强度不同。结论 在促进骨愈合的意义上, 水蛭对 VEGF 基因表达具有有益的调节作用。

【关键词】 骨折愈合; 水蛭; 基因表达

The influence of Hirudo nipponica on related genes expression during bone healing ZHENG Jun, DONG Fuhui, CHENG Wei. Institute of Orthopaedics and Traumatology, China Academy of Traditional Chinese Medicine (Beijing, 100700, China)

【Abstract】 Objective I, II, III procollagen mRNA, TGF- β_1 mRNA, BMP-2 mRNA and VEGF mRNA were observed dynamically during bone healing in order to express the influences of Hirudo nipponica on this process, understand Hirudo nipponica regulation target, and create genetics of the Traditional Chinese Medicine. Methods Single factor interfere model was set up in SD rat. Selecting different time, the in situ hybridization method was adopted to detect the change of above-mentioned all kinds of mRNA. Results I, II, III procollagen mRNA, TGF- β_1 mRNA, BMP-2 mRNA and VEGF mRNA have no remarkable positive expression in normal group; Model group express intensity different in different cell and different time; there is significant difference between Hirudo nipponica group and model group. Hirudo nipponica has different functions acts on different gene, in different function time order and different functional strength. Conclusion The application of Hirudo nipponica during fracture healing can lead to the different genes expression in species, localization, time, level and intensity. In conclusion, the using of Hirudo nipponica should be beneficial to bone repair.

【Key words】 Fracture healing; Leeches; Gene expression

水蛭作为一种活血化瘀药在骨伤科已有广泛应用, 在组织学水平的基础研究也有一些报道。但在分子生物学水平, 人们还所知不多。水蛭在骨愈合过程中是否对其相关基因表达存在调节作用, 调节的时空性、调节水平、强度、机制如何均属未知。通过水蛭对骨愈合过程中 I、II、III 型前胶原 mRNA、TGF- β_1 mRNA、BMP-2 mRNA、VEGF mRNA 表达影响的动态观察, 揭示中药水蛭在此过程中对其的干预作用, 了解水蛭的调节靶点, 为中药基因组学的建构提供理论与实验依据^[1]。

1 材料与方法

基金项目: 国家中医药管理局资助项目(97A205)

1.1 动物模型的建立 见文献[2]。

1.2 药物的制备 所用药材均购于北京同仁堂北城药材批发中心。粉碎后过 120 目筛, 临用时加蒸馏水制成口服液(28 g 生药/100 ml)。低温保存备用, 临用时摇匀。

1.3 模鼠的处理因素及取材 将大鼠随机分为正常组、模型组和骨碎补组 3 组, 每组 50 只鼠。模型组和骨碎补组均按上述模型制作方法打孔, 打孔术后第二天, 骨碎补组开始灌胃给药。用药量根据人体常用剂量(25 g/70 kg), 按人/鼠表面积比率换算等效计量法计算后, 每次 0.56 g/2 ml, 每天 2 次。模型及正常组灌服同等容量、频率的蒸馏水。

分别于术后 4、7、14、21、28 d 无菌条件下取胫

骨,处死。共 5 批,每批 30 只。所取胫骨为整段,以圆孔为中心约 10 mm 长。经生理盐水冲洗后立即置于液氮中暂存。

1.4 杂交切片的制备及原位杂交 用原位杂交的方法^[3-6],杂交液中不加标记探针作为杂交反应的阴性对照,在检测系统中用 PBS 取代地高辛抗体作为检测的阴性对照。染片的细胞中深紫蓝色为阳性表达。每只鼠按对角线选 10 个视窗,计数深紫蓝色斑点。1~5 为 0.5 个计量单位,5~10 为 1 个计量单位,以此类推折算量化(用 SPSS 软件计算),模型组最高值为 2。

1.5 统计学处理 所有数据经 SPSS 软件处理,组间比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组不同时间 TGF-β₁mRNA 的表达比较 见图 1。正常组各时间点均无显著意义的阳性表达。模型组 4 d 时,有较高表达。主要存在于间充质细胞、成纤维细胞及肉芽基质中。7 d 时,较高表达,并在软骨细胞中有表达。14 d 时,TGF-β₁mRNA 表达达到峰值。在成熟的软骨细胞、成骨细胞中均有高表达。21 d 时,主要在新生骨表面成骨细胞中有较高表达,成熟骨质区表达量很低。28 d 时,表达量很低。水蛭组 4 d 时,表达较低。主要存在于肉芽组织基质、间充质细胞、成纤维细胞。7 d 时,较高表达,并在软骨细胞中有表达。14 d 时,TGF-β₁mRNA 表达达到峰值。在成熟的软骨细胞、成骨细胞中均有高表达。21 d 时,主要在新生骨表面成骨细胞中有较高表达,成熟骨质区表达量很低。28 d 时,表达量很低。与模型组比较 2~3 周差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

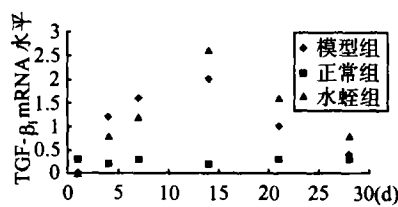


图 1 三组 TGF-β₁mRNA 水平比较

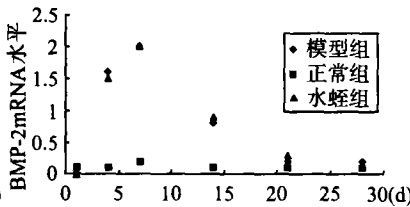


图 2 三组 BMP-2mRNA 水平比较

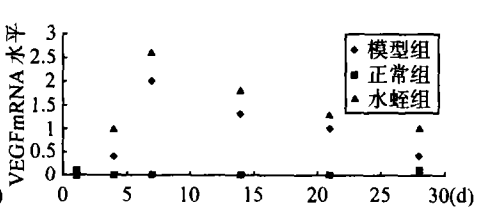


图 3 三组 VEGFmRNA 水平比较

2.4 各组不同时间 I 型前胶原 mRNA 的表达比较 见图 4。正常组各时间点均无显著意义的阳性表达。模型组 4 d 时,低量表达。7 d 时,表达量上升。成骨细胞中有高表达。14 d 时,达到峰值,主要表达于成骨细胞中。21 d 时,几乎维持于峰值水平,表达于成骨细胞中。28 d 时,表达量下降,表达于骨小梁表面

2.2 各组不同时间 BMP-2mRNA 的表达比较 见图 2。正常组各时间点均无显著意义的阳性表达。模型组 4 d 时,达到较高水平,主要存在于间充质细胞。7 d 达到峰值,主要存在于早期的软骨细胞。14 d 时,主要在早期的成骨细胞中有高表达。21 d 时,在成骨细胞中有表达,表达强度已呈下降趋势。28 d 时接近正常组水平。

水蛭组变化趋势同模型组,表达量无明显变化。4 d 时,达到较高水平,主要存在于间充质细胞。7 d,达到峰值,主要存在于早期的软骨细胞。14 d 时,主要在早期的成骨细胞中有高表达。21 d 时,在成骨细胞中有表达,表达强度已呈下降趋势。28 d 时,水平很低。与模型组比较各时间段差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组不同时间 VEGFmRNA 的表达比较 见图 3。正常组各时间点均无显著意义的阳性表达。模型组 4 d 时,表达于间充质细胞、成纤维细胞,表达强度较弱。7 d 时,达到峰值,于软骨细胞、早期的成骨细胞中有高表达。14 d 时,在血管内皮细胞、成熟及肥大的软骨细胞、成骨细胞均有较高程度表达。21 d 时,主要在成骨细胞、血管内皮细胞中有表达。28 d 时,在成骨细胞中仍有表达。

水蛭组表达水平始终高于模型组。4 d 时,表达于间充质细胞、成纤维细胞,表达强度相对较高。7 d 时,达到峰值,于软骨细胞、早期的成骨细胞中有高表达。14 d 时,在血管内皮细胞、成熟及肥大的软骨细胞、成骨细胞均有高程度表达。21 d 时,主要在成骨细胞、血管内皮细胞中有表达。28 d 时,在成骨细胞中有表达。与模型组比较全过程差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

成骨细胞中。水蛭组 4 d 时,达到峰值,但表达水平低于模型组。表达于间充质细胞、成纤维细胞。7 d 时,表达量已明显下降。14、21 d 时表达量极低。28 d 时,未检测到。与模型组比较全过程差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

2.5 各组不同时间 II 型前胶原 mRNA 的表达比较 见图 5。正常组各时间点均无显著意义的阳性表达。模型组 4 d 时,中等强度,表达于软骨细胞中。7 d 时,达到峰值,表达于成熟软骨细胞中。14 d 时,表达强度下降,但在成骨细胞中有表达。21 d 时,表达量极低。28 d 时,几乎探测不到。

水蛭组 4 d 时,中等强度,表达于软骨细胞中。7 d 时,达到峰值,表达于成熟软骨细胞中。14 d 时,表达强度下降程度高于模型组,但在成骨细胞中有表达。21 d 时,表达量极低。28 d 时,几乎探测不到。与模型组比较各时间段差异无显著性意义 ($P>0.05$)。

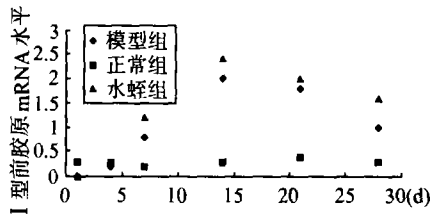


图 4 三组 I 型前胶原 mRNA 水平比较

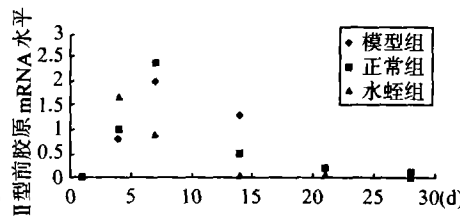


图 5 三组 II 型前胶原 mRNA 水平比较

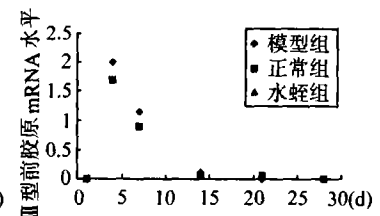


图 6 三组 III 型前胶原 mRNA 水平比较

2.6 各组不同时间 III 型前胶原 mRNA 的表达比较 见图 6。正常组各时间点均无显著意义的阳性表达。模型组 4 d 时,达到峰值,表达于间充质细胞、成纤维细胞。7 d 时,表达量已明显下降。14、21 d 时表达量极低。28 d 时,未探测到。

水蛭组中、后期表达量明显高于模型组。4 d 时,低量表达。7 d 时,表达量上升。成骨细胞中有高表达。14 d 时,达到峰值,主要表达于成骨细胞中。21 d 时,几乎维持于峰值水平,表达于成骨细胞中。28 d 时,表达量下降,表达于骨小梁表面成骨细胞中。与模型组比较 2~4 周差异有显著性意义 ($P<0.05$)。

3 讨论

水蛭为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* (Whitman)、水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman、柳叶蚂蟥 *W. acranulata* Whitman 的干燥体。味咸、苦,性平,有毒,归肝经。功效为破血,逐瘀,通经。主治癥瘕痞块,血瘀经闭,跌打损伤。其成分主要含有 17 种氨基酸,氨基酸总含量占干重的 49% 以上,还含有蛋白质、肝素、抗凝血素;新鲜水蛭唾液中含水蛭素。此外还含有钠、钾、钙、镁、锰、锌等元素。

本实验表明,在骨折 4 d 时, $TGF-\beta_1$ mRNA 的表达量低于模型组,由于骨折早期 $TGF-\beta_1$ 主要源于血小板,因而水蛭在骨折早期减小了血小板的凝集;而 III 型前胶原 mRNA 表达量亦相应下降,这些从一个侧面说明炎症反应程度降低,血肿量下降。在骨折 14 d 时 $TGF-\beta_1$ mRNA 的表达量开始高于模型组,而 VEGF mRNA 始终高于模型组,说明水蛭在骨折中、后期促进了血管生成,加速了爬行替代过程,促进骨愈合。而水蛭对血管通透性的影响有必要做进一步的研究。实验中 II 型前胶原 mRNA 在达到峰值之后,迅速下降; I 型前胶原 mRNA 表达水平显著上升。I 及 II 型前胶原的 mRNA 表达量的变化特征

支持此点推论。BMP-2 mRNA 的表达量在骨修复期与模型组相比无明显变化,提示水蛭无促进间充质细胞分化的作用。本实验结果显示,骨损伤后的血肿量并不影响骨愈合的速度。由此推论,血肿的形成仅仅是骨损伤后的必然反应。

结论:水蛭通过在骨折早期降低炎症反应程度,在骨折中、后期促进了血管生成而加速骨愈合。血肿的形成仅仅是骨损伤后的必然反应。

参考文献

- 董福慧,郑军. 在人类基因组学基础上建构骨折治疗的基因中药谱系的设想. 中医正骨, 2000, 12(2): 45-46.
- 郑军,董福慧. 骨内膜成骨的动物模型. 中国骨伤, 2000, 13(2): 522-523.
- Brunner G, Nguyen HM, Gabrilove J, et al. Basic fibroblast growth factor expression in human bone marrow and peripheral blood cell. Blood, 1993, 3: 631-638.
- Beck LS, DeGuzman L, Lee WP, et al. $TGF-\beta_1$ induces bone closure of skull defects. J Bone Miner Res, 1991, 6: 1257-1265.
- Bonewald LF, Dallas SL. Role of active and latent transforming growth factor β in bone formation. J Cell Biochem, 1994, 55: 350-357.
- Bostrom MPG, Lane JM, Berberian WS, et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. J Orthop Res, 1995, 13: 357-361.

(收稿:2003-01-13 修回:2003-03-31 编辑:李为农)