

骨 科 学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002202

骨不连微环境中骨形态发生蛋白-9 与表皮生长因子受体表达变化的初步研究

周 尹, 王 霞, 张 润, 李 明, 刘 星

(重庆医科大学附属儿童医院干细胞实验室、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、
儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地、儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

【摘要】目的:研究骨不连微环境下局部组织中骨形态发生蛋白-9(bone morphogenetic protein-9, BMP9)与表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的表达及成骨细胞与破骨细胞数量的变化,为骨不连的病因与治疗提供依据。**方法:**选取 12 只健康的 3 月龄新西兰大白兔为实验组构建骨不连动物模型,同时选取 6 只同龄同种健康兔为对照组,以 X 射线检查验证造模是否成功,以 Western blot、免疫组织化学检测局部组织中 BMP9 与 EGFR 表达量的变化,以苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate acid resistance, TRAP)染色观察局部组织中成骨细胞与破骨细胞数量。**结果:**X 射线检查结果提示骨不连动物模型构建成功,Western blot 和免疫组织化学结果提示骨折愈合后期 BMP9 与 EGFR 表达量较骨折愈合早期明显降低,且骨不连微环境中 BMP9 表达量较对照组明显降低,但 EGFR 表达量较对照组差异不明显;HE 染色和 TRAP 染色结果提示骨折愈合后期成骨细胞数量较骨折愈合早期明显减少,且骨不连微环境中成骨细胞数量较对照组减少更明显,但实验组与对照组破骨细胞数量在骨折早期、后期均无明显差异。**结论:**骨不连可能与局部组织中 BMP9、EGFR 表达量降低及成骨细胞的数量减少有关。

【关键词】骨形态发生蛋白-9;表皮生长因子受体;骨不连;成骨细胞;破骨细胞

【中图分类号】R322.7¹

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-12-17

A preliminary study of the expression of bone morphogenetic protein 9 and epidermal growth factor receptor in the nonunion microenvironment

Zhou Yin, Wang Xia, Zhang Run, Li Ming, Liu Xing

(Stem Cell Laboratory, Children's Hospital of Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; China International Science and Technology Cooperation Base of Child development and Critical Disorders; Chongqing Key Laboratory of Pediatrics)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and epidermal growth factor receptor (EGFR) and the number of osteoblasts and osteoclasts in local tissues in the nonunion microenvironment, and to provide a basis for the etiology and treatment of nonunion. **Methods:** Twelve 3-month-old healthy New Zealand white rabbits were selected as experimental group to develop an animal model of nonunion and six healthy New Zealand white rabbits of the same age were selected as control group. X-ray examination was used to verify the success of modeling. Western blot and immunohistochemistry were used to determine the expression of BMP9 and EGFR in local tissues. Hematoxylin-eosin (HE) staining and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining were used to count osteoblasts and osteoclasts. **Results:** X-ray examination indicated that the animal model of nonunion was successfully developed. Western blot and immunohistochemistry showed that the expression of BMP9 and EGFR was significantly reduced from the early stage to the late stage of fracture healing; the expression of BMP9 in the nonunion microenvironment was significantly lower than that of the control group, while the expression of EGFR was not significantly different from that of the control group. HE staining and TRAP staining showed that the number of osteoblasts was significantly reduced from the early stage to the late stage of fracture healing, and the decrease in osteoblasts in the nonunion microenvironment was greater than that in the control group; however, there was no significant difference in the number of osteoclasts between the experimental group and the

control group in both early and late stages of fracture healing.

Conclusion: The development of bone nonunion may be associated with decreased expression of BMP9 and EGFR and number of osteoblasts in local tissues.

【Key words】bone morphogenetic protein 9; epidermal growth factor receptor; nonunion; osteoblast; osteoclast

作者介绍:周 尹, Email: 294305239@qq.com,

研究方向: 小儿骨科及成骨因子的研究。

通信作者:刘 星, Email: liuxingda@126.com。

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(编号: csc2018jcyjAX0259)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190614.1552.004.html>

(2019-06-17)

骨折是骨科的一种常见疾病,尽管大多数骨折能够被治愈,但其中仍有 5%~10%最后发展为骨不连^[1-2]。近年来组织工程技术的发展为解决传统治疗骨不连的骨再生效率低下、骨形成缓慢等技术难点提供了一种有效解决途径。其中寻找更有效促进和调控间充质干细胞等种子细胞定向成骨分化的细胞因子是目前骨再生组织工程技术的关键和研究热点。

骨形态发生蛋白-9(bone morphogenetic protein-9, BMP9)亦被称为生长分化因子-2(growth differentiation factor-2, GDF2)最早在胚鼠肝脏中发现。BMP9 是一种具有极强成骨诱导作用的骨形态发生蛋白^[3]。既往研究显示 BMP9 具有极强的诱导成骨细胞、成骨前体细胞和其他定向分化的干细胞向成骨分化的能力^[4-5]。

表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)是一种重要的细胞增殖调控蛋白,通过结合其受体发挥多种生物学效应,其中识别 EGF 的主要受体是表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)。有研究发现抑制 EGFR 信号传导可以抑制成骨细胞和破骨细胞的增殖^[6]。而课题组前期实验发现 EGFR 抑制剂可明显抑制 BMP9 诱导间充质干细胞的成骨分化作用^[7]。

本研究拟通过构建骨不连动物模型,检测骨不连部位 BMP9 与 EGFR 的表达情况及局部组织中成骨细胞、破骨细胞数量的变化情况,并对骨不连的病因进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试剂 一抗 EGFR 抗体购自万类生物公司, BMP9 抗体购自碧云天公司, 二步法免疫组织化学检测试剂盒购自碧云天公司, TRAP 染色试剂盒购自凯基生物公司, 脱钙液购自凯基生物公司, Western blot 蛋白提取试剂盒购自碧云天公司。其他所有试剂产品均为进口分装或国产。

1.1.2 实验动物 3 月龄左右雄性新西兰大白兔均购自重庆医科大学动物实验中心。

1.2 实验方法

1.2.1 骨不连动物模型构建 选取 3 月龄雄性新西兰大白兔(2.8~3.2 kg)18 只分为以下 2 组:实验组 12 只,对照组 6 只;在造模 2 周和 8 周时分别处理 2 组动物。先使用 3%戊巴比妥钠按 3 mL/kg 腹腔注射进行麻醉,术中视麻醉效果进行一定补充。麻醉后,取右侧卧位,剔除左前臂兔毛,常规碘伏消毒,铺无菌巾,依次切开皮肤、皮下组织,钝性分离桡骨表

面覆盖肌肉及肌腱组织,充分暴露中段桡骨。实验组在桡骨中段用消毒钢尺测量 2 cm 拟截骨长度并做标记,用电锯将量好的桡骨节段性截除,不保留骨膜,最终造成 2 cm 的骨大段缺损模型^[8]。对照组在桡骨中段截断桡骨后对齐断端后逐层缝合。术中 2 组均保护好尺骨,未做内外固定,术后均给予青霉素 80 万单位肌注,1 次/d,持续 3 d,预防感染。造模术中动物死亡共 3 只,术后感染死亡 1 只,均已及时补充。造模后动物生长发育正常,2 组体质量未见明显差异。

1.2.2 X 射线检查 分别于术后 2 周、8 周时取造模动物进行 X 射线检查。检查前使用 10%水合氯醛按 3 mL/kg 腹腔注射进行镇静,取右侧卧位拍摄左前臂平片,观察不同时间实验组与对照组骨愈合情况,并按照 Lane-Sandhu X 线评分标准对各组骨缺损的愈合情况进行二维放射学评分。

1.2.3 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色 分别于 2 周、8 周时将造模动物使用空气栓塞法处死后取材,取材为骨折断端及新生骨痂组织。将所取组织 1 份于液氮保存,1 份于 10%福尔马林中固定保存。取福尔马林固定组织脱钙完全后脱水包埋,以 4 μ m 厚度切片。将石蜡切片于二甲苯脱蜡后梯度乙醇脱水,经苏木精、伊红染色后使用中性树脂封片,显微镜下观察组织情况。

1.2.4 抗酒石酸酸性磷酸酶染色 将各时间点实验组与对照组石蜡切片按抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate acid resistance, TRAP)染色实验步骤进行染色,染色完毕后中性树脂封片,显微镜下观察实验结果,其中红褐色颗粒样为阳性表达。

1.2.5 免疫组织化学检测 将各时间点实验组与对照组石蜡切片于二甲苯脱蜡后梯度乙醇脱水,按二步法免疫组织化学检测试剂盒说明书步骤进行处理,一抗分别使用 BMP9 和 EGFR 抗兔抗体,空白对照组使用磷酸盐缓冲液 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。实验完毕后中性树脂封片,显微镜下观察实验结果,胞质胞浆内被染深褐色即为阳性表达。

1.2.6 Western blot 印迹检测 分别于 2 周和 8 周时将造模动物使用空气栓塞法处死后取材,取材为骨折断端及新生骨痂组织(保存于液氮)。将所取材料按 Western blot 蛋白提取试剂盒说明书步骤提取组织蛋白,采用 BCA 法检测蛋白浓度并调整蛋白浓度为 3 mg/mL。将蛋白电泳转膜封闭后先后加入特异性一抗与相应二抗,检测组织中 BMP9 与 EGFR 表达量。Image J 图像软件分析结果。

1.3 统计学处理

数据均使用 SPSS 20.0 软件包进行处理。Lane - Sandhu X 线评分结果为等级资料,采用 $M(Q_1, Q_3)$ 描述,使用曼惠特尼秩和检验进行分析;Western blot 结果为计量资料,采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用独立样本 t 检验进行分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 术后 X 射线检查结果

术后 2 周时实验组骨缺损处有少量高密度影,考虑为早期少量骨痂形成,密度明显低于正常骨质,骨缺损间隙清晰;

对照组骨折处明显可见较丰富骨痂影,密度明显低于正常骨质,骨折线清晰。术后 8 周时实验组骨缺损处可见少量骨痂,不连续,断端较尖锐、硬化,骨髓腔变小甚至封闭,骨缺损区清晰可见,呈骨不连状态;对照组骨折处可见骨痂,骨折线基本消失,骨折基本愈合(图 1)。对 X 射线平片的 Lane-Sandhu 评分结果进行比较发现实验组与对照组在 2 周时评分结果无明显统计学差异($Z=-1.069, P=0.285$),在 8 周时实验组评分结果低于对照组且差异有统计学意义($Z=-2.343, P=0.019$),提示实验组出现骨不连(表 1)。

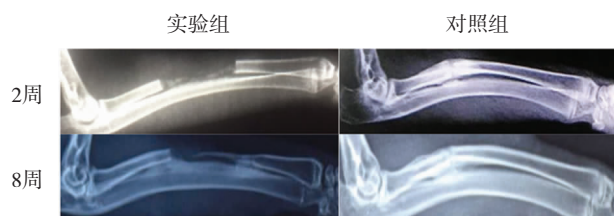


图 1 术后各时间点 X 射线平片结果

表 1 X 线片的 Lane-Sandhu 评分比较

组别	2周	8周
实验组 ($n=6$)	1.00 (0.00, 1.00)	4.50 (1.50, 5.75)
对照组 ($n=3$)	1.00 (1.00, 1.00)	12.00 (10.00, 12.00)
Z 值	-1.069	-2.343
P 值	0.285	0.019

2.2 HE 染色结果

术后 2 周实验组与对照组切片均可见大量骨吸收陷窝,骨细胞、骨质边缘可见大量成骨细胞,提示成骨活动活跃。术后 8 周实验组与对照组切片视野内骨吸收陷窝、骨细胞数及成骨细胞数量较 2 周时明显减少,其中实验组成骨细胞数量减少较对照组更明显(图 2)。HE 染色结果与 X 射线结果相符合,提示 2 周时实验组与对照组的成骨活动均活跃,未见明显差异,而 8 周时实验组与对照组成骨活动均减弱,其中实验组成骨活动较对照组更差。

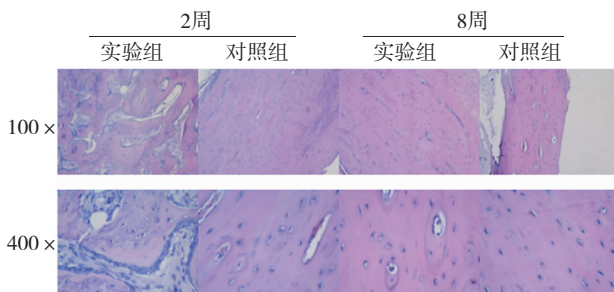


图 2 术后各时间点 HE 染色结果

2.3 TRAP 染色结果

术后 2 周实验组与对照组切片中均可见少量破骨细胞的阳性表达,400 倍镜下每 10 个视野中可见 3~5 个破骨细胞,实验组与对照组破骨细胞数量未见明显差异。而术后 8 周时实验组与对照组切片视野中均未见破骨细胞(图 3)。

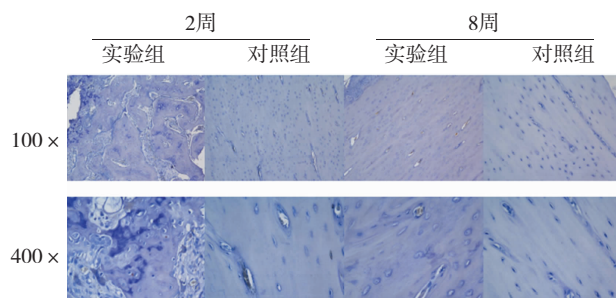


图 3 术后各时间点 TRAP 染色结果

2.4 免疫组织化学检测结果

术后 2 周实验组与对照组 BMP9 与 EGFR 表达量均高于 8 周组。术后 2 周实验组 BMP9 表达量明显低于对照组,而 8 周时实验组 BMP9 表达量与对照组之间无统计学差异(图 4)。术后 2 周和 8 周实验组 EGFR 表达量与对照组之间无统计学差异(图 5)。空白对照组术后高倍 2 周时和 8 周时高倍视野下可见零星类似阳性表达的深染组织,胞质内未见明显的阳性表达(图 6)。

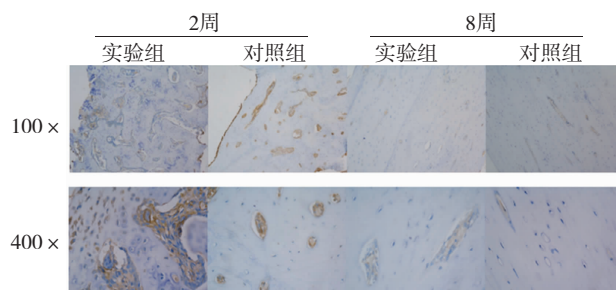


图 4 术后各时间点 BMP9 免疫组化结果

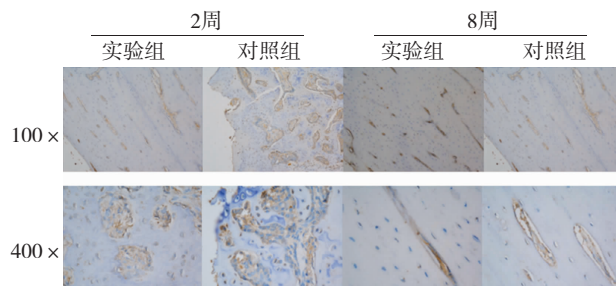


图 5 术后各时间点 EGFR 免疫组化结果

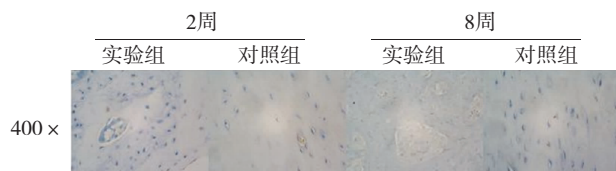


图 6 术后各时间点空白对照组免疫组化结果

2.5 Western blot 结果

以 GAPDH 作为内参,2 周实验组、2 周对照组、8 周实验组、8 周对照组 BMP9 蛋白表达量分别为: 1.261 ± 0.088 、 0.099 ± 0.050 、 0.254 ± 0.014 、 0.166 ± 0.014 ;其 EGFR 蛋白表达量分别为: 0.578 ± 0.029 、 0.653 ± 0.042 、 0.274 ± 0.004 、 0.298 ± 0.022 。2 周时实验组与对照组 BMP9 及 EGFR 表达量均明显

高于 8 周组。2 周时实验组 BMP9 表达量明显低于对照组($t=3.651, P=0.022$), 8 周时实验组 BMP9 表达量明显低于对照组($t=6.201, P=0.003$)。如图 7、图 8 所示。这提示实验组的骨折延迟愈合可能与 BMP9 表达量的降低有关。2 周时实验组 EGFR 的表达量高于对照组($P=0.037$), 8 周时实验组与对照组表达量无统计学差异。如图 9、图 10 所示。

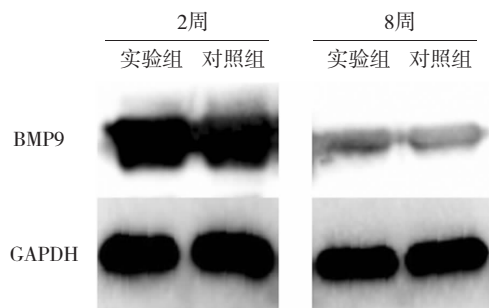
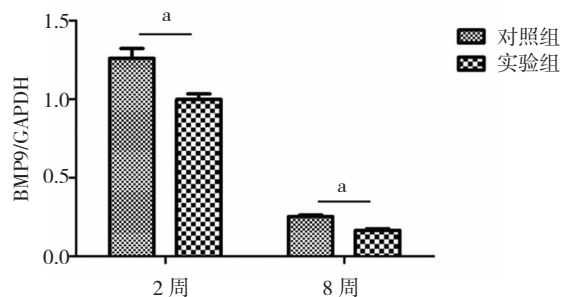


图 7 术后各时间点 BMP9 的 Western blot 结果



注:a, 2 组间结果存在统计学差异

图 8 BMP9 的 Western blot 结果的灰度值分析

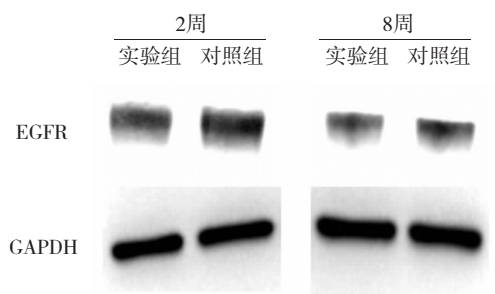
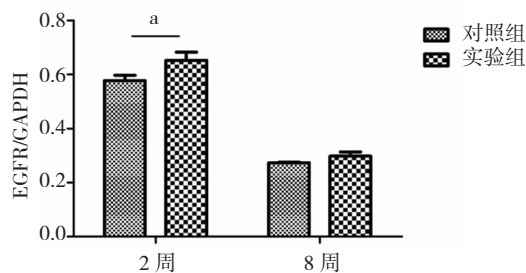


图 9 术后各时间点 EGFR 的 Western blot 结果



注:a, 2 组间结果存在统计学差异

图 10 EGFR 的 Western blot 结果的灰度值分析

3 讨论

随着社会的发展与经济的进步,高能量损伤颇为常见,导致创伤骨折越来越多。然而骨折愈合是个非常复杂的骨再生过程,其影响因素众多^[9],各种原因导致的骨不连常有发生。人们一直在寻找能增强骨折处成骨而提高骨不连治愈率的最佳方法,而目前越来越多的学者建议遵循骨折愈合的“钻石法则”来治疗骨不连^[10],此原则强调生物及力学环境对骨折愈合的影响,认为骨折的愈合需具备“钻石法则”的 4 个基本条件:适宜的细胞(主要是成骨细胞)环境;足够数量的生长因子;充足的骨基质(骨传导作用);稳定的力学环境。缺少其中的一个或者是几个条件,就可能会有 5%~30% 的患者发生骨不连或是骨折延迟愈合^[11]。

骨折的愈合是一个动态演变过程。在骨折愈合的不同阶段有不同的细胞参与,这对骨折的愈合起着非常重要的调控作用,影响着骨折的整个修复过程,从而决定着骨折愈合的速度与质量。骨折愈合过程需要骨髓间充质干细胞、软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞等相互协调,促进骨再生与重塑^[12]。本研究发现在骨折早期局部组织中成骨细胞数量明显高于骨折后期,且在骨折后期实验组成骨细胞数量低于对照组,而破骨细胞数量未见明显差异。这些结果提示骨不连的发生可能与成骨细胞的关系更为密切。

迄今为止,人们已经在骨折部位发现多种促进骨折愈合的物质,发挥着调节细胞增殖、分化和基质的合成、钙化等作用^[9, 13]。其中骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是研究得最早和最具潜力的促进间充质干细胞成骨分化的细胞因子,属转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF β)超家族的成员之一,目前共分离和鉴定了超过 22 种 BMPs,它们不但与骨、软骨的形成有关,而且与器官形成、肌肉发育、铁代谢及肿瘤发生有关^[14]。BMP9 已被证明是最具成骨性的 BMP 之一,且可通过多种细胞信号通路在成骨过程中起到重要作用^[15],研究证明 BMP9 可显著增加干细胞中早期和晚期成骨标志物的表达^[16-17],在小鼠骨缺损模型中配合移植材料可显著促进骨折愈合^[10]。本研究免疫组化结果与 Western blot 结果均提示骨折早期局

部组织中 BMP9 表达量高于骨折后期,而在骨折早期与后期中,Western blot 结果证实对照组 BMP9 表达量均明显高于实验组,这些结果提示骨不连的发生可能与局部组织中 BMP9 表达量降低有关。

有研究表明 EGFR 信号通路是主要调节骨代谢的信号通路之一,调节成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞的增殖、分化^[18]。目前各种 EGFR 抑制剂常被用于临床或临床前期的抗癌治疗研究中,有研究发现 EGFR 抑制剂的使用会影响癌症患者的骨密度,从而导致病理骨折,而且使用这些抑制剂治疗骨转移可能会加重溶骨损伤^[19]。有文献提示 EGFR 及其信号通路对骨折愈合过程中破骨细胞的增殖、分化等都有重要的生物学作用^[12],而破骨细胞在骨质吸收与骨痂塑性改造中起到关键作用。本研究免疫组化结果与 Western blot 结果均提示骨折早期局部组织中 EGFR 表达量高于骨折后期,这可能与骨折早期的骨痂吸收与重塑活动活跃有关;而在骨折后期时对照组与骨不连组 EGFR 表达量无统计学差异,这与切片染色所见破骨细胞的结果一致。

本研究通过构建骨不连动物模型证实了骨不连可能与局部组织中 BMP9、EGFR 表达量降低有关。相较于破骨细胞,成骨细胞在骨不连的发生中可能起到更为关键的作用,破骨细胞数量变化受到 EGFR 一定程度的调控。

因此,下一步深入研究成骨因子 BMP9 与 EGFR 在骨不连中的相互作用及 EGFR 对破骨细胞影响的分子机制可能有助于对骨不连的病因探究,从而为骨组织工程的发展和临床治疗骨不连等提供实验数据和理论依据。

参 考 文 献

- [1] Sarmiento A, Burkhalter WE, Latta LL. Functional bracing in the treatment of delayed union and nonunion of the tibia[J]. *International Orthopaedics*, 2003, 27(1): 26-29.
- [2] Shroeder JE, Mosheiff R, Khoury A, et al. The outcome of closed, intramedullary exchange nailing with reamed insertion in the treatment of femoral shaft nonunions[J]. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 2009, 23(9): 653-657.
- [3] Beederman M, Lamplot JD, Nan G, et al. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation[J]. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 2013, 6(8): 32-52.
- [4] Hu N, Jiang D, Huang E, et al. BMP9-regulated angiogenic signaling plays an important role in the osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells[J]. *Journal of Cell Science*, 2013, 126(Pt2): 532-541.
- [5] Wang J, Zhang H, Zhang W, et al. Bone morphogenetic protein-9 effectively induces osteo/odontoblastic differentiation of the reversibly immortalized stem cells of dental apical papilla[J]. *Stem Cells and Development*, 2014, 23(12): 1405-1416.
- [6] 王珂. 表皮生长因子受体的敲除对软骨内骨化的影响及其分子机制的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2008: 62-73.
- [7] Liu X, Qin J, Luo Q, et al. Cross-talk between EGF and BMP9 signalling pathways regulates the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Journal of Cellular & Molecular Medicine*, 2013, 17(9): 1160-1172.
- [8] Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions[J]. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 1986(205): 299-308.
- [9] Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing[J]. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1998(355S): 7-21.
- [10] Ollivier M, Gay AM, Cerlier A, et al. Can we achieve bone healing using the diamond concept without bone grafting for recalcitrant tibial nonunions[J]. *Injury*, 2015, 46(7): 1383-1388.
- [11] Guimarães JA, Duarte ME, Fernandes MB, et al. The effect of autologous concentrated bone-marrow grafting on the healing of femoral shaft non-unions after locked intramedullary nailing[J]. *Injury*, 2014, 45(S5): 7-13.
- [12] 袁功武, 兰生辉, 刘曦明. 表皮生长因子受体信号通路对骨折愈合的生物学作用[J]. *中国矫形外科杂志*, 2018, 26(4): 328-332.
- [13] Einhorn TA. New technologies for the enhancement of skeletal repair: challenges and opportunities[J]. *Indian Journal of Orthopaedics*, 2011, 45(6): 489-491.
- [14] Brazil DP, Church RH, Suras S, et al. BMP signalling: agony and antagonism in the family[J]. *Trends in Cell Biology*, 2015, 25(5): 249-264.
- [15] Lamplot JD, Qin J, Nan G, et al. BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis[J]. *American Journal of Stem Cells*, 2013, 2(1): 1-21.
- [16] Kang Q, Sun MH, Cheng H, et al. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery[J]. *Gene Therapy*, 2004, 11(17): 1312-1320.
- [17] Cheng H, Jiang W, Phillips FM, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs)[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2003, 85(8): 1544-1552.
- [18] Schneider MR, Sibilia M, Erben RG. The EGFR network in bone biology and pathology[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2009, 20(10): 517-524.
- [19] Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2012, 12(8): 553-563.

(责任编辑: 冉明会)