

下颌骨骨痂组织中 TGF- β_1 及 BMP-2 的表达及意义*

张雨洋¹ 蒋练¹ 满城¹ 张隆庆¹ 向晓波¹

[摘要] 目的:观察转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、骨形成蛋白-2(BMP-2)在人类下颌骨骨折骨痂组织中的表达及量的变化。方法:在下颌骨骨折的手术患者中,收集术中去除的骨断端间骨痂组织 30 例,以 2 例方颌畸形患者术中切取的下颌角骨块作正常对照;利用 SABC 免疫组织化学方法检测骨折后不同时期骨痂组织及正常下颌角骨组织中 TGF- β_1 、BMP-2 的表达。结果:TGF- β_1 、BMP-2 在正常骨组织中没有表达;在不同时期骨痂组织中均有表达,TGF- β_1 在骨折后第 1 周到第 3 周表达量缓慢增加,至第 3 周时达到高峰,随着时间推移,表达量逐渐下降;BMP-2 在骨折后前 2 周表达呈增加趋势,第 2 周达到高峰,以后随时间推移,表达量缓慢下降。结论:①BMP-2 可能是启动骨折修复的因子之一;②TGF- β_1 可能是骨折修复的另一条信号通路;③BMP-2 与 TGF- β_1 在骨折愈合过程中可能存在协同作用。

[关键词] 下颌骨骨折;免疫组织化学;转化生长因子 β_1 ;骨形态发生蛋白-2

[中图分类号] R683 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-1781(2013)24-1369-03

Expression and significance of TGF- β_1 and BMP-2 in mandibular callus

ZHANG Yuyang JIANG Lian MAN Cheng ZHANG Longqing XIANG Xiaobo

(Oral Surgery of Stomatological Hospital Affiliated Zunyi Medical College, Zunyi, 473000, China)

Corresponding author: JIANG Lian, E-mail: jianglian1964@163.com

Abstract Objective: To investigate the expressions of transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in human mandible fracture callus and their quantity changes in the process of healing. **Method:** Thirty callus samples from the fractured mandible bone stumps were collected during operation, and two callus samples were collected from the angle-square jaw patients as controls. The expressions of TGF- β_1 and BMP-2 were test by the immunohistochemistry technic-SABC-staining in different periods of human fractured mandibular callus and in osseous tissue of normal angle of mandible. **Result:** The TGF- β_1 and BMP-2 were expressed in callus of different periods but not in normal bone tissue. The expression of TGF- β_1 increased slowly during the first three weeks after fracture and reached its maximum in the third week, and then weakened gradually. The expression of BMP-2 increased gradually during the first two weeks after fracture and reached its maximum in the second week, then the expression weakened gradually. **Conclusion:** ①BMP-2 may be one of the factors promoting the repair of fracture. ②TGF- β_1 could be another signal pathway in repairment of fracture. ③There could exist some synergistic effects between TGF- β_1 and BMP-2 in the process of fracture healing.

Key words fracture of mandible; immunohistochemistry; transforming growth factor β_1 ; bone morphogenetic protein 2

* 基金项目:贵州省科技厅资助项目(No:黔科合J字 LKZ[2010]03 号)

¹ 遵义医学院附属口腔医院口腔外科(贵州遵义,473000)

通信作者:蒋练, E-mail: jianglian1964@163.com

- 21(15):688-691.
- [12] CORTESINA G, DESTEFANI A, CAVALOT A, et al. Current role of radiotherapy in the treatment of locally advanced laryngeal carcinomas[J]. J Surg Oncol, 2000, 74:79-82.
- [13] 赵根运. 喉癌术前放疗加手术与单纯手术疗效比较(140 例前瞻性研究)[J]. 中国社区医师杂志, 2010, 12(16):57-58.
- [14] 于文斌, 曾宗渊, 陈福进, 等. IV 期声门上型喉癌的治疗与预后[J]. 实用癌症杂志, 2005, 20(4):386-389.
- [15] SPECTOR G J, SESSIONS D G, LENOX J, et al. Management of stage, glottic carcinoma; therapeutic outcomes[J]. Laryngoscope, 2004, 114:1438-1446.
- [16] SPECTOR G J, SESSIONS D G, LENOX J, et al. Management of T3N1 glottic carcinoma; therapeutic outcomes[J]. Laryngoscope, 2006, 116:106-110.
- [17] SPECTOR G J, LENOX J, SESSIONS D G, et al. Management of T3N0M0 glottic carcinoma; therapeutic outcomes[J]. Laryngoscope, 2002, 112(7 Pt 1):1281-1288.

(收稿日期:2013-07-10)

在骨折愈合的研究中,生长因子对愈合过程的影响逐渐受到重视,并已取得很大的进展,TGF- β 对骨的吸收和形成具有重要的调节和偶联作用^[1],许多动物实验证实骨形成蛋白(BMP)对骨折的愈合具有促进作用^[2]。目前多采用动物长骨模型对骨折愈合进行研究^[3],本实验利用 SABC 免疫组织化学方法,半定量检测转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、BMP-2 在人下颌骨骨折骨痂中的表达及分布,初步探讨内源性 TGF- β_1 、BMP-2 促进颌骨骨折愈合的作用机制,为外源性 TGF- β_1 、BMP-2 的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 人下颌骨骨折骨痂标本取材与处理

2010-09—2011-05 就诊于遵义医学院附属口腔医院口腔颌面外科的骨折患者,年龄 20~45 岁,经 X 线确定骨折部位,排除脑外伤,无营养不良、糖尿病及骨质疏松等全身性疾病,骨折局部无明显化脓感染。行手术治疗时,收集术中去除的骨断端间骨痂共 30 例,取材部位及伤后时间详见表 1,以 2 例方颌畸形患者术中切取的下颌角骨块作正常对照。标本取材后,用 PBS 溶液浸泡 10 min,立即置于 4%多聚甲醛溶液中,4℃下固定 12 h^[4],用 10% EDTA 脱钙,制成石蜡标本,制备 4 μ m 石蜡切片,每例标本制备苏木精-伊红染色切片及免疫组织化学染色切片。

表 1 取材部位及取材时间点

	牙槽骨	颞部	下颌角	下颌体部	总计
第 1 周	1	8	1	—	10
第 2 周	1	5	3	3	12
第 3 周	1	1	—	3	5
第 4 周	—	—	1	2	3
总计	3	14	5	8	30

1.2 主要试剂

BMP-2 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);TGF- β_1 多克隆抗体(武汉博士德生物材料公司);SABC 免疫组织化学试剂盒(武汉博士德生物材料公司);多聚甲醛缓冲液及 10% EDTA 溶液由我院病理科配制。

1.3 免疫组织化学实验方法

染色采用常规 SABC 染色方法^[5]:①石蜡切片常规脱蜡,至水;②3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性;③用枸橼酸盐溶液微波修复;④正常山羊血清封闭;⑤分别滴加兔抗 TGF- β_1 、BMP-2 抗体作一抗,抗体稀释度为 1:100,4℃冰箱中孵育过夜;⑥滴加羊抗人 IgG;⑦滴加 SABC 溶液;⑧镜下控制 DAB 显色;⑨苏木精复染,盐酸乙醇分化;

⑩常规脱水,透明,封片,光镜下观察,照相,存盘。PBS 代替一抗作为阴性对照。

2 结果

在骨折后第 1 周,骨折断端局部血肿丰富,含有大量的炎症细胞、血细胞、成纤维细胞及周围疏松的结缔组织。TGF- β_1 在成纤维细胞、未分化间充质中有弱阳性表达;BMP-2 在未分化间充质细胞及血管周围细胞有明显阳性表达(图 1),在细胞外基质中弱阳性表达。

骨折后第 2 周,骨痂组织中以纤维成分和血管较多,含有较多的成骨细胞、软骨细胞和少量小骨质团块。阳性细胞表达率及表达强度均明显增加,TGF- β_1 在成骨细胞强阳性表达(图 2);BMP-2 在新形成的小骨质团块周围的成骨细胞以及骨断端骨细胞呈强阳性着色。

骨折后第 3 周,成骨细胞形成的骨质呈团块样,可见大量新骨形成。TGF- β_1 在成骨细胞中仍呈强阳性表达;BMP-2 阳性细胞表达率较以前减少,表达强度也开始减弱。

骨折后第 4 周,骨痂组织细胞中 TGF- β_1 、BMP-2 的阳性信号强度及其表达率均明显下降。空白对照组及正常骨组织中 TGF- β_1 、BMP-2 均为阴性表达(图 3)。

采集的图像用生物图像分析系统^[6]半定量测定不同时期各标本切片的 TGF- β_1 、BMP-2 的免疫组织化学结果,用平均光密度值表示,运用 SPSS 软件以 $\bar{x} \pm s$ 表示。经方差分析, $P < 0.05$,具有统计学意义(图 4)。

3 讨论

许多动物实验证实,骨折愈合的不同时段会有不同的生长因子表达^[7-8]。本实验运用免疫组织化学测得 TGF- β_1 、BMP-2 在正常颌骨组织中没有表达。在颌骨骨折自然愈合的早期骨痂组织中 TGF- β_1 微弱表达,而早期的未分化间充质细胞内即有 BMP-2 的表达。TGF- β_1 在骨折后第 2 周有明显的阳性表达,并在骨形成过程中逐渐增强;而 BMP-2 在颌骨骨折后的第 2、3 周的骨形成过程中均为强阳性表达。在骨折后第 4 周,TGF- β_1 及 BMP-2 在骨痂组织中的表达率及表达强度均明显下降。

根据本实验的结果推论,BMP-2 主要在人颌骨骨折愈合早期的骨诱导过程中发挥作用。国外有学者通过体外培养模型认为,BMP 的靶细胞为某些具有成骨潜力的未分化间充质细胞^[9],在外源性或内源性刺激下,这些细胞可合成并分泌 BMP-2,BMP-2 又可进一步诱导这些未分化间充质细胞向成骨细胞转化。BMP-2 可能是启动骨折修复的因子之一。TGF- β_1 可能在已有的成骨细胞及骨祖细胞进一步分化、成骨的过程中发挥作用。实验表

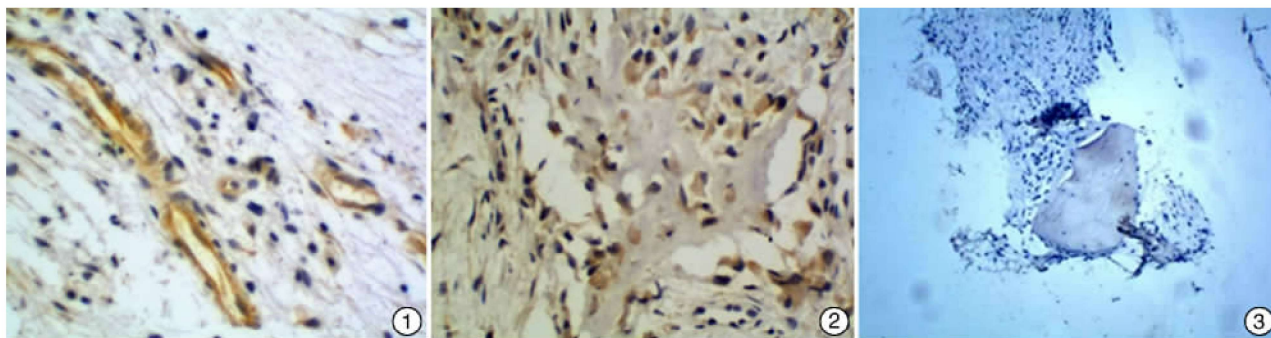


图 1 骨折后第 1 周 BMP-2 在未分化间充质细胞及血管周围细胞有明显阳性表达; 图 2 骨折后第 2 周 TGF- β_1 在成骨细胞强阳性表达; 图 3 TGF- β_1 、BMP-2 在正常骨组织中阴性表达

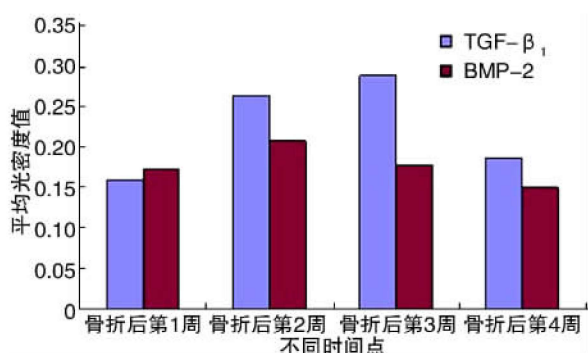


图 4 骨折后不同时期标本中 TGF- β_1 、BMP-2 免疫组织化学结果

明, TGF- β_1 在骨折早期由血小板释放; 成骨细胞上含有一个高密度的 TGF- β 受体^[10-11], 并影响 TGF- β 的生物学效应。所以 TGF- β_1 可能是骨折修复的另一条信号通路。综上所述, BMP-2 在骨愈合过程初期就已产生, 而且它极有可能在原始细胞向软骨样和骨样组织的细胞分化过程中起积极作用, 从而使这些细胞在分化成熟后又可促进 TGF- β_1 的合成与增殖。

颌骨骨折修复愈合是一个极其复杂的过程, 可能包括多种信号通路的参与, 并且各种信号通路之间也可能具有协调作用。将参与骨组织修复的生长因子应用于临床治疗骨不连、骨质疏松等疾病是目前的研究趋势。由于这些生长因子的作用机制以及各生长因子间的相互关系尚未完全阐明, 因此, 了解内源性生长因子在骨折愈合不同时期骨痂组织中的表达及表达程度, 可以进一步明确生长因子在骨系细胞增殖、分化中发挥的作用及其作用机制, 尤其为了解各生长因子之间的相互作用提供一

定的实验基础。

参考文献

- [1] AUDI L, GARCIA-RAMIREZ M, CARRASCOSA A. Genetic determinants of bone mass [J]. Horm Res, 1999, 51: 105-123.
- [2] 王文栋, 张瑾. 利用生长因子促进骨折愈合的研究进展 [J]. 中国医药导刊, 2007, 9(5): 120-121.
- [3] 张颖奇, 曹选平. 外源性生长因子在骨折愈合中的作用 [J]. 口腔医学, 2008, 28(7): 382-384.
- [4] 王丽, 张秋金, 林齐心, 等. 初论免疫组化标准化 [J]. 诊断病理学杂志, 2003, 10(5): 310-311.
- [5] 金小萍, 梅立新, 齐洁敏. 病理切片组织抗原修复免疫组化研究 [J]. 承德医学院学报, 2004, 21(2): 160-161.
- [6] 李涛, 范好, 刘芳. 免疫组织化学图像光密度分析的标准化方法 [J]. 解剖学杂志, 2008, 31(5): 727-728.
- [7] TAKAYANAGI H, KIM S, TANIGUCHI T. Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation [J]. Arthritis Res, 2002, 4 Suppl 3: S227-232.
- [8] MANCINI L, MORADI-BIDHENDI N, BRANDI M L, et al. Modulation of the effects of osteoprotegerin (OPG) ligand in a human leukemic cell line by OPG and calcitonin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279: 391-397.
- [9] CLARKSON P M, HUBAL M J. Exercise-induced muscle damage in humans [J]. Am J Phys Med Rehabil, 2002, 81(11 Suppl): S52-69.
- [10] 苏佳灿, 许硕贵, 张春才. 骨重建中细胞因子的作用及机制 [J]. 中国矫形外科杂志, 2001, 8(6): 593-595.
- [11] 苏佳灿, 王家林, 张春才. 骨折愈合中转化生长因子- β 的作用机制 [J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(1): 99-101.

(收稿日期: 2013-04-18)