

四种骨组织替代材料-骨界面区 细胞 IGF-ImRNA 表达水平原位杂交研究

欧国敏 陈治清

摘要 采用鼠胫骨内植入4种人体骨组织替代材料的动物实验,经组织核酸分子原位杂交技术(ISHH),研究了4个时期,材料对界面区细胞胰岛素样生长因子-I(IGF-I)mRNA 表达水平的影响。结果发现材料能够影响界面区细胞的 IGF-ImRNA 的表达水平,它的表达增强与界面区细胞增殖、基质产生和新骨形成有关,并且 IGF-ImRNA 的检测有助于界面区细胞功能状态的判定。

关键词 胰岛素样生长因子-ImRNA 核酸 原位杂交 骨组织替代材料 材料-骨界面

骨组织生物学研究表明,骨基质中含有多种生长因子¹。这些生长因子大部分由局部的间充质细胞或成骨细胞合成,经细胞膜上受体,通过自分泌或旁分泌途径发挥作用。胰岛素样生长因子-I(IGF-I)对骨形成过程的影响具有双重作用²:即一方面促进间充质细胞向成骨细胞增殖和分化;另一方面又能促使成骨细胞向骨细胞分化、成熟。使骨形成过程中,细胞增殖与分化这两个相互反馈制约的过程³达到了协调统一。

本文是在SD雄性大鼠胫骨内植入人体硬组织替代材料,通过原位杂交,考察骨形成过程中,早期界面上细胞表达 IGF-ImRNA 的情况,探讨 IGF-ImRNA 表达规律的检测,评价硬组织替代材料和材料植入界面细胞功能情况的关系。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 雄性SD大鼠,体重250~300g(华西医科大学动物实验中心提供)。

1.1.2 骨组织替代材料 生物玻璃陶瓷(BGC,由华西医科大学口腔生物医学工程重点实验室提供);钛合金(Ti6Al4V,由宝鸡有色金属研究所提供);羟基磷灰石(HA,由华西医科大学口腔生物材料研究室提供);羟基聚磷酸钙钠(HPA,由中国科学院有机化学研究所提供)。

材料尺寸为直径2mm,长度3mm。使用前,用双蒸馏水、超声波振荡清洗3次,100℃烘干,高压湿热灭菌。

1.1.3 样本制备及核酸原位杂交用试剂 新鲜配制4%多聚甲醛,0.5mol/L EDTA 脱钙液,均用二乙基焦碳酸(DEPC)水配制;IGF I寡聚核苷酸探针由上海细胞所赛尔

公司合成,探针序列为:5'TCC ACA CAC GAA CTG AAG AGC ATC CAC CAG 3',地高辛标记3'末端加尾标记试剂盒及地高辛标记核酸杂交检测试剂盒(Boehringer Mannheim);RNA 酶(Sigma);蛋白酶BP(江苏无锡酶制剂厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物 随机将大鼠分为4组,每组4只,用戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔内注射全麻,术区加用2%利多卡因,于双侧胫骨中份分别制备植入孔。方法为:用电机裂钻在胫骨壁上低速(小于2000r/min)钻孔,直径约2mm,深度进入骨髓,制备时,使用大量生理盐水降温,尽量使孔径与材料大小密合。每组4只大鼠,4种材料,植入部位左侧用A,B,右侧用C,D,每种材料按A,B,C,D顺序空白递推,在4只动物中分别植入。

1.2.2 样本处理 分别在实验的第三天、第七天、第十四天和第二十八天断头处死动物,用金刚砂片在慢速、冷却条件下分离样本,并立即用4%多聚甲醛,4℃固定24h,0.5mol/L EDTA 脱钙10d,每2d换一次脱钙液,小心取出材料,酒精梯度脱水,常规石蜡包埋,切片,4℃保存备用。

1.2.3 核酸原位杂交程序 二甲苯脱蜡10min×3,100%乙醇10min×2,梯度酒精水化:1×PBS 5min×1,3% H₂O₂ 15min,1×PBS 5min×1;蛋白酶BP 0.1mg/ml 37℃ 20min;1×PBS 5min×1,2×SSC 37℃ 10min,RNA 酶0.35mg/ml 37℃ 30min 处理作阴性对照。实验组用1×PBS 37℃ 30min;室温预杂交1h,2×SSC 浸;37℃ 杂交16h,杂交液探针浓度0.2mg/ml;2×SSC 15min×2,1×SSC 15min×2,0.2×SSC 37℃ 30min;buffer(I)浸,buffer(II) 37℃ 30min;抗Dig-Ap 酶 37℃ 1h;buffer(I)

本课题为国家自然科学基金资助项目

作者单位:610041 华西医科大学口腔医学院

15 m in × 2, buffer(III) 15 m in × 2; 显色(显色剂为: NBT 4 μl + BCIP 3 μl+ buffer(III) 1 m l); 水洗; 终止后用甲基绿衬染细胞核。

1.2.4 杂交结果观察与计算机图像分析 原位杂交结果以细胞浆被染为紫红色为阳性, 图像分析则以界面上细胞胞浆区染色的灰度值为参数进行测定, 并进行统计学方差分析和 *t* 检验。

2 结 果

2.1 IGF-ImRNA 原位杂交结果

术后 3 d: 4 种替代骨组织材料界面区部分细胞胞浆染成紫红色, 示 IGF-ImRNA 表达阳性, 且明显比同期空白对照组强。HPA, HA 周围(图 1)细胞密度高, 且胞核大, 圆形或卵圆形, 靠近界面上的细胞阳性信号稍强。细胞外基质区背景染色很浅。BGC 和钛合金界面区细胞阳性信号较前两者稍弱, 空白对照组阳性信号极弱。

术后 7 d: HPA, HA 周围细胞表达仍较强, 但此时 HPA 组阳性最强的细胞不在界面上, 而是在稍远处的尚未完全钙化的骨基质内(图 2), 而 HA 仍为界面上细胞阳性最强。钛合金周围细胞的阳性程度较 3 d 者显著增强。BGC 与空白对照组阳性程度相近, 离界面稍远处的细胞阳性较强。

术后 14 d: 所有材料周围和空白对照组骨缺损区细胞的阳性信号变弱。在 HPA 界面上信号最弱, HA 最强, BGC, 钛合金与空白对照组相近。

术后 28 d: HPA, HA 界面上很少有细胞存在, 未检测到阳性信号; BGC、钛合金界面上有少数细胞存在, 阳性程度低。空白对照组的成熟板状骨基质内细胞阴性, 只有表面细胞阳性稍强。

2.2 核酸原位杂交图像分析结果

附表 不同时期材料界面 IGF-ImRNA 表达灰度值校正值

分组	Cb ± s		
	3 d	7 d	14 d
HPA	14 1667 ± 9.342*	22 2140 ± 7.497*	5 4872 ± 9.313*
HA	10 6667 ± 12.208*	23 2143 ± 7.564*	16 9697 ± 7.736*
BGC	6 7368 ± 7.571*	17.3438 ± 8.346	11.9032 ± 10.189
Ti	9.9485 ± 5.026*	21.7407 ± 11.360*	9.2973 ± 8.259
对照	1.5000 ± 2.933	17.6520 ± 11.412	10.7750 ± 6.697

Cb ± s 平均灰度值 ± 标准差 Ti 为钛合金以下相同

* 示同一时期内材料组与对照组间存在显著性差异 (P < 0.05)

由于石蜡切片存在背景着色, 故灰度值应以校正正值(CB)为准。CB 值为灰度值减去背景值计, 不

同时期材料界面 IGF-ImRNA 表达灰度值校正值见附表。

3 讨 论

不同替代材料界面上的组织反应是有差别的, 而对界面上细胞功能状态的判定, 会有助于对这种差别的认识。体内、外研究均证明替代材料与细胞、蛋白是相互作用的, 材料的理化性质能够影响细胞外基质中胶原和某些非胶原蛋白的基因表达和蛋白合成^{4,5}, 细胞外基质, 特别是骨基质中, 含有多种骨生长因子, 其中 IGF-I 在骨基质中较为丰富, 可由成骨细胞合成, 它能促进前成骨细胞增殖⁶, 增加成骨细胞合成 I 型胶原⁷ 和骨钙蛋白⁸, 从而加快成骨细胞的分化, 增加碱性磷酸酶的活性⁹, 并能减缓胶原蛋白降解。IGF-I 这种双重作用使其能协调成骨细胞的增殖、基质形成及基质矿化的过程。在骨形成过程中, 协调好骨基质的产生和矿化之间的关系, 是骨替代材料发挥作用的关键, 它能使材料植入骨组织后既能缩短愈合的时间, 又能获得足够的骨量, IGF-I 这种特殊的生物学功能, 使它有可能成为一种有价值的生化指标, 来预示界面区骨形成情况。

细胞外基质成分的改变表明细胞的功能状态的不同, 不同功能状态的细胞与生长因子的表达是否有关呢? 本实验经界面区细胞核酸原位杂交, 表明 IGF-ImRNA 表达既与骨形成阶段有关, 同时也受到替代材料理化性质的影响。在术后 3 d, HPA 和 HA 界面上细胞阳性信号强, 这与组织学上出现的 HPA 和 HA 界面处细胞增生活跃, 细胞密度较高相平行, 说明 IGF-I 与其界面细胞增殖相关。7 d 时, HPA 周围, IGF-I 表达最强的细胞不在界面上, 而是在界面稍远处, 这些细胞正在合成骨基质, 表明此时 IGF-I 表达强弱与细胞功能活跃状态的组织学表现相一致, 这些细胞虽然不能增殖, 但它们有很强的合成蛋白、形成胞外基质的能力。7 d 时, 钛合金周围 IGF-ImRNA 的表达明显高于 3 d 组, 与骨折愈合过程中, 骨痂内 IGF-ImRNA 表达情况一致^{10~12}, 在骨折愈合的纤维组织肉芽期, 未检测到 IGF-ImRNA, 而在稍晚的软骨和骨形成期骨痂内成骨细胞 IGF-ImRNA 表达最强, 提示 IGF-ImRNA 在未向成骨细胞分化的纤维组织内表达较弱。术后 14 d, 28 d, HPA 和 HA 界面上, 骨

钙化程度较高的组织中 IGF-ImRNA 表达显著减弱, 这些细胞和基质的分化成熟程度也较高, 而 BGC, 钛合金界面上, 细胞阳性程度减弱不明显, 组织学上这些细胞仍处于增殖或基质分泌状态。在成熟骨内, IGF-ImRNA 出现在骨改建活跃部位的成骨细胞内, 而成熟的骨细胞表现为阴性, 说明 IGF-ImRNA 表达与细胞功能状态相关。

本研究结果说明界面区细胞 IGF-ImRNA 表达的增强; IGF-ImRNA 表达与界面区细胞增殖、基质产生和新骨形成有关。IGF-ImRNA 的检测有助于界面区细胞功能状态的判定。

(本文图见中心插页 6)

4 参考文献

- 1 Hauschka PV, Mavrakos AE, Iatrati MD, et al Growth factors in bone matrix. *J Biol Chem*, 1986, 261 (27): 12665
- 2 Hock JM, Centrella M, Canalis E, et al Insulin-like growth factor-I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology*, 1988, 122 (1): 259
- 3 Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation differentiation interrelationships during progressive of the osteoblast phenotype. *Endocrine Reviews*, 1993, 14(4): 424
- 4 Schreiber BG, Tuan R. Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces in vitro. *J Cell Science*, 1992, 101: 209
- 5 Cheny HS. Induction of expression of C-fos and C-myc proto-oncogenes by basic calcium phosphate crystal. *Cancer Res*, 1989, 49: 134
- 6 Schmid, Steiner T, Froesch ER, et al Insulin-like growth factor stimulate synthesis of nucleic acids and glycogen in cultured calvaria cells. *Calcif Tissue Int*, 1983, 35: 578
- 7 McCarthy TL, Centrella M, Canalis E, et al Regulatory effects of insulin-like growth factors I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial culture. *Endocrinology*, 1989, 124: 301
- 8 Canalis E, Lian JB. Effects of bone associated growth factors on DNA collagen and osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae. *Bone*, 1985, 9: 243
- 9 Chenu C, Valentinopran A, Chavassieux P, et al Insulin-like growth factor-I hormonal regulation by growth hormone and by 1, 25 (OH)₂D₃ and activity on human osteoblast-like cells in short term cultures. *Bone*, 1990, 11 (1): 81
- 10 Andrew JG, Hoyland J, Freemont J, et al Insulin-like growth factor gene expression in human fracture callus. *Calcif Tissue Int*, 1993, 53: 97
- 11 Edwall D, Prieseu PT, Levinovitz A, et al Expression of insulin-like growth factor I mRNA in regenerating bone after fracture influence of indomethacin. *J Bone Miner Res*, 1992, 7: 207
- 12 Cartner MH, Benson JD, Caldwell MD, et al Insulin-like growth factors I and II expression in the healing wound. *J Surg Res*, 1992, 52: 389

(1996- 11- 14 收稿)

IGF-ImRNA Expression Level of Cell in the Interfaces of Bone and Four Kinds of Substitutive Materials for Bone Tissues by the Technique in Situ Hybridization

Ou Guomin, Chen Zhiqing

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

Four kinds of substitutive materials for hard tissues were inserted into tibias of rat, effect of substitutive materials on IGF-ImRNA expression level of cell in the interfaces of bone and four kinds of substitutive materials were studied by the technique in situ hybridization. It showed that the biomaterials could affect the level of IGF-ImRNA expression, the enhanced expression level was associated with cell proliferation, formation of matrix and calcification, formation of new bone. Measurement of IGF-ImRNA could attribute to judge the functional state of cell, and to predict the final character of the interface.

Key words: IGF-ImRNA in situ hybridization interface of bone and materials