

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.14.015

麝香对颅骨骨缺损模型大鼠骨组织转化生长因子 β 、血管内皮生长因子 mRNA 表达的影响

李宁¹, 李应福^{1*}, 谢兴文², 李晶², 许伟², 黄晋²

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃省兰州市定西东路 35 号, 730000; 2. 甘肃省中医院)

摘要 目的 探讨麝香促进骨缺损愈合的可能作用机制。方法 300 只 SD 大鼠以颅骨钻制备颅骨骨缺损模型, 造模后随机分为模型组和实验组, 每组 150 只。两组再按照给药时间分为第 7、14、28 天 3 个时间点, 每个时间点 50 只。实验组大鼠每天灌服天然麝香 4.2 mg/100 g, 模型组每天灌服等量的生理盐水, 均每日灌胃 1 次。分别于灌胃第 7、14、28 天采用实时荧光定量 PCR 法检测两组大鼠骨缺损处组织中转化生长因子 β (TGF- β) 和血管内皮生长因子 (VEGF) mRNA 水平。结果 与模型组同时间点比较, 实验组第 7、28 天 TGF- β mRNA 及第 28 天 VEGF mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$); 实验组第 28 天 TGF- β 、VEGF mRNA 表达明显高于本组第 14 天 ($P < 0.05$)。结论 麝香可有效促使大鼠颅骨骨缺损区的愈合, 其机制可能与升高缺损处骨组织 TGF- β 、VEGF mRNA 表达有关。

关键词 骨缺损; 麝香; 转化生长因子 β ; 血管内皮生长因子

骨缺损是由创伤、感染等多种因素造成骨结构发生改变, 包括其微环境中生长因子及细胞因子发生调节变化, 常见的并发症有褥疮、患肢废用性萎缩、骨不连、骨感染等, 这使骨修复成为一系列极其复杂的过程^[1]。目前常用的骨缺损修复方法有自体骨移植、异体骨移植、组织工程骨、人工骨修复材料等, 虽然有一定的疗效, 但由于骨缺损区微环境的特殊性及其自身局限性等原因, 这些方法在临床上广泛使用仍受到很大限制^[2-4]。我们前期在麝香的干预下向大鼠尾静脉回植骨髓间充质干细胞的研究证实, 该方法不仅可以增加大鼠颅骨骨缺损处骨组织基质细胞衍生因子 (SDF-1) 的表达, 还能增加血清中 SDF-1、肝细胞生长因子 (HGF) 的表达^[5-6]。本实验通过观察麝香干预颅骨骨缺损模型大鼠骨缺损处骨组织中转化生长因子 β (TGF- β)、血管内皮生长因子 (VEGF) mRNA 含量变化, 探讨麝香促进骨缺损愈合的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SD 大鼠 300 只, 6 周龄, 雌雄各半, 体质量

(200 ± 20) g, 来源于甘肃中医药大学 SPF 实验动物中心, 实验动物合格证号: 62001000000201。

1.2 药物

麝香 (兰州安泰堂天顺行药业有限公司, 批号: 20151001), 由甘肃中医药大学中药鉴定学教研室鉴定, 为天然麝香。氯胺酮注射液 (西安力邦制药有限公司, 国药准字 H20054749)。

1.3 主要试剂和仪器

Trizol Reagent (Invitrogen 公司, 批号: 103105), RNA 逆转录试剂盒 (Promega 公司, 批号: A3500), SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo 公司, 批号: 441900)。PRO200 型组织匀浆器 (上海季诺科贸有限公司); 90 颅骨钻 (STRONG 公司); CT14RD 台式高速冷冻离心机 (上海天美生化仪器设备有限公司); Q5000 微量紫外分析仪 (美国 Quawell 公司); 7500 型 PCR 热循环仪 (美国 ABI 公司)。

1.4 模型的建立

参照文献^[7]建立颅骨骨缺损模型, 以氯胺酮注射液 0.1 g/kg 腹腔注射大鼠, 2~4 min 后取俯卧位, 利用三角固定器固定大鼠头部及四肢, 头部术野处用纱布块浸湿、剪毛、碘伏消毒, 剪长约 1~1.5 cm 纵行切口, 除去局部骨膜充分暴露颅骨。

基金项目: 国家自然科学基金 (81460735); 国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项 (JDZX2015080)

* 通讯作者: 869472706@qq.com

对头部毛细血管及硬脑膜不造成创伤的情况下用颅骨钻在术野处造成直径约 5 mm 的骨缺损,用无菌生理盐水冲洗骨缺损区域,去除残存骨屑,然后逐层缝合,完毕后用碘伏消毒伤口。

1.5 动物分组与给药

大鼠造模后按体重依次编号,采用随机数字表法分为实验组与模型组,每组 150 只,再按照给药时间采用随机数字表法分为 7、14、28 天 3 个时间点,每个时间点 50 只。实验组大鼠每天灌服麝香 4.2 mg/100 g,灌胃剂量按人与大鼠体质量的折算方法^[8]计算,模型组灌服等体积的生理盐水,均每日灌胃 1 次。

1.6 大鼠骨缺损处组织 TGF- β 、VEGF mRNA 表达

大鼠分别于给药第 7、14、28 天时进行颅骨骨缺损处取材,将每次制备的颅骨骨缺损样本标号、液氮冷冻,放置 -80℃ 冰箱备用。按照 Trizol 法提取组织总 RNA 说明书操作,取 100 mg 骨缺损组织加入 1 ml Trizol,利用匀浆器匀浆,并依次提取颅骨骨缺损总 RNA,通过微量紫外分析仪检测总 RNA 浓度与纯度,琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 的完整性。然后各组取 16 μ l 总 RNA,合 Promega RNA 逆转录试剂盒其他试剂形成总体积 40 μ l 体系,逆转录为 cDNA,并以此为模板,按照 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 说明书,加入相关试剂(蒸馏水 6.4 μ l、mix 10 μ l、上游引物 0.8 μ l、下游引物 0.8 μ l、样品溶液 2 μ l)最终成 20 μ l 体积,进行 PCR 扩增。以 7500 型 PCR 热循环仪分析软件,以相对定量值用于统计分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件分析数据,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析,若方差齐,采用 Bonferroni 法;若方差不齐,采用 Tamhane 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

表 1 示,与模型组同时间比较,实验组第 7、28 天 TGF- β mRNA 及第 28 天 VEGF mRNA 表达均升高($P < 0.05$);实验组第 28 天 TGF- β 、VEGF

mRNA 表达明显高于本组第 14 天 ($P < 0.05$)。

3 讨论

骨缺损的修复受多种因素的影响,如自身条件、缺损部位与大小、多种生长因子的调控及移植材料的选择等。骨缺损的“爬行替代”理论认为,新骨的生长是沿着移植物的表面逐渐爬行并逐步降解吸收从而替代移植物,而骨移植材料应具骨传导作用、骨诱导作用、成骨作用等生物学性能^[9]。

VEGF 是一种特异性的血管内皮细胞有丝分裂原,既能刺激血管内皮细胞增殖又能诱导血管分化与生成,是目前最强诱导血管生成的细胞因子^[10]。骨修复过程中血管形成与骨形成是相辅相成的,骨修复的前提条件是新生血管的形成,在骨折愈合过程中 VEGF 不仅将影响骨折愈合时间,甚至导致发生骨不连^[11]。TGF- β 有广泛的生物学作用,是骨吸收和骨形成之间重要的调节和耦联因子,主要通过诱导破骨细胞凋亡,抑制破骨细胞分化,刺激成骨母细胞的增殖,调节细胞外基质(蛋白聚糖、纤维结合蛋白、骨黏连素)的沉积,促进结缔组织再生等一系列过程参与组织细胞的损伤修复过程^[12-13]。

麝香具有开窍、辟秽、通络、散瘀、止痛的功能。《本草纲目》云“盖麝香走窜,能通诸窍之不利,开经络之壅遏。”前期研究发现,麝香可以促进骨髓间充质干细胞迁移至骨缺损处,加速骨折愈合^[8]。本研究结果显示,模型组大鼠骨缺损处组织 VEGF、TGF- β mRNA 分别在第 7、14 天处于高峰期,可能是由于创伤局部应激反应通过旁分泌或自分泌方式作用于炎症细胞,而炎症细胞释放相关细胞因子并促进细胞增殖、分化及细胞外基质合成;实验组骨缺损处组织 TGF- β mRNA 表达呈逐渐增高趋势,提示麝香可能通过诱导内源性 TGF 表达,抑制新生破骨细胞形成,刺激成骨细胞增殖、分化,有效调控细胞外基质增殖与分化,实现骨缺损区域的快速修复。实验组 VEGF mRNA 表达变化亦随给药时间延长而升高,表明麝香在创面修复早期刺激血管内皮细胞有丝分裂、诱导基底膜降

表 1 两组颅骨骨缺损大鼠缺损处组织中 TGF- β 、VEGF mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TGF- β mRNA			VEGF mRNA		
	第 7 天(50 只)	第 14 天(50 只)	第 28 天(50 只)	第 7 天(50 只)	第 14 天(50 只)	第 28 天(50 只)
模型组	1.17 $\pm$ 0.18	1.32 $\pm$ 0.15	1.28 $\pm$ 0.95	2.53 $\pm$ 0.47	1.36 $\pm$ 0.81	1.24 $\pm$ 1.01
实验组	1.51 $\pm$ 1.06	2.07 $\pm$ 0.83	3.69 $\pm$ 0.74*	3.95 $\pm$ 0.76	4.34 $\pm$ 1.23	7.14 $\pm$ 0.82*
t 值	0.5218	4.7362	3.6283	5.3841	2.4571	4.7384
P 值	0.0391	0.0837	0.0125	0.0632	0.0949	0.0382

注: TGF- β , 转化生长因子 β ; VEGF, 血管内皮生长因子; 与本组第 14 天比较, * $P < 0.05$

解使内皮细胞迁移而促进血管生成, 这为骨重塑提供了前提条件; 后期一方面 VEGF 促进破骨细胞骨吸收, 另一方面在 VEGF 作用下因损伤局部有了丰富的血供或侧支循环的建立, 成骨细胞及骨髓间充质干细胞增殖、分化, 在骨吸收与骨形成协同作用下加速了局部骨组织的修复和重塑。

参考文献

- [1] KHOJASTEH A, BEHANIA H, DASHTI SG, et al. Current trends in mesenchymal stem cell application in bone augmentation: a review of the literature [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2012, 70(4): 972-982.
- [2] GARCIA-MAYA M, ANDERSON AA, KENDAL CE, et al. Ligand concentration is a driver of divergent signaling and pleiotropic cellular responses to FGF [J]. J Cell Physiol, 2006, 206(2): 386-393.
- [3] ENDRES S, KRATZ M. Gamma irradiation. An effective procedure for bone banks, but does it make sense from an osteobiological perspective [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2009, 9(1): 25-31.
- [4] SAGAR N, PANDEY AK, GURBANI D, et al. In-vivo efficacy of compliant 3D nano-composite in critical-size bone defect repair: a six month preclinical study in rabbit [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77578. doi: 10.1371/journal.pone.0077578. eCollection 2013.
- [5] 赵永利, 谢兴文, 李宁. 等. 麝香对颅骨骨缺损模型大鼠 SDF-1 表达的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(4): 386-390.

- [6] 李应福, 李宁, 谢兴文. 等. 麝香对颅骨骨缺损模型大鼠基质细胞衍生因子 1 和肝细胞生长因子的相关性研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(11): 1477-1480.
- [7] 谢兴文, 赵永利, 李宁, 等. 麝香对颅骨骨缺损模型大鼠单核细胞趋化蛋白 1 表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(5): 48-51.
- [8] 刘亚敏, 张赐安, 徐秋英, 等. 麝香、冰片对全脑缺血再灌注大鼠脑组织氨基酸类神经递质的影响 [J]. 中国新药与临床药理, 2002, 13(4): 231-235.
- [9] 刘阳, 曹延林, 朱立新, 等. 新型可注射性 nHA/CS 骨修复材料修复兔股骨髁骨缺损的 X 线评估 [J]. 中国矫形外科杂志, 2011, 19(17): 1472-1475.
- [10] JABALEE J, FRANZ-ODENDAAL TA. Vascular endothelial growth factor signaling affects both angiogenesis and osteogenesis during the development of scleral ossicles [J]. Dev Biol, 2015, 406(1): 52-62.
- [11] 初同伟, 王正国, 朱佩芳. 等. 血管内皮生长因子对骨折愈合相关因子表达的调控 [J]. 中华骨科杂志, 2003, 23(4): 235-237.
- [12] LANGDAHL BL, STENKJAER L, CARSTENS M, et al. A CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene is associated with reduced bone mass and increased risk of osteoporotic fractures [J]. Calcif Tissue Int, 2003, 73(3): 237-243.
- [13] FRENKEL SR, SAADEH PB, MEHRARA BJ, et al. Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling [J]. Plast Reconstr Surg, 2000, 105(3): 980-990.

The Effect of Musk on mRNA Expression of Transforming Growth Factor β and Vascular Endothelial Growth Factor in Bone Tissues of Cranial Bone Defect Model Rats

LI Ning¹, LI Yingfu¹, XIE Xingwen², LI Jing², XU Wei², HUANG Jin²

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000; 2. Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of musk in improving bone defect healing. **Methods** Cranial bone defect models were made with cranial drill in 300 SD rats. After modeling, the rats were randomly divided into a model group and an experiment group, with 150 rats in each group. Rats in both groups were further divided into subgroups of 7 days, 14 days, and 28 days, respectively, with 50 rats in each subgroup. The experiment group was gavaged with 4.2 mg/100 g of natural musk, while the model group was gavaged with equivalent saline, once per day for 7 days, 14 days or 28 days, respectively. On the 7th, 14th and 28th day of gavage, real-time fluorescent quantitative PCR was adopted to detect levels of transforming growth factor β (TGF- β) mRNA and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in bone defect regions in both groups. **Results** Compared with those in the model group at the same time point, level of TGF- β mRNA on the 7th and the 28th day and level of VEGF mRNA on the 28th day in the experiment group increased remarkably ($P < 0.05$). In the experiment group, expression of TGF- β mRNA and VEGF mRNA on the 28th day were remarkably higher than that on the 14th day ($P < 0.05$). **Conclusion** Musk could effectively improve healing of cranial bone defect regions. Its mechanism may be related to increasing of expression of TGF- β mRNA and VEGF mRNA in bone tissue in defect regions.

Keywords bone defect; musk; transforming growth factor β ; vascular endothelial growth factor

(收稿日期: 2017-01-21; 修回日期: 2017-03-16)

编辑: 王利芬