

p27 在调节骨量和骨转换中的作用及机制研究

蔡建武¹, 陈辉², 蔡宁宇², 李斌², 潘骏^{2*}

(¹温州医科大学附属第三医院外科, 浙江 温州 325000; ²温州医科大学附属第二医院骨科, 浙江 温州 325000)

[摘要] 目的:明确 p27 在调节骨量和骨转换中的作用及机制。方法:选择同窝 8 周龄 p27 基因敲除(p27^{-/-})和同窝野生型(WT)小鼠胫骨和股骨行骨髓抽除术,利用影像学和组织病理学方法比较分析了术后 3、7、11、14 d 上述两组小鼠骨发生和骨转换的差异。结果:骨髓抽除术后 3 d,WT 和 p27^{-/-}小鼠骨髓均无明显新骨形成,但术后 7、11、14 d,p27^{-/-}小鼠骨髓中的新形成骨量均较 WT 小鼠明显增加。进一步研究发现,与 WT 小鼠相比,术后 7、11、14 d,p27^{-/-}小鼠骨髓腔中成骨细胞数和 I 型胶原阳性面积均明显增加,而破骨细胞数和破骨细胞面均明显减少。结论:p27 能够通过抑制成骨细胞骨形成,促进破骨细胞骨吸收,从而减少骨量并抑制骨转换。

[关键词] p27;骨髓抽除;骨量;骨转换

[中图分类号] R336

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)01-0053-05

doi:10.7655/NYDXBNS20170111

p27 plays an important role in modulating bone mass and bone turnover

Cai Jianwu¹, Chen Hui², Cai Ningyu², Li Bin², Pan Jun^{2*}

(¹Department of Surgery, the Third Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000; ²Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

[Abstract] **Objective:** To determine whether p27 plays an important role in modulating bone mass and bone turnover. **Methods:** We used 8-weeks-old p27 homozygote (p27^{-/-}) mice and WT littermate mice. Firstly, we performed bone marrow ablation (BMX) on both tibia and femur, and then we compared the difference between osteogenesis and bone turnover of the different groups by radiography and pathologic histology. Finally, we detected the difference of osteosis and bone turnover between groups on the 3rd/7th/11th/14th day after BMX respectively. **Results:** Three days after BMX, the bone mass of both WT and p27^{-/-} littermate showed no new osteogenesis. While compared to WT littermate, on the 7th/11th/14th day after BMX, the new osteogenesis in p27^{-/-} mice increased significantly. Further study showed that the number of osteoblasts and the positive area of type I collagen increased significantly. However, the number of osteoclasts and the positive area of osteoclasts decreased markedly. **Conclusion:** The BMX of p27 gene knockout mice study proved that p27 could reduce the bone mass and inhibit bone turnover by suppressing the osteogenesis of osteoblasts and promoting the bone resorption of osteoclasts.

[Key words] p27;bone marrow ablation;bone mass;bone turnover

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(01):0053-0057]

成骨细胞骨形成与破骨细胞骨吸收两者的平衡是维持正常骨量的关键^[1],细胞周期的调节可以显著影响成骨细胞和破骨细胞的增殖和分化^[2-4],同时可显著影响骨的损伤修复。研究证明骨质疏松小鼠的骨折愈合可能与 p53 信号通路有关^[5],p38 在生长板损伤区域和相邻软骨生长板处的炎症细胞内表达升高,同时 p38 活化可影响间充质干细胞的募集、增

殖、向成骨细胞分化,并能负调控生长板损伤处的骨形成^[6]。但细胞周期相关因子在骨损伤修复过程中的具体作用及机制尚不完全清楚。

小鼠骨髓抽除 (bone marrow ablation, BMX) 模型是在体模拟骨损伤修复的重要动物模型。在该模型中,长骨骨髓腔内部分骨髓被机械移除后引发膜内成骨^[7-8]。BMX 术后前 3 d 血凝块充满骨髓腔,随后进入快速骨形成阶段,形成的大量新生骨替代血痂,同时分泌生长因子募集破骨细胞,诱发骨吸收;

[基金项目] 温州市“551 人才工程”项目

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: panandjun@163.com

术后第 2 周新生骨量达到峰值,进入快速骨吸收阶段,经过破骨细胞对新生骨的改建和吸收,最终在术后 3 周左右恢复为正常的骨髓组织。由于该模型可以在短时间内再现骨发生和骨转换过程,并且在体内具有高度重复性^[7],因此,已被广泛应用于不同病理、生理情况下或不同功能基因对骨形成和骨吸收影响的研究。

p27^{kip1} 基因是一种细胞周期素依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)抑制因子,这一功能在 p27 基因敲除(p27^{-/-})小鼠模型中得到体现。通过对小鼠表型分析发现 p27^{-/-}小鼠生长加快,体型增大,多器官因细胞增殖增加而肥大,并发生多发性内分泌瘤病以及视网膜发育异常^[9-10]。本实验室最近的研究结果还发现 p27 缺失使成骨细胞骨形成增加,而破骨细胞骨吸收无明显变化,从而加快了长骨、牙齿和下颌骨的生长发育^[11-13]。关于 p27 是否通过类似机制来调节骨损伤后的修复,目前尚无相关文献报道。

那么 p27 作为重要的细胞周期调节因子在骨损伤修复过程究竟发挥何作用呢?为了回答这一问题,本课题组选择了同窝 WT 和 p27^{-/-}小鼠胫骨行骨髓抽除术,分别于术后 3、7、11 和 14 d 收集标本,利用影像学和组织病理学的方法比较分析了 WT 和 p27^{-/-}小鼠骨发生和骨转换的差异。

1 材料和方法

1.1 材料

多克隆羊抗 I 型胶原抗体(Polyclonal Goat anti-Type I collagen, Santa Cruz 公司,美国);二抗试剂:生物素结合的兔抗山羊 IgG(全分子)抗体(Sigma 公司,美国),PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物的饲养和繁殖与基因型的鉴定

亲代 p27^{-/-}小鼠从美国 Jackson 实验室购买,饲养于南京医科大学实验动物中心 SPF 级动物房。动物饲养条件:屏障环境饲养,温度 22~26℃,湿度 45%~75%。通过杂合子 p27 小鼠(p27^{+/-})与野生型小鼠雌雄交配,得到的子代小鼠出生后 10 d 剪取尾巴,用酶裂解法提取 DNA,PCR 扩增 DNA 片段,检测小鼠基因型。p27 的正向引物:5'-GATGGA CGCCAGACAAGC-3',反向引物:5'-CTCCTGCCATT CGTATCTGC-3',扩增产物 190 bp;NEO 基因的正向引物:5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3',反向引物:5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3',扩增产物

280 bp。所有引物均由上海 Invitrogen 公司合成。杂合子小鼠(p27^{+/-})雌雄交配获得野生型小鼠(WT)和 p27 基因缺失纯合子小鼠(p27^{-/-})各 12 只,用于下列实验。实验分为 WT 组和 p27^{-/-}组分别于骨髓抽除术后 3、7、11、14 d 取材,每个时间点随机分配 3 只小鼠。

1.2.2 骨髓抽除术

骨髓抽除术按照已经发表的制备方法。出生后 8 周同窝 WT、p27^{-/-}小鼠 5 组,按体重腹腔注射水合氯醛 0.2 mL/10 g 进行麻醉。一侧后肢膝关节去毛后医用碘伏消毒,膝关节外侧经皮行 3~5 mm 纵向切口暴露关节,膝关节半脱位,暴露股骨下端,1 mL 注射器针头在股骨内、外上髁之间钻孔直通骨髓腔,以生理盐水冲洗骨髓,再用 1 mL 注射器抽除骨髓。膝关节复位,继续暴露胫骨上部,1 mL 注射器针头在胫骨内、外上髁之间钻孔直通骨髓腔,抽除方法同股骨,后缝合韧带,严密缝合皮肤。手术组术后无饮食、饮水、排尿或排便异常。

1.2.3 微 CT 扫描和三维重建

用 SkyScan 1072 型扫描仪在电压 100 kV,电流 98 mA 条件下摄取分辨率为 18.2 μm 的二维图像,胫骨在扫描前均用塑料薄膜包裹以防止移动和脱水,用三维重建软件(Dataview、CTan、ANT)进行三维重建。

1.2.4 组织学观察

分离胫骨并在 PLP (2%多聚甲醛中添加 0.075 mol/L 赖氨酸和 0.01 mol/L 高碘酸钠)中 4℃固定过夜,用乙二胺四乙酸-甘油溶液在 4℃脱钙 2 周,脱钙满意后,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片厚 5 μm。切片脱蜡水化后用于 HE 染色和总胶原、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色,以及免疫组织化学染色。

1.2.4.1 总胶原染色

过饱和苦味酸直红染色液孵育标本 1 h。流水冲洗后用苏木素复染 1 min,梯度酒精上行脱水,二甲苯透明,中性胶封片。在同一光强度下随机选取 4 个视野,用 IPP 6.0 定量分析骨小梁区域的骨体积分数(BV/TV)。

1.2.4.2 TRAP 染色

酒石酸盐缓冲液孵育标本 20 min。弃去酒石酸盐缓冲液,用 TRAP 染色液孵育 15 min。流水冲洗后,甲基绿复染 5 min。水溶性胶封片。在同一光强度下随机选取 4 个视野,用 IPP 6.0 定量分析破骨细胞数和骨小梁破骨细胞面百分比。

1.2.4.3 免疫组织化学染色

切片脱蜡水化,透明质酸酶 37℃消化 30 min,

双氧水灭活过氧化物酶,抗 I 型胶原抗体 4℃ 孵育过夜,第 2 天用相应二抗(兔抗羊)结合,Elite ABC 放大,DAB 显色。苏木素复染,盐酸酒精分色 1~3 s,梯度酒精上行脱水,二甲苯透明,中性胶封片,晾干。标本切片置于 400 倍光镜下,在同一光强度下随机选取 4 个视野,进行阳性面积百分率的测算。

1.3 统计学方法

数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS15.0 软件进行 *t* 检验比较两组间差异。所有试验均独立重复 3 次, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

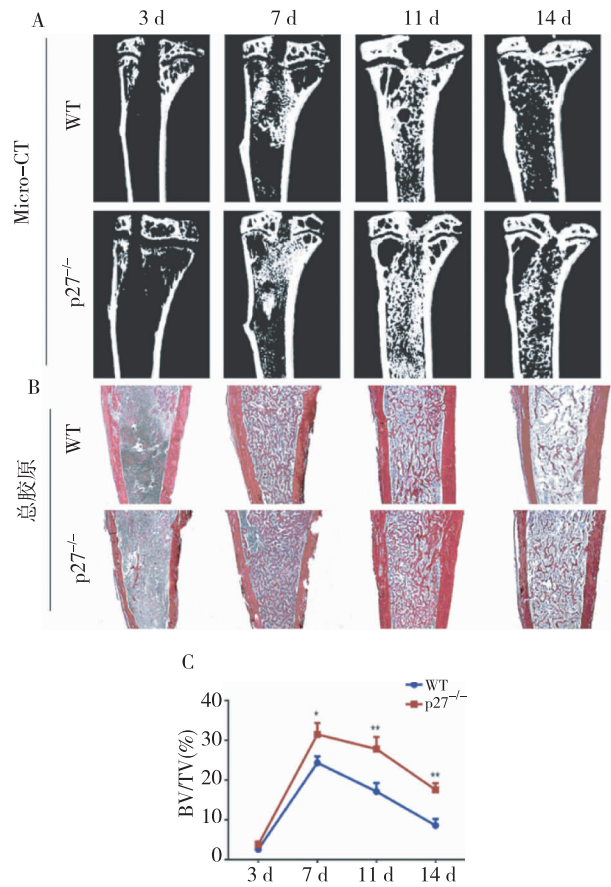
2 结果

2.1 p27 缺失对小鼠骨髓抽除后骨容量的影响

为了明确 p27 基因敲除对小鼠骨容量的影响,对同窝 WT 和 p27^{-/-}小鼠行 BMX 术,收集标本,利用 Micro-CT 和总胶原组织化学染色,观察小鼠 BMX 术后骨髓腔内新生骨量的变化。通过 Micro-CT 和三维重建发现 BMX 术后 3 d 钙化的新生骨小梁骨量在两组之间无明显差异,而 BMX 术后 7、11 和 14 d p27^{-/-}小鼠钙化的新生骨量较 WT 小鼠明显增加(图 1A)。通过总胶原染色对新生骨量的定量分析发现:BMX 术后 7、11 和 14 d,p27^{-/-}小鼠的新生骨量均高于 WT 小鼠,且差异有统计学意义(图 1B、C),这些结果说明,p27 缺失引起 BMX 术后新生骨量增加。

2.2 p27 缺失对小鼠骨髓抽除后成骨细胞分化和骨形成的影响

为了明确小鼠 BMX 术后因 p27 缺失导致的新生骨小梁容积增加是否与成骨细胞骨形成的变化相关,采用 HE 染色和 I 型胶原(Col-I)免疫组织化学染色,经组织形态学分析,观察了新生骨表面成骨细胞数、Col-I 阳性面积在骨干骨髓腔中的改变(图 2A、B)。结果显示:WT 小鼠在 BMX 术后 3 d 骨干骨髓腔中主要为血痂,尚无成骨细胞和骨小梁形成;术后 7 d 出现大量的成骨细胞和 Col-I 阳性的新生骨小梁;术后 11 d 成骨细胞和 Col-I 阳性的新生骨小梁逐渐减少;术后 14 d 多数新生骨小梁已经消失,被骨髓组织所取代,髓腔内仅残存少量的成骨细胞和 Col-I 阳性的新生骨小梁。p27^{-/-}小鼠在术后 3 d 骨髓腔中主要也为血痂但有较多量的成纤维细胞形成;术后 7 d 髓腔中出现大量成骨细胞和 Col-I 阳性的新生骨小梁;术后 11 d 成骨细胞和 Col-I 阳性的新生骨小梁量无明显减少;术后 14 d 成骨细胞和 Col-I 阳性新生骨小梁量开始明显减



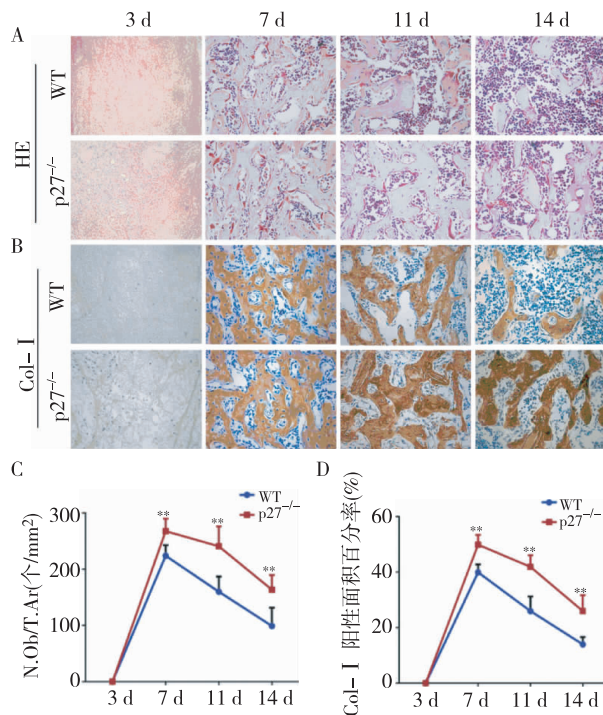
A: 微 CT 扫描三维重建胫骨正中冠状切面图像;B: 总胶原骨髓抽除术后胫骨切片显微图像($\times 50$);C: 骨体积分数(BV/TV,%)。与术后相同时间点同组 WT 小鼠相比,* $P<0.05$;** $P<0.01$ 。

图 1 p27 缺失对小鼠骨髓抽除后新生骨量的影响
Figure 1 Effect of p27 deficiency on new osteogenesis in mice after bone marrow ablation

少。通过对成骨细胞数和 Col-I 阳性面积百分率的定量分析(图 2C、D),结果发现:BMX 术后 7、11、14 d 成骨细胞数、Col-I 阳性骨小梁面积比较,p27^{-/-}小鼠均高于 WT 小鼠,且差异有统计学意义,这些结果说明 p27 缺失促进成骨细胞的增殖和分化及增强成骨细胞骨形成能力。

2.3 p27 缺失对骨髓抽除后破骨细胞骨吸收的影响

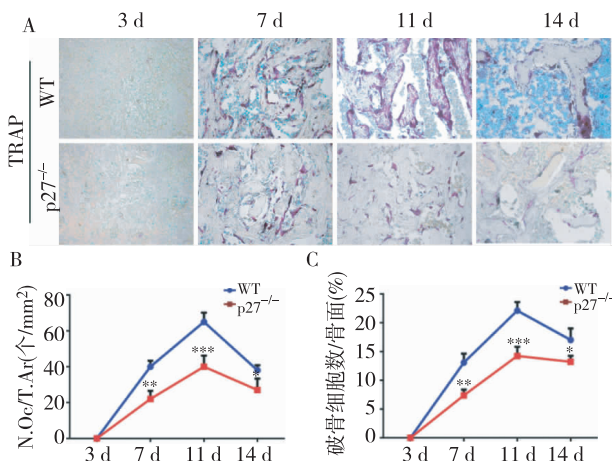
为明确 p27 缺失引起 BMX 术后新生骨量增加和骨髓重建延迟是否与破骨细胞骨吸收能力改变有关,采用 TRAP 染色实验。结果显示:WT 小鼠在 BMX 术后 7 d 开始产生破骨细胞,术后 11 d 达到高峰,术后 14 d 破骨细胞开始减少(图 3A)。BMX 术后 p27^{-/-}小鼠在破骨细胞的变化趋势与 WT 小鼠的变化一致,但 BMX 术后 7、11、14 d TRAP 阳性破骨细胞数和破骨细胞面的比较中,在 p27^{-/-}小鼠均少于 WT 小鼠,且差异有统计学意义。这些结果说明 p27 缺失引起破骨细胞增殖减少和骨吸收能力降低。



A: 8 周同窝 WT 和 p27^{-/-} 小鼠骨髓抽除后 3、7、11、14 d 胫骨骨干 HE 染色; B: Col- I 免疫组织化学染色切片的显微图像 (×400); C: 成骨细胞数 (N.Ob/T.Ar, 个/mm²); D: I 型胶原 (Col- I) 阳性面积/骨组织面积 (%). 与术后相同时间点同组 WT 小鼠相比; *P<0.05, **P<0.01.

图 2 p27 缺失对小鼠骨髓抽除后成骨细胞分化和骨形成的影响

Figure 2 Effect of p27 deficiency on osteoblast differentiation and bone formation in mice after bone marrow ablation



A: TRAP 组织化学染色骨髓抽除后胫骨骨干显微图像 (×400); B: 破骨细胞数/单位组织面积 (N.Oc/T.Ar, 个/mm²); C: 破骨细胞面/骨面 (%). 与术后相同时间点同组 WT 小鼠相比; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

图 3 p27 缺失对骨髓抽除后破骨细胞骨吸收的影响

Figure 3 Effect of p27 deficiency on bone resorption of osteoclasts in mice after bone marrow ablation

3 讨论

为了探讨 p27 基因在调节骨代谢中的作用机制,利用骨髓抽除模型,从细胞和整体水平比较分析了 p27 基因缺失小鼠与 WT 小鼠骨发生和骨转换的差异。

本研究结果显示,小鼠骨髓腔在 BMX 术后经历了一个快速的骨发生和骨转换至骨髓重建的过程。BMX 术后,与 WT 小鼠相比,p27^{-/-}小鼠在术后 3 d 骨量无明显变化,但在术后 7、11、14 d 骨量均增加,且差异有统计学意义。Micro-CT 三维重建结果基本与总胶原染色结果一致,但术后 7 d 骨髓近端的类骨质先于骨髓远端的类骨质矿化,远端为未被矿化的类骨质,因而不能在 CT 下显影。结果说明 p27 缺失能够引起小鼠骨髓抽除后新生骨量增加。

成骨细胞骨形成与破骨细胞骨吸收的平衡是维持正常骨量的关键。为了明确 BMX 术后 p27^{-/-}小鼠新生骨量增加是否与成骨细胞骨形成有关。采用 HE 染色和 Col- I 免疫组织化学染色的方法,经形态学分析,观察了 BMX 术后成骨细胞数和 Col- I 阳性新生骨小梁的变化。有体外实验研究表明 p27 基因可以抑制 C3H10T1/2 成纤维细胞向成骨细胞分化^[14],而 p27 基因缺失能够促进成骨细胞的生长和分化^[15]。Col- I 是钙盐沉积和细胞附着的支架^[16],占骨有机基质 90% 以上,是成骨细胞晚期分化的指标^[17]。本研究结果显示:BMX 术后,与 WT 小鼠相比,p27^{-/-}小鼠的成骨细胞数和 Col- I 阳性面积在术后 7、11、14 d 均增加,且差异有统计学意义。这些结果说明,与体外研究结果一致,骨损伤修复过程中,p27 缺失可促进成骨细胞的增殖,并通过上调 Col- I 的表达,促进成骨细胞分化,增强成骨细胞骨形成能力。

为明确 p27^{-/-}小鼠骨形成增加是否与破骨细胞骨吸收有关,本研究还比较了 BMX 术后 p27^{-/-}小鼠和同窝 WT 小鼠破骨细胞的数量和破骨细胞面的差异。有体外细胞实验表明骨髓单核细胞系分化为破骨细胞系时,有瞬时的 p27 和 p21 表达上调^[18];p27 可以促进破骨细胞的分化,且前破骨细胞被诱导分化为破骨细胞时,越早敲低 p27 对分化的抑制作用越明显^[19]。本研究结果显示,BMX 术后,与 WT 小鼠相比,p27^{-/-}小鼠在术后 7、11、14 d 破骨细胞数和破骨细胞面均减少,且差异有统计学意义。本研究结果说明骨损伤修复过程中,p27 缺失抑制破骨细胞的增殖,减弱了破骨细胞骨吸收能力。

本实验结果证明在骨损伤修复中,p27 基因缺

失能够通过促进成骨细胞骨形成和抑制破骨细胞骨吸收,从而发挥增加骨量的作用。这一结果与之前对 p27 骨形成作用研究相对一致,有趣的是前期的结果证实与 WT 小鼠相比,p27 缺失小鼠的破骨细胞骨吸收无明显变化,而本实验中 p27 缺失小鼠骨转换过程中破骨细胞骨吸收减弱,破骨细胞数减少,与之前的研究有差异,这可能是由于 BMX 术后炎症因子的表达增多,促进了破骨细胞的增殖分化,而 p27 缺失可以抑制这一过程。为进一步明确这一问题,我们需要通过观察 BMX 术后骨髓腔内骨髓细胞的增殖分化能力及炎症因子刺激后细胞变化来确定。

本研究结果揭示了 p27 基因缺失在小鼠骨损伤修复中对骨转换的重要作用,为明确细胞周期调节因子在骨形成和骨吸收调节中的作用增添了依据,同时也为骨损伤相关疾病的治疗提供了新的靶点及思路。

[参考文献]

- [1] Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts[J]. *Eur Cell Mater*,2008,15:53-76
- [2] Takahashi N, Muto A, Arai A, et al. Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010,658:21-30
- [3] McConnell J. Cell cycle control in early mouse development[J]. *J Reprod Fertil Suppl*, 1990,42:205-213
- [4] Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis [J]. *N Engl J Med*,1995,332(5):305-311
- [5] Wang C, Yu T, Tan L, et al. Bioinformatics analysis of gene expression profile in callus tissues of osteoporotic phenotype mice induced by osteoblast-specific Krm2 overexpression [J]. *Int J Rheum Dis*, [2016-03-01]. <http://dx.doi.org/10.1111/1756-185X.12840>
- [6] Zhou FH, Foster BK, Zhou XF, et al. TNF-alpha mediates p38 MAP kinase activation and negatively regulates bone formation at the injured growth plate in rats [J]. *J Bone Miner Res*,2006,21(7):1075-1088
- [7] Bab IA. Postablation bone marrow regeneration: an in vivo model to study differential regulation of bone formation and resorption[J]. *Bone*, 1995,17(4 Suppl):437S-441S
- [8] Schwartz Z, Sela J, Ramirez V, et al. Changes in extracellular matrix vesicles during healing of rat tibial bone:a morphometric and biochemical study [J]. *Bone*,1989,10(1):53-60
- [9] Nakayama K, Ishida N, Shirane M, et al. Mice lacking p27 (Kip1)display increased body size,multiple organ hyperplasia,retinal dysplasia,and pituitary tumors [J]. *Cell*,1996,85(5):707-720
- [10] Fero ML, Rivkin M, Tasch M, et al. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism,tumorigenesis,and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice [J]. *Cell*,1996,85(5):733-744
- [11] Yin Y, Wang Q, Sun W, et al. p27 (kip1) deficiency accelerates dentin and alveolar bone formation [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*,2014,41(10):807-816
- [12] Sun W, Wu J, Huang LY, et al. PTHrP nuclear localization and carboxyl terminus sequences modulate dental and mandibular development in part via the action of p27 [J]. *Endocrinology*,2016,157(4):1372-1384
- [13] Zhu M, Zhang J, Dong Z, et al. The p27 pathway modulates the regulation of skeletal growth and osteoblastic bone formation by parathyroid Hormone-Related peptide [J]. *J Bone Miner Res*,2015,30(11):1969-1979
- [14] McCabe LR, Last TJ, Lynch M, et al. Expression of cell growth and bone phenotypic genes during the cell cycle of normal diploid osteoblasts and osteosarcoma cells[J]. *J Cell Biochem*,1994,56(2):274-282
- [15] Drissi H, Hushka D, Aslam F, et al. The cell cycle regulator p27kip1 contributes to growth and differentiation of osteoblasts[J]. *Cancer Res*,1999,59(15):3705-3711
- [16] Duprez D, Bell EJ, Richardson MK, et al. Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb [J]. *Mech Dev*,1996,57(2):145-157
- [17] Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, et al. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001,280(3):874-877
- [18] Okahashi N, Murase Y, Koseki T, et al. Osteoclast differentiation is associated with transient upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitors p21 (WAF1/CIP1) and p27 (KIP1) [J]. *J Cell Biochem*,2001,80(3):339-345
- [19] Zauli G, Rimondi E, Stea S, et al. TRAIL inhibits osteoclastic differentiation by counteracting RANKL-dependent p27Kip1 accumulation in pre-osteoclast precursors [J]. *J Cell Physiol*,2008,214(1):117-125

[收稿日期] 2016-03-25