

PTH 敲除小鼠体内血管形成因素对骨折愈合的影响

周浩,孙鹏,周炜,殷国勇,凡进,李青青*

(南京医科大学第一附属医院骨科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探究内源性甲状旁腺激素(parathyroid hormone,PTH)缺失是否通过降低血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)的表达,导致骨折愈合过程中血管再生减弱,延迟骨折愈合。方法:构建 PTH 基因敲除(PTHKO)小鼠的骨折模型,摄 X 线片观察骨折愈合情况,用免疫组化方式检测骨合成代谢以及血管形成指标。结果:PTHKO 小鼠 VEGF 表达量下降,血小板内皮细胞黏附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule,PEGAM)免疫组化阳性减少,骨钙蛋白(osteocalcin,OCN)活性下降,骨折愈合延迟。结论:内源性 PTH 缺失可能通过减少间充质干细胞或成骨细胞释放 VEGF,导致骨折端血管减少,成骨活性受到抑制,从而影响软骨内成骨,最终导致骨折愈合延迟。

[关键词] PTH;VEGF;血管形成;骨折愈合

[中图分类号] R683

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)04-462-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140412

Angiogenesis impact on fracture healing in PTH knockout mice

Zhou Hao, Sun Peng, Zhou Wei, Yin Guoyong, Fan Jin, Li Qingqing*

(Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore whether the lack of endogenous PTH causes angiogenesis weakness by reducing the expression of VEGF during fracture healing and delays fracture healing. **Methods:** We constructed PTH knockout mice fracture model, and observed fracture healing from X-ray film and detected bone anabolism and angiogenesis using immunohistochemistry. **Results:** VEGF expression was decreased in PTHKO mice. Immunohistochemical analysis showed that positive PEGAM was reduced. OCN activity was decreased and fracture healing was delayed. **Conclusion:** Lack of endogenous PTH may release VEGF by reducing mesenchymal stem cells or osteoblasts, reduce vascular fracture, inhibit osteoblastic activity, suppress endochondral ossification and lead to fracture healing delay eventually.

[Key words] PTH;VEGF;angiogenesis;fracture healing

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(04):462-466]

骨折修复过程包括血肿形成期、炎性反应期、软骨性骨痂期和骨痂塑形期。此过程受众多因素影响和调节,如成骨细胞的分化、成熟,骨痂内血管网络的再生等^[1-2]。甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)是一种由甲状旁腺分泌的多肽类激素,其作用主要是维持体内钙磷平衡。传统观点认为内源性的 PTH 可以促进骨吸收,但最新研究表明:小剂量间断注射 PTH 亦可促进骨合成,进而促进骨折愈合^[3-4]。最先研究表明,血管生成在 PTH 促进骨折愈合的过程

中扮演着重要的角色,但具体机制尚未被明确阐明。在血管发生或再生的过程中,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)发挥着重要的调控作用。既往研究表明,VEGF 基因敲除小鼠的骨密度、骨小梁均明显减少,而 PTH 可提高成骨细胞中 VEGF 的表达水平^[5-6]。

本研究通过构建 PTH 基因敲除小鼠的骨折模型,检测其骨折愈合情况及血管形成的相关指标,初步探讨骨折愈合过程中 PTH 通过调控血管形成促进骨折愈合的具体机制。

1 材料和方法

1.1 材料

[基金项目] 国家自然科学基金(81271988)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: liqingqing_1999@163.com

抗小鼠血小板内皮细胞黏附分子 (platelet endothelial cell adhesion molecule, PEGAM)、骨钙蛋白 (osteocalcin, OCN) 和 VEGF 的单克隆抗体均购自美国 Cell Signaling 公司; 所有二抗均购自美国 Santa Cruz 公司。SABC 免疫组织化学试剂盒和 DAB 显色剂购自美国 Vector 公司; PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 PTH 基因敲除小鼠的构建和骨折模型的建立

敲除小鼠 PTH 基因的第 III 外显子, 代以抗新霉素基因作为筛选, 获得 PTH 基因敲除小鼠^[7]。亲代敲除小鼠从加拿大 McGill 大学引进, 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%。小鼠骨折模型建立方法: 氯胺酮和赛拉嗪混合物腹腔注射麻醉小鼠, 消毒膝关节周围的皮肤组织, 通过腓腱将 1 根 25 G 的注射针头插入股骨的髓腔。使用 Einhorn 设备, 通过 3 点弯曲法, 制造股骨中段骨折, X 线片证实。造模成功后, 皮下给予 0.5 mg/kg 布诺菲 (Abbott labs, 美国) 3 d。骨折后 1、2 周时, 麻醉下使用 Faxitron 系统 (Faxitron X-ray, Wheeling, Illinois) 摄 X 线片^[8]。实验分为 WT 组和 KO 组, 每组各 6 只小鼠, 分别于骨折模型完成后 1、2 周取材, 每个时间点均随机分配 3 只小鼠。

1.2.2 基因鉴定

剪取出生 10 d 后小鼠尾巴, 用酶裂解法提取 DNA, PCR 扩增 DNA 片段, 检测小鼠基因型。PTH 的正向引物序列为: 5'-GATGTGTGCAAACACCGTGGCTAA-3', 反向引物为: 5'-TCCAAAGTTTCATTACAGTAGAAG-3'; neo 基因的正向引物为: 5'-TCTTGATCCCACTTTGTGGTTCTA-3', 反向引物序列同 PTH 的正向引物序列。退火温度为 55℃。PTH 基因扩增产物为 451 bp, neo 扩增产物为 276 bp。所有引物均由上海 Invitrogen 公司合成。

1.2.3 免疫组织化学染色

将骨组织及骨痂于 10% 福尔马林溶液固定 12~24 h, 经 5% 乙二胺四乙酸 (EDTA-2Na) 脱钙 4~5 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。先行 HE 染色进行组织学观察, 后根据实验要求, 用相应的一抗, 以 SABC 法对切片进行染色和 DAB 显色 (具体方法按照说明书进行)。用阳性细胞表达率和目标灰度值进行量化: 标本切片置于光镜下输入并显示图像, 每个切片随机选取 4 个视野, 在同一光强度下进行阳性细胞表达率和灰度

值的测算。

1.2.4 免疫印迹

用 RIPA 裂解液 (Beyotime Biotechnology 公司, 美国) 裂解细胞, 提取蛋白, 使用 Bradford 法测量蛋白浓度。蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳后, 转移到 PVDF 膜 (Millipore Billerica 公司, 美国)。使用相应的一抗孵育 PVDF 膜, 4℃ 过夜, HRP 标记的二抗 37℃ 孵育 2 h。加入 ECL 发光液 (Beyotime Biotechnology 公司, 美国) 显影, 蛋白条带使用 Quantity One 软件检测 (Bio-Rad 公司, 美国)。

1.3 统计学方法

使用 SPSS13.0 软件对数据进行处理, 实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。所有实验均独立重复 3 次, *t* 检验或者单因素方差分析 (ANOVA) 比较组间差异, $P \leq 0.05$ 认为有统计学差异^[9]。

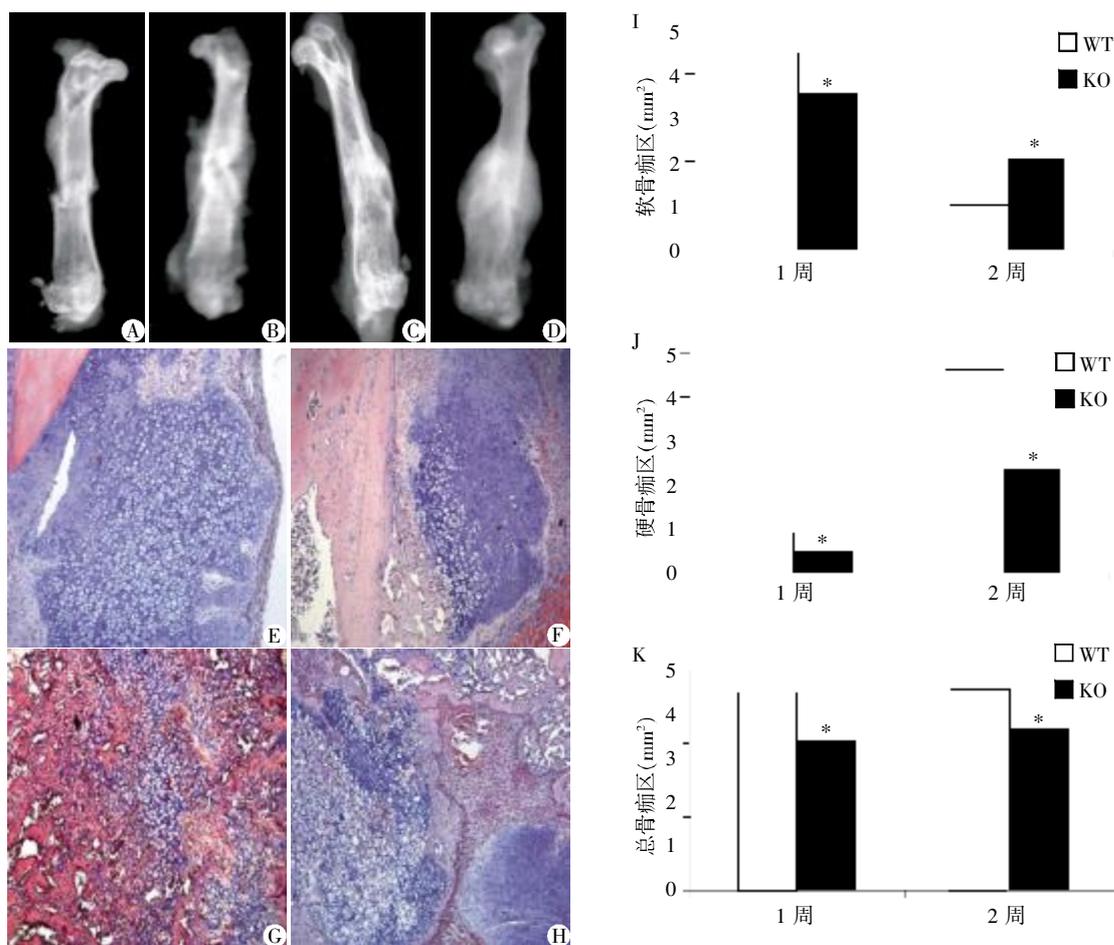
2 结果

2.1 PTHKO 小鼠骨折愈合延迟

分别于骨折后 1、2 周摄 X 线片, 结果如下: 骨折 1 周后, WT 小鼠和 KO 小鼠均可见较清晰的骨折线, 骨折端周边可见少量钙化区域, 但是 KO 小鼠的钙化区域小于 WT 小鼠 (图 1A、B)。骨折 2 周后, WT 小鼠骨折线开始模糊, 外生骨痂区域大而清晰; KO 小鼠骨折线比较清晰, 外生骨痂较小 (图 1C、D)。组织切片 HE 染色显示: 骨折后 1 周, WT 小鼠和 KO 小鼠骨折断端都可形成软骨性骨痂, WT 小鼠软骨痂面积为 $(4.51 \pm 0.56) \text{mm}^2$, KO 小鼠软骨痂面积为 $(3.63 \pm 0.42) \text{mm}^2$, WT 小鼠的骨痂范围明显大于 KO 小鼠 (图 1E、F)。骨折后 2 周, WT 小鼠总骨痂面积为 $(5.50 \pm 0.72) \text{mm}^2$, 软骨痂面积 $(1.25 \pm 0.25) \text{mm}^2$, 比较骨折后 1 周, 软骨出现明显的软骨内成骨且软骨区面积减少 (图 1G); KO 小鼠总骨痂面积为 $(4.40 \pm 0.78) \text{mm}^2$, 软骨痂面积 $(2.10 \pm 0.37) \text{mm}^2$, 表明 KO 小鼠骨折 2 周后软骨内成骨少于 WT 小鼠, 软骨区面积较大 (图 1H~K)。

2.2 PTHKO 小鼠的成骨障碍

为进一步明确 PTHKO 小鼠软骨内成骨障碍, 我们检测特异性成骨指标 OCN 活性。免疫组化结果显示: 骨折 1 周后, WT 小鼠 OCN 表达量为 80 ± 7 , KO 小鼠为 43 ± 8 , WT 小鼠成骨细胞活性约为 KO 小鼠 2 倍 (图 2A); 且 KO 小鼠活性成骨细胞多集中在骨痂边缘 (图 2B)。骨折 2 周后, WT 小鼠 OCN 表达量为 165 ± 11 , KO 小鼠 OCN 表达量为 114 ± 9 , 说明骨折 2 周后成骨细胞活性较 1 周均有所上升,



A: PTHKO 小鼠骨折后 1 周, 可见骨折线清晰, 外生骨痂较少; B: PTHWT 小鼠骨折后 1 周, 可见骨折线清晰, 外生骨痂较多; C: PTHKO 小鼠骨折后 2 周, 可见骨折线较清晰, 外生骨痂较薄; D: PTHWT 小鼠骨折后 2 周可见骨折线模糊, 外生骨痂较厚; E: PTHWT 小鼠骨折后 1 周, 骨折端可见软骨痂存在, 范围较大(HE 染色, ×100); F: PTHKO 小鼠骨折后 1 周, 骨折端可见软骨痂存在, 范围较小(HE 染色, ×100); G: PTHWT 小鼠骨折后 2 周, 可见骨折端明显的软骨内成骨且软骨区面积减少(HE 染色, ×100); H: PTHKO 小鼠骨折后 2 周, 可见骨折端软骨内成骨不明显, 软骨区面积较大(HE 染色, ×100); I、J、K 分别为软骨痂区、硬骨痂区和总骨痂区域的统计图表。与 PTHWT 小鼠比较, **P* < 0.05。

图 1 骨折愈合情况

Figure 1 State of fracture healing

KO 小鼠的 OCN 表达量约为 WT 小鼠表达量的 3/4 (图 2C、D、E)。

2.3 PTHKO 小鼠血管形成减少

骨折 1 周后, WT 小鼠骨痂边缘形成的血管生成区面积较大, 约为 $(1.27 \pm 0.24) \text{ mm}^2$ (图 3A), KO 小鼠的血管形成范围约为 WT 小鼠的 1/2, 仅有 $(0.71 \pm 0.28) \text{ mm}^2$ (图 3B); 骨折 2 周后, WT 小鼠软骨痂内可见大量血管面积为 $(3.22 \pm 0.38) \text{ mm}^2$, 而 KO 小鼠血管形成面积为 $(1.87 \pm 0.43) \text{ mm}^2$, 面积小于 WT 小鼠, 且集中于骨痂边缘(图 3C、D、E)。

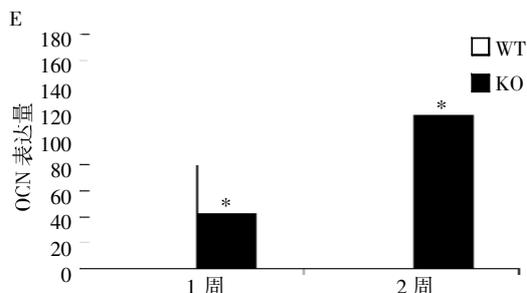
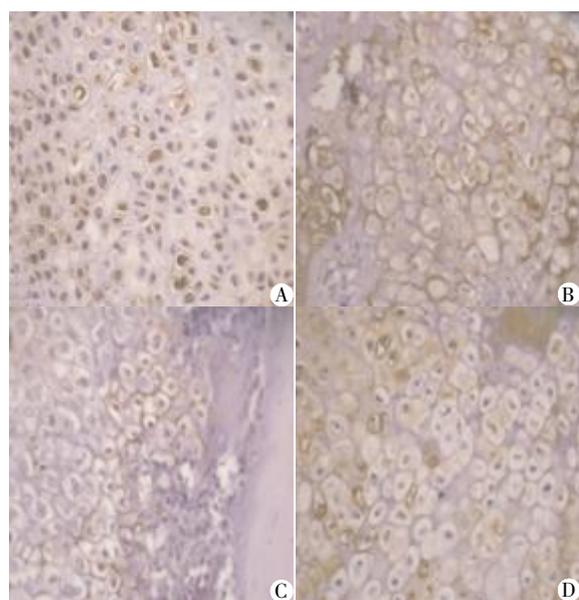
2.4 PTHKO 小鼠血管生长因子表达减少

骨折 1 周后, WT 小鼠 VEGF 表达量为 113 ± 27 , KO 小鼠表达量约为 45 ± 28 (图 4A、B), KO 小鼠表达量仅为 WT 小鼠的 1/2 (图 4E); 骨折 2 周

后, VEGF 表达量在 WT 和 KO 小鼠中均增加, WT 小鼠 VEGF 表达量为 150 ± 18 , KO 小鼠表达量约为 103 ± 22 , WT 小鼠表达量仍明显高于 KO 小鼠 (图 4C、D)。Western blot 检测结果证实了这种差异 (图 4F)。

3 讨论

骨折愈合过程中, 血管的再生与重塑至关重要。早期骨痂因为缺氧而导致软骨大量分化, 形成软骨痂。随着软骨的成熟、软骨基质的分泌与矿化, 血管沿着矿化的基质长入骨痂。在氧充足的情况下, 成骨细胞会大量分化成熟, 使得基质矿化, 生成大量编织骨^[1-2]。由此可见, 血管生成与软骨内成骨关系密切。但是成骨细胞与血管形成之间相互作用的机制目前



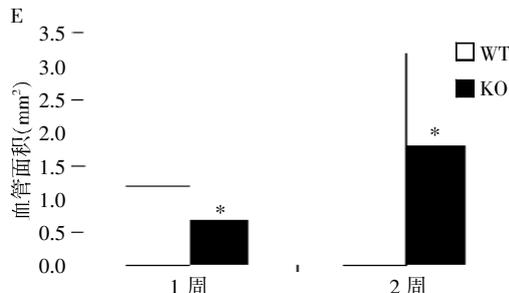
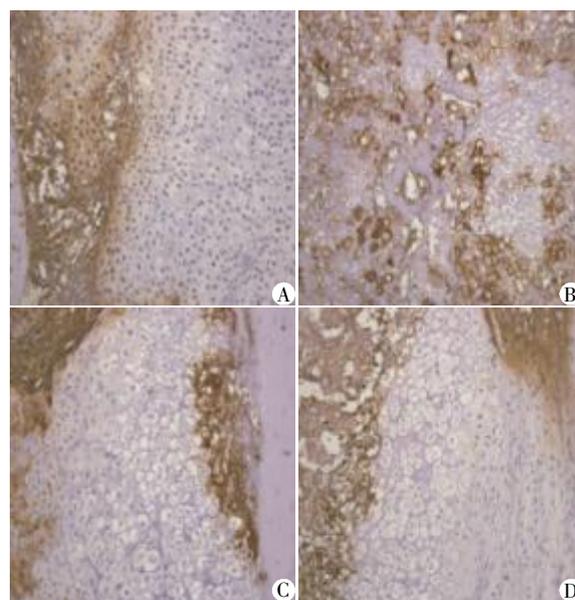
A: PTHWT 小鼠骨折后 1 周; B: PTHKO 小鼠骨折后 1 周; C: PTHWT 小鼠骨折 2 周后; D: PTHKO 小鼠骨折 2 周后; E: OCN 表达量统计图表, 与 PTHWT 小鼠比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 成骨细胞活性(免疫组化, $\times 400$)

Figure 2 Activity of osteoblasts(Immunohistochemistry, $\times 400$)

尚不明确。既往研究表明可能的机制有以下 3 个方面:①在血供充足的情况下, BMP2 等细胞因子促进早期软骨样组织向成骨方向分化^[9];②促进血管生成的细胞因子如: VEGF 等促进成骨细胞募集、活化^[10-11];③成骨细胞排列在毛细血管壁, 随着毛细血管长入软骨, 加速软骨内成骨^[12]。本研究发现在 PTH 内源性缺失的小鼠体内, 随着 VEGF 表达下降, 成骨细胞活性以及血管生成也受到抑制。这表明血管生成与软骨内成骨之间具有一定的相互联系。

我们前期的研究表明, 与野生型小鼠相比 PTH 基因敲除小鼠的骨小梁容积和成骨细胞数量明显较少^[13]。同时, 内源性 PTH 的缺失还可减弱外源性 PTH 的成骨作用, 从而导致骨折愈合的延迟^[14]。人工合成的 PTH 作为一种促进骨合成的药物, 小剂量间断注射可促进骨折愈合^[3-4]; PTH 既可以直接促进成骨细胞募集和分化, 增加合成代谢, 也可间接提高成骨细胞中 VEGF 的表达水平^[5-6]。在 PTH 基因敲



A: PTHWT 小鼠骨折后 1 周; B: PTHKO 小鼠骨折后 1 周; C: PTHWT 小鼠骨折后 2 周; D: PTHKO 小鼠骨折后 2 周; E: PECAM 阳性区域即血管分布面积统计图, 与 PTHWT 小鼠比较, * $P < 0.05$ 。

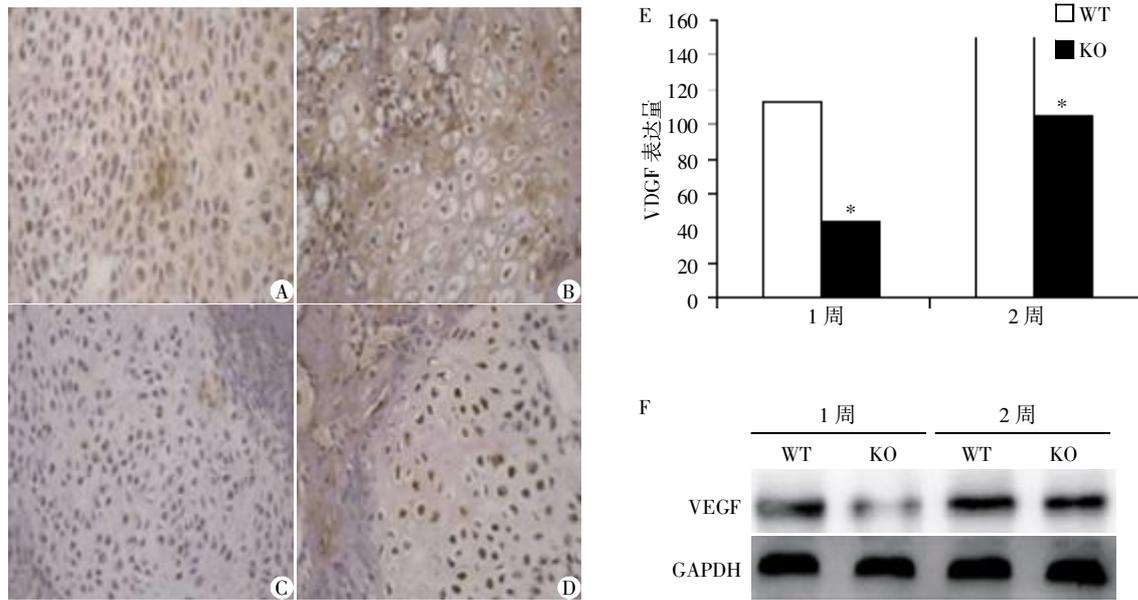
图 3 血管活性(免疫组化, $\times 100$)

Figure 3 Activity of angiogenesis(Immunohistochemistry, $\times 100$)

除小鼠体内, VEGF 表达量和成骨细胞活性同时下降, 说明 PTH 可能参与血管生成和成骨活性之间的调控。

VEGF 作为生长因子家族的一员, 不仅可促进血管生成, 还可直接作用于成骨祖细胞, 促进其募集以及分化, 从而促进骨折愈合^[11]。内源性 VEGF 基因缺陷导致小鼠干细胞形成成骨细胞和破骨细胞的能力减弱, 也证实 VEGF 可以直接影响成骨细胞的分化、成熟以及生物学功能。由此可见, VEGF 表达量下降可能是导致 PTH 敲除小鼠体内血管生成以及成骨细胞活性共同下降的原因之一。

综上所述, 本研究论证了内源性 PTH 缺失可通过降低间充质干细胞或者成骨细胞释放 VEGF, 减少骨折端血管形成, 抑制成骨活性, 从而影响软骨内成骨, 最终导致骨折愈合延迟。由于血管形成和软骨内成骨之间关系极其复杂, 其具体机制仍需深入探讨。



A: PTHWT 小鼠骨折后 1 周 VEGF 免疫组化(×400); B: PTHKO 小鼠骨折后 1 周 VEGF 免疫组化(×400); C: PTHWT 小鼠骨折后 2 周 VEGF 免疫组化(×400); D: PTHKO 小鼠骨折后 2 周 VEGF 免疫组化(×400)。E: 免疫组化检测 VEGF 表达量统计图表, 与 PTHWT 小鼠比较, * $P < 0.05$; F: VEGF 表达量的 Western blot 检测。

图 4 VEGF 的表达活性

Figure 4 Expression activity of VEGF

[参考文献]

[1] Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules[J]. *Injury*, 2007, 38 (1): 11-25

[2] Geris L, Gerisch A, Van Oosterwyck H. Angiogenesis in bone fracture healing: A bioregulatory model[J]. *J Theoretical Biol*, 2008, 251(1): 137-158

[3] Censure RC, Gardella TJ, Juppner H. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328 (3): 666-678

[4] Barnes GL, Kakar S, Morgan EF, et al. Stimulation of fracture-healing with systemic intermittent parathyroid hormone treatment [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2008, 90(1): 120-127

[5] Prisby R, Guignandon A, Lafage-Proust MH. Intermittent PTH(1-84) is osteoanabolic but not osteoangiogenic and relocates bone marrow blood vessels closer to bone-forming sites [J]. *J Bone Mineral Res*, 2011, 26 (11): 2583-2596

[6] Esbrit P, Alvarez-Arroyo MV, Caramelo C. C-terminal parathyroid hormone-related protein increases vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(6): 1085-1092

[7] Miao D, He B, Lanske B, et al. Skeletal abnormalities in Pth-null mice are influenced by dietary calcium [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(4): 2046-2053

[8] Marturano JE. An improved murine femur fracture device for bone healing studies [J]. *J Biomech*, 2008, 41 (6): 1222-1228

[9] Tomlinson RE, McKenzie JA, Silva MJ. Angiogenesis is required for stress fracture healing in rats [J]. *Bone*, 2013, 52(1): 212-219

[10] Street J, Bao M, Filvaroff EH, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(15): 9656-9661

[11] Keramaris NC, Calori GM, Giannoudis VS, et al. Fracture vascularity and bone healing: A systematic review of the role of VEGF[J]. *Injury*, 2008, 39(2): 45-57

[12] Rhee Y, Park SY, Kim YM, et al. Angiogenesis inhibitor attenuates parathyroid hormone-induced anabolic effect [J]. *Biomed Pharmacother*, 2009, 63(1): 63-68

[13] Miao D, He B, Karaplis AC, et al. Parathyroid hormone is essential for normal fetal bone formation [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(9): 1173-1182

[14] Ren YX, Liu B, Miao DS. Endogenous PTH deficiency impairs fracture healing and impedes the fracture-healing efficacy of exogenous PTH (1-34)[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): 1-10

[收稿日期] 2013-10-11