

论著·基础研究

胃泌素对大鼠激素性骨坏死的治疗作用

罗亚平¹, 李莹莹², 胡纯婷², 王井龙², 傅国辉^{1,2}, 陈诗慧²

上海交通大学 1. 附属第一人民医院病理中心, 上海 200080; 2. 基础医学院病理中心, 细胞分化与凋亡教育部重点实验室, 上海 200025

[摘要] **目的**·探讨胃泌素对大鼠激素性骨坏死的治疗作用。**方法**·24只SD大鼠随机分为正常对照组(正常组)、骨坏死对照组(骨坏死组)、骨坏死治疗组(治疗组)。骨坏死组和治疗组经尾静脉注射脂多糖1次/d(600 μg/kg)×2 d,同时肌肉注射甲基泼尼松龙1次/d(50 mg/kg)×3 d;对照组注射等量生理盐水。甲基泼尼松龙末次注射后,治疗组腹腔注射胃泌素1次/d(800 μg/kg)×14 d,骨坏死组注射等量生理盐水。治疗结束后,大鼠处死取股骨头生长板下骨小梁,通过苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, H-E染色法)、免疫组织化学法、荧光染色法、戈尔德染色法进行组织学分析和鉴定。**结果**·成功构建大鼠激素性骨坏死模型。H-E染色结果显示,治疗组较骨坏死组血栓面积、脂肪细胞数量及面积显著减少(均 $P<0.05$);免疫组织化学试验结果显示,治疗组较骨坏死组成骨相关转录因子(Sp7)阳性细胞显著增加($P<0.01$);戈尔德染色与荧光检测结果显示,治疗组较骨坏死组类骨质长度和面积明显增加(均 $P<0.01$),骨表面骨形成率和矿化沉积速率明显升高(均 $P<0.01$)。**结论**·胃泌素能够通过抑制骨髓中骨小梁内的血栓和脂肪形成、促进骨小梁的成骨来治疗大鼠激素性骨坏死。

[关键词] 激素性骨坏死;胃泌素;骨组织形态计量学;大鼠

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.03.007 **[中图分类号]** R68 **[文献标志码]** A

Therapeutic effect of gastrin on steroid-associated osteonecrosis in rats

LUO Ya-ping¹, LI Ying-ying², HU Chun-ting², WANG Jing-long², FU Guo-hui^{1,2}, CHEN Shi-hui²

1. Pathology Center, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China; 2. Key Laboratory of Cell Differentiation and Apoptosis of Chinese Ministry of Education, Pathology Center, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To investigate therapeutic effect of gastrin on steroid-associated osteonecrosis (SAON) in rat model. **Methods**·Twenty-four SD rats were randomly divided into three groups *i.e.* normal control group (normal group), SAON control group (SAON group) and SAON treatment group (treatment group). SAON group and treatment group were intravenously injected with lipopolysaccharide 1 time per day (600 μg/kg) for 2 d and meanwhile intramuscularly injected with methylprednisolone 1 time per day (50 mg/kg) for 3 d. Normal group was injected with normal saline of the same volumes. After steroid injections, treatment group was injected with gastrin 1 time per day (800 μg/kg) for 14 d, while SAON group was injected with normal saline of the same volumes. After the treatment, bone trabeculas below femoral head growth plate were dissected in the rats for bone histology. Hematoxylin-eosin (H-E) staining, immunohistochemistry, fluorescence staining and Goldner's trichrome staining were applied in this study. **Results**·SAON model in rats was successfully established. The result of H-E staining showed that compared with SAON group, thrombus area, number and area of fat cells in the bone marrows of treatment group obviously decreased (all $P<0.05$). Immunohistochemistry showed that osteogenic transcription factor (Sp7) positive cells in treatment group were more than those in SAON group ($P<0.01$). Compared with SAON group, osteoid length and area (Goldner's trichrome staining), and bone formation rate and bone mineralization deposition rate (fluorescence staining) all significantly increased in treatment group (all $P<0.01$). **Conclusion**·Gastrin can effectively treat SAON in rats by suppressing thrombus and lipid formation and enhancing bone-formation.

[Key words] steroid-associated osteonecrosis (SAON); gastrin; bone histomorphometry; rat

随着股骨头坏死的发生与发展,患者身体会出现一系列不可逆转的改变,例如软骨下骨塌陷等;当股骨头坏死进展到晚期,患者将面临关节置换手术。而在使用人工关节时,由于其主要缺陷为年限有限,对于年轻患者而言,其不仅需经历多次手术且手术难度逐渐增大,同时也将面临多次手术带来的经济压力和痛苦^[1]。前期,本课题组在

体内实验已证实,胃泌素能有效预防大鼠激素性骨坏死的发生,其病理机制是抑制骨小梁骨髓内血栓的形成和促进新骨形成^[2];该结果也是首次发现胃泌素可以预防激素性骨坏死的发生和发展,同时也提示胃肠激素与代谢性骨疾病之间存在的重要联系。本研究旨在探讨胃泌素对大鼠激素性骨坏死的治疗作用。

[作者简介] 罗亚平(1989—),女,硕士生;电子信箱:2270461489@qq.com。

[通信作者] 陈诗慧,电子信箱:chensh2015@shsmu.edu.cn。



1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠24只,16周龄,体质量(300 ± 20)g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。动物生产许可证号为SCXK(沪)2013-0016,使用许可证号为SYXK(沪)2013-0050。大鼠饲料为灭菌配合饲料,饲养程序按上海交通大学医学院实验动物科学部操作规程进行。

1.2 检测方法

1.2.1 建立大鼠激素性骨坏死模型 24只SD大鼠依据文献^[3]建立的激素性骨坏死模型造模。随机分为正常对照组(正常组)、骨坏死对照组(骨坏死组)、骨坏死治疗组(治疗组)。骨坏死组和治疗组经尾静脉注射脂多糖(美国Sigma-Aldrich),1次/d \times 2d,每次剂量为600 μ g/kg;同时肌内注射甲基泼尼松龙(美国Pharmacia & Upjohn),1次/d \times 3d,每次剂量为50 mg/kg。正常组注射等量生理盐水。末次注射后,骨坏死组注入生理盐水,治疗组腹腔注射胃泌素(上海强耀生物有限公司),1次/d \times 14d,每次剂量为800 μ g/kg。24只SD大鼠在处死前10d皮下注射钙黄绿素(瑞士Sigma-Aldrich)15 mg/kg 1次,处死前3d皮下注射二甲酚橙(瑞士Sigma-Aldrich)90 mg/kg 1次。该2种荧光可以显示新骨的沉积,钙黄绿素发出绿色荧光,二甲酚橙发出红色荧光,根据红光和绿光之间的距离可以判断骨的重建速度,即距离越宽说明新骨的沉积速度越快。治疗结束后,大鼠处死取股骨头生长板下骨小梁进行组织学分析和鉴定。所有的动物实验均经上海交通大学医学院伦理委员会批准(中国上海,编号A-2016-033)。

1.2.2 苏木精-伊红染色检测 样本经10%中性甲醛固定,10%乙二胺四乙酸二钠(EDTA)脱钙,石蜡包埋处理;在Leica半自动切片仪上,切成厚度5 μ m的组织切片;切片经二甲苯脱蜡,再经乙醇梯度脱蜡,水洗;苏木精浸染5 min,水洗;伊红浸染5 min,水洗;梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。显微镜下观察血栓的形成,拍照后利用ImageJ软件分析,计算骨髓中血栓面积、脂肪细胞数量和面积。

1.2.3 免疫组织化学分析 切片经二甲苯脱蜡、乙醇梯度脱蜡、抗原修复后,5%牛血清白蛋白室温孵育,山羊血清封闭;滴加成骨相关转录因子(Sp7)抗体(英国Abcam),4 $^{\circ}$ C过夜,PBS冲洗;滴加二抗[基因科技(上海)股份有限公司],室温孵育30 min,PBS冲洗;二氨

基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染,乙醇梯度脱水,封片。光学显微镜下观察并拍照,计算Sp7阳性细胞长度(Sp7在成骨细胞中表达,成骨细胞覆盖在骨表面,在二维图中呈线性分布)。

1.2.4 荧光显微镜检测 样本经10%中性甲醛固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,甲基丙烯酸甲酯(MMA,德国Mecck-Schuchardt)包埋处理;在Leica半自动切片仪上,切成厚度为5 μ m的硬组织切片,荧光显微镜下观察,拍照后利用ImageJ软件分析骨重建的速度,包括骨表面骨形成率和矿化沉积速率。

1.2.5 戈尔德染色分析 硬组织切片放入丙酮中脱去树脂,双蒸水漂洗2次;苏木精染色,双蒸水漂洗,用0.5%酸性乙醇分化20 s;偶氮红(美国Sigma)染色,1%乙酸漂洗;磷钼酸(美国Sigma)染色,双蒸水漂洗;品绿(美国Sigma)染色,双蒸水漂洗;梯度脱水,二甲苯透明,封片。光学显微镜下观察类骨质的形成,拍照后利用ImageJ软件分析,计算类骨质长度和面积。

1.3 统计学方法

所有实验数据均采用SPSS 18.0统计软件进行分析。定量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示。对于正态分布的数据,多组间比较采用单因素方差分析,2组间比较采用 t 检验;对于非正态分布的数据,组间比较采用非参数检验。率的比较采用 χ^2 检验和确切概率法。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

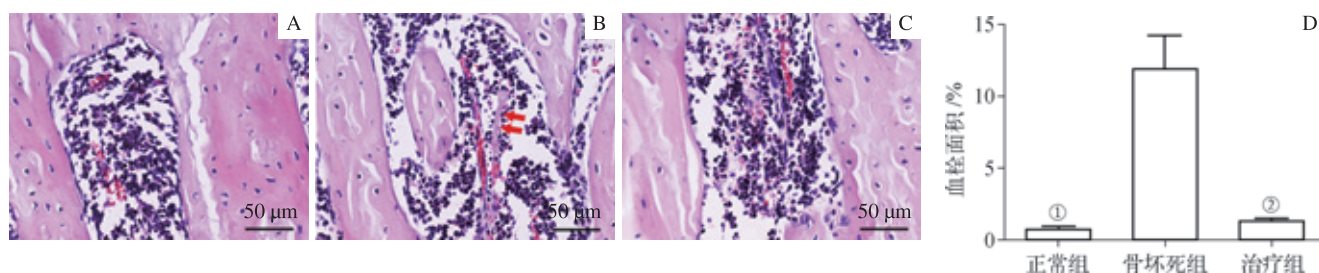
2 结果

2.1 胃泌素对骨髓中血栓形成的影响

苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, H-E)染色结果显示,骨坏死组血管内有更多的红色血栓形成。经软件分析,骨坏死组与正常组相比,骨髓中血栓面积明显增加($P=0.030$);治疗组与骨坏死组相比,骨髓中血栓面积明显减少($P=0.044$)(图1)。说明胃泌素能够抑制骨髓中血栓的形成。

2.2 胃泌素对骨髓中脂肪细胞的影响

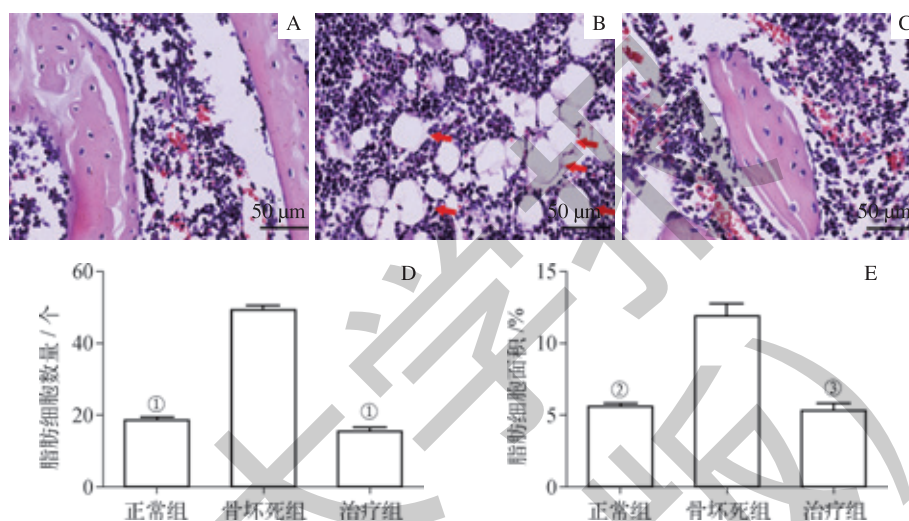
镜下可见,骨坏死组有更多的圆形或椭圆形脂肪细胞形成。与正常组相比,骨坏死组脂肪细胞的数量和面积明显增加(均 $P<0.01$);治疗组与骨坏死组相比,脂肪细胞数量和面积明显减少(均 $P<0.01$)(图2)。说明胃泌素能抑制脂肪细胞的形成。



注: A. 正常组; B. 骨坏死组; C. 治疗组; D. 血栓面积统计。A ~ C 为 H-E 染色, 箭头所指为血栓。[Ⓐ] $P=0.030$, [Ⓑ] $P=0.044$, 与骨坏死组比较。

图 1 胃泌素对骨髓中血栓形成的影响

Fig 1 Effect of gastrin on the formation of thrombus in marrows



注: A. 正常组; B. 骨坏死组; C. 治疗组; D. 脂肪细胞数量统计; E. 脂肪细胞面积统计。A ~ C 为 H-E 染色, 箭头所指为脂肪细胞。[Ⓐ] $P=0.000$, [Ⓑ] $P=0.002$, [Ⓒ] $P=0.003$, 与骨坏死组比较。

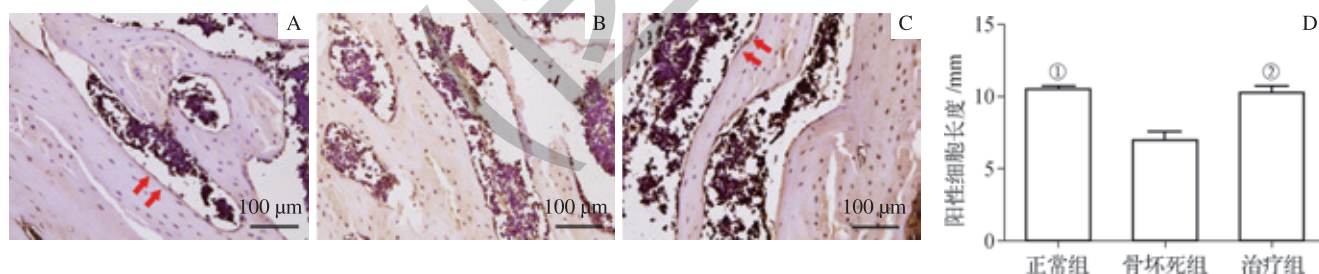
图 2 胃泌素对骨髓中脂肪细胞形成的影响

Fig 2 Effect of gastrin on the formation of fat cells in marrows

2.3 胃泌素对骨髓中 Sp7 表达的影响

免疫组织化学检测结果显示, 正常组和治疗组的骨表面有较多 Sp7 阳性细胞覆盖。骨坏死组与正常组相比,

Sp7 的表达明显减少 ($P=0.002$); 治疗组与骨坏死组相比, Sp7 的表达明显增加 ($P=0.005$) (图 3)。提示胃泌素能促进 Sp7 的表达。



注: A. 正常组; B. 骨坏死组; C. 治疗组; D. Sp7 阳性细胞长度统计。A ~ C 为免疫组织化学染色, 箭头所指为 Sp7 阳性细胞。[Ⓐ] $P=0.002$, [Ⓑ] $P=0.005$, 与骨坏死组比较。

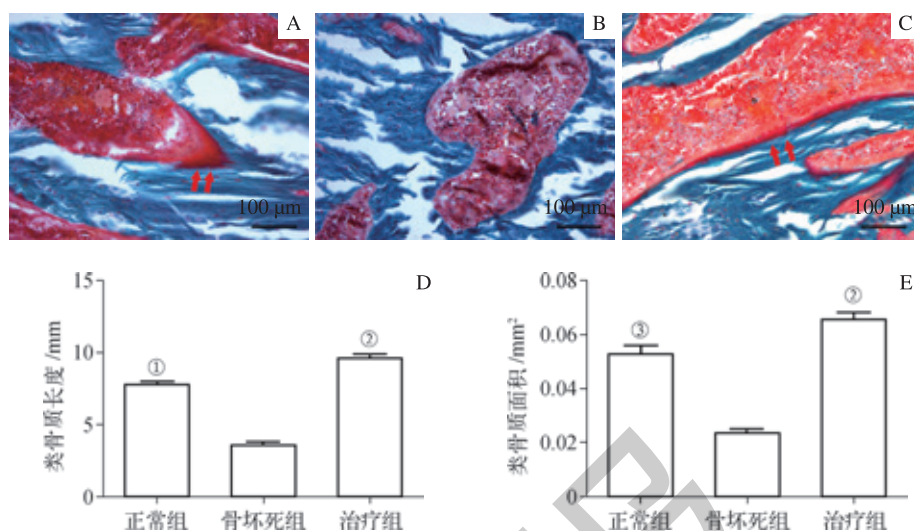
图 3 胃泌素对骨髓中 Sp7 表达的影响

Fig 3 Effect of gastrin on the expression of Sp7 in marrows

2.4 胃泌素对骨髓中类骨质形成的影响

戈尔德染色结果显示, 治疗组与正常组有更多的红色类骨质形成。骨坏死组与正常组相比, 类骨质长度和面积

均明显减少 (均 $P<0.01$); 治疗组与骨坏死组相比, 类骨质长度和面积均明显增加 (均 $P<0.01$) (图 4)。说明胃泌素能促进类骨质的形成。



注: A. 正常组; B. 骨坏死组; C. 治疗组; D. 类骨质长度统计; E. 类骨质面积统计。A ~ C 为戈尔德染色, 箭头所指为类骨质。① $P=0.002$, ② $P=0.003$, ③ $P=0.009$, 与骨坏死组比较。

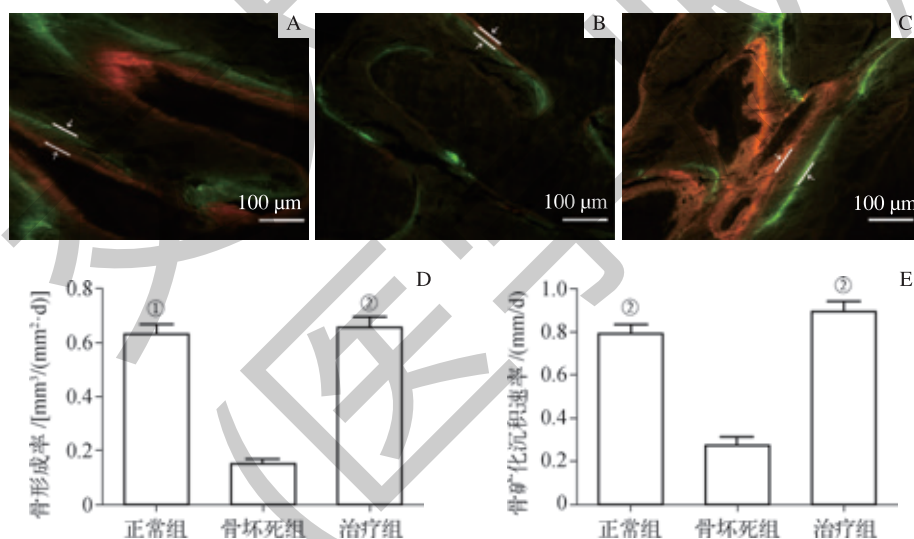
图 4 胃泌素对骨髓中类骨质形成的影响

Fig 4 Effect of gastrin on the formation of osteoid in marrows

2.5 胃泌素对骨重建速度的影响

荧光显微镜下观察, 正常组和治疗组红色荧光和绿色荧光之间的距离较宽, 而骨坏死组较窄。与正常组相比, 骨坏

死组骨表面骨形成率和矿化沉积速率明显降低 (均 $P<0.01$); 治疗组与骨坏死组相比, 骨表面骨形成率和矿化沉积速率明显升高 (均 $P<0.01$) (图 5)。提示胃泌素能加快骨重建速度。



注: A. 正常组; B. 骨坏死组; C. 治疗组; D. 骨表面骨形成率统计; E. 骨矿化沉积速率统计。A ~ C 为荧光显微镜下的观察结果, 箭头之间距离为红色荧光与绿色荧光之间的垂直距离。① $P=0.007$, ② $P=0.009$, 与骨坏死组比较。

图 5 胃泌素对骨重建速度的影响

Fig 5 Effect of gastrin on the bone reconstruction speed

3 讨论

基于胆囊收缩素 B 受体 (cholecystokinin B receptor, CCKBR, 也称胃泌素受体) 的研究发现, CCKBR^{-/-} 小鼠骨量减少可出现骨质疏松症^[4-5]; 但尚无关于胃泌素与股骨头坏死之间关系的实验证据, 尤其在胃泌素治疗和预防骨

坏死的作用方面。本研究的结果证实, 胃泌素能有效治疗大鼠激素性骨坏死的发生; 且结合本研究以及本课题组以往的动物实验结果发现^[6-7], 对大鼠腹腔注射 800 μg/kg 胃泌素即可观察到其对骨坏死的治疗作用, 未观察到明显不良反应。

组织病理学发现, 临床早期激素性骨坏死与成骨细胞

被抑制、破骨细胞作用增强、过量的脂质沉积和血栓形成有关,但尚未出现关节塌陷^[8-9]。本研究中,大鼠激素性骨坏死模型也发生了相应的病理学改变;而在接受胃泌素治疗后,模型大鼠的骨坏死病理变化得到明显改善,其主要是通过减少生长板下骨小梁骨髓内血栓的形成、促进新骨的生成来实现。

胃泌素的干预能够抑制脂肪沉积。脂肪沉积在血管周围可能阻碍了骨髓的血液灌注,从而促进骨坏死的发生。骨坏死组的大鼠骨髓中脂肪沉积显著增加,可能是因为类固醇激素和脂多糖都会影响脂质代谢,进而导致脂肪堆积。然而,在治疗组胃泌素抑制了脂质积累的能力,因此胃泌素对于骨坏死中的脂肪堆积具有抑制作用。

胃泌素的干预还能够促进 Sp7 的表达。Sp7 又称锌指结构转录因子 (Osterix),由 Sp7 基因编码;Sp7 的表达可使间充质细胞向成骨细胞分化,其在骨形成过程中发挥着

重要作用^[10]。在治疗组中胃泌素促进了 Sp7 的表达,说明胃泌素能够通过上调 Sp7 的表达来促进成骨细胞分化,从而促进成骨。

综上所述,本研究结果表明胃泌素能治疗大鼠的激素性骨坏死,其分子机制可能是胃泌素与其受体 CCKBR 结合和/或相互作用刺激胃酸分泌,从而促进胃肠道对钙的摄取和甲状旁腺激素对钙稳态的调节^[11-12]。胃泌素通过抑制骨髓中骨小梁内的血栓形成和促进骨小梁的成骨来治疗大鼠的激素性骨坏死,可见胃肠激素水平与骨代谢疾病发生之间可能存在着一定的关联。

后期,我们将在较大的动物模型中验证目前的实验结果,进一步评估胃泌素治疗激素性骨坏死和预防相关代谢性骨疾病的临床转化潜力^[13],以便将其应用于临床;此外,我们还将专注于胃泌素治疗激素性骨坏死的分子机制并开展更深入的研究。

参·考·文·献

- [1] Jiang J, Yang CH, Lin Q, et al. Does arthroplasty provide better outcomes than internal fixation at mid- and long-term followup? A meta-analysis[J]. Clin Orthop Relat Res, 2015, 473(8): 2672-2679.
- [2] Chen SH, Wang XL, Xie XH, et al. Comparative study of osteogenic potential of a composite scaffold incorporating either endogenous bone morphogenetic protein-2 or exogenous phytomolecule icaritin: an *in vitro* efficacy study[J]. Acta Biomater, 2012, 8(8): 3128-3137.
- [3] Qin L, Zhang G, Sheng H, et al. Multiple bioimaging modalities in evaluation of an experimental osteonecrosis induced by a combination of lipopolysaccharide and methylprednisolone[J]. Bone, 2006, 39(4): 863-871.
- [4] Zheng LZ, Liu Z, Lei M, et al. Steroid-associated hip joint collapse in bipedal emus[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76797.
- [5] Cao HJ, Zheng LZ, Wang N, et al. Src blockage by siRNA inhibits VEGF-induced vascular hyperpermeability and osteoclast activity: an *in vitro* mechanism study for preventing destructive repair of osteonecrosis[J]. Bone, 2015, 74: 58-68.
- [6] Cui Y, Li SB, Peng XC, et al. Trastuzumab inhibits growth of HER2-negative gastric cancer cells through gastrin-initialized CCKBR signaling[J]. Dig Dis Sci, 2015, 60(12): 3631-3641.
- [7] Song LJ, Liu RJ, Zeng Z, et al. Gastrin inhibits a novel, pathological colon cancer signaling pathway involving EGR1, AE2, and P-ERK[J]. J Mol Med (Berl), 2012, 90(6): 707-718.
- [8] Fehring TK, Fehring KA, Anderson LA, et al. Catastrophic varus collapse of the tibia in obese total knee arthroplasty[J]. J Arthroplasty, 2017, 32(5): 1625-1629.
- [9] Kubo Y, Motomura G, Ikemura S, et al. Factors influencing progressive collapse of the transposed necrotic lesion after transtrochanteric anterior rotational osteotomy for osteonecrosis of the femoral head[J]. Orthop Traumatol Surg Res, 2017, 103(2): 217-222.
- [10] Fisceletti M, Biggin A, Bennetts B, et al. Novel variant in Sp7/Osx associated with recessive osteogenesis imperfecta with bone fragility and hearing impairment[J]. Bone, 2018, 110: 66-75.
- [11] Schinke T, Schilling AF, Baranowsky A, et al. Impaired gastric acidification negatively affects calcium homeostasis and bone mass[J]. Nat Med, 2009, 15(6): 674-681.
- [12] Kolp E, Wilkens MR, Pendl W, et al. Vitamin D metabolism in growing pigs: influence of UVB irradiation and dietary vitamin D supply on calcium homeostasis, its regulation and bone metabolism[J]. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), 2017, 101(Suppl 1): 79-94.
- [13] Chen S, Zheng L, Zhang JA, et al. Novel bone targeting delivery system carrying phytomolecule icaritin for prevention of steroid-associated osteonecrosis in rats[J]. Bone, 2018, 106: 52-60.

[收稿日期] 2017-12-11

[本文编辑] 瞿麟平