

骨硬化素单链抗体对去卵巢模型大鼠骨质疏松性骨折愈合的影响^Δ

倪杰*, 侯宇, 艾笛, 姚琦[#](首都医科大学附属北京世纪坛医院骨科, 北京 100038)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)45-4240-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.45.06

摘要 目的:研究骨硬化素单链抗体对去卵巢模型大鼠骨质疏松性骨折愈合的影响。方法:取24只大鼠,手术切除卵巢后1周,用开放手术建立左下肢股骨中段横行骨折模型,随机分为模型组和治疗组,每组12只,模型组大鼠鞘内注射磷酸盐缓冲液0.2 ml,治疗组大鼠鞘内注射骨硬化素单链抗体2.5 mg/kg,每周2次。连续给药12周后,检测各组大鼠血清中钙、磷、碱性磷酸酶、骨钙素含量,左侧股骨的骨密度(BMD)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁间距(Tb.Sp)、骨体积分数(BVF)、结构模型指数(SMI)和形态学变化。结果:模型组大鼠血清中钙、磷、碱性磷酸酶、骨钙素含量分别为(1.92±0.54) mmol/L、(1.54±0.61) mmol/L、(64.43±13.92) U/L、(9.04±0.71) ng/ml,治疗组大鼠上述指标含量分别为(2.43±0.28) mmol/L、(1.58±0.26) mmol/L、(79.25±12.49) U/L、(9.57±0.83) ng/ml;模型组大鼠BMD、Tb.Th、Tb.Sp、BVF、SMI分别为(91.51±12.33) mg/cc、(0.09±0.02) mm、(0.47±0.22) mm、0.18±0.03、1.42±0.31,治疗组大鼠上述指标分别为(135.15±11.12) mg/cc、(0.01±0.03) mm、(0.34±0.11) mm、0.29±0.01、0.65±0.34。与模型组比较,治疗组大鼠血清中钙、碱性磷酸酶含量和BMD、BVF均明显增加($P<0.05$),SMI明显减小($P<0.05$),其余指标差异无统计学意义($P>0.05$)。镜下观察治疗组大鼠成骨细胞数量比模型组多。结论:骨硬化素单链抗体对去卵巢模型大鼠骨质疏松性骨折愈合有促进作用。

关键词 骨硬化素;单链抗体;去卵巢;大鼠;骨质疏松;骨折愈合

Effects of Sclerostin Single Chain Fv on Osteoporotic Fracture Healing of Ovariectomized Rats

NI Jie, HOU Yu, AI Di, YAO Qi (Dept. of Orthopedics, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the impact of sclerostin single chain Fv on osteoporotic fracture healing in ovariectomized rats. **METHODS:** 24 SD rats were ovariectomized. One week later, the middle shaft transverse fractures model of the femur of left lower extremity was established. Model rats were randomly divided into model group and treatment group with 12 rats in each group. Model group was given intrathecal injection of phosphate buffer 0.2 ml, and treatment group was given intrathecal injection of sclerostin single chain Fv 2.5 mg/kg, twice a week, for consecutive 12 weeks. The contents of calcium, phosphorus, alkaline phosphatase and osteocalcin in serum were determined. BMD, Tb.Th, Tb.Sp, BVF, SMI and morphologic change of left femur were also determined. **RESULTS:** The contents of calcium, phosphorus, alkaline phosphatase and osteocalcin in serum of model group were (1.92±0.54) mmol/L, (1.54±0.61) mmol/L, (64.43±13.92) U/L and (9.04±0.71) ng/ml; above index of treatment group were (2.43±0.28) mmol/L, (1.58±0.26) mmol/L, (79.25±12.49) U/L and (9.57±0.83) ng/ml. BMD, Tb.Th, Tb.Sp, BVF and SMI of model group were (91.51±12.33) mg/cc, (0.09±0.02) mm, (0.47±0.22) mm, 0.18±0.03 and 1.42±0.31; above index of treatment group were (135.15±11.12) mg/cc, (0.01±0.03) mm, (0.34±0.11) mm, 0.29±0.01 and 0.65±0.34, respectively. Compared with model group, the contents of calcium and alkaline phosphatase, BMD and BVF were increased significantly in treatment group ($P<0.05$), and SMI was decreased significantly ($P<0.05$); there was no statistical significance in other index ($P>0.05$). The amount of osteoblast in treatment group was more than in model group under microscope. **CONCLUSIONS:** sclerostin single chain Fv promotes osteoporotic fracture healing in ovariectomized rats.

KEY WORDS Sclerostin; Single chain Fv; Ovariectomized; Rats; Osteoporosis; Fracture healing

骨质疏松是一种以低骨量、骨组织微结构破坏为特征导致骨骼脆性增加和易骨折的全身性代谢障碍性疾病,发病率非常高,不仅给患者带来巨大的身心痛苦,而且给患者家庭和社会带来了沉重的经济负担。目前骨质疏松的药物治疗方法主要有:(1)激素替代治疗;(2)补充钙剂及维生素D;(3)抑制骨吸收;(4)促进骨形成;(5)中药治疗。骨硬化蛋白(Sclerostin)单克隆抗体能促进骨形成,增加骨密度,可能是未来治疗

骨质疏松症理想的选择^[1-3],但单克隆抗体存在分子质量过大、免疫原性强等缺点。单链抗体(Single chain Fv)是在单克隆抗体基础上发展起来的一种新型抗体,具有分子质量小、渗透性高的特点,有较高抗原结合活性。单链抗体是由免疫球蛋白的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)通过一段连接肽连接而成的单一肽链重组蛋白,具有完全抗原结合位点的最小抗体片断,便于通过基因工程进行改造,具有更加广阔的临床应用前景^[9-10]。因此,本研究在获得骨硬化素单链抗体基础上,拟探讨骨硬化素单链抗体对去卵巢模型大鼠骨量丢失的抑制作用,研究其对骨质疏松性骨折愈合的影响,为其临床应用提供理论依据。

1 材料

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81000796)

* 医师。研究方向:骨科。电话:010-63926627。E-mail: tank-love@263.net

通信作者:副主任医师,博士。研究方向:骨科。电话:010-63926160。E-mail: yqjh2010@163.com

1.1 仪器

μCT80 型微计算机断层扫描技术(Micro-CT)显微镜(瑞士 SCANCO Medical AG 公司);L8-80MXL90 离心机(美国 Beckman 公司,离心半径:13.5 cm)。

1.2 药品与试剂

骨质疏松单链抗体(粉末,中国科学院微生物研究所提供,批号:2011045,使用时配制成 2.5 mg/ml);10% 水合氯醛溶液(解放军总医院药剂科提供);注射用青霉素(华北制药集团有限责任公司,批号:F3071108,规格:每支 80 万 u)。

1.3 动物

SD 大鼠 24 只,♀,3 月龄,SPF 级,体质量为 210~220 g,购自北京大学医学部实验动物中心,许可证号:SCXK(京)2004-0001。

2 方法

2.1 建模^[1]

取大鼠 24 只,按 0.3 ml/100 g 腹腔注射 10% 水合氯醛溶液麻醉后,固定,于腰背部作正中切口,并向两侧游离皮下组织,于一侧腰背筋膜的肌肉与筋膜交界处切开,结扎输卵管后游离切除卵巢,缝合筋膜。双侧卵巢切除后切口内放入青霉素 8 万 u,缝合皮肤。术后 3 d 内每日注射青霉素 8 万 u 抗感染,每日碘伏消毒伤口,7 d 后拆线。所有大鼠都在同等条件下饲养,给予标准饲料。

2.2 分组与给药

取拆线后的大鼠,参照文献^[2]方法,用开放手术于左下肢股骨中段建立横行骨折模型,以直径 1 mm 克氏针髓内固定,术后分笼饲养,自由活动,按体质量随机分为模型组和治疗组,每组 12 只。模型组大鼠鞘内注射磷酸盐缓冲液(PBS)0.2 ml,治疗组大鼠根据预实验结果鞘内注射骨质疏松单链抗体 2.5 mg/kg,每周 2 次,连续给药 12 周。

2.3 指标考察

2.3.1 常规观察。术后观察所有大鼠是否出现感染、愈合是否良好、活动和进食是否正常,并每周称体质量。

2.3.2 血清中钙、磷、碱性磷酸酶和骨钙素的检测。两组大鼠给药 12 周后,按 0.3 ml/100 g 腹腔注射 10% 水合氯醛溶液进行麻醉,麻醉效果满意后,在眼后取血 1 ml,室温下 1 500 r/min 离心 10 min,取血清标本,送生化科检测大鼠血清中钙、磷、碱性磷酸酶含量,放射免疫法测定血清中骨钙素含量。

2.3.3 Micro-CT 检查。取所有大鼠的左侧股骨,用 70% 乙醇固定后,对股骨骨折端行 Micro-CT 扫描检查,最大分辨率 27 μm,间隔 21 μm。检测指标包括:骨密度(BMD)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁间距(Tb.Sp)、骨体积分数(BVF)、结构模型指数(SMI)。

2.3.4 骨形态学观察。取所有大鼠的左侧股骨,10% 中性福尔马林(pH 7.4)固定 7 d,PBS 清洗,pH 7.4 的 10% 乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙 10 d,PBS 清洗 3 次,置于三蒸水中过夜;标本脱水、石蜡包埋,切片 5 μm,脱蜡,以浓度梯度降低的乙醇水化,然后行常规苏木精-伊红(HE)染色,观察骨形态。

2.4 统计学处理

采用 SPSS 15.0 软件分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验标准。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 常规观察结果

所有大鼠术后切口未出现感染,愈合良好,活动和进食情况基本正常,每周大鼠的体质量变化无统计学意义($P>0.05$)。

3.2 血清中钙、磷、碱性磷酸酶和骨钙素含量结果

给药 12 周后,与模型组比较,治疗组大鼠血清中钙和碱性磷酸酶的含量均明显增加($P<0.05$),磷和骨钙素含量差异无统计学意义($P>0.05$)。两组大鼠血清中钙、磷、碱性磷酸酶和骨钙素含量结果见表 1。

表 1 两组大鼠血清中钙、磷、碱性磷酸酶和骨钙素含量结果($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 1 The contents of calcium, phosphorus, alkaline phosphatase and osteocalcin in serum of rats in 2 groups ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	钙,mmol/L	磷,mmol/L	碱性磷酸酶,U/L	骨钙素,ng/ml
模型组	1.92±0.54	1.54±0.61	64.43±13.92	9.04±0.71
治疗组	2.43±0.28*	1.58±0.26	79.25±12.49*	9.57±0.83

与模型组比较: * $P<0.05$

vs. model group: * $P<0.05$

3.3 Micro-CT 扫描结果

镜下观察显示,治疗组大鼠左侧股骨骨折线模糊,骨痂连接断端,髓腔再通;模型组大鼠左侧股骨骨折线仍隐约可见,断端骨痂连接不紧密。Micro-CT 扫描显微镜图见图 1。

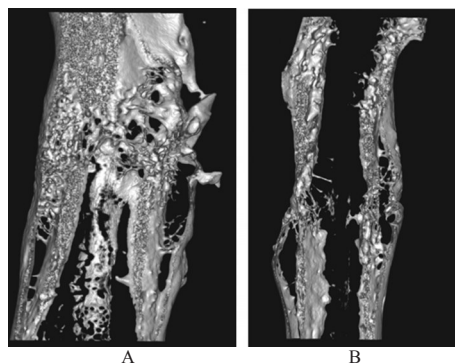


图 1 Micro-CT 扫描显微镜图

A. 模型组; B. 治疗组

Fig 1 Micro-CT scanning

A. model group; B. treatment group

与模型组比较,治疗组大鼠左侧股骨的 BMD、BVF 均明显增加($P<0.05$),SMI 明显减小($P<0.05$),Tb.Th、Tb.Sp 差异无统计学意义($P>0.05$)。两组大鼠左侧股骨的 Micro-CT 扫描结果见表 2。

表 2 两组大鼠左侧股骨的 Micro-CT 扫描结果($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 2 Micro-CT scanning of left femur of rats in 2 groups ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	BMD,mg/cc	Tb.Th,mm	Tb.Sp,mm	BVF,%	SMI
模型组	91.51±12.33	0.09±0.02	0.47±0.22	0.18±0.03	1.42±0.31
治疗组	135.15±11.12*	0.01±0.03	0.34±0.11	0.29±0.01*	0.65±0.34*

与模型组比较: * $P<0.05$

vs. model group: * $P<0.05$

3.4 骨形态观察结果

镜下观察显示,治疗组大鼠左侧股骨软骨质骨痂逐渐为骨性骨痂所替代,大量类骨质形成,部分标本可见板层骨形成,成骨细胞数量增多,骨性骨痂比例明显增加,体积增大且细胞浆染色较深;模型组大鼠左侧股骨软骨质成分较高,向骨性骨痂转化过程明显延迟,骨痂临近骨小梁细小松散,部分边缘骨吸收活跃。两组大鼠左侧股骨骨形态显微镜图见图 2(图中箭头所指为骨折线)。

4 讨论

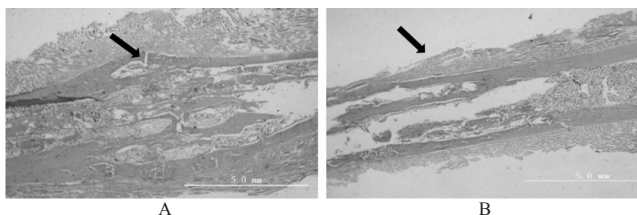


图2 两组大鼠左侧股骨的显微镜图(HE,×100)

A.模型组;B.治疗组

Fig 2 HE staining micrograph(HE,×100)

A. model group; B. treatment group

骨质疏松症是一个在世界范围内越来越引起人们重视的健康问题,其特点是患者的BMD和强度显著下降,导致脆性骨折,有很高的发病率和死亡率。抗骨质疏松研究已成为生命科学中富有挑战性且意义重大的领域。研究发掘作用于特定靶点的新型抗骨质疏松药物是当今治疗骨质疏松的重要研究方向^[13-15],而以骨硬化蛋白为靶点的抗体药物研发已成为国际抗骨质疏松药物研究的热点^[16-17]。目前,骨硬化素单克隆抗体已进入临床试验阶段,并取得了令人鼓舞的疗效;然而单链抗体与之相比,具有基因结构简单、构建表达方便、免疫原性小、组织穿透力强、可以大量生产等优点,具有更加广阔的临床应用前景。

近20年来抗体经过了多克隆抗体-单克隆抗体-基因工程抗体三个阶段的发展,单链抗体是目前报道最多的基因工程抗体之一,许多单链抗体在多种疾病的诊断中作出了很大贡献。骨骼正常形态维持依赖于骨吸收和骨形成之间的动态平衡,而破骨细胞活性增强、骨吸收过度,骨质疏松就会发生。由于骨质疏松对骨折愈合的不良影响,临床治疗中除了外科手术方法和内固定器械的改进,辅以积极的抗骨质疏松药物很有必要。然而临床治疗骨质疏松的一线药物仍以骨吸收抑制剂为主,相比抑制骨吸收,促进成骨细胞分化和骨形成活性是防治骨质疏松的关键。有研究表明,向大鼠皮下注射骨硬化素单链抗体连续4周,影像学和组织学结果显示,骨硬化素单克隆抗体不仅能促进骨形成、增加骨量,也可能加速骨折愈合^[8];单克隆抗体在灵长类骨折模型有类似效用,使硬骨痂面积和骨矿物质含量显著增加,骨痂扭转刚度和最大扭矩均增加^[9]。然而,未见骨硬化素单链抗体应用于骨质疏松预防及治疗方面的研究报道。主要原因在于通过真核表达体系制备大批量、高纯度蛋白的工艺仍不成熟,蛋白价格昂贵,而骨质疏松症患者给药周期又长,因此限制了其研究应用。而在前期工作中,我们与中科院微生物所合作,通过原核表达体系获得一定量高纯度且具有良好生物活性的骨硬化素单链抗体蛋白,为本研究完成提供了良好的物质基础。

骨折愈合的大致进程包括炎症反应期、原始骨痂形成期、骨痂塑形改造期几个主要阶段。本实验主要观察了原始骨痂形成期即软骨性骨痂向骨性骨痂转化的阶段,通过血生化检测、影像学、组织学、Micro-CT扫描手段,发现给药12周后,两组大鼠组间血清中钙和碱性磷酸酶差异有统计学意义,提示骨硬化素单链抗体治疗骨质疏松可以使骨形成增加。股骨骨折端进行Micro-CT扫描结果显示,骨硬化素单链抗体治疗组骨折线模糊,骨痂连接断端,髓腔再通;而模型组骨折线仍隐约可见,断端骨痂连接不紧密。与模型组比较,治疗组大鼠左侧股骨骨折端BMD、BVf均明显增加,SMI明显减小($P<0.05$)。

综上所述,骨硬化素单链抗体对去卵巢模型大鼠骨质疏松性骨折愈合有促进作用,为治疗骨质疏松疾病提供了一种

新的思路和方法。

参考文献

- [1] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future[J]. *Lancet*, 2011, 377(9773):1276.
- [2] Lewiecki EM. Sclerostin: a novel target for intervention in the treatment of osteoporosis[J]. *Discovery Medicine*, 2011, 12(65):263.
- [3] Ominsky MS, Li C, Li X, et al. Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody enhances bone healing and improves bone density and strength of nonfractured bones[J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(5):1012.
- [4] Tian X, Jee WS, Li X, et al. Sclerostin antibody increases bone mass by stimulating bone formation and inhibiting bone resorption in a hindlimb-immobilization rat model[J]. *Bone*, 2011, 48(2):197.
- [5] Li X, Warmington KS, Niu QT, et al. Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody increases bone formation, bone mass, and bone strength in aged male rats[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(12):2647.
- [6] Tian X, Setterberg RB, Li X, et al. Treatment with a sclerostin antibody increases cancellous bone formation and bone mass regardless of marrow composition in adult female rats[J]. *Bone*, 2010, 47(3):529.
- [7] Agholme F, Li X, Isaksson H, et al. Sclerostin antibody treatment enhances metaphyseal bone healing in rats[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(11):2412.
- [8] Ominsky MS, Vlasseros F, Jolette J, et al. Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(5):948.
- [9] Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, et al. scFv antibody: principles and clinical application[J]. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, Article ID 980250, 15.
- [10] McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains[J]. *Nature*, 1990, 348(6301):552.
- [11] 孔焕宇,陈燕平,杨淑芹,等.去卵巢大鼠骨质疏松监测指标的实验分析[J]. *中国骨伤*, 2004, 17(4):204.
- [12] Li C, Mori S, Li J, et al. Long-term effect of incadronate disodium (YM-175) on fracture healing of femoral shaft in growing rats[J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(3):429.
- [13] Silva BC, Bilezikian JP. New approaches to the treatment of osteoporosis[J]. *Annu Rev Med*, 2011(62):307.
- [14] Lane NE, Silverman SL. Anabolic therapies[J]. *Curr Osteoporosis Rep*, 2010, 8(1):23.
- [15] Sibai T, Morgan EF, Einhorn TA. Anabolic agents and bone quality[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2011, 469(8):2215.
- [16] Papapoulos SE. Targeting sclerostin as potential treatment of osteoporosis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(Suppl 1):i119.
- [17] Moester MJ, Papapoulos SE, Lowik CW, et al. Sclerostin: current knowledge and future perspectives[J]. *Calcif Tissue Int*, 2010, 87(2):99.

(收稿日期:2013-06-06 修回日期:2013-09-28)