

Ca - Alg 作为 OPG 缓释载体的实验研究

刘 瑶 张晓辉 杨 光 柳 娜 罗 恩

摘 要 **目的** 本实验以藻酸钙 (calcium alginate, Ca - Alg) 凝胶为载体将护骨素 (osteoprotegerin, OPG) 与羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HA) 复合构建 OPG/Ca - Alg/HA 复合材料, 筛选出 OPG 缓释效果最稳定的 OPG/Ca - Alg/HA 复合材料, 体外研究该材料缓释的 OPG 对体外培养破骨细胞的形态及功能影响, 并进一步研究其植入兔下颌骨缺损后骨缺损的修复的效果。**方法** 通过 ELISA 法检测检测 OPG 蛋白释放速率并筛选 OPG 缓释效果最稳定的 OPG/Ca - Alg/HA 复合材料; 将该材料与兔破骨细胞在体外共培养, 抗酒石酸酸性磷酸酶染色观察破骨细胞形态与功能; 体内植入兔下颌骨缺损, 通过影像学和组织学方法评估术后 8 周标本的成骨效果。**结果** 1.5% 藻酸钠溶液和 100mmol/L 氯化钙溶液配比的 OPG/Ca - Alg/HA 复合材料能以较平稳的速度释放 OPG。OPG/Ca - Alg/HA 复合材料与兔破骨细胞共培养后破骨细胞的伪足收缩, 细胞核固缩, 胞质内出现广泛空泡样变性, 形成的骨陷窝面积减小。OPG/Ca - Alg/HA 实验组与缺损部位骨组织结合紧密, 无明显松动, HA - 骨界面有明显成骨, 新生骨质致密; 对照组材料与缺损部位骨组织结合良好, 部分标本有松动, HA - 骨界面新生骨量少且疏松。**结论** Ca - Alg 作为 OPG 缓释载体, 在 1.5% 藻酸钠溶液和 100mmol/L 氯化钙溶液配比下具有较好的缓释作用; 其释放的 OPG 可以在体外实验中抑制成熟破骨细胞的骨吸收功能, 在体内实验中, 缓释 OPG 可以促进 Ca - Alg/HA 材料周围骨再生。

关键词 护骨素 藻酸盐 破骨细胞 骨再生 缓释

[中图分类号] R318 [文献标识码] A

Experimental Study of Ca - Alg as a Drug Carrier on OPG Sustained - release. Liu Yao, Zhang Xiaohui, Yang Guang, et al. West China School of Stomatology, State Key Laboratory of Oral Disease, Sichuan University, Sichuan 610041, China

Abstract Objective In this experiment we used calcium alginate (Ca - Alg) gel as a drug carrier of OPG/Ca - Alg/HA composite material constructed with osteoprotegerin (OPG) and hydroxyapatite (HA). Morphology and function of osteoclasts which were affected by sustained - release OPG were studied in vitro, and then restoration of rabbit mandibular defects with implanted OPG/Ca - Alg/HA composite material was evaluated in vivo. **Methods** Test the release rate of OPG from OPG/Ca - Alg/HA composite material with different concentrations of OPG by ELISA assay, in order to select the stable OPG sustained - release OPG/Ca - Alg/HA for further study. In vitro, observe morphologic and functional effects of rabbit osteoclasts which are co - cultured with the selected composite material. In vivo, evaluate osteogenic effects around the composite material implanted in rabbit mandibular defects for 8 weeks by radiological and histological assay. **Results** The OPG release rate from OPG/Ca - Alg/HA composed of 1.5% alginate and 100mmol/L calcium chloride solution was characterized by a stabile release rate throughout 7 days. Rabbit osteoclasts cocultured with OPG/Ca - Alg/HA in vitro were characterized by pseudopod shrinkage, karyopyknosis, vacuolar degeneration, and decreased area of bone absorptive lacunae. In vivo, OPG/Ca - Alg/HA composite material had better osseointegration. And obvious osteogenesis and high bone density were observed at material - bone interface. **Conclusion** As a drug carrier, Ca - Alg gel composed of 1.5% alginate and 100mmol/L calcium chloride solution has more stable OPG sustained - release effect. Sustained - released OPG could inhibit the bone resorption caused by osteoclasts in vitro and promote the regeneration of bone around OPG/Ca - Alg/HA composite material in vivo.

Key words Osteoprotegerin; Calcium alginate; Osteoclast; Osteoanagenesis; Sustained - release

骨缺损在生物材料植入修复之后, 周围的骨组织会进行改建。由于手术创伤、各种炎性因子、不良应

力等因素的影响, 常会在骨组织改建初期出现破骨细胞功能过强, 从而引起骨愈合不良甚至植入材料松动脱落, 导致手术的失败^[1-3]。破骨细胞的分化与成熟是由其细胞表面的核因子 κ B 受体激活剂 (receptor activator of nuclear factor κ B, RANK) 与成骨细胞分泌的核因子 κ B 受体激活剂配体 (RANK ligand, RANKL) 相结合来实现的^[4,5]。而护骨素 (osteoprotegerin, OPG) 是 RANKL 的诱骗受体, 使 RANKL 不能

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划项目 (NCET - 10 - 0597); 四川大学优秀青年学者基金资助项目 (2012SCU4A12)

作者单位: 610041 成都, 四川大学华西口腔医学院口腔疾病研究国家重点实验室 (刘瑶、张晓辉、柳娜、罗恩); 610031 成都, 西南交通大学材料与工程学院教育部材料先进技术实验室 (杨光)

通讯作者: 罗恩, 电子信箱: LuoEn521125@sina.com

与 RANK 正常结合,从而抑制了破骨细胞的成熟与功能,但 OPG 局部给药易流失^[6,7]。全身给药又可能引起多发性骨硬化症甚至干扰内分泌及心血管等系统^[8-10]。

藻酸钠是海藻细胞壁和细胞质的主要成分,与钙离子等二价金属离子交联可形成稳定的 Ca-Alg 凝胶,有良好的生物相容性,呈立体网状结构,有一定强度和可塑性,可限制水分子的流动,能与药物配伍,制成的药物衣膜有控制药物释放速率的能力,广泛应用于药品缓释、生物材料等领域^[11,12]。

因此,本实验以 Ca-Alg 凝胶为载体将 OPG 与羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)复合构建 OPG/Ca-Alg/HA 复合材料,并筛选 OPG 缓释效果最佳的 OPG/Ca-Alg/HA 复合材料。研究 OPG/Ca-Alg/HA 复合材料缓释的 OPG 对体外培养破骨细胞的形态及功能影响,并进一步研究该材料植入兔下颌骨缺损后对骨缺损的修复的效果。

材料与方法

1. 实验动物:一周新生乳兔 1 只。雄性健康新西兰大白兔 20 只,8 月龄,体重约 2.5~3.0kg。选择无缺失牙,咬合正常,动作敏捷者纳入实验。

2. 主要设备仪器:全自动光吸收酶标仪(Bio-Rad 680),恒温水浴箱(国华 HH-42),CO₂ 孵箱(SanYo MCO-15AC),倒置相差显微镜(inverted phase contrast microscope, IPCM)(O-lympus, IX70),普通双目光学显微镜(Nikon YS100),扫描电子显微镜(北京中科科仪技术发展有限责任公司 KYKY-2800 型),MicroCT 机(μ -CT80 瑞士 SCANCO 公司)。

3. 主要试剂:低分子藻酸钠干粉(Sigma 公司),无水氯化钙(成都科龙化工),孔板(Corning 公司),重组人 OPG 蛋白(以色列 Prospec 公司),人 OPG 因子 ELISA 试剂盒(武汉博士德公司),高糖 DMEM 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(FBS)(Hyclone 公司),醋酸(成都科龙化工),醋酸钠(成都科龙化工),氢氧化钠(成都科龙化工),浓盐酸(成都科龙化工),亚硝酸钠(成都科龙化工),酒石酸钾钠(成都科龙化工),副品红(成都科龙化工),N,N-二甲基酰胺(成都科龙化工),萘酚 AS-BI 磷酸二钠(日本 Wako 公司),注射用青霉素钠、注射用硫酸链霉素(华北制药股份有限公司),多聚甲醛(Sigma 公司),EDTA(乙二胺四乙酸)(Sigma 公司)。

4. 实验步骤:(1)OPG/Ca-Alg/HA 复合材料的构建及对破骨细胞骨吸收功能的影响:1)OPG/Ca-Alg/HA 复合材料的制备与 OPG 释放速率检测:HA 的准备:孔隙率 70% 的 HA 制成 15mm×15mm×3mm 的圆片,超声波清洁,75% 乙醇消毒,干燥。配置 1%、1.5%、2% 的藻酸钠溶液, pH 值调至 7.0,高温高压消毒。配置 50、100、150mmol/L 氯化钙溶液, pH 值调至 7.0,高温高压消毒。备选的 Ca-Alg 制备试剂按浓度

不同分为 3 组:A 组:1% 藻酸钠溶液 + 50mmol/L 氯化钙溶液;B 组:1.5% 藻酸钠溶液 + 100mmol/L 氯化钙溶液;C 组:2% 藻酸钠溶液 + 1500mmol/L 氯化钙溶液。将 24 块 HA 随机分为 A、B、C 组置于 24 孔板内。低温下向氯化钙溶液内加入重组人 OPG 蛋白,浓度为 1 μ g/ml。将藻酸钠溶液与氯化钙溶液按照 4:1 的比例加入各个孔内,迅速形成将 HA 包裹的 Ca-Alg 凝胶,在表面滴加 1ml 三蒸水,每日取样,ELISA 法检测每日 OPG 释放量并用 SPSS18.0 绘制 OPG 释放曲线。2)兔破骨细胞的体外分离与培养:破骨细胞体外分离培养参考张伟真等^[13](1995 年)的方法。新生 1 周乳兔拉颈处死,75% 乙醇浸泡 3~5min。分离四肢长骨,除去骨表面的软组织、骨膜及软骨,手术刀纵行剖开骨干,轻刮骨髓腔内表面,同时以无菌冲洗空针吸取培养基(10% 胎牛血清的高糖型 DMEM 培养基)冲洗骨髓腔内表面,至其变白为止。静置该培养液 2min 后,收集细胞悬液于预置有无菌盖玻片的 6 孔板中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 30min,换液继续培养。隔日换液,倒置相差显微镜下动态观察破骨细胞的形态和生长情况。3)破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)染色抗酒石酸酸性磷酸酶染色是破骨细胞的特异性染色之一,具体操作参考文献[14]。①孵育液制备:A 液,0.1mol/L 醋酸缓冲液(pH 值 5.0);B 液,六偶氮副品红液;C 液,萘酚 AS-BI 磷酸二钠 20mg 溶解于 1mlN,N-二甲基酰胺。A 液 18ml、B 液 1ml、C 液 1ml 混匀(pH 值 5.0),加入酒石酸钾钠 282mg,过滤备用;②染色:在 4℃ 条件下,4% 多聚甲醛溶液固定 20min,37℃ 下孵育 50min。蒸馏水冲洗,封片,显微镜下观察染色结果并采图。4)OPG/Ca-Alg/HA 复合材料对破骨细胞形态及骨吸收功能的影响:材料的制备:实验组以 1.5% 藻酸钠溶液 + 100mmol/L 氯化钙溶液(OPG 浓度为 1 μ g/ml)制成 OPG/Ca-Alg/HA 复合材料;对照组以 1.5% 藻酸钠溶液和 100mmol/L 氯化钙溶液(不含 OPG)制成。骨磨片的制备:新鲜牛股骨干的密质骨制成约 5mm×5mm×0.05mm 的薄片。超声波清洗 10min×3 次。低温浸泡在含有青霉素 1000IU/ml、链霉素 1000 μ g/ml 的容器中。将预置有骨磨片的 2 个 6 孔板随机分为两组,接种原代破骨细胞。换液后,将实验组和对照组的材料分别置于两组的各个孔内,在 37℃、5% CO₂ 潮湿条件下培养,隔日换液。7 天后取出骨磨片于 IPCM 观察破骨细胞及骨吸收陷窝。于每个骨磨片上选取面积最大的 12 个骨吸收陷窝,用计算机图像分析软件测量骨吸收陷窝的面积取均数。(2)HA/Ca-Alg/OPG 缓释材料修复兔下颌骨缺损:1)材料的灭菌与准备:材料用试剂消毒后于动物手术当天制成植入材料(15mm×15mm×4mm);实验组以 1.5% 藻酸钠溶液 + 100mmol/L 氯化钙溶液(OPG 浓度为 1 μ g/ml)制成 OPG/Ca-Alg/HA 复合材料;对照组以 1.5% 藻酸钠溶液和 100mmol/L 氯化钙溶液(不含 OPG)制成。2)实验分组:取自身对照实验设计。所有实验动物双侧下颌骨均通过手术制造极限骨缺损后植入材料,左侧下颌骨植入 OPG/Ca-Alg/HA 复合材料作为实验组,右侧下颌骨植入 Ca-Alg/

HA 复合材料作为对照组。术后 8 周取材。3) 支架材料的组合并植入动物体内:所有实验动物术前 12h 禁食不禁水,用 0.3g/L 戊巴比妥钠耳静脉麻醉(30mg/kg),备皮。仰卧位,术区消毒铺巾。局部辅以 2% 利多卡因浸润麻醉,在下颌骨下缘约 1cm 处做一长约 3cm 与下颌下缘平行的切口,全层切开皮肤、皮下组织及骨膜(注意保护面动脉),钝性分离至咬肌前缘,暴露下颌骨体,用盘状金刚砂车针在咬肌前缘颊侧下颌体处作扁圆柱形骨缺损(15mm × 15mm × 4mm),达骨密质,植入材料,冲洗止血,分层缝合创口。动物苏醒后,分笼常规饲养,术后每天肌肉注射青霉素 40 万 IU,每日两次,连续 3 天。4) 大体标本观察:植入后第 8 周,实验动物经耳缘静脉空气栓塞处死,取出下颌骨,去除骨及材料周围软组织。观察标本愈合情况。5) MicroCT 扫描分析:修整标本大小,用高速金刚砂磨片将标本对半切开,一半用 Micro CT 扫描(工作电压 70kV,工作电流 114 μ A,整合时间 700ms),用随机软件在配套工作站上三维重建定量分析材料周围新生骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th)。6) 组织学观察:另一半切开后标本 4% 多聚甲醛液中固定 48h,经 10% EDTA 脱钙液脱钙 60 天,70% ~ 100% 乙醇梯度脱水,三氯甲烷透明,石蜡包埋,连续切片,行 HE、Masson 染色,光镜下观察切片并采集图像。

5. 统计学方法:使用统计学分析软件 SPSS 18.0 行 *t* 检验分析两组标本新生骨小梁厚度有无差异,若 $P < 0.05$,则认为差异具有统计学意义。

结 果

1. OPG/Ca - Alg/HA 复合材料的构建及对破骨细胞骨吸收功能的影响:(1) OPG/Ca - Alg/HA 复合材料的构建及释放 OPG 速率检测:藻酸钠溶液与氯化钙溶液按不同浓度配制得到的 Ca - Alg 凝胶呈现不同的物理性状,得到不同 OPG 释放速率曲线(图 1)。A 组 Ca - Alg 凝胶呈透明度较好的半固态,流动性强、质软稀薄、难以塑形,上层加水静置 7 天后被完全稀释,对水分子的固定能力弱。ELISA 法检测结果显示其对 OPG 释放速率快,第 4 天时 OPG 的累积释放已经超过 80%,7 天时基本释放完全。B 组呈透明的固态胶冻状物质,有一定弹性,质软不易变形,上层加水静置 7 天后与液体层的界面变模糊。ELISA 法检测结果显示 7 天时累积释放约 70% 左右的 OPG,第 10 天时仍有少量 OPG 释出。C 组呈透明度较好的固体胶冻状物质,弹性较好,质韧不易变形,上层加水静置 7 天后与液体层仍有清晰固 - 液分界面。ELISA 法检测结果显示该浓度的 Ca - Alg 凝胶仅有极微量的 OPG 释放。以 1.5% 藻酸钠溶液 + 100mmol/L 氯化钙溶液为配比制成的 OPG/Ca - Alg/HA 复合材料具有良好物理性状,能以较平稳的速率缓慢释放 OPG,选入进一步实验。(2) 倒置相差显微镜下动态

观察兔破骨细胞:培养 30min 后破骨细胞已经贴壁,细胞质逐渐铺展;培养 2h 后,细胞基本完全铺展开。破骨细胞呈圆形、椭圆形、不规则形等多形性,细胞内可见数个甚至数十个细胞核,胞质边缘可见片状或丝状伪足(图 2),细胞在伪足的作用下缓慢移动。(3) 破骨细胞 TRAP 染色:TRAP 染色结果:破骨细胞的胞质中含有抗酒石酸酸性磷酸酶,因此胞质成玫瑰红色,细胞核不染色(图 3)。其他非破骨细胞因为不含此种酶,表现为 TRAP 染色阴性。(4) OPG/Ca - Alg/HA 复合材料对破骨细胞形态及骨吸收功能的影响:两组材料与破骨细胞共培养 3 天后,实验组破骨细胞即开始出现胞质内广泛空泡样变、细胞核透光度降低、核仁固缩、伪足数量减少、细胞运动能力减弱等。对照组细胞胞质未见明显异常,胞核透光度正常,片状及丝状伪足数量较多,细胞可缓慢移动(图 4)。共培养 7 天后 IPCM 观察骨磨片可见两组骨磨片上均有一定大小及数量的骨吸收陷窝形成,统计分析结果显示,两组中破骨细胞在骨片上形成的陷窝面积大小实验组小于对照组,且差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 5)。与不含 OPG 的对照组相比,实验组 OPG/Ca - Alg/HA 复合材料共培养后的破骨细胞的骨吸收能力有较明显的降低。

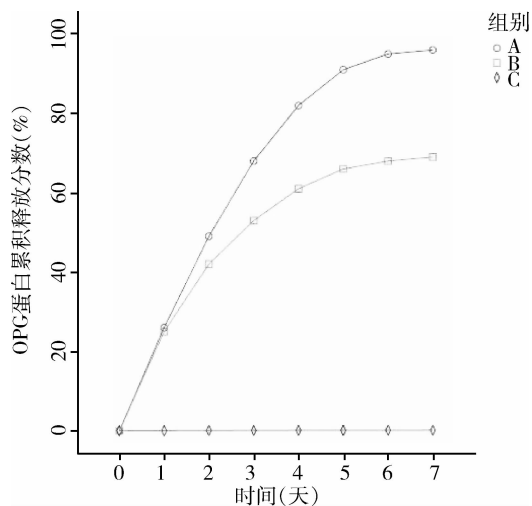


图 1 OPG 释放曲线

曲线斜率变化程度决定 OPG 的缓释稳定性

2. OPG/Ca - Alg/HA 复合材料修复兔下颌骨缺损:所有实验动物均健康,无并发感染及死亡。(1) 标本大体观察:术后 8 周,实验组材料表面被新生骨痂完全覆盖,材料稳固,和周围骨组织界限不清。对照组材料表面被少量新生骨痂覆盖,个别植入材料松动甚至脱落(图 6)。(2) Micro CT 扫描及分

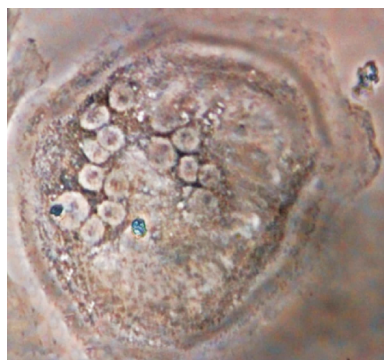


图2 IPCM 下的破骨细胞

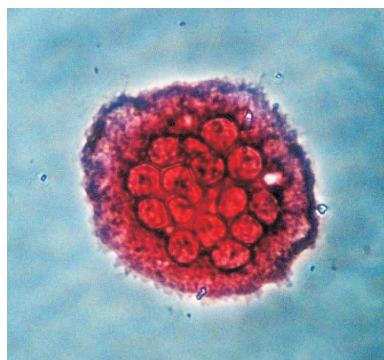


图3 破骨细胞 TRAP 染色

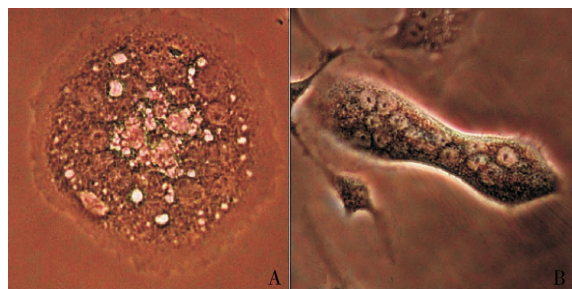


图4 两组材料与破骨细胞共培养3天后

A. 实验组破骨细胞出现胞质内广泛空泡样变、核仁固缩、伪足数量减少、细胞运动能力减弱；B. 对照组破骨细胞胞核透光度正常，片状及丝状伪足数量较多，细胞可缓慢移动

析，术后8周，实验组见大量新生骨将材料包围，新生骨质致密，材料-骨界面结合紧密。对照组材料周围新生骨数量较多，新生骨骨小梁疏松，材料-骨界面结合不严密，部分缺损部位未见新生骨填充（图7）。对第8周时标本的 Micro CT 扫描，三维重建定量分析两组新生骨小梁密度，结果显示实验组新生骨小梁厚度明显大于对照组，且差异具有统计意义（ $P < 0.05$ ）（图8）。（3）组织学观察（图9）：实验组镜下，第8周时有大量新生骨并长入材料，同

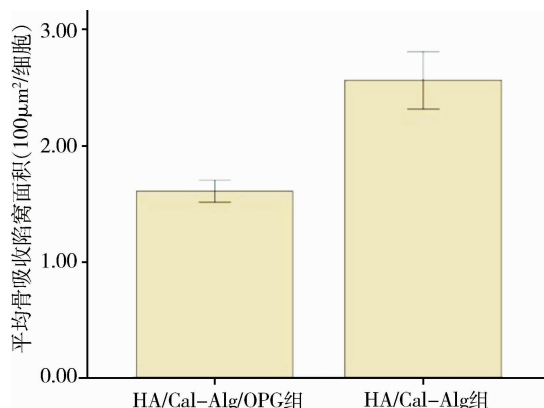


图5 两组破骨细胞形成的骨吸收陷窝面积比较

两组比较, $P < 0.05$

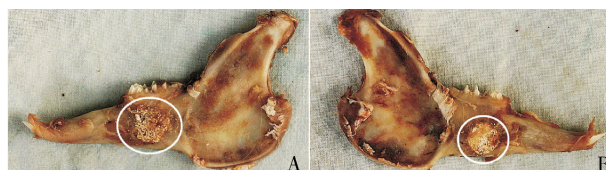


图6 大体标本, 术后8周

A. 实验组下颌标本材料表面被新生骨痂完全覆盖, 和周围骨组织界限不清; B. 对照组下颌标本材料表面被少量新生骨痂覆盖, 个别植入材料松动甚至脱落

时板层骨数量开始增多并也有部分长入材料, 破骨细胞偶见。对照组镜下, 第8周时新生骨长入材料, 板层骨开始增多, 部分骨-HA 界面处骨吸收明显, 破骨细胞多见。

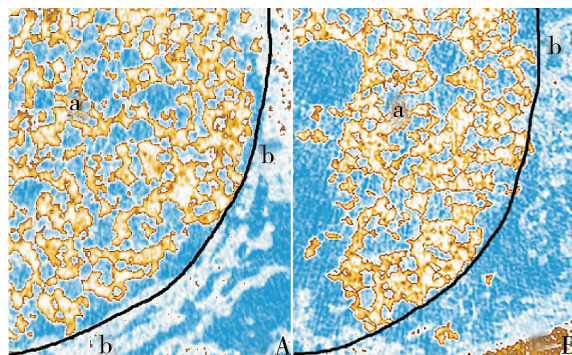


图7 Micro-CT 结果, 术后8周

A. 实验组大量新生骨将材料包围, 新生骨质致密, 材料-骨界面结合紧密; B. 对照组材料周围新生骨数量较多, 新生骨骨小梁疏松, 材料-骨界面结合不严密; a. 植入材料, b. 新生成骨

讨 论

1965年 Epker 等^[15] 提出, 成骨细胞和破骨细胞之间的相互作用影响着整个骨改建的过程。若二者的平衡被打破, 将出现成骨过多(骨硬化症)或骨吸

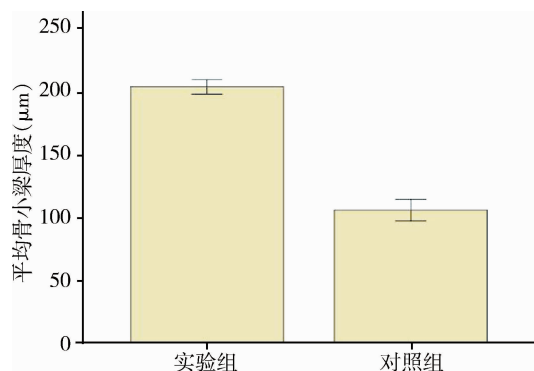


图 8 第 8 周时两组新生骨小梁密度比较
两组比较, $P < 0.05$

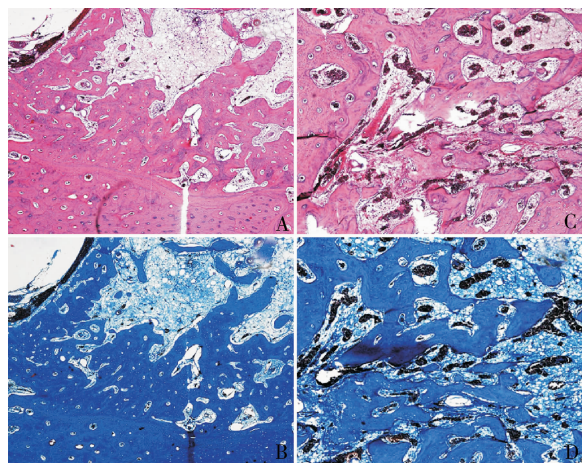


图 9 组织学观察, 术后 8 周 (×40)

A. 实验组 HE 染色; B. 实验组 Masson's 染色; C. 对照组 HE 染色; D. 对照组 Masson's 染色。A、B. 大量新生骨并长入材料, 同时板层骨数量开始增多并也有部分长入材料, 破骨细胞偶见; C、D. 新生骨长入材料, 板层骨开始增多, 部分骨 - HA 界面处骨吸收明显, 破骨细胞多见

收过多(骨质疏松)的疾病^[16]。研究发现, 体外培养的破骨细胞的分化与活性强弱是受成骨细胞调控的, 将成骨细胞与破骨前体细胞共培养可以得到破骨细胞, 而若将二者分开, 则没有破骨细胞形成, 单纯促进成骨细胞的形成与活性可能会促进其 RANKL 的分泌过多从而同时产生大量的破骨细胞^[17-19]。因此早期介入骨愈合过程, 防止破骨细胞激活, 抑制破骨细胞活性, 从而促进骨缺损的修复, 可能取得令人满意的效果。

大量研究表明, 通过以 Ca - Alg 为支架材料携带蛋白或者细胞以促进骨愈合是可行的^[20,21]。Sotome 等^[20]通过将羟基磷灰石、胶原、藻酸钠凝胶与人工重组骨结合蛋白 - 2 (bone morphogenetic protein - 2, BMP - 2)相结合, 植入大鼠股骨缺损, 获得了良好的

修复效果。De la Riva 等^[22]用携带有血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的藻酸钠/壳聚糖/聚乳酸复合物修复大鼠股骨缺损, 发现该复合物在修复缺损的同时不但促进了新生血管的生成, 同时也保持了理想的控释 VEGF 的速率。本实验采用 Ca - Alg 凝胶为载体将 OPG 与 HA 复合得到的缓释材料, 维持局部的 OPG 缓释浓度, 可达到持续抑制破骨细胞的成熟与功能的目的。

Rodeo 等^[23]在重建兔的前交叉韧带的动物实验中, 分别加入了重组鼠 OPG 蛋白和重组人 RANKL 蛋白, 发现 OPG 组和空白组相比, 破骨细胞数量明显减少, 韧带周围有更多骨组织在骨 - 韧带界面上形成, 而 RANKL 组的新生骨量却少且疏松。本实验将重组人 OPG 蛋白用于兔的体内, 也观察到了与 Rodeo 的实验相近的结果。考虑修复效果受到各种正负反馈机制和某些未知机制的调节, 且可能与蛋白计量相关, 研究 OPG 在骨缺损的修复过程中的序贯作用及分子机制才是进一步实验的关键。

Ca - Alg 作为 OPG 缓释载体, 在 1.5% 藻酸钠溶液和 100mmol/L 氯化钙溶液的浓度具有较好的物理性状和稳定的缓释作用, 释放的 OPG 可以在体外实验中抑制成熟破骨细胞的骨吸收功能。在体内实验中 OPG/Ca - Alg/HA 复合材料可以促进骨缺损的修复。

参考文献

- Kaneshita Y, Goda S, Kawamoto T. The effect of matrix metalloproteinase - 9 on the differentiation into osteoclast cells on RAW264 cells [J]. *Orthodontic Waves*, 2007, 66 (4): 122 - 128
- Abbas S, Clohisy JC, Abu - Amer Y. Mitogen - activated protein (MAP) kinases mediate PMMA - induction of osteoclasts [J]. *Journal Orthopaedic Research*, 2003, 21 (6): 1041 - 1048
- Yen ML, Tsai HF, Wu YY, et al. TNF - related apoptosis - inducing ligand (TRAIL) induces osteoclast differentiation from monocyte/macrophage lineage precursor cells [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45 (8): 2205 - 2213
- 王玉, 徐胜前. RANKL/RANK/OPG 系统与强直性脊柱炎相关性研究进展 [J]. *医学研究杂志*, 2010, 39 (10): 117 - 120
- 赵伟, 黄烽. 细胞核因子 κ B 受体活化因子配基在强直性脊柱炎的表达及意义 [J]. *解放军医学杂志*, 2004, 29 (6): 482 - 485
- 赵伟, 黄烽. 护骨素在强直性脊柱炎外周关节骨质破坏病理机制中的作用 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2005, 9 (6): 329 - 333
- Roodman GD, Dougall WC. RANK ligand as a therapeutic target for bone metastases and multiple myeloma [J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2008, 34 (1): 92 - 101
- Fata JE, Kong YY, Li J, et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin - ligand is essential for mammary gland development

- [J]. *Cell*, 2000, 103 (1):41 - 50
- 9 Van Campenhout A, Golledge J. Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 204 (2):321 - 329
- 10 王振刚. 非甾体抗炎药治疗强直性脊柱炎的再认识[J]. *中国医刊*, 2013, 48(7):1 - 2
- 11 李红兵. 海藻酸作为新型药物转运载体的开发[J]. *高分子通报*, 2006, 19(8):39 - 43
- 12 陆彬. 药物新剂型与新技术[J]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 168
- 13 张炜真, 于世凤, 郑麟蓓. 大鼠破骨细胞体外分离培养和鉴定[J]. *解剖学报*, 1995, 26(3):291 - 293
- 14 于明香, 金慰芳, 王洪复. 应用抗酒石酸酸性磷酸酶(Trap)染色观察体外培养破骨细胞的生存时间[J]. *泰山医学院学报*, 1996, 27(2):91 - 93
- 15 Epker BN, Frost HM. Correlation of bone resorption and formation with the physical behavior of loaded bone[J]. *J Dent Res*, 1965, 44 (1):33 - 41
- 16 Heymann D, Rousselle AV. Gp130 cytokine family and bone cells[J]. *Cytokine*, 2000, 12 (10):1455 - 1468
- 17 Jimi E, Nakamura I, Amano H, *et al.* Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell - to - cell contact[J]. *Endocrinology*, 1996, 137 (5):2187 - 2190
- 18 Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, *et al.* The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, 15 (6):457 - 475
- 19 朱晓庆, 金悦, 梁军波, 等. Wnt/ β - catenin 信号通路与糖尿病骨质疏松的关系[J]. *医学研究杂志*, 2011, 40(8):17 - 19
- 20 Sotome S, Uemura T, Kikuchi M, *et al.* Synthesis and in vivo evaluation of a novel hydroxyapatite/collagen - alginate as a bone filler and a drug delivery carrier of bone morphogenetic protein[J]. *Materials Science and Engineering*, 2004, 24 (3):341 - 347
- 21 Yuan H, Chen N, Lv X. Experimental study of natural hydroxyapatite/chitosan composite on reconstructing bone defects[J]. *J Nanjing Medical University*, 2008, 22 (6):372 - 375
- 22 De la Riva B, Nowak C, Sánchez E, *et al.* VEGF - controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA - H scaffolds[J]. *European J Pharmaceutics Biopharmaceutics*, 2009, 73 (1):50 - 58
- 23 Rodeo SA, Kawamura S, Ma CB, *et al.* The effect of osteoclastic activity on tendon - to - bone healing: an experimental study in rabbits[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2007, 89 (10):2250 - 2259

(收稿日期:2013 - 07 - 27)

(修回日期:2013 - 09 - 22)

多发性骨髓瘤免疫表型的特点

朱 萍 吴蓓倩 丁天凌 黄 波 牛 强 许小平 陈 宇

摘 要 目的 研究多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)细胞的免疫表型特点及意义。方法 采用直接免疫荧光法及三色流式细胞术,分析30例多发性骨髓瘤免疫表型。结果 30例MM患者的CD38、CD138均为阳性,CD3、CD10、CD22、CD34均为阴性,CD56表达阳性25例(83.3%),CD28表达阳性8例(26.7%),CD117表达阳性3例(10.0%),CD45弱阳性表达5例(16.7%),仅1例低表达CD19及CD20。结论 细胞免疫表型可以鉴别良恶性浆细胞,对MM辅助诊断、监测微小残留及靶向治疗提供依据。

关键词 多发性骨髓瘤 免疫表型 流式细胞术

[中图分类号] R733 [文献标识码] A

Feature and Significance of the Cell Immunophenotype of 30 Multiple Myeloma Patients. Zhu Ping, Wu Beiqian, Ding Tianling, Huang Bo, Niu Qiang, Xu Xiaoping, Chen Zi. Hematology Department, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

Abstract Objective To investigate the feature and significance of the cell immunophenotype on patients with multiple myeloma. **Methods** Multiple parameters of flow cytometry and direct immunofluorescence were used to analysis the cell immunophenotype from 30 patients with multiple myeloma. **Results** The cell immunophenotype CD38 and CD138 were all positive in all 30 patients, CD3, CD10, CD22, CD34 were all negative, CD56 were positive in 25 cases(83.3%), CD28 were positive in 8 cases(26.7%), CD117 were positive in 3 case(10.0%), CD45 was weakly positive in 5 cases (16.7%), CD19 and CD20 were weak expression in only one case. **Conclusion**

基金项目:上海市卫生局基金资助项目(2010079)

作者单位:200040 上海,复旦大学附属华山医院血液科

通讯作者:陈宇, 电子信箱:drchenzi@163.com