

但剂量相关性却鲜有报道。

本研究发现 4 组患者气腹后 Peak_{ET} CO₂ 明显升高, Cd 明显下降。P₂ 组、P₃ 组在气腹期间肺顺应性明显改善,但是随着用药剂量的增加,术后不良反应发生率明显升高,P₃ 组复视发生率和口干评分明显高于其他 3 组。其机制可能是:①PHCD 使支气管平滑肌舒张、有效地抑制唾液腺和呼吸道腺体的分泌,降低气道压,改善肺顺应性;②通过阻断瞳孔括约肌上的 M 受体,使瞳孔括约肌松弛,导致瞳孔散大,出现视物模糊、复视的现象;③PHCD 是一种效能较强的抗胆碱能药物并且半衰期长,因此高剂量静脉注射会导致术后并发症发生率高且持续时间长。

综上所述,气腹前静脉注射 PHCD 0.01mg/kg,可有效降低腹腔镜气腹引起的气道压升高,显著改善肺顺应性。减少气道内腺体黏液的分泌,保持呼吸道的通畅,更易于术中管理并且患者术后口干程度轻微,不良反应发生率低,可安全有效地应用于腹腔镜妇科手术的麻醉中。

参考文献

- 1 Han XY, Liu H, Liu CH, et al. Synthesis of the optical isomers of a new anticholinergic drug, penehyclidine hydrochloride (8018) [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2005, 15(8):1979–1982
- 2 Zhan J, Xiao F, Zhang ZZ, et al. Effect of penehyclidine hydrochloride on β-arrestin-1 expression in lipopolysaccharide-induced human pulmonary microvascular endothelial cells [J]. Braz J Med Biol Res, 2013, 46(12):1040–1046
- 3 Xiao HT, Liao Z, Mo ZJ. Progress in pharmacokinetics of penehyclidine hydrochloride [J]. Chin J New Drugs, 2009, 18:887–890

- 4 Pandit JJ, Pierton P, Mashour GA. Penehyclidine and awareness during anaesthesia: caution with zero numerators [J]. Anaesthesia, 2013, 68(2):131–135
- 5 Wu XJ, Xia ZY, Wang LL. Effects of penehyclidine hydrochloride on pulmonary contusion from blunt chest trauma in rats [J]. Injury, 2012, 43(2):232–236
- 6 Xiao HT, Liao Z, Tong RS. Penehyclidine hydrochloride: a potential drug for treating COPD by attenuating Toll-like receptors [J]. Drug Des Devel Ther, 2012, 6:317–322
- 7 Carron M, Veronese S, Gomiero W. Hemodynamic and hormonal stress responses to endotracheal tube and ProSeal Laryngeal Mask Airway? for laparoscopic gastric banding [J]. Anesthesiology, 2012, 117(2):309–320
- 8 Miller DM. A proposed classification and scoring system for supraglottic sealing airways: a brief review [J]. Anesth Analg, 2004, 99:1553–1559
- 9 Li DH, Jia RF, Duan HJ. Observation of SLIPA laryngeal mask is used in general anesthesia airway management [J]. The Journal of Clinical Anesthesiology, 2010, 26:528–529
- 10 阮骆阳,曹金良,徐晓梦.SLIPA 喉罩用于腹腔镜手术的可行性和安全性 [J].临床麻醉学杂志,2011,27(5):486–488
- 11 José M Beleña MD, José L Gracia MD, José L Ayala MD, et al. The laryngeal mask airway supreme for positive pressure ventilation during laparoscopic cholecystectomy [J]. Journal of Clinical Anesthesia, 2011, 23:456–460
- 12 刘芳,潘芳,冯艺,等. 盐酸戊乙奎醚对全麻患者肺顺应性的影响 [J]. 临床麻醉学杂志, 2008, 24(10):839–842
- 13 Zhan J, Liu Y, Zhang Z, et al. Effect of penehyclidine hydrochloride on expressions of MAPK in mice with CLP-induced acute lung injury [J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(3):1909–1914

(收稿日期:2014-02-13)

(修回日期:2014-02-25)

生物力学因素与 BMP2 单核苷酸多态性对颈椎后纵韧带骨化成骨作用的影响

张耀 刘宝戈 林欣 宋磊 李家谋 赵虎成

摘要 目的 探讨生物力学因素与骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2) 单核苷酸多态性对颈椎后纵韧带骨化 (ossification of the posterior longitudinal ligament, OPLL) 成骨作用的影响,为进一步发现 OPLL 多因素共同致病的具体机制奠定基础。**方法** 采集颈椎 OPLL 病变组手术减压过程中骨化部位的后纵韧带和颈椎外伤等手术减压过程中的正常对照组后纵韧带。利用 PCR 和直接测序法分析 BMP2 上 2 个单核苷酸多态性位点 109T>G (rs2273073), 570A>T (rs235768) 基因型

基金项目:首都医科大学基础临床合作课题(12JL08)

作者单位:100050 首都医科大学附属北京天坛医院骨科(张耀、刘宝戈、林欣、宋磊、李家谋);100084 北京,清华大学工程力学系(赵虎成)

通讯作者:宋磊,电子信箱: tiantansongl@163.com

及等位基因型的分布。Masson 三色染色观察组织学结构改变。免疫组织化学染色和 Western blot 法检测 BMP2 的分布和表达。用 C3H10T1/2 细胞做转染构建细胞模型:正常组、空载体组、BMP2 野生型组、BMP2 (rs2273073) 单突变组、BMP2 (rs235768) 单突变组、BMP2 (rs2273073, rs235768) 双突变组。采用机械应力装置对接种于 Flexercell 板的细胞施加 10%、0.5Hz 的机械应力,持续加载 24h。以同样接种于 Flexereell 板未施加机械应力的细胞作为对照组。采用 Western blot 法检测机械应力加载前后各组 BMP2 表达情况。结果 Masson 三色染色组织学观察显示病变组有成骨结构改变,免疫组织化学染色和 Western blot 法显示病变组 BMP2 的表达增加。机械应力加载后,细胞转染模型 BMP2 (rs2273073) 单突变组和 BMP2 (rs2273073, rs235768) 双突变组的 BMP2 表达较未施加应力组明显增加,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 BMP2 单核苷酸多态性位点 109T > G (rs2273073) 的突变不仅能提高人们对 OPLL 的易感性,同时能提高 OPLL 患者对机械应力的敏感度,从而加速 OPLL 的进展。

关键词 机械应力 单核苷酸多态性 骨形态发生蛋白-2 后纵韧带骨化 C3H10T1/2 细胞

[中图分类号] R68

[文献标识码] A

Mutual Effect of Biomechanical Factor and BMP2 Gene Nucleotide Polymorphisms on Osteogenic Differentiation in Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament (OPLL). Zhang Yao, Liu Baoge, Lin Xin, et al. Department of Orthopedics, Beijing Tian Tan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Abstract Objective To investigate the mutual effect of biomechanical factor and BMP2 gene nucleotide polymorphisms on osteogenic differentiation in ossification of the posterior longitudinal ligament (OPLL), which may lay the foundation of future study of multi-factor pathogenesis of OPLL. **Methods** The ligament tissues were taken from 15 of OPLL and 18 of non-OPLL patients during anterior decompressive surgery. The complete coding sequence of the BMP2 gene was analyzed using direct sequencing and the two SNPs of rs2273073 and rs235768 were detected and genotyped. The histology of ligament tissues were assessed using Masson Trichrome staining and the distribution and expression of BMP2 were evaluated by immunohistochemistry and Western blot. The C3H10T1/2 cells with different BMP2 gene variants were constructed by transfecting with plasmid vector encoding SNP of rs2273073 or rs235768 and then subjected to mechanical stress (0.5 Hz, 10% stretch) for 24h, the expression of BMP2 were detected by Western blot. **Results** Ligament tissues from OPLL patients showed enchondral ossification by Masson Trichrome staining. The distribution and expression of BMP2 were significantly higher by immunohistochemistry and Western blot analysis in OPLL patients. In the presence of mechanical stress, the expression of BMP2 protein in C3H10T1/2 cells transfected by BMP2 (rs2273073) and BMP2 (rs2273073, rs235768) were significantly higher than the corresponding non-stretched groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The BMP2 SNP of rs2273073 can not only increase individual susceptibility to OPLL, but also the sensibility to mechanical stress which may play an important role during the pathological process of OPLL.

Key words Mechanical stress; SNPs; BMP2; OPLL; C3H10T1/2 cells

颈椎后纵韧带骨化(ossification of the posterior longitudinal ligament, OPLL)的发生、发展是在具有一定遗传基础上多种因素共同参与作用的一种复杂病理过程^[1]。目前多种候选易感基因已被报道,同时,研究证实生物力学在 OPLL 发生、发展过程中具有重要作用,但由于 OPLL 是多因素综合作用的结果,既有基因学基础,又有环境因素影响,多因素共同致病的具体机制仍未明确。本研究在前期分子生物学和细胞学研究的基础上,通过多因素研究,分析在明确具有 BMP2 突变位点的基础上,生物力学因素在 OPLL 发生、发展过程中的作用,为进一步揭示 OPLL 多因素共同致病的具体机制,进而为预防及治疗 OPLL 提供研究依据^[2, 3]。

材料与方法

1. 材料: Wizard Genomic DNA Purification Kit (美国 Promega 公司); dNTP 及耐热性 DNA 酶(日本 TaKaRa 公司);

引物和 pcDNA3.1-BMP2 质粒由美国 Invitrogen 公司合成; C3H10T1/2 细胞购于美国菌种保藏中心; Lipofectamine 2000 转染试剂盒(美国 Invitrogen 公司);改良 Masson 三色染色试剂盒(北京雷根生物技术有限公司);二步法免疫组化检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);抗 BMP2 抗体(英国 Abcom 公司); Flexercell 4000 细胞加载培养系统(美国 Flexercell 公司); ABI 3730XL POP7 DNA sequencing analysis 5.2 (美国 Applied Biosystems 公司)。

2. 标本来源:颈椎 OPLL 病变组标本($n = 15$)取自患者颈前路手术中所得到的骨化部位的后纵韧带,对照组标本($n = 18$)取自术前影像学检查未发现骨化的脊髓型颈椎病或颈椎外伤患者手术中切除的后纵韧带。所有标本的采集都获得患者及家属的同意并签署书面的知情同意书。本研究的相关内容通过首都医科大学附属北京天坛医院伦理委员会的审批。

3. 基因测序:用 DNA 提取试剂盒进行基因组 DNA 提取。提取的 DNA 样品经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳测定, A260/A280 紫外线定量,确定每个样本已提取 DNA 成功。采用聚合酶链反应(PCR)对 BMP2 编码序列进行体外扩增(表 1)。对产物

纯化后用直接测序法测定序列(图 1),分析小样本量两组间位点 rs2273073 (T/G)、rs235768 (A/T) 基因型及等位基因的分布,并与前期的研究结果进行比较^[2]。

4. Masson 三色染色和免疫组织化学染色:病变组和对照组后纵韧带标本切取后用 PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 24h,进口脱钙液脱钙 3~7 天,然后按照常规石蜡切片程序处理,4 μm 厚度切片。然后参照相关染色试剂盒的操作说明进行染色,中性树胶封片,光镜观察。

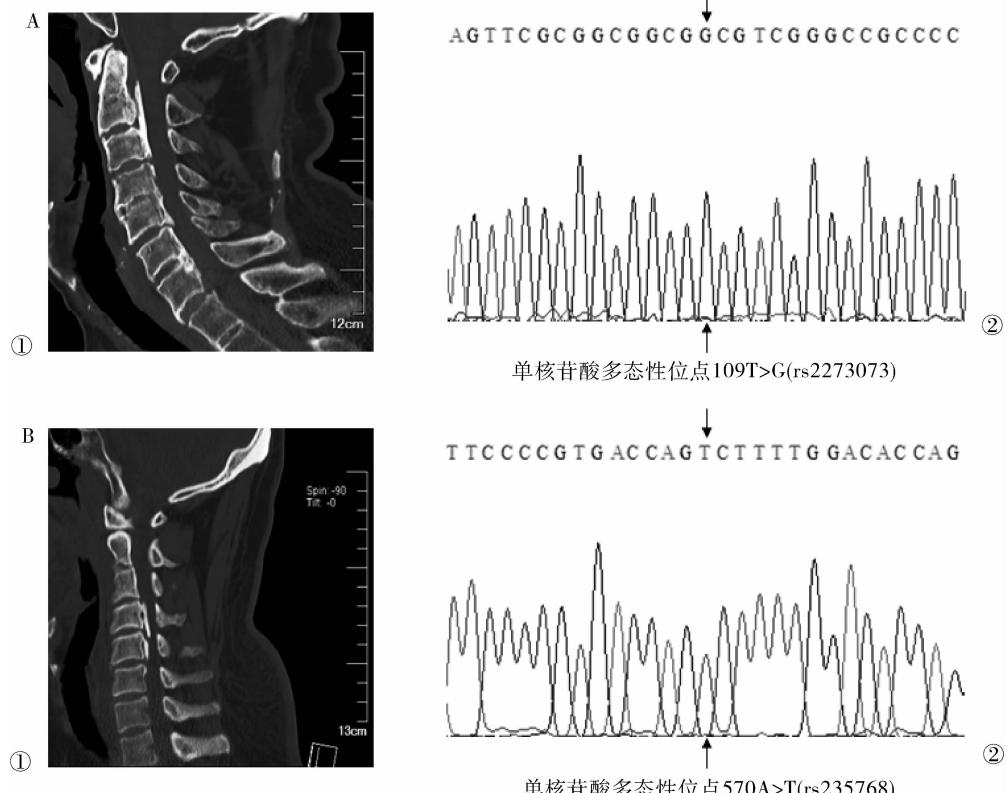


图 1 两位 OPLL 患者的 CT 图像和测序结果

A. 患者 1, 男性, 55 岁; B. 患者 2, 女性, 50 岁; ①CT 骨窗矢状位; ②基因测序结果。箭头所示为突变位点; 绿线条表示等位基因 A; 红线条表示等位基因 T; 蓝线条表示等位基因 C; 黑线条表示等位基因 G

5. Western bolt 法检测不同基因型后纵韧带标本 BMP2 的表达:根据基因测序结果,将病变组后纵韧带标本分为不同的亚组,同时以正常后纵韧带标本和取自创伤手术的骨块作为对照。将各组标本用 PBS 洗 3 次,加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂,用 Dounce'S 匀浆器匀浆。以上操作均在冰上完成。将混合物在 4℃ 离心,12000 × g,10min,取上清用 BCA 法测定蛋白浓度,−80℃ 保存。取等量蛋白行 SDS-PAGE 电泳,电转移至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温下封闭 1h,一抗 4℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 1h, ECL 化学发光法显色。用 Kodak2000 凝胶成像系统成像,用图像分析软件进行分析。

6. 细胞模型的构建:将 C3H10T1/2 细胞均铺于 25ml 培养瓶,加入含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 MEM 培养基 4ml, 置于

表 1 BMP2 的 SNP 位点的引物及扩增片段长度

引物	正义链(5'→3')	反义链(5'→3')	扩增长度(bp)	退火温度(℃)
引物 1	GGCGTTGGATG	GGAAGCTGCAC	566	58
	GGAGCCGATAA	ACAGCTTGTG		
引物 2	CTCACGGTCG	CCCTGCTCCATG	393	61
	GTCCTGTCC	CCTCAC		
引物 3	CGGACCAGT	TTCCATCATGG	393	60
	TTATCACCTC	CCAAAAGTTAC		
	AGCAGAGC	TAGCA		

37%、5% CO₂ 的细胞培养箱内培养,待细胞铺满瓶底 80% 左右用 0.05% 胰蛋白酶消化传代。取第 3 代 C3H10T1/2 细胞按照 1.5×10^4 /孔的密度接种于 6 孔板内,待细胞生长至 80% 汇合时,参照说明书使用各组 pcDNA3.1-BMP2 质粒进行转染。随机将细胞分为 6 组:正常组、空载体组、BMP2 野生型组、BMP2 (rs2273073) 单突变组、BMP2 (rs235768) 单突变组、BMP2 (rs2273073, rs235768) 双突变组。转染 12~24h 后在荧光倒置显微镜下观察绿色荧光蛋白表达的情况,然后用 G418,800mg/ml 筛选 14 天,从而得到稳定表达的细胞系。

7. 机械应力刺激实验:取各转染组细胞,接种前 1 天给细胞换液以保证细胞生长状态良好,次日按照 1×10^4 /孔的密度接种在 Flexercell 6 孔培养板内,安置底座确保培养板底部硅胶膜水平,然后放置于细胞培养箱内过夜待细胞贴壁。确保

细胞贴壁及生长状态良好后。吸去上层 10% FBS/MEM 培养液,加入 1% FBS/MEM 培养液进行同步化 24h,确保细胞生长状态一致。同步化 24h 后将培养板置于底座上放入机械应力加载系统,设定参数幅度为 10%、频率为 0.5 Hz,作用时间为 24h。以同样条件接种于 Flexercell 6 孔培养板而未施加机械应力的细胞作为对照组。

8. Western blot 法检测各转染组细胞 BMP2 表达:机械应力加载结束后收集各转染组细胞,参照本文“Western blot 法检测不同基因型后纵韧带标本 BMP2 的表达”项下的方法检测各组 BMP2 表达情况。同时,检测未施加机械应力的各转染组细胞的 BMP2 表达情况以作对照。

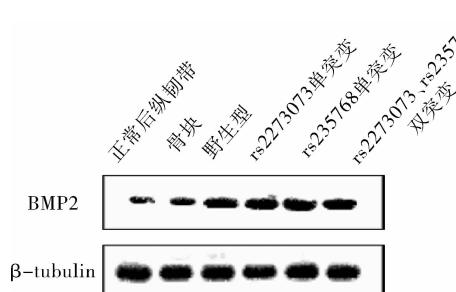
9. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理。定量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较用 SNK 检验。基因型、等位基因型分布用卡方检验分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 两位点基因型和等位基因的分布:单核苷酸多态性位点 109T > G (rs2273073) 的基因型、等位基因型在两组间的分布差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2)。单核苷酸多态性位 570A > T (rs235768) 的基因型在两组间的分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2), 等位基因型在两组间的分布差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 两组间位点 rs2273073、rs235768 的基因型、等位基因型的分布比较

SNP 位点 基因型	109T > G (rs2273073)			570A > T (rs235768)		
	TT	TG	GG	AA	AT	TT
病变组 (n = 15)	9	6	0	2	9	4
对照组 (n = 18)	17	1	0	9	7	2
$P < 0.05$						$P = 0.076$
等位基因	T	G	A	T		
病变组	24	6	13	17		
对照组	35	1	25	11		
$P < 0.05$						$P < 0.05$



2. Masson 三色染色结果: 颈椎后纵韧带主要有胶原纤维和弹性纤维组成,光镜下 Masson 染色,胶原纤维成蓝色,弹性纤维呈红色。对照组纤维呈波浪状,排列整齐,与韧带的纵轴一致。纤维细胞稀疏,成梭形,与纤维走向平行(图 2A)。病变组韧带正常组织结构消失,骨胶原着红色,新生骨在成熟过程中着红-蓝相间,骨质越成熟,红染越多(图 2B)。

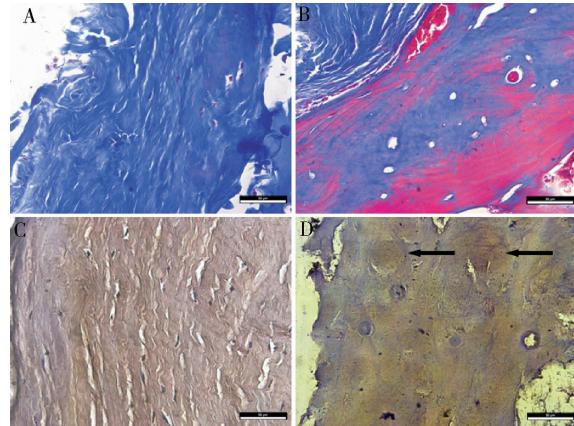


图 2 OPLL 病变组和对照组的 Masson 染色和免疫组化染色结果($\times 400$)

A. 对照组 Masson 染色;B. 病变组 Masson 染色;C. 对照组免疫组织化学染色;D. 病变组免疫组织化学染色。标尺 = 50 μm ,箭头所示为阳性区域

3. 免疫组织化学染色结果:BMP2 在 OPLL 病变组后纵韧带骨化区及周边区域均有表达,而在对照组后纵韧带中无表达(图 2C、D),棕黄色染区为阳性表现。

4. BMP2 在不同基因型骨化后纵韧带中的表达:病变组 BMP2 表达量明显高于正常后纵韧带和骨块,具有统计学意义 ($P < 0.01$)。然而,在病变组的各亚组之间,BMP2 的表达量没有统计学差异 ($P > 0.05$, 图 3)。

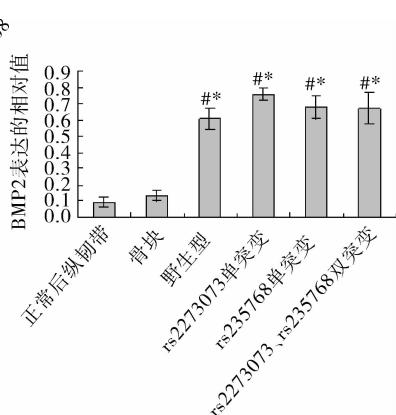


图 3 不同基因型骨化后纵韧带中 BMP2 的表达

与正常后纵韧带比较, * $P < 0.01$;与骨块相比较, # $P < 0.01$

5. 机械应力加载前后的各转染组细胞形态学改变: 机械应力加载后, 未见明显的细胞凋亡。各 BMP2 转染组细胞发生不同程度的形态变化, 由梭形

转变为肥硕梭形或者多角形, 并与应力方向平行。与此同时, 各组细胞聚集程度加大并逐渐表现出成骨细胞相似的形态特性(图 4)。

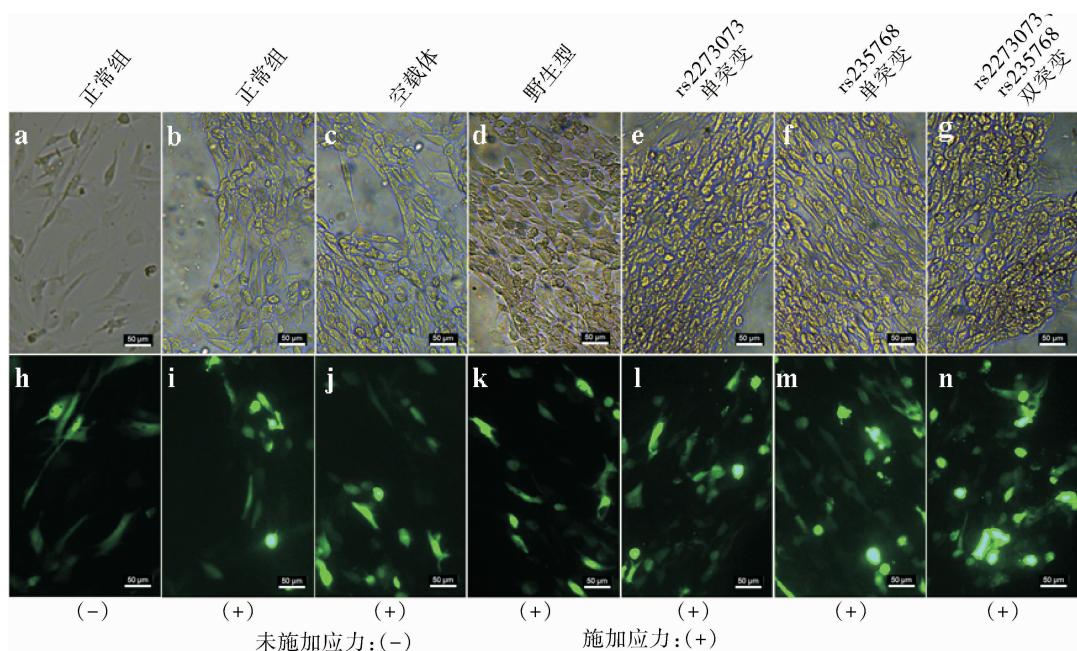


图 4 机械应力施加前后各组转染细胞的形态学改变

a ~ g. 机械应力施加前; h ~ n. 机械应力施加后

6. 机械应力加载前后的各转染组细胞 BMP2 表达情况: 机械应力加载前, 各 BMP2 转染组 [BMP2 野生型组、BMP2 (rs2273073) 单突变组、BMP2 (rs235768) 单突变组、BMP2 (rs2273073, rs235768) 双突变组] 的 BMP2 表达量明显高于正常组和空载体组 ($P < 0.01$), 具有统计学意义, 但各 BMP2 转染组间无统计学差异 ($P > 0.05$), 此结果与人不同基因型骨化后纵韧带 BMP2 表达情况相符。机械应力加载后, BMP2 (rs2273073) 单突变组和 BMP2 (rs2273073, rs235768) 双突变组的 BMP2 表达较未施加应力情况下明显增加, 具有统计学意义 ($P < 0.05$), 余各组 BMP2 表达量较应力前后无统计学差异 ($P > 0.05$, 图 5)。

讨 论

1839 年日本学者 Key 首次报道了颈椎后纵韧带骨化症, 但直到 1960 年 Tsukimoto 等报道了其是导致颈椎病的病因之一之后, 才开始真正引起人们的关注。后纵韧带骨化会压迫脊髓和神经根, 引起不同程度的神经症状, 从而严重影响人们的身心健康。后纵韧带骨化主要发生在日本和其他亚洲人群, 经过了半个世纪的研究, 其具体的发生机制仍未明确, 这其中

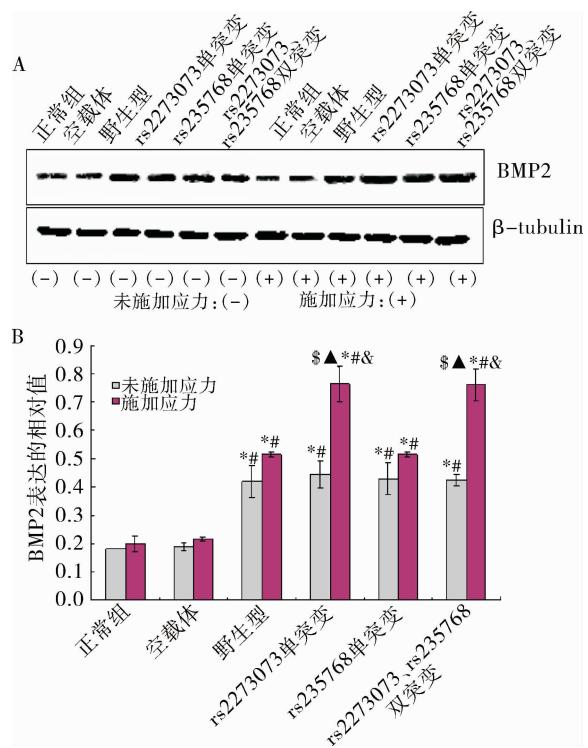


图 5 机械应力施加前后各转染组细胞 BMP2 表达比较
在同一机械应力施加情况下, 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与空载体比较, # $P < 0.01$; 与野生型比较, & $P < 0.01$; 与 rs235768 单突变比较, ^ $P < 0.01$; 与同组未施加应力比较, § $P < 0.05$

基因因素和环境因素已经被广泛研究并且被证实与其发生、发展有关^[4]。

BMPs 作为成骨诱导因子,可刺激多潜能基质干细胞分化为成骨细胞,并能增强成骨细胞的功能^[5]。现已发现 BMPs 家族至少包括 20 个成员,而不同 BMPs 成员对成骨具有不同的诱导作用。其中,BMP2 被认为是活性最强且唯一能体外单独诱导成骨的因子。已有研究表明 BMP2 能诱导 ST2 骨髓基质细胞,成骨肉瘤细胞,后纵韧带细胞等骨化^[6~8]。同时,研究证实 BMP2 能诱导后纵韧带骨化患者的后纵韧带细胞 BMP 受体表达或信号转导,已有研究者在细胞因子水平和基因水平进行相关研究证实^[9]。在本研究组的前期研究中,通过大范围的样本收集,采用基因测序的方法,已经成功证实了 BMP2 单核苷酸多态性位点 109T > G (rs2273073), 570A > T (rs235768) 的突变和 OPLL 的发生有关联性^[2]。虽然 2 个位点等位基因的突变如何导致了 OPLL 的发生与发展机制尚不清楚,但是这种突变可能增加了 BMP2 在颈椎后纵韧带中的表达,从而主要通过 Smads 或 MAPK 等途径发挥生物学效应。

与此同时,在颈椎后纵韧带骨化的发生和发展过程中,机械应力是目前公认的局部环境因素。临床研究发现,后纵韧带骨化的进展与椎间盘局部异常应力分布密切相关,且骨化进展通常发生在韧带拉伸作用下的椎间盘变形区^[10]。同时,机械应力刺激因素在动物实验中也得到了证实,动物实验表明,牵张应力刺激大鼠尾椎椎体 2 周后即出现明显骨化倾向^[11]。在颈椎后路椎板切除或者椎管成形术后,由于颈椎后部结构缺失,局部稳定性下降,手术患者的后纵韧带骨化进展较未手术患者明显加快^[12, 13]。而在前路融合术后,由于去除了颈椎局部节段不稳等因素,后纵韧带骨化的进展明显减慢或者消失^[14, 15]。同时,基础研究证实,对取自 OPLL 和非 OPLL 的韧带细胞施加循环机械应力刺激,结果 ALP、BMP2、BMP4 及 BMP 受体表达增加,成骨基因 Cbfα1、ALP、OC 的 mRNA 表达增加,而非 OPLL 组无变化。因此,在研究该疾病的时候,作为局部影响因素的机械应力,必须引起重视。

本研究通过细胞转染,构建不同 BMP2 基因型变体模型,同时施加循环机械应力,结果发现单核苷酸多态性位点 109T > G (rs2273073) 的突变不仅能提高人们对 OPLL 的易感性,同时能提高 OPLL 患者对机械应力的敏感度,从而加速 OPLL 的进展。但是本研

究也有以下几点局限性:①未完全覆盖 BMP2 上所有 SNPs 位点;②作为颈椎后纵韧带细胞的替代者,C3H10T1/2 细胞尽管已被广泛采用进行相关成骨研究,但还是有些许差异,在未来的研究中还有待进一步明确^[16, 17]。

总之,颈椎后纵韧带骨化的发病缓慢,缺乏有效的早期诊断方法,发病机制迄今仍未完全阐明,从而难以达到早期诊断、早期治疗。后纵韧带骨化的最终结局是采用外科手术治疗,而手术时机及方式至今仍存在分歧。分子遗传学研究有助于阐明该病的发生机制,从而有助于相关治疗药物的开发达到早期治疗作用,使患者免于手术的痛苦。同时,机械应力等环境因素的研究有助于对手术患者进行相关的指导与治疗,预防疾病复发和进展。

参考文献

- 1 Stapleton CJ, Pham MH, Attenello FJ, et al. Ossification of the posterior longitudinal ligament: genetics and pathophysiology [J]. Neurosurg Focus, 2011, 30(3): E6
- 2 Yan L, Chang Z, Liu Y, et al. A single nucleotide polymorphism in the human bone morphogenetic protein - 2 gene (109T > G) affects the Smad signaling pathway and the predisposition to ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine [J]. Chin Med J: Engl, 2013, 126(6): 1112–1118
- 3 Wang H, Liu D, Yang Z, et al. Association of bone morphogenetic protein - 2 gene polymorphisms with susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine and its severity in Chinese patients [J]. Eur Spine J, 2008, 17(7): 956–964
- 4 Choi BW, Song KJ, Chang H. Ossification of the posterior longitudinal ligament: a review of literature [J]. Asian Spine J, 2011, 5(4): 267–276
- 5 Luu HH, Song WX, Luo X, et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. J Orthop Res, 2007, 25(5): 665–677
- 6 Sowa H, Kaji H, Hendy GN, et al. Menin is required for bone morphogenetic protein 2 – and transforming growth factor beta – regulated osteoblastic differentiation through interaction with Smads and Runx2 [J]. J Biol Chem, 2004, 279(39): 40267–40275
- 7 Cillo JJ, Gassner R, Koepsel RR, et al. Growth factor and cytokine gene expression in mechanically strained human osteoblast – like cells: implications for distraction osteogenesis [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2000, 90(2): 147–154
- 8 Uchida K, Yayama T, Sugita D, et al. Initiation and progression of ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine in the hereditary spinal hyperostotic mouse (twy/twy) [J]. Eur Spine J, 2012, 21(1): 149–155
- 9 Horikoshi T, Maeda K, Kawaguchi Y, et al. A large – scale genetic association study of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine [J]. Hum Genet, 2006, 119(6): 611–616

- 10 Matsunaga S, Sakou T, Taketomi E, et al. Effects of strain distribution in the intervertebral discs on the progression of ossification of the posterior longitudinal ligaments [J]. Spine (Phila Pa 1976), 1996, 21(2) : 184 - 189
- 11 Tsukamoto N, Maeda T, Miura H, et al. Repetitive tensile stress to rat caudal vertebrae inducing cartilage formation in the spinal ligaments: a possible role of mechanical stress in the development of ossification of the spinal ligaments [J]. J Neurosurg Spine , 2006, 5(3) : 234 - 242
- 12 Nakamura H. A radiographic study of the progression of ossification of the cervical posterior longitudinal ligament: the correlation between the ossification of the posterior longitudinal ligament and that of the anterior longitudinal ligament [J]. Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi , 1994, 68(9) : 725 - 736
- 13 Kim YH, Khuyagbaatar B, Kim K. Biomechanical effects of spinal cord compression due to ossification of posterior longitudinal ligament and ligamentum flavum: a finite element analysis [J]. Med Eng Phys , 2013, 35(9) : 1266 - 1271
- 14 Kato Y, Iwasaki M, Fuji T, et al. Long - term follow - up results of laminectomy for cervical myelopathy caused by ossification of the posterior longitudinal ligament [J]. J Neurosurg , 1998, 89(2) : 217 - 223
- 15 Onari K, Akiyama N, Kondo S, et al. Long - term follow - up results of anterior interbody fusion applied for cervical myelopathy due to ossification of the posterior longitudinal ligament [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2001, 26(5) : 488 - 493
- 16 Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, et al. Fasudil hydrochloride induces osteoblastic differentiation of stromal cell lines, C3H10T1/2 and ST2, via bone morphogenetic protein - 2 expression [J]. Endocr J , 2010, 57(5) : 415 - 421
- 17 Huang HY, Hu LL, Song TJ, et al. Involvement of cytoskeleton - associated proteins in the commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to adipocyte lineage induced by BMP2/4 [J]. Mol Cell Proteomics , 2011, 10(1) : M110.002691

(收稿日期:2014-04-20)

(修回日期:2014-04-30)

龙丹生血颗粒对免疫性血小板减少性紫癜模型小鼠外周血象与骨髓巨核细胞以及血清 PAIgG 水平的影响

郎海燕 马 薇 张雅月 石凤芹 陈信义

摘要 目的 观察龙丹生血颗粒对 ITP 模型小鼠骨髓巨核细胞和血清 PAIgG 的影响。方法 70 只 Balb/c 小鼠随机分为对照、模型、升血小板胶囊、泼尼松、龙丹生血颗粒大、中、小剂量 7 组,除正常组外,其余各组隔日 1 次腹腔注射豚鼠抗小鼠血小板血清(GP-APS)建立 ITP 小鼠模型,于造模第 8 天开始给药,各组均按 0.2ml/(10g·d)体积灌胃。其中,正常组、模型组灌服生理盐水,升血小板胶囊组灌胃升血小板胶囊内容物混悬液 1.125g/kg,泼尼松按 0.0113mg/(10g·d)灌胃,龙丹生血颗粒大、中、小剂量组分别按 13.75g 生药/千克、6.88g 生药/千克、3.44g 生药/千克灌胃。连续 8 天后眼球取血分离血清,进行血液学、血清 PAIgG 检测,并观察小鼠骨髓巨核细胞形态及分类。结果 与正常组相比,模型组小鼠 PLT、WBC、Hb 降低,血清 PAIgG 明显升高,骨髓产板巨核细胞数减低。与模型组相比,龙丹生血颗粒各剂量组小鼠外周血 PLT、WBC、Hb 数值均有所恢复。大剂量组产板巨核细胞明显增加,PAIgG 有所降低。结论 龙丹生血颗粒通过降低血清 PAIgG 水平、促进骨髓巨核细胞分化而提升 ITP 模型动物外周血小板数值。

关键词 龙丹生血颗粒 免疫性血小板减少性紫癜 巨核细胞 PAIgG

[中图分类号] R593

[文献标识码] A

Effect of Long Dan Sheng Xue Granule on the Peripheral Hemogram, Bone Marrow Megakaryocytes and Serum PAIgG Level in Model Mice with Immune Thrombocytopenic Purpura. Lang Haiyan, Ma Wei, Zhang Yayue, et al. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Abstract Objective To observe the effect of Long Dan Sheng Xue granule on the peripheral hemogram, bone marrow megakaryocytes and serum PAIgG Level in model mice with immune thrombocytopenic purpura(ITP). **Methods** Seventy Balb/c mice were random-

基金项目:2013 年北京中医药大学自主选题项目(2013-JYBZZ-JS-162)

作者单位:100078 北京中医药大学东方医院(郎海燕);100700 北京中医药大学东直门医院(马薇、张雅月、石凤芹、陈信义)

通讯作者:陈信义,教授,主任医师,电子信箱:chenxinyi0729@126.com