

Rizek 等^[9]通过分析多重耐药革兰阴性杆菌对磷霉素氨丁三醇的敏感度发现,磷霉素氨丁三醇对黏质沙雷菌和克雷伯杆菌效果良好。

磷霉素氨丁三醇散具有广谱抗菌活性,且与其他抗菌药物没有交叉耐药性;磷霉素氨丁三醇散解决了传统磷霉素制剂口服生物利用度低的缺点,且抗菌谱覆盖常见尿路感染致病菌,尤其对 ESBL 阳性菌和多重耐药菌有效;磷霉素氨丁三醇散安全性高,不良反应轻微,可用于下尿路感染的经验治疗,对复杂性下尿路感染同样有效,可以作为下尿路感染的一线用药。

参考文献

- 1 李耘,吕媛,薛峰,等. 卫生部全国细菌耐药监测网(Mohnarín) 2011-2012 年革兰阴性菌耐药监测报告[J]. 中国临床药理学杂志,2014,30(3):260-276
- 2 Sorlozano A, Jimenez PA, Dios LD, *et al.* Evolution of the resistance to antibiotics of bacteria involved in urinary tract infections: a 7-year surveillance study[J]. *Am J Infect Control*, 2014, 42(10):1033-1038
- 3 Lai B, Zheng B, Li Y, *et al.* In vitro susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from urine samples obtained in mainland China to fosfomycin trometamol and other antibiotics: a 9-year surveillance study (2004-2012)[J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 6:14:66
- 4 Schito GC. Why fosfomycin trometamol as first line therapy for uncomplicated UTI? [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2003, 22 (Suppl 2):79-83
- 5 Stucki K, Harbarth S, Nendaz M. Enterococcal infections: from simple to most complex[J]. *Rev Med Suisse*, 2014, 10(446):1920-1923
- 6 Roussos N, Karageorgopoulos DE, Samonis G, *et al.* Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of fosfomycin for the treatment of patients with systemic infections[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2009, 34(6):506-515
- 7 Galatti L, Sessa A, Mazzaglia G, *et al.* Antibiotic prescribing for acute and recurrent cystitis in primary care[J]. *Antibiotic Chemother*, 2006, 57(3):551-556
- 8 Çagan AS, Gençer S, Batirel A, *et al.* Fosfomycin susceptibility of urinary *Escherichia coli* isolates producing extended-spectrum beta-lactamase according to CLSI and EUCAST recommendations[J]. *Mikrobiyol Bul*, 2014, 48(4):545-555
- 9 Rizek C, Ferraz JR, van der Heijden IM, *et al.* In vitro activity of potentials old and new drugs multidrug-resistant gram-negatives[J]. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 2015, 21(2):114-117

(收稿日期:2015-01-28)

(修回日期:2015-02-04)

caveolin-1 蛋白在骨折愈合过程中表达的实验研究

肖 峰 刘光华 刘邦忠 益莉娜 邹 珏 张金宇 薛宴旻 王秀玲

摘 要 **目的** 观察骨折愈合不同时期骨折部位 caveolin-1 蛋白的表达规律。**方法** S-D 大鼠 40 只,建立骨缺损模型。于术后 1、2、3、4 周随机选取 10 只大鼠,测定骨折处骨痂骨密度值。制作石蜡切片,进行 HE 染色及 caveolin-1 蛋白免疫组化染色。**结果** 随着骨折愈合时间延长,骨折部位骨痂骨密度逐渐增加,于术后第 4 周达最大。组织学结果显示,第 1 周,间充质细胞及软骨细胞膜上开始有 caveolin-1 蛋白表达;第 2 周,软骨细胞大量增殖,其膜上 caveolin-1 蛋白表达增加;第 3 周,软骨细胞退变、凋亡,其细胞膜上 caveolin-1 蛋白表达开始减少;第 4 周,软骨细胞被成骨细胞取代,caveolin-1 蛋白表达基本消失。**结论** 骨折后 caveolin-1 蛋白表达呈现先升后降的趋势,并与软骨细胞出现、消失有关,推测 caveolin-1 蛋白与软骨细胞分化、增殖有关,而与骨折后骨矿化过程无关。

关键词 骨折愈合 小凹蛋白-1 骨密度

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.09.025

Experimental Study on Expression of Caveolin-1 during Fracture Healing. Xiao Feng, Liu Guanghua, Liu Bangzhong, *et al.* The First Affiliated Hospital, The Seventh People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200137, China

Abstract Objective To observe the expression of caveolin-1 during fracture healing. **Methods** Forty male SD rats were en-

基金项目:上海市第七人民医院新星培养基金资助项目

作者单位:200137 上海市第七人民医院病理科(肖峰、益莉娜、邹珏、张金宇、薛宴旻、王秀玲);上海,复旦大学附属中山医院康复科(刘光华、刘邦忠)

通讯作者:王秀玲,主任医师,电子信箱:wxl367367@126.com

rolled. Animal model of cortical bone defect in right proximal tibia of rats were performed. Ten rats were randomly sacrificed at week 1, 2, 3, and 4. The bone mineral density (BMD) of the callus at the fracture point was measured. Then the callus were cut down and sliced for histological and immunohistochemistry observation. **Results** The BMD examination showed that callus BMD increased with time flowed, and got a maximal figure at week 4. Histological examination showed that at the first week, expression of caveolin-1 was detected on the plasma membrane of mesenchymal cell and cartilage cells. At the second week, with the proliferation of cartilage cells, expression of caveolin-1 increased. In week 3, expression of caveolin-1 decreased while the cartilage cells apoptosised. In week 4, caveolin-1 was almost disappeared while cartilage cells were replaced by osteoblasts. **Conclusion** Expression of caveolin-1 increased at first and decreased afterwards during fracture healing. This phenomenon was accompanied by the appearance and vanishing of cartilage cells. So it is speculated that caveolin-1 has a relationship with cartilage cells differentiation and proliferation, but has no relationship with the course of mineralization.

Key words Fracture healing; Caveolin-1; Bone mineral density

骨折愈合是一个很复杂的病理生理学过程,涉及多种细胞及细胞因子的协同作用,然而目前对骨折愈合过程中的信号转导机制尚不是很明确。小凹蛋白被认为是胞膜刺激感受装置和信号汇总平台,介导了细胞内化、合成、增殖、凋亡等多种信号转导^[1]。作为细胞信号转导中心的小凹蛋白-1 (caveolin-1) 目前正受到广泛关注,本研究将通过观察骨折愈合不同时期 caveolin-1 蛋白的表达规律,以探讨 caveolin-1 蛋白在骨折愈合中的作用。

材料与方法

1. 材料:选取 3 月龄,体重 250~300g 的 S-D 雄性大鼠 40 只(复旦大学附属中山医院实验动物中心提供);caveolin-1 多克隆抗体浓缩液 antibody (ab86711),稀释度 1:1000,试剂购自 Abcam 公司, Lot: 99121311;二抗使用 Dako 公司编号 K8000 的检测系统;双能 X 线骨密度测定仪(型号 Hologic 2000,美国 Hologic 公司)。

2. 缺损性骨折模型制作:2ml 0.1g 氯胺酮 100mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,选取右后肢用 9% 硫化钠脱毛,在无菌条件下手术,在胫骨前部、胫骨结节下 1cm 处,用厚约 2mm 的钢锯条,造成胫骨前 2mm 横形的缺损性骨折,深达髓腔。生理盐水冲洗创口,骨折不做内外固定,逐层缝合创口。于术后 1、2、3、4 周随机取 10 只大鼠处死,取术侧整根胫骨(含腓骨),仔细剔除肌肉及软组织后进行骨痂部位骨密度测定。截取含骨折部位在内的 1cm 长胫骨,用 10% 的多聚甲醛溶液固定 24h 后,再置于 10% EDTA 脱钙液中充分脱钙,待大头针可以轻易刺穿骨痂时结束脱钙,标本经彻底冲洗后,沿胫骨中轴矢状面剖开,经乙醇逐级脱水、透明、浸蜡后石蜡包埋,3μm 厚做连续切片备用。

3. 观察指标:(1)骨密度测定:在测试之前,先用标准品进行机器校正,系统切换至动物实验模式。将上面所取大鼠胫骨(含腓骨)标本依次放于双能 X 线骨密度测定仪的有机玻璃板上(每次 5 个标本),在完成整根胫骨扫描后,将 3mm × 9mm 大小取样框放置于骨痂部位,对骨痂处骨密度值进行测定。(2)处理:组织病理学观察,HE 染色;caveolin-1 蛋白免

疫组化观察,采用 EnVision 法进行 caveolin-1 蛋白免疫组化染色,DAB 显色,镜下控制反应时间,蒸馏水洗涤后苏木素轻度复染。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

4. 免疫组织化学结果判断:caveolin-1 蛋白定位于细胞膜,按染色强度(未着色、淡黄色、浅褐色和深褐色)和阳性细胞数占总细胞数(<5%、5%~25%、25%~49%、≥50%)分别计-、+、++、+++。

5. 图像处理与分析:每张免疫组化切片随机选取 10 × 40 倍 5 个不重叠视野进行图像采集,以 Image-Pro plus 软件进行光密度值测定,计算出平均光密度值(avIA)。

6. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不同时期平均光密度值及骨密度值比较均采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 骨密度测量结果:第 1~4 周各组大鼠骨折骨痂平均骨密度分别为 0.069 ± 0.007 、 0.075 ± 0.005 、 0.076 ± 0.008 、 $0.085 \pm 0.007 \text{ g/cm}^2$ 。即随着骨折愈合时间延长,骨折部位骨密度逐渐升高,并在第 4 周达到高峰(图 1),4 个时期骨密度差异有统计学意义($P = 0.000$)。

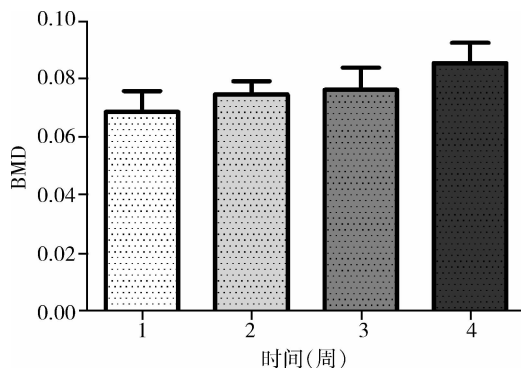


图 1 不同时期骨折骨密度变化

2. 组织学观察:骨折第 1 周,骨折断端附近骨膜

生发层细胞大量增殖,间充质细胞向软骨细胞及成骨细胞分化,局部区域形成软骨岛;第2周,骨折部位软骨细胞及成骨细胞大量聚集,产生软骨基质及类骨质;第3周,成骨、成软骨活动继续增强,软骨细胞开始出现退化、凋亡,破骨细胞大量出现,吸收软骨基质和类骨质;第4周,成骨活动继续加强,软骨基质及类骨质逐渐为骨组织取代。

3. 免疫组织化学观察:骨折后第1周,骨折部位开始出现 caveolin - 1 蛋白表达,表达区域主要位于间充质细胞及软骨岛内软骨细胞膜上(图2);第2周,软骨细胞大量增殖,caveolin - 1 蛋白表达也急剧增加,表达区域主要位于软骨细胞膜上(图3);第3周,随着软骨细胞退变、凋亡,其细胞膜上 caveolin - 1 蛋白表达开始减少(图4);至第4周,随着骨折逐渐愈合,软骨细胞消失,并被成骨细胞取代,caveolin - 1 蛋白基本很少表达(图5)。在骨折愈合的各期,小凹蛋白主要定位在间充质细胞、成软骨细胞及软骨细

胞,其各周表达的阳性率为 60%、90%、50%、10%。骨折部位 caveolin - 1 蛋白表达的平均光密度值测定结果显示,第1~4周,平均光密度值分别为 0.22 ± 0.03 、 0.27 ± 0.04 、 0.18 ± 0.12 、 0.06 ± 0.01 (图6),四个时期 caveolin - 1 蛋白表达的平均光密度值差异有统计学意义($P < 0.001$),见表1。

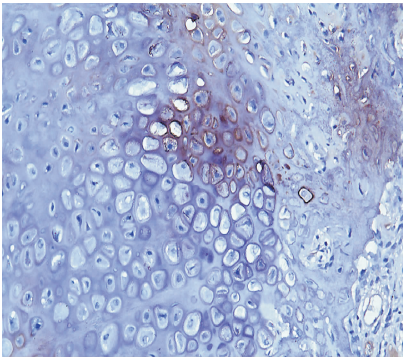


图4 第3周表达 caveolin - 1 的软骨细胞减少(IHC, ×200)

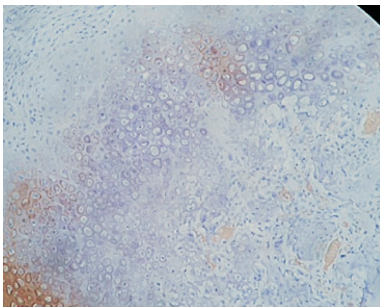


图2 第1周 caveolin - 1 表达于软骨细胞膜及间充质细胞(IHC, ×200)

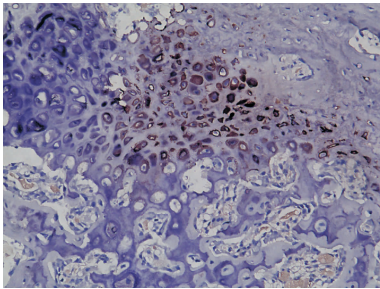


图3 第2周 caveolin - 1 表达于增殖的软骨细胞膜(IHC, ×200)

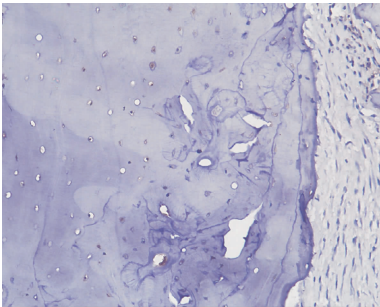


图5 第4周 caveolin - 1 阴性表达(IHC, ×200)

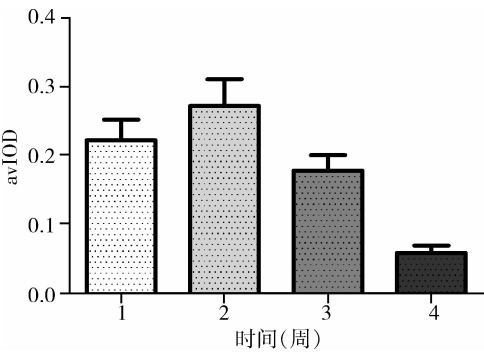


图6 不同时期 caveolin - 1 表达

表1 caveolin - 1 蛋白在骨折愈合过程中的表达情况

骨折愈合时间	n	-	+	++	+++	阳性率(%)	平均光密度值($\bar{x} \pm s$)
第1周	10	4	1	3	1	60	0.22 ± 0.03
第2周	10	1	2	3	4	90	$0.27 \pm 0.04^*$
第3周	10	5	1	3	1	50	$0.18 \pm 0.12^*$
第4周	10	9	1	0	0	10	$0.06 \pm 0.01^*$
总计	40	19	5	9	6	50	-

1、2、3、4周之间 caveolin - 1 蛋白表达的平均光密度值差异均有统计学意义, * $P < 0.001$

讨 论

caveolae(小凹)是细胞膜表面的内陷区域,广泛存在于各种细胞中,caveolae 的表面标记蛋白是 caveolin-1,它是许多信号分子的支架蛋白和负性调节蛋白,是胞膜刺激感受装置和信号集成平台,它介导了细胞内化、合成、增殖、迁移、凋亡等多种信号的转导,是细胞信号转导中心。

caveolin-1 蛋白在成骨细胞中的表达已经被证实,Baker 等^[2]的研究中提到其骨髓来源的间充质干细胞向成骨细胞分化的过程中,caveolin-1 蛋白的表达是增加的,Tang 等^[3]在体外培养的成骨细胞中检测到有 caveolin-1 蛋白表达,他的另一项研究发现骨折后外周血单核细胞中 caveolin-1 的基因表达持续增高,并在骨折后第 9~12 天达到最高峰,进而推测 caveolin-1 在骨折愈合的早期起重要的信号转导作用。张颖熠^[4]观察成骨细胞不同生长阶段 caveolin-1 蛋白表达变化,发现小鼠前成骨样 MC3T3-E1 细胞可表达基础 caveolin-1 蛋白,且随着培养时间的延长,caveolin-1 蛋白的表达逐渐降低。

除了成骨细胞,更多的人观察到 caveolin-1 蛋白在软骨细胞中表达。Kayoko 等^[5]在小鼠的颞下颌关节软骨的生发层检测到 caveolin-1 的表达,而在成熟的软骨细胞中未见表达,从而认为 caveolin-1 可能参与软骨细胞的繁殖与分化。Wolfgang 等^[6]一系列的研究表明 caveolin-1 不仅在新生与成年小鼠的关节软骨中均有表达,而且在成人的膝关节软骨中同样存在 caveolin-1 表达,证实 caveolin-1 在软骨繁殖分化中的作用。在本次试验中也观察到,在大鼠骨折愈合第 1 周,骨痂中间充质细胞、软骨细胞分布区可见显著 caveolin-1 蛋白表达,而在正常骨组织中,几乎没有 caveolin-1 蛋白表达,高倍镜下观察可见 caveolin-1 蛋白基本上表达于间充质细胞及软骨细胞膜上;随着时间推移,骨折部位软骨细胞大量增殖,其细胞膜上 caveolin-1 蛋白表达达到高峰;之后软骨细胞变性、凋亡,成骨细胞侵入软骨基质,caveolin-1 蛋白表达逐渐减少,直至第 4 周,随着骨折逐渐愈合,软骨细胞消失,并被成骨细胞取代,骨折部位几乎观察不到 caveolin-1 蛋白表达。骨折愈合的不同时期 caveolin-1 蛋白表达的平均光密度值差异有统计学意义($P=0.000$)。本实验结果证实在骨折后,间充质细胞及软骨细胞膜上均有 caveolin-1 蛋

白表达,而在成骨细胞则未见 caveolin-1 蛋白表达。并且,从此次研究中还观察到,caveolin-1 蛋白随着软骨细胞的增多而表达增加,随着软骨细胞凋亡而表达下降,因而推测 caveolin-1 蛋白参与了骨折愈合早期的间充质细胞分化为软骨细胞以及软骨细胞的增殖过程,也即 caveolin-1 蛋白与骨折后软骨内成骨过程密切相关。鉴于 caveolin-1 是胞膜刺激感受装置和信号集成平台,被认为是细胞信号转导中心,因而推测 caveolin-1 蛋白与骨折后软骨细胞分化增殖的信号转导密切相关。

骨密度反映的是骨矿含量,对骨痂部位进行 BMD 测定比用普通 X 线片可以更加敏感而精确的发现骨痂部位骨矿变化^[7]。易福东观察到雌激素对于增殖期和矿化期成骨细胞细胞 caveolin-1 蛋白表达无明显影响,但可以剂量依赖性下调分化期细胞 caveolin-1 蛋白表达,并且该作用不涉及一氧化氮途径。笔者研究结果显示,随着骨折愈合时间的延长,骨折部位骨痂骨密度逐渐升高,提示骨矿化程度逐渐升高,而与 caveolin-1 蛋白表达相比较后发现,随着骨矿化程度的增加,caveolin-1 蛋白表达逐渐减少,提示 caveolin-1 蛋白并不参与骨折后骨矿化过程,进一步证实 caveolin-1 蛋白在骨折愈合的早期起重要的信号转导作用。

参考文献

- 1 张勤勤,孙润广,李连启. caveolate 及其蛋白家族的生物学结构和功能的研究现状[J]. 北京生物医学工程,2011,30(2):215-220
- 2 Baker N, Zhang GF, You Y, et al. Caveolin-1 regulates proliferation and estrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Cellular Biochemistry, 2012, 113:3773-3787
- 3 Tang PF, George A. Patients with long bone fracture have altered Caveolin-1 expression in their peripheral blood mononuclear cells [J]. Arch Orthop Trauma Surg,2009,129:1287-1292
- 4 张颖熠. Caveolin-1 对成骨细胞 MC3T3-E1 增殖分化过程的调节作用[D]. 南昌:南昌大学,2009:1-22
- 5 Kayoko NI, Suzuki A, Amizuka N, et al. Expression of Caveolin-1 in the rat temporomandibular joint[J]. Wiley Liss, 2006,288(1):8-12
- 6 Wolfgang S, Ferruccio G, Daniela V, et al. Characterisation of caveolins from cartilage: expression of Caveolin-1, -2 and -3 in chondrocytes and in alginate cell culture of the rat tibia[J]. Histochem Cell Boil, 1999,112:41-49
- 7 王维彬,韩大成. 兔胫骨平台骨折愈合中的骨密度变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(26):4854-4856

(收稿日期:2015-01-18)

(修回日期:2015-02-06)