

分类号:

密 级: 公开

学 号: 20182114010

单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### PDGF-BB 基因多样性与新疆部分地区维、汉间 骨关节炎相关性研究

学 位 申 请 人	王梦雨
指 导 教 师	王维山教授
申请学位门类级别	临床医学硕士
学 科、专 业 名 称	外科学
研 究 方 向	骨外科疾病
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2021 年 6 月

分类号:

密 级: 公开

学 号: 20182114010

单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### PDGF-BB 基因多样性与新疆部分地区维、汉间 骨关节炎相关性研究

学 位 申 请 人	王梦雨
指 导 教 师	王维山教授
申请学位门类级别	临床医学硕士
学 科、专 业 名 称	外科学
研 究 方 向	骨外科疾病
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2021 年 6 月

**Study on the correlation between PDGF-BB gene diversity and  
osteoarthritis between Uyghur and Han in some areas of  
Xinjiang**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Master of Medicine**

By

**Wang Mengyu**

**( Surgery )**

Dissertation Supervisor: Prof. Wang Weishan

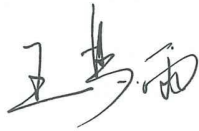
June, 2021

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：



时间：

2021年5月26日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：



时间：2021年5月26日

导师签名：



时间：2021年5月26日

## 摘要

**目的：**遗传因素是骨关节炎重要的病因和危险因素之一，且遗传易感因素在每个族群中的作用并不能被复制到所有的族群中，本研究拟探讨血小板衍生因子-B 的两个位点（rs1800817 位点、rs2285094 位点）基因在新疆地区汉族人群和维吾尔族人群的群体中是否有基因突变的情况；rs1800817 位点、rs2285094 位点基因多态性与原发性膝骨关节炎的遗传相关性；通过本实验探讨新疆地区 PDGF-BB 基因多样性与膝关节骨性关节炎之间是否存在一定的联系。希望通过本试验研究对易患骨关节炎群体能提供一个新的筛选位点，便于对新疆地区易感人群进行干预，延缓关节炎的发生。

**方法：**本实验在喀什地区三师医院、石河子大学第一附属医院、图木舒克市人民医院共选取研究对象 519 例汉族 266 例（骨关节炎 80 例，非骨关节炎 186 例），维吾尔族 253 例（骨关节炎 91 例，非骨关节炎 162 例），给予知情同意后，采集血样 5 ml，通过 PCR/RFLP 技术分析对所选对象的 PDGF-BB 位点(rs1800817 位点、rs2285094 位点)单核苷酸多态性基因型进行检测。用标准卡方检验(Standard chi square test) 分别比较 PDGF-BB (rs1800817 位点、rs2285094 位点) 基因多样性在汉族骨关节炎组和汉族非骨关节炎组中是否存在差异；维吾尔族骨关节炎组和非骨关节炎组中是否存在差异。应用 logistic 回归分析探究骨关节炎的危险因素和保护因素，并以 OR 和 95%可信区间(CI)表示相对风险度。

**结果：**本研究所选取的 519 例实验对象全部符合制定的纳入标准，均计入后期结果分析。汉族骨关节炎与非骨关节炎组、维吾尔族骨关节炎组与非骨关节炎组基因型均符合哈迪-温伯格（Hardy-Weinberg）平衡定律，所选取的研究对象可以代表新疆地区的汉族和维吾尔族人群；PDGF-BB 的 rs2285094 位点的 CC 型、CT 型在维吾尔族骨关节炎组和非骨关节炎组中的分布不同 ( $X^2=17.9$ ,  $P<0.00$ ) 有统计学差异；汉族骨关节炎组与非骨关节炎组相比 PDGF-BB 的 rs1800817 位点的 GT 型、GG 型分布 ( $X^2=4.61$ ,  $P=0.032$ ) 有统计学差异。

**结论：**PDGF-BB rs1800817位点基因型分布在汉族和维吾尔族中分布均有差异，rs2285094位点基因型分布在维吾尔族中有明显差异。新疆地区维吾尔族和汉族的PDGF-BB rs1800817位点中的GT型和GG型携带者可能会增加患骨关节炎风险；rs2285094位点中的CC型和CT型携带者可能会减低骨性关节炎发病风险。

**关键词：**原发性膝骨关节炎；PDGF-BB；基因多态性；新疆地区；汉族；维吾尔族；易感性

## Abstract

**Objective:** Genetic factors are one of the important etiological and risk factors for osteoarthritis, and the role of genetic susceptibility factors in each ethnic group cannot be replicated in all ethnic groups. The genetic correlation between the rs1800817 locus and rs2285094 locus polymorphisms and primary knee osteoarthritis was investigated by this experiment to determine whether there is an association between the genetic diversity of PDGF-BB gene polymorphisms and knee osteoarthritis in Xinjiang. It is hoped that the present study will provide a new screening locus for the osteoarthritis-prone population and facilitate the intervention of the susceptible population in Xinjiang to delay the onset of arthritis.

**METHODS:** A total of 519 Han Chinese (266 (80 osteoarthritis, 186 non-osteoarthritis)) and 253 Uyghur (91 osteoarthritis, 162 non-osteoarthritis) subjects were selected from the Third Division Hospital in Kashgar, the First Affiliated Hospital of Shihezi University and Tumushuk People's Hospital. The genotypes of single nucleotide polymorphisms at the PDGF-BB locus (rs1800817 locus and rs2285094 locus) of the selected subjects were detected by PCR/RFLP analysis. Standard chi square test was used to compare whether the genetic diversity of PDGF-BB (rs1800817 locus, rs2285094 locus) differed in the Han osteoarthritis group and the Han non-osteoarthritis group; and whether it differed in the Uyghur osteoarthritis group and the non-osteoarthritis group, respectively. Logistic multi-factor regression analysis was applied to explore the risk and protective factors for osteoarthritis, and the relative risk level was expressed as OR and 95% confidence interval (CI).

**RESULTS:** All 519 subjects selected for this study met the inclusion criteria established and were counted in the post-hoc outcome analysis. The genotypes of the Han Chinese osteoarthritis and non-osteoarthritis groups and the Uyghur osteoarthritis and non-osteoarthritis groups were all consistent with the Hardy - Weinberg law of equilibrium, and the subjects selected for the study were representative of the Han Chinese and Uyghur populations in the Xinjiang region, the CC type at the rs2285094 locus of PDGF-BB, the CT type in the Uyghur osteoarthritis group and the non-osteoarthritis group ( $\chi^2=17.9$ ,  $P<0.00$ ) were statistically different; the distribution of GT type and GG type at the rs1800817 locus of PDGF-BB in the Han osteoarthritis group compared with the non-osteoarthritis group ( $\chi^2=4.61$ ,  $P=0.032$ ) was statistically different.

**Conclusions:** The genotype distribution of the PDGF-BB rs1800817 locus differed in both Han and Uyghur ethnic groups, and the genotype distribution of the rs2285094 locus differed significantly in the Uyghur ethnic group. Carriers of the GT and GG types at the PDGF-BB rs1800817 locus may be at increased risk of osteoarthritis among Uyghurs and Han Chinese in Xinjiang; carriers of the CC and CT types at the rs2285094 locus may be at reduced risk of developing osteoarthritis.

**Keywords:** primary knee osteoarthritis; PDGF-BB; gene polymorphism; Xinjiang region; Han Chinese; Uyghur; susceptibility

# 目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
英文缩略词表.....	IV
前言.....	1
一、 骨关节炎的研究背景.....	1
二、 骨关节炎的发病机制.....	1
三、 骨关节炎的基因筛选.....	3
四、 研究价值及目的.....	3
材料及方法.....	4
1. 材料.....	4
1.1 病例采集.....	4
1.2 实验工具及试剂.....	4
2. 实验方法.....	6
2.1 提取 DNA.....	6
2.2 DNA 浓度测定.....	7
2.3 电泳凝胶的制备.....	7
2.4 DNA 扩增.....	7
2.5 DNA 测序.....	8
2.6 统计学处理.....	8
技术路线图.....	9
结果.....	10
讨论.....	15
结论.....	17
综述.....	20
致谢.....	32
作者简介.....	33
石河子大学硕士研究生学位论文.....	34
导师评阅表.....	34

## 英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
PDGF	Platelet-derived growth factor	血小板衍生生长因子
SNP	Single Nucleotide	单核苷酸多态性
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
OA	Osteoarthritis	骨关节炎
PKOA	Primary knee osteoarthritis	原发性膝骨关节炎
AC	Articular cartilage	关节软骨
BMI	Body Mass Index	体重指数
Rpm	Rotation per minute	每分钟转速
G	Gram	克
Sec	Second	秒
mL	Milliliter	毫升
H	Hour	小时
SD	Standard deviation	标准差
$\mu$ l	Micro liter	微升
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
HIF	Hypoxia inducible factor	缺氧诱导因子
SLIT3	SLIT guidance ligand 3	神经轴突导向分子

## 前言

### (Introduction)

#### 一、骨关节炎的研究背景

目前在我国越来越多的中老年人被诊断为骨关节炎(OA),其中膝骨关节炎的发病率在所有骨关节疾病中排第一位。在世界范围内 OA 也是最常见的关节疾病,在 60 岁及以上的人群中大约有 10%的男性和 18%的女性受到了影响。在美国的国家健康和营养调查报告中指出 OA 影响了大约 37%的 60 岁或以上人群<sup>[1]</sup>。近年来许多流行病学的调查统计分析和大量的前瞻性研究发现,骨关节炎的发病率处于一种上升的趋势且患病年龄处于下降的趋势。

人们对于骨关节炎的了解是一个漫长的研究和认知的过程,有许多因素(如年龄、自由基、细胞因子、骨内压、性别、创伤和遗传等)影响骨关节炎的发展,但是对于骨关节炎的病因和发病机制至今仍然不明。骨关节炎的病理特点是:关节软骨(AC)的损伤,软骨下骨中的骨小梁结构改变,关节内骨质增生关节间隙变窄以及出现滑膜的炎症<sup>[2,3]</sup>。关于关节软骨的退变一直以来是骨关节炎的重要关注点,骨关节炎会导致关节疼痛和功能障碍,AC 的退变最初被认为是导致骨关节疼痛并推进其病程发展唯一因素<sup>[4,5]</sup>。然而,只针对信号传导机制的调控来减缓 AC 变性和退变可能不足以阻止疾病的进展。近年来有研究发现在 OA 发生发展过程中关节软骨下骨也会出现一系列的病理改变<sup>[6-9]</sup>。

遗憾的是目前还没有一种能彻底治愈骨关节炎的方法,目前的治疗方法主要有以下几个方面:①以运动的方式治疗 OA:一项 Cochrane 关于膝关节关节炎的综述发现,运动可以减少疼痛,改善身体功能,并轻微改善生活质量。这种改善与先前评价非甾体抗炎药(NSAIDs)的研究相似<sup>[10]</sup>,研究表明加强柔韧性和有氧运动以及水上运动<sup>[11]</sup>,可以改善骨关节炎患者的疼痛和症状。②物理治疗技术:支具治疗可能对骨关节有一定的作用,但还需要进一步的研究。③药物治疗:是目前应用最广泛的治疗手段之一,非甾体类抗炎药对 OA 的整体疼痛是有效的<sup>[12]</sup>,但是在非甾体类抗炎药之间的效果没有明显的差异。④关节内治疗:通过向关节腔内注射类固醇类药物和透明质酸粘合剂来缓解症状延缓病程。⑤手术治疗:当骨关节炎患者保守治疗无效或者严重影响到患者的生活质量的时候所采取的最终手段。正是由于 OA 的高发病率、缺乏有效的治疗手段以及巨大的医疗成本和社会负担才引发了人们对 OA 的研究。

#### 二、骨关节炎的发病机制

在过去的二十年中随着实验技术的发展和膝关节骨性关节炎(KOA)这种疾病逐渐深入的了解,在 OA 的发病机制发生这个问题上发生比较大的变化。以往公认的发病机制是首先由关节软骨变性,继而而引起的一种退行性骨关节疾病并逐渐累及整个关节,包括软骨下骨、韧带、关节囊、滑膜及关节周围肌肉。并把软骨的退化作为是骨关

节炎(OA)的一个标志。已阐明有几种细胞类型参与 OA 的病理过程,如软骨细胞、骨细胞和软骨下骨中的成骨细胞、滑膜内衬细胞和滑膜中的单核细胞,OA 的病理过程主要是关节软骨发生改变。软骨下骨的改变可能先于软骨退化,并有助于骨关节炎(OA)的开始和进展。

1.骨关节炎中的软骨下骨:软骨下骨是指位于钙化软骨下面的骨性成分,它是由软骨下骨板和软骨下骨组成,软骨下骨是与钙化软骨相邻的骨性成分<sup>[13]</sup>。由于其多孔结构,并通过动脉、静脉血管和神经通过连接通道,将软骨下的骨板提供了关节软骨和软骨下小梁骨之间的连接,所以其被认为起到了支撑上覆的关节软骨的作用的同时将机械负荷分散到关节表面。软骨下骨可将增加的负荷传递给关节软骨,从而促进软骨损伤。研究发现软骨钙化层下方的 T2 加权像的核磁中表现为非囊性、界限不清、高信号区,将这种现象称为骨髓水肿<sup>[14]</sup>。在大部分的骨性关节炎患者中软骨侵蚀发生在骨性关节炎的浅表区域,这表明骨性关节炎和骨性关节炎进展之间存在着潜在联系。破骨细胞作为基质吸收细胞,在软骨下骨代谢中起“导体”作用,不仅参与骨吸收还参与 H 型血管定位和感觉神经支配。在软骨与骨相连接的周围区域中,抗酒石酸酸性磷酸酶阳性(TRAP+)细胞比骨髓间隙的细胞表达组织蛋白酶 K (Ctsk)更低<sup>[15]</sup>,细胞核更少。破骨细胞亚型在诱导盲端血管侧对侧吻合中起关键作用。这些所谓的“血管相关破骨细胞”对 H 型血管表现出高度的亲和力,并受到内皮细胞核因子-KB 配体(RANKL)受体激活因子表达的支持,诱导 H 型血管的吻合。软骨细胞的细胞外基质由近 70%-80%的水、胶原蛋白和蛋白聚糖组成,由于蛋白聚糖的负电位,使其形成了一个类似于“电子屏障”的负电荷屏障<sup>[16]</sup>。正是由于这种屏障的存在,才使正常的透明软骨内没有毛细血管。肥大的软骨细胞来源的血管内皮生长因子(VEGF)可以被间充质基质细胞(mcs)和内皮细胞的招募<sup>[17]</sup>,从而促进骨形成、血管神经支配和软骨吸收从而加速 OA 的发展。

2.血管生成与软骨:透明软骨是一种非血管化组织,阻碍血管形成,但血管生成在软骨骨化中起着关键作用<sup>[18]</sup>,提示血管可能与软骨的分解退化密切相关。肥大的软骨细胞是 VEGF 的主要来源,它的主要作用是软骨吸收、骨化和血管生成。来自成骨细胞的 VEGF 可以招募破骨细胞,刺激成骨和血管生成。VEGF 在关节间隙的作用可以通过拮抗剂阻断,通过排斥血管侵袭来缓解软骨的降解与退化,加强无血管环境的维持。越来越多的证据表明,在骨性关节炎软骨侵蚀的过程中软骨下骨中的血管形成比滑膜组织或滑膜血管侵袭作用更大。Xie 等人的重要研究表明,破骨前细胞来源的 PDGF-BB 在 H 型血管发生和骨重塑中发挥关键作用。

3.PDGF-BB 与血管生成:PDGF-BB 可以诱导一种血管生成的主要调节因子 VEGFA 的转录和分泌,在软骨内成骨过程中,肥大软骨细胞分泌 VEGF 可以促进软骨的血管侵袭<sup>[19]</sup>。在小鼠模型中 VEGF 的缺失可以导致骨髓血管系统的减少和紊乱,其中包括向肥厚软骨的毛细血管侵袭的延迟,并造成骨形成减少和肢体缩短。在体外研究表明 VEGFA 和 PDGF-BB 的时空信号在血管成熟过程起到了重要的作用。持续的 VEGFA 信号通路可通过与 Pdgrfb 结合削弱 PDGF-BB 信号通路,从而起到了抑制新生血管的生成的效果。

### 三、骨关节炎的基因筛选

近年来 OA 的遗传因素成为了研究热点,越来越多的研究者想要从基因多态性的遗传学角度解释其与 OA 的关联。基因多态性是指生物在种群中存在同一物种不同个体上通过基因表达不同的蛋白,从而使机体在功能、外观、性状等方面存在差异。本质上是生物在遗传基因表达中发生了基因突变,如单基因突变、等位基因变换、基因重复序列表达数差异等<sup>[20]</sup>。

虽然 OA 的病因学是复杂的,我们对其背后的分子过程的理解也很复杂。近年来随着越来越多的新技术的应用,通过对 OA 的遗传学、基因组学的不断深入研究。已经发现 OA 多种相关基因,通过筛选相关基因并对候选基因进一步研究二者之间关联性,如白细胞介素 1 基因、转化生长因子 $\beta$ 基因、白细胞介素 7 基因、白细胞介素 17 基因、基质金属蛋白酶 3 基因、基质金属蛋白酶 13 基因等。

近来在一些动物模型的实验研究中发现 Osteoblasts 前体分泌的 PDGF-BB 与软骨下骨中的血管生成和增生密切相关<sup>[21]</sup>支持了破骨细胞在 OA 病程中的重要作用<sup>[22]</sup>,已有研究表明 PDGF-BB 基因多样性与 ACS 患者不稳定斑块的形成相关<sup>[23]</sup>、在退变增生肥厚的黄韧带中表达较多<sup>[24]</sup>,但目前尚未有关 PDGF-BB 基因多样性在 OA 中的相关国内外研究,本研究运用现代分子生物学技术发现带有 OA 易感基因的人群,再综合多方面因素来判断人群患 OA 的风险,对风险性较高的人群有针对性的进行早期预防、明确诊断、系统治疗。

### 四、研究价值及目的

本实验研究采用 PCR-RFLP 技术验证 PDGF-BB 的 rs1800817 位点、rs2285094 位点基因型,同时考虑到新疆在我国西北边陲,处于亚洲内陆地区,与周边地区有山区隔断,在气候、饮食、生活习惯较沿海及其他地区有较大差异性,并且新疆地区民族成分混杂,各民族的文化背景和生活习惯均各不相同。此外,经济、文化、居住环境等条件在新疆地区的汉族与维吾尔族之间也存在着较大的差异。目前关于新疆地区 PDGF-BB 基因多态性与骨关节炎之间的相关性的研究尚未报道。因此本次实验旨在探讨新疆地区汉族与维族 PDGF-BB 基因多态性与骨关节炎的相关关系,并希望结果与不同地区、不同种族在基因多态性方面的研究比对,对骨关节炎的高危患病群体的筛选、预防、诊疗做出重要支持。

# 材料及方法

## (Materials and Method)

### 1. 材料

#### 1.1 病例采集

##### 1.1.1 研究对象

本实验在喀什地区三师医院、石河子大学第一附属医院、图木舒克市人民医院共选取研究对象 519 例，其中汉族 266 例（骨关节炎 80 例，非骨关节炎 186 例），维吾尔族 253 例（骨关节炎 91 例，非骨关节炎 162 例），所有纳入者由同一实验人员告知其相关实验目的，在获得受试者本人的同意后签署知情同意书，并通过填写“一般资料调查问卷”来统计一般基线资料。在肘正中静脉处用采血针抽取外周静脉血 5mL，将所抽取的静脉血存放在 EDTA 抗凝管中，存放在-80℃超低温医用冰箱中备用。将所有采集的病例分为四组：汉族骨关节炎组；汉族非骨关节炎组；维吾尔族骨关节炎组；维吾尔族非骨关节炎组。

(1)汉族骨关节炎组：汉族骨关节炎患者 80 例（其中男性 28 例，女性 52 例）。平均年龄  $57.66 \pm 8.66$ 。

(2)汉族非骨关节炎组：汉族正常对照组 186 例（其中男性 78 例，女性 108 例）。平均年龄  $55.61 \pm 7.56$ 。

(3)维吾尔族骨关节炎组：维吾尔族膝骨关节炎患者 91 例（其中男性 42 例，女性 49 例）。平均年龄  $56.82 \pm 7.80$ 。

(4)维吾尔族非骨关节炎组：维吾尔族正常对照组 162 例（男性 63 例，女性 99 例）。平均年龄  $55.10 \pm 8.40$ 。

##### 1.1.2 纳入标准:

(1)经过详细询问病史、查体、其他辅助影像学检查符合膝原发性骨性关节炎的诊断标准；

(2)所有的研究对象都是新疆地区常住人口；

(3)年龄在 50 岁以上的人群；

(4)符合条件被纳入的受试者均由本人在知情同意书上签字

**1.1.3 排除标准：**各种因素所导致的继发性骨性关节炎（外伤因素导致的关节内及关节外损伤、遗传性或先天发育的疾病、内分泌及代谢病、风湿性关节炎、类风湿性关节炎、地方性关节病、骨肿瘤、炎性膝关节炎、有长期服用影响骨代谢药物史、其他关节疾病等）。

### 1.2 实验工具及试剂

#### 1.2.1 实验设备

设备名称	生产厂家
EDTA 抗凝管	江西瑞邦公司, 中国
采血针	江西瑞邦公司, 中国
负 20 度冰箱	海尔公司, 中国青岛
负 80 度超低温医用冰箱	Thermo Fisher 科技公司, 美国
移液器 (0.1-2.5 $\mu$ l, 2-20 $\mu$ l, 20-200 $\mu$ l, 100-1000 $\mu$ l)	Eppendorf 公司, 德国
高速离心机	Thermo Fisher 科技公司, 美国
微量分光光度计	Thermo Fisher 科技公司, 美国
水平电泳系统 (电泳槽、电源)	BIO-RAD 公司, 美国
制胶板	BIO-RAD 公司, 美国
微波炉	Midea 集团, 中国
离心管收集盒	Thermo Fisher 科技公司, 美国
试管架	Thermo Fisher 科技公司, 美国
电子天平	常熟衡器厂, 江苏
漩涡振荡器	海门其林贝尔, 江苏
超净台	博迅, 上海
凝胶成像系统	BIO-RAD 公司, 美国
恒温水浴箱	欧诺仪表公司, 中国天津

### 1.2.2 实验试剂

试剂名称	生产厂家
无水乙醇	富宇精细化工有限公司, 天津
DEPC 水	华迈科生物技术有限公司, 北京
核酸染料	Tiagen Biochemical Company, 中国
DNA marker I	Tiagen Biochemical Company, 中国
6xloading buffer	Tiagen Biochemical Company, 中国
5xTBE buffer	生工生物工程 (上海) 股份有限公司
2xPCR master Mix	生工生物工程 (上海) 股份有限公司
血液 DNA 基因组提取盒	Tiagen Biochemical Company, 中国
琼脂糖粉	BIOWEST 公司, 西班牙
BsmI 内切酶	Tiagen Biochemical Company, 中国
DNA 上样缓冲液	Tiagen Biochemical Company, 中国
双蒸水	石河子大学医学院实验室制备

### 1.2.3 外周血的采集和存放

所有纳入的实验者在了解实验流程后, 在肘关节的肘正中静脉处采约 5ml 静脉血, 用 EDTA 管混匀, 记录信息, 放入试管架后存放于负 80 度医用低温冰箱中保存。

## 2. 实验方法

### 2.1 提取 DNA

#### 2.1.1 外周血的处理

将采集的静脉血从 - 80℃ 医用低温冰箱中取出, 将装有静脉血的 EDTA 抗凝管放在工作台上, 18℃-25℃ 彻底解冻后使用 1000 $\mu$ l 加样枪吸取出 200 $\mu$ l 静脉血至 1.5ml 一次性塑料离心管中, 为了提高提取的 DNA 浓度, 使外周血中的白细胞充分裂解, 按 1:2.5 的比例向离心管中加入 500 $\mu$ l 的裂解液 CL; 将装有上述混合液体的 1.5ml 塑料离心管至于振荡仪上震荡 2-3min, 将裂解液与静脉血充分混合匀; 将离心管至于已配平的离心机 11000rpm 离心 60s 后移去上层清亮液体, 用移液枪吸取 200 $\mu$ l GS 缓冲液加入 1.5ml 离心管中后反复晃动震荡使 GB 与剩余的液体充分混匀; 用加样枪依次吸取 200 $\mu$ l 缓冲液 GB 和 20 $\mu$ l PK 的预混溶液加入装有上述混合溶液的 1.5ml 一次性离心管中, 充分震荡颠倒混匀后, 放入加温至 56℃ 的恒温水域锅中 10min, 期间将离心管从水域锅中取出颠倒摇匀 4-5 次, 直至液体在灯光下颜色透亮为止 (若颜色未变清亮, 可适当延长在水域锅中的裂解时间)。将装有颜色清亮的离心管取出后放在操作台上降温 4-6min, 用移液枪向降温后的离心管中加入 350 $\mu$ l 缓冲液 BD。

#### 2.1.2 DNA 吸附

将上述所得溶液和絮状沉淀用移液枪加入 DNA 提取盒中自带的一次性塑料吸附柱 CG2 中(吸附柱 CG2 放入收集管中), 使用 12000rpm 的离心机将上述混合液离心 30sec, 用移液枪将上层的上清废液吸出丢弃在集液盒中, 将塑料吸附柱 CG2 安装在一次性收集管中。

#### 2.1.3 DNA 的漂洗

使用微量移液枪吸出 600 $\mu$ l 用无水乙醇按比例配比好的 PWB 漂洗溶液加入一次性塑料吸附柱 (CG2), 使用 11000rpm 的离心机离心半分钟, 将收集管中离心出的液体倒入废液收集盒中, 将吸附柱 CG2 放入收集管中; 继续向一次性塑料吸附柱 CG2 中加入 600 $\mu$ l 用无水乙醇配好的漂洗液 PWB, 11000rpm 离心机高速 30sec 后倒出收集管中离心出的液体至废液盒中, 将吸附柱 CG2 放入收集管中。将 CG2 吸附柱及收集管放入离心机中 11000rpm 离心 1 分钟后取出吸附柱, 将吸附柱收集管拔出 1-2cm (便于漂洗液的散发) 后放在干净的工作台上室温放置数分钟。

#### 2.1.4 DNA 的收集

把塑料吸附柱 CG2 重新放入一个新的一次性塑料 1.5ml 离心管中, 用 100 $\mu$ l 的加样枪吸取 80 $\mu$ l 的 TB 缓冲溶液加入一次性吸附柱 CG2 的中央吸附膜中, 室温放置 3min, 12000rpm 离心 2min, 将从吸附柱中离心下来的无色溶液收集到离心管中, 将离心管标号置于试管架上放入 - 20 度冰箱中备用。

## 2.2 DNA 浓度测定

将已提取好的 DNA 从 -20℃ 冰箱中拿出放在洁净操作台上室温解冻，打开 DNA 浓度测定系统，用 DEPC 水将光度计上的污物洗净同时将基线调为 0-0.1；将 DNA 用 1μ 的移液枪放入分光光谱仪中，分别测量 OD260（波长 260 nm 的吸光度的值）、OD280（波长 280 nm 的吸光度的值）及 OD260/OD280 的比值。其中 OD260/OD280 的比值在 1.6-2.0 之间视为所提取的 DNA 浓度合格，可以用来在 DNA 扩增中使用，比值小于 1.6 说明提取出的 DNA 浓度较低，无法用于扩增。

## 2.3 电泳凝胶的制备

用调零后的电子称取琼脂糖粉 1.2g 后倒入小烧瓶中，将 20x 的 TBE 溶液稀释成 1x 的 TBE 120ml；用量筒量取 120ml 1x TBE 溶液倒入烧瓶中，将烧瓶放入微波炉中加热 2min，待琼脂糖粉完全溶于 TBE 溶液中，用隔热手套将烧瓶取出置于洁净的操作台上，待溶液温度降至约 70℃ 时，用加样枪向小烧瓶中加入 10μl GoldView 核酸染料，顺时针方向轻摇烧瓶直至染料完全溶于烧瓶中（在混匀核酸染料时动作要轻，避免产生气泡影响后期制胶跑胶）；将配好的溶液沿着胶板壁缓慢倒入制胶盒中，用 1μ 移液枪头吸去胶板内液体表面气泡后将制胶盒平放至操作台上自然冷却 25-30min，将凝固后的凝胶取出（用手平托，避免损坏凝胶）放入 20x TBE 溶液中备用。

## 2.4 DNA 扩增

### 2.4.1 上、下游引物的设计与合成

在 NCBI 里的 SNP 上搜索血小板衍生生长因子-B(PDGF-B)的基因序列；再分别找出 rs1800817 位点的 DNA 和 rs2285094 位点的 DNA 序列，交由生工生物工程（上海）股份有限公司设计合成 rs1800817、rs2285094 位点上、下游引物（见表 2-1）。

表 2-1. PCR 引物

位点		序列
rs2285094 位点	上游引物	CCA TGT GCT GAC CAC TTC AT
	下游引物	GCC ACA TAA CAG GTC TGG CT
rs1800817 位点	上游引物	GGGCTGGTCTTCATTCATTACCTT
	下游引物	TGCAAGGGTCCAAAGTTCACT

### 2.4.2 PCR 扩增

使用移液枪将解冻好的 DNA 吸出 3μl、rs2285094 位点上、下游引物各 1μl、PCR mix 10μl、无酶水 5μl 至离心管中组成共 20μl 的反应体系；将 pcr 管放入 96 孔的梯度 PCR 仪里之后再设定 PCR 扩增反应条件：①预变性 94℃ 5min②变性 94℃ 30min③退火 62℃ 30smin④延伸 72℃ 27min⑤重复延伸 72℃ 5min⑥取出反应体系标记并放入 -20℃

冰箱中备用。用相同的方法进行 rs1800817 位点 DNA 扩增（见表 2-2）。

表 2-2. PCR 反应体系

名称和体积	来源
DNA 3 $\mu$ l	使用天根公司 DNA 提取盒提取
DEPC 水 5 $\mu$ l	天根生化公司
rs2285094 位点上、下游引物各 1 $\mu$ l	Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd.
PCR mix 10 $\mu$	Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd.

### 2.4.3 凝胶加样

用微量加样枪吸出 6 $\mu$ l maker 加入凝胶的第一个孔中（加样时应避免将移液枪枪头损坏凝胶），取 4 $\mu$ l DNA 与 DNA 上样缓冲液（loading buffer 1 $\mu$ l）的混合液加入其他凝胶孔内并做好记录。

### 2.4.4 凝胶电泳

将完成加样的凝胶平放在水平电泳仪（用双蒸水清洗干净后）的电泳板上，向电泳板内加入 TBE 溶液进行电泳。电泳参数：电压 100—120V；电泳时间：35 分钟。

### 2.4.5 电泳凝胶成像

在电泳结束后，将电泳凝胶取出放在成像仪内，通过调整凝胶块位置合适后进行曝光，将曝光后的图像保存并记录。

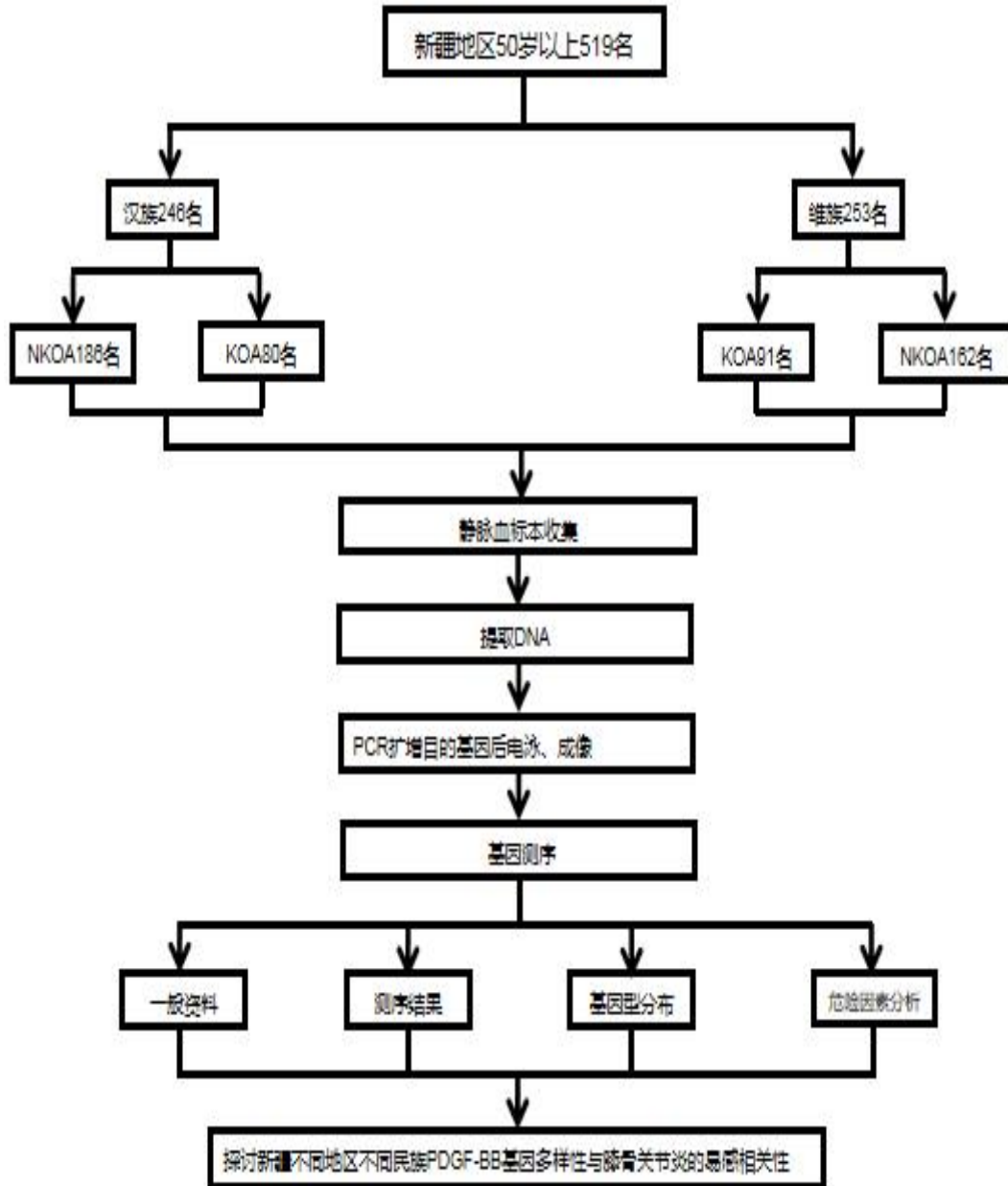
## 2.5 DNA 测序

将经过凝胶电泳过并通过凝胶成像系统确认 PCR 成功后的 DNA 样本标号记录，送至博迈德(北京)基因技术有限责任公司进行 DNA 双向测序。

## 2.6 统计学处理

本研究利用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。对样本人群的年龄、身高、体重等计量资料进行正态性检验，符合正态分布的资料采用  $X \pm S$  进行统计描述，对分类资料如性别、是否吸烟、是否饮酒等采用 n 表示；采用哈迪-温伯格平衡定律（Hardy-Weinberg equilibrium）方法对基因位点的基因型分布进行检验；对两组间计量资料的比较采用 t 检验，对计数资料的比较采用卡方检验；应用二分类 logistic 回归模型对患 PKOA 的相关风险因素进行分析。其中以 P 值 < 0.05 作为差异具有统计学意义的标准。

## 技术路线图



## 结果 (Result)

### 3.1 研究对象的基线资料比较

新疆地区的汉族骨性关节炎组与非骨性关节炎组、维吾尔族骨性关节炎组与非骨性关节炎组的年龄、身高、体重、BMI、性别、是否抽烟、是否喝酒（见表 3）进行比较，各组间无统计学差异（ $P>0.05$ ）。性别、是否吸烟、是否饮酒、是否从事重体力劳动（见

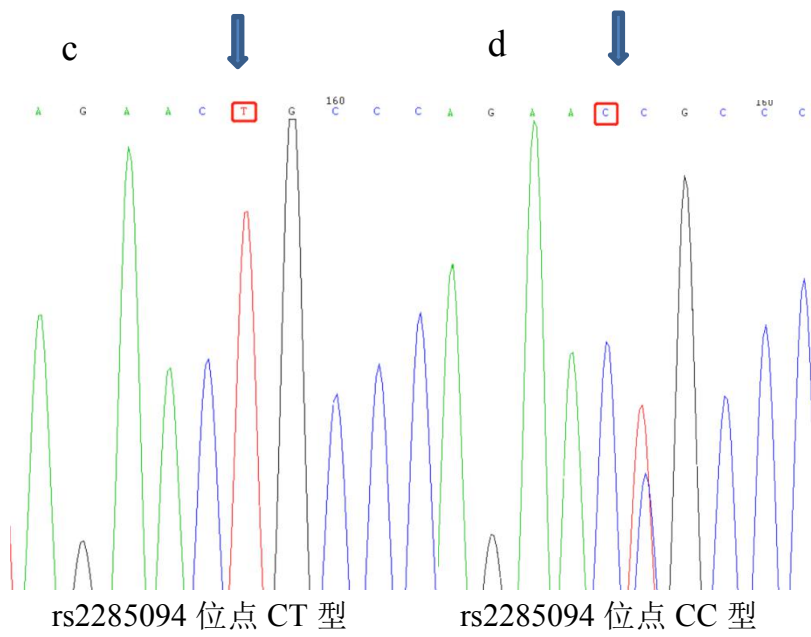
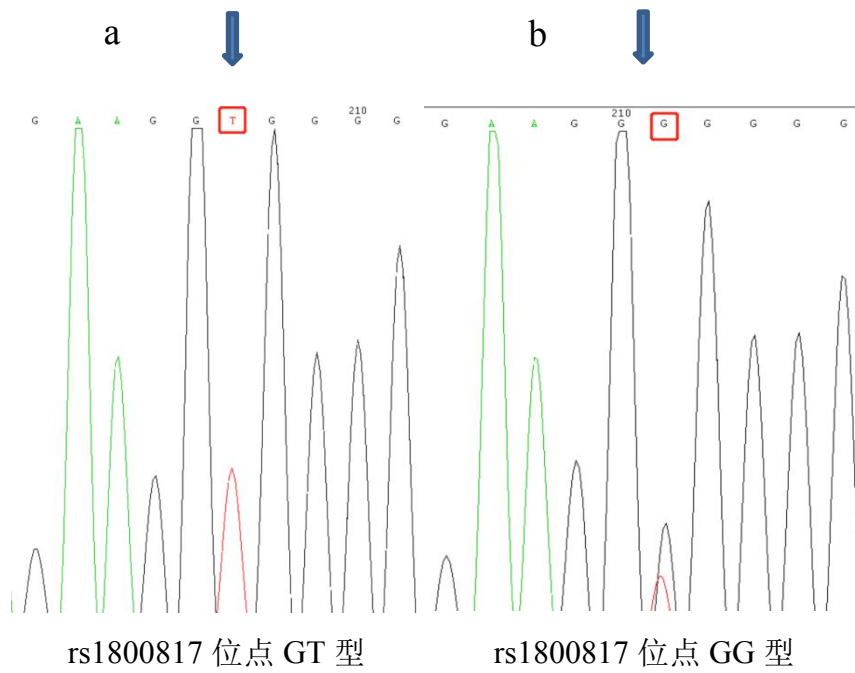
表 3-1 一般资料

	汉族				维吾尔族				
	关节炎组	对照组	$T/X^2$	$P$	关节炎组	对照组	$t$	$P$	
年龄	57.66±8.66	55.61±7.56	-1.94	0.053	56.82±7.80	55.10±8.40	-1.6	0.11	
身高	165.25±8.02	168.85±8.20	1.47	0.14	166.71±9.76	166.65±9.07	-0.49	0.96	
体重	69.63±5.06	68.92±8.76	-0.67	0.50	68.10±10.53	68.78±8.86	-0.25	0.80	
BMI	25.26±1.69	24.87±1.90	-1.58	0.12	24.94±2.10	24.90±2.02	-0.16	0.88	
性别	男	28	78	1.12	0.289	42	63	1.27	0.26
	女	52	108			49	99		
是否抽烟	是	60	133	0.34	0.56	62	115	0.23	0.63
	否	20	53			29	47		
是否喝酒	是	62	138	0.33	0.57	61	108	0.01	0.95
	否	18	48			30	54		
是否重体力劳动	是	70	162	0.01	0.93	79	140	0.01	0.93
	否	10	24			12	22		

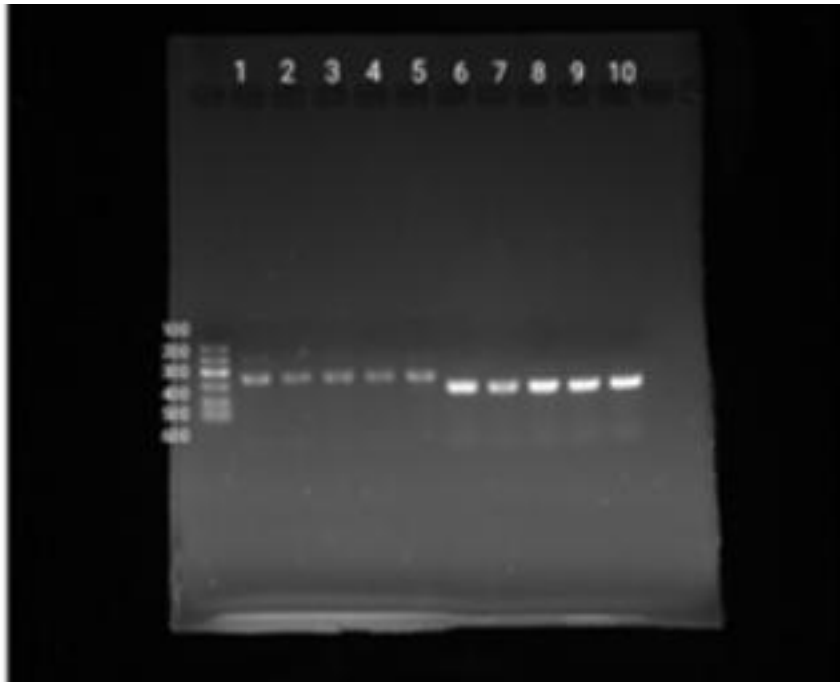
表 3-1) 进行比较，各组间无统计学差异（ $P>0.05$ ）。

### 3.2 PCR 和基因测序结果

将所提取的汉族 PKOA 组和对照组、维吾尔族 PKOA 组和对照组的 DNA 分别加入 PDGF-BB 的 rs1800817 位点引物；rs2285094 位点的引物在 PCR 仪中扩增，将扩增后的 DNA 行 2% 琼脂糖凝胶电泳（电泳结果见图 e）。将扩增结果满意的 DNA 送至北京博迈德基因公司行进行双向测序，分析受试者的 PDGF-BB 的 rs1800817、rs2285094 位点单核苷酸多态性（SNP）比较。通过在基因库中 PDGF-BB 的 rs1800817 位点引物；rs2285094 位点的比较 SNP 中的 rs1800817 位点与实验中的 rs1800817 位点比较有 GT、GG 两种基因型；通过比较 SNP 中的 rs2285094 位点与实验中的 rs2285094 位点比较有 CT、CC 两种基因型（见图 a-d）。



e



注：图 a：rs1800817 位点 GT 型；图 b：rs1800817 位点 GG 型；图 c：rs2285094 位点 CT 型；图 d：rs2285094 位点 CC 型；图 e：引物在 PCR 仪中扩增后的 DNA 行 2% 琼脂糖凝胶电泳的电泳结果。

### 3.3 PDGF-BB 的 rs1800817 位点、rs2285094 位点基因多态性与维吾尔族骨关节炎的相关性

维吾尔族骨关节炎组与非骨关节炎组相比 PDGF-BB 的 rs2285094 位点的 CC 型、CT 型分布不同 ( $\chi^2=17.9$ ,  $P<0.05$ ) 差异有统计学差异；维吾尔族骨关节炎组与非骨关节炎相比 PDGF-BB 的 rs1800817 位点的 GT 型、GG 分布不同 ( $\chi^2=5.08$ ,  $P<0.05$ ) 有统计学差异 (见表 3-2)。说明维吾尔族携带 rs2285094 位点的 CC 型、CT 型的个体患原发性膝关节骨性关节炎的发病风险较大，维吾尔族携带 rs1800817 位点的 GT 型、GG 型的个体患原发性膝关节骨性关节炎的发病风险较大。

表 3-2 维吾尔族骨关节组与非骨关节组的基因型分布

组别	例数	Rs2285094				Rs1800817			
		CT	CC	X <sup>2</sup>	P	GT	GG	X <sup>2</sup>	P
维族 OA	53	48	53	17.79	0.00	55	36	5.08	0.024
维族非 OA	42	116	42			74	88		

### 3.4 PDGF-BB 的 rs1800817 位点、rs2285094 位点基因多态性与汉族 PKOA 的相关性

汉族 PKOA 组与对照组相比 PDGF-BB 的 rs2285094 位点的 CC 型、CT 型分布 ( $X^2=0.001$ ,  $P=0.98>0.05$ ) 无统计学差异, 汉族 PKOA 组与对照组相比 PDGF-BB 的 rs1800817 位点的 GT 型、GG 型分布 ( $X^2=4.61$ ,  $P=0.032<0.05$ ) 有统计学差异 (见表 3-3)。

表 3-3 汉族骨关节炎组与非骨关节炎的基因型分布

组别	例数	Rs2285094				Rs1800817			
		CT	CC	X <sup>2</sup>	P	GT	GG	X <sup>2</sup>	P
汉族 OA	80	44	36	0.001	0.98	62	28	4.61	0.032
汉族非 OA	186	102	84			103	83		

### 3.5 二分类 Logistic 回归分析

经二分类 Logistic 回归分析, 把性别、民族、年龄、基因型等因素作为自变量, 骨关节炎作为因变量 (OA=1 NOA=0)。年龄、民族、rs1800817 位点基因多态性是 OA 的危险因素 ( $OR>1$ ); rs2285094 位点的基因多样性时 OA 的保护因素 ( $OR<1$ ), 其中民族是原发性膝关节骨性关节炎的危险因素, 这可能与不同民族间的生活方式及饮食不同关。性别、BMI、抽烟、饮酒、从事重体力劳动不是 OA 的危险因素 (见表 3-4)。

表 3-4 多因素 Logistic 回归分析

	B	S.E.	Wals	P	OR	95%CI	
						下限	上限
年龄	0.037	0.015	5.805	0.016	1.037	1.007	1.069
民族	-0.797	0.209	14.52	0	0.451	0.299	0.679
性别	0.372	0.375	0.982	0.322	1.45	0.695	3.025
BMI	0.075	0.053	2.017	0.156	1.078	0.972	1.195
是否抽烟	-0.012	0.358	0.001	0.973	0.988	0.49	1.994
是否饮酒	0.364	0.351	1.076	0.3	1.439	0.724	2.86
是否重体力劳动	-0.334	0.363	0.847	0.358	0.716	0.351	1.459
CT_CC_094	-4.517	1.023	19.506	0	0.011	0.001	0.081
CT_CC_817	4.664	1.024	20.739	0	106.089	14.252	789.727
常量	-4.468	1.595	7.847	0.005	0.011		

## 讨论

### (Discussion)

骨关节炎是全球最常见的关节疾病，其中 60 岁以上的人群中骨患有骨关节炎的男性约有 10%，女性约有 18%<sup>[25]</sup>。骨关节炎发病因素较多,包括高龄、较大的体重、外伤导致的关节损伤、出生时关节异常、痛风、糖尿病、手术造成的医源性关节损伤和与荷尔蒙相关的疾病等都被证明为 OA<sup>[26, 27]</sup>的高风险因素。骨性关节炎的病理生理特征是滑膜炎症、细胞外基质破坏导致关节软骨退化、软骨下骨组织重塑。最近有研究指出血管生成在组织修复和骨性关节炎的病理生理中也起着重要作用<sup>[28]</sup>。

目前，治疗骨关节炎尚未有有效的疾病调节剂<sup>[29, 30]</sup>，这主要是因为对 OA 的起始阶段驱动病理过程的机制了解有限。Walsh 和 Mapp PI 等人研究发现骨关节炎关节内的血管生成（即从已有的血管中生成新血管）已被证明是促进 OA 进展的因素<sup>[31]</sup>。有文献指出软骨下异常的化导致血管系统入侵骨软骨连接可以作为人类骨关节炎的一个标志<sup>[32]</sup>。

血小板源性生长因子在血管的生成中起到了重要作用，它最初是由 Ross<sup>[33]</sup>等人在研究中发现这种刺激物的来源是血小板，并将这种因子命名为血小板源性生长因子，这种因子可由巨噬细胞、内皮细胞和上皮细胞分泌<sup>[34]</sup>。研究发现 PDGF 家族包含有 A、B、C、D 四种，分别为 PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-CC 及 PDGF-DD。PDGF-BB 主要有促进血管收缩、细胞分裂和化学趋化性等作用。随着对 PDGF-BB 的研究深入，发现 PDGF-BB 的基因多样性与多种疾病都有显著的关联。有研究表明 PDGF-BB 的基因多样性与金属裸支架术后再狭窄有一定的关系<sup>[35]</sup>。Arora-Singh 和 Gourh 在研究中发现 PDGF-BB 中的 rs2285094 位点基因多样性与硬皮病的发生有一定的相关性<sup>[36, 37]</sup>近年来 Hui Xie 等人在实验研究中发现单核前破骨细胞分泌血小板衍生生长因子-BB (PDGF-BB)异常增加并诱导软骨下骨血管生成可以促进骨关节炎的发展。在小鼠内侧半月板(DMM)失稳的动物模型中发现，在小鼠的膝关节中早期出现异常的关节软骨下骨血管的生成是发生在关节软骨损伤之前。在 OA 中损伤的软骨下骨中的单核前体破骨细胞分泌过量的 PDGF-BB，继而激活周细胞中血小板衍生生长因子受 $\beta$ (PDGFR- $\beta$ )信号后促进新血管形成。在选择性敲除破骨前细胞中的 PDGF-BB 的小鼠模型中，发现软骨下骨血管生成减少，在一定程度上改善 DMM 引起的关节变性和软骨下神经支配；在破骨前细胞中表达 PDGF-BB 的转基因小鼠模型中再现了病理性软骨下骨血管生成并自发的发生关节变性和软骨下神经支配的现象。

由此可见，PDGF-BB 与骨关节炎的发生发展有着密切的关系。PDGF-BB 的基因多样性与骨关节炎是否也有一定的关系呢？在查阅相关国内外文献时我们发现尚未有关于 PDGF-BB 的基因多样性与 OA 的研究报道,这也是本实验的创新点。本实验通过 t 检验、卡方检验、二分类 logistic 回归模型等统计学方法分析 PDGF-BB 的 rs1800817 位点、rs2285094 位点多样性与新疆地区汉族和维吾尔族膝骨性关节炎之间的关联。研究结果表明 rs1800817 位点基因型分布在汉族和维吾尔族中分布均有差异 ( $X^2=5.08$ ,

$P=0.024<0.05$ ;  $X^2=4.61$ ,  $P=0.032<0.05$ ); rs2285094 位点基因型分布在汉族中无差异 ( $X^2=0.01$ ,  $P=0.98>0.05$ ); rs2285094 位点基因型分布在维吾尔族中有明显差异 ( $X^2=17.79$ ,  $P=0.00<0.05$ )。通过多因素 logistic 回归分析, 年龄是骨性关节炎的危险因素 ( $OR=1.007>1$ ), 这与以往的研究结果是一致的; 民族是骨性关节炎的保护因素, 这可能是维吾尔族与汉族的生活习惯不同所造成的, 这与沈明球等人的流行病学研究所一致<sup>[38]</sup>。rs2285094 位点中的 CC 型和 CT 型是骨性关节炎的保护因素 ( $OR=0.011<1$ ) 这提示 rs2285094 位点中的 CC 型和 CT 型携带者可能会减低新疆地区汉族和维吾尔族人群骨性关节炎发病风险, 但该位点的基因型分布在汉族人群中的分布无差异 ( $X^2=0.01$ ,  $P=0.98>0.05$ ) rs1800817 位点中的 GT 型和 GG 型是骨性关节炎的危险因素, 这提示 rs1800817 位点中的 GT 型和 GG 型携带者可能会增加新疆地区汉族和维吾尔族人群骨性关节炎发病风险。但是这个结果可能与样本量的大小有关, 存在一定局限性。此外, PDGF-BB 基因多态性对膝关节骨性关节炎易感性可能为原发性膝骨性关节炎的预防和治疗提供依据, 因此有关结论尚需进一步验证。

本研究的局限与不足:

1.新疆地处亚欧大陆腹地, 陆地边境线5600多公里, 地域广阔, 本实验在研究血小板衍生生长因子-BB (PDGF-BB)的基因多样性时应多地域、多地区选取原发膝骨关节炎的对照组和实验组。

2.本研究之所以选择汉族和维吾尔族两个人群是因为在新疆地区汉族和维吾尔族是人口数目最多的两个民族, 但是本实验的样本量稍有些少, 可以通过增加使本来使研究更具有代表性。

3.基因多样性影响原发性膝关节炎的发生、发展机制还需进一步进行更加深入的研究, PDGF-BB 的基因多样性与OA 的相关研究还未见有类似的报道, 本实验研究发现 rs1800817等位基因GT 型和GG 型可作为预测新疆地区汉族和维族OA 危险性的遗传学标志, rs2285094等位基因CT型和CC型可作为是维族OA危险性的遗传学标志; 但是 PDGF-BB 在OA 中作用机制还需更多的实验来验证。

## 结论

### (Conclusion)

1. PDGF-BB rs1800817位点基因型分布在汉族和维吾尔族中分布均有差异，rs2285094位点基因型分布在维吾尔族中有明显差异。
2. 新疆地区维吾尔族和汉族的PDGF-BB rs1800817位点中的GT型和GG型携带者可能会增加患骨关节炎风险；rs2285094位点中的CC型和CT型携带者可能会减低骨性关节炎发病风险。

## 参考文献

- [1] Dillon C F, Rasch E K, Gu Q, et al. Prevalence of knee osteoarthritis in the United States: arthritis data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey 1991-94[J]. *J Rheumatol*, 2006,33(11):2271-2279.
- [2] Hunter D J, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis[J]. *Lancet*, 2019,393(10182):1745-1759.
- [3] Martel-Pelletier J, Barr A J, Cicuttini F M, et al. Osteoarthritis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016,2:16072.
- [4] Aigner T, Soder S, Gebhard P M, et al. Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis--structure, chaos and senescence[J]. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2007,3(7):391-399.
- [5] Pitsillides A A, Beier F. Cartilage biology in osteoarthritis--lessons from developmental biology[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011,7(11):654-663.
- [6] Goldring S R, Goldring M B. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016,12(11):632-644.
- [7] Hu X, Ji X, Yang M, et al. Cdc42 Is Essential for Both Articular Cartilage Degeneration and Subchondral Bone Deterioration in Experimental Osteoarthritis[J]. *J Bone Miner Res*, 2018,33(5):945-958.
- [8] Mazur C M, Woo J J, Yee C S, et al. Osteocyte dysfunction promotes osteoarthritis through MMP13-dependent suppression of subchondral bone homeostasis[J]. *Bone Res*, 2019,7:34.
- [9] Alliston T, Hernandez C J, Findlay D M, et al. Bone marrow lesions in osteoarthritis: What lies beneath[J]. *J Orthop Res*, 2018,36(7):1818-1825.
- [10] Fransen M, McConnell S, Harmer A R, et al. Exercise for osteoarthritis of the knee[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015,1:D4376.
- [11] Hinman R S, Heywood S E, Day A R. Aquatic physical therapy for hip and knee osteoarthritis: results of a single-blind randomized controlled trial[J]. *Phys Ther*, 2007,87(1):32-43.
- [12] Clegg D O, Reda D J, Harris C L, et al. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis[J]. *N Engl J Med*, 2006,354(8):795-808.
- [13] Bowes M A, McLure S W, Wolstenholme C B, et al. Osteoarthritic bone marrow lesions almost exclusively collocate with denuded cartilage: a 3D study using data from the Osteoarthritis Initiative[J]. *Ann Rheum Dis*, 2016,75(10):1852-1857.
- [14] Flynn C, Hurtig M, Linden A Z. Anionic Contrast-Enhanced MicroCT Imaging Correlates with Biochemical and Histological Evaluations of Osteoarthritic Articular Cartilage[J]. *Cartilage*, 2020:939054004.
- [15] Romeo S G, Alawi K M, Rodrigues J, et al. Endothelial proteolytic activity and interaction with non-resorbing osteoclasts mediate bone elongation[J]. *Nat Cell Biol*, 2019,21(4):430-441.
- [16] Romeo S G, Alawi K M, Rodrigues J, et al. Endothelial proteolytic activity and interaction with non-resorbing osteoclasts mediate bone elongation[J]. *Nat Cell Biol*, 2019,21(4):430-441.
- [17] Zhang S, Chuah S J, Lai R C, et al. MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity[J]. *Biomaterials*, 2018,156:16-27.
- [18] Bragdon B, Lam S, Aly S, et al. Earliest phases of chondrogenesis are dependent upon angiogenesis during ectopic bone formation in mice[J]. *Bone*, 2017,101:49-61.
- [19] Grosso A, Burger M G, Lunger A, et al. It Takes Two to Tango: Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis for Bone Regeneration[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2017,5:68.
- [20]
- [21] Su W, Liu G, Liu X, et al. Angiogenesis stimulated by elevated PDGF-BB in subchondral bone contributes to osteoarthritis development[J]. *JCI Insight*, 2020,5(8).

- [22] Sun B H, Wu C W, Kalunian K C. New developments in osteoarthritis[J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2007,33(1):135-148.
- [23] 李繁. 血小板衍生生长因子-BB (PDGF-BB) 血浆水平及其基因多态性与冠心病的相关性研究[D]. 天津医科大学, 2017.
- [24] 张宇, 许学猛, 吴少鹏, 等. 血小板衍生生长因子-BB 在增生肥厚黄韧带中的表达及意义[J]. *南方医科大学学报*, 2011,31(07):1268-1272.
- [25] Su W, Liu G, Liu X, et al. Angiogenesis stimulated by elevated PDGF-BB in subchondral bone contributes to osteoarthritis development[J]. *JCI Insight*, 2020,5(8).
- [26] Yin Y W, Sun Q Q, Hu A M, et al. Association of rs9340799 polymorphism in estrogen receptor alpha gene with the risk of osteoarthritis: evidence based on 8,792 subjects[J]. *Mol Genet Genomics*, 2015,290(2):513-520.
- [27] Brandt K D, Dieppe P, Radin E. Etiopathogenesis of osteoarthritis[J]. *Med Clin North Am*, 2009,93(1):1-24.
- [28] Mabey T, Honsawek S, Saetan N, et al. Angiogenic cytokine expression profiles in plasma and synovial fluid of primary knee osteoarthritis[J]. *Int Orthop*, 2014,38(9):1885-1892.
- [29] Block J A. Osteoarthritis: OA guidelines: improving care or merely codifying practice?[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2014,10(6):324-326.
- [30] Conaghan P G, Cook A D, Hamilton J A, et al. Therapeutic options for targeting inflammatory osteoarthritis pain[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2019,15(6):355-363.
- [31] Mapp P I, Walsh D A. Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012,8(7):390-398.
- [32] Walsh D A, Bonnet C S, Turner E L, et al. Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007,15(7):743-751.
- [33] Shimoyama T, Hiraoka S, Takemoto M, et al. CCN3 inhibits neointimal hyperplasia through modulation of smooth muscle cell growth and migration[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010,30(4):675-682.
- [34] Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine[J]. *Genes Dev*, 2008,22(10):1276-1312.
- [35] Osadnik T, Strzelczyk J K, Regula R, et al. The Relationships between Polymorphisms in Genes Encoding the Growth Factors TGF-beta1, PDGFB, EGF, bFGF and VEGF-A and the Restenosis Process in Patients with Stable Coronary Artery Disease Treated with Bare Metal Stent[J]. *PLoS One*, 2016,11(3):e150500.
- [36] Ewens K G, George R A, Sharma K, et al. Assessment of 115 candidate genes for diabetic nephropathy by transmission/disequilibrium test[J]. *Diabetes*, 2005,54(11):3305-3318.
- [37] Bicanski B, Wenderdel M, Mertens P R, et al. PDGF-B gene single-nucleotide polymorphisms are not predictive for disease onset or progression of IgA nephropathy[J]. *Clin Nephrol*, 2007,67(2):65-72.
- [38] 沈明球, 刘俊昌, 王新军, 等. 新疆北疆牧区维、哈、汉族膝骨性关节炎致病因素的流行病学调查[J]. *中国组织工程研究*, 2015,19(29):4614-4618.

## 综述

### (Review)

#### H 型血管与血管生成及其在骨关节炎中的作用

摘要：血管在骨骼生长、再生以及在骨重塑中都起到了十分重要的作用，众所周知血管不仅为骨组织提供必要的营养物质、氧气、生长因子、激素等物质，而且在最近有研究发现血管在骨形成的调节中也起着重要的作用<sup>[1, 2]</sup>。在骨关节炎中，血管生成也参与了软骨生长和矿化的重新启动。在以往的研究中认为只有肝素结合蛋白生长因子在血管生成中起到了重要作用。近年来有研究发现一种低分子量的微血管细胞特异性因子，其被称为内皮细胞促血管生成因子(ESAF)。ESAF 除了具有血管生成活性外，还能激活中性的前金属蛋白酶和激活活性的酶-抑制剂复合物。H 型血管是由 Kusumbe 等人分别在生长板附近的骨小梁和骨皮质、骨膜和骨内膜表面发现了一种特殊的血管亚型。这些血管因高表达 CD31 和 Emcn 而被称为 H 型血管。血小板衍生生长因子 BB (PDGF-BB)、神经轴突导向分子-3 (SLIT3)、缺氧诱导因子 1- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )、Notch 通路和血管内皮生长因子(VEGF)等因子参与了血管生成和成骨的耦合。本篇综述主要从 H 型血管在骨骼中的形态、血管生成与骨关节炎以及新生血管在骨关节炎中的形态特征这几方面来介绍。

【关键词】 血管生成因子；骨关节炎；软骨下骨；H 型血管；血小板衍生生长因子

[Abstract]: Blood vessels play a very important role in bone growth, regeneration and in bone remodelling. It is well known that blood vessels not only provide essential nutrients, oxygen, growth factors and hormones to capable bone tissue, but in recent studies it has been found that blood vessels also play an important role in the regulation of bone formation <sup>[1, 2]</sup>. In osteoarthritis, angiogenesis is also involved in the reinitiation of cartilage growth and mineralisation. In previous studies only the heparin-binding protein growth factor was thought to play an important role in angiogenesis. In addition to its angiogenic activity, ESAF also activates neutral pre-metalloproteinases and activates active enzyme-inhibitor complexes. h-vessels were identified by Kusumbe et al. A specific subtype of vessels was identified on the surface. These vessels are referred to as H-vessels because of their high expression of CD31 and Emcn. Factors such as platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB), neuronal axon guidance molecule-3 (SLIT3), hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), Notch pathway and vascular endothelial growth factor (VEGF) are involved in the coupling of angiogenesis and osteogenesis. This review focuses on the morphology of H-vessels in bone, angiogenesis and osteoarthritis and the morphological features of neovascularisation in osteoarthritis.

Key words: Angiogenic factor; osteoarthritis; subchondral bone; H-vessel; platelet-derived growth factor

现在普遍认为骨关节炎的过程不仅仅是一种退化过程，而是由多种细胞、因子及多

种信号通路共同作用下所造成的。有研究表明在 OA 早期<sup>[3,4]</sup>会发生软骨的钙化、新骨的形成<sup>[5]</sup>、和新血管的穿透。事实上,骨新生血管增生和钙化的过程是相互联系的,难以单独发生。本综述主要探讨目前对 H 型血管调控信号通路和 H 型血管如何调控成骨的认识。进一步研究 H 型血管的调节和功能,以及新生血管与骨关节炎的关系。

### 1. 血管生成因子

自上世纪末血管生成对肿瘤生长的重要性就已被发现并被接受,但其参与 OA 的病程进展是一个最近新提出的概念<sup>[6,7]</sup>。ESAF 的发现是在 1979 年从肿瘤提取物中分离出一种低分子量的非蛋白质血管生成因子,同时也在人类的滑液中被发现了同样的因子<sup>[8]</sup>。与肿瘤血管生成因子所不同的是肿瘤血管生成因子在当时报道的分子量为 8 万道尔顿,但是这种血管生成因子非常小,分子质量不到 600 道尔顿,被命名为“上皮细胞促血管生成因子(ESAF)”。ESAF 的一个显著特性是它能够激活中性的前金属蛋白酶:原胶原酶、原明胶酶,以及少量的前基质溶素<sup>[9]</sup>,这些酶在软骨和结缔组织的降解中起到了关键作用。金属蛋白酶的活性通过分泌抑制剂来控制这些酶的活性,它与这些酶相互作用形成非活性复合物。一直以来这些酶抑制剂复合物的再活化被认为是一个非生理学命题。然而,最近的研究表明 ESAF 可以解离这种酶-抑制剂复合物,从而使其恢复活性。这些发现表明,ESAF 在新血管形成中的作用可能是通过限制结缔组织的降解从而为新毛细血管的渗透提供空间。

### 2. 骨骼中的 H 型血管

内皮细胞(ECs)在血管形成和血管生成过程中起着中心调控作用,在骨血管内排列着具有特定形态、分子和功能特性的特化血管内皮细胞(ECs)。Kusumbe 等人分别在生长板附近的骨小梁和骨皮质、骨膜和骨内膜表面发现了一种高表达 CD31 和 Emcn 血管亚型,将这些血管命称为 H 型血管。H 型血管是一种直柱状的血管组织,在其远端<sup>[10]</sup>H 型血管相互连接。而骨干窦状血管在骨干骨髓腔内形成致密、高支化的毛细血管网络,在这些血管膜表面 CD31 和 Emcn 为低表达,这些血管被称为 L 型血管。富含营养物质、氧气、生长因子和激素的血液从动脉和远端毛细血管动脉中流出,直接与 H 型血管相连。然后血液继续进入 L 型窦网位于干骺端和骨干交界处,最终流入中央静脉回流入血。H 型血管还排列有密集的骨祖细胞,这些细胞可分化为成骨细胞和骨细胞<sup>[11]</sup>。在干骺端和骨内膜<sup>[12]</sup>中,Runx2+早期骨祖细胞和胶原 1 $\alpha$ +成骨细胞也密集排列在 CD31+血管周围。骨祖细胞和成骨细胞在骨干窦 L 型血管附近不存在。骨祖细胞与 H 型血管的接近为骨形成提供了一种成骨细胞资源,而高氧含量为满足骨形成的代谢需求提供了必要的营养。H 型血管在年幼的哺乳动物中靠近生长板的地方最为丰富。长骨的软骨内成骨过程是发生在生长板上的长骨,是一种钙化骨不断替换软骨基质的过程,通过骨骼的塑形变成相应的形状。在哺乳动物出生后和青春期的骨干骺端细胞提供促进 H 型血管的信号。破骨细胞和(或)破软骨细胞被认为可以移除软骨形成血管生长所需的腔隙。最近, Romeo 等人报道从 H 型血管内皮因细胞(ECs)中释放的蛋白酶包括基质金属蛋白酶-9(MMP-9),是软骨吸收导致骨纵向生长<sup>[13]</sup>所必需的。他们的研究表明,与血管

相关的破骨细胞可以刺激内皮细胞帮助消化软骨板,从而帮助调节软骨内成骨的过程中的血管生长。

### 3.影响耦合 H 型血管生成和成骨的因素

H 型血管的形成与成骨作用之间有着很大的关系,这表明内皮细胞和成骨细胞之间存在这某种信号通路。在迄今为止的研究中已经发现了几种同时调控 H 型血管形成和成骨的因素。成骨细胞、成骨细胞、软骨细胞和内皮系细胞都可以分泌内皮因子,以达到诱导 ECs 增殖、血管组装和稳定化,如 PDGF-BB 和 SLIT3<sup>[14, 15]</sup>。ECs 可以分泌出如 HIF-1 $\alpha$ 、Notch、VEGF 等因子来促进血管的生成和稳定性,可能还有其他因素,但仍需进一步的研究来证明。

#### 3.1 PDGF-BB

H 型血管的生成是与骨形成紧密结合的,这表明内皮细胞和成骨细胞之间存在分子通讯。到目前为止,已经发现了几个调节 H 型血管形成和成骨的因素。PDGF-BB 是 PDGF 家族中的趋化和有丝分裂因子,在促进内皮祖细胞、间充质干细胞等多种间充质细胞的迁移、增殖和分化以促进血管生成和成骨过程中起关键作用<sup>[16-19]</sup>。Xie 等证实 PDGF-BB 在骨造型<sup>[14]</sup>和重塑过程中均能促进 H 型血管和骨的形成。他们指出破骨前细胞(骨吸收性破骨细胞的未成熟前体)是骨髓和外周血中 PDGF-BB 的主要来源。这一发现支持了之前的一篇报道,即 PDGF-BB 是由不成熟的、非吸收性破骨细胞<sup>[20]</sup>分泌的。破骨前细胞来源的 PDGF-BB 通过结合其受体 PDGF 受体 $\beta$  (PDGFR $\beta$ ),并触发丝裂原激活激酶和磷酸肌醇-3 激酶的 Akt 信号级联<sup>[21]</sup>,从而促进了间充质干细胞和骨髓来源的内皮祖细胞的迁移和分化。Gao 等人在实验中发现巨噬细胞/单核细胞在成骨的过程中可分化为骨膜抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP+)单核细胞并分泌 PDGF-BB,诱导骨膜源性细胞(PDC)骨膜蛋白表达并将其募集至骨膜骨表面,支持成骨和 H 型血管形成<sup>[22]</sup>。有趣的是,在两种不同类型的 PDCs 实验中,虽然这一信号机制在幼龄生长的小鼠和成年小鼠中都存在,巢蛋白+的 PDCs 主要在骨发育过程中被发现,而瘦素受体+的 PDCs 对成年小鼠的骨稳态至关重要。总的来说,破骨细胞前分泌的 PDGF-BB 在耦合血管生成和成骨过程中起着重要的调节作用。这一发现为破骨前细胞和 H 型血管之间的交流提供了证据,并确定了一个修饰 H 型血管的骨特异性细胞靶点。

#### 3.2 神经轴突导向分子-3

神经轴突导向分子-3 (SLIT3)是最初在中枢神经系统<sup>[23]</sup>中被识别的三种 SLIT 配体中的一个,它们在中枢神经系统中通过受体介导轴突引导信号的传递<sup>[24]</sup>。多项研究表明,SLIT3 也在神经系统之外的其他组织中表达。同时也参与其他的生理功能如血管生成<sup>[25-27]</sup>和干细胞介导等方面<sup>[28]</sup>。最近的研究表明,SLIT3 可以促进 H 型血管的形成和骨的形成<sup>[15, 29]</sup>。Xu 等人研究发现,成骨细胞来源的 SLIT3 作为促血管生成因子间接增加 H 型 ECs 数量,从而促进骨形成。在多个成骨细胞谱系细胞(骨钙素、骨钙素和牙本质基质酸性磷蛋白 1 表达细胞)中,SLIT3 基因缺失显示骨骼中 H 型 ECs 减少、成骨细胞活性降低、骨形成减弱,这提示了成骨细胞和 H 型 ECs<sup>[15]</sup>之间存在着串联关系。通过骨折

模型进一步证实成骨细胞来源的 SLIT3 是 H 型血管的形成和骨形成的重要因素。在 SLIT3 缺陷的小鼠模型中骨折修复速度减慢, 而缺乏连接蛋白 Schnurri3(成骨细胞活性抑制因子)<sup>[15]</sup>的小鼠模型中骨折愈合的速度加快。在小鼠绝经后治疗骨质疏松模型中, 使用外源性 SLIT3 促进骨折愈合和防止骨丢失, 通过增加 H 型血管形成。这些发现为成骨细胞源性信号指示 H 型血管开始骨生长提供了第一个证据。几乎同时, Kim 等人发现破骨细胞衍生的 SLIT3 将骨吸收与骨形成结合在一起。他们报道了来自成熟破骨细胞的 SLIT3 刺激成骨细胞在骨重塑部位的招募和增殖, 并增强了成骨<sup>[29]</sup>。小鼠组织蛋白酶 K (Ctsk)表达细胞中 Slit3 的缺失与 H 型血管显著减少和低骨量相关, 这也导致了破骨形成的增强。这些发现提示破骨细胞中的 SLIT3 可能通过上调血管生成间接促进成骨。但是 SLIT3 的主要来源还需进一步的实验证明。SLIT3 在骨髓微环境中可能有多种来源。另外, 在两项使用 cre 遗传模型研究中发现 SLIT3 在骨细胞表达上有重叠<sup>[15, 29]</sup>, 这说明骨细胞可能是 SLIT3 的来源之一。无论细胞来源如何, SLIT3 都是一种有效诱导 H 型血管和骨的形成的调节因子。在绝经后骨质疏松症<sup>[30]</sup>小鼠模型中, 重组 SLIT3 与甲状旁腺激素一样有效地增强骨折愈合和抑制骨丢失。因此, 作用在 SLIT3 信号通路的靶向药物为血管靶向骨合成代谢治疗、骨质疏松症和骨折愈合提供了一种潜在的方法。

### 3.3 HIF-1 $\alpha$

HIF 是一种转录因子, 主要作用是介导细胞对组织中的氧含量发生变化时做出一系列的反应, 并控制生理性和病理性新血管的生成<sup>[31, 32]</sup>。HIF 异质二聚体由三个 $\alpha$ -亚基(HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ 和 HIF-3 $\alpha$ )和一个 $\beta$ 亚基组成。缺氧可调节 HIF-1 $\alpha$ 的表达和活性。由于成骨细胞的高代谢需要氧气, 因此成骨细胞和附近的 ECs 可能在成骨过程中相对缺氧时 HIF-1 $\alpha$ 的表达增加。HIF-1 $\alpha$ 活性上调使缺氧组织中 VEGF 的表达增多, 使 HIF-1 $\alpha$ 对于伤口再生和肿瘤血管化<sup>[33]</sup>到了重要作用。同样, HIF-1 $\alpha$ 在骨形成和再生过程中也起着关键作用。Kusumbe 等人证明内皮性 HIF-1 $\alpha$ 是干骺端 H 型血管形成的重要启动子。H 型 ECs 在幼龄小鼠中的 HIF-1 $\alpha$ 高表达, 随着小鼠年龄的增长而降低 HIF-1 $\alpha$ 的表达量, 并与 H 型 ECs 的减少和年龄依赖性骨丢失有关。ECs 中缺氧信号的激活导致 H 型血管数量增加, 增强软骨内血管生成和骨的形成<sup>[12]</sup>。特异性的 EC-HIF-1 $\alpha$ 缺失导致骨祖细胞的显著减少, 与骨小梁形成的减少相关。特异性失活 von hipel - lindau (Vhl) E3 泛素连接酶<sup>[34]</sup>基因, 该基因在稳定内皮细胞中的 HIF-1 $\alpha$ , 增强 H 型血管生成和增加 osterix+骨祖细胞。成骨细胞也依赖于 HIF-1 $\alpha$ 信号。在成骨细胞中 Vhl 缺失, 导致成骨细胞 HIF-1 $\alpha$ 的过表达, 也增加了血管生成和成骨<sup>[35]</sup>。然而, HIF-1 $\alpha$ 在血管生成和成骨耦合中的作用可能仅局限于年轻小鼠, 因为在报道中指出仅在 3-4 周龄小鼠中表达, 并在<sup>[36]</sup>晚期消失。甲磺酸去铁胺可促进 HIF-1 $\alpha$ 活性和<sup>[37]</sup>的稳定性, 显著增加 H 型血管和成骨骨祖细胞和成骨细胞, 从而导致骨形成的增加。综上所述, 这些研究结果有力地表明, HIF-1 $\alpha$ 信号在 H 型血管调控、在血管生成与成骨中起着至关重要的作用<sup>[31, 38, 39]</sup>。

## 4. H 型血管在骨骼疾病中的应用

近年来, 已发现 H 型血管在多种骨病中发生改变, 并与病理生理学有关。针对 H

型血管形成和调控的药物已在动物疾病模型中被证明是骨关节炎、骨质疏松症、骨折延迟愈合、骨坏死和骨转移的潜在治疗靶点。

#### 4.1 H 型血管与骨关节炎

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种以进行性关节软骨退变、关节面和软骨下骨血管侵犯、异常软骨下骨重塑为特征的慢性疾病<sup>[40, 41]</sup>。Lu 等证明, 激活关节软骨细胞中雷帕霉素复合物(mTORC)的机制靶点可促进 VEGF 分泌进入软骨下骨, 刺激 H 型血管形成。软骨下血管生成与成骨的结合导致软骨下骨硬化、囊肿和骨赘的形成, 加速了骨性关节炎进展。抑制软骨细胞 mTORC 可减弱 H 型软骨下血管形成和 OA 进展<sup>[42]</sup>。在小鼠模型中, 雷帕霉素对 mTORC 的药理抑制降低了 OA 的严重程度, 这可能部分通过抑制病理血管生成起作用。最近, H 型血管被报道消化软骨基质<sup>[13]</sup>, 这可能是 OA 软骨变性的另一机制。这些发现导致了一个问题: 抑制 H 型 ECs 是否可能减缓 OA 进展。halofuginone 通过间接抑制 MMP-2 和直接抑制 TGF $\beta$ 信号通路抑制血管生成, 有效减少异常 H 型血管的形成从而减轻关节软骨退变和软骨下骨硬化<sup>[43]</sup>。

#### 4.2 H 血管与骨折愈合

在骨折愈合过程中, 软骨为新骨形成奠定了基础。因此, 软骨吸收在骨折愈合过程中的重要作用<sup>[44]</sup>。Romeo 等人最近的一项研究报道 H 型血管在骨发育和再生<sup>[13]</sup>过程中发挥着关键的软骨基质取代骨的作用。这就引出了一个问题, 促进 H 型血管在局部骨折区域的生成是否能促进骨折的修复。事实上, 在小鼠骨折模型<sup>[15]</sup>中, 重组 SLIT3 通过增加 H 型血管的形成, 有效地加速了骨折愈合。这是一种很有前途的治疗方法, 特别是对于大约 5%的骨折发生的延迟愈合或不愈合<sup>[45]</sup>。脊柱融合术是一种将两个或多个椎体固定连接的方式来治疗脊柱不稳的外科手术<sup>[46, 47]</sup>, 并需要类似的骨折修复机制。有报道称, 低强度脉冲超声可以通过增加 H 型血管生成和脊柱融合过程中成骨细胞的数量来促进脊柱融合<sup>[48]</sup>。

#### 4.3 H 血管与老年性/绝经后骨质疏松症

对于绝经后的老年妇女来说, 骨质疏松症的特点是骨骼脆性增加、微结构退化, 低骨密度、骨折风险的增加<sup>[49]</sup>。在去卵巢小鼠(模拟绝经后骨质疏松症)和老年小鼠(模拟老年骨质疏松症)模型中发现 H 型血管减少。H 型血管随年龄下降与血管分泌素、促成骨因子和骨祖细胞减少有关、与年龄相关的骨丢失有关<sup>[10, 50]</sup>。Wang 等报道 H 型血管的形成是老年人和骨质减少患者骨质丢失的重要指标<sup>[51, 52]</sup>。PDGF-BB 浓度在去卵巢小鼠模型中降低, 可能是因为失去了对破骨前细胞分化为具有更少的破骨前细胞<sup>[21]</sup>的成熟破骨细胞的抑制。Harmine 是一种 $\beta$ -卡波林生物碱, 通过增强破骨前细胞 PDGF-BB 诱导的 H 型血管形成来防止骨丢失<sup>[21, 53]</sup>。其他治疗药物如 Erk 抑制剂 NSC-87877 可阻止破骨前细胞融合成成熟的破骨细胞从而增加 PDGF-BB 的产生, 在绝经后骨质疏松症小鼠模型中诱导 H 型血管的形成并恢复骨量<sup>[54]</sup>。这可能为治疗年龄相关性骨质疏松症提供了额外的治疗靶点<sup>[55]</sup>。

#### 5. 血管生成与骨关节炎

新血管化与 OA 的关节改变有什么关系?这种关系可以通过以下三个过程来确定:骨赘的生长、软骨下板的“前进”<sup>[56]</sup>, 关节的“重塑”, 这些都涉及到 OA 的发病机制<sup>[57]</sup>。一般来说, 当毛细血管穿透软骨下板和关节软骨深部时边缘骨赘才开始形成, 随后软骨内成骨作用在原来的软骨上产生新骨。软骨含有血管生成和金属蛋白酶的抑制剂, 需要以某种方式避免这一情况的发生。骨赘通常存在于骨关节炎关节, 深部关节软骨钙化使软骨下板向前“推进”, 这与组织学上的“潮汐标志重复”相一致。事实上已经有人提出软骨不能产生阻止新血管形成的蛋白酶抑制剂<sup>[58-60]</sup>, 这是软骨损失开始的基础。在软骨碱性磷酸酶活性增加和基质囊泡积累的基础上<sup>[61]</sup>, 软骨钙化的更新被认为与 OA 相关。

#### 6. 新生血管形态特征和体外观察

软骨内成骨过程中血管侵犯的形态学特征已被众多学者所认识。哺乳动物生长板中的新血管化是这方面最引人注目的例子, 因为毛细血管有序同步侵入无血管的软骨推进了 OA 进展的进程<sup>[62]</sup>。显然, 在这个位置上血管生成的刺激和收缩之间的平衡是很明显的。侵入性血管以盲孔<sup>[63]</sup>的方式穿透钙化的软骨这与该区域的低氧张力相一致<sup>[64]</sup>。微血管浸润沿软骨细胞柱通过未矿化的横隔膜被侵蚀芽顶端的维管周围细胞<sup>[65, 66]</sup>。侵袭性血管周围细胞通常通过插入大量的细胞突起来降解软骨横隔, 这些过程可能利用其表面的蛋白水解酶系统来实现胶原溶解, 局部激活的胶原酶对这种裂解至关重要, 而 ESAF 正是激活这种酶的关键<sup>[63]</sup>。虽然它们被称为巨噬细胞样细胞, 但观察表明它们可能是特化的内皮细胞这类似于那些在实验血管生成中描述的细胞。在利用生长板软骨细胞的钙化培养进行的体外实验中表明, ESAF 是由肥大带和暂时性矿化带中产生的, 当这种高密度培养的软骨细胞开始矿化其软骨基质并被钙化沉积物包围时, 它们还释放 ESAF, 使其在开始钙化后 24 至 48 小时出现在培养基中。通过抑制碱性磷酸酶来抑制矿化会降低 ESAF 的产量, 但 ESAF 增加并不直接依赖于碱性磷酸酶的活性。因此, 在培养中产生的 ESAF 表明了体内的钙化软骨细胞形成了向毛细血管床扩散的梯度。侵袭性内皮细胞(可能围绕其细胞过程, 位于软骨隔膜内)产生的非活性胶原酶将被局部激活, 从而导致胶原降解受到控制。随后, 侵入的毛细芽两种元素均沿 ESAF 梯度通过横隔。在肥大过程中, 成熟肥大的软骨细胞周围也可能发生结缔组织的破坏, 尽管最近的研究表明这与结缔组织的再生有关而与吸收和细胞的退化关系不大。有趣的是这种胶原酶是存在于骨关节炎的软骨中<sup>[67]</sup>。

综上所述, 血管的生成与关节炎密切相关。H 型血管是一种新发现的骨血管亚型, 在骨建模和骨重塑过程中对骨的形成和修复起着重要的调节作用。增加 H 型血管的药物靶向与加速骨折愈合和预防与年龄或疾病相关的骨质疏松症中的骨丢失有关。H 型血管的发现为我们了解 ECs 和骨祖细胞之间相互作用的分子和细胞机制提供了新的知识。对人体和动物模型的进一步研究将为骨修复和骨丢失的新治疗策略的设计提供合理的基础。

PDGF-BB 与 H 型血管的生成密切相关, PDGF-BB 可以直接诱导内皮细胞增殖、迁移和管状形成, 并刺激 VEGF 分泌。因此, PDGF-BB 可能与其他促血管生成因子(如

VEGF)协同作用,诱导骨关节炎关节软骨下骨的新血管形成。在一些动物模型实验中发现 PDGF-BB 在破骨前细胞中的缺失几乎破坏了病状软骨下骨血管生成和关节损伤,这强烈暗示了 PDGF-BB 在骨关节炎前期和早期异常软骨下骨血管生成的发育过程中发挥了关键作用。CAO XU 等人在研究中发现与成骨结合过程中,破骨前细胞分泌 PDGF-BB 招募 EPCs 和 MSCs 促进血管生成。破骨前细胞分泌的 PDGF-BB 诱导 CD31hiEmcnhi 血管亚型的形成,促进血管生成与骨形成的耦合<sup>[68]</sup>。值得注意的是,在 ovx 诱导小鼠骨丢失的模型中,骨髓和外周血中 PDGF-BB 的浓度显著降低,骨髓中 CD31hiEmcnhi 血管也减少。破骨细胞从破骨前细胞成熟的增加降低了卵巢切除小鼠 PDGF-BB 的丰度,可能影响了骨形成。敲除 Ctsk 或注射 Ctsk 抑制剂可有效提高 PDGF-BB 的浓度<sup>[69]</sup>。破骨前细胞分泌的 PDGF-BB 是一个潜在的、可持续的骨膜皮质缺损和骨质疏松症的治疗靶点。创伤性关节损伤后单核骨前细胞分泌过多的 PDGF-BB,激活 PDGFR- $\beta$ 信号传导在骨/骨髓血管细胞和周围细胞中,以旁观的方式促进新血管的异常形成。未来的工作需要确定破骨前细胞 PDGF-BB 的增加是在转录水平还是翻译后水平,以及在 OA 发展过程中如何启动这一过程。除了机械的见解软骨下骨血管生成在 OA 发病机制及其作用,目前的工作只是为破骨前衍生的 PDGF-BB 在 OA 发展中的作用提供了概念验证证据。未来基于人群的研究需要进一步验证这些发现。

## 参考文献

- [1] Hankenson K D, Dishowitz M, Gray C, et al. Angiogenesis in bone regeneration[J]. *Injury*, 2011,42(6):556-561.
- [2] Zheng Z W, Chen Y H, Wu D Y, et al. Development of an Accurate and Proactive Immunomodulatory Strategy to Improve Bone Substitute Material-Mediated Osteogenesis and Angiogenesis[J]. *Theranostics*, 2018,8(19):5482-5500.
- [3] Sokoloff L. The biology of degenerative joint disease[J]. *Acta Rheumatol Belg*, 1977,1(1-2):155-156.
- [4] Howell D S, Woessner J J, Jimenez S, et al. A view on the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *Bull Rheum Dis*, 1978,29(8):996-1001.
- [5] Gilbertson E M. Development of periarticular osteophytes in experimentally induced osteoarthritis in the dog. A study using microradiographic, microangiographic, and fluorescent bone-labelling techniques[J]. *Ann Rheum Dis*, 1975,34(1):12-25.
- [6] Brown R A, Weiss J B, Tomlinson I W, et al. Angiogenic factor from synovial fluid resembling that from tumours[J]. *Lancet*, 1980,1(8170):682-685.
- [7] Cooke T D. The polyarticular features of osteoarthritis requiring hip and knee surgery[J]. *J Rheumatol*, 1983,10(2):288-290.
- [8] Weiss J B, Brown R A, Kumar S, et al. An angiogenic factor isolated from tumours: a potent low-molecular-weight compound[J]. *Br J Cancer*, 1979,40(3):493-496.
- [9] Weiss J B, Hill C R, Davis R J, et al. Activation of a procollagenase by low-molecular-weight angiogenesis factor[J]. *Biosci Rep*, 1983,3(2):171-177.
- [10] Kusumbe A P, Ramasamy S K, Adams R H. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone[J]. *Nature*, 2014,507(7492):323-328.
- [11] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation[J]. *Cell*, 2002,108(1):17-29.
- [12] Kusumbe A P, Ramasamy S K, Adams R H. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone[J]. *Nature*, 2014,507(7492):323-328.
- [13] Romeo S G, Alawi K M, Rodrigues J, et al. Endothelial proteolytic activity and interaction with non-resorbing osteoclasts mediate bone elongation[J]. *Nat Cell Biol*, 2019,21(4):430-441.
- [14] Xie H, Cui Z, Wang L, et al. PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis[J]. *Nat Med*, 2014,20(11):1270-1278.
- [15] Xu R, Yallowitz A, Qin A, et al. Targeting skeletal endothelium to ameliorate bone loss[J]. *Nat Med*, 2018,24(6):823-833.
- [16] Wang H, Yin Y, Li W, et al. Over-expression of PDGFR-beta promotes PDGF-induced proliferation, migration, and angiogenesis of EPCs through PI3K/Akt signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2012,7(2):e30503.
- [17] Fiedler J, Etzel N, Brenner R E. To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells

- stimulated by isoforms of PDGF[J]. *J Cell Biochem*, 2004,93(5):990-998.
- [18] Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine[J]. *Genes Dev*, 2008,22(10):1276-1312.
- [19] Ball S G, Shuttleworth C A, Kielty C M. Mesenchymal stem cells and neovascularization: role of platelet-derived growth factor receptors[J]. *J Cell Mol Med*, 2007,11(5):1012-1030.
- [20] Kreja L, Brenner R E, Tautzenberger A, et al. Non-resorbing osteoclasts induce migration and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Biochem*, 2010,109(2):347-355.
- [21] Xie H, Cui Z, Wang L, et al. PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis[J]. *Nat Med*, 2014,20(11):1270-1278.
- [22] Gao B, Deng R, Chai Y, et al. Macrophage-lineage TRAP+ cells recruit periosteum-derived cells for periosteal osteogenesis and regeneration[J]. *J Clin Invest*, 2019,129(6):2578-2594.
- [23] Long H, Sabatier C, Ma L, et al. Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance[J]. *Neuron*, 2004,42(2):213-223.
- [24] Jaworski A, Tessier-Lavigne M. Autocrine/juxtacrine regulation of axon fasciculation by Slit-Robo signaling[J]. *Nat Neurosci*, 2012,15(3):367-369.
- [25] Zhang B, Dietrich U M, Geng J G, et al. Repulsive axon guidance molecule Slit3 is a novel angiogenic factor[J]. *Blood*, 2009,114(19):4300-4309.
- [26] Paul J D, Coulombe K, Toth P T, et al. SLIT3-ROBO4 activation promotes vascular network formation in human engineered tissue and angiogenesis in vivo[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2013,64:124-131.
- [27] Qiu H, Xiao W, Yue J, et al. Heparan sulfate modulates Slit3-induced endothelial cell migration[J]. *Methods Mol Biol*, 2015,1229:549-555.
- [28] Geutskens S B, Andrews W D, van Stalborch A M, et al. Control of human hematopoietic stem/progenitor cell migration by the extracellular matrix protein Slit3[J]. *Lab Invest*, 2012,92(8):1129-1139.
- [29] Kim B J, Lee Y S, Lee S Y, et al. Osteoclast-secreted SLIT3 coordinates bone resorption and formation[J]. *J Clin Invest*, 2018,128(4):1429-1441.
- [30] Bernard N J. Endothelium-osteoblast crosstalk[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2018,14(7):386.
- [31] Riddle R C, Khatri R, Schipani E, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in angiogenic-osteogenic coupling[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2009,87(6):583-590.
- [32] Pugh C W, Ratcliffe P J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system[J]. *Nat Med*, 2003,9(6):677-684.
- [33] Greijer A E, van der Groep P, Kemming D, et al. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)[J]. *J Pathol*, 2005,206(3):291-304.
- [34] Jaakkola P, Mole D R, Tian Y M, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation[J]. *Science*, 2001,292(5516):468-472.

- [35] Wan C, Shao J, Gilbert S R, et al. Role of HIF-1alpha in skeletal development[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010,1192:322-326.
- [36] Riddle R C, Leslie J M, Gross T S, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha protein negatively regulates load-induced bone formation[J]. *J Biol Chem*, 2011,286(52):44449-44456.
- [37] Jones D T, Harris A L. Identification of novel small-molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 transactivation and DNA binding[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006,5(9):2193-2202.
- [38] Schipani E, Maes C, Carmeliet G, et al. Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF[J]. *J Bone Miner Res*, 2009,24(8):1347-1353.
- [39] Maes C, Clemens T L. Angiogenic-osteogenic coupling: the endothelial perspective[J]. *Bonekey Rep*, 2014,3:578.
- [40] Mobasheri A, Rayman M P, Gualillo O, et al. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017,13(5):302-311.
- [41] Glyn-Jones S, Palmer A J, Agricola R, et al. Osteoarthritis[J]. *Lancet*, 2015,386(9991):376-387.
- [42] Lu J, Zhang H, Cai D, et al. Positive-Feedback Regulation of Subchondral H-Type Vessel Formation by Chondrocyte Promotes Osteoarthritis Development in Mice[J]. *J Bone Miner Res*, 2018,33(5):909-920.
- [43] Cui Z, Crane J, Xie H, et al. Halofuginone attenuates osteoarthritis by inhibition of TGF-beta activity and H-type vessel formation in subchondral bone[J]. *Ann Rheum Dis*, 2016,75(9):1714-1721.
- [44] Bolander M E. Regulation of fracture repair by growth factors[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1992,200(2):165-170.
- [45] Zura R, Xiong Z, Einhorn T, et al. Epidemiology of Fracture Nonunion in 18 Human Bones[J]. *JAMA Surg*, 2016,151(11):e162775.
- [46] Kornblum M B, Fischgrund J S, Herkowitz H N, et al. Degenerative lumbar spondylolisthesis with spinal stenosis: a prospective long-term study comparing fusion and pseudarthrosis[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2004,29(7):726-733, 733-734.
- [47] Glaser J, Stanley M, Sayre H, et al. A 10-year follow-up evaluation of lumbar spine fusion with pedicle screw fixation[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2003,28(13):1390-1395.
- [48] Xu X, Wang F, Yang Y, et al. LIPUS promotes spinal fusion coupling proliferation of type H microvessels in bone[J]. *Sci Rep*, 2016,6:20116.
- [49] Black D M, Rosen C J. Clinical Practice. Postmenopausal Osteoporosis[J]. *N Engl J Med*, 2016,374(3):254-262.
- [50] Ramasamy S K, Kusumbe A P, Wang L, et al. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone[J]. *Nature*, 2014,507(7492):376-380.
- [51] Wang L, Zhou F, Zhang P, et al. Human type H vessels are a sensitive biomarker of bone mass[J]. *Cell Death Dis*, 2017,8(5):e2760.
- [52] Zhu Y, Ruan Z, Lin Z, et al. The association between CD31(hi)Emcn(hi) endothelial cells and bone

- mineral density in Chinese women[J]. *J Bone Miner Metab*, 2019,37(6):987-995.
- [53] Huang J, Yin H, Rao S S, et al. Harmine enhances type H vessel formation and prevents bone loss in ovariectomized mice[J]. *Theranostics*, 2018,8(9):2435-2446.
- [54] Yin H, Huang J, Cao X, et al. Inhibition of Src Homology 2 Domain-Containing Protein Tyrosine Phosphatase-2 Facilitates CD31hiEndomucinhi Blood Vessel and Bone Formation in Ovariectomized Mice[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018,50(3):1068-1083.
- [55] Yang M, Li C J, Sun X, et al. MiR-497 approximately 195 cluster regulates angiogenesis during coupling with osteogenesis by maintaining endothelial Notch and HIF-1alpha activity[J]. *Nat Commun*, 2017,8:16003.
- [56] Byers P D, Contepomi C A, Farkas T A. A post mortem study of the hip joint. Including the prevalence of the features of the right side[J]. *Ann Rheum Dis*, 1970,29(1):15-31.
- [57] Hsieh Y S, Yang S F, Chu S C, et al. Expression changes of gelatinases in human osteoarthritic knees and arthroscopic debridement[J]. *Arthroscopy*, 2004,20(5):482-488.
- [58] Kuettner K E, Hiti J, Eisenstein R, et al. Collagenase inhibition by cationic proteins derived from cartilage and aorta[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976,72(1):40-46.
- [59] Eisenstein R, Sorgente N, Soble L W, et al. The resistance of certain tissues to invasion: penetrability of explanted tissues by vascularized mesenchyme[J]. *Am J Pathol*, 1973,73(3):765-774.
- [60] Taylor C M, Weiss J B. Partial purification of a 5.7K glycoprotein from bovine vitreous which inhibits both angiogenesis and collagenase activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985,133(3):911-916.
- [61] Jubeck B, Gohr C, Fahey M, et al. Promotion of articular cartilage matrix vesicle mineralization by type I collagen[J]. *Arthritis Rheum*, 2008,58(9):2809-2817.
- [62] Lewin S L, Utley D S, Cheng E T, et al. Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhances rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone[J]. *Laryngoscope*, 1997,107(7):992-999.
- [63] Arsenault A L. Microvascular organization at the epiphyseal-metaphyseal junction of growing rats[J]. *J Bone Miner Res*, 1987,2(2):143-149.
- [64] Brighton C T, Jensen L, Pollack S R, et al. Proliferative and synthetic response of bovine growth plate chondrocytes to various capacitively coupled electrical fields[J]. *J Orthop Res*, 1989,7(5):759-765.
- [65] Schenk R K, Wiener J, Spiro D. Fine structural aspects of vascular invasion of the tibial epiphyseal plate of growing rats[J]. *Acta Anat (Basel)*, 1968,69(1):1-17.
- [66] Anderson C E, Parker J. Invasion and resorption in enchondral ossification. An electron microscopic study[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1966,48(5):899-914.
- [67] Ehrlich M G, Houle P A, Vigliani G, et al. Correlation between articular cartilage collagenase activity and osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 1978,21(7):761-766.
- [68] Su W, Liu G, Liu X, et al. Angiogenesis stimulated by elevated PDGF-BB in subchondral bone contributes to osteoarthritis development[J]. *JCI Insight*, 2020,5(8).

- [69] Xie H, Cui Z, Wang L, et al. PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis[J]. *Nat Med*, 2014,20(11):1270-1278.

## 致谢

### (Acknowledgements)

时光如逝，转眼之间已到硕士研究生毕业之际，不知不觉中我已经在新疆在石河子度过了8年的时光，提笔想向这三年来帮助过我的人表达感谢时，心中有千言万语，手中却不知从何说起。

在研究生三年中认识了许多优秀的老师，学到了很多知识。三年中我跟着老师上门诊、查房、手术、做实验、写论文，不知不觉中我感觉自己变化很大，我知道是王老师的对待病人和蔼可亲的样子影响了我，是王老师对待科研严谨的态度影响了我，我很庆幸能成为王维山教授的学生，感谢王维山教授这三年来对我的帮助和指导。

其次我要感谢史晨辉教授、李刚主任、孙建华主任、董金波主任、李江华主任、张振东老师、李晶老师以及骨科中心的各位老师临床工作中对我的指导和帮助，也非常感谢我的几位同门师兄弟，谢谢你们在生活、工作和实验中对我的帮助。

我还要感谢我的父母，在这三年中你们是我最大的依靠，感谢你们这三年对我的支持和理解，是你们不懈的鼓励、无私的帮助我才能顺利完成学业，我的这份成功有你们很大一份。

最后，感谢答辩委员会的各位专家教授。

## 作者简介

王梦雨，男性，生于 1994 年 9 月，籍贯河南省。2018 年毕业于川石河子大学医学院临床医学专业，获医学学士学位。2018 年 9 月就读于石河子大学医学院硕士研究生，外科学专业硕士。

### 在学期间主要参与的研究项目

完成《PDGF-BB 基因多态性与新疆地区不同民族人群骨关节炎易感相关性研究》的实验研究工作。

### 在学期间发表的文章


《PDGF-BB 基因多态性与新疆地区不同民族人群骨关/节炎易感相关性研究》 已录用  
《一种在髌骨脱位手术中的定位辅助装置》实用新型专利已通过

### 获奖情况：

无

## 石河子大学硕士研究生学位论文

## 导师评阅表

研究生姓名	王梦雨	学制	3
专业	外科学	研究方向	骨外科疾病
<p>学术评语:</p> <p>骨关节炎(OA)是一种渐进性退行性关节病变,主要表现为关节软骨的破坏。关节软骨的结构及功能的完整性依赖于软骨细胞合成代谢和分解代谢之间的动态平衡。尽管人们对OA的发生发展机制的研究取得了显著进展。然而,目前还没有疾病针对性的有效治疗方法。越来越多的研究表明PDGF-BB在OA的发展过程中起着重要的作用,王梦雨同学通过收集新疆地区汉族和维吾尔族人群的外周血,提取DNA,进行扩增酶切等试验方法,探讨了PDGF-BB基因多样性与新疆地区汉族、维吾尔族OA的关系。为OA的防治提供新的方法。</p> <p>论文结构完整,思维逻辑严密,通过各种基础研究方法分析了PDGF-BB基因多样性与新疆地区汉族、维吾尔族OA的相关性从而影响OA的发展。</p>			
<p>指导教师签字: </p> <p>2021年5月26日</p>			