

• 矿化组织学研究 •

基质金属蛋白酶-9 对出生后小鼠骨发育和骨改建的作用研究

柴纪华 栗钰晴 袁国华 张玉峰*

(口腔基础医学省部共建国家重点实验室培育基地和口腔生物医学教育部重点实验室,
武汉大学口腔医学院 湖北 武汉 430079)

[摘要] 目的:本研究旨在探讨基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)在出生后小鼠股骨与颅面骨发育与改建过程中的作用。方法:使用 X 射线投射技术、Micro-CT 扫描及三维成像技术、组织学染色技术,对比分析 MMP-9 基因敲除(MMP-9^{-/-})小鼠与野生型小鼠在不同发育阶段骨组织的特征。结果:较之野生型小鼠, MMP-9^{-/-}小鼠的股骨骨小梁厚度明显低于野生型小鼠。12 周 MMP-9^{-/-}小鼠的骨髓腔中存在大量脂肪细胞。MMP-9^{-/-}小鼠颅面骨矿化程度低于野生型小鼠。结论:MMP-9 基因缺失抑制了小鼠股骨与颅面骨的发育与改建,提示 MMP-9 在骨发育与骨稳态过程中发挥重要作用。

[关键词] 基质金属蛋白酶-9 股骨 颅面骨 发育与改建

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2019)07—0708—04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.07.021

Effects of Matrix Metalloproteinase-9 on Bone Development and Remodeling of Postnatal Mice. CHAI Jihua, LI Yuying, YUAN Guohua, ZHANG Yufeng*. The State Key Laboratory Breeding Base of Basic Science of Stomatology (Hubei-Most) & Key Laboratory of Oral Biomedicine Ministry of Education, School & Hospital of Stomatology, Wuhan University, Wuhan 430079, China.

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) on the development and remodeling of femur and craniofacial bone in postnatal mice. **Methods:** X-ray projection, Micro-CT scanning, three-dimensional imaging, and histological staining were used to observe and analyze the characteristics of bone of MMP-9^{-/-} mice with wild-type mice at different developmental stages. **Results:** Compared with the wild-type mice, the femoral trabecular thickness of adult mice was lower than that of wild-type mice. Fat cells were abundant in the bone marrow cavity at 12-week-old MMP-9^{-/-} mice. The degree of skull mineral density in MMP-9^{-/-} mice was lower than that of normal mice. **Conclusion:** MMP-9 gene deletion inhibited the development and remodeling of femoral and craniofacial bones in mice, suggesting that MMP-9 plays an important role in bone development and bone homeostasis.

[Key words] matrix metalloproteinase-9 femur craniofacial bone development and remodeling

骨组织发育分为软骨内成骨和膜内成骨两种方式。膜内成骨见于颅面骨,间充质细胞直接分化为骨细胞,分泌骨基质形成颅面骨。不同于膜内成骨,软骨内成骨见于长骨,间质细胞先分化为软骨细胞,继而软骨细胞被骨细胞代替进行骨发育。

基质金属蛋白酶家族(matrix metalloproteinase family, MMPs)是降解细胞外基质的重要参与者,在生理和病理条件下均发挥重要作用^[1-3]。研究表明,有 4 种基质金属蛋白酶(MMP-2、MMP-9、

MMP-13、MT1-MMP)参与骨骼的发育与改建^[2,4]。MMP-2 缺失导致遗传性多中心骨溶解及颅骨畸形^[5-7]。MMP-13 缺失导致椎骨和四肢骨生长和重塑缺陷^[8-10]。MT1-MMP 缺失影响长骨发育与改建以及膜内成骨过程^[11,12]。

基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)是 MMPs 家族中结构与功能最复杂的成员之一^[13,14]。MMP-9 作为破骨细胞标志性蛋白,在早期小鼠颅骨和四肢骨的破骨细胞中呈高表达^[14-16]。有研究发现 MMP-9 在股骨的早期发育和骨折修复过程中发挥重要作用^[6,17,18]。本研究进一步补充了 MMP-9 对出生后小鼠股骨的发育和改建

作者简介 柴纪华(1992~),女,山东聊城人,硕士在读,主要从事种植学和发育学相关的工作。

*** 通信作者** 张玉峰, E-mail: zyf@whu.edu.cn

的影响,但颅面骨的发育和改建尚未见报道。

本研究通过使用 X 射线投射技术,微型计算机断层扫描(Micro-CT)成像、组织学染色技术,观察分析 MMP-9^{-/-}小鼠与同窝对照小鼠中股骨及颅面骨发育差异,研究 MMP-9 在股骨与颅面部骨发育和改建过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 本实验所使用的动物为 MMP-9 基因敲除小鼠与背景鼠 FVB 小鼠(中国南京大学模式动物研究所),小鼠处理过程严格遵循国际机构条例和武汉大学动物保护委员会规定。利用聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR) 基因分型方法检测、验证野生型和突变小鼠的 MMP-9 基因表达情况。本实验使用同窝对照两种雄性小鼠(WT、MMP-9^{-/-})。鉴定小鼠基因型引物序列:WT: 5'-GTGGGACCATCATAACATCACA-3', 3'-CTCGCGGCAAGTCTTCAGAGTA-5'。MMP-9 mutant: 5'-CTGAATGAACTGCAGGACGA-3', 3'-ATACTTTCTCGGCAGGAGCA-5'。

1.2 主要试剂 多聚甲醛(Fisher Scientific, 美国);乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA, Sigma, 美国);二甲苯(Statlab, 美国);无水乙醇、正丁醇、石蜡(国药集团化学试剂有限公司);伊红染液、苏木精染液(Sigma, 美国)。

1.3 X 射线投射技术 同窝对照雄性小鼠(WT、MMP-9^{-/-})脱颈处死后分离股骨、下颌骨(4、12、24 周,每个时间点 3 只),放置于 4%多聚甲醛固定液固定 24 h 后,进行 X 线摄像,观察分析骨骼情况。

1.4 Micro-CT 成像 同窝对照雄性小鼠(WT、MMP-9^{-/-})脱颈处死后分离颅骨(4、12、24 周,每个时间点 3 只)、股骨(12、24 周,每个时间点 3 只),进行断层扫描并将骨骼进行三维成像分析^[19]。

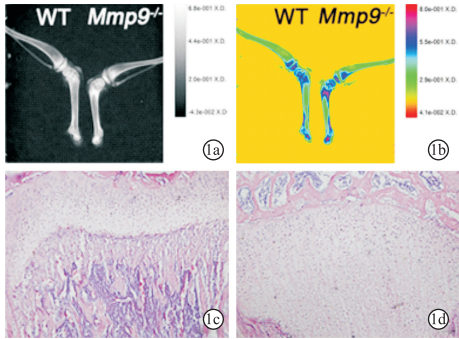
1.5 组织学染色 同窝对照雄性小鼠(WT、MMP-9^{-/-})脱颈处死后分离股骨(4、12、24 周,每个时间点 6 只)4%多聚甲醛固定液固定 24 h 后,使用 EDTA 进行脱钙处理,梯度乙醇脱水,正丁醇透明,石蜡包埋。组织切片机(Leica, 德国)进行组织切片,苏木精-伊红染色,显微数码成像系统(Leica, 德国)获取图像。

1.6 统计学分析 采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。用 GraphPad Prism 7 软件计算与制图,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP-9 基因缺失抑制小鼠股骨的发育与改

建 X 线检查结果显示,4 周时 MMP-9^{-/-}小鼠股骨长度短于野生型小鼠(图 1a,1b)。组织学染色发现 MMP-9^{-/-}小鼠的生长板处软骨层厚度大于野生型小鼠(图 1c,1d)。

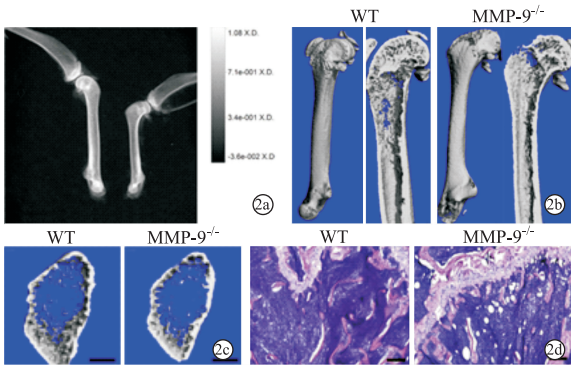


1a:4 周小鼠股骨 X 投射(黑白图片);1b:4 周小鼠股骨 X 投射(彩色图片);1c:野生型小鼠伊红-苏木精染色结果;1d:MMP-9^{-/-}小鼠伊红-苏木精染色结果

图 1 MMP-9 基因缺失影响小鼠股骨发育

Fig. 1 The deletion of MMP-9 gene affects the development of femur in mice.

X 线检查结果显示 12 周时 MMP-9^{-/-}小鼠股骨长度短于野生型小鼠(图 2a),Micro-CT 结果显示 MMP-9^{-/-}小鼠的股骨骨量与野生型小鼠比较差异无统计学意义,但骨小梁厚度明显低于野生型小鼠,MMP-9^{-/-}小鼠骨小梁数目多于野生型小鼠(图 2b,2c)。组织学染色发现 12 周 MMP-9^{-/-}小鼠骨髓腔内含大量空泡样脂肪组织(图 2d)。



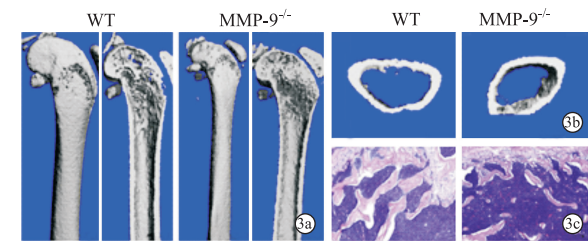
2a:12 周小鼠股骨 X 投射;2b、2c:小鼠股骨 Micro-CT 扫描;2d:苏木精-伊红染色

图 2 MMP-9 基因缺失影响股骨改建

Fig. 2 The deletion of MMP-9 gene affects the remodeling of femur in mice.

Micro-CT 结果显示,24 周时 MMP-9^{-/-}小鼠的股骨骨量低于野生型小鼠,但差异无统计学意义(图 3a、3b、3d),骨小梁厚度明显低于野生型小鼠(图 3e),骨小梁的数量多于野生型小鼠(图 3f),组织学染色发现 24 周 MMP-9^{-/-}小鼠的骨小梁厚度明显少于野生型小鼠,骨小梁的数量多于野生型小鼠(图

3c)。小鼠股骨骨量分析见表 1。



3a、3b：小鼠股骨 Micro-CT 扫描三维重建；3c：苏木精-伊红染色

图 3 MMP-9 基因缺失影响长骨改建

Fig. 3 The deletion of MMP-9 gene affects the remodeling of femur in mice.

表 1 12 周和 24 周小鼠的股骨骨量分析

Tab. 1 Analysis of femur bone mass in mice at 12 weeks and 24 weeks

组别		BV/TV /%	Tb. Th /mm	Tb. N/ 1·mm ⁻¹
WT	12 周	16.47±0.29	0.05±0.01	4.51±0.06
	24 周	12.00±0.58	0.04±0.01	4.20±0.12
MMP-9 ^{-/-}	12 周	15.80±0.42	0.04±0.01	4.70±0.06
	24 周	10.00±0.56	0.03±0.01	4.60±0.06

注：BV/TV：骨量与骨体积比；Tb. Th：骨小梁厚度；Tb. N：骨小梁数量

2.2 MMP-9 基因缺失抑制颅骨的发育与改建

Micro-CT 结果显示 2 周 MMP-9^{-/-}小鼠的颅骨未矿化区域多于野生型小鼠，MMP-9^{-/-}小鼠的颅骨骨量低于野生型小鼠，MMP-9^{-/-}小鼠的颅中缝的宽度大于野生型小鼠(图 4)，MMP-9^{-/-}小鼠颅骨的长度和宽度均小于野生型小鼠(表 2)。12 周和 24 周 MMP-9^{-/-}小鼠颅骨的矿化程度均低于野生型小鼠

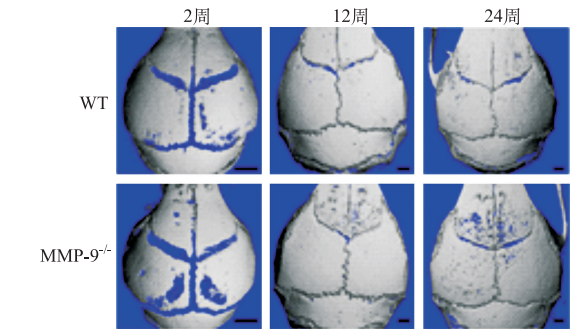


图 4 MMP-9 基因缺失影响了颅骨的发育与改建

Fig. 4 The deletion of MMP-9 gene affects the development and re-modeling of skull bone in mice.

表 2 小鼠颅骨长度和宽度

Tab. 2 Length and width of mice skull bone

组别		2 周	12 周	24 周
WT	长	9.06±0.15	14.18±0.26	12.64±0.09
	宽	8.41±0.08	9.97±0.26	8.83±0.06
MMP-9 ^{-/-}	长	8.40±0.06	13.67±0.42	12.40±0.06
	宽	7.90±0.41	9.57±0.15	8.62±0.04

(图 4)。12 周和 24 周 MMP-9^{-/-}小鼠颅骨长度和宽度与野生型小鼠均无明显差异(表 2)。

2.3 MMP-9 基因缺失抑制小鼠下颌骨发育与改建

X 线结果显示 4 周和 12 周和 24 周 MMP-9^{-/-}小鼠下颌骨密度低于野生型小鼠(图 5、表 3)。

表 3 下颌骨骨密度分析

Tab. 3 Analysis of mandibular bone density in mice

组别	4 周	12 周	24 周
WT	0.060±0.001	0.090±0.001	0.104±0.002
MMP-9 ^{-/-}	0.041±0.001	0.076±0.001	0.083±0.002

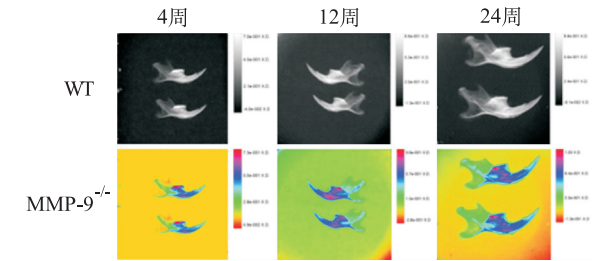


图 5 MMP-9 基因缺失影响了小鼠下颌骨发育与改建 (* P<0.05, ** P<0.01)

Fig. 5 The deletion of MMP-9 gene affects the development and re-modeling of mandible in mice (* P<0.05, ** P<0.01)

3 讨论

3.1 MMP-9 对出生后小鼠股骨发育和改建的影响在股骨早期发育过程中，MMP-9 参与了生长板肥大软骨区破软骨细胞的诱导及基质的降解，与血管内皮生长因子共同作用调节血管生成^[17,20]。在骨折修复早期阶段，MMP-9 基因缺失导致骨髓祖细胞大多向软骨细胞分化，影响骨折愈合^[18]。在本研究中我们发现第 4 周 MMP-9^{-/-}小鼠的生长板处软骨层厚度大于野生型小鼠。在第 12 周，MMP-9^{-/-}小鼠的生长板区和野生型小鼠无差异，这与先前的研究结果一致^[6,17]。在早期(2~8 周)，MMP-9 基因缺失小鼠的生长板区软骨层的厚度大于野生型小鼠，在成年后其生长板区软骨层恢复正常^[17]，提示 MMP-9 参与生长板肥大软骨区破软骨细胞的诱导及血管入侵并在股骨早期发育过程中发挥重要作用，而在成年后，对生长板区软骨层的影响不明显。

Micro-CT 及组织学结果显示第 12 周和第 24 周 MMP-9^{-/-}小鼠的骨小梁厚度低于野生型小鼠，骨小梁数量多于野生型小鼠，这与之前的研究结果一致^[6]。说明 MMP-9 在股骨改建过程中也发挥着重要作用。组织学染色结果显示 12 周 MMP-9^{-/-}小鼠骨髓腔内含有大量的脂肪细胞样空泡组织，表明

MMP-9 可能参与了骨髓干细胞向成骨细胞和成脂肪细胞向分化的调控。以上结果表明 MMP-9 在股骨改建过程中的作用可能与骨髓干细胞的分化及成骨细胞与破骨细胞的相互作用有关,但需要进一步的研究来证实。

3.2 MMP-9 对颅面骨发育和骨改建的影响 有研究表明,MMP-9 基因在早期小鼠颅骨中表达^[15,21]。但缺乏对 MMP-9 基因缺失对小鼠颅面部骨发育影响的研究。本研究发现在第 2 周时,MMP-9^{-/-}小鼠的颅骨矿化程度、长度和宽度均低于野生型小鼠,MMP-9^{-/-}小鼠的颅中缝宽于野生型小鼠,说明 MMP-9 在小鼠颅骨发育过程中发挥重要作用。

且在第 12 周和第 24 周,MMP-9^{-/-}小鼠颅骨矿化程度仍低于野生型小鼠,说明 MMP-9 在小鼠颅骨改建过程中发挥重要作用。但小鼠颅骨的长度和宽度与野生型小鼠无明显差异,说明 MMP-9 可能在小鼠颅骨早期发育过程中影响颅骨长度与宽度,但未对小鼠颅骨形态产生影响。MMP-9^{-/-}小鼠的下颌骨骨密度低于野生型小鼠,表明 MMP-9 可能在小鼠下颌骨发育和改建过程发挥重要作用。

总之,MMP-9 基因缺失抑制了小鼠股骨与颅面骨的发育与改建,提示 MMP-9 在骨发育与骨改建过程中起重要作用。

参考文献

- [1] Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 38(24):2223-2268.
- [2] Paiva KB, Granjeiro JM. Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 561:74-87.
- [3] Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince [J]. *Nat Rev Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(3):207-214.
- [4] Krane SM, Inada M. Matrix metalloproteinases and bone [J]. *Bone*, 2008, 43(1):7-18.
- [5] Inoue K, Mikuni-Takagaki Y, Oikawa K, et al. A crucial role for matrix metalloproteinase 2 in osteocytic canaliculi formation and bone metabolism [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(44):33814-33824.
- [6] Nyman JS, Lynch CC, Perrien DS, et al. Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(6):1252-1260.
- [7] Mosig RA, Dowling O, DiFeo A, et al. Loss of MMP-2 disrupts skeletal and craniofacial development and results in decreased bone mineralization, joint erosion and defects in osteoblast and osteoclast growth [J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(9):1113-1123.

- [8] Kennedy AM, Inada M, Krane SM, et al. MMP13 mutation causes spondyloepimetaphyseal dysplasia, Missouri type (SEMDMO) [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(10):2832-2842.
- [9] Song C, Li N, Hu X, et al. A de novo variant in MMP13 identified in a patient with dominant metaphyseal anadysplasia [J]. *Eur J Med Genet*, 2018, pii: S1769-7212(18)30150-2.
- [10] Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, et al. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice [J]. *Development*, 2004, 131(23):5883-5895.
- [11] Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, et al. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover [J]. *Cell*, 1999, 99(1):81-92.
- [12] Holmbeck K, Bianco P, Chrysovergis K, et al. MT1-MMP-dependent, apoptotic remodeling of unmineralized cartilage: a critical process in skeletal growth [J]. *J Cell Biol*, 2003, 163(3):661-671.
- [13] Kridel SJ, Chen E, Kotra LP, et al. Substrate hydrolysis by matrix metalloproteinase-9 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(23):20572-20578.
- [14] Vandooren J, Steen PEVD, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013, 48(3):222.
- [15] Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, et al. High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development [J]. *J Cell Biol*, 1994, 124(6):1091-1102.
- [16] Lorenzo JA, Pilbeam CC, Kalinowski JF, et al. Production of both 92- and 72-kDa gelatinases by bone cells [J]. *Matrix*, 1992, 12(4):282.
- [17] Vu TH, Shipley JM, Bergers G, et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes [J]. *Cell*, 1998, 93(3):411-422.
- [18] Colnot C, Thompson Z, Mclau T, et al. Altered fracture repair in the absence of MMP9 [J]. *Development*, 2003, 130(17):4123.
- [19] 徐小淋,杨风雪,戴红卫,等. Micro-CT 活体观察大鼠牙齿移动及复发过程的实验研究[J]. *口腔医学研究*, 2015, 31(12):1193-1196.
- [20] Tete S, Zara S, Zizzari VL, et al. Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinase-9, vascular endothelial growth factor, bone sialoprotein and i-nitric oxide synthase in calvaria vs. iliac crest bone grafts [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2012, 23(11):1254-1260.
- [21] Rice DPC, Kim HJ, Thesleff I. Detection of gelatinase B expression reveals osteoclastic bone resorption as a feature of early calvarial bone development [J]. *Bone*, 1997, 21(6):479-486.