

· 基础研究 ·

降钙素对卵巢切除大鼠股骨骨折愈合的作用

宋亚琪[#], 张柳[△], 骆阳, 田发明, 程潭

(河北联合大学附属医院骨外科, 河北唐山 063000)

摘要:目的 观察降钙素对卵巢切除大鼠股骨骨折愈合的作用。方法 将 3 月龄雌性 SD 大鼠 40 只随机分为假手术组, 卵巢切除组, 对照组和治疗组, 每组 10 只, 除假手术组外, 其余各组大鼠行双侧卵巢切除。4 周后处死假手术组和卵巢切除组大鼠, 测量右股骨骨密度。卵巢切除 4 周后, 对照组和治疗组行右股骨骨折, 分别皮下注射生理盐水和降钙素(16 IU/kg), 隔日 1 次, 于骨折术后 9 周测量右股骨骨密度, 行苏木精-伊红(HE)染色及抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色, 骨形态发生蛋白-2(BMP-2), 血管内皮生长因子(VEGF)免疫组化染色。结果 与假手术组比较, 卵巢切除组大鼠术后 4 周体质量显著增加, 股骨骨密度显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。骨折后 9 周, 治疗组 TRAP 染色阳性细胞积分吸光度值较对照组显著减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。骨折后 9 周, 对照组和治疗组骨折线较模糊, 骨痂体积无差别, 骨小梁排列较有序, 骨密度在两组间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。对照组与治疗组在骨折后 9 周的 BMP-2、VEGF 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 降钙素可以抑制去卵巢大鼠骨折部位破骨细胞活性, 但促进大鼠股骨骨折愈合的作用不明显。

关键词:降钙素; 骨质疏松; 卵巢切除术; 骨折愈合

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.20.026

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)20-2378-03

Effect of calcitonin on femoral fracture healing in ovariectomized rats

Song Yaqi[#], Zhang Liu[△], Luo Yang, Tian Faming, Cheng Tan

(Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To study the effect of calcitonin on femoral fracture healing in ovariectomized rats. **Methods** Female SD rats of 12 weeks old were randomly divided into four groups: sham operation (sham) group ($n=10$), ovariectomized operation (OVX) group ($n=10$), ovariectomy+fracture+saline (control) group ($n=10$), and ovariectomy+fracture+calcitonin (experimental) group ($n=10$). All rats except sham group received bilateral ovariectomy. Right midshaft femur fracture model was established 4 weeks after ovariectomy and fixed with intramedullary pin in control group and experimental group. Calcitonin (16 IU/kg) was injected subcutaneously in the neck once per two days in experimental group, while those in control group was given equal volume of normal saline. Rats in sham group and OVX group were killed 4 weeks after ovariectomy/sham operation for femoral bone mineral density evaluation by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA). Right femurs in control group and experimental group were harvested at the 9th week after fracture. All samples were assessed by CR film, (DEXA) bone mineral density measurement, and then were decalcified for paraffin section and stained with HE staining and TRAP staining, as well as BMP-2 and VEGF immunohistochemical staining. **Results** Compared with sham group, tBMD and mBMD of OVX group were decreased 4 weeks after ovariectomy ($P < 0.05$), and rats in OVX group gained more weight than those in sham group ($P < 0.05$). Integral optic density of positive TRAP staining in experimental group was weaker than that in control group at the 9th week after fracture ($P < 0.05$). At the 9th week after fracture, fracture lines were ambiguous in both control group and experimental group, and there was no difference of callus volume between the two groups. Bone trabeculae arranged orderly, and no significant difference of BMD existed between the two groups ($P > 0.05$). Immunohistochemical staining of BMP-2 and VEGF showed that no significant difference existed between control group and experimental group at the 9th week after fracture ($P > 0.05$). **Conclusion** The results suggested that the obvious inhibition effect of calcitonin on osteoclast cell at fracture site in ovariectomized rat was supported by current study. Treatment of calcitonin could not significantly promote femoral fracture healing in ovariectomized rat.

Key words: calcitonin; osteoporosis; ovariectomy; fracture healing

作为一种抗骨吸收剂, 降钙素通过与破骨细胞上相应的受体进行特异性结合, 进而抑制破骨细胞的功能, 主要用于骨质疏松症的治疗。然而降钙素对骨质疏松继发骨折愈合的作用及其相关机制尚不明确。本研究通过建立卵巢切除大鼠股骨骨折模型, 给予降钙素干预, 观察其对骨质疏松性骨折愈合的作用, 为临床提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)实验动物: SPF 级 3 月龄雌性 SD 大鼠 40 只, 体质量(234±9)g, 购自中国医学科学院动物中心(SCXK 京 2005-0013)。大鼠分笼饲养, 自由活动, 供给标准固体饲料(由河北联合大学动物中心提供), 自由摄食水, 每周称体质量 1 次。光照 12 h, 黑暗 12 h, 定期紫外线消毒预排风, 室温 22 ℃。

作者简介: 宋亚琪(1978~), 主治医师, 硕士, 主要从事骨质疏松和骨关节炎研究工作。 [#] 现工作单位为河北省唐山市人民医院骨科。

[△] 通讯作者, Tel: 13313059881; E-mail: zhliu130@sohu.com。

表 1 术后 4 周假手术组和卵巢切除组大鼠体质量和右股骨骨密度比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	n	体质量(g)		右股骨骨密度(g/cm ²)		
		0 周	4 周	tBMD	mBMD	dBMD
假手术组	10	236±6	284±6	0.198 4±0.010 9	0.210 7±0.006 0	0.195 1±0.039 7
卵巢切除组	10	232±11	316±15*	0.168 3±0.014 7*	0.179 2±0.015 2*	0.177 4±0.024 5

*: $P < 0.05$, 与假手术组比较。

(2)主要试剂与仪器:降钙素(密钙息)购自瑞士诺华制药北京公司,骨形态发生蛋白(BMP-2)、血管内皮生长因子(VEGF)免疫组化试剂盒购自福州迈新公司,氨丙基三乙氧硅烷(APES)黏片剂、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德公司,双能 X 线骨密度测量仪(DEXA)由美国 Norland- XR36 公司生产,计算机放射成像系统由日本 Konic 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 SD 大鼠 40 只,适应性喂养 1 周后随机分为 4 组:假手术组,卵巢切除组,对照组,治疗组,每组各 10 只。除假手术组外,其余各组大鼠行双侧卵巢切除,对照组与治疗组于卵巢切除 4 周后制作骨折模型,采用右股骨中段横行开放骨折,髓内针固定。治疗组采用降钙素颈部皮下注射给药,16 IU/kg,隔日 1 次,对照组给等量生理盐水。

1.2.2 标本处理与采集 假手术组和卵巢切除组于术后 4 周测量体质量后脱颈处死,取右侧股骨测量骨密度,以确认造模是否成功。对照组和治疗组于骨折术后 9 周处死,取右侧股骨即行 CR 摄片观察骨痂的连续性及其愈合情况。拔出股骨标本内克氏针,将股骨全长三等分,分别测量股骨全长(tBMD)、中 1/3 段(mBMD)、远 1/3 段骨密度(dBMD),记录数据。测量骨密度后,经生理盐水冲洗,置 10% 中性甲醛液 4℃ 冰箱保存。24~48 h 后切取股骨中段,经 10% 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)缓冲液(pH=7.4, 4℃)脱钙,隔 5~7 d 更换脱钙液;经过 3~5 周后,经鉴定脱钙完全,脱水,透明,纵向石蜡包埋,5 μm 连续切片。切片行 HE、TRAP 染色及 BMP-2、VEGF 免疫组化染色。

1.2.3 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色 5 μm 大鼠股骨切片脱蜡至水,将切片浸没于 Fast Garnet GBC Base Solution, Sodium Nitrite Solution 和 Naphthol AS-BI Phosphate Solution 混合剂中,37℃ 避光放置 1 h,去离子水冲洗,苏木精复染。100、400 倍显微镜观察,摄像后导入图像分析系统,测量阳性细胞积分吸光度(IOD)。

1.2.4 免疫组织化学染色 切片脱蜡至水,过氧化酶室温孵育 10 min,正常非免疫动物血清室温孵育 10 min,滴加 BMP-2 抗体或 VEGF 抗体于湿盒内 4℃ 过夜,加入生物素标记二抗室温孵育 10 min,链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液室温孵育 10 min,DAB 显色剂显色,自来水冲洗、复染、封固,400 倍显微镜观察,图像分析系统测量阳性细胞 IOD。

1.3 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计软件处理数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 骨质疏松模型的建立 术后 4 周卵巢切除组大鼠体质量显著高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。卵巢切除组大鼠右股骨 tBMD 和 mBMD 显著低于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$);dBMD 较假手术组也降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

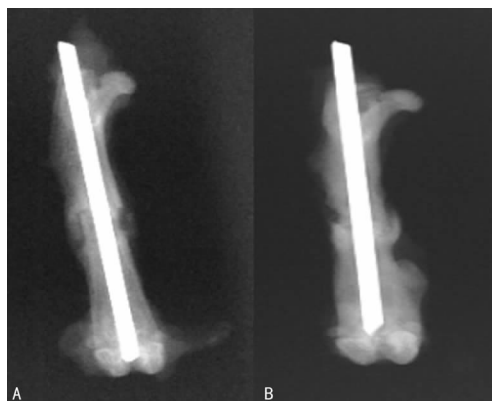
2.2 降钙素治疗对骨折愈合的影响 骨折后 9 周,对照组和治疗组骨折线均较模糊,骨痂体积无差别,见图 1。

2.3 降钙素对骨折大鼠右股骨骨密度的影响 骨折后 9 周,治疗组右股骨骨密度较对照组升高,两组间差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

2.4 降钙素对骨痂组织形态的影响 骨折后 9 周,治疗组与对照组均以骨性骨痂为主,有少量软骨细胞但无“软骨岛”,新生骨小梁互相融合,粗细较均匀,排列紧密,两组间无明显差异,见图 2 a、b。

2.5 骨折后各组 TRAP 表达比较 骨折后 9 周治疗组 TRAP 阳性细胞 IOD 值较对照组弱,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2 c、d,表 2。

2.6 骨折后各组 BMP-2 及 VEGF 的表达比较 骨折后 9 周治疗组 BMP-2、VEGF 阳性细胞积分 IOD 值与对照组比较,无统计学意义差异($P > 0.05$),见图 3。



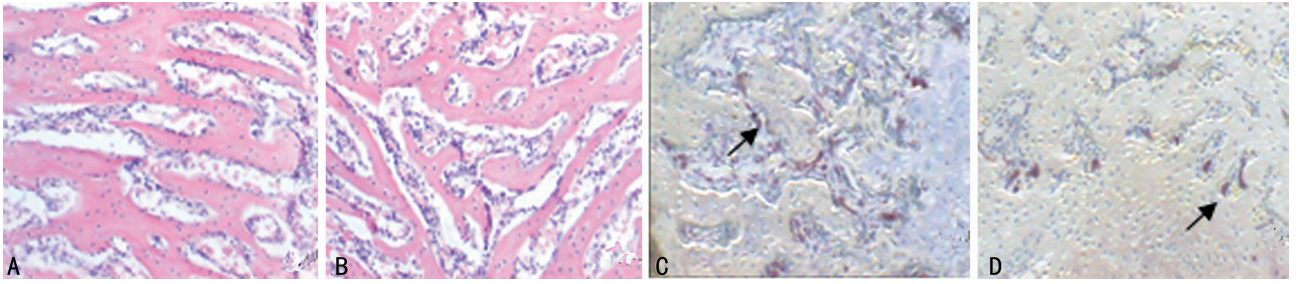
A: 对照组; B: 治疗组。

图 1 对照组和治疗组大鼠股骨标本 CR 摄片

表 2 对照组和治疗组股骨标本骨密度指标及 TRAP 阳性细胞积分 IOD 比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

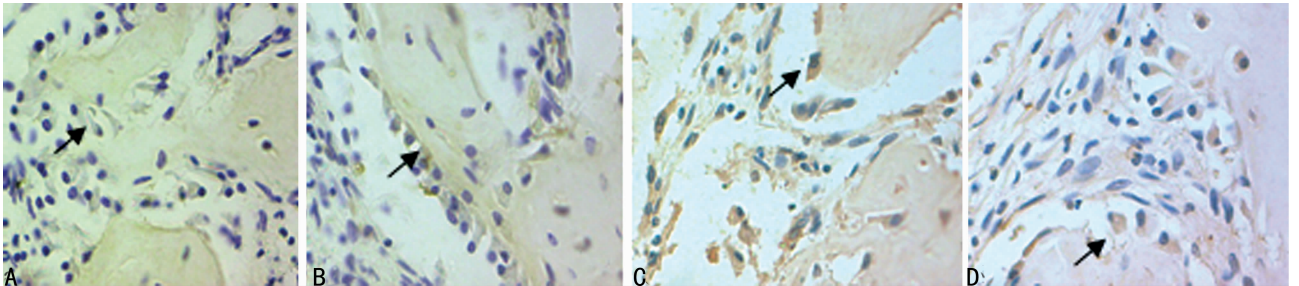
组别	n	右股骨骨密度(g/cm ²)			IOD
		tBMD	mBMD	dBMD	
对照组	10	0.183 6±0.015 5	0.186 9±0.018 9	0.175 3±0.013 1	4.06±0.18
治疗组	10	0.194 5±0.012 8	0.199 1±0.009 2	0.189 8±0.028 4	2.74±0.47*

*: $P < 0.05$, 与对照组比较。



A,C:对照组;B,D:治疗组;A,B:对照组和治疗组 HE 染色图;C,D:对照组和治疗组 TRAP 染色图(箭头:阳性表达)。

图 2 对照组和治疗组骨痂组织形态学及骨痂组织 (TRAP 染色, ×100)



A,C:对照组;B,D:治疗组;箭头:阳性表达;A,B:对照组和治疗组 BMP-2 表达图;C,D:对照组和治疗组 VEGF 表达图。

图 3 对照组和治疗组 BMP-2、VEGF 表达 (免疫组织化学染色, ×400)

3 讨 论

本研究和一些研究均证实,卵巢切除大鼠的骨代谢形式与人类绝经后骨质疏松症相似,可作为研究骨质疏松症可靠的动物模型^[1-4]。作者在前期的研究中发现,降钙素在骨质疏松性骨折愈合的早中期并无明显的促进作用,但随着治疗时间的延长,其可显著增加骨密度^[5]。本研究通过延长降钙素的作用时间,进一步观察其对骨质疏松性骨折愈合的作用。本研究发现,降钙素作用至骨折后 9 周,破骨细胞内的 TRAP 表达减少,证实了降钙素与破骨细胞上的受体结合后活化腺苷酸环化酶蛋白激酶 A 通路及磷脂酶 C 通路,从而抑制破骨细胞的活性,减少骨吸收^[6-7]。

作为 TGF-β 超家族成员,BMP-2 能通过增加或抑制细胞内的某些特异性蛋白的分泌,使成纤维细胞分化为成骨细胞,成肌细胞快速分化为肥大的软骨细胞,并促进基质钙化,在新骨形成和骨折愈合过程中发挥着重要作用^[8-10]。骨痂组织中 BMP-2 水平也可作为观察降钙素作用的指标^[11]。本研究发现,骨折后 9 周对照组和治疗组骨痂中 BMP-2 的表达无显著差异,说明降钙素治疗并不能通过提高骨痂中 BMP-2 的水平促进成骨作用来加速骨折愈合。血管生成在骨折愈合的各个阶段都起着重要的作用,VEGF 可特异作用于血管内皮细胞,促进血管形成,且参与了对其他促血管生成因子的调节。有研究证实 VEGF 可维持成骨细胞寿命促进骨形成^[12-14]。本研究发现,骨折后 9 周与对照组比较,治疗组骨痂中 VEGF 的表达呈增高趋势,两组差异无统计学意义。表明降钙素不能通过显著增加骨痂的血液供应从而促进骨折愈合。

一些临床研究发现,降钙素能加速放射学可见的骨痂形成和成熟,对骨折愈合起积极作用。通过本研究结果说明,在动物实验中尚未发现降钙素对骨质疏松性骨折愈合也具有类似作用,相关研究有待进一步深入。

参考文献:

[1] 郑杰,张柳,韩大成. 辛伐他汀体内给药部分阻止大鼠去

卵巢导致的骨丢失[J]. 中国骨质疏松杂志,2008,14(9): 654-658.
 [2] 穆树林,张柳,李震,等. 仙灵骨葆对卵巢切除大鼠股骨骨折愈合影响的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2009,23(6):690-693.
 [3] Pavlos PL,Theodoros TX,Sofia ET, et al. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research[J]. Comp Med,2008,58(5):424-430.
 [4] Burji T, Shin-ichi K. An immunohistochemical study of the antinociceptive effect of calcitonin in ovariectomized rats[J]. BMC Musculoskelet Disord,2008,9:164.
 [5] 宋亚琪,张柳,骆阳,等. 卵巢切除股骨骨折大鼠骨愈合中降钙素的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011, 15(7):1141-1145.
 [6] Karsdal MA, Tanko LB, Riis BJ, et al. Calcitonin is involved in cartilage homeostasis: is calcitonin a treatment for OA[J]. Osteoarthritis Cartilage,2006,14(7):617-624.
 [7] Mao BY, Barbara EK. Calcitonin induces expression of the inducible cAMP early repressor in osteoclasts[J]. Endocrine,2008,33(3):245-253.
 [8] Gregory JS,Chikashi K,Linda JS, et al. Fibroblast growth factor expression during skeletal fracture healing in mice [J]. Dev Dyn,2009,238(3):766-774.
 [9] Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, et al. Bone morphogenetic proteins:an up date on basic biology and clinical relevance[J]. J Orthop Res,1999,17(2):269-278.
 [10] Gabriel M, Sharmin S, Joseph PS, et al. β-catenin and Bmp-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation[J]. J Cell Biochem,2005,94(2):403-418.
 (下转第 2383 页)

3 讨 论

本研究观察了雄激素 DHT 对人外周血 EPCs 在体外培养过程中增殖能力的影响,实验结果表明在一定的浓度范围内 DHT 可呈浓度依赖性上调 EPCs 的增殖能力,但当浓度达 100 nmol/L 时,这种促进作用有所下降,但仍明显强于对照组。

目前,雄激素对 EPCs 功能的影响仍存在争议,其焦点主要在于雄激素是否能上调 EPCs 的功能^[6-8]。而导致各项研究出现差异的原因,除了与体外干预所选择 EPCs 的时期、雄激素类别有一定关系外,与实验研究所选用的不同对象(如人和鼠)也有一定关系,因为不同生物种类来源的 EPCs 生物学功能可能不完全一致。

本实验主要观察了雄激素 DHT 对早期 EPCs 增殖能力的影响。研究发现,DHT 可上调体外培养 EPCs 的数量,增强其增殖能力,且随 DHT 浓度增加,这种上调作用逐渐增强。然而,并不是像作者预期所期望的高浓度 DHT 产生对 EPCs 影响会更强,而是随着 DHT 浓度增大到 100 nmol/L 时,其上调 EPCs 增殖能力的作用有所下降,但与对照组相比,其上调作用仍十分明显,这表明 DHT 能够上调 EPCs 的增殖能力,但并不是其浓度越高这种作用越明显,而是在一定浓度范围内,这种上调作用呈剂量依赖性。

EPCs 主要存在于骨髓,是内皮细胞的前体细胞,具有增殖、黏附、迁移等功能,可由骨髓释放入外周血,参与新生血管的形成^[9-11]。肿瘤组织在生长过程中,释放大量细胞因子及化学因子,如 VEGF、FGF、TNF 等,他们可诱导 EPCs 由骨髓释放入外周循环参与肿瘤组织周围新生血管的形成^[12-13]。有研究显示,前列腺癌微血管密度与其临床分期、病理分级、疾病进展以及患者的生存密切相关,去势治疗导致雄激素水平降低后前列腺癌组织微血管密度减少^[14-15]。雄激素水平的降低,一方面减少了雄激素对前列腺癌细胞的刺激,使其生长受到抑制;另一方面可能也会导致前列腺癌的新生血管形成减少,从而抑制癌肿的生长。前者已经得到临床的证实,而后者还没有相关研究支持。因此,雄激素是否在促进前列腺癌新生血管形成中发挥作用以及通过何种机制发挥作用是值得进一步研究的。研究明确雄激素对 EPCs 功能的影响及其机制,将为前列腺癌的预防及治疗提供了新的思路。

参考文献:

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.
 [2] 李曾,王德林. 前列腺癌干细胞研究进展[J]. 中国癌症杂志, 2008, 18(8): 634-638.
 [3] Zhang HR, Chen FL, Xu CP, et al. Incorporation of endothelial progenitor cells into the neovasculature of malignant glioma xenograft[J]. Neurooncol, 2009, 93(2): 165-174.

[4] Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization[J]. Genes Dev, 2007, 21(12): 1546-1558.
 [5] Yu J, Akishita M, Eto M, et al. Androgen receptor-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells: role of phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway [J]. Endocrinology, 2010, 151(4): 1822-1828.
 [6] Foresta C, Caretta N, Lana A, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells in hypogonadal men [J]. Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(11): 4599-4602.
 [7] Foresta C, Zuccarello D, De Toni L, et al. Androgens stimulate endothelial progenitor cells through an androgen receptor-mediated pathway [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2008, 68(2): 284-289.
 [8] Fadini GP, Albiero M, Cignarella A, et al. Effects of androgens on endothelial progenitor cells in vitro and in vivo [J]. Clin Sci(Lond), 2009, 117(10): 355-364.
 [9] 赵子鄰,许顶立,郭志刚,等. 内皮祖细胞对心梗后心衰患者心功能改变的影响[J]. 南方医科大学学报: 临床研究版, 2011, 31(3): 504-507.
 [10] Imanishi T, Tsujioka H, Akasaka T. Endothelial progenitor cell senescence--is there a role for estrogen[J]. Ther Adv Cardiovasc Dis, 2010, 4(1): 55-69.
 [11] 涂昌,兰军,杨银广,等. 冠脉介入治疗对不稳定性心绞痛内皮功能及内皮祖细胞的影响[J]. 海南医学院学报, 2012, 18(11): 1529-1536.
 [12] Furuya M, Yonemitsu Y, Aoki I. III. Angiogenesis: complexity of tumor vasculature and microenvironment [J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(16): 1854-1867.
 [13] 徐承平,张华蓉,陈飞兰,等. 内皮祖细胞在胶质瘤新生血管中的募集和整合作用[J]. 重庆医学, 2008, 37(21): 2424-2426.
 [14] Cheng L, Zhang SB, Sweeney CJ, et al. Androgen withdrawal inhibits tumor growth and is associated with decrease in angiogenesis and VEGF expression in androgen-independent CWR22Rv1 human prostate cancer model [J]. Anticancer Res, 2004, 24(4): 2135-2140.
 [15] Hrouda D, Nicol DL, Gardiner RA. The role of angiogenesis in prostate development and the pathogenesis of prostate cancer[J]. Urol Res, 2003, 30(6): 347-355.

(收稿日期:2013-01-18 修回日期:2013-04-21)

(上接第 2380 页)

[11] 张尹娜,王文雅,张柳. 降钙素对骨性关节炎关节软骨的作用[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(11): 1393-1395.
 [12] Bates DO, Hillman NJ, William S, et al. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors[J]. J Anat, 2002, 200(6): 581-597.

[13] John S, Brian L. Vascular endothelial growth factor regulates osteoblast survival evidence for an autocrine feedback mechanism[J]. J Orthop Surg Res, 2009, 4: 19.
 [14] 刘磊. 血管内皮生成因子促进骨折愈合的实验研究[D]. 山东: 山东大学, 2007.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-04-28)