

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.30.020

## 降钙素对骨质疏松性骨折骨痂血管内皮生长因子表达的作用

宋亚琪<sup>1</sup>, 张柳<sup>2△</sup>, 骆阳<sup>2</sup>, 田发明<sup>2</sup>, 程潭<sup>2</sup>

(1. 唐山市人民医院乳腺外科, 河北唐山 063000; 2. 河北联合大学附属医院骨外科, 河北唐山 063000)

**摘要:**目的 观察降钙素对去卵巢大鼠股骨骨折愈合过程中骨痂组织血管内皮生长因子表达的作用。方法 选择 3 月龄雌性 SD 大鼠 80 只, 随机分为假手术组( $n=10$ )、卵巢切除组( $n=10$ )、对照组( $n=30$ )和用药组( $n=30$ )。卵巢切除后 4 周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, 对照组和用药组行右股骨中段骨折, 分别皮下注射生理盐水和降钙素(16 IU/kg), 隔日 1 次, 于骨折后 3、6、9 周处死大鼠取右股骨测骨密度, 行苏木精-伊红染色(HE 染色), 血管内皮生长因子免疫组化染色。结果 与假手术组比较, 卵巢切除组大鼠体重显著增加( $P<0.05$ ), 股骨骨密度显著降低( $P<0.05$ )。HE 染色: 骨折后 3 周, 两组骨折愈合以软骨内成骨过程为主, 骨密度无显著性差异( $P>0.05$ ); 骨折后 6 周, 两组骨小梁排列较有序, 用药组股骨骨密度较对照组升高( $P<0.05$ ); 骨折后 9 周, 两组均以骨性骨痂为主, 骨小梁排列紧密, 骨密度在两组间具有显著性差异( $P<0.05$ )。对照组与用药组在骨折后 3、6、9 周骨痂组织的血管内皮生长因子(VEGF)免疫组化染色结果无显著性差异( $P>0.05$ )。结论 降钙素治疗能增加骨质疏松性骨折骨密度, 对骨痂组织 VEGF 的表达无明显影响。

**关键词:**降钙素; 卵巢切除术; 骨折愈合; 血管内皮生长因子

中图分类号: R318.0

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)30-4040-03

### Effect of calcitonin on vascular endothelial growth factor in osteoporotic fracture callus

Song Yaqi<sup>1</sup>, Zhang Liu<sup>2△</sup>, Luo Yang<sup>2</sup>, Tian Faming<sup>2</sup>, Cheng Tan<sup>2</sup>

(1. Department of Breast Surgery Tangshan People's Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China;

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

**Abstract: Objective** To study the effect of calcitonin on the expression of vascular endothelial growth factor in femoral fracture healing in ovariectomized rats. **Methods** 80 female rats of 3 months old were randomly divided into four groups: Sham operation group(Sham, 10 cases); Ovariectomized operation group(OVX, 10 cases); Ovariectomy + fracture + saline group(Control, 30 cases) and Ovariectomy + fracture + calcitonin group(Experimental, 30 cases). Rats in Sham group and OVX group were performed ovariectomy and killed after 4 weeks, femoral bone mineral density was measured. For rats in Control group and Experimental group, right middle femoral fracture was performed 4 weeks later after ovariectomy. Calcitonin(16 IU/kg) were injected subcutaneously once per 2 days in Experimental group, while those in Control group were given equal volume of normal saline. Rats in these two groups were killed after 3, 6, 9 weeks(10 at a time), femoral bone mineral density(BMD) was measured; hematoxylin-eosin staining and immunohisto-chemical staining were performed at the 3th, 6th and 9th week after fracture, respectively. **Results** Compared with Sham group, rats weight in OVX group gained more( $P<0.05$ ), and BMD in OVX group significantly decreased more( $P<0.05$ ). HE staining, at the 3th week after fracture, endochondral ossification dominated in fracture healing, and no significant difference existed( $P>0.05$ ) in BMD. At the 6th week after fracture, bone trabecula in both groups arranged in order, compared with the control group, BMD in experimental group increased significantly( $P<0.05$ ). At the 9th week after fracture, bone trabecula in both groups arranged closely, BMD in both groups showed significant difference( $P<0.05$ ). There was no significant difference of vascular endothelial growth factor(VEGF) between experimental group and control group at the 3th, 6th, 9th week after fracture( $P>0.05$ ). **Conclusion** The results suggest that calcitonin treatment could enhance the bone mineral density significantly after fracture, but it has no impact on the expression of VEGF in osteoporotic fracture healing.

**Key words:** calcitonin; ovariectomy; fracture healing; vascular endothelial growth factor

骨折愈合是多种细胞参与, 受多种因素调控的复杂过程, 细胞因子在骨折愈合过程中起着十分重要的作用<sup>[1-3]</sup>。卵巢功能低下, 雌激素减少, 使骨吸收-骨形成偶联过程失衡, 即骨吸收作用超过了骨形成作用, 导致骨量减少, 骨脆性增加, 骨质量下降, 骨折愈合延迟。降钙素是一种调节骨代谢的激素类药物, 其主要作用是抑制破骨细胞的活性, 减少骨钙丢失, 从而增加骨骼内的无机盐含量, 提高骨密度, 同时促使血液中的钙离子向骨骼转移, 降低血钙浓度。降钙素作为一种抗骨吸收剂, 主要用于骨质疏松症的治疗, 但降钙素对骨质疏松性骨折愈合的作用尚不明确。本实验旨在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过程中骨痂血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,

VEGF)表达的作用, 为临床提供理论依据。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 模型制备健康 SPF 级 3 月龄雌性 SD 大鼠 80 只, 体质量( $234 \pm 9$ )g, 购自中国医学科学院动物中心(SCXK 京 2005-0013)。适应性喂养 1 周后随机分为 4 组: 假手术组( $n=10$ ), 卵巢切除组( $n=10$ ), 对照组( $n=30$ ), 用药组( $n=30$ )。假手术组采取腰背侧入路进入腹腔, 切除少许脂肪, 其余各组大鼠取相同入路, 行双侧卵巢切除。对照组与用药组于卵巢切除 4 周后制作骨折模型, 取大鼠右大腿中段外侧纵形切口, 长约 2 cm, 暴露股骨干, 在中端 1/3 处锯断成横行骨折, 直径 1.5 mm 的克氏针逆行穿入, 复位后穿入远段髓腔固定。用

药组采用降钙素颈部皮下注射,16 IU/kg,每 2 天 1 次,对照组给等量生理盐水。

1.2 方法

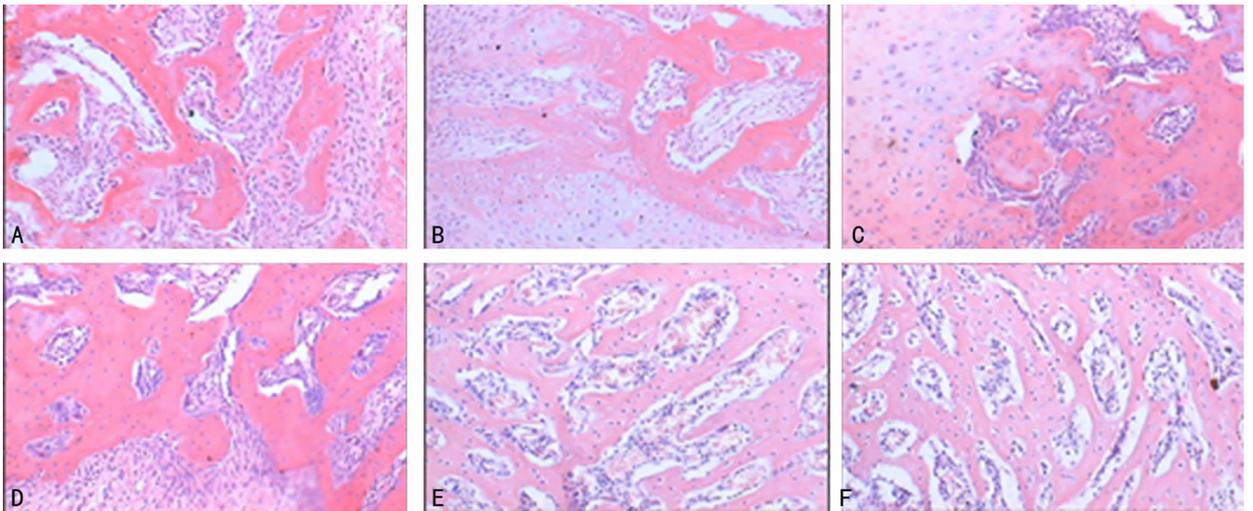
1.2.1 标本采集 假手术组和卵巢切除组于术后 4 周测量体质量后脱颈处死,取右侧股骨测量骨密度,以确认造模是否成功。对照组和用药组于骨折术后 3、6、9 周处死,每组每个观察点处死 10 只,取右侧股骨,将全程三等分,分别测近端 1/3、中端 1/3、远端 1/3 段骨密度。

1.2.2 标本处理 标本经鉴定脱钙完全后,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,纵向石蜡包埋,5 μm 连续切片,行苏木精-伊红(HE)染色及 VEGF 免疫组织化学染色(SD 法)。SP 法:切片脱蜡至水,体积分数 3% 的过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,滴加复消化液,山羊血清封闭非特异性抗原,加 VEGF 兔抗鼠多克隆抗体(1:400),4℃ 孵育过夜。以 PBS 代替一抗为阴性对照。滴加生物素化抗兔二抗(1:400),高敏过氧化氢复合物,DAB 显色,苏木精复染,脱水、透明和封固。镜下观察细胞染成棕黄色为阳性表达。采用高清晰度图像分析系统在 400 倍视野下,随机选取 6 个视野,统计每个视野下平均阳性细胞积分吸光度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS15.0 软件进行处理,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较行单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

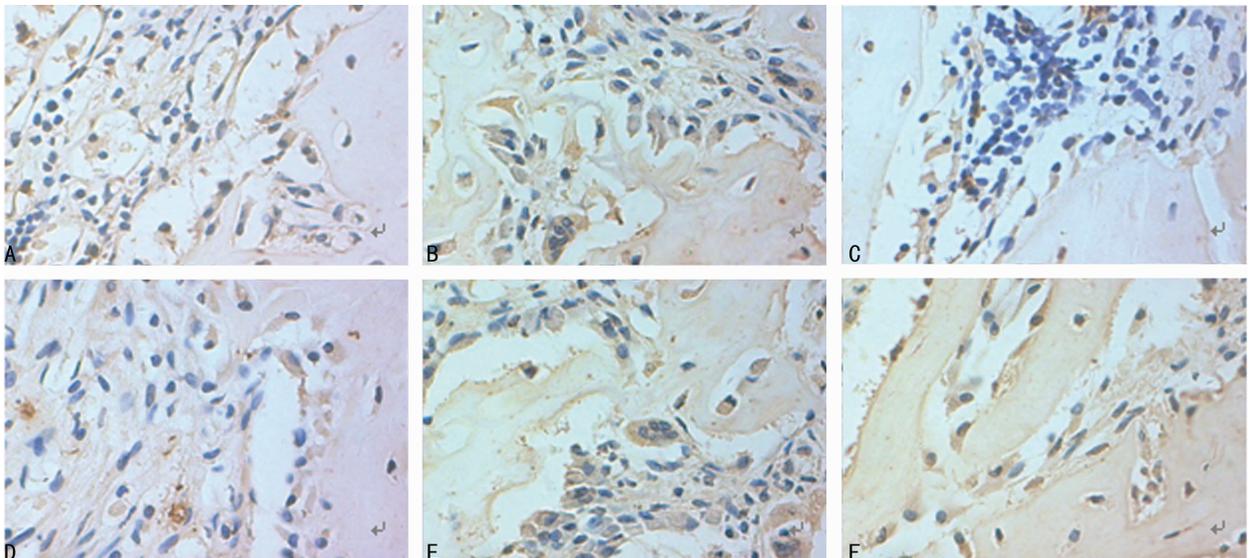
2 结果

2.1 术后变化 体质量术后 4 周,卵巢切除组大鼠体质量显著高于假手术组[(316±15)g vs. (284±6)g,  $P < 0.05$ ]。骨密度术后 4 周,卵巢切除组大鼠右股骨骨密度显著低于假手术组整体骨密度(tBMD)[(0.168 3±0.014 7)g/cm<sup>2</sup> vs. (0.198 4±0.010 9)g/cm<sup>2</sup>,  $P < 0.05$ ],中段骨密度(mBMD)[(0.179 2±0.015 2)g/cm<sup>2</sup> vs. (0.210 7±0.006 0)g/cm<sup>2</sup>,  $P < 0.05$ ]。骨折后 3 周,用药组骨密度较对照组有升高趋势,差异无统计学意义 tBMD[(0.185 5±0.012 4)g/cm<sup>2</sup> vs. (0.170 2±0.009 4)g/cm<sup>2</sup>,  $P > 0.05$ ]。骨折后 6 周,用药组骨密度较对照组显著升高 tBMD[(0.193 2±0.008 1)g/cm<sup>2</sup> vs. (0.169 4±0.010 2)g/cm<sup>2</sup>,  $P < 0.05$ ],mBMD[(0.211 6±0.021 4)g/cm<sup>2</sup> vs. (0.171 9±0.015 7)g/cm<sup>2</sup>,  $P < 0.05$ ]。骨折后 9 周,用药组骨密度较对照组升高,差异具有统计学意义 tBMD[(0.180 2±0.007 0)g/cm<sup>2</sup> vs. (0.150 8±0.019 1)g/cm<sup>2</sup>,  $P < 0.05$ ],mBMD[(0.192 8±0.004 8)g/cm<sup>2</sup> vs. (0.173 3±0.011 0)g/cm<sup>2</sup>,  $P < 0.05$ ]。



A: 骨折后 3 周对照组; B: 骨折后 3 周用药组; C: 骨折后 6 周对照组; D: 骨折后 6 周用药组; E: 骨折后 9 周对照组; F: 骨折后 9 周用药组。

图 1 对照组和用药组骨痂组织形态学观察(HE 染色, ×100)



A: 骨折后 3 周对照组; B: 骨折后 3 周用药组; C: 骨折后 6 周对照组; D: 骨折后 6 周用药组; E: 骨折后 9 周对照组; F: 骨折后 9 周用药组。

图 2 对照组和用药组骨痂组织 VEGF 表达(SP 染色, ×400)

**2.2 组织学表现** 骨折后 3 周, 用药组与对照组均以软骨性骨痂为主, 骨小梁松散, 部分边缘骨吸收活跃。骨折后 6 周, 新生骨小梁较前增粗, 排列较紧密, 两组间无明显差异。骨折后 9 周, 用药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 1。

**2.3 VEGF 的表达** VEGF 主要表达在成骨细胞质及少量成熟软骨细胞内, 以细胞膜、细胞浆呈棕黄色或棕黑色反应为阳性, 见图 2。对照组在骨折后 3、6、9 周的 VEGF 阳性细胞积分吸光度值分别为  $2.8186 \pm 0.1569$ 、 $3.0784 \pm 0.4329$ 、 $2.9278 \pm 0.1340$ , 用药组在骨折后 3、6、9 周的 VEGF 阳性细胞积分吸光度值分别为  $2.9841 \pm 0.6171$ 、 $3.2137 \pm 0.2884$ 、 $3.1025 \pm 0.2545$ , 两组各观测点的表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

骨质疏松性骨折, 一般分为软骨内成骨和膜内成骨两种愈合方式, 以前者为主。此类骨折愈合过程缓慢, 新生胶原形成不足, 骨小梁排列疏松, 矿化相对较少, 新骨形成及骨痂成熟延迟, 骨折愈合质量下降, 再骨折发生风险较大<sup>[4]</sup>。因此, 治疗骨折本身的同时, 积极治疗骨质疏松症是必不可少的。降钙素是临床常用的抗骨质疏松药物, 通过与破骨细胞上的受体结合, 活化腺苷酸环化酶蛋白激酶 A 通路及磷脂酶 C 通路, 抑制破骨细胞活性。研究发现降钙素可促进成骨细胞增殖, 增加成骨细胞活性, 促进软骨细胞的碱性磷酸酶的活性和对钙 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 的摄取, 增加骨基质合成<sup>[5]</sup>。由此可以推断降钙素应用在到骨质疏松性骨折的治疗中, 可能起促进作用。从本实验的结果来看, 骨折后 3 周, 用药组和对照组大鼠骨密度无显著性差异; 随着降钙素作用时间的延长, 大鼠骨密度较对照组显著增加, 表明降钙素增加骨密度的作用与时间具有协同作用, 即随时间增长降钙素作用渐增强。

骨折端丰富的血液供应对骨折愈合过程起着重要作用。VEGF 是从牛垂体星状细胞体外培养分离出的一种糖蛋白, 是最有力的血管生成因子。通过与血管内皮上的特异性受体结合, 促进内皮增殖、诱导血管生成, 改善血管通透性<sup>[6-7]</sup>。研究表明 VEGF 在骨折愈合过程中, 骨折端血管生成过程中发挥了重要作用, 并借此影响血管再生的各个环节<sup>[8-11]</sup>。钟刚等<sup>[12]</sup>通过基因转染技术证实 VEGF 可促进骺板形成过程中血管渗入, 加速软骨内成骨进而促进骨折愈合。本实验通过免疫组织化学染色, 检测骨痂组织 VEGF 含量, 评估降钙素是否通过该途径促进骨折愈合过程。结果表明, VEGF 表达贯穿骨折愈合各个时期, 用药组和对照组间无明显差异。VEGF 在骨折后 6 周的表达最强, 可能与该阶段各种内皮细胞、成纤维细胞、成骨细胞等活跃, 功能旺盛有关, VEGF 呈高表达, 有利于加速骨形成, 促进骨折愈合。骨折后 9 周, VEGF 在破骨细胞呈阳性表达, 说明其参与了骨痂塑形过程, 具体作用及机制尚不清楚。Farhadi 等<sup>[13]</sup>认为骨折处缺氧和 VEGF 的高表达, 促进了局部内皮细胞分泌骨形成蛋白 (BMP-2), 加速骨折愈合, 提示 VEGF 通过 BMPs 介导发挥成骨作用。进一步研究发现, 碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF), 对未分化间充质细胞的 VEGF 表达具有强诱导能力<sup>[14]</sup>。说明 VEGF 等骨生长因子互相作用, 有序的调控着骨折愈合过程。

本实验表明, 降钙素能增加骨质疏松性骨折骨痂的骨密度, 对 VEGF 表达过程无明显影响。可通过检测骨生长因子

BMP-2、bFGF 等指标, 并完善检测方法, 来进一步探究降钙素对骨质疏松性骨折作用的机制。

### 参考文献:

- [1] Li BC, Zhang JJ, Xu C, et al. Treatment of rabbit femoral defect by firearm with BMP-4 gene combined with TGF-beta1[J]. J Trauma, 2009, 66(2): 450-456.
- [2] Kawasaki T, Niki Y, Miyamoto T, et al. The effect of timing in the administration of hepatocyte growth factor to modulate BMP-2-induced osteoblast differentiation[J]. Biomaterials, 2010, 31(6): 1191-1198.
- [3] 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.
- [4] 黄公怡. 骨质疏松性骨折及其临床特点[J]. 中华骨科杂志, 2008, 28(1): 74-77.
- [5] 赵中涛, 刘强, 吴斗. 鲑鱼降钙素对体外培养鼠成骨细胞增殖及 IGF-I 表达的影响[J]. 中国医疗前沿, 2011, 6(6): 39-41.
- [6] Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, et al. Fracture vascularity and bone healing; a systematic review of the role of VEGF[J]. Injury, 2008, 39(suppl 2): S45-S57.
- [7] Uchida S, Sakai A, Kudo H, et al. Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats[J]. Bone, 2003, 32(5): 491-501.
- [8] Serruys PW, De Jaegere P, Kiemeneij F, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group[J]. N Engl J Med, 1994, 331(8): 489-495.
- [9] 刘杰, 孙正义, 曹蕾. 血管内皮生长因子对生物衍生骨复合骨髓基质细胞体内成骨的影响[J]. 中国临床康复, 2003, 7(11): 1622-1623.
- [10] Sarahrudi K, Thomas A, Braunsteiner T, et al. VEGF serum concentrations in patients with long bone fractures; a comparison between impaired and normal fracture healing[J]. J Orthop Res, 2009, 27(10): 1293-1297.
- [11] Street J, Bao M, Deguzman L, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(15): 9656-9661.
- [12] 钟刚, 裴福兴, 樊瑜波, 等. VEGF 基因转染促进骨折愈合的实验性研究[J]. 中华矫形外科杂志, 2003, 12(8): 604-609.
- [13] Farhadi J, Jaquiere C, Barbero A, et al. Differentiation-dependent up-regulation of BMP-2, TGF-beta1, and VEGF expression by FGF-2 in human bone marrow stromal cells[J]. Plast Reconstr Surg, 2005, 116(5): 1379-1386.
- [14] 张天浩, 董英海. 骨质疏松性骨折愈合过程中的骨重建因子[J]. 临床骨科杂志, 2008, 11(4): 371-374.