

雌激素对实验性骨质疏松症骨折愈合的影响

黄遂柱 赵永强 陈凤苞 李甲振

摘要 目的 研究不同剂量的雌激素对卵巢摘除后发生骨质疏松小鼠股骨骨折愈合的影响。方法 成年 balb/c 小鼠卵巢摘除后 3 个月开始制作右股骨中段闭合骨折模型,同一天开始皮下注射高低两种剂量雌激素,小鼠于折骨后 5、10、15、20、30 天分批处死,采用 X 射线、骨痂称重、骨痂中钙盐沉积率测定、组织学检查、血清生化检测等方法研究雌激素对骨折愈合的影响,并和卵巢摘除组、假手术对照组进行比较。结果 卵巢摘除组骨痂较小,但软骨痂钙化(骨痂成熟)时间未受到明显影响。高剂量雌激素可使软骨痂钙化时间推迟,干扰了骨痂成熟过程;生理剂量的雌激素对骨痂成熟影响较小。结论 雌激素缺乏和补充超生理剂量雌激素均对去势小鼠骨折早期愈合不利,补充生理剂量雌激素对小鼠骨折愈合影响较小。

关键词 雌二醇 卵巢摘除 骨折愈合 骨质疏松

Effects of estrogen on fracture healing of experimental osteoporotic mice

Huang Suizhu, Zhao Yongqiang, Cheng Fengbao, Li Jiazhen

Department of Orthopaedics, Henan Provincial Hospital, Zhengzhou 450003, China

Abstract Objective To investigate the effects of estrogen on fracture healing of ovariectomized mice with serious bone loss. **Methods** Adult balb/c mice underwent fracture of right femurs at middle point three months after ovariectomy and began to receive low and high doses of estrogen. Animals were sacrificed at 5, 10, 15, 20 and 30 days after fracture. X-rays, callus weighing, calcium depositing rate measurement, histological study and serum biochemical examination were used to investigate the effects of estrogen on fracture healing, and to compare with ovariectomized (OVX) group and sham-operated control (SO) group. **Results** The calluses were small in OVX group, but the callus maturity was not affected. High dose of estrogen impaired cartilage callus calcification while low dose of estrogen affected callus formation little. **Conclusion** Estrogen deficiency and super-physiological level of estrogen both interfere with fracture healing of ovariectomized mice. Physiological level of estrogen interferes with fracture healing little in ovariectomized mice.

Key words Estradiol Ovariectomy Fracture healing Osteoporosis

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMO)是老年妇女的多发病,雌激素替代疗法(estrogen replacement therapy, ERT)是防治 PMO、减少骨折发生的有效措施^[1],但雌激素对骨折愈合的影响,有关研究和

报道较少,目前尚未有肯定的结论。钙盐沉积是骨折愈合中的重要过程,是骨折愈合的关键性步骤,采用⁴⁵Ca 标记的方法,可以精确测得不同时期的骨痂中的钙盐沉积值。本研究以 balb/c 纯种小鼠作为去势动物模型,采用拍片、骨痂中钙盐沉积率测定、组织学分析等手段,研究补充不同剂量雌激素对卵巢摘除后已出现明显骨丢失小鼠骨折愈合的影响,为完善 ERT 疗法提

供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与手术:实验采用 balb/c 系小鼠 160 只(河南省实验动物中心提供),月龄 4~5 个月。随机均分为 4 组:假手术组(SO 组)40 只,仅做开腹手术,不摘除卵巢;卵巢摘除组(OVX 组)40 只,低剂量雌激素组(E_1 组)40 只和高剂量雌激素组(E_2 组)40 只,均摘除双侧卵巢。手术方法是:乙醚麻醉下,行无菌操作,采用经腹切口,依次摘除双侧卵巢,术后不用抗生素,动物每周称一次体重。

1.2 给药与折骨:各组动物术后 3 个月开始制作右股骨中段闭合骨折模型(每组各取 6 只动物,留作测定血清雌二醇水平)。方法是:在乙醚麻醉下,用特制的骨折器在小鼠右大腿中部折断股骨,动物折骨后任其自由活动。同一天开始背部皮下注射雌激素, E_1 组给予 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的苯甲酸雌二醇, E_2 组给予 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的苯甲酸雌二醇,SO 组和 OVX 组皮下注射同等剂量的精制茶油,每三天给药一次,每次每公斤体重 4ml(苯甲酸雌二醇和精制茶油为上海第九制药厂生产)。

1.3 骨折处 X 射线摄片(条件:36kV、6.4mAs,投照距离 100cm),在骨折后不同时期动物麻醉后摄片,观察骨折愈合情况。

1.4 钙盐沉积率测定:动物在折骨后的第 5 天、10 天、15 天、20 天和 30 天处死,在处死前 24 小时腹腔内注射同位素 $^{45}\text{CaCl}_2$ 溶液,每只给药量 $1.85 \times 10^7 \text{Bq}/\text{kg}$ (同位素 ^{45}Ca 由中国原子能科学院同位素所提供)。动物处死后立即取出右股骨,置 10% Formalin 溶液中固定 24 小时,取出后仔细剔除附着的软组织,然后在小转子下方 1mm 及髌股关节面上方 1mm 之间截取右股骨中段带骨痂的标本,吸水纸吸干表面水份后称标本湿重,然后放入容量 20 毫升的闪烁杯中,每只标本加入 60% HClO_4 0.1ml, 30% H_2O_2 0.2ml,置 80℃ 水浴锅中恒温 1.5 小

时消化完全后,再加入 bu-PBD 闪烁液(500 毫升二甲苯中加入 bu-PBD5 克)6ml,乙二醇乙醚 5ml,摇匀后,在 Beckman LS5801 型液闪计数器上测定标本中 ^{45}Ca 的放射性(用 cpm 值表示)。

1.5 组织学检查:每组每批取 2 个骨痂标本,5% 甲酸甲醛脱钙后,常规石蜡包埋、切片,HE 染色后进行光镜观察,了解骨痂成熟的过程。

1.6 血清雌二醇水平测定:动物在处理前采眼眶血,分离出血清,用天津德普公司提供的雌激素放免测定药盒,测定血清雌二醇水平。

1.7 统计学处理:数据均以均数 $\pm$ 标准差表示,差异性判断通过组间 t 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 一般资料:160 只小鼠在实验过程中有 2 例死亡(SO 组和 E_2 组各 1 只),6 只因骨折处错位明显而剔除,骨折部位均位于股骨中 1/3 处,各组除处理因素外,可比条件相同。

2.2 放射学检查结果:骨折后 5 天均未见骨痂显像,10 天时 OVX 组可见少量骨痂显影, E_2 组几乎无骨痂显像,SO 组和 E_1 组骨痂量也较少。15 天时各组均可见明显骨痂,但 E_2 组骨痂密度较低。20 天和 30 天时各组骨痂均可见较高密度影,但 E_2 组骨痂最大,OVX 组骨痂最小,SO 组和 E_1 组骨痂量比较接近。

2.3 骨痂重量的变化(见表 1): E_2 组骨痂重量在骨折后 20 天达到最大值,其余各组骨痂重量 15 天达最大值然后逐渐下降。除骨折后 15 天 SO 组骨痂重量大于 E_2 组外,余各组不同时期骨痂重量无显著性差异($P > 0.05$)。

2.4 骨痂中钙盐沉积量的测量(见表 2):以骨痂同位素 ^{45}Ca 的放射活性高低(cpm 值)作为评价骨折局部钙盐沉积量(24 小时内)多少的指标,并以骨痂重量纠正后得出单位重量骨痂中的钙盐沉积量进行统计分析。

表 1 骨折后不同时期各组小鼠的骨痂重量(mg, $\bar{x} \pm s$)

动物组别	折骨后的天数				
	5	10	15	20	30
SO	20.1±1.0	71.6±7.0	81.2±7.2	75.6±11.6	68.8±8.4
OVX	20.5±1.5	66.3±7.3	78.7±7.4	72.6±6.0	64.5±8.1
E ₁	20.3±1.2	69.2±4.7	69.2±4.7	75.1±7.0	69.7±6.7
E ₂	20.9±0.7	67.1±10.3	69.4±7.2*	77.7±8.3	70.44±7.7

注:与SO组比较 * $P<0.05$

表 2 各组小鼠折骨后不同时期骨折局部的钙盐沉积量($\bar{x} \pm s$)

动物分组	折骨后的天数				
	5	10	15	20	30
SO组	529.48±67.16	1204.24±173.09	2591.12±296.02	2344.13±255.94	1895.42±191.10
OVX组	629.06±78.63	1020.22±151.92	2229.14±275.27*	1961.05±237.48*	1445.78±108.82**
E ₁ 组	560.1±74.20	1144.03±140.85	2642.94±217.46	2308.97±155.11	1923.85±147.91
E ₂ 组	537.07±69.68	896.44±193.09*	2039.78±155.38**	2752.10±276.14*	1955.52±305.18

注:与SO组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.5 组织学检查结果:骨折后第5天骨折处以血肿为主,两端有纤维成分和岛状软骨,细胞增生活跃。10天时软骨成分及破骨细胞数量增多,OVX组软骨及软骨内骨化较SO组、E₂组稍多。15天时,OVX组可见软骨内骨化明显增多,而E₂组仍以软骨为主。20天时,E₂组也见大量软骨内骨化,其它组骨痂进一步成熟。30天时,各组骨痂均较成熟,但OVX组骨小梁较细,间隙较大,可见小梁中断破坏,呈疏松化表现。

2.6 血清雌二醇水平测定:OVX组小鼠血清雌二醇水平显著低于SO组($P<0.05$),E₁组小鼠血清雌二醇水平接近SO组,E₂组小鼠雌二醇水平显著高于SO组($P<0.01$)。

表 3 小鼠卵巢摘除后及补充雌激素后血清雌二醇水平的变化($\bar{x} \pm s$)

动物分组	样本数	血清雌二醇水平($\mu\text{g/ml}$)
SO	6	52.93±28.97
OVX	6	7.93±3.15*
E ₁	6	91.34±21.69
E ₂	6	532.54±256.60**

注:与SO组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3 讨论

实验结果表明,正常小鼠股骨骨折后第5天局部主要是血肿和机化组织,10~15天以纤维和软骨为主,20~30天则为软骨和骨性连

结。骨痂重量在骨折后15天(E₂组为20天)达到最大值,同骨痂中钙盐沉积量的峰值同期出现,可能和钙盐大量沉积前骨痂中的软骨细胞大量增殖有关^[3]。OVX组的钙盐沉积量峰值显著低于SO组($P<0.05$);E₁组钙盐沉积量的变化同SO组,钙盐沉积量峰值两组间无显著差异($P>0.05$);E₂组钙盐沉积量峰值推迟至骨折后20天才出现。

Bruce和Boden发现兔骨折愈合早期骨痂中雌激素受体浓度呈现有意义的增加,他认为雌激素对骨折愈合中的钙盐沉积有促进作用^[3]。但本研究却发现高剂量雌激素使小鼠骨折愈合中的钙盐沉积量峰值推迟出现,组织学检查发现骨痂成熟推迟,从而对早期骨折愈合不利。有资料表明,骨折早期局部血肿及无菌性炎症反应对骨折有利^[4]。临床上有刺激局部炎症反应而加速骨折愈合的例子,也有减轻局部炎症反应导致骨折愈合延迟的报道^[5]。超生理剂量雌激素对机体的细胞和体液免疫均有抑制作用^[6]。雌激素能降低骨组织中PGE₂浓度^[7]。因此,高剂量的雌激素很可能通过减轻局部炎症反应而妨碍骨折的愈合。值得注意的是,虽然E₂组钙盐沉积量峰值推迟出现,但其量却大于SO组($P<0.05$)。因此,雌激素促进骨折愈合中的钙盐沉积,主要表现在量上,而不是表现在

时间上。

对于卵巢摘除组,虽然钙盐沉积的峰值和SO组相一致,但骨折后各期(骨折后5天除外)钙盐沉积量均低于SO组,而且骨折后30天也可见骨痂骨小梁疏松,并且可见小梁中断、游离,说明低雌激素状态对骨折愈合不利,其原因除了雌激素水平降低外,也和卵巢摘除后的钙磷代谢紊乱有关。另外说明在骨折愈合过程中,骨痂的形成和重建与生理状态下的骨重建过程相似,卵巢摘除后骨转换加快,成骨活动和破骨活动均加强,但破骨活动超过成骨活动,从而造成了骨质丢失^[8]。在补充接近生理剂量雌激素的E₂组,钙盐沉积的峰值和SO组相一致,而且各期的钙盐沉积值和SO组相比无显著性差异。说明补充生理剂量的雌激素,能够使其骨折愈合中钙盐沉积过程恢复正常。因此,绝经后骨质疏松患者骨折愈合变慢除受老龄的影响外,还可能和低雌激素状态引起的钙磷代谢紊乱有关。

从本实验的结果看,补充高剂量雌激素和卵巢摘除后的低雌激素状态均妨碍骨折愈合,这种影响主要表现在骨折愈合的早期,至于它

们对晚期骨痂塑形的影响还有待于进一步研究。尤其是在分子水平上进一步探索雌激素在骨折愈合中的作用机制,将成为今后研究的重要课题,而这一工作的开展必将带动雌激素和骨代谢关系研究的深入,为绝经后骨质疏松症骨折预防和治疗提供理论依据。

参 考 文 献

- 1 Lindsay RB. Hormone replacement therapy for prevention and treatment of osteoporosis. *Am J Med*, 1993, 95: 375.
- 2 陈其昕,袁中兴,刘清等. 骨折愈合中修复性细胞增殖与骨形成的关系. *中华骨科杂志*, 1992, 12(4): 290.
- 3 Bruce AM, Frederick SK, Michael DF, et al. Estrogen receptors in fracture healing. *Clin Orthop*, 1992, 280: 277.
- 4 Gramdnes O, Keikeras O. The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand*, 1993, 64: 350.
- 5 谢旭明,沈伯祥,王江. 骨折愈合刺激素的临床疗效与观察. *中华外科杂志*, 1993, 21: 585.
- 6 刘村兰,匡彦德,何球藻. 雌二醇对大鼠细胞免疫功能的影响. *中国免疫学杂志*, 1992, 8: 95.
- 7 Feyen JHM and Rause LG. Prostaglandin production by calvaria from sham operated and oophorectomized rats: effect of 17 β -estradiol *in vivo*. *Endocrinology*, 1987, 121: 819.
- 8 Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991, 15: 175.

(上接第25页)

体的生理受力方向基本相似,以及测试方法简单(图7A)。与拉伸试验相比,压力测试结果会受骨与外力之间相对挤压所产生的“终端”效应的影响。如骨样本的上下面受力与压力装置平面不平行,会导致应力集中在骨样本的某个局部,从而减小了整体的应力和弹性模量。同样,如施加的压力与骨正常受力方向不一致,也会导致较小的应力和弹性模量。如制备具有二个绝对平行界面的样本有困难,可采用特制的自动调节平板来减少压力试验时的应力集中现象(图7B)^[16]。在测定骨松质压力特性时,可采用制备游离或非游离骨松质小样本进行压力试验^[2,3,12-15]。由于在制备游离骨松质样本时破坏了骨小梁的边界结构联接,游离骨松质样本的应力和弹性模量都会小于非游离骨松质的样

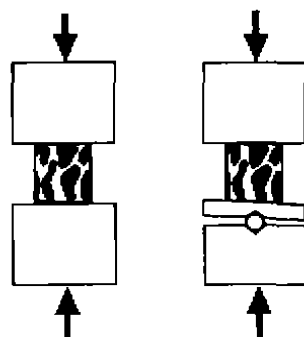


图7B (Turner et al, Bone, 14: 595, 1993)

a: 如所制备的骨松质样本受压力测试

面不平衡,会造成测量误差。

b: 用特别自动调节平板■可获得均匀的测试结果本。另外近来也采用超微力学测试刻压技术(Nano-indentation),对包埋后的骨密质、骨松质、甚至单个骨小梁进行局剖点状刻压测试^[23]。