

• 论著 •

基因重组人生长激素(r-hGH)对骨质疏松性骨折愈合影响的实验研究

郝永强 戴克戎 郭礼和 王以进 汤亭亭

摘要 目的 观察基因重组人生长激素(r-hGH)对骨质疏松性骨折愈合的作用及影响,以期为骨质疏松性骨折提供一种有效的治疗方法。方法 选择8月龄、雌性、SD大鼠36只,随机分为治疗组与对照组,每组各18只。手术方法建立骨质疏松性骨折实验模型后,治疗组动物每只每天皮下注射基因重组人生长激素(r-hGH)2.7 mg/kg,连续10天;对照组同法给予等量生理盐水。分别于用药后2、4、8周检测血浆IGF-1浓度,并进行骨痂组织骨密度(BMD)测定、骨痂组织力学强度测试等。结果 血浆IGF-1浓度:2周时,治疗组血浆IGF-1浓度值较对照组明显增高($P < 0.005$),4~8周时,两组血浆IGF-1浓度值水平相近($P < 0.5$ 或 $P > 0.5$);骨痂组织BMD:4周时治疗组较对照组高($P < 0.2$),8周时却较对照组低($P < 0.001$);力学强度测试:4~8周治疗组骨痂组织各扭转力学强度参数均较对照组高,其中最大扭转角在4周时两组间差异显著($P < 0.05$)。结论 外源性基因重组人生长激素(r-hGH)对实验性骨质疏松性骨折愈合有一定的促进作用。

关键词 基因重组人生长激素 骨质疏松性骨折 骨折愈合 大鼠

Effect of recombinant human growth hormone on experimental osteoporotic fracture healing

Hao Yongqiang, Dai Kerong, Guo Lihe, Wang Yijing, Tang Tingting

Department of Orthopaedics, Ninth People's Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai 200011, China

Abstract To observe the effect and influence of recombinant human growth hormone(r-hGH) on osteoporotic fracture healing in the rat, and to expect to provide an effective therapy for osteoporotic fracture. **Method** 36 female 8-month-old SD rats were randomized into two groups of 18 each, the treatment group and the control group. After the experimental model of osteoporotic fracture by operation was established, the treatment group was given r-hGH 2.7 mg/kg body weight/day (1mg-3IU) subcutaneously once a day for consecutive 10 days, whereas the control group was given equivalent saline as placebo. Plasma IGF-I concentration was determined, and bone mineral density (BMD) and biomechanical strength of callus were measured 2, 4, 8 weeks after the treatment. **Results** Plasma IGF-1 concentration in the treatment group was higher than that in the control group ($P < 0.005$) at 2th week

作者单位:200011 上海第二医科大学附属第九人民医院骨科(郝永强、戴克戎、汤亭亭);中国科学院上海细胞生物学研究所(郭礼和);上海科学技术大学生物力学研究室(王以进)

作者简介:郝永强,男,32岁,汉族,安徽省人,博士,主治医师。1992年进入上海中医药大学附属龙华医院骨科,师从施杞教授攻读硕士学位,进行脊柱相关性疾病的临床与实验研究;1995年进入上海第二医科大学附属第九人民医院骨科,师从戴克戎教授攻读博士学位,进行骨质疏松症的研究。1998年毕业于上海第二医科大学附属第九人民医院骨科工作。

and began to decline at 4th week. At 8th week, there was no significant difference between the two groups ($P < 0.5$ or $P' > 0.5$). At 4th week, callus area and BMD in the treatment group were higher than those in the control group, but at 8th week, they were lower and there was significant difference in BMD between the two groups ($P < 0.001$). From 4th to 8th week, biomechanical testing showed that torsional strength of callus in the treatment group was higher than that in the control group at 4th or 8th week, meanwhile the difference of maximum torsional angle between the two groups was significant ($P < 0.005$). **Conclusion** Exogenous recombinant human growth hormone can stimulate osteoporotic fracture healing in the rat.

Key words Recombinant human growth hormone Osteoporotic fracture Fracture healing
Rat

骨质疏松症的主要危害是并发骨折,即骨质疏松性骨折。目前,对骨质疏松性骨折愈合机理及治疗尚缺乏足够的认识,因而临床疗效难以提高,再次骨折发生率高。已有研究显示^[1],生长激素对一般骨折有一定的促进作用;另有研究表明^[2],体内生长激素分泌水平随增龄与雌激素分泌减少而降低,而生长激素降低可导致骨代谢异常^[3],这可能与以往研究中观察到的骨质疏松性骨折修复能力降低有关^[4]。随着现代基因工程技术的发展,规模化生产重组人生长激素并应用于临床已成为可能。为此,我们在对骨质疏松性骨折愈合方式与机理研究的基础上,进一步观察并探讨基因重组人生长激素(r-hGH)对骨质疏松性骨折愈合的作用与影响,以期对骨质疏松性骨折提供一种有效的治疗方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

选择 8 月龄,体重 290~340 g,雌性,SPF 级(无特定病原体动物),SD(Sprague-Dawley)大鼠(由中英合资上海 BK 实验动物中心提供),共 36 只,随机分为治疗组与对照组,每组各 18 只。动物饲养于完全清洁级环境下(上海第二医科大学实验动物中心清洁级动物室),自由进食消毒颗粒饲料(Ca 0.1%,P 0.4%),饮消毒水,室温控制于 $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$,湿度 56%,12 h~12 h 间隔照明,定期紫外线消毒与通风。

1.2 骨质疏松性骨折实验模型的建立

实验动物在氯氨酮(0.1 g/kg)腹腔注射麻醉后,经双侧腰背侧切口进入腹腔,行双侧卵巢切除;术后 3 月,再在氯氨酮麻醉下,建立骨折模型,即手术刀切断股骨中段,行克氏针(直径 1 mm,上海医用缝合针厂,标准号 Q/OYBA-03-1995)髓腔逆行内固定。手术过程均在严格无菌条件下进行,术后动物放至笼中自由活动与进食。

1.3 给药途径与方法

骨折实验模型建立后第 1 天起,治疗组动物每日皮下注射 r-hGH(中国科学院上海细胞研究所提供,4℃冰箱下保存) $2.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (1 mg=3 IU),连续 10 天;对照组给予等量体积生理盐水,分别于给药后 2、4、8 周过量麻醉处死,作以下观察。

1.4 观察项目与方法

(1) 血浆中 IGF-I 检测

分别于给药 2 周、4 周、8 周后,每只动物自心脏采取血标本 3~5 ml,离心后,取上清液(血浆)于 Eppendorf 管中(-20°C 保存待测)。放射免疫化学方法检测血浆浓度[大鼠 IGF-¹²⁵I 放射免疫检测试剂盒(Diagnostic Systems Laboratories, Inc, USA)]。

(2) 骨痂 BMD 测定

每组动物按期处死,取骨折侧股骨,剔除肌肉软组织,取出髓内骨圆针,在 DPX-L 型双能 X 线骨密度仪(Lunar, USA)下行股骨骨痂组织 BMD 测定[能量为 38/70 keV,高压稳定 $\pm 0.05\%$,仪器精密度 1%(附动物骨密度测定软

件)],以骨痂中点为中心,扫描2 cm,图像显示于荧光屏上并自动打印测定结果。测定完毕后,生理盐水湿纱布包敷,塑料袋密封贮存于一20℃冰箱中。

(3)生物力学测试

于一20℃冰箱中取出待测标本,逐级解冻,自然复温后,测厚千分尺(精确度0.01 mm,北京第二量具厂)测量股骨长度与骨痂矢状径、横径并计算相应骨痂面积,然后于骨痂边缘处贴应变片后,生物力学测试仪(上海科技大学生物力学研究室提供)下做股骨扭转强度测试。

1.5 统计学方法

数据均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,显著性检验采用两样本比较的 t 检验,选定 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 血浆 IGF-I 浓度

表1显示,2周时治疗组 IGF-I 浓度与对照组相比明显增高,两组间有显著差异($P < 0.005$);4周时逐渐下降,两者间浓度相近($P < 0.5$),8周时两组各自浓度波动不大($P > 0.5$)。

2.2 骨痂组织 BMD 测定结果

表2显示,4周时治疗组 BMD 值较对照组高,但差异不显著($P < 0.2$),8周时治疗组

BMD 值明显下降($P < 0.005$),对照组即明显上升($P < 0.001$),两者间比较有显著性差异($P < 0.001$)。

表1 不同时间血浆 IGF-I 浓度变化
($\bar{x} \pm s, \text{ng/ml}$)

时间(周)	治疗组	对照组
2	308.87±18.60 [△]	269.07±13.34
4	267.00±24.02	278.12±19.14
8	270.48±17.03	270.48±17.11

注:△两组间相比, $P < 0.005$

表2 骨痂组织 BMD 测定结果($\bar{x} \pm s, \text{g/cm}^2$)

时间(周)	治疗组	对照组
4	0.304±0.01407 [△]	0.283±0.01171
8	0.285±0.12712 ^{△△}	0.335±0.01957

注:△两组间相比, $P < 0.2$,△△两组间相比, $P < 0.001$

2.3 力学测试

表3显示,4周时治疗组骨痂组织截面积明显大于对照组,而8周时治疗组骨痂截面积明显变小,并较对照组低。

表4显示,治疗组4~8周时各力学强度参数均高于对照组,其中最大扭转角在4周时有显著性差异($P < 0.005$)。

表3 两组骨痂组织几何形态变化

时间 (周)	长度(Lmm)		矢状径(Hmm)		横向径(Dmm)		截面积(Smm ²)	
	治疗组	对照组	治疗组	对照组	治疗组	对照组	治疗组	对照组
2	38.43±0.753	38.12±0.713	5.93±0.537	6.13±0.637	7.56±0.754	6.12±0.872	36.35±6.220	37.54±5.725
4	37.35±2.081	38.04±0.730	7.10±0.502	6.65±0.700	8.39±1.200	7.34±0.922	47.09±9.825	39.11±7.421
8	38.15±0.680	39.10±1.245	5.93±0.750	6.56±1.254	7.74±1.726	7.30±1.340	36.63±11.708	42.72±7.000

表4 两组骨痂组织扭转力学强度测试结果分析($\bar{x} \pm s$)

时间 (周)	弹性模量($\text{g} \times \text{cm}^2/\text{deg}$)		最大扭矩($\text{g} \times \text{cm}$)		最大扭转角(deg/cm)	
	对照组	治疗组	对照组	治疗组	对照组	治疗组
4	297.42±7.13	318.66±97.24	2750±83.00	3000±600.00	7.12 [△] ±1.73	12.91±2.06
8	323.86±107.50	383.74±120.19	3150±374.49	3450±376.12	8.43±4.47	8.65±5.36

注:△两组间相比, $P < 0.05$

3 讨论

骨质疏松性骨折与一般性骨折愈合过程相似,除与血液供应及力学因素密切相关外,尚受内分泌激素与细胞生长因子等调节与影响,其中,生长激素起着一定的作用^[3]。生长激素可通过不同的途径与方式作用于骨组织,而IGFs在其中起着重要的传递与介导作用,IGFs既可由生长激素通过作用于肝脏间接产生释放入血液循环中^[23],也可直接作用于成骨细胞与软骨细胞膜上生长激素受体(GH-R)并诱导其产生IGFs且作用于局部^[5]。IGFs作用较为复杂,一方面IGFs可提高成骨细胞对生长激素的反应^[5];另一方面IGFs可调节骨形成与骨吸收作用间的“耦合”(Coupling of Formation to Resorption)^[7]。研究显示^[8],骨吸收时IGF自骨组织中释放出来,作为延迟的旁分泌因子(Delayed paracrine agents)促进成骨细胞的骨形成作用,以产生新骨填充骨吸收腔;同时破骨细胞的IGF产物作为旁分泌因子(Paracrine agents)调节骨吸收部位成骨细胞的数量;而成骨细胞产生的IGF作为自分泌因子(Autocrine agents)决定了骨吸收腔的充填程度。IGFs包括IGF-1、IGF-1, IGF-1型受体、IGF-1型受体,IGF连接蛋白(IGF binding proteins, IGFBPs)与IGFBP蛋白酶(IGFBP proteases),因而其作用也必定受多方面、多水平调节。而生长激素对骨组织的生物学作用主要是通过调节IGF-1^[9]水平起作用的,我们在对实验动物给予外源性r-hGH后发现,血浆IGF-1水平在停止注射后仍维持较高水平($P < 0.002$),这与Hedner^[19]等的实验结果相似,即外源性生长激素促进新骨形成在停止注射后仍有一定的延长作用,血浆IGF-1浓度在停止注射后仍有一定的增加,这一效应也在骨痂组织BMD中得到了体现(治疗组4周BMD值较对照组高($P < 0.2$),但8周后为何治疗组BMD值却较对照组明显降低($P < 0.001$)?我们认为一则是生长激素与IGF-1引致的骨转换增高,二则是外源

性生长激素的补充与相应的IGF-1水平增高,反馈地抑制了内源性生长激素的分泌,且短期的IGF-1水平增高与IGF-BPs^[21]、IGF-IR大量结合,导致体内IGF-BPs与IGF-IR耗竭并短期内难以恢复,使得自身的IGFs调节系统发生紊乱。而生长激素促进了大量骨髓造血细胞(Hemopoietic cells)侵入外骨痂而影响骨痂组织的矿化^[11]也起到一定的作用,Parfitt^[22]认为生长激素主要通过促进骨转换对骨组织起作用,在生长期由于骨转换呈正平衡可使骨量增加,而在绝经后由于骨转换呈负平衡,则导致骨量降低。有学者^[6]则认为骨转换增高本身即可导致骨量的降低,而并非一定是骨量的丢失。结合力学强度测试结果,我们认为骨量变化并非是影响骨痂组织力学强度的唯一因素,可能尚与骨痂组织材料性能和显微结构等有关。

关于生长激素对骨折愈合作用的实验研究与报道较多^[10,13,14],Bue Bak等^[13]通过研究认为补充的外源性生长激素剂量对骨折愈合作用的意义重大,力学测试结果表明,最大剂量组增加力学性能效果最为明显。除剂量因素外,给药频率更应重视,研究表明^[14],雌性大鼠血浆中生长激素基础浓度为10 ng/ml以下,而峰值可达到200~800 ng/ml,其分泌周期为30~60分钟,而在外源性补充生长激素后,血浆中生长激素浓度高于基础水平并可维持6~8小时,这对骨折愈合相当有益。因而,科学而合理的给药频率应当遵循给药个体内源性生长激素的分泌频率与规律,然而,这在具体实施中难度较大(由于存在个体差异,掌握每一个体实际分泌规律相当困难)。而在骨折愈合的不同时期给药,结果也存在差异,有研究表明^[1],生长激素对骨折愈合的促进作用主要在早期(骨折后20天内)。另外,需要指出的是:包括本实验在内的研究中,使用的都是与实验对象非同源的生长激素,因而生长激素间存在的结构差异及免疫源性可能对实验结果产生一定的影响。

参 考 文 献

- 1 Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT. The stimulation ef-

- fect of growth hormone on fracture healing is dependent on onset and duration of administration. *Clin Orthop Relat Res*, 1991, 264: 295-301.
- 2 Maurice FS, Basii GI, Carlos D. Regulation of growth hormone secretion. *Horm Res*, 1996, 46: 149-154.
- 3 Bouillon R. Growth hormone and bone. *Horm Res*, 1991, 36 (Suppl 1): 49-55.
- 4 郝永强, 戴克戎. 实验性骨质疏松性骨折愈合方式的组织学观察. *上海医学*, 1999, (3): 218-220.
- 5 Werten EA, Haynes KM, Barnard R, et al. Visual demonstration of growth hormone receptors on human growth plate Chondrocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990, 70(6): 1725-1731.
- 6 Eriksen EF, Kassem M, Brixen K. Growth hormone and insulin-like growth factors as anabolic therapies for osteoporosis. *Horm Res*, 1993, 40: 93-98.
- 7 Canalis E. Insulin-like growth factors and osteoporosis. *Bone*, 1997, 21(3): 215-216.
- 8 Mohan S, Baylink DJ. Insulin-like growth factor system components and the coupling of bone formation to resorption. *Horm Res*, 1996, 45 (Suppl 1): 59-62.
- 9 Inzucchi SE, Robbins RJ. Effects of growth hormone on human bone biology. *Clin Endocrinol Met*, 1994, 79(3): 691-694.
- 10 Hedner E, Linde A, Nilsson A. Systemically and locally administered growth hormone stimulates bone healing in combination with osteopromotive membranes; an experimental study in rats. *J Bone Miner Res*, 1996, 11(12): 1952-1960.
- 11 Kelley K, Arkins, S Minshall C, et al. Growth hormone, growth factors and hematopoiesis. *Horm Res*, 1996, 45(1-2): 38-45.
- 12 Parfitt A, Commentary M. Growth hormone and adult bone remodeling. *Clin Endocrinol*, 1991, 35: 467-470.
- 13 Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT. Dose response of growth hormone on fracture healing in the rat. *Acta Orthop Scand*, 1990, 61(1): 54-57.
- 14 Clark RG, Carlsson LMS, Robinson ICAF. Growth hormone secretory profiles in conscious female rats. *J Endocrinol*, 1987, 114: 399.