

降钙素对卵巢切除大鼠股骨骨折愈合的影响

张柳 张龙 赵文国 梁春雨

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,为临床上治疗骨质疏松性骨折提供实验依据。**方法** 50 只雌性、14 周龄 SD 大鼠共分成 5 组,每组 10 只。分成假手术组(Sham, G1),双侧卵巢切除术组(OVX, G2),假手术 + 骨折组(Sham + F, G3),卵巢切除术 + 骨折组(OVX + F, G4),卵巢切除 + 骨折 + 降钙素药物组(OVX + F + CT, G5),骨折组大鼠均采用右股骨中段横行骨折,髓内针固定;降钙素采用皮下给药,隔日 1 次($16 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$)。所有大鼠于术后 4 周杀死,取右侧股骨标本。然后,分别进行 CR 摄片、组织形态学观察,并应用双能 X 线骨密度仪(DEXA)测量右股骨整体、远段和中段骨密度以及 BMP-2 免疫组化观察,并应用病理图像分析仪对 BMP-2 免疫组化进行光密度测量。**结果** (1)OVX 组与 Sham 组比较, BMD 显著下降。(2)OVX + F + CT 组与 OVX + F 组比较:骨痂 mBMD 显著增高;BMP-2 的表达无显著性差异。**结论** 降钙素对 OVX 大鼠股骨骨折具有明显促进骨折愈合的作用,加速编织骨向板层骨的演变过程。

关键词: 骨质疏松症; 骨折愈合; 骨密度; 降钙素; 骨形态发生蛋白; 免疫组织化学

Effects of calcitonin on femoral fracture healing in ovariectomized rats ZHANG Liu, ZHANG Long, ZHAO Wenguo, LIANG Chunyu. Department of Orthopedics, the Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China

Abstract: **Objective** To observe and evaluate the effects of Calcitonin on fracture healing process and to provide supportive evidences of experiment for the treatment of osteoporotic fracture clinically. **Methods** Fifty 14-week-old female Sprague-Dawley rats were divided randomly into five groups of ten rats of each. Five types treatment had been operated to the five allocated groups respectively sham-operated group(Sham), bilateral ovariectomized group(OVX), sham-operated and femur fracture group(Sham + F), bilateral ovariectomized and femur fracture group(OVX + F), bilateral ovariectomized and femur fracture and administration of calcitonin group(OVX + F + CT). In groups which fractures needed right femoral diaphysis was fractured transversely at the midshaft and fixed with intramedullary nail. The rats in OVX + F + CT group were treated with calcitonin by subcutaneous injections ($16 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$) once per two days for 4 weeks. All the rats were killed in 4 weeks after operation. Right femur were removed for the observation of radiology and histology for the measurement of general/mid section/end section bone mineral density (BMD) and immunohistochemistry assessment by dual-energy X-ray absorptiometry(DEXA) and by light symptom visual analysis. **Results** (1) The mean tBMD of the OVX group was significantly lower than that of the Sham group. (2) The mean mBMD of the OVX + F + CT group was significantly higher than that of the OVX + F group; The woven bones have remodeled into lamellar bones and cartilage islands was rarely observed. No significant difference in expression of BMP-2 between the OVX + F and OVX + F + CT groups in callus were noted. **Conclusion** Calcitonin obviously accelerates the fracture healing in ovariectomized rats and improves woven bones to remodel into lamellar bones.

Key words: Osteoporosis; Fracture healing; Bone mineral density; Calcitonin; Bone morphogenetic proteins; Immunohistochemistry

骨折是骨质疏松最严重的并发症,可导致残疾,

甚至死亡。其临床特点具有:骨折愈合慢、治疗周期长、甚至临床不愈合和多种并发症、愈合后再骨折发生率高。降钙素自 1961 年由 Coop 等人发现以来,随着人们对它的研究深入,其作用日益受到重视。其主要作用是,抑制破骨细胞的活性,起到抑制骨吸

基金项目:河北省科技领军人才创新资金项目(06547008D-8)

作者单位:063000 唐山,华北煤炭医学院附属医院骨外科

通讯作者:张柳,Email:zhliu130@sohu.com

收的作用,减少骨量的丢失^[1]。

本实验应用动物双侧卵巢切除(OVX)模拟人类绝经后骨质疏松(OP);以及制作股骨骨折(F)的模型,并行股骨干骨折髓内针内固定,术后采用降钙素皮下注射给药。术后4周,应用计算机X线摄像、骨密度测量、组织形态学观察和免疫组织化学等技术,研究降钙素对骨质疏松骨折愈合的影响,为临床治疗骨质疏松性骨折提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康14周龄雌性Sprague-Dawley大鼠50只(由北京大学医学部实验动物中心提供),普通级,体重 258 ± 14 g。按体重随机分为5组,每组10只大鼠,即假手术组(Sham)、卵巢切除术组(OVX)、假手术+骨折组(Sham+F)、卵巢切除+骨折组(OVX+F)、卵巢切除+骨折+降钙素药物组(OVX+F+CT)。在实验过程中,大鼠分笼饲养,于室温20℃左右,自然光照,供给大鼠标准饲料(由华北煤炭医学院动物中心提供),自由饮食水。

1.2 动物模型的制备

1.2.1 去卵巢大鼠模型(OVX):所有动物2%戊巴比妥钠以 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重的剂量腹腔注射麻醉。背侧入路开腹腔后,双侧卵巢切除。假手术(Sham)组10只大鼠于腰背部入腹腔行假性手术。

1.2.2 大鼠股骨干横行骨折(F)模型:大鼠右大腿中段外侧纵形切口,长约2 cm,进入,暴露股骨干,在股骨干中1/3段用线锯锯断成横行骨折,直径1.5 mm的克氏针逆行穿入,复位后穿入远段髓腔固定。

1.3 降钙素给药方法

OVX+F+CT组大鼠按文献^[2,3]方法,给予皮下注射鲑鱼降钙素,隔日1次,每次以 $16 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重的剂量给药,共4周。

1.4 标本采集与处理

于术后4周时,分别将受试大鼠,心脏取血处死,取右侧完整的股骨标本,置入10%中性甲醛溶液,4℃冰箱保存。

1.5 计算机X线摄像仪摄片

将大鼠完整的右侧股骨标本经计算机X线摄像仪摄片(距离:90 cm、电压:40 kV、电流:3.2 mA),观察大鼠骨折愈合情况。

1.6 DEXA 测量骨密度方法

应用Norland-XR36 双能X线骨密度测量仪(DEXA,美国),采用小物体扫描模式,准确度

0.01%,扫描速度60 mm/s,分辨率(resolution)1.0 mm × 1.0 mm,扫描宽度5.0 cm的参数值,进行骨密度的测量。测量时,将克氏针拔除,分别测量股骨全长、远1/3段、中1/3段。为了评价精确度,随机选取1例,在位置不变的情况下,连续测量BMD各5次。精确度用变异系数(CV)表示。

1.7 骨痂形态学染色(HE 染色)

将大鼠右侧股骨中段骨折骨痂标本,固定、脱钙、脱水、包埋,沿正中冠状面作5 μm薄切片、脱蜡、苏木素染色、封片,Olympus显微镜下作普通光镜观察并摄相片。

1.8 免疫组化染色(SABC 法)

捞片后于烤箱烘干,二甲苯常规脱蜡。常规酒精逐级入水,蒸馏水冲洗5 min。入0.3% H₂O₂ (PBS稀释)5 min~10 min, PBS冲洗3次 × 5 min。0.01M枸橼缓冲液中微波炉加热92℃~98℃10 min × 2次,间隔10 min,室温冷却30 min,0.1M PBS冲洗3次 × 5 min。滴加20% BSA液20 min,不冲洗。再滴加1:100 BMP-2 一抗,4℃冰箱过夜,0.1M PBS冲洗3次 × 5 min。滴加20%鸡蛋清再封闭抗体,0.1M PBS冲洗3次 × 5 min。滴加生物素化二抗,37℃孵育30 min,0.1M PBS冲洗3次 × 5 min。滴加ABC试剂,37℃孵育30 min,0.1M PBS冲洗3次 × 5 min。1% Trion-100/PBS冲洗30 s,二氨基联苯胺(DAB)显色,自来水冲洗5 min,苏木素复染。入梯度酒精脱水、分色,二甲苯透明。中性树胶封片。每次染色用PBS替代BMP-2 一抗作为阴性对照。

1.9 图像分析

采用HPAIS-1000 高清晰度彩色病理图像分析系统将免疫组化标本切片经显微镜输入计算机图像分析系统,然后对图像进行二值分割,这时图像显示为背景为白色染色部分为红色,接着随机选取4个视野,在光镜10 × 10倍视野下,确定光源亮度和最佳灰度阈值,在同一阈值把所有样品全部测完,取骨痂组织阳性细胞平均积分光密度做为统计指标。计算机自动分析结果,测量染色区域积分光密度值,染色深浅度与光密度成正比。即组织细胞中BMP-2表达越强染色越深,所测的光密度值越高。

1.10 统计分析方法

实验数据建立EXCEL数据库,资料用SPSS(V12.0)来处理。各组数据经过Shapiro-Wilk正态性检验和Bartlett方差齐次检验后,利用单因素方差分析(ANOVA)比较各组之间的差异(两组间比较采用Student's *t* 检验)。数据采用均数加减标准差表示,

以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 绝经后骨质疏松模型的建立

术后 4 周测量 OVX 组与 Sham 组大鼠离体解剖的股骨远 1/3 段、中 1/3 段及整体的骨密度(表 1), 显示 OVX 组股骨骨密度值显著下降, 并经统计学检验后发现两者具有统计学显著性差异($P < 0.05$)。

表 1 各非骨折组大鼠股骨骨密度的测量值
($g/cm^2, \bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	Sham	OVX
tBMD	0.1143 ± 0.0065	0.0934 ± 0.0266^a
dBMD	0.1156 ± 0.0045	0.1016 ± 0.0036
mBMD	0.1103 ± 0.0086	0.1062 ± 0.0033

注: a 与 Sham 比较 $P < 0.05$

2.2 CR 摄片的观察(图 1)

大鼠离体右侧股骨干 CR 摄片, 观察骨痂的连续性发现, 各骨折组大鼠骨折端均未发现不愈合现象。OVX + F + CT 与 OVX + F 组比较: 大鼠的骨性愈合较好, 骨痂量相对较多, 骨折线较模糊, 内固定

克氏针无松动和移位, 无畸形愈合及成角。

2.3 骨密度测定

大鼠右侧股骨分别测量全长、远 1/3 段、中 1/3 段的骨密度, (中段包括了骨折部位及全部骨痂), 骨密度测量的 CV 值分别为 0.47%、0.51%、0.71%, 测得结果见表 2。

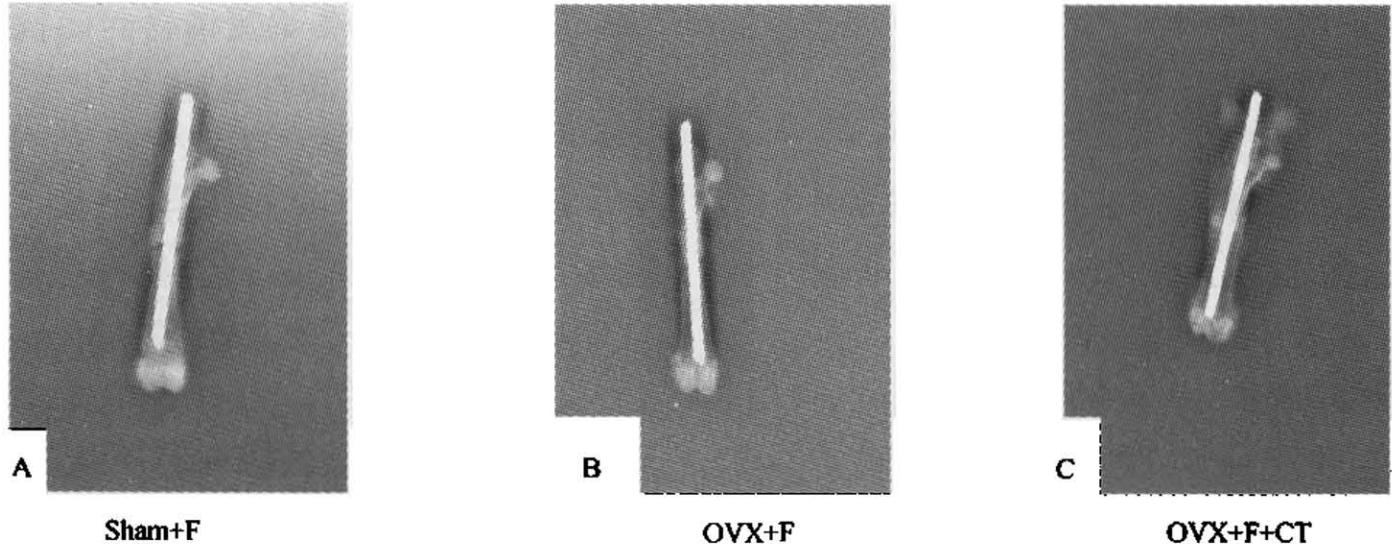
表 2 各骨折组大鼠股骨骨密度的测量值
($g/cm^2, \bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	Sham + F	OVX + F	OVX + F + CT
tBMD	0.1067 ± 0.0099	0.0941 ± 0.0135	0.1025 ± 0.0103
dBMD	0.1074 ± 0.0134	0.0994 ± 0.0370	0.1020 ± 0.0156
mBMD	0.1197 ± 0.0180	0.1137 ± 0.0277^a	0.1185 ± 0.0160^b

注: a 与 Sham + F 比较 $P < 0.05$; b 与 OVX + F 比较 $P < 0.05$

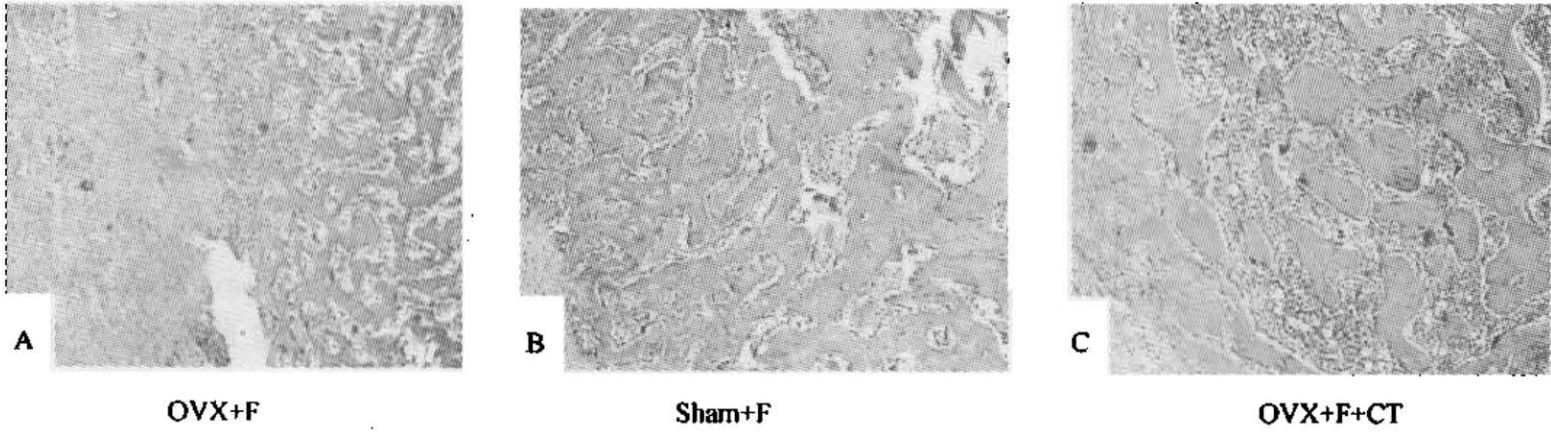
2.4 骨痂组织形态学观察结果(图 2)

OVX + F + CT 与 OVX + F 比较: OVX + F + CT 骨痂中骨性骨痂较多, 可见少量软骨细胞, 但未见到“软骨岛”存在, 破骨细胞少见, 小梁骨成熟度较高, 骨小梁粗细均匀一致, 间距无明显增宽, 板层骨形成。表明骨折愈合过程中软骨性骨痂向骨性骨痂转化加速。



①B 与 A 比较: A 骨折端骨折线比较模糊, 骨痂较多; B 骨折端骨折线比较清晰可见, 骨痂较少; ②C 与 B 比较: C 骨折线均模糊, 骨痂较多, 且 C 骨痂塑形较好。

图 1 各骨折组大鼠股骨骨折愈合 CR 摄片比较



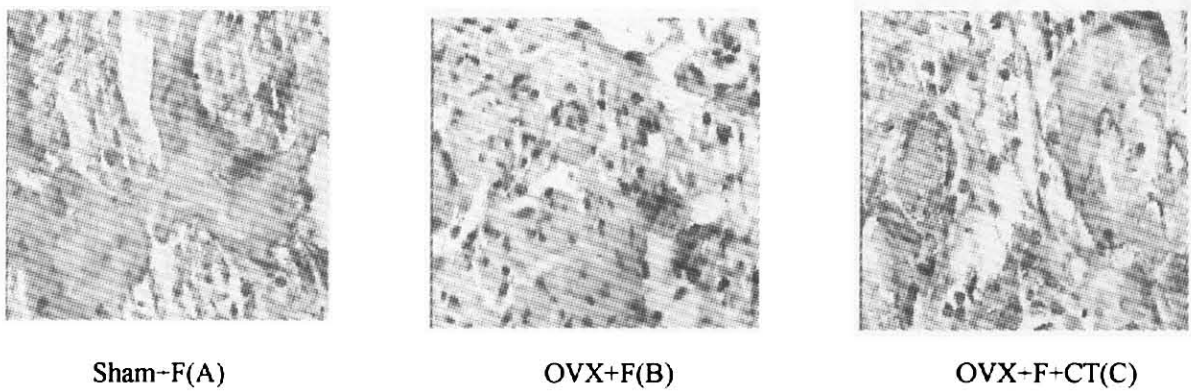
A 骨折端存在大量的软骨细胞, 可见软骨岛存在, 骨小梁较少, 且成熟度低, 深层可见编织骨; B 骨折端包绕少量的软骨细胞, 骨折端骨小梁较成熟, 由编织骨转化为板层骨; C 骨折端可见少量软骨细胞包绕, 骨小梁较成熟, 排列较整齐, 可见编织骨转化为板层骨。

图 2 骨折组大鼠骨折端骨痂组织切片形态学观察(HE 染色 10 × 10)

2.5 免疫组化染色观察结果(图 3)

BMP 主要沉积在功能活跃的成骨细胞及其周围和产生骨小梁的边缘,纤维骨痂中较少,实验结果

提示:Sham + F 组、OVX + F 组与 OVX + F + CT 组均有阳性细胞表达,但各组间 IOD 值无显著差异($P > 0.05$)。



BMP 主要沉积在骨小梁及成骨细胞内。A 骨折骨痂 BMP 棕色表达较弱;B 骨折骨痂 BMP 棕色表达略强;C 骨折骨痂 BMP 棕色表达略强。

图 3 各骨折组骨痂 BMP 比较(SABC 法,10 × 40)

3 讨论

3.1 骨质疏松症动物模型的成功复制

卵巢切除大鼠是最常用模拟妇女绝经后骨质疏松症的公认模型。本实验 OVX 组采用 14 周龄大鼠切除双侧卵巢,术后 4 周发现 OVX 大鼠体重自术后第 3 周开始呈现统计学上的显著性增加,离体右侧股骨的骨密度测量值显著性下降。由此可以证实本实验的绝经后骨质疏松症动物模型的复制是成功的。

3.2 降钙素对 OVX 大鼠股骨骨折愈合的影响

本实验中 OVX + F + CT 组与 OVX + F 组比较发现:CR 摄片可见骨折端骨折线较模糊,骨痂量较多。骨痂形态学镜下观察可见有板层骨形成,骨小梁发育较成熟,排列整齐。软骨细胞较少见。骨痂 BMD 值显著增加。骨痂 BMP-2 表达与 OVX + F 组比较无显著差异。

骨质疏松性骨折与一般骨折的愈合过程均经历炎症阶段、修复阶段和改建阶段,其中修复阶段历经纤维骨痂、软骨性骨痂至骨性骨痂的演变。与一般骨折愈合方式相似,软骨内成骨与膜内成骨共同参与了骨折的修复,并且以软骨内成骨为主。但在骨质疏松性骨折愈合过程中,软骨内成骨延缓,骨性骨痂改建(骨吸收 > 骨形成)加速,骨痂内胶原纤维疏松、排列紊乱,与主应力方向不一致,从而导致骨折愈合质量降低,再次骨折发生率增高。郝永强等^[4]研究中发现,在大鼠双侧卵巢切除后雌激素缺乏所诱发的骨质疏松性骨折愈合过程中,软骨性骨痂生成量多,但向骨性骨痂演变过程延缓。而在编织骨向成熟骨改建过程中,小梁骨表面成骨细胞数量减

少,成骨能力降低。相反,破骨细胞吸收能力旺盛,导致骨结构松散,骨痂质量下降。张先龙等^[5]在骨质疏松对卵巢切除大鼠骨折愈合影响的超微结构研究中,也认为其影响主要发生在骨折愈合后期(术后 28 d 后),表现为软骨内化骨迟缓,软骨骨痂向骨性骨痂演变缓慢,骨改建过程中破骨细胞性骨吸收加剧。

本实验的研究发现,OVX + F + CT 组骨痂生成量较多,骨痂 BMD 明显升高。软骨组织少见,编织骨已部分转化为板层骨,骨小梁成熟度较高,排列整齐。说明在骨质疏松性骨折愈合过程中,CT 通过抑制骨吸收,能减少骨量的丢失,促进骨矿化,增加骨痂的骨矿含量,能够有效提高骨痂骨密度;而且 CT 还可以加快骨小梁的形成和成熟,使软骨骨痂向骨性骨痂转化加速,从而加快骨折愈合的速度,缩短骨折愈合时间。本实验结果与 Giardino^[6] 和 Wallach^[7] 等人的研究结果相一致。

骨折修复受多种生长因子的调控,生长因子的作用是骨折愈合的基础。这些生长因子包括骨形态发生蛋白(BMP),转化生长因子 β (TGF- β),成纤维细胞生长因子(FGF),胰岛素样生长因子(IGF),血小板源性生长因子(PDGF),表皮生长因子(EGF),血管内皮生长因子(VEGF)等。它们在骨折愈合过程中相互作用,相互影响,共同诱导成骨^[8]。

本实验中,应用 CT 药物组与对照组相比,骨痂中 BMP-2 的表达无明显差异,说明 CT 对骨质疏松性骨折愈合的促进作用,可能是因为促进其他骨生长因子的表达而实现的,这还需要通过相关实验研究,来进一步加以证实。

(下转第 347 页)

【参 考 文 献】

- [1] 张亚.抑制骨吸收药物的现状及进展.国外医学老年医学分册,2003,24:91-94.
- [2] Wronski TJ, Yen CF, Burton KW, et al. Skeletal effects of calcitonin in ovariectomized rats. *Endocrinology*, 1991, 129: 2246-2250.
- [3] Li M, Shen Y, Burton KW, et al. A comparison of the skeletal effects of intermittent and continuous administration of calcitonin in ovariectomized rats. *Bone*, 1996, 18:375-380.
- [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,1999,22:137-139.
- [5] 张先龙,畦述平.骨质疏松对卵巢切除大鼠骨折愈合影响的超微结构研究.中华外科杂志,2001,39:241-243.
- [6] Giardino R, Fini M, Nicoli Aldini N, et al. Effects of synthetic salmon calcitonin and alendronate on bone quaiity in ovariectomized rats. *Minerva Med*, 1997, 88:469-477.
- [7] Wallach S, Rousseau G, Martin L. Effects of calcitonin on animal and in vitro models of skeletal metabolism. *Bone*, 1999, 25: 509-516.
- [8] 杨镇,主编.实验外科学.上海:上海科学技术出版社,2004. 642-649.

(收稿日期:2006-11-23)