

## · 论著 ·

# 生长激素雌激素对去势大鼠剩余牙槽骨内 IGF-I 表达的影响

唐成芳 郭三萍 李晓红 朱勇 姜鸣 肖卓 胡亚军

**摘要:** **目的** 观察生长激素、雌激素及两者联合运用对切除卵巢大鼠剩余牙槽骨内胰岛素样生长因子分布和表达的影响。**方法** 通过去除 SD 大鼠双侧卵巢,拔除单侧上颌磨牙,建立骨质疏松的剩余牙槽骨动物模型,并在此基础上通过免疫组化方法观察、分析切除卵巢及单独和联合运用生长激素、雌激素对去势大鼠剩余牙槽骨内胰岛素样生长因子分布和表达的影响。**结果** 骨质疏松组局部牙槽骨内的 IGF-I 表达最弱,雌激素、生长激素以及两者联合运用都能通过增加 IGF-I 在骨组织局部的表达量提高成骨的活性,检验有统计学意义( $P < 0.05$ )。生长激素及联合用药的效果优于单独运用雌激素,联合用药组提高 IGF-I 表达的效果略高于单用生长激素组,但无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 雌激素、生长激素及两药联合运用能通过增加 IGF-I 表达延缓牙槽骨吸收。

**关键词:** 骨质疏松; 剩余牙槽骨; 重组人生长激素; 雌激素; IGF-I

**The effects of estrogen and recombine human growth hormone on the express of IGF-I in maxillary in osteoporotic rats** TANG Chengfang, GUO Sanping, LI Xiaohong, et al. Stomatology Department of Xi'an Medical College, Xi'an 710076, China

**Abstract:** **Objective** The aim of this study was to study the effect of estrogen and recombine human growth hormone on the express of IGF-I in Maxillary in osteoporotic rats. **Methods** Animal models were established by ovariectomy and exodontia on left partial Maxillary. And the effects of estrogen and recombine human growth hormone on the distribution of IGF-I in Maxillary were observed in OP rats. The feasibility of using estrogen and recombine human growth hormone to reduce Resorption of Residual Ridge in OP rats was investigated in order to offer the theoretic guidance for OP patients to reduce Resorption of Residual Ridge and jaws and improve the effects of false tooth. **Results** The immunohistochemistry of IGF-I staining slices showed that the expression of IGF-I in the Residual Ridge of Osteoporosis group was the weakest. All three treatment group can increase the expression of IGF-I in bone and improve the effect of osteoblast. The effect was better in Er-HGHT group and r-HGHT group than in ERT group and the effect was slightly better in Er-HGHT group than in r-HGHT group, but statistic test had no obvious direction. **Conclusion** Estrogen and recombine human growth hormone and their combination can relive the resorption of residual ridge by increasing the expression of IGF-I.

**Key words:** Osteoporosis; Maxillary rebuilding; Resorption of residual ridge; Recombine human growth hormone; Estrone; IGF-I

研究发现剩余牙槽骨量丢失不仅与机械刺激等局部因素有关,还与骨质疏松有密切的关联<sup>[1]</sup>。剩余牙槽嵴的高度与骨质疏松的程度明显相关,骨质

疏松影响颌骨骨吸收和骨形成的平衡<sup>[2,4]</sup>。而牙槽骨丧失是一个严重而普遍的临床问题,如何防治牙槽骨吸收,增加颌骨骨量是许多口腔医师面临的难题之一。因此本实验研究了重组人生长激素与雌激素对去势大鼠牙槽骨局部成骨细胞因子 IGF-I 的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物与造模方法

基金项目: 陕西省科学技术研究发展计划项目[2003K10-G78 (1)]

作者简介: 710004 西安,西安医学院口腔医学系(唐成芳、朱勇、姜鸣);西安交通大学口腔医院修复科(郭三萍、李晓红、肖卓、胡亚军)

通讯作者: 郭三萍, Email: gsp2015@163.com

选用 4 月龄<sup>[6]</sup> 未交配同批次 Sprague-Dawley (SD)雌性大鼠 65 只(西安交通大学医学动物实验中心提供的国家 A 级实验动物),体重在 250 ~ 280 g。随机分为两组:去势组(ovariectomized rats, OVX)48 只,假手术组(Sham-ovariectomized rats, Sham-OVX)17 只。假手术组大鼠全麻下切除卵巢附近脂肪组织一块,去势组大鼠摘除双侧卵巢<sup>[7,8]</sup>。动物实验 8 w 以后,OVX 组与 Sham-OVX 组分别随机抽取 5 只大鼠,取股骨近心端进行骨质疏松造模检测,在全麻下采用自制的开口器及牙挺拔除全部剩余大鼠左侧上颌磨牙。

1.2 分组及给药方法

建模成功以后,将 OVX 组大鼠随机分为 4 组,每组 10 只:分别为骨质疏松组(osteoporosis, OP),雌激素治疗组(estrogen replacement therapy, ERT),重组人生长激素治疗组(recombine Human growth hormone therapy, r-HGHT),雌激素生长激素联合治疗组(estrogen and recombine Human growth hormone therapy, Er-HGHT),假手术对照组(sham-ovariectomized rats, Sham-OVX)不再分组,为 11 只。ERT 组、Er-HGHT 组于拔牙后第 2 天给予苯甲酸雌二醇皮下注射,0.1 mL/kg,3 d 1 次。r-HGHT 组、Er-HGHT 组每天给予皮下注射人重组生长激素,0.15 IU/kg,每日 1 次。其余各组每次注射等量的生理盐水。各组动物其他饲养条件均一致。

1.3 取材及指标测定

(1) 建模检测大鼠取股骨远心端,经 4%多聚甲醛固定、EDTA 脱钙、石蜡包埋、制作切片,行 HE 染色。LEICA 普通光学显微镜下观察建模检测大鼠股骨 HE 染色切片,应用医用图像分析软件 Image Pro Plus 5.1 进行骨组织计量学测定,计算骨小梁平均宽度、骨小梁平均间隔宽度、骨小梁面积/视野面积百分比。用 SPSS 12.0 统计软件进行 *t* 检验,计算结果以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )形式表示,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

(2) 分别于给药 4 w 后、8 w 后从以上各组随机抽取大鼠 5 只,20%乌拉坦过量麻醉处死。

(3) 取左侧上颌骨标本,剔净肌肉、黏骨膜等软组织后,4%多聚甲醛固定 3 d,EDTA 脱钙 3 w,流动水冲洗 24 h,梯度乙醇脱水、透明,常规石蜡包埋切片,采用 SPA 法进行免疫组化染色。IGF-I 抗体为兔抗人多克隆抗体(购自武汉博士德公司),工作浓度为 1:300。操作过程严格按照试剂盒说明进行。

(4) 在 LEICA 光学显微镜下观察对切片进行定

性分析,同时采用 Image Pro Plus 5.1 医用分析软件对阳性表达区域进行半定量的灰度分析,对各组的 IGF-I 表达进行比较分析,从而间接的反映各种药物对成骨的影响。每个标本平均取 5 个视野,灰度值取其均数。灰度值定为:黑为 0,白为 255,它与阳性强度成反比,也就是染色越深的,即阳性染色越强,阳性物质生成量越多,灰度值越小。对所得数据采用 SPSS 12.0 统计软件包进行统计分析,对数值进行单因素方差分析及多重比较。结果采用均数 ± 标准差表示,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 8 w 时 OVX 组及 Sham-OVX 组股骨组织切片骨计量学

可见 OVX 组大鼠骨小梁间距明显高于 Sham-OVX 组,OVX 组股骨骨小梁宽度、骨小梁面积/视野面积百分比明显低于 Sham-OVX 组,统计学上有显著差别。

表 1 8 w 时 OVX 组及 Sham-OVX 组股骨组织切片骨计量学分析结果(μm, %)

| 组别       | 骨小梁平均宽度(μm)   | 骨小梁平均间距(μm)     | 骨小梁/视野面积百分比(%) |
|----------|---------------|-----------------|----------------|
| Sham-OVX | 41.39 ± 5.69  | 80.73 ± 14.44   | 27.36 ± 6.73   |
| OVX      | 28.67 ± 6.90* | 103.72 ± 19.06* | 16.45 ± 7.52*  |

注:与 OVX 组比较,\*  $P < 0.05$ ,  $P$  值为两组 *t* 检验的概率值

2.2 剩余牙槽骨中 IGF-I 定性分析

用药后可见 IGF-I 的阳性表达基本一致,主要位于骨小梁周围。其胞质和胞核都呈弥漫成片的棕黄色阳性染色。在骨细胞的胞浆和胞膜也呈棕黄色的阳性染色,但较成骨细胞染色淡,且靠近骨小梁周边的骨细胞比位于骨小梁中央的骨细胞染色为深。但 OP 组剩余牙槽骨内的阳性染色明显浅淡。8 w 时各组染色较 4 w 时都稍有减弱,尤其是骨小梁周边的成骨细胞染色较前明显浅淡,呈棕色。

2.3 剩余牙槽骨中 IGF-1 灰度分析

统计学结果显示 IGF-I 灰度值:用药 4 w 后,Sham-OVX 组、Er-HGHT 组及 r-HGHT 组灰度值均显著低于 OP 组,  $P < 0.05$ ,差异有统计学意义;ERT 组与 OP 组,  $P > 0.05$ ,差异无统计学意义,而与 Sham-OVX 组比较,  $P < 0.05$ ,差异有统计学意义;3 个药物治疗组间灰度值差异无统计学意义。用药 8 w 后,Sham-OVX 组及各治疗组灰度值均显著低于 OP 组,  $P < 0.05$ ,差异有统计学意义;Sham-OVX 组灰度值低于 Er-HGHT 组、r-HGHT 组,但  $P > 0.05$ ,差异无统

表 2 用药 4 w 和 8 w 后剩余牙槽骨中 IGF-1 灰度值均数( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 时间  | Sham-OVX 组    | OP 组          | ERT 组         | r-HGHT 组      | Er-HGHT 组     |
|-----|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 4 w | 100.27 ± 6.73 | 120.57 ± 6.94 | 112.47 ± 9.51 | 109.44 ± 4.93 | 108.33 ± 9.56 |
| 8 w | 107.36 ± 7.56 | 133.99 ± 4.85 | 122.01 ± 9.01 | 115.93 ± 4.57 | 115.66 ± 8.25 |

表 3 比较各组间 4 w 组织中 IGF-I 灰度(P 值)

| 组别       | Sham-OVX 组 | OP 组    | ERT 组   | r-HGHT 组 | Er-HGHT 组 |
|----------|------------|---------|---------|----------|-----------|
| Sham-OVX | -          | 0.000** | 0.016 * | 0.287    | 0.721     |
| OP       | 0.000**    | -       | 0.694   | 0.046 *  | 0.015 *   |
| ERT      | 0.016 *    | 0.694   | -       | 1.000    | 1.000     |
| r-HGHT   | 0.287      | 0.046 * | 1.000   | -        | 1.000     |
| Er-HGHT  | 0.721      | 0.015 * | 1.000   | 1.000    | -         |

表 4 比较各组间 8 w 组织中 IGF-I 灰度(P 值)

| 组别       | Sham-OVX 组 | OP 组    | ERT 组   | r-HGHT 组 | Er-HGHT 组 |
|----------|------------|---------|---------|----------|-----------|
| Sham-OVX | -          | 0.000** | 0.001** | 0.474    | 0.591     |
| OP       | 0.000**    | -       | 0.020 * | 0.000**  | 0.000**   |
| ERT      | 0.001**    | 0.020 * | -       | 1.000    | 1.000     |
| r-HGHT   | 0.474      | 0.000** | 1.000   | -        | 1.000     |
| Er-HGHT  | 0.591      | 0.000** | 1.000   | 1.000    | -         |

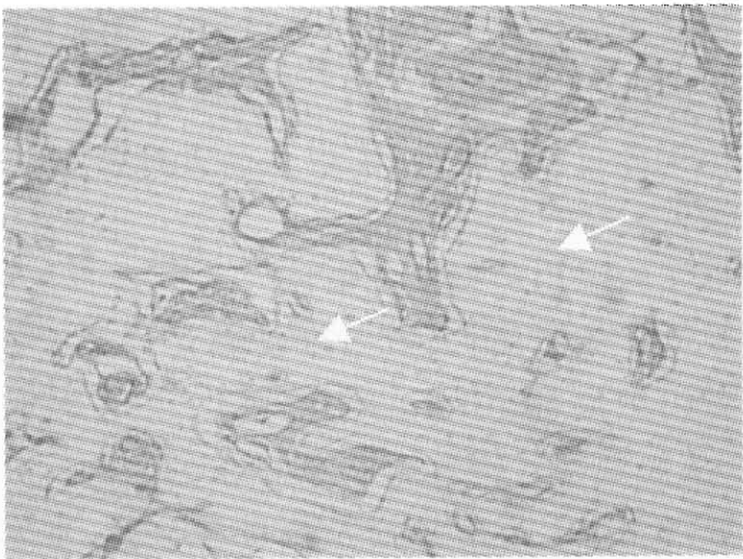


图 1 用药后 8 w Sham-OVX 组颌骨 IGF-I 组化(200 倍)

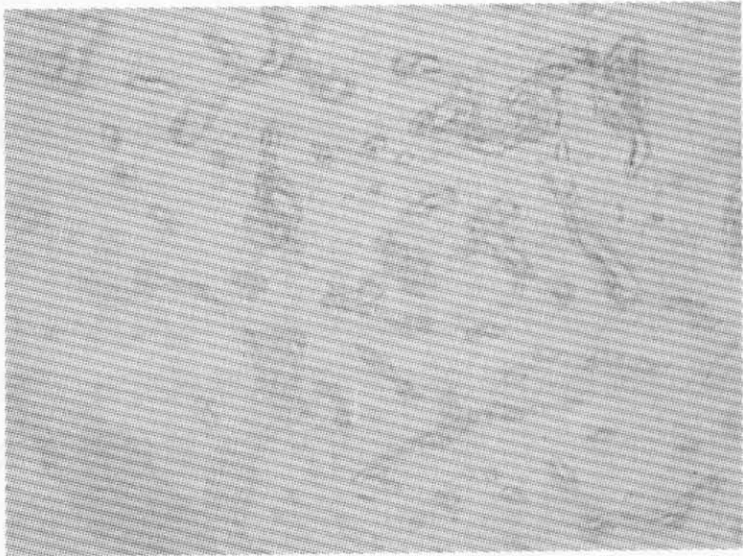


图 3 用药后 8 w ERT 组颌骨 IGF-I 组化(200 倍)

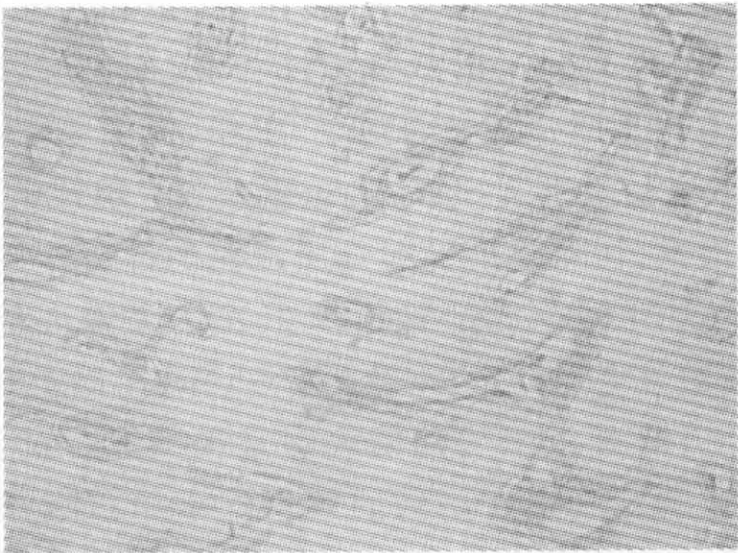


图 2 用药后 8 w OP 组颌骨 IGF-I 组化(200 倍)

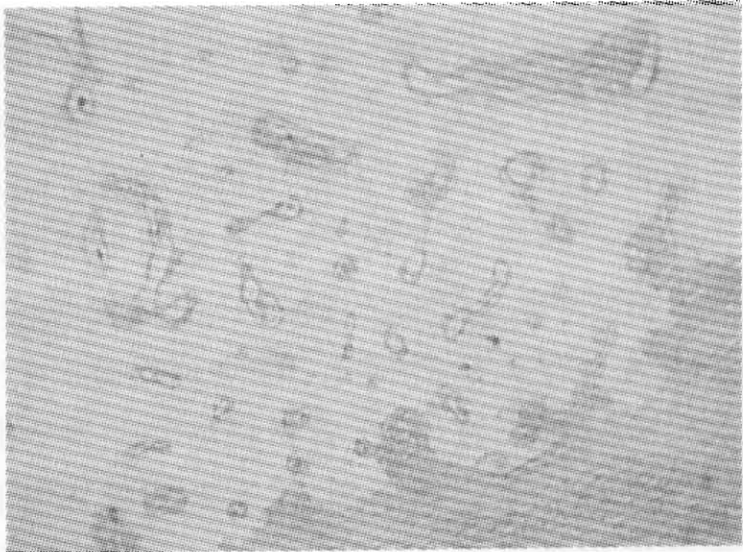


图 4 用药后 8 w r-HGH 组颌骨 IGF-I 组化(200 倍)

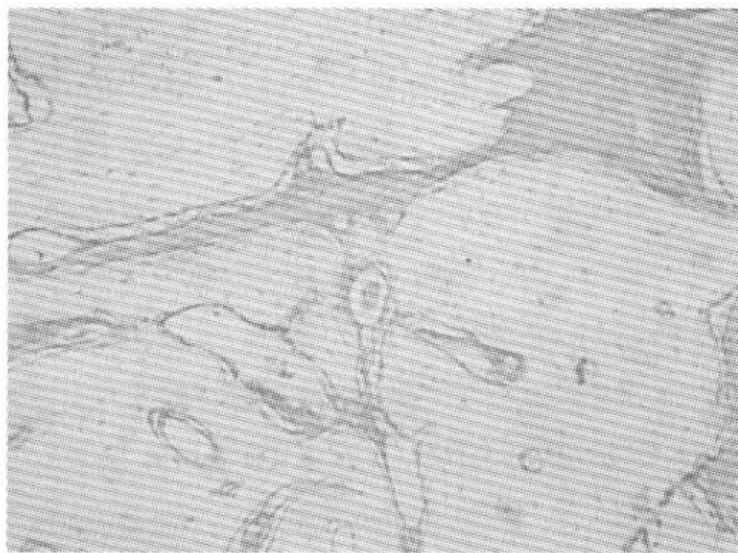


图 5 用药后 8 w Er-HGH 组颌骨 IGF-I 组化(200 倍)

计学意义; Sham-OVX 组灰度值低于 ERT 组,  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义。3 个药物治疗组间灰度值差异无统计学意义。

以上各组用药后 4 w IGF-I 灰度值均低于 8 w 时, 但  $P > 0.05$ , 差异无统计学意义。

### 3 讨论

骨组织形态计量学 (Bone Histomorphometry, BHM) 是用定量的方法分析骨组织形态结构改变的测量技术, 能精确地测量骨组织微细结构和总体骨量的变化, 是描述研究骨小梁结构变化的有效指标, 为 OP 提供病理学的依据, 应作为其诊断依据<sup>[9]</sup>。本实验模型组在卵巢切除手术后 8 w, 股骨骨小梁宽度、骨小梁面积/视野面积百分比明显低于对照组, 骨小梁间距明显高于对照组, 统计学上有显著差异。形态计量学指标也说明了本实验骨质疏松模型复制成功。而杜莉、Elovic 等众多学者的研究都表明躯干、四肢骨与颌骨 BMD、形态计量学指标都具有一致性。因此可以推论颌骨质疏松模型复制成功。

众所周知雌激素缺乏导致绝经后骨质疏松的发生, 雌激素替代疗法已经成为国际上公认的治疗骨质疏松的首选疗法, 是较为常用的骨质吸收的抑制剂<sup>[9]</sup>。近年来的研究发现<sup>[10-13]</sup>: 骨质疏松不仅与雌激素缺乏有关, 还与随着年龄增长而分泌减少的生长激素相关。有关学者提出: 骨质疏松症治疗不仅需要骨吸收抑制剂, 以阻止骨量的持续丢失, 最好同时使用促进骨形成的刺激剂, 以有效的提高骨量, 因此雌激素作为骨质吸收药物与生长激素等促进骨形成的药物联合运用治疗骨质疏松引起了较多的关注, 但对于联合用药对骨质疏松的防治作用是否优于单独运用药物尚无一致定论<sup>[14-16]</sup>。

IGF-I 是主要由肝脏细胞产生, 也可在骨组织中生成的一种细胞因子, 在成骨细胞中有其受体, 在骨的形成中起着一定的作用。目前体外实验<sup>[18,19]</sup>已经证实 IGF-I 是骨生成的强有力的刺激因子, 体内实验也证明 IGF-I 有促进骨形成的作用, 李伟民等<sup>[20]</sup>的动物实验研究也表明: IGF-I 可刺激骨质疏松大鼠成骨细胞活跃增生, 促进骨形成与骨转换速率, 并可使骨质疏松症骨组织形态改善。本实验定性观察到的 IGF-I 阳性表达范围主要位于成骨细胞的胞膜和胞浆也证实了 IGF-I 是反映骨形成的细胞因子之一。由此可见, IGF-I 对骨代谢起着重要的作用, 可作为骨形成的局部指标反映骨组织成骨的活性, 可以通过观察局部 IGF-I 的浓度变化来反映各种药物对成骨活性的影响。

免疫组化技术是近年来发展起来的一门新兴学科, 免疫组化染色需通过病理切片的着色情况来判定结果, 由于人眼对相同强度单色光的主观感觉不同, 将会影响对结果的判定<sup>[21]</sup>。而应用计算机进行图像分析, 则可避免这种主观感觉的偏差。图像分析系统可以给出灰度、直径、饱和度等生物参数, 这些参数对定量研究免疫组化染色情况提供了科学的依据。因此本实验采用了计算机通过 IPP 5.1 图像分析系统进行灰度值分析, 以提高分析精度, 避免了主观误差。

本实验采用免疫组化染色方法观察了去卵巢大鼠以及给予雌激素、人重组生长激素治疗后剩余牙槽骨骨组织局部 IGF-I 的浓度变化, 以反映成骨的活性, 从而观察延缓牙槽骨吸收的效果。

通过 IGF-I 灰度扫描及统计学分析, 本实验认为 Sham-OVX 组成骨活性最大, Er-HGHT 组及 r-HGHT 组次之, 3 个组骨形成活性均显著高于 OP 组。ERT 组成骨活性介于 Er-HGHT 组和 r-HGHT 组与 OP 组之间, 4 w 时成骨活性与 OP 组差异无显著性, 8 w 时成骨活性显著强于 OP 组, 但用药 4 w 和 8 w 后成骨活性都与 Sham-OVX 组差异有统计学意义。由此推论, 切除卵巢引起骨质疏松的部分作用是通过降低 IGF-I 在局部骨组织中表达来实现的。因此, 雌激素、生长激素以及两者联合运用都能通过增加 IGF-I 在骨组织局部的表达量提高成骨的活性, 生长激素及其联合用药的效果优于单独运用雌激素, 但差异无统计学意义。联合两药提高成骨活性的能力并不优于单独用药。本实验为临床上单独及联合运用生长激素治疗颌骨骨质疏松提供了一定的参考价值。

## 4 结论

骨质疏松条件下,局部牙槽骨内的 IGF-I 表达减弱,加快了牙槽骨的吸收;雌激素、生长激素以及两者联合运用都能通过增加 IGF-I 在骨组织局部的表达量来提高成骨的活性,延缓骨质疏松所致的牙槽骨的快速吸收。

### 【 参 考 文 献 】

- [1] 徐普.可摘局部义齿和全口义齿修复设计原理和运用.北京:北京医科大学出版社,2000.3:38-43.
- [2] Kribbs PJ, Chesnut CH, Ott SM, et al. Relationship between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population prosthesis. *Dent*, 1989, 62(4): 703.
- [3] VonWerner N, Gina Koller G. Symptomatic osteoporosis: A risk factor for residual ridge resorption of the jaws. *J Prosthet Dent*, 1992, 67(5): 655.
- [4] Hirai T, Ishijima T, Hasegawa AY, et al. Osteoporosis and reduction of residual ridge in edentulous patients. *J Prosthet Dent*, 1993, 69(1): 49.
- [5] 杜莉,胡国瑜.大鼠双侧卵巢切除术后下颌剩余牙槽骨的骨量变化.华西口腔医学杂志,1992,10(4):289-292.
- [6] 秦林林,陈金标,龚海洋,等.不同月龄雌性大鼠骨质疏松模型研究.中日友好医院学报,1997,11(1):6-9.
- [7] 赵和平,李宁,陈列.骨质疏松症动物实验模型的建立和评价.中国中医骨伤科杂志,2001,9(3):55-57.
- [8] 袁勇,钟卫军.骨质疏松症的动物实验研究进展.湖南中医药导报,2003,9(12):50-51.
- [9] 郭世绂,罗先正,邱贵兴.骨质疏松基础与临床.天津:天津科学技术出版社,2001.175-176.
- [10] Rucker D, Ezzat S, Diamanti A, et al. IGF-I and testosterone levels as predictors of bone mineral density in healthy, community dwelling men. *Clin Endocrinol(Oxf)*, 2004, 60(4): 491-499.
- [11] Taniguchi T, Matsumoto T, Shindo H. Changes of serum levels of osteocalcin alkaline phosphatase, IGF-I and IGF binding protein-23 during fracture healing. *Injury*, 2003, 34(7): 477-479.
- [12] Toshitsugu Sugimoto. Effect of combination human growth hormone in elderly osteoporotic women.
- [13] 刘慧珠,吕超.绝经妇女骨密度变化与雌激素、生长激素水平相关关系的变化.中国骨质疏松杂志,1996,2(1):12-14.
- [14] Sugimoto T, Kaji H, Nakaoka D, et al. Effect of low dose of recombinant human growth hormone on bone metabolism in elderly women with osteoporosis. *Eur J Endocrinol*, 2002, 147(3): 339-348.
- [15] Verhaeghe J, van Bree R, Van Herck E, et al. Effects of recombinant human growth hormone and insulin-like growth factor-I, with or without 17 beta-estradiol, on bone and mineral homeostasis of aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*, 1996, 11(11): 1723-1735.
- [16] 黄遂柱,王宏耀,赵永强,等.重组人生长激素治疗大鼠卵巢切除后骨量丢失的研究.中国骨质疏松杂志,2000,6(3):37-47.
- [17] 王旭霞,张君.重组人生长激素对老年大鼠有无牙颌骨吸收的影响.上海口腔医学,2005,14(4):416-418.
- [18] Hock JM, Gentrella M, Calais E. IGF-1 has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology*, 1988, 122: 254.
- [19] Sakata T, Halloran BP, Elalieh HZ, et al. Skeletal unloading induces resistance to insulin like growth factor I on bone formation. *Bone*, 2003, 32: 669-680.
- [20] 李伟民,王伟,吕建国,等.胰岛素样生长因子-1对骨质疏松大鼠骨形成作用. *The Journal of Bone and Joint Injury*, 2005, 19(4): 252-254.
- [21] 宋天保,邱曙东.实用免疫组织化学技术.陕西科学技术出版社,1992.