

· 论 著 ·

降钙素对骨质疏松性骨折修复过程胶原基因表达的影响

肖强^{1*} 刘静莉² 漆启华¹ 陆欢¹ 邓亮¹ 董谢平¹

1. 江西省人民医院骨科,江西 南昌 330006

2. 南昌市洪都中医院骨科,江西 南昌 330008

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013) 11-1170-04

摘要: **目的** 探索降钙素对骨质疏松性骨折愈合过程中基质 I、II、III 型胶原 mRNA 表达的影响,阐明降钙素促进骨质疏松性骨折愈合的机制。**方法** 选用 96 只 2 个月龄 SD 雌性大鼠,64 只行双侧卵巢切除(OVX)后,随机平分为降钙素组和对照组,其余 32 只为假手术组;10 周后所有大鼠在右侧桡骨下端制作 1 mm 骨缺损的骨折愈合模型。降钙素组从骨折术前 1 w 至术后 8 w 连续每天皮下注射鲑鱼降钙素 2 IU/kg,另 2 组注射等量生理盐水。采用原位杂交技术分析 7 d,14 d,28 d,56 d,4 个时间、点降钙素对骨折修复过程中基质 I、II、III 型胶原 mRNA 表达的影响。**结果** 降钙素治疗下,骨基质 I 型胶原 mRNA 表达的量与对照组比较有显著性差异,假手术组 > 降钙素组 > 对照组;III 型胶原 mRNA 的表达变化则与之相反。降钙素组软骨性骨痂向骨性骨痂转换时间较对照组缩短。**结论** 降钙素能影响胶原 mRNA 的表达,明显促进骨质疏松性骨折的愈合。

关键词: 骨质疏松;骨折愈合;胶原基因;降钙素

Effect of calcitonin on the expression of collagen gene during the healing process of osteoporotic fractures

XIAO Qiang¹, LIU Jingli², QI Qihua¹, LU Huan¹, DENG Liang¹, DONG Xieping¹

1. Department of Orthopedics, People's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang 330006, China

2. Department of Orthopedics, Hongdu TCM Hospital of Nanchang, Nanchang 330008, China

Corresponding author: XIAO Qiang, Email: kyxq168@126.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of calcitonin on the mRNA expression of matrix type I, II, and III collagen during the healing process of osteoporotic fractures, and to illuminate the mechanism of calcitonin in promoting the healing of osteoporotic fractures. **Methods** A total of 96 2-month female SD rats were selected. Of which, 64 rats received bilateral ovariectomy (OVX), and they were randomly divided into calcitonin therapy group and control group. The other 32 rats were divided into sham operation group. Ten weeks later, all the rats made into fracture models with about 1mm width of the bone defect at the end of the right radius. Rats in the calcitonin therapy group received a subcutaneous injection of 2 IU/kg salmon calcitonin once a day from 1 week before the operation to 8 weeks after the operation. Rats in the other 2 groups were injected with same volume of normal saline. The effect of calcitonin on the mRNA expression of type I, II, and III collagen during the healing process of bone fractures was observed using in situ hybridization on the 7th, 14th, 28th, and 56th day. **Results** With the treatment of calcitonin, the expression of matrix type I collagen mRNA was significantly different to that in control groups, which indicated as sham operation group > calcitonin therapy group > control group. Whereas, the expression of type III collagen mRNA was opposite to that of type I collagen mRNA. The period in calcitonin therapy group transferring from cartilaginous callus into bony callus was shorter than that in control group. **Conclusion** Calcitonin can affect the expression of collagen RNA and promote the healing process of osteoporotic fractures obviously.

Key words: Osteoporosis; Fracture healing; Collagen gene; Calcitonin

骨质疏松症是一种全身性的代谢性骨病,以骨量减少,骨的微结构破坏为特性,导致骨的脆性增加,容易发生骨折。骨质疏松患者由于骨质量差和骨强度性低,固定困难,术后骨折延迟愈合或不愈合发生率高。如何在治疗原发病的同时促进骨折愈

合,缩短治疗周期,减少再次骨折发生率,是当前骨质疏松骨折治疗中的难点。降钙素是骨代谢研究领域的重要发现。目前,降钙素因其能抑制破骨细胞活性,抑制骨吸收且没有雌激素副作用,临床主要用于治疗骨质疏松症。近年来研究发现,降钙素还能加快骨痂形成及促进骨小梁的改建,促进骨折愈

*通讯作者:肖强, Email:kyxq168@126.com

合^[1-2]。体外实验表明降钙素能促进成骨细胞分化和增殖^[3]。但对降钙素在骨质疏松性骨折愈合过程中的作用机制尚不清楚。笔者采用原位杂交技术观察降钙素对骨质疏松性骨折愈合过程胶原基因表达的影响,从分子水平上探讨其在骨质疏松性骨折愈合过程中的调节作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物:选用健康 2 个月龄雌性 SD 大鼠 96 只,平均体重 160~200g,由江西医学院动物科提供。

1.1.2 主要试剂及药品:地高辛—D N A 标记测试剂盒购自美国 Sigma 公司。鲑鱼降钙素(商品名:密盖息)北京诺华制药有限公司提供,规格为 50IU/支。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制作和分组:96 只 SD 大鼠随机分为降钙素组、对照组和假手术组,各 32 只。前 2 组动物,以质量浓度为 25 g/L 的戊巴比妥钠溶液按 25 mg/kg 体重腹腔注射麻醉,经背侧切口进入腹腔,作双侧卵巢切除术。余下 32 只为假手术组,未行双侧卵巢切除。饲养 10 周后制成骨质疏松动物模型组和假手术组。术后标准颗粒饮食(含 1% 钙,0.6% 磷)于 20~25℃ 室温饲养。所有动物在左前肢桡骨干造成 1 mm 骨缺损的标准骨折模型,右前肢桡骨下端松质骨制作 1 mm 骨缺损的标准骨折模型,缺损区不填充任何组织,任其自行修复。两次手术均在无菌条件下进行,使用青霉素抗感染。降钙素组从骨折术前 1 周至术后 8 周连续每天皮下注射密盖息 2 IU/kg。另两组注射等量生理盐水。分别于骨折术后 7,14,28,56 天处死取骨痂组织送检。

1.2.2 方法:(1)骨痂组织病理学观察。(2)骨痂组织 I、II、III 型胶原基因表达原位杂交检测。①组织切片制备:每组分别有 8 只动物处死后,取骨痂标本迅速放入液氮中保存 1 天后,移入 -70℃ 超低温冰箱中保存。待所有动物标本取齐后,按原位杂交要求,无 RNA 酶操作将标本从超低温冰箱中全部取出置于 Corney 固定液(58% 乙醇、30% 氯仿、10% 冰醋酸、2% 甲醛),-20℃ 固定 4 小时后,置于 10% EDTA 脱钙 15 天。脱钙后 PBS(PH7.4)漂洗及修整标本,石蜡包埋,作 8 μm 连续切片 3 张。60℃ 温箱过夜后,常温保存备用。②cDNA 探针制备、标记:大鼠 I、II、III 型胶原 cDNA 探针均由芬兰 Turku 大

学 Young 博士惠赠。由上海复旦大学遗传研究所按分子生物学常规方法扩增、提取、纯化、回收 cDNA 片断。标记按试剂盒所附说明书(随机引物法)操作。③原位杂交:分别经预杂交,杂交,漂洗,显色,HE 复染,再常规脱水、透明、树胶封片后光镜观察。对照组不加探针显色对照。④对照设立 正常对照:正常皮质骨作自身对照。空白对照:相邻切片,平行操作,杂交液中不加标记探针。结果判定:阳性反应信号为胞浆中出现紫蓝色颗粒。

1.2.3 图象分析及统计学处理:将原位杂交组织切片经显微镜摄像后,显微扫描仪扫描,用计算机行图象分析。每组随机抽取 5 例切片,每份切片随机测量 5 个视野 200 倍,测视野中阳性颗粒密度面积比值。各组不同时间点胶原 mRNA 表达值行单因素方差分析,各组同一时间点行 t 检验。采用 SPSS13.0 统计软件包。

2 结果

骨折后 7,14,28,56 天 4 个时间点所取组织的切片上,各组织、细胞形态结构均较完整。大多数玻片上原位杂交信号清晰,定位良好。

骨折后第 7 天,骨痂主要由未完全机化的肉芽组织、软骨骨痂以及部分沿骨折端骨膜下形成的编织骨组成。此时 III 型胶原基因的表达占主导地位,杂交阳性颗粒广泛出现于肉芽组织的成纤维细胞样细胞中,III 型胶原基因表达的颗粒密度各组之间的差异具有统计学意义($P < 0.05$),呈对照组 > 降钙素组 > 假手术组。同时, I 型胶原 mRNA 也开始在骨折端骨膜下编织骨中的成骨细胞中出现, II 型胶原 mRNA 则在细小的软骨岛内的软骨细胞中开始表达。

第 14 天,骨折处可见纤维性骨痂及小部分软骨性骨痂,少量原始骨小梁形成。软骨特异性胶原—II 型胶原 mRNA 表达占主导地位,杂交阳性颗粒在成熟的软骨细胞中密集出现,表达达到高峰。对照组、降钙素组胶原表达的颗粒密度与假手术组比较,无统计学意义($P > 0.05$)。III 型胶原 mRNA 的表达呈现减少趋势。而 I 型前胶原 mRNA 的表达则开始增加。

第 28 天,可见软骨骨痂周边被编织骨取代,原始骨小梁逐渐改建为成熟骨小梁。其中降钙素组的骨小梁结构致密,方向一致,而对照组骨小梁稀疏,方向紊乱。原位杂交见各组均可见散在的 I 型胶原 mRNA 表达阳性的成骨细胞达到高峰。其胶原表达

的颗粒密度各组之间的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),假手术组 > 降钙素组 > 对照组,有明显差异。而Ⅱ型胶原 mRNA 表达则明显下降,颗粒密度各组之间的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),对照组 > 降钙素组 > 假手术组。

表 1 各组 I 型胶原 mRNA 阳性颗粒
面积比值 (%) ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Table 1 The ratio of the area of positive granules of
type I collagen mRNA (%) ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	手术后时间(d)			
	7d	14d	28d	56d
假手术组 ($n=8$)	1.99 ± 0.51	13.29 ± 3.16	22.71 ± 4.14	17.63 ± 3.69
对照组 ($n=8$)	2.16 ± 0.67	6.73 ± 1.34	8.14 ± 2.77	7.10 ± 1.89
降钙素组 ($n=8$)	1.73 ± 0.66	9.78 ± 3.17	14.16 ± 3.74 [#]	14.16 ± 3.74 [#]

与假手术组比较: [#] $P < 0.01$

表 2 各组 II 型胶原 mRNA 阳性颗粒
面积比值 (%) ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Table 2 The ratio of the area of positive granules
of type II collagen mRNA (%) ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	手术后时间(d)			
	7d	14d	28d	56d
假手术组 ($n=8$)	1.78 ± 0.66	8.91 ± 1.36	4.57 ± 0.43	
对照组 ($n=8$)	1.54 ± 0.71	10.73 ± 1.64 [*]	5.04 ± 1.79	
降钙素组 ($n=8$)	2.03 ± 0.56	9.11 ± 2.78	4.78 ± 0.81	

与假手术组相比 ^{*} $P > 0.05$

表 3 各组 III 型胶原 mRNA 阳性颗粒
面积比值 (%) ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Table 3 The ratio of the area of positive granules
of type III collagen mRNA (%) ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	手术后时间(d)			
	7d	14d	28d	56d
假手术组 ($n=8$)	10.77 ± 3.22	7.13 ± 2.14	4.11 ± 2.13	
对照组 ($n=8$)	39.72 ± 8.91	32.19 ± 6.17	16.17 ± 5.17	
降钙素组 ($n=8$)	21.19 ± 5.69 ^{**}	17.91 ± 4.14	8.13 ± 3.11	

与假手术组比较: ^{**} $P < 0.01$

第 56 天,假手术组和降钙素组可见软骨性骨痂逐渐被骨性骨痂取代,其骨小梁较粗、致密、排列与应力方向一致,骨化正常。对照组仍可见较多软

骨性骨痂,向骨性骨痂转化缓慢,骨小梁较细、间隙较大、结构紊乱、疏松。各组均只见到 I 型胶原 mRNA 表达,表达的颗粒密度各组之间的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),假手术组 > 降钙素组 > 对照组。

空白对照组切片,均未观察到可靠的杂交阳性细胞。

3 讨论

骨折愈合过程主要包括成骨细胞增殖、细胞外基质成熟和矿化等 3 个阶段。骨基质的 90% 由胶原组成,胶原是骨修复的重要物质基础。胶原 mRNA 表达水平决定蛋白水平胶原产生的数量,其不仅表示骨修复的质量,而且表示骨修复的速度。因此,研究骨折愈合过程中上述胶原基因表达变化是阐明骨质疏松性骨折愈合机理以及降钙素的作用机制的重要指标。

Uppel ME^[4]等研究认为, I 型胶原是促成骨细胞分化和增强成骨细胞黏附能力主要因素,是成骨细胞表型成熟和钙结节形成的骨机械力量的基本保障,是组成骨构架的基质蛋白。刺激或抑制骨痂内 I 型胶原合成能加速或延缓骨折愈合的过程。本研究发现各组 I、II、III 型胶原基因表达随骨折愈合时间变化规律基本一致,峰值与低值对应的时间点大致相同。I 型胶原峰值在伤后 4 周,这与成骨细胞将软骨转化为编织骨的时间相一致。II 型胶原峰值在伤后 2 周,而 III 型胶原在骨折后 7 天即达到高峰。各组区别在于各时间点特别是在峰值点上 I、III 型胶原基因表达量的差异。I 型胶原的表达峰值对照组明显低于假手术组,提示 I 型胶原基因表达量的差异可能是导致临床上骨质疏松性骨折愈合延迟以及易发生再骨折的重要原因^[5-6]。

降钙素是调节骨代谢的重要激素。降钙素能和破骨细胞上降钙素受体结合,抑制破骨细胞活性从而抑制骨吸收。研究表明,降钙素还能作用于成骨细胞,刺激成骨细胞增殖和分化,I 型胶原和骨保护素基因表达,也可阻止成骨细胞的凋亡,促进骨小梁的改建,促进骨折愈合^[1,2,7]。本实验通过原位杂交技术结合组织学检查,研究降钙素对骨折修复过程中基质 I、II、III 型胶原 mRNA 表达的影响。结果表明,在骨折愈合的炎性阶段,降钙素能抑制 III 型胶原 mRNA 的表达,防止过度炎症反应。在骨折愈合的修复阶段,降钙素能促进成骨细胞 I 型胶原 mRNA 的表达,抑制 II 型胶原 mRNA 表达,从而促进软骨

性骨痂向骨性骨痂转换,促进骨形成。表明降钙素在体内能作用于成骨细胞,影响胶原 mRNA 的表达,对骨质疏松性骨折愈合早期和骨折后期的骨修复均有重要促进作用。

有关降钙素调控胶原 mRNA 表达的机理尚不明确。目前对成骨细胞膜上是否存在降钙素受体,尚存争议^[8]。有学者研究认为降钙素可能是通过 ERK-MAPK 信号通路上调核心结合因子 cbfal 基因来作用于成骨细胞^[9-10]。另有学者认为其部分机制可能系降钙素促进某些细胞因子如 IGF-1 分泌,通过自分泌对成骨细胞发挥作用^[11]。降钙素是通过受体调节机制直接对成骨细胞产生作用,还是通过旁分泌方式间接作用成骨细胞,或者二者兼有,尚需进一步研究。

【 参 考 文 献 】

[1] LI Xiaolin, LUO Xinle, YU Nansheng, et al. Effects of salmon calcitonin on fracture healing in experimental osteoporotic rats [J]. Chin J Osteoporos, 2003, 9(2): 111-113.

[2] ZHANG Liu, ZHANG Long, ZHAO Wenguo, et al. Effects of calcitonin On femoral fracture healing in ovariectomized rats [J]. Chin J Osteoporos, 2007, 13(5): 330-333.

[3] ZHU Jianmin, FANG Hao, CHEN Xingang, et al. Effects of calcitonin On osteoblasts in vitro [J]. Chin J Osteoporos. 2001, 7(2): 147-148.

[4] Uppel ME, Miller LM, Burr DB. The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility [J]. Osteoporos Int.

2008; 19(9): 1251-1265.

[5] Anakwe RE, Aitken SA, Khan LA. Osteoporotic periprosthetic fractures of the femur in elderly patients; outcome after fixation with the LISS plate [J]. Injury. 2008, 39(10): 1191-1197.

[6] Gardner MJ, Nork SE, Huber P, et al. Less rigid stable fracture fixation in osteoporotic bone using locked plates with near cortical slots [J]. Injury. 2010; 41(6): 652-656.

[7] TIAN Qingxian, HUANG Gongyi, ZHOU Junlin, et al. Effects of calcitonin on osteoblast cell proliferation and OPG/RANKL expression; experiment with mouse osteoblasts [J]. Natl Med J China, 2007, 87(21): 1501-1505.

[8] U. H. Lerner. Deletions of genes encoding calcitonin/CCRP, amylin and calcitonin receptor have given new and unexpected insights into the function of calcitonin receptors and calcitonin receptor-like receptors in bone [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2006, 6(1): 87-95.

[9] ZHEN Peng-fei, DONG Zhan, WANG Jie-guo, et al. Thyrocalcitonin regulates the cbfal mRNA expression of osteoblasts via signal pathway of ERK—MAPK [J]. Journal of Clinical Medicine in Practice, 2009, 13(7): 35-38.

[10] Ge C, Xiao G, Jiang D, et al. Critical role of the extracellular signal regulated kinase MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development [J]. J Cell Biol, 2007, 176(5): 709.

[11] ZHAO Jiasheng, ZHANG Xiuzhen, HAN Junfeng, et al. Vitro study of the effects of calcitonin oR ostenhlasts and investigation of its mechanism [J]. Shanghai Medical Journal, 2004, 27(2): 112-115.

(收稿日期: 2013-06-04)

(上接第 1138 页)

[8] ZHU Hanmin, CHENG Qun, GAN Jiemin, et al. Vitamin D status in healthy man and woman in Shanghai [J]. Chinese Journal of Osteopor [J]. 2010, 3(3): 157-163.

[9] Wolf M, Shah A, Gutierrez O, et al. Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients [J]. Kidney Int, 2007, 72(8): 1004-1013.

[10] Levin A, Bakris GL, Molitch M, et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease; results of the study to evaluate early kidney disease [J]. Kidney Int, 2007, 71(1): 31-38.

[11] LV Yi-lun, LIN Ying, Shi Hao, et al. Vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease patients [J]. Chinese Journal

of Nephrology, 2009, 25(9): 668-672.

[12] Alvarez JA, Law j, Coakley KE, et al. High-dose cholecalciferol reduces parathyroid hormone in patients with early chronic kidney disease: a pilot, randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. Am J Clin Nutr, 2012, 96(3): 672-9.

[13] Slatopolsky E, Moe S. 50 years of research and discovery in chronic kidney disease and mineral & bone disorder; the central role of phosphate [J]. Kidney Int Suppl, 2011(121): S1-S2.

[14] Moranne O, Froissart M, Rossert J, et al. Timing of onset of CKD-related metabolic complications [J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(1): 164-171.

(收稿日期: 2013-01-01)

降钙素对骨质疏松性骨折修复过程胶原基因表达的影响

作者：[肖强](#)，[刘静莉](#)，[漆启华](#)，[陆欢](#)，[邓亮](#)，[董谢平](#)，[XIAO Qiang](#)，[LIU Jingli](#)，[QI Qihua](#)，[LU Huan](#)，[DENG Liang](#)，[DONG Xieping](#)

作者单位：[肖强, 漆启华, 陆欢, 邓亮, 董谢平, XIAO Qiang, QI Qihua, LU Huan, DENG Liang, DONG Xieping \(江西省人民医院骨科, 江西南昌, 330006\)](#)，[刘静莉, LIU Jingli \(南昌市洪都中医院骨科, 江西南昌, 330008\)](#)

刊名：[中国骨质疏松杂志](#)

ISTIC

Chinese Journal of Osteoporosis

英文刊名：

年，卷(期)：2013(11)

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201311013.aspx