

骨硬化蛋白单克隆抗体对于有去卵巢大鼠骨折愈合影响的实验研究

谢辉*

湖北省荆门市第一人民医院创伤手足外科,湖北 荆门 448000

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 01-0012-04

摘要: 目的 探索骨硬化蛋白单克隆抗体(Scl-Ab)对去势大鼠股骨干骨折愈合影响的实验研究。方法 30只健康雌性SD大鼠随机行假手术(Sham, $n=5$)和切除双侧卵巢(OVX, $n=25$)手术12w后每组各取5只大鼠处死取股骨行双能X线仪检测确保骨质疏松的建立,随后OVX组大鼠建立左侧股骨干中段骨折模型随机的分成2组:OVX组及骨硬化蛋白单克隆抗体治疗(Scl-Ab)组。术后第1天Scl-Ab组开始给予药物治疗:Scl-Ab皮下注射(剂量25 mg/kg,每周2次)直至8w,8w时所有大鼠处死取股骨行Micro-CT、硬组织切片检测及HE组织切片检测。结果 Micro-CT结果显示:Scl-Ab组和OVX组相比,骨折端有较多的新生骨形成,且有较高BV/TV、Tb.Th、Tb.N和较低的Tb.Sp值,比较有明显的统计学意义。HE结果表明Scl-Ab组骨折端有更多的骨痂形成,且骨痂更加成熟。硬组织切片观察结果表明:Scl-Ab组骨折端骨痂矿化速度更快,和OVX组表明有统计学意义。结论 Scl-Ab通过增加骨折端骨量及促进骨组织矿化来治疗去卵巢大鼠股骨中段骨折的愈合。

关键词: 去势大鼠;骨质疏松性骨折;骨硬化蛋白单克隆抗体;骨矿化

The experimental study of effect of sclerostin antibody on fracture healing in ovariectomized rats

XIE Hui*

Department of Orthopedic Surgery, the First People's Hospital, Jingmen 44800, China

Corresponding author: XIE Hui, Email:1474888701@qq.com

Abstract: Objective This study was designed to investigate the effect of sclerostin-antibody (Scl-Ab) on the healing of femoral shaft fracture in OVX rats. **Methods** Thirty healthy female SD rats were randomly performed bilateral ovariectomy ($n=25$) or sham operation ($n=5$). In 12 weeks, 5 rats from each group were sacrificed. The femurs of the rats were collected for BMD evaluation to confirm the establishment of osteoporotic animal model. The left femoral shaft closed fracture model was created in all OVX rats. The rats were randomly divided into 2 groups: OVX group and Scl-Ab group. Rats in Scl-Ab group received 25 mg/kg of Scl-Ab, 2 times a week, for 8 weeks. The femurs of the rats were harvested and were evaluated with micro-computerized tomography. The undecalcified slices were observed with HE staining. **Results** Comparison with OVX group, more new bone formed in the fracture region in Scl-Ab group. BV/TV, Tb.Th, and Tb.N were higher, but Tb.Sp was lower in Scl-Ab group than those in OVX group. The results of HE staining showed that more callus formed and the callus was mature in Scl-Ab group. The observation of the undecalcified slices showed that the mineralization of the callus was faster in Scl-Ab group than in OVX group. **Conclusion** Scl-Ab can heal femoral shaft closed fractures by increasing bone mass and mineralization.

Key words: OVX rats, Osteoporotic fractures, Sclerostin antibody, Mineralization

骨质疏松骨折已经成为公共卫生问题,约有40%~50%的女性和13%~22%的男性一生中会出现骨质疏松骨折,防治骨质疏松对临床医生来说是一项巨大的挑战^[1]。由于低骨密度(BMD),骨强度降低,骨组织脆性增加,骨质疏松性骨折延迟愈合,不愈合等并发症的风险明显增高^[2]。经典Wnt信

号/β-联蛋白途径在骨折的愈合中发挥重要的作用已被人们熟知,骨硬化蛋白(Scl),是由Wnt信号通路传导中骨细胞分泌的糖蛋白的抑制剂,已被证明是骨量和骨形成的关键负调节物^[3]。最近的研究^[4]表明,骨硬化蛋白单克隆抗体(Scl-Ab)有助于增加去卵巢(OVX)大鼠的骨量。综上所述,我们假设,Scl-Ab也可能有助于骨折部位增加骨量,骨强度和骨形成促进OVX大鼠骨折的愈合。

*通讯作者: 谢辉, Email:1474888701@qq.com

本研究通过使用骨硬化蛋白单克隆抗体来治疗去卵巢大鼠股骨干骨折,观察其疗效,为临床上此抗体的使用提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

骨硬化蛋白单克隆抗体(MSD公司),Micro-CT(SkyScan1176,荷兰),手术操作器械(美国史塞克医疗器械公司)。钙黄绿素(sigma,美国),硬组织切片器(EXAKT300,德国),显微镜(ZEISS Axio Imager M1,德国),Image-Pro Plus全自动图像分析仪(Media Cybernetics,美国),骨密度测量仪(法国DMS公司,Lexxos)。

1.2 方法

1.2.1 骨质疏松动物模型的建立:30只健康的雌性Sprague-Dawley大鼠(3月龄,体重220~240g。由上海实验动物中心提供)用于去卵巢(OVX, $n=25$)制作骨质疏松模型和假手术(Sham, $n=5$)。手术开始前,所有大鼠称重,根据体重,适量腹腔注射10%水合氯醛(3 mL/kg)进行麻醉,麻醉成功后,于大鼠背部正中线下中下1/3处作一长约2 cm纵行切口,向两侧钝性分离皮下软组织,于脊柱旁开0.5 cm处钝性分开肌肉组织,显露卵巢脂肪包被组织,轻轻提起卵巢,于输卵管卵巢交界处丝线结扎,完整摘除双侧卵巢,逐层缝合,关闭创口。

1.2.2 股骨干骨折模型的建立:适量腹腔注射10%水合氯醛(3 mL/kg)进行麻醉,麻醉成功后,常规消毒,取左下肢髌骨外侧缘纵行切口,长约1 cm,逐层切开皮肤及部分股四头肌腱性组织,屈曲膝关节并向内侧脱位髌骨,充分显露股骨髁间凹。从股骨髁间凹处逆行插入1根5 mL注射器针头沿髓腔至股骨粗隆间。剪断多余的针头,并将其远端埋于股骨髁间骨皮质下。碘伏及生理盐水反复冲洗切口后,使用3~0丝线逐层缝合切口。将动物左下肢外展内旋位固定于造模支架上,通过三点弯曲实验的原理打击大腿中部,致股骨中断横行骨折。

1.2.3 术后护理及药物治疗:术后前3 d给予青霉素肌肉注射(2.5万U/kg)预防感染。正常环境下饲养12 w后各组取5只大鼠处死股骨行骨密度测量仪检测来检验骨质疏松建立模型建立情况。随后所有的去卵巢(OVX)大鼠随机的分成两组:OVX组、Scl-Ab组。术后第1天开始给予药物治疗:Scl-Ab组:Scl-Ab皮下注射(剂量25 mg/kg,每w 2次),OVX组注射相同剂量的生理盐水,直至8 w,每周称

大鼠体重,根据体重变化来调整药物剂量。所有大鼠在处死前第13天以及处死前第3天,分别腹腔内注射15 mg/kg剂量的钙黄绿素。本实验所使用的药物剂量参考以前发表的治疗骨质疏松效果明显的文献中所使用剂量^[5]。

1.2.4 Micro-CT检测:将骨折术后8w股骨标本置于扫描床上,扫描参数设置:电压50 kV,电流500 μ A,扫描方式为360°旋转,曝光时间250 ms,图像平面分辨率1024×1024。每次扫描约持续10 min,扫描完成后,选择圆柱形的骨折区域为感兴趣区(region of interest, ROI),得到骨折端新生骨组织的三维图像,并用Micro-CT内置软件(CT An software)进行定量分析,获得大鼠骨折区域骨微结构参数骨体积分数(bone volume/total volume, BV/TV)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th)、骨小梁数量(trabeculae number, Tb. N)、骨小梁分离度(trabecular spacing, Tb. Sp)。

1.2.5 骨折处组织切片:待所有股骨经过Micro-CT检测后,去掉股骨内置针头后,部分标本用4%多聚甲醛固定,梯度酒精脱水,甲基丙烯酸甲酯包埋。包埋块修整后置于硬组织切片器沿胫骨纵轴冠状面切片,清洗打磨抛光,切片最终厚度约为30~40 μ m,切片在荧光显微镜及Image-Pro Plus 6.0全自动图像分析仪对骨矿化沉积率(MAR)进行计算。剩下的部分标本放置在EDTA脱钙液中浸泡,每3~4天换液1次,连续脱钙4 w,X线检测是否脱钙完全,然后充分水洗,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,HE染色,OLYMPUS BX51多功能显微镜下观察新生骨生长情况,骨小梁的微观结构及分布。

1.3 统计学处理

计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用SPSS 19.0统计学软件进行分析,2组计量资料采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 手术对大鼠的影响

截止到实验截止时间,有2只大鼠由于手术不当、麻醉不当和伤口感染死亡,它们其中1只属于OVX组,一只属于Scl-Ab,最终共有18只去势大鼠进入最终试验结果评估。术后12 w时两组大鼠股骨的骨密度变化骨密度测量仪检测所得,Sham组大鼠的股骨骨密度为 233.21 ± 29.78 mg/cm²,而OVX组大鼠股骨骨密度为 167.24 ± 27.31 mg/cm²。相对Sham

组,OVX组大鼠的骨密度下降42.59% ($P < 0.05$),结果表明我们的骨质疏松模型建立是成功的。

2.2 Micro-CT 图片及骨微观参数检测

我们通过 Micro-CT 对骨折端感兴趣区域进行扫描的结果如图1所示,通过内置软件计算的骨微观参数如表1所示。我们可以通过观察图1明显的发现相对而言 Scl-Ab 组骨小梁的数量明显多于 OVX 组,而且骨小梁联系紧密,骨小梁更粗。骨微观参数更加明显的表明 Scl-Ab 组有最高的 BV/TV、Tb. Th、Tb. N 和最低 Tb. Sp,而 OVX 组有最高的 Tb. Sp 和最低 BV/TV、Tb. Th、Tb. N。和 OVX 组比较,Scl-Ab 组骨微观参数有明显的统计学意义,这些表明联合使用 Scl-Ab 可以明显增加去卵巢大鼠骨折端新生骨组织的生成,加速骨折的愈合。

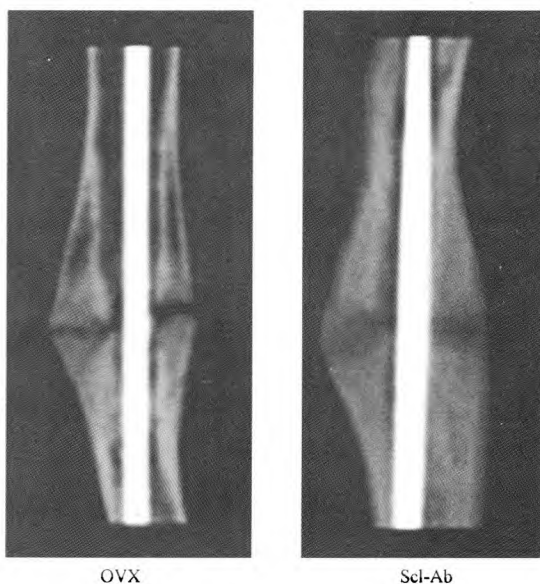


图1 药物治疗8w时OVX组及Scl-Ab组大鼠股骨干骨折端Micro-CT扫描结果

Fig.1 Micro-CT results of the femoral shaft fracture site in OVX and Scl-Ab group after 8 weeks of the treatment

表1 骨折术后8w时,各组大鼠左侧股骨干骨折区感兴趣区域骨微观参数($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Parameters of the interested region of the fracture zone in the left femurs of each group after 8 weeks of the treatment ($\bar{x} \pm s$)

Parameter	Scl-Ab	OVX
Tb. N	3.234 ± 0.115 *	2.124 ± 0.090
Tb. Th	0.198 ± 0.016 *	0.118 ± 0.011
BV/TV	0.534 ± 0.013 *	0.178 ± 0.016
Tb. Sp	0.412 ± 0.037 *	0.657 ± 0.129

注:与OVX组比较。* $P < 0.05$

2.3 组织切片观察结果

大鼠左侧股骨切片经过 HE 染色结果如图2.A所示,我们可以清楚发现 Scl-Ab 组骨折处新生骨的量远远大于 OVX 组,且新生骨之间联系紧密,排列有规律,这表明 Scl-Ab 明显加速骨折端新生骨组织的形成,HE 切片的观察结果进一步证实 Micro-CT 的结果。荧光共聚焦显微镜的观察的结果如图2.B所示,通过 Image-Pro Plus 6.0 计算 OVX 组、Scl-Ab 组骨矿化沉积率 (MAR) 结果如下: 0.80 ± 0.09 、 1.56 ± 0.10 ;通过 SPSS 软件统计表明各组之间有统计学意义 ($P < 0.05$),这表明联合使用 Scl-Ab 可以加速骨折端新生骨组织的矿化。

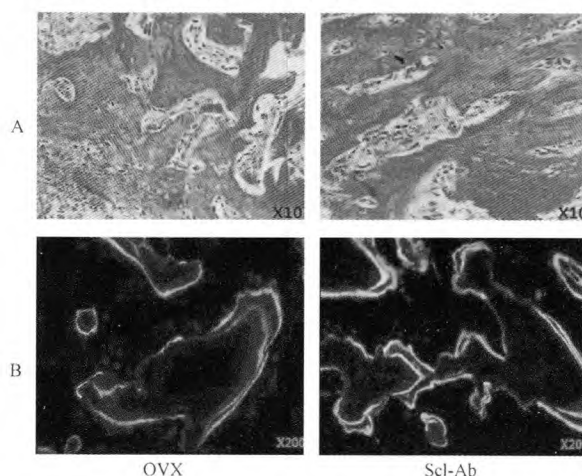


图2 A. 药物治疗8周时OVX组及Scl-Ab组骨痂HE染色切片
B. 药物治疗8周时OVX组及Scl-Ab组骨痂矿化情况

Fig.2 A. HE staining in OVX and Scl-Ab group after 8 weeks of the treatment
B. Mineralization of the callus in OVX and Scl-Ab group after 8 weeks of the treatment

3 讨论

本研究通过去卵巢手术来建立骨质疏松模型,正常状况下饲养3月后通过检测股骨骨密度变化情况来确保骨质疏松建立是成功的;随后通过三点弯曲原理建立闭合股骨中断横行骨折,通过使用 Scl-Ab 来治疗去卵巢诱导的骨质疏松骨折,Scl-Ab 使用8w后处死大鼠取股骨行 Micro-CT、硬组织切片等评估;我们的实验结果表明 Scl-Ab 可以明显增加去卵巢大鼠股骨干骨折处新生骨组织的生成,加速骨折的愈合以及骨质的矿化。

本实验主要研究的是原发性骨质疏松状态下的骨折,原发性骨质疏松分为绝经后骨质疏松和老年性骨质疏松。绝经后骨质疏松主要由于雌激素的不足,因此,骨形成较快,但破骨更快,属于高转化型。老年型骨质疏松,骨量丢失较慢,属于低转化型^[6]。但无论哪种骨质疏松症,骨形成和骨吸收的平衡打破了,都将影响骨质最终导致一系列的病理性骨折如做常见的骨质疏松骨折,因此其骨折愈合能力大大下降。目前可以促进骨质疏松骨折愈合的药物繁多,但均存在各自的局限性。虽然双膦酸盐类、甲状旁腺素类药、地诺单抗在治疗骨质疏松骨折中都有不错的疗效,但是常常会出现一些不利因素影响其临床应用,如双膦酸盐类人体吸收率低,不适用于有血栓栓塞性疾病或肾功能不全者^[7];地诺单抗使用时出现下颌骨坏死率^[8];甲状旁腺素皮下注射,应用不便,且不可用于骨骺线尚未闭合的青少年患者^[7]。

本实验选用的治疗骨质疏松骨折的药物 Scl-Ab 在治疗骨质疏松症也有着不错的效果,是目前治疗骨质疏松症一种非常有潜力的一种药物^[4]。Scl 是由 SOST 基因编码,具有通过 Wnt 通路负向调节骨形态发生蛋白活动及骨代谢,是导致骨质疏松的原因之一。Scl-Ab 可以拮抗骨硬化蛋白对骨形成的负向调节作用,在抑制骨量丢失的同时促进骨生成。在本实验中的 Scl-Ab 组 8w 时,可以看见大量排列整齐且成熟的编织骨形成,且骨组织之间联系紧密,而 OVX 组股骨干骨折处新生骨组织排列紊乱稀疏,且骨组织之间联系不紧密。同时,本试验还利用 Micro-CT 测定各组的新骨围观, Scl-Ab 组的新骨密度要明显高于 OVX 组 ($P < 0.05$)。通过 Micro-CT 对骨微观结构的观察中,发现 Scl-Ab 组与 OVX 组比较中,在骨小梁体积分数 (BV/TV)、骨小梁厚度 (Tb. Th)、骨小梁数量 (Tb. N) 都增高 (均 $P < 0.05$),骨小梁分离度 (Tb. Sp) 降低 ($P < 0.05$),表明 Scl-Ab 在增加骨折端骨量的同时也改善了骨质量。硬组织切片进一步证实 Micro-CT 的结果,同时

我们发现 Scl-Ab 明显可以加速新生骨组织的矿化,增加骨质强度。

本次试验也有其局限性,首先我们实验使用的大鼠数量有限,且时间较短,8w 之后动物骨质疏松的具体情况不知。我们没有从生化角度进一步观察 Scl-Ab 加速骨折愈合的具体改变,同时也没有进一步探索机制。但是这次试验从体内很好的证实 Scl-Ab 可以促进骨折端骨量的增加、加速骨组织的矿化及加速骨质疏松骨折的愈合,为其在临床上骨质疏松骨折的愈合治疗使用提供了理论基础。

【参 考 文 献】

- [1] Johnell O, Kanis J. Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporosis International*, 2005, 16, Suppl 2 (2 Supplement): S3-S7.
- [2] Ring D, Kloen P, Kadzielski J, et al. Locking compression plates for osteoporotic nonunions of the diaphyseal humerus. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 2004, 425 (425): 50-54.
- [3] Kamiya N, Ye L, Kobayashi T, et al. BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical Wnt pathway. *Development*, 2008, 135(22): 3801-3811.
- [4] Li X, Ominsky MS, Warmington KS, et al. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Bone & Mineral Research*, 2009, 24(4): 578-588.
- [5] Yao W, Dai W, Jiang L, et al. Sclerostin-antibody treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis maintained bone mass and strength. *Osteoporosis International*, 2015, 27(1): 1-12.
- [6] 刘学军. 骨质疏松症. *中国矫形外科杂志*, 2006, 14(21): 1668-1670.
Liu XJ. *Osteoporosis, Chinese Journal of Orthopaedic Surgery*, 2006, 14 (21): 1668-1670.
- [7] Warriner AH, Saag KG. Osteoporosis diagnosis and medical treatment. *Orthopedic Clinics of North America*, 2013, 44(2): 125-135.
- [8] Yee AJ, Raje NS. Denosumab, a RANK ligand inhibitor, for the management of bone loss in cancer patients. *Clinical Interventions in Aging*, 2012, 7(12): 331-338.

(收稿日期:2016-06-08;修回日期:2016-08-05)