

· 论 著 ·

降钙素基因相关肽在去势联合 I/R 大鼠海马和骨组织中表达的关联性研究

陈国立^{1,2*} 吴献伟² 胡洪新² 林海滨²

1. 莆田学院临床医学院, 福建 莆田 351100

2. 莆田学院附属医院, 福建 莆田 351100

中图分类号: R580 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 12-1760-05

摘要: **目的** 探讨降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)在去势大鼠合并脑缺血再灌注(I/R)中的损伤海马与骨质疏松股骨头中的跨种属组织关联性现象。**方法** 建立去势大鼠模型后,采用线栓法建立短暂性右侧大脑中动脉闭塞海马损伤(I/R)模型,随机将大鼠分为正常组、假手术组、去势组、I/R组和去势合并I/R组。20 d后通过HE染色法观察海马和股骨头组织病理形态学的变化情况,通过ELISA测定血清、海马及股骨头组织中CGRP表达。**结果** 与正常组相比,去势组、I/R组和合并组骨血清CGRP水平均明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$);与正常组相比,I/R组和合并组中海马CGRP水平明显上升($P<0.05$);与正常组相比,去势组和合并组中骨组织CGRP水平明显升高($P<0.05$);与正常组相比,I/R组、合并组海马神经元排列杂乱无序,层次混乱,形态异常,细胞数较正常组显著降低($P<0.05$);与正常组相比,去势组成骨细胞数明显下降($P<0.05$)。**结论** CGRP在去势联合I/R大鼠中的海马和骨组织表达具有正相关性,CGRP介导了神经系统参与骨组织代谢的调节、骨修复与改建,具有跨种属促进改善骨质疏松的作用。

关键词: 降钙素基因相关肽;骨质疏松;脑缺血再灌注(I/R);去势;海马;股骨头

Correlation between calcitonin gene-related peptide expression in hippocampus and bone tissue of castration combined with I/R rats

CHEN Guoli^{1,2*}, WU Xiangwei², HU Hongxin², LIN Haibin²

1. Department of Basic Clinical Medicine, Medical College of Putian, University, Putian 351100

2. The Affiliated Hospital of Putian University, Putian 351100, China

* Corresponding author: CHEN Guoli, Email: gglchen@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the association of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cross-species tissue in injured hippocampus and osteoporotic femoral head in castrated rats with cerebral ischemia-reperfusion (I/R) phenomenon. **Methods** After establishing a castrated rat model, a transient right middle cerebral artery occlusion model was established by wire bolting. The rats were randomly divided into normal group, sham operation group, castration group, I/R group and castration combined with I/R group. After 15 days, HE staining was used to observe the pathological changes of hippocampus and femoral head tissues, and the expression of CGRP in serum, hippocampus and femoral head tissues was determined by ELISA. **Results** The levels of CGRP in the serum were significantly decreased in the castration group, the I/R group and the combined group compared with the normal group ($P<0.05$). The levels of CGRP in the hippocampus tissue were significantly increased in the I/R group and the combined group compared with the normal group ($P<0.05$). The levels of CGRP in the femoral head tissue were significantly decreased in the castration and the combined group compared with the normal group ($P<0.05$). Compared with the normal group, the hippocampal neurons in the I/R group and the combined group were disordered, had confusing levels and abnormal morphology, and significantly lower cell number ($P<0.05$). The number of osteoblasts in the castration group decreased significantly compared with the normal group ($P<0.05$). **Conclusion** CGRP has a positive correlation between hippocampus and bone tissue expression in castration

基金项目: 福建省中青年教师教育科研项目(JAT170517)

* 通信作者: 陈国立, Email: gglchen@163.com

combined with I/R rats. CGRP mediates the involvement of the nervous system in bone tissue metabolism, bone repair and reconstruction, and has the effect of cross-species promotion to improve osteoporosis.

Key words: CGRP; osteoporosis; ischemia-reperfusion; hippocampus; ovariectomized; femoral head

神经系统日常广泛支配和调节机体各器官组织的代谢和功能需要,而神经因素对骨生长和骨组织代谢的直接性调节在临床观察中已得到验证。临床实验研究中发现合并脑外伤的骨愈合时间要比无脑外伤的骨愈合时间缩短^[1],其结果显示脑的不同部位组织成分呈现不同强度的成骨作用^[2],提示神经系统通过某种通路或者几种调节途径参与骨修复和再生过程。而降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是目前已知的神经肽类中既在中枢神经系统分布,又在骨髓、骨膜及骨髓等骨组织代谢活跃的地方均存在广泛分布。神经肽参与骨愈合已是热门的研究,但在文献检索中少见海马损伤组织检测与骨损伤修复因子的相关性报道。本研究将采用去卵巢大鼠联合缺血再灌注(I/R)中的海马组织和股骨头组织中 CGRP 作为观察指标,探讨 CGRP 对于各组大鼠损伤海马和改善股骨头骨质疏松的关联性机制。

1 材料与方法

1.1 大鼠去势联合 I/R 模型的建立

选用 50 只 4 月龄 SD 雌性大鼠,由福州吴氏动物中心提供(闽实动质准第 2014-0 005 号),体重(280±20)g。50 天后采用大鼠大脑中动脉线栓法建立大鼠的海马损伤(I/R)动物模型,随机分为对照组、假手术组、去势组、单纯 I/R 组、去势合并 I/R 组(合并组)五组,每组 10 只。对照组大鼠自由进食饮水,去势组切除大鼠双侧卵巢,假手术组切除等质量的腹部同部位周围的小块脂肪组织。每组手术后 20 天,观察各组大鼠相关指标变化情况。

1.2 血清 CGRP 活性检测

在 10%水合氯醛麻醉后进行静脉采血,静置 2 h,3 500 r/min,低温离心 15 min。采用 BMP-4ELISA 检测试剂盒(R&D 公司)吸取上清液,通过酶标仪(BioTek, USA)检测血清 CGRP。选择酶联免疫吸附法检测 CGRP 表达水平,所有操作均严格参照说明书执行。

1.3 海马组织 CGRP 活性变化

海马组织取材:经水合氯醛麻醉后用生理盐水低温灌注,断头取脑,钝性分离海马组织,预冷双蒸水冲洗,冰浴下制成匀浆。3 000 r/min 低温离心 15

min,取上清液,-20℃保存待测。采用放射免疫分析法(北京普尔伟业生物科技)测定 CGRP 含量,严格按试剂盒说明书具体步骤进行。

1.4 海马结构组织学观察

将每组的 10 只大鼠经麻醉后断头取脑,脱水浸蜡包埋,作连续冠状 4 μm 厚切片,HE 染色,显微镜(日本 Olympus BX51T-PHD-J11)下观察,镜下拍照采集。高倍镜下的海马 CA₁ 神经元,细胞结构典型、着色清晰的计为生存的锥体神经元,密度表示为 CA₁ 区 250 μm 长度内神经元数量。

1.5 股骨头组织 CGRP 活性变化

股骨头组织匀浆 CGRP 含量检测:取左侧股骨头吸去血迹,称重后制成匀浆,3 000 r/min,4℃低温离心 15 min,取上清,在-20℃以下保存。测定前 1:5 倍稀释,取其上清液测 CGRP 值,检测步骤严格按说明书进行。

1.6 股骨头结构组织学观察

麻醉后取股骨,用 4%多聚甲醛固定,进行脱水脱脂脱钙处理,制成蜡块,连续切片(厚度 4 μm)。用苏木精伊红(HE)染色,在镜下拍照采集存盘。随机选取,在高倍镜视野下观察成骨细胞分布,每一视野内定位软骨下区测定结果取平均值,求其所占的百分数。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行分析,连续型变量均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间数据比较用 *t* 检验;多组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.01$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 CGRP 活性变化

与正常组相比,假手术组血清 CGRP 水平没有出现明显改变。去势组、I/R 组和合并组血清 CGRP 水平明显下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 海马 CGRP 活性变化

与正常组相比,假手术组、去势组海马 CGRP 水平没有出现明显改变。I/R 组、合并组海马 CGRP 水平明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 各组大鼠血清降钙素基因相关肽含量的比较 (pg/mg)
Table 1 Comparison of serum calcitonin gene-related peptide levels in rats (pg/mg)

组别	均数±标准差	P_2 值
对照组	62.47±2.89	—
假手术组	65.57±2.64	0.052
去势组	36.75±2.31	<0.001
I/R 组	43.22±3.01	<0.001
合并组	47.43±2.90	<0.001
F 值	203.31	—
P_1 值	<0.001	—

注: P_1 为方差分析的 P 值, P_2 为对照组与其他组分别两两比较的 P 值。

表 2 各组大鼠海马降钙素基因相关肽含量的比较 (pg/mg)
Table 2 Comparison of calcitonin gene-related peptides in hippocampus of each group (pg/mg)

组别	均数±标准差	P_2 值
对照组	9.56±1.92	—
假手术组	8.78±1.47	0.890
去势组	10.05±2.31	0.977
I/R 组	13.82±3.62	0.001
合并组	14.49±2.521	<0.001
F 值	11.20	—
P_1 值	<0.001	—

注: P_1 为方差分析的 P 值, P_2 为对照组与其他组分别两两比较的 P 值。

2.3 股骨头组织 CGRP 活性变化

与正常组相比,假手术组、I/R 组股骨头 CGRP 水平没有出现明显改变。去势组和合并组中股骨头 CGRP 水平明显升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠股骨头降钙素基因相关肽含量的比较 (pg/mg)

Table 3 Comparison of calcitonin gene-related peptide levels in femoral head of rats in each group

组别	均数±标准差	P_2 值
对照组	119.55±3.08	—
假手术组	121.62±3.17	0.718
去势组	170.45±5.67	<0.001
I/R 组	132.73±5.28	<0.001
合并组	178.87±5.41	<0.001
F 值	360.72	—
P_1 值	<0.001	—

注: P_1 为方差分析的 P 值, P_2 为对照组与其他组分别两两比较的 P 值。

2.4 海马组织计量学指标比较

2.4.1 海马结构组织学观察:正常组(图 1A)海马 CA₁ 区椎体细胞排列均匀有序;细胞形态结构典型,染色清晰丰富。假手术组细胞整齐,神经元细胞近似正常(图 1B)。去势组海马区神经细胞结构清晰完整,结构正常排列有序(图 1C)。在 I/R 组中,海马区色泽较假手术组苍白,神经元排列散乱,细胞减少,细胞大多呈现固缩深染,异染色质聚集(图 1D)。合并组海马变薄,组织水肿,着色变浅,海马区细胞分布及形态紊乱加重,细胞减少,部分神经元细胞膜内陷成泡状,胞质内出现大片空亮区,大部分细胞核固缩、破碎(图 1E)。

2.4.2 海马组织统计学结果:与正常组相比,假手术组、去势组的生存神经元细胞数比较差异无统计学意义。I/R 组、合并组海马神经元细胞数较正常组显著降低 ($P < 0.01$),差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

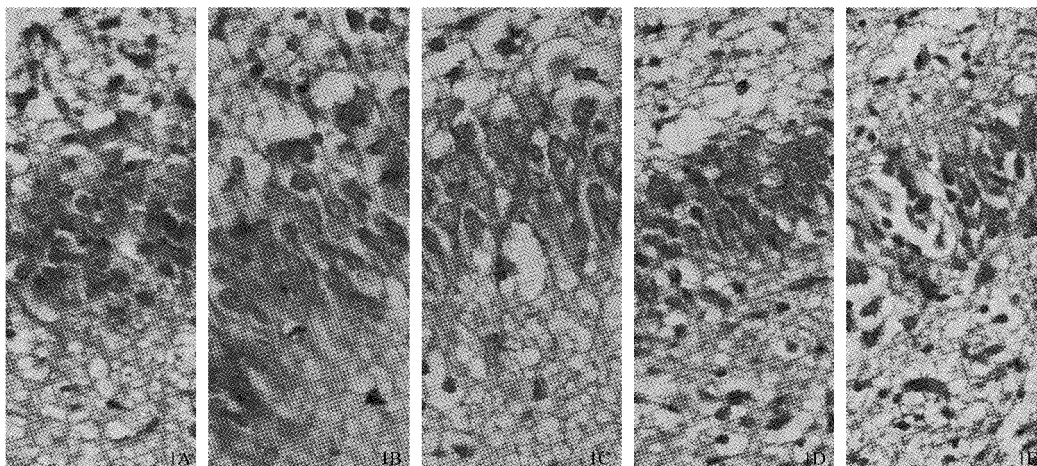


图 1 正常组、假手术组、去势组、I/R 组、合并组海马椎体细胞形态结构特点 (HE 染色)

Fig.1 Morphological and structural characteristics of hippocampal vertebral cells in normal group, sham operation group, castration group, I/R group and castration combined with I/R group (HE staining)

表 4 各组大鼠海马内生存细胞数的比较(长度 250 μm)**Table 4** Comparison of the number of surviving cells in the hippocampus of each group (length 250 μm)

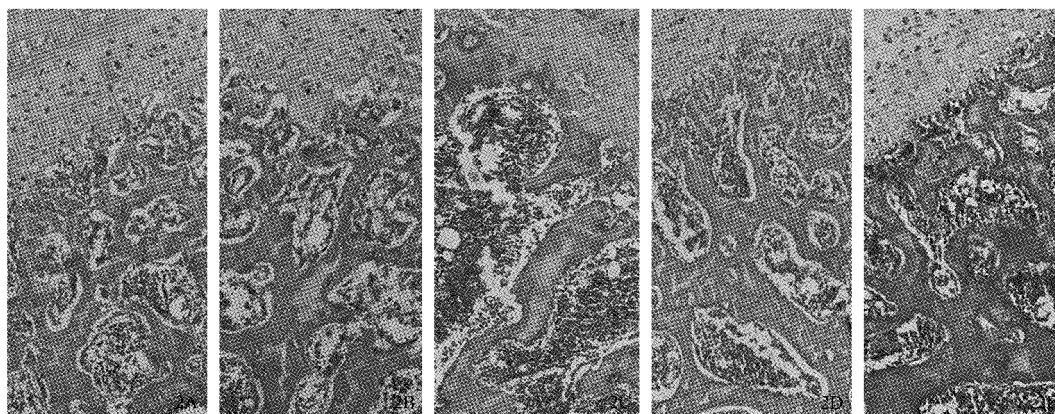
组别	均数 $\pm$ 标准差	P_2 值
对照组	140.49 $\pm$ 6.42	-
假手术组	149.61 $\pm$ 8.16	0.659
去势组	124.93 $\pm$ 39.50	0.214
I/R 组	101.43 $\pm$ 7.18	<0.001
合并组	79.30 $\pm$ 8.40	<0.001
F 值	23.18	-
P_1 值	<0.001	-

注: P_1 为方差分析的 P 值, P_2 为对照组与其他组分别两两比较的 P 值。

2.5 骨组织形态学比较比较

2.5.1 骨组织学观察:正常组股骨头软骨下区骨小梁粗大,整齐(图 2A);假手术组骨小梁较厚(图 2B);去势组骨小梁变细变薄,块状缺失(图 2C);I/R 组骨小梁变薄、排列稀疏(图 2D);合并组软骨下区骨小梁整齐有序,可见成骨细胞与新生的骨小梁(初级骨小梁)以及骨髓组织(图 2E)。

2.5.2 骨组织统计学结果:与正常组(14.55 $\pm$ 3.05)相比,假手术组(15.57 $\pm$ 2.75)、I/R 组(14.81 $\pm$ 2.48)和合并组(12.06 $\pm$ 3.14)成骨细胞数没有出现明显改变。去势组(8.80 $\pm$ 1.89)成骨细胞数明显下降,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 5。

**图 2** 正常组、假手术组、去势组、I/R 组、合并组大鼠股骨头软骨下区组织结构特点(HE 染色)**Fig.2** Tissue structure characteristics of femoral head subchondral area in normal group, sham operation group, castration group, I/R group and combined group (HE staining)**表 5** 各组大鼠股骨头成骨细胞数的比较**Table 5** Comparison of the number of osteoblasts in the femoral head of each group

组别	均数 $\pm$ 标准差	F 值	P_1 值	P_2 值
对照组	14.55 $\pm$ 3.05	10.53	<0.001	
假手术组	15.57 $\pm$ 2.75			0.813
去势组	8.80 $\pm$ 1.89			<0.001
I/R 组	14.81 $\pm$ 2.48			0.998
合并组	12.06 $\pm$ 3.14			0.139

备注: P_1 表示方差分析的 P 值, P_2 表示对照组与其他组分别两两比较的 P 值。

3 讨论

CGRP 是既与中枢神经调节又与成骨关系最密切的一种内源性神经肽,是一种具有强大诱导成骨活性的神经肽。神经肽通过调节成骨细胞和破骨细胞功能,在骨组织的正常代谢、重建、骨损伤修复及愈合过程中发挥极其重要的作用。

本研究显示 I/R 组和合并组海马在缺氧、缺血情况下 CGRP 水平明显升高,提示 CGRP 对海马损伤反应有神经保护作用。海马是中枢神经系统对缺氧最敏感的结构之一,正常大鼠海马 CGRP 弱表达,脑缺血后 CGRP 表达可应激性增强^[3]。CGRP 在海马组织中表达的强弱在一定程度上可反映其缺血-再灌注损伤的程度,缺血、缺氧时 CGRP 通过维持海马神经元的细胞内 Ca^{2+} 稳态,抑制海马神经元内钙超载,降低细胞的死亡率,降低海马神经元对缺血、缺氧的易感性,对缺氧区域损伤的神经元达到保护作用,以延缓缺氧导致的不可逆的损伤^[4]。CGRP 是到目前为止发现的最强的内源性扩血管肽,能刺激血管内皮细胞增殖,通过舒张血管以及对神经元直接的营养作用等^[5],促进海马神经元的生长发育。CGRP 的分布和表达变化是神经系统对损伤及免疫反应的一种重要的调节因素。

在骨组织中, CGRP 主要分布在靠近骨膜、干骺端及骺板等生长活跃的位置, 只要机体 CGRP 发生改变就可以刺激成骨细胞, 间接刺激成骨活性, 影响成骨效应^[6]。本研究中大鼠卵巢切除后雌激素缺乏所诱发的股骨头骨质疏松状态, 近似妇女绝经后雌激素缺乏引起雌激素受体激活受限发生的骨丢失。骨质疏松症是指骨矿成分和骨基质等减少, 引起骨小梁的微型骨折, 其修复过程就是骨形成及骨折愈合的过程^[7]。本研究所涉及的股骨头组织内 CGRP 升高是通过增加骨质疏松局部血流量来增强骨代谢, 通过成骨信号通路促进骨组织代谢及创伤修复过程^[8-9], CGRP 在成骨细胞的增殖与分化中起着促进作用。

实验显示去势组、I/R 组和合并组三个模型组中血清 CGRP 含量明显降低。血清中 CGRP 水平下调可能是去势引起的雌激素下降以及引起脑损伤的缺血、缺氧所致的全身性反应。I/R 组和合并组海马组织中 CGRP 活性提高, 而去势组、合并组组织内 CGRP 活性提高, 是对损伤组织如海马和骨组织的保护性机制反馈。局部损伤应激性的 CGRP 活性升高, 而此时全身整体的 CGRP 活性如血清中 CGRP 含量明显降低。研究表明 CGRP 含量的检测有助于判断是否出现了脑损伤。同时在海马缺氧的情况下, 海马组织保护性产生的 CGRP 能够通过与其受体结合, 参与骨的生长、修复和重建^[10]。作为神经递质的 CGRP 具有显著促进成骨细胞增殖的能力。本实验结果提示海马损伤时, 海马内固有成分 CGRP 等释放入血液而引起促进周围骨损伤加速愈合机制的可能性, CGRP 是海马损伤后参与骨修复加速的相关因子, 海马组织能跨种属促进大鼠成骨细胞的增殖。即海马损伤或组织改变从而促进骨骼代谢和骨修复。

在雌激素与雌激素受体主导下, 雌激素信号通路是连接海马和骨骼的重要通道。神经-内分泌调控着女性的生殖, 还参与调控女性的骨代谢。既通过骨组织调节骨代谢平衡, 又通过海马神经元等相关神经活动, 达到神经调节和神经保护等作用^[11-13]。缺血、缺氧海马组织诱发大鼠海马 CGRP 活性增强, CGRP 在海马损伤后参与了伤害性信息的传递过程, 同时介导了神经系统参与骨组织代谢

的调节、骨修复与改建。

【参 考 文 献】

- [1] da Paz AC, Carod Artal FJ, Kalil RK. The function of proprioceptors in bone organization: a possible explanation for neurogenic heterotopic ossification in patients with neurological damage[J]. *Med Hypotheses*, 2007, 68(1): 67-73.
- [2] Giarmoudis PV, Mushtaq S, Harwood P, et al. Accelerated bone healing and excessive callus formation in patients with femoral fracture and head injury[J]. *Injury*, 2006, 37(Suppl 3): 18-24.
- [3] 姜晓丹, 徐如祥, 谭盛, 等. 大鼠大脑缺血再灌注中 PMNs 对脑组织 CGRP 表达及损伤程度的影响[J]. *中国临床神经科学*, 2001, 9(4): 341-344.
- [4] Deruz BJ, Fertig KC, Filiano AJ, et al. Hypothermic reperfusion after cardiac arrest augments brain-derived neurotrophic factor activation[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(7): 843-851.
- [5] Weber GF. The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1552(2): 61-85.
- [6] Guo JT, Tan XJ. The research progress of calcitonin gene-related peptide in the bone and gastrointestinal in osteoporosis[J]. *Chin J Osteoporos*, 2015, 21(1): 121-124.
- [7] 陶周善, 周皖舒, 江云云. 骨形成蛋白联合雷奈酸锶对成骨细胞增殖和分化的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(2): 165-169.
- [8] 陈海英, 张如玉, 蔡阿明. 外源性 CGRP 诱导糖尿病大鼠膜性成骨的实验研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(4): 410-414.
- [9] Li Y, Tan Y, Yang B et al. Effect of calcitonin gene-related peptide on nitric oxide production in osteoblasts: an experimental study[J]. *Cell Biol Int*, 2011, 35(5): 757-765.
- [10] 郭纪涛, 谭雄进. 降钙素基因相关肽对骨质疏松症骨组织及胃肠作用的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(1): 121-124.
- [11] Zhang MR, Qu C, Sun J, et al. Different subtypes of estrogen receptor alpha and related signal molecules in the hippocampus are associated with spatial cognitive impairment of diabetic mice[J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2017, 69(3): 252-260.
- [12] Chhibber A, Woody SK, Karim RM, et al. Estrogen receptor beta deficiency impairs BDNF-5-HT2A signaling in the hippocampus of female brain: A possible mechanism for menopausal depression[J]. *Psychoneuro Endocrinology*, 2017, 82: 107-116.
- [13] Cho J, Yu NK, Kim VN, et al. Response to comment on multiple repressive mechanisms in the hippocampus during memory formation[J]. *Science*, 2016, 353(6298): 453.

(收稿日期: 2019-06-28; 修回日期: 2019-08-08)