

· 论 著 ·

甲状旁腺激素联合阿仑膦酸钠对大鼠骨质疏松性骨折骨痂血管形成的影响

刘颖* 孙昌俊 王乐 毕若杰 张恒 王大璐 齐巍

唐山市第二医院,河北唐山 063000

中图分类号: R318;R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 05-0669-05

摘要: **目的** 探讨甲状旁腺激素联合阿仑膦酸钠对大鼠骨质疏松性骨折骨痂血管形成及骨折愈合的影响。**方法** 75只雌性SD大鼠随机分为5组:假手术组、去势组、甲状旁腺素组、阿仑膦酸钠组、联合用药组,每组15只,首先进行双侧卵巢切除术,术后4周行右侧股骨干骨折髓内固定术,以构建大鼠骨质疏松性骨折动物模型。观察并评估骨折愈合,检测骨痂生物力学和骨密度(bone mineral density,BMD),检测血清血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)和骨形成发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2,BMP-2)浓度,观察骨痂形态结构,检测骨痂VEGF表达。**结果** 去势组较假手术组骨折愈合评分、骨痂生物力学强度、骨痂BMD、血清BMP-2和VEGF浓度、骨痂VEGF蛋白表达、骨痂微血管数均显著降低($P<0.05$),甲状旁腺素组、阿仑膦酸钠组、联合用药组较去势组上述指标均升高,其中以联合用药组升高最显著($P<0.05$)。**结论** 甲状旁腺激素联合阿仑膦酸钠通过介导VEGF,上调BMP-2表达,促进骨质疏松性骨折大鼠骨痂血管形成,增加骨密度,改善生物力学强度及骨组织形态学,加快骨折愈合。

关键词: 甲状旁腺激素;阿仑膦酸钠;骨质疏松性骨折;血管形成;大鼠;动物实验

Effect of parathyroid hormone combined with alendronate on the formation of osteophytes in rats with osteoporotic fractures

LIU Ying*, SUN Changjun, WANG Le, BI Ruojie, ZHANG Heng, WANG Dalu, QI Wei

The Second Hospital of Tangshan, Tangshan 063000, China

* Corresponding author: LIU Ying, Email: 18238268078@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of parathyroid hormone combined with alendronate on osteophyte formation and fracture healing in rats with osteoporotic fractures. **Methods** Seventy-five female SD rats were randomly divided into 5 groups: sham operation group, ovariectomized group, parathyroidism group, alendronate group, and combination drug group, with 15 rats in each group. Bilateral ovariectomy was performed. After 4 weeks of the operation, intramedullary fixation of the right femoral shaft was performed to establish the animal model of rat osteoporotic fractures. The fracture healing, biomechanics and bone mineral density (BMD) of the osteophyte were observed. Serum levels of VEGF and BMP-2 were detected. The morphology of the epiphysis was observed. VEGF expression in osteophytes was detected. **Results** The fracture healing score, osteophyte biomechanical strength, osteophyte BMD, serum BMP-2 and VEGF concentrations, osteophyte VEGF protein expression, and epiphyseal microvascular count were significantly lower in the ovariectomized group than those in the sham operation group ($P<0.05$). The above indicators increased in the parathyroidism group, the alendronate group, and the combination group. Among them, the increase in combination group was the most significant ($P<0.05$). **Conclusion** Parathyroid hormone combined with alendronate up-regulates BMP-2 expression, promotes osteophyte angiogenesis in rats with osteoporotic fracture, increases BMD, improves biomechanical strength and bone histomorphology, and accelerates fracture healing via mediation of VEGF.

Key words: parathyroid hormone; alendronate; osteoporotic fracture; angiogenesis; rats; animal experiments

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是以骨量减少、骨微结构破坏、骨脆性增加、导致骨折危险性显著升

高的一种全身性骨病。骨折是OP最严重的并发症,20%的OP患者有发生骨质疏松性骨折(osteoporotic fracture, OPF)的可能,是致残致死的主要原因之一^[1],因此,如何降低OPF的发生率已成

* 通信作者: 刘颖, Email: 18238268078@163.com

为治疗骨质疏松的防治目的。OP 不仅增加了患者发生骨折的风险,严重影响骨折愈合进程及效果^[2]。随着我国人口的老龄化的加剧,OP 及 OPF 的发病率逐渐上升,给家庭和社会带来了沉重的经济负担。甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)是日前临床治疗骨质疏松症的最常用药物之一,可调节钙、磷代谢水平。阿仑膦酸钠是首个以骨质疏松为适应证而获准上市的第三代二膦酸盐类药物,能显著增加骨量,提高骨质强度,降低骨折发生率。研究表明,甲状旁腺激素联合唑来膦酸对去势大鼠的骨折愈合有累加作用^[3]。因此,本研究旨在探讨甲状旁腺激素联合阿仑膦酸钠对 OPF 骨痂血管形成及骨折愈合的作用机制,为临床应用治疗 OPF 提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与材料

75 只 SPF 级雌性 SD 大鼠,12 W 龄,体重(320±30)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司(许可证号:SYXK(京)2017-0033)。重组人甲状旁腺激素(1-34)(100μg/支,批号:J201708072,美国 Sigma 公司),阿仑膦酸钠片(福善美)(70 mg×1 s,生产批号:J20170085,美国默沙东制药有限公司),柜式 X 线照相机购置于美国 Hologic 公司,双能 X 线骨密度测定仪购于美国 GE 公司,MTS-858 型生物力学实验机购于美国 MA 公司,ELISA 检测试剂盒购于武汉云克隆科技股份有限公司,兔抗鼠血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)多克隆抗体购于武汉博士德生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与药物干预:SD 大鼠饲养于华北理工大学医学动物实验中心 SPF 级屏障环境;按随机数字法分为假手术组、去势组、甲状旁腺素组、阿仑膦酸钠组、联合用药组,假手术组仅切除部分脂肪组织,其他 4 组均行双侧卵巢切除术。于术后第 2 天分别给予不同药物干预,假手术组、去势组:皮下注射 0.9% NaCl 5 mL/kg,1 次/d;甲状旁腺素组:皮下注射 PTH(1-34) 50 μg/kg,1 次/d;阿仑膦酸钠组:灌胃阿仑膦酸钠片 0.5 mg/kg,1 次/d;联合用药组:皮下注射 PTH(1-34) 50 μg/kg,1 次/d,灌胃阿仑膦酸钠 0.5 mg/kg,1 次/d。连续用药 8 周。

1.2.2 构建去卵巢大鼠骨质疏松骨折模型:10%水合氯醛腹腔麻醉,取腹部中线第 2 腰椎做长约 2 cm 纵行切口,依次分离进入腹腔,沿输卵管寻找卵巢组

织,严密结扎输卵管,切除卵巢,逐层间断缝合。卵巢切除术后 4 周行右侧股骨干骨折髓内固定术。腹腔麻醉,取左大腿外侧纵行切口,暴露股骨中段,使用线锯横行锯断股骨,用电钻以直径 1.0 mm 克氏针顺行插入骨折远端,骨折达到解剖复位,固定可靠且骨折端对位对线良好,逐层间断缝合,术后常规青霉素 80 万 U 肌肉注射,预防感染。各组大鼠均分笼饲养,标准饲料,自由饮水,饲养环境条件均相同。

1.2.3 组织标本处理:摄片后 10%水合氯醛麻醉,采取急性大失血法处死大鼠,打开胸腔,左心室采血 5~10 mL,3 000 r/min,离心 15 min,收取上层血清 0.5~1 mL, -20 ℃ 保存备用。剥离股骨痂,0.9% NaCl 冲洗后于 10%甲醛溶液固定,10%硝酸脱钙,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制作 5 μm 切片,60 ℃ 烤箱 4 h,取出室温保存备用。

1.2.4 放射性(X 线)检查:术后 4 周选取各组大鼠 10%水合氯醛腹腔麻醉后进行 X 线摄片,观察各组大鼠骨折愈合情况。放射学评估采用 Warden^[4] X 线评分系统进行评估,依据骨折断端表现行骨折愈合评分。评分标准:没有愈合 1 分;骨痂形成不明显 2 分;骨折部分愈合 3 分;骨折线逐渐消失,骨痂逐渐吸收消失 4 分;完全愈合 5 分。

1.2.5 骨生物力学检测:采用电子生物力学测试装置对骨折骨痂进行三点弯曲实验,仪器调试正常后固定骨标本位置,测试区域为骨痂中心位置,以支点跨距为 20 mm,加载速度 2 mm/min 给予股骨骨痂施加压力直至骨头断裂,通过计算机记录加载位移载荷-变形曲线,计算出最大荷载(N)和抗弯强度(N/mm)。

1.2.6 骨痂骨密度(bone mineral density, BMD)测定:取出待测骨痂,在 LUNAR 双能 X 线吸收扫描仪测量骨折部位上下区域骨密度,采用分辨率 1.0 mm×1.0 mm,扫描速度 60 mm/s 的扫描模式,以骨折端 2.0 mm×2.0 mm 为中心区域,测量骨痂 BMD(g/cm²),连续测量 BMD 各 5 次。

1.2.7 血清 VEGF 和 BMP-2 浓度测定:采用 ELISA 试剂盒检测血清 VEGF 和 BMP-2 浓度,按照试剂盒说明书步骤进行操作。

1.2.8 HE 染色:参照 HE 染色法实验步骤进行操作^[5],光镜下观察染色并采集图片。随机选取 5 个视野,计数新生血管数,取平均值。

1.2.9 免疫组织化学染色法:以兔抗鼠 VEGF 多克隆抗体浓度(1:1000),参照免疫组织化学染色法实验步骤进行操作^[6]。光学显微镜观察并采集图片,图像分析软件进行分析,免疫组织化学染色结果采

用免疫反应评分(IRS)进行测定。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学分析采用单因素方差分析,组间比较采用 SNK 法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组骨折愈合及评分

假手术组骨折线模糊不清或消失,骨痂生长包绕骨折端,连接紧密;去势组骨折线依然清晰可见,未见明显骨痂生长,断端骨痂未连接,骨折愈合欠

佳。甲状旁腺素组和阿仑膦酸钠组骨折线部分模糊,骨痂少量生长,骨折端骨痂部分连接,连接不紧密;联合用药组骨折线模糊,骨折端有连续性骨痂包绕,骨痂体积较大,部分愈合,并开始重建塑形。假手术组、去势组、甲状旁腺素组、阿仑膦酸钠组、联合用药组骨折愈合评分分别为: 4.86 ± 0.50 、 2.25 ± 0.24 、 3.10 ± 0.12 、 3.27 ± 0.10 、 4.50 ± 0.42 。去势组较假手术组骨折愈合评分显著降低($P < 0.05$),甲状旁腺素组、阿仑膦酸钠组、联合用药组较去势组骨折愈合评分均升高,其中以联合用药组骨折愈合评分升高最显著($P < 0.05$)。详见图 1。

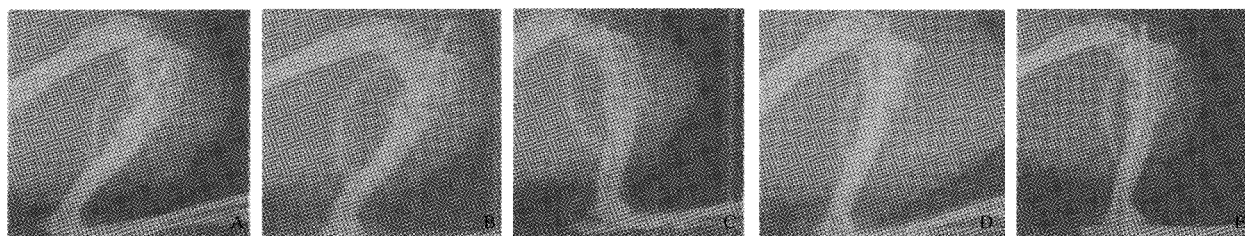


图 1 术后 4 周 X 线情况 A:假手术组;B:去势组;C:甲状旁腺素组;D:阿仑膦酸钠组;E:联合用药组

Fig.1 X-ray situation in 4 w after operation. A: Sham operation group; B: Castration group; C: Parathyroid hormone group; D: Alendronate group; E: Combination group

2.2 各组骨痂生物力学

各组大鼠股骨骨痂生物力学比较见表 1。去势组较假手术组骨痂最大荷载和抗弯强度显著降低($P < 0.05$),甲状旁腺素组、阿仑膦酸钠组、联合用药组较去势组骨痂最大荷载和抗弯强度均升高,其中以联合用药组骨痂最大荷载和抗弯强度升高最显著($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠股骨骨痂生物力学比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of biomechanics of the femoral epiphyses between each group($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	最大荷载/N	抗弯强度/(N/mm)
假手术组	15	230.80 ± 15.30	175.64 ± 16.20
去势组	15	$138.64 \pm 10.29^*$	$105.23 \pm 13.50^*$
甲状旁腺素组	15	166.28 ± 12.63	135.64 ± 14.06
阿仑膦酸钠组	15	175.60 ± 13.25	128.20 ± 11.24
联合用药组	15	$213.35 \pm 12.07^{\#}$	$151.28 \pm 13.50^{\#}$

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与去势组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

2.3 各组骨痂 BMD 比较

各组大鼠股骨骨痂 BMD 比较见表 2。去势组较假手术组骨痂 BMD 显著降低($P < 0.05$),甲状旁腺素组、阿仑膦酸钠组、联合用药组较去势组骨痂 BMD 均增高,尤以联合用药组增高最显著($P < 0.05$)。

表 2 各组股骨骨痂 BMD 比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of BMD in the femoral callus between each group($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	BMD/(g/cm ²)
假手术组	15	0.255 ± 0.013
去势组	15	$0.142 \pm 0.010^*$
甲状旁腺素组	15	0.182 ± 0.012
阿仑膦酸钠组	15	0.175 ± 0.010
联合用药组	15	$0.227 \pm 0.012^{\#}$

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与去势组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

2.4 各组血清 VEGF 和 BMP-2 浓度比较

各组大鼠血清 VEGF 和 BMP-2 浓度比较见表 3。去势组较假手术组血清 VEGF 和 BMP-2 浓度均显著降低($P < 0.05$),甲状旁腺素组、阿仑膦酸钠组、联合用药组较去势组血清 VEGF 和 BMP-2 浓度均升高,其中以联合用药组血清 VEGF 和 BMP-2 浓度升高最显著($P < 0.05$)。

表 3 各组血清 VEGF 和 BMP-2 浓度比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of serum VEGF and BMP-2 concentrations between each group($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	VEGF/(μg/L)	BMP-2/(μg/L)
假手术组	15	2.57 ± 0.32	2.94 ± 0.50
去势组	15	$1.40 \pm 0.16^*$	$1.61 \pm 0.10^*$
甲状旁腺素组	15	1.72 ± 0.25	2.17 ± 0.37
阿仑膦酸钠组	15	1.80 ± 0.30	1.97 ± 0.20
联合用药组	15	$2.32 \pm 0.35^{\#}$	$2.58 \pm 0.42^{\#}$

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与去势组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

2.5 各组组织学观察

假手术组骨痂骨小梁粗细均匀,生长旺盛,排列致密有序,成骨细胞数量较多,大量新生微小血管形成。去势组骨痂骨小梁明显减少,生长稀疏,排列紊乱,大量纤维组织及纤维软骨细胞。甲状旁腺素组

和阿仑膦酸钠组骨痂骨小梁相对较少,仍较纤细,排列较稀疏,略不规则,成骨细胞数量相对较少,可见新生微小血管。联合用药组骨小梁粗大,生长旺盛,排列致密有序,可见较多成熟的骨细胞及成骨细胞,新生微小血管较多。详见图2。

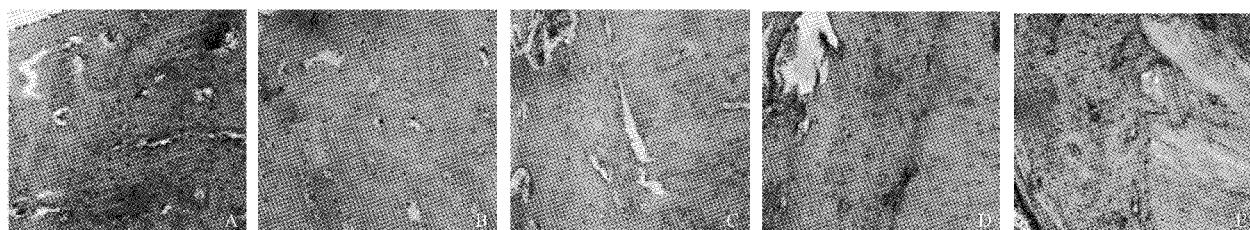


图2 HE染色观察骨痂的形态结构变化($\times 200$) A:假手术组;B:去势组;C:甲状旁腺素组;D:阿仑膦酸钠组;E:联合用药组

Fig.2 Morphological changes of bone callus were observed under HE staining ($\times 200$). A: Sham operation group; B: Castration group; C: Parathyroid hormone group; D: Alendronate group; E: Combination group

假手术组、去势组、甲状旁腺素组、阿仑膦酸钠组、联合用药组微血管计数(个/100倍视野)分别为: 3.74 ± 0.57 、 1.80 ± 0.36 、 2.63 ± 0.42 、 2.54 ± 0.30 、 3.30 ± 0.44 。去势组微血管数显著低于假手术组($P < 0.05$),甲状旁腺素组、阿仑膦酸钠组、联合用药组较去势组微血管数均增多,其中以联合用药组微血管数增加最显著($P < 0.05$)。

2.6 各组 VEGF 表达

VEGF 主要表达于成骨细胞内及少量成熟软骨细胞,以细胞膜或细胞质呈棕黄色为阳性。依据免疫反应评分得出假手术组、去势组、甲状旁腺素组、阿仑膦酸钠组、联合用药组的 VEGF 表达分别为: 0.271 ± 0.035 、 0.143 ± 0.010 、 0.1885 ± 0.015 、 0.205 ± 0.020 、 0.238 ± 0.028 。去势组较假手术组 VEGF 阳性表达显著降低($P < 0.05$),甲状旁腺素组、阿仑膦酸钠组、联合用药组较去势组 VEGF 阳性表达均升高,其中以联合用药组 VEGF 阳性表达升高最显著($P < 0.05$)。详见图3。

3 讨论

骨折愈合是一个复杂但有序的骨组织再生的过程,这一过程不仅由基因表达所致的新骨组织的不断合成与吸收,而且受到微环境(如细胞因子、生化因子、微血管)的影响^[7]。甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)是骨代谢过程中重要的调节因子,在调节机体钙磷代谢有十分重要的作用。PTH(1-34)不仅可刺激成骨细胞增殖、产生碱性磷酸酶及骨基质蛋白,促进软骨及骨形成,从而促进纤

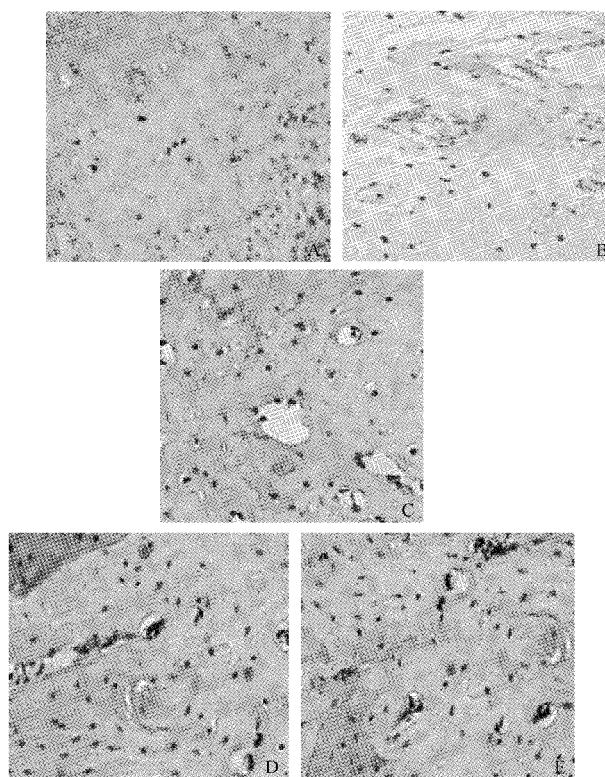


图3 免疫组化观察骨痂组织 VEGF 表达($\times 200$) A:假手术组;B:去势组;C:甲状旁腺素组;D:阿仑膦酸钠组;E:联合用药组

Fig.3 The VEGF expression in callus was observed with immunohistochemistry ($\times 200$). A: Sham operation group; B: Castration group; C: Parathyroid hormone group; D: Alendronate group; E: Combination group

维性骨痂形成和改善骨痂的生物力学强度;而且也可以激活多种信号通路参与改善骨折愈合的过

程^[8]。阿仑膦酸钠(alendronate, ALN)作为首个以骨质疏松为适应证而获准上市的第三代二膦酸盐类药物。其具有抑制骨吸收,降低骨转换、增加骨量而降低骨折发生率、加速骨折愈合^[9]。研究表明,阿仑膦酸钠通过增加骨痂量及骨密度以增加骨骼强度,通过减少分解代谢抑制破骨细胞的骨吸收作用,从而提高骨折愈合的程度^[10]。

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)是骨折愈合的关键性细胞因子之一,具有诱导间充质细胞、骨髓基质细胞迁移、增殖、分化成软骨细胞和成骨细胞,介导软骨及骨形成^[11]。其中尤以BMP-2作用最显著,BMP-2通过一系列级联反应激活其下游信号分子促进成骨细胞分化和诱导成骨的能力,参与骨形成过程中的各个阶段^[12]。研究表明BMP-2干预能够加速非骨质疏松性骨折愈合速度,缩短愈合时间^[13]。本研究表明甲状旁腺激素联合阿仑膦酸钠具有协同上调BMP-2表达,增加骨质疏松性骨折大鼠骨密度,改善生物力学性能及骨组织形态学,加快骨折愈合。

血管形成、恢复骨折断端血供是骨折修复的前提。VEGF是作用最强的促血管生长因子,VEGF可促进新血管生成,恢复骨折血运,VEGF还可直接作用于骨折部位成骨细胞VEGF受体,促进血管微环境中生长因子的表达。VEGF对原始成骨细胞有迁移趋化及分化作用,对骨的形成和重建有功能性的作用^[14]。本研究结果表明甲状旁腺激素、阿仑膦酸钠联合用药通过介导VEGF,上调BMP-2表达,促进骨质疏松性骨折大鼠骨痂血管形成,增加骨密度,改善生物力学强度及骨组织形态学,加快骨折愈合。同样,李梅等^[15]研究表明,人甲状旁腺素和阿仑膦酸钠均对骨质疏松有效,联合使用可增加骨密度和改善骨力学性能。曾中华等^[16]研究表明,在骨折愈合的不同时期,BMP-2和VEGF在成骨细胞中可以互相促进表达,共同调节骨祖细胞的增殖和成骨细胞、软骨细胞的分化,最终完成骨折修复。

综上所述,甲状旁腺激素和阿仑膦酸钠联合用药具有协同促进骨痂血管形成,进而加快骨折愈合。联合用药具有潜在的临床治疗价值。但其对骨质疏松性骨折愈合不同阶段具体信号调控机制还有待进一步研究。

【参 考 文 献】

[1] Alejandro P, Constantinescu F. A review of osteoporosis in the

older adult: An update[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2018, 44(3): 437-451.

[2] Marcia S, Muto M, Hirsch JA, et al. What is the role of vertebral augmentation for osteoporotic fractures? A review of the recent literature[J]. Neuroradiology, 2018, 60(8): 777-783.

[3] 杨璐铭, 胡静, 肖迪, 等. 甲状旁腺激素(1-34)与唑来膦酸联合治疗对骨质疏松大鼠骨折愈合的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(4): 431-435.

[4] Warden SJ, Bennell KL, Mc Meeken JM, et al. Acceleration of fresh fracture repair using the sonic accelerated fracture healing system (SAFHS): a review[J]. Calcif Tissue Int, 2000, 66(2): 157-163.

[5] 骆阳, 张柳, 宋亚琪, 等. 阿仑膦酸钠可抑制骨质疏松性骨折的愈合[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(37): 6841-6845.

[6] 宋亚琪, 张柳, 骆阳, 等. 降钙素对卵巢切除大鼠股骨骨折愈合的作用[J]. 重庆医学, 2013, 42(20): 2378-2380.

[7] Raybould G, Babatunde O, Evans AL, et al. Expressed information needs of patients with osteoporosis and/or fragility fractures: a systematic review[J]. Arch Osteoporos, 2018, 13(1): 55.

[8] Augustine M, Horwitz MJ. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein analogs as therapies for osteoporosis[J]. Curr Osteoporos Rep, 2013, 11(4): 400-406.

[9] Reginster JY, Al Daghi N, Kaufman JM, et al. Effect of a sequential treatment combining abaloparotide and alendronate for the management of postmenopausal osteoporosis[J]. Expert Opin Pharmacother, 2018, 19(2): 159-161.

[10] 陈龙, 陈临伟, 徐华梓, 等. 阿仑膦酸钠对骨质疏松性骨折影响的实验研究[J]. 浙江创伤外科, 2010, 15(4): 443-445.

[11] Wang X, Huang J, Huang F, et al. Bone morphogenetic protein 9 stimulates callus formation in osteoporotic rats during fracture healing[J]. Mol Med Rep, 2017, 15(5): 2537-2545.

[12] Yi Y, Choi KB, Lim CL, et al. Irradiated human chondrocytes expressing bone morphogenetic protein 2 promote healing of osteoporotic bone fracture in rats[J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(10): 2853-2863.

[13] Prall WC, Haasters F, Heggebo J, et al. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients feature impaired signal transduction but sustained osteoinduction in response to BMP-2 stimulation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 440(4): 617-622.

[14] 鲍小明, 张民. VEGF在骨质疏松性骨折愈合中的作用[J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20(22): 2054-2056.

[15] 李梅, 矫杰, 孟迅吾, 等. 甲状旁腺素片段与阿仑膦酸钠对骨质疏松大鼠骨转换和骨密度的影响[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(5): 335-338.

[16] 曾中华, 余黎, 龚玲玲, 等. 骨折愈合过程中BMP-2和VEGF的表达[J]. 武汉大学学报(医学版), 2005, 26(4): 467-469.

(收稿日期: 2018-11-17; 修回日期: 2019-01-30)