文章编号:1000-5404(2008)21-2011-04

论著

降钙素基因相关肽对大鼠胫骨骨折早期愈合的影响

韩 娜,张殿英,王天兵,张培训,姜保国 (北京大学人民医院创伤骨科,北京 100044)

摘 要:目的 建立大鼠单纯胫骨骨折模型,分别给予大鼠腹腔注射不同浓度的外源性降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide,CGRP)及其特异性受体拮抗剂,评价并探讨CGRP对骨折早期愈合的影响及其对骨形成蛋白-2(bone morphogenetic protein-2,BMP-2)的表达。**方法** 制作单纯胫骨骨折模型,将SD大鼠应用随机数字表法随机分为3组,每组10只,分别给予腹腔注射生理盐水(对照组)、CGRP及CGRP受体拮抗剂。术后1、2周和4周时取材,进行骨折部骨痂测量,HE染色观察骨折局部形态变化;利用免疫组织化学检测骨组织中BMP-2的表达情况。**结果** 大鼠腹腔内注射CGRP 1周时,各组均可见到少许骨痂,组间未见明显差别;术后2周时,各组外观有差别,CGRP组大鼠胫骨骨折部呈膨大样,大鼠骨痂量多于盐水对照组和拮抗剂组;术后4周CGRP组骨折部膨大明显缩小,骨皮质连续性好,各组外形已接近正常胫骨形态及大小。免疫组织化学结果显示:CGRP组胫骨骨折大鼠在骨折断端附近BMP-2的表达信号强于对照组和拮抗剂组。用药1周时,BMP-2免疫活性细胞从对照组的(18.52±10.08)增加为(36.80±11.18),增加了近2.2倍,拮抗剂组则减少为(14.50±8.80);用药2周时,BMP-2免疫活性细胞从对照组的(20.26±6.78)增加为(52.18±10.42),拮抗剂组减少为(11.21±8.40),变化幅度最大;用药4周时,BMP-2免疫活性细胞的增加从对照组的(21.25±8.65)增加为(31.41±9.18),拮抗剂组则减少为(18.32±10.28)。**结论** CGRP可能具有促进大鼠胫骨骨折早期愈合的作用,CGRP可以诱导骨组织中BMP-2的表达,推测CGRP的成骨作用与BMP-2的表达具有相关性。

关键词:降钙素基因相关肽;大鼠;骨折;BMP-2
中图法分类号:R-332;R341;R683.02 **文献标识码**:A

Effects of calcitonin gene-related peptide on tibial fracture healing at early stage in rats

HAN Na, ZHANG Dian-ying, WANG Tian-bing, ZHANG Pei-xun, JIANG Bao-guo (Department of Orthopaedics, People's Hospital, Peking University, Beijing 100044, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on early-stage bone fracture healing and on the expression of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in bone tissue of rats. Methods Totally 30 SD rats with tibial fracture were randomly and equally divided into 3 group and received normal saline (control group), CGRP or CGRP receptor antagonist injection intraperitoneally. In 1, 2 and 4 weeks later, the fracture sites from the 3 groups were subjected to X-ray scanning, callus measurement and HE staining. The expression of the BMP-2 was detected by immunohistochemical method. Results There was no obvious difference on callus amounts among the 3 groups, but at 2 weeks after treatment, there were significantly more callus in CGRP group with enlargement in the fracture site than in the other 2 groups; The enlargement of CGRP group became minimized with fused cortex and almost normal morphology and size. So were the other 2 groups. Immunohistochemical results showed that exogenous CGRP significantly increased BMP-2 expression, but the expression was decreased significantly after administration of CGRP receptor antagonist. Conclusion Our results suggest that CGRP may participate in the regulation of bone fracture healing, and induce BMP-2 production, implying that BMP-2 may be related functionally with CGRP in the mechanism of bone metabolism.

Key words: calcitonin gene-related peptide; bone fracture; bone morphogenetic protein-2; rats

---

基金项目:"十一五"国家科技支撑计划(2007BA104B00);国家重点基础研究发展计划(973计划)(2003CB515306)
Supported by the Supporting Program of the "Eleventh Five-year Plan" for Sci & Tech Research of China (2007BA104B00) and the National Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2003CB515306)

作者简介:韩 娜,女,山东省淄博市人,博士,助理研究员,主要从事骨折愈合方面的研究。电话:(010)88324570,E-mail:hanna@bjmu.edu.cn
通信作者:姜保国,E-mail:jiangbaoguo@vip.sina.com

收稿日期:2008-06-06;**修回日期**:2008-08-26

骨折愈合是创伤愈合的一种特殊类型,是一个复杂的组织学、分子生物学、生物力学、内分泌学的动态过程,随着对其细胞及生化机制研究的深入,人们发现神经肽在神经系统和骨折组织之间起着重要的桥接作用,参与了对修复细胞增殖、迁移、分化的调控。Garcia-Castellano 等[1]于 2000 年证实降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)等神经因子对骨折愈合起到了重要的调节作用,虽然越来越多的证据表明 CGRP 对骨形成具有促进作用,但其作用机制仍然未明了。本实验以大鼠单纯胫骨骨折为模型,初步探讨 CGRP 及其 CGRP 特异性受体拮抗剂对骨折愈合的影响。

1 材料与方法

1.1 大鼠胫骨骨折模型制备及分组

30 只 SPF 级 SD 大鼠,雌雄兼备,体质量(350 ± 40)g,由北京大学医学部动物中心提供。参照文献[2]制备模型,术前动物禁食 15 ~ 20 h,2% 戊巴比妥(30 mg/kg)腹腔注射麻醉。胫骨中段前正中切口,于左侧胫骨中上 1/3 处锯断胫骨,无菌条件下从胫骨内髁前方顺行穿入 1 根消毒医用克氏针(直径 1 mm, 上海医用缝合针厂)髓内固定。消毒缝合皮肤。骨折模型制作成功后,为了避免大鼠之间的个体差异,将实验大鼠按随机数字表法分为 3 组:对照组,腹腔注射生理盐水 1 ml;CGRP 组,腹腔内注射 30 μg/kg 的 CGRP 1 ml;拮抗剂组,腹腔内微量注射 $rCGRP_{8-37}$(30 μg/kg)1 ml,5 ~ 8 min 后再向腹腔内微量注射 30 μg/kg 的 CGRP 1 ml。每组 10 只,分笼饲养,3 组动物均置于室温 25 ℃左右,12/12 h 昼夜循环光照条件下生活自由饮水。术后每天在同一时间为动物腹腔注射药物,在 1、2、4 周时处死动物取骨组织标本进行后续实验。

1.2 药剂及配制

CGRP:美国 Sigma 公司产品,用 1% 乙酸配制成 1 mg/ml 的贮存液,用于大鼠腹腔内注射时,浓度稀释为 1×10^{-7} mol/L。CGRP 受体拮抗剂($rCGRP_{8-37}$,来源同 CGRP):用 0.9% 无菌生理盐水配制。用于大鼠腹腔内注射,浓度为(2.8 ± 10^{-4})mol/L。

1.3 骨折部位骨痂测量

使用游标卡尺测量骨痂中心处的横径,并测量骨痂中心远端 1 cm 处没有骨痂的胫骨横径, 取其差值进行比较并作统计学处理的。

1.4 石蜡切片的制备

以骨折处为中心取 1 cm 长大鼠胫骨固定于 4 % 多聚甲醛,10% EDTA 溶液中脱钙,充分脱钙后,流水冲洗 24 h(除酸),进行常规脱水、透明、浸蜡、切片,骨切片厚度 5 μm,将切片贴于经多聚赖氨酸处理过的干净载玻片上,按顺序标号,切片间隔分成 2 套,其中 A 套用于 HE 染色,B 套用作 BMP-2 免疫阳性细胞表达。玻片烤干后保存备用。

1.5 BMP-2 免疫组化染色

切片常规脱蜡、水化,PBS 洗涤,纯甲醇加过氧化氢至 3%,室温(约 25 ℃)孵育 20 min,以消除内源性过氧化物酶的活性,0.01 mol/L PBS 洗涤,滴加正常山羊血清封闭液,室温孵育 20 min,甩去多余液体,滴加 BMP-2 一抗 50 μl(1∶400),4 ℃过夜,PBS 洗涤,滴加生物素标记的二抗 50 μl(0.05% 的吐温-20 配制),37 ℃孵育 1 h,PBS 洗涤,滴加辣根酶标记链霉卵白素(稀释和使用方法同二抗),37 ℃孵育 2 h,PBS 洗涤,DAB 显色,苏木精复染 2 min,盐酸酒精分化,脱水、透明、封片、镜检。对照组用 PBS 代替一抗。

1.6 阳性细胞计数

3 组动物都是以单盲方法严格按照标准进行阳性细胞计数。在阳性细胞最密集处取 4 个互不重叠的高倍视野(×400)计出视野内阳性细胞数,每个视野数 2 遍,取平均数作为该视野内的阳性细胞数。4 个视野阳性细胞数取平均值作为该切片的阳性细胞数。

1.7 统计学处理

统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 12.0 统计软件对计量资料进行 t 检验。

2 结果

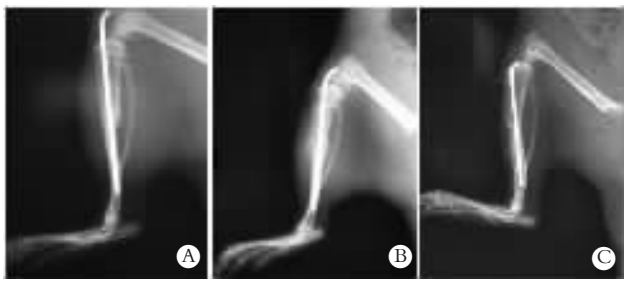
2.1 骨折部骨痂测量结果

术后 1 周,各组均可见到少许骨痂,组间未见明显差别;术后 2 周,CGRP 组和对照组外观有明显差别, CGRP 组大鼠胫骨骨折部呈膨大样,直径大于对照组和拮抗剂组($P < 0.05$); 术后 4 周各组骨折部膨大均有缩小,骨皮质连续性好,大多数外形已接近正常胫骨形态及大小(表 1,图 1)。

表 1 术后 2 周胫骨骨痂中心处与无骨痂处的横径差值比较(mm, $\bar{x} \pm s$)

时间	对照组	CGRP 组	拮抗剂组
术后 1 周	1.25 ± 0.45	1.46 ± 0.28	1.41 ± 0.61
术后 2 周	1.95 ± 0.54	2.65 ± 0.69[a]	2.01 ± 0.56
术后 4 周	1.86 ± 0.65	1.56 ± 0.43	1.93 ± 0.67

a: $P < 0.05$,与对照组比较



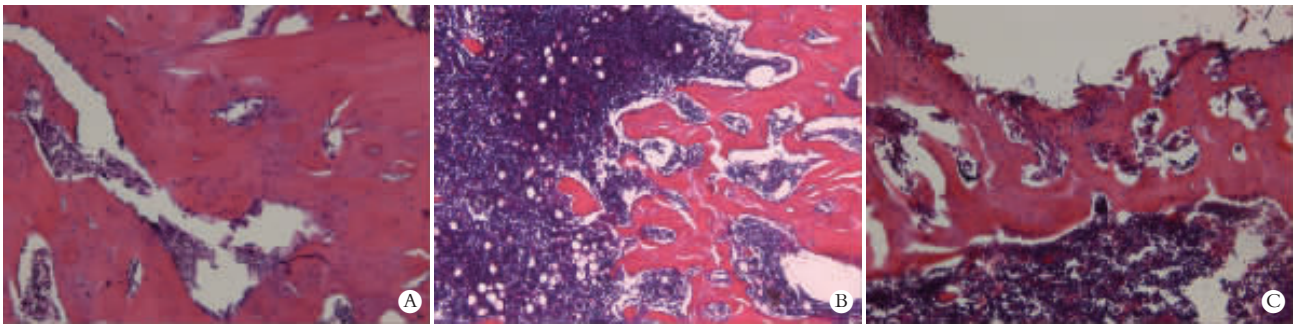
A:对照组;B:CGRP 组;C:拮抗剂组

图 1 术后 2 周 X 线表现

2.2 HE 染色结果

2.2.1 腹腔注射生理盐水对大鼠单纯胫骨骨折的影响 骨折发生 1 周时,对照组可见骨折端纤维母细胞自骨膜下增殖长入骨折间隙,夹杂有少量的早期软骨细胞;骨折 2 周,可见有大量的早期软骨细胞、成纤维细胞和纤维母细胞,成骨细胞数目增多,可见纤维性骨痂、软骨性骨痂和骨性骨痂,骨折端可见骨膜下成骨;骨折 4 周,骨折端纤维骨痂消失,成骨细胞和纤维母细胞减少,可见骨性骨痂与软骨骨痂(图 2A)。

2.2.2 腹腔注射 CGRP 对大鼠单纯胫骨骨折的影响 用药 1 周时,可见骨折端有大量肉芽组织生长连接, 纤维骨痂生成,并可见较多的早期软骨细胞、成纤维细胞;用药 2 周时,可见骨



A：对照组；B：CGRP 组；C：拮抗剂组

图 2　术后 2 周骨组织 HE 染色结果　（×400）

折端有大量纤维性骨痂、软骨性骨痂和骨性骨痂,大量较成熟软骨存在,有新生骨小梁长入;用药 4 周时,可见骨折端为结构均一的编织骨痂,其中成骨细胞活跃,骨膜增厚明显,有丰富的骨痂组织和成熟的骨小梁(图 2B)。

2.2.3　腹腔注射分别给予 CGRP 受体拮抗剂 $rCGRP_{8-37}$ 和 CGRP 对大鼠单纯胫骨骨折的影响　　联合用药 1 周,骨折端可见纤维母细胞和少量成软骨细胞;用药 2 周时,成软骨细胞较 1 周时有所增加,编织骨的含量极少;用药 4 周时,编织骨和成熟骨组织均少于对照组,骨性骨痂面积亦明显小于对照组（图 2C)。

2.3　免疫组织化学结果

2.3.1　对照组大鼠胫骨内 BMP-2 免疫活性细胞的表达　BMP-2 阳性神经元集中表达在骨折断端,在腹腔给予生理盐水 1、2 周和 4 周时,骨折断端 BMP-2 免疫阳性细胞平均数分别为(18.52 ± 10.08)、(20.26 ± 6.78)和(21.25 ± 8.65)。

2.3.2　CGRP 组大鼠胫骨内 BMP-2 免疫活性细胞的表达　CGRP 组胫骨骨折大鼠在骨折断端附近 BMP-2 的表达信号强于对照组和拮抗剂组。用药 1 周时,其中 BMP-2 免疫活性细胞从对照组的(18.52 ± 10.08)增加为(36.80 ± 11.18),增加了近 2.2 倍;用药 2 周时,其中 BMP-2 免疫活性细胞从对照组的(20.26 ± 6.78)增加为(52.18 ± 10.42),增加幅度最大;用药 4 周时, BMP-2 免疫活性细胞从对照组的(21.25 ± 8.65)增加为(31.41 ± 9.18)。各组间比较,差异统计学有意义($P < 0.05$)。由此可见,CGRP 组中 BMP-2 免疫活性细胞表达增强。

2.3.3　拮抗剂组大鼠胫骨内 BMP-2 免疫活性细胞的表达　腹腔给予拮抗剂组大鼠,胫骨 BMP-2 免疫阳性细胞的表达在用药 1、2 周和 4 周时,分别为(14.50 ± 8.80)、(11.21 ± 8.40)和(18.32 ± 10.28),与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3　讨论

CGRP 作为最丰富的一种神经肽,已经被证实在骨折愈合中起一定的促进作用,在骨折患者的血浆中,其浓度有明显增加[3]。但是,CGRP 对骨折愈合的调节作用机制仍未阐明。

骨折的愈合主要涉及 2 种机制:激素调节钙-磷代谢的系统作用和骨生长因子的局部调节作用。这些作用通过自分泌和旁分泌系统促进成骨细胞增殖和骨基质的生物合成。在众多的骨生长因子中,BMP-2 最受注目,与骨诱导关系最为密切,并已证明是正常胚胎时期骨和成年骨修复中最主要的诱导分化因子[4]。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins ,BMPs)是具有高度骨诱导活性的低分子量多肽[5]。近年来,大量实验均证实 BMP-2 是骨形成的重要调节因子,可在活体内诱导成骨[6]。BMP-2 的诱导成骨作用大致可分为趋化期、分化期、骨质形成及重塑期 4 个时期,其主要生物学作用是诱导未分化的间质细胞向骨和软骨发生不可逆分化,并诱导成骨细胞的前体细胞分化成成骨细胞,它可通过调节 TGFβ、维生素 D、IGFⅠ、IGF-Ⅱ等生长因子而诱导成骨作用[7]。BMP-2 诱导成骨的方式主要是软骨内化骨,但也可以膜内化骨方式成骨,它诱导成骨与周围环境有密切关系,在体和离体实验都证明 BMP-2 有促进成骨细胞分化和诱导体外成骨的能力[8]。

已有实验证实,BMP-2 在成骨过程中起着重要作用,它具有使未分化的间充质细胞定向分化为骨细胞并形成骨组织的能力[9],有报道经皮注射 BMP-2 对骨折愈合有促进作用[10]。本研究中,X 线平片及 HE 染色结果均显示在给予大鼠腹腔注射 CGRP 2 周之后,骨折断端愈合情况要好于对照组和拮抗剂组,提示 CGRP 对骨折愈合有一定的促进作用。同时,免疫组织化学染色结果显示用药 2 周时,骨组织中 BMP-2 免疫阳性蛋白的表达也均强于对照组和拮抗剂组,提示 BMP-2 可能参与了 CGRP 促进骨折愈合的作用,并在早期起了重要作用。其可能机制有:以往普遍认为 CGRP 具有强大的扩血管作用,可以增加骨折局部血流量,从而加速骨折愈合;CGRP 可以诱导 BMP-2 的表达增加,CGRP 的成骨作用可能与其表达增加具有相关性。本研究结果表明给予骨折大鼠腹腔注射 CGRP 后,促进了骨折部位 BMP-2 的表达,而后者又可以促进骨折的愈合,BMP-2 可能在 CGRP 加速骨折愈合过程中起到了重要作用。骨组织细胞只有在各种细胞因子协同作用下,才能完成骨质吸收和新骨质生成。但与骨愈合相关的因子是众多的,BMP-2 只是其中之一,

它与其他骨生长因子的相互作用也不十分清楚,CGRP加速骨折愈合的确切机制需要进一步的探讨研究。

参考文献:

[1] Garcia-Castellano J M, Diaz-Herrera P, Morcuende J A. Is bone a target-tissue for the nervous system? New advances on the understanding of their interactions[J]. Iowa Orthop J, 2000, 20: 49 - 58.

[2] 费琴明, 陈统一, 陈中伟. 大鼠胫骨标准骨折模型的制作[J]. 上海实验动物学, 2002, 22(1):10 - 12.

[3] Onuoha G N, Alpar E K. Elevation of plasma CGRP and SP levels in orthopedic patients with fracture neck of femur[J]. Neuropeptides, 2000, 34(2):116 - 120.

[4] Derner R, Anderson A C. The bone morphogenic protein[J]. Clin Podiatr Med Surg, 2005, 22(4):607 - 618, vii.

[5] Takahashi K. Bone morphogenetic protein (BMP): from basic studies to clinical approaches[J]. Nippon Yakurigaku Zasshi, 2000, 116(4): 232 - 240.

[6] Ren X Y, Ruan Q R, Zhu D H, *et al*. Tetramethylpyrazine inhibits agiontensin II-induced nuclear Factor-KappaB activation and bone morphogenetic protein-2 downregulation in rat vascular smooth muscle cells [J]. Sheng Li Xue Bao, 2007, 59(3): 339 - 344.

[7] Toom A, Arend A, Gunnarsson D, *et al*. Bone formation zones in heterotopic ossifications: histologic findings and increased expression of bone morphogenetic protein 2 and transforming growth factors beta2 and beta3[J]. Calcif Tissue Int, 2007, 80(4):259 - 267.

[8] Eckardt H, Christensen K S, Lind M, *et al*. Recombinant human bone morphogenetic protein 2 enhances bone healing in an experimental model of fractures at risk of non-union[J]. Injury, 2005, 36(4): 489 - 494.

[9] Chen D, Ji X, Harris M A, *et al*. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type ⅠB and ⅠA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages[J]. J Cell Biol, 1998, 142(1):295 - 305.

[10] Edwards R B 3rd, Seeherman H J, Bogdanske J J, *et al*. Percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a calcium phosphate paste accelerates healing of a canine tibial osteotomy[J]. J Bone Joint Surg Am, 2004, 86 - A(7):1425 - 1438.

(编辑 吴培红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)21-2014-01

宫腔镜术后TURP综合征1例

余 琴 (重庆医科大学附属第一医院妇科,重庆 400016)

1 临床资料

患者,女性,34岁,因"月经量少1⁺年,加重2⁺个月,检查发现宫腔粘连"入院。常规术前准备后在全麻下经宫腹腔镜联合行宫腔黏连电切术。术中情况:5%葡萄糖液体膨宫,压力100 mmHg,流速260 ml/min,宫腔深度7 cm,较正常缩小约1/4,宫颈管扩张经过顺利,常规手术经过顺利,膨宫液总用量4 500 ml,排出量4 000 ml,手术时间40 min。待麻醉清醒后送回病房继续监护,心电检测正常,血压正常,呼之能应,对答切题,用止痛泵止痛,轻微恶心、呕吐,于术后12 h突然出现四肢抽搐,眼睑上翻,嘴微张,呼之不应,15 s后缓解,但表情淡漠,嗜睡,双侧瞳孔等大,等圆,对光反射好,不合作,急查血电解质:K^+ 3.9 mmol/L, Na^+ 118 mmol/L, Cl^- 91 mmol/L, Ca^{2+} 1.83 mmol/L, CO_2-CP 19.1 mmol/L,血糖8.1 mmol/L,诊断:TURP综合征。立即给予补钠利尿治疗,因病情危重转入中心ICU,查血 Na^+ 132 mmol/L,血渗透压336 mOsm/L,意识障碍未改善,脑MRI正常,高渗状态,给予5%葡萄糖输入,胃管内注入白开水纠正高渗状态及小剂量镇静处理。48 h后患者转危为安,术后7 d出院,康复良好。

作者简介:余 琴,女,重庆市人,主管护师,主要从事妇产科临床护理、内窥镜辅助技术和护理教学方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)89011081, E-mail:LYLFZ8@126.com

收稿日期:2008-07-30;修回日期:2008-08-28

2 讨论

2.1 TURP综合征的命名

宫腔镜手术中,由于宫腔容积小,手术需要使用低黏度液体介质膨胀宫腔,可以是电解质或非电解质液体。在宫腔镜单极电切手术中,为了防止带电离子的传导,只能使用非电解质液体(5%葡萄糖)作为膨宫介质。在一些较复杂的手术操作中,内膜和肌层血管长时间暴露在膨宫介质中,在膨宫压力的作用下液体沿开放的血管进入体循环,当机体的吸收量超过一定的阈值,即可出现体液超负荷和血浆的低渗透压状态及稀释性低钠血症,从而引发急性左心功能衰竭、肺水肿、脑水肿等一系列临床表现。其发病见于泌尿外科经尿道前列腺切除手术(transurethral resection of prostate, TURP),因此称之为TURP综合征,是宫腔镜手术中常见且严重的并发症之一,发生率为0.47%[1],其病因复杂,病情凶险,如对此并发症早期认识不足,可贻误治疗,导致死亡。

2.2 TURP综合征的表现

TURP综合征是由于大量灌流液在体内迅速吸收后引起的一系列症状和体征,其早期表现为[2]:因血容量增加,初期血压升高,中心静脉压升高及心动过缓,后期血压下降;肺水肿时出现呼吸困难、呼吸急促、喘息和紫绀缺氧表现;脑水肿时表现烦躁不安、恶心呕吐、头痛、视力模糊、意识障碍、呼吸表浅等;肾水肿时则可引起少尿或无尿。临床上根据其发生的程度和速

(下转2023页)