文章编号:1000-5404(2010)10-1003-05

论著

外源性甲状旁腺素对小鼠骨折愈合的影响

谢杨丽,苏 楠,金 旻,赵 玲,陈 林 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤实验室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] 目的 观察外源性甲状旁腺素(parathyroid hormone,PTH)对骨折愈合的影响。**方法** 按闭合性骨折制作模型的方法建立小鼠胫骨骨折模型,并在观察期内每天皮下注射 PTH1-34(80 μg/kg),取材,检测血清钙磷水平,X 线摄片与组织学观察骨折愈合情况,检测第 1、3、7、14、21 天和第 28 天骨痂组织中调节骨代谢的相关基因 mRNA 的表达情况。**结果** PTH1-34 不影响血清钙磷水平,但能在一定程度上使骨折后 7 d 软骨痂增加,骨折后 14 d 残余软骨痂减少,骨折后 21 d 骨髓腔中残余编织骨减少。在骨折的早期(3 ~ 7 d),PTH 给药组中的增殖相关基因 PCNA 和 IGF-1 mRNA 的表达与对照组相比明显增高 ($P < 0.05$);在骨折的中晚期(7 ~ 28 d),PTH 给药组中的成骨相关基因 Cbfa-1、Col-1、OCN、ALP mRNA 的表达与对照组相比,有明显增高($P < 0.01$),在此时期,RANKL/OPG mRNA 的比值也有统计学差异($P < 0.01$)。**结论** 在骨折愈合过程的不同阶段,外源性 PTH 可以通过调节不同的骨代谢相关基因的表达来促进骨折的愈合。

[关键词] 甲状旁腺素;骨折愈合;骨代谢
[中图法分类号] R683.42; R364.3; R458.1 **[文献标志码]** A

Effects of exogenous PTH1-34 on healing of bone fracture in mice

Xie Yangli, Su Nan, Jin Min, Zhao Ling, Chen Lin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Center of bone Metabolism and Repair, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] Objective To investigate whether exogenous parathyroid hormone (PTH) can stimulate bone fracture healing. Methods Closed proximal tibia fracture was created and stabilized with an intramedullary pin in 60 2-month-old mice. The 50 surviving mice were randomly and equally divided into PTH treatment group and control group. Mice of different groups received a daily injection of PTH1-34 (80 μg/kg) or saline for 1 to 28 d post-fracture, and the concentration of serum calcium and phosphorus were measured and callus tissue properties was analyzed at 1, 2 and 3 weeks post-fracture by radiography and histology. Total RNA was extracted from callus tissues, and the expression levels of bone formation-related genes were evaluated by real-time PCR. Results The serum calcium and phosphorus levels were not significant different between 2 groups. In 7 d post-fracture, cartilaginous callus areas were increased in PTH-treated mice compared with that of control mice. In contrast, in 14 d post-fracture, the remnant cartilaginous callus areas were smaller in PTH-treated mice than that in control mice. The remnant fibrous bone areas in marrow cavity were also reduced in PTH-treated mice compared to control mice in 21 d after fracture. In the early stages of fracture (3 to 7 d), compared with the control group, the PCNA and IGF-1 mRNA expressions were obviously increased in PTH treatment group. In the middle and late (7 to 28 d) stages of fracture, compared with the control group, the Cbfa-1, Col-1, OCN, ALP mRNA expressions were significant increased in PTH treatment group. Conclusion These results indicate that exogenous PTH enhances bone fracture healing in terms of increasing callus areas, endochondral bone formation and osteoblastic bone formation, possibly through upregulating PCNA, IGF-1, Cbfa-1, Col-1, OCN, and ALP at different stage of the healing process.

[Key words] parathyroid hormone; fracture healing; bone metabolism

Supported by the National Basic Research Program (973 program,2005CB522604) and the National Natural Science Foundation of China (30530410). Corresponding author:Chen Lin,Tel:86-23-68757041,E-mail:linchen70@163.com

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划,2005CB522604);国家自然科学基金重点项目(30530410)
[通信作者] 陈 林,电话:(023) 68757041,E-mail:linchen70@163.com

甲状旁腺素(parathyroid hormone,PTH)对骨骼的作用很复杂,既能促进骨形成,又能促进骨吸收,这依赖于给药方式与给药剂量的不同。研究发现,持续性高剂量给予外源性PTH能增加骨吸收,而间断性低剂量给予外源性PTH能通过增加成骨细胞的分化和促进骨形成来增加骨容量[1]。最近的研究[2]发现,在实验性骨折愈合过程中,PTH1-34能增加骨痂的形成和骨骼的机械强度。但目前PTH促进小鼠骨折愈合分子机制尚不明确。骨折愈合过程包括炎症期、血肿机化期、软骨痂形成期、硬骨痂形成期和骨痂塑型改建期等病理学过程。以骨折处骨髓间充质细胞及骨膜下骨生成细胞(osteogenic cell)等可直接分化为成骨细胞为特征的膜内成骨在骨折愈合过程中发挥着重要作用[3]。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)和Ⅰ型胶原(collagen 1,Col-1)是成骨细胞活性的特异性指标;核心结合因子1(Cbfa1)为Runx2家族转录因子,调节成骨细胞和软骨细胞的增殖与分化;胰岛素样生长因子-Ⅰ(insulin-like growth factor-1,IGF-1)也被证实在促进骨形成的作用中起着十分重要的作用[4]。为了探讨PTH对小鼠骨折愈合的分子机制,我们利用小鼠制作标准骨折模型,皮下注射外源性PTH1-34,动态观察PTH在骨折愈合过程中对骨折愈合的影响,重点观察其对调节骨代谢的相关基因表达水平的影响,从而在分子水平探讨低剂量PTH对小鼠骨折愈合的作用,旨在为PTH1-34治疗骨折愈合提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

PTH1-34(Anaspec,美国),Trizol(Invitrogen,美国),逆转录试剂盒(Exscript, TaKaRa,日本),定量PCR反应试剂盒(SYBR™ Premix *Ex Taq*™ Kit,TaKaRa,日本),PCR仪(Eppendorf,德国),实时荧光定量PCR仪(Stratagene,美国),全自动生化分析仪(Beckman,美国),动物微量X光机(FAXITRON,美国),全视野数字乳腺X线摄影(Giotto,意大利)。

1.2 动物模型及分组

2月龄雄性SPF级C57BL/6J小鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心)60只,参考闭合性骨折制作模型的方法来制作骨折模型[5-7]。使用1%戊巴比妥钠按1 ml/kg剂量腹腔注射,待小鼠完全麻醉后,备皮、消毒小鼠右下肢,在小鼠右侧膝关节下切开约8 mm纵行切口,然后使用1 ml 27G注射器针头插入小鼠胫骨生长板,有落空感后拔出。将直径0.3 mm的不锈钢丝作为髓内固定针打入小鼠胫骨髓腔,贯穿整个小鼠胫骨骨干主体部位,分离肌肉筋膜后,于胫骨中上1/3处用眼科剪剪断胫骨。缝合切口,制成小鼠右侧胫骨干骨折模型。存活小鼠取50只使用随机数字表法分为对照组和PTH给药组($n=25$)。PTH给药组每日皮下注射PTH1-34(80 μg/kg),对照组给予等量生理盐水。

1.3 骨折模型制作评价及愈合情况评估

术后清洁环境下单笼饲养,室温22~24 ℃,湿度60%,定期紫外线消毒与排风。常规给水及饮食,小鼠可自由活动。手术当日,观察其苏醒情况。次日,Giotto FFDM系统对小鼠进行X线摄影,观察模型制作情况。于骨折后7、14、21 d和28 d处死小鼠,取其骨折胫骨行动物微量X线片检查,初步评价骨折愈合情况后,多聚甲醛固定,乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片厚5 μm,常规藏红固绿染色,光镜观察其组织病理改变。

1.4 血清中Ca、PO4含量测定

骨折后7、14、21 d和28 d眼眶取血处死小鼠,4 ℃,2 500 r/min离心10 min分离血清,用Beckman DXC800全自动生化分析仪对血清中钙磷含量进行测定($n=8$)。

1.5 总RNA提取、逆转录

取各时间点的右侧胫骨骨折处上下各0.3 mm处剪下骨痂,加入液氮后研磨至粉末加入1 ml Trizol中,常规提取RNA,紫外分光光度计光密度值$D(260)/D(280)$范围在1.8~2.0。取1 μg总RNA为模板,参照逆转录试剂盒的说明书进行逆转录反应。

1.6 实时荧光定量PCR检测

内参和目的基因的引物由上海生工生物工程公司合成(表1)。引物均由Invitrogen公司合成。PCR反应体系配制及扩增条件设置参照定量PCR反应试剂盒说明书进行,每次做3个复孔,每个基因重复3次。扩增条件:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,57 ℃ 20 s,72 ℃ 15 s,40个循环(扩增);95 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,95 ℃ 30 s。定量PCR仪自动给出熔解曲线分析,得到扩增曲线、熔解曲线和样本的循环阈值(cycle threshold,Ct)值。每份标本目的基因的表达强度用其对应的环孢素A结合蛋白(cyclophillin A)基因的量进行校正,即△Ct为目的基因相对于内参基因的表达强度,$\triangle Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{Cyclophillin\ A}$。将目的基因在组织的表达差异倍数用$2^{-\triangle\triangle Ct}$方法计算来表示,而$-\triangle\triangle Ct = -(\triangle Ct_{PTH给药组} - \triangle Ct_{对照组})$。$2^{-\triangle\triangle Ct} > 1$,目的基因表达上调,反之下调。

表1 目的基因引物序列及目的片段长度

基因名称	引物序列	退火温度(℃)	产物长度(bp)
Cyclophilin A	正义链:5′-CGAGCTCTGAGCACTGGAGA-3′	55	82
	反义链:5′-TGGCGTGTAAAGTCACCACC-3′		
OPG	正义链:5′-TCCCTTGCCCTGACCACTCTT-3′	56	152
	反义链:5′-CAGGTAACGCCCTTCCTCACA-3′		
RANKL	正义链:5′-CCGAGACTACGGCAAGTACC-3′	55	206
	反义链:5′-GCGCTCGAAAGTACAGGAAC-3’		
Cbfa-1	正义链:5′-CCTGAACTCTGCACCAAGTC-3′	54	232
	反义链:5′-GAGGTGGCAGTGTCATCATC-3′		
IGF-1	正义链:5′-GTGGACCGAGGGGCTTTTACTTC-3′	60	246
	反义链:5′-TTTGCAGCTTCGTTTTCTTGTTTG-3′		
PCNA	正义链:5′-CACCAAATCAAGAGAAAGTT-3′	57	602
	反义链:5’-GAGAATGGAGAGAAAAGAAA-3′		
ALP	正义链:5′-CTTGCTGGTGGAAGGAGGCAGG-3′	55	393
	反义链:5′-GGAGCACAGGAAGTTGGGAC-3′		
Col-1	正义链:5′-AATGGTGAGACGTGGAAACCCGAG-3′	60	184
	反义链:5′-CGACTCCTACATCTTCTGAGTTTGG-3′		
OCN	正义链:5′-TCTGACAAAGCCTTCATGTCC-3′	58	199
	反义链:5′-AAATAGTGATACCGTAGATGCG-3′		

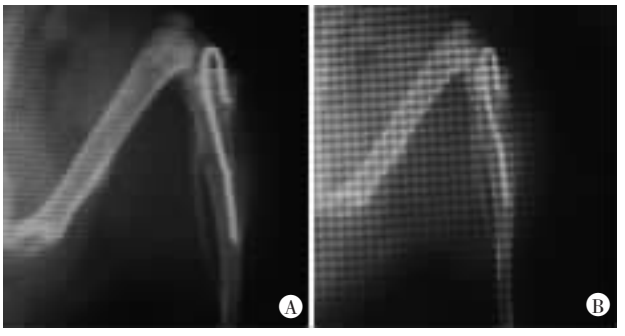
1.6 统计学方法

数据值以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件对两组均数进行独立样本的 t 检验（双侧）。

2 结果

2.1 骨折模型制作成功

骨折小鼠麻醉后 2～3 h 可完全苏醒并逐渐恢复正常活动，但伤侧肢体在术后 3～5 d 方可承质量。小鼠可自由饮水、饮食及活动，两组实验动物术后成活率均为 100%，取其中 50 只进入结果分析。术后次日 X 线片示两组骨折制作成功，对合良好，未出现扭转，错位及多余碎骨片（图 1）。

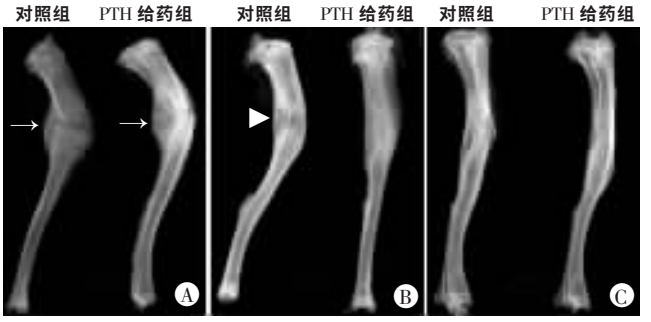


A：对照组；B：PTH 给药组

图 1　骨折模型制作鉴定

2.2 骨折愈合情况评价

利用 X 线片对小鼠的胫骨骨折愈合情况进行大体观察（图 2）。骨折后 14 d，对照组与给药组均出现明显骨桥，PTH 给药组的骨痂密度较对照组高。骨折后 21 d，对照组骨折断端虽出现骨性连接，但骨折线清晰可见，PTH 给药组骨折已基本愈合，处于骨痂改建阶段。骨折后 28 d，两组骨折均已完全愈合。

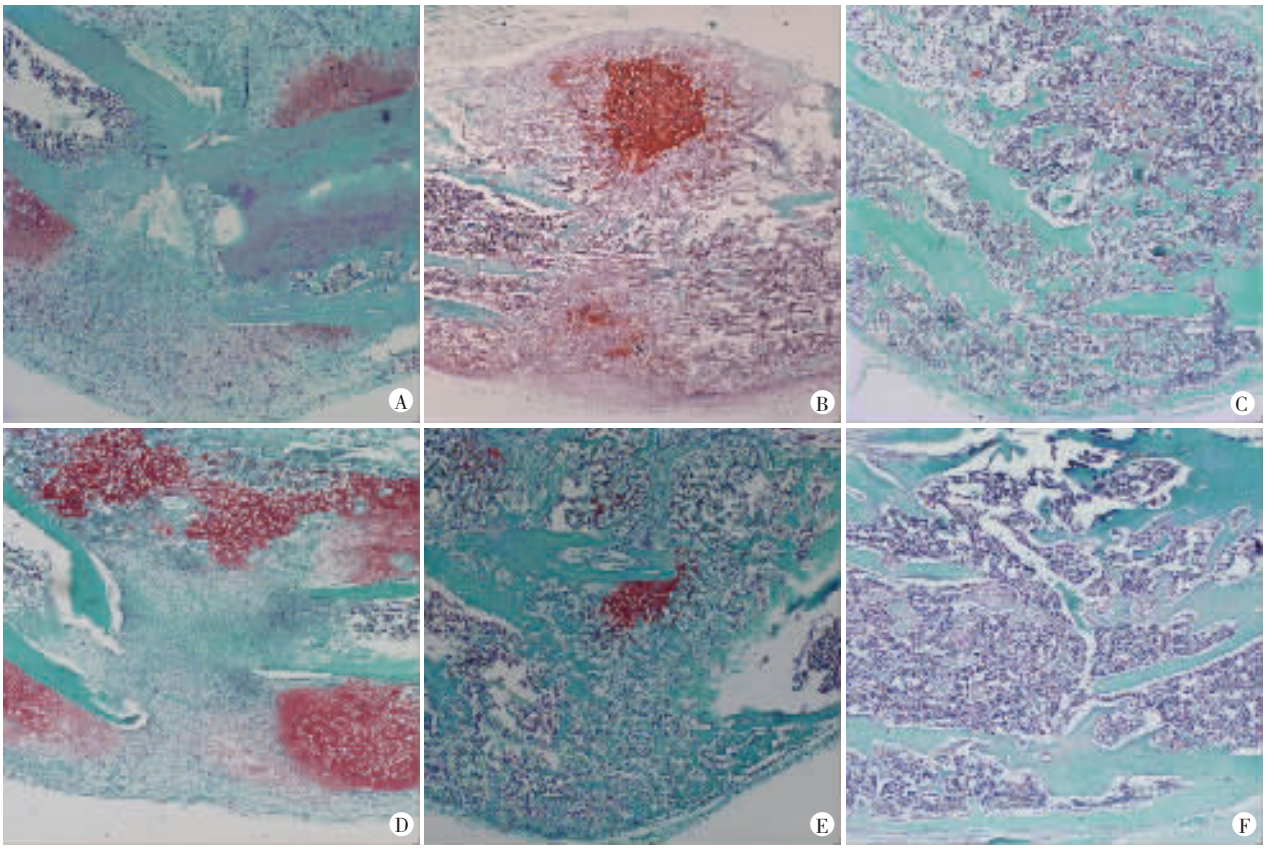


↑：骨桥；▲：骨折线

A：第 14 天；B：第 21 天；C：第 28 天

图 2　骨折后第 7、14、21 天小鼠胫骨 X 线片表现

骨折后 7 d，骨痂主要由软骨性骨痂及少量骨性骨痂组成。与对照组小鼠相比，PTH 给药组小鼠的总骨痂面积、软骨性骨痂面积明显增加。骨折后 14 d，大部分软骨性骨痂已被骨性骨痂替代。此时，与对照组小鼠相比，PTH 给药组小鼠的总骨痂面积和骨性骨痂面积都明显增加，但残留的软骨性骨痂面积则明显减小。骨折 21 d 后，骨痂处于重建阶段。与对照组小鼠相比，PTH 给药组小鼠骨髓腔已基本再通，只有极少量残存的编织骨，而对照组小鼠骨髓腔中有较多编织骨（图 3）。



A、B、C：分别为对照组骨折后第 7、14、21 天骨痂；D、E、F：分别为 PTH 给药组骨折后第 7、14、21 天骨痂

图 3　胫骨骨折后第 7、14、21 天骨痂组织学病理观察　（藏红固绿　×40）

2.3 PTH对小鼠血清总钙、磷含量的影响

体内钙磷代谢水平的改变常常会影响成骨矿化功能。为明确PTH给药组骨折愈合的改变是否继发于体内钙磷代谢的改变,我们检测了两组小鼠血清钙磷水平发现,PTH给药组与对照组各时相点血清总钙、磷含量(图4)均在小鼠正常血清钙磷含量范围内,且没有统计学差异($P>0.05$)。

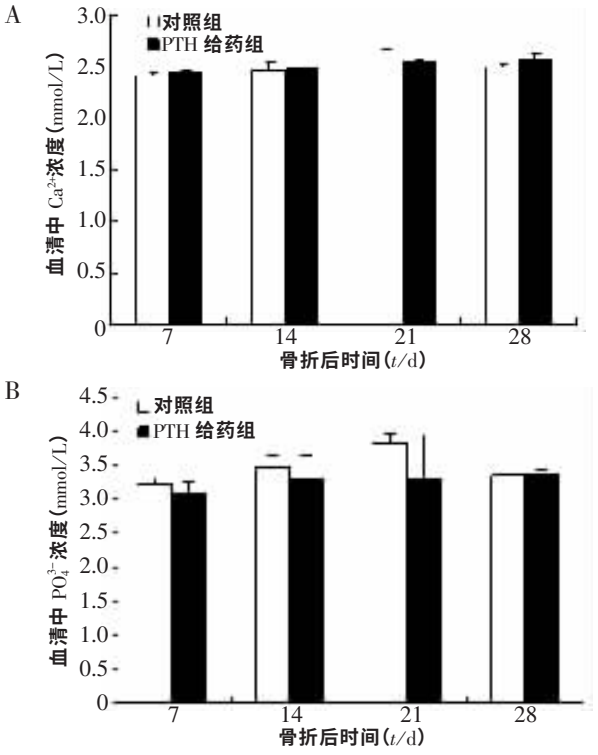


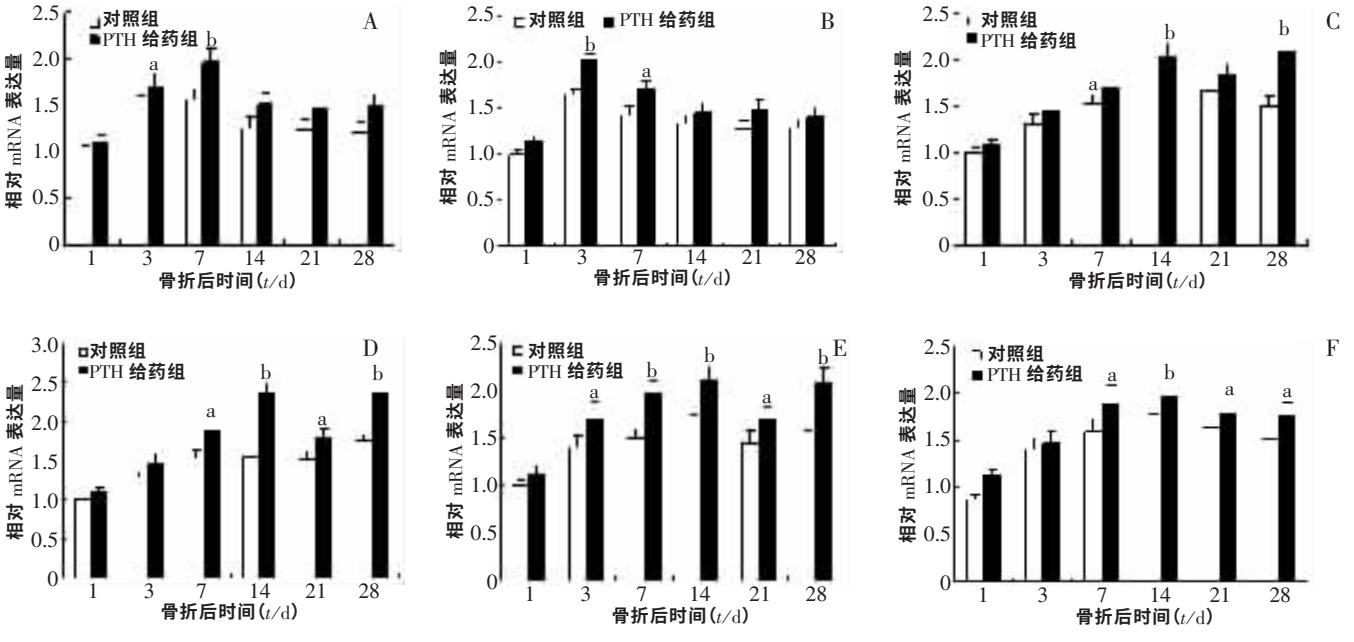
图4 PTH对小鼠血清总钙(A)、磷(B)含量的影响

2.4 PTH对小鼠骨折愈合过程中相关基因mRNA表达水平的影响

与对照组相比,在骨折后第3天IGF-1、增殖性细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)mRNA的水平明显增加($P<0.05$),持续到第7天,随后逐渐下降(图5A、B);PTH给药组中核结合因子a-1(core-binding factor a-1,Cbfa-1)、Ⅰ型胶原(collagen 1,Col-1)、骨钙素(osteocalcin,OCN)mRNA的水平从骨折后1周开始显著升高,且持续到骨折后第4周(图5C、D);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP) mRNA水平从骨折后第3天开始有差异,且持续到骨折后第4周(图5E);核因子κB受体活化因子配基/骨保护素比值(receptor activator of NF-κB ligand/ osteoprotegerin,RANKL/OPG)的比值从骨折后第1周开始有统计学差异($P<0.05$),第2周差异达到最大,随后差异减小,且持续到骨折后第4周(图5F)。

3 讨论

为明确外源性PTH1-34在骨折愈合过程中的作用,我们通过对骨折后小鼠间歇给予PTH1-34 80 μg/(kg·d),或相应剂量的生理盐水进行对照观察。影像学结果显示,给药组骨痂密度和骨连接程度较对照组好。组织学发现,在骨折后7 d PTH给药组小鼠软骨痂面积较对照组增多;在骨折后7 d和14 d,给药组的总骨痂面积和骨性骨痂面积都较相应对照组多,骨折14 d PTH给药组残余软骨痂较对照组减少;骨折后21 d,PTH给药组残余编织骨减少,骨髓腔基本再通。由此说明,间歇给予PTH1-34 80 μg/(kg·d)



A: IGF-1; B: PCNA; C: Cbfa-1; D: OCN; E: ALP; F: RANKL/OPG比值

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与相同时间点的对照组比较

图5 PTH对骨折愈合过程中调节骨代谢相关基因表达水平的影响

可以促进骨折愈合过程中软骨形成,加速软骨向骨的转化及骨的矿化。血清钙磷测定发现,PTH1-34 不影响小鼠的血液钙磷代谢。以上结果提示,PTH1-34 促进成骨作用不依赖于血清钙磷代谢的变化,可能是直接影响了成骨细胞的成骨功能。

先前的体内研究发现 PTH 促进骨形成作用受 IGF-1 的调节[6]。体外研究也发现 IGF-1 可以增加成骨细胞的增殖和分化,并且增加胶原的合成,阻断 IGF-1 能抑制 PTH 促进胶原的合成和 ALP 的活性。IGF-1 与 IGF-IR 基因敲除小鼠对 PTH 的促成骨作用没有反应[8]。以上研究提示,IGF-1 的可能是低剂量 PTH 促进骨折愈合的一个分子机制。本研究表明:与对照组相比,PTH 给药组中的 IGF-1 mRNA 从骨折后第 3 天就明显增加,直至骨折后第 7 天差异达到最大,随后逐渐减小;同时 PCNA mRNA 在骨折后第 3 天就达到最大差异,随后差异逐渐减小。PCNA 为增殖性细胞核抗原,反映了骨膜下成骨细胞的增殖情况,而 IGF-1 有促进成骨细胞增殖和分化作用。先前的体外研究显示 PTH 刺激成骨细胞的增殖可以不依赖于 IGF-1[9,10],PCNA 和 IGF-1 变化趋势不一致,提示 PCNA 的变化可能是 IGF-1 和 PTH 两种不同途径所致。此外我们发现骨折后不同时期,PTH 给药组小鼠成骨性相关基因 Cbfa-1、Col-1、OCN、ALP 明显高于对照组小鼠,这可能继发于成骨细胞增殖与分化的增加。由此说明,在骨折愈合过程中,间歇给予 PTH1-34 可以增加成骨细胞的数量与活性,加速骨折愈合过程中的成骨作用,从而加速软骨痂向骨性骨痂的转换,促进了骨折的愈合。这与其他研究者的结果是一致的[11-15]。

骨折的愈合过程是一个骨重建的过程,在该过程中骨形成和骨吸收之间的相互协调至关重要[16,17]。因此我们通过检测 RANKL/OPG 的比值来观察破骨细胞的活性,结果显示,在骨折后第 7 天,破骨细胞活性在 PTH 治疗组明显高于对照组,骨折后第 14 天差异达到最大,随后逐渐降低。这可能是在骨折愈合过程中,PTH 通过调节 OPG 和 RANKL 的表达来促进破骨细胞的骨吸收,加速骨痂组织的改建。

综上所述,外源性 PTH 可以通过促进骨祖细胞的增殖,骨基质蛋白的合成,骨诱裂的发生来促进骨痂的形成与重建,在治疗骨折愈合方面有一定的临床应用价值。

参考文献:

[1] Goltzman D. Studies on the mechanisms of the skeletal anabolic action of endogenous and exogenous parathyroid hormone[J]. Arch Biochem Biophys, 2008, 473(2): 218-224.

[2] Barnes G L, Kakar S, Vora S, *et al*. Stimulation of fracture-healing with systemic intermittent parathyroid hormone treatment[J]. J Bone Joint Surg Am, 2008, 90(Suppl 1): 120-127.

[3] Hofmann A, Mattyasovszky S G, Bruning C, *et al*. Osteoblasts: cellular and molecular regulatory mechanisms in fracture healing[J]. Orthopade, 2009, 38(11): 1009-1019.

[4] Zhou H, Mak W, Kalak R, *et al*, Glucocorticoid-dependent Wnt signaling by mature osteoblasts is a key regulator of cranial skeletal development in mice[J]. Development, 2009, 136(3): 427-436.

[5] 杨启红, 陈林, 朱京慈. 小鼠胫骨骨折愈合中 FGFR3 基因表达的原位定位[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(12): 1220-1222.

[6] Holstein J H, Garcia P, Histing T, *et al*. Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration[J]. J Orthop Trauma, 2009, 23(5 Suppl): S31-S38.

[7] 苏楠,陈林. 小鼠骨损伤模型在骨修复机制研究中的应用[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(3): 271-276.

[8] 吴永发, 王科嘉, 苏佳灿. 骨形态发生蛋白主导的多因子联合应用促进成骨作用研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2009, 30(7): 843-845.

[9] Locklin R M, Khosla S, Turner R T, *et al*. Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone[J]. J Cell Biochem, 2003, 89(1): 180-190.

[10] Wang Y, Nishida S, Boudignon B M, *et al*. IGF-I receptor is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on bone[J]. J Bone Miner Res, 2007, 22(9): 1329-1337.

[11] Schmidmaier G, Lucke M, Schwabe P, *et al*. Collective review: bioactive implants coated with poly (D, L-lactide) and growth factors IGF-I, TGF-beta1, or BMP-2 for stimulation of fracture healing[J]. J Long Term Eff Med Implants, 2006, 16(1): 61 - 69.

[12] Kaback L A, Soung-do Y, Naik A, *et al*. Teriparatide (1-34 human PTH) regulation of osterix during fracture repair[J]. J Cell Biochem, 2008, 105(1): 219-226.

[13] Cipriano C A, Issack P S, Shindle L,et al. Recent Advances Toward the Clinical Application of PTH (1-34) in Fracture Healing[J]. HSS J, 2009, 5(2): 149-153.

[14] Warden S J, Komatsu D E, Rydberg J, *et al*. Recombinant human parathyroid hormone (PTH 1-34) and low-intensity pulsed ultrasound have contrasting additive effects during fracture healing[J]. Bone, 2009,44(3): 485-494.

[15] Rowshan H H, Parham M A, Baur D A, *et al*. Effect of intermittent systemic administration of recombinant parathyroid hormone (1-34) on mandibular fracture healing in rats[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2010,68(2): 260-267.

[16] Cox G, Einhorn T A, Tzioupis C, *et al*. Bone-turnover markers in fracture healing[J]. J Bone Joint Surg Br, 2010, 92(3): 329-334.

[17] de-Castro L F, Lozano D, Dapía S, *et al*. Role of the N- and C-terminal fragments of parathyroid-hormone-related protein as putative therapies to improve bone regeneration under high glucocorticoid treatment [J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(4): 1157-1168.

(**收稿**:2010-02-27;**修回**:2010-03-30)

(编辑 王小寒)