论著

文章编号:1000-5404(2010)22-2420-04

# 妊娠对兔骨折愈合的影响研究

李曙光[1*],张国志[1],袁 强[1],张爱国[1],王志文[2],李建岷[1],段东升[3*](063000,河北 唐山,河北联合大学:附属医院普外科[1],中医系[2];063200,河北 唐山,冀东油田职工医院外科[3])

【摘要】 **目的** 探讨妊娠对兔骨折愈合的影响。**方法** 将70只日本大耳白雌兔按随机数字表法分成对照组($n$=30)、妊娠前组($n$=40),对照组不做处理。妊娠前组交配受孕,受孕后选出30只组成妊娠组。妊娠组孕后9 d分组造模成左小腿中段闭合骨折模型,按造模前,造模后即时,造模后1、2、3周各时相点抽取耳缘静脉血或心穿血,提取血清后-80 ℃冻存,一并送检生长激素,按时组织学检查,免疫组化检查、计算机数字化X线成像(computed radiography,CR)检查,其数据行统计学检验。**结果** 妊娠组造模后即时,造模后1、2、3周血清生长激素值[(1.331±0.067)、(1.426±0.024)、(1.507±0.109)、(1.826±0.289) ng/ml]高于对照组[(1.208±0.151)、(1.317±0.102)、(1.246±0.192)、(1.340±0.313) ng/ml]($P<0.05$);妊娠组造模后1、2、3周的骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein,BMP)平均光密度值和平均积分光密度值均高于对照组($P<0.05$),CR定量测得的骨痂平均光密度值均高于对照组($P<0.05$)。**结论** 兔早中期妊娠可能对骨折愈合有促进作用。

【关键词】 骨折愈合;兔;妊娠;影响
【中图法分类号】 R363.27;R683.7;14.1 【文献标志码】 A

# Effect of pregnancy on fracture healing in rabbits

Li Shuguang[1], Zhang Guozhi[1], Yuan Qiang[1], Zhang Aiguo[1], Wang Zhiwen[2], Li Jianmin[1], Duan Dongsheng[3]([1]Department of General Surgery, Affiliated Hospital, [2]Faculty of Chinese Traditional Medicine, Hebei United University, Tangshan, Hebei Province, 063300; [3]Department of Surgery, Worker's Hospital of Jidong Oilfield, Tangshan, Hebei Province, 063200, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effect of pregnancy on fracture healing of rabbit. **Methods** A total of 30 pregnant Japanese big ears white female rabbits and 30 matched female rabbits were subjected. Fracture model was established in 9 d after pregnancy. Before, and 1, 2, and 3 weeks after model establishment, their blood was extracted and stored at -80 ℃ for growth hormone with radioimmunoassay. Callus samples were collected for morphological and immunohistochemical study. Computed radiography (CR) was performed for radiological data. **Results** Serum growth hormone in pregnant group was 1.331±0.067, 1.426±0.024, 1.507±0.109 and 1.826±0.289 ng/ml respectively in 0, 1, 2 and 3 weeks of model establishment, significantly higher than those in control group except for the time of model establishment (1.208±0.151, $P>0.05$; 1.317±0.102, 1.246±0.192 and 1.340±0.313 ng/ml for the 3 time points, $P<0.05$). There was more bone morphogenetic protein (BMP) expressed in the callus of pregnant group than in that of the control ($P<0.05$). CR indicated that more condensed callus was observed in the pregnant group than in the control ($P<0.05$). **Conclusion** Pregnancy in early metaphase promotes fracture healing in rabbits.

【**Key words**】 fracture healing; rabbits; pregnancy; influence

Li Shuguang and Duan Dongsheng contributed equally to this article. Corresponding author: Wang Zhiwen, Tel: 86-315-3725470

临床上脑外伤患者催乳素升高促进肢体骨折愈合、性激素减少导致骨质疏松或骨质疏松性骨折,引起了我们的注意。雌激素对骨组织代谢、生长、发育等具有间接作用,与雄激素共同参与调节蛋白质合成,可见性激素参与成骨过程中必需的蛋白质合成过程。目前,骨折愈合理论研究愈深愈广,但性激素与骨愈合的关系研究尚少,尤其是妊娠对骨折愈合影响。众所周知,妊娠期各种性激素变化复杂,导致妊娠各期对骨折愈合影响不同。因此,我们利用自制骨折器[1]设计了妊娠兔骨折模型实验,研究妊娠对兔骨折愈合的影响,完善骨折愈合理论。

【通信作者】 王志文,电话:(0315)3725470
* 同等贡献者

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组

同一种源70只4月龄发情期清洁级日本大耳白兔雌兔(体质量约3 kg,由河北联合大学实验动物中心提供),按随机数字表法分成妊娠前组40只,对照组30只,共同散养。抽取造模前耳缘静脉血,将妊娠组发情母兔放入公兔笼内受孕,配种后第8天经摸胎确定受孕。从受孕兔中随机选出30只组成

妊娠组。

### 1.2 骨折造模

妊娠组孕后 9 d 各组均常规左膝周脱毛、碘伏消毒，闭合穿入 2 mm 克氏针后，使用台钳样骨折器[1]于左小腿中段制成闭合骨折模型[2]，抽取造模后耳缘静脉血，查计算机数字化 X 线成像(computed radiography，CR)片[3]，明确骨折情况。各兔同期散养，按时饮食水。

### 1.3 取材及标本处理

造模后 1、2、3 周，按随机数字表法抽取动物 2 组各 10 只心穿取血 10 ml 备用，后气栓法处死，行 CR 检查，拔除克氏针后行骨密度检查。各血样 3 000 r/min 离心取上清，超低温(－80 ℃)冻存，送至中国北京北方生物技术研究所检测生长激素[4](放免法)。切取各兔骨痂标本于同样部位纵行一分为二，其一立即置入 10% 福尔马林缓冲液中固定，5% EDTA 脱钙 10～15 d。后水洗，脱水，石蜡包埋，制成 4 μm 连续性切片。行组织学、免疫组化检查[4]。

### 1.4 仪器与设备

中国西安产 XH6020γ 免疫计数仪，生长激素放免盒由中国北京北方生物技术研究所提供。CR 机为日本产柯尼卡牌计算机数字 X 线机。德国 Leica 公司 Leica 2155 硬组织切片机。中国武汉产 HPIAS-100 高清晰度彩色病理图文分析系统。德国 LEICA 公司制造 Leica MPS30 荧光/光学显微镜及显微照相机。

### 1.5 CR 图像分析

1.5.1 图像输入　以同样条件所摄 CR 片储存于移动硬盘上，并输入图像分析系统。

1.5.2 负像变换　通过“负像变换”将 CR 片正像转换为负像(即黑处变白，白处变黑)。

1.5.3 图像分割及处理　采用“交互分割”分割骨痂，再经“图像修整”去除图像不光滑边界，并去掉小孤立点。

1.5.4 尺寸定标　以图像的实际尺寸确定微机的测量长度单位。

1.5.5 光密度定标　每个骨折图像测量前均选该图像周围背景最亮处(负像)作光密度定标。

1.5.6 统计参数　微机对每个分割图像进行测量统计，测出该处平均光密度值[3]。

### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行各检测指标的独立样本均数 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 生长激素

造模前，2 组生长激素无统计学差异($P>0.05$)；造模后即时，妊娠组生长激素水平升高($P<0.05$)；1、2、3 周时，妊娠组均较对照组水平明显升高($P<0.05$)，随着周次增长，妊娠组生长激素升高明显。提示妊娠组随着妊娠月份增长，生长激素分泌增多(表 1)。

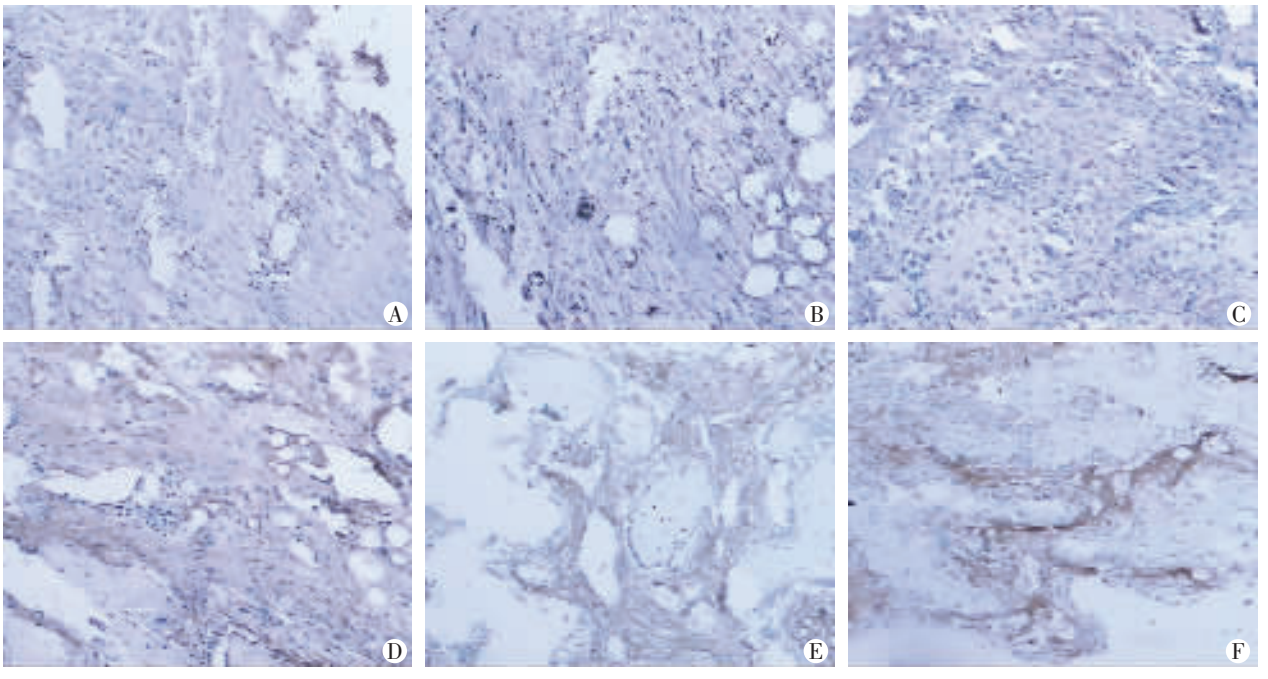
**表 1　2 组不同时间点血清中生长激素值**(ng/ml，$\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 造模前 ($n=30$) | 造模后即时 ($n=30$) | 造模后 1 周 ($n=10$) | 造模后 2 周 ($n=10$) | 造模后 3 周 ($n=10$) |
|---|---|---|---|---|---|
| 对照组 | 1.254±0.182 | 1.208±0.151 | 1.317±0.102 | 1.246±0.192 | 1.340±0.313 |
| 妊娠组 | 1.243±0.135 | 1.331±0.067[a] | 1.426±0.024[a] | 1.507±0.109[a] | 1.826±0.289[a] |

a：$P<0.05$，与对照组比较

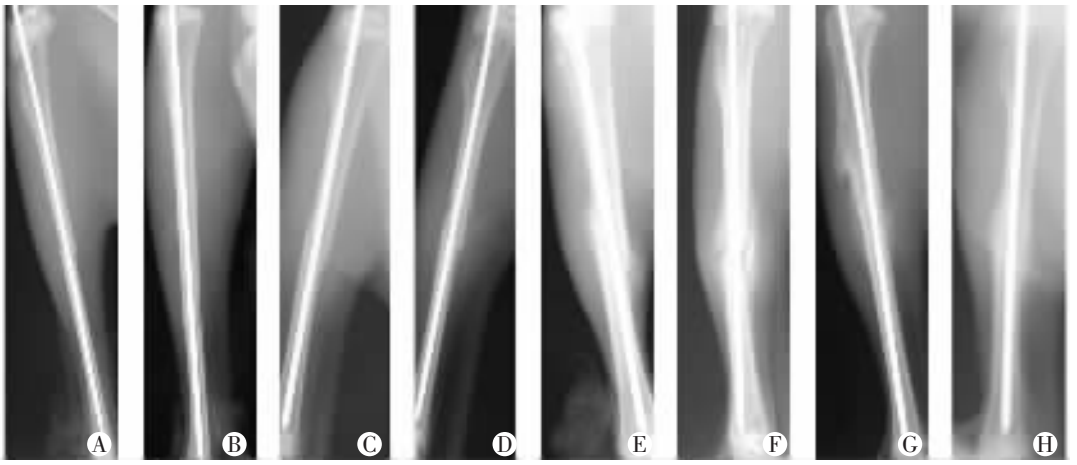
### 2.2 骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein，BMP)检测结果

BMP 主要沉积于功能活跃的成骨细胞内及其周围和新生骨小梁边缘，纤维骨痂中含量较少，骨折后 1、2、3 周骨痂局部的 BMP 含量逐渐增多，妊娠组在骨折后 3 周，随着骨小梁的成熟，BMP 含量减少，但仍高于对照组(图 1，表 2、3)。




A：对照组 1 周；B：妊娠组 1 周；C：对照组 2 周；D：妊娠组 2 周；E：对照组 3 周；F：妊娠组 3 周

**图 1　各组 1、2、3 周骨痂 BMP 免疫组化观察**(SABC ×100)




A：对照组造模后即时；B：妊娠组造模后即时；C：对照组1周；D：妊娠组1周；E：对照组2周；F：妊娠组2周；G：对照组3周；H：妊娠组3周

**图2 2组造模后即时，造模1、2、3周骨折愈合CR影像**

**表2 2组不同时间点骨痂中BMP光密度值（/μm²，$n=10$，$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | 造模后1周 | 造模后2周 | 造模后3周 |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 0.139 2±0.066 4 | 0.295 1±0.077 4 | 0.384 3±0.087 2 |
| 妊娠组 | 0.287 7±0.109 3[a] | 0.529 9±0.149 6[a] | 0.513 4±0.081 6[a] |

a：$P<0.05$，与对照组比较

**表3 2组不同时间点骨痂中BMP积分光密度值（/10² μm²，$n=10$，$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | 造模后1周 | 造模后2周 | 造模后3周 |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 4.597 8±1.267 1 | 6.653 7±1.842 5 | 8.053 7±1.335 9 |
| 妊娠组 | 8.156 2±1.270 3[a] | 9.892 7±1.709 8[a] | 9.173 8±2.563 8[a] |

a：$P<0.05$，与对照组比较

### 2.3 CR片定量结果

在骨折修复过程中，2组骨痂平均光密度值造模后1、2、3周逐渐增高（图2，表4，$P<0.05$）。表明妊娠能加快骨折愈合速度，提高骨折愈合质量。

**表4 2组不同时间点骨痂CR片的光密度值（/μm²，$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | 造模后即时（$n=30$） | 造模后1周（$n=10$） | 造模后2周（$n=10$） | 造模后3周（$n=10$） |
|---|---|---|---|---|
| 对照组 | 0.344 7±0.073 5 | 0.408 3±0.069 6 | 0.391 2±0.095 6 | 0.440 7±0.100 7 |
| 妊娠组 | 0.347 9±0.084 0 | 0.576 0±0.143 1[a] | 0.614 8±0.161 3[a] | 0.596 5±0.103 3[a] |

a：$P<0.05$，与对照组比较

## 3 讨论

临床上脑外伤患者肢体骨折愈合加速，其机制与催乳素相关[5]。因此，我们利用自制骨折器[1]设计了妊娠兔骨折模型实验，通过本实验研究妊娠对兔骨折愈合的影响。

### 3.1 妊娠期内分泌系统的变化

妊娠期垂体增大1～2倍，尤其在妊娠末期，腺垂体增生肥大明显。促性腺激素分泌增多，妊娠黄体及胎盘分泌大量雌、孕激素，对下丘脑及腺垂体的负反馈作用，使卵泡刺激素（FSH）及促黄体生成激素（LH）分泌减少，故妊娠期间卵巢内的卵泡不再发育成熟，也无排卵。同时，催乳激素随妊娠进展逐渐增量，直至足月妊娠。催乳激素有促进乳腺发育的作用，为产后泌乳作准备。

妊娠期在人绒毛膜促性腺激素（HCG）作用下，雌激素大量增加，皮质醇、睾酮增加，妊娠兔呈高代谢征象，同时阴毛增多、增粗[6,7]。胰腺功能亢进，特别表现为胰腺β细胞亢进，胰腺分泌增加，胰岛素从孕中期开始增加，至分娩前达高峰。因此妊娠兔高葡萄糖血症和高胰岛素血症，确保了兔胎儿葡萄糖的供应，来维持体内糖代谢。

### 3.2 妊娠与骨愈合的关系

哺乳动物的下丘脑、垂体和卵巢分泌的激素在功能上相互作用，构成一个完整的神经内分泌生殖调节体系，即下丘脑-垂体-卵巢轴，它在生殖活动中起着主要的调节作用。下丘脑中分布的促性腺激素释放激素（GnRH）神经元可以分泌GnRH，GnRH调节垂体中促性腺激素细胞分泌促性腺激素FSH和LH，促性腺激素作用于卵巢受体，引起雌激素和孕酮分泌并影响生殖活动。从组织学角度上研究下丘脑-垂体-卵巢轴中的结构，可见GnRH神经元、促性腺激素细胞、卵泡随周期性变化而呈现出不同的形态结构和分泌特点。由此，妊娠期下丘脑-垂体-卵巢轴分泌的各种激素（如雌孕激素、生长激素、转化生长因子[8]、胰岛素样生长因子[9]、血管内皮因子[10]、表皮样生长因子[11]、催乳素[5]、睾酮、HCG、FSH、LH及促肾上腺皮质激素、皮质醇[12]等），尤其是生长激素，在骨的生长及骨折愈合时起着重要作用[4]。

### 3.3 生长激素及骨形成蛋白与妊娠兔骨愈合

生长激素由垂体前叶嗜酸性细胞产生，是胶原生长的一种重要调节剂，在骨的生长及骨折愈合时起着重要作用，GH可刺激胰岛释放生长因子——IGF-Ⅰ、IGF-Ⅱ生成，刺激成骨细胞，促进骨细胞有丝分裂，成

骨细胞分化,兴奋碱性磷酸酶活性,促进骨钙素的合成,增强骨连接素的基因表达。同时,生长激素通过促进钙吸收,使沉积在骨折端的钙增多;另外,其兴奋肾脏 1-羟化酶活性,使 25(OH)$_2$D$_3$ 转变为 1,25(OH)$_2$D$_3$,形成骨盐,使新骨生长[13]。同时,生长激素使赖氨酸运转到细胞内的过程加速,RNA、DNA 和基质蛋白合成增加,刺激硫酸软骨素和骨胶质的合成,使骨折处及附近骨外膜生发层内前成骨细胞、成骨细胞成软骨细胞同步性增殖,加速骨折愈合过程。本研究中妊娠前,2 组生长激素无统计学差异;妊娠后 1、2、3 周,妊娠组生长激素分泌增高。由此可见,妊娠期垂体促进生长激素分泌在纤维骨痂形成期,促进钙盐沉积,骨痂塑形改建期,加速改建过程。

骨折愈合是骨折或骨缺损的修复过程,其实质是骨损伤后的再生过程。近年来,随着一些新方法的应用,如放射性核素示踪、电镜技术、免疫组化分析、DNA 及 RNA 探针技术等,使人们对骨的愈合过程中的某些环节有了进一步认识。现已从骨基质和骨细胞及骨器官培养中分离出多种骨源性生长因子(BDGF),如胰岛素样生长因子、转化生长因子、成纤维细胞生长因子、血小板衍生生长因子以及 BMP[14],这些因子有着不同的生物活性,主要有致有丝分裂作用、分化作用、趋化作用及溶骨作用。事实证明,骨细胞产生一定量的生长因子储存于细胞外基质中;同时,骨细胞还分泌一些生长因子作用于相邻的成骨细胞(旁分泌作用)及其自身(自分泌作用)。骨吸收时,储存于骨基质中的生长因子得以释放,作为迟缓性旁分泌剂,刺激成骨细胞前体的增殖。归根结底这些生长因子通过刺激成骨细胞的增殖及其活性,调节局部骨生成作用[15]。本实验结果显示:BMP 主要沉积于功能活跃的成骨细胞内及其周围和新生骨小梁边缘,纤维骨痂中含量较少,骨折后 1、2 周骨痂局部的 BMP 含量逐渐增多,尤以妊娠组明显。在妊娠组骨折后 3 周,随着骨小梁的成熟,BMP 含量减少。妊娠组 BMP 高峰期之所以出现在骨折的第 2 周,因为骨折第 1 周连接骨痂主要由成纤维细胞组成,只有骨内外膜成骨细胞合成 BMP,且骨内膜血运不丰富,成骨细胞功能相对不活跃,因而骨痂局部 BMP 浓度低;在骨折后的 2 周,连接骨痂进入软骨成骨阶段,随着毛细血管进入软骨基质的内皮细胞和间充质细胞增殖分化为成骨细胞,形成骨小梁,最终所有的软骨被细嫩的海绵骨替代,沟通了骨膜血运系统与骨髓营养动脉系统,内外骨痂与连接骨痂血运良好,成骨细胞功能最活跃,因而合成 BMP 多;在骨折修复的第 3 周,妊娠组由于其分泌激素的相互作用,新生骨小梁活动逐渐减少,成骨细胞趋于静止,合成 BMP 减少。兔各孕期 CR 片骨痂平均光密度值逐渐增高,说明妊娠兔骨愈合质量优于同期非妊娠兔。早中期妊娠能缩短骨愈合的时间和提高骨愈合的质量,以达到其促进骨折愈合的作用。

本研究通过对妊娠兔生长激素、骨形成蛋白的研究说明,在妊娠早中期,妊娠兔随孕期增长,生长激素分泌增多,骨形成蛋白易形成于骨痂部,有益于骨折愈合。由此可见,早中期妊娠可能有利于兔骨折愈合。我们对骨愈合的分子水平研究,进一步认识了骨愈合过程,明确了妊娠期骨愈合的机制,为骨愈合的基因治疗奠定了基础。

## 参考文献:

[1] 李曙光,王志文,袁强,等. 可控性骨折模型早期内分泌改变的对照研究[J]. 第四军医大学报,2005,26(16):1519.

[2] Alho A, Husby T, Hiseth A. Bone mineral content and mechanical strength. An *ex vivo* study on human femora at autopsy[J]. Clin Orthop Relat Res, 1988, 227:292-297.

[3] 李曙光,王志文,袁强,等. 麝香乌龙丸促进骨折愈合的影像学研究[J]. 中华实用中西医杂志,2004,17(21):3305-3307.

[4] 李曙光,王志文,袁强,等. 骨折愈合过程的生物学检测指标[J]. 华北煤炭医学院学报,2003,5(3):303-305.

[5] Wildburger R, Zarkovic N, Tonkovic G, *et al*. Post-traumatic hormonal disturbances: prolactin as a link between head injury and enhanced osteogenesis[J]. J Endocrinol Invest, 1998, 21(2): 78-86.

[6] 黄遂柱,赵永强,陈风苞,等. 雌激素对实验性骨质疏松症骨折愈合的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2000,6(1):65-68.

[7] 赵永强,王宏跃,李甲振,等. 卵巢摘除及补充雌激素对小鼠骨折愈合中钙沉积的影响[J]. 中医正骨,2000,12(5):3-4.

[8] Schilling B, Yeh J. Transforming growth factor-beta(1), -beta(2), -beta(3) and their type I and II receptors in human term placenta[J]. Gynecol Obstet Invest, 2000, 50(1):19-23.

[9] 陈其新,毛鑫智. 胰岛素样生长因子对胚胎生长发育的作用[J]. 动物医学进展,2001,22(1):34-37.

[10] Shiraishi S, Nakagawa K, Kinukawa N, *et al*. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the human placenta[J]. Placenta, 1996, 17(2/3):111-121.

[11] Hofmann G E, Anderson T L. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptor during implantation in the rabbit[J]. Am J Obstet Gynecol, 1990, 162(3):837-841.

[12] 刘志强,王豫黔,张丹,等. 子宫平滑肌间隙连接蛋白 43、促肾上腺皮质激素释放激素、皮质醇与分娩发动的研究[J]. 现代妇产科进展,2005,14(6):473-475.

[13] Ohlsson C, Bengtsson B A, Isaksson O G, *et al*. Growth hormone and bone[J]. Endocr Rev, 1998, 19(1):55-79.

[14] Bouletreau P J, Warren S M, Spector J A, *et al*. Factors in the fracture microenvironment induce primary osteoblast angiogenic cytokine production[J]. Plast Reconstr Surg, 2002, 110(1):139-148.

[15] Blumenfeld I, Srouji S, Lanir Y, *et al*. Enhancement of bone defect healing in old rats by TGF-beta and IGF-1[J]. Exp Gerontol, 2002, 37(4):553-565.

(收稿:2010-06-09;修回:2010-07-20)
(编辑 邓强庭)