

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.02.006 [http://www.crter.org]
刘凯, 石崇, 刘树发, 张洪凯. 雷洛昔芬促进兔下颌骨骨折的愈合[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(2): 217-222.

雷洛昔芬促进兔下颌骨骨折的愈合★

刘 凯, 石 崇, 刘树发, 张洪凯

佳木斯大学附属第二医院, 黑龙江省佳木斯市 154007

文章亮点:

将雷洛昔芬首次用于兔下颌骨骨折, 发现雷洛昔芬能够促进成骨细胞分化, 加速骨矿物沉积, 同时诱导骨形态发生蛋白 2 表达从而加速骨折的愈合。

关键词:

组织构建; 骨组织构建; 雷洛昔芬; 下颌骨; 骨折愈合; 兔; 骨形态发生蛋白; 组织构建图片文章

摘要

背景: 雷洛昔芬虽在临床中广泛应用于治疗骨质疏松, 但对骨折愈合的影响尚未见报道。

目的: 观察雷洛昔芬对兔下颌骨骨折愈合的影响。

方法: 取新西兰大耳白兔 24 只, 制备双侧下颌角 1.5 mm×10.0 mm 骨缺损模型, 随机抽签法分为 2 组, 实验组于造模后第 2 天开始给予 7.5 mg/(kg·d)雷洛昔芬至 30 d, 对照组不作处理。

结果与结论: X 射线观察造模后 1 周两组骨缺损区骨痂形成不明显。3 周实验组缺损区模糊, 对照组缺损区仍可见; 4 周实验组骨痂多, 髓腔再通; 对照组骨痂较多, 髓腔未通。造模后 1, 3, 4 周实验组骨密度和血清骨源性碱性磷酸酶较对照组明显升高($P < 0.05$), 均于第 4 周时达到高峰; 造模后 3, 4 周实验组骨痂中骨形态发生蛋白 2 的表达强度高于对照组($P < 0.01$)。提示雷洛昔芬能够促进成骨细胞分化, 加速骨矿物沉积, 同时诱导骨形态发生蛋白 2 表达从而加速骨折的愈合。

刘凯★, 男, 1980 年生, 黑龙江省佳木斯市人, 汉族, 2004 年佳木斯大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事颌面外科临床、口腔解剖研究。
30139535@qq.com

通讯作者: 石崇, 硕士, 佳木斯大学附属第二医院, 黑龙江省佳木斯市 154007
1357699514@qq.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)02-00217-06

收稿日期: 2012-03-10
修回日期: 2012-05-05
(20120310002/WL · S)

Raloxifene promotes the healing of mandibular fractures in rabbits

Liu Kai, Shi Chong, Liu Shu-fa, Zhang Hong-kai

The Second Affiliated Hospital of Jiamusi Medical College, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China

Abstract

BACKGROUND: Although raloxifene has been widely applied in the treatment of osteoporosis, its influence on fracture healing is unclear.

OBJECTIVE: To investigate the effect of raloxifene on the healing of mandibular fractures in rabbits.

METHODS: Totally 24 New Zealand white rabbits were collected. Model of bilateral mandibular angle bone defect (1.5 mm×10.0 mm) in rabbits was established. All rabbits were randomly divided into experimental and control groups. The rabbits in the experimental group were performed 7.5 mg/(kg·d) raloxifene at day 2 after modeling for 30 days, while those in the control group had no treatment.

RESULTS AND CONCLUSION: X-ray observation showed that callus formation was not obvious in the two groups after modeling for 1 week. Defect area of the experimental group was indistinct, but that of the control group could be found at week 3. At week 4, callus in the experimental group was increased and medullary cavity passed again. Callus in the control group was more, and medullary cavity did not pass. Compared with control group, bone mineral density and serum bone alkaline phosphatase in the experimental group was increased obviously after modeling for 1, 3 and 4 weeks ($P < 0.05$), and they both reached the peak. The expression of bone morphogenetic protein 2 in callus was higher than that of the control group after

Liu Kai★, Master, Attending physician, the Second Affiliated Hospital of Jiamusi Medical College, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China 30139535@qq.com

Corresponding author: Shi Chong, Master, the Second Affiliated Hospital of Jiamusi Medical College, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China 1357699514@qq.com

Received: 2012-03-10
Accepted: 2012-05-05

modeling for 3 and 4 weeks ($P < 0.01$). These results suggest that raloxifene can promote osteoblast differentiation, accelerate bone mineral deposition, and induce bone morphogenetic protein 2 expression at the same time, and thereby accelerate the healing of bone fracture.

Key Words: tissue construction; bone tissue construction; raloxifene; mandible; fracture healing; rabbits; bone morphogenetic proteins; tissue construction photographs-containing paper

Liu K, Shi C, Liu SF, Zhang HK. Raloxifene promotes the healing of mandibular fractures in rabbits. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(2): 217-222.

0 引言

雷洛昔芬是第二代选择性雌激素受体调节剂^[1-2], 临床上主要用于预防和治疗绝经后妇女的骨质疏松症, 其在骨组织有雌激素激动作用, 能抑制破骨细胞陷窝的形成, 加强成骨细胞增殖活动和增强骨基质蛋白的表达, 维持正常骨结构, 增加骨量, 而在子宫和乳腺组织中有较弱的雌激素激动或拮抗雌激素作用^[3-5]。虽在临床中广泛应用于治疗骨质疏松, 但对骨折愈合的影响尚未见报道。本实验通过多种检测方法观察雷洛昔芬对下颌骨骨折愈合是否有促进作用。

1 材料和方法

设计: 对比观察。

时间及地点: 实验于2010年5至9月在佳木斯大学动物实验中心完成。

材料:

实验动物: 健康新西兰大耳白兔24只, 雌雄不拘, 体质量1.9–2.1 kg, 由佳木斯大学动物实验中心提供。

主要试剂及仪器:

Main reagents and instruments:

试剂及仪器

来源

骨形态发生蛋白 2 抗体、DAB 显色试剂盒、雷洛昔芬	武汉博士德生物工程有限公司
SABC 免疫组织化学试剂盒	北京中杉金桥生物有限公司
X 射片机、X 射线片分析仪	岛津公司, 日本
扫描电镜	美国 Luner 公司
光学显微镜及显微摄影系统	奥林巴斯公司
高速技工马达	佛山医疗器械有限公司

方法:

兔下颌骨骨折模型的制备: 术前动物禁食(不禁水)12 h, 动物腹腔注射10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉。无菌条件下在一侧下颌骨体部切口, 暴露骨面, 用高速技工马达在下颌骨体部垂直造成1.5 mm×10.0 mm的部分骨折模型, 冲洗伤口后分层对位缝合筋膜、肌肉和皮肤。造模后肌肉注射盐酸庆大霉素 4×10^4 U/只, 1次/d, 连续3 d, 分笼饲养。

干预分组: 造模后将24只动物随机抽签法分为2组, 每组12只。实验组于造模后第2天开始口服雷洛昔芬7.5 mg/(kg·d), 每次观察至雷洛昔芬被完全吞服, 共30 d; 对照组, 不作任何处理。放入标准实验室笼中喂养并允许自由活动。

检测指标:

X射线及骨密度测定: 在造模后1, 3, 4周每组随机抽取家兔4只, 行下颌骨正侧位摄片,

观察骨折位置及骨痂生成情况。照射范围包括骨折断端在内长1 cm范围。骨密度测定用骨密度扫描仪测定每组动物颌骨骨折断端处骨密度。

血清骨源性碱性磷酸酶的检测：造模后1, 3, 4周分别抽取兔耳缘静脉血送检。

组织学观察：空气栓塞处死后，切取包含骨缺损在内长度为1 cm的骨组织，去除软组织，在4%戊二醛室温固定24 h或48 h，生理盐水洗干净后，放入15% EDTA中性甲醛溶液中，低温约(4 ℃)脱钙2周，常规石蜡包埋，切片，切片厚5 μm，进行免疫组织化学染色。免疫组织化学染色图像处理应用JD801图像分析仪对骨形态发生蛋白2表达结果进行半定量分析，将免疫组织化学染色切片通过显微镜输入计算机分析系统，所有载玻片均应在同一放大倍数($\times 400$)，同一光强度下分析，每个时相点2张玻片，分别测相同的面积。测量指标：平均吸光度= $\lg 225 - \lg A$ ，A代表测量灰度值。图像表现：背景是灰白色，免疫组织化学的染色是棕红色，之后测定免疫组织化学染色区的吸光度。吸光度值和被染色的颜色深浅度呈正比例，即细胞中骨形态发生蛋白2表达越强，其染色就越深，吸光度值测定就越高。

主要观察指标：两组动物造模后1, 3, 4周行骨密度和血清骨特异性碱性磷酸酶检测，X射线平片和骨形态发生蛋白2免疫组织化学染色并观察。

统计学分析：由通讯作者采用SPSS 17.0软件完成统计处理，实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用重复测量的方差分析和完全随机设计的两样本的t检验， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 动物大体观察及X射线观察 两组兔术后均未出现切口感染及坏死。造模后1周：两组骨缺损区骨痂形成不明显。造模后3周：实验组缺损区模糊，对照组缺损区仍可见。造模后4周：实验组骨痂多，髓腔再通；对照组骨痂较多，髓腔未通，见图1, 2。

2.2 骨密度测定 两组骨密度值进行性升高均于第4周时达到高峰，1周时两组值差异无显著性意义($P > 0.05$)，3, 4周实验组较对照组明显升高($P < 0.05$)，见表1。

2.3 血清骨源性碱性磷酸酶测定 实验组血清骨源性碱性磷酸酶均较对照组高，差异有显著性意义($P <$

0.05)，造模后4周达峰值，见表2。

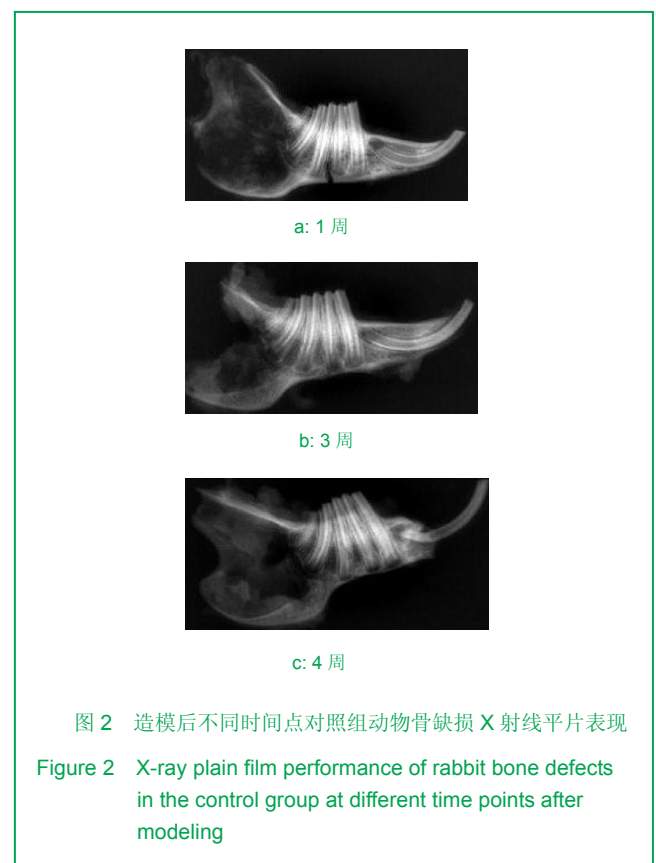
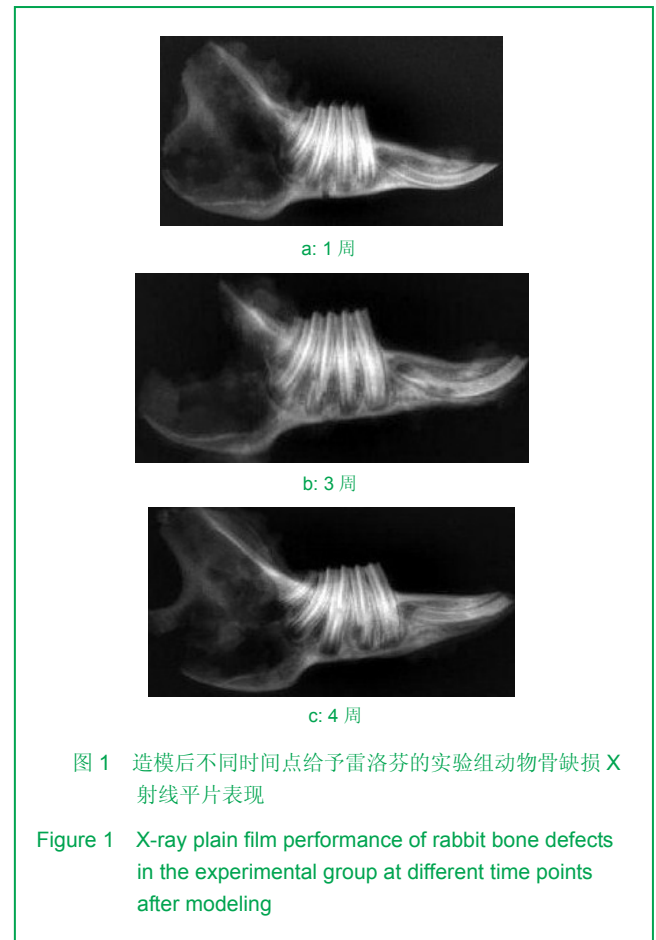


表 1 造模后不同时间点两组动物骨密度比较
Table 1 Comparison of rabbit bone mineral density in the two groups at different time points after modeling ($\bar{x} \pm s, n=4, \text{g/cm}^2$)

组别	1 周	3 周	4 周
实验组	0.501±0.121	0.542±0.028	0.581±0.232
对照组	0.485±0.065	0.512±0.075 ^a	0.546±0.034 ^a

^aP < 0.05, vs. 实验组

表 2 造模后不同时间点两组动物血清骨源性碱性磷酸酶比较
Table 2 Comparison of rabbit serum bone alkaline phosphatase in the two groups at different time points after modeling ($\bar{x} \pm s, n=4, \times 16.67 \text{ nakt/L}$)

组别	1 周	3 周	4 周
实验组	14.46±0.11	14.68±0.12	14.76±0.04
对照组	14.21±0.04 ^a	14.43±0.49 ^a	14.54±0.11 ^a

^aP < 0.05, vs. 实验组

2.4 组织学观察结果 见图3-5。

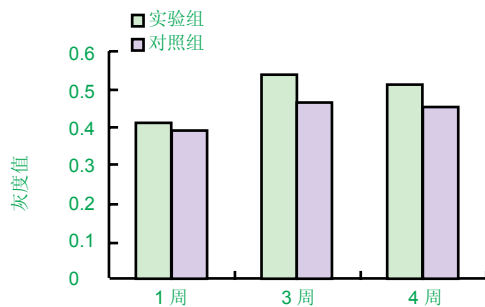


图 3 两组不同时间点骨形态发生蛋白 2 免疫组织化学灰度值比较

Figure 3 Comparison of gray value of bone morphogenetic protein 2 in the two groups at different time points

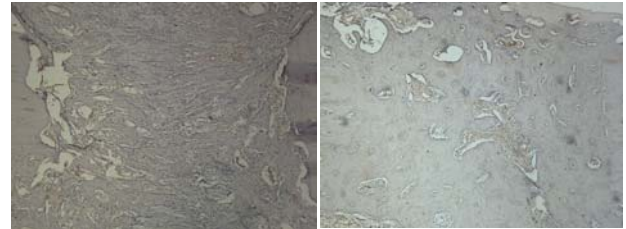
造模后1周：两侧骨端骨细胞、骨折间隙大量成纤维细胞、成骨细胞及成软骨细胞均呈阳性染色，对照组染色强度弱于实验组。

造模后3周：骨端的成骨细胞、成纤维细胞以及骨痂的成骨细胞、成软骨细胞成纤维细胞均呈阳性染色，相比下实验组更强。

造模后4周：骨痂中和骨痂表面成骨细胞呈阳性染色，实验组仍强于对照组。

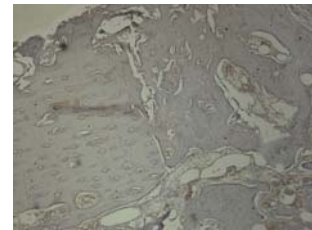
图像分析免疫组织化学染色强度测量结果：两组均在第3周时染色强度最高。统计结果显示，第3，4周实

验组染色强度明显高于对照组，差异有显著性意义(P < 0.01)。表明实验组骨痂中骨形态发生蛋白2的表达强度高于对照组，见图3-5。



a: 1 周

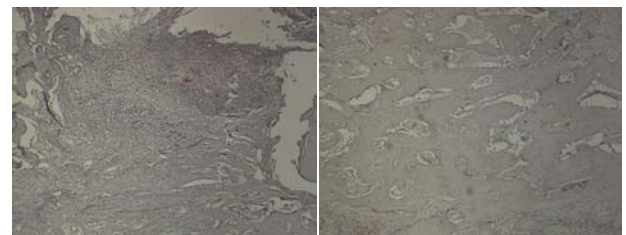
b: 3 周



c: 4 周

图 4 造模后不同时间点给予雷洛昔芬的实验组免疫组织化学观察(×100)

Figure 4 Immunohistochemistry observation of the experimental group at different time points after modeling (×100)



a: 1 周

b: 3 周



c: 4 周

图 5 造模后不同时间点对照组免疫组织化学观察(×100)

Figure 5 Immunohistochemistry observation of the control group at different time points after modeling (×100)

3 讨论

骨折愈合是一个影响因素众多、极其复杂的机体结缔组织再生修复的生理过程^[6-8],传统叙述将骨折愈合的组织学分为4个阶段:炎性阶段、软骨痂阶段、硬骨痂阶段和再塑阶段^[9-10],骨组织时刻处于骨重建的动态变化之中,即不间断的骨形成和骨吸收贯穿于生命的始终。骨重建是个非常复杂的过程,受多种因素的交互作用,这些因素包括成骨细胞、破骨细胞、激素、生长因子、细胞因子,最终达到骨结构的稳定。

从X射线结果分析,造模后1周,实验组骨折处骨痂桥接面积较对照组明显增大。造模后3周,实验组骨折断端已桥接,有连续骨痂形成;对照组断端仅开始桥接。造模后4周,各组两骨折断端均已桥接,断端附近骨膜形成密度较高、体积较大的连续骨痂,实验组骨折基本已骨性愈合,骨折线消失,骨痂密度近似于皮质骨,塑形良好并出现部分髓腔再通,且较对照组骨痂体积大、密度高。

生长因子在骨及软骨的形成、骨折愈合、其他组织修复过程中起着重要的作用^[11-12]。骨形态发生蛋白2是由成骨细胞分泌具有诱导间充质细胞、骨髓基质细胞、骨膜细胞迁徙、增殖分化为软骨细胞、成骨细胞最终导致新骨形成的成骨活性因子^[13-14],骨形态发生蛋白2是公认的最主要的骨形成调控因子^[15-16],体内外实验都证明其有很强的促进成骨细胞分化和诱导体外成骨的能力^[17-19]。Zhou等^[20]研究指出,雌激素替代治疗不仅阻止骨丢失,也增加骨形成,在间充质干细胞中上调成骨基因骨形态发生蛋白2的mRNA表达。骨形态发生蛋白能够诱导未分化的间充质细胞不可逆地分化为成软骨细胞和成骨细胞,导致新骨形成,骨形态发生蛋白的主要生物学作用为诱导间充质细胞分化为成骨细胞,调节细胞外基质的合成和降解^[21-23]。骨形态发生蛋白2的水平可反映成骨细胞骨形成能力^[24],实验组在3,4周时骨断端的骨形态发生蛋白2水平平均高于对照组,差异有显著性意义,说明雷洛昔芬可以促进骨细胞的骨形成,利于骨折愈合。

骨源性碱性磷酸酶由成骨细胞合成,成骨细胞中含有大量的骨源性碱性磷酸酶,当成骨细胞转化为骨细胞时,骨源性碱性磷酸酶活性逐渐下降、消失。骨源性碱

性磷酸酶是骨形成过程必须的催化剂,是反应骨生成速度的最敏感指标,对骨矿化、骨形成有重要作用,对骨钙化障碍的诊断具有重要价值^[25]。本实验所用药物能促进成骨细胞的增生活跃,使血清中骨源性碱性磷酸酶升高,对骨折愈合的成骨有促进作用。

雷洛昔芬实验组可以显著增加骨折端骨痂面积、骨小梁密度及成骨细胞数量;显著提高骨折端骨矿物含量、骨密度,促进骨形态发生蛋白2的表达。通过对实验各个阶段组织切片观察实验组较对照组提前机化血肿,纤维、软骨、骨性骨痂的生长情况都优于对照组,髓腔也较后者提前再通。从理论及动物实验上说明有利于骨折愈合。

作者贡献: 通讯作者和第一作者进行实验设计,实验实施为通讯作者和第三作者,实验评估为第一作者,资料收集为通讯作者和第三作者,通讯作者成文,第一作者审校,第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合中国科技部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献

- [1] Tang C, Zhang BK, Zhou Q, et al. Anhui Yike Daxue Xuebao. 2010;45(3):363-366.
唐超,张伯科,周琪,等.雷洛昔芬对蛋白尿慢性肾纤维化大鼠肾脏的保护作用[J].安徽医科大学学报,2010,45(3):363-366.
- [2] Lu HX, Li SB. Hainan Yixue. 2008;19(6):111-112.
路会侠,李绍波.雷洛昔芬对去势大鼠骨密度IL-6的影响[J].海南医学,2008,19(6):111-112.
- [3] Taranta A, Brama M, Teti A, et al. The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and osteoblast activity in vitro. Bone. 2002;30(2):368-376.
- [4] Jordan VC. Fourteenth Gaddum Memorial Lecture. A current view of tamoxifen for the treatment and prevention of breast cancer. Br J Pharmacol. 1993;110(2):507-517.
- [5] Dai X, Wu J, Cui YG, et al. Jiangsu Yiyao. 2011;37(13):1511-1154.
戴雪,吴洁,崔毓桂,等.雷洛昔芬可减弱 β -淀粉样蛋白对原代海马神经元的毒性作用[J].江苏医药,2011,37(13):1511-1154.
- [6] XU ST, Ge BF, Xu YK. Beijing: Renmin Junyi Chubanshe. 1999:23-27.
胥少汀,葛宝丰,徐印坎.实用骨科学[M].北京:人民军医出版社,1999:23-27.

- [7] Han N, Zhang DY, Wang TB, et al. *Disan Junyi Daxue Xuebao*. 2008;30(21):1000-5404.
韩娜,张殿英,王天兵,等.降钙素基因相关肽对大鼠胫骨骨折早期愈合的影响[J].第三军医大学学报,2008,30(21):1000-5404.
- [8] Schmid GJ, Kobayashi C, Sandell LJ. Fibroblast growth factor expression during skeletal fracture healing in mice. *Dev Dyn*. 2009;238(3):766-774.
- [9] Wu JP, Huang JX. Beijing: Renmin Weisheng Chubanshe. 1992:208.
吴阶平,黄家驹.外科学[M].北京:人民卫生出版社,1992:208.
- [10] Bei CY, Lin ZF, Yang Z, et al. *Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi*. 2009;23(5):570-576.
贝朝涌,林卓锋,杨志,等.NGF对骨折愈合影响的研究[J]中国修复重建外科杂志,2009,23(5):570-576.
- [11] Zeng ZH, Yu L, Gong LL, et al. *Wuhan Daxue Xuebao: Yixueban*. 2005;26(4):467-469.
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.
- [12] Athanasopoulos AN, Schneider D, Keiper T, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced up-regulation of CCN1 in osteoblasts mediates proangiogenic activities in endothelial cells and promotes fracture healing. *J Biol Chem*. 2007;282(37):26746-26753.
- [13] Kaps C, Bramlage C, Smolian H, et al. Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. *Arthritis Rheum*. 2002;46(1):149-162.
- [14] Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, et al. Recombinant humanBMP2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *Cell Biol*. 1991;113(3):681-687.
- [15] Guo SQ, Xu JZ. *Disan Junyi Daxue Xuebao*. 2005;27(16):1707-1710.
郭书权,许建中.BMP-2诱导成骨及传递的研究进展[J].第三军医大学学报,2005,27(16):1707-1710.
- [16] Yang L, Zhang KF, Zhu XF, et al. Effects of benefiting bone capsule on expression of bone morphogenetic protein-2 in bone tissue of the ovariectomized rats. *Zhongguo Linchuang Kangfu*. 2006;10(3):190-192.
- [17] Chen D, Harris MA, Rossini G, et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int*. 1997;60(3):283-290.
- [18] Hu DZ, Fu G. *Zhongyi Zhenggggu*. 1998;10(1):47-49.
胡德志,付刚.骨形态发生蛋白2(BMP-2)的研究进展[J].中医正骨,1998,10(1):47-49.
- [19] Beck LS, Amento EP, Xu Y, et al. TGF-beta 1 induces bone closure of skull defects: temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rhTGF-beta 1. *J Bone Miner Res*. 1993;8(6):753-761.
- [20] Lu X, Chen JN, Zhang JF. *Zhongguo Yaolixue Tongbao*. 2011;27(1):24-28.
卢翔,陈江宁,张峻峰.雷洛昔芬通过促进一氧化氮释放诱导脂肪干细胞向成骨细胞分化[J].中国药理学通报,2011,27(1):24-28.
- [21] Jin Y, Yang L, White FH. An immunocytochemical study of bone morphogenetic protein in experimental fracture healing of the rabbit mandible. *Chin Med Sci J*. 1994;9(2):91-95.
- [22] Zhang P, Bai Y, Li YS, et al. *Zhongguo Shiyong Yiyao*. 2011;6(20):226-227.
张攀,白钰,李云裳,等.BMP-2在骨组织再生和修复上的作用研究进展[J].中国实用医药,2011,6(20):226-227.
- [23] Huang W, Carlsen B, Wulur I, et al. BMP-2 exerts differential effects on differentiation of rabbit bone marrow stromal cells grown in two-dimensional and three-dimensional systems and is required for in vitro bone formation in a PLGA scaffold. *Exp Cell Res*. 2004;299(2):325-334.
- [24] Tsuji K, Cox K, Bandyopadhyay A, et al. BMP4 is dispensable for skeletogenesis and fracture-healing in the limb. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90 Suppl 1:14-18.
- [25] Yan H, Zhang HJ, Ding X. *Yixue Linchuang Yanjiu*. 2008;25(11):1671-7171.
颜华,张惠佳,丁向.脑性瘫痪患儿120例血骨源性碱性磷酸酶检测的临床意义[J].医学临床研究,2008,25(11):1671-7171.