

股骨头坏死模型动物血清降钙素基因相关肽水平的变化

黄涛, 凯赛尔江·艾合买提, 崔泳(新疆医科大学第五附属医院骨科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011)

文章亮点:

- 1 骨折后血清降钙素基因相关肽水平明显升高这一现象引起了国内外众多学者的关注, 但前人的研究多是单一的建立全身不同骨折模型后检测血清降钙素基因相关肽水平, 很少有建立股骨头坏死模型后检测血清降钙素基因相关肽水平的研究。
- 2 以往对降钙素基因相关肽促进骨折愈合及加速骨修复、重建功能等方面的研究多集中于创伤愈合及颅脑损伤方面, 而股骨头坏死早期的保头治疗是临床治疗上的难题, 降钙素基因相关肽能否用于延缓或逆转早期股骨头坏死进程, 这将是降钙素基因相关肽在重建外科领域研究的重点和方向。
- 3 实验成功地建立了股骨头坏死模型, 并且证明了股骨头坏死动物血清降钙素基因相关肽水平较正常动物有明显升高, 还发现股骨头坏死动物血清降钙素基因相关肽水平呈逐渐上升至一个高峰后又逐渐下降现象, 出现这种现象的机制尚不清楚, 是否会与股骨头骨破坏程度及股骨头骨细胞死亡数目等有关, 还有待进一步探讨研究。

关键词:

实验动物; 骨及关节损伤模型; 股骨头无菌性坏死; 激素; 液氮; 动物模型; 降钙素基因相关肽

主题词:

股骨头坏死; 模型; 动物; 降钙素基因相关肽

基金资助:

新疆维吾尔自治区青年科创基金(2013Y11)

摘要

背景: 降钙素基因相关肽是肽能神经分泌的一种神经肽, 具有多种重要的生理功能, 在骨组织的正常代谢、骨缺损的修复及重建过程中起着重要的作用。

目的: 观察股骨头坏死模型动物血清降钙素基因相关肽水平的变化。

方法: 选用新西兰大白兔 45 只, 随机分为 3 组, 分别为激素建模组, 液氮建模组, 正常对照组, 并于造模后第 4, 6, 8, 9, 10 周测定血清降钙素基因相关肽水平, 于造模后第 9, 10 周进行病理学检测。

结果与结论: 激素造模组、液氮造模组在实验 8 周后病理检测出现明确的骨坏死区且血清降钙素基因相关肽水平明显高于正常对照组, 表明股骨头坏死可能与血清降钙素基因相关肽水平的变化具有高度相关性。

黄涛, 凯赛尔江·艾合买提, 崔泳. 股骨头坏死模型动物血清降钙素基因相关肽水平的变化[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(5):667-673.

Changes in serum calcitonin gene-related peptide levels in animal models of femoral head osteonecrosis

Huang Tao, Kaisaierjiang Aihemaiti, Cui Yong (Department of Orthopedics, Fifth Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: Calcitonin gene-related peptide is a peptide secreted from neuropeptides, has multiple important physiological functions, and plays a key role in normal metabolism of bone tissue, bone defect repair and reconstruction.

OBJECTIVE: To observe the changes in the levels of serum calcitonin gene-related peptide of animal models of osteonecrosis of the femoral head.

METHODS: A total of 45 New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups: hormone modeling group, liquid nitrogen modeling group and normal control group. At 4, 6, 8, 9 and 10 weeks after model establishment, serum calcitonin gene-related peptide levels were determined. At 9 and 10 weeks, pathological detection was performed.

RESULTS AND CONCLUSION: Clear bone necrosis was visible at 8 weeks. Simultaneously, serum calcitonin gene-related peptide levels were significantly higher in the hormone modeling and liquid nitrogen modeling groups than in the normal control group. These data suggested that osteonecrosis of the femoral head was possibly strongly associated with serum calcitonin gene-related peptide levels.

Subject headings: Femur Head Necrosis; Models, Animal; Calcitonin Gene-Related Peptide

Funding: the Youth Scientific Innovation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2013Y11

黄涛, 男, 1985 年生, 黑龙江大庆市人, 蒙古族, 2014 年新疆医科大学毕业, 硕士, 医师, 现就职于解放军兰州军区乌鲁木齐总医院关节外科。

通讯作者: 崔泳, 副主任医师, 新疆医科大学第五附属医院骨科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.05.003
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)05-00667-07

稿件接受: 2014-11-02

Huang Tao, Master, Physician, Department of Orthopedics, Fifth Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Cui Yong, Associate chief physician, Department of Orthopedics, Fifth Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Accepted: 2014-11-02

Huang T, Kaisaierjiang Aihemaiti, Cui Y. Changes in serum calcitonin gene-related peptide levels in animal models of femoral head osteonecrosis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2015;19(5):667-673.

0 引言 Introduction

股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)是股骨头血供中断或受损,引起骨细胞及骨髓成分死亡,继而导致股骨头结构改变、股骨头塌陷、关节功能障碍的疾病^[1]。临床上大体将股骨头坏死分为两类:创伤性股骨头坏死和非创伤性股骨头坏死。导致股骨头坏死的原因相当繁杂,近年来学者对股骨头坏死进行了大量研究,但到目前为止,除了创伤性股骨头缺血性坏死的发病机制比较清楚外,其余的非创伤性股骨头坏死的发病机制仍不清楚。

目前公认为激素是非创伤性股骨头坏死的首要病因,其病例数约占到全部股骨头坏死的1/3,并且此类患者的数量呈日益增加趋势。因而,为了预防和延缓股骨头关节软骨塌陷,在塌陷之前或股骨头坏死早期,运用各种方案行保头治疗,延长股骨头坏死自然病程及推迟关节置换的时间,是未来临床防治工作的主要方向。

降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是肽能神经分泌的一种神经肽,具有多种重要的生理功能,在骨组织的正常代谢、骨缺损的修复及重建过程中起着重要的作用。研究发现,降钙素基因相关肽对骨组织愈合的调控和促进作用,主要体现在调节成骨细胞、破骨细胞的数量和活性,增加局部血流量,影响细胞增殖,调节免疫细胞功能等方面。降钙素基因相关肽受体存在于成骨细胞和破骨细胞的表面^[2],降钙素基因相关肽通过与细胞表面受体结合,调节成骨细胞和破骨细胞的功能,从而参与调节骨生长、修复和重塑。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2012年3月至2014年3月在新疆医科大学实验动物中心完成。

材料:

股骨头坏死模型动物血清降钙素基因相关肽检测用试剂和仪器:

试剂和仪器	来源
1.5T核磁共振仪、DR机	德国西门子子公司
手术器械	上海医疗器械厂
光学显微镜	日本Olympus公司
酶标仪	BIO-Rad, 美国
生物组织包埋机	天津航空机电公司
兔降钙素基因相关肽酶联免疫吸附测定试剂盒	Caymen, 美国
马血清	HyClone, 美国
甲基强的松龙	Pfizer, 美国

实验动物: 选用6月龄新西兰大白兔45只, SPF级, 体重2.0~3.0 kg, 雌雄不限, 由新疆医科大学实验动物中心提供。采用实验室啮齿类动物标准饲料饲养, 自由摄食、水, 饲养间室温控制在20~25 ℃, 湿度控制在70%左右, 空气流通。

动物实验和研究中使用程序的可行性由新疆医科大学实验动物伦理委员会批准确认。

实验方法:

动物分组: 随机将所有实验动物分为3组, 每组15只, 分别为激素建模组, 液氮建模组, 正常对照组。

建模方法:

激素致股骨头坏死组: 激素建模方法参见文献[3]。①经兔耳缘静脉注射马血清, 首次按照10 mL/kg剂量注射1次。2周后开始按照5 mL/kg剂量, 连续注射2 d, 1次/d。②在第1次注射马血清1 d后, 开始按照4 mg/kg的剂量肌肉注射甲基强的松龙, 1次/周, 连续注射8周。③于实验开始至第8周, 每周于臀部肌肉注射庆大霉素 8×10^4 U, 预防感染。

液氮致股骨头坏死组: 液氮建模方法参见文献[4]。3%戊巴比妥钠按照30 mg/kg剂量静脉注射麻醉, 麻醉生效后采取俯卧位, 将股骨与水平面尽量成90°角, 剪去以大转子为中心直径10 cm的毛, 活力碘消毒, 于大转子上方做一4.0~5.0 cm纵行切口, 切开皮肤, 暴露肌层; 于大转子内侧距大转子约0.5 cm处切开肌筋膜, 经臀中肌和臀小肌间隙入路显露髋关节, 完全显露关节囊, 暴露股骨头, 在周围垫上无菌敷料保护周围组织, 用自制液氮喷射器在股骨头外上方喷冻3 min, 至喷冻区股骨头呈石膏色。喷冻后用37 ℃生理盐水复温3 min, 缝合肌筋膜及皮肤, 无菌敷料覆盖伤口, 每日肌肉注射青霉素 40×10^4 U, 连续注射1周, 以防止感染。

影像学检查: 造模后第4, 8周进行MRI、X射线检查。

病理检查: 造模后第8, 9, 10周取股骨头标本进行病理检测。

ELISA测定血清降钙素基因相关肽水平: 所有动物均按照实验路线于第4, 6, 8, 9, 10周由耳缘静脉取血5 mL, 将所有血样在半小时内置于离心机上, 以1 000×g离心15 min, 取上层透明清液(血清), 放置于-20 ℃环境中保存待测。将待测血清及降钙素基因相关肽标准品依次加入包被有纯化降钙素基因相关肽抗体的微孔板中, 然后依次向微孔中加入工作液。经过3~5次彻底洗涤后, 加入底物显色。最后加入终止液, 使反应终止, 各孔内溶液颜色变成黄色。

用酶标仪在波长450 nm处读取吸光度值, 以纵坐标为吸光度值, 横坐标为标准品浓度, 绘制标准曲线, 按照计算公式计算待测血清降钙素基因相关肽水平。

主要观察指标: 各组动物不同时间点MRI、X射线、病理学检测结果, 各组动物不同时间点血清降钙素基因相关肽水平。

统计学分析: 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验检测数据应用SPSS 16.0统计软件进行分析、处理、检验, 组间差异性比较作方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 液氮建模组实验动物术后因感染死亡1只, 正常对照组实验动物因腹泻死亡2只, 余下实验动物正常存活。

2.2 模型质量

MRI观察结果: 激素建模组实验动物在造模第4周时行MRI检查, 结果显示双侧股骨头出现斑片状低信号区域(图1A)。造模第8周时MRI图像显示在T2WI图像上股骨头出现混杂性低信号, 提示股骨头已经出现坏死; 在T1WI和T2WI上呈明显的低信号区域, 提示增生反应区存在(图1B)。

液氮建模组在术后第4周时MRI检查图像显示双侧股骨头及头下信号不均匀, 股骨头表面软骨退变、变薄, 髓臼内少量积液(图1C)。至第8周时MRI图像显示股骨头出现明显坏死区, 呈低信号, 未见股骨头塌陷, 提示股骨头已经坏死(图1D)。

X射线观察结果: 激素建模组动物在造模第4周时行X射线检查, 结果提示股骨头密度明显增高, 关节间隙基本正常; 造模第8周时股骨头轮廓呈现出不规则改变, 周边出现不规则透光带, 骺板较清晰, 关节间隙稍微增宽(图2A, B)。

液氮建模组动物在术后第4周时行X射检查, 结果显示股骨头大体轮廓基本正常, 但股骨头局部呈现密度不均匀影像, 骺板尚清晰, 未观察到股骨头出现明显塌陷, 关节间隙无明显变化; 第8周时股骨头体积缩小、股骨头表面毛躁、不光滑、局部出现塌陷、骺板比较模糊、关节间隙增宽(图2C, D)。

病理检测结果: 激素建模组于造模第8, 9, 10周时分别处死5只实验动物行病理学检查。光镜观察结果提示, 第8周时, 动物骨小梁内骨陷窝增加, 骨细胞核固缩, 骨小梁之间脂肪细胞也增多、增大, 骨小梁明显稀疏(图3A); 造模第9周时, 髓内脂肪细胞增大, 增多, 造血组织(骨小梁间充质细胞)下降(图3B); 造模第10周时, 脂肪细胞增多极为明显, 髓腔几乎全部被脂肪细胞填满, 正常骨髓组织明显减少(图3C)。

液氮建模组于造模第8, 9周时分别处死5只实验动物, 第10周时处死剩余4只实验动物行病理学检查。造模第8周时观察结果提示, 股骨头冷冻区域软骨下出现出血、凝血; 冷冻区周边骨小梁分布紊乱, 发生断裂, 且空骨陷窝数量明显增加; 髓腔内出现肉芽组织增生、出血、充血, 可见由脂肪细胞相互融合而形成的小囊(图4A); 造模第9周时观

察股骨头冷冻区域内骨小梁结构、走行极其紊乱, 有匍行附着, 空骨陷窝出现在周边大部分骨小梁内; 软骨下小血管数量减少, 周围软骨出现脱落(图4B); 造模第10周时, 出现较大面积的软骨剥脱现象, 软骨覆盖下的骨质因软骨的剥脱而暴露; 死骨出现在骨髓腔周围, 并可见沉积性生长的新生骨, 骺板细胞堆积、变形(图4C)。

正常对照组病理检查结果显示, 软骨层均匀, 软骨细胞无坏死, 软骨陷窝无空虚(图5A); 骨小梁走行规则, 有少量的空骨陷窝(图5B, C); 骨髓内脂肪细胞大小均匀, 无增大及增多现象, 与造血组织比例均匀(图5D)。

2.3 各组血清降钙素基因相关肽水平 实验第4, 6, 8, 9, 10周检测血清降钙素基因相关肽水平, 统计学分析结果显示, 各时间点激素建模组、液氮建模组血清降钙素基因相关肽水平明显高于正常对照组(表1)。

研究结果还发现, 随着建模时间的延长, 激素建模组、液氮建模组实验动物血清降钙素基因相关肽水平呈不断上升趋势, 在上升至某个高峰后又逐渐回落状态, 而正常对照组血清降钙素基因相关肽水平则保持在一个相对稳定的数值, 上下起伏不大(图6)。

3 讨论 Discussion

3.1 股骨头坏死的修复过程及发病机制 股骨头坏死后死骨的吸收、新骨的形成及血管的再生是坏死修复过程主要表现^[5]。Jones^[6]发现再生血管不能达到软骨下较远距离的坏死灶, 因为其穿透能力仅为0.10–0.15 cm, 故软骨下的骨坏死灶因不能得到良好的血液供应而得不到修复, 因此极易发生微骨折, 因骨折的存在, 再生血管的长入又进一步被阻挡, 从而坏死进程进入了恶性循环。因而选择有效的方法促进坏死区域血管再生及新骨形成是股骨头坏死早期行保头治疗的关键。股骨头缺血坏死是多因素导致的对股骨头有滋养作用的血管受损, 使股骨头骨质因变性、缺血而发生坏死的一种病变^[7]。依据机制差异, 本病病因可分为创伤及非创伤性两种^[8]。在中国, 激素是股骨头坏死发病的首要原因^[9]。

3.1.1 骨微循环障碍机制 导致股骨头坏死的基本病理机制是骨细胞的血液供应因各种原因而中断。根据导致骨微循环障碍的作用环节及机制的不同, 可总结为以下3种: 血管内因素、血管外因素、综合因素, 血管内因素又可分为骨外血管因素及骨内血管因素。骨外血管因素如骨折等所致的血管炎或股骨头血供中断等都直接导致骨细胞血液供应受损; 骨内血管因素如激素等原因所致的脂肪压迫等造成了静脉回流受阻, 进而导致骨细胞损害。血管外因素如关节囊内骨折等原因导致关节腔内积液等致使关节腔内压力升高, 继而影响股骨头血供。综合因素则为上述各种因素共同作用而导致骨细胞缺血, 激素导致的股骨头缺血坏死, 既能够通过血管内机制起作用, 也可以通过血管外机制起作用^[10–11]。

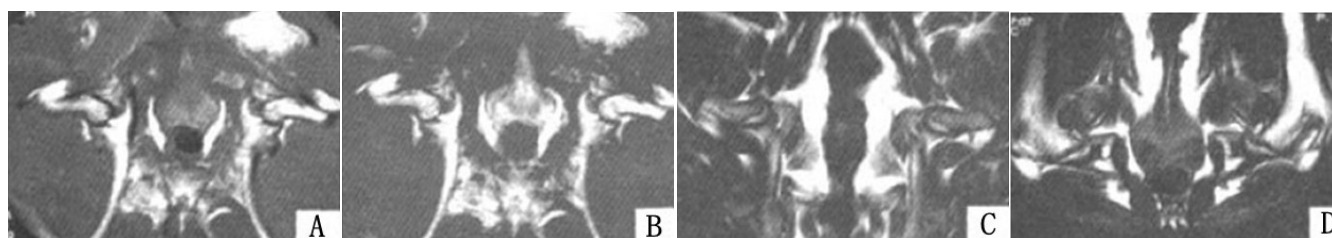


图1 激素及液氮建模组动物模型在第4周及第8周核磁(MRI)检查结果

Figure 1 Nuclear magnetic (MRI) inspection results of animal models in the hormone and liquid nitrogen modeling groups at 4 and 8 weeks

图注: 图中A为激素建模组造模第4周, 双侧股骨头出现斑片状低信号区域; B为激素建模组造模第8周, 股骨头出现混杂性低信号, 提示股骨头已经出现坏死; C为液氮建模组造模第4周, 双侧股骨头及头下信号不均匀, 股骨头表面软骨退变、变薄, 髋臼内少量积液; D为液氮建模组造模第8周, 股骨头出现明显坏死区, 呈低信号, 未见股骨头塌陷, 提示股骨头已经坏死。



图2 激素及液氮建模组动物模型在第4周及第8周X射线检查结果

Figure 2 X-ray results of animal models in hormone and liquid nitrogen modeling groups at 4 and 8 weeks

图注: 图中A为激素建模组第4周, 股骨头密度明显增高, 关节间隙基本正常; B为激素建模组第8周, 股骨头轮廓呈现出不规则改变, 周边出现不规则透光带, 髌板较清晰, 关节间隙稍微增宽; C为液氮建模组第4周, 股骨头大体轮廓基本正常, 局部呈现密度不均匀影像, 髌板尚清晰, 髌关节间隙无明显变化; D为液氮建模组第8周, 股骨头体积缩小、股骨头表面毛躁、不光滑、局部出现塌陷、髌板比较模糊、关节间隙增宽。

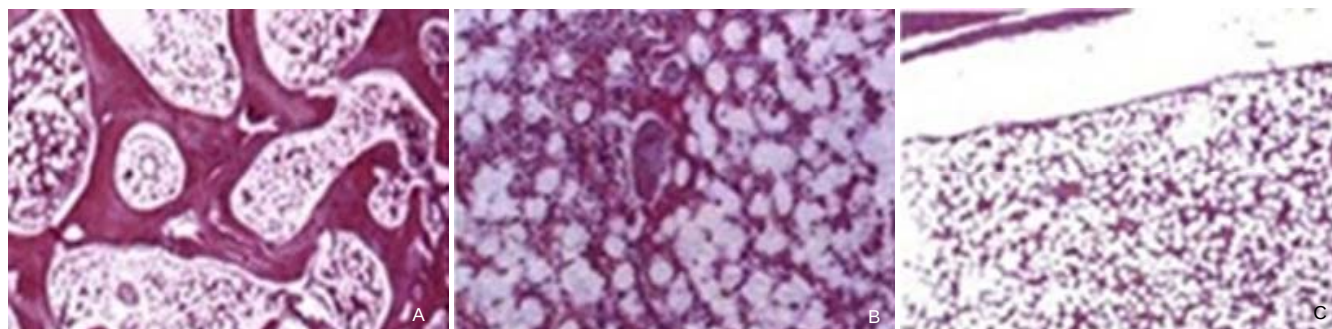


图3 激素建模组股骨头标本病理检查结果(×200)

Figure 3 Pathological examination results of femoral head specimen in the hormone modeling group (×200)

图注: 图中A为建模第8周, 显示骨小梁内骨陷窝数目增多, 骨细胞核固缩, 小梁间脂肪细胞同时也增多、增大, 骨小梁明显稀疏; B为建模第9周, 显示髓腔内脂肪细胞增多、增大, 具有造血功能的骨小梁间质中细胞数量减少; C为建模第10周, 显示脂肪细胞增多极为明显, 髓腔几乎全部被脂肪细胞填满, 正常骨髓组织明显减少。

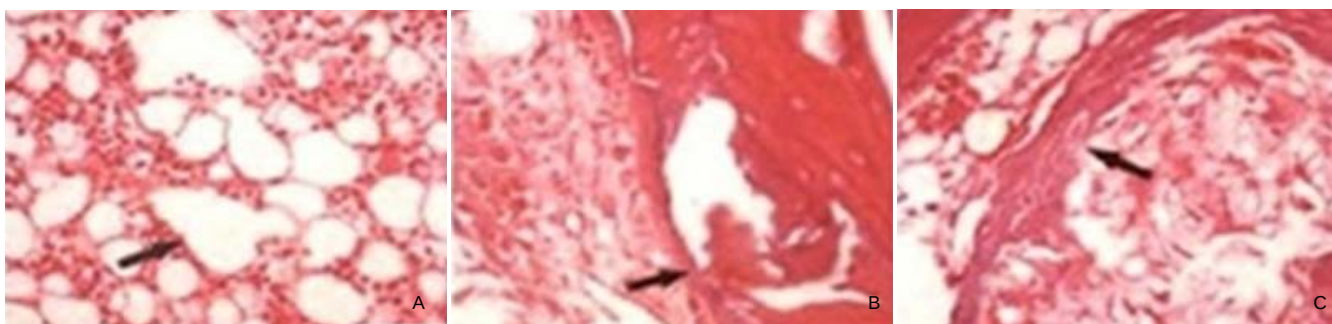


图4 液氮建模组股骨头标本病理检查结果(×200)

Figure 4 Pathological examination results of femoral head specimen in the liquid nitrogen modeling group (×200)

图注: 图中A为建模第8周, 显示软骨下出血、凝血; 股骨头冷冻区周边骨小梁走形不规则, 可见明显断裂, 且空骨陷窝数量明显增加, 髓腔内出现肉芽组织增生、出血、充血, 可见由脂肪细胞相互融合而形成的小囊(↑); B为建模第9周, 显示股骨头冷冻区边缘软骨剥脱, 软骨下血管数量降低; 骨小梁走形极其不规则, 有爬行附着(↑); 空骨陷窝出现在边缘多数骨小梁内; C为建模第10周, 显示有较大面积的软骨剥脱显现, 软骨覆盖下的骨质因软骨的剥脱而暴露; 死骨出现在骨髓腔周围, 并可见沉积性生长的新生(↑), 髌板细胞堆积、变形。

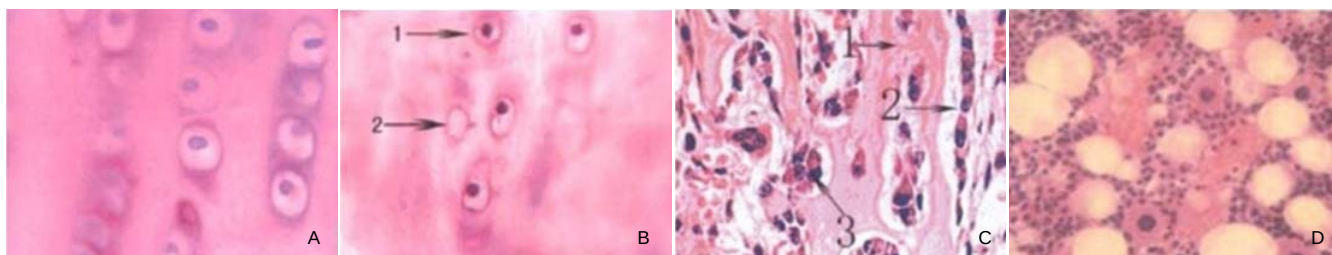


图5 正常对照组股骨头标本病理检查结果

Figure 5 Pathological examination results of femoral head specimen in the normal control group

图注: 图中 A 显示股骨头正常关节软骨细胞($\times 1\,000$); B 显示股骨头骨小梁($\times 1\,000$), 1 为骨小梁; 2 为空虚的骨陷窝; C 显示正常形态的成骨细胞和破骨细胞($\times 400$), 1 为骨小梁; 2 为成骨细胞; 3 为破骨细胞; D 显示骨髓内脂肪小囊($\times 1\,000$)。

表 1 各组实验动物血清降钙素基因相关肽水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

Table 1 Comparison of the levels of serum calcitonin gene-related peptide of experimental animals among the three groups

周数	激素建模组	液氮建模组	正常对照组
4	14.40 $\pm$ 1.56 ^a	23.40 $\pm$ 2.69 ^a	11.18 $\pm$ 0.88
6	21.56 $\pm$ 1.91 ^a	41.06 $\pm$ 1.82 ^a	11.19 $\pm$ 1.01
8	39.39 $\pm$ 3.77 ^a	54.52 $\pm$ 4.64 ^a	11.18 $\pm$ 0.91
9	49.95 $\pm$ 2.28 ^a	45.24 $\pm$ 3.61 ^a	11.23 $\pm$ 0.62
10	40.11 $\pm$ 4.14 ^a	36.87 $\pm$ 3.67 ^a	11.27 $\pm$ 0.50

表注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

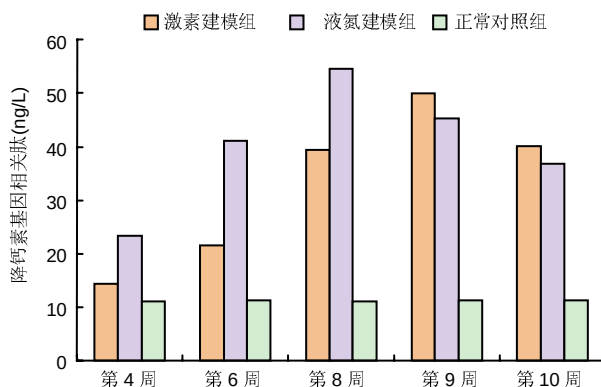


图6 各组实验动物血清降钙素基因相关肽水平变化趋势

Figure 6 Change trend of levels of serum calcitonin gene-related peptide of experimental ins among the three groups

图注: 激素建模组血清降钙素基因相关肽水平在第4周开始逐渐升高, 在第9周时达到高峰后又逐渐下降。液氮建模组血清降钙素基因相关肽水平在第4周开始逐渐升高, 在第8周时达到高峰后又逐渐下降。而正常对照组血清降钙素基因相关肽水平则保持在一个相对稳定的数值, 上下起伏不大。

3.1.2 成破骨细胞作用 骨细胞的凋亡、死亡过程即为股骨头坏死的过程。股骨头坏死后的修复过程主要体现为新生血管长入、坏死骨质的吸收以及新骨的生成, 然而新骨的形成和死骨的吸收过程则是由破骨细胞及成骨细胞的功能状态决定的。若成骨细胞的骨再生效应与破骨细胞的骨吸收作用在一定的程度上保持稳定, 骨折和塌陷或许就可避免。而骨细胞及成骨细胞的功能状态, 决定了骨的再生与吸收之间的关系是否能够保持平衡^[12]。成骨细胞、破骨细胞及骨细胞的生存周期也直接受到激素的影响。股骨头之所以会发生坏死、塌陷, 是因为骨组织细胞不断的凋亡所导致的不可逆转、不可修复而造成的。

3.2 降钙素基因相关肽的作用 降钙素基因相关肽表面受体在降钙素基因相关肽的作用下, 能够大幅度提高成骨细胞内环磷酸腺苷和钙离子浓度, 使细胞发生超极化, 从而改变细胞的功能和形态^[13-14]。降钙素基因相关肽可刺激新骨再生、加速成骨细胞增殖^[15], 还可促进骨细胞增殖, 以及胰岛素样生长因子 I 的表达增强; 并能够抑制具有骨吸收作用的肿瘤坏死因子的表达^[16]。降钙素基因相关肽也能够在体外培养的情况下, 增加骨髓干细胞的骨克隆数量, 还可以诱导骨形态发生蛋白仅在细胞内表达^[17-18]。

3.2.1 降钙素基因相关肽对成骨细胞的作用 成骨细胞增殖、成骨细胞外基质矿化、成骨细胞凋亡和成骨细胞外基质成熟这4个步骤是成骨细胞在促进新骨再生的过程中必须要经历的阶段。首先, 蛋白激酶C是成骨细胞内合成代谢反应中不可缺少的物质, Villa等^[19]发现降钙素基因相关肽能够提高成骨细胞内蛋白激酶C的活性, 从而调节成

骨细胞内的合成、代谢反应速度。其次, 降钙素基因相关肽可以通过调节成骨细胞内钙离子的浓度, 而达到增强或抑制成骨细胞活性的目的; 第三, 降钙素基因相关肽可以明显提升细胞内的环磷酸腺苷水平, 其还可以通过影响环磷酸腺苷/蛋白激酶A信号途径从而增强成骨细胞的代谢^[20], 明显提升了成骨细胞的增殖率。第四, Imai等^[21]在实验动物体内培育出能够大量分泌降钙素基因相关肽的成骨细胞, 发现其活性远远高于正常成骨细胞, 骨合成速率明显超过骨吸收速度, 成骨量较对照组明显增加。

3.2.2 降钙素基因相关肽对破骨细胞的作用 降钙素基因相关肽能够降低血浆中钙离子的浓度^[22], 是因为降钙素基因相关肽和降钙素都可以降低血浆中钙离子的浓度, 而他们这种降低血液中钙离子浓度的作用是通过抑制骨吸收而实现的^[23]。降钙素基因相关肽与降钙素受体有极高的结合能力, 降钙素基因相关肽与降钙素受体结合后, 破骨细胞的活性直接受到影响, 骨吸收速度明显被抑制。Valentijn等^[24]的实验发现, 降钙素基因相关肽可以明显抑制动物的骨量丢失。Cornish等^[25]将破骨细胞置于体外培养, 证明了降钙素基因相关肽能够抑制破骨细胞活性的作

用。通过异丙肾上腺素诱导培养骨髓间充质干细胞,使其向破骨细胞转化,证实了降钙素基因相关肽可以抑制破骨细胞的增殖、分化^[26]。

研究人员利用体外培养的方法证明了降钙素基因相关肽能够降低单核造血干细胞的数量,而且也降低了成熟的破骨细胞的数量^[27],说明不仅破骨细胞前体细胞的数量受降钙素基因相关肽的控制,而且降钙素基因相关肽也可以影响成熟破骨细胞的活性,从而达到抑制骨吸收的作用。徐琳等^[28]的实验结果显示,在动物骨折愈合过程中,降钙素基因相关肽能够增强骨保护素的表达,使骨的吸收分解受到抑制,而RANKL的表达明显被抑制,致使破骨细胞的活动减少,骨折愈合加速。众多研究结果都已明确显示,降钙素基因相关肽能够通过多种途径起到影响成熟破骨细胞的功能,以及调节前体破骨细胞向成骨细胞分化的能力。

3.2.3 降钙素基因相关肽对骨血流的调节作用 降钙素基因相关肽是至今发现最强的内源性扩血管肽^[29],其能够直接作用于血管平滑肌而实现其强烈的扩血管作用。降钙素基因相关肽还能够加速血管内皮细胞增生,进而加快血管的再生,而达到增加局部血流的目的。轴突反射和神经末梢等因骨折所致的创伤而受到刺激,而释放拥有扩张血管的神经肽,作为迄今为止最强的内源性血管舒张肽的降钙素基因相关肽,其通过作用于毛细血管,将会引起血管通透性增加、血管扩张、水肿发生及血浆外渗等炎症反应^[30]。

3.2.4 降钙素基因相关肽与骨折愈合的关系 众多的实验结果和临床研究均证实骨的修复与生长的确受内分泌因素和神经系统的调控^[31-33],而降钙素基因相关肽是众多神经肽中的一种,其在骨的修复重建过程中发挥着不可或缺的作用^[34]。感觉神经纤维中存有许多降钙素基因相关肽,当神经受到刺激时,神经末梢就会分泌大量的降钙素基因相关肽。而降钙素基因相关肽具有促进骨生长、修复骨缺损以及调节骨组织塑形与改建的作用^[35]。Hukkanen等^[36]研究在骨折愈合过程中降钙素基因相关肽阳性神经纤维的分布变化,实验结果显示在骨折初期分布于骨外膜中降钙素基因相关肽阳性神经纤维先是逐渐减少,然后在进入快速增殖时期,最后,随着骨改建及骨痂形成的过程其分布和密度也会相应发生变化。

在骨代谢过程中,降钙素基因相关肽发挥着极其关键的作用^[37]。Coderre等^[38]在骨折后的第7天时观察到,降钙素基因相关肽阳性纤维散在的分布于骨痂中。而骨膜中则能够观察到分布致密的降钙素基因相关肽阳性纤维分支和新生纤维。但是在骨折后2周和3周时,只有在骨膜处才能找到这些与肥大细胞相伴的降钙素基因相关肽阳性纤维。Wang等^[39]测定了骨折患者和肌肉损伤患者血液循环中降钙素基因相关肽的表达变化,结果显示:骨折患者血液中降钙素基因相关肽水平明显高于肌肉损伤患者。所有上述试验结果和研究证据均表明,降钙素基因相关肽及其阳性神经纤维参与了骨折的修复过程,并且在骨组织生长修复、

骨折愈合以及骨的再生及改建过程中发挥着重要作用。

3.3 研究实际意义 本实验研究通过建立激素及液氮致股骨头坏死模型,运用ELISA方法测定实验组动物股骨头坏死后血清降钙素基因相关肽水平较正常对照组动物血清降钙素基因相关肽水平明显升高。证明了血清降钙素基因相关肽水平的变化与股骨头坏死具有某种相关性,具体机制不详。是否与股骨头软骨细胞及股骨头骨细胞坏死有关,有待进一步研究。

本研究还发现,随着建模时间的延长,血清降钙素基因相关肽水平呈持续升高状态,当到达一个高峰后,又呈下降状态。这种浓度变化是否与股骨头骨破坏及骨细胞坏死程度有关有待进一步研究。

致谢: 感谢张腾宙在本实验数据检测、分析中做出的突出贡献。

作者贡献: 实验设计为凯赛尔江·艾合买提、黄涛,实验实施为黄涛,实验评估为凯赛尔江·艾合买提、崔泳,资料收集为黄涛。黄涛成文,凯赛尔江·艾合买提、崔泳审校,黄涛对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 降钙素基因相关肽-是肽能神经分泌的一种神经肽,具有多种重要的生理功能,其主要是由感觉神经合成与分泌。在骨组织的正常代谢,骨缺损的修复、重建过程中起着重要的作用。

作者声明: 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 张鹤山,李子荣.股骨头坏死诊断与治疗的专家建议[J].中华骨科杂志,2007,27(2):146-148.
- [2] Poyner D,Marshall I,Brain SD.The CGRP Family. Lands, Bioscience. USA:Texas, 1999:173-252.
- [3] 李瑞琦,张国平,李宜炯,等.兔激素性股骨头坏死模型的研究[J].现代中西医结合杂志,2013,22(28):3087-3089,3170.
- [4] 周正丽,张潜,彭筋宸,等.液氮冷冻兔股骨头坏死模型制备新方法及其可靠性评价[J].解剖学报,2012,43(2):284-288.
- [5] Mont MA, Jones LC, Einhorn TA,et al.Osteonecrosis of the femoral head. Potential treatment with growth and differentiation factors.Clin Orthop Relat Res.1998;(355 Suppl): S314-335.
- [6] Jones JP Jr.Alcoholism, hypercortisonism, fat embolism and osseous avascular necrosis. 1971.Clin Orthop Relat Res. 2001;(393):4-12.
- [7] Chao YC, Wang SJ, Chu HC,et al.Investigation of alcohol metabolizing enzyme genes in Chinese alcoholics with avascular necrosis of hip joint, pancreatitis and cirrhosis of the liver.Alcohol Alcohol. 2003;38(5):431-436.
- [8] Kim HK, Herring JA.Pathophysiology, classifications, and natural history of Perthes disease.Orthop Clin North Am. 2011;42(3):285-295.

- [9] 陈演.股骨头坏死病因学研究的某些进展[J].华西医学,2009,24(7):1899-1901.
- [10] Aaron RK,Gray RL.Osteonecrosis:etiology,natural history,pathophysiology and diagnosis//Cailaghan JJ, Rosenberg AG,Rubash JE. Theaduhhip.2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins,2007:463-476.
- [11] Jones LC, Hungerford DS.Osteonecrosis: etiology, diagnosis, and treatment.Curr Opin Rheumatol. 2004;16(4):443-449.
- [12] Suh KT, Kim SW, Roh HL, et al.Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol-induced osteonecrosis.Clin Orthop Relat Res. 2005;(431):220-225.
- [13] Bjurholm A, Kreicbergs A, Schultzberg M,et al. Neuroendocrine regulation of cyclic AMP formation in osteoblastic cell lines (UMR-106-01, ROS 17/2.8, MC3T3-E1, and Saos-2) and primary bone cells.J Bone Miner Res. 1992; 7(9):1011-1019.
- [14] Michelangeli VP, Fletcher AE, Allan EH,et al.Effects of calcitonin gene-related peptide on cyclic AMP formation in chicken, rat, and mouse bone cells.J Bone Miner Res. 1989; 4(2):269-272.
- [15] Bernard GW, Shih C.The osteogenic stimulating effect of neuroactive calcitonin gene-related peptide.Peptides. 1990; 11(4):625-632.
- [16] Vignery A, McCarthy TL.The neuropeptide calcitonin gene-related peptide stimulates insulin-like growth factor I production by primary fetal rat osteoblasts.Bone. 1996;18(4): 331-335.
- [17] Calland JW, Harris SE, Carnes DL Jr.Human pulp cells respond to calcitonin gene-related peptide in vitro.J Endod. 1997;23(8):485-489.
- [18] Shih C, Bernard GW.Calcitonin gene related peptide enhances bone colony development in vitro.Clin Orthop Relat Res. 1997;(334):335-344.
- [19] Villa I, Dal Fiume C, Maestroni A,et al.Human osteoblast-like cell proliferation induced by calcitonin-related peptides involves PKC activity.Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003; 284(3):E627-633.
- [20] Villa I, Mrak E, Rubinacci A,et al.CGRP inhibits osteoprotegerin production in human osteoblast-like cells via cAMP/PKA-dependent pathway.Am J Physiol Cell Physiol. 2006;291(3):C529-537.
- [21] Imai S, Matsusue Y.Neuronal regulation of bone metabolism and anabolism: calcitonin gene-related peptide-, substance P-, and tyrosine hydroxylase-containing nerves and the bone. Microsc Res Tech. 2002;58(2):61-69.
- [22] Tippins JR, Morris HR, Panico M,et al.The myotropic and plasma-calcium modulating effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP).Neuropeptides. 1984;4(5):425-434.
- [23] Chambers TJ, Magnus CJ.Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts.J Pathol. 1982;136(1):27-39.
- [24] Valentijn K, Gutow AP, Troiano N,et al.Effects of calcitonin gene-related peptide on bone turnover in ovariectomized rats. Bone. 1997;21(3):269-274.
- [25] Cornish J, Callon KE, Bava U,et al.Effects of calcitonin, amylin, and calcitonin gene-related peptide on osteoclast development.Bone. 2001;29(2):162-168.
- [26] Ishizuka K, Hirukawa K, Nakamura H,et al.Inhibitory effect of CGRP on osteoclast formation by mouse bone marrow cells treated with isoproterenol.Neurosci Lett. 2005;379(1):47-51.
- [27] 孙应明,罗颂椒,赵昱辉,等.降钙素基因相关肽对体外大鼠破骨细胞形成的影响[J].临床口腔医学杂志,2005,21(1):3-5.
- [28] 徐琳,谭颖徽,王建华,等. 失神经支配兔下颌骨折愈合过程中 CGRP对OPG/RANKL表达的影响[J].第三军医大学学报,2005, 27(10):988-990.
- [29] Hukkanen M, Konttinen YT, Santavirta S,et al.Effect of sciatic nerve section on neural ingrowth into the rat tibial fracture callus. Clin Orthop Relat Res. 1995;(311):247-257.
- [30] Figini M, Emanuelli C, Grady EF,et al.Substance P and bradykinin stimulate plasma extravasation in the mouse gastrointestinal tract and pancreas.Am J Physiol. 1997;272 (4 Pt 1):G785-793.
- [31] Eleftheriou F.Regulation of bone remodeling by the central and peripheral nervous system.Arch Biochem Biophys. 2008; 473(2): 231-236.
- [32] Jones KB, Mollano AV, Morcuende JA,et al.Bone and brain: a review of neural, hormonal, and musculoskeletal connections. Iowa Orthop J. 2004;24:123-132.
- [33] Eleftheriou F.Neuronal signaling and the regulation of bone remodeling.Cell Mol Life Sci. 2005;62(19-20):2339-2349.
- [34] Huebner AK, Keller J, Catala-Lehnen P,et al.The role of calcitonin and alpha-calcitonin gene-related peptide in bone formation.Arch Biochem Biophys. 2008;473(2):210-217.
- [35] Gajda M, Litwin JA, Cichocki T,et al.Development of sensory innervation in rat tibia: co-localization of CGRP and substance P with growth-associated protein 43 (GAP-43).J Anat. 2005; 207(2):135-144.
- [36] Hukkanen M, Konttinen YT, Santavirta S,et al.Rapid proliferation of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves during healing of rat tibial fracture suggests neural involvement in bone growth and remodelling. Neuroscience. 1993 Jun;54(4):969-979.
- [37] Schlomer JJ, Storey BB, Ciernei RT,et al.Calcitonin gene-related peptide inhibits early B cell development in vivo.J Leukoc Biol. 2007;81(3):802-808.
- [38] Coderre TJ, Basbaum AI, Levine JD.Neural control of vascular permeability: interactions between primary afferents, mast cells, and sympathetic efferents.J Neurophysiol. 1989; 62(1):48-58.
- [39] Wang X, Han CD, Fiscus RR,et al.Hypotension- and endotoxin-induced alterations in calcitonin gene-related peptide: modulation by dexamethasone.Circ Shock. 1991; 34(2): 217-223.