

内源性甲状旁腺激素促进小鼠骨折愈合

胡兆兴, 王维东, 范军届, 凡进, 金正帅*

(南京医科大学第一附属医院骨科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)在小鼠骨折愈合过程中的作用。方法:选择8周龄野生型和PTH基因敲除雄性小鼠各15只,制备右侧股骨开放性骨折模型,并于骨折后7、14、21 d处死,运用小动物显微CT及其相关软件测量骨痂区骨密度;运用组织学、免疫组织化学、X线、CT三维重建比较分析两组小鼠的术后骨折愈合情况。结果:术后14 d和21 d PTH基因敲除小鼠的骨折端骨密度显著低于PTH野生型组($P < 0.05$)。X线和显微CT显示PTH基因敲除小鼠骨折愈合、骨痂的塑形和PTH野生型小鼠相比均延迟。结论:内源性PTH促进小鼠骨折愈合。

[关键词] 甲状旁腺激素;基因敲除;骨折愈合;小动物CT

[中图分类号] R683

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)04-457-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140411

Endogenous parathyroid hormone promotes fracture healing in mice

Hu Zhaoxing, Wang Weidong, Fan Junjie, Fan Jing, Jin Zhengshuai*

(Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the role of the parathyroid hormone (PTH) in fracture healing of mice. **Methods:** A total of 30 male mice at 8 weeks old (including 15 wild-type mice and 15 PTH gene knockout mice) were selected to establish right femur fracture model. At 7, 14 and 21 days after the operation, the mice were sacrificed for measurement of bone mineral density (BMD) of the callus by micro-CT. To determine the role of PTH in fracture healing, the fracture models were assessed by histology, immunohistochemistry, X ray and micro-CT. **Results:** At 14 and 21 days after the operation, BMD in PTH gene knockout mice was significantly reduced compared to that in PTH wild-type mice ($P < 0.05$). X ray and micro-CT scanning showed that the fracture healing and the callus transformation and remodeling in PTH gene knockout mice were both delayed compared to those in wild-type mice. **Conclusion:** This study suggests that endogenous PTH promotes the fracture healing in mice.

[Key words] parathyroid hormone; gene knockout; fracture healing; micro-CT

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(04):457-461]

骨折愈合是一个缓慢、持续的过程,其病理过程主要有一期愈合和二期愈合。而临床上和实验中较常见的是二期愈合,一般认为其主要经过血肿机化期、原始骨痂形成期、成熟骨板期和塑形期等4个阶段。骨折后的长期卧床、患肢制动等原因,往往导致许多严重并发症。因此,临床上急需一种能够加快骨折愈合、减少并发症的药物。

甲状旁腺素(parathyroid hormone, PTH)是由甲状旁腺分泌的一种多肽类激素,是维持机体钙磷代谢平衡的重要调节激素^[1],可提高骨的强度,增加全

身骨密度^[2]。2002年,美国食品与药物管理局(FDA)批准人工合成的具有重组人PTH(1~34)氨基酸片段的多肽类激素药物特立帕肽(teriparatide)用于临床治疗绝经后妇女的骨质疏松^[3]。大量动物实验证实间歇性给予PTH(1~34)可通过增加软骨形成来刺激软骨质成骨、促进间充质干细胞分化为成骨细胞等方式加速骨折愈合^[4-5]。而内源性PTH对小鼠简单横行骨折二期愈合过程的影响还未见报道。本研究拟通过应用PTH基因敲除小鼠,制作股骨开放性骨折模型,探讨PTH基因对骨折愈合的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

[基金项目] 国家自然科学基金(81271988)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jinzhengshuai@hotmail.com.cn

选用 C57BL/6J 种系 PTH 基因敲除杂合子 (PTH^{+/-}) 小鼠进行雌雄配对, 以获取 PTH 野生型 (PTH^{+/+}) 和 PTH 基因敲除纯合子 (PTH^{-/-}) 子鼠。小鼠饲养于南京医科大学 SPF 级实验动物中心。本研究选用同窝 8 周龄野生型 (WT) 和 PTH 基因敲除纯合子 (KO) 雄性小鼠各 15 只用于研究。

1.2 方法

1.2.1 动物基因型的鉴定

应用酚-氯仿-异戊醇法抽提小鼠鼠尾片段 DNA, 并通过 PCR 的方法进行基因型的鉴定。PTH 的正向引物序列为: 5'- GATGTGTGCAAACACCGTGGCTAA-3'; 反向引物为: 5'- TC-CAAAGTTTCATTACAGTAGAAG-3'; Neo 基因的正向引物为: 5'- TCTTGATTCCCACCTTTGTGGTTCTA-3', 反向引物为: 5'- TCCAAAGTTTCATTACAGTAGAAG-3'。所有引物均由上海 Invitrogen 公司合成。2.5 mmol/L dNTP 混合液、Taq 酶、BstE II 核酸内切酶、DNA Marker 等为日本 TaKaRa 公司产品。PCR 反应条件: 94℃ 预变性, 4 min; 94℃ 变性, 45 s; 55℃ 退火, 45 s; 72℃ 延伸, 45 s; 共进行 30 个循环; 72℃ 延伸, 10 min。仅有 PTH 基因扩增产物 451 bp 条带为野生型, 仅有 Neo 扩增产物 276 bp 条带为纯合子, 两条扩增产物均有者为杂合子 (图 1)。

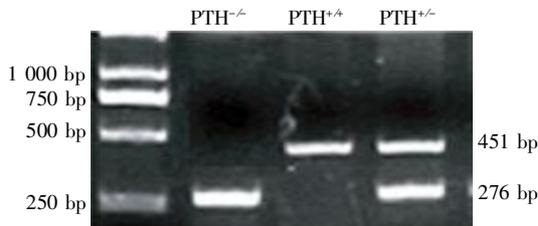


图 1 PTH 基因敲除小鼠基因型鉴定图

Figure 1 Identification of genotyped PTH of knockout mice

1.2.2 骨折造模与取材

选用经基因型鉴定的 8 周龄同窝雄性野生型和 PTH^{-/-}小鼠各 15 只, 用 1% 戊巴比妥钠 (1 μl/g) 腹腔注射, 待小鼠完全麻醉后, 备皮、络合碘消毒小鼠右下肢, 根据开放性骨折模型文献报道^[6-7], 于无菌环境中, 在右侧膝关节至髌关节之间行 8 mm 纵行切口, 于股外侧肌和腱膜之间钝性分离直至暴露小鼠右侧股骨干, 用特制的剪刀在股骨干中部剪断小鼠股骨, 然后使用直径 0.45 mm 注射器针头作为髓内固定装置逆行插入小鼠右侧股骨髓腔并复位骨折端, 直至针头插入股骨近端, 针头末端剪断、缝合切口。造模小鼠分别于术后 7、14、21 d (各时间点两组小鼠均随机取 5 只) 常规颈椎脱臼处死, 解剖分离出

右侧股骨, 小心剔除肌肉等软组织, 多聚甲醛-赖氨酸-过碘酸钠 (PLP) 固定 24 h 后换 PBS 保存, 待拍摄完 X 线及小动物 CT 后, 标本用乙二醇四乙酸在 4℃ 脱钙 15~20 d, 常规脱水, 石蜡包埋, 5 μm 连续切片, 切片标本用于 HE 染色及免疫组织化学染色。

1.2.3 X 线及 micro-CT

未脱钙的股骨骨折模型采用 Faxitron X-Ray 公司 805 型号机器, 条件 22 kV、曝光 4 min。采用比利时 SkyScan 公司的 1176 扫描仪及自带分析软件、三维成像软件, 条件: 40 kV; 98 μm; 0.9° 旋转间距; 分辨力 18.2 μm; 最小对比阈值检测。

1.2.4 HE 染色

石蜡切片常规脱蜡水化, 苏木素 (美国 Sigma 公司) 染色, 1% 盐酸酒精分化, 流水冲洗返蓝, 伊红 (美国 Sigma 公司) 复染, 常规脱水透明, 中性树胶封片。

1.2.5 免疫组织化学分析

石蜡切片经常规烤片、脱蜡、水化、热修复后, 5% 过氧化氢处理 20 min, 5% 正常羊血清封闭 1 h, 分别加兔抗 I、II 型胶原抗体 (1:100, 美国 Abcam 公司), 4℃ 过夜, 加羊抗兔 IgG (1:200, 美国 Sigma 公司) 37℃ 1 h, 加 DAB 溶液 (武汉博士德公司) 室温避光孵育 4~5 min, 苏木素复染 2.5 min, 常规脱水透明, 中性树胶封片, 光镜观察, 摄片。

1.3 统计学方法

数据使用 SPSS20.0 软件进行组间单因素方差分析, P ≤ 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PTH 基因缺失导致小鼠股骨干骨折愈合延迟

X 线分别检测 WT 和 KO 小鼠的骨痂形成, 结果显示: 所有小鼠骨折模型均为简单横行骨折, 且 KO 小鼠的骨痂形成较 WT 小鼠缓慢, 而其愈合时间也更长 (图 2)。

2.2 PTH 基因缺失导致小鼠股骨干骨折愈合过程中骨痂区骨密度 (BMD) 降低

为明确 PTH 缺乏对骨痂中骨量的影响, 行 micro-CT 检测及三维重建, 并通过小鼠骨密度标准品间接测得小鼠骨痂区 BMD: 术后 14 d KO 组 BMD (0.478 ± 0.014) g/cm³, WT 组 BMD (0.538 ± 0.040) g/cm³ (P < 0.001); 术后 21 d KO 组 BMD (0.630 ± 0.012) g/cm³, WT 组 BMD (0.786 ± 0.050) g/cm³ (P < 0.001, 图 3)。结果显示, PTH 基因敲除小鼠骨折愈合过程中骨痂中骨密度减小, 骨量降低 (14、21 d)。其骨痂形成较野生型缓慢 (7、14 d), 而到 21 d 时,

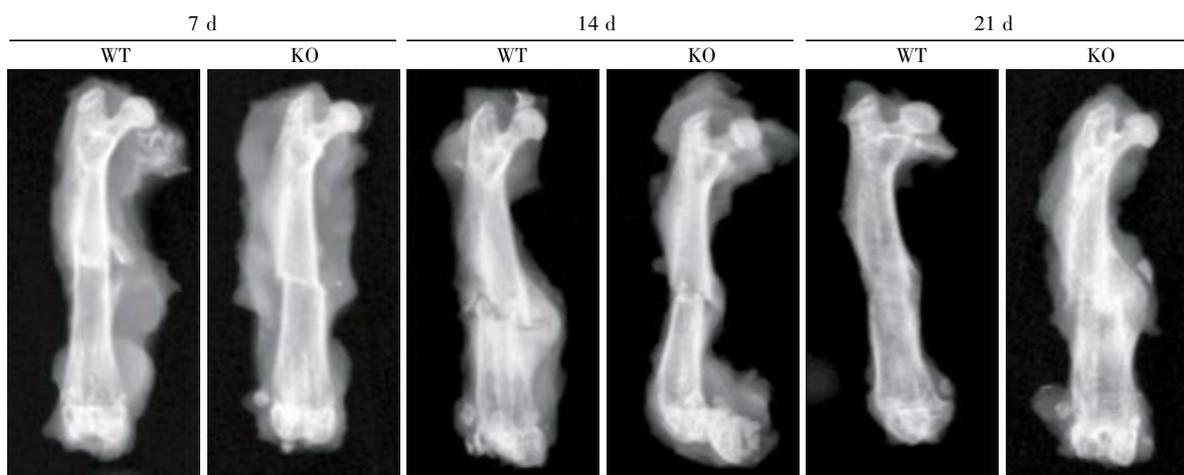


图 2 小鼠股骨干骨折后 7、14、21 d X 线

Figure 2 X-ray taken 7, 14 and 21 days after femoral fracture in mice

野生型小鼠骨痂已进入塑形期, 而 KO 小鼠骨痂巨大, 仍处于成熟骨板期(图 4)。

2.3 PTH 基因缺失导致骨折愈合延迟, 骨痂的改建和重塑能力明显减弱

术后 7、14、21 d 骨痂切片、苏木精-伊红染色 (HE 染色) 及 I、II 型胶原免疫组织化学染色结果见图 5。术后 7 d, KO 与 WT 骨痂均以软骨为主, 而 WT 骨痂两端的编织骨中 I 型胶原表达明显高于 KO 组; 术后 14 d, 骨痂软骨区逐渐被编织骨替代。免疫

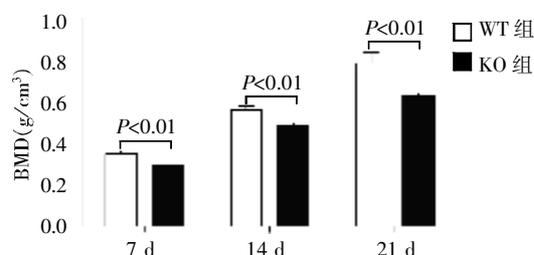


图 3 小鼠股骨干骨折后 7、14 和 21 d 骨痂区骨密度的比较
Figure 3 Bone mineral density (BMD) of the callus at 7, 14 and 21 days after femoral fracture in mice

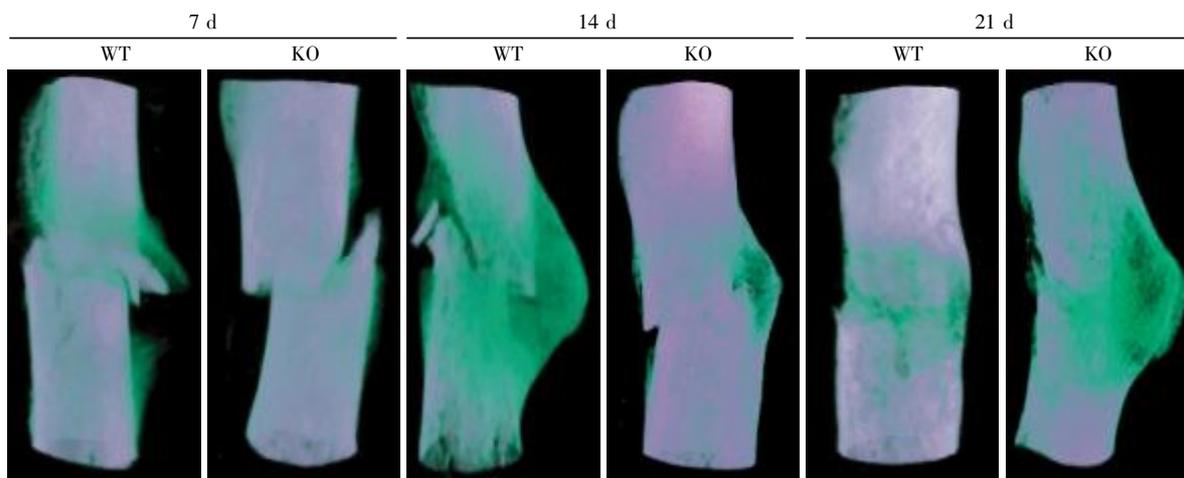


图 4 小鼠股骨干骨折后 7、14、21 d micro-CT 三维重建图像

Figure 4 Three-dimensional reconstruction of micro-CT images at 7, 14 and 21 days after femoral fracture in mice

组化结果显示, KO 小鼠骨痂内编织骨形成障碍, II 型胶原表达遍布整个骨痂区, 图像分析定量结果显示, PTH 基因敲除小鼠骨痂区 II 型胶原阳性面积与野生型同窝小鼠相比明显增多(图 5B), 而 I 型胶原阳性面积明显减少; 21 d 时, KO 小鼠与 WT 小鼠骨痂区均为编织骨, 而免疫组化结果与 14 d 相似。

3 讨论

小鼠闭合性股骨骨折模型已被广泛运用于骨折愈合研究^[6-8], 闭合性骨折模型, 多采用各种重物压砸使小鼠股骨骨折, 这样很难控制小鼠骨折的类型, 常出现粉碎性骨折, 而简单横行骨折的概率较低, 且

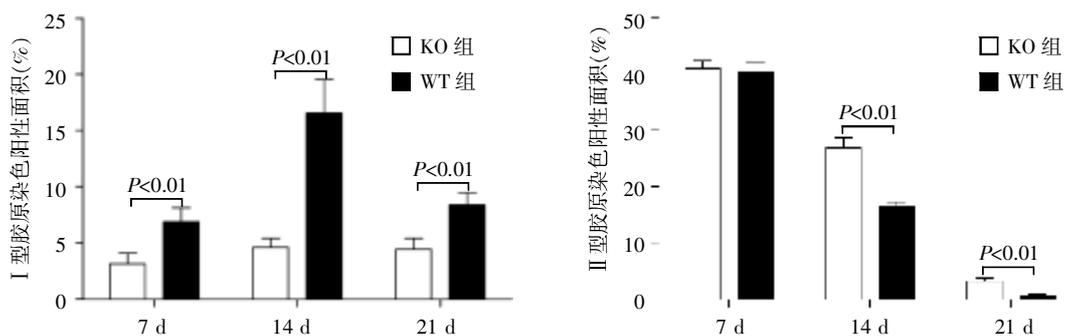
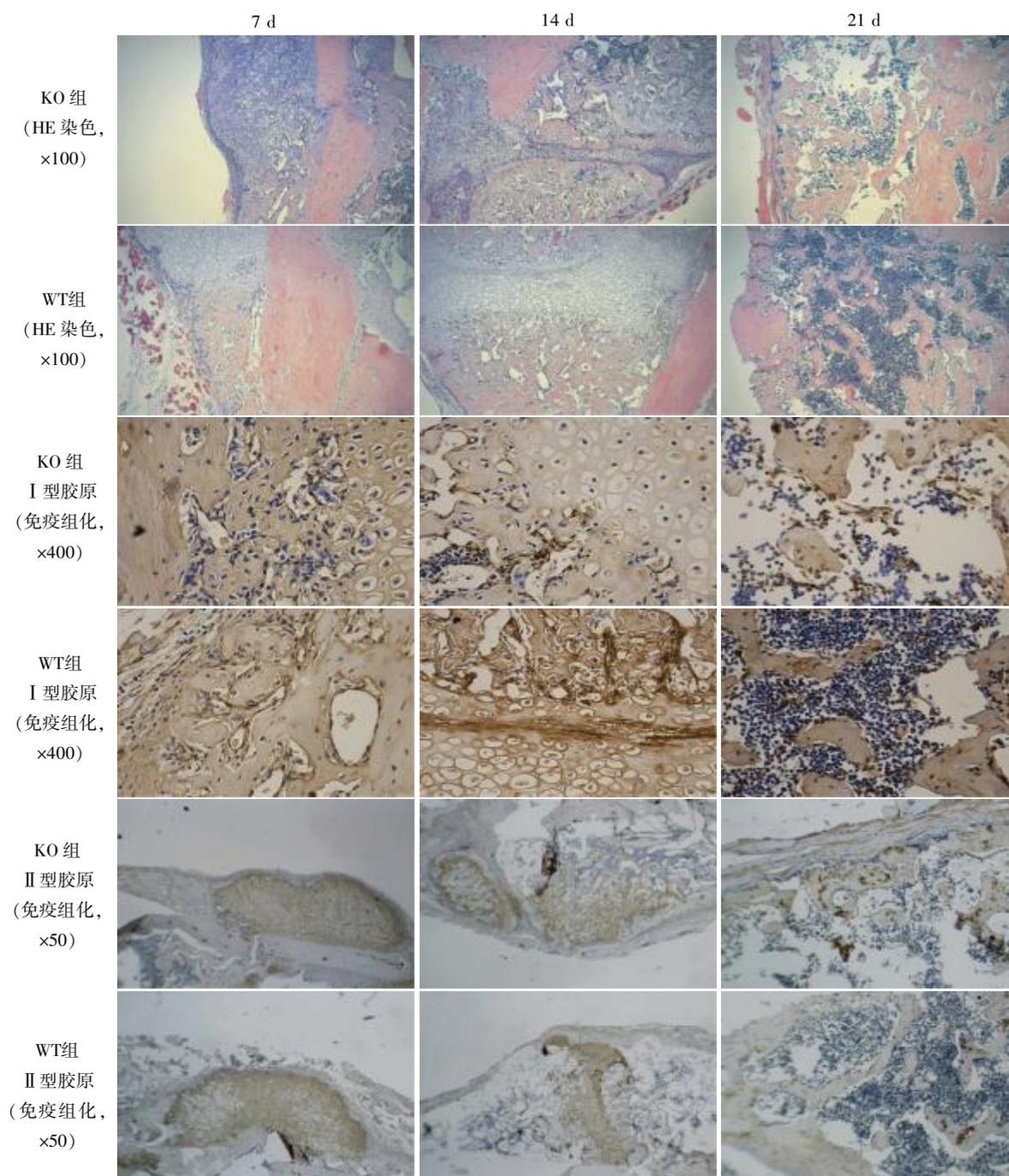


图 5 小鼠股骨干骨折后各时间点骨痂区 HE 染色及免疫组织化学染色

Figure 5 HE and immunohistochemical staining in mice femoral fracture callus at different time points

骨折端移位难以控制。而不同类型的骨折,往往其愈合过程不同。将不同类型骨折归为一种骨折进行研究显然不妥。本研究运用开放性骨折模型^[6-7],在原有基础上改良,使用特制的剪刀直视下将小鼠股骨干剪断,可避免不完全骨折,基本可以保证所得骨折模型为简单骨折模型。根据术后 X 线、骨痂切片染色可确认,所有骨折模型都为简单骨折,且其愈合过程符合骨折二期愈合标准过程。

PTH 是由 84 个氨基酸残基组成的多肽激素,通过与靶细胞膜上的 G 蛋白偶联受体结合后,激活 cAMP/PKA、NonPLC/PKC 和 PLC/PKC 等信号途径发挥作用^[9],在调节骨骼合成和分解代谢中起到重要作用。大量研究表明,间断注射 PTH(1~34)具有促进骨合成、增加骨密度的作用^[10-12]。研究发现,内源性 PTH 对骨折愈合也发挥重要作用;PTH 基因敲除小鼠骨折愈合缓慢,且各时期都明显落后于野生型小鼠,同时间点(14 d 和 21 d)的骨痂区骨密度明显降低。

本研究通过对骨痂区的 X 线摄影发现 PTH 基因敲除的小鼠骨折愈合不良,骨痂的塑形能力减弱,证实了 PTH 在骨折愈合中起重要作用。为了进一步探讨 PTH 缺乏对骨折愈合的影响,本研究通过组织学、免疫组织化学和图像分析的方法对骨痂进行了定量分析。结果发现,PTH 基因敲除小鼠骨折愈合过程中,各时间点骨痂 I 型胶原阳性面积相比野生型小鼠明显减少。I 型胶原主要是由成骨细胞分泌,是骨胶原原纤维的主要成分^[5]。本研究说明了内源性 PTH 能够通过刺激成骨细胞合成分泌 I 型胶原而促进骨折愈合。骨折后 14 d,野生型小鼠骨痂两端已形成坚硬的钙化组织(编织骨),而 PTH 基因敲除小鼠骨痂相同区域仍存在大量软骨细胞。通过对两组骨痂 II 型胶原阳性面积的定量分析发现,骨折后 7 d 两组无差异,而 14 d 和 21 d 时 PTH 基因敲除小鼠骨痂区 II 型胶原阳性面积比例相比 PTH 野生型小鼠明显增加。II 型胶原为软骨细胞分泌,是软骨基质的重要组成部分。这一结果说明 PTH 基因敲除导致软骨细胞的骨转化能力降低,软骨内成骨障碍。

本研究利用组织学和免疫组织化学比较分析了 8 周龄野生型和 PTH 基因敲除型小鼠骨折愈合过程中的差异。结果发现与野生型小鼠相比 PTH 基因敲除小鼠骨折愈合延迟,骨痂区骨密度降低, I 型胶原表达降低,而 II 型胶原表达在骨折前期无差异,在

14 d 和 21 d 时 II 型胶原表达增高。因此说明内源性 PTH 不仅能够刺激成骨细胞功能,促进 I 型胶原分泌,还能促进软骨内成骨。综上所述,内源性 PTH 正是通过某种机制影响成骨细胞及软骨细胞功能,从而发挥对骨折愈合过程的作用。

[参考文献]

- [1] Aspenberg P. Annotation: parathyroid hormone and fracture healing[J]. *Acta Orthop*, 2013, 84(1): 4-6
- [2] Yamamoto T, Hamaya E, Sowa H. Evidence for osteoporosis treatment using PTH (1~34) daily subcutaneous injection [J]. *Clin Calcium*, 2012, 22(3): 399-406
- [3] Madore GR, Sherman PJ, Lane JM. Parathyroid hormone [J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2004, 12(2): 67-71
- [4] Lin EA, Liu CJ, Monroy A, et al. Prevention of atrophic nonunion by the systemic administration of parathyroid hormone (PTH 1~34) in an experimental animal model [J]. *J Orthop Trauma*, 2012, 26(12): 719-723
- [5] Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH [J]. *Bone*, 2007, 40(6): 1434-1446
- [6] 袁亮,林振,付兆宗,等. 信号选择性甲状旁腺激素模拟肽促进去势雄性小鼠的骨折愈合 [J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33(2): 182-187
- [7] Doyon AR, Ferries IK, Li J. Glucocorticoid attenuates the anabolic effects of parathyroid hormone on fracture repair [J]. *Calcif Tissue Int*, 2010, 87(1): 68-76
- [8] Takahata M, Awad HA, O'Keefe RJ, et al. Endogenous tissue engineering: PTH therapy for skeletal repair [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(3): 545-552
- [9] Yang D, Guo J, Divieti P, et al. Parathyroid hormone activates PKC-delta and regulates osteoblastic differentiation via a PLC-independent pathway [J]. *Bone*, 2006, 38(4): 485-496
- [10] Sowa H, Hamaya E, Yamamoto T. Teriparatide; human recombinant parathyroid hormone (1~34) as a daily subcutaneous injection [J]. *Clin Calcium*, 2011, 21(1): 9-16
- [11] Gafni RI, Brahim JS, Andreopoulou P, et al. Daily parathyroid hormone 1~34 replacement therapy for hypoparathyroidism induces marked changes in bone turnover and structure [J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(8): 1811-1820
- [12] Komrakova M, Krschek C, Wicke M, et al. Influence of intermittent administration of parathyroid hormone on muscle tissue and bone healing in orchietomized rats or controls [J]. *J Endocrinol*, 2011, 209(1): 9-19

[收稿日期] 2013-12-11