

制动与失神经对兔胫骨生物力学性能及降钙素基因相关肽表达的对比研究*

王 艳¹ 黄 磊² 董传菲² 黄如意² 陈国平¹ 项栋良¹

摘要

目的:对比研究后肢制动与坐骨神经离断对兔胫骨骨强度、骨密度及降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)含量的影响,比较神经学因素和力学因素对维持骨量并防止骨质疏松,哪个因素更为重要。

方法:采用随机数表法将18只新西兰大耳白兔分为制动组、失神经组和正常组,每组6只,制动组用石膏管状固定左后肢;失神经组对左侧后肢手术切断坐骨神经取下1cm,造成其坐骨神经Sunderland V级损伤;正常组不做任何处理。造模后安静饲养28d取兔左侧胫骨,采用三点弯曲力学试验观察骨强度,双能X线骨密度检测仪观察骨密度,免疫组化检测CGRP表达。

结果:①骨强度:与正常组比较,制动组和失神经组的兔胫骨骨强度明显降低,差异有显著性意义($P < 0.05$);与失神经组相比,制动组兔胫骨骨强度稍有降低,但差异无显著性意义($P > 0.05$);②骨密度:与正常组比较,制动组和失神经组的兔胫骨骨密度明显降低,差异有显著性意义($P < 0.05$);与失神经组相比,制动组兔胫骨骨强度稍有降低,但差异无显著性意义($P > 0.05$);③CGRP:与正常组比较,制动组和失神经组的兔胫骨CGRP表达明显降低,差异有显著性意义($P < 0.05$);与制动组相比,失神经组兔胫骨CGRP表达稍有降低,但差异无显著性意义($P > 0.05$)。

结论:①制动和失神经均会降低兔胫骨强度、密度及CGRP表达水平,且两者之间差异无显著性意义;②制动与失神经对兔胫骨强度、密度的影响可能与CGRP表达水平有关;③力学因素对骨质的影响可能稍大,但两者之间差异无显著性意义。

关键词 制动;失神经;降钙素基因相关肽;骨强度;骨密度

中图分类号:R58,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2018)-05-0525-05

Contrastive study of the effect of immobilization and denervation on the biomechanical properties and calcitonin gene-related peptide expression of the rabbit tibia/WANG Yan, HUANG Lei, DONG Chuanfei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(5): 525—529

Abstract

Objective: To study the effect of hindlimb immobilization and sciatic nerve transaction on the bone strength, bone density and calcitonin gene-related peptide (CGRP) expression of the rabbit tibia, and to compare which is more important for maintaining bone mass and prevent osteoporosis.

Method: 18 New Zealand white rabbits were randomly divided into immobilization group, denervation group and normal group with 6 rabbits in each group. The immobilization group was treated with plaster shell immobilization on the left hindlimb. The denervation group was treated with cutting off the sciatic nerve of the left hindlimb 1cm long. The normal group accept none of above treatments. 28 days after modeling, the left tibia was taken for strength evaluation with three point bending mechanics test, and bone mineral density measure with dual energy X-ray absorptiometry, and the expression of CGRP detection by immunohistochemistry.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.05.006

*基金项目:黑龙江中医药大学创新人才基金项目(051290);黑龙江省博士后基金项目(LBH-Z13202)

1 黑龙江中医药大学附属第二医院,哈尔滨,150001; 2 黑龙江中医药大学

作者简介:王艳,女,医学博士(后),主任医师,教授; 收稿日期:2016-12-10

Result: ①Bone strength: compared with the normal group, the tibia bone strength of the rabbits in the immobilization group and the denervated group was significantly decreased, and the strength of the tibial bone of the rabbits in the immobilization group was slightly lower than that in the denervated group, but the difference was not statistically significant ($P>0.05$); ②Bone mineral density (BMD): compared with the normal group, the BMD of the tibia in the immobilization group and the denervated group was significantly decreased, and those in the immobilization group was slightly lower than those in the denervated group, but the difference was not statistically significant ($P>0.05$); ③CGRP: compared with the normal group, the CGRP expression in the tibia of the rabbits in the immobilization group and the denervated group was significantly decreased, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); compared with the immobilization group, those in the tibia of the denervated rabbits was slightly lower, but the difference was not statistically significant ($P>0.05$).

Conclusion: ①Immobilization and denervation can reduced the strength, density and CGRP expression level of the rabbit tibia, and there was no significant difference between them; ②The effects of the immobilization and denervation on tibia strength and density in rabbits may be related to the expression of CGRP; ③Dynam factors for preventing osteoporosis may be slightly important, but the difference was not statistically significant.

Author's address The Second Hospital Affiliated to Heilongjiang, University of Traditional Chinese Medicine, Haerbin, 150001

Key word immobilization; denervation; calcitonin gene-related peptide; bone strength; bone mineral density

周围神经损伤后,人更多关注的靶器官为肌肉,但是受损神经支配区域的骨组织也可出现骨钙含量、骨整体生物力学性能持续下降^[1];另外,制动作为骨与关节损伤的主要治疗措施之一,也会导致骨量丢失,从而引起制动局部骨组织发生骨质疏松,增加了骨折的风险。随着康复医学的发展,合理开展早期预防,有效降低骨质疏松症和骨折的发生率,在临床上越来越引起重视。

本研究通过观察后肢制动与坐骨神经离断对兔胫骨强度、密度及降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)表达的影响,比较神经学因素和力学因素对维持骨量并防止骨质疏松,哪个因素更为重要,为临床上神经损伤后与骨组织疾病制动治疗后继发的骨质疏松症防治提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选用新西兰大耳白兔18只,3—4月龄,体重为 $2\text{kg}\pm 100\text{g}$,雌雄各半,由黑龙江中医药大学动物实验中心提供。采用随机数表法随机将其分为3组:制动组、失神经组和正常组,每组6只。

1.2 模型制备

失神经组:参照Wang Y等^[2]实验造模方法,用10%水合氯醛行兔耳缘静脉缓慢注射麻醉(2ml/kg

体重),俯卧用软布条固定四肢,左侧后肢股骨外侧剪毛,碘伏消毒手术野,在兔髌后上棘至膝关节处连线剪一长约2cm的手术切口,切开皮肤、浅筋膜、股骨前侧与后侧肌群之间连接的深筋膜,沿肌间隔斜向后钝性分离两组肌群,即可见到位于其内的坐骨神经及其向下分支——胫神经和腓总神经,离断后取下1cm,完成各组需要的模型制备后,用可吸收外科缝合线缝合深筋膜,用非可吸收缝合线缝合皮肤,术后连续注射3日青霉素预防感染,青霉素注射药量为20万单位/次,2次/日。

制动组:将兔固定于兔狗两用解剖台边缘,留出干预侧后肢,造模中一人轻轻按压兔肩胛骨和骨盆,防止造模实施中兔可能受到惊吓后挣扎而对造模操作产生影响。先将兔膝关节处缠绕一圈防护用绵,然后将石膏绷带放入约50℃温水中浸泡1—2min后取出,轻轻挤出多余水分后进行后肢石膏包裹塑形,等待管状石膏风干硬化后放入笼中观察。

1.3 造模成功判定标准

失神经组:失神经组兔造模完成后,造模处手术切口愈合良好,未有局部或全身感染发生,由于兔造模侧后肢坐骨神经及其分支离断损伤,兔在站立、行走及跳跃时,干预侧后肢呈向后拖拽姿势。

制动组:制动组造模完成后,管状石膏与兔后肢贴合度良好,在兔站立或坐下时,管状石膏固定的后

肢均呈水平放置。

1.4 干预方法

制动组:采用石膏管固定左侧后肢;失神经组:左后肢手术暴露坐骨神经及其分支并对其离断后取下1cm,造成其坐骨神经Sunderland分级V度损伤;正常组:不做任何处理。以上3组均安静饲养28d。

1.5 标本处理

行兔耳缘静脉深度麻醉后,配合心脏放血安乐死,迅速取兔胫骨,将附着于骨上的软组织清理干净,立即放入中性甲醛液中暂时保存,并迅速送检做骨三点弯曲力学实验。

1.6 检测方法

三点弯曲力学试验:将保存于中性甲醛液1h左右的兔胫骨取出,先用脱脂棉擦干表面,然后用游标卡尺测量胫骨干长度后取中点标记,放置于材料试验机下进行三点弯曲力学测试,将标记的中点对准加压部位,使用跨距为6cm,压力加载速度1mm/min,测得兔胫骨断裂时的破坏载荷。

骨密度检测:将三点弯曲力学测试断裂后兔胫骨远端部分迅速送做骨密度检测。将胫骨平放对齐,使用双能X线骨密度检测仪(DEXA)进行扫描,由于腔骨远端部大小不一,所以选取胫骨平台下1cm处1.53cm²矩形面积作为观察目标。

检测免疫组化:免疫组化方法:①常规二甲苯脱蜡、水化组织切片;②按照一抗的需要,采用抗原修复液(pH6.0)对组织切片进行预处置;③3% H₂O₂去离子水孵育切片15min,PBS冲洗3min×5次,以阻断内源性过氧化物酶;④滴加1:300兔抗CGRP抗体(一抗,北京中杉生物工程有限公司),4℃冰箱孵育留宿;⑤PBS浸洗,滴加IgG抗体-Fab段-HRP多聚体,室温37℃孵育30min,PBS浸洗3min×5次;⑥使用DAB溶液显色;⑦蒸馏水冲洗,苏木素复染,梯度酒精脱水、二甲苯透明、树脂封片;⑧采用数码医学图像分析系统Motic Med 6.0对免疫组化切片进行分析,统计阳性目标面密度(阳性染色面积/统计场总面积)。

1.7 统计学分析

采用SPSS 17.0进行统计学分析,实验数据用均数±标准差表示,并进行正态性检验和方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析和两两比较采用LSD检验。

2 结果

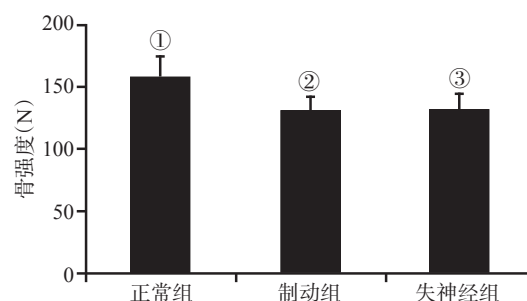
2.1 各组兔胫骨骨强度

与正常组比较,制动组和失神经组的兔胫骨强度明显降低,差异显著($P < 0.05$);与失神经组相比,制动组兔胫骨强度稍有降低,但两组差异无显著性意义($P > 0.05$)。见图1。

2.2 各组兔胫骨骨密度

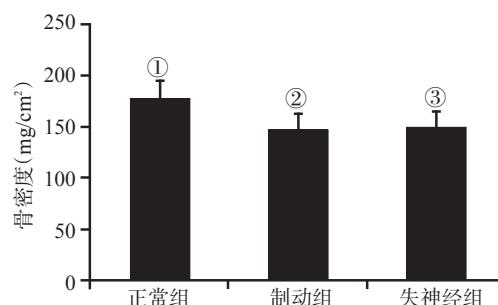
组间比较使用单因素方差分析,与正常组比较,制动组的兔胫骨骨密度明显降低,差异显著($P < 0.05$);与失神经组相比,制动组兔胫骨密度稍有降低,但两组差异无显著性意义($P > 0.05$)。见图2。

图1 各组兔胫骨骨强度



①三组组间比较 $F=7.03$; 与正常组比较:② $P=0.005$,③ $P=0.007$

图2 各组兔胫骨骨密度

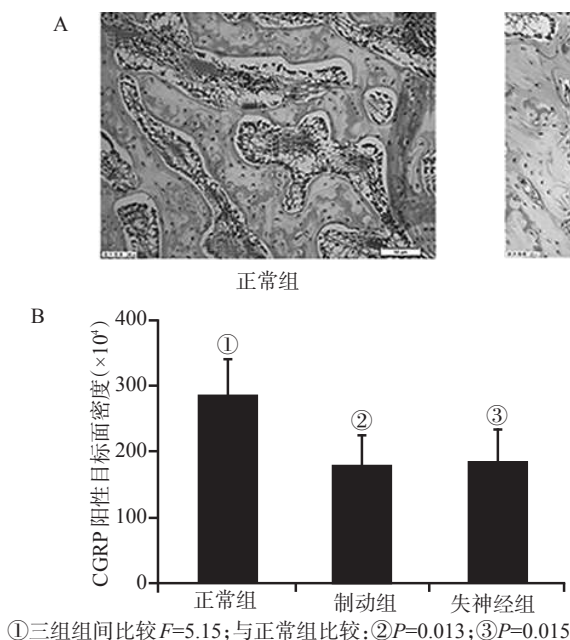


①三组组间比较 $F=6.50$; 与正常组比较:② $P=0.005$,③ $P=0.01$

2.3 各组降钙素基因相关肽的比较

4周后,光镜下观察各组中CGRP的表达。胞浆中出现棕色颗粒为CGRP的阳性表达,见图3A。与正常组比较,制动组和失神经组的兔胫骨CGRP表达明显降低,差异显著($P < 0.05$);与制动组相比,失神经组兔胫骨CGRP表达稍有降低,但两组差异无显著性意义($P > 0.05$),见图3B。

图3 各组降钙素基因相关肽的比较

(免疫组化染色, $\times 20$)

3 讨论

本研究通过观察后肢制动与坐骨神经离断对兔胫骨强度、密度及 CGRP 表达的影响,比较失神经与石膏制动引起骨质变化的异同,结果发现失神经与制动均会引起骨强度和密度的改变,骨量丢失,造成骨质疏松,可能与降钙素基因相关肽的下降有关,与以往的研究相似,但略有差异^[3-5]。虽然制动对骨质影响稍大,但差异无显著性意义。

骨骼是人的重要组成部分,不仅具有负重、保护内脏和大脑的功能,还是人们完成日常活动的重要运动器官,因此骨组织生物力学的研究具有重要意义。根据 Wolf 定律可知骨组织能改变其结构以适应其所处的力学环境的变化,力学因素是骨塑形活动的重要影响因素,当骨组织所处的力学环境发生改变时,力学因素通过调节骨生成活动与骨吸收活动之间的平衡从而影响骨组织的内部排列、骨矿物含量等。骨细胞是骨组织中含量最为丰富的细胞,在骨组织中骨细胞作为感应力学刺激的主要细胞与骨基质一起构成骨组织的主体结构^[6]。本实验证明了制动所致的骨力学载荷减少能明显降低骨的生物力学性能。

失周围神经支配后,骨质疏松发生率明显升高,

这提示神经系统可能通过某种调控机制影响骨代谢,这可能由于周围神经系统参与了骨组织与周围神经之间的信号传导,从而导致骨代谢的改变^[7]。骨膜上有丰富的感觉神经末梢纤维,感觉神经末梢纤维中各类神经肽物质可能通过局部作用对成骨细胞及破骨细胞直接产生影响,其中 CGRP 被认为是骨代谢局部作用中的关键神经肽,当周围神经损伤后阳性神经纤维在骨组织中的分布被改变,尤其是分布在血管周围的 CGRP 免疫活性阳性的感觉纤维减少明显,因此神经损伤后的成骨细胞骨生成作用及骨矿化作用减弱可能与此有关^[8]。神经损伤后还可间接影响骨重塑,损伤神经的支配区的运动与感觉功能不同程度受损,肌肉泵作用可能受到影响,骨内血液重新分配,血液流速亦发生改变,而 CGRP 是目前体内发现的最强的舒血管物质,它可能通过影响局部血循环进而影响骨代谢,使骨密度、骨量及骨形态计量学发生改变^[9]。

本实验显示,失神经组和制动组均较正常组骨强度、密度有显著下降($P < 0.05$),而制动组下降程度更低,但二者差异无显著性,考虑实验中坐骨神经离断后,兔后肢的运动功能虽然受到明显影响,但仍有部分的负重作用,由此认为失神经和制动均可引起骨质疏松,且考虑力学载荷刺激的改变可能对骨组织的影响更大。本实验中,失神经组的 CGRP 表达水平兔胫骨的显著低于正常组,这将导致骨吸收的抑制作用被减弱,从而引起一种以骨吸收增强为特点的骨生物力学性能改变,这与其他研究人员的结果相一致^[10]。我们还观察到制动组的 CGRP 表达较正常组也有明显降低,且制动组 CGRP 表达水平改变与其骨强度、密度的改变有相似趋势,说明 CGRP 也可能参与制动引起的骨质疏松形成的调

节。这与李志宏等^[4]的研究相似,但略有不同。他们观察了4个时间点(术后1天、10天、30天、60天)中第30天的时间点与我们的试验中(28天)结果一致,下一步我们将进一步进行不同时间点的动态观察。

单纯观察制动或周围神经损伤对骨代谢影响的研究已经很多,然而,人们对周围神经损伤后的骨重塑与单纯去除力学载荷刺激后的骨重塑对比了解较少。实验中我们发现失神经组CGRP表达较制动组降低更明显,考虑失神经组由于神经损伤而导致失神经支配区骨组织CGRP表达减少,而制动组的CGRP表达降低可能由于局部制动使神经组织也处于一种相对失用状态引起。实验中制动组的生物力学性能较失神经组降低更明显,考虑失神经组由于失神经造成的负重和运动功能障碍而导致骨的力学载荷不足,但仍有少部分负重,而制动组较失神经组的制动干预更充分,因而,导致制动组的骨组织生物力学性能降低也更明显。由此,我们认为神经支配与力学载荷刺激对骨组织的生物力学性能的维持均起十分重要的作用,而力学载荷刺激在骨的生物力学性能的维持中可能扮演着一个较重要的角色。提示临床上对于神经损伤患者的治疗中给予骨组织足够力学载荷刺激应引起足够重视,可能弥补失神经造成的骨量丢失,促进神经恢复与增加骨组织的力学载荷刺激在有效地防止骨质疏松上同等重要。

参考文献

- [1] 瞿英,刘欣伟,李哲,等.应用鼠神经生长因子修复周围神经损伤对骨质疏松的影响[J].中国组织工程研究,2014,(51):8233—8237.
- [2] Wang Y, Ma M, Tang Q, et al. The effects of different tensile parameters for the neurodynamic mobilization technique on tricipital muscle wet weight and MuRf-1 expression in rabbits with sciatic nerve injury[J]. J Neuroeng Rehabil, 2015, 12(1):37.
- [3] 陈阳,马信龙,马剑雄.废用性骨质疏松症的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2013,(12):1286—1290.
- [4] 李志宏,周振华,谢菊英,等.坐骨神经和股神经离断、后肢固定对大鼠降钙素基因相关肽水平及骨密度的影响[J].中国康复医学杂志,2009,(12):1112—1115.
- [5] 韩娜,姜保国.降钙素基因相关肽与骨修复及骨重建[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,(37):7351—7354.
- [6] You L, Temiyasathit S, Lee P, et al. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading[J]. Bone, 2008, 42(1):172—179.
- [7] Eleftheriou F. Regulation of bone remodeling by the central and peripheral nervous system[J]. Arch Biochem Biophys, 2008, 473(2):231—236.
- [8] Fu C, Yin Z, Yu D, et al. Substance P and calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglia in sciatic nerve injury rats[J]. Neural Regen Res, 2013, 8(33):3124—3130.
- [9] 周健.降钙素基因相关肽促进人脐静脉血管内皮细胞增殖及其相关机制的初步研究[D].广州:南方医科大学,2013.
- [10] Mrak E, Guidobono F, Moro G, et al. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) inhibits apoptosis in human osteoblasts by β -catenin stabilization[J]. J Cell Physiol, 2010, 225(3): 701—708.