

· 基础研究 ·

电针对股骨骨折大鼠骨痂内神经肽表达水平的影响

王新 周路纲 刘洪智 王磊 孙煜杰 苏昊

【摘要】目的 研究电针刺激穴位对股骨骨折大鼠骨痂内神经肽表达水平的影响。**方法** 将 40 只雄性 Wistar 大鼠随机分为骨折组和电针组,2 组大鼠均制成股骨骨折模型,其中电针组大鼠于骨折模型建立后给予电针刺激。2 组大鼠分别于术后第 4、7、14 及 28 天时各取 5 只处死,并采集骨折部位组织制成切片。采用免疫组织化学染色法检查各组大鼠术后不同时间点骨痂内降钙素基因相关肽(CGRP)及 P 物质(SP)表达情况。**结果** 电针组大鼠在术后骨折愈合不同阶段,其骨痂内各种细胞胞浆中均有 CGRP、SP 阳性颗粒表达,且出现时间较骨折组早,维持时间较骨折组长;图像分析系统显示电针组骨痂内 CGRP、SP 光密度值明显高于骨折组,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 电针刺激穴位能显著提高骨折大鼠骨痂内 CGRP、SP 等神经肽表达,推测电针可通过影响神经肽水平参与并调节骨折愈合过程。

【关键词】 神经肽; 电针; 骨痂; 股骨骨折

Electroacupuncture and the expression of neuropeptides in the callus formed after femoral fracture WANG Xin, ZHOU Lu-gang, LIU Hong-zhi, WANG Lei, SUN Yu-jie, SU Hao. Department of Traumatic Orthopedics, Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, China

【Abstract】 Objective To investigate the influence of electroacupuncture on the expression of neuropeptides in fibrocartilage callus tissue after femoral fracture. **Methods** Forty male Wistar rats were randomly divided into a fracture group and an electroacupuncture group. Femoral fracture models were established in both groups, and the rats in the electroacupuncture group were given electroacupuncture. Rats were sacrificed on the 4th, 7th, 14th and 28th days after surgery. The calluses were stained immunohistochemically to detect the expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP). **Results** CGRP and SP levels increased rapidly after electroacupuncture, with neuropeptides expressed strongly in callus cell tissue. The optical density (OD) in the electroacupuncture group was significantly higher than that in the fracture group ($P \leq 0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture can significantly increase the expression of neuropeptides in rats after femoral fracture. Electroacupuncture can promote fracture healing through regulating neuropeptides.

【Key words】 Neuropeptides; Electroacupuncture; Callus; Femoral fracture

相关基础及临床研究表明,针刺穴位对促进骨折愈合具有显著疗效^[1],但目前对于针刺促进骨折愈合的作用机制还存在争议^[2]。大量研究表明,机体骨组织及骨膜部位有大量感觉和自主神经纤维分布,在骨痂形成早期阶段即可检测到其分泌的神经肽水平显著上升,推测神经肽在骨折愈合重建过程中发挥重要作用^[3]。本研究通过观察电针刺激穴位后骨折大鼠骨痂内降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)及 P 物质(substance P, SP)神经肽表达水平的变化,从而探讨电针治疗对机体神经肽水平的影响以及促进骨折愈合的相关机制。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物与主要试剂

共选取 8 月龄、雄性、无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级别 Wistar 大鼠 40 只,体重 290 ~ 340 g;主要实验试剂包括:降钙素基因相关肽(CGRP)、P 物质(SP)一抗、SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒等,均由武汉博士德生物工程有限公司出品。

二、动物分组及模型建立

将上述 40 只大鼠随机分为骨折组及电针组,每组各 20 只大鼠,均制成大鼠股骨骨折模型。骨折模型制作步骤如下:实验大鼠经 10% 水合氯醛(按 300 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉后,将其俯卧位固定于手术台上备皮,行股外侧切口,经股前、外侧肌间隔分离至股骨,手术切断股骨中段(即股骨大转子下 1 cm 处),然后采用克氏针(直径 1 mm,上海医用缝合针厂出品)进

行髓腔逆行固定。整个手术过程均在严格无菌环境下进行,术后将大鼠放置于笼中自由活动、进食。电针组大鼠在上述骨折基础上,于术后第 2 天给予电针治疗,电针治疗期间保持大鼠处于清醒状态,将其固定于手术台上(尽量不妨碍其肢体活动)。大鼠穴位定位参照《实验针灸学》相关标准^[4],选取足三里、悬钟、伏兔和三阴交等穴,针刺采用 28 号 0.5 寸(约 1.65 cm)不锈钢毫针,进针深度为 0.8 ~ 2.0 mm。进针后接通 G6805-2A 型多功能电针治疗仪,设置输出电压峰值为 6 V,频率为 4 Hz,电流强度以大鼠肢体肌肉有轻微颤动为度,电针治疗每次持续 20 min,隔日治疗 1 次,连续治疗 4 周。骨折组大鼠每天于相同时间段亦固定于手术台上(固定方法及持续时间与电针组一致),但期间未给予电针治疗。

三、标本采集及处理

2 组分别于术后 4、7、14 及 28 d 时各取 5 只大鼠用 10% 水合氯醛(按 300 mg/kg 体重)行腹腔注射麻醉,经左心室灌注生理盐水和 4% 多聚甲醛-PBS 缓冲液固定后,立即在无菌环境下截取骨折部位上、下 1 cm 范围内肢体组织(包括血肿、骨痂及周围组织块等),在 4 ℃ 环境下置于 4% 多聚甲醛液中固定 24 h,然后用蒸馏水浸泡 4 h,再经质量分数为 20% (体积分数为 10%) 乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙 8 d,随后进行常规系列酒精脱水、二甲苯透明及纵向石蜡包埋处理,完毕后将蜡块置于 4 ℃ 冰箱中备用。

四、免疫组化检测

将各组大鼠骨折标本蜡块沿骨纵轴方向行连续纵行切片(切片厚约 7 μm),切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后,用蒸馏水洗 5 min,然后滴加体积分数为 0.3% 的过氧化氢溶液(经 PBS 液稀释)作用 5 min,以消除内源性过氧化物酶活性;再经 PBS 液冲洗 5 min × 3 次。微波抗原修复步骤如下:将骨折标本切片浸入 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液中,用微波炉加热至沸腾后断电,间隔 10 min 再重复加热沸腾 1 次,待冷却后用 PBS 液洗涤 1 min × 2 次;滴加体积分数为 5% 的 BSA 封闭液(室温环境下),20 min 后甩去多余液体,然后再滴加 1:100 稀释的一抗(兔抗鼠 CGRP、SP)多克隆抗体,于 97 ℃ 条件下反应 60 min,复温后用 PBS 液冲洗 2 min × 3 次,再滴加 1:300 稀释的羊抗兔 IgG (二抗抗体),于 37 ℃ 条件下孵育 20 min,经 PBS 液冲洗 2 min × 3 次;滴加 ABC 试剂,在湿盒中反应 20 min (37 ℃ 环境下)后,经 PBS 液冲洗 5 min × 3 次;滴加 DAB(AR1022)显色,37 ℃ 作用 5 ~ 30 min,直到有满意染色结果出现时为止,最后切片经蒸馏水充分洗涤、常规脱水、透明、封片后待检。将处理好的切片置于光镜下观察骨折愈合及染色情况,如胞浆中有棕黄色颗

粒即代表阳性着色。

五、股骨标本图像分析

每组标本切片在高倍镜(×400)视野下各随机选取 5 个视野,采用 Leica Qwin 图像处理与分析系统(德国 Leica 公司产品)检测各个视野的平均灰度值,然后减去该标本背景平均灰度值,取其倒数作为最终光密度值(optical density, OD),该 OD 值代表细胞中 CGRP、SP 免疫组化阳性反应强度,OD 值越高,则表示细胞胞浆中相应蛋白含量越显著。

六、统计学分析

本研究所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 版统计学软件包进行数据分析,各组标本切片 OD 值经方差分析后,采用 Turkey 检验法进行组间比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、术后各组大鼠光镜下 CGRP、SP 表达情况比较

大鼠骨折 4 d 后,发现骨折组及电针组骨折部位单核细胞、纤维母细胞、间充质细胞及内皮细胞等均有 CGRP、SP 阳性颗粒表达。骨折后 7 d 时,发现骨折组骨折端纤维母细胞自骨膜下增生并长入骨折间隙内,同时夹杂有少量成骨细胞,胞浆中可见 CGRP、SP 阳性颗粒表达;电针组成骨细胞数量较骨折组增多,骨折端可见大量肉芽组织、纤维性骨痂生成,细胞胞浆内有 CGRP、SP 强阳性颗粒表达。骨折后 2 周时,发现骨折组成骨细胞数量增多,骨折端肉芽组织生长,纤维性骨痂生成,骨折端可见骨膜下成骨、软骨内成骨现象,骨痂逐渐纤维化,细胞核趋向扁平状,胞浆内有 CGRP、SP 阳性颗粒表达;电针组骨折端可见大量纤维性、软骨性及骨性骨痂,并有新生骨小梁长入,骨性骨痂数量较骨折组明显增多,并且骨痂周围有丰富血管生成,细胞内有 CGRP、SP 强阳性颗粒表达。骨折后 4 周时,发现骨折组骨折端成骨细胞、纤维母细胞数量减少,纤维骨痂消失,以软骨骨痂与骨性骨痂为主,细胞内可见 CGRP、SP 阳性颗粒表达;电针组骨折端骨痂质地均一,其中成骨细胞功能活跃,骨膜增厚显著,细胞内可见 CGRP、SP 阳性颗粒表达。

二、术后各组大鼠 CGRP、SP 蛋白表达水平比较

术后 4 d 时,发现电针组 CGRP、SP 蛋白表达 OD 值均较骨折组显著增加,组间差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。术后 7 d 时,电针组 CGRP 和 SP 蛋白表达 OD 值均达到峰值,并维持到实验结束(骨折后 4 周)时,期间 CGRP 和 SP 蛋白表达 OD 值均无明显降低。骨折组术后 4 d 时 CGRP、SP 蛋白表达呈弱阳性,至术后 7 d 时才出现阳性表达,其 CGRP、SP 蛋白表达 OD 值于术后 2 周时达到峰值,随即开始缓慢下降,具

体数据详见表 1、图 1。

表 1 术后 2 组大鼠骨折部位 CGRP 及 SP 表达 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	CGRP 表达 OD 值	SP 表达 OD 值
骨折组			
术后 4 d	5	0.2113 $\pm$ 0.0631	0.1783 $\pm$ 0.0532
术后 7 d	5	0.2621 $\pm$ 0.0912	0.2196 $\pm$ 0.0763
术后 14 d	5	0.3146 $\pm$ 0.1041	0.2546 $\pm$ 0.0831
术后 28 d	5	0.1621 $\pm$ 0.0376	0.1621 $\pm$ 0.0376
电针组			
术后 4 d	5	0.3572 $\pm$ 0.1124 ^a	0.2689 $\pm$ 0.0913 ^a
术后 7 d	5	0.4356 $\pm$ 0.1586 ^a	0.3406 $\pm$ 0.1107 ^a
术后 14 d	5	0.4392 $\pm$ 0.1642 ^a	0.3406 $\pm$ 0.1022 ^a
术后 28 d	5	0.4354 $\pm$ 0.9464 ^a	0.3412 $\pm$ 0.0613 ^a

注:与骨折组比较,^a $P < 0.05$

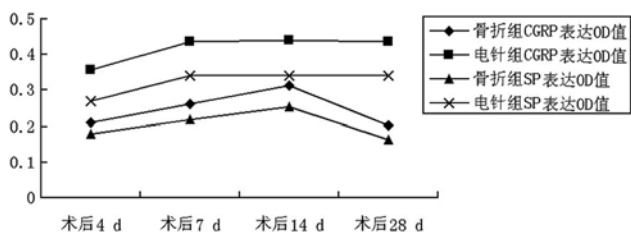


图 1 术后 2 组大鼠骨折部位 CGRP 及 SP 表达 OD 值比较

讨 论

大量研究表明,电针在促进骨折愈合方面具有显著疗效^[5,6],但对电针刺激穴位促进骨折愈合的治疗机制尚未明确。有学者认为,采用电针作用于骨折患者时,能刺激其肌肉有规律收缩,在骨折断端处产生规律性被动挤压,推测这种压力效应是加速骨折愈合的重要因素;肌肉规律的收缩与舒张动作同时也加强了肢体血液循环,促进血液回流,增强机体代谢功能,加速血肿吸收及肿胀消退^[6]。张作君等^[7]观察了骨折患者经电针治疗前、后血流图的变化情况,发现治疗后患肢血流图波幅值明显增加;后又在活体动物实验中进行了验证,发现骨折大鼠模型经电针治疗后,其骨折处主要动脉血管直径平均增加 0.61 mm,提示电针治疗有扩血管、促血液循环等功效。另有研究发现,针刺能增加骨折局部钙磷沉积,加速骨折临床愈合。在骨折愈合过程中,机体及骨痂局部微量元素(如 Zn、Cu、Mn、Fe 等)均发生明显变化^[8],采用补充微量元素的方法已证明对促进骨折愈合具有重要意义^[9]。张俐等^[10]通过对骨折家兔进行针灸治疗后发现,针刺及艾灸组家兔血清和骨痂内微量元素含量均较对照组有不同程度提高,并认为主要原因可能包括以下方面:①针刺能促进机体消化、吸收功能,增加摄入体内微量元素的总量;②针刺治疗可能激活了微量元素在酶上的结合

位点,促进酶与底物结合,从而提高酶的催化效率。

研究发现,神经肽是一类具有多种功能及生物活性的分子多肽,广泛分布于机体中枢及周围神经组织中,神经肽在神经系统及骨折组织间发挥重要的桥接作用,参与对细胞修复、增殖、迁移及分化功能的调控^[11]。有学者发现,神经肽可与成骨细胞、破骨细胞膜上的神经肽受体结合,直接参与骨细胞功能的调节。CGRP 能与成骨细胞膜上的受体结合,并能刺激成骨细胞促进骨形成;CGRP 还可通过与破骨细胞膜上的降钙素受体结合,从而发挥抑制骨吸收作用;另外有实验发现,CGRP 能通过刺激干细胞有丝分裂而加速骨形成^[12,13];王新等^[14]研究发现,CGRP 可促进成骨细胞中编码胰岛素样生长因子-1 的 mRNA 表达及合成,从而动态调节骨形成和骨吸收平衡。Goto 等^[13]在动物实验中发现破骨细胞膜上存在 SP 高亲和力受体,SP 与之结合后能促进破骨细胞增殖,参与骨吸收过程。从上述大量研究结果可知,机体骨细胞中存在多种神经肽受体,各种神经肽通过与其受体结合,从而对骨细胞代谢过程发挥调控作用。

目前大量研究发现,血液供应对促进骨折愈合具有重要意义。机体有大量肽能神经分布于血管周围,能参与对血管功能的调节。CGRP、SP 均有显著扩血管作用,其强烈扩血管效应主要是通过直接作用于血管平滑肌而实现的;另外 CGRP 还具有刺激血管内皮细胞增殖的作用,可促进血管生长并增加局部血流量。CGRP、SP 是较强的内源性扩血管神经肽,神经系统可通过这些递质调节血管功能,从而增加骨折患处的局部血液供应^[15,16]。相关研究发现,机体循环系统中的神经肽含量非常低,与其发挥生理效应时所需的浓度相差甚远,故推测神经肽主要是由神经纤维在局部分泌并发挥生理效应,体循环中的神经肽对骨代谢无显著影响作用。

本研究结果显示,电针组大鼠骨折愈合速度较骨折组明显加快,在骨折愈合不同阶段,发现其骨痂内主要参与骨折愈合的细胞均有神经肽阳性颗粒表达,如在骨折发生后 4 d 时,骨痂内即有 CGRP、SP 阳性颗粒表达;骨折后 7 d 时 CGRP、SP 阳性表达水平达到峰值,并维持到实验结束时,且期间无明显下降。骨折组大鼠在骨折发生后 4 d 时仅有 CGRP、SP 弱阳性表达,骨折后 7 d 时才呈现阳性表达,骨折后 2 周时达到峰值,随后则逐渐减弱。以上结果均表明,电针刺激穴位不仅能加快大鼠骨折愈合速度,还可长时间增强骨折处神经肽表达,从而有利于骨折愈合过程中各种细胞的迁移、增殖及分化,促进血管管径扩张,改善血液供应,加快骨性骨痂及软骨骨痂

形成,促进骨折愈合。本研究仅是从神经肽层面对电针促进骨折愈合的相关机制进行了初步探讨,由于骨折愈合过程非常复杂,涉及机体多方面因素参与,故关于电针促进骨折愈合的确切机制还需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 熊芳丽,肖亚严. 针灸促进骨折愈合的临床观察. 中国针灸, 1997, 11: 685-686.
- [2] 宋亚文,谢利民,崔全起,等. 针刺取穴与骨折愈合疗效关系初探. 中国中医骨伤科杂志, 2005, 13: 12-15.
- [3] 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.
- [4] 邓春雷. 实验针灸学. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 7.
- [5] 董福慧,关继超,赵勇,等. 骨折愈合的应力适应性研究. 中国骨伤, 2001, 14: 14-16.
- [6] 张俊峰. 针刺、脉冲直流电治疗骨折 44 例报道. 中国针灸, 1988, 8: 23-25.
- [7] 张作君,王俊欣,成传德,等. 针刺、艾灸促进骨折愈合的临床研究. 中国针灸, 1992, 12: 7-10.
- [8] 沙因,刘平生,章佩群,等. 骨折愈合过程中金属元素含量的变化. 微量元素与健康研究, 1994, 11: 1-3.
- [9] 吕德成,吴汝舟,姜长明,等. 微量元素对家兔骨折愈合影响的实

- 验研究. 中华骨科杂志, 1992, 12: 282-286.
- [10] 张俐,移平,吴炳煌,等. 针灸对骨折家兔微量元素的影响. 中国中医骨伤科杂志, 1999, 7: 1-4.
- [11] Maria R, Anita L, Hitoshi M, et al. Microisolated mouse osteoclasts express VIP-1 and PACAP receptors. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 274: 400-404.
- [12] Togari A, Arai M, Mizutani S, et al. Expression of mRNAs for neuropeptide receptors and beta-adrenergic receptors in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. Neurosci Lett, 1997, 233: 125-128.
- [13] Goto T, Yamaza T, Kido MA, et al. Light and electron microscopic study of the distribution of axons containing substance P and the localization of neurokinin-1 receptor in bone. Cell Tissue Res, 1998, 293: 87-93.
- [14] 王新,宋跃明,裴福兴. 神经肽对大鼠成骨细胞胰岛素样生长因子-1 及其受体基因表达的影响. 中华实验外科杂志, 2006, 23: 1515-1518.
- [15] Shihe BG. Calcitonin gene related peptide enhance bone colony development in vitro. Clin Orthop, 1997, 334: 335-344.
- [16] Lundgaard A, Aalkjaer C, Bjurholm A, et al. Vasorelaxation in isolated bone arteries. Vasoactive intestinal peptide, substance P, Calcitonin gene-related peptide, and bradykinin studied in pigs. Acta Orthop Scand, 1997, 68: 481-489.

(收稿日期: 2008-09-29)

(本文编辑: 易 浩)

· 消息 ·

《中华糖尿病杂志》创刊暨征稿启事

《中华糖尿病杂志》(ISSN 1674-5809, CN 11-5791/R)由中华医学会主办并编辑出版, 2009 年为双月刊, 每期 80 面, 国内外公开发行。16 元/期, 全年共 96 元。主要栏目包括: 述评、专题笔谈、专家共识、论著、综述、病例报告等。现向广大医务工作者及科研人员征集文稿, 内容涉及: 糖尿病流行病学及危险因素, 糖尿病诊断技术与综合干预, 糖尿病并发症及重症监护, 糖尿病发病机制, 患者教育与护理等。

投稿要求: (1) 文稿应具有先进性、科学性、实用性。资料真实, 数据准确, 论点鲜明, 结构严谨。(2) 来稿需经作者单位审核, 并附单位推荐信。(3) 稿件须包含题名、作者姓名、作者单位、第一作者简介、基金资助详情、通信作者地址、Email、电话及传真、投稿日期; 论著应含中、英文摘要。(4) 请通过 <http://www.cma.org.cn> 进行网上投稿, 点击首页左下角“业务中心”后, 先注册, 再进行业务申请, 然后进入期刊编审系统。该远程投稿系统可供作者随时查阅稿件状态。(5) 投稿时请交纳审稿费 50 元, 中华医学会会员减半, 本刊 VIP 会员可免审稿费。

2009 年本刊 VIP 会员享有的权利包括: 获赠全年本刊(个性化杂志, 杂志封面印有会员姓名); 投稿免审稿费; 审稿时进入快速通道(1 个月内回复); 已通过审稿会的稿件, 在同等条件下可优先发表。VIP 会员费用: 150 元/年。VIP 会员费用邮寄及杂志订阅地址: 100010 北京东四邮局 100010-58 信箱。汇款单上请注明《中华糖尿病杂志》。

联系地址: 100710 北京东四西大街 42 号, 中华医学会《中华糖尿病杂志》编辑部。电子邮箱: zhtnb@cma.org.cn 或 zhtnbzz@126.com。电话: 010-85158312, 85158310, 85158316, 传真 010-85158310。

《中华糖尿病杂志》编辑部