

# 结合雌激素对去势大鼠骨折愈合生物力学指标的影响

陈镗如<sup>1</sup>, 徐克惠<sup>2</sup>, 乔 林<sup>2</sup> (1. 四川省人民医院妇产科, 成都 610072; 2. 四川大学华西第二医院妇产科, 成都 610041)

**【摘要】 目的** 探讨结合雌激素(倍美力)对去势大鼠骨折愈合及骨痂生物力学指标的影响。**方法** 采用 54 只 6 月龄雌性大鼠, 分为倍美力组、伪手术组和去势组。倍美力组和去势组大鼠均切除两侧卵巢, 切除后第 8 周, 各组大鼠均实施右侧股骨骨折, 同时倍美力组按 0.065 mg/(kg·d) 给予倍美力药物灌胃。3 组均在实施骨折后第 2、4、6、8 周随机处死大鼠, 取其右侧股骨行 X 射线照片观察骨痂变化, 测定软骨痂及骨折断端骨痂吸光度、骨痂 I 型胶原阳性表达积分吸光度及骨折后第 8 周右股骨的生物力学指标。**结果** X 线片显示, 倍美力组和伪手术组骨痂密度在骨折后各时期均高于去势组; 倍美力组在骨折后第 8 周的软骨痂吸光度和骨折断端骨痂吸光度均低于去势组, 组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而与伪手术组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 去势组的骨痂 I 型胶原阳性表达积分在骨折后各时期均低于倍美力组与伪手术组, 组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而倍美力组与伪手术组的表达比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 倍美力组的破坏强度、弯曲弹性模量、刚度系数均优于去势组, 组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而与伪手术组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 结合雌激素可使骨痂中 I 型胶原合成增多, 使骨的柔韧性增加、硬度增加, 最终改善骨的生物力学性能。

**【关键词】** 结合雌激素; 绝经后骨质疏松性骨折; 生物力学; 大鼠

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.05.017 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)05-0622-03

**Effects of premarin on bone biomechanic indexes in fracture healing of ovariectomized rats** CHEN Man-ru<sup>1</sup>, XU Kehui<sup>2</sup>, QIAO Lin<sup>2</sup> (1. Department of Obstetrics and Gynecology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

**【Abstract】 Objective** To explore the effects of conjugated estrogen hormones (premarin) on the bone biomechanic indexes and fracture healing of the ovariectomized rats. **Methods** 54 female rats, aged 6-month-old, were divided into 3 groups: premarin group, sham operation group (SHAM group) and ovariectomized group (OVX group). Rats in the premarin group and the OVX group were ovariectomized. The right femur was broken by operation at 8 weeks after ovariectomization. Premarin [0.065 mg/(kg·d)] was given immediately through intragastric administration after establishment of osteoporotic fracture model in the premarin group. Rats in the 3 groups were randomly killed at the end of postoperative 2, 4, 6, 8 weeks respectively. The right femur was examined for observing the change of bone callus by X-rays; the absorbance determination of cartilage callus and bone callus in the end of femoral fracture were performed; the integral absorbance detection of positive expression of type I bone collagen and the detection of biomechanical indexes of right femur at 8 weeks after fracture were performed. **Results** The X-ray examination showed that the bone callus density in various periods after fracture in the premarin group and the SHAM group were significantly higher than that in the OVX group. The absorbance of cartilage callus and bone callus of the end of fracture at 8 weeks after fracture in the premarin group were lower than that in the OVX group with statistical difference ( $P < 0.05$ ), but without statistical differences compared with that in the SHAM group ( $P > 0.05$ ). The integral absorbance of positive expression of type I bone collagen in various periods in the OVX group was significantly lower than that in the premarin group and the SHAM group ( $P < 0.05$ ), while there were no statistical differences in the expression between the premarin group and the SHAM group ( $P > 0.05$ ). The destructive intension, elastic modulus and stiffness coefficient of right femur in the premarin group were better than those in the OVX group with statistical differences ( $P < 0.05$ ), while without statistical differences compared with the SHAM group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Premarin may increase the synthesis of type I collagen, and the flexibility and hardness of bones, finally improve the biomechanics properties.

**【Key words】** conjugated estrogen hormones (premarin); postmenopausal osteoporotic fracture; biomechanics; rat

绝经后雌激素下降对骨修复重建的影响受到了广泛的关注, 有报道显示雌激素对骨折愈合有着重要的调节作用<sup>[1-2]</sup>。而骨折愈合后的生物力学特性是反映骨生长代谢的一个重要指标。本实验通过切除大鼠两侧卵巢模拟妇女绝经状态, 建立绝经后骨质疏松性骨折的动物模型, 探讨结合雌激素在骨质疏

松性骨折愈合中对骨痂生物力学指标的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与分组** 54 只体质量为 280~380 g 的 6 月龄雌性大鼠, 随机分为倍美力组、伪手术组、去势组, 每组各 18 只。喂食颗粒饲料, 动物房定期消毒和通风, 12 h 间隔照明,

室温控制于 19~22 ℃。

**1.2 建立骨质疏松性骨折动物模型** 大鼠予以氯胺酮(0.1 g/kg)腹腔注射麻醉成功后,两侧腰背部切口进入腹腔。伪手术组仅切除少许脂肪组织,倍美力组与去势组则切除两侧卵巢。将所有切除的卵巢组织制成石蜡切片,显微镜观察证实切除组织为卵巢。去势后 8 周进行阴道细胞学检查。实施手术后 8 周,3 组大鼠均暴露右侧股骨中段,在氯胺酮(0.1 g/kg)麻醉下横行切断,然后克氏髓腔逆行内固定,术后自由活动 and 进食。骨折后第 2 天开始给予灌胃,每日 1 次,连续 8 周。去势组及伪手术组均给予 1.5 mL 生理盐水灌胃,倍美力组给予 0.065 mg/(kg·d)倍美力灌胃。

1.3 方法

**1.3.1 X 线观察** 实施骨折后第 2、4、6、8 周,每组随机处死 4 只大鼠,取右侧股骨全长行 X 射线照片,观察骨痂变化。

**1.3.2 骨痂吸光度测定** 使用 MDX-3A 黑白密度计测定右侧股骨软骨痂吸光度,以骨折线长为直径,取离骨折线 1/2 直径距离的四点照射;测定骨折断端骨痂吸光度,取离骨折端 0.5 个骨横径照射。

**1.3.3 骨痂 I 型胶原阳性表达积分吸光度测定** 骨折模型建立后第 2、4、6、8 周,每组随机处死 4 只大鼠,取右侧股骨中段的骨痂组织,制备成石蜡切片。免疫组化检测采用 I 型胶原 SABC 试剂盒(武汉博士德公司),按说明书中的标准步骤操作。观察 I 型胶原的表达,细胞质或细胞间质内出现棕黄色或深棕黄色者为阳性。每张切片随机选取 10×40 倍下 5 个不重叠视野,用 Image-Pro Plus4.01 的图像分析系统对阳性染色的强度进行半定量测定,记数 I 型胶原阳性表达的积分吸光度。积分吸光度是平均吸光度与面积的乘积,可以反映蛋白表达量。

**1.3.4 生物力学指标测定** 取实施骨折后 8 周的大鼠右侧骨折股骨,拔出固定针后予以生理盐水纱布包裹,放入-20 ℃的冰柜保存备用。次日使用电子万能实验机、高精度数字位移计、10 kg 力传感器、X-Y 函数记录仪对骨折股骨进行三点弯曲实验。加载速度 2 mm/min,支座间距 24 mm。测定刚度系数、破坏强度、破坏挠度、弹性模量、破坏能量吸收 5 项生物力学指标。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据处理和统计学分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析;以  $\alpha = 0.05$  为检验水准, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

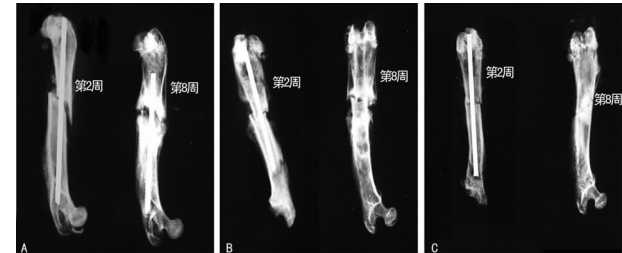
**2.1 一般结果** 倍美力组和去势组所切除的组织经病理切片证实为卵巢组织。切除卵巢后 8 周阴道细胞学观察,倍美力组和去势组显示:上皮细胞几乎无表层细胞,以底层细胞为主,呈雌激素缺乏状态;伪手术组显示:雌激素水平先升高后下降,呈周期性改变。54 只大鼠除 5 只死亡,其余 49 只大鼠均完成实验。各组大鼠在实施骨折手术前、后体质量比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),骨折部位均在股骨中分,显示各组大鼠除药物因素外其余条件均相同,具有可比性。

**2.2 X 线片观察** 去势组骨痂密度在骨折后各时期均低于倍美力组和伪手术组,8 周时去势组骨折线仍较清晰,伪手术组和倍美力组骨折线模糊、甚至消失。见图 1。

2.3 骨痂吸光度

**2.3.1 各组大鼠骨折后不同时期软骨痂吸光度比较** 骨折后第 8 周,去势组软骨痂吸光度高于倍美力组,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );倍美力组与伪手术组软骨痂吸光度比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );倍美力组软骨痂吸光度随骨

折时间的增加而降低。见表 1。



注:A 为去势组;B 为伪手术组;C 为倍美力组。

图 1 实施骨折后第 2 周和第 8 周各组大鼠骨折 X 线片

表 1 各组大鼠骨折后不同时期软骨痂吸光度比较( $\bar{x} \pm s, A$ )

| 组别   | n  | 第 2 周                   | 第 4 周                   | 第 6 周     | 第 8 周                  |
|------|----|-------------------------|-------------------------|-----------|------------------------|
| 倍美力组 | 18 | 1.76±0.09 <sup>ab</sup> | 1.68±0.02 <sup>ab</sup> | 0.76±0.17 | 0.45±0.21 <sup>a</sup> |
| 伪手术组 | 18 | 1.33±0.12               | 0.83±0.11               | 0.89±0.21 | 0.38±0.15 <sup>a</sup> |
| 去势组  | 18 | 0.99±0.18               | 1.14±0.15 <sup>b</sup>  | 0.60±0.14 | 0.80±0.23              |

注:与去势组比较,<sup>a</sup>  $P < 0.05$ ;与伪手术组比较,<sup>b</sup>  $P < 0.05$ 。

**2.3.2 各组大鼠骨折后不同时期骨折断端骨痂吸光度比较** 各组的骨折断端骨痂吸光度均随骨折时间增加而降低。骨折后各时期,去势组的骨折断端骨痂吸光度均高于倍美力组和伪手术组,且骨折后第 6、8 周组间比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。骨折后各时期,倍美力组与伪手术组骨折断端骨痂吸光度比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组大鼠骨折后不同时期骨折断端骨痂的吸光度( $n = 18, \bar{x} \pm s, A$ )

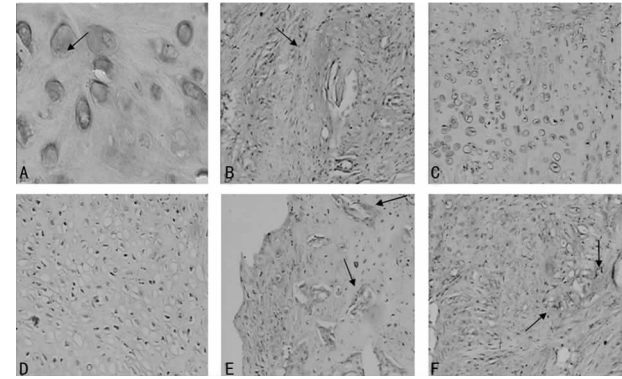
| 组别   | 第 2 周      | 第 4 周      | 第 6 周                   | 第 8 周                   |
|------|------------|------------|-------------------------|-------------------------|
| 倍美力组 | 0.48±0.070 | 0.42±0.069 | 0.35±0.049 <sup>a</sup> | 0.33±0.046 <sup>a</sup> |
| 伪手术组 | 0.46±0.080 | 0.43±0.072 | 0.37±0.074 <sup>a</sup> | 0.34±0.072 <sup>a</sup> |
| 去势组  | 0.55±0.077 | 0.52±0.080 | 0.51±0.068              | 0.49±0.054              |

注:与去势组比较,<sup>a</sup>  $P < 0.05$ 。

表 3 各组大鼠骨折后各时期骨痂 I 型胶原阳性表达积分吸光度比较( $n = 18, \bar{x} \pm s, A$ )

| 组别   | 第 2 周                     | 第 4 周                     | 第 6 周                     | 第 8 周                     |
|------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 倍美力组 | 315.84±56.31 <sup>a</sup> | 335.43±78.94 <sup>a</sup> | 290.42±42.28 <sup>a</sup> | 262.40±54.84 <sup>a</sup> |
| 伪手术组 | 304.31±67.59 <sup>a</sup> | 323.85±57.18 <sup>a</sup> | 300.13±46.07 <sup>a</sup> | 268.72±42.82 <sup>a</sup> |
| 去势组  | 252.88±51.65              | 268.08±57.08              | 232.46±28.54              | 227.70±39.87              |

注:与去势组比较,<sup>a</sup>  $P < 0.05$ 。



注:A 为 I 型胶原在软骨细胞胞浆表达(×400);B 为 I 型胶原在骨小梁表达(×100);C 为去势组骨折后第 2~8 周 I 型胶原表达(×100);D 为倍美力组骨折后第 8 周 I 型胶原表达(×100);E 为倍美力组骨折后第 4 周 I 型胶原表达(×100);F 为倍美力组骨折后第 6、8 周 I 型胶原表达(×100)。

图 2 I 型胶原在骨组织的表达

**2.4 各组大鼠骨折后各时期骨痂 I 型胶原阳性表达积分吸光度比较** 骨折后各时期,去势组 I 型胶原阳性表达积分吸光度均低于倍美力组与伪手术组,组间比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ );倍美力组与伪手术组各时期 I 型胶原阳性表达积分吸光度比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 3。I 型胶原在骨组织的表达,见图 2。由图 2C 可见,去势组骨折后第 2~8 周 I 型胶原均主要在软骨细胞表达;由图 2D 可见倍美力组骨折后第 8 周, I 型胶原在软骨细胞表达较少,与伪手术

组相似;由图 2E 可见,倍美力组骨折后第 4 周, I 型胶原主要在成骨细胞表达,软骨细胞也有少量表达,与伪手术组相似;由图 2F 可见,倍美力组骨折后第 6、8 周, I 型胶原主要在骨痂周边组织、骨小梁中表达,与伪手术组相似。

**2.5 各组大鼠骨折后 8 周各项股骨生物力学指标比较** 倍美力组的破坏强度、弯曲弹性模量、刚度系数均优于去势组,组间比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。倍美力组和伪手术组间各项指标比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

表 4 各组大鼠骨折后 8 周各项股骨生物力学指标比较 ( $n=18, \bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 刚度系数(N·mm <sup>2</sup> )        | 破坏强度(Mpa)               | 破坏能量吸收(N·mm) | 弯曲弹性模量(Gpa)                | 破坏挠度(mm)  |
|------|---------------------------------|-------------------------|--------------|----------------------------|-----------|
| 倍美力组 | 37 610.34±3 376.29 <sup>a</sup> | 12.55±4.32 <sup>a</sup> | 23.91±15.04  | 480.56±125.74 <sup>a</sup> | 1.03±0.76 |
| 伪手术组 | 8 966.75±4 905.00               | 8.46±3.67               | 24.24±13.30  | 117.67±69.15 <sup>a</sup>  | 1.41±0.24 |
| 去势组  | 4 258.25±1 438.30               | 4.14±1.27               | 14.92±3.81   | 57.50±31.90                | 1.47±0.22 |

注:与去势组比较,<sup>a</sup>  $P<0.05$ 。

3 讨 论

因绝经后妇女骨丢失与大鼠切除卵巢后的骨丢失相似,大鼠模型目前已成为研究绝经后骨质疏松的成熟模型<sup>[3-4]</sup>。本研究倍美力组和去势组大鼠均切除两侧卵巢,阴道细胞学观察,呈雌激素缺乏状态,模拟绝经,成功建立了绝经后骨质疏松动物模型。

骨折愈合是特殊的组织修复,骨痂组织出现不同功能细胞活动,并有大量胶原纤维产生,其间有大量钙盐沉积。胶原纤维是组成骨结构和维持骨强度的基质蛋白。I 型胶原是骨有机质的重要成分,在骨基质矿化、骨质吸收与形成、骨分化与增殖等过程中起重要作用,其含量与骨的生物学特性密切相关<sup>[5]</sup>。本实验中,去势组骨痂 I 型胶原阳性表达积分吸光度在骨折后各时期均较倍美力组和伪手术组低,提示 I 型胶原在去势组合成较倍美力组和伪手术组少。胶原纤维在骨折愈合中不仅是结缔组织修复愈合的重要因素,更是钙盐沉积不可缺少的基础。骨折端的骨痂密度能说明骨痂的钙化程度。而骨痂吸光度可反映骨痂密度,骨痂吸光度越大,骨痂密度越小。本研究显示,骨折后第 8 周,去势组的软骨痂密度低于倍美力组( $P<0.05$ ),而骨折后各时期,去势组骨折断端骨痂密度均低于倍美力组和伪手术组,且骨折后第 6、8 周组间比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。这说明去势组骨折断端骨痂钙盐沉积少,骨矿化差。由此可见大鼠去势后雌激素水平低下, I 型胶原合成少,骨矿化差。提示雌激素降低可能影响 I 型胶原的表达,从而影响 I 型胶原的形成和结构,为骨矿化提供框架的机械支持能力降低,使无机质无法沉淀矿化,骨盐失去依附,导致去势组骨折端骨量的丢失,骨折断端骨痂密度降低。

骨折愈合的生物力学特性反映骨的生长代谢,它是骨结构连续性、骨量、骨材料特性等的综合反映。骨的生物力学性能不仅是反映骨质量的重要指标<sup>[6-7]</sup>,也是评价骨质疏松药物治疗的指标之一<sup>[8-9]</sup>。弹性模量表示材料抗形变的能力,反映骨自身的强度和韧性。刚度系数反映骨抵抗外力发生形变的能力,破坏能量吸收显示导致骨折所需能量,以上指标均反映骨的结构力学性能<sup>[10]</sup>。破坏强度反映骨的塑形能力,而骨塑形主要由有机质决定。本研究结果显示,骨折后第 8 周去势组生物力学性能中的弯曲弹性模量、刚度系数、破坏强度均低于倍美力组和伪手术组。I 型胶原的表达减少,使骨折断端骨痂密度降低,造成骨小梁材料力学性能和结构力学性能的变化,从而可能导致骨抵抗外力的能力降低,骨脆性增加,骨折愈合质量降低。而骨 I 型胶原对骨组织保持足够的弹性刚度和弯曲度应力是必需的。倍美力的雌激素作用可能促进骨折愈合过

程中 I 型胶原增加,从而使骨的柔韧性增加,同时缓慢增加骨量,加快骨矿化,使骨的硬度也有所增加,最终改善骨的生物力学性能。

综上所述,结合雌激素干预骨质疏松性大鼠可有效改善骨的生物力学性能,促进骨折愈合,但其临床应用的剂量、时间及效果仍有待进一步的临床实践。

参考文献

[1] Zhao JW, Gao ZL, Mei H, et al. Differentiation of human mesenchymal stem cells: the potential mechanism for estrogen-induced preferential osteoblast versus adipocyte differentiation[J]. Am J Med Sci, 2011, 341(6): 460-468.

[2] 李鹏彪, 尹芸生, 潘晋平, 等. 雌激素对骨质疏松大鼠骨折愈合过程成骨细胞血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国药物与临床, 2010, 10(8): 884-887.

[3] 郭峰, 李正南, 刘晋平, 等. 六月龄大鼠去卵巢后建立骨质疏松症模型的可行性[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(24): 4459-4462.

[4] 王键, 龚颜, 曾荣, 等. 去势大鼠骨质疏松模型的研究[J]. 海南医学, 2013, 24(3): 424-426.

[5] 袁邵辉, 刘伟, 吴滨奇, 等. 骨质疏松性骨折愈合过程中 I, II 型胶原蛋白表达与其力学性能[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(2): 208-212.

[6] Christiansen BA, Bouxsein ML. Biomechanics of vertebral fractures and the vertebral fracture cascade [J]. Curr Osteoporos Rep, 2010, 8(4): 198-204.

[7] Silva MJ. Biomechanics of osteoporotic fracture[J]. Injury, 2007, 38(Suppl3): S69-S76.

[8] Xue L, Wang Y, Liu L, et al. A HNMR-based metabolomics study of postmenopausal osteoporosis and intervention effects of Er-Xian decoction in ovariectomized rats [J]. Int J Mol Sci, 2011, 12(11): 7635-7651.

[9] 王翔, 郭海玲, 赵咏芳, 等. 阿仑膦酸钠改善去卵巢大鼠的骨基质结构[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(50): 8621-8628.

[10] Burgers TA, Mason J, Niebur G, et al. Compressive properties of trabecular bone in the distal femur [J]. J Biomech, 2008, 41(5): 1077-1085.