

·基础研究·

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

李志宏¹ 周振华¹ 谢菊英² 唐吉平¹

摘要 目的:明确失神经、固定对大鼠降钙素基因相关肽水平及骨密度的影响,探索失神经和固定引起的骨质疏松的可能机制。方法:10 周龄 SD 雄性大鼠 96 只,随机分为 3 组,每组 4 个时间点,每时间点 8 只。失神经支配组接受双侧坐骨神经和股神经切断术,固定组大鼠双侧后肢利用石膏管型固定,对照组大鼠接受假手术。主要观察指标:造模后第 1、10、30、60 天各组大鼠胫骨骨密度和降钙素基因相关肽的变化及降钙素基因相关肽水平与骨密度水平相关性。结果:①降钙素基因相关肽:造模后第 10、30、60 天失神经支配组大鼠胫骨降钙素基因相关肽的水平低于对照组($P<0.05-0.01$);而固定组仅造模后第 30 天与对照组之间存在显著性差异($P<0.05$)。造模后第 10、60 天固定组高于失神经支配组($P<0.05-0.01$)。②骨密度:与对照组相比,失神经支配组、固定组造模后第 30、60 天骨密度降低($P<0.05-0.01$);失神经支配组和固定组造模第 30 天骨密度开始下降,60d 后下降明显,组内比较差异有显著性意义($P<0.05-0.01$)。③失神经后降钙素基因相关肽与骨密度水平变化高度相关($P<0.05$);而固定后降钙素基因相关肽与骨密度水平变化无明显相关性($P>0.05$)。结论:失神经可导致骨组织降钙素基因相关肽水平下降,降钙素基因相关肽水平下降是失神经性骨质疏松的可能机制之一;固定引起的骨质疏松的发生与降钙素基因相关肽的变化无关。

关键词 失神经;固定;降钙素基因相关肽;骨密度

中图分类号:R681,R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-12-1112-03

Effects on the level of calcitonin gene-related peptide and bone mineral density after sciatic and femoral denervation or hinder limb immobilization/LI Zhihong,ZHOU Zhenhua, XIE Juying,et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(12):1112—1114

Abstract Objective: To explicit the effects on the level of calcitonin gene-related peptide(CGRP) and bone mineral density (BMD) after denervation and immobilization, and explore the possible mechanism of osteoporosis caused by denervation and immobilization. **Method:** Ninety-six male SD rats were randomly divided into 3 groups: denervated group, immobilized group and control group, with 4 time points in each group and 8 rats in each time point. Denervated group received the bilateral sciatic nerve and femoral nerve cutting off. Immobilized group received hinder limbs immobilizing with tube plaster. Control group only received sham operation. Main outcomes were measured: content changes of CGRP and BMD as well as relevance between CGRP and BMD at the 1st d, 10th d, 30th d and 60th d after model preparation. **Result:** ①CGRP: The expression of CGRP was lower in denervated group at the 10th d, 30th d and 60th d after model preparation ($P<0.05-0.01$), with statistical difference between immobilized group and control group at the 30th d after immobilization ($P<0.05$). The expression of CGRP was higher in immobilized group than that in denervated group at the 10th d and 60th d after model preparation ($P<0.05-0.01$). ②BMD: Compared with control group, content of BMD in immobilized group and denervated group decreased at the 30th d and 60th d after model preparation ($P<0.05-0.01$), beginning decrease from the 30th d, and obviously decreasing at the 60th d in immobilized group and denervated group. There were significant differences in intra-group comparison ($P<0.05-0.01$). ③CGRP was highly related to BMD after denervation ($P<0.05$). However, there was no obvious relation between CGRP and BMD after immobilization ($P>0.05$). **Conclusion:** Denervation can decrease the level of CGRP, and CGRP is one of possible mechanisms of osteoporosis caused by denervation. It is irrelevant between CGRP and osteoporosis caused by immobilization.

Author's address Hunan City University, Yiyang, 413000

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

降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP)是由 37 个氨基酸残基组成的神经多肽,主要分布于中枢和外周神经系统,特别是感觉神经元胞体和末梢,起着神经递质和神经调质作用。在

1 湖南城市学院,湖南益阳,413000

2 湘南学院附属医院康复科

作者简介:李志宏,女,副教授,硕士

收稿日期:2009-07-14

骨中, 降钙素基因相关肽主要与 P 物质(substance P, SP)纤维共存, 分布于骨发生活跃的部位。CGRP 可作用于成骨细胞^[1]或通过刺激干细胞有丝分裂和骨间质细胞分化刺激骨化^[2], 通过与破骨细胞上的降钙素受体结合^[3], 抑制骨吸收。研究发现, 周围神经损伤后, 失神经支配后的肌肉组织失去了对 CGRP 合成的抑制作用, 而致神经元中 CGRP 合成增多^[4]。大鼠坐骨神经损伤后脊髓 CGRP 表达发生变化, 有促进神经再生的作用^[5-6]。但周围神经损伤及制动后骨中神经肽物质 CGRP 是否发生相应变化? 变化后的 CGRP 对骨密度(bone mineral density, BMD)有怎样的影响? 至今仍不十分清楚。本文对此进行研究, 以观察局部骨组织中的 CGRP 表达变化在失神经性骨质疏松及失用性骨质疏松形成过程中的可能机制。

1 材料与方法

10 周龄 SD 雄性大鼠 96 只, 体质量 220—250g, 由湖南医科大学动物中心提供(动物合格证号: 4104035), 国家标准啮齿类动物常规饲料喂养, 自由饮食, 充足清洁饮水, 室温保持在(22±2)℃, 相对湿度 45%—55%, 人工照明, 12h 光照和黑暗交替。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准^[7]。

1.1 动物分组及模型制作

10 周龄 SD 雄性大鼠 96 只, 体质量 220—250g, 随机分为 3 组, 每组 4 个时间点, 每时间点 8 只。
①失神经支配组: 大鼠用 30g/L 戊巴比妥钠按 25 mg/kg 麻醉, 固定四肢、备皮、消毒, 无菌条件下, 先于俯卧位行两侧后肢股外侧切口, 臀肌间隙暴露坐骨神经, 于股骨转子水平切断双侧坐骨神经, 远端游离, 切除 5mm, 端口尼龙丝线结扎, 缝合切口, 再置大鼠于仰卧位, 行两侧股正中纵切口, 于腹股沟韧带水平, 钝性分离, 暴露股神经, 切断大鼠两侧股神经, 远端游离 5mm, 缝合切口。创口缝合前后均用头孢噻肟钠喷洒, 以防术后感染。
②固定组: 大鼠固定与失神经支配手术同时进行, 腹腔内用 5g/L 氯胺酮按 20—30ml/kg 注射麻醉后, 管型石膏固定 1、10、30、60d。
③对照组行假手术, 即在造模过程中仅暴露神经, 然后缝合伤口, 伤口用头孢噻肟钠喷洒, 以防感染。

1.2 主要观察指标及检测方法

实验期间大鼠的一般情况: 造模后第 1、10、30、60 天各组大鼠胫骨骨密度和 CGRP 的变化及 CGRP 与 BMD 的相关性。

骨密度检测: 将 SD 大鼠俯卧位置于双能 X 射线骨密度诊断仪上, 用小动物测量软件在高分辨率模式下对大鼠双侧胫骨上段进行扫描, 检测造模后第 1、10、30、60 天骨密度的变化。扫描参数为: 1.0mm×1.0mm, 60mm/s, 12.00cm REV.3.9.3/2.1.0。

CGRP 检测: 大鼠称质量后, 在尽可能安静的情况下, 迅速断头; 取胫骨上段, 称质量, 在生理盐水中煮 5 min; 置匀浆器内, 加入 1mol/L HCl 1ml, 充分匀浆后倒入塑料指形管中, 在室温下放置 100 min; 加入 1mol/L NaOH 1ml, 中和酸; 3000r/min 低温 (4℃) 离心 20 min, 取上清液; 低温 (-40℃ 以下) 保存待测。造模后第 1、10、30、60 天采用放免法检测 CGRP, 进行放免测定时, 加入放免缓冲液复溶后测定 CGRP 水平, 取一定量上清液以考马斯亮蓝法进行组织蛋白定量, 最终结果以 ng/g 表示。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 10.0 软件完成统计处理, 组间比较采用单因素方差分析, 方差齐性者做 *t* 检验, 方差不齐性者做校正 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有显著性意义; 对各时间点各组大鼠胫骨骨密度和 CGRP 的变化进行相关分析。

2 结果

纳入 SD 大鼠 96 只, 均进入结果分析, 实验动物无脱落。

2.1 实验期间大鼠的一般情况

大鼠失神经造模后 30 min 左右清醒, 两后肢无主动屈伸功能, 后爪屈曲, 以足掌支持体质量, 躯体重心降低并前移, 前进时以臀部肌群帮助行走, 后退时靠腰腹部肌群收缩代偿。造模后大鼠活动量显著减少, 部分大鼠一侧或两侧足部肿胀, 4—8d 后逐渐消失, 个别大鼠有下肢自噬现象。固定组大鼠精神好, 活动时后肢拖地, 但重心无明显前移。对照组大鼠无明显异常。

2.2 造模后各组大鼠胫骨 CGRP 的变化

由表 1 可知, 造模后第 10、30、60 天失神经支配组大鼠胫骨 CGRP 水平显著低于对照组; 而固定组 CGRP 的水平仅造模后第 30 天时与对照组之间存在明显差异。造模后第 10、60 天固定组与失神经支配

表 1 造模后不同时间点各组大鼠胫骨

组别	CGRP 的变化 (x±s, n=32, ng/g)			
	第 1 天	第 10 天	第 30 天	第 60 天
对照组	131.2±30.5	220.2±40.1	200.1±31.1	200.8±30.2
失神经组	140.3±31.0	100.9±20.1 ^②	110.6±30.5 ^①	110.1±10.7 ^①
固定组	151.2±40.3	210.4±40.0 ^③	110.2±20.0 ^①	220.1±30.4 ^③

与对照组比较: ①*P* < 0.05, ②*P* < 0.01; 与失神经组比较: ③*P* < 0.05, ④*P* < 0.01

配组大鼠胫骨 CGRP 水平之间差异显著。失神经支配组 CGRP 水平呈持续下降趋势,而固定组 CGRP 水平先升高后下降,再升高。

2.3 造模后各组大鼠胫骨骨密度的变化

与对照组相比,失神经支配组、固定组造模后第 30、60 天骨密度显著降低,其中第 60 天骨密度差异显著。失神经支配组和固定组造模第 30 天骨密度开始下降,第 60 天后下降明显,组内比较差异有显著性意义。失神经支配组与固定组之间骨密度变化虽较大,但两者相比,无明显差异。

2.4 失神经、固定后 CGRP 与骨密度水平相关分析

失神经后 CGRP 与骨密度水平变化高度相关($P < 0.05, r = 0.431$);而固定后 CGRP 与骨密度水平变化相关程度不高($P > 0.05, r = 0.349$)。

表 2 造模后不同时间点各组大鼠

胫骨骨密度的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 32, \text{mg/cm}^2$)

组别	第 1 天	第 10 天	第 30 天	第 60 天
对照组	90.1±20.4	90.3±21.4	90.8±23.1	90.5±21.6
失神经组	89.0±24.6	73.9±27.7	57.3±28.5 ^{①③}	29.8±30.2 ^{②④⑤}
固定组	89.3±31.5	87.9±30.1	64.2±23.7 ^{①③}	31.2±32.3 ^{②④⑤}

与对照组比较^① $P < 0.05$, ^② $P < 0.01$; 与同组 30d 比较^③ $P < 0.05$, ^④ $P < 0.01$; 与同组 60d 比较^⑤ $P < 0.01$

3 讨论

3.1 失神经后 CGRP 水平变化及对骨密度的影响

失神经后骨密度发生相应改变,甚至出现骨质疏松症,有学者把这种骨质疏松命名为“神经源性骨质疏松”^[8]。那么失神经后导致的骨质疏松究竟是不是“神经源性骨质疏松”? CGRP 水平变化在这种骨质疏松形成中起怎样的作用? 作用机制如何?

实验发现,失神经后局部骨中 CGRP 水平先轻微升高,后持续降低,低于正常。韩庆林等^[9]研究发现失神经后循环中的 CGRP 水平短暂升高,然后恢复正常,说明失神经后对局部骨中 CGRP 水平的影响大于对循环中 CGRP 水平的影响。此外, CGRP 有神经源 CGRP 和免疫源 CGRP 之分^[9],正常情况下,免疫源 CGRP 较少;失神经后,神经源和免疫源 CGRP 均增高,尤其是免疫源 CGRP,但本实验却发现骨中 CGRP 水平是下降的,说明局部骨中 CGRP 水平降低主要是由于神经缺失,神经传递丧失,神经系统合成和释放的 CGRP 不能到达靶器官,即主要是由于神经源 CGRP 到达靶器官的量较少,而由炎症引起的免疫源 CGRP 即使增加,也不能超出由神经缺失引起的神经源 CGRP 减少,因此认为神经的完整性是维持局部骨中 CGRP 水平正常的关键因素。同时,我们还发现失神经后 CGRP 水平下降的同时伴随骨内血液重新分配和血液速度的改变,骨量下降,骨形

态计量学发生改变,骨密度下降,且失神经后大鼠 CGRP 水平与骨密度水平变化高度相关^[10],说明 CGRP 不仅参与了骨密度的调节,且可能是失神经性骨质疏松^[11]形成过程中的主要因素,因此,亦可将此类骨质疏松称为神经源性骨质疏松。

CGRP 调节骨密度的机制可能有以下几点:首先, CGRP 可作用于成骨细胞^[1]或通过刺激干细胞有丝分裂和骨间质细胞分化刺激骨化^[2],或通过刺激成骨细胞产生胰岛素样生长因子 1 间接刺激骨化^[12],具有促进骨化的作用^[13],同时通过与破骨细胞上的降钙素受体结合^[14-15],通过抑制白细胞介素 1、白细胞介素 6 引起的骨吸收作用^[16]抑制骨吸收。失神经后 CGRP 水平减少,由 CGRP 介导的成骨数量随之减少,作用于破骨细胞、抑制骨吸收的能力也降低,破骨增加,骨量下降。此外,失神经后,局部血循环改变,骨内血液重新分配,血液速度发生改变,而 CGRP 是目前体内发现的较强的舒血管物质,它可能通过影响局部血循环进而影响骨密度。而完整的神经支配是骨密度维持正常的前提^[17],失神经后骨密度发生改变, CGRP 具有促进神经再生和修复的作用^[18-21], CGRP 水平下降,神经再生和修复功能受影响,可间接影响骨密度。

3.2 固定制动后 CGRP 水平及对骨密度的影响

以往大多数研究已经证实,长期制动可导致废用性骨质疏松形成,即骨量下降,骨生物力学改变,易发生骨折,因此在废用性骨质疏松形成过程中,骨量是持续降低的。本实验结果显示,固定过程中 CGRP 水平变化不明显,仅第 30 天与对照组之间存在显著性差异。但固定过程中 CGRP 与骨密度的变化并不完全一致,且两者相关程度不高,所以认为 CGRP 对骨密度的影响不大,单纯观察 CGRP 水平变化不能说明骨量改变的程度,应综合考虑其他因素的作用。

参考文献

- [1] 韩庆林,苟三怀,王琪. 降钙素基因相关肽(CGRP)调控成骨细胞功能研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(7): 544—545, 549.
- [2] Hara-Irie F, Amizuka N, Ozawa H. Immunohistochemical and ultrastructural localization of CGRP-positive nerve fibers at the epiphyseal trabecules facing the growth plate of rat femurs[J]. Bone, 1996, 18(1): 29—39.
- [3] 孙应明,罗颂椒,赵显辉,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.
- [4] 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, 12(37): 7351—7354.
- [5] 许愿忠,王瑞,张建伟,等. 不同延迟时间后修复大鼠坐骨神经缺损对 CGRP 表达的影响[J]. 中国临床解剖学杂志, 2005, 23(6): 648—

- 651.
- [6] 郑林丰,谢应桂,许愿忠,等.大鼠坐骨神经结扎后降钙素基因相关肽的变化[J].第三军医大学学报,2006,28(17):1791—1794.
- [7] 中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [8] 高润.神经源性骨质疏松[J].中国康复医学杂志,2001,16(6):380—382.
- [9] 李继锋,王舟,纪祥瑞.降钙素基因相关肽在神经免疫内分泌网络中的作用(综述)[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2004,11(3):177—179.
- [10] 栾军伟,陈晓亮.降钙素受体基因多肽与骨密度的相关性[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(41):8345—8348.
- [11] 贾经汉,邱新建,陈志坚.骨质疏松动物模型的研究进展[J].中国康复医学杂志,2007,22(8):765—768.
- [12] 王新,术跃明,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[J].中华实验外科杂志,2006,23(12):1515—1518.
- [13] Villa I, Mrak E, Rubiniacci A, et al. CGRP inhibits osteoprotegerin production in human osteoblast-like cells via cAMP/PKA-dependent pathway [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006,291(3):C529—537.
- [14] Ishizuka K, Hirukawa K, Nakamura H, et al. Inhibitory effect of CGRP on osteoclast formation by mouse bone marrow cells treated with isoproterenol [J]. Neurosci Lett, 2005,379(1):47—51.
- [15] 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.
- [16] Grills BL, Schuijers JA. Immunohistochemical localization of nerve growth factor in fractured and unfractured rat bone[J]. Acta Orthop Scand, 1998,69(4):415—419.
- [17] Zaidi M, Chambers TJ, Bevis PJ, et al. Effects of peptides from the calcitonin genes on bone and bone cells[J]. Q J Exp Physiol, 1988, 73(4):471—485.
- [18] 段平国,刘德明.降钙素基因相关肽与神经损伤修复[J].四川解剖学杂志,2006,14(1): 44—46.
- [19] 郑林丰,谢应桂,许愿忠.降钙素基因相关肽在神经系统损伤中的作用[J].创伤外科杂志,2006,8(6):571—573.
- [20] 王晓云,郭霞,钱忠明.骨组织中降钙素基因相关肽阳性神经的分布及生理作用[J].中华骨科杂志,2005,25(3):185—188.
- [21] 李兴志,张鉴栩,卢晓维,等.颈交感干离断对局灶性脑缺血大鼠血浆中降钙素基因相关肽的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2008,23(3):216—218.

中华医学会第十二次全国物理医学与康复学学术会议征文通知

中华医学会第十二次全国物理医学与康复学学术会议定于2010年8月19—23日在安徽省歙县岩寺华商山庄召开。本次会议的主题是“继往开来,共谋全国康复医学事业发展”,重点学习和交流物理医学与康复学专业的最新理论、新知识、新技术,邀请国内外著名专家就康复医学领域的热点问题作专题讲座,进行中英文学术交流并评选优秀论文,届时将举办康复设备展览。欢迎广大物理医学与康复科、康复医学科、理疗科、骨科、神经内科、神经外科、老年医学科、儿科、中医科、针灸推拿科及其他相关学科的医师、治疗师、护士投稿并参加此次盛会。

征文范围:神经系统疾患康复、肌肉骨骼疾患康复、心肺等内科疾患康复、儿童疾患康复;运动感觉功能障碍康复、言语、吞咽、认知等各种功能障碍康复;日常生活活动能力、生存质量的研究;各种自然及人工物理因子、针灸、按摩手法的应用与研究;疼痛和痉挛的评估与治疗;矫形器的制作与应用研究;社区康复的理论与实践;循证康复、学科建设、康复医学教育、康复护理;康复医疗仪器的研制与应用研究等。

征文要求及优秀论文评选:论文摘要一份,字数800字以内。要求科学性强,数据真实可靠,文字表达准确精炼。稿件格式:word文档格式,第一行文题,字号为宋体小三号加粗,第二行作者姓名、工作单位、通讯地址、邮编、联系电话和Email地址(请项目齐全),字号为宋体五号字,第三行摘要,字号为宋体小四号字。文件名以论文题目命名。本次大会将评选中文优秀论文和青年英语优秀论文。①中文优秀论文征文要求:除符合上述论文摘要要求外,请在文题右上方注明“优秀论文评选”字样,摘要中“目的”、“方法”、“结果”和“结论”等字加粗。作者可自愿另报送4000字以内的中文全文和文题的英文。②中青年英语优秀论文征文要求:英文结构式论文摘要一份,字数800字以内。要求科学性强,数据真实可靠,文字表达准确精炼。word文档格式,第一行文题,第二行作者姓名、工作单位、通讯地址、联系电话和Email地址,第三行论文摘要(包括Objective,Methods,Results,和Conclusion)。文件名以文章题目命名。作者可自愿另报送4000字以内的英文全文和文题的中文。在线投稿请务必以中文填报个人信息和联系方式。

投稿方式:请登录大会网站 www.capmr.org/2010meeting,只接受在线投稿。截稿时间:2010年5月30日。联系方式:安徽省医学会学术部,赵平,电话:0551-2822919;安徽省立医院康复医学科,吴鸣,电话:0551-2283245。

中华医学会学术会部