

# 局部微电流刺激对兔胫骨骨缺损部位 降钙素基因相关肽表达的影响

姚玉英<sup>1</sup> 张宏<sup>1</sup> 范雅丽<sup>1</sup> 杨东浩<sup>1</sup> 金玉祥<sup>1</sup> 贾丽丽<sup>1</sup> 郭志利<sup>1△</sup>

**[摘要]** 目的:探讨局部微电流刺激对兔胫骨骨缺损部位降钙素基因相关肽(CGRP)表达的影响。方法:选择家兔40只,随机分为模型组和治疗组各20只,对两组家兔进行胫骨近端骨缺损造模,并对各组胫骨骨缺损部位骨密度(BMD)、骨矿物含量(BMC)及骨生物力学进行观察,免疫组化法对各组新生骨痂中CGRP及受体(CGRPR-1)表达情况进行检测。结果:造模1周后,两组家兔骨痂BMD及BMC差异无统计学意义( $P>0.05$ ),2、3及4周后,治疗组家兔的新生骨区BMD、BMC均高于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。实验4周后,治疗组家兔胫骨骨缺损部位的弹性载荷、弯曲能量、断裂载荷及刚性系数比模型组明显高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。免疫组化结果显示,造模1周后,两组家兔新生骨组织CGRP及CGRPR-1表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ),2、3及4周后,治疗组CGRP及CGRPR-1表达水平明显高于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论:局部微电流刺激可促进成骨细胞分化,加速骨矿物沉积,增加骨缺损部位的弯曲载荷强度,促进经肽分泌,加快胫骨骨缺损的愈合。

**[关键词]** 局部微电流刺激;胫骨;骨缺损;骨密度;降钙素基因相关肽

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)04-0020-04

## Effect of Local Microcurrent Stimulation on the Expression of Calcitonin Gene-Related Peptide in Tibial Defect of Rabbits

YAO Yuying<sup>1</sup> ZHANG Hong<sup>1</sup> FAN Yali<sup>1</sup> YANG Donghao<sup>1</sup>  
JIN Yuxiang<sup>1</sup> JIA Lili<sup>1</sup> GUO Zhili<sup>1△</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Shijiazhuang Medical College, Shijiazhuang 050599, China.

**Abstract Objective:** To investigate the effect of local microcurrent stimulation on the expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the tibial defect of rabbits. **Methods:** 40 rabbits were randomly divided into model group and treatment group with 20 rabbits in each. The model of proximal tibial bone defect was established in two groups of rabbits. Bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC) and biomechanics of tibial bone defect were observed in each group. The expression of CGRP and CGRPR-1 in each group was detected by immunohistochemistry. **Results:** There was no significant difference in callus BMD and BMC between the two groups at 1 week after the establishment of the model ( $P>0.05$ ). While the BMD and BMC of the new bone area in the treatment group were higher than those in the model group after 2, 3 and 4 weeks ( $P<0.05$ ). The elastic load, bending energy, fracture load and rigidity coefficient of tibial defect in the treatment group were significantly higher than those in the model group after 4 weeks ( $P<0.05$ ). The results of immunohistochemistry showed that there was no significant difference in the expression of CGRP and CGRPR-1 between the two groups at 1 week after the establishment of the model ( $P>0.05$ ), but both in the treatment group were significantly higher than those in the model group after 2, 3 and 4 weeks ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Local microcurrent stimulation can promote the differentiation of osteoblasts, accelerate the deposition of bone mineral, increase the bending load intensity of bone defect, promote the secretion of peptide, and accelerate the healing of tibial bone defect.

**Keywords:** local microcurrent stimulation; tibia; bone defect; bone mineral density; calcitonin gene-related peptide

成,尤其随着我国交通事业的快速发展,其发生率呈逐年增加趋势<sup>[1-2]</sup>。因胫骨特殊的解剖结构,其周围皮下组织及外周肌肉较少,一旦受损,易导致局部滋养血管及组织损伤,给临床治疗带来较大的难度,且胫骨骨折后感染引起的骨缺损等并发症,会导致极高的伤残率,给患者生活质量带来严重影响,一直是骨科研究的热点和难点<sup>[3-4]</sup>。电刺激治疗对胫骨骨缺损修复有着明显的疗效,近些年在临床上得到越来越多的应用<sup>[5]</sup>。本研究通过对兔胫骨骨缺损部位进行局部微电流刺激,分析其对降钙素基因相关肽表达的影响,阐明其对骨缺损愈合机制,以期为胫骨骨缺损的愈合提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物

选用新西兰家兔(动物批准号为 SCXK(冀)2018-0013)40 只,雌雄各半,3 个月月龄,体质量 2.0~3.0 kg,由河北医科大学动物实验中心提供,饲养于清洁级实验室中(室温 22~25 ℃,湿度 50%~65%),给予普通饲料喂养。

1.2 实验药物与试剂

兔多隆抗体 CGRP 和兔多隆抗体 CGRPR-1(武汉博士德公司)、射用异戊巴比妥钠(广东新亚药业)。

1.3 实验仪器

电子天平(型号为 AEL-40SM,日本岛津)、骨密度仪(型号为 XR-46,美国 NORLAND 公司)、显微镜(型号为 Olympus IX71,日本 OLYMPUS)、神经刺激仪(型号为 LH202H,北京华卫产业开发公司)。

1.4 方法

1.4.1 分组、模型制备及干预 将 40 只新西兰家兔随机分模型组和治疗组(各 20 只),适应性饲养 1 周后,给予 2%戊巴比妥钠溶液麻醉,无菌条件下对右膝关节下胫骨上端 1/3 处进行纵行切口(切口约 3 cm),分离黏膜、筋膜、肌肉至骨膜,采用动力钻形成 10 mm×3 mm 胫骨近端骨缺损(10 mm×3 mm),术后清理创口碎骨组织并止血,无菌缝合后包扎,构建胫骨骨缺损模型。两组家兔术后均常规饲养,自由活动,

治疗组术后第 1 天,将电刺激仪正负置于骨缺损所在胫骨近端,负极置于远端神经处,对周围神经点进行刺激,脉冲时间 0.6~1.0 ms,脉冲频率 2~20 Hz,刺激电流 50 mA,1 次/d,每次 30 min。

1.4.2 骨密度(BMD)及骨矿物含量(BMC)检测 造模后 1、2、3 和 4 周,各组取 5 只兔处死后,取右胫骨,并剔除周围附着的肌肉及筋膜。对骨痂 BMD 和 BMC 进行检测。

1.4.3 三点弯曲力学实验 造模后 4 周,取各组家兔右胫骨样本,置于 MTS 试验机上采用三点弯曲法进行生物力学检测,通过仪器记录弹性载荷、弯曲能量、断裂载荷,并计算出刚性系数。

1.4.4 免疫组织化检测 造模后 1、2、3 和 4 周,各组取 5 只兔处死后,取右胫骨,切取包含骨缺损在内长度为 1 cm 的骨组织作为标本,置入 10%中性福尔马林溶液固定,15%EDTA 溶液中脱钙,脱水,透明,石蜡包埋后连续切片,按照 SABC 试剂盒说明书行免疫组织化学染色检测 CGRP 及受体(CGRPR-1)表达情况,用已知 CGRP 及 CGRPR-1 阳性表达的切片作为阳性对照,PBS 液代替一抗液作为阴性对照,光镜下观察 CGRP 及 CGRPR-1 阳性表达部位与表达强弱并拍照。采用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统对结果进行定量分析,应用平均积分吸光度对 CGRP 及 CGRPR-1 表达程度进行定量检测分析,平均光度值越高,表示该部位 CGRP 及 CGRPR-1 表达越强。

1.5 统计学方法

使用 SPSS 20.0 软件处理数据,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验, $P < 0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组家兔的骨痂 BMD 值

造模 1 周后,两组家兔骨痂 BMD 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),2、3 及 4 周后,治疗组家兔的新生骨区 BMD 均高于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 两组家兔的胫骨 BMD 值( $\bar{x} \pm s, g/cm^2$ )

组别	1 周	2 周	3 周	4 周
模型组	0.165±0.06	0.172±0.08	0.178±0.07	0.182±0.06
治疗组	0.163±0.07	0.323±0.09	0.536±0.08	0.754±0.08
$t$	0.049	2.804	7.531	12.790
$P$	0.962	0.021	<0.001	<0.001

2.2 两组家兔的骨痂 BMC 值

造模 1 周后,两组家兔骨痂 BMC 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),2、3 及 4 周后,治疗组家兔的新生骨区骨痂 BMC 高于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

2.3 两组家兔骨生物力学性能

造模 4 周后,三点弯曲检测结果显示,治疗组胫骨的弹性载荷、弯曲能量、断裂载荷及刚性系数比模型组明显上升( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 2 两组家兔的胫骨 BMC 值( $\bar{x}\pm s$ ,g)

组别	1 周	2 周	3 周	4 周
模型组	0.425±0.05	0.573±0.07	0.617±0.06	0.735±0.07
治疗组	0.423±0.08	0.836±0.19	1.238±0.13	1.653±0.18
<i>t</i>	0.047	2.904	9.698	10.629
<i>P</i>	0.964	0.033	<0.001	<0.001

表 3 两组家兔胫骨生物力学性能( $\bar{x}\pm s$ )

组别	弹性载荷/N	弯曲能量/N	断裂载荷/N	刚性系数/(kN·mm <sup>2</sup> )
模型组	89.47±3.38	6.24±1.05	132.37±3.13	3.02±0.16
治疗组	124.56±3.05	11.64±1.58	165.64±3.23	4.18±0.15
<i>t</i>	17.235	6.365	16.540	11.827
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 两组家兔的新生骨组织 CGRP 表达

造模 1 周后,两组家兔新生骨组织 CGRP 表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ),2、3 及 4 周后,治疗组家兔的新生骨组织 CGRP 表达均高于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 4 及图 1。

2.5 两组家兔的新生骨组织 CGRPR-1 表达

表 4 两组家兔的新生骨组织 CGRP 表达( $\bar{x}\pm s$ )

组别	1 周	2 周	3 周	4 周
模型组	0.193±0.08	0.184±0.06	0.173±0.05	0.172±0.04
治疗组	0.195±0.07	0.467±0.09	0.335±0.08	0.264±0.06
<i>t</i>	0.042	5.850	3.840	2.853
<i>P</i>	0.967	<0.001	0.004	0.019

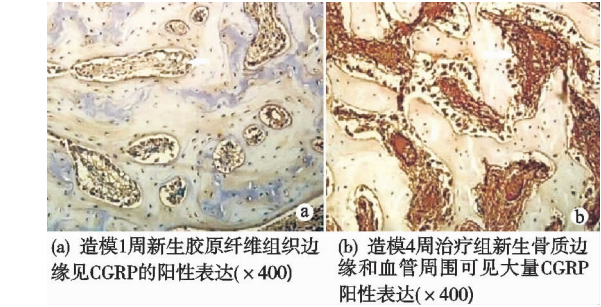


图 1 造模后 CGRP 的阳性表达

表 5 两组家兔的新生骨组织 CGRPR-1 表达( $\bar{x}\pm s$ )

组别	1 周	2 周	3 周	4 周
模型组	0.255±0.08	0.218±0.08	0.215±0.07	0.202±0.06
治疗组	0.253±0.09	0.533±0.12	0.436±0.11	0.354±0.09
<i>t</i>	0.037	4.884	3.790	3.142
<i>P</i>	0.971	0.001	0.004	0.012

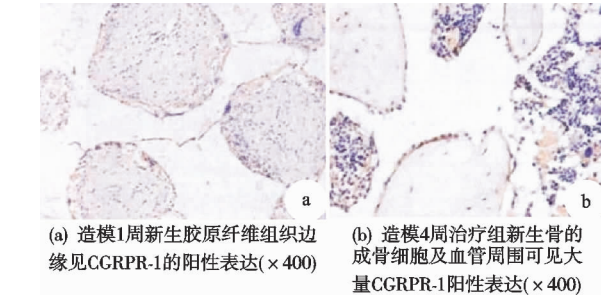


图 2 造模后 CGRPR-1 的阳性表达

后患者愈合较慢,修复过程复杂<sup>[6-7]</sup>。受病情延误、伤势严重、治疗方法不当及护理失误等因素影响,胫骨骨折患者会发生骨缺损等并发症,从而造成骨折不愈合,需要进行二期手术促进其愈合,不仅增加了患者及家

兔的新生骨组织 CGRPR-1 表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ),2、3 及 4 周后,治疗组家兔的新生骨组织 CGRPR-1 表达均高于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 5 及图 2。

3 讨论

胫骨骨折是常见的骨折类型之一,通过外科手术可对胫骨骨折进行有效治疗,但因胫骨解剖结构独特,缺乏有效的软组织和血运保护,易造成明显骨缺损,术

属的经济负担,还严重影响患者的生存质量<sup>[8-9]</sup>。本研究以新西兰兔为研究对象,其与人类骨组织代谢速率相似,造模手术时损伤组织较少,术后并发症少,可减少模型的其他影响因素,更利于研究电刺激对胫骨骨缺损家兔模型骨组织愈合的影响。

电刺激是一种电疗方法,是将低频脉冲电流输入人体特定部位进行治疗的一种手段,具有无创伤、无痛的优点,是骨科传统的有效治疗手段之一<sup>[10-11]</sup>。本研究结果显示,造模 2、3 及 4 周后,治疗组家兔的新生骨区 BMD 和 BMC 均高于模型组。这是因为通过局部微电流刺激,可使家兔胫骨骨折区域产生各种“感应电产物”,从而有效激活成骨细胞,促进破骨细胞吸收,使

骨形成大于骨吸收,利于骨形成,加快骨塑形,增加骨痂形成,促进骨修复。

骨组织的生物力学是生物物理学的一个重要分支,通过对骨组织的力学性能进行检测,可有效反应骨组织的整体性能<sup>[12-13]</sup>。本研究造模后 4 周,三点弯曲检测结果显示,治疗组胫骨的弹性载荷、弯曲能量、断裂载荷及刚性系数比模型组明显上升,这可能是因为经过局部微电流刺激,可刺激破骨细胞早期前提分化和增殖,促进骨吸收,加快骨重塑,增加骨痂形成速度,随着骨密度增高及骨矿物含量的增加,其力学性能测试结果也变大,从而维持骨的正常生物力学性能,最终加快骨折愈合的速度和质量<sup>[14]</sup>。

胫骨缺损的修复过程十分复杂,会受到各种因素的影响,如激素、多种细胞因子及神经肽等因素调控<sup>[15-16]</sup>。感觉神经和自主神经会分泌神经肽类物质影响骨组织的代谢,其中 CGRP 是影响成骨细胞及破骨细胞的关键神经肽,并可与 CGRPR-1 结合参与调节骨生长及骨重塑过程<sup>[17-18]</sup>。骨折愈合最根本的因素是局部血液供应,CGRP 具有很强的血管调节活性,可刺激血管内皮细胞的增殖,促进血管生成,从而参与骨折早期修复及晚期塑形<sup>[19-20]</sup>。本研究结果显示,造模 2、3 及 4 周后,治疗组家兔的新生骨组织 CGRPR-1 表达均高于模型组。这可能是因为通过局部微电流刺激治疗,可有效刺激骨膜上丰富的感觉神经末梢纤维,提高神经元的兴奋性,增加 CGRP 的分泌释放,并激活胶质细胞上 CGRPR-1,促进胶质细胞增殖,神经突起生长及加强轴浆运输能力,改善神经损伤后其支配区局部的血供情况,调节骨的生长、修复及改建。

综上所述,通过对兔胫骨骨缺损部位进行局部微电流刺激,可提高降钙素基因相关肽表达,促进骨缺损的愈合,改善骨痂质量。后期应用于临床治疗将促进骨缺损患者的康复,值得临床推广与应用。

## 参考文献

- [1] 张觅,刘洋,李明辉,等. 关节镜辅助手术治疗胫骨平台骨折 54 例[J]. 中国中医骨伤科杂志,2018,26(12):77-79.
- [2] 乔锋,李涤尘,靳忠民,等. 3D 打印外固定架治疗胫骨骨折的临床应用[J]. 中华骨科杂志,2019,39(1):23-29.
- [3] 卢炎君,张永红,王栋,等. 手风琴技术治疗胫骨骨折延迟愈合或不愈合[J]. 中华骨科杂志,2019,39(1):30-35.
- [4] 武旭刚,周宗波,朱华亮,等. 三黄洗剂对胫腓骨骨折术后伤口感染的疗效分析[J]. 河北医学,2019,25(10):1700-1703.
- [5] 席小芳,李学智,刘菲,等. 短刺加电针法对膝关节炎兔膝关节软骨修复的影响[J]. 针刺研究,2016,41(2):124-130.
- [6] KAZIMIERZ T. SZOPINSKI, PAWEL ADAMCZYK. Interposition of the transverse ligament of the knee into a fracture of the tibial plateau: a case report[J]. Skeletal

- Radiology,2018,47(1):1011-1014.
- [7] SHIN Y W, KIM D W, PARK K B. Tibial tubercle avulsion fracture according to different mechanisms of injury in adolescents: tibial tubercle avulsion fracture[J]. Medicine,2019,98(32):e16700.
- [8] WU G L, ZHAO S C, CHEN H W, et al. Arthroscopic treatment of tibial intercondylar ridge avulsion fracture with double-root line double tunnel fixation technique[J]. China Journal of Orthopaedics and Traumatology, 2018, 31(7):621-626.
- [9] RYU S M, YANG H S, SHON O J. Staged treatment of bicondylar tibial plateau fracture (Schatzker Type V or VI) using temporary external fixator: correlation between clinical and radiological outcomes[J]. Knee Surgery & Related Research,2018,30(3):261-268.
- [10] 林广劲. 神经肌肉电刺激联合补肾壮骨汤治疗对股骨骨折术后患者关节功能、生活质量及骨代谢的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2019,28(16):1767-1770.
- [11] 田振峰,喻伟光,李洁冰,等. 经皮神经电刺激对桡骨远端骨折患者血清 CGRP 变化的影响及意义[J]. 河北医药,2015,37(15):5273-5277.
- [12] 宋子鉴,郑欣,王进,等. 不同月龄新西兰兔桡骨扭转力学特性的研究[J]. 中华解剖与临床杂志,2018,23(6):533-537.
- [13] 王建朝,刘国彬,张晓娟,等. 人体腓骨体部骨组织显微硬度的分布特征[J]. 中华解剖与临床杂志,2019,24(5):430-434.
- [14] 王亚军,张来举,宋凯,等. 电针对去卵巢大鼠骨密度及生物力学的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2018,24(5):22-26.
- [15] SONG L, WU J Q, HU J J, et al. Neuropeptide Y Y1 receptor antagonist PD160170 promotes osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and femoral defect repair in rats[J]. J South Med Univ, 2018, 38(6): 669-676.
- [16] 陈波,郭祥,张寿,等. 转染 BMP-2 基因的骨髓 MSC 复合多孔磷酸钙骨水泥构建组织工程化骨对兔骨缺损的修复作用研究[J]. 临床和实验医学杂志,2019,18(17):7-11.
- [17] TEPPER S J. History and review of anti-calcitonin gene-related peptide (CGRP) therapies: from translational research to treatment[J]. Headache,2018,58(S3):238-275.
- [18] LIANG W, LYU T, LI L, et al. Effect of calcitonin gene-related peptide on osteoporotic fracture healing in vitro[J]. Chinese Journal of Orthopaedics, 2017, 37(6): 353-359.
- [19] ZHANG Y, XU J, RUAN Y C, et al. Implant-derived magnesium induces local neuronal production of CGRP to improve bone-fracture healing in rats[J]. Nature Medicine,2016,22(10):1160-1169.
- [20] TANG P, DUAN C, WANG Z, et al. NPY and CGRP inhibitor influence on ERK pathway and macrophage aggregation during fracture healing[J]. Cellular Physiology and Biochemistry,2017,41(4):1457-1467.

(收稿日期:2020-08-15)