

• 基础实验研究论著 •

尼古丁对大鼠骨折愈合和骨痂血管内皮生长因子表达的影响*

黄伟忠, 张 莉, 唐景云, 廖苑妮, 刘东云
(坪山新区人民医院检验科, 广东深圳 518118)

摘 要:目的 探讨尼古丁对大鼠骨折愈合和骨痂血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。方法 将 120 只 SD 大鼠随机分为 3 组, 低尼古丁组($n=40$)、高尼古丁组($n=40$)和对照组($n=40$)。建立骨折愈合模型, 于建模后第 3、7、14、21 天分别处死 10 只大鼠, 采集桡骨骨折部位骨痂组织, 采用苏木素-伊红(HE)染色进行显微镜下观察、测量骨痂厚度和成熟度, 采用免疫组织化学染色检测骨痂中 VEGF 表达水平。结果 建模后第 3 天, 低尼古丁组、高尼古丁组大鼠骨痂厚度、成熟度及 VEGF 表达水平与对照组的差异无统计学意义($P>0.05$)。建模后第 7、14、21 天, 低尼古丁组、高尼古丁组大鼠的 VEGF 表达水平高于对照组, 但骨痂厚度和成熟度低于对照组($P<0.05$); 低尼古丁组大鼠 VEGF 表达水平高于高尼古丁组($P<0.05$)。结论 尼古丁减少骨痂形成, 延缓骨折愈合过程, 促进 VEGF 表达, 且不同尼古丁剂量对 VEGF 表达的影响不同。

关键词:尼古丁; 骨折愈合; 血管内皮生长因子类

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)23-3112-02

Effects of nicotine on fracture healing and vascular endothelial growth factor expression in callus tissue in rats*

Huang Weizhong, Zhang Li, Tang Jingyun, Liao Yuanni, Liu Dongyun

(Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Pingshan District, Shenzhen, Guangdong 518118, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of nicotine on fracture healing and vascular endothelial growth factor(VEGF) expression in callus tissue in rats. **Methods** 120 rats were randomly divided into 3 groups: low nicotine group($n=40$), high nicotine group($n=40$) and control group($n=40$). Fracture healing rat models were established and 10 of them were sacrificed on the 3rd, 7th, 14th, 21st day after model establishment. Callus tissues in radial fracture were collected. Hematoxylin-eosin(HE) staining was used to conduct microscopic observation, callus thickness and maturity measuring. Immunohistochemical staining was employed to detect the VEGF expression level in callus tissues. **Results** On the 3rd day after model establishment, differences of callus thickness, maturity and VEGF expression level of rats between control group and low nicotine group, high nicotine group, respectively, were not statistically significance($P>0.05$). On the 7th, 14th and 21st day after model establishment, the VEGF expression level of rats in low nicotine group and high nicotine group were higher than that in control group, but their callus thickness and maturity were lower than those in control group($P<0.05$). VEGF expression level of rats in low nicotine group was higher than that in high nicotine group($P<0.05$). **Conclusion** Nicotine reduces callus formation, suspends healing process and induces VEGF expression. Different doses of nicotine have different effects on VEGF expression.

Key words: nicotine; fracture healing; vascular endothelial growth factors

尼古丁又名烟碱, 是烟草中的重要成分。全球烟民众多, 美国有 6 千多万, 欧盟有 1 亿多, 而中国烟民高达 3 亿多^[1]。烟草给人们的身体健康带来了巨大的威胁, 已经引起全球的广泛关注。尼古丁作为烟草中的重要成分, 会对心血管、呼吸系统、消化系统等系统产生危害^[2], 尼古丁对健康的危害已经有很多相关研究了, 但是关于尼古丁对骨折愈合影响的研究却很少。为了研究尼古丁对骨折早期愈合的影响, 本实验以 SD (Sprague Dawley) 大鼠为实验材料建立尼古丁生物效应下的骨折愈合动物模型, 通过观察骨痂厚度、成熟度和骨痂中血管内皮生长因子(VEGF)分析尼古丁对大鼠骨折愈合的影响, 进而探讨尼古丁对人体骨折愈合的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 120 只健康 SD 大鼠, 7 周龄, 雄性, 体质量 260~300 g, 平均(280.0±20.0)g。购自广东省医学动物实验中心(粤监证字 200A0SCXK2003-0002), 动物的饲养和实验的进行均在深圳市人民医院动物实验室。整个实验过程中对动物的实验操作符合《关于善待实验动物的指导性意见》的要求^[3]。

1.1.2 试剂 磷酸氢二钠(分析纯)、磷酸二氢钠(分析纯)、枸橼酸(化学纯); VEGF 免疫组织化学试剂盒(美国 ADL 公司); 尼古丁标准液(美国 Sigma 公司, 纯度不低于 99%, 5 mL/支)。

1.2 实验方法

1.2.1 分组 将 120 只 SD 大鼠随机分成 3 组, 低尼古丁组、高尼古丁组和对照组, 每组 40 只。

1.2.2 骨折愈合模型的建立 对照组大鼠注射生理盐水 0.5 mL·kg⁻¹·d⁻¹, 低尼古丁组大鼠注射尼古丁 2 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 高尼古丁组大鼠注射尼古丁 4 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 连续注射 3 周后, 对大鼠进行腹腔麻醉(10%水合氯醛, 0.3 mL/100 g), 进行手术, 切开皮肤, 锯断桡骨, 造成 3 mm 的桡骨缺损, 使用生理盐水冲洗切口后逐层缝合, 不做任何固定。术后继续分笼常规饲养, 连续 3 d, 每天肌肉注射青霉素 80 000 U/100 g 进行抗感染治疗, 并继续分别注射生理盐水和尼古丁。

1.2.3 标本采集 模型建立后的第 3、7、14、21 天, 每组随机处死 10 只大鼠, 以骨折断端上下 0.5 cm 取骨痂组织。将骨痂组织经过固定、脱钙、石蜡包埋后制成切片, 进行苏木素-伊红(HE)染色后于显微镜下观察、测量骨痂厚度和成熟度。进行 VEGF 免疫组织化学染色、观察, 用 Biomias99 图像分析系统

* 基金项目: 深圳市科技计划资助项目(201103329)。 作者简介: 黄伟忠(1980~), 男, 主管检验师, 主要从事临床检验科的工作。

软件处理,观察骨痂中 VEGF 阳性表达的细胞数目。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。骨痂成熟度采用描述性分析。

2 结 果

2.1 骨痂厚度测量结果 骨折愈合模型建立后的第 3、7、14、21 天分别比较 3 组间的差异性,见表 1。模型建立后的第 3 天,3 组间的差异无统计学意义($P>0.05$),第 7、14、21 天,3 组间的差异均有统计学意义($P<0.05$)。2 个剂量的尼古丁组间的比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 骨折愈合不同时间点各组大鼠的骨痂厚度($\bar{x} \pm s$, mm)

组别	<i>n</i>	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
对照组	10	1.10±0.14	1.59±0.09	1.98±0.12	2.39±0.09
低尼古丁组	10	1.06±0.10	1.43±0.12	1.78±0.08	1.93±0.11
高尼古丁组	10	1.05±0.09	1.39±0.09	1.68±0.09	1.89±0.09

2.2 骨痂成熟度测定结果的描述性分析 (1)对照组大鼠:术后第 3 天,骨内、外膜开始增厚;术后第 7 天,骨折端的新生血管出现,肉芽组织形成,纤维母细胞增生,可见少量的成骨细胞;术后第 14 天,外骨痂中肉芽组织生长,纤维性骨痂生成、新生的毛细血管出现,骨生成细胞和成骨细胞增多明显;术后第 21 天,骨折端纤维母细胞减少,纤维性骨痂减少,软骨骨痂和编织骨痂增多。(2)低尼古丁组和高尼古丁组:术后第 3、7 天,骨痂成熟度与对照组无明显的差异;第 14、21 天,骨痂中的成纤维细胞和纤维性结缔组织含量增加,但成骨细胞的增殖数量减少,骨痂成熟度低,内、外骨痂塑型晚。

2.3 VEGF 阳性细胞数检测结果 模型建立第 3 天,各组大鼠 VEGF 阳性细胞数的差异无统计学意义($P>0.05$);模型建立第 7、14、21 天,对照组与两尼古丁组比较,VEGF 阳性细胞数差异均有统计学意义($P<0.05$)。低、高尼古丁组 VEGF 表达均高于对照组,且 2 个尼古丁组之间比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。VEGF 在早期骨痂中表达区域主要集中在血管内皮细胞、成纤维细胞、骨膜间充质细胞、成骨细胞、破骨细胞以及炎症细胞上。

表 2 骨折愈合不同时间点各组大鼠的 VEGF 阳性细胞数($\bar{x} \pm s$, 个/HP)

组别	<i>n</i>	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
对照组	10	24.2±6.4	22.8±7.3	41.0±2.9	63.0±5.5
低尼古丁组	10	24.6±3.7	38.4±2.1	49.6±4.2	77.8±1.1
高尼古丁组	10	26.4±2.3	32.2±2.1	46.0±3.4	71.0±5.3

3 讨 论

本研究没有采用吸烟法,而是采用注射尼古丁的方法对大鼠进行处理,减少了实验误,这是因为采用吸烟法,每只老鼠对尼古丁的吸收是不同的,容易造成实验的误差,而皮下注射避免了这种误差的产生,提高了实验的准确性^[4-8]。低尼古丁组大鼠注射尼古丁的剂量相当于每天吸 1~2 包烟,高尼古丁组大鼠相当于每天吸 2~3 包烟^[9-13]。

尼古丁影响骨痂增殖分化,减少骨痂形成,抑制骨的成熟改造,延缓骨折愈合过程,促进 VEGF 表达促进内皮细胞增

生,从而促进血管新生,且不同尼古丁剂量对 VEGF 表达的影响不同^[14]。

尼古丁的生物效应十分复杂,一方面能影响骨痂的增殖分化,使骨痂形成减少;抑制骨的成熟改造,使骨骼愈合过程减缓。另一方面,尼古丁可促进 VEGF 的表达,可能促进血管新生,且不同剂量的尼古丁对 VEGF 表达影响不同,其临床意义有待进一步研究^[15]。

参考文献

[1] 王长海,栗平,李晓东,等. 实验性松质骨缺损修复过程中血管内皮生长因子与转化生长因子 $\beta 1$ 的表达[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2012,6(2):333-337.

[2] 秦宏敏,李强,胥毅,等. 尼古丁对骨髓间充质干细胞碱性磷酸酶活性的抑制作用[J]. 中国临床康复,2005,9(2):76-77.

[3] 张新风,张志宏,解超勇. 尼古丁对兔骨髓源成骨细胞生物学特性的影响[J]. 山东医药,2008,48(3):27-28.

[4] 白冰,钟丽芳,朱静涛. 尼古丁对成人成骨细胞生物学性能的影响[J]. 华西口腔医学杂志,2009,27(5):483-486.

[5] Zhao H, Ma S, Chen L, et al. The effects of nicotine on bone calcium and phosphorus content and alkaline phosphatase activity in different part of rat[J]. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2013, 31(3):225-227.

[6] Malin DH, Moon WD, Goyarzu P, et al. Inhibition of monoamine oxidase isoforms modulates nicotine withdrawal syndrome in the rat[J]. Life Sci, 2013, 93(12/14):448-453.

[7] Palotai M, Bagosi Z, Jászberényi M, et al. Ghrelin amplifies the nicotine-induced dopamine release in the rat striatum[J]. Neurochem Int, 2013, 63(4):239-243.

[8] Sivarao DV, Frenkel M, Chen P, et al. MK-801 disrupts and nicotine augments 40 Hz auditory steady state responses in the auditory cortex of the urethane-anesthetized rat[J]. Neuropharmacology, 2013, 73:1-9.

[9] 白冰,朱静涛,钟丽芳. 烟草影响人成骨细胞生物学性能机制的研究[J]. 口腔医学,2010,30(1):35-37.

[10] Younes-Rapozo V, Moura EG, Manhães AC, et al. Maternal nicotine exposure during lactation alters hypothalamic neuropeptides expression in the adult rat progeny[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 58:158-168.

[11] Zhang Z, Liu X, Lu S, et al. Increased pain in response to mechanical or thermal stimulation in a rat model of incision-induced pain with nicotine dependence and withdrawal[J]. Exp Ther Med, 2013, 5(4):1063-1066.

[12] Xiao D, Huang X, Yang S, et al. Estrogen normalizes perinatal nicotine-induced hypertensive responses in adult female rat offspring[J]. Hypertension, 2013, 61(6):1-4.

[13] Wen D, Peng C, Ou-Yang GX, et al. Effects of nicotine stimulation on spikes, theta frequency oscillations, and spike-theta oscillation relationship in rat medial septum diagonal band Broca slices[J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(4):464-472.

[14] Zheng LW, Ma L, Cheung LK. Changes in blood perfusion and bone healing induced by nicotine during distraction osteogenesis[J]. Bone, 2008, 43(2):355-361.

[15] Rothem DE, Rothem L, Soudry M, et al. Nicotine modulates bone metabolism-associated gene expression in osteoblast cells[J]. J Bone Miner Metab, 2009, 27(5):555-561.