

# 卵巢切除大鼠血清甲状旁腺素、降钙素 变化与骨质量降低

崔伟 刘成林 史之祯 付宏伟 郑强 邱连俊

**摘要** 本文以 OVX 大鼠为动物模型,观察了去势 15 天、30 天和 60 天大鼠血清甲状旁腺激素 (PTH) 和降钙素 (CT) 含量,第 6 胸椎 ( $T_6$ ), 第 3 腰椎 ( $L_3$ ) 和股骨矿盐含量及骨力学参数的变化。实验结果表明,去势 15 天、30 天和 60 天大鼠血清 CT 显著降低,去势 30 天和 60 天大鼠血清 PTH 显著降低。去势 15 天大鼠  $T_6$  横截面积显著降低,去势 60 天大鼠  $T_6$  类骨质含量显著增加。去势 15 天和 30 天大鼠  $L_3$  矿盐含量显著降低,30 天骨压缩强度显著降低,60 天最大应力、杨氏模量显著降低,横截面积显著增加。去势 15 天和 30 天大鼠股骨弯曲应力、张应力显著降低,弹性能密度在 30 天显著降低,去势 60 天股骨近 1/3 部位矿盐含量显著降低。实验结果提示,OVX 大鼠 CT 降低是引起骨质丢失、骨力学性能低下的一个重要因素。松质骨丢失早于皮质骨,但力学性能的降低晚于皮质骨,OVX 大鼠骨有机质减少是非胶原蛋白减少。

**关键词** 卵巢切除 骨质疏松 生物力学 降钙素 椎骨体 皮质骨

## Changes of parathyroid hormone and calcitonin contents in serum and deterioration of bone quality in ovariectomized rats

Cui Wei, Liu Chenglin, Shi Zhuzhen, Fu Hongwei, Zheng Qiang and Qiu Lianjun

Institute of Space-Medical Engineering, Beijing 100094, China

**Abstract** The aim of the study was to determine the effect of ovariectomy on serum contents of parathyroid hormone (PTH) and calcitonin (CT), and also bone mass and biomechanical competence. A total of 42 Sprague-Dawley rats, 2 months old, were randomized to six groups. Of them three groups were ovariectomized (OVX) and followed for 15, 30 and 60 days after operation. The other three groups were sham-operated and followed for the same periods. At death, the sixth thoracic vertebra ( $T_6$ ), the third lumbar vertebra ( $L_3$ ) and left femur were obtained from each rat. The results revealed that, compared with controls, serum CT contents in OVX rats were significantly decreased on days 15, 30 and 60, and serum PTH content was significantly decreased on days 30 and 60. The cross-sectional area of  $T_6$  was significantly decreased on day 15 and osteoid content was significantly increased on day 60. The ash content of  $L_3$  had a significant decrease on days 15 and 30, compressive strength of  $L_3$  had a significant decrease on day 30. The maximum stress, Young's modulus were significantly decreased and cross-sectional area of  $L_3$  was significantly increased on day 60. Bending stress and tension stress of femur significantly decreased on days 15 and 30, elastic energy density had a significant decrease on day 30. The ash content were significantly decreased only in proximal 1/3 of the femur shaft on day 60. The study has showed that CT decrease in OVX rats may be a factor in reduction of bone quality. Bone mineral loss of trabecular bone is earlier than that of cortical bone, but the decrease in biomechanical competence of trabecular bone is later than that of cortical bone. The decrease of bone matrix in OVX rats is the decrease in non-collagenous proteins.

**Key words** Ovariectomy Osteoporosis Biomechanics Calcitonin Vertebral body Cortical bone

绝经后骨质疏松(PMO)是严重危害人类健康的一种代谢性骨病,其特点为骨量减少,骨力学性能降低,主要发病原因为体内雌激素的降低,但确切发病机制目前尚不清楚。本文以OVX大鼠为动物模型,观察不同去势时间大鼠血清PTH,CT和不同部位骨质变化特点,探讨去势大鼠内分泌激素变化对骨矿盐、胶原蛋白和生物力学特性变化的影响。这对于研究POM发病机理有一定的指导意义。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物:**选用S.D.雌性大鼠,两月龄,体重 $200 \pm 23\text{g}$ (中国科学院动物研究所提供)42只,按体重配对分为6组,每组7只。三组动物为去势组,三组动物为对照组,去势动物乙醚麻醉,背部切口,切除双侧卵巢,对照组背部切口后,假去势。动物自由进食、进水、标准饲料。实验期分别为15天,30天和60天,实验期结束,断头处死动物。

**1.2 实验方法:**①血清PTH和CT测定:RIA法测定大鼠血清PTH-M和CT。放免药盒选用美国DPC产品,PTH放免药盒批内变异系数3.8%,批间变异系数6.3%,灵敏度 $4\text{ng/dl}$ 。CT放免药盒批内变异系数8%,批间变异系数10%,灵敏度 $16\text{pg/ml}$ 。②骨力学标本制备:分离出第6胸椎骨( $T_6$ ),第3腰椎骨( $L_3$ )和右侧股骨,去除附着软组织,股骨去除近侧端关节软骨。椎骨须进行如下标本制备:仔细去除棘突、横突和关节突起,不要损害椎体皮质外壳,因后者与其生物力学特性有密切关系,将椎骨标本制备成具有两个平行平面的圆柱体, $T_6$ 高约3mm, $L_3$ 高约4~5mm。这样制备的标本去除了软骨生长板和初级松质骨,仅由中心的小梁骨和外周的皮质外壳组成。用浮力法计算该圆柱体体积并测量其高度和计算其横截面积( $\text{mm}^2$ )<sup>[1]</sup>。③力学实验: $T_6$ 和 $L_3$ 进行压缩力学

实验。将标本置于材料实验机上进行压缩力学实验,加载速度 $2\text{mm/min}$ ,同时记录载荷-变形曲线。左侧股骨进行三点弯曲实验,加载速度 $5\text{mm/min}$ ,跨距17mm。同时记录变形曲线。力学指标:压缩实验:(1)最大载荷(N);直接从载荷-变形曲线上获得。(2)最大应力(MPa);椎骨体单位面积上承受的力。(3)杨氏模量(MPa);将载荷-变形曲线转化成应力-应变曲线后其斜率即为杨氏模量。(4)最大强度( $\text{N} \times \text{g} \times \text{g}^{-1}$ );最大载荷值与每g骨组织所含矿盐含量(g/g)比值。(5)最大应变;应力-应变曲线最大应变处每毫米标本长度的变形值。(6)弹性挠度强度( $\text{mm} \times \text{mm} \times \text{mg}^{-1}$ );弹性挠度与每毫米标本长度所含胶原蛋白含量( $\text{mg/mm}$ )的比值。(7)弹性应变强度( $\text{mm} \times \text{mg}^{-1}$ );弹性应变与每毫米标本长度所含胶原蛋白含量( $\text{mg/mm}$ )的比值。三点弯曲实验:1)弹性能密度:直接从载荷-变形曲线上计算弹性能密度( $\text{N} \times \text{mm} \times \text{ml}^{-1}$ )。2)计算骨截面惯性矩;根据骨截面惯性矩计算骨应力、弹性模量等力学指标<sup>[2]</sup>。3)生化分析:压缩力学实验后,标本烤干致恒重( $105\text{C}$  24小时),而后磨成细颗粒状,取约15mg,6N HCL消化8小时,测定胶原蛋白含量。剩余样品 $600\text{C}$  24小时灰化,测矿盐含量。胶原蛋白和矿盐含量以 $\text{mg/mm}$ 表示。

左侧股骨去净附着软组织,及两端干骺端(以便去除松质骨),在牙科锯上分为远1/3、中1/3和近1/3三部分,按上述方法测定其灰份,以 $\text{mg/g}$ 表示。

### 1.3 数据处理:

$t$ -检验用于组间差异的比较, $P < 0.05$ 为显著性水平。

## 2 结果

**2.1** 两组大鼠 $T_6$ 、 $L_3$ 、股骨干中段横截面积和血清PTH、CT变化见表1。

表1 两组大鼠 T<sub>6</sub>、L<sub>3</sub> 和股骨干中段骨横截面积和血清 PTH、CT 变化

时间 (天)	例数	T <sub>6</sub> (mm <sup>2</sup> )	L <sub>3</sub> (mm <sup>2</sup> )	股骨干 (mm <sup>2</sup> )	PTH (ng/dl)	CT (ng/ml)
去势组:	15	6 11.78±2.99**	24.33±2.35	8.14±0.95	35.33±3.01	213.33±21.60**
	30	6 14.96±4.69	26.09±4.68	9.21±0.38*	28.17±4.22**	206.67±17.51*
	60	7 17.09±2.26	31.40±4.32*	10.72±1.92	28.10±6.54**	205.00±25.88**
对照组:	15	7 15.47±1.15	26.03±2.56	8.36±0.80	38.86±10.38	251.43±18.64
	30	7 18.39±2.60	27.11±3.55	8.37±0.73	52.17±17.31	288.57±73.13
	60	7 16.80±2.00	26.89±3.31	9.37±0.95	84.00±51.22	201.43±88.17

±s; 与同时间对照组比较 \*P<0.05, \*\*P<0.01

从表1可知,与对照组比较,去势15天大鼠 T<sub>6</sub> 骨横截面积显著降低,去势30天大鼠股骨干横截面积显著增加,去势60天大鼠 L<sub>3</sub> 截面积显著增加。去势30天和60天大鼠血清

PTH 显著降低。去势15天、30天和60天大鼠血清 CT 均显著降低。

2.2 两组大鼠股骨干力学性能和矿盐变化见表2。

表2 两组大鼠股骨干生物力学性能和股骨干近1/3矿盐变化

时间 (天)	例数	最大应力 (MPa)	弹性应力 (MPa)	张应力 (MPa)	弹性性能密度 (N·mm·ml <sup>-1</sup> )	弹性模量 (MPa)	矿盐含量 (mg/g)
去势组:	15	6 185.10±40.94	128.65±14.02**	257.30±28.06**	0.074±0.034	3169.55±1178.55	0.58±0.02
	30	6 174.23±20.49**	130.37±27.94**	260.75±55.83*	0.078±0.047*	3649.25±1007.40	0.59±0.03
	60	7 175.78±50.70	109.45±28.60	218.96±51.19	0.057±0.025	3391.25±1385.41	0.55±0.04*
对照组:	15	7 227.20±67.38	151.23±14.52	302.43±29.04	0.080±0.020	4190.50±918.70	0.59±0.02
	30	7 234.21±39.92	172.08±18.04	344.16±36.11	0.125±0.070	3479.03±993.10	0.57±0.05
	60	7 191.23±58.91	148.94±48.72	297.83±97.44	0.098±0.045	3529.98±1460.45	0.60±0.03

注:与同时间对照组比较 \*P<0.05, \*\*P<0.01

实验结果表明,与对照组比较,去势60天大鼠股骨干近1/3矿盐含量显著降低。去势30天大鼠股骨最大应力显著降低,去势15天和30天大鼠股骨弹性应力和张应力显著下降。股

骨弹性性能密度在去势30天显著降低,弹性模量无明显变化。

2.3 两组大鼠 L<sub>3</sub> 矿盐、胶原蛋白含量及力学性能变化见表3。

表3 两组大鼠第三腰椎(L<sub>3</sub>)矿盐和胶原含量及力学性能变化

时间 (天)	例数	矿盐含量 (mg/mm)	胶原含量 (mg/mm)	最大应力 (MPa)	最大强度 (N·g·g <sup>-1</sup> )	杨氏模量 (MPa)
去势组:	15	6 8.10±0.07**	2.67±0.63	8.73±0.29	411.69±41.21	83.27±37.52
	30	6 8.61±1.18**	2.39±0.68	8.36±1.48	416.13±39.11**	104.75±12.23**
	60	7 10.35±2.29	3.31±0.81	7.69±0.71*	511.52±118.44	67.48±18.19**
对照组:	15	7 10.11±0.76	2.51±0.32	9.03±1.48	437.38±69.38	92.48±15.83
	30	7 10.63±1.27	2.81±0.50	9.19±1.22	459.61±14.00	86.12±15.77
	60	7 11.27±1.67	2.62±0.38	9.05±1.25	458.90±21.20	106.99±20.80

注:与同时间对照组比较 \*P<0.05, \*\*P<0.01

实验结果表明,去势15天和30天大鼠 L<sub>3</sub> 矿盐含量显著降低,去势大鼠胶原蛋白含量无明显变化。去势30天 L<sub>3</sub> 杨氏模量显著增加,60天杨氏模量显著降低。去势30天 L<sub>3</sub> 骨强度显

著降低,去势60天 L<sub>3</sub> 最大应力显著降低。

2.4 两组大鼠 T<sub>6</sub> 骨矿盐、胶原蛋白含量及力学性能变化见表4。

表4 两组大鼠 T<sub>6</sub> 骨矿盐、胶原含量及生物力学性能变化

时间 (天)	例数	矿盐含量 (mg/mm)	胶原含量 (mg/mm)	最大强度 (N·g·g <sup>-1</sup> )	弹性挠度强度 (mm·mm·mg <sup>-1</sup> )	弹性应变强度 (mm·mg <sup>-1</sup> )	
去势组:	15	6	3.58±1.00	1.89±0.44	264.64±35.62	0.21±0.10	0.07±0.02
	30	6	4.58±1.65	1.82±0.42	304.92±57.09	0.23±0.07	0.06±0.02
	60	7	5.67±0.87	2.69±0.70**	316.05±67.48	0.14±0.03**	0.03±0.01**
对照组:	15	7	5.06±1.40	1.48±0.46	340.22±84.00	0.33±0.15	0.13±0.17
	30	7	5.67±0.86	1.54±0.38	350.18±40.09	0.32±0.12	0.08±0.03
	60	7	5.80±0.59	1.26±0.33	320.73±61.29	0.43±0.21	0.10±0.04

注:与同时间对照组比较 \*P<0.05, \*\*P<0.01

由表4可知,去势大鼠 T<sub>6</sub> 矿盐含量无明显变化,去势60天 T<sub>6</sub> 胶原蛋白含量显著增加,弹性挠度强度和弹性应变强度显著降低, T<sub>6</sub> 骨强度无明显变化。

### 3 讨论

CT 能够抑制破骨细胞活性,PTH 能够促进膜内成骨和皮质内成骨<sup>[3,4]</sup>。去势15天、30天和60天大鼠血清CT含量显著降低,去势30天和60天大鼠血清PTH含量显著降低,提示该动物模型骨吸收大于骨形成。同时也表明CT对雌性激素降低反应较PTH敏感。骨横截面积是反应骨膜骨形成的一项指标<sup>[1]</sup>。去势15天大鼠 T<sub>6</sub> 横截面积显著降低,表明此时 T<sub>6</sub> 骨膜成骨细胞活性降低。T<sub>6</sub> 骨膜成骨细胞活性降低是一种自我保护作用,以抑制CT降低所引起的破骨细胞性骨吸收,因为破骨细胞性骨吸收依赖于成骨细胞活性<sup>[5]</sup>。由于这种自我保护作用,尽管CT显著降低,但矿盐含量无明显变化。T<sub>6</sub> 骨膜成骨细胞活性降低的原因尚不清楚。去势60天 T<sub>6</sub> 胶原蛋白含量显著增加,矿盐含量无变化,表明 T<sub>6</sub> 类骨质增加,揭示骨矿化受阻。骨力学参数是反映骨质量的可靠指标。尽管 T<sub>6</sub> 胶原蛋白含量显著增加,但弹性挠度强度和弹性应变强度均显著降低,表明 T<sub>6</sub> 胶原蛋白质量异常,同时也是矿化障碍,类骨质增加的原因之一。T<sub>6</sub> 胶原增加的原因与血PTH降低,成骨细胞活性低下,抑制破骨细胞活性,使陈旧性胶原不能及时清除有关。

L<sub>3</sub> 是松质骨,去势15天和30天 L<sub>3</sub> 矿盐含量显著降低,表明 L<sub>3</sub> 对体内内分泌激素变化

敏感。去势15天 L<sub>3</sub> 矿盐含量减少与CT降低、破骨细胞性骨吸收增加有关。30天矿盐含量降低的幅度小于15天及60天无明显变化,与PTH降低、间接抑制破骨细胞活性有关。提示PTH降低对OVX大鼠是一种自我保护作用。同样去势60天大鼠 L<sub>1</sub> 横截面积显著增加,也是PTH降低导致骨吸收降低,骨形成相对增加所致。L<sub>1</sub> 力学参数在15天无改变,表明OVX早期不足以影响其骨力学性能。骨强度是与骨折有关的重要参数,30天降低是PTH和CT共同降低的结果,60天恢复到对照水平与横截面积增加,提高对载荷耐力有关。去势60天 L<sub>1</sub> 最大应力显著降低,一方面表明此时骨塑性降低,同时也提示横截面积增加对 L<sub>1</sub> 骨塑性无改善作用。松质骨杨氏模量直接受骨再建的影响。去势30天大鼠杨氏模量显著增加,60天显著降低与30天 L<sub>1</sub> 胶原含量较60天低,矿盐含量相对增加,使骨硬度增加有关。同时也提示骨再建增加可降低杨氏模量。OVX大鼠松质骨力学降低机制是雌激素降低以及引起的上述内分泌激素改变使水平骨小梁数量减少,变薄,骨各向异性增加,使其对载荷耐力降低所致<sup>[6]</sup>。OVX大鼠 T<sub>6</sub> 和 L<sub>3</sub> 骨矿盐和骨力学特性的变化不一致性可能与它们在体内的活动度有关。T<sub>6</sub> 活动度较 L<sub>3</sub> 大,故 T<sub>6</sub> 受活动影响,能够保护 T<sub>6</sub> 在OVX后不发生骨矿盐丢失及力学性能变化程度没有 L<sub>3</sub> 严重。

股骨干为皮质骨,去势30天大鼠骨干横截面积显著增加,表明骨膜成骨作用增强,提示此时处于高转换型骨代谢,这种去势诱导的皮质骨形成增加与文献报道一致<sup>[7]</sup>。目前认为这种

作用与体内雌激素降低,使成骨细胞对 PTH 敏感性增加,受体后作用增强有关。因此尽管去势 30 天 PTH 降低,但皮质骨成骨细胞对 PTH 敏感性增加,导致皮质骨横截面积增加。这种骨横截面积的增加本身对骨组织是一种保护作用,横截面积的增加使骨质远离中心轴,以提高其对弯曲载荷的抵抗力<sup>[5]</sup>。股骨干近 1/3 矿盐含量仅在去势 60 天显著降低(中 1/3 和远 1/3 无变化,数据未给出)与皮质骨代谢率低有关。同时也表明股骨近 1/3 是股骨中代谢相对较活跃的部位。去势 15 天和 30 天大鼠股骨弹性应力和张应力显著降低,提示这是两项敏感指标。因为骨弹性特性主要由骨矿化相决定<sup>[9]</sup>,故上述两项指标降低,提示骨矿化异常,这种异常主要是矿盐在胶原中分布异常<sup>[10]</sup>。最大应力主要反映骨塑性特性,骨塑性主要由有机相决定。去势 30 天骨最大应力降低提示骨有机相异常。弹性能密度指骨在弹性弯曲中单位体积所吸收的最大能量。弹性能密度降低也是骨矿化相异常的结果。去势大鼠股骨杨氏模量无明显改变与骨干中段矿盐含量无变化有关。股骨干力学结果提示大鼠股骨力学降低主要是雌激素减少及其导致的 CT 降低,骨质量异常所致。PTH 降低对股骨力学变化无明显影响,因为 30 天力学参数数值与 15 天无明显差别。上述结果还提示,尽管 30 天骨干截面积增加,以增强抗载荷作用,但未能增强骨力学性能。随着去势 60 天大鼠股骨横截面积的进一步增加(从  $9.21 \pm 0.38$  增加到  $10.72 \pm 1.92$ ),骨力学参数与对照组无明显差别,这进一步说明骨横截面积抵抗载荷的作用大于骨量本身作用。大量实验数据已表明 OVX 大鼠动物模型对骨质疏松研究是可行的,因为大鼠骨组织对力学反应(组织和器官水平)及对激素反应与人类相似<sup>[11]</sup>,但因为大鼠骨载荷方式和骨重建方式特点(松质骨重建与人类相似,但无皮质内骨重建)故从性成熟但仍处于生长期大鼠的 OVX 模型外推到人类

时要考虑到这一差别。

综上所述,①雌激素降低所致的 CT 减少是 OVX 大鼠骨质量降低的原因之一,PTH 减少是一种保护作用。②OVX 大鼠松质骨矿盐丢失早于皮质骨,但力学性能降低则晚于皮质骨。③OVX 大鼠骨有机质含量减少主要是非胶原蛋白含量减少。

### 参 考 文 献

- 1 Masekide LI, Dandsen C, Knudse UB, et al. The effect of aging and ovariectomy on the vertebral bone mass and biomechanical properties of mature rats. *Bone*, 1993, 14: 1.
- 2 Turner CH and Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone; a tutorial. *Bone*, 1993, 14: 595-608.
- 3 Marie F. Calcitonin receptor binding as a marker of osteoclast heterogeneity in osteoporotic rodents. *J Bone Miner Res*, 1986, 1: 543.
- 4 Wronski TJ and Yen CF. Anabolic effect of parathyroid hormone on cortical bone in ovariectomized rats. *Bone*, 1994, 15: 51.
- 5 Gideon A. Perspectives: mechanical loading, estrogen deficiency, and the coupling of bone formation to bone resorption. *J Bone Miner Res*, 1991, 6: 527.
- 6 Mosekide LI. Correlation between the compressive strength of iliac and vertebral trabecular bone in normal individuals. *Bone*, 1985, 6: 291.
- 7 Mosekide LI, Saard CH, Moosker JE, et al. PTH has more pronounced effect on vertebral bone mass and biomechanical competence than antiresorptive agents (estrogen and bisphosphonate) assessed in sexually mature, ovariectomized rats. *Bone*, 1994, 15: 401.
- 8 Theocas A Einhorn. Bone strength: the bottom line. *Calcif Tissue Int*, 1992, 51: 333-339.
- 9 Burstein An, Zuka JC, Heiple KG, et al. Contribution of collagen and mineral to the elastic-plastic properties of bone. *Bone Jt Surg*, 1977, 57A: 936-941.
- 10 Landis WJ. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone*, 1995, 16: 533.
- 11 Chambers TJ. Induction of bone formation in rat tail vertebrae by mechanical loading. *Bone Miner*, 1993, 20: 167.