

活性维生素 D₃与尼尔雌醇对去卵巢大鼠骨代谢的影响

刘宏伟 徐克慧 杨式之 谭建三 李洪洋

摘要 4月龄雌性SD大鼠随机分为:卵巢切除组、假手术组、切除卵巢后给予活性维生素D₃组或给予尼尔雌醇组。活性维生素D₃剂量为0.0208 μ g/100gBW,隔天一次;尼尔雌醇为0.15mg/100gBW,每周一次,10周后处死动物并取右胫骨制备不脱钙骨切片进行骨计量学测定,并测定肱骨重量、无机质重量及骨钙、磷含量等。结果:卵巢切除组从骨小梁体积、骨小梁宽度、骨重量和无机质重量与体重之比及骨钙含量等方面显示绝经后骨质疏松模型建立,骨重建指标显示该模型为高转换型骨质疏松。活性维生素D₃组各指标与假手术组相似,但成骨细胞指数高于假手术组与去势组相似,表明活性维生素D₃通过抑制雌激素缺乏状态下过高的骨吸收而达到防止骨丢失的作用。而尼尔雌醇组各指标均与假手术组相似,提示尼尔雌醇通过抑制雌激素缺乏状态下过高的骨转换,恢复骨重建过程的平衡而防止切除卵巢大鼠的骨丢失。

关键词 活性维生素D₃ 尼尔雌醇 卵巢切除大鼠 骨形态计量学

1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ and nilestriol prevent osteoporosis in ovariectomized rats

Liu Hongwei, Xu Kehui, Yang Shizi, Tan Jian-san and Li Hongxiang

Department of Obstetrics and Gynecology

The Second Affiliated Hospital, West China University of

Medical Sciences, Chengdu 610041

Abstract Four month-old female SD rats were divided randomly into four groups: (a) ovariectomized (OVX), (b) sham operated; (c) ovariectomized and treated with 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ 0.0208 μ g/100g body weight once every two days; (d) ovariectomized and treated with nilestriol (CEE₁) 0.15mg/100g body weight once a week. All the rats were sacrificed 10 weeks after operation and their right proximal tibiae were processed and decalcified for quantitative bone histomorphometry. The bone weight (ash content) and contents of calcium and phosphorus in right humerus were measured. The results showed that the trabecular bone volume, trabecular thickness, calcium content, ratios of bone weight and ash content to body weight were significantly reduced in the OVX group compared with the sham operated group; the osteoblast index, osteoclast index, osteoid volume increased in the OVX group, which indicates that a rat model of high turnover type was established. All the changes of indicators in the vit D₃ treated group and the CEE₁ treated group were similar to those in the sham-operated group, but their mechanisms acting upon bone metabolism are different. The bone loss in the vit D₃-treated group was prevented by a decline in bone resorption, while that in the CEE₁-treated group was prevented by a decrease in both bone resorption and bone formation.

Key words 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ Nilestriol Ovariectomized rats Bone histomorphometry

雌激素替代疗法是目前防治绝经后骨质疏松的主要方法,但并不适应于所有的绝经后妇女。维生素D代谢障碍亦是骨质疏松的原因之一。本文对比研究了 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 与尼尔雌醇在防治绝经后骨质疏松中的作用及机理。

1 材料和方法

1.1 实验药物

1.1.1 活性维生素D₃,即罗钙全(Rocaltrol),为 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$,瑞士罗氏药品化学有限公司出品。

1.1.2 尼尔雌醇(Nilestriol,CEE₁),化学名:17 α -乙炔雌三醇,3-环戊醚。上海第十二制药厂出品。

1.2 实验动物分组及处理:4月龄雌性SD大鼠52只,来自华西医科大学实验动物中心,平均体重250克。随机分为4组:a.卵巢切除组(OVX组),开腹后切除双侧卵巢,13只;b.假手术组(SHAM组),开腹后关腹,12只;c.活性维生素D₃组(D₃组),切除双侧卵巢后第一天起给罗钙全0.0208 $\mu\text{g}/100\text{gBW}$ 灌胃,隔日一次,同时加钙每天5.5mg(元素钙),12只;d.尼尔雌醇组(CEE₁组),切除双侧卵巢后第一天起给尼尔雌醇0.15mg/100gBW灌胃,每周一次,15只。动物饲养于一级达标动物房内,饲料含钙1.1%,磷0.61%,饮自来水。术后10周股动脉放血处死动物。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 骨形态计量测定^[1~4]:每组取6只动物右胫骨避光固定于75%乙醇,取近侧1厘米逐级脱水,透明,甲基丙烯酸甲酯包埋,德国Jungk重型切片机做纵向切片,厚5 μm ,甲苯胺蓝染色及改良马氏染色。左胫骨常规20%福尔马林固定、脱钙,石蜡包埋,HE染色。利用方格测试系统进行骨结构、骨重建静态参数测定。脱钙切片用于测定细胞参数,余参数用不脱钙切片进行测定。

1.3.2 肱骨重量及无机质含量测定:在肱骨完全去除软组织后称重,烘干后称干重(万分之一天平),电炉内烧成灰,其灰重即为骨无机质重量。用离子选择电极法及钼蓝比色法测出骨灰中钙、磷含量。

1.3.3 血清骨生化指标测定:分别用甲基麝香草酚蓝法、紫外测定法及对硝基苯磷酸二钠速率法测定血清中钙、磷及碱性磷酸酶含量。

1.4 统计分析:采用美国SPSS软件包进行多组比较的方差分析。

2 结果

2.1 骨形态计量学:骨形态计量学各指标结果见表1。OVX组骨小梁体积较假手术组下降40%,骨小梁变薄,类骨质体积,成骨细胞指数、破骨细胞指数较假手术组增加1倍,差异均有显著性。D₃组除成骨细胞指数与OVX组相似,高于其它两组,其余指标与假手术组相似。CEE₁组各指标均与SHAM组接近,差异无显著性。

表1 胫骨近端骨形态计量结果

参数	OVX	SHAM	D ₃	CEE ₁
TBV(%)	19.45 $\pm$ 4.98*	32.13 $\pm$ 3.53	30.12 $\pm$ 15.10	36.12 $\pm$ 8.40
OSV(%)	1.91 $\pm$ 1.93*	0.58 $\pm$ 0.57	0.83 $\pm$ 0.79	0.39 $\pm$ 0.42
TH-TR(μm)	50.09 $\pm$ 8.55*	77.13 $\pm$ 31.20	58.11 $\pm$ 15.89*	76.58 $\pm$ 19.76
OC(OC/mm ²)	19.68 $\pm$ 8.37*	9.51 $\pm$ 5.40	5.86 $\pm$ 6.70	6.68 $\pm$ 5.38
OBI(OC/mm ²)	222.87 $\pm$ 84.91*	139.01 $\pm$ 56.68	198.79 $\pm$ 30.25*	115.31 $\pm$ 46.25

注:TBV 骨小梁体积;OSV 类骨质体积;TH-TR 骨小梁宽度;OBI 成骨细胞指数;OC 破骨细胞指数;*与SHAM组比较 $P<0.05$

2.2 肱骨重量及骨钙、骨磷含量:OVX组肱骨重量,无机质重量与体重之比及骨钙含量均低于SHAM组,骨磷有降低趋势,但无统计学意义。D₃组除湿重外,与SHAM组相似。CEE₁组与SHAM组间差异无显著性(表2)。

2.3 血清骨生化指标 血清钙各组无差异。血磷OVX组高于其它三组,OVX组AKP有升高趋势,见表3。

表2 肱骨重量与体重之比及骨钙、磷含量

项目	OVX	SHAM	D ₃	CEE
湿重	(144.30±14.32) × 10 ⁻³	(172.29±17.12) × 10 ⁻³	(155.73±11.63) × 10 ⁻³	(171.67±18.52) × 10 ⁻³
干重	(91.45±6.61) × 10 ⁻³	(102.27±6.67) × 10 ⁻³	(97.33±3.62) × 10 ⁻³	(101.11±4.02) × 10 ⁻³
灰重	(57.37±4.82) × 10 ⁻³	(64.44±4.46) × 10 ⁻³	(63.77±0.31) × 10 ⁻³	(61.69±1.27) × 10 ⁻³
Ca(mg/g)	138.30±30.59*	156.57±21.22	193.38±16.41	188.00±40.10
P(mg/g)	67.90±13.20	76.71±9.39	83.38±11.49	82.67±22.29

注：*与SHAM组比较，P<0.05

表3 血清钙、磷、碱性磷酸酶

组别	Ca (mmol/L)	P (mmol/L)	AKP (IU/L)
OVX	2.55±0.28	1.46±0.07*	161.27±137.04
SHAM	2.51±0.16	2.20±0.12	133.80±89.82
D ₃	2.65±0.09	2.83±0.11	131.73±64.35
CEE	2.56±0.11	2.08±0.70	103.04±28.20

注：*与SHAM组比较，P<0.05

3 讨论

本研究切除成熟雌性大鼠双侧卵巢后10周,骨小梁体积降低,骨小梁宽度变薄,肱骨重量与体重之比及骨钙含量等骨量指标均较对照组低,而成骨细胞指数、破骨细胞指数、类骨质体积等骨重建指标升高,血碱性磷酸酶有升高趋势,表明去势大鼠典型的绝经后骨质疏松模型已形成。此模型为高转换型,且骨吸收大于骨形成,致骨重建过程失衡而导致骨丢失。此与人类绝经后骨质疏松及多数动物实验结果一致^[4~6]。

雌激素替代治疗是目前被广泛接受的防治绝经后骨质疏松方法。其对抗骨丢失的作用一般认为是抑制雌激素缺乏状态下过高的骨转换,恢复骨重建过程的平衡^[4,7]。本研究证实尼尔雌醇同样具有此作用。因其选择性作用于下生殖道,对子宫、乳腺作用弱,是一种相对安全的雌激素,目前在国内应用较多。

维生素D防治绝经后骨质疏松既往研究不多。近年活性维生素D引起人们的重视,其主要适应症为慢性肾功能不全所致骨代谢紊乱。随年龄增长,由于肝、肾,特别是肾功能降低,1α,

羟化酶活性降低,造成内源性1α,25(OH)₂D₃产生不足,肠道对钙吸收降低^[8],且绝经后雌激素减少致继发生1α,25(OH)₂D₃合成减少。本研究观察到D₃组骨小梁体积,骨重量与体重之比、骨钙含量与对照组相似,表明活性维生素D联合钙剂具有防治绝经后骨质疏松的作用。

活性维生素D₃与甲状旁腺素、降钙素是调节钙、磷代谢的重要激素。维生素D对骨代谢具有双相作用,生理剂量时促进肠钙吸收及肾小管钙、磷的重吸收,维持血钙浓度稳定。另一方面在高剂量时可协同甲状旁腺素促进溶骨。故各家报道维生素D对骨代谢的作用不一。本研究剂量的活性维生素D₃对雌激素缺乏状态下过高的骨吸收具有明显抑制作用,从而防止骨丢失,而对骨形成抑制不明显,此与尼尔雌醇有所不同。提示活性维生素D可能是防治绝经后骨质疏松的又一有效药物,特别适用于因各种原因不宜应用雌激素者。

参考文献

1 李松龄,韩芝艳,邱明才.用甲基内酯酸甲酯单体制备不脱钙骨切片.中华病理学杂志,1986,15(1):71

2 邱明才,李松龄,孙贵连.不脱钙甲苯胺蓝骨切片的制备.中华病理学杂志,1987,16(1):10.

3 Antonio R. Villanueva. A new Goldner's one step trichrome stain for identification of osteoid streams, bone and cells undecalcified, plastic embedded sections on bone. J Histochemol. 1988,11(1):243

4 Wrobleski T J, Cimron M, Doherty A L, et al. Estrogen treatment prevents osteoporosis and depresses bone turnover in ovariectomized rats. Endocrinology, 1985, 117(2):681.

(下转第6页)

皮毛浸湿,再压以小水袋(用乳胶指套灌满蒸馏水即可)。图3是测量活麻大鼠股骨中点情况。3只大鼠的仪器测量值(BMC)和将其灰化的骨灰称重计算值(BMC)在不确定度为 $\pm 4\%$ 以内一致。测量30根离体左股骨(由华西医科大学卫生系提供),在每一根股骨中段切下1.0cm左右长的骨段,按编号(放在有机玻璃水盒中淹满蒸馏水)先测量其仪器值(BMC),然后按编号放于30个陶瓷干锅内,电炉800℃煅烧两小时,冷却后取出,称重计算得到灰烬值(BMC),二者比较,平均值在 $\pm 3.5\%$ 的误差内与灰烬值一致。

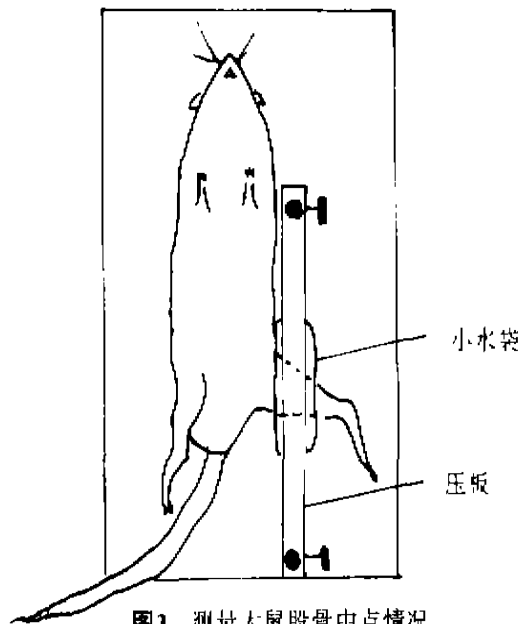


图3 测量大鼠股骨中点情况

4 讨论

4.1 ^{125}I 液体源是否因为液体状态而对测量有影响?实验证明,对测量结果无影响。实际上,液体量是很少的,只有0.1~0.2ml,仪器扫描运动很平稳,液体不会荡漾。让仪器作空行程扫描运动,其计数率始终在放射性统计涨落内不发生变化。实际测量人骨标准时,与灰值比较,

在误差 $\pm 2\%$ 内一致。测大鼠干股骨时,与烧灰值比较,误差在 $\pm 3.5\%$ 内一致。

4.2 ^{125}I 液体源的包装有无泄漏和污染?中国原子能科学研究院生产的 ^{125}I 液体源是用国际标准安瓿瓶包装的,作者曾在不同时间内购过三个这种源,用湿润试纸擦拭安瓿瓶外表面,用上海电子仪器厂生产的FD-3014数字两用 γ 辐射仪(显示微仑/小时)测试,仪器无明显显示,说明安瓿瓶表面无污染和外泄。将新购源放于手套箱内,三天后取走,用FD-3014测试,无显示蒸发污染。

4.3 改进的价值:单光子吸收法有结构简单,操作方便,测量精确,价格低和临床应用意义显著的特点,所以,对诊断骨质疏松有特定价值,这些在刘忠厚教授^[1]主编的《骨质疏松症》一书中有全面论述。这里只强调改进后的价值。改进后的SPA-4型骨矿分析仪既弥补了只使用 ^{241}Am 单光子不能测低骨矿密度的不足,又克服了使用双能X线(DEXA)方法测大鼠费用昂贵的困难,满足了医学研究的需要。上海医科大学翁世芳等^[4]将改进后的SPA-4型骨矿分析仪用于大鼠骨质疏松模型活体测量,得到了可同DEXA方法相比较的理想结果。

参考文献

- 1 鄢中付. SPA-4型骨矿分析仪. 计测, 1991, 3: 1~8.
- 2 Smith M A. Comparison between ^{117}Gd and ^{241}Am - ^{137}Cs for dual Photon absorptiometry of the Spine. Phys Med Biol, 1983, 28(6): 703.
- 3 刘忠厚主编. 骨质疏松症, 第一版, 北京: 北京化学工业出版社, 1992.
- 4 翁世芳, 黄克, 王洪复. 大鼠骨密度测定骨质疏松模型研制中的应用, 第二届全国骨质疏松研讨会(西安)论文集, 1994, 270.