

# 卵巢切除大鼠血清三种骨钙素 变化与骨丢失

崔伟 刘成林 史之颖 郑强 谢力勤

**摘要** 本实验以卵巢切除(OVX)大鼠为动物模型,利用骨钙素(Osteocalcin,OC)能够与羟磷灰石结合的特性,研究了OVX大鼠血清中总OC,与羟磷灰石具有高亲和力OC(结合型OC)和低亲和力OC(游离型OC)水平随时间变化的特点及与骨丢失的关系。实验结果显示,OVX 15天大鼠血中总OC,结合型OC,和游离型OC均显著增加,第3腰椎(L<sub>3</sub>)矿盐密度显著降低。OVX 30天大鼠血清总OC水平无明显改变,但游离型OC水平显著增加,结合型OC水平显著降低,L<sub>3</sub>矿盐密度显著降低。OVX 60天大鼠血清总OC和游离型OC显著增加,L<sub>3</sub>矿盐密度显著降低,但结合型OC无明显改变。实验结果提示,OVX大鼠骨盐丢失与骨内OC羧化作用降低或羧化作用与OC合成增加间脱耦联有关。血总OC可用于评价骨转换型的指标,血结合型OC可用于骨形成的指标,而游离型OC可用于判断骨丢失的指标。<sup>1</sup>

**关键词** 骨钙素  $\gamma$ -羧化谷氨酸 卵巢切除 骨丢失

## Changes of serum osteocalcin and bone loss in ovariectomized rats

Cui Wei, Liu Chenglin, Shi Zhizhen and Zheng Qiang

Institute of Space Medical-Engineering, Beijing 100094, China

**Abstract** Ovariectomy has a proven pronounced effect on bone mass. Osteocalcin (OC) can be bound to hydroxyapatite. The aim of the study was to investigate the relationship between changes of three sorts of OC in serum and bone loss in rats ovariectomized for different periods. We measured serum total OC (OC<sub>total</sub>), OC with high affinity for hydroxyapatite (OC<sub>bound</sub>), OC with low affinity for hydroxyapatite (OC<sub>free</sub>), and bone mineral density in the third lumbar vertebra (L<sub>3</sub>). The results revealed that serum OC<sub>total</sub>, OC<sub>free</sub> and OC<sub>bound</sub> significantly increased and bone mineral density in L<sub>3</sub> significantly decreased in rats ovariectomized for 15 days. Serum OC<sub>total</sub> had no change, but OC<sub>free</sub> significantly increased, OC<sub>bound</sub> and bone mineral density in L<sub>3</sub> significantly decreased in rats ovariectomized for 30 days. Serum OC<sub>total</sub> and OC<sub>free</sub> significantly increased, serum OC<sub>bound</sub> had no change, and bone mineral density in L<sub>3</sub> significantly reduced in rats ovariectomized for 60 days. The results suggest that the decrease in carboxylation effect on OC or uncoupling between increased secretion of OC by osteoblasts and carboxylation effect on OC in bones may be one of the important reasons for bone loss in ovariectomized rats. The possibility is put forward that serum OC<sub>total</sub> levels may be a marker of bone turnover, OC<sub>bound</sub> may be a marker of bone formation, and OC<sub>free</sub> may be a marker of bone loss.

**Key words** Osteocalcin  $\gamma$ -Carboxyglutamic acid Ovariectomy Bone loss

骨钙素(Osteocalcin, OC)是由成骨细胞合成、分泌的一种维生素K依赖性钙结合蛋白<sup>[1]</sup>,是反映机体骨更新状态和骨形成的特异指标<sup>[2]</sup>。一般认为高转换型骨丢失状态下,血OC水平升高,但有些情况下,如Paget氏病患

者,虽然为高转换型骨丢失,但其血OC水平并无明显变化<sup>[1]</sup>。我们在实验中也发现,OVX大鼠血OC水平有时并无明显改变,但其骨矿盐密度显著降低。因而,单纯用血OC水平的变化,并不能解释一些骨丢失的变化。为了进一步

了解血 OC 变化与矿盐变化关系,本研究观察了 OVX 大鼠血清总 OC 含量( $OC_{total}$ )与羟磷灰石高亲和力 OC 含量,即结合型 OC ( $OC_{bound}$ )和与羟磷灰石低亲和力 OC 含量即游离型 OC ( $OC_{free}$ )。同时测定了第 3 腰椎( $L_3$ )矿盐密度。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物:**选用 SD 雌性大鼠 42 只,两月龄,体重  $200 \pm 23g$  (中国科学院动物研究所提供),按体重配对分为 6 组,每组 7 只。去势和对照各三组。去势动物乙醚麻醉,背部切口,切除双侧卵巢。对照组行假去势手术。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。

**1.2 实验方法:**①血清三种类型 OC 的测定:断头处死动物,收集动物血液,室温放置 2

小时后,3000 转/分离心 5 分钟,用吸管收集血清。将每只动物血清分为两份,一份用于测定  $OC_{total}$ ,另一份血清加羟磷灰石( $100mg/ml$ )结合 OC 24 小时后<sup>[1]</sup>,测定上清液中 OC 含量,为  $OC_{free}$  含量。血中  $OC_{total}$  与  $OC_{free}$  差值即为  $OC_{bound}$  含量。OC 的测定采用放射免疫法(北京北方放射免疫试剂研究所提供药盒)。② $L_3$  矿盐密度测定:取出  $L_3$ ,去净附着软组织,浮力法测定体积。经力学试验后,将其烤干至恒重( $105^{\circ}C$  24 小时), $600^{\circ}C$  48 小时灰化,测其灰分,计算密度。③ $t$  检验用于组间数据比较。

## 2 结果

OVX 大鼠血清三种 OC 含量和  $L_3$  矿盐密度的变化见附表。

附表 OVX 大鼠血清三种 OC 含量和  $L_3$  矿盐密度的变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	总 OC (ng/ml)	游离型 OC (ng/ml)	结合型 OC (ng/ml)	矿盐密度 ( $ng/cm^2$ )
15 天:对照组	7	$13.64 \pm 0.99$	$11.36 \pm 0.80$	$1.29 \pm 0.19$	$390 \pm 20$
去势组	7	$15.93 \pm 1.54^*$	$13.79 \pm 1.50^*$	$2.14 \pm 1.07^*$	$330 \pm 30^*$
30 天:对照组	7	$17.36 \pm 2.36$	$10.14 \pm 1.36$	$7.25 \pm 2.24$	$390 \pm 20$
去势组	7	$19.29 \pm 1.60$	$14.14 \pm 1.35^*$	$5.14 \pm 1.21^*$	$440 \pm 50^*$
60 天:对照组	7	$15.93 \pm 1.79$	$8.41 \pm 0.79$	$7.59 \pm 1.26$	$400 \pm 40$
去势组	7	$23.71 \pm 2.93^*$	$15.79 \pm 3.05^*$	$7.93 \pm 2.24$	$350 \pm 60^*$

\* 与同时间对照组比较:  $P < 0.05$

实验结果表明,OVX 15 天大鼠  $L_3$  矿盐密度显著降低,血清中 3 种 OC 含量显著增加。OVX 30 天大鼠  $L_3$  矿盐密度显著降低,血清总 OC 水平无明显变化,但游离型 OC 显著增加,结合型 OC 显著降低。OVX 60 天大鼠  $L_3$  矿盐密度显著降低,血清总 OC 和游离 OC 含量显著增加,结合型 OC 无变化。

## 3 讨论

OVX 15 天和 30 天大鼠  $L_3$  矿盐密度显著降低,表明在 OVX 早期即可发生骨密度降低。目前尚未见 OVX 早期腰椎骨密度降低的报道。OVX 60 天  $L_3$  矿盐密度未进一步降低,可能

与机体的适应性有关。OVX 15 天和 60 天血清总 OC 升高,30 天无变化,表明 OVX 15 天和 60 天  $L_3$  骨密度的降低与 30 天不同,为高转换型骨丢失。目前对 OC 的结构已经清楚,人、大鼠和牛的 OC 是由 49 个氨基酸组成的一条多肽链,所有种属 OC 的共同特点是在其分子第 17、21 和 24 位上有 3 个维生素 K 依赖的  $\gamma$ -羧化谷氨酸残基(Gla)。该羧化反应发生在翻译后<sup>[5]</sup>。OC 依其侧链上的 3 个 Gla 所带负电荷与  $Ca^{2+}$  结合,消除 Glu31、Ala34 和 Glu35 的螺旋形成抑制作用,引起  $\alpha$  螺旋结构的增加,提高 OC 对羟磷灰石亲和力,促进矿盐沉积,同时促进非结晶钙磷盐转变为羟磷灰石,增加骨矿盐含量<sup>[6]</sup>。

凝胶过滤技术已经证实,大鼠血中 OC 分子量与从大鼠骨中纯化出的 OC 分子量相同,均为 6kD,具有完整抗原性<sup>[1]</sup>。表明血中 OC 不是骨 OC 降低产物,而是由成骨细胞直接释放入血的。OVX15 天大鼠血清中 3 种 OC 水平均显著提高,表明大鼠成骨细胞活性增加,骨质处于高转换型骨丢失状态。结合型 OC 水平的增加,提示骨质中 OC 的羧化作用增强,这是机体的一种代偿自我保护作用,以尽量减少骨丢失;而血中游离型 OC 水平的增加,表明 OVX 大鼠合成增加的 OC 中仍有一部分不能有效地被羧化。提示此时骨内 OC 的羧化作用不能与 OC 分泌增加的作用相偶联。这种 OC 分泌增加与 OC 羧化作用脱偶联,使处于高转换型的骨质中不能得到充足的有效羧化的 OC,因此尽管 OVX15 天大鼠血中结合型 OC 显著增加,但仍不能满足骨质对 OC 的需求,从而影响钙盐沉积,这可能是 OVX 大鼠早期骨丢失的原因之一。

OVX30 天大鼠血清总 OC 水平无明显改变,表明此时骨转换状态恢复到对照水平,成骨细胞合成、分泌 OC 的功能也恢复到对照水平。血中结合型 OC 的减少和游离型 OC 的增加,表明此时骨内 OC 的羧化作用降低,使成骨细胞合成、分泌的 OC 不能有效地被羧化,使矿盐沉积障碍,这是 OVX30 天大鼠骨丢失原因之一,同时也提示 OVX15 天和 OVX30 天大鼠骨丢失机制既有相同点,又有不同点。

OVX60 天大鼠血清总 OC 含量显著增加,表明此时骨又处于高转换型状态,成骨细胞合成、分泌 OC 的作用增加。游离型 OC 增加,结合型 OC 无明显变化,表明 OVX60 天大鼠血清总 OC 的增加是游离型 OC 增加的结果,同时也提示骨内对 OC 的羧化作用相对降低,不能满足高转换型骨组织对羧化型 OC 增加的需求,使成骨细胞合成、分泌增加的 OC 不能有效地被羧化,从而影响钙盐沉积,导致骨矿盐丢失。从以上结果可以认为,OVX 大鼠骨质内 OC 的羧化作用降低或相对降低,使得成骨细胞合成、分泌的 OC 不能充分有效地被羧化,影响钙盐沉

积,是 OVX 大鼠骨矿盐丢失的原因之一。对于 OVX 大鼠 OC 羧化作用降低的原因,目前尚不清楚。Marjo 等<sup>[2]</sup>认为人体内维生素 K 水平低下,是 PMO 患者 OC 羧化作用降低的原因之一。但我们的实验结果不支持此观点,因为各组动物饲料相同,进食量无差别。我们认为 OVX 大鼠骨内 OC 羧化作用降低的原因可能与下面因素有关:(1)骨内  $\gamma$ -谷氨酰羧化酶活性低下,不能将氢醌型维生素 K 氧化成环氧化醌型维生素 K,因而使羧化反应活性降低。(2)环氧化醌还原酶活性低下,不能将环氧化醌型维生素 K 还原为氢醌型维生素 K,以保证羧化反应重复进行。(3)骨组织对氢醌型维生素 K 摄取量低下。上述实验结果表明,OVX 大鼠骨矿盐丢失与骨内 OC 羧化作用降低或 OC 羧化作用与 OC 合成、分泌增加之间脱偶联有关。文献报道,血清结合型 OC 水平增加,与血清骨源碱性磷酸酶活性增加正相关,血清游离型 OC 水平增加与尿钙排出量正相关<sup>[2]</sup>。因此可以认为血总 OC 含量可作为骨更新指标,结合型 OC 可用为骨形成指标,游离型 OC 可用作判断骨丢失的指标。

#### 参考文献

1. Beresford JN, Gallagher IA, Poser J V, et al. Production of osteocalcin in vitro: effect of 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, parathyroid hormone and glucocorticoid. *Metab Bone Dis Relat Res*, 1981, 3: 229.
2. Delmas PD. Biochemical marker of bone turnover for the clinical assessment of metabolic bone disease. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1990, 19: 1.
3. Delmas PD, Demiaux B, Malaval L, et al. Serum bone Gla protein is not a sensitive marker of bone turnover in Paget's disease of bone. *Calcif Tissue Int*, 1986, 38: 60.
4. Knapen MHJ, Hamulyak K, Vermeere. The effect of vitamin K supplementation on circulating osteocalcin (bone Gla protein) and urinary calcium excretion. *Ann Int Med*, 1989, 111: 1001.
5. Rosa Torres, Concepcion Piedra and Aurcho Rapado. Binding of serum osteocalcin to hydroxyapatite in Paget's disease of bone. *Bone and Mineral*, 1994, 14: 55.
6. Peter V. Hauschka and Steven A. Calcium-dependent alpha helical structure in osteocalcin. *Biochemistry*, 1982, 21: 2538.
7. Paul A, Price Satou K, Nishimoto. Radioimmunoassay for the vitamin K-dependent protein of bone and its discovery in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 2234.
8. Marjo HJ, Knapen, Kon-Soong, G, et al. Vitamin K induced changes in markers for osteoblast activity and urinary calcium loss. *Calcif Tissue Int*, 1993, 13: 81.