

卵巢切除大鼠皮质骨氨基多糖 和非胶原蛋白变化与矿盐丢失

崔伟 刘成林 史之祯 郑强 谢力勤

摘要 本实验目的是观察卵巢切除(OVX)大鼠皮质骨矿盐变化特点,研究其变化机理。选用SD-两月龄大鼠,摘除双侧卵巢,实验期60天,观察了OVX大鼠股骨干近、中和远1/3段矿盐含量的变化及股骨干近1/3段骨质中氨基多糖(GAG)、白蛋白和骨钙素(BGP)含量的变化。研究结果显示:OVX60天大鼠股骨干仅近1/3段矿盐含量显著降低,中和远1/3段矿盐含量无明显改变。股骨干近1/3段骨质中GAG和BGP含量显著增加,白蛋白含量显著降低。结果表明OVX60天大鼠股骨干近1/3段矿盐丢失与局部骨质内GAG含量增加,白蛋白含量和BGP质量降低有关。

关键词 卵巢切除 骨矿盐丢失 白蛋白 骨钙素 氨基多糖

Changes in glycosaminoglycan, noncollagenous proteins and mineral loss in cortical bone of ovariectomized rats

Cui Wei, Liu Chenglin, Shi Zhizhen, et al

Institute of Space-Medical Engineering, Beijing 100094

Abstract The aim of the study was to determine the effect of ovariectomy on the mineral change at three different regions (proximal, middle, and distal) along the rat femoral diaphyses. 14 female S. D. rats were randomized into ovariectomized (OVX) group and sham-operated group, 7 rats for each group. The experimental period was 60 days. Mineral content at the proximal, middle, and distal regions and the content of glycosaminoglycan (GAG), bone Gla protein (BGP) and albumin of the proximal regions of the femoral diaphyses were determined. The results showed that mineral content was significantly decreased only in proximal regions, the other two regions had no change in OVX rats. The content of GAG and BGP were significantly increased, albumin content was significantly decreased in proximal regions of femoral diaphyses of OVX rats. The results indicate that the increase in GAG content and the decrease in BGP quality and albumin content are one of the important reasons for mineral loss of cortical bone of OVX rats.

Key words Ovariectomy Bone mineral loss Albumin Bone Gla protein Glycosaminoglycan

绝经后骨质疏松(PMO)骨丢失机理研究是老年医学重点研究课题之一。骨质中氨基多糖(GAG)和非胶原蛋白(白蛋白和骨钙素)对骨矿盐的沉积分别起抑制和促进作用。以往的研究重点集中在松质骨,这与松质骨代谢率高,对体内激素变化敏感有关。皮质骨由于其结构致密,代谢率低,对内分泌激素变化敏感性差,因此目前对PMO皮质骨矿盐丢失机理研究的不多。国外

仅重点对皮质骨生物力学特性进行了一系列研究。本研究目的是以卵巢切除(OVX)大鼠为动物模型,探讨OVX大鼠皮质骨矿盐变化特点及机理,这对于研究PMO皮质骨变化及机理有一定指导意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物:选用SD雌性两月龄大鼠14只,体重 $200 \pm 23g$ (中国科学院动物研究所提供)。按体重配对分为OVX组和对照组。OVX组大鼠乙醚麻醉、背部切口,摘除双侧卵

巢。对照组行假去势手术。动物自由进食、进水。标准实验室饲料。实验期 60 天。

1.2 实验方法

1 股骨干不同部位矿盐含量的测定:断头处死动物,取出左侧股骨,去净附着软组织并去除两端干骺端和松质骨部分^[1]。将股骨干用牙科锯分为远、中和近 1/3 段。105℃烤干至恒重后,放入灰化炉中,600℃48 小时灰化,计算矿盐含量(mg/g)。

2 股骨干近 1/3 段 GAG 含量测定

取大鼠右侧股骨,按与左侧股骨相同方式将股骨干分为远、中和近 1/3 段。取近 1/3 段,液氮冷冻后,冰浴条件下研磨成细颗粒状。

取约 20mg 骨样品,放入螺口试管内,2ml 6N HCl 105℃消化 7 小时,取出后冷却并用 6N NaOH 调 pH 值到 7.0。3000 转/分离心 15 分钟,取上清液 0.8ml,加 3.5% 乙酰丙酮(Na_3PO_4)0.8ml,100℃水浴 30 分钟,冷却后加 2ml Ehrlich 试剂,室温放置 30 分钟,535nm 比色^[2]。

3 骨质内白蛋白和 BGP 含量的测定:取约 20mg 样品,放入离心管内,加 3ml 0.5M EDTA (含蛋白酶抑制剂) PMSF 0.1mmol/L 叠氮钠 0.2mmol/L, pH7.4), 室温提取 72 小时,提取过程中用振荡器反复振荡。提取完成后,将脱钙骨基质和提取液一起制备成匀浆,4000 转/分离心 15 分钟,将非胶原上清与胶原蛋白分开^[3]。取上清液 RIA 法测定骨基质中 BGP 和白蛋白含量。BGP 放免药盒购于北方放射免疫试剂研究所,白蛋白放免药盒购于美国 DPC 产品。

1.3 数据处理: *t* 检验用于两组间数据比较。

2 结果

2.1 两组大鼠股骨干不同部位矿盐含量变化见表 1。

由表 1 可知,OVX60 天大鼠股骨干近 1/3 段矿盐含量显著降低,中和远 1/3 段矿盐含量无明显变化。

2.2 两组大鼠股骨干近 1/3 段 GAG、白蛋白和 BGP 含量变化见表 2。

表 1 两组大鼠股骨干不同部位骨盐含量变化

组别	n	近 1/3 段 (g/g)	中 1/3 段 (g/g)	远 1/3 段 (g/g)
对照组	7	0.60±0.03	0.64±0.07	0.58±0.02
OVX 组	7	0.55±0.04*	0.65±0.03	0.56±0.05

$\bar{x} \pm s$; 与对照组比较, * $P < 0.05$

表 2 两组大鼠股骨干近 1/3 段 GAG、白蛋白和 BGP 含量的变化

组别	n	GAG (mg/g)	白蛋白 (mg/g)	BGP ($\mu\text{g/g}$)
对照组	7	1.99±0.41	0.23±0.04	0.55±0.05
OVX 组	7	3.59±1.30**	0.18±0.02*	0.65±0.07*

$\bar{x} \pm s$; 对照组比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

由表 2 可知,OVX60 天大鼠股骨干近 1/3 段 GAG 和 BGP 含量显著增加,白蛋白含量显著降低。

3 讨论

本实验发现 OVX60 天大鼠股骨干近 1/3 段矿盐含量显著降低,中和远 1/3 段矿盐含量无明显改变,表明股骨干近 1/3 段代谢率较高,对体内激素变化敏感。该结果提示 PMO 皮质骨也可能有矿盐丢失现象发生。BGP 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,能供助于其分子结构中 3 个 γ -羧化谷氨酸残基(Gla)与羟磷灰石结合,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^[4]。OVX 大鼠股骨干近 1/3 段 BGP 含量显著增加,表明成骨细胞活性增强,BGP 合成增加。我们已报道 OVX60 天大鼠骨中 BGP 羧化功能降低,血中游离 BGP 含量增加^[5],所以 OVX 大鼠股骨干近 1/3 段骨 BGP 的增加,多为非羧化型 BGP 增加,它们仅能存在于骨基质中,而不能与羟磷灰石结合^[6],因而无促进骨矿盐沉积作用或促进矿盐沉积作用低下。这是 OVX 大鼠股骨干近 1/3 段 BGP 含量增加,但矿盐含量降低的原因之一。但也有文献报道,骨中 BGP 增加,有促进骨吸收的作用^[7]。

GAG 是骨基质中重要成分之一,它在骨基质内带有大量阴离子,能够与 Ca^{2+} 结合并干扰胶原纤维的形成和其在骨基质中的再分布,进而影响矿盐在骨基质中的沉积^[8]。骨质矿化前,成骨细胞分泌水解酶,清除过量的 GAG,以促

进矿盐沉积。OVX 大鼠股骨干近 1/3 段骨质内 GAG 含量显著增加,表明成骨细胞清除 GAG 能力降低。这是 OVX 大鼠皮质骨矿盐丢失的重要原因之一。OVX 大鼠股骨干近 1/3 段内成骨细胞合成,分泌 BGP 增加,但清除 GAG 能力降低这种成骨细胞功能不一致的表现。提示在 OVX 条件下,皮质骨内成骨细胞的表达功能具有一定的选择性。Finkelman 报道(OVX 大鼠骨质内成骨细胞合成转变生长因子(TGF)增加,但合成类胰岛素生长因子功能无变化^[9],也支持上述观点。

白蛋白是一种由肝细胞合成,经血循环运送到骨质中的一种血源性非胶原蛋白。骨质中白蛋白含量的变化可反映骨循环状况。在骨质矿化部位,白蛋白能与骨基质中一些蛋白相互作用,促进矿盐沉积^[10]。其机理可能与其作为一种载体,携带一些小分子物质或离子进出骨基质有关^[11]。由此可知,OVX60 天大鼠股骨干近 1/3 段内白蛋白含量显著降低,是该部位矿盐丢失的重要原因之一。Schoutens 报道(OVX 大鼠骨血流加快,矿盐丢失,给与雌二醇后,骨血流和矿盐恢复到对照水平。并认为骨血流加快可促进矿盐丢失^[12]。Kapitola 大鼠报道(OVX 大鼠股动脉血流加快,骨密度降低^[13]。从我们的实验结果可以认为,OVX 大鼠股骨干近 1/3 段白蛋白含量显著降低,可能是骨血流加速,影响白蛋白沉积的结果,并且这种白蛋白含量的减少可能是血流加速,导致骨矿盐丢失的原因之一。

综上所述,我们的实验结果表明,OVX 大鼠皮质骨也发生矿盐丢失,这种丢失与骨质内 BGP 质量降低、GAG 含量增加和白蛋白含量

减少有关。

参 考 文 献

- 1 Benedict MR, Ayers DC, Calore TD, et al. Differential distribution of insulin-like growth factors and their binding proteins within bone: relationship to bone mineral density. *J Bone Miner Res*, 1994, 9: 1803
- 2 李昌君,朱秀珍,柴本甫.不同年龄节软骨氨基多糖的分析. *中华骨科杂志*, 1985, 5: 236
- 3 Jeron A, Remy VA, Piet G, et al. Mechanical properties, bone mineral content and bone composition (collagen, osteocalcin, IGF-I) of rat femur; Influence of ovariectomy and nandrolone decanoate (anabolic steroid) treatment. *Calcif Tissue Int*, 1993, 53: 269
- 4 Peter V, Hauschka and Stevan A. Calcium-dependent 2-helical structure in osteocalcin. *Biochemistry*, 1982, 21: 2338
- 5 崔伟,刘成林,史之祯等.卵巢切除(OVX)大鼠血清三种骨钙素变化与骨丢失. *中国骨质疏松杂志*, 1996, 2: 16
- 6 James R, Paul A. Direct demonstration that the vitamin K-dependent bone Gla protein is incompletely γ -carboxylated in human. *J Bone Miner Res*, 1994, 9: 1989
- 7 Lian JBM, Tassman M and Glowacki. Resorption of implanted bone prepared from normal and warfarin-treated rats. *J Clin Invest*, 1984, 73: 1223
- 8 Vogel KG, Paulsson M and Heinegard D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrogenesis by small proteoglycan of the tendon. *Biochem J*, 1984, 223: 587
- 9 Finkelman RD, Eason AL and Bell NH. Ovariectomy selectively reduced the concentration of transforming growth factor beta in rat bone. *J Bone Miner Res*, 1991, 6(Suppl): S99
- 10 Mekke MD, Farach CC, Butter WT, et al. Structural immunolocalization of noncollagenous (osteopontin and osteocalcin) and plasma (albumin and HS-glycoprotein) proteins in rat bone. *J Bone Miner Res*, 1993, 8: 485
- 11 Krash-Hansenu. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan Med Bull*, 1989, 37: 57
- 12 Schoutens A, Verbas M, Hernute M, et al. Increase of bone blood flow, an initial step of bone demineralization in the rat. *Calcif Tissue Int*, 1984, 36(Suppl): S3
- 13 Kapitola J, Kubickova J and Andrie J. Blood flow and mineral content of the tibia of female and male rats: Changes following castration and/or administration of estradiol or testosterone. *Bone*, 1995, 16: 69

(上接第 69 页)

- 2 李青南,黄连芳,谢华,等. 淫羊藿提取液对去势大鼠骨代谢的影响. *中草药*, 1993, 24(12): 637.
- 3 李朝阳,李青南,吴铁,等. 中药补骨 2 号对去势雌大鼠骨质骨代谢影响的定量研究. *中成药*, 1994, 16(10): 52.
- 4 谢华,李青南,黄连芳,等. 蛇床子总香豆素对类固醇性骨质疏松的作用. *中国药理学报*, 1994, 15(4): 371.
- 5 吴铁,廖进民,李青南,等. 壮骨肾元防治肾上腺皮质激素所致大鼠骨质疏松的实验研究. *中国中西医结合杂志*, 1996, 16(2): 102.
- 6 李朝阳,吴铁,李青南,等. 蛇床子素对去卵巢大鼠近侧股

骨代谢影响的定量研究. *药学报*, 1996, 31(5): 327.

- 7 李朝阳,李青南,黄连芳,等. 尼尔雌醇对去卵巢大鼠骨代谢影响的定量研究. *中国老年学杂志*, 1996, 16(4): 227.
- 8 Wronski TJ, Sebenck, PA, Cintron M, Walsh CC. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1987, 40: 155.
- 9 李朝阳,林柏云,黄连芳,等. 己烯雌酚对去卵巢大鼠骨质骨影响的定量研究. *实用老年医学*, 1996, 10(4): 166.
- 10 刘忠厚主编. 骨质疏松的研究与防治. 北京, 化学工业出版社, 1994 第一版, 80~81