

# 高转换型骨质疏松模型的生化特点

冯 坤 刘斗桂 张灵菊 高子范

**摘要** 应用摘除卵巢的方法,建立大鼠高转换型骨质疏松模型。本模型有以下生化特征:血清骨钙素水平明显升高;血浆酸性磷酸酶活性增强;全尿钙、全尿羟脯氨酸和肌酐含量增高。提示血浆酸性磷酸酶活力可以作为此模型动物骨吸收的特异指标,血清骨钙素水平可用于评价骨转换率。用总尿钙和总尿羟脯氨酸指标评价骨量丢失,其敏感性高于尿钙/肌酐、羟脯氨酸/肌酐。

**关键词** 骨质疏松症 生物化学 动物实验

## Biochemical characteristics of osteoporosis model with high bone turnover activity

Feng Kun, Liu Dougui, Zhang Lingju and Gao Zifan

Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital and Institute of  
Henan Province, Luoyang 471002

**Abstract** Using the method of ovariectomy, osteoporosis models with high-bone-turnover activity were made. The biochemical characteristics of the models included raised serum BGP level, enhanced plasma ACP activity, and increased urinary calcium and hydroxyproline and creatinine level in comparison with the controls. It is suggested that plasma ACP activity could be taken as a specific index of bone absorption; serum BGP level could be used to evaluate bone turnover, and the total urinary calcium and hydroxyproline had higher sensitivity in evaluating bone absorption than Ca/Cr and Hop/Cr in the models.

**Key words** Osteoporosis Biochemistry Urinary analysis Blood analysis

随着人口的老齡化,骨质疏松症已成为危害老年人特别是绝经后妇女健康的常见疾患,也成了影响人们生活质量的严重社会问题。原发性骨质疏松可分“绝经后骨质疏松”及“增龄性骨质疏松”,前者伴随骨吸收加快,骨形成代偿性加快,属于“高转换型”,后者骨吸收慢,骨形成更慢,属于“低转换型”。国内外学者研究表明,绝经或卵巢切除的妇女由于性腺功能衰退,性激素缺乏,可致使骨代谢呈负平衡而出现高转换型骨质疏松。根据这个原理,我们采用摘除卵巢的方法,建立了大鼠高转换型骨质疏松模型,并对模型大鼠进行了与骨代谢相关的血尿生化分析及骨样品的无机元素和骨密度测定,分析了卵巢切除后引起的大鼠高转换型骨质疏松的生化特点。

## 1 材料与方法

**1.1 动物及造模:**12月龄雌性 Wistar 大鼠购自中国医科院动物研究所繁殖场,平均体重 300g(280~320g)。44只动物随机分成空白组和造模组。造模组动物摘除双侧卵巢<sup>[1,2]</sup>,空白组做假手术(未切除卵巢)。

**1.2 取样:**造模后4个月取材。(1)尿:处死前取24小时全尿,测定总尿钙(Ca)、磷(P)、肌酐(Cr)和羟脯氨酸(Hop);(2)血浆:用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉动物,取肝静脉血,一部分制成血清测定骨钙素(BGP),另一部分用肝素抗凝,置于冰水浴中,冷冻离心分离血浆,立即测定钙、磷、碱性磷酸酶(ALP)和酸性磷酸酶(ACP);(3)骨标本:取股骨、L<sub>1</sub> 标本、胫骨,剔尽附着的软组织,4℃保存。

**1.3 分析仪器与方法:**(1)血生化分析:血浆钙用邻甲酚酞络合酮法,反应温度25℃,波长570nm;血浆磷采用磷钼酸法,反应温度25℃,波长340nm。钙、磷试剂盒均为北京中生生物

工程高技术公司产品。血浆 ALP、ACP 采用对硝基苯磷酸二钠基质测定法,酶活性单位为金氏单位;血清 BGP 采用放免法测定。(2)尿生化分析:用碱性苦味酸盐法测定尿肌酐;用 GB-HA 显色法测定尿钙<sup>[3]</sup>;用氯氨-T 氧化法测定尿羟脯氨酸<sup>[4]</sup>。(3)骨样分析:按文献方法<sup>[5]</sup>采用 Archimede 原理测定骨标本体积后,室温真空干燥至恒重,用十万分之一分析天平称重,计算出骨密度。电感耦合等离子体发射光谱法测定骨中无机元素含量。(4)分析仪器:HP8452A 紫外可见分光光度计(美国)。RD-20IV 高速冷冻离心机(日本)。ICP-AE3 电感耦合等离子体

表 1 各组动物骨密度测定结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	L <sub>3</sub> 椎体密度	胫骨密度	股骨密度
空白组	1.038±0.07	1.314±0.03	1.250±0.06
造模组	0.960±0.06*	1.263±0.04*	1.192±0.06*

\*与对照组比较有非常显著差异( $P < 0.01$ )

直读光谱仪(美国)。MettlerH54AR 十万分之

一分析天平(瑞士)。羟脯氨酸标准试剂为中科院上海生化所产品。分析试剂均为分析纯。

## 2 结果

各组动物 L<sub>3</sub>、胫骨、股骨骨密度测定结果见表 1。造模组均明显低于空白组( $P < 0.01$ ),表明手术 4 个月后,动物已出现严重骨丢失。各组动物血生化分析结果见表 2。造模组血清骨钙素水平高于空白组,有统计学差别( $P < 0.01$ );造模组血浆钙、磷、ALP 与空白组比较,差别均无显著意义( $P > 0.05$ );血浆 ACP 活性低于空白组,有显著意义( $P < 0.01$ )。造模组动物 24 小时尿肌酐、钙和羟脯氨酸含量均高于空白组( $P$  均  $< 0.01$ ),但两组的 Ca/Cr、Hop/Cr 比值无差别,见表 3。

骨钙、磷及微量元素含量分析结果表明,造模组股骨单位体积内钙、磷、镁、锌含量均显著低于空白组( $P < 0.01$ ),结果见表 4。

表 2 各组动物血浆生化指标测定结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	BGP(ng/ml)	Ca(mmol/L)	P(mg/L)	ACP(U/L)	ALP(U/L)
空白组	8.43±5.89	1.93±0.42	31.71±10.21	3.13±0.57	8.43±2.43
造模组	16.69±9.87**	2.02±0.37*	37.75±12.91*	3.71±0.74**	9.76±2.38*

\*与对照组比较有显著差异( $P < 0.05$ ); \*\*与对照组比较有非常显著差异( $P < 0.01$ )

表 3 尿肌酐(Cr)、钙(Ca)及羟脯氨酸(Hop)含量测定结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Cr	Ca	Hop	Ca/Cr	Hop/Cr
空白组	5.49±1.78	0.62±0.31	31.11±35.55	0.11±0.05	18.73±6.75
造模组	6.36±1.55	0.99±0.48*	34.40±32.14*	0.14±0.08	22.66±5.66

\*与对照组比较有非常显著差异( $P < 0.01$ )

表 4 股骨中无机元素的测定( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Ca(mg/cm <sup>2</sup> )	P(mg/cm <sup>2</sup> )	Mg(μg/cm <sup>2</sup> )	Cu(μg/cm <sup>2</sup> )	Zn(μg/cm <sup>2</sup> )	Fe(μg/cm <sup>2</sup> )
空白组	0.26±0.02	0.14±0.01	6.53±0.71	30.19±3.51	0.24±0.02	88.6±10.0
造模组	0.23±0.02*	0.11±0.01*	5.66±0.29*	29.23±2.31	0.22±0.02*	86.4±14.9

\*与对照组比较有非常显著差异( $P < 0.01$ )

## 3 讨论

骨质疏松是指骨的化学成分没有改变,只是单位体积内骨量减少的病理变化,它是一种综合征。临床发现,切除卵巢的妇女与同年龄组妇女相比有较高的骨质疏松发生率。妇女绝经或卵巢切除后,由于体内雌激素水平降低,而使骨代谢呈负平衡状态——骨吸收相对增强,骨

量逐步丢失,形成骨质疏松<sup>[6]</sup>。所以目前常用卵巢切除的办法造成具有类似骨质疏松骨丢失现象的雌性大鼠模型为研究对象来进行骨质疏松的研究。从本文测定的大鼠 L<sub>3</sub>、胫骨、股骨骨密度结果来看,切除卵巢 4 个月后动物骨骼已出现骨密度和骨矿含量明显下降,模型组动物骨密度指标均低于空白组,差别具有统计学意义。经我们多年应用认为,这种方法建立的骨质疏

松模型,虽然试验周期较长,但成功率高、重复性好,与临床绝经后妇女骨质疏松症病理机制相同,是比较理想的研究模型。

骨钙素是骨组织中的一种能结合钙的蛋白质,其与羟基磷灰石结合,而沉聚在骨组织中。骨钙素是从骨细胞或成骨细胞中含成的,血中的骨钙素是最新合成尚未与骨结合的游离蛋白,也可以是骨吸收来自细胞外基质,骨细胞的合成增强及破骨细胞的活跃均可造成血清骨钙素水平的升高,所以它既反映成骨作用也反映吸收作用。目前国内外学者已将血清骨钙素作为骨代谢、骨转换的一个敏感指标,而常用于检测代谢性骨病的骨转换率<sup>[1]</sup>。骨性碱性磷酸酶是来自成骨细胞,成骨细胞含有丰富的碱性磷酸酶,其在骨钙化区水解磷脂,释放的磷酸根与钙以沉淀的方式沉积在胶原骨架上,发生骨矿化作用。成骨活跃时,成骨细胞分泌大量碱性磷酸酶,一部分参与骨的钙化,一部分释放到血液中,使血中酶活性升高。血清(血浆)中约50%碱性磷酸酶来源于骨,另一半来源于肝,极少量的碱性磷酸酶来源于小肠和胎盘。血清(血浆)ALP活性可以反映成骨细胞活跃状况。一般认为这种血ALP的升高是伴随着骨吸收亢进而出现的代偿性骨形成增强引起的。所以,采用破骨抑制疗法治疗绝经后骨质疏松时,患者血清(血浆)碱性磷酸酶活性下降,采用成骨疗法治疗时血碱性磷酸酶活性升高。酸性磷酸酶主要存在于骨、前列腺、红细胞、血小板和脾脏中。血清ACP活性远高于血浆是由于在凝血过程中血小板内ACP释放入血所致。因此,我们采用雌性动物血浆,排除了前列腺、红细胞、血小板内ACP因素的影响,此时血浆ACP主要来源于骨。骨性ACP由破骨细胞释放,在骨吸收时对骨基质的溶解起重要作用,当骨吸收活跃时,反映在血中酶活性明显升高。本实验结果也证明,血清骨钙素含量增加和血浆酸性磷酸酶活性增高是此模型的明显特征,碱性磷酸酶活性虽然有增高的趋势,但差别并不明显。

血钙受多种内分泌激素调节而处于平衡状态。临床检查绝经妇女的血钙虽然有增加的倾

向,但多在正常范围内波动。体内磷85%存在于骨中,其主要作用是促进骨基质的合成和骨矿沉积。血浆无机磷的水平影响骨吸收速率,血磷的稳定是骨生长和矿化的必要条件<sup>[8]</sup>。临床和实验研究都表明,卵巢切除对血磷影响不大。本试验有相同的结果。

尿钙的测定对骨矿代谢的研究有很重要的价值。尿钙是肠道钙吸收、骨钙溶解、肾小球滤过和肾小管重吸收多种生理生化过程的最后结果。24小时尿钙测定对临床评价钙平衡有重要意义。但分析24小时尿钙时,饮食钙摄入量对测定值影响很大,因而临床24小时尿钙测定难以准确反映骨吸收的状态而不被应用。本文采取对动物连续禁食方法收集24小时尿样进行分析,完全消除了饮食的影响,总尿钙基本上反映了骨吸收的状态,从而观察到模型动物骨钙的严重丢失现象。

羟脯氨酸是反映体内胶原代谢的生化标志物,在没有明显皮肤病和结缔组织病时,通过控制含胶原食物的摄入、检测的尿羟脯氨酸排出量在很大程度上反映了骨代谢的改变。有人研究绝经后骨质疏松妇女的尿羟脯氨酸与骨吸收率正相关<sup>[9]</sup>。根据本实验的数据统计结果造模组动物24小时尿Hop量明显增加,说明造模后动物骨胶原的分解代谢加快,骨吸收活性增强。

许多研究表明,临床检查骨质疏松患者的尿Ca/Cr、Hop/Cr值高于正常人,在动物实验中也发现同样规律<sup>[10]</sup>。引进肌酐指标的意义是校正尿量,但在本实验中发现,造模组动物尿总肌酐排出量高于空白组近20%,伴随尿Ca、Hop的升高,其Cr也升高,两组Ca/Cr及Hop/Cr值无差别,这就使Ca/Cr、Hop/Cr指标在评价骨吸收时的准确性和灵敏性有所降低。我们认为,卵巢切除不仅引起机体内分泌失调,钙、磷及胶原代谢紊乱,而且对整个机体的吸收与排泄功能也有影响,在采用尿Ca/Cr、Hop/Cr指标时应全面考查影响尿肌酐的因素,以准确敏感地评价骨代谢。

本实验的结果表明,对12(下转第24页)

正位 BMD, 其中共有 9 例有不同程度的骨量减低(包括骨质疏松), 并且经过化疗达到完全缓解后, BMD 较前有所增加, 由此可见, BMD 是检测 MM 患者骨量丢失的一个有用的指标<sup>[1]</sup>。MM 的 BMD 减低与破骨细胞活动因子(OAF)有关, OAF 包括淋巴毒素, IL-1, 肿瘤坏死因子等。人们在研究 IL-1 对骨改建的作用机制时发现, IL-1 抑制成骨细胞的胶原合成, 增强胶原酶及 stromelysin 的基因表达, 刺激破骨细胞的骨吸收<sup>[9]</sup>。因此 MM 患者的骨丢失与恶性浆细胞的浸润使成骨细胞功能减退, 破骨细胞的骨吸收增强有关。

作者对 MM 患者的血钙、磷、AKP 也进行了测定, 其结果与正常对照无显著差异, 所以, 对 MM 患者应全面检查骨代谢的指标, 尤其是在判断治疗效果时, 血浆 BGP、24 小时 HOP 及骨密度测定有一定的临床指导价值。由于病例仅 10 例, 虽然能在一定程度上反应 MM 患者骨代谢的变化, 但还需要进一步观察。

### 参 考 文 献

1 武永吉. 多发性骨髓瘤. 见: 方斯, 主编. 现代内科学. 上

- 卷, 第一版. 北京: 人民军医出版社, 1995, 2292-2299.
- 2 Kinos JA, Melton LJ, Christiansen C, et al. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 1994, 9(8): 1137.
  - 3 Carlson K, Jönghall S, Simonsson B, et al. Serum osteocalcin concentrations in patients with multiple myeloma: correlation with disease stage and survival. *J Intern Med*, 1992, 231(2): 133.
  - 4 Meunier C, Le-Loet X, Basuyau JP, et al. Osteocalcin is not a marker of progress in multiple myeloma. Le Groupe d'Etude et de recherche sur le Myelome (GERM). *Eur J Haematol*, 1996, 56(1-2): 30.
  - 5 Taube T, Beneton MN, McCloskey EV, et al. Abnormal bone remodelling in patients with myelomatosis and normal biochemical indices of bone resorption. *Eur J Haematol*, 1992, 49(4): 192.
  - 6 Scutellari PN, Orzincolo C, Bagni B, et al. Bone disease in multiple myeloma. A study of 237 cases. *Radiol Med Torino*, 1992, 83(5): 542.
  - 7 Mariette X, Khalifa P, Ravaud P, et al. Bone densitometry in patients with multiple myeloma. *Am J Med*, 1992, 93(5): 595.
  - 8 Umeda M, Takata M. Bone lesions in multiple myeloma. *Nippon Rinsho*, 1995, 53(3): 678.
  - 9 郭华章, 刘建, 胡蕴玉. 细胞因子在骨质疏松症发病机制中的作用. *中国骨质疏松杂志*, 1996, 2(2): 83.

(上接第 27 页)

月龄雌性大鼠手术切除卵巢后造成的高转换型骨质疏松模型, 血清骨钙素水平及酸性磷酸酶活性均明显升高是此模型的明显特征, 前者说明骨高转换率, 后者表示骨吸收活性。尿钙和尿羟脯氨酸总量增高能说明骨丧失情况, 骨矿质及骨密度显著下降表明骨质疏松模型成立。

### 参 考 文 献

- 1 Kalu DN, Hardin RR. Evaluation of the pathogenesis of skeletal changes in ovariectomized rats. *Endocrinol*, 1981; 115: 507.
- 2 Tabuchi C, Simmons DJ, Faust A, et al. Bone defect in ovariectomized rats. *J Clin Invest*, 1986, 78: 633.
- 3 上海市医学化验所. 临床生化检验(1). 上海科学技术出版社, 1979; 109, 222.
- 4 Stegmann H, Lin CC, Hardin RR, et al. Determination of

hydroxyproline. *Clin Chem Acta* 1966; 18: 267.

- 5 Kalu DN, Sivalier RR. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology*, 1969, 124: 7.
- 6 Eriksen EF. Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis. Quantitative assessment of rates of formation, resorption and bone loss at tissue level. *J Bone Min Res*, 1990, 5: 311.
- 7 Price PA, Parthemore JC, Deftos LJ. New biochemical marker for bone metabolism. *J Clin Invest*, 1980, 66: 878.
- 8 刘忠厚. 骨质疏松症. 北京: 化学工业出版社, 1992: 175.
- 9 Euffenburger T. Bone remodeling and calcium metabolism: A correlated histomorphometric, calcium kinetic, and biochemical study in patients with osteoporosis and Paget's disease. *Metabolism*, 1977, 26: 589.
- 10 沈霖, 杜靖远, 杨家玉, 等. 补肾密骨液对实验性骨质疏松的影响. *中医正骨*, 199, 16(4): 3.