

维甲酸致雌性大鼠骨代谢变化的实验研究

胡 彬 李青南 李朝阳 吴 铁 黄莲芳 傅玉萍

摘要 目的:建立维甲酸诱导的雌性成年大鼠骨质疏松模型,以探讨其密质骨代谢变化。方法:采用16只3月龄雌性SD大鼠,随机分为对照组和维甲酸模型组,后者连续ig维甲酸 $70\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,21天后处死并取内脏称重,胫骨中段制不脱钙骨片用半自动图象分析仪进行测算和分析。结果:维甲酸组卵巢重量显著减轻,子宫萎缩;胫骨中段总面积无明显变化,但骨髓腔变大,皮质变薄;骨外膜动态指标变化不显著,而内膜面荧光周长百分率、骨形成率与骨吸收均有增高趋势,呈骨高转化型改变,但骨吸收大于骨形成,同时类骨质增多。结论:维甲酸在短期内可引起雌性SD大鼠密质骨丢失,但同时类骨质增多,提示维甲酸造成骨钙化缺陷。

关键词 维甲酸 骨质疏松 密质骨

Experimental study of tretinoin-induced metabolic changes in cortical bone of female rats

Hu Bin, Li Qingnan, Li Chaoyang, Wu Tie, et al.

(Bone Biology Laboratory, Guangdong Medical College Zhanjiang 524023, China)

Abstract AIM: To study the metabolic changes in cortical bone due to tretinoin-induced osteoporosis in female rats. METHODS: Sixteen Sprague-Dawley (SD) female rats, three months of age, were randomly divided into control and tretinoin group with tretinoin $70\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for three weeks. The tibia shafts were processed undecalcified for quantitative bone histomorphometric analysis. RESULTS: The ovary significantly decreased in weight, compared with control group, and the uterus was atrophic. As compared with control group, the tretinoin group did not induce significant changes in total area of cortical bone, but the cortical bone area was decreased and the marrow cavity area was increased. On periosteal surface, there were no significant changes between the tretinoin and the control groups. However, on endosteal surface, the tretinoin group was characterized by markedly increased percent labeled perimeter (+253%) and stimulated double labeled formation, compared with the control group. In the tretinoin group osteoid increased not only in perimeter but also in area, and was higher than that in the control group. On the other hand, tretinoin increased percent eroded perimeter (+36%). CONCLUSION: There is a tendency of cortical bone loss induced by tretinoin, but tretinoin markedly increased osteoid, suggesting that tretinoin may have effect on bone mineralization defect.

Key words Tretinoin Osteoporosis Cortical bone

维甲酸是维生素A的一类衍生物^[1],临床用于肿瘤和银屑病等疾病的治疗^[2,3]但具有致骨质疏松等副作用^[4]。有文献报导利用维甲酸能造成雄性大鼠骨质疏松模型^[5],维甲酸对幼年雌性大鼠的骨骼的影响已见文献^[6]报道,但

对成年雌性大鼠骨代谢变化的影响仍未见有报导,本文旨在研究维甲酸对雌性成年鼠骨代谢的变化。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 采用3月龄雌性Sprague Dawley (SD)大白鼠(广东省实验动物中心)16只,体重200g左右,先在动物房适应1周,随机

分为生理年龄对照组(I组)、维甲酸组(II组),每组8只。所有动物在同等条件下饲养,自由饮水和摄食(食物来自本院动物实验中心)。

1.2 药物 全反式维甲酸:重庆华邦生化技术有限公司生产,批号930907,使用前研磨用蒸馏水配成3.5%的混悬液,避光保存及使用。盐酸四环素:上海新亚制药厂生产,每支0.25g,批号901030-10,作为荧光标记物。Calcein(SIGMA CHEMICAL CO. USA lot: 61F-0527):粉剂,使用前用2%碳酸氢钠溶于生理盐水配成5%的混悬液,也作为荧光标记物。

1.3 给药方法 I组用生理盐水ig 2ml. kg⁻¹. d⁻¹; II组用维甲酸ig 70mg. kg⁻¹. d⁻¹。在处死大鼠前第14,13天和第4,3天分别sc四环素(25mg/kg)和Calcein(5mg/kg),因其能整合钙并主要沉积在新形成骨基质钙的起点,显示了两次注射标记物期间骨形成的情况。

1.4 21天后用2%戊巴比妥钠(40~50mg/kg)腹腔麻醉,并右心室抽血处死,取软组织称重,并摘取左侧胫骨用低速锯(Buehler LTD. USA)将其分为三段,取中段在其胫腓骨联合点下1mm处到近端1cm段横断面锯开,以暴露骨髓腔利于渗透固定,然后置70%乙醇固定

24~48小时后,用特殊骨染料(Osteochrome Villanueva Bone Stain, Polysciences, INC. USA)染色3天。从50%乙醇开始梯度脱水及丙酮脱脂。最后用甲基丙烯酸甲酯进行不脱钙骨包埋。包埋块干后用低速锯锯成300μm骨片,经人工磨成20μm的薄片再次梯度脱水,透明封片。

1.5 标本检测 骨组织形态计量学检测用半自动图象数字化分析仪,对胫骨中段密质骨的骨组织作静态和动态测量(附图)及计算,其测量参数之含义参见文献^[7]。各参数值均进行组间t检验。百分率(%)用“ $x_2/x_1 \times 100\%$ ”公式计算。

2 结果

2.1 维甲酸组动物出现进食减少,体毛枯疏、反应迟钝、口唇炎和结膜充血等药物不良反应的表征。实验结束后取软组织称重,对照组卵巢重量为121.5±22.3(mg),维甲酸组为96.6±14.0(mg),卵巢重量显著减轻($p<0.05$);对照组子宫重量为420±100(mg),维甲酸组为370±140(mg),子宫亦出现较大的萎缩趋势,这表明短期实验中维甲酸对大鼠性腺有明显损害。

2.2 密质骨骨组织形态计量学参数比较

表1 大鼠密质骨骨组织形态计量学之静态和骨外膜动态参数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	T.Ar mm ²	Ma.Ar mm ²	Ct.Ar mm ²	%Ma.Ar %	%Ct.Ar %	Periosteal surface		
						%L.Pm %	MAR μm/d	BFR μm ³ /d
I组	4.03±0.27	0.83±0.10	3.21±0.24	20.50±2.02	79.50±2.02	58.68±13.71	0.97±0.22	58.77±23.89
II组	4.02±0.28	0.94±0.15	3.08±0.19	23.29±2.69	76.71±2.60	46.43±5.49	0.89±0.29	41.14±14.50
%-I	0	14	-4	14	-4	-21	-8	-14

注:I组:年龄对照组,II组:维甲酸组,%-I:与对照组比较

表2 大鼠密质骨骨组织形态计量学骨内膜动态参数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Endosteal			surface		
	DL-rate△ %	%L.Pm %	DL-rate▲ %	%O.Pm %	%O.Ar %	%Er.Pm %
I组	0	8.56±5.33	1/6	0.98±2.40	0.01	3.82±1.40
II组	5/7	28.45±20.27	7/7	22.95±18.19	0.13±0.11	5.20±1.42
%-I		253*			920.09	36

注:△为双荧光检出频率 ▲为类骨组织检出频率,* $p<0.05$

由表1可见,II组与I组比较,静态参数中

骨组织总面积(T.Ar)没有明显变化,但骨髓面

积(Ma. Ar)及其百分率有明显扩大趋势,T. Ar 减 Ma. Ar 所得皮质骨面积(Ct. Ar)及其百分率也呈减少趋势。在骨外膜面动态指标中荧光标记周长百分数(%L. Pm),骨矿化沉积率(MAR)及骨形成率(BFR)均略有减少,无显著性差异,此结果与静态参数骨组织总面积(T. Ar)没有明显变化相符。

由表 2 可见,在骨内膜面,维甲酸组显著增加荧光标记周长百分数(%L. Pm),而且明显刺激双荧光形成,I 组 6 只大鼠均无检测到双荧光,维甲酸组双荧光的检出频率(DL-rate)为 5/7,同时也刺激类骨质的形成。由 I 组的检出频率(O-rate)1/6 到 II 组的 7/7,类骨质面积百分率也明显的增加。另外,骨吸收周长百分数(%Er. Pm)有明显的增大趋势,两组间 T-test 结果接近于 $p < 0.05$ 。

3 讨论

本实验骨组织形态计量学的结果显示维甲酸主要影响皮质骨的骨内膜面,使骨形成的参数值增加,也使骨吸收增加。表明其既增加成骨细胞的数量与活性,又刺激破骨细胞使其活性增强,出现一种类似骨高转化的改变。骨的静态指标显示维甲酸组的骨髓腔扩大、密质骨骨量有减少的趋势。说明维甲酸对骨代谢的影响是骨吸收大于骨形成。

维甲酸造成卵巢重量明显减轻,子宫萎缩。维甲酸有损伤雄性大鼠性腺的作用^[1],但未见有维甲酸对雌性大鼠卵巢影响的报告。体内性激素的减少是导致骨质疏松的主要原因。本实验维甲酸处理组卵巢损伤功能减退是导致其皮质骨骨髓腔扩大、密质骨变薄的直接原因之一。从文献研究结果而知,维甲酸引起大鼠血钙浓

度降低^[6],导致体内出现内分泌的变化,继发性引起 PTH 增加,刺激了破骨细胞的活性,使骨吸收作用增强,这也可能是维甲酸导致骨丢失的另一原因。

从类骨质的检出频率看,对照组为 1/6,维甲酸组为 7/7,说明维甲酸组类骨质的相对量明显增加。这可能揭示了维甲酸刺激成骨细胞使类骨质分泌增加,也可能是由于维甲酸引起低血钙影响了类骨质的钙化,出现类似于骨软化状态的改变,这与文献^[6]报导相符。结合实验中大鼠对维甲酸的毒副作用反应较大,因而考虑维甲酸致雌大鼠骨质疏松模型尚需完善。

综上所述,雌性大鼠应用维甲酸后卵巢功能受损,骨吸收增加,骨皮质变薄,出现骨量丢失的情况。类骨质增加,其作用机制有待于进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 李家泰主编. 临床药理学. 第一版. 人民卫生出版社 1991;1044—1051
- 2 Flanagan I L, Breitman T R. Clinical effects of Retinoids on cancer. J Natl Cancer Inst. 1987, 78(3):533—538
- 3 Kampe T, Werner B. The Relevance of the mouse papilloma test as a predictor of retinoids activity in human psoriasis. Dermatologica. 1990, 180(1):30
- 4 朱学骏主编. 实用皮肤病性病治疗学. 第一版. 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1992;61—63
- 5 邵金莺, 尹钟株, 许哲等. 龙牡壮骨药对大鼠实验性骨质疏松的影响. 中药药理与临床 1989, 5:25
- 6 刘和娣, 李恩, 赵晓林等. 补肾药对维甲酸致大鼠骨病变和肠钙吸收的影响. 骨质疏松的研究与防治, 第二卷, 1996. 11. 7 第四届全国骨质疏松学术研讨会(洛阳)
- 7 李青南, 廖进民, 吴铁, 黄莲芳等. 淫羊藿预防羟基尿酸致雄大鼠骨质疏松症的定量研究. 中国中医骨伤科杂志 1996, 4(3):1—4