

去势大鼠骨质疏松症的实验研究

向明珠 杨 柳 李海平



摘要 12月龄雌性大鼠22只,分为2组:实验组切除双侧卵巢,对照组行假手术,13周后测定两组的血清雌二醇(E_2)、睾酮(T)、促卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、钙(Ca)、磷(P)、碱性磷酸酶(AKP)、骨钙素(BGP),并行骨生物学及形态计量学观察。结果表明:实验组 E_2 、T、股骨抗弯能力,湿重、干重、灰重及成骨细胞表面均明显降低,FSH、LH、AKP、BGP及骨吸收表面增高。认为去势鼠骨丢失是由于雌激素缺乏导致骨吸收与骨转换增加所引起。

关键词 卵巢切除 雌二醇 骨钙素 骨生物学 骨形态计量学

Experimental study on osteoporosis in ovariectomized female rats

Xiang Mingzhu, Yan Liu, and Li Haiping

Department of Endocrinology, The First People's Hospital of Jingzhou, Jingzhou 434000, Hubei, China

Abstract Twenty-two female Wistar rats aged 12 months were divided randomly into ovariectomized group and sham-operated group. All the animals were sacrificed 13 weeks after the operation. The blood sample were collected for determination of estradiol(E_2), testosterone(T), follicle-stimulating hormone(FSH), luteinizing hormone(LH), calcium(Ca), phosphate(P) alkaline phosphatase(AKP) and osteocalcin(BGP). Bone biodynamics and bone histomorphometry of the femor were observed. The results serum E_2 , T, bending resistance of the femor, and wet dry ash weight, trabecular surface covered by osteoblasts were all significantly reduced in the ovariectomized group, while its FSH, LH, AKP, BGP, and trabecular surface covered by osteoclasts were obviously increased. The results suggest that the bone loss in ovariectomized group is accompanied by increased bone resorption and turnover which results from the decrease in circulating estrogen.

Key words Ovariectomy Estrodiol Osteocalcin Bone biodynamics Bone histomorphometry

绝经后骨质疏松以及由此引起的骨折率增加是影响中老年妇女健康的严重问题。本试验以去势雌性大鼠建立绝经后骨丢失模型,探讨骨丢失机制,为临床诊断及防治绝经后骨质疏松提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料 成熟(12月龄)雌性 Wistar 大鼠22只,平均体重约200 g,分为两组:去势组(实验组、卵巢切除组)12只,对照组(假手术组)10只。

作者简介:向明珠,女,1964年毕业于湖北医科大学。现任主任医师,湖北医科大学内科兼职教授,硕士研究生导师,兼湖北省老年学会骨质疏松委员会副主任委员,湖北省糖尿病学会常委,荆州市内科学会常委。享受国务院颁发的“政府特殊津贴”,为第九届全国人大代表。

作者单位:434000 湖北省荆州市第一人民医院内分泌科

1.2 方法 所有大鼠均在3%戊巴比妥钠腹腔注射(3.5 mg/kg·BW)麻醉下施行手术,卵巢切除组开腹后切除双侧卵巢,对照组行开腹后假手术,即不切除卵巢,两组均经缝合腹腔、闭合伤口,分组编号分笼复合饲料喂养,术后13周行断头处死。观察:①光镜下观察实验组与对照组子宫内膜层、肌层、腺体的变化。②术后13周观察实验组与对照组血清雌二醇(E₂)、睾酮(T)、促卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、钙(Ca)、磷(P)、碱性磷酸酶(AKP)、骨钙素(BGP)的变化。③按性别出股骨,将左侧股骨置于弯曲试验台上,支点距20 mm,以NA1-Ⅲ型数字测力计测量左侧股骨的抗弯能力,然后测量湿重、干重、灰重。④分别取两组大鼠右侧股骨,测量股骨全长(GBC)、骨干中点前后直径(GZC)、两髁间直径(DKZ),股骨中点断端皮质骨厚(ZDH)、股骨中点断端髓腔直径(IZJ)等指标后,分取股骨上端与下端,置于70%酒精,于4℃下固定,然后用丙酮脱水,甲基丙稀酸甲酯、丁酯(按3:7比例)包埋,于Jung K型切骨机中切出7μ厚不脱钙骨切片,分别于Giemsa、Von-kossa染色,用半自动图像分析仪(IBM-386、VFG图像板、ANALY软件)测量并求得平均

骨体积(MTV)、平均骨小梁厚(MBH)、类骨质表面占骨小梁表面长(OTS)、平均类骨质宽(MOSW)、成骨细胞表面(OTB)和破骨细胞与吸收陷窝表面长(OTC)6项指标。

骨计量学检查要求以测量股量大转子处为标准,辅以测量股骨下端骨骺板的近骨干一侧镜下视野。每张切片至少要求测量三个不同视野,然后求平均值,测宽度要求分测视野内最宽最窄各两点,再测一中等厚度处,求其平均值。

统计学处理采用组间t检验。

2 结果

2.1 术后大鼠子宫病理报告 手术后大鼠子宫切片示实验组子宫明显萎缩,体积明显缩小变细,壁层、肌层变薄,子宫内膜也有一定程度的萎缩,腺体数目减少,间质纤维组织透明样变。对照组子宫肌层和内膜层大致正常。

2.2 手术后两组大鼠性激素、促性腺激素、Ca、P、AKP及BGP测定 术后实验组大鼠之E₂、T均较对照组明显降低,LH、FSH升高,尤以E₂与FSH之改变明显。实验组AKP、BGP升高,Ca、P不变(见表1)。

表1 两组大鼠术后E₂、T、LH、FSH、Ca、P、AKP、BGP测定(±s)

| 组别 | E ₂ pmol/L | T nmol/L | LH IU/L | FSH IU/L | Ca mmol/L | P mmol/L | AKP IU/L | BGP μg/L |
|-----|--------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| 实验组 | 13.759 ±12.309 | 62.321 ±36.262 | 0.980 ±0.20 | 2.350 ±0.404 | 2.806 ±0.203 | 1.442 ±0.226 | 24.767 ±5.467 | 4.612 ±0.513 |
| 对照组 | 51.930 ±24.017 | 144.387 ±64.889 | 0.731 ±0.305 | 0.725 ±0.207 | 2.827 ±0.222 | 1.335 ±0.402 | 17.510 ±4.806 | 4.283 ±0.476 |
| P值 | <0.001 | <0.01 | <0.05 | <0.001 | >0.05 | >0.05 | <0.01 | <0.05 |

2.3 两组大鼠术后股骨重量及折断力 术后实验组股骨之湿重、干重、灰重及折断力较对照组明显为低(见表2)。

表2 两组大鼠术后股骨重量及折断力(±s)

| 组别 | 湿重(g) | 干重(g) | 灰重(g) | 折断力(kg) |
|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 实验组 | 0.747±0.061 | 0.509±0.050 | 0.223±0.031 | 7.250±0.750 |
| 对照组 | 0.810±0.080 | 0.583±0.059 | 0.299±0.07 | 8.60±0.768 |
| P值 | <0.05 | <0.01 | <0.01 | <0.001 |

2.4 两组骨形态计量学参数 实验组与对照组大鼠相比,GBC与IZJ无明显差异.ZDH、MTV、OTS、OTB、MBH,实验组显著低于对照组,GZC、DKZ、MOSW、OTC高于对照组。骨计量学检查两组参数有非常显著差异(见表3)。

表3 两组大鼠股骨形态计量学参数比较($\bar{x} \pm s$)

| 项 目 | 实验组 | 对照组 | P 值 |
|-----------------------|--------------|--------------|-------|
| GBC(mm) | 34.966±1.172 | 35.010±0.703 | >0.05 |
| GZC(mm) | 3.237±0.242 | 2.993±0.138 | <0.01 |
| DKZ(mm) | 7.098±0.350 | 6.673±0.199 | <0.01 |
| ZDH(mm) | 0.933±0.039 | 1.004±0.129 | <0.05 |
| IZJ(mm) | 1.563±0.210 | 1.553±0.169 | >0.05 |
| MTV(%) | 35.314±2.852 | 42.181±2.196 | <0.01 |
| OTS(%) | 7.605±1.187 | 12.020±2.120 | <0.01 |
| MOSW(μm) | 2.871±0.676 | 2.160±0.313 | <0.01 |
| OTB(%) | 6.281±0.686 | 17.373±3.681 | <0.01 |
| OTC(%) | 8.902±1.884 | 6.393±0.787 | <0.01 |
| MBH(μm) | 13.415±1.248 | 15.572±2.10 | <0.01 |

3 讨论

绝经后骨质疏松的病因十分复杂,现在普遍认为绝经后雌激素的缺乏,钙磷调节激素的失衡和种种危险因子可考虑为骨质疏松的病因。本研究去除大鼠卵巢,造成雌激素缺乏,以探讨绝经后骨丢失的机制。切除卵巢造成骨质疏松模型与大鼠月龄有极密切关系,有研究8月龄大鼠切除卵巢1周后BMC、BMD下降显著,以后变缓,28天后与伪组差异有统计学意义,认为不宜用月龄小的大鼠切除造模^[1]。本文采用12月龄成熟雌性大鼠,术后13周观察,虽因条件所限,未能测量大鼠腰椎或股骨之骨密度,但从实验组切除卵巢后测得雌激素水平较对照组明显下降,促性腺激素升高,子宫萎缩,类似人类卵巢功能衰退之表现,认为骨质疏松造模成功。雌激素缺乏可致骨代谢呈负平衡状况,即破骨细胞的骨吸收增加,成骨细胞的骨形成活性相对减弱,这样机体每完成一个骨重建周期将会损失一部分骨量,其结果在若干周期后就形成了骨质疏松^[2]。

临床观察,血清Ca、P及AKP一般在正常范围,也有认为绝经后妇女骨吸收增加,骨转换

率增加,致代偿性成骨细胞活性增加而使AKP升高^[3]。BGP是骨的一种重要的非胶原蛋白,是骨转化活跃与否的标志,妇女的BGP随年龄升高,也有下降的报道^[4]。本研究证实实验组与对照组血Ca、P无差异,但AKP与BGP升高,与临床所见相似,表明绝经后骨转换率升高。此外,本实验中,切除卵巢大鼠术后13周所见,MTV明显下降,而骨转换指标明显升高(如OTC表面增加),正好与雌激素缺乏之骨组织代谢表现相同,显示手术切除卵巢为绝经期高转换率骨质疏松动物模型的良好方法,为探讨骨质疏松发生机理与指导治疗提供了一种可靠的手段。

从骨计量指标中还可见到,模型的破骨细胞活性增加,成骨细胞活性下降,证实雌激素缺乏除影响大鼠破骨细胞活性外,也降低成骨细胞活性,而使骨重建单位出现负平衡,为骨量丢失、骨MTV减少的首要原因。若在防治中增加成骨细胞活性和/或抑制破骨细胞活性,则均可起到防治骨质疏松的作用。自然增龄的影响亦应考虑。此外,在类骨质指标中,实验组之OTS明显低于对照组,但MOSW指标反见增加,从而间接证实雌激素缺乏同样影响骨质的矿化,这可能与钙缺乏或骨矿化前沿异常有关^[5],最终使类骨质生成面减少,而生成的类骨质钙化成熟为骨的过程又减慢,两者均影响新骨的形成而使骨的韧性与刚性下降,从而导致骨质疏松并易发生骨折。故补钙改善局部循环中的钙水平,增加骨组织的利用率,可使类骨质钙化相对较易完成,此可能为补钙防治骨质疏松症的机理之一。

参 考 文 献

- 1 秦林林,陈金标,裴海洋,等.不同月龄雌性大鼠骨质疏松模型研究.中日友好医院学报,1997,11(1):6.
- 2 Brown Jp. Serum bone gla-protein, a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. Lancet, 1984;1:1090.
- 3 朱宪彝主编.代谢性骨病学.第1版.天津:天津科学技术出版社,1989,239~240,529~532.
- 4 李玉坤,邱明才.老年性骨质疏松研究近况.中华老年医学杂志,1994,13(6):367.