PTH对大鼠胫骨远心端松质骨的影响及其组织形态计量学检测

李青南 胡 彬 李朝阳 黄连芳

摘要 目的 用骨组织形态计量学方法定量检测大鼠胫骨远心端不活跃的骨小梁，并观察甲状旁腺激素(PTH)对此骨骺已关闭部位低转化骨的影响。方法：3月龄SD大鼠21只随机分3组：(1)对照组，(2)PTH 30 mg组，(3)PTH80 mg组，(均按 $kg^{-1}\cdot d^{-1}$计，皮下注射21d)。各组动物于实验21天处死，取胫骨远心段不脱钙骨制片测量。结果：(1)静态参数：用药两组和对照组比较骨小梁面积和骨结构无变化。(2)动态参数：荧光周长百分率(%*L. Pm*)，矿化沉积率(*MAR*)，类骨质周长百分率(%*O. Pm*)和骨形成率(*BFR*)用药两组比对照组明显增加，且呈量效关系，但骨吸收的参数比较未见差异。结论：胫骨远心段骨转化率虽然很低，但对PTH合成代谢药物短期内仍有明显反应。

关键词 骨质疏松 胫骨远端 甲状旁腺激素 大鼠

Effect of parathyroid hormone on distal tibia metaphysis and a histomorphometric study on this area in female rats

Li Qingnan, Hu Bin, Li Chaoyang and Huang Lianfang

Guangdong Medical College, Bone Biology Laboratory, Zhanjing 524023, China)

Abstract **Aim**: To study distal tibia metaphysis and observe the effect of parathyroid Hormone (PTH) on this area in female rats. Methods: 21 rats were divided into three groups; a placebo group received normal saline, the second group received 30 μg PTH/$kg^{-1}\cdot D^{-1}$ and the third group received 80 μg PTH/$kg\cdot d^{-1}$, all subcutaneously for 21 days. The distal tibia 1 metaphyses (DTM) were processed undecalcified for quantitative bone histomorphometry. Results: (1) Static data: there was no significant change in dpercent trabecular bone area and bone area and bone architecture between placebo-treated rats and rats treated with the two doses of PTH for 21 days. (2) Dynamic data: 30 and 80 $\mu g/kg^{-1}$ PTH increased the bone formation indices significantly (%L. Pm, MAR, BER, &O. Pm), and also increased activation frequency (Act. F) in 21 days compared with placebo group. 80 μg PTH showed more effect (dose dependent) than 30 μg group. But the bone resorption perimeter did not have any significant change. Conclusion: with a closed growth plate and low turnover on the distal tibia metaphysis site in female rats, PTH still have the effects in short period.

Key words Osteoporosis Distal tibia Parathyroid hormone Rats

作者简介：李青南，女，42岁，副研究员，硕士研究生导师，骨生物学研究室主任，中国老年学学会骨质疏松委员会委员，广东省老年学学会骨质疏松委员会常委。1982年毕业于广东医学院，留校任教，曾两次到美国犹他大学骨研究室进修，从事骨生物学方面的研究。加国后筹建了骨生物学研究室，开展中药对骨质疏松的预防研究工作并与美国导师进行了西药二膦酸盐类药物和前列腺素E2合作课题。

作者单位：524023 广东湛江广东医学院骨生物学研究室

目前用骨组织形态计量学研究大鼠实验性骨质疏松所采用的骨标本部位多为胫骨近心端的骨小梁，而对大鼠胫骨远心端的骨小梁研究很少[1,2]。胫骨远心端与胫骨近心端主要不同之处是，三月龄鼠的骨骺已关闭，骨骺处的皮质骨多，干骺段的骨小梁较厚，且骨转化率较低，这一特点更接近人类的骨小梁[3,4]。但由于其标本制作较困难，限制了它的应用。本文的目的是介绍骨组织形态计量学对大鼠胫骨远心端骨小梁研究的方法学，并观察甲状旁腺素（PTH）对此部位骨小梁的短期作用。

1 材料和方法

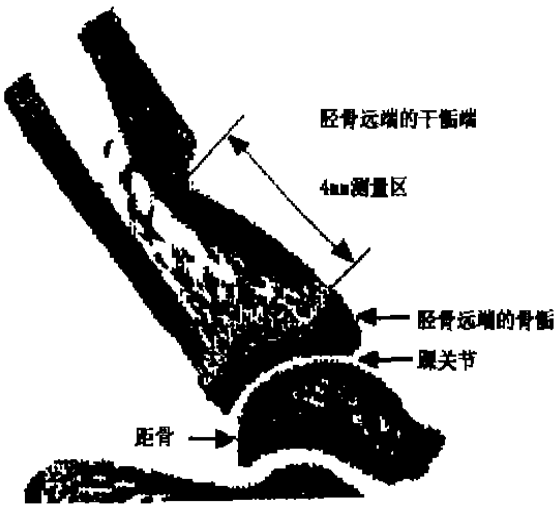
1.1 三月龄雌性 Sprague-Dawley 大鼠（Charles River Laboratory, Inc., Portage, MI）21只，体重210克，分笼喂养，自由摄水摄食，适应二周后，随机分为三组：对照组，PTH 30 μg 组和80 μg 组，每天注射 PTH 一次（$kg^{-1} \cdot d^{-1}$计，皮下）共21天。PTH 的配制方法按文献[5]。

1.2 所有大鼠于处死前第14，13天和4，3天分别皮下注射25 mg/kg 四环素和10 mg/kg calcein 作荧光标记。实验结束时，用2%戊巴比妥钠麻醉，右心室抽血处死，取左胫骨在胫腓骨连接处用低速锯（Buehler LTD. USA）将其锯断，取远心端做不脱钙骨包埋。特殊骨染料（Villanueva bone stain）染色（Poly-scirnce, Inc., Warrington PA）。包埋块干后，用低速锯按矢状面锯成230μm 骨片（附图），经人工磨成20μm 薄片，梯度脱水后，封片。

1.3 骨组织形态计量学检测为半自动图象数字化仪，测量范围是从前骨骺和干骺端的连接处往胫腓连接处3毫米。对此处干骺端的骨小梁作静态和动态参数测量和计算[6,7]。百分率（%）用 '$X_2 \div X_1 \times 100 - 100$' 公式计算。数据采用 Fisher's PLSD 多组比较的方差分析。

2 结果

2.1 静态参数



附图 骨组织取材

对照组和用药组在3周实验中胫骨远心端干骺段骨小梁的面积和骨结构差异无显著性，详见附表。

2.2 动态参数

PTH 低剂量用药组与对照组比较：荧光周长百分率（$\%L.Pm$）、矿化沉积率（MAR）、类骨质周长百分率（$\%O.Pm$）和骨形成率（BFR）均有明显增加（194%，25%，257%，和398%），骨激活频率（$Act.F$）也显著增加（396%），且高剂量组比低剂量组增加明显，两组比较呈量效关系。但骨吸收的参数无变化。

3 讨论

本研究应用 PTH 对3月龄正常雌性大鼠进行21天用药，观察胫骨远心端的骨小梁对药物的反映。结果显示 PTH 低剂量短时间对低转化骨的骨形成指标（$\%L.Pm$，MAR，BFR 和 $\%O.PM$）有刺激作用，与对照组比有明显地增加，同时还提高骨转化率，且随剂量而增大。但 PTH 不影响此部位的骨吸收。PTH 对骨作为一种合成代谢类药物在临床应用或动物实验已有不少报道[10~15]。然而动物实验研究并非胫骨远心端。有趣的是有文献报道[9]应用合成代谢类药物前列腺素 E_2 对大鼠进行治疗时发现：DTM 对前列腺素 E_2 的应答反应比 PTM 应答反应

大。这种低转化骨比高转化骨对药物应答强的原因何在，有以下几种可能性：(1)在DTM有静止的具有骨形成作用的骨源细胞库(progenitocell)，骨祖细胞，也称为前成骨细胞，前生骨细胞，是一种幼稚的干细胞。这种细胞在出生后仍可存留于某些部位，有进行增殖的分化的能力，分布于骨小梁的游离面附近，骨膜最内层，哈弗氏管内衬，骺板处软骨基质小梁及毛细血管外周等处，因而可随时提供此类细胞。(2)DTM的骨髓是脂肪，干细胞处于休息状态，使骨源细胞易于起作用。(3)DTM骨小梁的转化率低，固仅需少量的细胞即可起作用。前列腺素E_2和PTH同属合成代谢类药物应有相同的作用，我们的实验结果也显示21天PTH即能明显地提高所有骨形成的指标。这说明PTH能明显地刺激胫骨远端骺板已闭合的低转化的骨。

附表 PTH对大鼠胫骨远心端骨小梁的影响

Code	n	骨小梁面积 (%)	骨小梁厚度 (μm)	骨小梁数量 (#/μm)	骨小梁分离度 (μm)	荧光周长 (%)	矿化沉积率 (μm/d)	骨形成率 (%)	类骨质周长 (%/yr)	骨吸收周长 (%)	激活频率 (cycle/yr)
ANOVA		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.102	0.0001	0.002	0.03	0.08	0.0004
对照组		41.31	128.20	3.24	186.80	4.12	0.59	12.85	2.47	0.28	0.69
SD	7	8.61	24.80	0.52	52.70	2.48	0.18	9.75	1.39	0.07	0.54
PTH(30μg)		42.78	121.4	3.53	167.3	12.12	0.74	45.82	12.3	0.3	3.42
SD	6	7.05	8.7	0.55	40	3.88	0.12	18.58	2.88	0.19	1
%对照组		4	−5	9	−10	194[e]	25	257[e]	398[e]	7	396[e]
PTH(80μg)		45.3	131.7	3.48	162.6	22.55	0.82	89.13	27.09	0.29	7.6
SD	6	7.44	21.5	0.62	40.4	3.89	0.14	34.81	9.43	0.09	1.44
%对照组		10	3	7	−13	447[e]	39[e]	594[e]	997[e]	4	1001[e]
%PTH(30μg)		6	8	−1	−3	85[h]	11	95[h]	120[h]	−3	122[h]

e：$p<0.05$与对照组比；*h*：$p<0.05$与30μg PTH比；%来源公式 $X_2 \div X_1 \times 100 - 100$

参考文献

1 Ljrri K, Ma YF, Jee WSS, et al. Adaptation of Non-growing former epiphysis and metaphyseal trabecular bones to aging and immobilization in rat. Bone (Suppl.) 1995, 17: 207s～212s.

2 Ma YF, Ke HZ, Jee WSS. Prostaglandin E_2 adds bone to a cancellous bone site with a closed growth plate and low turnover in ovariectomized rats. Bone 1994, 15: 137～146.

3 Dempster DW, Bone remodeling. In: Disorders of bone and mineral metabolism. Coe F L, Favus MJ eds. New York: Raven Press, Ltd; 1992, 355～380.

4 Parfitt AM, Mathews CHS, Villanueva AR, et al. Relationship between surface, volume and thickness of iliac trabecular bone in aging and osteoporosis: Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. J Clin Invest, 1983, 72: 1397～1409.

5 Ma YF, Jee WSS, Ke HZ, et al. Human parathyroid hormone-(1-38) restores cancellous bone to the immobilized, osteopenic proximal tibial metaphysis in rats. J Bone Min Res, 1995, 10: 496～505.

6 Li QN, Jee WSS, Ma YF, et al Risedronate pretreatment does not hamper the anabolic effects of prostaglandin E_2 in ovx rats. Bone (Suppl.), 1995, 17: 261s～66s.

7 Jee WSS, Ihoue J, Jee KW, Haba T. Histomorphometric assay of the growing long bone. Takahashi H ed. Handbook of bone morphlogy. Japan: Niigata city, 1983, 101～22.

8 Ito H, Ke HZ, Jee WSS, et al Anabolic responses of an adult cancellous bone site to prostaglandin E_2 in the rat. Bone and Mineral, 1993, 21: 219～236.

9 Reeve J, Tregear GW, Parsons JA. Preliminary trial of low doses of human parathyroidhormone 1－34 peptide in treatment of osteoporosis. Calcif Tissue, 1976, 21: 469～477.

10 Slovik DM, Neer RM, Potts JT Jr. Short-term effects of synthetic human parathyroid hormone 1－34 administration on bone mineral metabolism in osteoporotic patients. J Clin Invest, 1981, 68: 1261～1271.

11 Sorensen OH, Lumholtz B, Lund BI, et al. Acute effects of parathyroid hormone on vitamin D metabolism in patients with the bone loss of aging. J Clin Endocrinol Metab, 1982, 54: 1258～1261.

12 Hefti E, Trechsel U, Bonjour J-P, et al. Increase of whole-body calcium and skeletal mass in normal and osteoporotic adult rats treated with parathyroid hormone. Clin Sci 1982, 62: 389～396.

13 Mitlak BH, Williams DC, Bryant HU, et al. Intermittent administration of bovine PTH-(1-34) increases serum 1, 25-dihydroxyvitamin D concentrations and spine bone mineral density in senile (23 month) rats. J Bone Miner Res 1992, 7: 479～484.

14 Gasser JA, Jerome CP. Parathyroid hormone: A cure for osteoporosis? Triangle, 1992, 31: 111～121.