

去势大鼠血清骨钙素水平及意义

章明放 黄凤歧 谭郁彬

赵晖 金孟珏 马淑新



关键词 骨质疏松 骨钙素 去势大鼠

摘要 目的 测定雌性大鼠切除双侧卵巢(去势)18周后骨钙素水平,探讨其意义。**方法** 16周龄雌性SD大鼠分为假切对照组和去势组。术后第18周末,处死取血清放免法测骨钙素水平、钙、磷浓度和碱性磷酸酶活性;处死前留24小时尿,测钙、磷和羟脯氨酸排泄量。**结果** 去势骨钙素水平($0.98 \pm 0.14 \mu\text{g/L}$)较假切对照组($1.50 \pm 0.32 \mu\text{g/L}$)显著降低($P < 0.01$),血清钙、磷浓度显著降低,血清碱性磷酸酶活性、尿钙、尿磷和羟脯氨酸排泄量显著增加。**结论** 骨钙素水平的显著降低有可能提示在骨丢失相对缓慢时段骨转换率和骨形成的相对降低和减少。

Reduced serum bone gla protein level and significance in ovariectomized rat

Zhang Mingfang, Huang Fengqi, Tan Yubin et al.

Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract Objective To measure the level of osteocalcin (BGP) in ovariectomized rat and study its significance. **Methods** 20 female SD inbred rats were divided into sham-ovariectomized (sham-OVX) group and ovariectomized group (OVX). 18 weeks postsurgery, serum and 24 hour urine were collected to measure BGP by radioimmunoassay. Serum Ca, P concentration, alkaline phosphatase activity, urine Ca, P and hydroxyproline were also measured. **Results** Compared with sham-OVX rat, the BGP level of OVX rats ($0.98 \pm 0.14 \mu\text{g/L}$) was markedly lower than that of sham-OVX rat ($1.50 \pm 0.32 \mu\text{g/L}$, $P < 0.01$), and serum Ca, P were also reduced. Serum AKP, urine Ca, P and HOP were significantly increased. **Conclusion** Reduced BGP of OVX rat suggests that there is reduced bone formation and declined bone turnover during a slow phase of bone loss in ovariectomized rat.

Key words Osteoporosis Osteocalcin Ovariectomized rat

骨钙素(osteocalcin),通常又称骨 γ -羧基谷氨酸蛋白(BGP)是80年代后期发现的一种由

成骨细胞分泌的肽类物质,其含量变化被认为与成骨细胞功能和骨转换密切相关。本研究拟探讨雌性大鼠切除双侧卵巢第18周末骨钙素水平及其意义。

本课题为天津市自然科学基金资助项目

作者单位:300070 天津医科大学病理学教研室(章明放、黄凤歧、赵晖);天津市内分泌研究所(谭郁彬、金孟珏、马淑新)

作者简介:章明放,男,1953年5月出生,天津医学院毕业,所学专业病理学,副教授,从事代谢性骨病的研究

1 材料和方法

SD近交系雌性大鼠20只,16周龄,平均体重125g,随机分为假性手术对照组(CON组)和

切除双侧卵巢组(OVX组),每组10只。实验期间自由摄食(天津市实验动物中心提供)和饮水(天津市自来水)。术后第18周末,股动脉放血处死,取血清-20℃保存待测。处死前收集24小时尿液,-20℃保存待测。

放射免疫法测定血清骨钙素水平,药盒购自北京东亚免疫技术研究所。BGP标准品为人工合成的代表成骨细胞活性状态的7~19片段物(Sigma)公司,与甲状腺球蛋白(Sigma公司)偶联后免疫家兔后获得抗血清,效价1:600。批内变异系数(CV)2.61%,批间5.74%。测定方法见文献^[1]。

COBAS生化自动分析仪(瑞士产)测定血清钙、磷浓度和碱性磷酸酶(AKP)活性;尿钙、磷浓度。氯胺T比色法测尿羟脯氨酸(HOP)浓度并计算出24小时排泄量。

各项参数以均值加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间差异行双尾 t 检验。

2 结果

表1 血清学检测结果($\bar{x} \pm s$)

指标	CON	OVX
BGP($\mu\text{g/L}$)	1.50 $\pm$ 0.32	0.98 $\pm$ 0.14**
Ca(mmol/L)	3.54 $\pm$ 1.10	2.72 $\pm$ 0.14*
P(mmol/L)	1.96 $\pm$ 0.39	1.40 $\pm$ 0.30**
AKP(U/L)	54.9 $\pm$ 8.30	78.00 $\pm$ 11.81**

注与CON比* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表2 尿检测结果($\bar{x} \pm s$, mg/24h)

组别	Ca	P	HOP
CON	1.60 $\pm$ 0.40	8.61 $\pm$ 1.97	1.10 $\pm$ 0.46
OVX	2.58 $\pm$ 0.16**	15.33 $\pm$ 1.71**	1.57 $\pm$ 0.53*

注:与CON组比.* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

血清学和尿液检测结果分别见表1和表2。OVX组的骨钙素水平和钙、磷浓度显著低于CON组,而碱性磷酸酶活性显著高于CON组。OVX组的24小时钙、磷和羟脯氨酸排泄量显著高于CON组。

3 讨论

由成骨细胞分泌的骨钙素被认为是评价成

骨功能的较特异参数,其直接反映成骨细胞的活性和骨生理代谢变化^[1]。其在骨质疏松症的发生发展过程中变化如何受到较多的关注,因为其不仅涉及到发病机制,也涉及到有效防治的评价。

雌激素减少后的骨矿物含量的减少或骨量的减少和骨形成关系如何尚未阐明。众多研究表明,雌激素减少或缺乏使其对破骨作用的抑制解除,骨吸收显著增加,随之骨形成也增加,高转换率骨质疏松形成^[2]。而高转换率骨质疏松的主要生化特征之一便是骨钙素的显著增加^[3]。骨形态计量学的研究显示,雌性大鼠切除双侧卵巢后,骨小梁类骨质和成骨细胞被覆的表面显著增加,四环素标记的双荧光带也显著增加,表明骨形成的活跃。但应注意到,雌激素减少后的骨丢失有快速时相和平缓时相。就大鼠而言,切除双侧卵巢后的快速时相持续约100天左右,而后进入相对平缓时相^[4]。在快速时相,尤其在快速时相的前期,骨吸收显著增加,由于吸收和形成的偶联作用,具有修复和代偿作用的骨形成增多,但这种骨形成增多是否持续骨质疏松的整个过程,或骨钙素是否保持在较高水平尚无研究报导。

本实验表明,雌性大鼠切除双侧卵巢后18周末,血清骨钙素显著降低,提示成骨细胞活性下降,骨形成减少。有可能在度过丢失的快速时相,具代偿意义的骨形成逐渐降低,骨吸收和骨形成的偶联进一步失衡,骨吸收占优势,从而在血清学检测出骨钙素水平的显著低下,反映了成骨细胞的疲惫或失代偿。我们用点杂交方法研究去势大鼠的骨I型胶原mRNA的表达后发现,去势90天后,骨I型胶原mRNA表达显著下降,说明骨形成的减少(另文发表),同本文骨钙素的结果相吻合。Fiore等对15名因良性病变而行卵巢切除的均龄46.6岁妇女的骨钙素进行动态检测,在术后3、6和12个月时,骨钙素水平呈梯度逐渐显著减少,推论成骨细胞功能不足是负骨平衡和骨量减少的一个重要原因^[5]。我们的研究只在一个时间位点上检测,有必要

参 考 文 献

动态地检测骨钙素在骨质疏松不同阶段的变化以阐明其变化规律。近年来,有研究依据骨钙素与羟磷灰石亲和力的不同将其分为结合型和游离型骨钙素,结合型似乎与骨转换率和骨丢失速率相关;游离型是一种与结合型不同,髌部骨折病人中显著增加,与骨量负相关的骨钙素,但其结构和来源仍不清楚^[6,7]。故随着对骨钙素的认识深化和检测方法的改进,其意义将得到进一步阐明。

碱性磷酸酶也常用做成骨细胞功能评价的指标。本研究中,骨钙素水平显著减少,而碱性磷酸酶显著增加。类似的研究结果亦有报导。Fiore 认为此非一致的机制可能与骨转换速率不同,与不同部位骨丢失程度不同有关^[3]。此外,骨钙素和碱性磷酸酶可能反映成骨细胞活性的不同位点和时相,且碱性磷酸酶活性也常受到多种非骨因素的影响。

本研究中血清钙、磷浓度的显著降低和尿钙、磷排泄的显著增加仍表明负钙平衡的存在及以骨吸收占优势的骨矿物含量的丢失。

- 1 杨梅芳,李振甲,朱守荣,等. 骨钙素 RIA 试剂盒研制及其临床应用. 中华核医学杂志, 1994, 4: 167-169.
- 2 Riggs BL, Melton LJ. Involutional osteoporosis. *N Engl J Med*, 1986, 314: 1676-1685.
- 3 Ismail F, Epstein S, Michael DF, et al. Serum bone gla protein and the vitamin D endocrine system in the oophorectomized rat. *Endocrinology*, 1988, 122: 624-630.
- 4 Wronski TJ, Cintron M, Damm LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*, 1988, 43: 179-183.
- 5 Fiore CE. Postophorectomy bone loss is associated with reduced BGP serum level, a possible effect of osteoblastic insufficiency. *Calcif Tissue Int*, 1987, 41: 303-306.
- 6 Szulz P, Chapuy M-C, Meunier PJ, et al. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture: a three-year follow-up study. *Bone*, 1996, 18: 487-488.
- 7 Knapen MHJ, Kruseman ACN, Wouters RSM, et al. Correlation of serum osteocalcin fractions with bone mineral density in women during the first 10 years after menopause. *Calcif Tissue Int*, 1998, 63: 375-379.

(上接第72页)

- steroids. *Chest*, 1994, 105: 1722.
- 14 Laroche H, Arlet J, Mzaieres B. Osteonecrosis of the femoral and humeral heads after intraarticular corticosteroid injections. *J Rheumatol*, 1990, 17: 549.
- 15 Schwartzman MS, Franck WA. Vitamin D toxicity complicating the treatment of senile, postmenopausal and glucocorticoid-induced osteoporosis. *Am J Med*, 1987, 82: 224.
- 16 Sambrook P, Birmingham J, Kelly P, et al. Prevention of corticosteroid osteoporosis: a comparison of calcium, calcitriol and calcitonin. *N Engl J Med*, 1993, 328(24): 1747.
- 17 Lueng M, Picado C, Del Rio L, et al. Treatment of steroid-induced osteopenia with calcitonin in corticosteroid-dependent asthma, a one-year follow-up study. *Am Rev Respir Dis*, 1990, 142: 104.
- 18 Nishioka T, Kurayama H, Yasuda T, et al. Nasal administration of salmon calcitonin for prevention of glucocorticoid-induced osteoporosis in children with nephrosis. *J Pediatr*, 1991, 118(5): 703.
- 19 Adachi JD, Bensen WG, Brown J, et al. Intermittent etidronate therapy to prevent corticosteroid-induced osteoporosis. *N Engl J Med*, 1997, 337: 382-387.
- 20 Reid IR, King AR, Alexander CJ, et al. Prevention of steroid-induced osteoporosis with 3-amino-1-hydroxypropylidene-1, 1-bisphosphonate (APD). *Lancet*, 1988, 1: 143.
- 21 Gallacher SJ, Ferner AK, Anderson K, et al. Intravenous pamidronate in the treatment of osteoporosis associated with corticosteroid dependent lung disease: an open pilot study. *Thorax*, 1992, 47: 932.
- 22 Rico H, Cabranes HA, Hernandez ER, et al. Reversion of the steroid-induced disease of serum osteocalcin with sodium fluoride. *Clin Rheumatol*, 1991, 10(1): 10.