

双侧卵巢切除山羊不同时间段 血生化指标的变化

陈槐卿 李良 吴文超 田卫 东云华 陈琪 郑虎 翁玲玲

摘要 动态观察山羊假手术组(Sham)和双侧卵巢切除组(OVX)在术前、术后3月、6月、12月和18月不同时间段血清骨特异性碱性磷酸酶(B-ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)、血清骨钙素(BGP)、血清磷(P)、血清钙(Ca)的变化规律,以及术后12月血清雌二醇(E_2)水平的改变和术后6月、18月子宫与阴道重量的变化。结果显示:Sham组术后18月B-ALP水平明显高于术前($P < 0.01$),其余各时间段相比差异无显著性($P > 0.05$)。Sham组中TRAP、P、Ca各时间段亦无明显改变($P > 0.05$);而BGP在术后3月下降,明显低于术前($P < 0.05$),以后逐渐升高,恢复到术前水平。OVX组B-ALP在术后3月出现增高,但与术前相比差异无显著性($P > 0.05$);术后6个月B-ALP迅速增高,比术前升高167%($P < 0.01$);此后B-ALP仍缓慢上升,至术后18个月比术前升高219%($P < 0.01$)。OVX组术后6月、12月和18月与同时间段Sham组相比,其B-ALP水平差异有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。OVX组中TRAP在术后3月比术前明显增高($P < 0.05$);术后6月增高最为明显($P < 0.01$),与同时间段Sham组相比也明显增高($P < 0.05$)。OVX组血清P在术后3月、12月比术前明显增高($P < 0.05$);但血清Ca各时间段变化不明显($P > 0.05$)。Sham组术后12月血清 E_2 水平明显高于同时间段OVX组($P < 0.01$)。Sham组术后6月子宫明显重于OVX组($P < 0.01$),术后18月子宫和阴道重量也明显比同时间段OVX组重($P < 0.01$);而OVX6月组的子宫重量明显重于OVX18月组($P < 0.05$)。本实验结果说明OVX组在卵巢切除后6月其破骨细胞与成骨细胞功能活性明显增加,骨转换率增高,这与临床绝经后骨质疏松的骨代谢属于高转换型相符合。同时也说明OVX组中卵巢切除术是成功的。

关键词 卵巢切除山羊 生化指标

Changes of blood biochemical parameters in ovariectomized goats at regular intervals

Chen Huaiqing, Li Liang, Wu Wenchao, et al

Biomedical Engineering Research Unit, West China University of Medical Science, Chengdu 610041, China

Abstract Objective To investigate the changes of serum B-ALP, TRAP, BGP, E_2 , Ca and P in ovariectomized goats at regular intervals. **Methods** Twenty female goats, two years old, were randomized into two groups: the sham operated ($n=5$) and the ovariectomized (OVX) groups. The OVX group was further divided into three subgroups, OVX 6 months ($n=5$), OVX 12 months ($n=5$) and OVX 18 months ($n=5$) groups. Blood was drawn from the external jugular vein in all groups before ovariectomy, and at 3, 6, 12 and 18 months after ovariectomy, some biochemical parameters were examined, including the concentrations of bone specific alkaline phosphatase (B-ALP), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), osteocalcin (BGP), estradiol (E_2), Ca and P in serum. **Results** The level of B-ALP in the

sham operated group was slightly increased at 6 month after operation and remained at the level at one and half years after operation. This change may be related with increase in body weight of the goats. Other biochemical parameters maintained relatively constant in the sham operated group throughout the whole course. The levels of B-ALP and TRAP were obviously increased in the OVX group at 6 month after ovariectomy and remained at this level at one and half years after ovariectomy. This increasing amplitude and rate in the OVX group were much higher than those in sham operated group. The level of E_2 in serum and the weight of uterus in the OVX groups were lower than those in the sham operated group at 6 month, one year and one and half years after operation. **Conclusion** The bone metabolism after ovariectomy is of high turnover pattern, which is consistent with the condition of postmenopausal osteoporosis of women. The results also support that the ovariectomized goat can be used as an animal model of osteoporosis

Key words Ovariectomized goats Biochemical parameters

1 前言

绝经后骨质疏松是一种全身性、老年性的退行性病变。由于雌激素降低,导致骨形成与骨吸收偶联失平衡。而骨代谢过程中,成骨细胞与破骨细胞的功能活性,骨基质的变化及骨矿物质的变化,又可引起血清中一系列生化改变^[1]。因此,我们在前期工作基础上^[1],动态观察了双侧卵巢切除山羊骨质疏松模型不同时间段骨特异性碱性磷酸酶(B-ALP)、血清骨钙素(BGP)、抗酒石酸性磷酸酶(TRAP)和血钙(Ca)、血磷(P)的变化规律,以及术后12月血清雌二醇(E_2)水平的改变和6月、18月子宫与阴道重量的变化。以间接了解山羊卵巢切除后雌激素的变化和成骨细胞、破骨细胞功能活性的变化。

2 材料与方 法

2.1 实验分组:选用2岁左右健康雌性成都麻羊20只,平均体重28kg左右,随机分为假手术组(Sham)5只;双侧卵巢切除组(OVX)15只;OVX组又随机分成6个月、12个月、和18个月3个小组,每组各5只。

2.1.1 OVX组:在消毒无菌条件下,用动物专用麻药846肌注麻醉。经腹腔切除双侧卵巢。术后给予青霉素肌注治疗1周。药物治疗组在术后6个月给予药物治疗。

2.1.2 Sham组:按OVX组的方法打开腹腔,

观察卵巢、输卵管及一般情况,但不切除卵巢。术后给予青霉素肌注治疗1周。

2.2 血标本制备

分别于切除双侧卵巢前、切除双侧卵巢后3个月、6个月、12个月、18个月抽取各组山羊颈静脉血液。分离血清,-70℃低温保存备用。

2.3 测试方法

2.3.1 采用放免法测定BGP(药盒由北京东亚免疫技术研究所提供)、 E_2 (药盒由天津德普免疫技术公司提供)。采用对硝基苯磷酸二钠法测TRAP(酶试剂盒由北京化工厂提供)。采用邻-甲酚酞络合酮法测血Ca。采用直接紫外光法测血清P。

2.3.2 采用亲和沉淀法测B-ALP。麦胚凝集素(对glcNAC₂, NeuNAC₂特异)由Sigma公司提供。取血清100 μ l至小试管内,加入20g/L Triton X-100 5 μ l,摇匀,置37℃恒温水浴箱保温30分钟,取出小试管加入麦胚凝集素100 μ l,摇匀,再置37℃恒温水浴箱保温30分钟;2000g离心15分钟,弃上清液,用SDS200 μ l溶解沉淀,置HTACHI 7170A全自动生化分析仪测定B-ALP活性。重复性批内变异系数CV=6.12%;批间变异系数CV=6.40%^[1]。

2.4 子宫阴道标本制备:处死动物后,剥离干净子宫与阴道,称湿重。

3 结果

3.1 Sham组和OVX组不同时间段血清B-

ALP、TRAP、BGP、和P变化见图1、图2、图3和图4。

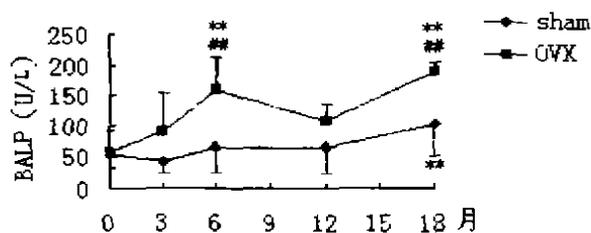


图1 不同时间段 Sham 组和 OVX 组血清 B-ALP 变化

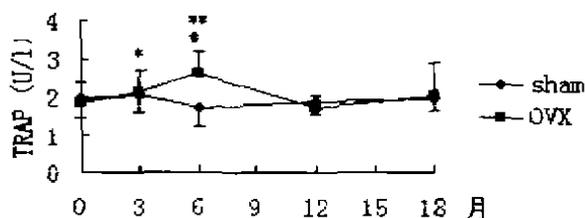


图2 不同时间段 Sham 组和 OVX 组血清 TRAP 变化

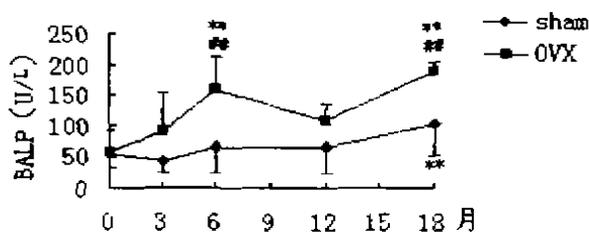


图3 不同时间段 Sham 组和 OVX 组血清 BGP 变化

3.1.1 Sham 组术后3个月 B-ALP 有一下降趋势,术后6个月 B-ALP 逐渐升高,恢复到术前水平,并维持到术后12个月,各时间段与术前相比差异无显著性 ($P > 0.05$); 术后18个月,则明显高于术前 ($P < 0.01$)。而 OVX 组 B-ALP 在术后3个月出现增高,但与术前相比差异无显著性 ($P > 0.05$); 术后6个月 B-ALP 迅速增高,比术前升高 167%; 此后 B-ALP 仍缓慢上升,至术后18个月比术前升高 219%; 术后6个月和18个月的 B-ALP 与同时间段

Sham 组相比差异有显著性 ($P < 0.01$), 见图1。从图1可以看出,OVX 组中 B-ALP 的上升幅度和上升速率都远远大于 Sham 组。

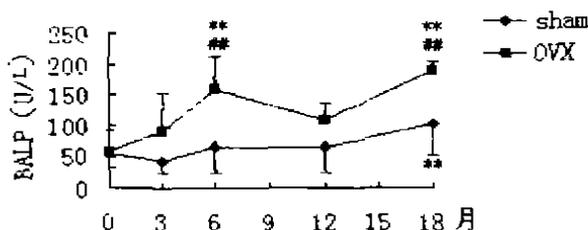


图4 不同时间段 Sham 组和 OVX 组血清 P 变化

- $P < 0.05$, * $P < 0.01$, 与术前相比;
" $P < 0.05$, " $P < 0.01$, 与相应时间段的 Sham 组相比

3.1.2 Sham 组术后 TRAP 各时段间变化差异无显著性 ($P > 0.05$)。而 OVX 组在术后3个月 TRAP 比术前明显增高 ($P < 0.05$), 到术后6个月增高最为明显 ($P < 0.01$), 与同时间段 Sham 组相比差异亦有显著性 ($P < 0.05$); 术后12个月恢复正常水平, 至术后18个月, 与术前相比差异无显著性 ($P > 0.05$), 见图2。

3.1.3 Sham 组 BGP 水平在术后3个月出现一低值, 与术前相比差异有显著性 ($P < 0.05$)。术后6个月 BGP 水平逐渐升高, 恢复到术前水平, 并维持该水平至术后18个月, 各时间段之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。OVX 组中 BGP 水平在术后3个月比术前下降 43%, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 以后缓慢升高, 术后6个月仅比术前下降 32%; 术后12个月逐渐增高, 恢复到术前水平, 并持续至术后18个月, 见图3。

3.1.4 Sham 组的血清 P 和 Ca 在各时间段无明显变化 ($P > 0.05$); OVX 组的血清 P 在术后3个月和术后12个月分别高于术前, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 见图4。而 OVX 组血清 Ca 各时间段无明显变化 ($P < 0.05$)。Sham 组和 OVX 组之间在各时间段相比其 P 和 Ca 差异无显著性 ($P > 0.05$)。

3.2 Sham 组和 OVX 组血清 E_2 和子宫阴道重量变化见表1。

表1 Sham组和OVX组血清E₂和子宫阴道重量变化

分组	E ₂ (pg/ml)		子宫重量(g)				阴道重量(g)			
	12月		6月		1.5月		6月			
	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$		
Sham	5	5.68 ± 1.13	—	—	5	79.18 ± 25.53	—	—	5	19.34 ± 4.63
OVX	5	3.32 ± 0.73*	4	17.4 ± 6.6	5	9.00 ± 2.19**	—	—	5	5.29 ± 1.64

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与 Sham 组相比, # $P < 0.05$, 与 OVX 6 月组相比

从表1中可以看出,Sham组术后12个月的血清E₂明显高于同时间段OVX组,差异有显著性($P < 0.05$)。Sham组术后18个月子宫和阴道重量明显比同时间段OVX组重,差异有显著性($P < 0.01$)。而OVX组6个月的子宫重量大于其18个月的子宫重量($P < 0.05$),但两者的阴道重量差异不明显($P > 0.05$)。

4 讨论

骨转换生化指标对于骨质疏松等代谢性骨病的诊断,预测危险因素及疗效,都有重要意义^[1,2]。在本实验中,术后3月Sham组BGP水平降低,与术前相比差异无显著性($P > 0.05$)。这可能与季节有关。因为我们实验于9月底开始,而术后3月这段时间处于山羊的低代谢期,在此阶段骨的代谢降低,骨转换率下降。以后随季节变暖,BGP逐渐升高,至术后6月恢复术前水平,并持续保持在该水平上。而Sham组术后18个月B-ALP水平明显高于术前($P < 0.01$),这种变化可能与山羊体重增加有关,同时也与山羊的不断生长发育有关。OVX组在术后3月到6月之间TRAP明显增高,其增高先于B-ALP的增高。以后由于破骨吸收过程中产生一系列细胞因子的作用,又促进成骨活性增强,使OVX组中的B-ALP的水平大幅度增高,在术后6个月、12个月和18个月分别比术前增加167%、79%和219%,差异有显著性($P < 0.01$)。这说明OVX组在卵巢切除后6个月其破骨细胞与成骨细胞功能活性明显增加,骨转换率增高,这与临床绝经后骨质疏松的骨代谢属高转换型相符合。OVX组术后3月至6月

BGP水平的下降除了季节因素影响外,还可能与成骨作用受抑制,破骨活性增强有关。目前有资料表明,B-ALP是骨转换增强的最敏感的骨形成指标。而BGP与B-ALP的变化在临床应用中并不都是显示出平行关系^[4]。血清Ca在各时间段两组之间无明显改变。血清P在OVX组中,术后3月与术后1年比术前明显增高($P < 0.05$),但与相应时间段Sham组相比差异无显著性。OVX组中血清P的这种变化似与该组骨转换增强有关,有待进一步的实验论证。E₂水平在术后1年时,Sham组明显高于OVX组;而子宫阴道重量也明显高于OVX组。而OVX组6月的子宫重量大于其1年半的子宫($P < 0.05$),这说明OVX组中卵巢切除术是成功的。上述结果提示双侧卵巢切除山羊有关骨代谢的血液生化指标以及雌激素水平、子宫、阴道重量与绝经后妇女的相应变化相符合,进一步证明双侧卵巢切除山羊可以作为绝经后骨质疏松的大动物模型。

参 考 文 献

- 1 Robey PG, Boskey AL. The biochemistry of bone. In: Marcus R et al. eds, Osteoporosis, 1996, Academic Press, 95-156.
- 2 薛延. 骨质疏松症的生化诊断. 中国骨质疏松杂志, 1995, 1(1): 58-62.
- 3 李良, 陈槐卿, 等. 建立骨质疏松山羊模型初探. 中国骨质疏松杂志, 1994, 4(2): 12-16.
- 4 周学瀛, 等. 骨转换生化指标及骨质疏松遗传基础. 全国代谢骨病学术研讨会论文集, 1998年11月, 47-49.
- 5 Behr W, Barnert J. Quantification of bone alkaline phosphatase in serum by precipitation with wheat-germ lectin: a simplified method and its clinical plausibility. Clin Chem, 1986, 32(10): 1960-1966.