

晚期糖化终末产物在老年大鼠骨质疏松发病中的作用

孔德娟 陈永春 李恩 刘昆

[摘要] 目的 探讨晚期糖化终末产物(AGE)在老年大鼠骨质疏松发病中的作用。方法 选用20月龄老年大鼠和3月龄大鼠,测定其骨密度及骨胶原中晚期糖化终末产物的含量及血、尿生化指标。结果 老年大鼠骨密度明显低于3月龄大鼠($P<0.05$),而骨胶原中晚期糖化终末产物的含量明显升高($P<0.001$)。同时发现老龄组大鼠血清甲状旁腺激素(PTH)明显升高($P<0.05$),尿钙与肌酐比值升高($P<0.02$),而尿磷与肌酐比值降低($P<0.05$)。结论 骨胶原中随年龄增加的晚期糖化终末产物,通过多种途径导致骨形成降低,骨吸收相对增加而致骨密度下降。PTH升高并非低血钙引起,而与AGE升高有关。

[关键词] 晚期糖化终末产物 老年性骨质疏松 骨密度 甲状旁腺激素

Effects of advanced glycosylation end products in pathogenesis of senile osteoporosis Kong Dejuan, Chen Yongchun, Li En, et al. Department of Biochemistry, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

[Abstract] **Objective** To explore the effects of advanced glycosylation end products (AGEs) in the pathogenesis of senile osteoporosis. **Methods** twenty-month-old rats and three-month-old rats were used in this study. Bone mineral density, content of AGEs in bone collagen, and serum and urine biochemical indexes were determined. **Results** The content of AGEs in senile rat bone collagen was higher than that in young group ($P<0.001$). Compared with the young group, lumbar bone mineral density in the senile rats was significantly reduced ($P<0.05$), serum levels of parathyroid hormone (PTH) significantly increased ($P<0.05$), and urine Ca/Cr levels remarkably increased ($P<0.02$). **Conclusion** Contents of AGEs in senile rat bone collagen increase with age, which results in absolute reduction of bone formation and relative increase of bone resorption by multiple ways. Increased serum PTH is not a compensatory response to hypocalcemia, but is related to increased AGEs in bone collagen.

[Key words] Advanced glycosylation end products; Senile osteoporosis; Bone mineral density; Parathyroid hormone

晚期糖化终末产物(Advanced glycosylation end products, AGEs)是糖的醛基或酮基与蛋白质等的自由氨基之间发生的一系列非酶糖

化反应,最终生成的一类具有特征性荧光物质。^[1]该反应过程称为非酶糖化作用。目前研究表明,随着年龄的增加,在一些含有自由氨基较多的组织中晚期糖化终末产物增加^[2,3]。骨的有机基质中90%为I型胶原,含有大量的自由氨基,是非酶糖化的好发部位。临床研究发现血透患者升高的晚期糖化终末产物——AGEs修饰的 β_2 微球蛋白(AGEs- β_2 M)与其沉积部位的骨

作者单位:050017 石家庄,河北医科大学生化教研室

作者简介:孔德娟,1991年毕业于河北医科大学生化专业,获医学硕士学位。1999年6月通过论文答辩,获医学博士学位,现任生化教研室讲师

质疏松有关^[1-3]。本研究采用自然衰老大鼠来探讨晚期糖化终末产物在老年骨质疏松发病中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物及处理

实验选用 19 月龄 SD 大鼠 10 只雌雄各半,作为老龄大鼠组。另选 10 只 2 月龄 SD 大鼠,作为低龄组。常规喂养 1 个月后,禁食 24h,收集 24h 尿液待测。将全部大鼠经股动脉放血处死,离心、收集血清。取腰 2~4 做骨密度检测,取右侧股骨和胫骨,剔除软组织,放入-70℃冰箱保存,用于测定骨胶原中晚期糖化终末产物的含量。

1.2 骨胶原中晚期糖化终末产物的测定

从-70℃冰箱取出骨标本后,沿骨纵轴剪开,用冰冷的 PBS(pH7.4)冲洗骨髓腔数次直至冲洗液 PBS 无红色为止。滤纸吸干水分后,放入液氮中,30min 后取出,在研钵中用力研磨,过 20 目不锈钢筛,称取 20 目以下的骨颗粒 20mg,置 0.5mol/L EDTA (pH7.4)中,4℃脱钙 72h,每 24h 换液一次。脱钙骨粉经 5ml 氯仿:甲醇(2:1, V:V)脱脂 12h。加入甲醇 2ml,蒸馏水 0.5ml,650g 离心,10min。吸弃上清,沉淀经 5ml 甲醇洗 2 次,去离子水洗 3 次,再用含 0.1mol/L CaCl₂ 的 0.02mol/L Hepes 缓冲液(buffer H pH7.5)洗 2 次。Buffer H 中 4℃过液。离心,除去 Buffer H,骨颗粒沉淀重新悬浮在 1.0ml 含 280U VII 胶原酶(Sigma 公司产品)的 Buffer H 中,同时加入 2μl 氯仿和 2μl 甲苯以防细菌生长,水浴摇床中 37℃消化 24h。10 000g 离心 5min。以激发波长 370nm,发射波

长 440nm 处测定上清中的荧光强度(日本日立公司 F4500 荧光分光光度计),含胶原酶 VII 的 buffer H 作空白对照。上清再经 6N 盐酸 110℃水解 24h 后,用于羟脯氨酸的测定。以胶原中羟脯氨酸的含量为 14%,计算出胶原含量。AGEs 的含量以每毫克胶原中相对荧光强度表示。

1.3 血、尿生化指标的测定:血甲状旁腺激素(PTH)和降钙素(CT)采用放射免疫分析法,操作按试剂说明书进行。血碱性磷酸酶(ALP)采用氨基萘替比林测酚法。羟脯氨酸采用氯氮 T 氧化法。

1.4 骨密度测定:SD 1000 骨矿测定仪,测定大鼠第三腰椎骨密度。

1.5 统计学分析:所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据用计算机统计软件 PSI 运算处理。

2 结果

2.1 各组大鼠骨密度和骨胶原中 AGEs 含量的变化

从表 1 可以看出,老龄组大鼠与低龄组大鼠比较,骨密度明显降低($P<0.05$),通过测定骨胶原中晚期糖化终末产物(AGEs)相对含量,老龄组大鼠与低龄大鼠比较明显升高($P<0.001$),两组大鼠血糖相比较差异无显著性。

2.2 各组大鼠血、尿生化指标的变化

老龄组大鼠与低龄组大鼠比较血清 PTH 显著升高($P<0.05$),血清 ALP、血钙、血磷和血清 CT,两组相比没有统计学差异。老龄组大鼠尿钙与尿肌酐比值明显升高($P<0.02$)、尿磷与尿肌酐比值老龄组与低龄组比较显著降低($P<0.05$)。尿羟脯氨酸与肌酐比值两组之间无统计学差异,见表 2 和表 3。

表 1 各组大鼠骨密度、血糖、骨胶原中 AGEs 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	骨密度(g/cm ³)	血糖(mmol/L)	AGEs(RF/mg 胶原)
低龄组	10	0.367±0.07	6.6±0.6	38.30±10.6
老龄组	9	0.297±0.06*	5.7±0.6	87.99±25.29**

注:老龄组与低龄组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.001$

表 2 各组大鼠血清 PTH、CT、ALP、Ca、P 变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PTH(pg/ml)	ALP(KU)	Ca(mmol/L)	P(mmol/L)	CT(pg/ml)
低龄组	10	61.2±61.5	42.7±9.2	2.5±0.7	2.5±0.7	265.0±97.7
老龄组	9	106.3±15.1*	50.3±30.3	2.6±0.2	2.3±0.4	376.8±130.7

注:老龄组与低龄组比较 * $P<0.05$

表 3 各组大鼠尿液生化指标的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	尿 Ca/d(mg)	尿 P/d(mg)	尿 HOP/d(μmol)	尿 Ca/Cr(mg/g)	尿 P/Cr(mg/g)
低龄组	10	0.57±0.47	7.2±3.7	1.66±1.25	15.56±20.0	509.25±187.55
老龄组	8	1.23±1.03	5.9±1.8	1.23±0.89	72.72±20.86**	392.02±165.26*

注:老龄组与低龄组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.02$

3 讨论

老年性骨质疏松属低转换型,即反映骨形成及骨吸收的指标均偏低。这是由于随着年龄的增长,骨形成绝对不足而骨吸收相对增加所致。而决定骨形成和骨吸收的是成骨细胞和破骨细胞的数量及活性。随着年龄的增长引起成骨细胞活性降低和或数量减少的因素成为决定老年性骨质疏松的主要原因。

许多研究发现一类被称作糖化终末产物的物质随着年龄的增长在体内皮肤等组织积累增多^[1-3]。糖化终末产物是体内糖的醛基或酮基与蛋白质、脂类等的自由氨基首先形成可逆的希夫式碱,然后经过重排,氧化和脱水等反应,最后形成稳定的具有特征性荧光的一类物质。正常情况下该类物质是体内组织重建及内环境稳定所必需,但过度积累则会引起许多病理变化^[6]。骨胶原是含有较多自由氨基的长寿命蛋白,因此,晚期糖化终末产物很容易在此形成并积累。而胶原蛋白上 AGE 的形成则改变了这种蛋白质的生理功能,如细胞对基质蛋白的粘附能力降低,而成骨细胞对骨胶原蛋白的粘附是成骨作用启动的先决条件。另一方面 AGEs 还可以和细胞膜上的特异受体结合促使该细胞合成和释放细胞因子和生长因子,如白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)和胰岛素样生长因子等,从而改变细胞间的信息传递,影响

细胞的增殖与分化^[7-10]。研究表明高浓度的 AGEs 蛋白对成骨细胞的促增殖作用减弱,促分化作用延迟,成骨细胞数量减少,活性降低,导致骨形成降低^[11]。而 AGEs 引起的 IL-1 和 IL-6 释放增加可导致骨吸收增加。本实验通过测定大鼠骨胶原中 AGEs 的含量,发现老龄大鼠显著高于低龄大鼠,而骨密度明显低于 3 月龄大鼠。

本实验发现,PTH 在老年大鼠组较低龄组升高且有显著差异,但尿钙同时增加,说明 PTH 分泌增加并非由于低血钙所引起,而是由于其他原因所致。有研究表明:肾脏 1-α 羟化酶非酶糖化(即生成 AGE-1-α 羟化酶)后,因其活性降低,不能使 VitD₃ 转变为 1,25-(OH)₂D₃,从而使 1,25-(OH)₂D₃ 的水平下降。作为 1,25-(OH)₂D₃ 的“促激素”PTH,此时将反馈性地分泌增加,达到调节 1-α 羟化酶活性的目的。老年大鼠 PTH 虽然增加,但反应骨代谢的指标-血 ALP 和尿羟脯氨酸并没有显著变化。原因可能是随着年龄的增长,AGEs 在骨胶原上积累增多,使 I 型胶原发生交联,这种结构的改变导致其对蛋白水解酶高度抵抗^[12,13]。而 PTH 促进骨吸收是通过刺激破骨细胞释放各种蛋白水解酶,分解骨的有机基质^[14]。因此,虽然 PTH 升高,却不能充分发挥骨吸收作用,这也是老年性骨质疏松呈低转换型的原因。

综上所述,老年性骨质疏松的发病可能是

体内 AGEs 的积累增加,通过多种途径使成骨作用降低,骨吸收作用相对增加,从而导致骨质疏松。

参 考 文 献

- 1 James T Wu. Advanced glycosylation end products: a new disease marker for diabetes and aging. *J Clin Lab Analy*, 1993;7: 252-255.
- 2 Paul RG, Bailey AJ. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. *Int J Biochem Cell Biol*, 1976;240: 1297-1310.
- 3 Munch G, Thome J, Foley P, et al. Advanced glycation end products in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev*, 1997;23: 134-144.
- 4 Miyata T, Maeda K. New aspect in the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis: role of β_2 -microglobulin modified with advanced glycation end products in bone and joint destruction. *Nephrol Dial Transplant*, 1996;11(Suppl 2): 140-143.
- 5 Miyata T, Sprague SM. Advanced glycation of β_2 -microglobulin in the pathogenesis of bone lesions in dialysis-associated amyloidosis. *Nephrol Dial Transplant*, 1996;11(Suppl 3): 86-90.
- 6 Vlassara H, Brownlee M, Managuli K, et al. Carboxyl TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissues remodeling. *Science*, 1988;240: 1546-1548.
- 7 Miyata T, Kawai R, Taketomi S, et al. Possible involvement of advanced glycation end products in bone resorption. *Nephrol Dial Transplant*, 1996;11(Suppl 3): 54-57.
- 8 Miyata T, Inagi R, Iida Y, et al. Involvement of β_2 -microglobulin modified with advanced glycation end products in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis: induction of human monocyte chemotaxis and macrophage secretion of tumor necrosis factor- α and interleukin-1. *J Clin Invest*, 1994;93: 724-728.
- 9 Iida Y, Miyata T, Inagi R, et al. β_2 -Microglobulin modified with advanced glycation end products induces interleukin-6 from human macrophages: role in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994;201: 1235-1238.
- 10 Kirstein M, Aston C, Hintz R, et al. Receptor specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycation end products-modified proteins. *J Clin Invest*, 1992;90: 159-166.
- 11 孔德娟,李恩,陈永春,等.晚期糖化终末产物对大鼠成骨细胞增殖和分化的影响. *中国骨质疏松杂志*, 1999;5(3): 32-35.
- 12 朱宪彝,朱德民,郭世绶,等.代谢性骨病学.天津:天津科学技术出版社出版,1989,326-329.
- 13 Schmdier SL, Kohn RR. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glycosylation of human skin collagen. *J Clin Invest*, 1981;67: 1630-1635.
- 14 Meng J, Sakata N, Takabayashi S, et al. Advanced glycosylation end products of the Maillard reaction in corneal pepsin-insoluble and pepsin-soluble collagen from diabetic rats. *Diabetes*, 1996;45: 1937-1943.