

重组人生长激素治疗大鼠卵巢切除后骨量丢失的研究

黄遂柱 王宏耀 赵永强 廖文胜 戴克戎

[摘要] 目的 研究重组人生长激素对卵巢切除后大鼠骨量丢失的治疗作用。方法 大鼠卵巢切除后3个月开始接受不同剂量生长激素治疗,8周后处死。采用骨密度测定,骨组织计量学分析,血清生化指标测定等观察生长激素对实验性骨质疏松症的治疗作用。结果 生长激素使骨质疏松大鼠腰椎骨密度增加,股骨中段皮质骨显著增厚,腰椎体小梁骨体积增加而且小梁连结性明显改善。重组人生长激素可促进骨质疏松大鼠类胰岛素生长因子-1合成增加。结论 重组人生长激素能显著增加骨质疏松大鼠松质骨和皮质骨的骨量并改善结构。生长激素的作用和剂量有关。

[关键词] 生长激素 骨质疏松症 骨密度 骨组织计量学 类胰岛素生长因子-1

Recombinant human growth hormone therapy for experimental osteoporosis of rats Huang Suizhu, Wang Hongyao, Zhao Yongqing, et al. Department of Orthopedics, Henan Provincial Hospital, Zhengzhou 450003, China

[Abstract] **Objective** To study the effects of recombinant human growth hormone on skeleton of ovariectomized rats with obvious bone loss. **Methods** Adult rats began to receive different doses of growth hormone 3 months after ovariectomy and were sacrificed after 8 weeks of treatment. Bone mineral density and serum insulin-like growth factor-I were measured, bone histomorphometry was used to investigate the effects of growth hormone on osteoporotic rat skeleton. **Results** Bone mineral density of lumbar spines and the thickness of middle femur cortex were greatly improved. Vertebral trabecular bone volume significantly increased and trabecular connectivity restored. Recombinant growth hormone also improved serum level of insulin-like growth factor-I. **Conclusion** Recombinant growth hormone can restore bone mass of osteoporotic rats and improved bone architecture. The effects are dose-related.

[Key words] Growth hormone; Osteoporosis; Bone mineral density; Bone histomorphometry; Insulin-like growth factor-I

绝经后骨质疏松症是危害老年妇女身体健康的常见病,由于骨量严重丢失,骨结构明显退变,松质骨及皮质骨力学强度极度降低,骨折风

险大大增加。目前临床上常用的药物如雌激素、降钙素等都是通过降低骨转换,减少骨吸收而阻止骨量进一步丢失,并无增加骨量、恢复骨结

作者单位:450003 河南省人民医院骨科(黄遂柱、赵永强);义马矿务局总医院骨科(王宏耀);上海第二医科大学附属第九人民医院骨科(廖文胜、戴克戎)

作者简介:黄遂柱,1990年毕业于华北煤炭医学院医疗系并获学士学位。1992~1995年在河南医科大学攻读并获得骨科学硕士学位。1995~1998年在上海第二医科大学攻读并获得骨科学博士学位。1998年至今在河南省人民医院骨科工作

构的作用,因此对严重的骨质疏松症疗效较差^[1]。生长激素是垂体分泌的一种促进生长发育的激素,近来发现对成熟骨的代谢也有重要作用^[2]。本研究采用卵巢切除大鼠作为绝经后骨质疏松症动物模型,探讨生长激素对实验性骨质疏松的治疗作用及其作用机理。

1 材料和方法

1.1 建立动物模型

60只6月龄健康雌性SD大鼠(清洁级动物)随机均分为6组:对照组(SO组)、卵巢切除组(OVX组)、雌二醇治疗组(E₂组)、低剂量生长激素治疗组(GH₁组)、中剂量生长激素治疗组(GH₂组)、高剂量生长激素治疗组(GH₃组)。除SO组外,其他各组动物行双侧卵巢切除(SO组仅做开腹手术)。大鼠摄食为灭菌的标准饲料(含钙1.02%、磷0.76%、维生素D2000 IU/kg)。

1.2 动物给药方法

各组大鼠术后3个月开始背部皮下注射下列药物;SO组和其他各组同等体积的生理盐水;E₂组应用苯甲酸雌二醇1.5 μg/(kg·d⁻¹);GH₁组应用重组人生长激素(rh-GH)0.15 μg/(kg·d⁻¹);GH₂组应用 rh-GH1.0 μg/(kg·d⁻¹);GH₃组应用 rh-GH3.0 μg/(kg·d⁻¹)。苯甲酸雌二醇为上海第九制药厂生产,所用剂量为接近生理剂量的雌激素。rh-GH由中科院上海细胞研究所提供(1 mg=3 IU)。GH₁组所用剂量为大鼠垂体切除后需要补充生长激素的生理剂量^[3],GH₂组为预实验中能够显著引起大鼠体长改变的药理剂量, GH₃组为中间剂量。各组动物于治疗8周后处死,取材作如下检测。

1.3 骨密度测定

大鼠处死后迅速取出第4~6腰椎,尽量去除软组织,但保留椎弓等附件。同时采取右股骨,剥除周围软组织,采取的标本均在-40℃冰箱内保存。应用Hologic-2000型DEXA骨密度仪测量,精确度1%,扫描速度60 mm/sec,分

辨率1.0 mm·1.0 mm,扫描宽度20.0 cm。结果以均数±标准差表示,差异性通过组间 t 检验判断。

1.4 骨组织计量学分析

大鼠处死后立即取出L₁椎体,去除附件及附着的软组织,立即放入Millonig's液中固定24小时。乙醇逐级脱水,每次24 h,最后二甲苯透明4 h,甲基丙烯酸甲酯包埋。在Polycut-s型硬组织切片机上切片,沿椎体中部冠状面切4 μm切片。甲苯胺蓝染色,参照Parfitt等人骨小梁参数计量方法^[4],借助VIDAS图像分析系统进行测量,参数包括松质骨体积(Cn-BV/TV)、类骨质表面(OS/BS)、骨吸收表面(ES/BS)、小梁连结点数(N.Nd)和游离末端指数(N.Tm)。结果以均数±标准差表示,差异性通过组间 t 检验进行判断。

1.5 股骨中段皮质骨厚度测量

大鼠左股骨中段取出后立即放入Millonig's液固定24 h,酒精逐级脱水,二甲苯透明4 h,甲基丙烯酸甲酯包埋;polycut-s型硬组织切片机上切取50 μm厚切片,方向和股骨长轴垂直,不染色直接用中性树胶封片,普通光镜及偏光显微镜下观察并测量皮质总厚度和外层皮质、内层皮质的厚度,测量时分别取左、右、前、后4点,最后计算平均值。数据以均数±标准差表示,组间差异性用 t 检验进行判断。

1.6 血清中rh-GH和类胰岛素生长因子I(insulin-like growth factor-I, IGF-I)水平测定 血清rh-GH水平采用上海生物制品研究所的rh-GH放免药盒测定。IGF-I水平采用美国DSL-2900大鼠专用放免诊断药盒测定。大鼠血清测定前需经过抽提(50 μl样本+200 μl抽提液,25℃,放置30 min混匀),抽提后的血清按常规步骤进行IGF-I水平测定。数据以均数±标准差表示,差异性通过 t 检验进行判断。

2 结果

2.1 骨密度测定

大鼠卵巢切除术后5个月,椎体骨密度明

显低于对照组 (OVX 组与 SO 组比较, $P < 0.05$), 而同期股骨中段骨密度值和对照组比无明显变化 ($P > 0.05$)。雌激素治疗组椎体骨密度有一定恢复, 而股骨中段骨密度没有明显变化。GH 治疗组椎体骨密度有不同程度恢复, 高剂量治疗组 (GH₃ 组) 股骨中段骨密度也显著增加 (表 1)。

表 1 GH 对卵巢切除大鼠椎体及股骨中段 BMD 的影响 (g/cm²)

分组	L4~6 骨密度	股骨中段骨密度
SO	0.1367±0.0083	0.1046±0.0056
OVX	0.1238±0.0058*	0.1043±0.0039
E ₂	0.1293±0.0019	0.1061±0.0086
GH ₁	0.1267±0.0057	0.1091±0.0045
GH ₂	0.1381±0.0117▲	0.1109±0.0060
GH ₃	0.1411±0.0108▲	0.1121±0.0052▲

注: 与 SO 比较, * $P < 0.05$, 与 OVX 比较, ▲ $P < 0.05$

2.2 骨组织计量学分析

松质骨骨量的变化表现出, OVX 组松质骨体积 (Cn-BV/TV) 明显下降, 各治疗组 Cn-BV/TV 均有一定程度, GH₂ 组和 GH₃ 组增加显著 (与 OVX 比较, $P < 0.01$), 尤其 GH₂ 组增

加最显著。反映骨转换的指标, OVX 组类骨质表面 (OS/BS) 和骨吸收表面 (ES/BS) 均显著增加, 应用雌激素 (E₂ 组) 后两种参数又显著降低, GH 治疗组上述两种参数和 OVX 组相比无显著差异。反映松质骨结构的参数, OVX 组小梁连接点数 (N. Nd) 和游离末端数 (N. Tm) 也发生明显退变, GH 治疗后这两种参数均有一定程度改善, 尤其是小梁连接点数 (表 2)。

2.3 股骨中段皮质骨厚度测量

普通光镜下可见大鼠股骨中段皮质分为两部分, 外层由排列整齐的板层骨构成, 内层是一些不规则骨组成, 偶见不典型的哈佛氏系统, 这些结果和 Danielson^[1] 的报道一致。偏光镜下可以清楚地看到, 皮质骨外层胶原排列整齐, 而内层胶原排列杂乱无序, 有时呈漩涡样。卵巢切除后大鼠外层皮质厚度有所增加, 而内层皮质厚度下降更显著, 总的皮质厚度降低 ($P < 0.05$)。GH 治疗可使皮质厚度明显增加 ($P < 0.05$), 尤其是外层皮质厚度增加更为明显, E₂ 组外层皮质没有明显改变, 但内层皮质厚度较 OVX 组增加 (表 3)。

表 2 GH 治疗对卵巢切除大鼠 L₂ 椎体小梁参数的影响

分组	Cn-BV/TV (%)	OS/BS (%)	ES/BS (%)	N. Nd	N. Tm
SO	26.07±3.66	20.24±4.38	1.44±0.39	8.50±1.66	7.60±1.14
OVX	11.42±2.09▲▲	35.89±4.16▲▲	4.76±0.81▲▲	4.75±0.82▲▲	15.32±3.05▲▲
E ₂	15.03±2.47*	13.28±2.73**	0.94±0.22**	5.25±0.96	13.16±2.83
GH ₁	15.89±1.96*	35.41±4.61	3.88±0.47	5.81±1.06	13.24±2.69
GH ₂	20.26±2.96**	33.77±5.08	3.67±0.62	7.02±1.39*	12.86±2.98
GH ₃	17.89±2.73**	31.37±4.36	4.04±0.65	6.25±1.17*	13.04±3.02

注: 与 SO 比较▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与 OVX 比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 3 卵巢切除及 GH 治疗后大鼠股骨中段皮质厚度测量

分组	外层皮质	内层皮质	皮质总厚度
SO	126.48±23.59	465.63±58.30	612.30±65.25
OVX	165.34±20.52*	351.96±46.67*	517.37±54.40*
E ₂	123.66±26.40	433.25±50.01▲	575.40±62.55
GH ₁	213.15±31.33▲	395.85±48.33	609.54±84.83
GH ₂	258.36±45.69▲▲	387.69±45.65	645.31±55.44▲
GH ₃	263.61±36.10▲▲	395.42±51.42	659.92±97.37▲

注: 与 SO 组比较* $P < 0.05$; 与 OVX 组比较▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

2.4 血清中 rh-GH 和大鼠 IGF-I 水平测定

OVX 大鼠应用 rh-GH 后,血清可以测出 rh-GH,并随应用剂量的不同而有所变化(表 4)。未采用 rh-GH 治疗大鼠,测定结果为阴性,说明 rh-GH 测定药盒不能测出大鼠自身生长激素水平。卵巢切除后大鼠血清 IGF-I 水平没有明显变化,补充雌激素可使 OVX 大鼠的血清 IGF-I 水平显著下降($P<0.01$)。补充 GH 可使血清 IGF-I 水平显著提高,其变化幅度和 GH 的用量有关。

表 4 卵巢切除及 GH 治疗对大鼠 IGF-I 的影响及血清 rh-GH 测定

分组	rh-GH(ng/ml)	IGF-I(ng/ml)
SO		364.56±133.81
OVX		388.90±65.06
E ₂		180.56±18.78*
GH ₁	47.49±4.70	457.00±83.33*
GH ₂	50.09±6.10	545.15±91.79*
GH ₃	55.09±4.58	637.74±119.16**

注:与 OVX 比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3 讨论

严重的绝经后骨质疏松的治疗仍然是临床医生所面临的一大难题,为寻求能有效刺激骨形成、促进骨量恢复的药物,众多研究者仍在进行不懈的努力。早期人们曾发现氟化物可以刺激骨形成,不论临床研究还是体外实验均支持这一事实,但随后研究者就发现其所刺激形成的新骨结构不良并有成骨不全,使得新生骨的力学强度尤其是皮质骨力学强度并未提高甚至还会降低^[6,7]。因此临床上常会出现这样的结果,氟化物治疗后骨量提高了,但骨折发生率并未降低。

用生长激素治疗骨质疏松症的理论来源于一些临床和实验研究。有研究报道,老年人存在生长激素分泌功能减退,尤其是患骨质疏松症的老年人^[8]。这表明生长激素可能在骨质疏松症发生中起着一定作用。体外实验也发现,生长激素可以促进成骨细胞的分裂、增殖及其功

能^[9,10]。此外,生长激素还通过促进 IGF-I 的合成而间接发挥作用^[11]。IGF-I 已被证实有促进骨形成的作用。本实验采用 6 月龄 SD 大鼠, Kalu 和 Wronski 认为^[12,13],6~12 月龄大鼠骨量处于比较稳定的高值期,卵巢切除 3 个月后骨量就降至最低值并长期保持低值状态。因此该实验的动物模型能较好的模拟严重的绝经后骨质疏松症。一般来讲,高等动物的生长激素对低等动物有作用,反之则不然。本实验结果显示, rh-GH 可以促进骨质疏松大鼠 IGF-I 的合成,说明 rh-GH 对骨质疏松大鼠是有作用的。

传统的骨质疏松症治疗药物大都是通过降低骨转换而起作用的,而生长激素则不然。它对骨质疏松大鼠松质骨的骨转换无显著影响,但骨量却明显增加。例如,骨组织计量学研究发现生长激素治疗可使松骨体积显著增加,骨密度测量也发现治疗组腰椎骨密度显著增加。这表明,生长激素促进骨重建过程中的骨形成,从而导致骨重建正平衡,骨量得以增加。生长激素的另一特点是对皮质骨具有显著的作用。本研究结果显示,生长激素治疗使骨质疏松大鼠股骨中段皮质骨厚度明显增加,尤其是皮质外层变化最明显,而皮质外层正是皮质中结构最合理、力学强度最佳的部位。实验还发现,生长激素对皮质骨和松质骨的作用特性不同,随着剂量增大,生长激素对皮质骨的作用增强,但对松质骨的作用并未随之增加。中剂量生长激素对提高松质骨量、改善骨结构最为有效,而高剂量的生长激素对松质骨的作用不仅没有增加,而且较中剂量治疗组还有降低。而采用低剂量(生理剂量)生长激素治疗则无明显效果,说明必须采用药理剂量的生长激素才有治疗骨质疏松的作用。本实验采用两种超生理剂量生长激素治疗骨质疏松大鼠,并未发现明显不良反应。GH₂、GH₃ 组大鼠体重和 OVX 组相比无明显变化,但动物尸解结果表明,生长激素治疗可使骨质疏松大鼠体内(腹腔内)脂肪量减少,而肌肉量则有所增加。

(下转第 46 页)

在 30~40 岁到达峰值,妇女在 40 岁以后随年龄增长骨矿含量减少^[3]。妇女妊娠引起的骨密度降低可能导致骨峰值也降低,增加了绝经后发生骨质疏松的危险,并且妊娠期钙代谢与妊高症等疾病也有关系^[4]。因此,孕妇平时应增加钙的摄入量和参加适当运动,对孕妇骨密度降低应引起高度重视,骨密度测量对早期发现孕妇骨密度降低有重要意义。

参 考 文 献

- 1 程国钧,刘建立,王占力,等. 绝经与年龄对妇女骨密度丢失的影响. 中华医学杂志,1992,72:436.
- 2 王玮,郝秋芳,张香云. 355 例绝经前后妇女骨质疏松及其危险因素调查. 中华妇产科杂志,1993,28:360.
- 3 刘忠厚,潘子昂,丁石麟,等. 骨骼生长衰老规律和原发性骨质疏松症预诊的研究. 中国骨质疏松杂志,1995,1:1.
- 4 中国老年学学会骨质疏松委员会. 骨质疏松诊断标准学科组,中国人原发性骨质疏松症诊断标准(试行). 中国骨质疏松杂志,1993,5:1.
- 5 丛克家,迟绍霖,刘桂荣. 钙与妊高症. 中华妇产科杂志,1993,28:657.
- 6 中国预防医学科学院,营养与食品卫生研究所编著. 食物成份表(全国代表值),第 1 版. 北京:人民卫生出版社,1991. 132-135.
- 7 Pitkin RM, Reynolds WA, Wilkins GA, et al. Calcium metabolism in normal pregnancy: a longitudinal study. Am Obstet Gynecol, 1979, 133: 781.
- 8 李降敏,高淑云,李葵玲,等. 正常妊娠与妊高征孕妇钙代谢的研究. 中华妇产科杂志,1993,28:389.
- 9 温力,钱玉宇,钱荣立. 前臂骨中远端骨密度值差异的临床意义. 中华医学杂志,1992,72:188.
- 10 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. 275-277.