

骨形态计量学对增龄及去睾丸大鼠骨代谢的实验研究

黄连芳 李青南 陈艳 胡彬 金勳杰

摘要 目的 探讨3月半龄雄性大鼠增龄及去睾丸后骨量的变化,比较两者之间骨代谢的变化。方法 20只3月半龄SD雄性大鼠,随机分成基础对照组、年龄对照组和去睾丸组,同等条件下饲养90天。实验结束,取胫骨近端行不脱钙骨制片进行骨组织形态计量学分析。结果 年龄对照组(6月半龄)与基础对照组(3月半龄)相比,骨组织静态参数骨小梁面积百分率有下降趋势,骨的显微结构明显变差,动态参数如荧光标记周长百分率、骨形成率和单位骨小梁周长的破骨细胞数等均减少,出现骨低转换的改变。去睾丸大鼠与年龄对照组相比,静态参数在年龄对照组的基础上进一步减少(骨小梁面积百分率-50%),代表骨吸收和骨形成的动态参数值都明显增加,出现骨高转换的改变。结论 增龄的大鼠骨代谢呈低转换,有骨量丢失的趋势,去睾丸后的大鼠在增龄的基础上呈现骨高转换,而骨吸收大于骨形成,结果造成骨量的进一步丢失。

关键词 增龄 睾丸切除术 骨质疏松 骨组织形态计量学

Bone histomorphometric study of aging male and orchietomized rats

Huang Lianfang, Li Qingnan, Chen Yan, et al.

Bone Biology Laboratory, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China

Abstract Objective To study the skeletal effects of aging male rats compared with those of orchietomized (ORX) rats at 90 days after operation and to distinguish the differences between them. **Methods** Twenty 3-and-half-month-old male SD rats were randomly divided into basal control (group A, sacrificed at the beginning), aging control (group B) and orchietomized (group C) 90 days after initiation of the experiment. The proximal tibia (PTM) were processed undecalcified sections of 5 μm and 10 μm in thickness for histomorphometric analysis. **Results** There were significant changes in aging control group compared with basal control group, including decrease in trabecular bone mass and worse microstructure, resulting in low bone turnover in aging control group. ORX group had decreased trabecular bone mass (-50%) with high bone turnover, compared with matched aging group. **Conclusion** Ninety day aged and ORX rats have low and high bone turnover respectively, which result in osteoporosis; the both account for the bone loss in ORX 90-day group.

Key words Aging Orchietomy Osteoporosis Bone histomorphometry

骨质疏松症是危害老年人健康的常见病,

近年来,雄性激素与骨质疏松的关系也日渐受到人们的关注^[1,3]。但对去睾丸所致骨质疏松的骨形态计量学研究较少,特别是对增龄变化及去睾丸变化之间比较的研究,本文旨在观察年龄增长及去睾丸所致雄激素下降的骨代谢的变

化,为临床防治男性骨质疏松提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 药物:盐酸四环素,上海新亚制药厂生产,批号:89124-18,Calcein(USA)作为荧光标记物。戊巴比妥钠、乙醇、磷酸-福尔马林缓冲液、甲基丙烯酸甲酯(北京化工厂)。骨染料(Masson-Goldner Trichrome; Ponceau Fuchsin Stock; Phosphotungstic acid-Orange G; Light green, Sigma, Co. USA)。

1.2 动物:3月半龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大白鼠(广东省实验动物中心提供)。

1.3 方法:取上述SD大鼠20只,体重 293 ± 24 g,随机分为三组。A组为基础对照组(Basal),6只,实验开始时,将其杀死取材。B组为年龄对照组(Aging),7只,在2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉下,取仰卧式,碘酒、酒精消毒阴囊皮肤,纵隔旁相距1 cm各开一纵行切口,剪开鞘膜后,分别将双侧睾丸与附睾分离(不切除),然后放回阴囊,缝合切口。C组为去睾丸组(ORX),7只,行B组方法找出双侧睾丸并切除之。所有动物在同等条件下饲养,自由摄食(饲料由本院动物实验中心提供)和饮水,每周称体重一次。全部大鼠在处死前第14、13天和第3、2天分别给其皮下注射盐酸四环素(25 mg/kg)和Calcein(5 mg/kg),这样就可于骨表面形成黄色和绿色两层双荧光标记,以动态观察两次注射期间骨形成的情况。

90天后,用2%戊巴比妥钠麻醉并心脏取血处死全部大鼠,取其左侧胫骨用低速锯(Buehler Ltd, USA)将其分为三段,取胫骨上段沿胫骨粗隆行额状面切开暴露骨髓腔,再置于磷酸-福尔马林缓冲液中固定24 h后,以70%乙醇开始逐级脱水,最后用甲基丙烯酸甲酯进行不脱钙骨包埋。组织块用超薄切片机(Leica 2155德国)切成 $5 \mu\text{m}$ 的薄骨片和 $10 \mu\text{m}$ 的厚骨片。置于 40°C 干燥箱中烤2~3 h后,薄片用Goldner染色,透明后封片,用于测量破骨细胞。厚片直接透明后封片,用于测量骨小梁的变化及荧光标记。

1.4 骨组织形态计量学检测 用半自动图象数字化分析仪[包括光镜和荧光显微镜(Nikon, 日本),数字化板,电脑和形态学程序“Stereology”体视学软件(美国)],测量距胫线下1 mm处至远端4 mm范围内的骨组织的各参数。其测算参数之含义和计算公式见文献^[3]。各参数值用均数和标准差表示。各组之间的差异性用组间 t 检验进行检测。

2 结果

骨组织形态结构的变化(见附表)。

2.1 年龄变化的影响:B组(6月半龄)与A组(3月半龄)比较,骨量减少,如骨小梁面积百分率(%Tb. Ar)下降32%(P 值无显著性差异);但其他指标如:骨小梁数目(Tb. N)-45%($P < 0.01$),骨小梁间隙(Tb. Sp)+111%($P < 0.05$),骨小梁厚度(Tb. Th)+19%($P < 0.05$),都有显著性差异。代表骨形成的参数值明显减少,如荧光标记周长百分率(%L. Pm)-34%($P < 0.05$),骨矿化沉积率(MAR)-26%($P < 0.01$),骨形成率/组织参数(BFR/TV)、骨形成率/小梁面积(BFR/BV)和骨形成率/周长(BFR/BS)分别减少72%($P < 0.001$)、59%($P < 0.01$)和51%($P < 0.01$);代表骨吸收的参数值也明显减少,如单位骨小梁周长的破骨细胞数(N. OC/Tb. Pm)-53%($P < 0.05$)。其余各参数值均无显著性差异。

2.2 去睾丸对骨骼的影响:C组与B组比较,骨量明显减少,如骨小梁面积百分率(%Tb. Ar)下降50%($P < 0.05$),骨小梁数目(Tb. N)减少54%($P < 0.01$),骨小梁间隙(Tb. Sp)增加155%($P < 0.05$);代表骨形成的参数值明显增加,如荧光标记周长百分率(%L. Pm)增加59%($P < 0.01$),单位骨小梁面积(BFR/BV)和周长(BFR/BS)的骨形成率分别增加54%($P < 0.01$)和74%($P < 0.05$);代表骨吸收的参数值明显增加,如N. OC/Tb. Pm增加89%($P < 0.05$)。其余各参数值均无显著性差异。

表1 骨组织形态结构的变化

参数	单位	基础对照组 (n=6)	年龄对照组 (n=7)	去睾九组 (n=7)
%Tb. Ar	%	17.88±5.06	12.17±6.61	6.13±2.94 ^{###}
Tb. Th	mcm	46.64±1.90	55.33±7.75 [*]	63.67±8.62 ^{***}
Tb. N	(#/mm)	3.82±1.02	2.11±0.92 ^{**}	0.96±0.43 ^{###}
Tb. Sp	mcm	232.77±83.68	491.17±217.14 [*]	1252.83±767.95 ^{###}
%L. Pm	%	24.15±6.15	15.98±3.71 [*]	25.39±5.23 ^{##}
MAR	mcm/d	1.44±0.18	1.08±0.21 ^{**}	1.17±0.18 ^{**}
BFR/BS	mcm/d × 100	35.16±10.41	17.25±5.36 ^{**}	30.02±8.80 ^{##}
BFR/BV	%/year	462.58±145.99	190.63±54.68 ^{**}	294.44±99.40 ^{##}
BFR/TV	%/year	78.04±22.01	21.81±10.63 ^{###}	18.17±10.19 ^{###}
N. OC/Tb. Ptm	#/mm	0.59±0.31	0.28±0.11 [*]	0.52±0.23 ^{##}
%O. pm	%	0.21±0.22	1.02±0.57 ^{**}	1.33±1.09 [*]
MLT	day	3.26±3.13	5.14±1.96	3.81±2.42

注:与基础对照组比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与年龄对照组比,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$

3 讨论

本实验的结果表明,随着年龄的增长,3个半月至6个半月,大鼠骨代谢过程减弱,骨小梁面积百分率减少32%,表现为骨形成和骨吸收的参数值均明显减小,出现骨低转换,造成骨小梁数量减少,分离度增加,厚度增加,最终出现年龄相关的骨丢失。去睾丸90天组的改变说明,在增龄骨丢失的基础上,骨量进一步减少(%Tb. Ar-50%,而与基础组比-66%)。大鼠去睾丸后骨形成和骨吸收均增强,但由于骨吸收大于骨形成,导致骨质丢失,出现骨高转换型骨质疏松。其机制可能是雄激素(睾酮)水平下降对骨骼的直接影响。有文献报道^[6],在人的成骨细胞上有雄激素受体,雄激素与这些受体结合,降低骨高转换率,使骨量增加;去睾丸后,骨转换率增加。最近研究表明破骨细胞上也存在雄激素受体,雄激素对破骨细胞也有直接作用,雄激素下降后,破骨细胞活性增强,骨吸收增加。另外,睾酮可促进降钙素分泌,而降钙素能抑制破骨细胞的活性,所以去睾丸后导致的降钙素减少可能也是破骨细胞活性增加的原因之一。对于增龄表现为骨低转换,而去睾丸后骨高转换的原因是由于增龄的大鼠体内睾酮水平是生理性的缓慢的下降,而去睾丸大鼠的睾酮水平是一个病理性的快速的下降过程,造成骨量进一步丢失。

本实验室曾做过去睾丸大鼠的短期模型(50天)^[6],结果是动态参数有增高的表现,静态参数没有变化,未出现骨丢失。本实验去睾丸90天动态和静态参数均发生改变,出现骨质疏松,而且是在增龄基础上进一步骨丢失。与大鼠去卵巢比较,后者最早15天出现骨质丢失,说明雌雄大鼠骨变化的不同。临床上男性“绝经期”没有明显的概念,雄激素水平急剧下降多出现在疾病如前列腺癌切除睾丸之后的患者,而女性在绝经期就有激素水平的急剧下降,而且性激素水平下降后女性比男性更早出现骨质疏松。因此老年女性更容易发生骨质疏松,且比男性骨质疏松发生早。

参 考 文 献

- 1 Galus MA. Osteoporosis in men. Arch Intern Med, 1998, 158(2):194.
- 2 Guinness M, Orwoll E. Early induction of alterations in cancellous and cortical bone histology after orchectomy in mature rats. J Bone Miner Res, 1995, 10(11):1735-1744.
- 3 Krongrand A, Levis S, Rous BA. Osteoporosis after orchectomy for prostate cancer. J Urol, 1997, 158(4):1529.
- 4 Da Paz LH, Jorgetti V, Yoshinari NH. Animal models of osteoporosis. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo, 1997, 52(2):86-89.
- 5 Daniell HW. Osteoporosis after orchectomy for prostate cancer. J Urol, 1997, 157(2):439-444.
- 6 李青南, 黄连芳, 谢华. 雄性大鼠去势后骨代谢的研究. 湛江医学院学报, 1993, 11:60.
- 7 汪春风, 林柏云, 李朝阳. 实验骨组织形态计量学参数分析与意义. 广东解剖学通报, 1995, 17(2):97-101.
- 8 王艳林, 伍汉文, 李代强, 等. 去睾丸大鼠骨质疏松及其治疗. 中华骨科杂志, 1995, 15(5):271.