

钙及高压氧对卵巢切除大鼠骨丢失影响的实验研究

陈大福 薛延 袁越 曹珊 马贵骥

【摘要】 目的 评价纳米碳酸钙及高压氧对雌激素缺乏引起的骨丢失的预防作用。方法 采用3月龄 Wistar 雌性大鼠切除双侧卵巢并用低钙饲料喂养作动物模型,术后分别给予钙剂及高压氧,连续14周。结果 与假手术组(Sham)相比去势组(OVX)骨密度、股骨生物力学性质、生化、骨形态计量指标均有显著差异;钙剂组(OVX + Ca)及高压氧组(OVX + HBO)与 OVX 组比较,股骨干及股骨近段骨密度、股骨最大载荷、弹性挠度、最大应力、弹性模量显著升高,血清 TRAP、ALP 显著下降,高压氧组股骨弹性载荷、弹性应力、弹性应变的升高及血清 TRAP、ALP 的下降均较钙剂组明显。结论 纳米碳酸钙及高压氧能在一定程度上抑制去势低钙饲料喂养的 Wistar 大鼠骨密度及骨生物力学性能下降。

【关键词】 骨丢失; 纳米碳酸钙; 高压氧

Effect of calcium and hyperbaric oxygenation on bone loss in ovariectomized rats CHEN Dafu, XUE Yan, YUAN Yue, et al. Beijing Jishuitan Hospital, Beijing Institute of Traumatology and Orthopaedics, Beijing 100035, China

【Abstract】 Objective To evaluate the preventive effect of nanometer calcium carbonate and hyperbaric oxygenation(HBO) on bone loss induced by depletion of estrogen. **Methods** Bone mineral density(BMD), biomechanical properties and biochemical histomorphological parameters were investigated in 3-month-old ovariectomized Wistar rats on a low-calcium diet. Administration of calcium and HBO was started immediately after ovariectomy and continued for 14 weeks. **Results** BMD, biomechanical properties, biochemical and histomorphological parameters significantly changed in OVX rats, compared with sham-operated rats. Significant increase was found in OVX + Ca and HBO rats, compared with OVX rats in regard to the BMD values of proximal femoral segment and femoral diaphysis, and in regard to the biomechanical parameters of femur such as maximum load, elastic deformation, maximum stress and elastic modulus. With respect to the change in biochemical parameters, the OVX + Ca rats and OVX + HBO rats showed a significant decrement in serum TRAP and ALP, compared with OVX group. The increment of elastic load, elastic stress, elastic strain and the decrement of serum TRAP and ALP were more obvious in OVX + HBO group than in OVX + Ca group. **Conclusion** Nanometer calcium carbonate supplementation and hyperbaric oxygenation can inhibit bone loss and the decrease of biomechanical properties in ovariectomized Wistar rats on a low calcium diet.

【Key words】 Bone loss; Nanometer calcium carbonate; Hyperbaric oxygenation

骨质疏松症是以骨量减少、骨脆性增加易发生骨折为特征的一种代谢性骨疾病^[1]。维持正常骨量需一定的激素水平、足够的钙摄入和适当的运动锻炼。国人的饮食钙含量普遍较低,因此,提高钙摄入是预防骨质疏松发生的长远基础性措施之一。长期低钙饲养可使动物松质骨减少,皮质骨变薄,整个骨量减少,而给予高钙饲料后这些改变可部分逆转。目前补钙对低钙饲养去势大鼠的抗骨丢失作用少见

报导,本文对此进行了实验观察,并初步观察了高压氧对去势大鼠骨丢失的影响。

材料和方法

1. 主要仪器设备:双能 X-线骨密度仪(Norland XR-36 DEXA),全自动生化分析仪(SABA),QTS-25 流变仪,大型高压氧气舱。

2. 试剂盒(北京中生公司)与药物:抗酒石酸-酸性磷酸酶(TRAP)试剂盒(对硝基苯磷酸二钠法),碱性磷酸酶(ALP)试剂盒,钙试剂盒(邻甲酚酞络合酮法),钙剂(为纳米级碳酸钙)。

作者单位:100035 北京积水潭医院北京创伤骨科研究所骨与关节疾病研究中心

3. 动物及实验方法:3月龄 Wistar 雌性大鼠,体重(250±20)g,动物及饲料(饲料钙含量0.2%)均购自医科院动物研究所。动物分假手术组(Sham)10只;去势组(OVX)10只;去势+钙剂组(OVX+Ca)10只;去势+高压氧组(OVX+HBO)10只。适应性饲养一周后2%戊巴比妥钠35~40 mg/kg腹腔麻醉,行去势手术及假手术,术后单笼喂养。灌胃给钙剂,250 mg·kg⁻¹·d⁻¹(元素钙),每天1次,连续14周,高压氧压力0.2 MPa,氧浓度99%,每次60 min,隔日1次,共14周。给药14周入代谢笼收集24小时尿后,2%戊巴比妥钠腹腔麻醉,腹主动脉取血分离血清测生化指标;取第4腰椎、右股骨测骨密度,右股骨行三点弯曲试验;取第三腰椎作脱钙石蜡片用MIDAS-A病理图像分析仪行骨形态计量学测量。

4. 采用SPSS统计软件作单因素方差分析。

结 果

1. 大鼠一般情况

去势后各组大鼠呈代偿性肥胖,子宫重量显著低于Sham组,HE染色镜下见子宫内膜萎缩、子宫壁变薄,为缺乏卵巢激素刺激所致。

2. 股骨干、股骨近段、第四腰椎骨密度(BMD)

去势组(OVX)与假手术组(Sham)比较股骨干、股骨近段、第四腰椎骨密度均显著下降($P < 0.05$);钙剂组(OVX+Ca)股骨干、股骨近段BMD及高压氧组(OVX+HBO)股骨干BMD均较OVX组显著升高

($P < 0.05$);钙剂组及高压氧组第四腰椎BMD较OVX组高,但它们之间无显著差异(表1)。

表1 股骨干、股骨近段及第四腰椎骨密度(g/cm³)($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 股骨干 | 股骨近段 | 第四腰椎 |
|---------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Sham | 0.127±0.001 | 0.123±0.015 | 0.113±0.007 |
| OVX | 0.118±0.008 ^{s*} | 0.112±0.012 ^{s*} | 0.101±0.009 ^{s*} |
| OVX+Ca | 0.124±0.007 ^{vs*} | 0.117±0.008 ^{va*} | 0.105±0.006 ^{s*} |
| OVX+HBO | 0.122±0.008 ^{v*} | 0.116±0.009 ^{s*} | 0.103±0.012 ^{s*} |

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ v: 与OVX组比较; s: 与Sham组比较; va: 与OVX,Sham组分别比较

3. 骨生物力学参数

OVX组与Sham组比较生物力学性能明显降低;钙剂组及高压氧组在股骨的最大载荷、弹性挠度、最大应力、弹性模量等参数均较OVX显著升高,二组与OVX组比较在弹性载荷、弹性应力、弹性应变等指标高压氧组较钙剂组改善显著(表2)。

4. 血尿生化指标

OVX组与Sham组比较,血钙、24小时尿钙均明显升高、血TRAP及ALP上升幅度分别为207.5%、144.5%;钙剂组血钙及24小时尿钙均明显高于其他各组,血TRAP及ALP较OVX组下降显著,但其降低程度均无高压氧组降低明显;高压氧组血钙与OVX组无明显差异,而24小时尿钙排出则显著下降(表3)。

表2 股骨骨生物力学特性($\bar{x} \pm s$)

| 指标 | Sham | OVX | OVX+Ca | OVX+HBO |
|--------------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 最大载荷(N) | 138.1±6.8 | 113.3±10.7 ^{s*} | 125.4±10.6 ^{v*} | 129.9±11.9 ^{v*} |
| 弹性载荷(N) | 109.2±11.3 | 86.4±9.1 ^{s*} | 98.7±1.8 | 100.9±5.1 ^{v*} |
| 最大挠度(mm) | 0.89±0.03 | 0.73±0.04 ^{s*} | 0.87±0.02 | 0.87±0.03 |
| 弹性挠度(mm) | 0.71±0.05 | 0.62±0.06 ^{s*} | 0.67±0.04 ^{v*} | 0.69±0.09 ^{v*} |
| 最大应力(N/mm ²) | 242.6±38.1 | 215.9±37.1 ^{s*} | 232.0±32.3 ^{v*} | 224.9±31.1 ^{v*} |
| 弹性应力(N/mm ²) | 169.8±29.5 | 150.0±32.0 ^{s*} | 157.3±31.1 | 162.5±33.8 ^{v*} |
| 最大应变(%) | 4.7±0.2 | 3.6±0.1 ^{s*} | 4.4±0.1 | 4.2±0.6 |
| 弹性应变(%) | 3.7±0.3 | 2.8±0.3 ^{s*} | 3.2±0.2 | 3.4±0.6 ^{v*} |
| 弹性模量(MPa) | 6449.6±1593.9 | 6024.2±1699.5 ^{s*} | 6242.4±1255.4 ^{v*} | 6164.5±1392.5 ^{v*} |

注: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; v: 与OVX组比较; s: 与Sham组比较

表3 血尿生化指标($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 血钙(mmol/L) | TRAP(B-单位) | 碱性磷酸酶(U/L) | 24小时尿钙(mmol) |
|---------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Sham | 2.11±0.09 | 1.46±0.65 ^{c*} | 113.2±23.2 | 0.020±0.009 |
| OVX | 2.22±0.16 | 3.03±0.87 ^{s*} | 163.7±38.8 ^{s*} | 0.029±0.002 ^{s*} |
| OVX+Ca | 2.62±0.24 ^{vs**} | 2.27±0.16 ^{v*} | 124.6±14.5 ^{v*} | 0.051±0.007 ^{vs**} |
| OVX+HBO | 2.18±0.04 ^{c**} | 1.83±0.59 ^{va**} | 114.0±14.7 ^{vc**} | 0.022±0.004 ^{vc**} |

注: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ v: 与OVX组比较; s: 与Sham组比较; c: 与OVX+Ca组比较; vs: 与OVX,Sham组分别比较; vc: 与OVX及OVX+Ca组分别比较

5. 第三腰椎骨小梁相对面积及股骨干上 1/3 段骨皮质及髓腔面积

OVX 组与 Sham 组比第三腰椎骨小梁相对面积、股骨干上 1/3 段骨皮质面积均显著下降。与 OVX 组比较:钙剂组股骨干上 1/3 段骨皮质面积显著升高、高压氧组股骨干上 1/3 段髓腔面积显著下降、钙剂组及高压氧组第三腰椎骨小梁相对面积无显著增加(表 4)。

表 4 第四腰椎、股骨干上 1/3 段形态计量学测量($\bar{x} \pm s_x$)

| 组别 | 第三腰椎骨小梁 相对面积(%) | 股骨干上 1/3 段 皮质面积(mm ²) | 股骨干上 1/3 段 髓腔面积(mm ²) |
|-----------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Sham | 23.1 ± 0.9 | 6.24 ± 0.41 | 2.36 ± 0.4 |
| OVX | 18.4 ± 3.7s* | 5.47 ± 0.66s* | 2.74 ± 0.33s* |
| OVX + Ca | 20.5 ± 3.0 | 5.76 ± 0.63v* | 2.53 ± 0.38 |
| OVX + HBO | 19.6 ± 4.3 | 5.68 ± 1.10 | 2.60 ± 0.55v* |

注: * $P < 0.01$ ** $P < 0.01$; v: 与 OVX 组比较; s: 与 Sham 组比较

讨 论

绝经后骨丢失主要是由于雌激素的急剧下降,骨转换率升高,破骨大于成骨,骨再建呈负平衡。雌激素缺乏,其直接抑制破骨能力及对 PTH 的拮抗作用均下降,相对增强了破骨细胞对 PTH 的敏感性,使得破骨细胞破骨功能活跃,并抑制成骨细胞胶原合成,导致骨量丢失^[2]。骨代谢负平衡状态下,再建点越多、再建周期越短骨丢失越多,有研究认为细胞外钙离子浓度升高能降低骨转换率,使骨再建表面破骨细胞吸收陷窝体积减少^[3],另一些研究则认为钙、二磷酸盐、雌激素等骨再建活性抑制因子,通过减少骨再建活动起动脉点数目减少骨吸收^[4]。

近年在鼠、人、牛的甲状旁腺主细胞上发现并克隆出对高钙离子浓度敏感的钙受体(CaR),CaR 是一种主细胞跨膜蛋白^[5],细胞外钙离子浓度升高,则 CaR 直接或间接在转录及后转录水平抑制 PTH 的基因表达,“Knock out”CaR 基因后则甲状旁腺主细胞增生^[6]。有研究表明低钙摄入引起 PTH 分泌升高,刺激破骨细胞增殖、胞体增大、吸收活性增强^[7],而给予高钙摄入则可逆转,因此,细胞外钙离子浓度对破骨细胞功能的调节是通过 PTH 分泌介导的。

细胞培养发现,增加培养基的钙离子浓度,明显刺激鼠^[8]、人^[9]骨细胞的增殖,这种提高细胞外钙离子浓度,刺激骨细胞增生的作用,鼠是通过 IGF-I,人通过 IGF-II 介导的。Yoo A 等用含钙 0.02% 饲料喂养大鼠 4 周后,发现实验组血钙明显低于对照组

(饲料含钙 0.6%),血中 IGF-I 比对照组下降 40%,同时,血清中一种与 IGFs 有高度特异亲和能力的 IGFs 结合蛋白(IGFBPs)—IGFBP3、IGFBP4 分别升高 2~3 倍、1~1.5 倍,恢复实验组饲料钙至对照组水平 1~2 周后,IGF-I 及 IGFBP3、IGFBP4 又逐渐回复至对照组水平^[10],因此,从细胞培养及动物实验研究都有证据表明 IGFs 及 IGFBPs 参与了钙调节成骨、破骨过程。

实验中补钙大鼠血 TRAP 及 ALP 血钙浓度、24 小时尿钙、股骨皮质面积、BMD、力学性能等指标的显著改变,说明增加钙摄入可抑制负平衡骨转化率,促使骨基质矿化^[11],改善骨的微结构。实验结果发现股骨的力学性能变化比其骨密度变化敏感,在 OVX 组前者较后者降低明显,在钙剂组前者较后者升高明显,Heaney 等认为在体外骨的抗折强度与它的表观密度的平方成正比,弹性模量与它的表观密度的立方呈正比,因此少量的骨密度变化会引起巨大的力学性质改变^[12]。

目前,国内外众多种类钙剂中以碳酸钙为原料的钙剂仍占主导地位,碳酸钙的有效性、安全性已经过长期的临床应用验证,其价格低廉也更适于推广。本研究选用的纳米碳酸钙与普通碳酸钙比较有以下特点:①纳米碳酸钙粒度 $< 20 \sim 30$ nm(普通碳酸钙粒度 $> 50 \mu\text{m}$),纯度 $> 99.5\%$;②依照 1995 版国家药典进行溶出度试验,在 0.01 N 浓度 HCl 下,5、10、15、30、45、60 min 纳米碳酸钙溶出度显著高于普通碳酸钙;③钙体内负荷试验,对同一受试对象(30 例,男 16 例,女 14 例,年龄 20~43 岁,均无与钙代谢有关的疾病及 1 年内未接受过影响钙代谢的药物),纳米碳酸钙组服后 0~2、2~4、4~6 h 的尿 Ca/Cr 比值显著高于普通碳酸钙组相应时间段的 Ca/Cr 比值($P < 0.05$),说明纳米碳酸钙更易吸收及更快增加体内钙储量。

高压氧组血 TRAP、ALP 下降、股骨的骨密度升高均显著,并在改善骨弹性载荷、弹性应力、弹性应变等力学性能效果较钙剂组好。因此,本研究初步推测高压氧可抑制负平衡的高骨转化,改善骨的韧性,促使基质钙化,但其确切机制不清楚。高压氧能加快组织血液循环提高氧分压,有资料表明高原骨折愈合时间延长,给予高压氧后则与平原骨折愈合时间相近,可见高压氧可促进成骨。此外,高压氧可能使局部骨组织周围呈负电性,而这种负电性可诱导新骨形成^[13]。

补充纳米碳酸钙对低钙摄入去势大鼠的骨丢失有明显的抑制作用;高压氧对抗去势后骨丢失作用的动物实验观察可能对预防绝经前切除双侧卵巢妇女的骨丢失有临床参考价值,但需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Peck WA, Riggs BL, Bell NH. Physician's resource manual on osteoporosis, Washington, DC: National Osteoporosis Foundation, 1987. 58-66.
- 2 Ernst M, Schmid CH, Froesch ER. Enhanced osteoblast proliferation and collagen gene expression by estradiol. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85:2307-2310.
- 3 Dawson-Hughes B, Dallal GE, Krall EA, et al. A controlled trial of the effect of calcium supplementation on bone density in postmenopausal women. N Engl J Med, 1990, 323: 878-883.
- 4 Heaney RP, MD. Interpreting trials of bone-active agents. Am J Med, 1995, 98: 329-335.
- 5 Garrett J. Molecular cloning and characterization of human parathyroid calcium receptor. J Biol Chem, 1995, 270: 12919-12925.
- 6 Ho C. A mouse model for familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. Nat Genet, 1995, 11: 389-394.
- 7 Thompson ER, Baylink DJ, Wergedal JE. Increase in number and size of osteoclasts in response to calcium or phosphorus deficiency in the rat. Endocrinology, 1975, 97: 283-289.
- 8 Sugamoto T, Kabataba M, Junichi K, et al. IGF- I mediates the stimulatory effect of high calcium concentration on osteoblastic cell proliferation. Am J Physiol, 1994, 266: E709-716.
- 9 Honda Y, Fitzsimmons RJ, Baylink DJ, et al. Effect of extracellular calcium on insulin-like growth factor II in human bone cells. J Bone Miner Res, 1995, 10: 1660-1665.
- 10 Yoo A, Tanimoto H, Akesson K, et al. Effects of calcium depletion and repletion on serum insulin-like growth factor I and binding protein levels in weaning rats. Bone, 1998, 22: 225-232.
- 11 Orwoll ES, McClung MR, Oviatt SK, et al. Histomorphometric effect of calcium or calcium plus 25-hydroxyvitamin D₃ therapy in senile osteoporosis. J Bone Miner Res, 1989, 4: 81-88.
- 12 Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. Bone, 1993, 14: 595-608.
- 13 顾志华, 高瑞亭, 主编. 骨伤生物力学基础 天津大学出版社, 1990. 226-232.