

镓盐对维甲酸致大鼠骨质疏松模型影响的实验研究

熊咏民 代晓霞 郭雄 左弘 王志伦 李广元 薛莉 耿冬

【摘要】 目的 研究镓盐对维甲酸致骨质疏松大鼠骨代谢的影响,为镓盐治疗骨质疏松提供实验依据。**方法** 用维甲酸建立大鼠骨质疏松模型,并通过氯化镓灌胃给药治疗两个月,应用生化、病理等方法研究其对反映骨质疏松相关指标的影响。**结果** 维甲酸可导致大鼠骨结构改变、密度降低,骨有机基质含量下降,血清抗酒石酸酸性磷酸酶(TPAP)上升。应用氯化镓后,可增加骨密度,增加骨皮质厚度和骨小梁百分比,降低TRAP活性和碱性磷酸酶(AKP)活性,从而降低骨转换率。**结论** 镓盐是一种有效的降低骨转换率的药物。

【关键词】 骨质疏松; 镓盐; 维甲酸; 骨代谢

Effects of gallium chloride on osteoporotic rat model produced with tretinoin XIONG Yongmin, DAI Xiaoxia, GUO Xiong, et al. Institute of Endemic Diseases, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China.

【Abstract】 Objective To investigate the effect of gallium salts on bone metabolism in rats with tretinoin-induced osteoporosis and provide experimental basis for clinical application of the chemical agent. **Methods** After duplicating osteoporotic rat model by using tretinoin, we observed the effect of gallium chloride on changes of bone metabolism in blood, urine and bone *in vivo*. **Results** The bone structure of osteoporotic rat model was altered; the bone mineral density and the organic matrix decreased, and content of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in serum was high. After treatment with gallium salt, the above damages were inhibited or retarded. **Conclusion** Gallium salt is effective in treating osteoporosis.

【Key words】 Osteoporosis; Gallium salts; Tretinoin; Bone metabolism

骨质疏松是一种骨量降低和骨组织结构改变,导致脆性增加及易发生骨折的全身性疾病^[1]。由于骨质疏松症的广泛流行性以及它的危害性,使其预防和治疗得到了极大的关注。目前前景看好的一些治疗骨质疏松的药物价格多较昂贵,近年来发现镓盐可降低骨转化率^[2],而且价廉,但作为治疗骨质疏松药物,其作用和机理尚不十分清楚。本研究用维甲酸致大鼠骨质疏松模型,同时观察氯化镓对骨代谢的影响,为骨质疏松的防治提供重要的实验资料。

材料和方法

1. 材料

(1)实验动物:3月龄雌性SD大鼠45只(西安交通大学医学院实验动物中心提供,国家A级动物),体重190~260g。随机分为2组:正常对照组(13只),骨质疏松组(32只)。均以常规饲料(饲料

由西安医科大学实验动物中心配制)喂养,饮用蒸馏水。骨质疏松组按85mg/kg d维甲酸灌胃15d,对照组用蒸馏水。每组随机选5只大鼠处死,取血、尿及骨观察模型复制情况。然后进入两个月治疗阶段。实验分为正常对照组(8只),骨质疏松组(9只),氯化镓治疗组(10只),雌激素治疗组(8只)。正常对照组和骨质疏松组,正常喂养;氯化镓治疗组,25mg/kg d氯化镓灌胃;雌激素治疗组,雌二醇0.2μg/kg,3次/周,腹腔注射。

(2)取材:处死动物前各组动物进入代谢笼收集24h尿。乌拉坦麻醉下测量骨密度,腹腔静脉采血,分别取动物双侧肢体、脊椎及肋软骨。尿及血既时检验或置低温冰箱中保存,骨分别在-70℃低温冰箱中保存或多聚甲醛固定。

(3)药物:氯化镓,北京有色金属研究总所合成;维甲酸,上海制药六厂生产。

2. 方法

(1)血清学指标测定:碱性磷酸酶(AKP)用南京

作者单位:710061 西安,西安交通大学医学院地方病研究所

建成生物研究所提供试剂盒检测;血清抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)用 Lau K H W 方法检测^[3];元素钙(Ca)、镓(Ga)用原子吸收分光光度法测定;磷(P)用钼兰比色法测定;骨钙素(BGP)用放免法测定,试剂盒由北京东亚免疫技术研究所提供。

(2)尿液指标测定:肌酐用苦味酸法测定;羟脯氨酸用氯胺 T 法测定。

(3)骨中各项指标的测定:采用美国 GDR-2000 型 Hologic 双光能 X 线骨密度仪测定大鼠股骨、腰椎及总骨密度;用 CMIAS 型北航多功能病理彩色图象分析系统检测骨病理形态,计算平均骨小梁宽度、平均骨小梁间距、平均骨皮质厚度及骨容积占骨髓质

容积百分比(以骨小梁百分比表示);用生化方法测定骨胶原和蛋白聚糖含量。

3. 统计学处理

所有数据均输入计算机,用 SPSS for windows 10.0 版本软件进行 *t* 检验和方差分析,计算结果以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

结 果

1. 模型期结果

(1)血清检测结果:实验结果显示,与正常组相比,骨质疏松组 Ca、P 有升高趋势,BCP 有降低趋势,AKP、TRAP 均较对照组显著增高,见表 1。

表 1 血清检测指标

组别	例数	Ca (mmol/L)	P (mmol/L)	Ga (nmol/L)	TRAP (U/L)	AKP (U/L)	BGP (μ g/L)
正常对照组	4	1.31 $\pm$ 0.12	1.57 $\pm$ 0.67	0.02 $\pm$ 0.003	13.72 $\pm$ 3.38	152.60 $\pm$ 38.3	1.1 $\pm$ 0.88
骨质疏松组	5	1.38 $\pm$ 0.14	1.64 $\pm$ 0.13	0.02 $\pm$ 0.002	28.95 $\pm$ 8.96*	354.62 $\pm$ 31.99**	0.22 $\pm$ 0.22

注:与对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

(2)模型期尿检测结果:骨质疏松组尿羟脯氨酸及尿肌酐比较正常对照组有升高趋势,见表 3。

(3)模型期骨组织改变:骨质疏松组大鼠与正常对照组比较,总骨密度降低 3.92%,股骨骨密度和腰椎骨密度降低 8.33%,但无显著性差异。骨形态

计量学结果显示:骨质疏松组平均骨小梁宽度、平均骨小梁间距、平均骨皮质厚度以及骨小梁百分比与对照组比较,均有显著性差异,见表 2。骨胶原及蛋白聚糖含量测定,骨质疏松组已糖醛酸含量显著降低,氨基己糖及骨胶原含量亦有降低趋势,见表 3。

表 2 骨形态计量结果

组别	例数	平均骨小梁宽度(μ m)	平均骨皮质厚度(μ m)	骨小梁百分比(%)	平均骨小梁间距(μ m)
正常对照组	5	76.70 $\pm$ 13.80	418.90 $\pm$ 160.20	0.150 $\pm$ 0.04	115.50 $\pm$ 2.28
骨质疏松组	5	48.60 $\pm$ 12.70**	153.00 $\pm$ 38.70**	0.079 $\pm$ 0.019**	176.90 $\pm$ 3.40**

注:与对照组比较 ** $P < 0.01$

2. 镓盐治疗两个月结果

(1)血清学指标检测:血清 Ca、P 各组间无显著性差异;镓盐治疗组血 Ga 含量与其它组比较显著增高;ATP 及 TRAP 各组无显著性差异,但可见两治疗组较骨质疏松组有下降趋势,与正常对照组接近;BGP 含量两治疗组与骨质疏松组比较,有增高趋势,与正常对照组接近,见表 4。

(2)尿检测结果:镓盐治疗组和雌激素治疗组尿羟脯氨酸明显低于骨质疏松组;骨质疏松组尿肌酐

比明显高于其它 3 组,见表 6。

(3)骨组织检测结果骨密度测定各组间无显著性差异;骨形态计量结果表明,平均骨小梁宽度骨质疏松组显著低于镓盐治疗组和正常对照组,平均骨皮质厚度骨质疏松组与其它 3 组比较明显变窄,骨小梁百分比,其它 3 组显著低于正常对照组,且骨质疏松组显著低于镓盐治疗组,平均骨小梁间距各组间无显著性差异,见表 5;骨胶原及蛋白聚糖各组间无显著性差异,见表 6。

表 3 大鼠骨胶原、蛋白聚糖及尿羟脯氨酸含量

组别	例数	骨				尿	
		胶原含量 (mg/g)	己糖醛酸 (mg/100mg)	氨基己糖 (mg/100mg)	硫酸基 (mg/100mg)	羟脯氨酸 (mg/24h)	肌酐比
正常对照组	5	89.98 $\pm$ 7.15	6.84 $\pm$ 1.48	5.35 $\pm$ 2.01	1.17 $\pm$ 0.074	11	0.62 $\pm$ 0.25
骨质疏松组	5	84.92 $\pm$ 9.02	4.21 $\pm$ 0.97*	2.95 $\pm$ 1.06	1.12 $\pm$ 0.066	10	0.82 $\pm$ 0.24

注:与对照组比较 * $P < 0.05$

表 4 血清检测指标

组别	例数	Ca (nmol/L)	P (nmol/L)	Ca (nmol/L)	BGP (μg/L)	AKP (U/L)	TRAP (U/L)
正常对照组	6	1.19 ± 0.074	1.42 ± 0.31	0.020 ± 0.011	1.23 ± 0.77	150.53 ± 77.46	13.12 ± 2.21
骨质疏松组	6	1.25 ± 0.090	1.34 ± 0.37	0.022 ± 0.013	0.93 ± 0.66	189.85 ± 63.38	16.50 ± 6.45
雌激素治疗组	6	1.29 ± 0.088	1.41 ± 0.30	0.024 ± 0.010	1.20 ± 1.36	137.50 ± 99.37	12.96 ± 6.92
镓盐治疗组	9	1.33 ± 0.100	1.54 ± 0.19	0.53 ± 0.059 ^{***}	1.17 ± 0.70	161.28 ± 89.18	14.88 ± 5.79

注: 镓盐治疗组与各组相比 * * P < 0.01

表 5 骨形态计量结果

组别	例数	平均骨小梁宽度 (μm)	平均骨皮质厚度 (μm)	骨小梁百分比 (%)	平均骨小梁间距 (μm)
正常对照组	5	72.40 ± 12.80	405.60 ± 89.20	0.21 ± 0.017	143.20 ± 12.20
骨质疏松组	6	51.00 ± 2.90 ^{***}	193.40 ± 8.00 ^{***}	0.11 ± 0.019 ^{***}	148.70 ± 31.80
雌激素治疗组	6	53.80 ± 4.70 ^{***}	567.70 ± 162.4	0.13 ± 0.026 ^{***}	160.90 ± 31.30
镓盐治疗组	8	63.70 ± 11.10	276.70 ± 111.7	0.14 ± 0.032 ^{***}	168.60 ± 33.20

注: 骨小梁宽度骨质疏松组与雌激素治疗组与其它两组比较 * * P < 0.01; 骨皮质厚度骨质疏松组与各组相比 * * P < 0.01; 骨小梁百分比对照组与各组比较 * * P < 0.01。

表 6 骨胶原、蛋白聚糖及尿羟脯氨酸含量

组别	例数	骨				例数	尿	
		胶原 (mg/g)	己糖胺酸 (mg/100mg)	氨基己糖 (mg/100mg)	硫酸基 (mg/100mg)		羟脯氨酸 (mg/24h)	羟胍比
正常对照组	5	82.87 ± 4.33	4.52 ± 3.34	3.19 ± 1.01	1.16 ± 0.048	6	0.58 ± 0.091	0.058 ± 0.012
骨质疏松组	6	79.93 ± 8.76	5.36 ± 1.21	4.64 ± 0.81	1.14 ± 0.055	6	0.73 ± 0.18 ^{***}	0.092 ± 0.026 ^{***}
雌激素组	5	75.35 ± 7.80	2.80 ± 1.90	2.13 ± 0.66	1.13 ± 0.034	6	0.34 ± 0.065 ^{***}	0.058 ± 0.025
镓盐治疗组	10	79.08 ± 7.37	5.42 ± 1.50	4.28 ± 0.94	1.14 ± 0.085	10	0.33 ± 0.013 ^{***}	0.058 ± 0.013

注: 尿羟脯氨酸与对照组比较 * * P < 0.01; 尿羟胍比骨质疏松组与各组比较 * * P < 0.01

讨 论

骨质疏松症是威胁中老年人健康的一种常见病,其发病率随我国社会老龄化而迅速上升。应用动物模型研究骨质疏松的机理和防治是极为重要的。80 年代,在世界专利索引(WPI)中出现了预防骨质疏松症的镓盐(WPIN₆₄-18972/31)等药物,近年来,有关镓盐的应用研究,愈来愈广泛深入。

本研究选用 3 月龄雌性大鼠,维甲酸灌胃两周后血、尿及骨出现了典型的骨质疏松改变,表明骨质疏松模型复制成功。骨代谢生化指标具有创伤性小、快速灵敏、特异等特点,对于评价骨转换状态和骨质疏松的早期诊断、治疗及分型具有重要价值。BGP 主要由骨中的成骨细胞合成,血中的 BGP 水平基本可以反映骨中的 BGP 水平,是反映机体骨转换和骨形成的特异指标^[4];血清 AKP 也可反映成骨细胞活性,常作为反映骨形成的生化指标;TRAP 主要

由破骨细胞释放,在骨吸收活跃的部位 TRAP 升高,血清中的 TRAP 水平可反映破骨细胞活性和骨吸收的状态,是反映骨吸收的特征性酶^[3]。本实验结果表明,骨质疏松组大鼠血中 AKP 和 TRAP 明显升高, BGP 降低,提示维甲酸使大鼠破骨细胞活性明显增强,同时也显示了对成骨细胞活性的影响,其模型属高转换型骨质疏松,骨转换加快。应用镓盐治疗后,两种酶的活性均有下降趋势, BGP 含量增加表明镓盐抑制破骨细胞的功能,降低其破骨能力,而且亦提示对成骨细胞活性有一定影响,降低了骨转换率。镓可降低骨转化已有不少研究报道,本实验结果也证实了这一点。

骨形成和骨吸收是骨代谢的两个基本过程,骨质疏松症就是由于骨代谢的失衡,破骨量大于成骨量所致。骨是由骨细胞、骨盐及有机质等 3 部分组成,骨基质中胶原占 90% 以上,羟脯氨酸是胶原特有的氨基酸,是反映机体内胶原代谢的生化指标,尿

羟脯氨酸排出量在很大程度上反映了骨代谢的改变。蛋白聚糖也是骨基质重要成分之一,骨基质中蛋白聚糖对骨盐的沉降起重要作用。本次实验可观察到,模型组大鼠骨胶原及蛋白聚糖含量降低(其中己糖醛酸含量显著降低),血钙和血磷亦呈现降低趋势,说明骨质疏松大鼠体内存在着骨代谢异常,提示破骨细胞活性增高加速了骨基质的分解作用。尿羟脯氨酸是胶原代谢的分解产物,骨质疏松大鼠尿羟脯氨酸含量有升高趋势,亦证实胶原分解增强,与骨胶原含量变化相吻合。应用镓盐治疗后,尿羟脯氨酸排泄量明显降低,表明镓能降低骨转换率,减少胶原分解。同时,骨形态计量学结果显示,骨质疏松组的平均骨小梁宽度和平均骨皮质厚度明显变小,骨小梁百分比明显降低,平均骨小梁间距明显变大。镓盐治疗组平均骨皮质厚度增加,骨小梁百分比变大,充分表明镓盐可抑制骨溶解,增加骨量及骨的硬度。这可能与镓盐抑制破骨细胞活性、对抗溶骨作用有关。

雌激素通过促进破骨细胞的凋亡,抑制骨吸收,促进骨形成,维持骨转换平衡^[5],本实验应用雌激素

作为阳性对照评价镓盐对骨质疏松的治疗作用。结果显示镓盐能增加骨密度;增加平均骨小梁宽度和平均骨皮质厚度,增加骨小梁百分比,使骨硬度增强;降低血清 TRAP、AKP 活性,增加骨钙素含量;改善骨质疏松症的骨基质代谢状态,促进骨组织形成;充分表明镓盐是一种有前途的降低骨转换率的药物,目前,镓盐对骨质疏松治疗的研究还处于起始阶段,其有关机理尚需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 刘忠厚,杨定焯,朱汉民,等.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,1999,5(1):1.
- 2 Warrell RP. Gallium nitrate inhibits accelerated bone turnover in patients with bone metastases. J Clin Oncol, 1987, 5(2):292
- 3 Lau KHW, Onishi T, Wergedel JE, et al. Characterization and assay of tartrate resistant acid phosphatase activity in serum. Clin Chem, 1987, 33(4):458.
- 4 薛延.骨质疏松的生化诊断.中国骨质疏松杂志,1995,1(1):58
- 5 Kameda T, Mano H, Yuasa T, et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone osteoclast. J Exp Med, 1997, 186(4):489

·小知识·

骨质疏松的三级预防

陆曙民

骨质疏松防治的关键在于预防,治疗效果远不及预防。

一、一级预防——无病防病

从儿童、青少年起,合理膳食营养,多吃含钙、磷高的食品,尤其牛奶、奶制品、豆类、鸡蛋、绿色蔬菜、海带、鱼等,多晒太阳,不吸烟、不饮酒,少喝浓咖啡、浓茶和碳酸饮料,少吃糖和盐,动物蛋白不宜太多,哺乳期不宜太长。

二、二级预防——有病早治

人到中年,尤其绝经妇女,骨质流失加快,要测

骨密度。欧美较多用雌激素补充(HRT)加长期预防性补钙;日本较多用活性维生素D和钙剂。同时积极治疗与骨质疏松有关疾病,如糖尿病、类风湿性关节炎、慢性肾炎、甲旁亢、甲亢和慢性肝病。

三、三级预防——康复医疗

防止残疾、改善中老年人生活质量,延长寿命,采用促进骨形成、抑制骨吸收的药物,加强防摔、防碰、防颠等措施,骨折者争取手术,加强固定,早期活动,理疗、锻炼、康复、营养、补钙、止痛、心理治疗,提高免疫功能。