

孕激素对去势雌性大鼠骨密度及骨形态计量作用的初步研究

张绍芬 张剑峰 沈婕 周光兴 刘畅

【摘要】 目的 了解孕激素对去势雌性大鼠骨密度及骨形态计量作用。方法 50只6月龄Wistar雌性大鼠随机分为5组:假手术组和卵巢切除组,卵巢切除后分别加安宫黄体酮2mg组、安宫黄体酮20mg组和倍美力组。手术后7d喂药,用药后3个月处死。测定各组大鼠子宫湿重、全身及股骨骨密度并取大鼠椎骨、胫骨组织切片进行形态计量分析。结果 两组孕激素组子宫湿重与卵巢切除组相同,均显著低于假手术组与倍美力组($P < 0.001$)。假手术、雌、孕激素组全身骨密度测定均大于卵巢切除组($P < 0.05$)。各组股骨骨密度无显著差异。组织切片观察显示,假手术与倍美力组骨小梁粗壮、饱满、结构完整;卵巢切除组则纤细、断裂、完整性差。孕激素组骨小梁结构优于卵巢切除组但不及假手术及倍美力组。计量分析显示孕激素组椎骨骨小梁面积明显大于卵巢切除组($P < 0.05$),但低于倍美力组($P < 0.05$)。胫骨骨小梁面积与卵巢切除组相仿,均明显低于假手术和倍美力组($P < 0.05$)。孕激素2mg与20mg组间无明显差异。结论 两种剂量的安宫黄体酮对卵巢切除大鼠骨质疏松均有一定防治作用,但从骨组织形态计量分析,其作用较弱,与结合雌激素相比,尚不足以维持骨量。

【关键词】 孕激素; 大鼠; 骨密度; 病理形态学; 形态计量分析

Effects of progesterone on bone mass density and histomorphometry of ovariectomized rats ZHANG Shaofen, ZHANG Jianfeng, SHEN Jie, et al. Department of Gynecology, Hospital for Obstetrics and Gynecology, Fudan University, Shanghai 200011, China, ^a Department of Pathology, School of Experimental Animals of Fudan University, Shanghai 200032, China

【Abstract】 **Objective** To study the effects of progesterone on the bone mass density (BMD) and histomorphometry of ovariectomized rats. **Methods** Fifty female Wistar rats, 6 months old, were randomized into five groups: ovariectomized group (OVX); sham-OVX; the remaining three groups were ovariectomized and treated with medroxyprogesterone acetate (MPA) 2 mg, MPA 20 mg and premarin, respectively. Seven days after operation, all rats were given the medicine for 3 months. Then, they were sacrificed, and their uterine wet weight, total and femoral BMD were measured. Pathomorphology and histomorphometry of the tibia and vertebra of all rats were observed. **Results** The uterine wet weight of both MPA groups were the same as that of OVX group, but they were all significantly lower than those of sham-OVX and premarin groups ($P < 0.001$). Total BMDs of sham-OVX, premarin and progesterone groups were all higher than that of OVX group ($P < 0.05$). There was no difference in femoral BMD between different groups. Histomorphology showed sturdy and intact trabecular bone in sham-OVX and premarin groups, while slender, broken and less intact trabecular bone was observed in OVX group. The mean trabecular area (MTA) of vertebra of both MPA groups were significantly higher than that in OVX groups ($P < 0.05$), but lower than in premarin groups ($P < 0.05$). No difference in MAT of tibia was observed between both MPA groups and OVX group; they were all significantly lower than those in sham-OVX and premarin groups ($P < 0.05$). There was no difference between MPA 2 mg and 20 mg groups. **Conclusion** MPA of both dosages has certain preventive effect on osteoporosis in ovariectomized rats, but it is less strong than conjugated estrogen and is not enough to maintain the bone mass.

【Key words】 Progesterone; Rats; Bone mass density; Pathomorphology; Histomorphometry

绝经后雌激素水平下降是骨质疏松症发病的重要因素,雌激素替代治疗对骨质疏松防治作用已进

行了大量研究并得到充分肯定。绝经后妇女孕激素水平亦急剧下降,而孕激素对骨量的作用仍有一些不一致的报道。我们通过动物实验研究初步观察孕激素(安宫黄体酮,MPA)对去势雌性大鼠骨密度与

作者单位:200011 上海,复旦大学附属妇产科医院妇科(张绍芬、张剑峰、沈婕、刘畅),实验动物部病理科(周光兴)

骨组织形态计量的作用。

材料和方法

1. 动物分组:50 只 6 月龄雌性清洁级 Wister 大鼠体重 170~230 g,由上医大实验动物部提供(合格证号 02-22-12),随机分为 5 组,每组 10 只。A 组:假手术组(SHAM),B 组:单纯切除卵巢组(OVX),C 组:安宫黄体酮 2 mg 组(OVX + MPA2),D 组:安宫黄体酮 20 mg 组(OVX + MPA20),E 组:倍美力 0.625 mg 组(OVX + E)。假手术组行假性手术(去除卵巢周围腹腔少许脂肪),其余各组均行双侧卵巢切除术。术时均予 1%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉。SHAM 组有一只大鼠因麻醉过深在手术后死亡。手术后 7 d 各组开始灌药,共 3 个月。灌药方案:A 组与 B 组给予甲基纤维素。C 组与 D 组给予安宫黄体酮溶液,剂量分别为 1.6 mg/kg/d 及 16 mg/kg/d。E 组予倍美力溶液,0.5 mg/kg/d。药物剂量相当于临床患者每公斤体重剂量的 40 倍。实验期间自由摄食(上医大实验动物部提供标准固体饲料)和饮水。

2. 子宫湿重:实验末所有动物颈动脉插管放血处死,随后取子宫并称重。

3. 全身与股骨骨密度:大鼠处死后各组随机取 6 只大鼠置 DPX-L 型双能 X 线骨密度仪(美国 Lunar 公司生产)探头下,应用动物全身骨密度测定软件作全身扫描,测定全身骨密度。每只大鼠取左侧股骨,安置在装有蒸馏水的支架上,以全长的 1/2 交

界处为测量点,应用 SPA 单光子骨密度仪(中国测试技术研究院装置)作骨横越扫描,测出值即为股骨骨密度。

4. 骨组织病理切片形态观察与计量分析:取第三腰椎中间和右侧胫骨上 1/3 处骨组织标本,去净软组织,10%中性甲醛固定。骨标本经常规脱钙、包埋,制成 5 μm 厚的组织切片,椎体标本取横切面,胫骨标本取纵切面,作 HE 染色。切片采取混合编号,双盲法进行病理形态学观察并摄片。采用 Q520 型自动图像分析仪(英国 Cambridge 公司)作骨形态计量。每组随机取 3 只大鼠的切片,每个切片随机测 3 个视野,共 9 个视野,取平均值,取一固定视野面积(67306.82 μm^2)测量其中骨小梁面积。

5. 统计学处理:各项参数以均值加减标准差表示。SPSS 软件行方差分析并行 Newman-Keuls 组间比较。

结 果

1. 各组大鼠子宫湿重、全身与股骨骨密度

见表 1。A、E 组子宫湿重明显高于 B、C、D 组, B、C、D 组间差异无显著性。A、C、D、E 组全身骨密度无明显差异,但均明显高于 B 组。各组股骨骨密度差异无显著性。

2. 骨组织病理形态学观察

见图 1。大鼠腰椎骨组织切片显示,A 组与 E 组骨小梁粗壮、饱满、着色较深,形态结构完整,骨髓腔相对较小,腔内造血红细胞数量较多;B 组骨小梁纤

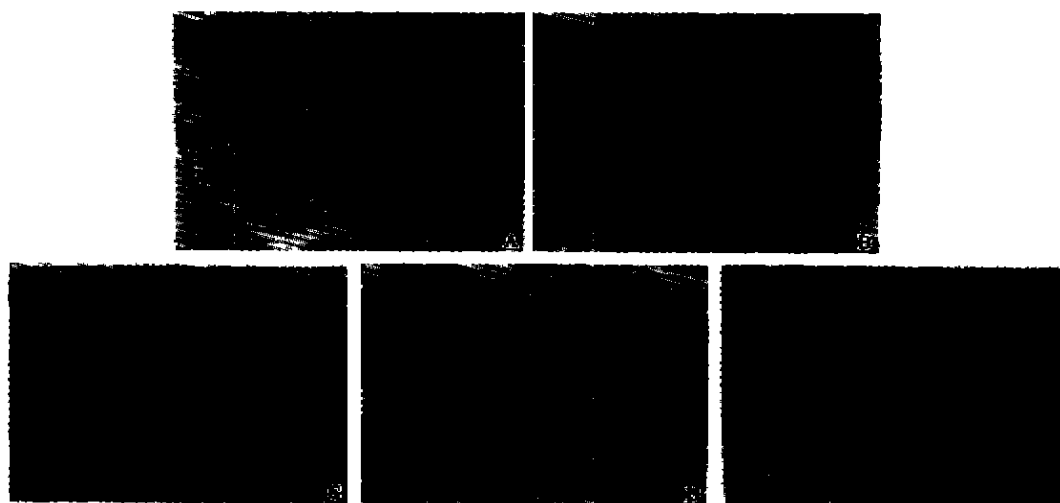


图 1 各组腰椎骨小梁形态结构比较

表1 各组大鼠子宫湿重、全身及股骨骨密度检测结果

组别	子宫湿重(g)	例数	全身骨密度(g/cm ²)	例数	股骨骨密度(g/cm ²)	例数
A(SHAM)	0.629 ± 0.112 [*]	9	0.407 ± 0.012 ^{**}	6	0.233 ± 0.028	9
B(OVX)	0.175 ± 0.028	10	0.386 ± 0.014	6	0.232 ± 0.022	10
C(OVX + MPA ₂)	0.200 ± 0.039	10	0.426 ± 0.027 ^{**}	6	0.240 ± 0.015	10
D(OVX + MPA ₂₀)	0.196 ± 0.073	10	0.423 ± 0.012 ^{**}	6	0.255 ± 0.024	10
E(OVX + E)	0.618 ± 0.071 [*]	10	0.409 ± 0.019 ^{**}	6	0.236 ± 0.015	10

注:与B、C、D组比较,* $P < 0.01$;与B组相比较,** $P < 0.05$

细、着色淡、形态结构完整性差,有扭曲和断裂,髓腔大小不一,腔内造血细胞减少。C组骨小梁形态较A、E组差,但小梁连接性尚可,髓腔内造血细胞数量较多。D组骨小梁纤细,连接性差,骨髓腔内造血细胞数量较少。各组胫骨切片观察结果与椎骨类似,但C组胫骨骨小梁显得较为粗壮、着色深,D组胫骨骨小梁连接性尚好。

3. 骨组织形态计量

见表2。A、C、D、E组大鼠椎骨骨小梁面积均明显大于B组,但C、D组与E组比较则有显著降低。A、E组胫骨骨小梁面积则大于B、C、D组,B、C、D组差异无显著性。

表2 各组大鼠椎骨和胫骨骨小梁面积(μm^2 $n=9$)

组别	椎骨	胫骨
A(SHAM)	34733.3 ± 3993.9 [*]	30877.8 ± 1335.1 [△]
B(OVX)	24777.8 ± 5105.2	22600.0 ± 1416.9
C(OVX + MPA ₂)	29411.1 ± 2605.2 [*]	24477.8 ± 1865.0
D(OVX + MPA ₂₀)	29488.9 ± 14145.8 [*]	23377.8 ± 5134.0
E(OVX + E)	41900.0 ± 3008.9 ^{**}	28466.7 ± 4789.0 [△]

注:与B组比较* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$;与B、C、D组比较

[△] $P < 0.05$

讨 论

绝经后骨丢失伴随着雌孕激素缺乏,一般认为补充孕激素对骨质疏松也有防治作用。19去甲基睾丸酮类衍生物如炔诺酮可以增加绝经后妇女骨密度。有人认为炔诺酮有一定的雄激素和雌激素样作用,动物实验显示其与大鼠的雌激素受体起作用^[1]。炔诺酮还能通过竞争结合骨细胞表面的糖皮质激素受体,发挥抗糖皮质激素作用,减少骨丢失。但大剂量长期应用炔诺酮对肝脏以及血脂、血糖代谢有不良影响。17- α 羟孕酮类衍生物如安宫黄体酮较接近天然孕酮,其雄激素作用较弱,副作用较少。我们

通过动物实验研究观察不同剂量安宫黄体酮对骨质疏松的防治作用。

子宫是雌激素作用的靶器官,实验末各组大鼠子宫湿重反映了各组雌激素水平。假手术组与结合雌激素组子宫湿重大于去势组与MPA2 mg、MPA20 mg组。去势组与MPA组子宫湿重无差异,提示孕激素治疗组雌激素水平低下,与去势组相似。

大鼠全身骨密度测定被认为是动物骨代谢研究中骨量改变的较精确的指标^[2],与外周骨密度测定相结合可用以评价骨代谢改变。我们的实验观察到MPA2 mg、MPA20 mg组全身骨密度均大于去势组,而股骨BMD无明显改变。股骨以皮质骨含量为主,推测孕激素改变骨量主要是通过通过对以椎骨为主的小梁骨起作用的。

骨力学强度取决于骨基质的材料特征、骨显微结构及骨矿物质含量。骨量降低并非是骨折发生的唯一条件,骨显微结构改变更能反映骨力学强度变化^[3]。我们采用椎骨和股骨骨化活跃的近软骨化骨处作定位观察,选用骨小梁显微结构作为观察指标,各片均取一固定视野面积,测定其中骨小梁面积进行比较。动物实验结果显示MPA组骨小梁形态结构不及假手术及雌激素组粗壮、饱满,但优于去势组。去势组骨小梁完整性差、纤细、扭曲、断裂,符合骨质疏松模型。从形态学观察,MPA2 mg组骨小梁结构似略优于MPA20 mg组。本实验对骨组织形态计量分析亦显示MPA组椎骨骨小梁面积低于雌激素组,但高于去势组。胫骨骨小梁面积则显示MPA组与去势组无明显差异,均低于假手术组与雌激素组。形态计量的分析在MPA2 mg与MPA 20 mg间均无差异。MPA对骨量的作用有一些不一致的报道。我们对去势7 d后大鼠应用MPA 3个月的实验研究初步观察到MPA对卵巢切除大鼠骨质疏松有一定防治作用,但比结合雌激素组效果差。结合雌

(下转第42页)

差异($P < 0.05$)。POF 患者比自然绝经的 BMD 偏低。

讨 论

卵巢性激素不仅对下丘脑-垂体有反馈作用,而且卵巢自身分泌和旁分泌协同优势卵泡颗粒细胞产生雌激素^[1]。目前认为女性绝经后心血管疾病发病率较绝经前增高与雌激素缺乏有关,还认为雌激素的缺乏是早老性痴呆的发生原因之一^[2]。35岁以后骨形成减慢,骨吸收增加,骨量开始丢失,每年丢失全身骨量的0.3%~0.5%,很少超过1%。但绝经后5年内小梁骨丢失率达到每年3%~5%左右。手术绝经较自然绝经会更快一些。因此使骨结构及功能发生变化,脆性增加,产生骨痛,体态变异,骨折危险性增加。可见卵巢的生理功能对女性生活质量及寿命的长短是至关重要的。自然绝经时卵巢功能有一逐渐减退的过程,而手术绝经,尤其是双侧卵巢切除患者,卵巢功能在短期内突然衰竭,这些妇女缺少一个雌激素水平逐渐下降的过程,如未能及时采取补充雌激素或其他措施,往往更年期症状出现的早且明显。尽管子宫切除手术保留全部或部分卵巢,但因手术可能影响了卵巢的血液供应,也会缩短卵巢功能逐渐减退的过程。

1987年Eriksen等首次证实人成骨细胞上存在着雌激素受体,雌激素直接调节骨代谢并最近的研究证实破骨细胞是雌激素的靶细胞^[3],雌激素通过促进破骨细胞的凋亡而调节部分骨代谢并能直接抑

制破骨细胞,加强成骨细胞的代谢;促进降钙素的分泌,降低破骨细胞对甲状旁腺素的敏感性;促进1,25双羟维生素D的合成,增加肠钙吸收。提高胰岛素样生长因子(IGF-1)对骨的影响;抑制白介素-6对破骨细胞的促进作用。老年妇女任何时间均可开始应用HRT。Notalovitz^[4]报道长期适当地使用雌激素使髓骨骨折的危险性降低50%~60%。

我们的研究也证实了POF的病人由于绝经时间较长没有及时的预防和治疗,比自然闭经的骨量丢失早并且快,骨量就比同龄妇女丢失的多。不仅PMO首选HRT,既能改善全身症状又能提高骨量,重要的是对那些POF及有妇科手术史的病人更应积极地加以预防,尽管这些妇女从年龄上尚未到更年期,但生理变化上可认为进入更年期了。及时地向她们讲清防治的重要性,尽早采用HRT进行治疗。

参 考 文 献

- 1 Shoham Z, Schachter M. Estrogen biosynthesis-regulation, action, remote effects, and value of monitoring in ovarian stimulation cycles. *Fertil Steril*, 1996, 65(4):687.
- 2 Tang MX, Jacobs D, Stern Y, et al. Effect of estrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet*, 1996, 348(9025):429.
- 3 Kameda T, Mano H, Yuasa T, et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone resorbing osteoclasts. *J Exp Med*, 1997, 186:489-495.
- 4 Notalovitz M. Estrogen therapy and osteoporosis: principle and practice. *Am J Med Sci*, 1997, 313:2-12.