

骨形态计量学评价低钙对大鼠皮质骨的作用研究

陈建波 李青南 黄莲芳 胡彬 陈艳

【摘要】 目的 评价低钙饮食对大鼠皮质骨的影响。**方法** 3月龄 SD 普通级雄性大鼠 40 只, 随机分为 5 组。第 1、2 组饲养 1 个月, 分为正常对照组(1 mol, Ca 1.0%)和极低钙组 VLCD(1 mol, Ca 0.1%), 余下 3 组饲养 3 个月, 分为正常对照组(3 mol, Ca 1.0%)、极低钙组 VLCD(3 mol, Ca 0.1%)和低钙组 LCD(3 mol, Ca 0.3%)。各组动物喂养包含对应钙含量的精制饲料, 处死前进行双荧光标记。实验结束时, 取左侧胫骨中段行骨形态计量学检测。**结果** 无论是低钙饮食 1 个月, 还是 3 个月, 无论是极度缺钙, 还是仅有轻微的钙不足, 胫骨中段横截面皮质骨始终未出现显著意义的变化, 但骨内膜骨吸收有增加的趋势。**结论** 低钙对皮质骨作用不明显, 这可能与机体在低钙状态下动用骨骼的次序或快慢有关。

【关键词】 低钙饮食; 骨质疏松; 骨组织形态计量学; 皮质骨

Bone histomorphometric analysis of effects of low calcium on cortical bone in male rats CHEN Jianbo, LI Qingnan, HUANG Lianfang, et al. Medical Laboratory Center, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China. Bone Biology Laboratory, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of low calcium on the cortical bone in male rats by bone histomorphometrical techniques. **Methods** Forty three-month-old male Sprague-Dawley (SD) rats, with a mean weight of (280 ± 22) g, were randomized into five groups. Group 1 and group 2 were fed a normal calcium diet as control (Ca 1.0%) and a very low calcium diet (VLCD, Ca 0.1%), respectively, for one month; groups 3-5 were fed a normal calcium diet as Control (Ca 1.0%), a very low calcium diet (VLCD, Ca 0.1%), and a low calcium diet (LCD, Ca 0.3%), respectively for three months. All animals received double bone fluorochrome labeling prior to sacrifice. At the end of experiment, the left tibiae were harvested for bone histomorphometrical evaluations. **Results** The cortical bone of the mid-diaphyseal cross-section in VLCD and LCD groups did not change significantly for a diet of either one month or three months, but the bone resorption in endocortical surface tended to increase in calcium-restricted groups. **Conclusion** Low calcium has little effect on rat cortical bone, which may be attributed to the sequence of skeletal exploitation by the body.

【Key words】 Low calcium diet; Osteoporosis; Histomorphometry; Cortical bone

皮质骨是哺乳动物长骨骨量的主要组成成份, 占长骨骨量的 80%, 能确保长骨的力学适应, 因此皮质骨在骨质疏松中的作用及变化显得十分重要。皮质骨与松质骨其结构成份不一样, 两者对骨质疏松的反应有差异, 如绝经后早期仅见松质骨丢失, 而在绝经 15 年后却多以皮质骨丢失为主。臂部骨折中有 95% 伴有皮质骨所致的骨质疏松, 仅有 78% 伴随松质骨所致的骨质疏松^[1]。两者对药物反应程度亦

不一样, 治疗骨质疏松药物氟化物、双磷酸盐以及 PTH 对皮质骨的效果不明显^[2-4]。以往的研究显示, 低钙会引起松质骨骨量显著减少, 但由于皮质骨与松质骨的差异性, 低钙对皮质骨的作用可能会产生不同的变化, 现报道如下。

材料和方法

1. 低钙饲料的配制

根据 AOAC 推荐的标准饲料配方^[5], 对饲料中的钙含量进行适当加减, 配成所需的浓度。饲料中钙和蛋白的含量经农业部食品质量监督检验测试中

作者单位: 510182 广州医学院医学检验中心(陈建波); 广东医学院骨生物学研究室(李青南、黄莲芳、胡彬、陈艳)

心(湛江)测试,符合实验要求。

2. 实验动物及分组

3 月龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 普通级大鼠 40 只(广东医学院实验动物中心提供),体重(280 ± 22) g,随机分为 5 组。第 1、2 组饲养 1 个月,分为正常对照组(1 mol, Ca 1.0%)和极低钙组 VLCD(1 mol, Ca 0.1%),余下 3 组饲养 3 个月,分为正常对照组(3 mol, Ca 1.0%)、极低钙组 VLCD(3 mol, Ca 0.1%)和低钙组 LCD(3 mol, Ca 0.3%)。所有动物在同等条件下饲养,自由摄食,每周称体重 1 次。全部大鼠在处死前第 14、13 天和第 4、3 天分别给皮下注射盐酸四环素(25 mg/kg)和钙黄绿素(5 mg/kg)。实验结束时,取左侧胫骨,剔除骨上附着的组织,10% 甲醛固定。取胫骨用慢速锯于胫骨上端 1/3 处横行锯断胫骨,将余下的胫骨下部分于胫骨和腓骨结合处横行锯开,取中段骨进行检测。将锯开的胫骨中段进行酒精梯度脱水,甲基丙烯酸甲酯(北京化工厂)包埋

后磨片。磨片是将胫骨中段先用锯片机锯成 100 μm 厚的骨片,共锯 3 片,胫腓骨结合处为第 1 片,接着往下依次为第 2 片和第 3 片。用粗糙玻璃将第 2 片磨成 20~30 μm 厚,测量皮质骨的各项参数。

3. 仪器

数字图像分析系统(DIAS):由光学和荧光显微镜及数字画板(Summagraphic, Fairfield, CT)组成,配备一个苹果 Macintosh 计算机及形态计量程序“Stereology”(KSS Computer Engineers, Magna, UT)。慢速锯(Buehler LTD. USA)。

4. 统计学处理

测量参数均采用均数和标准差表示,用 Windows SPSS 10.0 软件进行方差分析。

结 果

1. 低钙饮食 1 个月大鼠皮质骨参数变化(表 1)。

表 1 低钙饮食雄性大鼠皮质骨形态计量学数据($\bar{x} \pm s$)

组别	Ct. Ar mm ²	% Ct. Ar (%)	% Ma. Ar (%)	% P-L. Pm (%)	P-MAR $\mu\text{m}/\text{d}$	P-BFR/BS $\mu\text{m}/\text{d} \times 100$	% E-L. Pm (%)	E-MAR $\mu\text{m}/\text{d}$	E-BFR/BS $\mu\text{m}/\text{d} \times 100$	% Er. Pm (%)
1 月 对照组	0.4 ± 0.02	82.7 ± 2.09	17.3 ± 2.09	68.4 ± 11.62	1.2 ± 0.11	81.4 ± 12.62	16.6 ± 5.79	0.1 ± 0.14	1.3 ± 2.84	1.7 ± 0.43
VLCD 组	0.4 ± 0.03	82.1 ± 1.38	17.9 ± 1.38	61.0 ± 14.36	1.1 ± 0.17	70.6 ± 22.33	17.7 ± 8.87	0.1 ± 0.19	3.5 ± 5.53	2.0 ± 0.58
3 月 对照组	4.9 ± 0.54	75.0 ± 2.66	25.0 ± 2.66	22.0 ± 24.17	0.5 ± 0.37	18.5 ± 28.65	31.9 ± 11.83	0.7 ± 0.17	22.4 ± 9.96	0.6 ± 0.32
VLCD 组	4.3 ± 0.33	72.8 ± 4.13	27.1 ± 4.13	30.8 ± 11.41	0.8 ± 0.15	26.2 ± 12.28	33.4 ± 15.75	0.7 ± 0.29	25.8 ± 19.61	0.8 ± 0.33
LCD 组	4.4 ± 0.43	73.2 ± 4.53	26.8 ± 4.53	33.5 ± 19.46	0.8 ± 0.25	29.1 ± 20.68	31.7 ± 7.25	0.8 ± 0.21	26.7 ± 11.05	0.7 ± 0.11

注: n = 8

从表 1 可见,喂低钙饮食 1 个月后,皮质骨参数变化并不明显。与正常对照组相比,VLCD 组静态参数中,其皮质骨面积、骨髓腔面积均无显著变化。在动态参数中,骨的内外膜呈现出不同的变化趋势。骨外膜荧光周长百分数(% L. Pm)、矿化沉积率(MAR)及骨形成率(BFR/BS)比正常对照组略有下降,但差异均未有显著性。而在骨内膜,骨矿化沉积率(MAR)及骨形成率(BFR/BS)比正常对照组则分别增加了 110% 和 176%,但由于数据变异太大,在统计上差异无显著性。骨内膜吸收周长百分数(% Er. Pm)亦增加了 17%,表明在骨内膜面骨形成和骨吸收增加,骨转换率升高。

2. 低钙饮食 3 个月大鼠皮质骨参数变化

低钙饮食 3 个月后,与对照组相比,两个低钙组骨髓腔面积、皮质骨面积百分比以及骨髓腔面积百分比仍没有明显变化。动态参数显示,骨外膜虽然在 VLCD 和 LCD 组荧光周长百分数、矿化沉积率以

及骨转换率均增加,但均未有统计意义。而在骨内膜,VLCD 和 LCD 组骨吸收周长百分数(% Er. Pm)分别上升了 39% 和 14%,两个低钙组骨形成参数% L. Pm、MAR 均不同程度地增加,骨形成率 BFR/BS 增高。

讨 论

结果表明,无论是低钙饮食后 1 个月,还是 3 个月;无论是极度缺钙,还是仅有轻微的钙不足,皮质骨始终未出现明显的变化。皮质骨面积(Ct. Ar)以及皮质骨面积百分比(% Ct. Ar)基本上未受低钙饮食的影响。这表明虽然皮质骨占长骨骨量的大部分,但皮质骨对低钙饮食并不敏感。

动态参数分析显示,短期内骨外膜的成骨能力降低,随着缺钙的加深,骨外膜塑型开始增加,有塑型飘移趋势。骨内膜荧光标记显示,低钙饮食使皮

(下转第 249 页)

少从而影响骨代谢;使骨质的丢失加速,骨的吸收到抑制,引起骨量减少,从而可促发或加重糖尿病骨质疏松的发生,使骨形成减少导致骨质疏松^[3,4]。至于 61 岁以上糖尿病组骨密度与对照组相比亦显得偏低一些,但差异无显著性,可能是这些病人发病后经治疗控制了糖尿病。提示该年龄组糖尿病患者骨量丢失速率减慢。从表 2 可以看到,女性 II 型糖尿病患者和同年龄健康对照组相比较,没有明显差异,这可能是本研究的年龄组的患者均已绝经,绝经后女性雌激素水平下降,性腺功能衰退致雌激素的分泌急剧下降。雌激素不足使破骨细胞的骨吸收活动增加,成骨细胞的形成活动相对减弱,使骨代谢呈负平衡状态,导致骨量减少,骨质疏松^[5]。本组资料显示,绝经后妇女体内雌激素水平下降是影响骨密度值的主要原因。但女性 II 型糖尿病患者骨质疏松大多为重度骨质疏松,而绝经后女性与同年龄组相比较少有重度骨质疏松;说明女性 II 型糖尿病患者骨质疏松原因是两方面的。除了糖尿病的原因外,还与雌激素分泌不足有关。其中雌激素水平下降在骨代谢中起重要作用。

从表 1,2 可以看到,糖尿病患者 BMD 随着年龄的增长而降低,揭示对老年患者应给予早期预防和

治疗。

从骨质疏松检出率的部位来看(表 3,4),II 型糖尿病患者无论男女均为 Ward's 三角区的 BMD 值最低,检出率分别为 47.4% (27/57) 和 64.6% (31/48),说明 Ward's 三角区是骨质疏松发生最早出现的敏感部位。这因为 Ward's 三角区主要结构为骨小梁丢失速度最快,最能反映人体的骨代谢情况。我们认为 Ward's 三角区可判断 OP 和骨折的预测部位,并根据这些部位的 BMD 结果,可以进行追踪复查、疗效观察的指标之一。

参 考 文 献

- 1 夏维波,孟迅吾. 骨质疏松的防治对象-会议讨论的共识. 中华内分泌代谢杂志,1998, 14 (3):199-202.
- 2 Houghs, Avioli LV, Bergteld MA, et al. Correction of abnormal bone and mineral metabolism in chronic streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat by insulin therapy. Endocrinology, 1981, 108:2228.
- 3 Verhaeghe J, Herck EV, Visse WJ, et al. Bone and mineral metabolism in BB rats with long-term diabetes: decreased bone turnover and osteoporosis. Diabetes, 1990, 39:477-482.
- 4 车琦,周智广. 糖尿病的骨质量改变及其机理. 中国糖尿病杂志, 1998, 6 (3):171-173.
- 5 刘忠厚,主编. 骨质疏松学. 北京:科学出版社,1998. 593-594.

(收稿日期:2002-12-05)