

17- β 雌二醇对去卵巢大鼠成骨细胞间质胶原酶 MMP-8, MMP-13 及其抑制因子 TIMP-1 表达的作用

蒋谊 廖二元 戴如春 魏启幼 罗湘杭

【摘要】 目的 研究 17- β 雌二醇(E_2)对成骨细胞间质胶原酶 MMP-8、MMP-13 和组织基质金属蛋白酶抑制剂 TIMP-1 的调控作用,探讨绝经后骨质疏松的发病机制。方法 利用去卵巢大鼠骨质疏松(OVX)模型,观察 E_2 治疗对骨组织形态计量学参数的影响;采用免疫组化和原位杂交的方法,检测其胫骨近端成骨细胞中 MMP-8、MMP-13、TIMP-1 mRNA 和蛋白表达水平的改变。结果 OVX 组大鼠与 E_2 治疗组相比,骨量丢失明显,成骨细胞中 MMP-13 mRNA 和蛋白的表达水平显著升高,而 MMP-8、TIMP-1 mRNA 与蛋白的表达无明显改变。相关分析表明 MMP-13 蛋白表达水平与骨小梁间隔(Tb.Sp)、骨小梁类骨质表面积(OS/TBA)呈正相关,与骨小梁数目(Tb.N)、骨小梁占全部骨组织体积比(TBV/TTV)呈负相关。结论 MMP-13 在雌激素缺乏性骨量丢失中起重要作用。雌激素可通过下调成骨细胞中 MMP-13 的表达,抑制骨吸收,降低骨转化率,防治绝经后骨质疏松症的发生。

【关键词】 17- β 雌二醇;骨质疏松症;间质胶原酶;组织基质金属蛋白酶抑制剂

Effect of 17- β estradiol on expression of interstitial collagenases and tissue inhibitor of metalloproteinase in osteoblasts of ovariectomized rat model JIANG Yi, LIAO Eryuan, DAI Ruchun, et al. The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China

【Abstract】 Objective To characterize the effects of 17- β estradiol (E_2) on the expression of interstitial collagenases MMP-13, MMP-8 and tissue inhibitor of metalloproteinase TIMP-1 in osteoblast of bone tissue in order to elucidate the molecular mechanism of postmenopausal osteoporosis. **Methods** The adult ovariectomized rat (OVX) models with osteoporosis were used in this study to investigate the changes of bone histomorphometric parameters after treatment with E_2 . The expressions of MMP-13, MMP-8, TIMP-1 mRNA and protein were analysed, respectively by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. **Results** Compared with E_2 -treated rats, the expression of MMP-13 mRNA and protein but not MMP-8 or TIMP-1 in OVX rats increased significantly, accompanied by large quantity of bone loss in trabecular bones. Furthermore, the expression of MMP-13 protein showed positive correlation with Tb. Sp and TBV/TTV, and negative correlation with Tb. N and OS/TBA. **Conclusion** Overexpression of MMP-13 plays an important role in the estrogen-deficient bone loss. Estrogen inhibits bone resorption and decreases the bone turnover rates by down-regulating the MMP-13 expression in osteoblast to prevent and treat osteoporosis.

【Key words】 17- β Estradiol; Osteoporosis; Interstitial collagenase; Tissue inhibitors of matrix metalloproteinase

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是老年女性的一种常见病、多发病,以骨量减少、骨微结构退变和骨脆性增加为主要的病理特征^[1]。雌激素水平的下降或缺乏是导致 PMOP 发病

的重要因素之一。成骨细胞作为雌激素作用的重要靶细胞,可分泌多种基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases MMPs),后者在骨重建的各环节中发挥调控作用。间质胶原酶(interstitial collagenase)是 MMPs 家族中的重要成员,可表达于成骨细胞中,但雌激素对其调节作用目前还不清楚,因此我们利用去卵巢

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970347)

作者单位:410011 长沙,中南大学湘雅二医院

大鼠骨质疏松模型,观察了雌激素治疗前后去卵巢大鼠胫骨成骨细胞中间质胶原酶 MMP-8, MMP-13 及其抑制因子 TIMP-1 (tissue inhibitors of matrix metalloproteinase) 表达水平的改变,旨在探讨 PMOP 的发病中雌激素作用的分子机制。

材料和方法

1. 实验动物

18 只 7 月龄雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,重 (257 ± 28.5)g,随机分为去卵巢模型组 (ovariectomized group, OVX), 17-β 雌二醇 (17-βestradiol, E₂), 补充治疗组 (E₂-treated group, ERT) 和假手术组 (sham group, SHAM), 每组各 6 只。ERT 组大鼠于术后每日予以 E₂ (北京四环制药厂) 100 μg/(kg·d) 灌胃。继续饲养大鼠 35 周,分别于处死前 14 d 和前 4 d,在大鼠腹腔内注射 0.5% 钙黄绿素 0.1 ml/100 g 体重,最后用 3% 戊巴比妥 0.1 ml/100 g 体重麻醉后,腹主动脉放血处死大鼠。

2. 骨组织塑料包埋

取大鼠右侧胫骨近端 1/3,仔细分离周围附着的肌肉结缔组织。将骨组织置于 4% 多聚甲醛溶液 (pH 7.4, 含 0.1% DEPC) 中固定 24 h,其后在 0.1 mol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4, 含 10% 蔗糖) 浸洗 12 h。脱水程序为 70% 乙醇 2 d, 95% 乙醇 2 d, 100% 乙醇 2 d, 二甲苯 2 d。接着,标本依次在塑料聚合液 I 液、II 液、III 液中各浸润 3 d^[2]。其中 I 液: 100 ml 甲基丙烯酸甲酯 (methylmethacrylate, MMA) + 35 ml 甲基丙烯酸丁酯 (butyl methacrylate) + 5 ml 苯甲酸甲酯 (methylbenzoate) + 1.2 ml 聚乙二醇 400 (polyethylene 400) (Sigma 公司); II 液: I 液 + 0.4 g 干燥过氧化苯甲酰; III 液: I 液 + 0.8 g 干燥过氧化苯甲酰。以上固定、脱水和浸润过程均在 4℃ 进行。其后,将 400 μl N, N 二甲基-对-苯甲胺 (N, N-dimethyl-p-toluidine) (Sigma 公司) 加入到 100 ml 预冷 (4℃) III 液中,用磁力搅拌器搅拌数分钟后,迅速倒入 20 ml 玻璃包埋瓶中,再放入骨标本。用 CO₂ 排空包埋瓶中氧气,盖紧瓶塞后,置于 -20℃ 中低温聚合 3 d。

3. 切片脱塑处理

用磨轮机将组织修块成 3 cm × 2 cm × 2 cm,暴露骨组织面。重型切片 (HM360, 德国 Zeiss 公司) 沿胫骨纵向非连续切片,普通切片厚 4 μm, 荧光观察切片厚 10 μm。切片贴附于明胶-铬矾处理过的载玻片, 37℃ 烤片 36 h, 其后于 2-甲氧基乙酸乙酯 (2-methoxyethylacetate) (上海化学试剂厂) 中脱塑 1 h, 蒸

馏水冲洗; 0.1 mol/L Tris 盐酸缓冲液 (pH 7.4) 中水化 5 min, 备用。

4. Goldner's Massion trichrome 染色与荧光观察

脱塑水化后的切片在 1:1 的苏木素与氯化铁混合染液中染色 7 min, 温自来水冲洗两次; 1% 丽春红-酸性品红染色液中染色 2 min, 1% 乙酸冲洗; 1% 磷钼酸中分化 6 min, 1% 乙酸冲洗; 0.1% 亮绿黄 SF (Sigma 公司) 染色 5 min, 1% 乙酸冲洗。室温干燥后中性树脂封片。

荧光观察切片不经脱塑处理直接置于激光共聚焦显微镜 (Bio-Rad 1024, 美国伯乐公司) 下, 观测钙黄绿素的荧光标记。

5. 骨形态计量学参数测量

骨形态计量学参数用 Bioquant98 图像分析软件测量计算。参照李红等^[3]方法, 取胫骨骺板下 1 mm 外为观测范围。每个测量参数于 ×200 高倍镜下随机观测 10 个视野。测量参数包括: 骨小梁厚度 (Tb.Th), 骨小梁与全部骨组织体积之比 (TBV/TTV), 骨小梁间隔 (Tb.Sp), 骨小梁数目 (Tb.N), 矿物质沉积率 (MAR), 类骨质的厚度 (O.Th), 骨小梁类骨质表面积 (OS/TBA)。

6. 免疫组化

切片脱塑水化, 用 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶活性后, 置于 0.01 mol/L 的枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中抗原微波修复 10 min; 山羊抗血清封闭 10 min, 其后分别滴加兔抗 MMP-13 (1:25), MMP-8 (1:25) 和 TIMP-1 (1:30) 多克隆抗体 30 μl (武汉博士德公司), 4℃ 孵育过夜。接着滴加生物素化的山羊抗兔 IgG (二抗) 室温下孵育 30 min, 0.1 mol/L PBS 冲洗; SABC 室温下孵育 30 min, 0.1 mol/L PBS 冲洗; AEC 显色, 苏木素复染, 水溶性封片剂封片。用正常胎盘组织作阳性对照, 以 PBS 代替一抗作阴性对照。

成骨细胞胞浆呈红色为阳性细胞, 采用 Langab 等^[4]介绍的方法, 在 ×200 高倍镜视野下计数阳性染色的成骨细胞数和整张切片的成骨细胞数, 两者比值为阳性表达百分数。为保证结果的可重复性, 在骨组织包埋块上以 1 mm 间隔分别制备两组切片 (A 组和 B 组) 做同一指标的计数。由于该间隔距离大于骨小梁平均厚度 (0.1 mm) 和骨髓腔间隔 (0.25 mm) 及一个骨重建单位 (0.4 mm) 三者之和, 即两套切片代表了不同骨空间位点。

7. 原位杂交

原位杂交探针及检测试剂盒均购自武汉博士德公司。其中, MMP-13 探针序列: 5'-CCTCG CTGTG

GAGTG CCTGA CAGTG GTGGT-3', 5'-ACTCC TCTGA CCCTGGTGCC TTGAT GTAC-3', 5'-CAGGT ACTTC TGGAG AAGGC ATCCT CAGCT-3'; MMP-8 序列: 5'-AGGCT CCGAG AAATG CAGTC TTTCT TCGGC-3', 5'-TGATC TTTAA AGACAGATTC TTCTG GCGCC-3', 5'-CATAC AGTTT GAATh CAGCA TCTGG AGtu-3'; TIMP-1 序列: 5'-ACCAC CTTAT ACCAG CGTTA TGAGA TCAAG ATGAC.3', 5'-CACAO GTCCCACAAC CGCAG CGAGG AGTTT CTCAT-3'.

切片脱塑水化,用 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶活性,0.1 mol/L PBS 冲洗;滴加 3% 柠檬酸稀释的胃蛋白酶 37℃ 消化 30 min, 0.5 mol/L PBS 冲洗;加入 20 μl 的预杂交液于 37℃ 孵育 2 h,再滴加 20 μl 杂交探针于 37℃ 杂交 12 h。其后依次经 2 × SSC,0.5 × SSC,0.2 × SSC 洗涤 15 min。利用试剂盒中地高辛显色系统进行信号检测。以正常肝脏组织作阳性对照,用预杂交液代替杂交液作阴性对照。

成骨细胞胞浆呈红染为阳性细胞,阳性成骨细胞百分比的计数方法同免疫组化。

8. 统计学处理

数据用 SPSS10.0 统计软件处理。均数组间比

较用单因素方差分析,两两比较用 SNK(Student-Newman-Keuls)法;MMP-13 蛋白与骨形态计量学参数间进行相关分析。

结 果

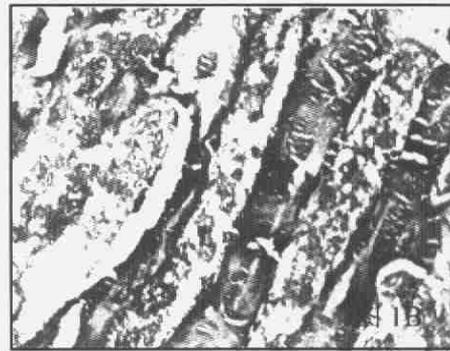
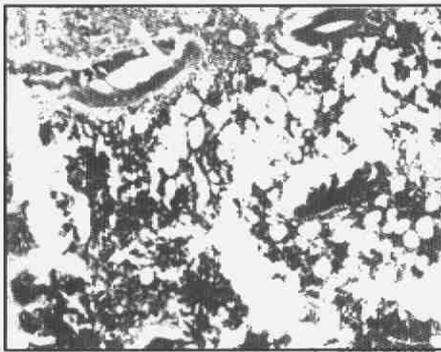
1. 骨形态计量学参数

骨计量学参数表明,OVX 组与 ERT 组相比,骨小梁与全部骨组织体积之比(TBV/TTV)、骨小梁数目(Tb. N)、骨小梁间隔(Tb. Sp)、骨小梁类骨质表面积(OS/TBA)和矿物质沉积率(MAR)差异均有显著性(P < 0.05),而骨小梁厚度(Tb.Th)和类骨质的厚度(O.Th)差异无显著性,见表 1 与图 1A-图 1B。

表 1 不同处理组 SD 大鼠胫骨近端形态计量学参数(̄x ± s)

测量参数	SHAM 组	OVX 组	ERT 组
Tb.Sp(μm)	101.53 ± 45.88	211.93 ± 35.61*	84.90 ± 24.85
Tb.N(/mm)	7.78 ± 2.44	4.21 ± 0.78*	7.94 ± 1.19
TBV/TTV(%)	29.54 ± 5.99	13.55 ± 5.26*	34.39 ± 12.43
Tb.Th(μm)	43.22 ± 24.03	33.27 ± 11.35	43.26 ± 13.52
OS/TBA(%)	16.77 ± 5.29	24.79 ± 7.75*	17.07 ± 3.61
O.Th(μm)	3.22 ± 1.85	4.59 ± 1.72	4.65 ± 2.69
MAR(μm/d)	0.67 ± 0.24	1.09 ± 0.30*	0.84 ± 0.29

注:与 SHAM 和 ERT 组比较,* P < 0.05



OVX 组(A)与 ERT 组(B)相比,骨小梁数目减少,骨髓腔间隔增宽,呈骨质疏松样改变

图 1 大鼠胫骨下骨小梁结构 Goldner's trichrome 染色 × 100

2. 免疫组化与原位杂交

OVX 组与 ERT 组相比,表达 MMP-13 mRNA 和蛋白的成骨细胞数目(图 2A-D)差异有显著性(P < 0.05),但表达 MMP-8 与 TIMP-1 的成骨细胞阳性率无明显改变,见表 2。在代表不同骨结构位点(A 组

和 B 组)的两套切片中,MMP-13,MMP-8 与 TIMP-1 mRNA 和蛋白的表达无明显差异,见表 3。除成骨细胞外,部分衬里细胞和骨髓腔中一些散在单核细胞中也有 MMP-13、MMP-8 和 TIMP-1 的阳性表达。

表2 不同处理组 MMP-13、MMP-8 和 TIMP-1 mRNA 和蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$) %

组别	例数	MMP-13		MMP-8		TIMP-1	
		mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
SHAM 组	6	21.58 ± 4.94	23.58 ± 4.31	19.17 ± 5.02	17.00 ± 3.88	21.75 ± 3.11	24.83 ± 4.69
OVX 组	6	33.25 ± 6.14*	37.42 ± 3.34*	20.41 ± 7.83	17.92 ± 4.56	25.92 ± 4.58	26.75 ± 5.72
ERT 组	6	24.08 ± 4.29	25.58 ± 4.06	14.83 ± 3.56	16.00 ± 4.18	22.17 ± 6.16	23.83 ± 3.41

注:与 SHAM 组和 ERT 组相比, * $P < 0.05$

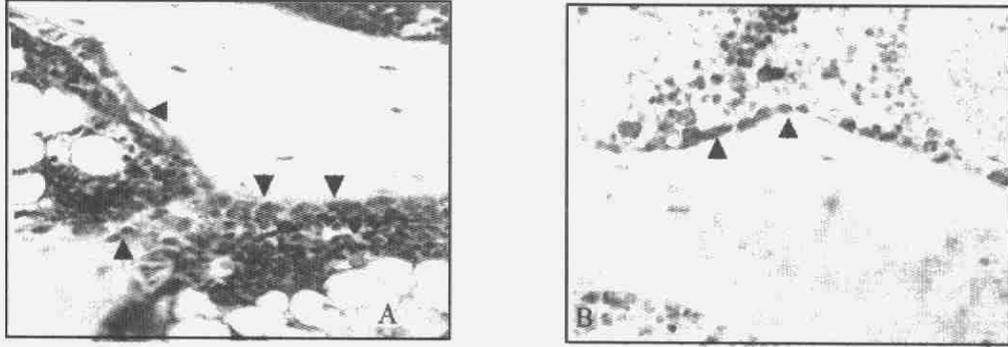


图 2A-2B 成骨细胞中 MMP-13 蛋白在 OVX 组(A)和 ERT 组(B)中的表达,OVX 组中表达 MMP-13 蛋白的成骨细胞数量增加 AEC 显色 × 200

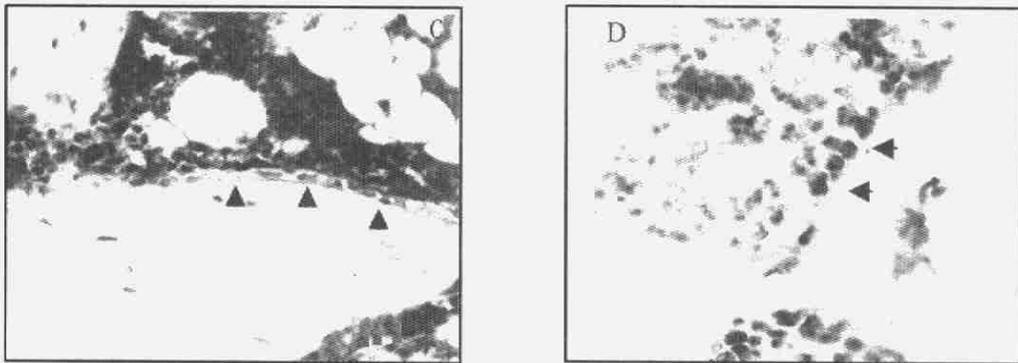


图 2C-2D 成骨细胞中 MMP-13 mRNA 在 OVX 组(C)和 ERT 组(D)中的表达,OVX 组中表达 MMP-13 mRNA 的成骨细胞数量增加。AEC 显色 × 200

表3 A 组与 B 组间 MMP-13、MMP-8 和 TIMP-1 mRNA 和蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$) %

组别	例数	类型	MMP-13		MMP-8		TIMP-1	
			A 组	B 组	A 组	B 组	A 组	B 组
SHAM 组	6	蛋白	21.67 ± 4.76	25.50 ± 3.08	16.83 ± 3.76	17.17 ± 4.36	27.17 ± 4.17	22.50 ± 3.62
		mRNA	20.17 ± 6.15	23.00 ± 3.34	19.00 ± 5.06	19.33 ± 5.46	20.50 ± 2.88	23.00 ± 3.03
OVX 组	6	蛋白	38.66 ± 3.33	36.17 ± 3.13	19.18 ± 3.16	16.67 ± 5.57	25.50 ± 5.24	28.00 ± 6.39
		mRNA	31.50 ± 7.12	35.00 ± 4.98	23.17 ± 8.63	17.67 ± 6.50	26.33 ± 4.84	25.50 ± 4.72
ERT 组	6	蛋白	26.83 ± 4.17	24.33 ± 3.89	17.33 ± 3.92	14.67 ± 4.08	23.67 ± 3.74	24.00 ± 3.09
		mRNA	21.83 ± 4.17	23.00 ± 3.03	13.67 ± 3.27	16.00 ± 3.74	20.33 ± 7.11	24.00 ± 4.98

3. MMP-13 蛋白表达与骨形态计量学参数相关性分析

MMP-13 蛋白的表达水平与骨小梁间隔(Tb.SP)和骨小梁类骨质表面积(OS/TBA)呈正相关($P < 0.05$),与骨小梁数目(Tb.N)、骨小梁占全部骨组织

体积比(TBV/TTV)呈负相关($P < 0.05$),见表4。

讨 论

老年女性骨质疏松的发生与体内雌激素水平的下降密切相关^[5,6]。为了探讨雌激素缺乏性骨量丢

失的病理机制,我们对7月龄去卵巢骨质疏松模型大鼠进行了长达35周的观察研究。通过骨形态计量学分析表明(表1),OVX组大鼠与SHAM组相比,骨代谢的静态学指标如骨小梁数目、骨小梁体积百分比分别下降了3.57/mm和15.99%,骨小梁间隔则由101.53 μm 上升至211.93 μm ,提示OVX大鼠胫骨近端骨量大量丢失。同时,骨代谢动力学参数如类骨质百分比和骨矿沉积率分别升高8.02 μm 和0.42 $\mu\text{m}/\text{d}$,说明OVX大鼠骨代谢活跃,处于高骨转化状态,而ERT组大鼠则能有效的抑制因卵巢切除所造成的骨计量学参数的改变。

表4 MMP-13蛋白表达与骨计量学参数相关分析($\bar{x} \pm s$)

测量参数	例数	相关系数	P值
Tb.Sp(μm)	18	0.72	$P < 0.05$
Tb.N(/mm)	18	-0.63	$P < 0.05$
TBV/TTV(%)	18	-0.58	$P < 0.05$
Tb.Th(μm)	18	-0.15	N
OS/TBA(%)	18	0.61	$P < 0.05$
O.Th(μm)	18	0.50	N
MAR($\mu\text{m}/\text{d}$)	18	0.40	N

骨组织表面覆盖着一层未矿化的类骨质屏障,主要由I型胶原构成,阻止了破骨细胞与矿化骨质的接触。Holliday等^[7]认为,只有当类骨质屏障被降解,暴露 $\alpha_v\beta_3$ 整和素结合位点RGD(arg-gly-asn sequence)序列时,才能与破骨细胞上 $\alpha_v\beta_3$ 整和素结合而并促进其激活。胶原酶作为MMPs家族中重要成员,主要参与I型、II型、III型胶原的降解,因此可引起类骨质屏障的破坏,在骨重建启动激活及病理性骨吸收中发挥着重要的作用^[8]。成骨细胞中胶原酶的表达存在种属差异,人成骨细胞(hOB)可分泌MMP-1、MMP-8和MMP-13三种胶原酶,但大鼠成骨细胞中只有MMP-8、MMP-13而不能分泌MMP-1^[9]。我们早期体外细胞培养的研究发现,雌激素能抑制MG63成骨样细胞分泌MMP-1^[5],但雌激素对成骨细胞胶原酶MMP-13、MMP-8的调控作用还不清楚。

我们通过免疫组化与原位杂交的方法,发现与ERT组相比,OVX组表达MMP-13 mRNA和蛋白的成骨细胞百分率分别增加了9.17%和11.84%,两者差异有显著性(表2),但MMP-8 mRNA和蛋白的表达则无明显改变。研究表明MMP-13可受多种激素与细胞因子的调控。Uchida等^[10]报道PTH(1-34)诱导的大鼠高钙血症与其颅骨中MMP-13 mRNA和蛋白表达水平呈正相关,提示PTH刺激骨吸收的作

用可由MMP-13介导。Delang等^[11]发现糖皮质激素能延长MMP-13 mRNA的半衰期,上调大鼠成骨细胞中MMP-13蛋白的表达。本实验表明,与ERT组相比,OVX组MMP-13 mRNA和蛋白在成骨细胞中的表达上调,提示雌激素能抑制成骨细胞中MMP-13的表达,但MMP-13蛋白表达上调的机制是通过直接增强MMP-13 mRNA的转录,还是间接提高mRNA的稳定性或两者兼有,还有待进一步研究。TIMP-1是能特异性抑制包括胶原酶在内的多种MMPs的活性。本实验发现OVX组与ERT组相比,成骨细胞中TIMP-1的表达水平无明显改变,与我们早期的研究结果相一致^[6],提示雌激素可能对TIMP-1无调节效应。

MMP-13蛋白与骨形态计量学参数的相关分析表明,MMP-13表达水平与骨小梁间隔(Tb.Sp)和骨小梁类骨质表面积(OS/TBA)呈正相关,与骨小梁数目(Tb.N)、骨小梁占全部骨组织体积比(TBV/TTV)呈负相关(表4)。我们还发现MMP-13 mRNA与矿物质沉积率(MAR)间的相关系数为0.53(数据未列出),两者呈正相关($P < 0.05$),但MMP-13蛋白与MAR间无相关性,继续增加标本量可能会得到阳性结果。上述结果表明,MMP-13在雌激素缺乏性骨量丢失中起重要的作用,MMP-13蛋白表达越高,骨量丢失越多,同时伴有骨转换率的上调。

我们还观察到,在骨小梁表面的部分衬里细胞中也有MMP-13、MMP-8和TIMP-1的阳性表达,同Breckon等^[12]结果相类似。目前多数学者认为衬里细胞与成骨细胞具有同源性,是成骨细胞处于静止期的形态表现^[13],因此衬里细胞中表达的MMPs可能也参与了骨重建的过程。此外,在骨髓腔中的少量单核细胞也有MMP-13、MMP-8和TIMP-1的阳性表达。上述细胞的性质还不清楚,可能是多能间充质细胞向成骨细胞分化中的一些前体细胞或祖细胞,已初具成骨细胞的表型特征。

本实验研究表明,因雌激素水平下降,使其对成骨细胞中MMP-13表达的抑制作用减弱。后者在缺乏TIMP-1有效拮抗的前提下,通过降解类骨质屏障,导致骨重建过度激活,骨吸收增强,骨量丢失增加,该途径可能是绝经后骨质疏松发病的又一重要机制。

参 考 文 献

- 1 Barondeas DA, Singh M, Hendrix SL, et al. Radiographic measurements, bone mineral density, and the Singh Index in the proximal femur of white

- and black Postmenopausal women. *Dis Mon*, 2002, 48: 637-646.
- Erben RG. Embedding of bone samples in methylmethacrylate: an improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 1997, 45: 307-313.
 - 李红, 高妍, 马红, 等. 大鼠不同部位骨骼对外源性甲状腺激素反应性的研究. *中国骨伤*, 2002, 15: 534-536.
 - Langaub MC, Monier-faugere MC, Qi Q, et al. Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide type 1 receptor in human bone. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 448-456.
 - Liao EY, Luo XH, Wang WB, et al. Effects of different nylestriol/levonorgestrel dosages on bone metabolism in female Sprague-Dawley rats with retinoic acid-induced osteoporosis. *Endocr Res*, 2003, 29: 23-42.
 - Liao EY, Luo XH. Effects of 17 beta-estradiol on the expression of matrix metalloproteinase-1, -2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human osteoblast-like cell cultures. *Endocrine*, 2001, 15: 291-295.
 - Holliday LS, Welgus HG, Fliszar CJ, et al. Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. *J Biol Chem*, 1997, 272: 22053-22058.
 - Uusitalo H, Hiltunen A, Soderstrom M, et al. Expression cathepsins B, H, K, L, and S and matrix metalloproteinases 9 and 13 during chondrocyte hypertrophy and endochondral ossification in mouse fracture callus. *Calcif Tissue Int*, 2000, 67: 382-390.
 - Sasano Y, Zhu JX, Tsubota M, et al. Gene expression of MMP8 and MMP13 during embryonic development of bone and cartilage in the rat mandible and hind limb. *J Histochem Cytochem*, 2002, 50: 325-332.
 - Uchida M, Yamato H, Nagai Y, et al. Parathyroid hormone increases the expression level of matrix metalloproteinase-13 *in vivo*. *J Bone Miner Metab*, 2001, 19: 207-212.
 - Delany AM, Jeffrey JJ, Rydziel S, et al. Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by Post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem*, 1995, 270: 26607-26612.
 - Breckon JJ, Papaioannou S, Kon LW, et al. Stromelysin (MMP-3) synthesis is up-regulated in estrogen-deficient mouse osteoblasts *in vivo* and *in vitro*. *J Bone Miner Res*, 1999, 14: 1880-1890.
 - Dobnig H, Turnerr RT. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology*, 1995, 136: 3632-3638.

(收稿日期: 2003-11-03)

(上接第 233 页)

中药坚骨颗粒治疗可以拮抗造模引起的骨骼抗外力能力的下降,改善骨质疏松大鼠骨的韧性,避免或减少骨折的发生,有预防切除卵巢后引起的大鼠骨质疏松的作用。但对动物股骨的弹性模量、极限强度和破坏强度指标的影响不明确,表明中药坚骨颗粒在此实验期间对骨的材料力学性能的影响小于雌激素的作用。所以,如何提高中药治疗骨质疏松症的疗效是中药在骨质疏松症应用研究中的重要问题之一。

参 考 文 献

- Kalu DN, Hardin RR. Evaluation of the pathogenesis of skeletal changes in

ovariectomized rats. *Endocrinology*, 1984, 115: 507.

- Tabuchi C, Simmous DJ, Faust A, et al. Bone defect in ovariectomized rats. *J Clin Invest*, 1986, 78: 633.
- 冯坤, 刘月桂, 张灵菊, 等. 高转换型骨质疏松模型的生化特点. *中国骨质疏松杂志*, 1997, 3: 155.
- 冯坤, 陈宝龙. 骨质疏松研究中的动物模型. *中国实验动物杂志*, 1999, 9(1): 62.
- Frost HM. The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporosis and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. *Bone*, 1997, 2: 73-85.
- Dike N, Kalu. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral*, 1991, 15: 175-192.
- 冯坤, 刘月桂, 张灵菊, 等. 中药坚骨液对卵巢切除后骨质疏松大鼠血、尿生化的影响. *中医正骨*, 1996, 3(1): 3.

(收稿日期: 2004-01-08)

(上接第 235 页)

参 考 文 献

- Taggart HM, Chesnut CH, Ivey JL, et al. Deficient calcitonin responses to calcium stimulation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet*, 1982, 1: 475-478.
- Borges MF, Abelint NMA, Memusa FOM. Calcitonin deficiency in early stages of chronic autoimmune thyroiditis. *Clin Endocrinol*, 1998, 49: 69-75.
- Poppe K, Verbruggen CA, Velkeniers B, et al. Calcitonin reserve in different stages of atrophic autoimmune thyroiditis. *Thyroid*, 1999, 9: 1211-1214.
- Oishi S, Shimada T, Tajiri J, et al. Elevated serum calcitonin levels in patients with thyroid disorders. *Acta Endocrinol (Copenhagen)*, 1984,

107: 476-481.

- Body JJ, Demester-Mirkine N, Brokowski A, et al. Calcitonin deficiency in primary hypothyroidism. *Clin Endocrinol Metab*, 1986, 62: 700-703.
- Body JJ. Calcitonin: from the determination of circulation levels in various physiological and pathological conditions to the demonstration of lymphocyte receptors. *Horm Res*, 1993, 39: 166-170.
- Guyetant S, Wion Barrbot N, Rousselet MC. C-cell hyperplasia: retrospective quantitative study of 112 cases. *Hum Pathol*, 1994, 25: 514-521.
- Libbey NP, Nowakowski KJ, Tucci J. C-cell hyperplasia of thyroid in a patient with goitrous hypothyroidism and Hashimoto's thyroiditis. *Am Surg Pathol*, 1989, 13: 71-77.
- Pantazi H, Papapetrou PD. Calcitonin levels are similar in goitrous euthyroid patients with or without thyroid antibodies as well as in hypothyroid patients. *Eur J Endocrinol*, 1998, 138: 530-535.

(收稿日期: 2003-08-26)