

去势成年雌性大鼠骨质疏松模型血清 NO 和 NOS 的水平及其意义

宋宁 富玲 原银栋 黄涛 夏禹

【摘要】 目的 测定大鼠骨质疏松模型血清中 NO 和 NOS 的水平,探讨骨质疏松症与 NO 和 NOS 浓度的关系。**方法** 6 月龄成年雌性 SD 大鼠随机分成实验组和对照组,术前及术后均测量腰椎骨密度,术后分离血清,用改良镀铜镉还原法测定 NO 含量,用化学比色法测定 NOS 含量。**结果** 术前,两组大鼠骨密度差异无显著性,术后,实验组大鼠骨密度明显低于对照组骨密度,差异有显著性($P < 0.05$)。血清 NO 和 NOS 水平实验组明显低于对照组,差异有显著性($P < 0.05$),有统计学意义。**结论** NO 和 NOS 在骨质疏松的病理生理过程中起重要作用。

【关键词】 一氧化氮; 一氧化氮合成酶; 绝经后骨质疏松; 骨密度

Change and significance of serum nitric oxide and nitric oxide synthase in adult ovariectomized rat model of osteoporosis SONG Ning, FU Ling, HUANG Tao, et al. Medical Center of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China

【Abstract】 Objective To measure the serum levels of nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) in adult ovariectomized rat model of osteoporosis (OP) and study the relationship between NO, NOS levels and osteoporosis. **Methods** 6-month-old adult female SD rats were divided at random into ovariectomized osteoporotic group and control group. Bone mineral density (BMD) was measured pre-and post-operation and serum was separated after operation, the was assayed NO content by modified plated copper cadmium reduction and for NOS content by chemical colorimetry. **Results** There was significant difference in BMD before operation. After operation, however, BMD and NO, NOS levels in the model group were far lower than those in the control group, with a significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** NO and NOS play an important role in the pathophysiological course of osteoporosis.

【Key words】 Nitric oxide; Nitric oxide synthase; Postmenopausal osteoporosis; Bone mineral density

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是由 Pommer 于 1885 年首先报道,以骨量减少,骨的微观结构退化为特征,致使骨的脆性增加以及易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病。随着人口结构的老龄化,骨质疏松症已成为全球范围内越来越严重的健康问题。

近年来,生物医学界发现一氧化氮(NO)及一氧化氮合成酶(NOS)在参与和促进骨质疏松症的病理生理过程中也起着重要的作用^[1]。研究表明,NO 及 NOS 与成骨细胞(osteoblast, OB)和破骨细胞(osteoclast, OC)的代谢有密切关系。NOS 低水平表达时,合成低浓度 NO,促进骨吸收,这说明 NO 在 OB

和 OC 之间的信号传导过程中可能起重要作用。探讨 NO, NOS 与骨质疏松症的关系,对治疗骨质疏松症具有深远意义。本实验通过观察去势成年雌性大鼠骨质疏松模型血清中 NO 和 NOS 水平,探讨 NO 和 NOS 与骨质疏松症的关系。

本实验首先建立大鼠骨质疏松症动物模型,造模前后测定两组大鼠腰椎骨密度及术后血清中 NO 和 NOS 的变化,分析 NO 和 NOS 与骨质疏松的相关性,为骨质疏松症的特异性治疗的发展提供实验依据。

材料和方法

1. 材料

(1)动物:6 月龄成年雌性 SD 大鼠,体重(250 ± 25) g,共 150 只,动物级别:清洁级。

作者单位:110024 沈阳,沈阳医学院附属中心医院(宋宁、富玲);中国医科大学附属第一临床医院(原银栋、黄涛);东北输变电设备集团中心医院(夏禹)

(2)仪器:Prodigy 骨密度测量仪;三用电热水恒温水箱;离心沉淀机;722 光栅分光光度计;超声细胞粉碎机。

(3)试剂:NO 和 NOS 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

2. 方法

(1)动物分组:大鼠随机分成 2 组,实验组(A 组):75 只,对照组(B 组):75 只。

(2)制造骨质疏松模型:大鼠用 2.5% 硫喷妥钠 0.1 ml/100 g 腹腔注射麻醉,严格无菌操作,A 组完整切除双侧卵巢,B 组切除大网膜脂肪一块,体积、重量大致与两侧卵巢相同。

两组动物分别标记,单独饲养,相同的环境中摄食,饮水,时间为 13 周。

(3)骨密度测定方法:制造骨质疏松模型术前及术后 13 周,选定大鼠腰椎作为测量部位,进行骨密度测量。每只大鼠测定 3 次,取其均值。

(4)标本采集:造模术后 13 周,对两组大鼠采血,于肠系膜上动脉抽血 2~3 ml,分离出血清 > 0.5 ml,置于 -20℃ 冰箱冷冻待测。

(5)NO 和 NOS 测定方法:血清 NO 和 NOS 的测定按照试剂盒说明书进行。

(6)统计学处理:所测数据用 SAS 软件包统计分析。大鼠骨密度用 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性差异用 t 检验, $P < 0.05$ 表示在统计学上差异有显著性, $P < 0.01$ 表示差异有非常显著性。

结 果

1. 大鼠腰椎骨密度测量:结果见表 1。

表 1 造模术前,术后两组大鼠腰椎骨密度测定结果 ($\bar{x} \pm s$, g/cm²)

组别	n	BMD(术前)	BMD(术后)	P
实验组(A)	75	0.2001 ± 0.0186	0.1727 ± 0.0165	0.96(术前)
对照组(B)	75	0.1997 ± 0.0176	0.2004 ± 0.0263	0.001729(术后)

将两组骨密度进行 t 检验,术前 $P > 0.05$,差异无显著性,术后 $P < 0.01$,差异有非常显著性,说明去势模型组骨密度明显低于正常假手术组,造模成功。

2. 两组大鼠血清 NO 和 NOS 测定:结果见表 2。

表 2 两种大鼠 NO 和 NOS 测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NO(μmol/L)	NOS(U/ml)
实验组(A)	75	33.231 ± 3.194	34.622 ± 4.814
对照组(B)	75	37.108 ± 4.085	40.307 ± 5.031

上述两组数据进行 t 检验, $P < 0.05$,两组之间差异有显著性,说明去势模型组 NO 和 NOS 水平明显低于对照组。

讨 论

由于绝经后骨质疏松(PMO)的发病机理仍有许多不明之处,因此,须通过动物实验来进行相关的研究。雌性大鼠去势后骨密度降低,骨转换增加与人绝经后骨骼的变化相似,最适宜作 PMO 的动物模型。统计学结果是确定模型是否成功的标准^[2]。本实验结果显示,实验组大鼠腰椎骨密度明显低于对照组,差异有显著性,说明造模成功。

NO 是在一氧化氮合成酶(NOS)作用下,以 L-精氨酸(L-Arg)为底物,氧化产生的一种小分子自由基气体。NOS 有 3 种异构体:神经元形式(nNOS),内皮细胞形式(eNOS)和诱导形式(iNOS)。其中 nNOS 和 eNOS 属于构建型 NOS(cNOS)。目前认为,细胞因子和内毒素对各种细胞而言都是潜在的具有诱导性质的 NOS 诱导剂,而糖皮质激素,白介素-4(IL-4),IL-10 和转化生长因子 β (TGF- β)则抑制 NO 的产生。

目前已经证实骨组织中存在全部 3 个 NOS 亚型^[3]。破骨细胞、成骨细胞均既能表达 cNOS,又能表达 iNOS。骨细胞维持其正常功能需一定浓度 cNOS 存在,免疫组化和原位杂交研究证明,骨髓巨细胞是 iNOS 活性最主要的来源。在细胞因子,如肿瘤坏死因子 α (TNF- α),白介素 1 β (IL-1 β),干扰素 γ (IFN- γ)等诱导下, iNOS 被诱导生成大量 NO^[4]。NOS 诱导生成 NO 不仅对 OB、OC 增殖、迁移、分化、功能等有直接作用,并可通过对细胞因子的相互影响施加间接影响。

NO 的生物合成主要受 NOS 调节,而多种细胞因子可影响 NOS 活性,所以 NO 在很大程度上受细胞因子的调节,一类可上调 NO 合成,如 IFN- γ , TNF- α , IL-1 β ,另一类可下调 NO 合成,如 IL-4, IL-10, TGF- β , 前列腺素 E₂(PGE₂)。一些学者提出, IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β 等因子改变 OB 或 OC 内的 NO 水平是实现它们调节功能的方式之一^[5]。

研究发现,破骨细胞是 NO 的主要来源。破骨细胞的功能与 NO 的关系被 MacIntyre 等首次提出,高浓度 NO 可抑制 OC 的骨吸收活动,低浓度 NO 则增强骨吸收。Stern 和 Diamond 研究证实,加入 NO 供体药物硝普钠(SNP)后,OC 的骨吸收活性受到抑制, SNP 增加了环鸟苷酸(cGMP)的水平,而 cGMP 的浓度关系着破骨细胞的活性,且能抑制破骨细胞的生

成。

Tsukahara 等^[6]发现,长期应用 NOS 的抑制剂氨基胍可以引起骨吸收和骨形成的平衡失调,导致骨量减少,同样在 PMO 的动物模型中,也显示了破骨细胞的吸收活性被 NOS 的抑制增强。提示在体内, NOS 抑制剂经增强破骨细胞骨吸收而改变骨代谢的活动。

近年来的研究表明, OB 也可产生 NO。IL-1 β , TNF- α , IFN- γ 等因子通过 NO 浓度影响 OC 性骨吸收作用的主要靶细胞为 OB, OB 在各种细胞因子的作用下合成释放 NO 有助于 OC 活性的调节。借助改变 OB 内的 NO 水平是 IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β 等因子作用的主要方式之一^[7]。

低水平 NO 导致细胞因子诱导性骨吸收增强与绝经后雌激素缺乏妇女骨质疏松密切相关。本实验中大鼠去势后,雌激素降低, NO 和 NOS 水平低下的结果充分证明了这一结论。

现已公认,雌激素缺乏是 PMO 的主要原因,其机理尚未完全阐明。但已知雌激素通过多种途径参与骨代谢,实验发现雌激素可以促进内源性 NO 的产生^[8,9]。妇女在绝经后,由于缺乏雌激素的控制,使得在骨组织中调节骨代谢的细胞因子变得紊乱, TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 、LPS 等活性受到抑制, IL-4、IL-10、TGF- β 等活性增强,这些因子调节着 NO 和 NOS 的水平, NOS 抑制,导致 NO 合成和释放减少,从而促进了骨质疏松的病理生理过程。Armour 等^[10]的体外实验表示, 17 β -雌二醇(E₂)在人成骨细胞培养中促进 cNOS mRNA 的产生和 cNOS 的活性,从而提高 NO 水平,揭示 cNOS 途径是关于雌激素在骨作用的一个重要指标, NO 可防治雌激素减少所致的骨量丢失,具有类似雌激素替代疗法的作用,雌激素对骨量的维持作用是通过 NO 调节的。从而提示,外源性给予 NO 在预防雌激素缺乏所导致的骨丢失方面有

一定治疗价值。

研究 NO 和 NOS 在骨质疏松的病理过程中的作用机制具有重要的临床意义。一方面提高 NOS 活性,可以提高 NO 的水平,从而起到抑制 OC 骨吸收的作用,另一方面由于 NO 对骨细胞的已知作用,可以应用 NO 供体药物达到治疗骨质疏松的目的。如何保持 NO 在一适当的浓度水平,在骨质疏松的防治中将具有重要意义,而此方面的研究也必然为临床上的绝经后骨质疏松症的预防和治疗开辟一条新的途径。

参 考 文 献

- 1 Van TH, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology*, 2001, 103: 255-261.
- 2 Gurkan L. Bone change after castration in rats; a model for osteoporosis. *Acta Orthop Scand*, 1986, 57: 67.
- 3 Miep H, Helfrich, Deborah, et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 1108-1112.
- 4 Robert J, De Marco G, Gangula P, et al. Cytokine induced Nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 1797-1801.
- 5 Ralston SH. The Michael Mason Prize Essay 1997, Nitric oxide and bone: what a gas. *Br J Rheumatol*, 1997, 36: 831-838.
- 6 Tsukahara H, Miura M, Tsuchida S, et al. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. *Am J Physiol*, 1996, 270: E840.
- 7 Damoulis PD, Hauschka PV. Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 412-422.
- 8 Berthezene F. Hormone replacement therapy at menopause in the diabetic woman. *Diabetes Metab*, 2001, 27: S83-S86.
- 9 李昂, 萧劲夫, 薛延. 骨质疏松的一氧化氮机制研究. 国外医学老年医学分册, 2001, 22: 33-37.
- 10 Armour KE, Ralston SH. Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblast-like cells. *Endocrinology*, 1998, 139: 799. (收稿日期: 2003-09-01)
- 11 缪应新, 朱汉民, 朱晓颖, 等. 上海地区汉人维生素 D 受体基因多态性与骨密度关系的初步分析. *中国骨质疏松杂志*, 2002, 8: 20-22.
- 12 张红红, 柳川, 刘建伟, 等. 聚合酶链反应限制性片段长度多态性检测维生素 D 受体基因型. *中华医学检验杂志*, 1998, 21: 145-147.
- 13 Tsai KS, Hau SHJ, Cheng WC, et al. Bone mineral density and gene markers in relation to vitamin D receptor gene polymorphisms in Chinese men and women. *Bone*, 1996, 19: 513-518.
- 14 Lim SK, Park YS, Park JM, et al. Lack of association between vitamin D receptor genotypes and osteoporosis in Koreans. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80: 3667-3681.
- 15 Kikuchi R, Uemura T, Gorai I, et al. Early and late postmenopausal bone loss is associated BsmI vitamin D receptor gene polymorphism in Japanese women. *Calcif Tissue Int*, 1999, 64: 102-106.
- 16 张清学, 王文军, 邝健全, 等. 维生素 D 受体基因多态性与绝经前后妇女的骨密度. *中山医科大学报*, 2000, 21: 376-379.
- 17 Finkelstein JS, Lee MT, Sowers MF, et al. Ethnic variation in bone density in premenopausal and early perimenopausal women: effects of anthropometric and lifestyle factors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87: 3057-3067.
- 18 赵金秀, 周学淑, 孟迅吾, 等. 中国妇女维生素 D 受体基因型与骨密度及骨钙素关系的研究. *中国医学科学院学报*, 1997, 19: 252-256. (收稿日期: 2003-09-01)

(上接第 142 页)