

去卵巢大鼠胫骨形态计量学与一氧化氮的关系

石少辉 章明放 张文治 邱爽 李晋平

摘要: **目的** 初步探讨去势后不同时期大鼠骨髓基质细胞上清液一氧化氮(NO)与胫骨形态计量学变化的关系。**方法** 4月龄雌性 Wistar 大鼠 36 只,随机分为 6 组:假切 1 月组(I 组),假切 4 月组(II 组),去势 1 月组(III 组),去势 4 月组(IV 组),去势 7 月组(V 组),去势 12 月组(VI 组)。各组大鼠处死后取左侧胫骨、股骨体外培养骨髓基质细胞,测定各组大鼠上清液中 NO 浓度的改变;取右侧胫骨近端制备不脱钙的骨切片,观察各组大鼠胫骨形态计量学的变化。**结果** 与假切对照组比较去势组大鼠上清液中 NO 浓度降低,平均骨小梁体积减小,成骨表面和类骨质表面等成骨指数降低;破骨细胞、吸收表面等骨吸收指数升高;去势 4、7、12 月组 NO 浓度改变无统计学意义。**结论** 在骨质疏松患者骨的代谢过程中破骨细胞的数目增多,活性增强与 NO 浓度改变有关。

关键词: 去势;骨髓基质细胞;一氧化氮;胫骨;胫骨形态计量学

Relationship between nitric oxide and tibia histomorphometry in ovariectomised rats SHI Shaohui, ZHANG Mingfang, ZHANG Wenzhi, et al. Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between the changes in nitric oxide (NO) and the tibia in ovariectomized rats. **Methods** Sixty-six female Wistar rats were divided into six groups randomly. The first group was sham-ovariectomized for one month, and the second group for four months. The third group was ovariectomized for one month, and the fourth for four months, the fifth for seven months, and the sixth for one year. All rats were killed at the end of experiment. Their right proximal tibia were processed into undecalcified sections, and the bone marrow stromal cells of left tibia and femora were cultured *in vitro*. Then the concentration of NO in supernatant of culture and the changes in histomorphometry were examined. **Results** The NO concentration and trabecular bone volume in ovariectomized groups were significantly lower, and the osteoblast surface and the osteotoid surface were smaller than those in sham-operated groups, while the number of osteoclasts and erosion surface were significantly greater. **Conclusions** NO plays an important role in bone resorption, and may be related to that the increase in number and the enhancement in activity of osteoclasts during osteoporosis.

Key words: Ovariectomy; Bone marrow stromal cells; Nitric oxide; Tibia; Histomorphometry

骨质疏松是以骨量减少、骨组织结构退变为特征,骨的脆性增高而导致骨折危险性增加的一种代谢性骨病,好发于绝经后妇女和老年男性,其发病机制尚未完全明了。近年来实验研究发现一氧化氮(Nitric Oxide, NO)和一氧化氮合酶(Nitric Oxide Synthase, NOS)在骨的代谢过程中起重要作用^[1,2]。体内 NO 主要来源于成骨细胞及骨髓细胞^[3],而骨髓基质细胞是成骨细胞的主要来源。本研究通过观察

体外培养大鼠去势后,不同时期骨髓基质细胞上清液中 NO 浓度的变化,探讨 NO 在骨质疏松发病过程中的变化及意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物:选取 4 月龄雌性 Wistar 大鼠 36 只(中国军事医学科学院实验动物研究所),随机分为 6 组:假切 1 月组(I 组),假切 4 月组(II 组),去势 1 月组(III 组),去势 4 月组(IV 组),去势 7 月组(V 组),去势 12 月组(VI 组),每组 6 只。实验开始时,每只大鼠以 10% 的水合氯醛 3 ml/kg 腹腔麻醉,经背部开口,去势组摘除双侧卵巢,假切组切去卵巢附

作者单位:300070 天津医科大学病理教研室(石少辉、章明放、李晋平);天津市环湖医院(张文治);天津医科大学免疫教研室(邱爽)

通讯作者:章明放, Email: zhangmf@tjmu.edu.cn

近部分脂肪,并于实验终止日断颈处死。

1.2 仪器及试剂:Sakuka Tissue TEK VIP脱水机(日本),Leica EG 1160石蜡包埋机(澳大利亚),Leica 1516切片机(澳大利亚), α -MEM培养基(Gibco公司,美国),胎牛血清(Hyclon公司,美国),甲苯胺蓝(TBD试剂公司)甲基丙烯酸羟乙基脂(TBD试剂公司),A100目目镜网格(日本)。

1.3 骨髓基质细胞培养:处死前30 min每只大鼠腹腔注射肝素钠3000 u(约0.2 ml),断颈处死后用75%酒精浸泡10 min,在无菌条件下取左侧胫骨、股骨,再用 α -MEM液冲洗骨髓腔(α -MEM液中含20% FBS,100 IU/ml青霉素,100 μ g/ml链霉素),再以200目铜网过滤冲洗液,过滤后的冲洗液置6孔板中,每孔加入的 α -MEM为2 ml;倒置显微镜观察后6孔板置5% CO₂培养箱中,隔日换 α -MEM培养液。第13天末吸取细胞培养液置冷藏管中,-20℃冰箱中保存,最后培养上清液中NO浓度用硝基还原酶法测定。

1.4 骨组织标本制备及观察:大鼠处死后取右侧胫骨,梯度酒精脱水,甲基丙烯酸羟乙基脂包埋,硬组织切片机切成5 μ m厚,每例标本各切2张,分别以甲苯胺蓝染色和HE染色。甲苯胺蓝染色用于骨形

态计量学观察,HE染色用于破骨细胞计数。所有数据采用100目目镜网格,在200倍视野下距断板1~3.5 mm处进行计量。

1.5 统计学处理:所有数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据采用SPSS forWindows 11.5软件包进行处理,采用方差分析及两两比较的LSD-*t*检验。

2 结果

2.1 骨组织病理学改变:甲苯胺蓝染色,骨组织矿物质呈深蓝色,类骨质呈浅蓝色。大鼠去势后随时间的延长胫骨骨皮质逐渐变薄,骨小梁细小稀疏且显著减少,骨髓腔增宽(图1)。

2.2 各组大鼠胫骨平均骨小梁体积、成骨指数和骨髓基质细胞上清液NO浓度改变见表1。

表1 大鼠胫骨骨密度、成骨指数及NO含量的测定($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (n)	OV/TV (%)	Ob/BS (%)	OS/BS (%)	NO (μ mol/L)
I	6	21.44 \pm 1.82	53.40 \pm 20.25	17.03 \pm 4.87	64.74 \pm 8.40
III	6	20.77 \pm 3.05	34.50 \pm 0.27**	11.8 \pm 5.67*	46.01 \pm 2.58**
IV	6	16.27 \pm 2.67**	22.07 \pm 4.07**	5.96 \pm 4.87**	47.61 \pm 3.21**
V	6	12.28 \pm 4.47**	27.10 \pm 10.13**	10.8 \pm 5.25*	52.89 \pm 10.85**
VI	6	7.52 \pm 4.25**	36.33 \pm 10.11**	1.39 \pm 1.28**	46.21 \pm 8.23**

注:与假切1月组比较**P* < 0.05,***P* < 0.01

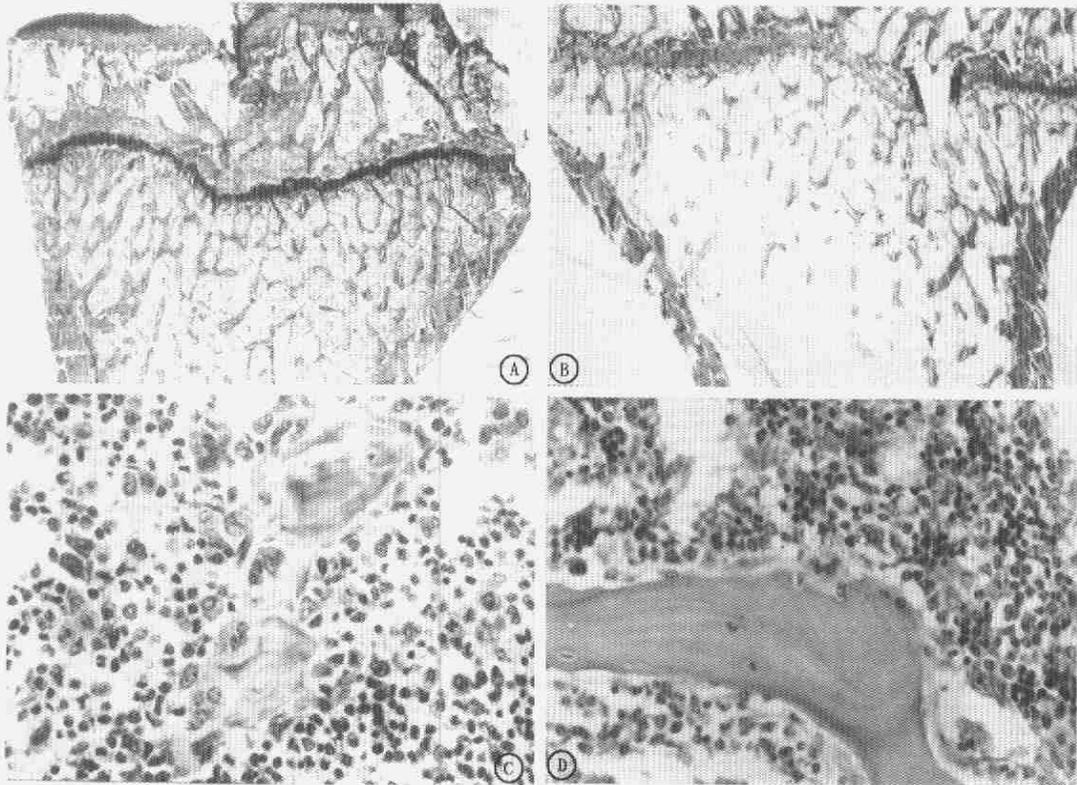


图1 骨组织病理学改变

A 甲苯胺蓝染色 \times 40 假切1月组 骨组织矿物质染成深蓝色; B 甲苯胺蓝染色 \times 40 去势7月组 骨皮质变薄骨小梁细小稀疏且明显减少,骨髓腔增宽; C 甲苯胺蓝染色 \times 400 骨小梁边缘被覆成骨细胞和破骨细胞; D HE染色 骨小梁表面破骨细胞

2.3 各组大鼠胫骨骨吸收指数见表2。

表2 大鼠胫骨吸收指标($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	N.Oc/T.Ar(个/mm ²)	ES/BS(%)
I组	6	1.96 ± 0.12	22.06 ± 2.01
II组	6	0.88 ± 0.12**	13.36 ± 0.95**
III组	6	2.43 ± 0.64*	29.86 ± 1.71**
IV组	6	1.45 ± 0.06* [△]	16.39 ± 1.84* [△]

注:与I组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与II组比较[△] $P < 0.01$

3 讨论

NO又称内皮来源的舒张因子,是体内一种含自由基的气体。NO性质不稳定,极易扩散,是广泛存在于细胞间、细胞内的重要信息分子,体内NO是由L-精氨酸经合成酶催化而生成的。成骨细胞、骨细胞和破骨细胞均能表达NOS,这为NO作为一种信息分子调节骨的代谢提供了一种可能性。在动物实验中发现,正常雌性大鼠静脉注入NOS抑制剂8周后,破骨细胞数目增多,骨吸收增强,骨密度显著降低^[4];卵巢切除后大鼠血清NO水平明显降低^[5],而当补加雌激素或NO供体药物硝酸甘油后可防治骨质的丢失^[6-8]。提示NO有类似雌激素作用,防治由雌激素缺乏所致的骨质丢失,雌激素对骨量的维持可能相当程度上由NO信使分子来介导。

基础浓度的NO是维持破骨细胞正常功能所必需的,适当低浓度的NO可促进破骨细胞前体细胞向破骨细胞分化;较高浓度的NO不仅可促使破骨细胞前体细胞大量凋亡,抑制培养的骨组织或体外培养破骨细胞的骨吸收活动,而且还能抑制破骨细胞形成的骨陷窝的体积和数目^[9,10]。本实验结果显示,与对照组比较去势后大鼠平均骨小梁体积减小,骨髓基质细胞上清液NO浓度显著降低;但破骨细胞数目增多,骨吸收表面增大。这提示去势后雌激素水平降低,雌激素对成骨样细胞和内皮细胞NOS活性的激活作用减弱^[11],导致NO生成减少,破骨细胞的抑制作用降低而促使骨质疏松的发生。

骨质疏松主要是由于骨形成与骨吸收脱耦联,骨吸收大于骨形成所致。经实验证实,破骨细胞前体细胞分化为成熟的破骨细胞必须依据成骨细胞的存在^[12],而成骨细胞增殖,及其分泌骨基质功能正常水平的发挥必需依据适当浓度NO的存在。超过一定阈值浓度的NO不仅对破骨细胞有抑制作用,而且还能抑制成骨细胞的成熟及其功能,并通过环氧酶旁路抑制成骨细胞碱性磷酸酶活性,阻断前列腺素对成骨细胞的作用及抑制骨基质矿化^[13,14]。本实验中去势4、7、12月骨髓基质细胞上清液中NO

浓度改变无统计学意义;成骨表面、类骨质表面等成骨指数在老龄和去势后降低。已知骨质疏松是一种高转换率骨病,去势后成骨表面、类骨质表面等成骨指数也可增加。这说明老龄及去势后雌激素和NO仍然对骨代谢的调节起重要作用,而其他微环境因素,如:IL-1、IL-6等细胞因子,也可能通过某种机制共同参与调节骨的代谢,其具体机制还有待于进一步实验研究。

【参 考 文 献】

- [1] Van'T Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology*, 2001, 103:255-269.
- [2] Mentareri R, Kamel S, Wattel A, et al. Regulation of bone resorption and osteoclast survival by nitric oxide: possible involvement of NMDA-receptor. *J Cell Biochem*, 2003, 88:1145-1156.
- [3] Van'T Hof RJ, Ralston SH, Johnston PW, et al. Nitric oxide's function in bone cells. *Curr Opin Orthop*, 1997, 8:19-24.
- [4] Fox SW, Chambers TJ, Chow JW. Nitric oxide is an early mediator of the increase in bone formation by mechanical stimulation. *Am J Physiol*, 1996, 270:955-960.
- [5] 贺买宏,王治伦,陈挺,等. 雌激素治疗去势雌性大鼠骨质疏松症血清NO、NOS的变化. *中国地方病杂志*, 2002, 21: 14-16.
- [6] Wimalawansa SJ, Chapa MT, Yallampalli C, et al. Prevention of corticosteroid-induced bone loss with nitric oxide donor nitroglycerin in male rats. *Bone*, 1997, 21: 275-279.
- [7] Wimalawansa SJ. Restoration of ovariectomy-induced osteopenia by nitroglycerin. *Calcif Tiss Int*, 2000, 66:56-50.
- [8] Hukkanen M, Platts LA, Lawes T, et al. Effect of nitric oxide donor nitroglycerin on bone mineral density in a rat model of estrogen deficiency-induced osteopenia. *Bone*, 2003, 32:241-249.
- [9] Kikkawa I, Satio S, Tominaga K, et al. Lipopolysaccharide (LPS) stimulates the production of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by osteoclasts in murine bone marrow cell culture. *Microbiol Immunol*, 1998, 42:591-598.
- [10] Mancini L, Becherini L, Benvenuti S, et al. Bioeffects of a nitric oxide donor in a human preosteoclastic cell line. *Int J Clin*, 1997, 17: 93-96.
- [11] Armour KE, Ralston SH. Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblast-like cells. *Endocrinology*, 1998, 139:799-802.
- [12] Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, 1999, 21:115-137.
- [13] Kanemitsu M, Ikeda K, Yamada Y, et al. Interaction between nitric oxide synthase and cyclooxygenase pathways in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, 1997, 12:1789-1796.
- [14] 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. (收稿日期:2004-10-28)