

雌激素治疗去卵巢大鼠骨丢失的不同部位效应观察

彭维杰 李岱 罗丹 李青 何明

摘要:目的 探讨雌激素对去卵巢(OVX)大鼠骨丢失的作用敏感部位。方法 8月龄SD大鼠去卵巢后,皮下注射 17β -雌二醇(E_2)(10, 30 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)3月,双能X线骨密度仪检测全身总骨密度(BMD),离体腰椎(L_{4,6})、股骨、胫骨BMD。实验分为假手术组、去卵巢模型组、雌激素小剂量组、雌激素大剂量组,每组10只。结果 E_2 可逆转OVX所致总BMD降低,增加OVX后腰椎整体及3个兴趣区BMD。 E_2 治疗可升高OVX后股骨BMD,其中股骨整体、股骨近端和股骨远端处改变最为明显($P < 0.01$)。其余各兴趣区BMD改变相对稍弱,而股骨中段最不敏感。胫骨BMD指标中以胫骨近端最为敏感($P < 0.01$),而中远端几乎无改变。结论 雌激素对去卵巢(OVX)大鼠的作用敏感部位与骨量丢失敏感部位具有一致性,雌激素增加骨密度主要在腰椎、股骨近端、股骨远端和胫骨近端。

关键词: 雌激素; 去卵巢大鼠; 骨密度; 敏感部位; 腰椎; 股骨; 胫骨

The sensitive regions of the effect of estrogen on bone lost in ovariectomized rats PENG Weijie^{1,2}, LI Dai², LUO Dan², et al. (1. Medical College, Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. School of Pharmaceutic Sciences, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: **Objective** To investigate the sensitive regions of the effect of estrogen on the bone mineral density (BMD) in ovariectomized rats. **Methods** 17β -estradiol (E_2) had been administered (10, 30 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, s. c.) in ovariectomized 8-month old SD rats for 3 months. Total body BMD and BMD in isolated lumbar part of spines (L_{4,6}), the femurs and the tibias post-treatment were measured by dual-energy X-ray absorptiometry. Forty rats were randomly divided into four groups including sham, OVX (ovariectomy), E_2 (10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), E_2 (30 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) group. **Results** The administration of E_2 may reverse the decreased BMD of total body and L_{4,6} after ovariectomy. BMD in total femurs, distal and proximal femurs metaphysis are most apparently increased after E_2 treatment in OVX rats, and BMD in other femur interest regions are weakly changed, especially in middle part of femurs. In tibias, the proximal metaphysis are most sensitive to E_2 treatment, and there were no significant changes in middle to distal part of tibias. **Conclusions** The sensitive regions of the effect of estrogen are in accordance with bone lost after ovariectomy in rats. The increase of BMD after treatment by E_2 is mainly present in lumbar part of spines, the proximal and distal metaphysis in femurs, and the proximal metaphysis in tibias.

Key words: Estrogen; Ovariectomized rats; Bone mineral density (BMD); Sensitive regions; Lumbar; Femur; Tibia

雌激素替代治疗是绝经后骨质疏松症(Postmenopause Osteoporosis, PMOP)的常规治疗手段,大量实验和临床研究已经确证雌激素长期替代可升高去卵巢动物或绝经后妇女全身和局部骨密

度,从而有效预防和治疗PMOP。尽管有部分实验研究已经查明去卵巢后骨矿密度降低的敏感部位^[1,2],如主要集中于腰椎、股骨近端、股骨远端和胫骨近端等部位,但针对包括雌激素等的各种治疗药物对这些敏感部位的影响,仍缺乏较细致的研究和明确的证据。因此,本研究拟采用8月龄大鼠卵巢切除模型,在长期雌激素替代治疗后,主要通过观察上述骨量丢失敏感部位BMD的改变,探讨雌激素对去卵巢大鼠骨量丢失的作用敏感部位。

基金项目:国家自然科学基金项目(30500184)

作者单位:330006 南昌,南昌大学医学院药理学系(彭维杰、李青、何明);中南大学药学院(彭维杰、李岱、罗丹)

通讯作者:彭维杰,Email:weiqipeng@126.com

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂

(1) QDR 24500 A 型扇形束双能 X 线骨密度仪: Hologic 公司。

(2) AEU-210 型精密电子天平: 湖南湘仪天平仪器厂。

(3) 722s 型光栅分光光度计: 上海第二分析仪器厂。

(4) ^{125}I -雌二醇放免检测试剂盒、 ^{125}I -骨钙素放免检测试剂盒: 北京北免东雅生物技术研究所。

(5) $^{17\beta}$ -雌二醇, L-精氨酸: Sigma 公司。

1.2 实验动物分组与处理

雌性 Sprague-Dawley 大鼠, 8 月龄, 由中南大学湘雅二医院动物实验室提供。常规喂养 1 w 后进行手术。动物处理用戊巴比妥钠 (60 mg/kg, i. p.) 麻醉完全后, 首先进行全身骨密度检查。手术时大鼠取俯卧位, 消毒后于肋弓下第 3 腰椎处切口, 钝性分离并切除双侧卵巢 (假手术组不摘除卵巢), 分层缝合肌肉筋膜, 皮下撒上少量的青霉素粉, 缝合伤口喂药, 术后 4 d 肌注青霉素。术后大鼠饲养在温度为 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$, 每天光照 12 h 的环境中, 大鼠任意进食湘雅二医院动物实验室自产的大鼠全价颗粒饲料 (1.53% 钙、0.9% 磷) 和自来水。实验分为: 假手术组、去卵巢模型组、雌激素小剂量组、雌激素大剂量组。每组 10 只。药物治疗组给予 $^{17\beta}$ -雌二醇

($10, 30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 皮下注射, 每周 5 d)。 $^{17\beta}$ -雌二醇首先溶于无水乙醇后再与市售芝麻油混匀 (两者体积比为 3:97), 假手术组和去卵巢组均给予溶媒。术前及术后每月测量体重。治疗 12 w 后, 大鼠首先麻醉后测量全身骨密度, 再于麻醉状态下处死, 收集血浆, 冻存于 -70°C 备测 $^{17\beta}$ -雌二醇、骨钙素水平。分离子宫并称重。仔细剥离附着在左侧股骨、左侧胫骨和腰椎 ($\text{L}_{4,6}$) 的肌肉和其他结缔组织以备检测离体骨密度。

1.3 全身和离体骨密度测量^[1]

骨密度通过双能 X 线骨密度仪测量。骨密度 (BMD) 以骨量 (BMC \checkmark g) / 骨投影面积 (cm^2) 表示。全身 BMD 测量: 麻醉后的大鼠取俯卧式行全身扫描, 扫描宽度为 18 cm, 长度任意调整, 扫描速度为 4.8 s/cm。测定大鼠全身 BMD。

离体股骨、胫骨和腰椎 BMD 测量: 将已干净剥离肌肉和结缔组织的离体骨置于测量台, 分别对股骨、胫骨和腰椎行高清晰度扫描, 扫描宽度为 5 cm, 长度可任意调整, 扫描速度为 31.1 s/cm。腰椎、股骨、胫骨分别如图 1 所示分为 3 个或 7 个兴趣区, 其中椎骨兴趣区 SR 1-3 分别代表 $\text{L}_{4,6}$, 股骨兴趣区 FR 1-7 分别代表从股骨远端到近端的 7 个部分, 胫骨兴趣区 TR 1-7 分别代表从胫骨近端到胫骨远端的 7 个部分。测定各离体骨整体 BMD 以及各兴趣区 BMD。

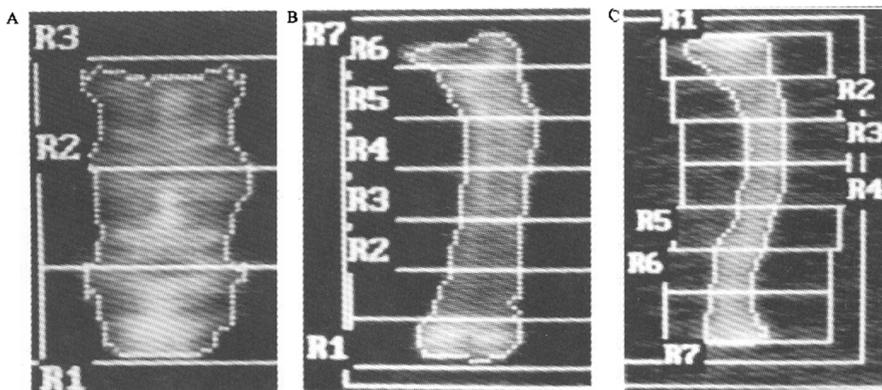


图 1 大鼠腰椎 ($\text{L}_{4,6}$)、股骨、胫骨分析图像

1.4 血浆 $^{17\beta}$ -雌二醇、骨钙素浓度测定

放免法, 参照放免试剂盒说明书进行检测。

1.5 统计学处理

数据用平均值 \pm 标准差表示。所有数据用单因

素方差分析和 the Student Newman Keuls t-test。 $P < 0.05$ 被认为差异有显著性。

2 结果

2.1 雌激素对各实验组大鼠体重的影响

术前各组体重无明显差异。大鼠去卵巢后体重明显增加, E₂ 两种剂量均可防止体重增加 (P < 0.05)(表 1)。

2.2 雌激素对大鼠子宫重量、血浆 17-β 雌二醇和骨钙素浓度的影响

如表 6 所示,去卵巢组血浆 17-β 雌二醇 (E₂) 水平和子宫重量较假手术组明显降低。雌激素替代治疗后明显增加血浆雌二醇浓度和子宫重量。与 OVX 组相比, E₂ 显著降低血浆骨钙素浓度 (P < 0.01), 以小剂量组更为明显。

2.3 雌激素对骨密度的影响

表 2 显示治疗前后全身 BMD 的变化。手术前各组全身 BMD 无明显差异, 手术后 3 个月, 各组 BMD 均有所升高, 但 OVX 组均值低于假手术组和 E₂ 大剂量组, 然而各组处理前后骨密度变化百分率差异并无统计学意义。

离体腰椎 BMD (表 3) 结果显示, 腰椎整体及 3 个兴趣区 BMD 在 OVX 后均显著降低 (P < 0.01), E₂ 呈剂量依赖性增加各 BMD。表 4 为各处理组对离体股骨整体及 7 个兴趣区 BMD 的影响, 其中股骨整体、股骨近端 (FR 6-7) 和股骨远端 (FR 1) 处 BMD 指标改变最为明显, 表现为 OVX 后显著降低而 E₂ 治

疗显著升高 (P < 0.01)。其余各兴趣区 BMD 改变相对稍弱, 而股骨中段 (FR 3-4) 对 E₂ 最不敏感。胫骨 BMD 指标中以胫骨近端 (TR 1) 最为敏感 (P < 0.01), 而中远端 (TR 4-7) 几乎无改变 (表 5)。

表 1 雌激素对大鼠体重 (g) 的影响 (n = 10)

组别	治疗前	1 个月	2 个月	3 个月
Sham	309 ± 9	322 ± 10*	332 ± 12*	341 ± 15*
OVX	317 ± 7	359 ± 12##	383 ± 15##	405 ± 18##
E ₂ (L)	314 ± 6	340 ± 9#	345 ± 10**	351 ± 13**
E ₂ (H)	318 ± 9	331 ± 11	339 ± 11*	348 ± 12*

注: OVX 去卵巢模型组; E₂(L): OVX + E₂ (10 μg · kg⁻¹ · d⁻¹); E₂(H): OVX + E₂ (30 μg · kg⁻¹ · d⁻¹)。与 OVX 比较* P < 0.05, # P < 0.05, ## P < 0.01

表 2 雌激素对大鼠整体骨密度 (g/cm) 的影响

组别	治疗前	治疗后	Increase rate (%)
Sham	0.1651 ± 0.0031	0.1723 ± 0.0024	4.50 ± 1.48
OVX	0.1590 ± 0.0025	0.1628 ± 0.0017##	2.90 ± 1.47
E ₂ (L)	0.1620 ± 0.0032	0.1687 ± 0.0022	4.02 ± 1.45
E ₂ (H)	0.1633 ± 0.0015	0.1712 ± 0.0028*	4.79 ± 1.27

注: 与 OVX 比较* P < 0.05, # P < 0.05, ## P < 0.01

表 3 雌激素对大鼠离体腰椎 (L₄₋₆) 各兴趣区骨密度的影响

组别	whole	SR1	SR2	SR3
Sham	0.2003 ± 0.0053	0.2078 ± 0.0062	0.2037 ± 0.0055	0.1898 ± 0.0043
OVX	0.1756 ± 0.0025##	0.1807 ± 0.0027##	0.1803 ± 0.0032##	0.1661 ± 0.0025##
E ₂ (L)	0.1907 ± 0.0043*	0.1982 ± 0.0046*	0.1940 ± 0.0042	0.1795 ± 0.0045*
E ₂ (H)	0.2016 ± 0.0050**	0.2101 ± 0.0056**	0.2040 ± 0.0051**	0.1892 ± 0.0018**

注: SR1, SR2, SR3 分别代表 L_{4,6} (R1, 2, 3) 兴趣区。与 OVX 比较* P < 0.05, ** P < 0.01, # P < 0.01

表 4 雌激素对大鼠离体股骨骨密度的影响

组别	whole	FR1	FR2	FR3	FR4	FR5	FR6	FR7
Sham	0.2019 ± 0.0049	0.2618 ± 0.0057	0.1604 ± 0.0054	0.1631 ± 0.0046	0.1809 ± 0.0058	0.1999 ± 0.0063	0.2160 ± 0.0072	0.2112 ± 0.0039
OVX	0.1803 ± 0.0031##	0.2366 ± 0.0035##	0.1500 ± 0.0016	0.1512 ± 0.0043#	0.1625 ± 0.0053#	0.1711 ± 0.0050##	0.1842 ± 0.0054##	0.1915 ± 0.0035##
E ₂ (L)	0.1955 ± 0.0030*	0.2634 ± 0.0058**	0.1600 ± 0.0026	0.1613 ± 0.0028	0.1650 ± 0.0073	0.1851 ± 0.0038	0.2004 ± 0.0049	0.2064 ± 0.0033**
E ₂ (H)	0.2003 ± 0.0046**	0.2721 ± 0.0054**	0.1641 ± 0.0048*	0.1614 ± 0.0041	0.1746 ± 0.0045	0.1888 ± 0.0051*	0.2078 ± 0.0068**	0.2117 ± 0.0041**

注: FR1-7 代表股骨 7 个兴趣区 (R1-7); 与 OVX 比较* P < 0.05, ** P < 0.01, # P < 0.05, ## P < 0.01

表 5 雌激素对大鼠离体胫骨骨密度的影响

组别	whole	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5	TR6	TR7
Sham	0.1781 ± 0.0035	0.2425 ± 0.0037	0.1714 ± 0.0037	0.1615 ± 0.0035	0.1588 ± 0.0035	0.1585 ± 0.0039	0.1623 ± 0.0038	0.1724 ± 0.0026
OVX	0.1683 ± 0.0026#	0.2114 ± 0.0033##	0.1607 ± 0.0035#	0.1529 ± 0.0033#	0.1520 ± 0.0031	0.1535 ± 0.0041	0.1512 ± 0.0034#	0.1657 ± 0.0025
E ₂ (L)	0.1754 ± 0.0034	0.2426 ± 0.0040**	0.1635 ± 0.0029	0.1608 ± 0.0035	0.1552 ± 0.0040	0.1538 ± 0.0043	0.1564 ± 0.0037	0.1666 ± 0.0026
E ₂ (H)	0.1803 ± 0.0030**	0.2471 ± 0.0072**	0.1730 ± 0.0021**	0.1630 ± 0.0019*	0.1556 ± 0.0024	0.1563 ± 0.0033	0.1581 ± 0.0031	0.1714 ± 0.0028

注: TR1-7 代表胫骨 7 个兴趣区 (T1-7); 与 OVX 比较* P < 0.05, ** P < 0.01, # P < 0.05, ## P < 0.01

表 6 各组大鼠子宫重量及血浆 17-β 雌二醇和骨钙素浓度

组别	E ₂ (pg/mL)	子宫重量 (g)	骨钙素 (ng/mL)
Sham	53.3 ± 9.2	0.82 ± 0.12	2.35 ± 0.24
OVX	14.2 ± 3.5#	0.25 ± 0.03##	2.61 ± 0.31
E ₂ (L)	37.7 ± 6.3*	0.59 ± 0.07*	1.68 ± 0.09**
E ₂ (H)	49.0 ± 6.1**	0.59 ± 0.04*	1.83 ± 0.15**

注: 与 OVX 比较* P < 0.05, ** P < 0.01, # P < 0.01

3 讨论

绝经后骨质疏松症 (Postmenopause Osteoporosis, PMOP) 是由于女性生理性绝经后雌激素缺乏导致骨吸收与骨形成过程失衡, 以进行性骨量丢失、骨小梁退行性变、骨质疏松、骨脆性增加和易发生骨折为临床特征, 严重危害中老年妇女健康的全身性疾病。

随着老龄化时代的到来, PMOP 发病率日益升高, 对该疾病的防治研究为当前主要热点之一。

PMOP 的最主要的病因之一是雌激素缺乏, 引起骨的吸收和重建平衡失调。骨在代谢活动过程中的重建(remodeling)是破骨细胞骨吸收作用与成骨细胞骨形成作用之间的一种动态平衡。骨重建发生于骨表面, 小梁骨表面有骨内膜覆盖, 骨重建活动非常活跃^[3]。传统观点认为雌激素通过调节降钙素、PTH、维生素 D、IGF-1、BMPs 等激素和细胞因子的合成与分泌, 产生抑制破骨细胞性骨吸收作用, 目前认为, 雌激素还可以通过受体途径直接调节破骨细胞的骨吸收和成骨细胞的骨形成。雌激素和 ER 结合, 通过影响细胞周期, 诱导破骨细胞的凋亡, 抑制破骨细胞前体形成、细胞的募集和分化, 抑制破骨细胞的活性, 此外, 雌激素对成骨细胞的增殖、分化也具有直接促进作用, 但雌激素对骨吸收的影响更为主要^[4,5]。因此, 当雌激素缺乏时, 骨转换增加, 破骨细胞过于活跃, 其功能相对或绝对增强, 骨重建呈负平衡, 引起骨量丢失, 松质骨骨小梁丰富, 其对雌激素缺乏所致骨量丢失的敏感性大于皮质骨, 因此以松质骨为主的部位如椎骨、股骨近端、远端与胫骨近端干骺处等受累最为严重, 常常表现为上述部位骨密度降低较其他部位更为明显, 这在临床和动物实验均已得到证明^[6,7]。

本研究采用 8 月龄大鼠去卵巢后给与 17 β -雌二醇替代治疗 3 月, 能较好模拟绝经后骨质疏松临床病例及其治疗。研究发现大鼠去卵巢后出现明显骨量丢失, 整体骨密度、离体腰椎(L₄₋₆)、股骨、胫骨骨密度指标均明显低于假手术组, E₂ 替代治疗 3 月后可抑制骨量丢失现象, 表现为骨密度升高、骨更新指标骨钙素浓度降低。本研究还发现, 由成骨细胞分泌的骨钙素作为骨重建和骨形成指标, 其血浆水平在雌激素大剂量组反而高于小剂量组, 这间接说明在低剂量时, 雌激素主要通过抑制骨吸收而减少骨丢失和骨重建, 而高浓度雌激素同时还可能促进成骨细胞所介导的骨形成, 这与他人^[8,9]报道一致。

尽管大量临床和动物实验已经证明雌激素替代治疗可有效防治 PMOP, 但实验大都采用全身骨密度进行疗效观察, 针对雌激素具体的骨作用部位, 仍缺乏较系统和明确的证据。本实验详细观察了雌激素对去卵巢大鼠骨量丢失的主要作用敏感部位。去卵巢后各实验组全身骨密度均有所升高可能与体重增加有关。然而, 本研究发现各实验组离体骨密度改变较全身骨密度更为敏感, 以松质骨结构为主的

离体腰椎(L₄₋₆)、SR 1-3)、股骨近端干骺端(FR 7)、股骨远端干骺端(FR 1)以及胫骨近端干骺端(TR 1)对于衡量去卵巢大鼠骨量改变更为敏感, 这与他人^[1,2]的研究结果一致。雌激素作用的敏感部位与骨量丢失敏感部位具有明显的一致性, 而且该作用具有一定的剂量依赖关系, 低剂量雌激素主要防止上述最敏感部位的骨量丢失, 而高剂量雌激素对某些次敏感区域同样有效。不少研究已经证实, 对于绝经后骨质疏松或去卵巢骨质疏松模型, 雌激素升高松质骨骨密度的作用敏感性强于皮质骨^[6,7]。本实验中股骨两侧干骺端(FR 1、FR 7)对雌激素的敏感性强于股骨骨干段(FR 3-5), 胫骨近侧干骺端(TR 1)对雌激素的敏感性也强于胫骨骨干(TR 4-6)和远端(TR 7), 股骨干、胫骨干、胫骨远端均以皮质骨为主, 尽管胫骨远端的低反应性可能还与体重增加有关, 由于雌激素作用与骨量丢失敏感区的高度一致性, 仍提示对于本实验模型, 雌激素治疗骨量丢失作用可能主要与抑制骨吸收有关, 而通过促进成骨细胞性骨形成的作用并不明显。

因此, 本试验表明, 在 8 月龄大鼠去卵巢 12 w 后, 雌激素升高骨密度作用部位与骨量丢失部位具有明显的一致性, 提示雌激素主要通过抑制骨吸收发挥作用, 其主动增加骨形成的作用并不明显。

【参 考 文 献】

- [1] 伍贤平, 廖二元, 陆泽元, 等. 双能 X 线吸收法测定大鼠骨量的评价及去卵巢骨丢失敏感区的选择. 中华内分泌代谢杂志 2000, 16: 212-215.
- [2] 陆泽元, 廖二元, 伍贤平, 等. 去卵巢对大鼠骨密度的影响. 中国骨质疏松杂志 2002, 8: 13-15.
- [3] 陈东, 王连唐, 陈国栋, 等. 去卵巢后大鼠不同部位的骨组织计量学与骨密度研究. 中国骨质疏松杂志 2002, 8: 208-210.
- [4] 马庆芬, 姚珍薇. 雌激素对骨质疏松作用机制的研究进展. 国外医学妇产科学分册 2005, 32: 162-164.
- [5] Nelson HD. Postmenopausal osteoporosis and estrogen. Am Fam Physician 2003, 68: 606, 610, 612.
- [6] Levine JP. Long-term estrogen and hormone replacement therapy for the prevention and treatment of osteoporosis. Curr Womens Health Rep 2003, 3: 181-186.
- [7] Andersson N, Islander U, Egecioglu E, et al. Investigation of central versus peripheral effects of estradiol in ovariectomized mice. J Endocrinol, 2005, 187: 303-309.
- [8] Tobias JH, Compston JE. Does estrogen stimulate osteoblast function in postmenopausal women? Bone 1999, 24: 121-124.
- [9] Samuels A, Perry MJ, Gibson RL, et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in estrogen-induced osteogenesis. Bone 2001, 29: 24-29.

(收稿日期: 2006-07-20)