·论著·

地塞米松促进大鼠血管钙化的实验研究

杨英 薛明明 刘陶迪 范晓梅 纳仁高娃 张海峰

中图分类号：R31 文献标识码：A 文章编号：1006-7108(2008)01-0031-04

摘要：目的 在大鼠血管钙化模型上，探讨地塞米松对血管钙化的影响。方法 在维生素 D_3 加尼古丁诱导制备的大鼠血管钙化模型上，给予地塞米松肌肉注射，制备血管钙化加骨质疏松复合模型，观察地塞米松对血管钙化的影响。Wistar 大鼠共分为 4 组，即对照组、骨质疏松组、钙化组和钙化加骨质疏松组。8 周后，进行主动脉钙含量测定、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）活性及骨钙素（osteocalcin，OC）含量测定，判断血管钙化程度；用骨密度仪测定大鼠骨密度以反映骨质疏松程度。结果 在钙化加骨质疏松组，其血管钙含量（183.39 ± 7.22）nmol/(mg·pr)高于单独钙化组（111.72 ± 8.58）nmol/(mg·pr)（$P < 0.01$）；钙化组腰椎骨密度（0.18 ± 0.01）g/cm^2 低于正常对照组（0.20 ± 0.006）g/cm^2（$P < 0.01$）。结论 地塞米松所致的骨质疏松症可能会加重血管钙化；血管钙化也可能促进骨质疏松症的发生，其机制有待进一步探讨。

关键词：地塞米松；骨质疏松；血管钙化；大鼠

Dexamethasone enhances vascular calcification in rats

YANG Ying, XUE Mingming, LIU Taodi, et al. Department of Physiology, Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010059, China

Abstract: Objective To explore the effect of Dexamethasone on vascular calcification. **Methods** We induced complex animal model of calcification plus osteoporosis in rats by injecting Dexamethasone in the calcification model (induced by Vitamin D_3 and Nicotine). Forty male Wistar rats, two months of age, were divided randomizedly into four groups, every group had ten: control group, osteoporosis group (OP), calcification group (VDN) and osteoporosis plus calcification group (VDN + OP). Eight weeks later, the content of arterial calcium, the activity of alkaline phosphatase (ALP) and the concentration of osteocalcin (OC) were assayed to reflect the degree of calcification. The bone density was detected by bone density instrument. **Results** The results showed that calcium content of blood vessel in calcification plus osteoporosis group (183.39 ± 7.22) nmol/mg·pr was higher than VDN group (111.72 ± 8.58) nmol/mg·pr ($P < 0.01$); in addition, the bone density of lumbar vertebra in VDN group (0.18 ± 0.01) g/cm^2 was lower than control group (0.21 ± 0.006) g/cm^2 ($P < 0.01$). **Conclusion** Osteoporosis may aggravate vascular calcification; and vascular calcification could enhance the occurrence of osteoporosis; the mechanism of these results needs further approach.

Key words: Dexamethasone; Osteoporosis; Vascular calcification; Rat

血管钙化常发生于动脉粥样硬化性血管病变，也存在于糖尿病、肾病血管病变、高血压等疾病的病理过程中，可导致血栓形成、动脉粥样硬化斑块破裂等严重后果，是心血管疾病的重要危险因素[1]。以往认为血管钙化是钙盐在血管壁的被动沉积，然而近年来许多研究结果显示，血管钙化是一个主动的、可调节的过程，与骨形成过程有许多相似之处[2]。骨质疏松是一种以骨量减少、骨组织微细结构退化为特征，致使骨的脆性增加以及易发生骨折的全身性疾病。令人感兴趣的是，在临床上发现血管钙化与骨质疏松可并存于同一个体[3]，这一矛盾现象的出现，提示两者可能存在某种内在的联系。本研究在维生素 D_3 加尼古丁诱导的大鼠血管钙化模型上，应用地塞米松造成骨质疏松症，在这种复合动物模型上观察血管钙化和骨质疏松这两种疾病的相互关系，旨在对临床预防及治疗决策提供理论依据。

基金项目：内蒙古医学院青年基金资助项目（QN200410）

作者单位：010059 呼和浩特，内蒙古医学院生理教研室

作者 Email：yangying1103@sohu.com

1 材料和方法

1.1 动物分组及造模方法

二月龄健康雄性 Wistar 大鼠 40 只，清洁级，体重 180 ~ 220 g，由内蒙古大学实验动物中心提供。随机分为 4 组，每组 10 只。对照组：普通饲料喂养，不做特殊处理。钙化组（VDN）：按照文献制备[4]。骨质疏松组（OP）：按文献方法制备[5]。钙化加骨质疏松组（VDN + OP）：同 OP 及 VDN 组方法。

1.2 试剂与药品

地塞米松磷酸钠注射液；骨钙素放免试剂盒（中国原子能科学研究所）；羟脯氨酸测试盒（南京建成生物制品有限公司）；VD_3、尼古丁购自 Sigma 公司；碱性磷酸酶试剂盒（南京建成生物制品有限公司）。其余试剂均为市售分析纯。

1.3 主要仪器

原子吸收分光光度计（JenanovAA300）；双能 X 线骨密度仪（NORLAND，XR-36）；全自动生化分析仪（BECKMAN）；N-695B 型智能放免 γ 测量仪。

1.4 取材及标本制备

大鼠共同喂养 8 周后，注射过量戊巴比妥钠处死动物。处死前置于代谢笼中收集 24 h 尿液（－20℃保存待测）。颈动脉取血 5 ml，分离血清（－20℃保存备用，待测各项生化指标）。迅速剖开动物取胸腹主动脉全长用 PBS 冲洗后，去除外膜后于－70℃保存备用。取腰椎 2 ~ 4 节段及右股骨全长，清除肌肉及结缔组织后于－40℃保存待测。

1.5 血管总钙含量测定[6]

取胸主动脉 1 cm（约 10 mg）80℃烤干，组织称重，加入 2 mol/L 硝酸 2 ml 消化 180℃烤干，冷却后加入去离子水（含 27 nmol/L 的氯化钾和 27 μmol/L 的氯化镧）10 ml 复溶，取 2 ml 加入 1% 氯化锶 100 μl，用原子吸收分光光度计在 422.7 nm 波长处读取吸光度，测定组织的钙含量，并换算成 nmol/(mg·pr)。

1.6 血管碱性磷酸酶（ALP）活性测定

取腹主动脉约 1 cm 制备组织匀浆，离心吸取上清液，按药盒说明书操作测定血管组织 ALP 活性。结果用考马斯亮蓝法测定的总蛋白含量进行标准化，单位为 U/(mg·pr)。

1.7 血管骨钙素（OC）放免测定

取腹主动脉约 1 cm 制备组织匀浆，离心后吸取上清液，骨钙素浓度用 ^{125}I 放免法进行测定，结果用考马斯亮蓝法测定的总蛋白含量进行标准化，单位为 ng/(mg·pr)。

1.8 骨密度测定

采用双能 X 线骨密度仪，应用小动物软件测定大鼠右侧股骨及腰椎骨密度。

1.9 血液和尿液生化指标测定

血清钙、磷、碱性磷酸酶活性，尿钙、磷、尿肌酐送生化实验室采用全自动生化分析仪测定，各项指标均为集中检测。血清骨钙素、尿羟脯氨酸（HOP）测定参照试剂盒说明进行。

1.10 统计学处理

各组实验结果以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。使用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理。用单因素方差分析、组间比较用 q 检验作统计学处理，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管总钙含量变化

VDN 组和 VDN + OP 组主动脉总钙含量较对照组分别升高 3.4 倍和 5.6 倍（$P < 0.01$）；OP 组总钙含量较对照组高 60%（$P < 0.01$）；VDN + OP 组较单独 VDN 组高 1.6 倍（$P < 0.01$），见表 1。

2.2 血管 ALP 活性和 OC 含量变化

VDN 组 ALP 活性和 OC 含量分别较对照组高 1.36 倍和 1.7 倍（$P < 0.01$）；VDN + OP 组 OC 含量较单独 VDN 组高 1.28 倍（$P < 0.01$），见表 1。

表 1 各组大鼠主动脉总钙含量、ALP 活性、OC 含量测定（$\bar{x} \pm s$）

组别	大鼠数（只）	钙含量 [nmol/(mg·pr)]	ALP 活性 [U/(mg·pr)]	OC 含量 [ng/(mg·pr)]
对照组	10	32.88 ± 7.65	261.12 ± 37.63	1.85 ± 0.58
VDN 组	10	111.72 ± 8.58**	354.86 ± 59.96**	3.15 ± 0.49**
OP 组	10	52.61 ± 8.16**##	191.27 ± 34.76*##	1.97 ± 0.43##
VDN + OP 组	10	183.39 ± 7.22**##△△	179.1 ± 34.41*##	4.04 ± 0.77**#△△

注：与对照组比较* $P < 0.05$，** $P < 0.01$；与 VDN 组比较# $P < 0.05$，## $P < 0.01$；与 OP 组比较△△ $P < 0.01$

2.3 骨密度测定结果

VDN 组腰椎骨密度较对照组降低($P < 0.01$),股骨骨密度较对照组降低($P > 0.05$);OP 组腰椎和股骨骨密度均较对照组降低($P < 0.01$);VDN + OP 组腰椎和股骨骨密度均较对照组降低($P < 0.01$),见表 2。

2.4 血清生化检测结果

血清钙和磷各组间比较无统计学意义($P > 0.05$);OP 组和 VDN + OP 组血清骨钙素均低于对照组($P < 0.05$);OP 组血清 ALP 高于对照组($P < 0.05$),见表 3。

表 2 各组大鼠腰椎和股骨骨密度(g/cm^2, $\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数(只)	腰椎骨密度	股骨骨密度
对照组	10	0.1990 ± 0.0063	0.1609 ± 0.0176
VDN 组	10	0.1849 ± 0.0109**	0.1561 ± 0.0053
OP 组	10	0.1488 ± 0.0044**##	0.1277 ± 0.0042**##
VDN + OP 组	10	0.1483 ± 0.0071**##	0.1303 ± 0.0067**##

注:与对照组比较** $P < 0.01$;与 VDN 组比较## $P < 0.01$

表 3 各组血清生化测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数(只)	血钙(mmol/L)	血磷(mmol/L)	血骨钙素(μg/L)	血 ALP(IU/L)
对照组	10	2.24 ± 0.12	2.25 ± 0.62	2.50 ± 1.03	120.29 ± 16.09
VDN 组	10	2.31 ± 0.05	2.21 ± 0.29	2.05 ± 0.51	141.88 ± 18.11
OP 组	10	2.27 ± 0.05	1.94 ± 0.40	1.64 ± 0.54*	166.9 ± 45.14*
VDN + OP 组	10	1.99 ± 0.55	2.11 ± 0.24	1.59 ± 0.32*	159.63 ± 41.16

注:与对照组比较* $P < 0.05$

2.5 24 h 尿生化检测结果

VDN、OP 及 VDN + OP 组大鼠尿钙/肌酐及尿磷/肌酐均较对照组高,无统计学差异($P > 0.05$);OP 组尿 HOP/肌酐较对照组高 2.72 倍($P < 0.05$);VDN + OP 组尿 HOP/肌酐较对照组、VDN 组和 OP 组分别高 4.23 倍($P < 0.01$)1.87 倍($P < 0.01$)和 1.55 倍($P < 0.05$),见表 4。

表 4 各组 24 h 尿生化检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数(只)	尿钙/肌酐	尿磷/肌酐	尿 HOP/肌酐(g/mol)
对照组	10	0.17 ± 0.03	7.09 ± 4.17	5.27 ± 1.21
VDN 组	10	0.26 ± 0.08	9.37 ± 5.48	11.95 ± 2.13
OP 组	10	0.21 ± 0.06	7.66 ± 4.77	14.34 ± 4.84*
VDN + OP 组	10	0.26 ± 0.12	10.38 ± 6.57	22.29 ± 5.89**##△

注:与对照组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 VDN 组比较## $P < 0.01$;与 OP 组比较△ $P < 0.05$

3 讨论

骨质疏松症是老年人的常见病,尤其多见于绝经期妇女和长期服用糖皮质激素的患者。糖皮质激素导致的骨质疏松是最常见的一种继发性骨质疏松。长期和过量使用糖皮质激素(如地塞米松)所致的骨质疏松症,仅次于绝经后雌激素缺乏引起的骨质疏松症[7]。值得注意的是在临床上发现血管钙化常与骨质疏松症可并存于同一个体,提示这两种疾病可能存在着某种联系。本研究首次在维生素 D_3 和尼古丁诱导的大鼠血管钙化模型上,肌注地塞米松造成血管钙化加骨质疏松复合模型,观察血管钙化和骨质疏松之间的相互关系。

3.1 大鼠血管钙化模型特征

大剂量维生素 D_3 诱发血管钙化的动物模型已应用多年,其机理是过量维生素 D_3 可造成动脉组织钙含量增高,尼古丁可增强维生素 D_3 的反应,二者合用可造成动脉钙超载,引起动脉中膜、弹力膜钙沉积,最终导致血管钙化。

碱性磷酸酶(ALP)是基质小泡的重要组成部分。ALP 可水解磷酸酯键而提高局部的磷酸根浓度,为羟磷灰石结晶的形成提供底物,增加羟磷灰石晶体中磷酸盐的量,是钙化形成过程中的重要环节。ALP 作为成骨细胞早期分化标志物,对骨化作用是不可或缺的。文献报道在血管钙化部位 ALP 活性增加,可能对血管钙化的发生具有重要的调节作用[8]。

骨钙素(OC)又称骨 Gla 蛋白,主要在骨骼中的成骨细胞和骨细胞合成及分泌,是成骨细胞晚期分化标志物,属于 γ-羧基谷氨酸蛋白家族,最初由骨组织中分离出来,在骨组织钙化中起重要的作用。在正常的动脉组织中没有 OC 表达,但在血管钙化过程中其分泌增加,且分泌的程度与钙化呈正相关。有研究发现在发生钙化的粥样斑块中可检测到 OC[9]。

本研究结果观察到大鼠造模 8 周后,钙化组大

鼠主动脉钙含量、ALP 活性和 OC 含量均显著增高，表明大鼠血管出现明显的钙化，与文献报道一致[4]，显示血管钙化造模成功。

3.2 地塞米松对大鼠血管钙化的影响

在本研究中最重要的发现是，在钙化加骨质疏松复合模型组，其主动脉钙含量是单独钙化组的 1.6 倍（$P < 0.01$），这一结果说明，肌注地塞米松导致的继发性骨质疏松可加重血管的钙化。同时，在钙化加骨质疏松复合模型组，骨钙素含量也较单独钙化组高（$P < 0.05$），此结果也间接支持这一结论。另外在骨质疏松组，其主动脉钙含量也高于对照组（$P < 0.01$），提示地塞米松不仅是钙化的促进因子，也可能是钙化的始动因子。

3.3 大鼠继发性骨质疏松模型特点

骨质疏松以骨量减少、骨微观结构退化为特征。临床上一般通过骨密度测量结合血、尿生化指标进行诊断。判定糖皮质激素性骨质疏松模型是否复制成功，主要取决于动物经过地塞米松诱导后骨量丢失是否具有统计学意义。本实验发现地塞米松注射 8 周后，骨质疏松组和复合模型组较对照组的腰椎和股骨骨密度均明显减低（$P < 0.01$），表明大鼠骨量显著减少，即糖皮质激素性骨质疏松模型复制成功。同时更重要的结果是钙化组的腰椎骨密度低于对照组（$P < 0.01$），提示血管钙化可能促进骨质疏松症的发生。

3.4 骨代谢生化指标变化及其意义

糖皮质激素性骨质疏松症临床表现为低转换型，即骨形成、骨吸收皆抑制，而骨吸收大于骨形成[10]。动物骨代谢生化指标的改变要比骨密度改变明显，可以将二者联合，作为判断骨质丢失的指标。在本研究中反映骨形成的指标主要有血清骨钙素；反映骨吸收的指标则是尿羟脯氨酸。

骨钙素是由成骨细胞产生和分泌的一种非胶原蛋白，具有骨代谢调节激素的作用，血中 BGP 水平与骨骼中呈正相关，是反映骨更新的一项良好而特异性的指标。因此测定血中 BGP 的含量可直接反映骨的形成状况。BGP 是通过其结构上的 γ-羧基谷氨酸残基与骨矿物质及羟磷灰石有很强的亲和力，从而使骨钙化。BGP 升高或降低可以反映骨形成增加或减少。虽然血 ALP 也是反映骨代谢的良好指标，但 ALP 作为一项酶学检查，受其它许多因素的影响，而 BGP 仅由骨产生，比 ALP 更具特异性[11]。

本实验中 4 组动物的血清钙、磷差异无统计学意义（$P > 0.05$）；反映骨形成的指标血清骨钙素在 OP 组和 OP + VDN 组均低于对照组（$P < 0.05$，$P < 0.05$）；而骨吸收的指标尿 HOP/肌酐在 OP 和 OP + VDN 组均高于对照组（$P < 0.05$，$P < 0.01$），更为重要的是在 OP + VDN 组与单独 OP 组相比亦有统计学意义（$P < 0.05$）。该结果首先符合继发性骨质疏松模型的特点，即由于骨吸收大于骨形成而引发骨量的减少导致骨质疏松，同时也提示地塞米松促进血管钙化的机制可能是通过使骨吸收增加，使钙从骨组织中流失导致骨质疏松，继而沉积于动脉血管壁上而导致血管钙化。

本实验研究首次在血管钙化和骨质疏松复合模型上，探讨两者的相互作用。结果显示地塞米松所致的继发性骨质疏松症可以加重血管的钙化，而血管钙化也可以促进骨质疏松症的发生，其作用机制需要进一步深入的研究加以阐明。本研究为两种疾病在临床上的预防和治疗决策提供了一定的基础研究资料。

【参考文献】

[1] Wallin R, Wajih N, Greenwood G T, et al. Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. Med Res Rev, 2001, 21(4): 274-301.

[2] Bostrom K. Insights into the mechanism of vascular calcification. Am J Cardiol, 2001, 88(2): 20-22.

[3] Schulz ZE, Arfai K, Liu XD, et al. Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures. Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(9): 4246-4253.

[4] Niederhoffer N, Bobryshev YV, Lartaud II, et al. Aortic calcification produced by vitaminD_3 plus nicotine. VascRes, 1997, 34: 386-398.

[5] 李恩，薛延，王洪复，等. 骨质疏松鉴别诊断与治疗. 北京：人民卫生出版社，2005: 626-627.

[6] Daly MJ, Blz JS, Nayler WG. Contracture and calcium paradox in the rat heart. Cir Res, 1987, 61: 560-569.

[7] Manelli F, Giustina A. Glucocorticoid-induced osteoporosis trends endocrinol metab, 2000, 11(3): 79-85.

[8] Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, et al. β-Glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995, 15: 2003-2009.

[9] Balica M, Bostrom K, Shin V, et al. Calcifying subpopulation of bovine aortic smooth muscle cells is responsive to 17β-estradiol. Circulation, 1997, 95: 954-960.

[10] Canalis E, Pereira RC, De lany AM. Efects of glucocorticoids on the skeleton pediatr endocrinol metab, 2002, 15(Suppl 5): 1341-1345.

[11] 冼华，曹文富. 血中骨代谢生化指标在骨质疏松症诊治中的意义. 中国骨质疏松杂志，2007, 13(1): 69-71.

（收稿日期：2007-03-09）