

乳铁蛋白对去卵巢大鼠骨密度和骨形态学的影响

高威 张巧

中图分类号: Q954.6-33 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)09-0637-04

摘要:目的 观察乳铁蛋白对去卵巢大鼠骨密度、骨组织形态学的影响。方法 50 只 SD 健康雌性大鼠分为假手术组(Sham)10 只与去卵巢模型组(ovariectomy, OVX)40 只,去卵巢大鼠随机分为模型组、雌激素治疗组($0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{周}^{-1}$)、小剂量乳铁蛋白治疗组、大剂量乳铁蛋白治疗组,每组 10 只。假手术组和模型组不做治疗。12 周后观察大鼠雌激素水平、左侧股骨、脊柱密度及骨组织形态学的改变。结果 小剂量乳铁蛋白治疗组、大剂量乳铁蛋白治疗组大鼠股骨近端、脊柱骨密度值高于模型组($P < 0.05$)与假手术组及雌激素治疗组接近($P > 0.05$)。骨小梁数目、骨小梁厚度、骨皮质厚度均较模型组明显改善($P < 0.05$)。破骨细胞数较模型组减少($P = 0.06$)。结论 适量乳铁蛋白可减少去卵巢大鼠骨丢失,预防骨质疏松的作用。

关键词: 乳铁蛋白; 去卵巢大鼠; 骨密度; 骨质疏松症

DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.09.003

Effect of lactoferrin on bone mineral density and thighbone tissue morphology in ovariectomized rats GAO Wei, ZHANG Qiao. Department of Endocrinology, The First Hospital Affiliated to Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of lactoferrin on bone mineral-density and thighbone tissue morphology in ovariectomized rats. **Methods** Fifty 4-month-old female Sprague-drawley rats, were divided randomly into five groups, ten rats in each group. The first group were sham-operated(Sham-G), while the remaining groups, established by excising both sides ovary, were low-dose group, large-dose group, estradiol group and model group. There wasn't any therapy in sham-operated group and model group. After 12 weeks' corresponding therapy, all groups were sacrificed to procure blood serum for testing the contents of E_2 . thighbone tissue morphology and both left retral thighbone and spinal column for testing bone mineral density(BMD) were observed in each specimen. **Results** As compared with those model group, both left retral thighbone and spinal column bone mineral density in low-dose group and large-dose group were significantly higher($P < 0.05$) As compared with sham-operated group and estradiol group, that get close to; As compared with those model group, bone trabecula number, bone trabecula thickness and cortical thickness were significantly higher($P < 0.05$), but, osteoclast numbers decreased($P = 0.06$). **Conclusion** Fairly dose lactoferrin can obviously prevent and cure the osteoporosis in ovariectomized rats.

Key words: Lactoferrin; Ovariectomized rats; Bone mineral density; Osteoporosis

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是一种与雌激素缺乏直接相关,以骨量减少、骨组织微结构破坏为特征,导致脆性增加和易于骨折的代谢性骨病^[1]。雌激素替代治疗(estrogen

replacement therapy, ERT)是预防和治疗 PMOP 以及预防骨折的首选方案,但因长期使用此类药物有导致乳腺癌、子宫内膜癌的潜在危险^[2],因此找到一种更合理的药物治疗骨质疏松成为研究的热点。

近期研究发现乳铁蛋白(lactoferrin, LF)具有促进成骨样细胞增殖分化,抑制破骨细胞活性和破骨细胞前体细胞转化为破骨细胞的作用。目前大多研究仅限于乳铁蛋白作细胞培养和局部骨内注射,尚

作者单位: 550004 贵阳 贵阳医学院附属医院内分泌科(第一作者现在河南大学淮河医院内分泌科)

通讯作者: 张巧, Email: zhangqiao @ medmail.com.cn

无绝经骨质疏松实验动物模型整体治疗的报道。本课题采用去卵巢方法复制大鼠绝经后骨质疏松模型,并与雌激素治疗组相比较,观察不同剂量乳铁蛋白治疗组对去卵巢大鼠骨密度的改变及骨组织形态学的影响,为乳铁蛋白防治骨质疏松症提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物为 4 月龄未生育健康 SD 雌性大鼠 50 只,体重 180~220 g (由贵阳医学院实验动物中心提供)。实验用普通大鼠饲料(由贵阳医学院实验动物中心提供)。乳铁蛋白(94.4%)购于上海统园食品有限公司。双能 X 线骨密度测量仪(美国 Lunar 公司)。E₂ 放免试剂盒(天津九鼎医学生物工程有限公司)。光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物的饲养和分组:分组分笼喂养,环境温度(20±3)℃,相对湿度 40% 左右,自由摄食和饮水。50 只雌性大鼠随机分为假手术组(sham)10 只与去卵巢组 40 只。将 40 只去卵巢大鼠随机分为模型组、雌激素治疗组、小剂量乳铁蛋白治疗组、大剂量乳铁蛋白治疗组,每组 10 只。

1.2.2 去卵巢大鼠模型的建立:随机取 40 只大鼠,分别用 10% 水合氯醛 0.3 ml/100 g 腹腔注射麻醉后,参照文献方法^[3]。摘除双侧卵巢。青霉素肌注,5 万 U/只,1 次/d,连续 3 d。

1.2.3 假手术组的实施:将其余 10 只作假手术,同样麻醉后在无菌条件下打开腹腔后,切除少许脂肪组织,直接关闭腹腔。青霉素肌注 5 万 U/只,1 次/d,连续 3 d。

1.2.4 治疗方法:除假手术组和模型组外,其余 3 组在造模 1 周后进行治疗,为期 12 周。雌激素组:以苯甲酸雌二醇后肢肌肉注射,每只鼠每次肌注 0.1 mg/kg,每周 1 次,用 50 μl 微量注射器注射;大、小剂量乳铁蛋白组:以乳铁蛋白稀释后灌胃,分别按每只鼠 3000 mg·kg⁻¹·d⁻¹、1500 mg·kg⁻¹·d⁻¹。每周称体重 1 次,调整剂量;模型组及假手术组:不做任何治疗,每天抓取刺激 1 次。

1.2.5 标本的采集:大鼠治疗 12 周检测骨密度测量后,股动脉取血,以 2000 r/min 离心 10 min,收集血清,-80℃ 保存待用。无菌条件下取出左侧股骨,剔净软组织,无菌生理盐水冲洗后,置于-80℃ 冰箱保存待切片、染色。

1.2.6 左侧股骨及脊柱骨密度测量:大鼠治疗 12 周后,以 10% 水合氯醛 0.3 ml/100 g 行腹腔麻醉后,用双能 X 线骨密度仪测量,以“Small Animal Scout Scan”软件分析,对股骨整体、脊柱进行骨密度检测。骨组织形态学检查及量度评估。

1.2.7 左侧股骨经多聚甲醛固定后行脱钙、脱水、透明、浸渍、包埋、贴片后,作常规 HE 染色(由贵阳医学院病理科协助完成)。将上述做 HE 染色的每张切片在 100 X 光镜下随机选取 5 个视野,查看骨小梁的厚度、骨小梁数目、骨皮质的厚度、骨皮质密度,分别按以下标准评分:正常 0 分,轻度减少 1 分,中度减少 2 分、重度减少 3 分;并做单位面积破骨细胞记数。评分亦高,骨质疏松亦明显,分值相关统计成表加以分析。

1.2.8 统计学处理:实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,所有数据采用 SPSS 11.5 统计软件处理,多个样本均数比较采用方差分析(one-way ANOVA),方差齐性时采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Tamhane's T₂ 检验。骨组织形态学评分分析采用秩和检验。

2 结果

2.1 血清 E₂ 浓度:见表 1。

表 1 各组大鼠血清 E₂ 的比较

组别	样本数	E ₂ (pmol/L)
假手术组	10	135.61±16.43 ^a
模型组	10	85.57±12.28 ^b
雌激素组	10	128.78±20.01 ^a
小剂量乳铁蛋白组	10	87.64±15.14 ^b
大剂量乳铁蛋白组	10	97.82±10.08 ^b

注:与模型组比较^aP<0.01;与假手术组比较^bP<0.01

模型组、小剂量乳铁蛋白治疗组、大剂量乳铁蛋白治疗组血清 E₂ 浓度明显低于假手术组(P<0.01),差异有统计学意义;而雌激素治疗组血清 E₂ 浓度与假手术组相近,差异无统计学意义(P>0.05)。

2.2 左侧股骨、脊柱骨密度情况:见表 2。

大剂量乳铁蛋白组、小剂量乳铁蛋白组、雌激素组股骨及脊柱骨密度明显高于模型组(P<0.05),而与假手术组相近(P>0.05)假手术组、雌激素组、小剂量乳铁蛋白组、大剂量乳铁蛋白组左侧股骨、脊柱骨密度,组间无明显差异。

表 2 各组骨密度的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	脊柱骨密度(g/m^2)	股骨骨密度(g/m^2)
假手术组	10	0.109 ± 0.007^a	0.128 ± 0.012^c
模型组	10	0.097 ± 0.010^b	0.117 ± 0.006^d
雌激素组	10	0.108 ± 0.005^a	0.126 ± 0.012^a
小剂量组	10	0.107 ± 0.010^a	0.127 ± 0.011^a
大剂量组	10	0.111 ± 0.009^a	0.135 ± 0.006^c

注 :与模型组比较^a $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与假手术组比较^b $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

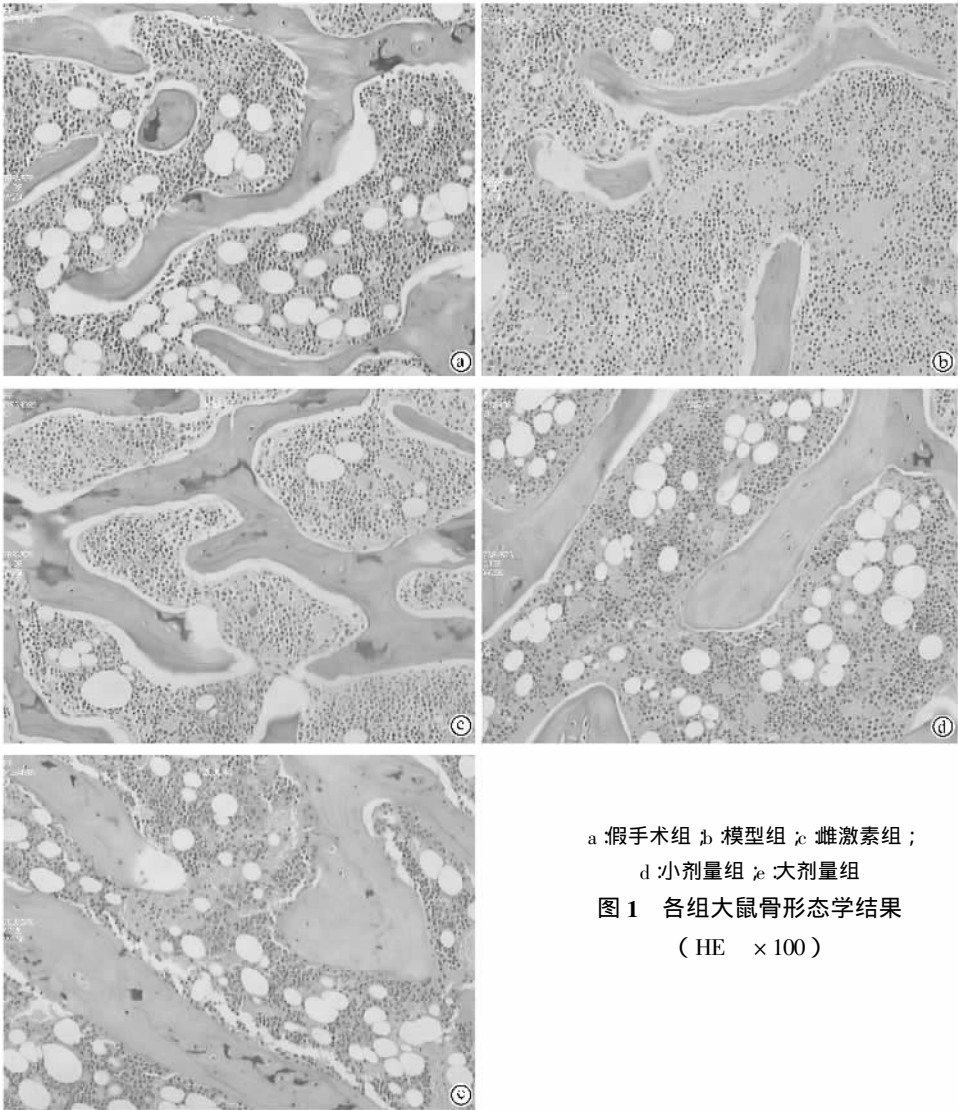
2.3 骨组织形态学检查与量度评估 :见图 1 和表 3。
图 1 显示模型组大鼠股骨骨小梁数目、骨小梁厚度、骨皮质厚度、骨皮质密度明显少于假手术组、雌激素组、小剂量乳铁蛋白组、大剂量乳铁蛋白组 ;按量度评估方法统计成表 ,其中分值越高 ,骨质疏松越明显。假手术组、雌激素组、小剂量乳铁蛋白组、

大剂量乳铁蛋白组股骨骨小梁数目、骨小梁厚度、骨皮质厚度、骨皮质密度评分值均明显低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)模型组大鼠单位面积骨髓腔破骨细胞数增加明显 ,大剂量乳铁蛋白治疗组破骨细胞最少 ,与模型组相比 ,其差异接近 ,有统计学意义($P = 0.06$)。

表 3 各组大鼠股骨组织形态学的比较(单位 :分)

组别	样本数	皮质厚度	皮质密度	骨小梁数目	骨小梁厚度	破骨细胞数
假手术组	10	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	89
模型组	10	26	25	27	24	106
雌激素组	10	7 ^a	4 ^a	12 ^b	10 ^a	100
小剂量组	10	13 ^b	15 ^b	15 ^b	16 ^b	99
大剂量组	10	3 ^a	3 ^a	1 ^a	1 ^a	86

注 :与模型组比较^b $P < 0.05$,^a $P < 0.01$



a :假手术组 b 模型组 c 雌激素组 ;
d 小剂量组 e 大剂量组

图 1 各组大鼠骨形态学结果
(HE × 100)

3 讨论

绝经性骨质疏松症是临床骨质疏松症最常见的类型,而去卵巢大鼠模型是临床研究 POMP 的经典模型。本研究中用去卵巢大鼠方法复制 POMP 模型结果模型组、小剂量乳铁蛋白治疗组、大剂量乳铁蛋白治疗组血清 E_2 水平明显低于假手术组、雌激素组 ($P < 0.01$),说明本研究大鼠去卵巢后,建立了绝经期后骨质疏松模型。LF 没有明显增加去卵巢大鼠血清 E_2 的水平。

乳铁蛋白主要存在于人和多数哺乳动物乳汁中,其功能多样性。除了促进铁吸收、抗菌、抗病毒以及在细胞生长与分化、胚胎发育等方面都起着的作用外,近年来研究还发现 LF 是一种新的骨生长因子。Cornish 等^[4]在细胞培养的研究中证实,LF 具有促进成骨样细胞增值的作用。牛奶中提取的 LF 能引起老鼠成骨样细胞中胸苷量相应增加。Naot 等^[5]利用骨小结形成法证实 LF 具有促进成骨样细胞分化的作用。LF 浓度 $\geq 100 \mu\text{g}$ 时明显引起骨小结形成数量并能增加骨矿化区域,也能抑制成骨细胞凋亡,成骨细胞凋亡率受 LF 抑制达 50% ~ 70%。Lorget 等^[6]研究提示,兔子混合骨细胞培养中 LF 可降低骨吸收,该抗骨吸收效应是 LF 显著抑制破骨细胞成熟所致。在体内,局部注射 LF 引起的骨生长效果强于注射胰岛素、胰淀素、肾上腺髓质素、C 端 PTH 相关肽、降钙素和降钙素相关因子的效果^[7]。而骨形态计量学是能定量观察和研究骨组织形态及其结构的一门体视学技术。骨小梁厚度 (Tb. Th), 骨小梁数目 (Tb. N) 是反映骨小梁微细结构变化的综合指标。单位骨小梁面积破骨细胞数 (Oc. N) 是反映破骨细胞功能的重要指标。本研究中对骨形态学观察及量度评估发现,给 LF 后第 12 周骨小梁数目、骨小梁厚度、骨皮质厚度、骨皮质密度均较模型组明显改善 ($P < 0.01$),破骨细胞数较模型组减少,且大剂量 LF 组较小剂量组改善更为明显 ($P < 0.01$)。说明 LF 具有促进骨形成,减少破骨细胞活数量的作用,与 Naot 等^[5]、Cornish 等^[4]结果一致。

LF 能否具有雌激素样活性,改善模拟妇女绝经后骨质疏松症的作用,主要观察其骨密度的变化^[8]。

骨密度是骨钙代谢中量化骨量的重要指标,也是评价骨量最有说服力的指标之一。本研究对去卵巢大鼠干预 12 周股骨及脊柱骨密度检测发现与模型组比较,大剂量乳铁蛋白组、小剂量乳铁蛋白组、雌激素组骨密度明显升高 ($P < 0.05$),差异有显著性并与假手术组相似,尤其以脊柱更为明显 ($P < 0.01$);而假手术组、雌激素组、小剂量乳铁蛋白组、大剂量乳铁蛋白组左侧股骨、脊柱骨密度无明显差异。实验结果发现,乳铁蛋白组股骨骨密度高于模型组,表明乳铁蛋白具有促进体内钙吸收,促进骨骼生长的作用,且呈现剂量依赖性趋势。同时,乳铁蛋白与雌激素相似,对去卵巢大鼠的骨钙流失有一定的抑制作用。

本研究结果发现乳铁蛋白有增加去卵巢大鼠模型骨小梁数目、厚度及骨皮质厚度,提高其股骨及脊柱骨密度的作用,初步证实乳铁蛋白对绝经骨质疏松的发生可能有预防作用,如何将乳铁蛋白应用于临床防治骨质疏松症及其作用机制尚有待于进一步探讨。

【参 考 文 献】

- [1] 廖二元,谭利华.代谢性骨病学.北京:人民卫生出版社,2003:668-669.
- [2] 田李军.中医药治疗绝经后骨质疏松症的研究概况.四川中医,2002,20(2):22.
- [3] 顾增发.切除卵巢大鼠骨质疏松模型的研究.中华老年学杂志,1989,9(2):118-119.
- [4] Cornish J, Callon KE, Naot D, et al. Lactoferrin Is a Potent Regulator of Bone Cell Activity and Increases Bone Formation *in Vivo*. *Endocrinology*, 2004, 145(9):4366-4374.
- [5] Naot D, Grey A, Reid IR, et al. Lactoferrin-A Novel Bone Growth Factor. *Clin Med Res*, 2005, 3(2):93-101.
- [6]orget F, Clough J, Oliveira M, et al. Lactoferrin reduces *in vitro* osteoclast differentiation and resorbing activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(2):261-266.
- [7] Orr AW, Pedraza CE, Pallero MA, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein is a calreticulin coreceptor that signals focal adhesion disassembly. *J Cell Biol*, 2003, 161(6):1179-1189.
- [8] 韦永中,陶松年.依普拉芬和雌激素对实验性骨质疏松作用的初步观察.中国骨质疏松杂志,2001,7(1):76-77.

(收稿日期:2009-05-28)