

氧化应激与大鼠增龄性骨量减少关系的初步探究

张育斌 陈建庭 钟招明 张宇 侯刚

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2010)02-0084-05

摘要: **目的** 探讨氧化应激与大鼠增龄性骨量减少之间的关系,为老年性骨质疏松症的临床干预提供理论依据。**方法** 选用2、6及18月龄Wistar大鼠各20只,按月龄分为幼年、中年、老年3组,采用比色法检测血清中氧化指标晚期氧化蛋白产物(AOPP)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)含量和抗氧化指标超氧化物歧化酶(SOD)活力,并用双光子骨密度仪测定大鼠离体股骨骨密度值。**结果** (1)与幼年组、青年组相比,老年组骨密度显著降低($P < 0.01$),而幼年组与青年组之间无显著性差异($P > 0.05$)。(2)老年组与幼年组、青年组比较,AOPP、MDA含量升高($P < 0.01$),而幼年组与青年组之间无显著性差异($P > 0.05$),SOD活力则显示随年龄的增加而下降($P < 0.05$),各组之间NO含量差异无显著性($P > 0.05$);(3)股骨骨密度与AOPP含量之间呈负相关关系($r = -0.640$, $P < 0.01$);与MDA含量负相关($r = -0.421$, $P < 0.01$),与SOD活力正相关($r = 0.483$, $P < 0.01$),与NO含量无相关性($r = -0.246$, $P > 0.05$)。**结论** 随着大鼠年龄的增加,骨量逐渐减少,机体内的氧化应激水平逐渐增高,提示氧化应激与大鼠增龄性骨量减少关系密切。

关键词: 氧化应激; 增龄性; 大鼠; BMD; AOPP; MDA; NO; SOD

The relationship between oxidative stress and age-related osteopenia in rats ZHANG Yubin, CHEN Jianting, ZHONG Zhaoming, et al Department of Orthopaedic Surgery and Spine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract **Objective** To explore the relationship between oxidative stress and age-related osteopenia of rats and to provide the theoretic basis for the intervention of age-related osteoporosis. **Methods** The colorimetry was adopted to measure the serum levels of AOPP, MDA, NO and SOD for Wistar rats at 2, 6 and 18 months old ($n = 20$ in each group). The BMD in femur was measured by Dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA). **Results** (1) The BMD in femur was decreased significantly in 18 months old rats compared with 2 and 6 months old groups ($P < 0.01$), but it was not significantly different between 2 and 6 months old groups ($P > 0.05$). (2) The serum levels of AOPP, MDA were increased significantly in 18 months old rats compared with 2 and 6 months old ones ($P < 0.01$), but they were not significantly different between 2 and 6 months old groups ($P > 0.05$). The serum level of NO was not significantly different among 3 groups ($P > 0.05$). The activity of SOD showed a decrease with aging ($P < 0.05$). (3) There was a negative correlation between AOPP and femur BMD levels ($r = -0.640$, $P < 0.01$). The same trend was observed between MDA and femur BMD ($r = -0.421$, $P < 0.01$). There was no correlation between NO levels and femur BMD levels ($r = -0.246$, $P > 0.05$). A positive correlation was observed between SOD and femur BMD levels ($r = 0.483$, $P < 0.01$). **Conclusions** Increased level of oxidative stress is involved into age-related osteopenia in rats. Oxidative stress might play an important role in the pathophysiology of age-related osteoporosis.

Key words Oxidative stress; Aging; Rats; BMD; AOPP; MDA; NO

基金项目: 广东省自然科学基金资助课题 (06024394)

作者单位: 510515 广州, 南方医科大学南方医院脊柱骨病外科

通讯作者: 陈建庭, Email: chenjt99@sina.com

随着人口的老龄化,骨质疏松日渐成为危害老年人健康、致残的重要原因。根据国内流行病学研究表明,我国 60 岁以上人群骨质疏松症患病率达 22.6%, 80 岁以上人群患病率达 50.0%。研究表明,衰老、遗传因素、营养、细胞因子、激素、吸烟、制动等因素与老年性骨质疏松相关^[1]。其中,衰老是主要原因之一^[2]。而在对衰老的病因研究中,衰老自由基学说认为活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是引起衰老的重要原因。提示氧化应激 (oxidative stress, OS) 中氧化指标与抗氧化指标之间失衡而导致 ROS 增加可能是老年性骨质疏松症的原因之一。

目前,常用去卵巢雌性大鼠或去势雄性大鼠为骨质疏松模型,但采用自然衰老大鼠作为模型进行研究较少见;此外,根据研究表明,雌激素可以导致体内氧化应激水平产生明显变化^[3],为此,本研究选用自然衰老雄性大鼠作为骨质疏松症的动物模型。而由于 ROS 的性质非常活跃,在活体内难以积蓄,难以进行有效测量,所以,本研究通过观察血清氧化指标 AOPP、MDA、NO 含量及抗氧化指标 SOD 活力的变化,研究氧化应激中 ROS 对蛋白质、脂质作用所形成的产物和体内自由基、抗氧化水平,并探讨氧化指标、抗氧化指标与股骨 BMD 的相关性,观察氧化应激与大鼠增龄性骨量减少之间的关系,为老年性骨质疏松的防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 氯胺-T (Sigma 公司, 美国); SpectraMax M5 多功能酶标仪 (Molecular Devices 公司, 美国); XR-46 型双能 X 线骨密度仪 (DXA) (NORLAND 公司, 美国)。

1.2 实验动物与分组

试验由南方医科大学伦理委员会批准实施,研究对象为 2、6 及 18 月龄雄性 Wistar 大鼠各 20 只 (南方医科大学动物中心提供, 国家 A 级实验动物), 按月龄分为幼年组 (221~285 g)、中年组 (478~556 g) 及老年组 (809~885 g)。在室温 (22±1)℃, 湿度 50%~60% 的房间饲养, 自由摄食, 喂以大鼠标准饲料 (南方医科大学动物中心提供), 饮用蒸馏水, 昼夜时差控制为 12 h: 12 h 饲养条件一致。

1.3 标本收集

术前称重, 采用乌拉坦 (200 g/L) 按照体积: 体重 1.0 mL/100 g 剂量麻醉, 颈动脉置管、无肝素离心管采血 6 mL 于 3000 r/min 离心出血清 15 min, 取上清、分装 -70℃ 冰箱冻存。大鼠安乐处死后取左侧股骨, 盐水纱布包埋后置于 -70℃ 保存。

1.4 检测指标

1.4.1 股骨骨密度 (BMD): 测量参照文献 [4] 的方法, 取解冻的股骨排列为前后位置于盛生理盐水的塑料盘内, 应用骨密度仪 (XR-46 型双能 X 线) Small animal 程序扫描整段股骨的 BMD, 测定参数: 扫描宽度 20 mm, 扫描速度 7 mm/s。

1.4.2 血清指标测量: 晚期氧化蛋白产物 (AOPP): 测定按文献 [5] 的方法进行: 上清液与 PBS 按 1:5 稀释, 以氯胺-T 同法稀释作空白对照, 加入 1.16 mmol/L KI 10 μL 及乙酸 20 μL 后立刻测 340 nm 处的吸收值。AOPP 浓度以氯胺-T 含量表示。

NO、MDA 和 SOD 用比色法测定。血清解冻后, 各取血清样本 100、100、30 μL, 按试剂盒说明进行操作, 用 SpectraMax M5 多功能酶标仪分别在 550、532、550 nm 波长处读取吸光度, 按公式计算 NO、MDA 的含量以及 SOD 活力。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件包, 计量资料采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。各组间 BMD、AOPP、NO、MDA 及 SOD 的差异比较用 One-Way ANOVA 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 双侧 $P < 0.05$ 认为差异有显著性。应用 Pearson's 相关分析检验股骨 BMD 和血清指标的相关性。

2 结果

2.1 各组大鼠股骨骨密度变化

幼年组、青年组大鼠骨密度与老年组比较均有显著性差异 ($P < 0.01$), 而幼年组和青年组之间比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 并且青年组 BMD 均数较幼年组高 (见表 1)。

表 1 各组大鼠骨密度测量 ($\bar{x} \pm s$)

部位	幼年组 (20)	中年组 (20)	老年组 (20)
股骨 (g/cm^2)	0.1324 ± 0.0089*	0.1390 ± 0.0147*	0.1041 ± 0.0068

注: 与老年对照组比较, * $P < 0.01$

2.2 各组大鼠血清氧化指标及抗氧化指标

与幼年组、青年组大鼠相比, 老年组氧化指标 AOPP、MDA 含量升高 ($P < 0.01$)。幼年组与青年组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。3 组比较 SOD 活

力随年龄增加而下降 ($P < 0.05$)。3组间 NO 含量差异无显著性 ($P > 0.05$)。

表 2 血清 AOPP、MDA、NO 含量和 SOD 活性 ($\bar{x} \pm s$)

项目	幼年组 (20)	中年组 (20)	老年组 (20)
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	129.30 $\pm$ 27.22*	133.925 $\pm$ 41.85*	198.51 $\pm$ 44.87
MDA (nmol/mgpro)	7.80 $\pm$ 1.68*	8.26 $\pm$ 2.97*	11.36 $\pm$ 1.55
NO ($\mu\text{mol/L}$)	69.43 $\pm$ 7.57	67.61 $\pm$ 6.64	68.69 $\pm$ 9.35
SOD (U/mL)	104.50 $\pm$ 15.91* [▲]	93.61 $\pm$ 10.62 [°]	82.152 $\pm$ 9.10

注:与老年对照组比较, * $P < 0.05$ * $P < 0.01$; 与中年组比较: [▲] $P < 0.05$

2.3 大鼠股骨骨密度与血清指标的相关关系

大鼠股骨骨密度与 AOPP 含量之间呈显著负相关关系 ($r = -0.640$, $P < 0.01$)。与 MDA 含量负相关 ($r = -0.421$, $P < 0.01$), 与 SOD 活力正相关 ($r = 0.483$, $P < 0.05$), 与 NO 含量无相关性 ($r = -0.246$, $P > 0.05$) (见表 3)。

表 3 大鼠股骨骨密度与血清氧化应激指标之间的 Pearson's 相关系数

项目	AOPP	MDA	NO	SOD
BMD r	-0.640	-0.421	-0.246	0.483
P	0.000	0.001	0.058	0.000

3 讨论

老年性骨质疏松症 (II 型骨质疏松症) 是随着年龄不断增长, 骨矿成分和骨基质比例减少, 骨质变薄, 骨小梁数量减少, 骨脆性增加, 骨折危险度增高的一种全身骨代谢障碍的退行性疾病。老年性骨质疏松症发生是一个复杂的病理过程, 多数学者认为衰老是主要原因之一。而氧化应激在衰老进程中发挥重要作用, 氧化应激 (oxidative stress OS) 是机体活性氧的生成增加和/或机体清除活性氧的能力降低, 而导致活性氧的生成与清除失衡, 过量的活性氧可引起机体分子、细胞的损害^[6]。因此, 探讨 OS 与 II 型骨质疏松症的关系对骨质疏松的防治具有重要意义。

Wang 等^[7]研究表明, 大鼠股骨 BMD 在 6 月龄时达到峰值, 在 9 月龄后开始下降, 而 9 月龄到 27 月龄股骨小梁骨 BMD 降低了 71.4%。本研究中, 18 月龄大鼠骨密度较 2 月龄及 6 月龄大鼠显著下降, 2 月龄与 6 月龄之间变化较少, 两者之间无统计学意义。这与 Wang 等的研究结果一致。衰老可以通过以下几个方面导致骨质疏松的发生, 随着年龄的增长, 骨形成功能持续降低, 主要表现为: 成骨细胞分裂增生能力降低、基质合成减少^[8]。骨吸收功

能短暂增加, 主要表现为: 破骨细胞数量一度增加, 而其泌酸和蛋白酶功能基本得以保持^[9]; 破骨细胞调节能力降低, 主要表现为成骨细胞中 RANKL (NF- κB 受体活化因子配体) 和护骨素表达失耦联^[10-11]。所以老年期成骨细胞和破骨细胞的生物学特点决定其骨重建的结果, 从而导致骨量的丢失。

而氧化应激则主要通过以下几个方面参与了骨质疏松过程: (1) 通过 NF- κB 、PLC- γ 1 (氧化应激活化磷脂酶 C- γ)、ERK1/2 (细胞外信号调节激酶 1/2) 等信号途径抑制成骨细胞前体细胞向成骨细胞分化, 抑制成骨细胞的矿化作用, 诱导其凋亡^[12]; (2) 通过刺激 RANKL 的表达促进破骨细胞产生^[13]; (3) 通过破坏纤维连接蛋白抑制细胞外基质生成^[14]。由此可见, 氧化应激是导致骨质疏松的主要原因之一。

AOPP 是 1996 年首先由 Wilko Sarsat 等提出, 它是通过氯化氧化反应在氧化应激过程由吞噬细胞激活生成的次氯酸或氯胺对血清白蛋白氧化作用生成的含双酪氨酸的蛋白交连物。研究表明, AOPP 的产生以及增长存在于多种病理状态, 包括糖尿病、尿毒症、慢性肠道炎症性疾病以及肥胖症等^[15-19]。提示 AOPP 的增长可能与体内病理生理环境有关。AOPP 做为新的尿毒症毒素和炎症递质, 可作为一个测定氧化剂介导的蛋白损害的可靠的指标, 能够评价针对降低氧化应激治疗的效果^[20]。最近研究表明, 氧化应激可以刺激体外培养的成骨细胞前体细胞系 MC3T3-E1 产生大量的 AOPP^[21-22]。本课题组前期研究证实, AOPP 可通过激活活性氧依赖的 NF- κB 途径抑制成骨样细胞体外增殖和分化^[23]。提示 AOPP 与骨质疏松症之间可能存在着联系。本研究证实老年组大鼠的 AOPP 含量较幼年组及中年组显著增加, 并且有随着年龄增长而增加的趋势。通过 AOPP 含量与股骨骨密度的相关分析表明, 两者之间存在较显著的负相关关系。提示这种新型的氧化应激产物与大鼠增龄性的骨量减少之间存在着密切的关系。

丙二醛 (MDA) 是脂质过氧化代谢的毒性产物, 它的含量直接反映体内脂质过氧化的速率和强度, 可以做为判断自由基损害程度的指标, 间接反映细胞受氧自由基损害的过程^[24]。Yalin 等^[25]在老年男性骨质疏松患者发现 MDA 含量显著增加; 本研究中, 老年组大鼠的 MDA 含量较幼年组及中年组高, 并且 MDA 含量与骨密度之间有正相关关系。既往研究表明, MDA 对氨基基团有高反应性, 可以

抑制核酸和蛋白的合成,并可以使酶的活性下降^[26],从而导致老年大鼠体内抗氧化物质减少,骨量逐渐下降。

国外一些研究表明,骨细胞可以产生 NO 和表达一氧化氮合成酶(nitric oxide synthetase, NOS)。同时,NO 作为骨细胞自分泌和旁分泌过程中的重要介质,在前炎症因子^[27]、机械牵张^[28]以及雌激素^[29]等不同刺激物刺激下,能反应性的增加。本研究中,未发现各年龄组之间 NO 含量的差别,NO 含量与股骨 BMD 无相关关系。研究表明,NO 对骨组织有双向调节作用,低浓度 NO 可以通过 IL-1 导致骨吸收形成,刺激成骨细胞分化、增殖;而高浓度 NO 在抑制成骨细胞增殖的同时,也抑制了破骨细胞的增殖和分化^[30]。关于 NO 水平和 BMD 的关系也有不同的结论,Wimalawansa 等^[31]认为 NO 是绝经后骨量丢失的保护因素;而 Cuzzocrea 等^[32]认为两者之间负相关。本文作者认为 NO 的双向调节作用可能是 NO 与 BMD 之间关系出现不同结果的主要原因。

抗氧化酶 SOD 在机体的抗氧化系统中发挥着极其重要的作用,其在组织中或血浆中的含量可反映该器官氧化应激所处的状态和抗氧化能力的强弱。Sontakke 等^[33]和 Maggio 等^[34]研究发现,骨质疏松患者的 SOD 水平较正常人群低,并由此推断骨质疏松患者的抗氧化水平显著下降。本研究进一步支持上述观点,我们发现 SOD 活力随年龄的增加而下降,SOD 与 BMD 之间存在负相关关系。Kono 等^[35]研究表明, O_2^- 可以抑制体内抗氧化酶的活性,随着年龄的增长,体内 O_2^- 逐渐累积,SOD 歧化 O_2^- 的能力逐渐减弱,导致体内氧化应激水平增加,最终导致骨量下降。

综上所述,随着年龄的增长,Wistar 大鼠可以出现骨量减少,氧化应激水平逐渐增高,抗氧化水平逐渐下降,说明氧化应激与增龄性骨量减少密切相关。进一步研究氧化应激对骨细胞分化和功能的影响,阐明氧化应激导致骨质疏松的机制,对骨质疏松的防治有重要意义。

【参 考 文 献】

- [1] Lin JT, Lane JM. Osteoporosis-A review. Clin Orthop Relat Res 2004(425): 126-134
- [2] Riggs BL, Wahner HW, Seeman E, et al. Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging-differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes. J Clin Invest 1982, 70(4): 716-723
- [3] Muthusani S, Ramachandran I, Muthusamy B, et al. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. Clin Chim Acta 2005, 360(1-2): 81-86
- [4] Lei Z, Xiaoying Z, Xingguo L. Ovariectomy-associated changes in bone mineral density and bone marrow haematopoiesis in rats. Int J Exp Pathol 2009, 90(5): 512-519
- [5] Santangelo F, Witko-Sarsat V, Druke T, et al. Restoring glutathione as a therapeutic strategy in chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant 2004, 19(8): 1951-1955
- [6] Sies H. Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem 1993, 215(2): 213-219
- [7] Wang L, Banu J, Mmahan CA, et al. Male rodent model of age-related bone loss in men. Bone 2001, 29(2): 141-148
- [8] Klein-Nulend J, Sterck JG, Semeins CM, et al. Donor age and mechanosensitivity of human bone cells. Osteoporos Int 2002, 13(2): 137-146
- [9] Jevon M, Hirayama T, Brown MA, et al. Osteoclast formation from circulating precursors in osteoporosis. Scand J Rheumatol 2003, 32(2): 95-100
- [10] Pietschmann P, Skalic M, Kneissel M, et al. Bone structure and metabolism in a rodent model of male senile osteoporosis. Exp Gerontol 2007, 42(11): 1099-1108
- [11] Kersch-Schindl K, Wendlová J, Kudlacek S, et al. Serum levels of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in healthy women and men. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2008, 116(8): 491-495
- [12] Bai XC, Lu D, Bai J, et al. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. Biochem Biophys Res Commun 2004, 314(1): 197-207
- [13] Lee NK, Choi YG, Baik JY, et al. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. Blood 2005, 106(3): 852-859
- [14] Hosoya S, Suzuki H, Yamamoto M, et al. Alkaline phosphatase and type I collagen gene expressions were reduced by hydroxyl radical-treated fibronectin substratum. Mol Genet Metab 1998, 65(1): 31-34
- [15] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen KT, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. J Immunol 1998, 161(5): 2524-2532
- [16] Kalousova M, Skřehla J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. Physiol Res 2002, 51(6): 597-604
- [17] Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, et al. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. Atherosclerosis 2002, 162(1): 221-225
- [18] Krzystek-Kopacka M, Neubauer K, Berdowska I, et al. Enhanced formation of advanced oxidation protein products in IBD. Inflamm Bowel Dis 2008, 14(6): 794-802
- [19] Kocak H, Oner-Iyidogan Y, Gurdol F, et al. Advanced oxidation protein products in obese women: its relation to insulin resistance and resistin. Clin Exp Med 2007, 7(4): 173-178

- [20] Cen H, Zheng S, Fang YM, et al. Induction of HSF1 expression is associated with sporadic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2004; 10(21): 3122-3126.
- [21] Lee KH, Choi EM. Myricetin, a naturally occurring flavonoid prevents 2-deoxy-D-ribose induced dysfunction and oxidative damage in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Eur J Pharmacol*. 2008; 591(1-3): 1-6.
- [22] Choi EM, Kim YH. Hesperetin attenuates the highly reducing sugar-triggered inhibition of osteoblast differentiation. *Cell Biol Toxicol*. 2008; 24(3): 225-231.
- [23] Zhong ZM, Bai L, Chen JT. Advanced oxidation protein products inhibit proliferation and differentiation of rat osteoblast-like cells via NF-kappaB pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2009; 24(1-2): 105-114.
- [24] Miller M, Zamojska S, Fijałkowski P, et al. [Assessment of malonyldialdehyde concentration as a product of lipid peroxidation and lipid metabolism in patients on chronic dialysis]. *Polimer Lekarski*. 2006; 20(120): 664-667.
- [25] Yalin S, Bagis S, Polat G, et al. Is there a role of free oxygen radicals in primary male osteoporosis? *Clin Exp Rheumatol*. 2005; 23(5): 689-692.
- [26] Bird RP, Draper HH. Effect of malonaldehyde and acetaldehyde on cultured mammalian cells. Growth, morphology, and synthesis of macromolecules. *J Toxicol Environ Health*. 1980; 6(4): 811-823.
- [27] Ralston SH, Todd D, Helfrich M, et al. Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. *Endocrinology*. 1994; 135(1): 330-336.
- [28] Klein-Nulend J, Helfrich MH, Sterck JG, et al. Nitric oxide response to shear stress by human bone cell cultures is endothelial nitric oxide synthase dependent. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 250(1): 108-114.
- [29] Amour KE, Amour KJ, Gallagher ME, et al. Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology*. 2001; 142(2): 760-766.
- [30] Van't HR, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology*. 2001; 103(3): 255-261.
- [31] Wimalawansa SJ. Restoration of ovariectomy-induced osteopenia by nitroglycerin. *Calcif Tissue Int*. 2000; 66(1): 56-60.
- [32] Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, et al. Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. *Endocrinology*. 2003; 144(3): 1098-1107.
- [33] Sontakke AN, Tare RS. A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. *Clin Chim Acta*. 2002; 318(1-2): 145-148.
- [34] Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, et al. Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(4): 1523-1527.
- [35] Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem*. 1982; 257(10): 5751-5754.