

· 论 著 ·

有机镓对去势大鼠骨代谢及骨量变化的影响

王佳时 王广斌 付勤* 李彬 贺明

(中国医科大学附属盛京医院关节骨外科, 沈阳 110004)

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013)05-0426-05

摘要: **目的** 观察有机镓对去势大鼠骨代谢及骨量变化的影响。**方法** 将 30 只大鼠随机分为假手术组、卵巢切除组和有机镓组。除正常对照组外,其他 2 组行卵巢切除。12 周后假手术组、卵巢切除组给予 PBS 治疗,有机镓组给予有机镓干预。8 周后取大鼠第五腰椎、股骨分别进行 Micro-CT 测定骨小梁组织结构;组织形态学测骨小梁占总骨量的百分数(BV/TV);生物力学测定股骨颈机械强度检查;生化指标检测比较血清 TRAP、ALP、钙、磷。**结果** Micro-CT 测试表明有机镓组平均骨小梁厚度(Tb.Th)、皮质厚度(Ct.Th)均明显高于卵巢切除组($P < 0.05$),BV/TV 明显高于卵巢切除组($P < 0.05$),破骨细胞数显著减少,有机镓组股骨颈平均最大骨折负荷比卵巢切除组高 27.4%,血清 TRAP、钙、磷减少($P < 0.05$)。**结论** 有机镓减少骨吸收的同时增加骨形成,对于去势大鼠骨量减少有明显的改善作用。

关键词: 有机镓;去势大鼠;骨质疏松;骨代谢;骨形态计量学

Effect of organic gallium on bone metabolism and bone mass in ovariectomized rats

WANG Jiashi, WANG Guangbin, FU Qin, LI Bin, HE Ming

(Department of Orthopedics, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, China)

Corresponding author: FU Qin, Email: dr_fuq@sohu.com

Abstract: Objective To observe the effect of organic gallium on bone metabolism and bone mass in ovariectomized rats.

Methods Thirty rats were randomly divided into sham group, ovariectomized group, and organic gallium group. Rats in the other 2 groups were ovariectomized except for those in normal control group. After 12 weeks, rats in sham group and ovariectomy group were treated with PBS, while rats in organic gallium group were treated with organic gallium. After the treatment for 8 weeks, the fifth lumbar vertebrae and the femur of rats were collected. The bone trabecular structure was detected using micro-CT. The percentage of bone trabecular in total bone mass (BV/TV) was detected using histomorphology method. Mechanical strength of the femoral neck was tested using biomechanical test. Biochemical markers including serum TRAP, ALP, calcium, and phosphorus were detected. **Results** Micro-CT tests showed that the mean trabecular thickness (Tb.Th) and the cortical thickness (Ct.Th) in organic gallium group were significantly higher than those in OVX group ($P < 0.05$). BV/TV in organic gallium group was also significantly higher than that in OVX group ($P < 0.05$). And a significant reduction in the number of osteoclasts was observed in organic gallium group. The average maximum fracture load of the femoral neck in organic gallium group was 27.4% higher than that in OVX group. The serum concentrations of TRAP, calcium, and phosphorus were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Organic gallium can reduce bone resorption and increase bone formation at the same time. It can significantly ameliorate the bone mass loss in ovariectomized rats.

Key words: Organic gallium; Ovariectomized rats; Osteoporosis; Bone metabolism; Bone histomorphometry

骨质疏松症是^[1]以骨量减少、骨组织显微结构发生退行性改变为特征,导致脆性增加及骨折发

生率增高的一种全身性疾病。根据发病原因不同,可将其分为原发性与继发性,其中,原发性骨质疏松症包括绝经后骨质疏松症(I型)与老年性骨质疏松症(II型),继发性骨质疏松症(III型)仅占少数。镓^[2-6]对骨吸收具有抑制作用。它能够吸附到骨组

基金项目: 国家自然科学基金项目(81070688)

* 通讯作者: 付勤, Email: dr_fuq@sohu.com

万方数据

织羟基磷灰石上并快速结合到成骨中心,进入代谢活跃的细胞中。治疗剂量的镓可以在骨中形成痕量级蓄积。由于具有这些生物效应,因此镓化合物可以用来治疗多种骨丢失疾病,包括癌症相关高钙血症、骨转移瘤和绝经后骨质疏松症^[7-9]。但是与镓相关的副作用限制了它的使用范围。酵母有富集能力,能够将无机物转换成有机状态,可以作为镓的载体。通过这种方式转化的有机镓,其在保持治疗作用的同时可以降低镓相关的毒性^[10,11]。

1 材料和方法

1.1 实验动物

动物清洁级 Wistar 大鼠,雌性体重(240 ± 20) g,3 个月龄。由中国医学科学院实验动物中心提供。动物合格证号:北京市实验动物质量合格证明 NO 0077412。硝酸镓(Betapharma 有限公司,上海,中国);嗜盐杆菌(中国科学院微生物研究所提供) 订单编号:20100487。

1.2 检测仪器

Micro-CT(SCANCO Medical AG, Switzerland); 高精度数显光栅位移传感器(Instron Corporation, AM);日立 7600-020 全自动生化分析仪;Shimadzu EZ-1 压力装置(Shimadzu EZ-1, Japan);XR-36 型双能 X 线骨密度仪(NORLAND, AM)。

1.3 有机镓制备

嗜盐杆菌(中国科学院微生物研究所提供)接种于 125ml 的三角瓶内,瓶内含 30ml YEPG(每公升:10g 酵母膏,10g 蛋白胨,20g 葡萄糖,3g 硝酸镓)液体培养基。28℃,摇床(200rpm)孵育 20h。测定酵母细胞中镓含量,结合在酵母细胞中的镓即为有机镓。

1.4 实验方法

1.4.1 实验动物选择和分组:取上述雌性 Wistar 大鼠 30 只。按体重随机分为三组,每组 10 只,分别制成一个假手术组(sham)和两个卵巢切除组(OVX)。

1.4.2 动物模型建立:卵巢切除组在无菌条件下经腹侧入路行双侧卵巢摘除;假手术组摘除与卵巢质量相同的卵巢周围组织一个;12 周后各组随即选取 5 只大鼠胫骨,以双能 X 线仪进行骨密度测定,两组测定结果进行对比[0.2321 ± 0.153 g/cm² (sham)] VS [0.1984 ± 0.137 g/cm² (OVX)] 确认骨质疏松造模成功。

1.4.3 给药剂量与方法:假手术组和一个卵巢切除组用 PBS 治疗,另外一个卵巢切除组用有机镓治疗

[OVX + 有机镓 120 pg/(kg·d)]。治疗期为 8 周。

1.4.4 标本采集:实验大鼠在最后 1 次给药后,禁食 24 h。经 10% 水合氯醛注射麻醉(0.3 ml/100g 体重),麻醉后用碘伏消毒手术部位。①血清:用注射器采动脉血。腹主动脉取血 5 ~ 8 ml/只。室温静置 4 h 用离心机 3 000 r/min,离心 30 min,取血清,分装,保存在 -80℃ 条件进行血钙和血磷含量测定。②取右侧股骨进行组织学检查。左侧股骨颈进行生物力学测试。第五腰椎进行 Micro-CT 检测分析

1.5 观察指标及测定方法

1.5.1 Micro-CT:利用台式 Micro-CT 对所有试验动物的第五腰椎体进行检测分析(SCANCO Medical AG, Switzerland)。断面数量从 200 至 300 不等,取决于椎骨体积的不同。从椎体的冠状面开始扫描,覆盖椎体的全部皮质骨和骨小梁。三维骨小梁结构参数可以直接测量:Bone volume (BV);骨小梁体积;Total volume (TV);被测样品总体积;BV/TV:骨体积分数;trabecular thickness (Tb. Th);骨小梁厚度;trabecular separation Tb. Sp);骨小梁间距;trabecular number (Tb. N);骨小梁数目;Cortical thickness (Ct. Th);皮质厚度。

1.5.2 骨组织形态计量学观察参数:对股骨远端 1/3 进行 5μ 连续切片,并用酒酸抵抗性的酸性磷酸酶(TRAP)进行染色。形态学计量用与光学显微镜相连的半自动图像分析仪(Osteoplan II; Carl Zeiss, Thomwood, 美国)对股骨远端松质骨的组织构造,进行定量分析,内容包括松质骨体积以与总骨体积的百分比表示(BV/TV),骨小梁厚度和骨小梁间距,并对酒酸抵抗性酸性磷酸酶阳性多核破骨细胞的数目进行测定。

1.5.3 大鼠离体股骨颈生物力学测定:应用作用于股骨头的垂直载荷测量股骨颈机械强度。(Shimadzu EZ-1 压力装置,日本)室温条件下,股骨缓慢融化后,除去附着在股骨上的软组织,在股骨干中部切断股骨干,利用甲基丙烯酸甲酯固定远端股骨,上至小转子,保持股骨处于垂直位。黄铜柱位于股骨头上方并垂直作用于股骨头。铜柱平行于股骨干长轴,并以 5 mm/min 的速度匀速运动,直至股骨颈骨折。记录股骨颈骨折时,骨折载荷的最高值(牛顿, N)。

1.5.4 骨代谢生化指标检测:血清 TRAP、血清 ALP 测定。日立 7600-020 全自动生化分析仪检测血清磷和血清钙含量。

1.6 统计学处理

Micro-CT 检测所得骨小梁结构数据,组织形态测定学所得数据,骨机械性能检测所得数据均进行均数和标准差统计。ANOVA 用于组间差异统计 (SPSS 版本 13.0)。全部数据统计分析, P 值小于 0.05 时,差异具有显著性。

2 结果

2.1 有机镓含量测定

酵母中镓的含量用种子活化分析方法检测^[12],酵母中金属镓的浓度为 $471.2 \pm 17.2 \mu\text{g/g}$ 。镓达到

饱和时的浓度为 0.3%^[13],因此选择 0.3% 浓度的硝酸镓加入酵母组织液中。

2.2 骨密度检测比较

经过八周治疗,有机镓治疗组骨量比卵巢切除组增加 25.2%,有机镓治疗组骨量与假手术组骨量相接近。有机镓治疗组骨小梁数低于假手术组骨小梁数(表 1)。但有机镓治疗组骨小梁厚度比假手术组增加 13.6%,比卵巢切除组增加 42.7%。有机镓治疗组骨皮质厚度比卵巢切除组增加 22.9%,(表 1)。

表 1 不同组别治疗 8w 后大鼠第五腰椎标本 Micro-CT 参数对比

组别	TV (mm)	BV (mm)	BV/TV (%)	Tb. Th (μm)	Tb. N (1/mm)	Ct. Th (μm)
Sham	227.1 ± 21.3	82.1 ± 7.5	36.2 ± 1.1	103.6 ± 11.2	3.6 ± 0.2	273.5 ± 31.8
OVX	202.8 ± 24.9 *	64.5 ± 8.1 *	31.8 ± 0.6 *	82.7 ± 9.8 *	2.8 ± 0.2 *	248.2 ± 29.1 *
OVX + organic gallium	241.2 ± 26.1 * #	96.7 ± 11.6 * #	39.7 ± 0.9 #	117.2 ± 12.4 * #	3.4 ± 0.3 #	305.7 ± 40.4 * #

注:与 Sham 组比较, * $P < 0.05$;与 OVX 组比较, # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ compared to Sham group; # $P < 0.05$ compared to OVX group

2.3 骨组织形态计量学检测比较

组织形态测定术检测松质骨骨量 BV,骨小梁占总骨量的百分数 (BV/TV)。卵巢切除组股骨小梁占总骨量的百分数 (BV/TV) 比假手术组低 28.9%,有机镓治疗组明显增加了骨小梁占总骨量的百分数

(图 1a)。组织形态学检测同样揭示了有机镓对于破骨细胞的影响。有机镓治疗组破骨细胞数量比 OVX 组低 32.6% ($P < 0.05$,图 1b)。

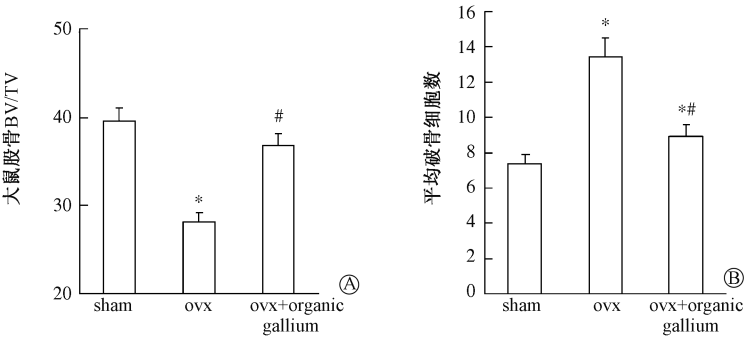


图 1 不同组别大鼠离体股骨组织形态学检测结果
注:与 Sham 组比较, * $P < 0.05$;与 OVX 组比较, # $P < 0.05$
Fig. 1 Histomorphometry results of rat femur in different groups
* $P < 0.05$ compared to Sham group; # $P < 0.05$ compared to OVX group

2.4 生物力学测定

有机镓组股骨颈平均最大骨折负荷比卵巢切除组高 27.4%。有机镓治疗组股骨颈强度高于卵巢切除组接近与假手术组(图 2)。

2.5 生化指标检测比较

OVX 组与 Sham 组相比较,血清 ALP 降低, $P < 0.05$;血清 TRAP、血钙含量、血清磷明显升高,(表 2)。有机镓组与 OVX 组相比较,血清 TRAP 的含量降低了 61.9%, $P < 0.05$;血清血清磷、血钙含量,分别降低了 19.5%、11.34%, $P < 0.05$ 。见表 2。

表 2 不同组别血清生化指标比较

Table 2 Comparison of serum biochemical parameters among different groups

组别	血清 TRAP(U/L)	ALP(U/L)	血清钙(U/L)	血清磷(U/L)
Sham	4.58 ± 3.28	48.47 ± 11.91	2.06 ± 0.12	1.82 ± 0.51
OVX	13.58 ± 3.28 *	43.37 ± 17.83 *	2.38 ± 0.47 *	2.41 ± 0.64 *
OVX + organic gallium	5.17 ± 2.65 #	46.16 ± 13.29	2.11 ± 0.18 #	1.94 ± 0.75 #

注:与 Sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 OVX 组比较, # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ compared to Sham group; # $P < 0.05$ compared to OVX group

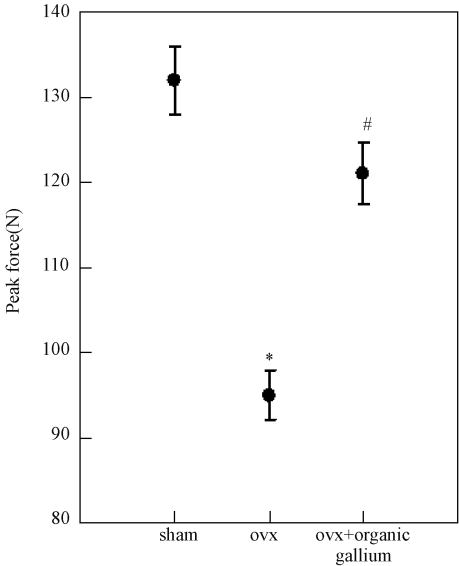


图 2 不同组别大鼠离体股骨颈生物力学测定

注:与 Sham 组比较, * $P < 0.05$;
与 OVX 组比较, # $P < 0.05$

Fig. 2 Biomechanical test of rat femoral neck in different groups

* $P < 0.05$ compared Different groups of rats in vitro
determination of femoral neck biomechanics to Sham group
$P < 0.05$ compared to OVX group

3 讨论

骨质疏松症是^[1]以骨量减少、骨组织显微结构发生退行性改变为特征,导致骨脆性增加及骨折发生率增高的一种全身性疾病。根据发病原因不同,可将其分为原发性与继发性,其中,原发性骨质疏松症包括绝经后骨质疏松症(Ⅰ型)与老年性骨质疏松症(Ⅱ型),继发性骨质疏松症(Ⅲ型)仅占少数。骨质疏松症总患病率女性为 20.7%,男性为 14.4%。2010 年第六次全国人口普查主要数据公报:全国总人口为 13.7 亿;60 岁及以上人口为 1.7 亿,占 13.26%,其中 65 岁及以上人口为 1.2 亿人,占 8.87%。60 岁以上人群中骨质疏松症的患病率明显增高,女性尤为突出。骨质疏松症的最大危害是并发骨折,即在受到轻微创伤或日常活动中即可

发生的骨折,常见部位是脊椎、髋部、前臂远端。骨质疏松性骨折危害很大,导致病残率和死亡率增加,骨质疏松及骨质疏松性骨折的治疗和护理需要投入巨大的人力和物力,费用高昂造成沉重的家庭、社会和经济负担。骨质疏松已经成为严重的医疗和社会问题。

镓是一种有效的骨吸收抑制剂,可以用来保持或重恢复骨量,作为抗骨吸收药物可以降低骨质疏松患者骨折的风险。镓的作用机制,目前认为三价金属镓离子在体内极易与转铁蛋白受体(Transferrin,TF)形成 TF-Ga(Ⅲ)复合物,阻止铁进入细胞,致细胞内铁缺乏而导致核糖核苷酸还原酶铁依赖 M2 亚单位活性降低,从而抑制细胞内 DNA 合成^[14]。国外学者则对硝酸镓治疗骨疾病进行了全面的研究,他们认为镓能够通过某种未定的机理,可能是影响了成骨细胞或/和破骨细胞的细胞因子 IL-6 分泌,使得骨代谢趋于正常化^[15,16]。自 Warril^[7-9]报告了硝酸镓能抑制骨再吸收和对癌症所致的高钙镓作为一种新的治疗代谢性骨病的药物,其作用机制和对钙代谢的调节引起了人们极大的关注。临床上治疗恶性肿瘤骨转移并发的高血钙症、骨的 Paget 病和淋巴瘤。镓的某些理化性质与骨生理相关。镓能够吸附到骨组织羟基磷灰石上并快速结合到成骨中心^[17],进入代谢活跃的细胞^[18]。治疗剂量的镓可以在骨中形成痕量级蓄积^[19,20]。由于具有这些生物效应,因此镓化合物可以用来治疗多种骨丢失疾病^[21],如绝经后骨质疏松症。但可能因为静脉注射硝酸镓,易引起肾、肝等毒性,限制了其应用^[22]。

本实验研究有机镓对骨质疏松症的效应。本研究证实有机镓治疗后,卵巢切除致骨质疏松大鼠的骨小梁体积增加。有机镓治疗增加脊椎骨小梁体积通过增加骨小梁的厚度实现,而非依靠增加骨小梁的数量。与对照组相比,有机镓治疗改变卵巢切除大鼠骨小梁结构的同时,显著增加了骨的机械性能(最大载荷)。因此,在此种骨质疏松症动物模型

中,增加骨小梁厚度可以显著改善骨强度。血中矿物质含量可以影响骨矿化。大鼠的卵巢被切除后,骨量和骨密度降低,血中矿物质含量增加。有机镓治疗后,卵巢切除大鼠的血总钙和无机磷酸盐浓度降低。与卵巢切除组比较,有机镓治疗显著增加卵巢切除大鼠的骨矿物质含量。有机镓同样能够降低破骨细胞的数目,在去势导致的大鼠骨质疏松症中,由于缺少雌激素,破骨细胞的数目增加,活性增强,并且它能够增加骨吸收抑制骨形成,通过本研究发现了有机镓治疗后破骨细胞的数量显著低于 OVX 组。这说明有机镓作为一种抗骨质疏松的药物不但可以减少破骨细胞的数目同时还会影响破骨细胞的活性。这些发现强有力地证实了有机镓的双重作用:减少骨吸收的同时增加骨形成。

综上所述,通过酵母作为镓的载体将无机镓转化为有机镓,其在保持治疗作用的同时可以降低镓相关的毒性^[12]。有机镓能够提高骨小梁的显微结构、骨组织的生物力学强度,减少破骨细胞的数量抑制骨吸收,对于去势后大鼠的骨量减少有明显的对抗作用,但其对于骨代谢的影响发生机制尚需进一步的深入研究。

【 参 考 文 献 】

[1] Edited By R Marcus, D Feldman and J Kelsey. Osteoporosis, copyright 1996 by Academic Press, Inc, USA.

[2] Guo Yuxia, Yang Dazhi, Wang Duo, et al. Effects of gallium nitrate on collagen and bone calcium protein in rat models of estrogen deficiency-induced osteoporosis. J Clinl Rehabilit Tiss Engineer Res, 2010, 14(2):205-209 (in Chinese).

[3] Wang Zhilun, DI Mingzhi. Preliminary study on the anti-osteoporotic effect of gallium in ovariectomized female rats. Chin J Endemiol, 2002, 21(6):439-441 (in Chinese).

[4] Dai Xiaoxia, Xiong Yongmin, Guo Xiong, et al. Dynamic effects of gallium chloride on osteoporotic rat model induced by tretinoin. J Hygie Res, 2006, 35(2):175-178 (in Chinese).

[5] Pang Wei, Wang Zhilun, Zhou Yang. Study on the influence of Gallium on osteocyte ultrastructure in osteoporosis. J Xi ' an Jiaotong University (Medical Sciences), 2006, 27(1):59-61 (in Chinese).

[6] Lei Yanxia, Zhao Junjie, Dai Xiaoxia, et al. Effect of gallium salt on bone metabolism and trace elements of the rat serum in osteoporosis induced by treino. J Xi ' an Jiaotong University (Medical Sciences). 2004, 25(4):362-365 (in Chinese).

[7] Warrell RP Jr, Bockman RS, Coonley CJ, et al. Gallium nitrate

inhibits calcium resorption from bone and is effective treatment for cancer-related hypercalcemia. Clin Invest, 1984, 73(5):1487-90.

[8] Warrell RP Jr, Bosco B, Weinerman S, et al. Gallium nitrate for advanced Paget disease of bone; effectiveness and dose-response analysis. Ann Intern Med, 1990, 113(11):847-51.

[9] Warrell RP Jr, Alcock NW, Bockman RS. Gallium nitrate inhibits accelerated bone turnover in patients with bone metastases. J Clin Oncol, 1987, 5(2):292-8.

[10] ZHAO Jun-jie, LEI Yan-xia, LI Guang-yuan, et al. Influence of organic-gallium on trace elements in rat bone of osteoporosis caused by tretinoin. J Xi ' an Jiaotong University (Medical Sciences), 2009, 30(3):307-310 (in Chinese).

[11] LEI Yan-xia, ZHAO Jun-jie, HU Ai-ling, et al. Organic gallium improves tretinoin-induced osteoporosis in rats. J Southern Medical University. 2007, 27(9):1361-1346 (in Chinese).

[12] Kaszycki P, Fedorovych D, Ksheminska H, et al. Chromium accumulation by living yeast at various environmental conditions. Microbiol Res, 2004, 159(1):11-7.

[13] Ma Z, Fu Q. Comparison of the therapeutic effects of yeast-incorporated gallium with those of inorganic gallium on ovariectomized osteopenic rats. Biol Trace Elem Res, 2010, 134(3):280-7.

[14] Larson SM, Grunbaum Z, Rasey JS. The role of transferrins in gallium uptake. Int J Nucl Med Biol, 1981, 8(4):257-66.

[15] Bockman RS, Bosco B. Treatment of patients with advanced Paget's disease of bone with two cycles of gallium nitrate. Semin Arthritis Rheum, 1994, 23(4):268-9.

[16] Warrell RP Jr, Lovett D, Dilmanian FA, et al. Low-dose gallium nitrate for prevention of osteolysis in myeloma: results of a pilot randomized study. J Clin Oncol. 1993, 11(12):2443-50.

[17] Dudley HC, Maddox GE. Deposition of radio gallium (Ga72) in skeletal tissues. J Pharmacol Exp Ther, 1949, 96(3):224-7.

[18] Anghileri LJ. Studies on the accumulation mechanisms of radioisotopes used in tumor diagnostic. Strahlentherapie, 1971, 142(4):456-62.

[19] Bockman RS, Boskey AL, Blumenthal NC, et al. Gallium increases bone calcium and crystallite perfection of hydroxyapatite. Calcif Tissue Int, 1986, 39(6):376-81.

[20] Donnelly R, Bockman RS, Doty SB, et al. Bone particles from gallium-treated rats are resistant to resorption in vivo. Bone Miner, 1991, 12(3):167-79.

[21] Warrell RP Jr. Gallium nitrate for the treatment of bone metastases. Cancer, 1997, 80(8 Suppl):1680-5.

[22] Baselga J, Kris MG, Scher HI, et al. Phase II trial of gallium nitrate in previously treated patients with small cell lung cancer. Invest New Drugs, 1993, 11(1):85-6.

(收稿日期:2012-12-20)

有机镓对去势大鼠骨代谢及骨量变化的影响

作者：[王佳时](#)，[王广斌](#)，[付勤](#)，[李彬](#)，[贺明](#)，[WANG Jiashi](#)，[WANG Guangbin](#)，[FU Qin](#)，
[LI Bin](#)，[HE Ming](#)
作者单位：[中国医科大学附属盛京医院关节骨外科, 沈阳, 110004](#)
刊名：[中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名：[CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS](#)
年，卷(期)：2013, 19 (5)

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201305002.aspx