

长期低剂量镉暴露对大鼠破骨细胞形成的影响

贾荣飞¹ 朱国英² 金泰虞³ 陈晓^{2*}

1. 上海徐汇区中心医院,上海 200032
2. 复旦大学放射医学研究所,上海 200031
3. 复旦大学公共卫生学院,上海

中图分类号: R114 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 09-1084-05

摘要: 目的 探讨低剂量镉暴露对大鼠破骨细胞形成的影响。方法 24只Sprague-Dawley雄性大鼠随机分成3组,通过饮水进行镉染毒,染毒剂量为2 mg/L和10 mg/L;对照组饮水中加入相同体积的生理盐水。染毒后第24周,收集血液、腰椎及两侧胫骨,分别用于血抗酒石酸性磷酸酶5b测定、骨密度测定及组织形态分析。通过酶组织化学染色,观察大鼠胫骨破骨细胞形成情况。结果 染毒组大鼠骨密度较对照组有不同程度下降,其中高剂量组大鼠骨密度和对照组相比有显著差异($P < 0.05$)。骨组织形态分析显示镉作用后大鼠胫骨骨髓腔增宽,骨小梁数量及骨小梁连接明显减少。组织化学染色显示镉染毒可以增加大鼠胫骨破骨数量及面积,和对照组相比有显著差异($P < 0.05$)。染毒组大鼠血抗酒石酸性磷酸酶5b水平显著高于对照组($P < 0.05$)。结论 低剂量镉染毒能增加大鼠骨组织内破骨细胞数量,骨吸收的过度活跃可能是低剂量镉骨损害的重要途径。

关键词: 镉;低剂量;破骨细胞;骨密度;骨组织形态;抗酒石酸性磷酸酶5b

Effect of long-term, low-dose exposure of cadmium on the formation of osteoclasts in rats

JIA Rongfei¹, ZHU Guoying², JIN Taiyu³, CHEN Xiao²

1. Department of Oncology, Shanghai Xuhui Central Hospital, Shanghai 200031
2. Institute of Radioactive Medicine, Fudan University
3. School of Public Health, Fudan University, Shanghai, China

Corresponding author: CHEN Xiao, Email: chx_win@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect of long-term, low-dose exposure of cadmium (Cd) on the formation of osteoclasts in rats. **Methods** Twenty-four male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups. Rats were treated with Cd via drinking water at the concentration of 0, 2, or 10 mg/L for 24 weeks. The same volume of normal saline was added into the water in the control group. After 24 weeks, all the rats were sacrificed. The blood, the lumbar vertebrae and the bilateral tibias were collected for the detection of tartrate resistant acid phosphatase 5b (Tracp5b), bone mineral density (BMD) determination, histomorphometry. The enzyme histological staining was used for the observation of osteoclasts formation in the rat tibia. **Results**

BMD of rats in Cd-treated group was lower than that in control group, and the decrease in 10 mg/L group was statistically significant ($P < 0.05$). Bone histomorphometry showed that after the intervention of Cd, the marrow cavity in the rat tibia broadened, and the number and the connection of the bone trabecula reduced significantly. Histochemical investigation indicated that Cd could increase the number and area of osteoclasts in the rat tibia, and the difference was significant ($P < 0.05$). The Tracp 5b levels in Cd-treated groups were significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Long-term, low-dose exposure of Cd can stimulate osteoclast formation. And excessive bone resorption mediated via osteoclasts may be an important way of Cd toxic effect on bone.

Key words: Cadmium; Low dose; Osteoclasts; Bone mineral density; Bone histomorphology; Tartrate resistant acid phosphatase 5b

镉是一种重要的环境污染物。流行病学研究表明镉暴露可以引起骨丢失、骨质疏松以及增加骨折的风险^[1-3]。近年来,大量研究表明环境水平的镉暴露同样也是骨质疏松的重要危险因素之一^[4]。早期研究认为,镉的骨损害可能继发于肾脏损害。镉可以抑制机体肠道的钙吸收及促进钙的排泄,并且可以抑制肾脏活性维生素D的合成^[5,6]。但是目前关于低剂量镉骨损害的机理还不清楚。我们的前期体外研究显示,破骨细胞可能是低剂量镉损害的重要靶细胞之一,低剂量镉暴露可以促进体外破骨细胞的形成^[7,8]。本研究,我们将通过组织学方法观察低剂量镉暴露对大鼠骨组织破骨细胞形成的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组及染毒

24只8周龄雄性SD大鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供),体重 200 ± 12 g,合格证号:SCXK(沪)2008-0016。饲养于SPF级屏障系统,12h昼夜节律照明,环境温度为 $22^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 $50 \sim 80\%$,用标准饲料喂养,自由饮水。适应1周后,随机分为3组,每组8只,通过饮水进行镉染毒,染毒剂量为 2 mg/L (低剂量组)和 10 mg/L (高剂量组),对照组加入相同体积的生理盐水。染毒24周后,水合氯醛麻醉处死大鼠,收集血样、腰椎及双侧胫骨。

1.2 骨密度测定

取L1-L5腰椎,尽量去除周围肌肉等软组织,用冷的生理盐水纱布包裹,应用双能X线骨密度仪(Hologic Discovery Wi,美国)测定骨密度,仪器精度为 1% ,变异系数(CV) $<1\%$ 。

1.3 骨组织形态及组织化学分析

取左侧胫骨,去除周围肌肉及软组织后,4固定3天。然后梯度酒精($40\% \sim 100\%$)脱水。左侧胫骨经过二甲苯透明,甲基丙烯酸甲酯浸润及包埋。修整去除多余包埋材料后,用硬组织切片机切片,切片厚度为 $8 \mu\text{m}$ 。烘干后,进行Goldner's trichrome染色。中性胶封片,显微镜下拍照。骨小梁染成亮绿色。

取右侧胫骨,同样去除周围肌肉及软组织后,4%多聚甲醛 4°C 固定3天。然后 10% EDTA脱钙液, 4°C 脱钙 $10 \sim 14$ 天,石蜡包埋,切片, 50°C 烘烤 30 min ,二甲苯脱蜡两次,每次 15 min ,梯度酒精水化($100\% \sim 40\%$),应用试剂盒(Sigma 387-A)进行

抗酒石酸酸性磷酸酶染色。水化,中性胶封片,显微镜下拍照,分析破骨细胞的数量及面积。

1.4 血抗酒石酸酸性磷酸酶5b(Tracp5b)测定

应用EIA试剂盒(RAT TRAP Assay, IDS, UK)测定大鼠血清Tracp5b水平。试剂盒批内变异 $<8\%$,样品回收率为 $83 \sim 106\%$ 。标准品浓度为 1.8 U/L ,测得浓度为 1.7 U/L 。试剂盒检测下限为 0.1 U/L 。

1.5 统计学分析

应用SPSS16.0统计分析软件进行ONEWAY-ANOVA分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$,有统计学意义。

2 结果

2.1 镉染毒对大鼠腰椎骨密度的影响

染毒组大鼠腰椎骨密度都较对照组有不同程度下降(图1),并呈现一定剂量效应关系。高剂量组大鼠骨密度显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

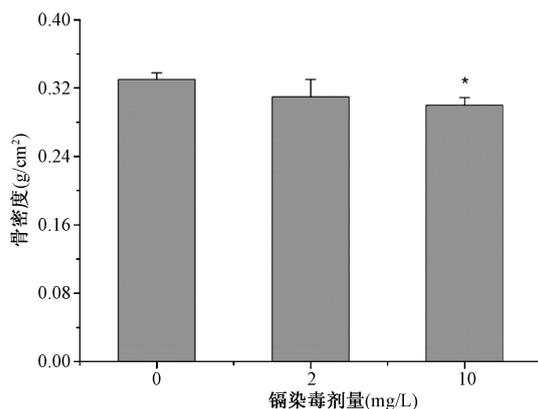


图1 低剂量镉染毒对大鼠骨密度的影响

与对照组比较,* $P < 0.05$

Fig. 1 Effect of low-dose exposure of cadmium on bone mineral density in rats. Compared with control group, * $P < 0.05$

2.2 镉对大鼠胫骨骨微结构的影响

镉作用对大鼠胫骨骨微结构有明显损害。Goldner's trichrome显示镉染毒组大鼠骨髓腔明显增宽,骨小梁数量明显减少,骨小梁连续性降低,骨小梁之间连接减少,骨体积分数明显降低(图2)。特别是高剂量组,骨微结构的损害更加明显。

2.3 镉对大鼠血Tracp5b水平的影响

染毒组大鼠血Tracp5b水平有显著升高。和对照组相比, 2 mg Cd/L 和 10 mg Cd/L 染毒组大鼠血

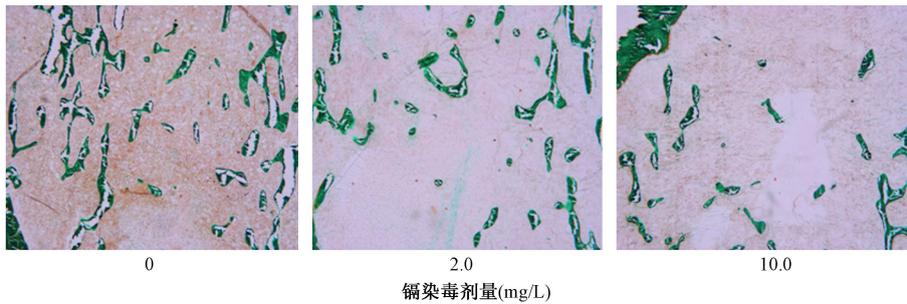


图2 低剂量镉染毒对大鼠骨微观结构的影响

Fig. 2 Effect of low-dose exposure of cadmium on bone microstructure in rats

清 Tracp5b 水平分别增加了 60% 和 140% (图 3)。

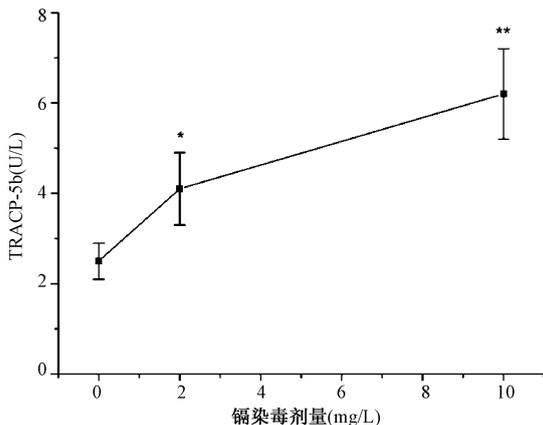


图3 低剂量镉染毒对大鼠血 Tracp5b 水平的影响与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig. 3 Effect of low-dose exposure of cadmium on serum Tracp5b level in rats. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 镉对大鼠胫骨破骨细胞的影响

对照组大鼠胫骨干骺端可以看到有少量 TRAP 阳性细胞。镉染毒对大鼠胫骨干骺端破骨细胞数量有显著影响(图 4)。染毒组大鼠破骨细胞数量及面积都显著高于对照组(图 5), 差异有统计学意义。

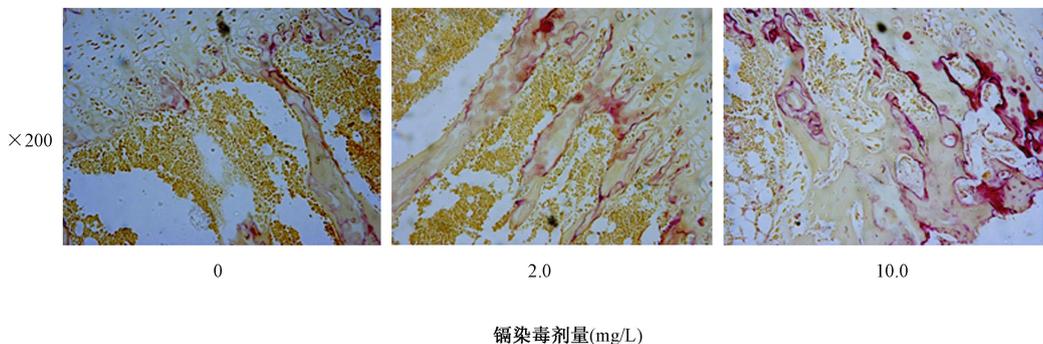


图4 低剂量镉染毒对大鼠胫骨破骨细胞形成的影响

Fig. 4 Effect of low-dose exposure of cadmium on osteoclast formation in rats

3 讨论

骨骼是镉损害的重要靶器官之一。研究认为镉引起的骨质疏松继发于镉的肾脏损害,特别是镉可以抑制活性维生素 D 的生成^[5,6]。但是也有流行病学研究表明低水平的镉暴露引起的骨损害与活性维生素 D 的水平无关^[9]。我们的前期体外研究表明,低剂量镉暴露可以抑制成骨细胞活性和矿化^[10]。此外,体外研究也显示,低剂量镉暴露可以刺激破骨细胞的形成^[7,8,11]。本研究显示,长期低剂量镉暴露可以刺激大鼠体内破骨细胞的形成。

长期低剂量镉暴露后可以降低大鼠骨密度并影响骨的微观结构,主要表现为骨小梁数量的减少,骨小梁分离度增加,骨连接减少。根据文献报道,2 mg Cd/L 及 10 mg Cd/L 的剂量分别接近于环境水平暴露及低污染地区暴露^[12,13]。本研究所使用的染毒剂量尽管较低,但是长期暴露仍然可以诱导出明显骨损害。

尽管有研究表明镉的骨损害继发于其肾脏损害,但是体外研究表明镉可以直接影响成骨细胞代谢及活性。镉可以抑制成骨细胞的增殖、分化及矿化。但是有研究提示镉对骨形成相关基因没有显著

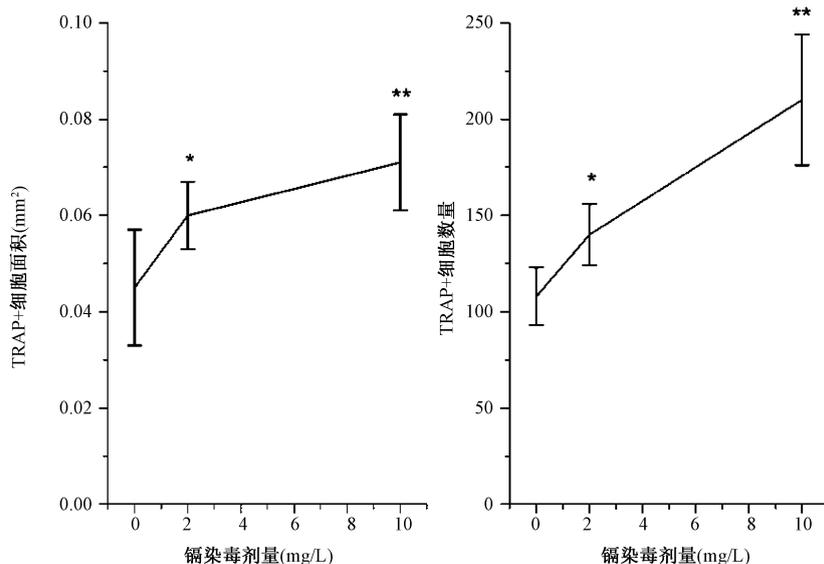


图5 低剂量镉染毒对大鼠胫骨破骨细胞面积和数量的影响

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig. 5 Effect of low-dose exposure of cadmium on the area and number of osteoclasts in rats.

Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

影响,但是可以影响骨吸收相关基因的表达^[14]。我们推测破骨细胞可能是镉骨损害的靶细胞之一。早期研究显示镉可以促进破骨细胞前体细胞向破骨细胞分化并能增强破骨细胞活性^[11]。我们前期研究也表明镉可以刺激 RAW264.7 细胞,一种单核-巨噬细胞,向破骨细胞分化^[8]。但是,目前少有研究探讨低剂量镉暴露是否可以影响在体破骨细胞的形成。本研究从组织学角度证实低剂量镉染毒后可以显著增加大鼠胫骨破骨细胞数量,提示骨吸收的过度活跃可能是长期低剂量镉骨损害的重要途径。

抗酒石酸酸型磷酸酶 (Tracp) 是由破骨细胞和有活力的巨噬细胞释放^[15]。血液循环中的 TRACP 有 Tracp 5b 和 Tracp 5a 两种形式^[16], Tracp5b 来源于破骨细胞, Tracp 5a 来源于巨噬细胞^[17, 18]。由于 Tracp 5b 能反映骨吸收的情况,并且不受肾脏及肝脏代谢影响^[19],被用来作为新型的骨代谢标志物。近来研究表明, Tracp 5b 主要反映破骨细胞的数量,并且能够预测将来的骨丢失^[20]。血清 Tracp5b 值可以代替组织学检测对大鼠骨组织中破骨细胞数量进行评估^[20, 21]。我们应用 EIA 的方法测定各组大鼠的血 Tracp 5b,结果表明镉能显著增加大鼠血 Tracp 5b 水平。该结果同样提示低剂量镉可能通过增加破骨细胞活性/数量,增加骨吸收能力,进而引起骨代谢紊乱。

本研究表明长期低剂量镉染毒可以显著影响骨

密度及骨微观结构。低剂量镉骨损害可能与其诱导破骨细胞形成,进而导致骨吸收过度活跃有关。

【 参 考 文 献 】

- [1] Åkesson A, Bjellerup P, Lundh T, et al. Cadmium-induced effects on bone in a population-based study of women. *Environ Health Perspect*, 2006, 114(6): 830-834.
- [2] Engström A, Michaëlsson K, Suwazono Y, et al. Long-term cadmium exposure and the association with bone mineral density and fractures in a population-based study among women. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(3): 486-495.
- [3] Staessen JA, Roels HA, Emelianov D, et al. Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: prospective population study. *Lancet*, 1999, 353(9159): 1140-1144.
- [4] Engström A, Michaëlsson K, Vahter M, et al. Associations between dietary cadmium exposure and bone mineral density and risk of osteoporosis and fractures among women. *Bone*, 2012, 50(60): 1372-1378.
- [5] Kjellström T. Effects of cadmium on bone, on vitamin D, and calcium metabolism. In: *Cadmium and Health: A toxicological and epidemiological appraisal*, 1986, Boca Raton (FL), USA, 111 - 158.
- [6] Jin T, Nordberg GF, Ye T, et al. Osteoporosis and renal dysfunction in general population exposed to cadmium in China. *Environ Res*, 2004, 96(3): 353-359.
- [7] Chen X, Zhu G, Gu S, et al. Effects of cadmium on osteoblasts and osteoclasts in vitro. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2009, 28(2): 232-236.

- [8] Chen X, Zhu G, Jin T, et al. Cadmium induces differentiation of RAW264.7 cells into osteoclasts in the presence of RANKL. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(9): 2392-2397.
- [9] Engström A, Skerving S, Lidfeldt J, et al. Cadmium-induced bone effects is not mediated via low serum 1, 25-dihydroxy vitamin D. *Environ Res*, 2009, 109(2): 188-192.
- [10] 陈晓,朱国英,金泰虞,等. 镉对体外培养成骨细胞增殖、凋亡、矿化及分化的影响. *复旦学报(医学版)*, 2007, 34(4): 513-517.
Chen Xiao, Zhu Guoying, Jin Taiyi, et al. Effects of cadmium on proliferation, apoptosis, differentiation and mineralization in osteoblast in vitro. *Fudan Univ J Med Sci*, 2007, 34(4): 513-517.
- [11] Wilson AK, Cerny EA, Smith BD, et al. Effects of cadmium on osteoclast formation and activity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, 140(2): 451-460.
- [12] Brzońska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. Low-level lifetime exposure to cadmium decreases skeletal mineralization and enhances bone loss in aged rats. *Bone*, 2004, 35(5): 1180-1191.
- [13] Brzońska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. Effect of low-level lifetime exposure to cadmium on calciotropic hormones in aged female rats. *Arch Toxicol*, 2005, 79(11): 636-646.
- [14] Regunathan K, Glesne DA, Wilson AK, et al. Microarray analysis of changes in bone cell gene expression early after cadmium gavage in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, 191(3): 272-293.
- [15] Yaziji H, Janckila AJ, Lear SC, et al. Immunohistochemical detection of tartrate-resistant acid phosphatase in non-hematopoietic human tissues. *Am J Clin Pathol*, 1995, 104(4): 397-402.
- [16] Lam Kw, Li CY, Yam LT, et al. Comparison of tartrate-resistant acid phosphatase in Gaucher's disease and leukemic reticuloendotheliosis. *Clin Biochem*, 1981, 14(4): 177-181.
- [17] Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, et al. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(7): 1337-1345.
- [18] Janckila AJ, Neustadt DH, Nakasato YR, et al. Serum tartrate-resistant acid phosphatase isoforms in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*, 2002, 320(1-2): 49-58.
- [19] Halleen JM, Alatalo SL, Janckila AJ, et al. Serum tartrate-resistant acid phosphatase is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Clin Chem*, 2001, 47(3): 597-600.
- [20] Alatalo SL, Peng Z, Janckila AJ, et al. A novel immunoassay for the determination of tartrate-resistant acid phosphatase 5b from rat serum. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(1): 134-139.
- [21] Chu P, Chao TY, Lin YF, et al. Correlation between histomorphometric parameters of bone resorption and serum type 5b tartrate-resistant acid phosphatase in uremic patients on maintenance hemodialysis. *Am J Kidney Dis*, 2003, 41(5): 1052-1059.

(收稿日期:2014-02-14)

作者单位更改申明

本刊第8期论著篇名《腺病毒介导的BMP-2和EGFP基因转染兔骨髓基质干细胞及种植脱钙骨的体外观察》,因作者本人疏忽,误将第一作者单位写错,现将第一作者陈佳滨,单位由桂林医学院更改为桂林医学院附属医院,特此申明。

申请人:陈佳滨

长期低剂量镉暴露对大鼠破骨细胞形成的影响

作者: [贾荣飞](#), [朱国英](#), [金泰虞](#), [陈晓](#), [JIA Rongfei](#), [ZHU Guoying](#), [JIN Taiyi](#), [CHEN Xiao](#)

作者单位: [贾荣飞, JIA Rongfei\(上海徐汇区中心医院, 上海, 200032\)](#), [朱国英, 陈晓, ZHU Guoying, CHEN Xiao\(复旦大学放射医学研究所, 上海, 200031\)](#), [金泰虞, JIN Taiyi\(复旦大学公共卫生学院, 上海\)](#)

刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 

英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年, 卷(期): 2014(9)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201409012.aspx