

25(OH)D₃、维生素 D 受体与糖皮质激素性骨质疏松关系的研究

田丽花¹ 张劼² 黄松² 蔡劲薇² 冼晶² 梁敏^{2*}

1. 广西柳州市工人医院,柳州 545005

2. 广西医科大学第一附属医院内分泌科,南宁 530021

中图分类号: R318 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 07-0769-05

摘要: **目的** 观察地塞米松(Dex)不同作用时间对大鼠骨量、骨组织维生素 D 受体(VDR)和血清 25 羟维生素 D₃(25(OH)D₃)的影响。**方法** 40 只 3.5 月龄的 sprague-dawley(SD)雌性大鼠,随机分为 Dex 组和对照组,每组 20 只,分别干预 4 周和 9 周。Dex 组肌肉注射 Dex 2.5 mg/kg,每周 2 次,对照组注射等量生理盐水。干预 4 周和 9 周分别用双能 X 线骨密度仪测骨密度,逆转录聚合酶链反应和免疫组化法检测骨组织 VDR mRNA 和蛋白的表达水平,用 ELISA 法检测血清 25(OH)D₃ 的含量。**结果** 干预 4 周,Dex 组大鼠体重下降(56.67 ± 24.43)g,9 周下降(85.83 ± 26.35)g($P < 0.05$);Dex 组体重低于对照组($P < 0.01$)。干预 9 周,Dex 组骨密度低于对照组($P < 0.05$)。干预 4 周,Dex 组大鼠骨组织 VDR mRNA 表达高于对照组(1.48 ± 0.32 vs 1.15 ± 0.19)($P < 0.05$);9 周,Dex 组大鼠骨组织 VDR mRNA 表达低于对照组(1.07 ± 0.35 vs 1.38 ± 0.29)($P < 0.05$)。Dex 组大鼠骨组织 VDR 蛋白表达在 4 周和 9 周与对照组均无差异($P > 0.05$)。干预 4 周,Dex 组血清 25(OH)D₃ 含量与对照组无差异($P > 0.05$);9 周,Dex 组血清 25(OH)D₃ 含量低于对照组($P < 0.05$)。**结论** SD 大鼠肌肉注射 Dex 2.5mg/kg,每周 2 次,9 周能成功建立糖皮质激素性骨质疏松模型。Dex 可能通过减少 VDR 的转录和 25(OH)D₃ 的含量来引起骨密度下降,导致骨质疏松的发生。

关键词: 糖皮质激素;骨密度;VDR;25(OH)D₃

Study on the relationship of VDR, 25(OH)D₃ and glucocorticoid-induced osteoporosis

TIAN Lihua¹, ZHANG Jie², HUANG Song², CAI Jingwei², XIAN Jing², LIANG Min²

1. Liuzhou Worker's Hospital, Liuzhou 545005, China

2. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Corresponding author: LIANG Min, Email: 172797187@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of dexamethasone (Dex) on bone mass, vitamin D receptor (VDR), and 25(OH)D₃ in rats at different time. **Methods** Forty 3.5-month-old Sprague Dawley (SD) rats were randomly assigned to Dex group and control group, with 20 rats in each group. The rats in Dex group were intramuscularly injected 2.5 mg/kg Dex twice a week, while rats in control group were injected equivalent normal saline intramuscularly. BMD was measured using dual energy X-ray absorptiometry. The expression of VDR mRNA and protein in bone tissue was measured with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry. 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D₃) was detected with ELISA. **Results** The weight of rats decreased 56.67 ± 24.43g in 4 weeks after intervention, and decreased 85.83 ± 26.35g in 9 weeks. The weight of rats in Dex group was lower than that in control group ($P < 0.01$). At 4 weeks, the expression of VDR mRNA in Dex group was higher than that in control group (1.48 ± 0.32 vs 1.15 ± 0.19, $P < 0.05$), but it was lower at 9 weeks (1.07 ± 0.35 vs 1.38 ± 0.29, $P < 0.05$). The expression of VDR protein in Dex group was not different comparing to that in control group at 4 and 9 weeks. The serum level of 25(OH)D₃ in Dex group had no change at 4 weeks, but decreased significantly at 9 weeks ($P < 0.05$). **Conclusion** GIOP animal model can be successfully established by injecting 2.5mg/kg Dex twice a week intramuscularly for 9 weeks in SD rats. Dex may decrease BMD resulting in osteoporosis by decreasing VDR transcription and 25(OH)D₃ level. **Key words:** Glucocorticoid; Bone mineral density; Vitamin D receptor; 25(OH)D₃

糖皮质激素是临床最常用的药物之一,长期应用糖皮质激素可引起包括糖皮质激素性骨质疏松 (glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 在内的多种并发症。据不完全统计,全球 50 岁以上人群中约 3%,80 岁以上人群约 5.2% 曾使用糖皮质激素。英国约 35 万人,美国超过 100 万人存在 GIOP 风险^[1]。GIOP 是 20-45 岁人群骨质疏松症最常见的原因^[2]。GIOP 的发生与激素的剂量、时间密切相关,糖皮质激素的剂量越大,使用时间越长,对骨量的影响就越大。大剂量激素治疗更容易出现骨质疏松和骨折^[3]。但是,即使小剂量的糖皮质激素应用一段时间也会出现 GIOP。GIOP 所致的骨折严重影响了患者的生活质量,增加了家庭和社会的负担。

维生素 D 是治疗 GIOP 的基础药物之一,维生素 D 需经过 2 次羟化,先转化为 25(OH)D₃,后转化为 1,25(OH)₂D₃ 才能发挥作用。其中 25(OH)D₃ 为血清中维生素 D 代谢产物中含量最多、最稳定的一种,其血清浓度可代表机体维生素 D 的营养状况^[4],为评估维生素 D 是否缺乏的可靠指标。维生素 D 水平与骨密度关系密切,维生素 D 水平不足可导致骨密度降低^[5]。1,25(OH)₂D₃ 是维生素 D 的生物活性形式,通过与维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR) 结合发挥作用。1,25(OH)₂D₃ 本身又可诱导 VDR 的转录^[6]。研究发现 VDR 上含有糖皮质激素反应元件^[7,8],VDR 基因是糖皮质激素的靶基因之一,糖皮质激素可直接调节 VDR 的表达,通过增加 VDR 的转录来增强 1,25(OH)₂D₃ 的作用;随着作用时间的延长,糖皮质激素对 VDR 的作用减弱^[7,8]。骨组织是糖皮质激素作用的主要靶器官之一,目前糖皮质激素对骨组织 VDR 作用的研究较少。那么,糖皮质激素对骨组织 VDR 表达的影响如何?糖皮质激素是否是通过影响维生素 D 和 VDR 来影响骨密度?为此,本研究拟从整体动物水平,研究地塞米松 (Dex) 不同作用时间对大鼠骨量、骨组织 VDR 和血清 25(OH)D₃ 的影响,旨在探讨 GIOP 的发病与 25(OH)D₃、VDR 的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

健康清洁级 3.5 月龄雌性 SD 大鼠 40 只,体重 210~290 g,由广西医科大学动物实验中心提供,合格证号:SCXK 桂 2009-0002。广西医科大学实验动物饲养房饲养,温度 (22±1)℃,湿度 59%~61%,每天光照与黑暗时间各为 12 h,采用标准化房笼,大

鼠普通饮食,自由进水。按随机数字表法分两组: Dex 组和对照组,每组 20 只。适应性喂养 1 周后, Dex 组肌肉注射 Dex 2.5 mg/kg,每周 2 次;对照组注射等量的生理盐水;分别干预 4 周和 9 周。每周测一次体重。

1.2 主要试剂

地塞米松磷酸钠注射液 (1 ml: 5 mg, 广东三才石岐制药有限公司),大鼠麻醉剂 (10% 的水合氯醛),焦炭酸二乙酯 (DEPC), Trizol (Invitrogen 公司),逆转录试剂盒 (Fermentas), DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo),免疫组化染色试剂盒 (SP-9000, 中杉金桥),大鼠 25(OH)D₃ 检测试剂盒 (上海西唐生物科技有限公司)。PCR 引物: 根据 Gene Bank 中大鼠 VDR、GAPDH (内参) 的基因序列设计引物,由宝生物工程 (大连) 有限公司设计并合成。

1.3 骨密度测定

应用 LUNAR-DPXIQ 型 (GE 公司) 双能 X 线骨密度仪的小动物软件测定骨密度。大鼠腹腔注射 10% 的水合氯醛 0.4 ml/100 g 麻醉后,测定活体整体骨密度;然后处死大鼠后分离右侧股骨测定离体股骨的骨密度,以骨矿化密度 (g/cm²) 表示,见图 1、2。

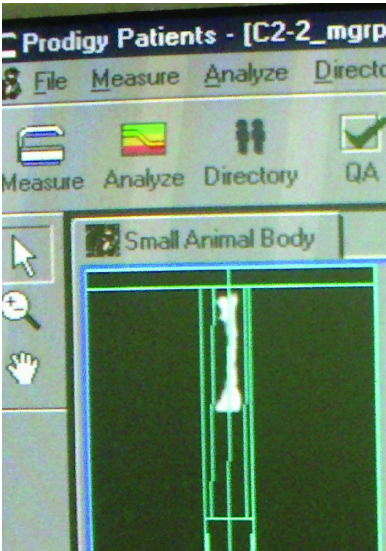


图 1 大鼠股骨离体骨密度

Fig. 1 BMD of the femur of SD rats

1.4 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测骨组织 VDR mRNA 表达

处死大鼠,取左侧股骨采用 TRIZOL 法提取骨组织总 RNA。取 2 μg 骨组织总 RNA 逆转录为



图 2 大鼠活体整体骨密度
Fig. 2 The whole body BMD of SD rats

cDNA; 然后进行 PCR 扩增, 检测骨组织 VDR mRNA 表达水平, 以 GAPDH 为内参。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外线灯下观察结果。应用 Image J 软件测量 VDR 和 GAPDH 对应的电泳条带灰度值, 并计算 VDR 与 GAPDH 灰度值的比值, 重复 3 次, 取平均值。

1.5 免疫组化法检测骨组织 VDR 蛋白表达

取右侧股骨近端骨髓部分, 4% 多聚甲醛充分固定 24 h, 10% EDTA 脱钙, 每周换脱钙液 2 次, 脱钙约 1 月后采用免疫组化 SABC 法检测骨组织 VDR 蛋白的表达。在光学显微镜下观察并任取 5 个视野, 用 Image-ProPlus 图像分析系统分析每一个视野阳性细胞数情况, 取每张切片每个高倍视野的平均光密度值。

1.6 ELISA 法检测大鼠血清 25(OH)D₃ 含量

收集大鼠血清, 用 ELISA 法检测 25(OH)D₃ 含量。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行数据统计处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料两组间比较用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

干预 4 周时, Dex 组和对照组各死亡 2 只(均为 2/10)。9 周时, Dex 组死亡 4 只(4/10), 对照组死亡 1 只(1/10)。实验开始时, 两组大鼠体重无差异

(*P* > 0.05)。干预 4 周和 9 周后, Dex 组体重均较干预前下降(4 周, 204.2 ± 15.9 g vs 260.8 ± 13.9 g, *P* = 0.002; 9 周, 168.3 ± 22.1 g vs 254.2 ± 26.2 g, *P* = 0.000), 均低于对照组(4 周, 204.2 ± 15.9 g vs 254.2 ± 28.9 g, *P* = 0.004; 9 周, 168.3 ± 22.1 g vs 251.5 ± 44.9 g, *P* = 0.000)。9 周时, 大鼠出现拱背少动, 毛发稀疏、直立无光泽, 精神状态差、懒动等表现。

2.2 大鼠骨密度变化

干预 4 周, Dex 组活体整体和离体股骨的骨密度与对照组无差异(0.126 ± 0.003 g/cm² vs 0.127 ± 0.003 g/cm², 0.175 ± 0.056 g/cm² vs 0.185 ± 0.045 g/cm²); (*P* > 0.05)。9 周, Dex 组活体整体和离体股骨的骨密度均低于对照组(0.084 ± 0.005 g/cm² vs 0.121 ± 0.006 g/cm², 0.150 ± 0.013 g/cm² vs 0.192 ± 0.012 g/cm²) (*P* < 0.05)。活体整体骨密度与离体股骨的骨密度变化一致。

2.3 骨组织 VDR mRNA 和蛋白表达情况

干预 4 周, Dex 组 VDR mRNA 的表达高于对照组(*P* < 0.05); 9 周, Dex 组 VDR mRNA 的表达低于对照组(*P* < 0.05)。干预 4 周和 9 周, Dex 组 VDR 蛋白的表达与对照组无差异(*P* > 0.05), 见图 3。

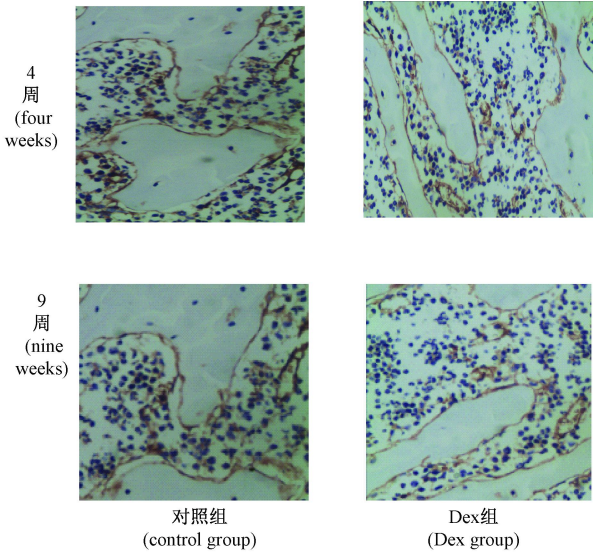


图 3 骨组织 VDR 蛋白的表达(40 × 10)
Fig. 3 The expression of VDR protein in bone tissue (40 × 10)

2.4 大鼠血清 25(OH)D₃ 含量变化

干预 4 周, Dex 组大鼠血清 25(OH)D₃ 含量与对照组无差异(958.93 ± 40.14 ng/ml vs 977.32 ±

28.93 ng/ml) ($P > 0.05$); 9 周, Dex 组血清 25(OH)D₃ 含量低于对照组 (858.55 ± 74.02 ng/ml vs 975.44 ± 16.12 ng/ml) ($P < 0.05$)。

3 讨论

骨质疏松症是一种慢性、进行性以骨量减少和骨微结构破坏为特征,易发生脆性骨折的疾病,是体内多种因素共同作用的结果。随着糖皮质激素在临床的广泛应用,GIOP 已成为最常见的继发性骨质疏松^[9]。糖皮质激素可通过多种形式影响钙磷代谢,但至今 GIOP 的发病机制仍未完全明确。

糖皮质激素诱导法建立 GIOP 动物模型已得到公认,但模型的制备方法多样,尚未完全统一。大鼠是目前使用最多的动物,常用的有 SD 和 Wistar 大鼠。因 3 月龄时大鼠性腺与内分泌系统已发育成熟,肌肉骨骼系统基本定型,因此多数研究选择 3 月龄大鼠。造模时糖皮质激素的选择和使用方法多样,可选用氢化可的松、强的松、地塞米松等药物,可用皮下埋植、肌肉注射、灌胃等方式给药,造模时间长短不一。灌胃操作较困难且造模时间长,皮下注射或皮下埋植药物吸收效果欠佳,成本较高。糖皮质激素的作用效果还与剂量、时间密切相关,小剂量造模会比大剂量所需时间长,但大剂量激素导致大鼠死亡率高,成模率低。因此,探讨 GIOP 造模较为简单易行的方法,建立合适的动物模型是进行下一步研究的关键。本研究采用 3.5 月龄 SD 大鼠,肌肉注射 Dex 2.5 mg/kg,每周 2 次,分别干预 4 周和 9 周。结果发现,干预后 Dex 组大鼠的体重逐渐下降,明显低于对照组 ($P < 0.01$)。可能是由于地塞米松影响大鼠体内蛋白质、糖、脂肪的代谢,导致肌肉、结缔组织、淋巴组织退化,使动物体重下降。研究发现地塞米松可造成大鼠肝、脾、肾、子宫、胸腺重量明显减少而导致体重下降^[10]。干预 9 周时,SD 大鼠出现毛发稀疏、无光泽,拱背懒动现象,抵抗力低下,易于死亡,死亡率达到 4/10,较 4 周 (2/10) 时升高。表明 SD 大鼠的体重随地塞米松干预时间延长逐渐下降,死亡率逐渐增高。如果进一步延长时间,SD 大鼠的死亡率还可能进一步增加,影响成模率。本研究结果显示,干预 4 周时, Dex 组骨密度与对照组无差异; 9 周时, Dex 组骨密度明显低于对照组 ($P < 0.05$),说明 SD 大鼠肌肉注射地塞米松 2.5 mg/kg,每周 2 次,9 周时成功制作出 GIOP 的动物模型;该方法简单易行,大鼠成模率较高。我们同时测定了大鼠活体整体骨密度和离体股骨骨密度,发现两者

的变化趋势一致,表明大鼠活体整体和离体股骨的骨密度均可用于评价 GIOP 动物模型的骨量情况,而活体整体骨密度测定操作简便,可监测药物不同作用时间大鼠骨密度的变化,尽早发现造模是否成功;也有利于观察大鼠随增龄骨密度的变化;也使得研究的同质性更强,有利于实验的顺利进行。因此,后续的研究可直接测定大鼠活体整体骨密度来准确评估大鼠发生骨质疏松的情况,无需再分离股骨测定离体股骨骨密度。

糖皮质激素通过与糖皮质激素受体 (GR) 结合后,与靶基因糖皮质激素反应元件相互作用,调节靶基因的表达式来发挥作用。近年来的研究发现 VDR 上存在糖皮质激素反应元件,VDR 基因是糖皮质激素的靶基因之一。已有报道糖皮质激素可增加脂肪细胞、内皮细胞和肿瘤细胞的 VDR 转录^[11]。糖皮质激素对 VDR 的作用具有 GR 依赖性,应用 GR 拮抗剂后,糖皮质激素诱导 VDR 表达被抑制^[7,8]。目前糖皮质激素对骨组织 VDR 的影响研究较少,糖皮质激素对骨组织上 VDR 直接的作用尚未清楚^[12]。本研究发现,地塞米松干预 4 周, Dex 组大鼠股骨 VDR mRNA 的表达水平增高,9 周时 Dex 组大鼠股骨 VDR mRNA 的表达水平降低,考虑可能与地塞米松作用早期,糖皮质激素直接与 VDR 上的糖皮质激素反应元件结合,增加 VDR 的转录,导致 VDR mRNA 的表达水平增高;糖皮质激素还能通过与 GR 结合后,通过 GR 信号途径增强 VDR 的转录。随着地塞米松干预时间的延长,糖皮质激素对 VDR 的诱导作用减弱^[7,8];同时糖皮质激素能抑制 GR 的表达^[13],也使得 VDR 的表达降低。但在 VDR 蛋白表达水平,本研究结果显示,地塞米松对大鼠骨组织 VDR 蛋白表达无影响,表明地塞米松对 VDR 的作用可能仅限于转录水平,对蛋白水平无明显作用。

进一步研究地塞米松对大鼠血清维生素 D 代谢的影响,结果发现地塞米松干预 4 周,SD 大鼠血清 25(OH)D₃ 水平无变化;9 周时,25(OH)D₃ 的含量明显减少,考虑可能与糖皮质激素可诱导 24 羟化酶的表达^[14],将维生素 D 转化为 24,25(OH)₂D₃,导致 25(OH)D₃ 和 1,25(OH)₂D₃ 的生成减少;同时,24 羟化酶的表达增加还能促进 1,25(OH)₂D₃ 的分解代谢,导致 1,25(OH)₂D₃ 减少。糖皮质激素可能通过减少 25(OH)D 和 1,25(OH)₂D₃ 的含量,导致大鼠骨量的降低。

综上所述,采用肌肉注射地塞米松 2.5 mg/kg,每周 2 次,可成功建立 SD 大鼠的 GIOP 模型。地塞

米松干预 9 周,SD 大鼠体重下降,25(OH)D₃ 含量减少,VDR mRNA 的表达下降,骨密度降低,表明糖皮质激素可能通过减少维生素 D 含量和 VDR 基因的表达,引起骨密度的下降,导致 GIOP 的发生。

【 参 考 文 献 】

- [1] Den Uyl D, Bultink IE, Lems WF. Glucocorticoid-induced osteoporosis. Clin Exp Rheumatol, 2011, 29(5 suppl 68): S93-98.
- [2] Grossman JM, Gordon R, Ranganath VK, et al. Ameican College of Rheumatology 2010 recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Arthritis Care Res (Hoboken), 2010, 62(11): 1515-1526.
- [3] Compston J. Management of GC-induced osteoporosis. Nat Rev Rheumatol, 2010, 6(2): 82-88.
- [4] Hanley DA, Cranney A, Jones G, et al. Vitamin D in adult health and disease: a review and guideline statement from Osteoporosis Canada. CMAJ. 2010, 182(12): 610-618.
- [5] Yu X, Zhang J, Yan C, et al. Relationships between serum 25-hydroxy- vitamin D and quantitative ultrasound bone mineral density in 0-6 year old children. Bone, 2013, 53(1): 306-310.
- [6] Sun X, Zemel MB. 1Alpha, 25-dihydroxyvitamin D and corticosteroid regulate adipocyte nuclear vitamin D receptor. Int J Obes(Lond), 2008, 32(8): 1305-1311.
- [7] Hidalgo AA, Trump DL, Johnson CS. Glucocorticoid regulation of the vitamin D receptor. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010, 121(1-2): 372-375.
- [8] Hidalgo AA, Deeb KK, Pike JW, et al. Dexamethasone enhances 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 effects by increasing vitamin D receptor transcription. J Biol Chem, 2011, 286(42): 36228-36237.
- [9] Migliaccio S, Brama M, Malavoha N. Management of glucocorticoids- induced osteoporosis: role of teriparatide. Ther Clin Risk Manag, 2009, 5(2): 305-310.
- [10] 杨雪平, 陈珺, 卢丽, 等. 短期应用糖皮质激素对大鼠皮质骨和松质骨的不同影响. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(4): 265-269
YANG Xueping, Chen Jun, Lu Li, et al. The different effects of short-term application of glucocorticoids in cancellous and cortical bone in SD rat. Chin J osteoporos, 2010, 16(4): 265-269 (in Chinese)
- [11] Kim MH, Lee GS, Jung EM, et al. The negative effect of dexamethasone on calcium-processing gene expressions is associated with a glucocorticoid- induced calcium-absorbing disorder. Life Sci. 2009, 85(3-4): 146-152.
- [12] Yamamoto Y, Yoshizawa T, Fukuda T, et al. Vitamin D receptor in osteoblasts is a negative regulator of bone mass control. Endocrinology. 2013, 154(3): 1008-1020.
- [13] Lahnalampi M, Heinäniemi M, Sinkkonen L, et al. Time-resolved expression profiling of the nuclear receptor superfamily in human adipogenesis. PLoS One. 2010, 5(9): e12991.
- [14] Dhawan P, Christakos S. Novel regulation of 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase (24 (OH) ase) transcription by glucocorticoids: cooperative effects of the glucocorticoid receptor, C/EBP beta, and the Vitamin D receptor in 24 (OH) ase transcription. J Cell Biochem. 2010, 110(6): 1314-1323.

(收稿日期: 2014-10-22)