

去卵巢骨质疏松大鼠骨组织肥大细胞增生及其病理学意义

祁珊珊 雒志恒 冯自立* 龚帅 何佳 郝少阳 李婉

陕西理工大学维生素 D 生理与应用研究所, 陕西 汉中 723000

中图分类号: R335.9 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017)07-0860-04

摘要: 目的 观察肥大细胞在去卵巢骨质疏松大鼠骨组织中的分布,探讨肥大细胞增生与绝经后骨质疏松症之间的关系。方法 3月龄健康雌性SD大鼠20只,随机分为假手术组(Sham组)和去卵巢组(OVX组),卵巢去除后3个月,采集和分离血清样品测定血清雌二醇、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)、骨保护素(osteoprotegerin,OPG)和核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of NF- κ B ligand,RANKL),收集股骨近端干骺端、胫骨近端干骺端组织样品进行常规组织切片制作和肥大细胞的甲苯胺蓝染色,并计数单位面积肥大细胞的数量。结果 OVX组大鼠血清雌二醇、OPG含量较Sham组显著降低($P < 0.01$),血清ALP、RANKL含量较Sham组显著增高($P < 0.01$);组织化学染色结果显示肥大细胞主要分布于大鼠胫骨、股骨骨髓腔中,OVX大鼠胫骨、股骨骨髓腔肥大细胞数量较Sham组显著增多($P < 0.01$)。结论 3月龄大鼠卵巢去除后3个月呈现骨质疏松症状,骨髓腔肥大细胞数量与骨质疏松呈正相关,可作为绝经后骨质疏松症诊断和治疗的依据。

关键词: 大鼠;去卵巢;骨质疏松;肥大细胞

Mast cell proliferation in the bone tissue of ovariectomized osteoporotic rats and its pathological significance

QI Shanshan, LUO Zhiheng, FENG Zili*, GONG Shuai, HE Jia, HAO Shaoyang, LI Wan

Vitamin D Research Institute, Shaanxi Sci-tech University, Hanzhong 723000, China

Corresponding author: FENG Zili, Email: fengzili2008@163.com

Abstract: Objective To investigate the distribution of mast cells in the bone tissue of ovariectomized osteoporotic rats, and to explore the relationship between mast cell proliferation and postmenopausal osteoporosis. **Methods** Twenty 3-month-old healthy female SD rats were randomly divided into sham operation group (Sham group) and ovariectomized group (OVX group). After 3 months of operation, the serum samples were collected to detect the levels of estradiol, alkaline phosphatase (ALP), osteoprotegerin (OPG), and receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL). The femoral metaphysis and proximal metaphysis were collected to make histological sections. Mast cells were stained with toluidine blue. The number of mast cells were counted per unit area. **Results** The levels of serum estradiol and OPG in the OVX group decreased significantly compared with those in the Sham group ($P < 0.01$). The levels of serum ALP and RANKL were higher than those in the Sham group ($P < 0.01$). Histochemical staining showed that mast cells were mainly distributed in bone marrow cavity of the tibia and femur. The number of mast cells in the tibia and femoral bone marrow cavity in the OVX group was higher than that in the Sham group ($P < 0.01$). **Conclusion** Osteoporosis symptom appears in 3 month after ovariectomy in 3-month-old rats. The number of mast cells in the bone marrow cavity is positively correlated with osteoporosis, which can be used as the basis for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis.

Key words: Rat; Ovariectomy; Osteoporosis; Mast cell

基金项目: 陕西省科技创新团队项目(2012KCT-29);陕西省科协青年人才托举项目(20160128);陕西理工大学大学生创新创业项目(2017037);陕西理工大学博士后项目(SLGBH16-03)

* 通讯作者: 冯自立, Email: fengzili2008@163.com

妇女绝经后因卵巢功能下降、雌激素水平骤降,体内骨转换率显著加快,骨吸收的速度超过骨形成的速度,导致骨量丢失、骨密度下降、骨骼脆性增加引起的骨质疏松症称为绝经后骨质疏松症

(postmenopausal osteoporosis, PMOP)^[1]。组织学和组织化学研究表明破骨细胞活动和骨吸收增加与骨髓肥大细胞增殖有关,研究发现老年性骨质疏松患者骨髓肥大细胞数量明显增加^[2-3]。此外,研究发现系统性肥大细胞增生症也会导致骨质疏松^[4-6]。然而上述研究仅限于对老年性骨质疏松症患者骨髓肥大细胞的观察,绝经后骨质疏松症是否也伴随骨髓肥大细胞的增生,骨髓肥大细胞增生是否可以成为骨质疏松诊断和治疗的依据?本研究以去卵巢大鼠为绝经后骨质疏松疾病模型,观察和计数肥大细胞在骨质疏松大鼠骨组织中的分布,探讨肥大细胞作为绝经后骨质疏松症诊断和治疗依据的可能性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雌性12w龄未孕SD大鼠20只,体重(245±33)g,由第四军医大学实验动物中心提供[SCXK(军)2012-0007]。所有动物分笼饲养,自由饮水,适应性饲养1w后进行实验。

1.2 试剂与仪器

大鼠雌二醇(estradiol, E₂)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨保护素(osteoprotegerin, OPG)和核因子κB受体活化因子配体(receptor activator of NF-κB ligand, RANKL)测定试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司。仪器主要有酶标仪(Biotek)、石蜡组织切片机(Leica RM2235)、倒置荧光显微镜(Nikon)、计算机图像分析系统(Image pro plus 6.0)。

1.3 卵巢去除手术

将20只SD大鼠分为假手术组(Sham组)和去卵巢组(OVX组),其中Sham组10只,OVX组10只。OVX组大鼠参考笔者先前报道的方法实施卵巢去除手术^[7]。Sham组大鼠实施假手术,术后1w对OVX组大鼠进行阴道涂片,连续涂片观察5d,去卵巢组不出现动情周期,表明卵巢去除成功。

1.4 血液样本采集和分析

去除卵巢后3个月,所有大鼠CO₂麻醉后眼眶静脉采血,离心收集血清,采用酶联免疫法(ELISA)检测血清E₂、ALP、OPG、RANKL含量,检测严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 骨组织样本采集

采血结束后,取股骨近端干骺端、胫骨近端干骺端放入3.7%的多聚甲醛溶液中固定24h,流水冲洗后置于10%的EDTA缓冲溶液(pH 8.0)中进行脱钙(脱钙时间约为20d左右)。

1.6 骨组织肥大细胞染色观察

脱钙结束后,对骨组织样本进行固定、脱水、石蜡包埋、切片(5 μm),改良甲苯胺蓝染色,95%的酒精分化,脱水,透明,封片,光学显微镜观察骨组织肥大细胞的分布。

1.7 肥大细胞的计数

每个骨组织样本每隔5张连续切片计数一张,共计5张,低倍镜下(10×10)计数每张骨组织切片中所有肥大细胞,并求5张切片肥大细胞的均数,据此求得各组肥大细胞计数值。

1.8 统计学处理

利用SPSS 17.0统计软件对数据进行单因素组间方差分析和比较,结果以“平均值±标准差”表示,P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠血清E₂、ALP、OPG、RANKL检测结果

大鼠血清E₂、ALP、OPG、RANKL检测结果如表1所示,大鼠卵巢去除后3个月,血清E₂、OPG含量较Sham组显著降低(P<0.01),ALP和RANKL的含量较Sham组显著增加(P<0.01),血清生化指标证实大鼠卵巢去除后3个月呈现骨质疏松症状。

表1 两组大鼠血清骨代谢生化指标检测结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Results of serum biochemical markers of bone metabolism in rats of the two groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	E ₂ (ng/L)	ALP(U/L)	OPG(pg/mL)	RANKL(pg/mL)
Sham	20.68±3.48	3.51±0.34	4.37±0.39	0.82±0.08
OVX	5.73±0.54	5.20±0.41	2.51±0.13	1.32±0.10

2.2 骨肥大细胞的分布及形态

大鼠骨肥大细胞的分布基本一致,肥大细胞呈圆形、椭圆形或梭形,胞浆内充满紫红色的异染性颗粒,并存在脱颗粒现象,散在分布于骨组织中,其在胫骨、股骨组织中的分布均集中于骨髓腔,在骨小梁中无肥大细胞分布(图1)。

2.3 去卵巢骨质疏松大鼠骨组织肥大细胞数量变化

大鼠卵巢摘除后,股骨、胫骨干骺端肥大细胞的数量较Sham组明显增多,且差异具有统计学意义(P<0.01)。OVX组大鼠骨组织肥大细胞数量约为Sham组的5倍,上述变化表明,大鼠卵巢去除后随着体内雌激素水平的降低,骨组织肥大细胞数量呈递增趋势。见表2。

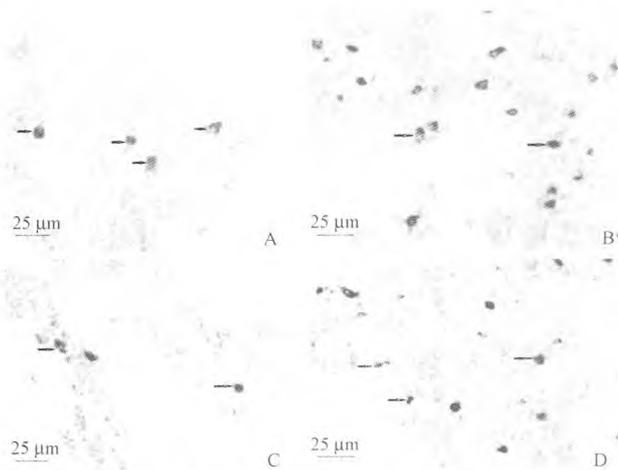


图1 肥大细胞在大鼠骨组织中的分布。A: Sham组大鼠胫骨干骺端肥大细胞(甲苯胺蓝 400×); B: OVX组大鼠胫骨干骺端肥大细胞(甲苯胺蓝 400×); C: Sham组大鼠股骨干骺端肥大细胞(甲苯胺蓝 400×); D: OVX组大鼠股骨干骺端肥大细胞(甲苯胺蓝 400×); 箭头所示为肥大细胞

Fig. 1 Distribution of mast cells in bone tissue of rats. A: Mast cells in the tibial metaphysis of Sham rats (toluidine blue, 400×); B: Mast cells in the tibia metaphysis of OVX rats (toluidine blue, 400×); C: Mast cells in the femoral metaphysis of Sham rats (toluidine blue, 400×); D: Mast cells in the femoral metaphysis of OVX rats (toluidine blue, 400×). The mast cells are shown in the arrow.

表2 两组大鼠胫骨干骺端、股骨干骺端横断面
全层肥大细胞数量比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparison of the number of mast cells in cross-sectional layer of the tibia metaphysis and femoral metaphyseal between two groups($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	胫骨干骺端肥大细胞数量	股骨干骺端肥大细胞数量
Sham组	19.51 ± 4.67	23.07 ± 4.42
OVX组	100.32 ± 17.45	110.76 ± 12.43

3 讨论

PMOP是一种与衰老相关的内分泌疾病,主要发生在绝经后妇女,由于绝经后雌激素缺乏导致骨量减少及骨组织结构变化,使脆性增加,骨折发生率增加,绝经后妇女发生骨质疏松的患病率约为男性的4倍^[1]。组织化学研究表明破骨细胞活动和骨吸收增加与骨髓肥大细胞增殖有关,1968年Frame最早运用组织化学的方法观察和计数了老年性骨质疏松患者骨髓肥大细胞,发现老年性骨质疏松患者骨髓肥大细胞增生^[8],这个发现在1981年被Fallon等人^[9]证实,他们的研究发现肥大细胞主要分布在

松质骨而非皮质骨,且在松质骨骨髓腔中分布,这与本研究结果一致。虽然肥大细胞与老年性骨质疏松症的关系提出较早,但肥大细胞与绝经后骨质疏松症是否也有联系,这方面无人研究。

本研究发现3月龄大鼠去除卵巢后3个月呈现明显的骨质疏松症状,主要表现在血清雌二醇含量急剧降低,血清ALP、RANKL含量急剧增加,血清OPG含量降低,笔者先前的动物实验在对骨组织形态学等方面的研究证实3月龄大鼠去除卵巢后3个月骨小梁面积百分比、骨小梁厚度等均显著降低^[10]。本研究通过对胫骨干骺端、股骨干骺端组织切片肥大细胞的染色和计数发现OVX大鼠胫骨干骺端、股骨干骺端肥大细胞数量较Sham组显著增加,OVX组胫骨、股骨骨髓腔肥大细胞数量约为Sham组的5倍,且肥大细胞主要分布在骨髓腔中,肥大细胞的形态区别不大。笔者前期在对去卵巢骨质疏松大鼠子宫肥大细胞的研究中发现,大鼠卵巢去除后子宫肥大细胞数量也较Sham组显著增加,给药雌激素治疗28d后OVX组大鼠子宫肥大细胞数量又明显降低^[11]。Narita等^[12]的研究认为,雌激素可使肥大脱颗粒,甚至细胞崩解,高浓度雌激素使肥大脱颗粒,导致其数量减少。

很多研究表明肥大细胞与骨重塑之间有密切联系,在钙缺乏大鼠骨组织中肥大细胞数量显著增加^[13-14]。肥大细胞含有肝素和血管活性物质,肥大细胞内的颗粒含肝素或肝素前体,当遇到物理或化学刺激可促使肥大细胞脱颗粒,此时肝素被释出,研究发现肝素与骨吸收息息相关,Goldhaber^[15]的研究发现肝素可以促进骨吸收,给兔子注射肝素后其发生自发性骨折的概率显著增加。Relea等^[16]的研究认为锌对骨的代谢和支持起很重要的作用,锌可直接影响骨骼发育,促进骨形成,抑制骨吸收,其主要作用机制是锌具有稳定肥大细胞和抑制内源性肝素颗粒释放的作用。

本实验所发现的绝经后骨质疏松大鼠骨髓腔肥大细胞增生进一步证实肥大细胞在骨重塑中具有重要意义,对了解肥大细胞在绝经后骨质疏松症中的功能具有一定意义,也为绝经后骨质疏松症的诊断和治疗提供了一个新靶标。

【参考文献】

[1] 马俊岭,郭海英,阳晓东. 骨质疏松症的流行病学概况. 中国全科医学, 2009, 12(98): 1744-1746.

Ma JL, Guo HY, Yang XD. Epidemiology of primary

- osteoporosis. Chinese General Practice, 2009, 12(98):1744-1746. (in Chinese)
- [2] Brumsen C, Papapoulos SE, Lentjes EG, et al. A potential role for the mast cell in the pathogenesis of idiopathic osteoporosis in men. *Bone*, 2002, 31(5): 556-561.
- [3] Chiappetta N, Gruber B. The role of mast cells in osteoporosis. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 2006, 36(1): 32-36.
- [4] 王桂芝, 张北川, 刘季和. 肥大细胞与肥大细胞增生症研究进展. 国外医学皮肤病学分册, 1992, 18(4): 198-202.
Wang GZ, Zhang BC, Liu JH. Research progress of mast cells and mast cell hyperplasia. *Foreign Medical Dermatology*, 1992, 18(4): 198-202. (in Chinese)
- [5] Sperr WR, Valent P. Diagnosis, progression patterns and prognostication in mastocytosis. *Expert review of hematology*, 2012, 5(7): 261-274.
- [6] Abramowitz JD, Weinerman SA. Osteoporosis as the sole manifestation of systemic mastocytosis in a young man. *Endocrine Practice*, 2012, 18(6): 158-161.
- [7] 祁珊珊, 杨祎琦, 庞田田, 等. 去卵巢法构建绝经后骨质疏松模型手术探讨. 中国兽医杂志, 2014, 50(2): 27-29.
Qi SS, Yang YQ, Pang TT, et al. A successful surgical procedure of rat ovariectomy for establishing an animal model of women's postmenopausal osteoporosis. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 50(2): 27-29. (in Chinese)
- [8] Frame B, Nixon RK. Bone marrow mast cells in osteoporosis of aging. *N Engl J Med*, 1968, 279(12): 626-630.
- [9] Fallon MD, Whyte MP, Teitelbaum SL. Systemic mastocytosis associated with generalized osteopenia: histopathological characterization of the skeletal lesion using undecalcified bone from two patients. *Human Pathol*, 1981, 12(9): 813-820.
- [10] 祁珊珊, 王永吉, 辛薇. SD大鼠绝经后骨质疏松疾病动物模型的构建. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(1): 49-52.
Qi SS, Wang YJ, Xin W. An animal model establishment of SD rat with women postmenopausal osteoporosis. *J Clin Exp Pathol*, 2016, 32(1): 49-52. (in Chinese)
- [11] 祁珊珊, 王永吉. 苯甲酸雌二醇对绝经后骨质疏松模型大鼠子宫内膜及子宫肥大细胞数量的影响. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(2): 150-153.
Qi SS, Wang YJ. Effect of estradiol benzoate on endometrial morphology and the number of uterine mast cells in the rat model of postmenopausal osteoporosis. *Chin J Osteopor*, 2016, 22(2): 150-153. (in Chinese)
- [12] Narita S, Goldblum RM, Watson CS, et al. Environmental estrogens induce mast cell degranulation and enhance IgE mediated release of allergic mediators. *Environ Health Perspect*, 2007, 115(1): 48-52.
- [13] Urist MR, McLean FC. Accumulation of mast cells in endosteum of bone of calcium-deficient rats. *AMA Arch Pathol*, 1957, 63(3): 239-251.
- [14] Tesar R, Notelovitz M. Bone and vaginal mast cell population changes associated with calcium deficiency. *Calcified Tissue International*, 1983, 35(4): 221-226.
- [15] Goldhaber P. Heparin enhancement of factors stimulating bone resorption in tissue culture. *Science*, 1965, 147(3656): 407-408.
- [16] Relea P, Revilla M, Ripoll E, et al. Zinc Biochemical markers of nutrition, and type I osteoporosis. *Age Aging*, 1995, 24(4): 303-307.

(收稿日期: 2016-12-13; 修回日期: 2017-01-11)

(上接第 850 页)

- [15] 胡静, 郑洪新. 骨质疏松大鼠的骨形成蛋白-4 诱导成骨信号转导机制变化. 中国老年学杂志, 2009, 29(19): 2462-2464.
Hu J, Zheng HX. Signal transduction mechanism change of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) in osteoporosis. *Chinese Journal of Gerontology*, 2009, 29(19): 2462-2464. (in Chinese)
- [16] Litvin J, Selim AH, Montgomery MO, et al. Expression and function of Periostin-isoforms in bone. *J Cell Biochem*, 2004, 92(5): 1044-1061.
- [17] 方航, 张荣凯, 陈郁鲜, 等. 机械应力相关基因在骨关节炎软骨下骨的表达. 中国组织工程研究, 2013, 17(22): 4084-4090.
Fang H, Zhang RK, Chen YX, et al. Expression of mechanical stress related genes in subchondral bone of rat osteoarthritis model. *J Clin Rehabil Tis Eng Res*, 2013, 17(22): 4084-4090. (in Chinese)

(收稿日期: 2016-04-05; 修回日期: 2016-05-01)