

注射用骨肽对去卵巢骨质疏松大鼠骨微结构、骨密度和骨生物力学性能的影响

韩 龙¹, 吴水培^{2*}

(1. 安徽医科大学解放军九八临床学院, 浙江 湖州 313000; 2. 解放军九八医院, 浙江 湖州 313000)

【摘要】 目的 观察注射用骨肽对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度、骨生物力学和小肠钙结合蛋白(CaBp-D9K)mRNA表达的影响,探讨注射用骨肽治疗去卵巢骨质疏松的作用机制。**方法** 将建模成功(切除双侧卵巢)的48只大鼠随机分为观察组和模型组,另分别取24只大鼠作为假手术组(切除部分小肠系膜)和空白组。空白组、假手术组和模型组给予生理盐水灌胃,观察组给予注射用骨肽1.1 mg/kg灌胃。干预2个月后观察四组的骨体积(BV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁分离度(Tb.Sp)、骨密度、骨生物力学、血清1,25(OH)₂D₃和小肠CaBp-D9K mRNA表达水平。**结果** 模型组骨密度、最大载荷、断裂载荷、BV、Tb.Th、Tb.N、血清1,25(OH)₂D₃和小肠CaBp-D9K mRNA表达水平低于空白组和假手术组,Tb.Sp高于空白组和假手术组,组间比较差异有显著性($P < 0.05$)。观察组骨密度、最大载荷、断裂载荷、BV、Tb.Th、Tb.N、血清1,25(OH)₂D₃和小肠CaBp-D9K mRNA表达水平高于模型组,Tb.Sp低于模型组,组间比较差异有显著性($P < 0.05$)。**结论** 注射用骨肽可降低去卵巢大鼠骨质疏松程度,增加小肠CaBp-D9K mRNA表达,促进肠钙吸收可能是其重要作用机制。

【关键词】 骨质疏松;绝经;注射用骨肽;骨密度;骨生物力学;钙结合蛋白;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 06-0079-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.06.014

Effects of ossotide injection on bone mineral density (BMD), bone microstructure and biomechanical properties in ovariectomized rats

HAN Long¹, WU Shupei^{2*}

(1. No. 89 Clinical College of PLA, Medical University of Anhui, Huzhou 313000, China;

2. No. 89 Hospital of PLA, Huzhou 313000)

【Abstract】 Objective To observe the effect of ossotide injection on bone mineral density (BMD), bone microstructure and biomechanical properties and mRNA expression of small intestinal calcium binding protein (CaBp-D9K), and to study the mechanism of ossotide injection in the treatment of ovariectomized osteoporosis. **Methods** Forty-eight 3-month old SPF male rats with successful modeling (excision of bilateral ovaries) were randomly divided into the observation group and model group, 24 normal rats were divided into sham operation group (excised part of the mesenteric membrane), and 24 normal blank group. The blank group, sham operation group and model group were given normal saline, and the observation group was intragastrically given 1.1 mg/kg ossotide. Two months after intervention, the bone volume (BV), trabecular bone volume (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), trabecular separation (Tb.Sp), bone

[作者简介] 韩龙(1987—),男,住院医师,硕士生,研究方向:创伤骨科。E-mail: 495279904@qq.com

[通信作者] 吴水培(1951—),男,主任医师,研究方向:骨科创伤修复功能重建。E-mail: 519559109@qq.com

mineral density, bone biomechanics, serum $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ levels and CaBp-D9K mRNA expression levels of small intestine were assessed and statistically analyzed. **Results** The bone mineral density, maximum load, fracture load, BV, Tb.Th, Tb.N, serum $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and intestinal CaBp-D9K mRNA expression level in the model group were significantly lower than those of the control group and sham operation group ($P < 0.05$), Tb.Sp of the model group was significantly higher than that of the control group and sham operation group ($P < 0.05$). The bone mineral density, maximum load, fracture load, BV, Tb.Th, Tb.N, serum $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and intestinal CaBp-D9K mRNA expression level in the observation group were significantly higher than those of the model operation group, and the Tb.Sp of the observation group was lower than that of the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** Ossotide injection treatment can reduce the degree of osteoporosis in ovariectomized rats, increasing intestinal CaBp-D9k mRNA expression and promoting intestinal calcium absorption may be its important mechanisms of action.

[Key words] osteoporosis; menopause; ossotide for injection; bone mineral density; bone biomechanics; calcium binding protein; rats

绝经后妇女因卵巢功能衰退,雌激素严重缺乏,骨吸收大于骨形成,易出现骨质疏松,表现为骨强度受损、骨组织显微结构退后和骨折危险性增加,骨质疏松可导致患者活动能力下降、躯体疼痛,严重者可导致骨折,严重影响患者的生活质量和生命安全^[1]。目前西医治疗绝经后骨质疏松主要方法为抑制骨吸收和促进骨形成,激素替代疗法是常用的治疗方式,但激素替代可增加患者子宫内膜癌和血栓发生的风险,降低了患者治疗的依从性^[2]。注射用骨肽是含有多种骨代谢的活性肽类,具有调节骨代谢、刺激成骨细胞增殖,调节钙磷代谢,促进新骨形成,防治骨质疏松和促进骨折愈合等效果,是治疗骨质疏松的常用药物^[3]。研究显示,钙吸收障碍和营养物质生物利用度降低也是导致骨质疏松的重要因素,肠道钙吸收以主动吸收为主,需要钙调节蛋白(CaBp-D9K)协助,CaBp-D9K活性降低可导致钙吸收障碍,导致骨质疏松发生,提高肠钙吸收率是防治绝经后骨质疏松的重要途径^[4]。目前较少见注射用骨肽对CaBp-D9K影响的报道,本研究通过对注射用骨肽干预下观察去卵巢骨质疏松大鼠CaBp-D9KmRNA表达、骨密度、骨生物力学性能的变化,进一步探讨注射用骨肽治疗绝经后骨质疏松的作用机制,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,体重180~230g,3月龄,由安徽医科大学实验动物中心提供[SCXK(皖)2017-0018],在安徽医科大学实验动物中心进行实验[SYXK(皖)2017-0124],自由进食饮水,保持12h昼夜节律,室温22℃~25℃,并按实验动物使用的3R原则给予人道的关怀,安徽医科大学实验伦

理委员会批号:2017-0024。适应性饲养1周后进行建模,采用随机数字表法,选取24只SD大鼠作为空白组,不接受干预治疗;选取24只SD大鼠作为假手术组;在建模成功后随机选取48只SD大鼠分为2组,模型组和观察组,每组24只。空白组、假手术组、模型组给予生理盐水灌胃,观察组给予注射用骨肽灌胃。

1.2 主要试剂及仪器

注射用骨肽购自黑龙江珍宝岛药业股份有限公司,规格:10mg多肽; $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 酶联免疫试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司;Trizol总RNA提取试剂盒购自美国Invitrogen公司;cDNA反转录试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;CaBP-D9k、 β -actin引物序列由大连宝公司合成。

Discovery-A骨密度仪购自美国好乐杰公司;高速离心机购自长沙湘锐离心机有限公司;Genios多功能酶标仪购自奥地利Tecan公司;RG-3000 Real-Time PCR仪购自北京照生行仪器设备有限公司;AG-IC20KN万能材料实验机购自岛津仪器苏州有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 模型的建立

空白组不予以处理,模型组和观察组参照文献^[5],在SD大鼠适应性饲养1周后,对大鼠进行建模,采用3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,背部正中切口,进入腹腔背侧,完整切除双侧卵巢,假手术组同样采用3%戊巴比妥钠麻醉,背部正中切口,进入腹腔背侧,切除小段肠系膜。术后均给予抗生素3d预防感染。术后大鼠饲养条件同术前。

1.3.2 药物干预

建模3个月对实验动物进行干预,观察组:注射用多肽成人每日剂量10mg,按60kg计算,为

0.17 mg/kg,大鼠等效剂量按成人每日用药量的 6.3 倍计算为 1.07 mg/kg,取 1.1 mg/kg,溶于 1 mL 生理盐水腹腔注射。模型组、假手术、空白组给予等量生理盐水腹腔注射。连续干预 2 个月。

1.3.3 骨显微结构和骨密度检测

药物干预结束后采用 micro-CT 扫描股骨头至股骨中段,获取骨体积(BV)、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁数量(Tb. N)、骨小梁分离度(Tb. Sp)等参数;骨显微结构完成后采用 Discovery-A 骨密度仪检测股骨骨密度。

1.3.4 血清 1,25(OH)₂D₃ 和骨生物力学

大鼠麻醉后行腹主动脉取血,4℃ 静置 20 min,3000 r/min 离心 20 min,取上清液,保存于 -80℃ 冰箱,采用酶联免疫吸附法检测血清 1,25(OH)₂D₃ 水平;分离大鼠左侧股骨采用三点弯曲实验^[6]记录股骨最大载荷(指股骨断裂前所能承受的最大力)和断裂载荷值(股骨断裂时所承受的力)。

1.3.5 小肠钙结合蛋白(CaBp-D9K)mRNA 表达测定

取十二指肠以下 10 cm 小肠,无菌生理盐水冲洗干净,纵行剪开肠腔,刮下肠黏膜,采用 Trizol 法提取小肠组织总 RNA,在反转录酶 M-MLV 作用下,将 mRNA 反转录成 cDNA,采用 RG-3000 real-time

PCR 仪扩增,反应条件:95℃ 2 min,95℃ 10 s,60℃ 40 s,40 个循环,引物序列见表 1。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件包完成数据统计分析。实验数据以平均数 ± 标注差($\bar{x} \pm s$)表示,方差检验齐性后,组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-t 法, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 股骨显微结构参数的比较

空白组和假手术组 BV、Tb. Th、Tb. N、Tb. Sp 水平相比较差异均无显著性($P > 0.05$);模型组 BV、Tb. Th、Tb. N 水平低于空白组和假手术组,Tb. Sp 高于空白组和假手术组,观察组 BV、Tb. Th、Tb. N 水平低于模型组,Tb. Sp 高于模型组,差异均有显著性($P < 0.05$)。(见表 2 和图 1)

2.2 骨密度和骨生物力学的比较

空白组和假手术组骨密度、最大载荷、断裂载荷相比较差异均无显著性($P > 0.05$);模型组骨密度、最大载荷、断裂载荷均显著低于空白组和假手术组($P < 0.05$);观察组骨密度、最大载荷、断裂载荷均显著低于模型组($P < 0.05$)。(见表 3)

表 1 CaBp-D9K 和 β-actin 引物序列

Tab.1 Primer sequences of CaBp-D9K and β-actin

基因 Genes	引物序列 Primer sequences
CaBp-D9K	上游 Upstream 5'-GATAAGAACGGTGTGGAGAAGT-3'
	下游 Downstream 5'-TCAATCAGTAGGTGGTCTCGG-3'
β-actin	上游 Upstream 5'-AAGTTC AACGGCACAGTCAAG-3'
	下游 Downstream 5'-CCAGTAGACTCCACGACATACTCA-3'

表 2 四组大鼠股骨显微结构参数相比较(n = 24)

Tab.2 Comparison of microstructure parameters of the femur in the four rat groups

组别 Groups	BV (mm ³)	Tb. Th (μm)	Tb. N (mm ⁻¹)	Tb. Sp (μm)
空白组 Blank group	29.052 ± 1.821	0.108 ± 0.014	3.693 ± 0.232	0.184 ± 0.072
假手术组 Sham operation group	29.123 ± 1.653	0.105 ± 0.018	3.633 ± 0.183	0.212 ± 0.091
模型组 Model group	22.171 ± 1.734 ^{ab}	0.076 ± 0.009 ^{ab}	1.841 ± 0.212 ^{ab}	1.984 ± 0.243 ^{ab}
观察组 Observation group	26.080 ± 1.772 ^{abc}	0.091 ± 0.008 ^{abc}	2.691 ± 0.143 ^{abc}	0.948 ± 0.177 ^{abc}

注:与空白组相比较,^a $P < 0.05$;与假手术组相比较,^b $P < 0.05$;与模型组相比较,^c $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the blank group, ^a $P < 0.05$. Compared with the sham operation group, ^b $P < 0.05$. Compared with the model group, ^c $P < 0.05$.

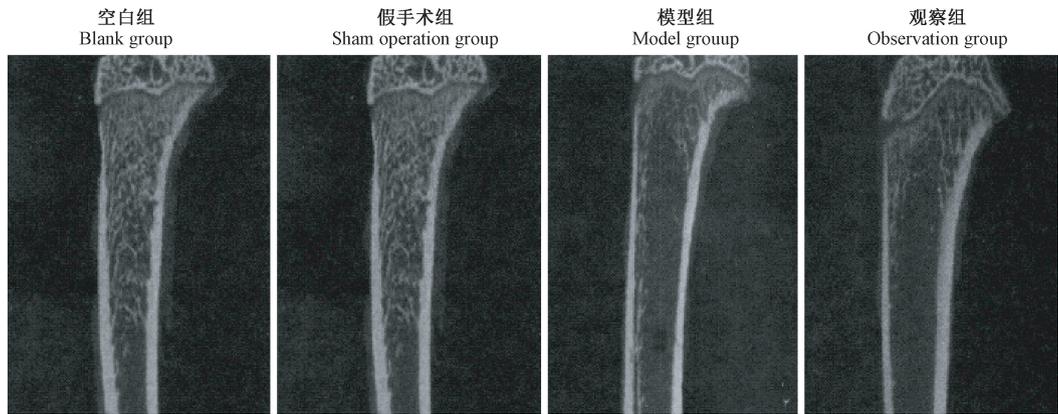


图 1 四组大鼠股骨显微结构的 micro-CT 图像

Fig. 1 Micro-CT images of the microstructure of the femur of the four rat groups

表 3 四组骨密度和骨生物力学相比较 ($n = 24$)

Tab. 3 Comparison of bone mineral density and bone biomechanics between the four rat groups

组别 Groups	骨密度 (g/cm^2) Bone Density	最大载荷 (N) Maximum Load	断裂载荷 (N) Breaking Load
空白组 Blank Group	0.258 ± 0.017	33.738 ± 2.382	59.644 ± 3.518
假手术组 Sham Operation Group	0.253 ± 0.021	32.846 ± 2.423	58.859 ± 4.136
模型组 Model Group	0.218 ± 0.026^{ab}	20.541 ± 3.609^{ab}	45.261 ± 2.634^{ab}
观察组 Observation Group	0.238 ± 0.019^{abc}	27.457 ± 2.810^{abc}	53.868 ± 3.714^{abc}

注:与空白组相比较, $^aP < 0.05$;与假手术组相比较, $^bP < 0.05$;与模型组相比较, $^cP < 0.05$ 。

Note. Compared with the blank group, $^aP < 0.05$. Compared with the sham operation group, $^bP < 0.05$. Compared with the model group, $^cP < 0.05$.

表 4 四组血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和小肠 CaBp-D9K mRNA 表达相比较 ($n = 24$)

Tab. 4 Comparison of serum $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and intestinal CaBp-D9K mRNA expression between the four groups

组别 Groups	$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (ng/L)	CaBp-D9K mRNA
空白组 Blank Group	145.314 ± 21.468	0.542 ± 0.108
假手术组 Sham Operation Group	140.857 ± 26.827	0.537 ± 0.082
模型组 Model Group	87.251 ± 20.685^{ab}	0.327 ± 0.096^{ab}
观察组 Observation Group	122.459 ± 20.543^{abc}	0.449 ± 0.073^{abc}

注:与空白组相比较, $^aP < 0.05$;与假手术组相比较, $^bP < 0.05$;与模型组相比较, $^cP < 0.05$ 。

Note. Compared with the blank group, $^aP < 0.05$. Compared with the sham operation group, $^bP < 0.05$. Compared with the model group, $^cP < 0.05$.

2.3 血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和小肠 CaBp-D9K mRNA 表达的比较

空白组和假手术组血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和小肠 CaBp-D9KmRNA 表达相比较差异均无显著性 ($P > 0.05$);模型组血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和小肠 CaBp-D9K mRNA 表达均低于空白组和假手术组,观察组血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和小肠 CaBp-D9K mRNA 表达

均低于模型组,差异均有显著性 ($P < 0.05$)。(见表 4)

3 讨论

肠道钙的吸收包括被动扩散过程和主动跨细胞过程,主动跨细胞转运过程是肠道钙的吸收主要方式,需要 CaBp-D9K 协助完成转运过程。CaBp-

D9K 分子量为 9000, 是受活性维生素 D 调节的钙转运蛋白, 其主要功能是提高维生素 D 依赖性细胞内钙转运, 增加钙离子通过细胞弥散的速度, 使钙离子快速从细胞顶端到达基底侧, 因此小肠 CaBp-D9K 含量与肠道钙吸收能力成正比^[7]。绝经女性雌激素水平降低可导致继发性甲状旁腺和维生素 D 合成减少, 导致肠道功能缺陷, 随着年龄增加, 肠黏膜 CaBp-D9K 表达逐渐降低, 70 岁的人较其青年时期的 CaBp-D9K 降低超过 50%, 因此, CaBp-D9K 表达降低是绝经后骨质疏松高发的重要因素^[8]。1, 25(OH)₂D₃ 是维生素 D₃ 的活性代谢产物, 可与维生素 D 受体结合调控 CaBp-D9K 活性, 外源性 1, 25(OH)₂D₃ 补充可增加 CaBp-D9K 基因转录^[9]。

本研究采用去卵巢大鼠复制女性绝经后骨质疏松动物模型。去卵巢后实验动物体内雌激素水平降低, 骨吸收增强, 骨生长减弱, 骨量丢失, 逐步形成骨质疏松模型。本研究结果显示, 模型组骨密度、最大载荷、断裂载荷、BV、Tb. Th、Tb. N 水平低于空白组和假手术组; Tb. Sp 高于空白组和假手术组; 观察组骨密度、最大载荷、断裂载荷、BV、Tb. Th、Tb. N 水平均高于对照组, Tb. Sp 低于模型组。结果提示, 注射用骨肽可促进去卵巢骨质疏松大鼠骨量增加, 骨小梁连接更为紧密, 对去卵巢所致骨质疏松具有良好的治疗作用, 与有关研究^[10]一致。本研究结果显示, 模型组血清 1, 25(OH)₂D₃ 水平和小肠 CaBp-D9k mRNA 表达均显著低于空白组和假手术组, 提示肠黏膜 CaBp-D9k mRNA 表达降低所致钙吸收障碍可能是去卵巢大鼠骨质疏松发生的重要因素, 与有关研究^[8-9]一致。本研究结果同时显示, 观察组血清 1, 25(OH)₂D₃ 水平和小肠 CaBp-D9k mRNA 表达均高于模型组, 提示注射用骨肽可通过提高 1, 25(OH)₂D₃ 水平, 增加小肠 CaBp-D9k

mRNA 表达, 促进肠道钙吸收。

综上所述, 注射用骨肽可降低去卵巢大鼠骨质疏松程度, 增加小肠 CaBp-D9k mRNA 表达, 促进肠钙吸收可能是其重要作用机制。

参考文献:

- [1] 谢占成. 骨碎补总黄酮联合全身振动对绝经后骨质疏松性椎体压缩性骨折术后的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(90): 1199-1203.
- [2] 郭崑, 卜淑敏, 韩天雨. 不同干预方法对去卵巢骨质疏松大鼠子宫 GSK-3β 蛋白表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(5): 53-58.
- [3] 于建红. 注射用骨肽联合阿仑膦酸钠治疗骨质疏松症的临床疗效观察 [J]. 中国医药指南, 2015, 13(23): 40, 42.
- [4] 葛伟, 唐曦, 欧阳钢, 等. 电针对绝经后骨质疏松症模型大鼠肠黏膜钙结合蛋白-D9k mRNA 和蛋白表达的影响 [J]. 上海针灸杂志, 2013, 32(11): 944-947.
- [5] 刘冬梅, 袁林, 苏林冲, 等. 强骨康疏胶囊对去卵巢骨质疏松症模型大鼠细胞因子的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(3): 338-341.
- [6] 林峻先. 不同运动训练方式对老年骨质疏松模型小鼠骨生物力学的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(11): 2633-2636.
- [7] 欧阳钢, 唐曦, 莫非, 等. 电针对去卵巢大鼠模型肠黏膜维生素 D 受体 mRNA 和蛋白表达的影响 [J]. 中华老年医学杂志, 2014, 33(3): 302-305.
- [8] 施洁. 电针对去卵巢大鼠肠粘膜钙结合蛋白 D9K 和维生素 D 受体基因表达的影响 [D]. 南京中医药大学, 2014.
- [9] 李小林, 武密山, 朱紫薇, 等. 去卵巢骨质疏松模型大鼠小肠钙结合蛋白 mRNA 表达与菟丝子黄酮的干预 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(27): 4271-4276.
- [10] 薛秀娟. 阿仑膦酸钠联合注射用骨肽治疗绝经后骨质疏松临床疗效评价 [J]. 中国医药科学, 2016, 6(18): 57-59, 72.

[收稿日期] 2018-01-30