

去卵巢小鼠骨质疏松症与骨内血管关系研究

宋健¹ 吴超然² 赵强¹ 李长英³ 徐献伦⁴

(1.山东省济宁市第一人民医院创伤骨科; 2.山东省济宁市第一人民医院影像科; 3.山东省济宁市第一人民医院脊柱外科; 4.山东省济宁市第一人民医院骨科, 山东济宁 272100)

[摘要] 目的:研究去卵巢小鼠骨质疏松症与骨内血管的关系,为绝经后骨质疏松的治疗提供新的思路。方法:选取60只9周龄雌性C57BL/6小鼠,按照随机数字表法分为假手术组、卵巢切除组、雌激素治疗组及去铁敏治疗组各15只。假手术组切除卵巢周围部分脂肪组织;卵巢切除组切除双侧卵巢;雌激素治疗组、去铁敏治疗组在双侧卵巢切除的基础上,给予17 β -雌二醇、去铁敏治疗。术后4周脱颈处死小鼠,取其子宫称重,并检测其股骨微观结构参数与血管数量,分析骨内血管与骨量变化的相关性。结果:与造模前相比,4周后小鼠体质量均有所升高,其余3组组体质量升高、子宫重量降低较假手术组更为明显,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。卵巢切除组骨密度、骨体积分数、小梁骨数量、股骨远侧干骺端微血管相对面积低于假手术组,其小梁骨间距高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$),雌激素治疗组、去铁敏治疗组造模4周后远端骨量/股骨远侧干骺端微血管相对面积与假手术组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。Pearson相关性分析显示股骨远侧干骺端微血管相对面积与骨密度、骨体积分数、小梁骨数量呈正相关,与小梁骨间距呈负相关($P < 0.05$)。结论:小鼠卵巢切除后骨内微血管密度的减少与骨质丢失具有密切关联,雌激素、去铁敏药物均可上调骨内血管密度、促进骨生成,为绝经后骨质疏松症的治疗提供了新的研究方向。

[关键词] 去卵巢;小鼠;骨质疏松症;骨内血管;绝经

中图分类号:R681 文献标识码:A 文章编号:2095-5200(2017)04-012-03

DOI: 10.11876/mimt201704006

绝经后骨质疏松症是与生理退行性变化有关的疾病,女性绝经后雌激素缺乏所致骨量减少、骨密度降低及骨组织结构变化是造成骨质疏松上升、骨折风险加剧的主要原因^[1]。最新研究发现,绝经后骨质疏松症的发生不仅与雌激素水平变化有关,还与骨髓内脂肪组织的增加与骨内血管减少具有密切关联^[2]。因此,有效调节骨质疏松症发病过程中的血管因素,有望提高骨内血流量、减少骨量丢失,维持正常骨量及结构^[3]。本研究建立去卵巢小鼠骨质疏松症模型,自骨内血管角度探讨骨微观结构参数的变化,旨在为绝经后骨质疏松症的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物与分组 60只9周龄雌性C57BL/6小鼠(南京君科生物工程有限公司),体质量202~227g,平均(210.36 \pm 11.48)g,按照随机数字表法分为假手术组、卵巢切除组、雌激素治疗组及去铁敏治疗组,各15只。

1.1.2 药品与仪器 本研究主要药品包括4%多聚甲醛、去铁敏、17 β -雌二醇,均购自美国Sigma公司;主要仪器为Lotus SP Micro-CT扫描仪(美国GE公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 造模 假手术组:切除卵巢周围部分脂肪组织;卵巢切除组、雌激素治疗组、去铁敏治疗组:切除双侧卵巢。

各组小鼠术毕均于左侧股骨下端关节面上缘9mm处作一外侧骨孔,孔径1mm,置入PE-50管,一端使用氰基丙烯酸酯粘合剂固定于骨孔,另一端通过皮下自背部皮肤穿出,关闭管腔^[4]。

雌激素治疗组术后第2d开始,自PE-50管向左侧股骨远端注入17 β -雌二醇,隔日1次,每次100 μ g/kg,雌激素共计注入5次;去铁敏治疗组:术后第2d开始,自PE-50管向左侧股骨远端注入去铁敏,隔日1次,每次20 μ L(200 μ M),去铁敏共计注入5次^[5]。假手术组、卵巢切除组:术后第2d开始注入20 μ L生理盐水,隔日1次,共计注入5次。

1.2.2 取材观察 股骨微观结构参数:自造模首日起,4周后脱颈处死各组内10只小鼠,取其子宫、左侧股骨,使用Micro-CT扫描仪测量其股骨远侧干骺端小梁骨密度和小梁骨的静态微观结构参数,包括小梁骨厚度、小梁骨数量以及梁骨间距等^[6]。

股骨血管数量:取各组剩余5只小鼠,采用墨汁灌注组织学切片法,制备微血管墨汁厚片标本,每张切片分别选择生长板测量5个视野,采用体视学方法,测量血管占其视野的相对面积,规定为血管相对密度,以评价微血管扩张、增多的程度^[7]。

1.3 统计学分析

应用SAS6.12统计软件包进行统计学分析,体质量、

第一作者:宋健,本科,主治医师,研究方向:创伤骨科临床,Email:2689552038@qq.com。

通讯作者:赵强,博士,副主任医师,研究方向:创伤骨科。

子宫重量、骨量及微血管相对面积等计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,并采用 t 检验,相关性分析采用Pearson法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体质量及子宫重量变化

与造模前相比,各组小鼠造模4周后体质量均有所升高,其余3组体质量升高较假手术组更为明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其余3组子宫重量均低于假手术组,差异有统计学意义,见表1。

表1 各组小鼠变化比较(g, $\bar{x} \pm s$)

组别	体质量		
	造模前	造模4周后	造模4周后子宫重量
假手术组	209.51 ± 10.69	260.13 ± 16.69	625.68 ± 117.26
卵巢切除组	211.03 ± 10.25	295.57 ± 16.39*	120.24 ± 11.35*
雌激素治疗组	210.14 ± 10.33	294.26 ± 18.71*	122.15 ± 10.18*
去铁敏治疗组	213.61 ± 10.18	293.35 ± 16.74*	121.96 ± 11.06*

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$

2.2 远端骨量

卵巢切除组骨密度、骨体积分数、小梁骨数量低于假手术组,其小梁骨间距高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$),雌激素治疗组、去铁敏治疗组造模4周后远端骨量与假手术组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

表2 各组小鼠远端骨量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	骨密度(mg/cc)	骨体积分数	小梁骨数量(mm)
假手术组	10	395.26 ± 24.47	0.40 ± 0.08	3.69 ± 0.83
卵巢切除组	10	321.05 ± 19.58*	0.31 ± 0.04*	2.45 ± 0.62*
雌激素治疗组	10	388.41 ± 26.24#	0.39 ± 0.06#	3.67 ± 0.79#
去铁敏治疗组	10	383.59 ± 25.07#	0.40 ± 0.07#	3.66 ± 0.79#

组别	例数	小梁骨厚度(μm)	小梁骨间距(μm)
假手术组	10	0.13 ± 0.04	0.17 ± 0.05
卵巢切除组	10	0.10 ± 0.03	0.35 ± 0.15*
雌激素治疗组	10	0.12 ± 0.04	0.18 ± 0.05#
去铁敏治疗组	10	0.12 ± 0.03	0.17 ± 0.03#

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与卵巢切除组比较,# $P < 0.05$

2.3 微血管相对面积

造模4周后,卵巢切除组股骨远侧干骺端微血管相对面积 2.16 ± 0.52 低于假手术组的 3.95 ± 0.84 ,差异有统计学意义($P < 0.05$),雌激素治疗组、去铁敏治疗组股骨远侧干骺端微血管相对面积分别为 3.88 ± 0.75 、 3.91 ± 0.73 ,与假手术组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 相关性分析

Pearson相关性分析示,股骨远侧干骺端微血管相对面积与骨密度、骨体积分数、小梁骨数量呈正相关,与小梁骨间距呈负相关($P < 0.05$)。见表3。

表3 股骨远侧干骺端微血管相对面积与远端骨量的相关性分析

参数	骨密度(mg/cc)	骨体积分数	小梁骨数量(/mm)	小梁骨厚度(μm)	小梁骨间距(μm)
r 值	0.727	0.639	0.685	0.124	-0.622
P 值	< 0.05	< 0.05	< 0.05	> 0.05	< 0.05

3 讨论

作为一种全球性健康问题,骨质疏松患者不仅骨折风险上升,还可引起慢性肌肉疼痛和骨骼疼痛^[8]。雌激素可通过多种途径参与骨代谢^[9-11]:结合破骨细胞表面受体,下调破骨细胞溶酶体酶活性,抑制骨吸收、降低骨切片凹陷风险;作用于破骨细胞前体,抑制破骨细胞生长、分化,延缓骨量减少进程;结合成骨细胞表面受体,上调胶原酶、细胞因子及生长因子释放,介导胰岛素样生长因子1、转化生长因子,调节成骨代谢,诱导骨重建。因此,女性绝经后雌激素水平的急剧降低可导致骨形成受阻、骨吸收加剧,进而引发骨量减少甚至骨质疏松。本研究实验动物卵巢切除后,小鼠体质量明显增加、子宫重量明显降低,机体代偿性增加脂肪雌激素的合成以维持雌激素稳态水平,是导致其体重急剧上升的主要原因^[12-13]。经补充雌激素治疗后,雌激素治疗组小鼠远端骨量丢失得到了有效控制,说明雌激素对于抑制小梁骨微观结构退变具有重要意义。

血管为雌激素的靶组织^[14]。有学者发现,骨的塑形过程与血管形成具有密切关联,成骨细胞及破骨细胞通过血管达到骨改建部位,对于维持骨骼生长、稳定具有重要作用,而血管内皮细胞可有效促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞谱系分化,从而上调骨量^[15]。Chen等^[16]指出,血管内皮细胞生长因子(VEGF)等血管形成相关因子具有调控前成骨细胞的募集、增殖和向成骨细胞的分化作用,且能够增强成骨细胞和破骨细胞的活性,促进骨形成过程。本研究通过微血管相对面积评估骨内血管状态,结果表明,骨内血管增殖速度、数量均与远端骨量具有明显相关性。去铁敏治疗组小鼠骨量丢失状态得到了明显抑制,去铁敏可通过低氧诱导因子途径增加局部血管内皮生长因子表达、促进局部血管生成^[17],此次研究结果在证实骨内血管对于骨形成发挥的重要作用的同时,亦说明去铁敏能够拮抗卵巢切除或绝经后因雌激素缺乏所致骨量丢失甚至骨质疏松^[18]。

综上所述,去卵巢小鼠骨质疏松症与雌激素减少所致骨内血管密度、数量降低具有密切关联,补充雌激素或注射去铁敏对于骨内血管数量增加具有积极作用,而这一作用可防止骨量丢失,降低骨质疏松风险,值得作为骨质疏松症防治的新思路加以进一步探索。

参考文献

- [1] CHEN B, YAN Y L, LIU C, et al. Therapeutic effect of deferoxamine on iron overload-induced inhibition of osteogenesis in a zebrafish model[J]. Calcif Tissue Int, 2014, 94(3): 353-360.
- [2] ROSSI F, PERROTTA S, BELLINI G, et al. Iron overload causes osteoporosis in thalassemia major patients through interaction with transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels[J]. Haematologica, 2014, 99(12): 1876-1884.
- [3] 卫鹏斌. VEGF在BMP-2促进骨质疏松性成骨细胞成骨过程中作用机制的研究[D].太原:山西医科大学,2015.
- [4] VRTAČNIK P, MARC J, OSTANEK B. Hypoxia mimetic deferoxamine influences the expression of histone acetylation-

(下转第16页)

- 围神经损伤 [C]// 中华医学会第十四次全国物理医学与康复学学术会议. 2012.
- [7] 吴承远, 刘玉光, 张良文, 等. 立体定向神经外科治疗三叉神经痛研究 [C]// 2011 中华医学会神经外科学学术会议论文汇编. 2011.
- [8] MØLLER A R. Microvascular Decompression Surgery for Disabling Positional Vertigo and Tinnitus[M]//Microvascular Decompression Surgery. Springer Netherlands, 2016: 95-101.
- [9] CRUCCU G, FINNERUP N B, JENSEN T S, et al. Trigeminal neuralgia[J]. *Neurology*, 2016, 87(2): 220-228.
- [10] MURATORIO F, TRINGALI G, LEVI V, et al. Hydrocephalus: an underrated long-term complication of microvascular decompression for trigeminal neuralgia. A single institute experience[J]. *Acta Neurochir*, 2016, 158(11): 2203-2206.
- [11] 曾明慧, 傅先明, 姜晓峰. 原发性三叉神经痛发病机制研究进展 [J]. *临床神经外科杂志*, 2012, 09(1):55-57.
- [12] CRUCCU G, FINNERUP N B, JENSEN T S, et al. Trigeminal neuralgia New classification and diagnostic grading for practice and research[J]. *Neurology*, 2016, 87(2): 220-228.
- [13] HUANG H, WANG Z, MA Y, et al. Analysis of magnetic resonance tomographic angiography false negatives in trigeminal neuralgia before microvascular decompression[J]. *Oral Radiol*, 2017, 33(1): 45-50.
- [14] 程竞. 老年原发性三叉神经痛微血管减压术探讨 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2014.
- [15] 周厚地, 张瑞, 童强, 等. 鼠神经生长因子联合甲钴胺短期治疗糖尿病痛性神经病变的疗效观察 [J]. *第三军医大学学报*, 2015, 37(15): 1593-1595.
- [16] DUAN Y, SWEET J, MUNYON C, et al. Degree of distal trigeminal nerve atrophy predicts outcome after microvascular decompression for type 1a trigeminal neuralgia[J]. *J Neurosurg*, 2015, 123(6): 1512-1518.
- [17] TULEASCA C, CARRON R, RESSEGUIER N, et al. Decreased Probability of Initial Pain Cessation in Classic Trigeminal Neuralgia Treated With Gamma Knife Surgery in Case of Previous Microvascular Decompression: A Prospective Series of 45 Patients With > 1 Year of Follow-up[J]. *Neurosurgery*, 2015, 77(1): 87-95.
- [18] OGIWARA T, GOTO T, KUSANO Y, Et al. Subtemporal transtentorial approach for recurrent trigeminal neuralgia after microvascular decompression via the lateral suboccipital approach: case report[J]. *J Neurosurg*, 2015, 122(6): 1429-1432.

(上接第13页)

- and DNA methylation-associated genes in osteoblasts[J]. *Connect Tissue Res*, 2015, 56(3): 228-235.
- [5] VALIZADEH N, FARROKHI F, ALINEJAD V, et al. Bone density in transfusion dependent thalassemia patients in Urmia, Iran[J]. *Iran J Pediatr Hematol Oncol*, 2014, 4(2): 68.
- [6] 肖琼. 富血小板纤维蛋白新生诱导骨的微观结构和生物力学性能的研究 [D]. 泸州: 四川医科大学; 西南医科大学, 2015.
- [7] KLEIN-NULEND J, VAN OERS R F M, BAKKER A D, et al. Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency, and osteoporosis[J]. *J Biomech*, 2015, 48(5): 855-865.
- [8] UMLAND E M, KAREL L, SANTORO N. Bazedoxifene and Conjugated Equine Estrogen: A Combination Product for the Management of Vasomotor Symptoms and Osteoporosis Prevention Associated with Menopause[J]. *Pharmacotherapy*, 2016, 36(5): 548-561.
- [9] 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 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(2): 150-153.
- [10] DU Z, STECK R, DOAN N, et al. Estrogen deficiency-associated bone loss in the maxilla: A methodology to quantify the changes in the maxillary intra-radicular alveolar bone in an ovariectomized rat osteoporosis model[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2014, 21(5): 458-466.
- [11] 朱欢丽. 雌激素治疗骨质疏松症机制研究 [D]. 上海: 华中科技大学, 2008.
- [12] 武兆忠. 原发性骨质疏松症 OPG 基因启动子多态性分析及雌激素对人成骨样细胞 OPG 表达的调控 [D]. 广州: 中山大学, 2005.
- [13] KRISHNAMOORTHY D, FRECHETTE D M, ADLER B J, et al. Marrow adipogenesis and bone loss that parallels estrogen deficiency is slowed by low-intensity mechanical signals[J]. *Osteoporos Int*, 2016, 27(2): 747-756.
- [14] MIYAMOTO T. Mechanism Underlying Post-menopausal Osteoporosis: HIF1 α is Required for Osteoclast Activation by Estrogen Deficiency[J]. *Keio J Med*, 2015, 64(3): 44-47.
- [15] 刘竹影, 陈颖, 刘倩, 等. 血管内皮祖细胞改善骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞的增殖及凋亡 [J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(14): 1999-2006.
- [16] CHEN L, ZHU Z, PENG X, et al. Hepatic magnetic resonance imaging with T2* mapping of ovariectomized rats: correlation between iron overload and postmenopausal osteoporosis[J]. *Eur Radiol*, 2014, 24(7): 1715-1724.
- [17] GIUSTI A. Bisphosphonates in the management of thalassemia-associated osteoporosis: a systematic review of randomised controlled trials[J]. *J Bone Miner Metab*, 2014, 32(6): 606-615.
- [18] POGGI M, SORRENTINO F, PUGLIESE P, et al. Longitudinal changes of endocrine and bone disease in adults with β -thalassemia major receiving different iron chelators over 5 years[J]. *Ann Hematol*, 2016, 95(5): 757-763.