

[文章编号] 1000-1182(2014)02-0134-04

甲状旁腺激素与雌激素对去势雌性大鼠 牙槽骨代谢的影响

孙哲 林志勇 白广亮 狄婧 姜丽霞
山东大学附属省立医院口腔科, 济南 250021

[摘要] 目的 观察甲状旁腺激素与雌激素单独和联合应用对去势雌性大鼠牙槽骨代谢的影响。方法 选用4月龄雌性Wistar大鼠66只, 分成两组, 分别为伪手术组($n=18$)和去势组($n=48$)。8周后各处死8只证实骨质疏松造模成功。剩余的伪手术组(A组, $n=10$) Wistar大鼠作为对照; 将剩余的去势组Wistar大鼠随机分成4组, 分别为去势组(B组)、去势加雌激素组(C组)、去势加甲状旁腺激素组(D组)、去势加雌激素和甲状旁腺激素组(E组), 每组10只。A组和B组注射生理盐水($1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$); C组注射苯甲酸雌二醇($10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$); D组注射甲状旁腺激素($20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$); E组注射苯甲酸雌二醇($10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和甲状旁腺激素($20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。隔日腹腔注射1次, 用药8周。治疗后处死大鼠并测定牙槽骨骨密度, 观察每组大鼠骨组织形态计量学参数及血清钙、磷、碱性磷酸酶(ALP)水平。结果 去势手术8周后, 去势组大鼠牙槽骨密度明显低于伪手术组($P<0.05$)。用药8周后, C、D、E组骨密度、骨小梁面积百分比(%Tb.Ar)、骨小梁宽度(Tb.Th)和骨小梁数量(Tb.N)较B组均有明显提高, 其中E组提高最明显($P<0.05$)。各组血清钙磷值无明显改变($P>0.05$), B组ALP值较A组明显升高($P<0.05$)。结论 间歇性、小剂量注射甲状旁腺激素能增加去势大鼠牙槽骨的骨密度和改善骨结构, 与雌激素联合使用对骨质疏松的治疗有协同作用。

[关键词] 甲状旁腺激素; 雌激素; 骨质疏松; 牙槽骨

[中图分类号] Q 593+.6 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2014.02.007

Influence of parathyroid hormone and estrogen on alveolar bone metabolism of castrated female rats Sun Zhe, Lin Zhiyong, Bai Guangliang, Di Jing, Jiang Lixia. (Dept. of Stomatology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of parathyroid hormone and estrogen on alveolar bone metabolism of castrated female rats. **Methods** Sixty-six female Wistar rats which were healthy and 4 months old were divided into two groups, with group SHAM ($n=18$) and group ovariectomy (OVX) ($n=48$). After 8 weeks of ovariectomy, the osteoporosis model was confirmed by examining 8 ovariectomized and sham-operated rats. The rest 10 rats in group SHAM were the control group (group A). The rest 40 rats in group OVX were divided into ovariectomized group (group B), ovariectomized and treated with estrogen (group C), ovariectomized and treated with parathyroid hormone (group D), ovariectomized and treated with estrogen and parathyroid hormone (group E) at random with 10 in each group. Group A and B injected physiological saline ($1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), group C injected estradiol benzoate ($10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), group D injected parathyroid hormone ($20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), group E injected parathyroid hormone ($20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and estradiol benzoate ($10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The intraperitoneal injection were made every other day to rats in each group, which continued for 8 weeks. The bone mineral density (BMD), bone histomorphology and serum Ca, P, alkaline phosphatase (ALP) were measured after therapy. **Results** After 8 weeks of ovariectomy, the lumbar BMD of ovariectomized rats were significantly declined compared with those of the sham-operated rats ($P<0.05$). Eight weeks later after the drug use, the BMD, %Tb.Ar, Tb.Th, Tb.N in group C, D, E were slightly elevated compared to group B, especially the group E ($P<0.05$). Serum calcium and phosphorus values did not change significantly ($P>0.05$). ALP values in group B was significantly higher than that in group A ($P<0.05$). **Conclusion** Intermittent application of parathyroid

[收稿日期] 2013-06-10; **[修回日期]** 2014-01-12

[基金项目] 山东省科技发展基金资助项目(2010G0020226)

[作者简介] 孙哲, 硕士, E-mail: sz0116@126.com

[通讯作者] 林志勇, 主任医师, 硕士, E-mail: zhiyongl@126.com

hormone in small doses can increase alveolar BMD of castration rats and improve their bone structure. And it can have synergy effects on the treatment of osteoporosis if it is used combining with estrogen.

[Key words] parathyroid hormone; estrogen; osteoporosis; alveolar bone

骨质疏松症是老年人常见的一种骨代谢疾病,尤其是绝经后妇女发病率很高,给社会和家庭带来了巨大的经济负担,成为不容忽视的一种全身代谢性疾病。研究^[1-2]表明,骨质疏松症对牙槽骨的骨矿含量和剩余牙槽骨体积都会产生明显影响。这些影响是在临床进行相关口腔疾病治疗过程中所不能忽视的。目前临床上对骨质疏松症的治疗,主要是通过抑制骨吸收和降低骨转换率来提高骨密度,而对骨质量的改善尚缺乏有效的治疗方法。近年来的研究^[3-4]发现,小剂量、间歇应用甲状旁腺激素对骨形成有促进作用,同时还可以改善骨骼的微结构,为原发性骨质疏松症的治疗开辟了更有效的新途径。

本研究通过去除雌性Wistar大鼠双侧卵巢组织建立骨质疏松动物模型,观察甲状旁腺激素与雌激素对去势后雌性大鼠牙槽骨的影响,从而为临床上应用甲状旁腺激素治疗与绝经后女性骨质疏松相关的口腔疾病提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 药物和试剂

甲状旁腺激素(上海吉尔生化有限公司,批号:S110819-04,每支100 μg ,纯度97.3%),苯甲酸雌二醇注射液(上海通用药业股份有限公司,批准文号:国药准字H31021114,每支2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),大鼠甲状旁腺激素酶联免疫分析试剂盒(济南格因生物科技公司),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒、钙试剂盒(Olympus Diagnostica GmbH公司,日本),Estradiol II 雌二醇诊断试剂盒(Roche Diagnostics GmbH公司,德国)。

1.2 主要仪器设备

双能X线骨密度测量仪(XR-36型, Norland公司,美国),全自动生化分析仪(AU5400型, Olympus公司,日本),病理切片机、计算机病理图像采集与分析系统(Leica公司,德国)。

1.3 实验动物模型的建立

选用雌性Wistar大鼠66只(购自山东大学动物实验中心),4月龄,体重220~260 g, SPF级。饲养7 d后进行手术,建立实验模型。100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 氯胺酮腹腔注射麻醉,其中48只(去势组)背部正中切口切除双侧卵巢,其余18只(伪手术组)仅切除卵巢周围等量脂肪组织。所有大鼠同等条件下喂养,自

由饮水摄食,喂食标准颗粒饲料。

1.4 动物分组和给药方法

术后8周,伪手术组和去势组各取8只实验动物,放血处死后取上颌骨行骨密度测定,确认大鼠骨质疏松模型建立成功后进行实验分组。除伪手术组10只(A组)外,去势组再随机分为去势组(B组)、去势加雌激素组(C组)、去势加甲状旁腺激素组(D组)、去势加雌激素和甲状旁腺激素组(E组),每组10只。A组和B组:按1 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重腹腔注射0.9%生理盐水;C组:按10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重腹腔注射苯甲酸雌二醇;D组:按20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重腹腔注射甲状旁腺激素;E组:按10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重腹腔注射苯甲酸雌二醇和按20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重腹腔注射甲状旁腺激素。隔日1次,用药时间为8周。

1.5 观察指标

各组大鼠用药后8周抽取大鼠静脉血,然后全部放血致死取大鼠上颌骨标本。测定指标为:1)生化指标:将2 mL全血离心后制备血清,采用全自动生化分析仪进行血清钙、磷、ALP浓度的生化分析。2)骨密度:采用双能X线骨密度测量仪通过计算机系统应用软件测量大鼠上颌骨标本骨密度,精确度CV=1%。3)骨形态计量学测定:将骨组织置于4%多聚甲醛内固定72 h, 10%甲酸脱钙,流水冲洗12 h,常规乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,硬组织切片机沿骨长轴方向切成厚度为5 μm 的切片,苏木素-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色,将制作完成的切片运用Leica计算机病理图像采集与分析系统及Image Pro Plus图像分析软件进行形态观察和骨组织形态计量学测量。测量大鼠上颌牙槽骨的骨小梁面积百分数(%Tb.Ar)、骨小梁宽度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)和骨小梁间隔(Tb.Sp),每片测量3次取均值^[5]。

1.6 统计学分析

采用SPSS 13.0软件包对实验数据进行分析,组间比较采用单因素方差分析,样本间的两两比较采用多个样本的 q 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠骨质疏松模型造模成功

大鼠去势手术后8周,去势组、伪手术组大鼠骨

密度分别为 (0.130 ± 0.016) 、 (0.141 ± 0.007) $\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ，去势组大鼠的骨密度显著低于伪手术组 $(P<0.05)$ 。提示骨质疏松模型造模成功。

2.2 甲状旁腺激素与雌激素对去势雌性大鼠骨密度的影响

实验大鼠用药8周后，通过双能X线骨密度测量仪测量各组大鼠上颌牙槽骨的骨密度。通过对比发现C、D、E组大鼠牙槽骨密度均较B组有明显增加 $(P<0.05)$ ；E组大鼠和D组大鼠相比，牙槽骨密度增加 $(P<0.05)$ ；C、D组之间牙槽骨密度差异无统计学意义 $(P>0.05)$ （图1）。

2.3 甲状旁腺激素与雌激素对去势雌性大鼠骨组织形态及形态计量学参数的影响

去势手术8周后，进行组织病理学检查。观察大鼠上颌骨的组织切片可见，伪手术组大鼠骨小梁粗大、致密，排列规则；而去势组大鼠骨小梁变得细小、稀疏，有断裂，间隙增宽，排列变得十分紊乱、

不规则（图2）。用药治疗8周后发现，C组和D组骨小梁结构得到改善，而E组骨小梁结构改善更加明显，与伪手术组相似（图2）。

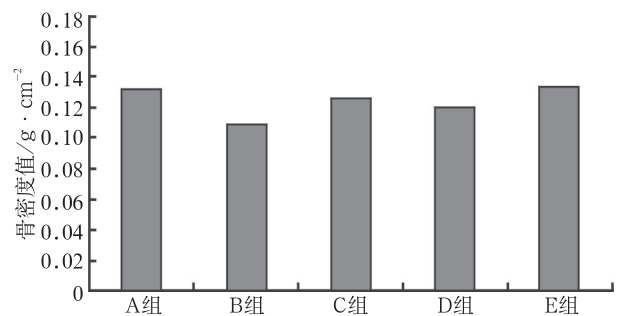
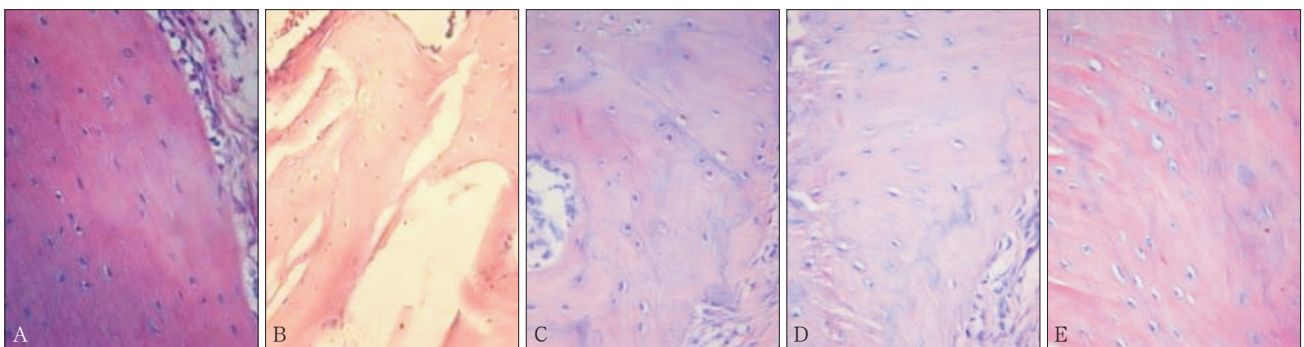


图1 用药8周后各组大鼠上颌牙槽骨的骨密度

Fig 1 The bone mineral density of maxillary alveolar bone in the every group after 8 weeks treatment

用药治疗8周后，C、D、E组和B组比较，E组和C、D组比较，上颌骨的%Tb.Ar、Tb.Th、Tb.N均增加 $(P<0.05)$ ，Tb.Sp均减少 $(P<0.05)$ （表1）。



A: A组; B: B组; C: C组; D: D组; E: E组。

图2 用药8周后各组上颌牙槽骨的比较 HE $\times 400$

Fig 2 Comparison of maxillary alveolar bone in the every group after 8 weeks treatment HE $\times 400$

表1 用药8周后各组大鼠上颌骨形态计量学指标和生化指标

Tab 1 The maxillary histomorphometry and biochemical markers in the every group after 8 weeks treatment

组别	形态计量学指标				生化指标		
	%Tb.Ar/%	Tb.Th/ μm	Tb.N/mm	Tb.Sp/ μm	Ca/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	P/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	ALP/U $\cdot\text{L}^{-1}$
A	15.57 \pm 2.66	48.66 \pm 8.01	2.74 \pm 0.25	197.57 \pm 29.55	2.57 \pm 0.11	1.58 \pm 0.22	120.32 \pm 20.03
B	8.99 \pm 4.15 [*]	31.17 \pm 9.90 [*]	1.36 \pm 0.43 [*]	276.19 \pm 41.00 [*]	2.35 \pm 0.16 [*]	1.76 \pm 0.27 [*]	208.15 \pm 24.82 [*]
C	12.64 \pm 2.32 ^{*△}	39.81 \pm 8.21 ^{*△}	2.15 \pm 0.37 ^{*△}	212.38 \pm 36.59 [*]	2.54 \pm 0.19 [*]	1.79 \pm 0.31 ^{*△}	169.15 \pm 25.72 ^{*△}
D	12.69 \pm 2.71 ^{*△}	40.04 \pm 7.46 ^{*△}	2.18 \pm 0.51 ^{*△}	205.10 \pm 24.07 [*]	2.49 \pm 0.18 [*]	1.66 \pm 0.26 [*]	221.94 \pm 30.10 [*]
E	15.98 \pm 3.60 ^{*△}	49.32 \pm 9.49 ^{*△}	2.68 \pm 0.55 ^{*△}	183.14 \pm 32.86 ^{*△}	2.56 \pm 0.14 [*]	1.87 \pm 0.24 [*]	245.27 \pm 21.45 ^{*△}

注：^{*}与A组相比 $P<0.05$ ，^{*}与B组相比 $P<0.05$ ，^{*}与C组相比 $P<0.05$ ，[△]与D组相比 $P<0.05$ 。

2.4 甲状旁腺激素与雌激素对去势雌性大鼠血清钙、磷及ALP水平的影响

用药治疗8周后，各组血清钙磷值无明显改变 $(P>0.05)$ ，B组ALP值较A组明显升高 $(P<0.05)$ ，E组和B、C、D组比较，血清磷、ALP明显

升高 $(P<0.05)$ （表1）。

3 讨论

甲状旁腺激素是由甲状旁腺细胞合成分泌的一

种单链多肽分子,是调节细胞外钙、磷浓度的主要激素之一,主要作用是使血钙、血磷浓度维持在正常水平,靶器官主要是肾脏、骨骼和小肠^[6]。近年来人们通过实验发现小剂量间歇应用甲状旁腺激素可以明显增加松质骨、皮质骨骨量和提高骨生物力学强度,且经大规模临床研究证实,经美国食品药品监督管理局批准作为骨质疏松的治疗药物上市^[7],故与甲状旁腺激素等新型促骨形成剂联合应用以提高疗效成为今后骨质疏松治疗的发展方向。

本实验说明甲状旁腺激素的主要作用是促进骨转换过程中的成骨细胞骨形成功能。成骨细胞骨形成功能提高,不仅可以明显增加皮质骨的骨密度,而且可以改善骨结构,提高抗骨折能力,从而明显减少骨折的风险。但是甲状旁腺激素在临床治疗中也有一定的副作用,包括头晕、恶心、背痛和下肢痉挛。还有动物实验显示出甲状旁腺激素有增加骨肉瘤发病率的风险^[8]。在今后的研究中应该开发甲状旁腺激素的新剂型,改善其副作用,增强患者的依从性,或者研究现有药物之间的相互作用,取长补短,使其能更好的应用于临床治疗。

雌激素是调节骨代谢的重要激素之一,它对骨骼的发育和骨量的维持有着必不可少的作用。当雌激素减少或者缺乏时,它可通过调控破骨细胞生成的细胞因子,使破骨细胞数量增加,或者抑制成熟破骨细胞凋亡而促进骨吸收^[9]。本实验中用药8周后,C组骨密度明显增加;大鼠骨小梁的结构得到明显改善,%Tb.Ar、Tb.Th、Tb.N增加,Tb.Sp减少,证实了雌激素对去势后大鼠骨组织有减少骨吸收,促进骨形成的作用。

本实验通过建立去势雌性大鼠模型,应用甲状旁腺激素、雌激素及两者联合治疗,结果显示:C组和D组都表现为骨量增加,C组的骨形成参数和骨吸收参数均降低,D组的骨形成指标明显升高,而骨吸收指标虽较A组高,但较B组有所降低。提示两者在治疗机制上的差别,雌激素主要通过抑制破骨细胞吸收和骨转换,保持原有骨量。而甲状旁腺激素则在提高骨转换的同时,也提高了骨量和骨小梁的连接性,使骨的生物性能得到改善。甲状旁腺激素在绝经后骨质疏松症中所起的作用主要是通过成骨细胞分泌的骨吸收因子促进破骨细胞的生成来实现的。雌激素有拮抗甲状旁腺激素的骨吸收作用,能够刺激成骨细胞活性,因此去势后的大鼠由于雌激素缺乏使骨组织对甲状旁腺激素作用的敏感性增

加,骨质吸收增加。E组与C组和D组比较,能较大地提高骨量,改善骨结构,说明两者对骨量的形成有协同作用。在本实验中E组在生化指标、骨密度和骨组织形态计量学指标等方面均较C和D组改善效果明显,但其机制仍不清楚。

综上所述,甲状旁腺激素可明显增加骨密度,改善骨结构,提高抗骨折能力,与雌激素联合使用对骨质疏松的治疗有协同作用,为今后临床上应用甲状旁腺激素治疗与绝经后女性骨质疏松相关的口腔疾病提供了实验基础。

[参考文献]

- [1] Jiang GZ, Matsumoto H, Hori M, et al. Correlation among geometric, densitometric, and mechanical properties in mandible and femur of osteoporotic rats[J]. J Bone Miner Metab, 2008, 6(2):130-137.
- [2] Brennan-Calanan RM, Genco RJ, Wilding GE, et al. Osteoporosis and oral infection: independent risk factors for oral bone loss[J]. J Dent Res, 2008, 87(4):323-327.
- [3] Guo YS, Yuan WJ, Zhang AP, et al. Parathyroid hormone-mitogen-activated protein kinase axis exerts fibrogenic effect of connective tissue growth factor on human renal proximal tubular cells[J]. Chin Med J(Engl), 2010, 123(24):3671-3676.
- [4] Rubin MR, Bilezikian JP. Parathyroid hormone as an anabolic skeletal therapy[J]. Drugs, 2005, 65(17):2481-2498.
- [5] 汪春风, 林柏云, 李朝阳. 实验骨组织形态计量学参数分析与意义[J]. 广东解剖学通报, 1995, 17(2):97-101.
- [6] Zhang XZ, Wang B, Yang J, et al. A randomized, multicenter controlled trial to compare the efficacy of recombinant human parathyroid hormone(1-34) with elcatonin in postmenopausal women with osteoporosis in China[J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(24):2933-2938.
- [7] Hodsman AB, Bauer DC, Dempster DW, et al. Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use [J]. Endocr Rev, 2005, 26(5):688-703.
- [8] Tashjian AH Jr, Goltzman D. On the interpretation of rat carcinogenicity studies for human PTH(1-34) and human PTH(1-84)[J]. J Bone Miner Res, 2008, 23(6):803-811.
- [9] 潘央央, 吴红崑. 雌激素对绝经后妇女牙槽骨吸收的影响机制[J]. 国际口腔医学杂志, 2011, 38(2):174-176.

(本文编辑 杜冰)