

甲状旁腺激素通过增加血管及骨的形成防治骨质疏松

谭磊* 邢攸军

山东省章丘市中医医院骨一病区 250200

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 09-1112-04

摘要: 目的 探索甲状旁腺激素(PTH)对去势大鼠骨质疏松的防治作用。方法 30 只健康雌性 SD 大鼠随机行假手术(Sham, $N=10$)和双侧卵巢(OVX, $N=20$)切除手术后,所有 OVX 组大鼠随机的分成 2 组: OVX 组、PTH + OVX 组。术后第一天开始给予药物治疗, PTH + OVX 组: PTH 皮下注射(剂量 $60 \mu\text{g}/\text{kg}$, 每周 3 次),直至手术后 12 周为止,实验截止时间之前所有大鼠注射碘海醇后处死取股骨行 Micro-CT 检测。结果 与 OVX 组比较, PTH + OVX 组股骨远端有较高的 BMD、BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Conn. D、血管体积分数和较低的 Tb. Sp, 其中 Sham 组大鼠股骨远端有最高的 BMD、BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Conn. D、血管体积分数和最低 Tb. Sp。结论 甲状旁腺激素通过促进血管形成及骨量增加来防治去势大鼠骨质疏松。

关键词: 去势大鼠, 骨质疏松症, 甲状旁腺激素, 血管形成

Parathyroid hormone (1-34) prevents and treats osteoporosis by stimulation of angiogenesis and osteogenesis

TAN Lei, XING Youjun

Department of First Orthopedics, Zhangqiu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhangqiu 250200, Shandong, China

Corresponding author: TAN Lei, Email: 1097618763@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of parathyroid hormone (1-34) on the prevention and treatment of osteoporosis in OVX rats. **Methods** After bilateral ovariectomy (OVX, $n=20$) and sham operation (Sham, $n=10$), all animals from OVX group were randomly divided into two groups, OVX group and PTH + OVX group. Rats in PTH + OVX group received PTH ($60 \mu\text{g}/\text{kg}$, 3 times a week) for 12 weeks. The rats were injected iohexol to observe angiogenesis before sacrificed. The distal femurs were evaluated using micro-computerized tomography. **Results** Comparing with OVX group, the femurs in Sham and PTH + OVX groups had a higher BMD, BV/TV, Tb. Th, Tb. N, Conn. D, and vascular volume fraction, but a lower Tb. Sp. Rats in Sham group had the highest BMD, BV/TV, Tb. Th, Tb. N, Conn. D, and vascular volume fraction, and the lowest Tb. Sp. **Conclusion** Parathyroid hormone (1-34) prevents and treats osteoporosis through enhanced angiogenesis and osteogenesis. **Key words:** OVX rats, Osteoporosis, Parathyroid hormone, Angiogenesis.

随着世界人口老年化进一步加重,骨质疏松症已经成为一种严重危害老年人群生活质量的社会公害,其患病率预计在未来 10 年将显著增加。骨质疏松症大大增加髋部的骨折发生率,相对于西方国家髋部的骨折发生率在下降,亚洲大部分国家髋部骨折发生率在明显增加^[1]。预计到 2050 年,世界上有一半的髋部骨折会出现在亚洲的国家^[2]。这些表明对骨质疏松的防治在亚洲相对而言更为紧迫。对其防治的研究已成为迫切需要解决的问题。随着近年来抗骨质疏松药物的开发及研究,甲状旁腺激素(PTH)治疗骨质疏松也渐渐被人们重视,大量的研

究小剂量间断使用甲状旁腺激素(PTH)可以加快机体的骨转换,促进成骨细胞的活性,最终会提高骨量,增加骨密度,改善由于卵巢衰退导致骨质疏松^[3]。本研究从血管及骨组织形成方面着手研究 PTH 对去卵巢大鼠骨质疏松的防治作用,为骨质疏松的治疗的机制研究提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

12 周龄 SPF 级 SD 雌性大鼠 30 只,体重 $225 \sim 250 \text{ g}$,由上海斯莱克动物公司提供许可证号: (SCXK(沪) 2007-0005,合格证号: 2007-000548429)。随机分为假手术组(Sham),去卵巢组

* 通讯作者: 谭磊, Email: 1097618763@qq.com

(OVX) PTH 治疗组(PTH + OVX) 每组各 10 只。

1.2 材料

碘海醇(扬子江药业集团有限公司); PTH (美国礼来公司); Micro-CT (SkyScan1176, 荷兰)。

1.3 骨质疏松动物模型的建立及治疗

30 只健康的雌性 Sprague-Dawley 大鼠(3 月龄, 体重 220 ~ 240g。由上海实验动物中心提供)用于去卵巢(OVX, N = 20) 制作骨质疏松模型和假手术(Sham, N = 10)。手术开始前, 所有大鼠称重, 根据体重, 适量腹腔注射 10% 水合氯醛(3 mL/kg) 进行麻醉, 麻醉成功后, 于大鼠背部正中中线中下 1/3 处作一长约 2 cm 纵行切口, 向两侧钝性分离皮下软组织, 于脊柱旁开 0.5 cm 处钝性分开肌肉组织, 显露卵巢脂肪包被组织, 轻轻提起卵巢, 于输卵管卵巢交界处丝线结扎, 完整摘除双侧卵巢, 逐层缝合, 关闭创口。术后前 3d 给予青霉素肌肉注射(2.5 万 U/kg) 预防感染。术后所有的去卵巢(OVX) 大鼠随机的分成两组: OVX 组、PTH + OVX 组。术后第一天开始给予药物治疗: PTH + OVX 组: PTH 皮下注射(剂量 60 μ g/kg, 每周 3 次), OVX 组和 Sham 组注射相同剂量的生理盐水, 直至手术后 12 周为止, 每周称量大鼠体重, 根据体重变化来调整药物剂量。本实验所使用的药物剂量参考以前发表的治疗骨质疏松效果明显的文献中所使用剂量^[4]。

1.4 Micro-CT 检测

所有存活的大鼠在术后 12 周时处死, 在大鼠处死之前, 予 3% 戊巴比妥钠(45 mg/kg) 对实验大鼠行腹腔麻醉, 无菌条件下在大鼠腹正中行一长约 2 cm 切口, 仰卧位固定, 分离肾动脉以下腹主动脉及静脉, 近端结扎腹主动脉近肾动脉侧, 远端使用动脉夹夹闭腹主动脉后, 向远端插入 PE50 管至髂总动脉开口处约 1 cm, 5-0 缝线多处固定, 仔细探查无渗血后, 经 PE50 管给予 2 ml 温肝素盐水(10 U/L) 灌注大鼠后肢, 而后过量戊巴比妥钠处死大鼠。经 PE50 管向腹主动脉远端推注硝酸甘油 200 mg 扩张血管, 后以 2 ml 生理盐水灌注后肢。1 min 后以 60% 含碘造影剂(碘海醇) 3 ml 手动推入。随后完整取下大鼠双侧股骨, 剔除周围软组织, 生理盐水冲洗后, 采用 10% 的多聚甲醛固定用于 Micro-CT 检测。将左侧股骨置于扫描床上, 扫描兴趣区为股骨中下段松质骨。断层扫描后, 3D 重建, 去除骨皮质影像, 分析软件定量分析。获得大鼠股骨感兴趣区域骨微结构参数骨体积分数(bone volume/total volume, BV/TV)、骨小梁厚度(trabecular thickness,

Tb. Th)、骨小梁数量(trabeculae number, Tb. N)、骨小梁分离度(trabecular spacing, Tb. Sp)、连接密度(connective density, Conn. D.)、骨密度(BMD)、血管体积分数。

1.5 统计学处理

应用 SPSS19.0 统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm SD$ 方式表示; 采用两因素析因设计的方差分析; 两组间比较采用两样本 t 检验; 组间两两比较采用方差分析下的 LSD 方法, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 手术对大鼠的影响

截止到给药 12 周时, 有 2 只大鼠死亡, 它们其中 1 只属于 OVX 组, 1 只属于 PTH + OVX 组, 最终共有 28 只大鼠进入最终试验结果评估。这表明去卵巢诱导骨质疏松模型具有建立模型的手术简单、重复性佳、且模型制作成功的周期短以及稳定型好等优点。

2.2 大鼠骨密度的改变

给药 12 周时, 大鼠股骨远端的骨密度由 Micro-CT 检测的结果如表 1 所示, 12 周时 Sham 大鼠的股骨骨密度为(227.44 $\pm$ 34.38) mg/cm², 而 OVX 组大鼠股骨骨密度为(169.43 $\pm$ 31.32) mg/cm²。相对 Sham 组, OVX 组大鼠的骨密度下降 34.32% ($P < 0.05$)。这表明我们的模型建立是成功的。我们可以发现 PTH + OVX 组、Sham 组的股骨远端的骨密度都明显高于 OVX 组, 且有明显的统计学意义($P < 0.05$)。这表明 PTH 可以增加去卵巢诱导骨质疏松的骨密度。

表 1 大鼠股骨远端骨密度的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Change of BMD of the distal femurs in the rats

Groups	Number	12 weeks(mg/cm ²)
OVX	9	169.43 $\pm$ 31.32
PTH + OVX	9	213.71 $\pm$ 32.39*
Sham	10	227.44 $\pm$ 34.38* &

* 与 OVX 组比较有显著性差异($P < 0.05$); & 与 PTH + OVX 组比较有显著性差异($P < 0.05$)

2.3 Micro-CT 三维重建分析及骨微观参数

我们通过 Micro-CT 对股骨干骨小梁及血管进行三维重建, 重建的结果如图 1 所示, 通过内置软件计算的骨微观参数及血管体积分数如表 2 所示。我们可以通过观察图 1 明显的发现相对而言 PTH + OVX 组大鼠股骨干骺端的骨小梁的数量明显多于 OVX 组, 而且骨小梁联系紧密, 骨小梁更粗, 但是低

于正常组。骨微观参数更加明显的表明 Sham 组有最高的 BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Conn. D 和最低 Tb. Sp 而 OVX 组有最高的 Tb. Sp 和最低 BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Conn. D。从三维重建的图像我们明显可以发现 Sham 及 OVX + PTH 组血管密度明显高于 OVX 组 通过软件计算出的结果如表 2 所示,结果表明 Sham 及 PTH + OVX 组血管体积分数明显高于 OVX 组且各组比较有统计学意义($P < 0.05$)。各组骨微观参数及血管体积分数有明显的统计学意义,这些表明 PTH 可以明显增加去卵巢诱导的骨质疏松骨小梁的质和量,减少骨组织血管减少。

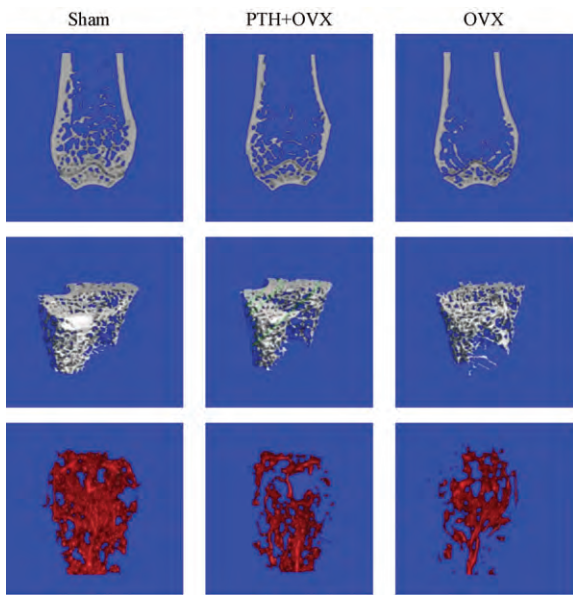


图 1 左股骨干骺端的二维平扫图及股骨髓三维重建的结果。

Fig. 1 2D picture of the left femur and 3D reconstruction of the femur

表 2 术后 12 周时,各组大鼠左股骨干骺端骨微观参数及血管造影通过 Micro-CT 三维重建结果

Table 2 Indexes of microstructure of the left femur and vascular images using 3D micro-CT reconstruction after 12 weeks of the operation

	Sham	PTH + OVX	OVX
Tb. N	3.032 ± 0.115* ^{&}	2.805 ± 0.111*	2.270 ± 0.090
Tb. Th	0.165 ± 0.014* ^{&}	0.177 ± 0.011*	0.123 ± 0.011
BV/TV	0.445 ± 0.016* ^{&}	0.390 ± 0.027*	0.198 ± 0.016
Tb. Sp	0.292 ± 0.035* ^{&}	0.389 ± 0.057*	0.610 ± 0.129
Conn. D	97.421 ± 14.321* ^{&}	68.234 ± 6.678*	46.750 ± 8.970
体积分数	47.43 ± 5.67* ^{&}	40.78 ± 4.89*	31.32 ± 3.78

* 与 OVX 组比较有显著性差异($P < 0.05$);[&] 与 PTH + OVX 组比较有显著性差异($P < 0.05$)

3 讨论

随着医学事业的不断发展和人们生活水平的不断提高,人们的平均寿命不断延长和出生率的不断降低,人口老龄化越来越严重,因此老年病日益增多,尤其是骨质疏松症。WHO 将骨质疏松症 (Osteoporosis, OP) 定义为骨密度低于成人骨量峰值 2.5 个标准差的骨疾病成为骨质疏松症。参与调节骨重建主要有甲状旁腺激素(PTH), 1,25(OH)₂D₃, 降钙素和雌激素这四种主要激素。连续给予 PTH 刺激机体会增强破骨细胞活性,导致骨量丢失,如最常见的原发性甲状旁腺功能亢进就是这种表现,而间歇性小剂量使用 PTH 具有促进骨合成代谢作用,并导致改善骨微结构,增加骨量。大量的研究已经表明间歇性小剂量使用 PTH 确实具有提高骨质疏松状态下骨密度,增加骨量,降低骨折的发生率^[5,6]。这可能与 PTH 的作用机制有关,PTH 可以抑制成骨细胞凋亡,加速骨衬细胞对新分化成骨细胞的招募及破骨细胞的增殖,这些作用主要通过 Wnt 信号通路来进行^[7]。我们的实验再一次证实了间歇性小剂量使用 PTH 确实可以对骨质疏松的防治效果显著,不仅可以保持骨密度,阻止骨小梁的减少。

本实验主要研究的是原发性骨质疏松,原发性骨质疏松分为绝经后骨质疏松和老年性骨质疏松。绝经后骨质疏松主要由于雌激素的不足,因此,骨形成较快,但破骨更快,属于高转化型。老年型骨质疏松,骨量丢失较慢,属于低转化型^[8]。但无论哪种骨质疏松症,骨形成和骨吸收的平衡打破了,都将影响骨质最终导致一系列的病理性骨折如做常见的骨质疏松骨折。本实验选用的抗骨质疏松药物 PTH 在治疗骨质疏松症都有着不错的效果,是目前治疗骨质疏松症的一线药物^[9]。PTH 已被证明是目前最有效的骨形成的促进剂,主要应用于绝经后女性骨质疏松症、男性骨质疏松症及糖皮质激素诱发的骨质疏松症^[10]。在本实验中的 PTH + OVX 组和 Sham 组,无论是在 4w 或者 8w 时,可以看见大量排列整齐的骨小梁,且小梁之间联系紧密,而 OVX 组股骨干骺端干骺端骨小梁排列紊乱稀疏,且部分骨小梁已经断裂且小梁之间联系不紧密。于此,本试验还利用 Micro-CT 测定各组的新骨骨密度,PTH + OVX 组和 Sham 组的新骨密度要明显高于 OVX 组($P < 0.05$)。通过 Micro-CT 对骨微观结构的观察中,发现 PTH + OVX 组和 Sham 组与 OVX 组比较

中,在骨小梁体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)都增高($P < 0.05$),骨小梁分离度(Tb.Sp)降低($P < 0.05$),表明 PTH 在提高骨量的同时也改善了骨质量。

本研究中发现 PTH 明显提高 OVX 大鼠股骨干骺端血管密度及量,图 1 Micro-CT 结果清晰的向我们展示在骨质疏松状态下股骨的干骺端的血管在减少,这可能与与相关成骨的调节因子缺少有关。骨质疏松状态下其雌激素相对缺乏,这会导致影响到 VEGF 及相关因子的表达减少,进一步影响血管内皮细胞的增殖,最终导致血管的减少^[11]。OVX + PTH 组大鼠股骨干骺端血管明显多于 OVX 组,这表明 PTH 可以保护去卵巢导致的雌激素减少影响的血管减少,大量的研究表明 PTH 可以通过经典的 Wnt/ β -catenin 来影响骨组织的形成及重建,而 Wnt/ β -catenin 也会通过影响 VEGF 相关通路基因的表达来影响血管的生成。我们的实验证实 PTH 确实可以促进骨质疏松状态下骨组织的血管形成来影响骨组织的营养,同时可以促进骨组织的形成来影响骨质疏松。这些结果表明 PTH 治疗骨质疏松与促进血管形成及增加局部骨量有着密切的关系,血管形成为骨形成提供营养,这样共同作用的结果导致骨质疏松改善。

本次试验也有其局限性,首先我们实验使用的大鼠数量有限,且时间较短,12 周之后动物骨质疏松的具体情况不知。我们虽然通过 Micro-CT 已经从大体角度发现 PTH 通过增加骨量及血管形成来防治骨质疏松,但是我们没有进一步从微观结构如病理切片角度进一步观察骨骼的具体改变,同时也没有进一步探索机制。我们实验使用的 PTH 剂量明显参考临床上使用的剂量,这样的剂量是否是骨质疏松的治疗最佳剂量不得而知,进一步确定使用 PTH 剂量也是下一步要考虑的事。

综上所述,本次试验虽然没有从机制、生化方面进一步研究 PTH 可以防治去卵巢诱导的骨质疏松,但是这次试验从体外很好的证实 PTH 确实可以通过促进血管及骨组织的形成来防治骨质疏松,为在临床药物方面提供了可能性。

【参 考 文 献】

[1] Cooper C, Cole Z A, Holroyd C R, et al. Secular trends in the

incidence of hip and other osteoporotic fractures [J]. Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA, 2011, 22 (5): 1277-88.

- [2] Cooper C, Campion G, Melton LJ, 3RD. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection [J]. Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA, 1992, 2(6): 285-9.
- [3] Skripitz R, Aspenberg P. Parathyroid hormone—a drug for orthopedic surgery? [J]. Acta orthopaedica Scandinavica, 2004, 75(6): 654-62.
- [4] Tao Z S, Tu K K, Huang Z L, et al. Combined treatment with parathyroid hormone (1-34) and beta-tricalcium phosphate had an additive effect on local bone formation in a rat defect model [J]. Medical biological engineering computing, 2015, 53(1): 1-8.
- [5] Kneissel M, Bboyde A, Gasser J A. Bone tissue and its mineralization in aged estrogen-depleted rats after long-term intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) analog SDZ PTS 893 or human PTH(1-34) [J]. Bone, 2001, 28(3): 237-50.
- [6] Pettway G J, Meganck J A, Koh A J, et al. Parathyroid hormone mediates bone growth through the regulation of osteoblast proliferation and differentiation [J]. Bone, 2008, 42(4): 806-18.
- [7] Baron R, Hesse E. Update on Bone Anabolics in Osteoporosis Treatment: Rationale, Current Status, and Perspectives [J]. J Clin Endocr Metab, 2012, 97(2): 311-25.
- [8] 刘学军. 骨质疏松症 [J]. 中国矫形外科杂志, 2006, 14 (21): 1668-70.
- [9] Brun L R, Galich A M, Vega E, et al. Strontium ranelate effect on bone mineral density is modified by previous bisphosphonate treatment [J]. SpringerPlus, 2014, 3(1): 676.
- [10] 陈奇盛. 原发性骨质疏松的诊断与治疗 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29 (13): 1720-2.
- [11] 向本旭, 刘婷婷, 孙芳玲, 等. VEGF 相关信号通路在血管新生中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 42(12): 378-382.

(收稿日期: 2016-03-17; 修回日期: 2016-05-23)