

胎肾细胞悬液对去卵巢骨质疏松大鼠骨生物力学性能的影响

霍志刚 郑清莲 李信民 刘俊田 刘永惠

摘要：目的 探讨胎肾细胞悬液对去卵巢(OVX)骨质疏松大鼠股骨、腰椎骨生物力学性能的影响。
方法 取3月龄未交配健康SD雌性大鼠39只,随机分为4组,即A、B、C、D组。A组行假手术,B、C、D组行OVX手术。术后12周,A、B组给予生理盐水,C组给予尼尔雌醇,D组给予胎肾细胞悬液。药物治疗4周后,对左侧股骨、第2腰椎骨分别行三点弯曲力学试验、压缩力学试验,测量生物力学参数,检测血清雌二醇水平。**结果** 与A组比较,B组大鼠股骨、腰椎骨的生物力学性能下降($P < 0.05$),血清雌二醇下降($P < 0.01$);与B组相比,C组、D组股骨、腰椎骨的生物力学性能明显改善,血清雌二醇的水平升高($P < 0.05$);C组与D组差异无显著性($P > 0.05$)。**结论** 胎肾细胞悬液能够改善去卵巢大鼠的骨生物力学性能,提高血清雌二醇的水平,作用与尼尔雌醇相似。说明胎肾有防治去卵巢大鼠骨质疏松的作用。

关键词：胎肾细胞悬液；去卵巢大鼠；骨质疏松症；骨生物力学

Effects of fetal renal cell suspension (FRCS) on biomechanical properties of bones in ovariectomized osteoporosis rats HUO Zhigang, ZHENG Qinglian, LI Xinmin, et al. Department of Traditional Chinese Medicine, First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Abstract : **Objective** To explore the effects of fetal renal cell suspension (FRCS) on biomechanical properties of femur and lumbar vertebra in ovariectomized osteoporosis rats. **Methods** Thirty nine female Sprague-dawley rats, three months old, were divided randomly into four groups : SHAM group (group A), OVX group (group B), OVX + E group (group C), and OVX + FNCS group (group D). Twelve weeks after operation, the rats in group A and group B were treated with sodium chloride, the group C was treated with Nilestriol suspension, the group D was treated with FNCS. All rats were sacrificed after four weeks. The three-point bending test on the left femur and compression test on the second lumbar vertebra were performed, and serum estradiol (E_2) level was measured. **Results** The biomechanical property and the level of E_2 in group B were significantly lower than group A ($P < 0.05$). The biomechanical property and the level of E_2 in group C and group D were significantly higher than group B ($P < 0.05$). No differences were shown between group C and group D ($P > 0.05$). **Conclusion** FRCS is beneficial in improving the biomechanical property, and it can increase the level of E_2 of ovariectomized osteoporosis rats. These effects of FNCS were similar to the effects of Nilestriol. This study suggests that FNCS could effectively treat the osteoporosis of ovariectomized rats.

Key words : Fetal Renal Cell Suspension (FRCS) ; Ovariectomized rats ; Osteoporosis ; Bone biomechanics

原发性骨质疏松症尤其是绝经后骨质疏松症的发病主要与性激素水平下降有关。目前防治骨质疏

松症的常用药物并非理想,因此研制、开发新型安全、有效、可以长期应用的防治骨质疏松症的理想药物成为倍受关注的问题。中医理论认为“肾藏精”、“主骨生髓”以及“以脏补脏”。前期实验中发现:胎肾细胞悬液对于老年大鼠骨质疏松模型、维甲酸所致骨质疏松模型都有一定改善骨质疏松的作用。基于这一中医理论并在前期实验的基础上,本实验采用去卵巢大鼠作为骨质疏松模型,以骨生物力学性

基金项目 陕西省科技研究发展(攻关)计划(2004K16-G17)

作者单位:710061 西安,西安交通大学第一附属医院中医科(霍志刚、郑清莲、刘永惠);西安交通大学医学院生化教研室(李信民);西安交通大学医学院药理学(刘俊田)

通讯作者:霍志刚, chiredingyu@tom.com

能参数为指标,研究胎肾细胞悬液对去卵巢大鼠骨质疏松模型在骨生物力学性能方面的影响,为证实胎肾细胞在防治骨质疏松症上的有效性提供进一步的实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3 月龄未交配健康 SD 雌性大鼠 39 只,体重 (310 ± 20) g,孕 19 ~ 21 天 SD 大鼠,普通级标准大鼠饲料(均由西安交通大学医学院动物中心提供)。所有实验动物饲养条件一致。

1.2 药物

1.2.1 胎肾细胞悬液的制备:按照文献^[1]将孕 19 ~ 21 天的同种 SD 母鼠,脱臼处死,常规备皮,消毒,取出胎鼠,将胎鼠消毒后移入超净台内,取出胎肾,放入小培养器皿内,用生理盐水洗涤 3 遍,去肾包膜、肾蒂,放入另一个培养皿内,眼科剪将胎肾轻轻剪碎,转移入 200 目尼龙网,用 5 mL 注射器针芯研磨,边研磨,边用生理盐水冲洗,收集细胞悬液,调整细胞数 2×10^7 /mL,台盘兰染色活细胞在 80% ~ 90% 以上。

1.2.2 尼尔雌醇片:由北京四环制药二厂生产,京卫药准字(1996)第 153001 号,批号:200010801,1 mg/片,蒸馏水配置成混悬液灌胃。

1.3 主要实验仪器及试剂

INSTRON 1011 型万能材料实验机(英国生产);LGS-4-1 型马福炉(上海第三实验电炉厂);Cap-Ria 16 γ -免疫计数器(美国 CAPINTEC-INC 有限公司)雌二醇(E_2)放射免疫试剂盒(天津九鼎医学生物工程有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 造模 参照文献^[2] 39 只大鼠随机分为 2 组,其中一组 8 只为假手术组(代号为 A),另一组 31 只为造模组。各组大鼠均以 10% 的水合氯醛溶液,按 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 大鼠体重腹腔注射麻醉。采用背侧入路,摘除双侧卵巢,进行手术造模。假手术组仅切除双侧卵巢附近小块脂肪,随即止血缝合。所有手术大鼠术后肌肉注射青霉素钠 16 万单位/(只·日),连用 3 日,预防伤口感染。实验过程中每周称大鼠体重 1 次。

1.4.2 动物分组与给药 术后 1 周,将造模组存活的健康大鼠 31 只称重后,随机分为模型组 10 只(B)、雌激素组 10 只(C)、胎肾细胞悬液组 11 只(D),术后 12 周开始给药,A、B 组予生理盐水按 2

$\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 尾静脉注射,C 组按 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 尼尔雌醇剂量灌胃,每周 1 次,D 组按 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量,尾静脉注射胎肾细胞悬液。A、B、D 组每周 2 次。

1.4.3 标本的收集制作 连续干预处理 4 周后,禁食 24 h,第 2 日统一乙醚吸入麻醉,腹主动脉抽取全血 5 mL,3000 r/min 离心 5 min,分离血清,冰箱保存, E_2 待测。

取血后处死,完整取出各组大鼠的第二腰椎骨,剔净软组织,用剪刀小心剪下椎间盘、棘突及附件,并用细砂纸打磨成类似圆柱形,高度 5 ~ 7 cm。完整取出两侧股骨,去除表面附着的软组织。标本制取过程中、结束后均用生理盐水浸湿的纱布包裹,放入保鲜盒,置于 -20°C 低温冰箱保存。骨生物力学 1 周内测试。

1.4.4 观测指标及方法:(1) 大鼠一般情况。(2) 生物力学参数^[3,4] ① 股骨三点弯曲力学指标的测定 取完整的左侧股骨,测定股骨中段直径(游标卡尺,精确度 0.02 mm,同一部位不同侧面测量,共测 4 次,取均值),采用万能实验机测定(跨距为 20 mm,速度为 $1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$,直至骨折)最大载荷、破断载荷、弹性载荷,计算出结构刚度、弯曲能量、最大应力、最大应变、破断应力、弹性模量。② 腰椎压缩力学指标的测定 取第 2 腰椎椎体,测定中段直径(同上),采用万能实验机测定(速度为 $2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$)最大载荷、破断载荷,计算出结构刚度、最大应力、最大应变、破断应力、弹性模量。(3) 血清雌二醇 将保存的大鼠血清取出,应用放射免疫法测量血清雌二醇的含量,有关操作严格按照放射免疫试剂盒说明书进行。

1.5 统计学分析处理

所有数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行多组间单因素方差分析,两两间比较用 Student-Newman-Keuls 法。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

手术后,大鼠食量明显减少,反应迟钝,体毛竖起、枯疏;术后 1 个月大鼠体重开始明显增加,饮食也明显增加,活动灵活。整个实验过程中,共死亡 7 只大鼠,其中术后至用药前死亡大鼠 2 只,死亡原因可能为伤口感染;用药过程中死亡 5 只,其中 4 只可能因静脉注射操作失当而死亡;另有 1 只可能为灌胃不当,导致死亡。由于死亡动物并非集中在一组,而是分散在各组,其中 A 组死亡 0 只,B 组死亡 2 只,C 组死亡 2 只,D 组死亡 3 只,故对实验结果无

影响。

2.2 大鼠左侧股骨结构力学参数的变化(见表 1)

2.3 大鼠左侧股骨材料力学参数的变化(见表 2)

2.4 大鼠第二腰椎结构力学参数变化(见表 3)

2.5 大鼠第二腰椎材料力学参数变化(见表 4)

表 1 左侧股骨结构力学参数($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	最大载荷(N)	弹性载荷(N)	破断载荷(N)	弯曲能量(N·mm)
A	130.2463 ± 8.5973	115.8963 ± 9.4703	127.0864 ± 21.0151	30.1681 ± 7.0565
B	113.6500 ± 9.6642*	93.3655 ± 11.5693**	93.8514 ± 10.1761**	17.4348 ± 2.9931*
C	141.1125 ± 9.4059#	107.4927 ± 7.4816#	117.6642 ± 13.8378#	23.4452 ± 6.5756
D	129.1738 ± 17.4045#	111.1864 ± 11.1864##	117.1490 ± 18.3894#	29.3402 ± 14.0455#

注 A 组 假手术组 B 组 模型组 C 组 雌激素组 D 组 胎肾细胞组。与 B 组比较 * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ 。其中 B 组与 A 组比较, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ C、D 组与 B 组比较, # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$ C 组与 D 组比较, ^ $P \leq 0.05$, ^^ $P \leq 0.01$ 。

表 2 左侧股骨材料力学参数变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	最大应力(MPa)	最大应变($\times 10^4\%$)	破断应力(MPa)	弹性模量(MPa)
A	189.9117 ± 18.0574	384 ± 71	171.3027 ± 24.4283	239.6526 ± 57.4711
B	150.3333 ± 20.1928**	463 ± 80*	123.9007 ± 11.5366**	197.3231 ± 53.0116
C	198.3019 ± 23.8587#	304 ± 49#	185.3498 ± 28.7887##	292.7010 ± 96.9890#
D	200.8365 ± 20.1013##	388 ± 126	182.7198 ± 33.7488##	214.2614 ± 35.3327

注 A 组 假手术组 B 组 模型组 C 组 雌激素组 D 组 胎肾细胞组。与 B 组比较 * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ 。其中 B 组与 A 组比较, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ C、D 组与 B 组比较, # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$ C 组与 D 组比较, ^ $P \leq 0.05$, ^^ $P \leq 0.01$ 。

表 3 腰椎骨结构力学参数变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	最大压缩载荷(N)	破断载荷(N)	结构刚度(N/mm)
A	381.8726 ± 22.1815	356.9549 ± 26.1401	534.0759 ± 94.2569
B	297.2553 ± 21.0289**	278.5321 ± 44.8743**	421.1327 ± 133.6711
C	365.9125 ± 18.5231#	329.1369 ± 26.7475#	487.9609 ± 165.3438
D	362.5000 ± 32.8769##	317.9305 ± 34.1488##	435.4905 ± 121.4689

注 A 组 假手术组 B 组 模型组 C 组 雌激素组 D 组 胎肾细胞组。与 B 组比较 * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ 。其中 B 组与 A 组比较, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ C、D 组与 B 组比较, # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$ C 组与 D 组比较, ^ $P \leq 0.05$, ^^ $P \leq 0.01$ 。

表 4 腰椎骨材料力学参数变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	最大应力 N/mm ²	破断应力 N/mm ²	弹性模量 MPa	最大应变 %
A	13.3129 ± 2.4866	11.2750 ± 2.1532	693.1375 ± 155.7673	0.1035 ± 0.0304
B	9.9812 ± 0.8268**	8.1922 ± 0.5823*	549.9332 ± 133.1606	0.1487 ± 0.0241
C	12.4491 ± 1.4069#	10.8118 ± 2.2004#	563.0058 ± 173.6011	0.1236 ± 0.0433
D	12.1189 ± 1.3943#	8.4776 ± 1.5909#	586.0350 ± 78.2653	0.1196 ± 0.0271

注 A 组 假手术组 B 组 模型组 C 组 雌激素组 D 组 胎肾细胞组。与 B 组比较 * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ 。其中 B 组与 A 组比较, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ C、D 组与 B 组比较, # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$ C 组与 D 组比较, ^ $P \leq 0.05$, ^^ $P \leq 0.01$ 。

2.6 血清雌二醇的变化(见表 5)

表 5 血清雌二醇变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	血清雌二醇含量(pg/mL)
A	2.0850 ± 1.0797
B	0.2563 ± 0.2288*
C	1.3925 ± 0.5237#
D	1.1600 ± 0.7102#

注 A 组 假手术组 B 组 模型组 C 组 雌激素组 D 组 胎肾细胞组。与 B 组比较 * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ 。其中 B 组与 A 组比较, * $P \leq 0.01$ C、D 组与 B 组比较, # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$ C 组与 D 组比较, ^ $P \leq 0.05$, ^^ $P \leq 0.01$ 。

3 讨论

胎肾属于动物类补肾中药。应用胎肾防治骨质疏松症,在前期的实验及其相关的实验中均可以显示出胎肾对骨质疏松症有一定的防治作用,这也证实了中医‘以脏补脏’”‘肾藏精’以及‘肾主骨,生髓’的理论。

雌激素是主要由卵巢分泌的一种激素,雌激素可直接作用于成骨细胞的受体,提高成骨细胞的功能,使骨量增加 雌激素可通过成骨细胞和破骨细胞的雌激素受体来限制骨转换,以维持骨吸收与骨形

成的平衡^[5]。

目前,雌激素替代疗法是公认的防治绝经期骨质疏松症的有效方法之一,组织形态学观察和骨量测定技术均证明卵巢切除或绝经的妇女给予雌激素替代治疗后,与非雌激素替代的妇女相比,骨丢失相对减少,骨折发生率相对降低。在动物身上也有相同结果。因此无论从发病原因还是临床疗效来看,雌激素都是最佳的阳性对照药的选择。尼尔雌醇是合成的雌激素制剂,是临床常用的绝经后雌激素替代药,因此本实验选用尼尔雌醇作为阳性对照药。

3.1 胎肾细胞悬液对去卵巢骨质疏松大鼠骨生物力学性能的影响

骨生物力学研究骨组织在外界作用下的力学特征和骨在受力后的生物学效应,是对骨质量进行评定的一种可靠方法。单纯骨矿含量的增加,骨质量并不一定相应增加,有时反而降低,因此进行骨生物力学研究是评定骨质量和抗骨丢失疗效的最佳方法。

从表 1、2、3、4 可知,与假手术组相比,模型组股骨、腰椎骨的最大载荷、破断载荷、最大应力、破断应力、弹性模量均有明显下降($P < 0.05$),与模型组相比,尼尔雌醇组、胎肾细胞悬液组的上述生物力学参数明显提高($P < 0.05$),这说明切除卵巢导致股骨、腰椎骨的生物力学性能明显下降,表明造模是成功的。应用尼尔雌醇、胎肾细胞悬液进行干预,可提高股骨、腰椎的力学强度,对抗其卵巢切除后由于雌激素降低导致的骨生物力学性能下降的趋势。与尼尔雌醇组相比,胎肾细胞悬液组与之无显著差异。

本次实验结果显示,胎肾细胞悬液能提高骨的结构力学性能(提高最大载荷和破断载荷的数值),同时能提高骨的材料力学性能(提高最大应力、破断应力参数的数值),这种作用与尼尔雌醇作用相当。

3.2 胎肾细胞悬液对去卵巢大鼠雌二醇水平的影响

雌激素水平降低是绝经后骨质疏松发病的首要

因素,雌激素对维持成骨细胞的功能并抑制破骨细胞的活性必不可少,对于骨重建的动态平衡起着重要的调节作用。当雌激素降低时,骨微环境相对平衡被破坏,引起骨代谢紊乱,导致骨质疏松病理过程的出现。

从表 5 可知,与 A 组相比,B 组血清中的 E_2 量有明显下降($P < 0.01$) 这说明切除卵巢导致血清 E_2 水平明显下降,造模是成功的;与 B 组相比,C 组、D 组血清 E_2 水平明显升高($P < 0.05$),说明应用尼尔雌醇、胎肾细胞悬液进行干预,可提高血清 E_2 水平,进而对抗去卵巢后的骨质疏松症状。与 C 组比较,D 组与之无显著差异($P > 0.05$),胎肾细胞悬液的作用与尼尔雌醇相似。

综上所述,本实验中胎肾细胞悬液能够明显改善去卵巢大鼠骨质疏松模型的骨生物力学性能,与治疗绝经后骨质疏松症疗效确切的尼尔雌醇相似。推论其机制,可能为胎肾细胞悬液具有雌激素或类雌激素效应,能够提高大鼠血清中的雌二醇,从而能够改善去卵巢后引起的骨质疏松症。但是,胎肾细胞悬液中治疗骨质疏松的有效物质究竟是蛋白质成分,还是细胞移植的作用?胎肾细胞悬液作用于骨质疏松症的确切机制?这些将是我们今后进一步研究的内容。

【参 考 文 献】

- [1] 彭宁,李锐,张维,等. 胎肾细胞移植对维甲酸所致大鼠骨质疏松症的实验研究. 中国骨质疏松杂志,2001,7(4):300-304.
- [2] 张柳,刘锋,梁春雨,等. 麝香乌龙丸对卵巢切除大鼠股骨骨折愈合的实验研究. 中国骨质疏松杂志,2007,13(1):33-36.
- [3] 陈孟诗,赖胜祥,李良,等. 大鼠的骨生物力学指标选取及测试. 生物医学工程学杂志,2001,18(4):547-551.
- [4] 史念珂,富东慧,蔡霞. 大鼠股骨生物力学实验研究. 天津大学学报,2006,39(4):458-462.
- [5] 鞠传广,马庆军. 雌激素对骨重建过程的影响. 中国骨质疏松杂志,2002,8(4):372.

(收稿日期:2007-09-09)