

硬化蛋白抗体和跑台运动对大鼠骨代谢的影响

蒋健¹ 缪律^{1*} 陈简妮²

1. 上海体育学院,上海 200438

2. 上海财经大学体育教学部,上海 200438

中图分类号: R681, Q953 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 04-0415-08

摘要: **目的** 通过对糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠模型进行硬化蛋白和跑台运动的干预,研究硬化蛋白抗体和跑台运动对大鼠骨代谢的影响。**方法** 雄性 Wistar 大鼠饲养到 19 周后,分为 5 组: C 组(正常对照组)、M 组(甲强龙对照组)、M + E 组(甲强龙 + 运动组)、M + S 组(甲强龙 + 硬化蛋白抗体组)、M + E + S 组(甲强龙 + 运动 + 硬化蛋白抗体组)。**结果** (1) 注射甲强龙可以提高脂肪体重和骨细胞凋亡水平,降低全身和股骨骨矿物质含量,降低股骨骨密度和骨陷窝率,且伴随着股骨远端的骨小梁骨量的下降。(2) 单纯性的运动可以提高骨量、骨陷窝率,同时可以降低脂肪体重、骨吸收标志物 NTx 和骨细胞凋亡水平,但运动不会影响骨矿物质含量和皮层骨参数结构。(3) 单纯性的注射硬化蛋白抗体能增加骨形成标志物骨钙素(osteocalcin, OC),防止甲强龙对骨质量的不良影响,进而提高骨含量、骨密度以及骨体积百分比。硬化蛋白抗体可以增加远端和中段部分的皮质骨参数,防止骨陷窝率下降和因甲强龙诱导产生的骨细胞凋亡水平上升。(4) 运动和硬化蛋白交互作用时,可以提高骨密度、皮质骨参数,促进骨形成抑制细胞凋亡的发生。**结论** 单纯性的 Scl-Ab 注射方案可以预防糖皮质激素治疗对骨量的不良影响,显著提高皮质骨骨量和骨强度。单纯性的跑台运动方案可以降低脂肪含量,并在不影响皮质骨的情况下防止骨小梁丢失。运动与硬化蛋白之间表现出良好的协同作用,对治疗糖皮质激素诱导骨质疏松症具有积极作用。

关键词: 硬化蛋白抗体;跑台运动;骨代谢;大鼠

The effect of sclerostin antibody and treadmill exercise on bone metabolism in rats

JIANG Jian¹, MIAO Lv^{1*}, CHEN Jianni²

1. Shanghai University of Sport, Shanghai 200438

2. Department of Physical Education, Shanghai University of Finance, Shanghai 200438, China

Corresponding author: MIAO Lv, Email: 613668885@qq.com

Abstract: **Objective** To study the effect of the sclerostin antibody and treadmill exercise on bone metabolism in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis. **Methods** After feeding of 19 weeks, male Wistar rats were divided into 5 groups, group C (normal control group), group M (with methylprednisolone), M + E group (with methylprednisolone and exercise), group M + S (with methylprednisolone and sclerostin antibody), group M + E + S (with methylprednisolone, exercise, and sclerostin antibody). **Results** (1) Injection of methylprednisolone improved the weight of body fat and apoptosis bone cells, reduced systemic and femoral bone mineral content, reduced the femoral bone mineral density (BMD) and bone lacuna, and accompanied by a decrease trabecular bone in the distal femur. (2) Simple exercise improved bone mass, bone lacuna rate, and reduced fat mass and bone resorption marker NTX and apoptosis of bone cells. However, exercise did not affect bone mineral content and cortical bone structure parameters. (3) Simple injection of sclerostin antibody increased bone formation marker osteocalcin, prevented from the adverse effect of methylprednisolone on bone quality, and improved bone mineral content, bone mineral density and bone volume percentage. Sclerostin antibody increased the distal and middle part of the cortical bone parameters and prevented from decrease of bone lacuna and increase of apoptosis due to methylprednisolone. (4) Interaction of exercise and sclerostin antibody increased bone mineral density and the cortical bone parameters, and stimulated bone formation and inhibited apoptosis. **Conclusion** The simple injection of sclerostin antibody prevents from side effect on bone mass induced by glucocorticoids, and increases cortical bone mass and bone strength. The simple exercise program reduces fat content and prevents trabecular bone loss. The combination of exercise

*通讯作者: 缪律, Email: 613668885@qq.com

and sclerostin antibody has a positive effect on the treatment of osteoporosis induced by glucocorticoid.

Key words: Sclerostin antibody; Treadmill exercise; Bone metabolism; Rat

1 前言

糖皮质激素被广泛应用于慢性炎症和自身免疫疾病的治疗。但是长期使用糖皮质激素会导致骨形成下降并提高骨折发生的概率^[1]。糖皮质激素诱导产生的骨质疏松症是骨质疏松症的第二位原因^[2]。硬化蛋白作为糖蛋白的分泌蛋白,是成骨细胞分化和骨形成的负向调节^[3]。硬化蛋白是通过结合 Wnt 信号通路受体相关蛋白 LRP5 和 LRP6,从而可以阻断 Wnt 信号通路,减少骨形成^[4],所以硬化蛋白被看做一种抑制骨形成的生理制剂^[5]。除了药物治疗,体育活动可以增加骨密度和骨强度,当负重运动或其它机械负荷运动达到一定强度时,骨架会对其产生适应性^[6]。国际骨质疏松基金会和欧洲钙化组织学会指南推荐,应该鼓励人进行适当的运动来提高骨骼健康。

硬化蛋白抗体和运动锻炼对骨形成具有促进作用,与糖皮质激素对骨量造成的有害影响是互补的。因此本实验旨在对糖皮质激素性骨质疏松症大鼠模型指标进行硬化蛋白抗体和跑台运动的干预,研究硬化蛋白抗体和跑台运动对大鼠代谢的影响。

2 材料与方法

2.1 动物分组及处理

雄性 Wistar 大鼠 75 只,购于上海斯莱克动物实验中心,饲养期间,大鼠自由摄食、饮水,动物房温度控制在 $(22.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$,相对湿度 $(50\% \pm 10\%)$,明暗周期 12:12。饲养到 19 周后,按体重分层随机分为以下 5 组:(1)C 组:正常对照组($n=15$);(2)M 组:注射甲强龙组($n=15$);(3)M+E 组:在 M 组基础上实施运动干预组($n=15$);(4)M+S 组:在 M 组基础上注射硬化蛋白组($n=15$);(5)M+E+S 组:在 M+S 组基础上实施运动干预($n=15$)。

实验干预 9 周后,实验期满后用氯氨酮(100 mg/kg)腹腔注射麻醉,左心室放血。血液离心分离后储存在 -80°C 超低温冰箱保持待用。股骨和胫骨解剖游离结缔组织及脂肪组织分别储存在 -20°C 和 -4°C 条件下。

2.2 甲基龙和硬化蛋白抗体注射方案

注射甲强龙 $5\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,每周 5 次;注射硬化蛋白抗体 $25\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,每周 2 次;正常对照组没

有运动干预,用注射生理盐水。

2.3 运动方案

在 M+E 组和 M+E+S 组,每天运动 1 h,每周 5 次,为期 9 周。在第 1 周和第 9 周,大鼠进行递增负荷实验测试最大有氧速度(MAS)。实验时以 7.5 m/min 的速度热身 5 min,之后每 2 min 速度增加 1.5 m/min 。当大鼠不能跟上跑台速度或停止运动时,此时的速度即为 MAS。简单来说,1 h 的训练计划如下:以 MAS 的 50% 进行 10 min 热身练习。随后进行 5 组 10 min 的跑台训练,其中前 8 min 大鼠以 MAS 的 85%~90% 进行锻炼,后 2 min 大鼠以 MAS 的 50% 进行锻炼。

2.4 测试指标

2.4.1 身体脂肪量、瘦体重和 BMD:体重、脂肪量、瘦体重使用美国 GE 公司产 DPX-MD 型双能 X 线骨密度仪。用 Lunar DPX-MD 型骨密标准模型和分析软件度仪及所附小动物梯级在其腰椎体和右侧股骨进行扫描,得出大鼠的 BMC 和 BMD。

2.4.2 骨组织形态计量学:(1)骨小梁静态参数。对左股骨远端干骺端骨骨小梁微结构进行 μCT (Skyscan 1072, Skyscan, Belgium) 扫描。设置 X 射线电压为 85 kV,电流 $110\text{ }\mu\text{A}$,对骨组织进行扫描,然后利用三维重建软件进行三维构建。将感兴趣区截取下来,使用 Skyscan μCT 分析软件对下列参数进行测定:骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数目(Tb.N)、结构模型指数(SMI)、骨量厚度(Tb.Th)、骨小梁分离度(Tb.Sp)。(2)皮质骨参数。对皮质骨的研究,本实验通过 Micro-CT 对左股骨远端干骺端进行二维重建。将皮质骨和骨小梁分离,使用二位计算方法,转化为二进制图片。对皮质骨的研究笔者采用了和骨小梁相同的采集特性。重建后利用扫描分析软件绘制骨皮质轮廓。在阈值反转前,采用简单的全阈值法,并开发了适用于骨小梁的分析算法,用来表现皮质孔隙度网络的特性。然后,通过 Buxsein 等人^[10]的算法来计算骨皮质形态参数。总面积、骨髓区和皮层厚度评估使用 ImageJ 软件完成。(3)骨陷窝参数。在第 9 周后第 1 天取材,腹腔注射 0.3% 巴比妥钠 10 ml/kg 进行麻醉,取下大鼠股骨头,室温置于 10% 甲醛溶液中固定 24 h,流水冲洗 24 h 后,移入 10% EDTA 溶液中脱钙,至骨组织无气泡发生或软化为宜,随后转入 70% 酒精内

脱水 1 h,再以 80% 酒精脱水 3 h,90% ,95% 酒精 3 次脱水各 1 h,100% 酒精 3 次脱水各 1 h,投入苯甲酸脂酯中透明过夜,浸石蜡 50 min 包埋,切片行 HE 染色。通过光镜统计出视野内骨陷窝数和空缺的骨陷窝数,求出骨陷窝所占的百分比。

2.4.3 股骨的生物力学性能:通过施加三点弯曲试验对左侧股骨进行力学性能的评估。每个股骨固定在计测仪两个较低的支架上。调整两支点间距离为 20 mm,将股骨自由放置在支架上,曲面向下,使股骨中点,两支点中心及加载点重合,以 1 mm/min 的速度加载至样本断裂,用 Instron 3343 软件描述载荷-变形曲线。记录一下数据:最大负荷(N)、刚度(N/mm)。然后转化为力-位移曲线,得出以下骨生物力学参数:从最大负荷和横截面积计算内在的模量(弹性模量,MPa)和最大应力(N/mm²)^[7-8]。

2.4.4 骨形成和骨吸收的生化分析:9 周实验后,对骨转换标记进行分析。骨钙素测定分析骨形成,骨 I 型胶原氨基末端交联肽(NTx)测定分析骨吸收。采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定 NTx 含量。NTx 测定使用 I 型胶原 ELISA 试剂盒。厂商的批内和批间变异系数分别 <8% 和 <10%。

2.4.5 免疫组织化学染色:对切片进行免疫组织化学染色,检测 Caspase 3 蛋白的表达。操作步骤按照试剂说明书进行。一抗采用兔单抗 ASP 175(美国丹佛细胞信号技术公司,1:100),抗采用过辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体(1:2 000)。在 100 倍显微镜下观察并计数 Caspase 3 免疫反应阳性细

胞数。

2.5 数理统计与分析

所有数据采用均数 ± 标准差表示,用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,先采用双因素方差分析,针对其出现差异的影响因素,在进行独立样本 T 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 研究结果

在实验开始时,各组之间的最大有氧速度没有显著差异。经过 9 周跑台实验,M + E 组的 MAS 为 (31.8 ± 1.9)m/min 和 M + E + S 组的 MAS(32.2 ± 1.8)m/min 较实验开始时跑速和较 C 组(16.1 ± 1.5)m/min 均出现显著提高($P < 0.05$)。

3.1 测试指标

在实验开始时,各组的体重、脂肪量、瘦体重之间不存在显著性差异(表 1)。实验后,M 组的体重显著低于 C 组($P < 0.05$);M 组实验后瘦体重显著低于 C 组($P < 0.05$),而 M 组与 C 组的脂肪量接近,M 组的脂肪量百分高于 C 组。通过双因素方差分析,得出运动对糖皮质诱导骨质疏松大鼠的身体成分起到改善作用($P < 0.05$),单纯性的 Scl-Ab 作用未起到明显作用,而运动和 Scl-Ab 交互作用未对体成分起到显著作用。M + E 组较 M 组、M + E + S 组较 M + S 组的体重均显著下降($P < 0.05$),虽然运动没有影响瘦体重,但是运动使 M + E 组、M + E + S 组的脂肪量显著下降($P < 0.05$)。

表 1 不同组大鼠身体体重变化情况($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes of body weight in rats of different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group		体重(g) Body weight	瘦体重(g) Lean weight	脂肪量(g) Fat mass	体脂百分比(%) Percent body fat
C 组	实验前	448.16 ± 36.54	393.25 ± 19.46	53.07 ± 16.76	12.10
	实验后	562.27 ± 46.75 ^b	494.83 ± 42.56 ^b	68.93 ± 17.08	12.20
M 组	实验前	457.42 ± 38.65	394.51 ± 16.13	54.25 ± 17.03	11.80
	实验后	509.58 ± 41.84	438.24 ± 35.76	70.46 ± 18.54	13.80
M + E 组	实验前	462.63 ± 39.41	396.65 ± 14.62	55.71 ± 17.35	11.90
	实验后	450.79 ± 40.26	414.29 ± 28.66 ^T	35.72 ± 8.64 ^T	7.80 ^T
M + S 组	实验前	473.17 ± 36.35	397.12 ± 18.79	56.25 ± 16.98	11.70
	实验后	523.05 ± 39.43	452.41 ± 37.80	71.04 ± 17.31	13.60
M + E + S 组	实验前	463.57 ± 34.66	395.63 ± 15.75	57.24 ± 16.65	12.30
	实验后	459.71 ± 33.08	427.87 ± 32.64	32.19 ± 7.75	7.20

注:T:实验后与实验前比较, $P < 0.05$;b:与 M 组比较, $P < 0.05$

在实验开始时,各组之间的全身或股骨 BMC、BMD 不存在显著性差异(表 2)。经过 9 周实验,5 组的全身或股骨的 BMC、BMD 较实验开始时均显著

增加($P < 0.05$)。相比 C 组,M 组的全身 BMC、股骨 BMC、BMD 密度均显著下降($P < 0.05$);相比 M 组和 C 组,Scl-Ab 组的全身和股骨的 BMC、BMD 均

显著升高 ($P < 0.05$); 相比 M 组和 S 组, 运动组的 BMC 和 BMD 未出现升高。与 M 组相比, 发现运动干预可以使 M + E 组的全身 BMC 出现显著下降 ($P < 0.05$), 可能与 M + E 组的体重脂肪量显著下降有关。

表 2 不同组大鼠骨含量、骨密度变化情况 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Changes of BMD and BMC of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别		全身 BMD (g/cm ²)	股骨 BMD (g/cm ²)	全身 BMC (g)	股骨 BMC (g)
C 组	实验前	0.18 ± 0.01	0.32 ± 0.02	13.22 ± 1.67	0.42 ± 0.01
	实验后	0.19 ± 0.01 ^T	0.40 ± 0.02 ^T	17.16 ± 1.77 ^T	0.59 ± 0.01 ^T
M 组	实验前	0.18 ± 0.01	0.33 ± 0.02	13.11 ± 1.79	0.42 ± 0.01
	实验后	0.19 ± 0.01 ^T	0.37 ± 0.018 ^{Ta}	16.74 ± 2.00 ^{Ta}	0.53 ± 0.01 ^{Ta}
M + E 组	实验前	0.17 ± 0.01	0.32 ± 0.01	13.08 ± 1.70	0.42 ± 0.01
	实验后	0.20 ± 0.01 ^T	0.38 ± 0.02 ^T	15.02 ± 1.94 ^{Tb}	0.51 ± 0.01 ^T
M + S 组	实验前	0.17 ± 0.01	0.33 ± 0.02	13.30 ± 1.89	0.41 ± 0.01
	实验后	0.24 ± 0.01 ^T	0.47 ± 0.02 ^T	19.56 ± 1.88 ^{Tab}	0.67 ± 0.01 ^{Tab}
M + E + S 组	实验前	0.18 ± 0.01	0.3296 ± 0.02	13.36 ± 1.85	0.43 ± 0.01
	实验后	0.24 ± 0.01 ^T	0.4715 ± 0.02 ^T	19.10 ± 1.99 ^{Tab}	0.65 ± 0.01 ^{Tab}

注: T: 实验后与实验前比较, $P < 0.05$; a: 与 C 组比较, $P < 0.05$; b: 与 M 组比较, $P < 0.05$

3.2 骨组织形态计量学

3.2.1 骨小梁静态参数: 由表 3 可知, 经过 9 周的甲强龙治疗, M 组大鼠的远端股骨小梁的 BV/TV、Tb. N 和 Tb. Th 较 C 组显著下降 ($P < 0.05$)。通过双因素方差分析发现, 单纯性的运动和单纯性的 Scl-Ab 干预可以显著改善指标。M + E 组较 M 组出现显著升高 ($P < 0.05$), 说明单纯性的运动可以防止骨小梁的丢失; 对 M + S 组和 M 组、M + S + E 组

和 M + E 组进行独立样本 T 检验, M + S 组 (M + S + E 组) 的 BV/TV、Tb. N、Tb. Th 的水平都显著高于 M 组 (M + E 组) ($P < 0.01$), 说明单纯性的 Scl-Ab 干预可以降低骨小梁形态指标, 且影响程度更大。当运动和 Scl-Ab 交互作用, 能显著改善骨小梁指标水平 ($P < 0.01$), 较单纯性 Scl-Ab 干预组没有显著改善骨小梁参数。

表 3 硬化蛋白抗体和跑台运动对大鼠股骨远端骨小梁结构的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Effect of Scl-Ab and treadmill exercise on the trabecular of the distal femur in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	BV/TV (%)	Tb. N (1/mm)	Tb. Th (mm)	Tb. Sp (mm)	Tb. Pf (1/mm)	SMI
C 组	17.86 ± 0.93	1.64 ± 0.08	0.11 ± 0.002	0.50 ± 0.03	7.89 ± 0.53	1.87 ± 0.06
M 组	14.55 ± 0.79 ^a	1.43 ± 0.07 ^a	0.09 ± 0.003 ^a	0.54 ± 0.04	10.39 ± 0.06	1.97 ± 0.06
M + E 组	20.67 ± 1.23 ^b	1.81 ± 0.13 ^b	0.12 ± 0.017 ^b	0.51 ± 0.05	4.67 ± 0.76 ^{ab}	1.63 ± 0.06 ^{ab}
M + S 组	48.73 ± 2.55 ^{abc}	2.20 ± 0.14 ^{abc}	0.23 ± 0.005 ^{abc}	0.46 ± 0.05	-7.49 ± 1.04 ^{abc}	-0.22 ± 0.23 ^{abc}
M + S + E 组	45.27 ± 2.93 ^{abc}	2.18 ± 0.09 ^{abc}	0.21 ± 0.005 ^{abc}	0.45 ± 0.05	-4.84 ± 0.99 ^{abc}	0.37 ± 0.23 ^{abc}

注: a: 与 C 组比较, $P < 0.05$; b: 与 M 组比较, $P < 0.05$; c: 与 M + E 组比较, $P < 0.05$

3.2.2 皮质骨参数: 由表 4 可知, 甲强龙治疗或单纯性跑台运动干预大鼠时, 对股骨远端干骺端、骨皮质区和皮质孔隙率没有显著影响; 当单纯注射 Scl-Ab 时, 发现皮质骨面积增加, 皮质骨孔隙率降低。

表 4 硬化蛋白抗体和跑台运动对甲强龙干预的成年雄性大鼠股骨的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Effect of Scl-Ab and treadmill exercise on the femur of adult male rats with methylprednisolone intervention ($\bar{x} \pm s$)

组别	Ct. Po (%)	Ct. Ar (mm ²)	Ct. Th (mm)	M. Ar (mm ²)	Ct. Ar (mm ²)	I (mm ⁴)
C 组	0.80 ± 0.04	3.45 ± 0.06	0.78 ± 0.01	5.71 ± 0.41	8.28 ± 0.17	8.88 ± 0.36
M 组	0.81 ± 0.03	3.31 ± 0.08	0.76 ± 0.02	5.87 ± 0.33	7.67 ± 0.24 ^a	8.41 ± 0.63
M + E 组	0.70 ± 0.04	3.34 ± 0.08	0.75 ± 0.01	5.87 ± 0.24	7.87 ± 0.18	8.33 ± 0.56
M + S 组	0.57 ± 0.05 ^{abc}	4.98 ± 0.19 ^{abc}	0.92 ± 0.02 ^{abc}	4.66 ± 0.16 ^{abc}	9.17 ± 0.18 ^{abc}	10.35 ± 0.49 ^{abc}
M + E + S 组	0.49 ± 0.05 ^{abc}	4.01 ± 0.09 ^{abc}	0.92 ± 0.02 ^{abc}	4.80 ± 0.21 ^{abc}	9.53 ± 0.20 ^{abc}	11.37 ± 0.64 ^{abc}

注: a: 与 C 组比较, $P < 0.05$; b: 与 M 组比较, $P < 0.05$; c: 与 M + E 组比较, $P < 0.05$

对皮质骨的研究结果由表 5 可知,通过双因素方差分析发现,单纯性的运动干预对股骨中段皮质骨厚度、骨组织面积、皮质骨面积、骨髓腔面积没有显著影响。单纯性的 Scl-Ab 和交互作用时,在保持骨组织面积基本不变的情况下,使皮质骨厚度明显增加($P < 0.05$),骨髓腔面积明显下降($P < 0.05$)。

表 5 不同组大鼠皮质骨形态指标对比情况($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of histomorphometry parameters of rats among different groups ($\bar{x} \pm s$)

指标	Cor thickness (mm)	Total area (mm ²)	Marrow area (mm ²)
C 组	0.79 ± 0.10	14.62 ± 1.22	5.70 ± 0.97
M 组	0.77 ± 0.08	14.22 ± 1.11	5.89 ± 1.15
M + E 组	0.74 ± 0.08	14.03 ± 1.02	5.83 ± 1.02
M + S 组	0.92 ± 0.11 ^b	14.96 ± 1.25	4.53 ± 0.81
M + E + S 组	0.91 ± 0.10 ^b	15.27 ± 1.30	4.67 ± 0.84

注:b: 与 M 组比较, $P < 0.05$

3.2.3 骨陷窝参数:由表 6 可知,M 组的骨陷窝率显著低于其它各组($P < 0.05$)。但是不同组之间的骨陷窝密度却无显著差异,骨陷窝密度也无显著差异,均值为(33.27 ± 3.16) μm^2 。

表 7 不同组大鼠股骨中段生物力学性能评价($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Biomechanical properties of the femur in rats in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	最大载荷(N)	总载荷(N·mm)	最大应力(N·mm ²)	弹性模量(MPa)
C 组	179.8 ± 6.1	81.9 ± 6.5	176.5 ± 8.5	5835 ± 386
M 组	163.9 ± 5.8	76.2 ± 4.9	177.1 ± 8.9	6109 ± 327
M + E 组	166.7 ± 3.9	97.2 ± 8.2 ^b	170.5 ± 7.4	5719 ± 456
M + S 组	203.8 ± 9.3 ^{abc}	84.2 ± 9.3	182.4 ± 9.2	6005 ± 386
M + S + E 组	219.6 ± 9.3 ^{abc}	114.9 ± 4.3 ^{ab}	181.9 ± 8.9	5569 ± 283

注:a: 与 C 组比较, $P < 0.05$; b: 与 M 组比较, $P < 0.05$; c: 与 M + E 组比较, $P < 0.05$

3.4 骨形成和骨吸收的生化分析(表 8)

表 8 硬化蛋白抗体和运动对甲强龙干预的雄性大鼠骨转换标志物的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 8 Effect of Scl-Ab and exercise on bone turnover markers of the femur in adult male rats with methylprednisolone ($\bar{x} \pm s$)

组别	NTx(Nm BCE/L)	OC(ng/ml)
C 组	157.35 ± 9.52	61.76 ± 9.61
M 组	174.35 ± 7.44	55.37 ± 9.42
M + E 组	140.35 ± 7.46 ^b	55.50 ± 14.78
M + S 组	172.69 ± 7.65 ^c	154.98 ± 17.86 ^{abc}
M + S + E 组	162.10 ± 8.57	125.69 ± 19.82 ^{abc}

注:a: 与 C 组比较, $P < 0.05$; b: 与 M 组比较, $P < 0.05$; c: 与 M + E 组比较, $P < 0.05$

由表 8 可知,9 周后,M 组的骨形成标志物 OC

表 6 不同组大鼠骨陷窝密度和骨陷窝率($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Bone lacunae density and bone lacuna rate of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	骨陷窝密度(mm ²)	骨陷窝率(%)
C 组	630.5 ± 78.2	53.3 ± 12.1
M 组	627.4 ± 90.6	43.3 ± 11.5 ^a
M + E 组	590.3 ± 61.4	55.3 ± 10.4
M + S 组	645.2 ± 82.1	60.7 ± 10.5
M + S + E 组	603.5 ± 56.7	55.8 ± 10.9

注:a: 与 C 组比较, $P < 0.05$

3.3 股骨的生物力学性能

由表 7 可知,与 C 组相比,只施加甲强龙干预对大鼠的生物力学参数不会产生影响,单纯性的跑台运动干预可以显著提高总载荷($P < 0.05$),但是其它载荷没有出现显著变化;单纯性的 Scl-Ab 注射,能提高最大载荷($P < 0.05$)。相比 M + S 组,M + E + S 组的骨强度未发生显著提高,但是 M + E + S 组的总载荷较 M 组和 C 组均显著提高($P < 0.05$)。各组的最大应力和弹性模量较 C 组均无显著性变化。

和骨代谢标志物 NTx 水平没有显著变化。运动干预组的 NTx 水平较 M 组出现下降,但 OC 没有变化。Scl-Ab 组的 OC 水平显著高于 M 组($P < 0.05$),但 NTx 水平保持不变。M + E + S 组的标志物水平接近 M + S 组。

3.5 免疫组织化学染色

C 组、M 组、M + E 组、M + S 组、M + S + E 组的大鼠骨细胞凋亡率分别为(15.4 ± 2.9)%、(32.5 ± 4.8)%、(22.9 ± 3.2)%、(19.3 ± 2.7)%、(23.0 ± 3.4)%,由此可见,M 组的细胞凋亡水平显著高于其它组。而经过 Scl-Ab 或运动干预后,骨细胞凋亡水平接近 C 组水平。研究发现骨细胞凋亡百分比和骨陷窝百分比之间呈中度负相关($\rho = -0.47, P = 0.03$)。

4 分析与讨论

4.1 硬化蛋白和运动对体重、骨密度的影响

在本研究中,糖皮质激素治疗会使该组样本体重增长变慢,部分样本出现骨骼肌萎缩和瘦体重下降的现象。甲强龙治疗会大鼠的体重和瘦体重较对照组较实验前出现下降。上述变化在 M 组和 C 组的脂肪量接近时,导致糖皮质激素治疗情况下体内脂肪百分比轻微增加。单纯性的运动干预没能进一步增加瘦体重,但它能减少脂肪含量,从而降低大鼠的体脂百分比。而单纯性的 Scl-Ab 干预不会影响 M 组大鼠的体重或体成分,这与 Scl-Ab 在地塞米松治疗组的研究结果类似^[9]。

笔者探讨硬化蛋白抗体和间歇跑台运动交互作用,对糖皮质激素诱导的成年雄性大鼠的影响。从单纯性的 Scl-Ab 作用、Scl-Ab 和运动与 Scl-Ab 交互作用可以看出,不仅可能防止糖皮质激素诱导对骨的不良影响,而且能提高 BMD、骨的微结构和骨强度。通过对比其他人对糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠模型的研究数据^[10-11],可以看到甲强龙组大鼠体重增速显著下降,其中是瘦体重增加下降,导致脂肪量百分比上升^[12-13]。使用甲强龙会影响大鼠骨密度和含量,这符合实验预期。分析运动方式对骨质疏松症的影响,一般认为抗阻运动^[14-16]对骨质疏松症的作用更要好,而冲击运动也有助于提高骨质量和骨密度^[17]。分析不同运动强度对骨质疏松症的影响,Kemmler^[18]认为每周 2 次以上强度运动有助于改善个体骨密度,Yamazaki 认为^[19]中等强度可以改善女性绝经后的骨代谢,曹鹏^[20]研究发现低、中强度运动可以促进老龄雌性大鼠骨密度增加。

4.2 硬化蛋白和运动对骨组织形态计量学指标的影响

本研究中,M 组大鼠的骨小梁数目减少,而股骨皮质骨的质量和强度变化并不明显。单纯性的运动作用、单纯性的 Scl-Ab 作用使得同类处置大鼠骨小梁数目、股骨厚度显著增加,表明硬化蛋白间歇跑台运动对大鼠骨小梁静态参数有促进作用。先前已经观察到糖皮质激素对骨小梁的作用要比皮质骨大^[21]。在对小鼠^[22]和临床^[23]研究过程中,对于糖皮质激素治疗后的皮质骨丢失已有报道,通过糖皮质激素的不同剂量和治疗周期长短,有助于解释其对皮质骨的影响差异。糖皮质激素对大鼠骨小梁结构参数存在着不良影响,本研究中单纯性的运动对皮质骨参数无明显影响,单纯性的 Scl-AB 对皮质骨

参数起到促进作用,两者交互作用时,也能起到促进作用,但和单纯性 Scl-Ab 相比无显著差异。

在以往的研究报道中^[24],骨陷窝面积受到糖皮质激素影响而增强,在本研究中未发现这一变化,但是 Scl-Ab 干预在糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠组别中,对骨形成表现出较强的作用,DXA 和 BMD 明显增加,骨小梁和皮质骨参数、股骨中断皮质骨的强度都在增强,股骨干骺端孔隙度降低。股骨远端骨小梁体积的增加与骨小梁数目的增加、骨小梁厚度的增加有关。基于皮质几何结果分析,Scl-Ab 介导的皮质厚度增加主要是因为骨内沉积,这与糖皮质激素治疗小鼠的研究结果类似^[21]。

4.3 硬化蛋白和运动对生物力学性能的影响

本研究表明:通过单纯性的运动惟一能显著提高的参数是总载荷。这一发现可能与运动能降低非酶糖化的骨基质,这与骨的延展性有一定联系,可能是 M + E + S 组大鼠骨膜轻微扩张的结果。有研究表明通过数月的运动,可以降低大鼠非酶交联骨基质^[25]。通过单纯性的 Scl-Ab 能提高最大载荷和刚度,说明 Scl-Ab 可以使骨的应变增强,使得骨结构稳定在一个新的水平。

4.4 硬化蛋白和运动对骨形成和吸收参数的影响

研究表明对猕猴^[26]、老年雄性大鼠^[27]和雌性大鼠^[28]使用硬化蛋白抗体,可以提高骨形成、骨密度和骨强度。对糖皮质激素诱导的骨质疏松症小鼠模型给予硬化蛋白抗体干预,小鼠的骨生物力学性能会显著提高。硬化蛋白抗体还能显著增强健康男性和绝经后妇女骨形成标志物水平^[29],用于治疗绝经后骨质疏松症的单克隆抗体目前正在临床Ⅲ期实验。运动可以延缓绝经后妇女的骨量丢失,促进骨细胞活性与骨质形成,而对降低骨质吸收的作用较弱^[30]。与其它啮齿动物的 GIOP 模型研究结果一致的是,糖皮质激素诱导的骨丢失与骨转化标志物 OC 和骨代谢标志物 NTx 的明显变化不同步^[31-32],本研究中的结果与其基本一致。单纯性的运动干预能使 NTx 下降而 OC 水平基本不变,单纯性的 Scl-Ab 可以使 OC 升高而 NTx 水平保持不变。运动和 Scl-Ab 交互作用的效果接近注射 Scl-Ab 效果。

4.5 硬化蛋白和运动对免疫组织的影响

通过实验可以发现糖皮质激素对骨细胞活性有一定影响。糖皮质激素作用的显著特征是腔隙性下降、细胞凋亡水平提高。本研究中单纯性的 Scl-Ab 作用或运动作用是抑制甲强龙的不良影响,交互作

用也表现出对骨细胞抗凋亡水平起到了抑制作用。值得注意的是这些指标之间呈显著的负相关,说明由糖皮质激素诱导的细胞凋亡水平上升伴随着骨细胞占视野面积降低。目前已有文献报道对糖皮质激素诱导骨质疏松引起细胞凋亡水平上升,应该采取不同的处理方式^[33-35]。其中利塞膦酸钠可以防止糖皮质激素治疗大鼠胫骨骨皮质腔隙性的改变^[34]。Feng 等人在 2013 年研究发现,中药淫羊藿苷通过雌激素受体激活信号调节激酶(ERK)信号通路,从而抑制糖皮质激素诱导的细胞凋亡^[35]。最近 Sato 等人的研究发现,抑制真系细胞翻译起始因子 2 α 去磷酸化,减轻内质网应激,可以防止糖皮质激素诱导的骨细胞凋亡发生^[33]。

把提高皮质骨骨量和骨强度最为最终目的,本研究的一个重要目标就是综合评价硬化蛋白抗体和运动疗法对骨骼代谢的促进作用。首先假设通过间隔运动引起的周期性机械刺激,骨细胞通过激活多种信号途径,促进对负荷诱导应激的反应^[35]。目前研究发现 Wnt β -catenin 信号通路是骨细胞的重要表达途径^[36],而 Scl-Ab 治疗也能刺激该通路信号传导^[37]。这可能是因为同化激素激活了骨细胞的反应机制,间隔运动产生了一个动态应变信号进而引发了破骨细胞的反应^[38]。这两个潜在的代谢干预手段的结合,会改变调控系统的阈值进而激活更高水平的骨形成。

5 结论

单纯性的 Scl-Ab 注射方案可以预防糖皮质激素治疗对骨量的不良影响,显著提高皮质骨骨量和骨强度。单纯性的跑台运动方案可以降低脂肪含量,并在不影响皮质骨的情况下防止骨小梁丢失。Scl-Ab 和运动之间表现出良好的协同作用,交互作用较单纯性的运动或 Scl-Ab 作用,并没有进一步引起骨参数的显著改善。硬化蛋白抗体和跑台运动对治疗糖皮质激素诱导骨质疏松症具有积极作用。

【参 考 文 献】

- [1] Van Staa TP. Use of oral corticosteroids and risk of fractures. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(6):993-1000.
- [2] Van Staa TP. The pathogenesis, epidemiology and management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 2006, 79(3):129-137.
- [3] Semenov MV, He X. LRP5 mutations linked to high bone mass diseases cause reduced LRP5 binding and inhibition by SOST. *J Biol Chem*, 2006, 281(50):38276-38284.

- [4] Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem*, 2005, 280(29):26770-26775.
- [5] Choi HY. Lrp4, a novel receptor for Dickkopf 1 and sclerostin, is expressed by osteoblasts and regulates bone growth and turnover in vivo. *PLoS One*, 2009, 4(11):7930-7931.
- [6] Lespessailles E, Prouteau S. Is there a synergy between physical exercise and drug therapies for osteoporosis? *Clin Exp Rheumatol*, 2006, 24(2):191-195.
- [7] Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bones: a tutorial. *Bone*, 1993, 14(4):595-608.
- [8] Draca N. Biomechanical properties of bones from rats treaded with sevelamer. *Coll Antropol*, 2011, 35(2):557-563.
- [9] Marenzana M. Sclerostin antibody treatment enhances bone strength but does not prevent growth retardation in young mice treated with dexamethasone. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(8):2385-2395.
- [10] Kaasik P. Ageing and dexamethasone associated sarcopenia: peculiarities of regeneration. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, 105(1):85-90.
- [11] You YH. The effect of high glucocorticoid administration and food restriction on rodent skeletal muscle mitochondrial function and protein metabolism. *PLoS One*, 2009, 4(4):5283-5284.
- [12] Shin YS. Prednisolone-induced muscle dysfunction is caused more by atrophy than by altered acetylcholine receptor expression. *Anesth Analg*, 2000, 91(2):322-328.
- [13] Freedman MR, Horwitz BA, Stern JS. Effect of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on development of obesity. *Am J Physiol*, 1986, 250(4):595-607.
- [14] 欧阳梅. 越野行走对老年人骨密度和骨代谢指标的影响. *北京体育大学学报*, 2007, 30(8):1065-1067.
- [15] OuYang M. Effect of cross country walking on bone mineral density and bone metabolism in the elderly. *Journal of Beijing Sport University*, 2007, 30(8):1065-1067. (in Chinese)
- [15] Stengel SV, Knebler W, Pintar R, et al. Power training is more effective than strength training for maintaining bone mineral density in postmenopausal women. *J Appl Physiol*, 2005, 99(1):181-188.
- [16] Rotstein A, Harush M, Vaisman N. The effect of a water exercise program on bone of postmenopausal women. *J Sports Med Phys Fitness*, 2008, 48(3):352-359.
- [17] Creighton DL, Morgan AL, Debra B, et al. Weight-bearing exercise and markers of bone turnover in female athletes. *Applied Physiology*, 2001, 90(2):565-570.
- [18] Kemmler W, Egelkek K, Lauber D, et al. Exercise effect on fitness and bone mineral density in early postmenopausal women: 12 year EFOPS result. *Med Sci Sports Exercise*, 2002, 34(12):2115-2123.
- [19] Yamazaki S, Ichimura S, Iwamoto J, et al. Effect of walking exercise on bone metabolism in postmenopausal women with osteopenia/osteoporosis. *J Bone Miner Metab*, 2004, 22(1):500-508.

- [20] 曹鹏. 不同强度跑台运动对老龄雌性大鼠骨量和骨代谢的影响. 北京体育大学学报, 2009, 32(2): 74-75.
Cao P. Effect of different intensity treadmill exercise on bone mass and bone metabolism in aged female rats. Journal of Beijing Sport University, 2009, 32(2): 74-75. (in Chinese)
- [21] Natsui K. High-dose glucocorticoid treatment induces rapid loss of trabecular bone mineral density and lean body mass. Osteoporos Int, 2006, 17(1): 105-108.
- [22] Weinstein RS. Osteoprotegerin prevents glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis in mice. Endocrinology, 2011, 152(9): 3323-3331.
- [23] Wang Y. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. J Clin Invest, 2007, 117(6): 1616-1626.
- [24] Weinstein RS. Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. J Clin Invest, 2002, 109(8): 1041-1048.
- [25] Isaksson H. Physical exercise improves properties of bone and its collagen network in growing and maturing mice. Calcif Tissue Int, 2009, 85(3): 247-256.
- [26] Ominsky MS. Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength. Bone Miner Res, 2010, 25(5): 948-959.
- [27] Li X. Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody increases bone formation, bone mass, and bone strength in aged male rats. Bone Miner Res, 2010, 25(12): 2647-2656.
- [28] Li X. Increased bone formation and bone mass induced by sclerostin antibody is not affected by pretreatment or cotreatment with alendronate in osteopenic, ovariectomized rats. Endocrinology, 2011, 152(9): 2212-2222.
- [29] Mzenszana M. Sclerostin antibody treatment enhances bone strength but does not prevent growth retardation in young mice treated with dexamethasone. Arthritis Rheum, 2011, 63(8): 2385-2395.
- [30] 乔玉成. Cochrane 评价: 绝经后妇女骨质疏松运动干预效果的比较. 中国体育科技, 2010, 6(46): 121-128.
Qiao YC. Cochrane evaluation: comparison of the effect of osteoporosis on the movement of osteoporosis in postmenopausal women. China sport science and technology, 2010 (46): 121-128. (in Chinese)
- [31] Mstuo T. Effects of vibration resistance exercise and high-protein snack on bone mass, composition, and strength in rats given glucocorticoid injections. Biosci Biotechnol Biochem, 2003, 67(12): 2518-2523.
- [32] Hofauer LC, Rauner M. Minireview: live and let die: molecular effects of glucocorticoids on bone cells. Mol Endocrinol, 2009, 23(10): 1525-1531.
- [33] Sato AY. Prevention of glucocorticoid induced-apoptosis of osteoblasts and osteocytes by protecting against endoplasmic reticulum(ER) stress in vitro and in vivo in female mice. Bone, 2014, 73(3): 60-68.
- [34] Iwamoto J. Effects of vitamin K (20) and risedronate on bone formation and resorption, osteocyte lacunar system, and porosity in the cortical bone of glucocorticoid-treated rats. Calcif Tissue Int, 2008, 83(2): 121-128.
- [35] Feng R. Icarin protects against glucocorticoid-induced osteoporosis in vitro and prevents glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis in vivo. Cell Biochem Biophys, 2013, 67(1): 189-197.
- [36] Rubin J, Rubin C, Rubin CR. Jacobs, Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. Gene, 2006, 237(2): 1-16.
- [37] Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. Osteoporos Int, 2010, 21(9): 1457-1469.
- [38] Veverka V. Characterization of the structural features and interactions of sclerostin: molecular insight a key regulator of Wnt-mediated bone formation. J Biol Chem, 2009, 284(16): 10890-10900.

(收稿日期: 2015-10-21)