

# 去势兔骨质疏松动物血清 TRAP 及 BALP 水平的观察

蔡桂英 侯 静 杨 霞 魏 玲

**摘要** 破骨细胞生成的抗酒石酸盐酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)及成骨细胞生成的骨碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase, BALP)均可分泌入血。因此,血中 TRAP 及 BALP 水平可分别反映破骨细胞及成骨细胞的功能。本文在以往工作的基础上,观察了经双侧卵巢切除法诱导五月龄新西兰纯种大白兔形成骨质疏松动物的血清 TRAP(采用对硝基酚磷酸盐法)及 BALP(热失活法)水平,结果显示:术后兔血清 TRAP 及 BALP 活性均较术前升高,TRAP 的变化先于 BALP。术后 1 月 TRAP 活性升至最高,然后逐渐降低,至术后 2.2 月左右基本降至术前水平;BALP 活性在术后 2.2 月左右升至最高,并在此水平上保持约半个月,其后很快下降,于术后 3.7 月左右基本降至手术前水平。对照兔血清 TRAP 及 BALP 活性的变化趋势基本一致。结果说明:手术去势后首先刺激破骨细胞的骨吸收作用,然后刺激成骨细胞的骨形成作用。这可能是女性绝经后头几年内骨质快速丢失的一个原因。有关骨质疏松动物模型血中 TRAP 及 BALP 变化规律的研究,目前国内外尚未见报道。本文研究结果为原发性骨质疏松的病因学、发病机理及防治药物的研究提供重要的参数。

**关键词** 去势兔 抗酒石酸盐酸性磷酸酶 骨碱性磷酸酶 骨质疏松

## Serum levels of tartrate-resistant acid phosphatase and bone alkaline phosphatase in ovariectomized rabbits with osteoporosis

Cai Guiying, Hou Jing, Yang Xia and Wei Ling

Department of Biochemistry, West China University of

Medical Sciences, Chengdu 610041, China

**Abstract** The serum levels of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and bone alkaline phosphatase (BALP) were assayed dynamically in ovariectomized rabbits with osteoporosis by the methods of p-nitrophenyl phosphate and heat-inactivation, respectively. The results indicated that the postoperative serum levels of both TRAP and BALP in bilaterally ovariectomized rabbits were higher than those prior to operation, but the change in TRAP was earlier than that in BALP. The serum level of TRAP reached highest at one month after ovariectomy, then decreased gradually and returned to the preoperative level at about 2.2 months after operation and kept unchanged in half a month, then decreased rapidly and returned to the preoperative level at 3.7 months after operation. The change tendencies of serum levels of TRAP and BALP in the control group were basically consistent. The results suggest that the change of TRAP as a sign of bone resorption occurs earlier than that of BALP as a sign of bone formation in serum of ovariectomized rabbits.

**Key words** Ovariectomized rabbits Tartrate-resistant acid phosphatase Bone alkaline phosphatase Osteoporosis

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)的发病率高,危害性大,近年来深受人们的关注,特别是对绝经后骨质疏松症的研究日益广泛与深入,其中有关骨吸收及骨形成生化标志物的研究更

是当前的热门研究课题之一。破骨细胞分泌的抗酒石酸盐酸性磷酸酶(Tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)被认为是破骨细胞功能的标志<sup>[1]</sup>。骨中生成的 TRAP 可进入血循环<sup>[2]</sup>。骨碱性磷酸酶(Bone alkaline phosphatase, BALP)由成骨细胞生成,参与骨形

成<sup>[3]</sup>,并可进入血循环<sup>[4]</sup>。因此,血中 TRAP 及 BALP 水平可分别反映破骨细胞及成骨细胞的功能。1985 年 Stepan 等人报道切除卵巢后的妇女血中 TRAP 与 BALP 之间的关系<sup>[5]</sup>。但有关骨质疏松动物模型血中 TRAP 与 BALP 的水平及其变化规律的研究,国内外均未见报道。本文旨在动态观察去势兔骨质疏松动物模型血中 TRAP 及 BALP 水平及其变化趋势,以期原发性骨质疏松症的基础与临床研究提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 动物血样:**五月龄兔经双侧卵巢切除诱发形成骨质疏松模型,在术前及术后一月开始,每半月一次经耳缘静脉取血,分离血清,低温保存备用。

**1.2 主要试剂及仪器:**对硝基酚磷酸二钠盐由德国 Merck 公司生产。对硝基酚由成都化学试剂厂生产。DG3022A 型酶标仪由国营南京电子管厂生产。UV-120-02 型分光光度计由日本岛津生产。TB-85 型超级恒温水浴箱(温波+

0.1℃)由日本岛津生产。

**1.3 方法:**TRAP 活性的测定采用 K-HW Lau 等的方法<sup>[6]</sup>,以 37℃,pH5.5,在 80mmol/L 酒石酸钠存在下,每分钟催化生成 1 $\mu$ mol 对硝基酚的酶量为一个酶活性单位(U)。BALP 活性的测定采用热失活法<sup>[7]</sup>,以 37℃,pH9.8,每分钟催化生成 1 $\mu$ mol 对硝基酚的酶量为一个酶活性单位(U)。

## 2 结果

**2.1 血清 TRAP 及 BALP 标准曲线(见图 1 及图 2)**

TRAP 活性测定的批内变异系数为 4.8% (n=8),批间变异系数为 9.8% (n=23);BALP 活性测定的批内变异系数为 2.3% (n=4),批间变异系数为 8.4% (n=11)。

**2.2 去势兔血清 TRAP 活性(表 1)**

**2.3 去势兔血清 BALP 活性(表 2)**

**2.4 去势兔血清 TRAP 与 BALP 活性变化趋势比较(表 3 及图 3)**

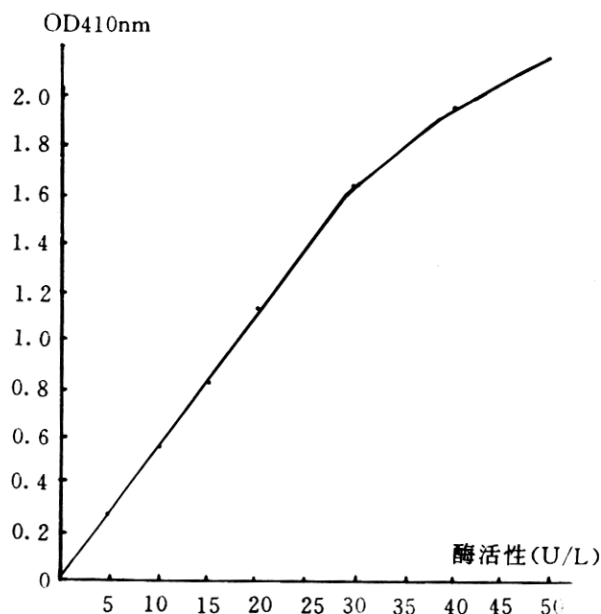


图 1 血清 TRAP 活性测定标准曲线

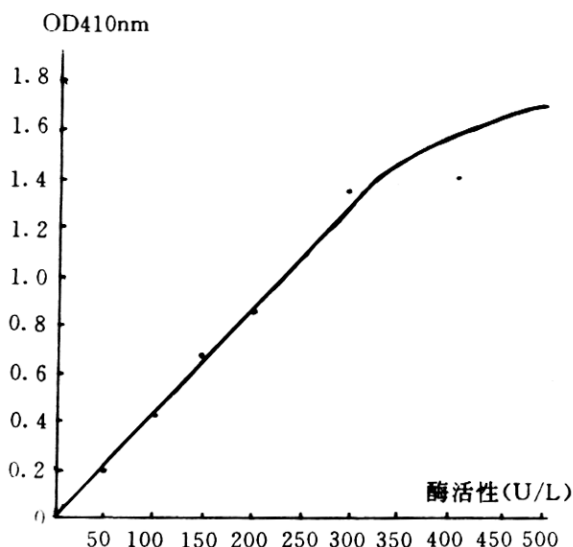


图 2 血清 BALP 活性测定标准曲线

表 去势兔血清 TRAP 活性(U/L)

| 组别           | 术前       | 术 后 (月)  |          |          |          |          |          |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|              |          | 1        | 1.5      | 2.2      | 2.7      | 3.2      | 3.7      |
| 手术组<br>(n=3) | 16.6±5.1 | 20.3±4.2 | 20.2±6.3 | 16.1±3.3 | 18.6±5.0 | 16.7±2.0 | 17.4±4.9 |
| 对照组<br>(n=4) | 19.6±1.1 | 18.6±5.2 | 20.8±1.1 | 16.6±3.2 | 16.2±4.0 | 15.1±3.3 | 18.5±3.4 |

表 去势兔血清 BALP 活性(U/L)

| 组别           | 术前       | 术 后 (月)  |           |           |           |           |          |
|--------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
|              |          | 1        | 1.5       | 2.2       | 2.7       | 3.2       | 3.7      |
| 手术组<br>(n=3) | 13.5±5.6 | 14.8±4.0 | 19.2±10.7 | 20.2±11.5 | 20.4±4.3  | 17.9±10.3 | 13.9±8.7 |
| 对照组<br>(n=4) | 32.0±8.6 | 30.6±6.1 | 33.5±17.2 | 21.5±14.0 | 20.2±13.3 | 18.4±12.7 | 10.3±9.1 |

表 去势兔血清 TRAP 与 BALP 活性变化趋势(U/L)

| 指标<br>(U/L) | 术前       | 术 后 (月)  |          |           |          |           |          |
|-------------|----------|----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
|             |          | 1        | 1.5      | 2.2       | 2.7      | 3.2       | 3.7      |
| TRAP        | 16.6±5.1 | 20.3±4.2 | 20.2±6.3 | 16.1±3.3  | 18.6±5.0 | 16.7±2.0  | 17.4±4.9 |
| BALP        | 13.5±5.6 | 14.8±4.0 | 19.2±4.0 | 20.2±11.5 | 20.4±4.3 | 17.9±10.3 | 13.9±8.7 |

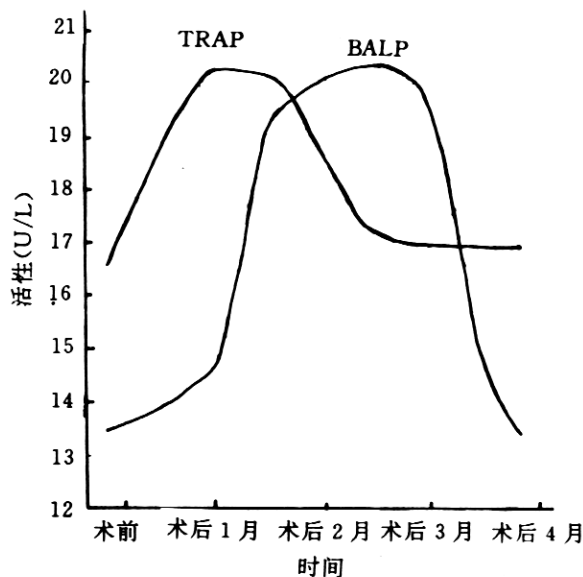


图 3 手术组去势兔血清 TRAP 与 BALP 变化趋势比较

### 3 讨论

实验选用的免于性成熟期(五月龄)手术切除卵巢,经骨密度、病理组织切片及生物力学等检查证实已形成骨质疏松动物模型<sup>[8]</sup>。由兔血清 TRAP 及 BALP 水平的观察表明,对照组的 TRAP 及 BALP 活性的变化趋势基本一致,这与 Stepan 有关正常人血中 TRAP 与 BALP 活性变化的报道<sup>[9]</sup>是相符的。而切除卵巢后的兔血中 TRAP 及 BALP 活性均较术前升高。术后 1 月血清 TRAP 活性升至最高,然后又逐渐降低,至术后 2.2 月左右,基本降至术前水平;而 BALP 活性则在术后 2.2 月左右才升至最高,至术后 3.7 月左右基本降至术前水平。结果显示,去势兔在术后血中 TRAP 的变化先于 BALP,说明雌激素的缺乏首先刺激骨吸收,然后刺激骨形成,骨吸收的变化先于骨形成。这与 Stepan 等人观察到的手术切除双侧卵巢后妇女血中 TRAP 与 BALP 的变化情况基本相

符<sup>[5]</sup>。

切除卵巢,雌激素水平急剧下降,使甲状腺滤泡旁 C 细胞对  $\text{Ca}^{2+}$  的敏感性下降,从而减少降钙素(CT)分泌;由于肾  $1-\alpha$  羟化酶活性降低,使  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  合成障碍,继之使肠钙吸收减少,血钙下降,刺激甲状旁腺素(PTH)合成增加<sup>[10]</sup>;促进破骨细胞的刺激因子,如白介素-6 表达增加<sup>[11]</sup>。以上这些因素都可刺激破骨细胞的增多,并使其存活期延长,破骨细胞活性增强,骨吸收就增加,血中 TRAP 很快升高。随后,由于血中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高,反馈抑制 PTH 的分泌,并刺激 CT 合成,致使骨吸收活动减弱,TRAP 活性逐渐降低。成骨细胞可分泌有丝分裂原及促基质合成的刺激因子于其周围的骨基质中,作为骨重建的自分泌调节因素发挥作用<sup>[12]</sup>。当骨吸收发生时,有丝分裂原及刺激因子从骨基质中释放,并作用于被破骨细胞作用暴露出来的前成骨细胞及成熟成骨细胞,促进增殖,使骨形成增加。在骨吸收初期,由于刺激因子等被释放量少,骨形成缓慢;随着骨吸收增加,这些因子释放增加,成骨细胞激活程度升高,骨形成速率加快,BALP 活性不断升高。由于成骨细胞被激活,使新的骨质生成,又将成骨细胞包埋,继而钙化,成骨作用终止,成骨细胞转化为骨细胞,此时 BALP 活性很快下降。

实验结果说明,雌激素缺乏,首先影响破骨细胞,使其活性上升,继之促进成骨细胞活性升高,这可能是女性绝经后头几年内骨代谢增强,骨质丢失速率加快的原因。

### 参 考 文 献

- 1 Andersson GN, Marks Jr SC. Tartrate-resistant acid ATPase as a cytochemical marker for osteoclasts. J His-

- tochem Cytochem, 1989, 37: 113.
- 2 Li CY, Chuda RA, Lam WKW, et al. Acid phosphatase in human plasma. J Lab Clin Med, 1973, 82: 446.
- 3 Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol, 1990, 143: 420.
- 4 Low MG, Huang KS. Factors affecting the ability of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D to degrade the membrane anchors of cell surface proteins. Biochem J, 1991, 279: 483.
- 5 Stepan JJ, Pospichal J, Schreiber V, et al. The application of plasma tartrate-resistant acid phosphatase to assess changes in bone resorption in response to artificial menopause and its treatment with estrogen or norethisterone. Calcif Tissue Int, 1989, 45(5): 273.
- 6 Lau K-HW, Onishi T, Wergedal JE, et al. Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum: potential use to assess bone resorption. Clin Chem, 1987, 33(4): 458.
- 7 Moss DW, Whitby LG. A simplified heat inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. Clin Chim Acta, 1975, 61: 63.
- 8 杨霞, 蔡桂英, 侯静, 等. 去势兔骨质疏松动物模型建立的初探. 生物医学工程杂志, 1997, 等发表.
- 9 Stepan JJ, Tesarova A, Havranek T, et al. Age and sex dependency of the biochemical indices of bone remodeling. Clin Chim Acta, 1985, 151: 273.
- 10 Ledger GA, Burritt MF, Kao PC, et al. Abnormalities of parathyroid hormone secretion in elderly women that are reversible by short term therapy with  $1,25$ -dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$ . J Clin Endocrinol Metab, 1994, 79: 211.
- 11 Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, et al. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. Science, 1992, 257: 88.
- 12 Huffer WE. Morphology and biochemistry of bone remodeling: possible control by vitamin D, parathyroid hormone and other substances. Lab Invest, 1988, 59(4): 418.