

· 基础研究 ·

甲基睾丸素、钙剂对损毁弓状核老年大鼠骨丢失的干预研究

杨家荣¹ 周涛² 刘锡仪³

摘要 目的:观察甲基睾丸素、钙剂对新生期损毁弓状核老年雄性大鼠的第三腰椎、股骨的体积骨密度、性激素水平及胫骨干骺端微结构变化的影响。方法:选用 18 只新生期雄性 SD 大鼠,按体重随机分成损毁弓状核老年大鼠组(MA)、自然衰老大鼠组(NA)、损毁 ARC 老年大鼠治疗组(MT),同等条件下饲养至 820 日龄,处死大鼠收集血清行 T 和 E₂ 放免检测,取左侧胫骨干骺端行骨组织切片及组织形态计量学分析等。结果:MA 组大鼠 L3、股骨的体积骨密度均下降,T 和 E₂ 水平显著下降,与 NA 组比较差异有显著性意义($P<0.05$)。与 MA 组比较,MT 组大鼠 L3、股骨的体积骨密度、T 和 E₂ 水平明显增加,胫骨干骺端 %Tb.Ar、Tb.N、Tb.Th 明显增加。结论:损毁弓状核的老年雄性大鼠骨丢失加速,提示下丘脑弓状核参与骨质疏松形成的调控,应用甲基睾丸素、钙剂可以阻止损毁弓状核老年大鼠骨丢失的发生。

关键词 左旋谷氨酸单钠;下丘脑弓状核;骨代谢;骨质疏松;甲基睾丸素;碳酸钙

中图分类号:R493,R681 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-07-0602-03

Intervention of methyl testosterone and calcium carbonate on bone loss in elderly rats treated with MSG neonatally/YANG Jiarong,ZHOU Tao,LIU Xiyi,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21 (7):602—604

Abstract **Objective:**To study the changes in bone mineral density(BMD) of femur, third lumbar vertebrae,and bone microstructure in pretibia metaphysis in neonatally MSG-treated male aged rats with methyl testosterone and calcium carbonate.**Method:**Eighteen newborn SD rats were randomly divided into control group,model group and treatment group. After surviving 820 days,the rats were killed and examined the changes of markers.**Result:**Compared with control group, the level of serum T and E₂ in model group decreased significantly. The bone mineral density of femur and third lumbar vertebrae decreased evidently. Compared with model group, the level of serum T and E₂ in treatment group increased significantly. The bone mineral density of femur and third lumbar vertebrae increased evidently, and the %Tb.Ar, Tb.N and Tb.Th of proximal tibial metaphysis (PTM) were significantly increased. **Conclusion:** The cause of accelerated bone loss in neonatally MSG-treated male aged rats attributes to the lesions of ARC,which suggests that the ARC participates in the regulation and control of bone metabolism.Methyl testosterone and calcium carbonate can prevent the bone loss in neonatally MSG-treated male aged rats.

Author's address Dept. of Pharmacology to Tianjin First Central Hospital,Tianjin,300192

Key words monosodium L-glutamate;hypothalamus arcuate nucleus;bone metabolism;osteoporosis;Methyl testosterone;calcium carbonate

由于女性骨质疏松发病率远高于男性,且骨质疏松后骨折的发生率也比男性为高,故以往对男性骨质疏松的重视远不及女性患者。雌激素在妇女绝经后骨质疏松症发病机制中的作用,以及雌激素替代治疗可有效地防治骨质疏松症正被人们逐渐认识和肯定。而男性骨质疏松的研究起步较晚,其发病机制还不十分清楚,治疗上也缺乏公认有效的方法。研究表明,新生期大鼠注射谷氨酸单钠(monosodium L-glutamate,MSG)100 天后导致骨质疏松,提示下丘脑弓状核(hypothalamus arcuate nucleus,ARC)参与骨骼生长、发育的调控。本文利用新生期注射

MSG 制作损毁 ARC 老年大鼠的动物模型,观察研究甲睾酮、钙剂对损毁 ARC 老年雄性大鼠骨代谢、骨丢失的影响,为男性骨质疏松的防治提供思路 and 理论依据。

1 材料与方法

1 天津市第一中心医院药剂科,300192

2 天津中医学院生理教研室

3 广东医学院生理教研室

作者简介:杨家荣,女,副主任药师

收稿日期:2005-09-26

1.1 实验动物及分组

新生雄性 SD 大鼠 18 只(广东医学院实验动物中心提供), 采用同窝对照的方法按体重随机分为损毁 ARC 老年大鼠组(MA, n=6)、自然衰老大鼠组(NA, n=6)、损毁 ARC 老年大鼠治疗组(MT, n=6)。MA 组与 MT 组大鼠在出生后第 1、3、5、7、9 天颈部皮下注射 10% 谷氨酸单钠(购自上海化学试剂公司, 4g/kg), 共 5 次; NA 组同法皮下注射等体积的生理盐水。每次注射后 MSG 组和对照组大鼠均放回原窝, 由原母鼠哺乳。

1.2 动物饲养及处理

24 天断奶, 在完全相同的条件下饲养至 700 日龄时, MA 组与 NA 组大鼠给予生理盐水, 按 0.6ml/100g·d 灌胃, 820 日龄处死取材, MT 组大鼠给予甲睾酮(12μg/100g·d)和碳酸钙(0.833g/100g·d), 所有药物均配成混悬液, 按 0.6ml/100g·d 灌胃, 820 日龄处死取材, 取血清, 脑、右侧股骨、胫骨及第三腰椎, 放入 10% 的福尔马林液中固定。

1.3 检测指标及方法

取下丘脑作石蜡冠状切片, 厚度为 4μm, HE 染色后光镜下(40×10)观察, 在弓状核-正中隆起层面圈定同一范围, 利用 LEICA-Qwin 图像分析软件计算弓状核细胞数。采用放射免疫分析法测定血清雌二醇(E2)、睾酮(T)的水平。取右侧股骨、第三腰椎置于 1/10 万电子天平上称骨湿重/100g 体重, 110℃ 下烤至恒重后称骨干重/100g 体重, 并计算体积骨密度(干重/骨体积)。右侧胫骨上 1/3 段经脱钙、脱水、透明、石蜡包埋, 矢状面连续切片, 厚度为 5μm, 行胶原特殊染色后采用半自动图像数字化分析仪测定骨小梁面积百分数(%Tb.Ar)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)和骨小梁分离度(Tb.Sp), 将上 1/3 段胫骨的 HE 染色片在高倍视野下(40×10)进行破骨细胞记数。

1.4 统计学分析

测量数据使用 SPSS10.0 统计软件进行统计学处理, 先行方差齐性检验, 方差齐者使用 *t* 检验, 方差不齐的经变量转换后使用 *t* 检验或直接使用非参数检验。

2 结果

2.1 老年大鼠 ARC 细胞计数

ARC 细胞计数, NA 组 50.2±6.5, MA 组 13.0±2.0, MT 组 13.2±3.7。与 NA 组比较, MA 组大鼠 ARC 区域内神经细胞数明显减少, 差异有非常显著性意义($P<0.01$), 损毁程度达 70%—80% (图 1—3, 见后置彩色插页 1)。

2.2 老年雄性大鼠骨重、体积骨密度的改变

见表 1。MA 组大鼠股骨及第三腰椎的湿重、干重、体积骨密度较 NA 组明显为低, 治疗后 MT 组大鼠股骨及第三腰椎的湿重、干重及体积骨密度较 MA 组明显升高, 差异有显著性意义($P<0.05$), 骨干重、体积骨密度基本恢复到 NA 组水平。

2.3 老年大鼠胫骨干骺端松质骨的变化

见表 2。MA 组大鼠胫骨干骺端松质骨的 %Tb.Ar、Tb.N、Tb.Th 显著低于 NA 组 ($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$), 而 Tb.Sp 显著高于 NA 组 ($P<0.05$)。治疗后 MT 组大鼠的 %Tb.Ar、Tb.N、Tb.Th 显著高于 MA 组 (P 均 <0.05), 而 Tb.Sp 显著低于 MA 组 ($P<0.05$)。光镜下观察(图 4—6, 见后置彩色插页 1), 与 MA 组比较, MT 组大鼠骨小梁数量增加、明显变厚; 骨髓腔中平均每个高倍镜视野中的破骨细胞数明显减少, 差异有显著性意义($P<0.05$)。

2.4 老年雄性大鼠血清中性激素水平的改变

见表 3。MA 组大鼠血清中睾酮、雌二醇的水平明显低于 NA 组 (P 均 <0.01)。治疗后 MT 组大鼠血清中睾酮、雌二醇的水平明显升高, 与 MA 组相比,

表 1 治疗前后各组老年大鼠股骨和第三腰椎的骨重、体积骨密度的比较

($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	股骨			第三腰椎		
		湿重(g/100g)	干重(g/100g)	骨密度(g/ml)	湿重(g/100g)	干重(g/100g)	骨密度(g/ml)
NA 组	6	0.232±0.021	0.141±0.009	1.365±0.132	0.047±0.008	0.0255±0.0045	0.889±0.086
MA 组	6	0.163±0.022 ^①	0.102±0.016 ^①	1.008±0.082 ^②	0.033±0.008 ^①	0.0174±0.0028 ^②	0.757±0.12 ^①
MT 组	6	0.201±0.020 ^③	0.138±0.016 ^④	1.228±0.141 ^④	0.046±0.006 ^③	0.0255±0.0038 ^④	0.991±0.047 ^④

MA 组与 NA 组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$; 与 MT 组比较: ③ $P<0.05$, ④ $P<0.01$

表 2 治疗前后各组大鼠胫骨干骺端骨组织形态计量学参数及破骨细胞计数的比较

($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	%Tb.Ar	Tb.Th	Tb.N	Tb.Sp	破骨细胞数
NA 组	6	13.195±1.659	77.806±12.382	2.579±0.573	328.055±62.098	5.209±1.264
MA 组	6	8.485±1.046 ^②	59.167±11.920 ^①	1.688±0.239 ^①	441.484±71.153 ^①	6.834±1.413 ^②
MT 组	6	10.752±1.340 ^③	70.834±4.543 ^③	1.966±0.190 ^③	362.655±51.585 ^③	6.429±1.129 ^③

MA 组与 NA 组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$; ③与 MT 组比较 $P<0.05$

表 3 治疗前后各组老年大鼠性激素水平的改变 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	E ₂ (pg/ml)	T(ng/dl)
NA 组	6	6.31±1.61	53.44±17.36
MA 组	6	3.04±0.78 ^①	18.22±4.77 ^①
MT 组	6	4.15±0.41 ^②	30.06±9.45 ^②

①与 NA 组比较 $P < 0.01$; ②与 MT 组比较 $P < 0.05$

差异有显著性意义 (P 均 < 0.05)。

3 讨论

谷氨酸单钠是一种神经毒素, 能选择性地破坏新生期大鼠、小鼠等动物下丘脑弓状核神经胞体, 而对路过或终止于弓状核的神经纤维无明显影响。许多研究表明, 通过外周给予新生大鼠 MSG 可作为损毁 ARC 的动物模型^[1-3]。已有文献报道, 新生期大鼠给予 MSG 后可引起复杂的神经内分泌免疫功能紊乱, 因此国内外许多学者常利用 MSG 研究下丘脑与垂体及所属靶器官的关系, 探讨 ARC 对神经内分泌免疫的调控。研究发现, 损毁新生鼠弓状核后可使下丘脑-GH-IGF-I 轴功能低下^[4-5]; 下丘脑-垂体-性腺轴功能低下, 血清中 T、E₂ 水平均明显下降^[6]; 进一步发现, 新生期大鼠皮下注射 MSG 100 天后导致骨质疏松, 提示 ARC 参与骨骼生长、发育的调控^[1,3]。

雄激素既可直接刺激成骨细胞上的雄激素受体, 抑制骨髓腔中的破骨细胞的分化和生成, 并促进皮质骨内膜下成骨。又可在体内经过芳香化酶转化为雌二醇, 然后与破骨细胞内的雌激素受体结合, 从而抑制骨吸收^[7-8]。本研究中损毁 ARC 老年大鼠弓状核细胞数较同龄自然衰老大鼠减少 70%—80%, T、E₂ 水平减少, 第三腰椎、股骨骨密度降低, 胫骨干骺端大鼠 %Tb.Ar、Tb.N、Tb.Th 减少, 有显著性意义, 表明 ARC 细胞数、性激素水平、骨丢失程度关系密切, 提示 ARC 参与老年骨质疏松形成的调控。给予甲基睾丸素、碳酸钙治疗 120 天后, 可比较全面恢复骨密度及性激素水平。其中与 MA 组比较, MT 组大鼠的 %Tb.Ar 增加了 26.72%, Tb.N 增加了 16.47%, Tb.Th 增加了 19.72%, 而 Tb.Sp 减少了 17.86%, 说明

甲基睾丸素、钙剂替代治疗可以预防甚至逆转损毁 ARC 老年大鼠的骨质疏松。

近年来国外应用雄激素治疗男性骨质疏松症, 特别是对年轻性腺功能低下患者的治疗日趋普遍^[9-10], 但是对老年男性进行雄激素替代治疗的利弊尚待进一步的研究。

参考文献

- [1] 刘浩宇, 刘锡仪. 新生期大鼠注射谷氨酸单钠后导致骨质疏松 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2000, 6(4): 10—12.
- [2] Sanchis-Segura C, Aragon CM. Consequences of monosodium glutamate or goldthioglucose arcuate nucleus lesions on ethanol-induced locomotion [J]. Drug Alcohol Depend, 2002, 68(2): 189—194.
- [3] Florent Eleftheriou, Shu Takeda, Xiuyun Liu, et al. Monosodium glutamate-sensitive hypothalamic neurons contribute to the control of bone mass [J]. Endocrinology, 2003, 144: 3842—3847.
- [4] Bloch B, Ling N, Benoit R, et al. Specific depletion of immunoreactive growth hormone-releasing factor by monosodium glutamate in rat median eminence [J]. Nature, 1984, 307(5948): 272—273.
- [5] 杨佩荪, 盛树力. 谷氨酸单钠引起大鼠垂体性侏儒变化 [J]. 首都医学院学报, 1990, 11(4): 283—288.
- [6] Nemeroff CB, Lamartinieri CA, Mason GA, et al. Marked reduction in gonadal steroid hormone levels in rats treated neonatally with monosodium-L-glutamate: further evidence for disruption of hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation [J]. Neuroendocrinology, 1981, 33(5): 265—267.
- [7] Wiren K, Keenan E, Zhang X, et al. Homologous androgen receptor up-regulation in osteoblastic cells may be associated with enhanced functional androgen responsiveness [J]. Endocrinology, 1999, 140(7): 3114—3124.
- [8] Vandenput L, Boonen S, Van Herck E, et al. Evidence from the aged orchidectomized male rat model that 17 beta-estradiol is a more effective bone-sparing and anabolic agent than 5 alpha-dihydrotestosterone [J]. Bone Mine Res, 2002, 17(11): 2080—2086.
- [9] 黄洪, 朱大龙, 田成功. 十一酸睾酮对雄性骨质疏松大鼠骨代谢的影响 [J]. 中国临床康复, 2005, 9(3): 202—203.
- [10] 刘红光, 区品中, 吴波以, 等. 雌激素及雄激素对去睾丸大鼠骨质疏松形成的干预研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2003, 9(2): 97—101.

2006 年全国康复医学秋季培训班招生通知

江苏省康复医学培训中心在连续举办 28 期全国康复医学培训班的基础上, 将于 2006 年 9 月继续举办全国康复医学培训班。培训目标: 具备全面康复观念, 初步掌握康复评估和治疗技术, 并能对常见疾病开展康复治疗的康复医学人才及全国各类职业学校康复专业教师的师资培训。日期: 2006.9.13—12.13。培训费 2000 元。边远省份和贫困地区学员可部分或全部减免学费。学习期满发继续教育学分证书 (I 类学分) 及江苏康复医学培训中心结业证。各单位可以通过书面、电话或电子邮件报名。地址: 南京市珞珈路 30 号, 康复医学培训中心办公室 (611 房间) 高秋野收, 邮编: 210024。电话: 025-83318752, 电子邮件: gaoqiuye@carm.org.cn