·基础研究·

雌性大鼠过量运动的破骨作用效应观察*

郑 陆¹ 陈晓红¹ 王 超¹ 王智强¹

摘要

目的:通过雌性大鼠的长期递增负荷跑台运动,观察过量运动对骨代谢的破骨作用效应。

方法:108只3月龄雌性大鼠随机分为6组,分别进行4、9、11、13、15、17周的递增负荷运动(T₄、T₉、T₁₁、T₁₃、T₁₅、T₁₇组,每组10只大鼠),并设立同期对照组(每组8只大鼠)。以DEXA仪测定大鼠全身BMD值;以放免法测定血清雌二醇(E₂)水平;以ELISA法测定大鼠血清巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、骨保护素(OPG)等细胞因子的水平。

结果:大鼠BMD结果显示,T₄组显著高于同期对照组,T₁₅及T₁₇组显著低于同期对照组。各运动组雌激素水平呈现逐渐降低趋势,T₁₃、T₁₅、T₁₇组差异有显著性意义。血清细胞因子的结果显示,在整个运动过程中,TNF- α 明显高于对照组;OPG在运动后半程显著低于对照组;GM-CSF与对照组差异不明显。

结论:17周递增负荷训练后,大鼠出现以破骨作用占主导地位的骨代谢改变,BMD下降。

关键词 递增负荷;过量运动;骨密度;破骨细胞;细胞因子

中图分类号:R49,R873 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2011)-04-0342-05

Observation of bone resorption effect induced by over-load training in female rats/ZHENG Lu, CHEN Xiaohong, WANG Chao, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(4): 342—346

Abstract

Objective: To observe the bone resorption effect induced by over-load training in female rats.

Method: One hundred and eight 3-month-old female rats were divided into 6 groups 10 rats in each group at random to receive 4, 9, 11, 13, 15, 17 weeks progressively increasing load training on treadmill respectively. In addition, the study set corresponding control groups 8 rats in each group. Bone mineral density(BMD) was measured by dual energy x-ray absorptiometry(DEXA), estradiol(E₂) was measured by radioimmunoassay(RIA), and serum granulocyte macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF), tumor necrosis factor- α (TNF- α), osteoprotegerin(OPG) were detected by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA).

Result: In T₄(training 4 weeks) group BMD were of higher levels compared with corresponding control group, and in T₁₅ and T₁₇(training 15 and 17 weeks) groups BMD were at lower levels. E₂ showed a gradual decreasing trend, and there were significant differences in T₁₃, T₁₅ and T₁₇ groups. TNF- α concentrations increased significantly in the training period, OPG decreased in the later period, and there was no change in GM-CSF.

Conclusion: Through 17 weeks progressively increasing load training on treadmill, bone resorption played a dominant role in bone metabolism of female rats, and BMD decreased finally.

Author's address Capital Institute of Physical Education, Beijing, 100088

Key word progressively increasing load; over-load training; bone mineral density; osteoclast, cytokine

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.04.010

*基金项目:北京市教育委员会人才强教“学术创新团队”项目资助(2007)

1 首都体育学院,北京,100088

作者简介:郑陆,女,博士,教授; 收稿日期:2009-11-04

诸多研究表明,适量运动可以通过提高骨代谢水平,促进骨形成,产生健骨效应^[1]。同时,国内外许多研究发现,女运动员在大负荷运动训练后,可能出现月经周期紊乱,雌激素水平降低,骨密度(bone mineral density, BMD)下降,甚至产生应力性骨折^[2-3]。动物实验结果亦表明,大鼠在递增负荷运动训练中,逐渐出现动情周期紊乱、雌激素水平低下、全身骨密度降低等特征性表现^[4]。显然,过量运动有可能使骨代谢处于骨吸收大于骨形成的负平衡状态,导致骨量降低。但就目前已有报道的结果分析,有关过量运动致骨量降低的机制仍尚待研究。

本研究通过递增负荷运动至过量状态过程中,大鼠BMD及骨代谢相关细胞因子的测定分析,探讨过量运动中骨量降低与这些细胞因子的内在关系,以及这些因子在破骨效应中的可能作用机制,以期为阐释过量运动致骨量降低的机制提供实验依据。

1 对象与方法

1.1 实验对象

3月龄未交配的雌性SD大鼠108只,体重 $259.31 \pm 11.52\text{g}$,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。分笼饲养,自由进食、饮水,以国家标准啮齿类动物常规饲料喂养。环境温度 $18\text{—}24\text{°C}$,相对湿度 $45\%\text{—}55\%$,通风良好。

1.2 动物分组及训练方案

实验开始前所有大鼠进行一周的适应性训练,每天固定时间进行阴道脱落细胞学检查,筛选动情周期正常且能适应跑台运动的大鼠,随机分为运动及对照组。运动大鼠分为6组,每组10只,分别进行为期4、9、11、13、15、17周(T4, T9, T11, T13, T15, T17)的递增负荷运动。设立与运动组相对应的同期对照组,每组8只(C4、C9、C11、C13、C15、C17),以区分运动负荷及增龄因素对动物的影响。运动组大鼠采用杭州段氏PT2000型跑台进行训练,每周运动6d,休息1d。负荷设定参照Bedford^[5]运动负荷标准及我们前期建立的运动性动情周期紊乱动物模型的负荷标准^[6]。具体的负荷设定标准见表1。

1.3 取材

按照预设方案,行分批取材。大鼠称重,以3%

表1 大鼠运动负荷的设定

周数	运动速度(m/min)	持续时间(min)	跑台坡度(度)
1	10	20	5
2	15 18	10 20	5
3	18 20	15 15	5
4	20 22	20 20	5
5	22 25 28	20 15 15	5
6	25 28 30	20 20 30	10
7	28 30	30 40	10
8	30 32	30 40	10
9	32	30 40	10
10	35 40	30 40	10
11	38 40	30 40	10
12	40 42	30 40	10
13	43 46	30 40	10
14	43 46	30 40	10
15	43 46	30 40	10
16	43 46	30 40	10
17	43 46	30 40	10

浓度的戊巴比妥钠(美国Sigma公司)按 30mg/kg 行腹腔注射麻醉。将大鼠四肢展平置于双能X线骨密度仪床面,测量大鼠的全身骨密度。大鼠固定于解剖板上,开腹,经腹主动脉抽血处死。分离血清,置液氮保存,待测各项细胞因子指标。

1.4 指标测试

以美国GE公司生产的Lunar Prodigy型双能X线骨密度仪(dual energy X-ray absorptiometry, DEXA),enCORE(小动物分析软件-版本10.50.086)进行扫描,行大鼠BMD测定。于每日实验前以随机附带的模块对骨密度仪进行质控检测。以解放军总医院科技开发中心放免所Sn-695B型免疫计数器进行雌二醇(estradiol, E₂)测定,所用试剂为天津九鼎医学生物工程公司(S10950185)提供。采用美国Thermo公司生产的全波长扫描多功能酶标仪(Varioskan Flash),以ELISA法对各细胞因子指标进行测定。OPG试剂盒为Biomedical gruppe公司产品(BI-20602),GM-CSF为BPB Biomedicals公司产品(706215),TNF- α 为Bender medsystems公司产品(BMS622)。

1.5 统计学分析

以Excel 2003建立数据库,以SPSS 11.0软件处理,结果以均数 $\pm$ 标准差表示,以独立样本t检验对运动组及对照组大鼠的实验数据进行显著性检验, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异非常显著。

2 结果

2.1 全身BMD的变化

对照各组大鼠全身BMD随月龄增加呈上升趋势,运动各组大鼠随运动负荷的增加BMD先增加而后逐渐降低,T15、T17组均显著低于同期对照组(见表2)。

2.2 雌二醇的变化

从均值的总体变化趋势来看,对照各组E₂值基本均衡;运动各组大鼠则呈下降趋势, T13、T15、T17组均显著低于同期对照组,结果见表3。

2.3 相关细胞因子的变化

2.3.1 巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) GM-CSF在运动及同期对照组大鼠,变化趋势基本一致,但T4组低于同期对照组,T9、T15及T17组高于同期对照组,但差异均无显著性(见表4)。

2.3.2 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α) 运动组大鼠随负荷增大,TNF- α 呈现波动性显著升高。在T15、T17组均显著高于同期对照组(见表5)。

2.3.3 骨保护素(osteoprotegerin, OPG) 运动组大鼠随负荷增大,OPG呈现下降趋势,在T13、T17组均显著低于同期对照组(见表6)。

3 讨论

3.1 递增负荷运动对细胞因子的影响

表2 大鼠骨密度的变化

实验周	运动组(n=10)	对照组(n=8)	P
4	0.1728±0.0060 ^①	0.1671±0.0073	0.012
9	0.1762±0.0108	0.1758±0.0043	0.898
11	0.1808±0.0074	0.1812±0.0118	0.932
13	0.1786±0.0079	0.1840±0.0110	0.124
15	0.1734±0.0082 ^①	0.1882±0.0093	0.000
17	0.1709±0.0071 ^①	0.1812±0.0075	0.000

①与同期对照组相比P<0.01

表3 大鼠雌二醇的变化

实验周	运动组(n=10)	对照组(n=8)	P
4	6.10±1.61	5.644±1.74	0.751
9	5.62±1.35	6.50±1.53	0.253
11	5.43±1.47	6.58±1.40	0.161
13	4.59±1.17 ^①	6.89±1.98	0.005
15	2.08±0.76 ^①	5.97±3.14	0.002
17	1.98±0.84 ^①	6.90±1.65	0.000

①与同期对照组相比P<0.01

表4 大鼠血清GM-CSF的变化

实验周	运动组	运动组鼠数	对照组	对照组鼠数	P
4	126.68±71.52	10	219.69±98.98	10	0.374
9	208.89±98.19	8	139.81±77.72	7	0.677
11	146.88±93.87	7	160.86±70.89	5	0.876
13	230.41±95.05	14	247.46±78.94	13	0.892
15	414.38±73.77	8	323.36±91.75	8	0.510
17	296.10±99.79	6	246.31±64.81	10	0.757

①与同期对照组相比P<0.01

表5 大鼠血清TNF- α 的变化

实验周	运动组	运动组鼠数	对照组	对照组鼠数	P
4	5.96±0.68	10	5.74±0.765	10	0.977
9	6.14±0.83	8	5.84±0.39	7	0.205
11	5.97±2.26	7	5.89±0.69	5	0.853
13	6.22±1.59	14	5.64±0.67	13	0.180
15	6.60±0.98 ^①	8	5.72±1.26	8	0.037
17	6.15±0.76 ^①	6	5.63±0.62	10	0.040

①与同期对照组相比P<0.05

表6 大鼠血清OPG的变化

实验周	运动组	运动组鼠数	对照组	对照组鼠数	P
4	134.23±7.75	7	137.11±4.17	7	0.403
9	138.25±7.73	8	138.03±7.46	6	0.958
11	132.58±7.75	9	131.50±6.52	9	0.752
13	125.10±5.01 ^①	13	133.61±11.32	12	0.021
15	122.27±5.33	13	127.07±4.90	7	0.065
17	122.71±7.61 ^①	7	131.53±7.18	8	0.038

①与同期对照组相比P<0.05

本研究所测定的三种细胞因子均对破骨细胞具有明显的调节作用。GM-CSF主要来源于活化的T细胞、B细胞、单核-巨噬细胞、成纤维细胞和血管内皮细胞。它是破骨细胞增殖分化的必要条件,主要作用是刺激骨髓中始祖细胞分化成熟,形成破骨细胞^[7]。TNF- α 是TNF家族的重要成员之一,主要由单核-巨噬细胞分泌,不仅可以抑制骨形成,还可以直接或通过刺激基质细胞内破骨细胞前体的增殖而促进破骨细胞形成^[8]。此外,TNF- α 还作用于成骨细胞诱导IL-6、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage-colony stimulating factor, M-CSF)和GM-CSF的产生,间接地激活破骨细胞,并抑制破骨细胞的凋亡。而GM-CSF、IFN- γ 、M-CSF等细胞因子对单核细胞-巨噬细胞产生TNF- α 具有刺激作用^[9-10]。OPG在体内多种组织细胞均有表达,骨组织中主要表达于成骨细胞/骨髓基质细胞。机体OPG水平对于破骨细胞的分化及功能活性具有负性调节作用^[11],这种作用通过骨代谢调节轴得以

体现。OPG通过与RANK竞争性结合RANKL,阻断RANKL的骨吸收信号传递,因此又被称为破骨细胞生成抑制因子^[9]。

本研究中所测三种细胞因子对递增负荷运动刺激的反应不尽相同。当机体处于适量运动负荷刺激状态下(约为运动11周及之前),表现为GM-CSF、TNF- α 和OPG水平与同期对照组无显著差异;而当负荷的持续递增超过机体的承载能力时,则表现为TNF- α 水平的升高及OPG水平的降低,而GM-CSF无显著改变。如前所述,这些细胞因子水平可以反映机体骨代谢过程中破骨效应的变化,结果提示,本研究中运动11周之后各组大鼠骨代谢可能表现为破骨效应明显强于对照组。但是,整个运动过程运动各组大鼠GM-CSF未见明显改变,确切原因有待查证。另外,本研究发现,TNF- α 在T15组出现显著降低,其水平变化滞后于OPG。提示,就对过量运动负荷的反应程度而言,相比TNF- α 和GM-CSF,OPG可能更为敏感。

3.2 递增负荷运动对BMD的影响

骨量评价的金标准——BMD作为诊断骨质疏松和临床用药的依据,一直得到广泛认可和应用。机体骨量的维持是以成骨和破骨作用的平衡为前提的,当各种因素综合作用下,成骨或破骨作用占主导地位,则可表现为骨量增加或降低的效应。从本研究各组大鼠BMD的均值可以看出,对照各组BMD随年龄增长呈上升趋势,说明本研究中3月龄大鼠的骨量尚未达到峰值,其BMD随增龄而增加。有报道认为雌性大鼠在7—10月龄BMD逐渐达到峰值^[12-13],这亦与本研究在对照C15组(约7月龄)BMD达最大的结果相吻合。进一步的分析发现,T4-11组大鼠BMD虽有所增加,但与同期对照组无显著性差异。由于实验所用大鼠处于生长发育期,其BMD的升高可能系增龄和运动负荷综合作用的结果。这或许意味着前11周的运动负荷对骨组织而言相对较低,对骨代谢的刺激效果较弱;另一种可能的解释是,骨的重建过程耗时较长,因而相对缓慢,9周的运动训练尚不足以引起骨量的显著改变。

随着运动负荷的加大及运动时间的加长,运动11周后各组大鼠的BMD呈现下降趋势,至T15、T17组与同期对照组差异非常显著($P<0.01$)。据现有资

料及我们的研究分析,导致BMD降低的原因可能与下述因素有关:①机械力的直接刺激:当大鼠承载的负荷过大、负荷时间过长时,机体通过启动破骨过程,导致骨小梁数目、厚度及体积均变小,骨小梁分离度大幅增加,因而松质骨骨量降低,骨结构出现微损伤^[14],这在我们的平行实验中已得到证实(将另文说明)。②持续高强度运动影响和抑制了下丘脑-垂体-卵巢(hypothalamus-pituitary-ovarian, HPO)轴功能,而持续的低雌性激素状态,干扰了正常的骨代谢^[15]。③机体雌激素水平的持续低下,诱导骨代谢相关细胞因子,特别是骨代谢调节轴为核心的相应变化。最终通过调控破骨细胞的分化、成熟及功能活性,实现其骨吸收效应^[9,16]。

3.3 低雌激素状态下细胞因子与BMD降低的关系

众所周知,骨量的高低是机体骨代谢水平的反映,是成骨与破骨作用平衡的结果。而雌激素是调节骨形成和骨吸收的重要因素之一。本研究中,对照各组间 E_2 值基本持平,说明此批大鼠在整个实验期间,性腺轴功能正常,可以排除由于老化、性腺轴功能低下,可能对实验结果产生的影响。运动各组大鼠随着训练负荷的增加及训练时间的延长,雌激素水平持续下降,并在训练结束时的T17组达最低。雌激素对骨的调节作用一方面是通过与雌激素受体结合发挥作用^[17],另一方面,就是通过各种细胞因子等局部因素发挥其骨代谢调节作用。Pacifici等^[18]发现,切除卵巢的患者体内TNF- α 和GM-CSF水平升高,与此同时,尿中反映骨吸收的指标羟脯氨酸/肌酐、钙/肌酐亦明显上升;接受雌激素治疗4周后TNF- α 和GM-CSF逐渐降低,骨吸收指标亦同步降低。此外,雌激素还可促进OPG的表达,其可以拮抗破骨细胞前体细胞上RANK与其配体RANKL的结合,阻断破骨细胞前体细胞分化、成熟,从而抑制骨吸收^[19]。这些研究均表明,雌激素水平的维持是抑制破骨作用的重要因素。由于本研究大鼠在递增负荷运动过程中,HPO轴功能受抑,至运动13周组始呈现低雌激素状态,因而,机体可以通过调控TNF- α 和OPG对破骨细胞的调节作用,在破骨细胞分化、活化、成熟等各个时期发挥作用。另据报道,TNF- α 不仅通过促进RANKL的表达促进破骨细胞的分化成熟,而且通过非RANKL依赖途径直接诱导

骨髓单核巨噬细胞分化为破骨细胞^[20]。因此, TNF- α 不仅通过直接促进破骨细胞的增殖和功能, 还通过上调RANKL的表达, 提高破骨细胞的数量和功能活性。可见, 雌激素水平低下时, TNF- α 、GM-CSF及OPG均作为重要的骨代谢偶联调节因子参与对机体骨代谢的调控。因而, 其水平的变化在一定程度上能够反映个体当前骨代谢的总体状况。

4 结论

本研究中, 雌性大鼠在递增负荷运动下, 血清TNF- α 出现显著增高, 它可通过促进破骨细胞功能和活性影响骨代谢; 而OPG作为具有骨保护作用的破骨细胞抑制因子, 出现明显下降; 与此同时, 大鼠全身骨密度出现相应的下降。表明持续递增负荷运动造成大鼠机体的过度负荷状态后, 机体骨代谢以破骨作用占主导地位, 因而BMD下降。

参考文献

[1] Hind K, Burrows M. Weight-bearing exercise and bone mineral accrual in children and adolescents: a review of controlled trials[J]. Bone, 2007, 40(1): 14—27.

[2] Nichols JF, Rauh MJ, Barrack MT, et al. Bone mineral density in female high school athletes: interactions of menstrual function and type of mechanical loading[J]. Bone, 2007, 41(3): 371—377.

[3] Joy EA, Campbell D. Stress fractures in the female athlete[J]. Curr Sports Med Rep, 2005, 4(6): 323—328.

[4] 陈晓红, 郑陆, 王智强. 过度运动致骨量降低动物模型的建立[J]. 中国运动医学杂志, 2009, 28(6): 667—671.

[5] Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures[J]. J Appl Physiol, 1979, 47(6): 1278—1283.

[6] 郑陆, 潘力平, 隋波, 等. 运动性动情周期紊乱动物模型的建立[J]. 山东体育学院学报, 2005, 21(2): 46—49.

[7] Park BK, Zhang H, Zeng Q, et al. NF- κ B in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF[J]. Nat Med, 2007, 13(1): 62—

69.

[8] Suda T, Kobayashi K, Jimi E, et al. The molecular basis of osteoclast differentiation and activation[J]. Novartis Found Symp, 2001, 232: 235—247; discussion 247—250.

[9] 陈晓红, 郑陆. 运动、骨代谢、细胞因子研究进展[J]. 中国运动医学杂志, 2008, 27(6): 784—788.

[10] Hughes DE, Jilka RL, Manolagas S, et al. Sex steroids promote osteoclast apoptosis in vitro and in vivo[J]. J Bone Miner Res, 1995, 10 (abstract 48): S150.

[11] 叶超群, 纪树荣, 张凡, 等. 脊髓损伤继发骨质疏松大鼠骨髓基质细胞OPG、RANKL基因表达特点[J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(9): 782—785.

[12] Jee WS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis[J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2001, 1(3): 193—207.

[13] 贾经汉, 邱新建, 陈志坚. 骨质疏松动物模型的研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(8): 765—768.

[14] Bourrin S, Genty C, Palle S, et al. Adverse effects of strenuous exercise: a densitometric and histomorphometric study in the rat[J]. J Appl Physiol, 1994, 76(5): 1999—2005.

[15] 高丽, 郑陆, 李晓霞, 等. 运动性动情周期抑制雌性大鼠骨变化的实验研究[J]. 山东体育学院学报, 2005, 39(11): 58—62.

[16] West SL, Scheid JL, De Souza MJ. The effect of exercise and estrogen on osteoprotegerin in premenopausal women[J]. Bone, 2009, 44(1): 137—144.

[17] 郑陆, 潘力平, 高丽. 递增负荷运动及恢复过程中大鼠雌激素受体 mRNA 表达的变化及其意义[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(7): 592—595.

[18] Pacifici R, Brown C, Puschek E, et al. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(12): 5134—5138.

[19] Liang L, Yu JF, Wang Y, et al. Estrogen regulates expression of osteoprotegerin and RANKL in human periodontal ligament cells through estrogen receptor beta[J]. J Periodontol, 2008, 79(9): 1745—1751.

[20] Rossa C, Ehmann K, Liu M, et al. MKK3/6-p38 MAPK signaling is required for IL-1 β and TNF- α -induced RANKL expression in bone marrow stromal cells[J]. J Interferon Cytokine Res, 2006, 26(10): 719—729.