

· 论 著 ·

降钙素对去卵巢大鼠椎间盘退变的影响

王文雅¹, 张 柳^{2△}, 王哲彦¹, 苗家园², 程 潭², 田发明²

(河北联合大学: 1. 病理教研室; 2. 附属医院骨科, 河北唐山 063000)

摘要:目的 探讨降钙素对去卵巢大鼠椎间盘退变的治疗作用及其作用机制。方法 选择 3 月龄健康 1 级大鼠(Sprague Dawley, SD)50 只, 随机分为 5 组, 每组 10 只, Sham8 组和 Sham20 组大鼠暴露卵巢但不切除。给予等剂量生理盐水皮下注射, 分别于 8、20 周后脱颈处死取椎体。OVX8 组和 OVX20 组手术切除卵巢后 3 d 内, 每日 1 次肌注青霉素 20 万 U/只, 8、20 周处死取椎体。降钙素组切除卵巢后 8 周开始给予 20 IU/kg 降钙素隔日皮下注射, 20 周处死取椎体。对椎体及椎间盘分别进行骨密度检测、苏木素-伊红(HE)染色及甲苯氨蓝染色, II 型胶原(COL II)免疫组化检测。结果 (1)OVX8 组与 Sham8 组比较, 蛋白多糖含量降低, 脊索细胞减少; OVX20 组椎间盘退变进一步加剧, 降钙素组椎间盘退变程度较 OVX20 组明显改善。(2)同时点 OVX 组与 Sham 组比较, 骨密度均显著降低; 降钙素组与 OVX20 组比较, 骨密度显著增加。(3)同时点 OVX 组 COL II 表达显著低于 Sham 组; 降钙素组的 COL II 表达则显著高于 OVX20 组。结论 降钙素能减轻去卵巢大鼠椎间盘的退变, 其机制可能与维持椎体骨量, 抑制 COL II 和蛋白多糖降解有关。

关键词: 卵巢切除术; 椎间盘; 免疫组织化学; 降钙素

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.26.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)26-2608-03

Effects of calcitonin on intervertebral disc degeneration in ovariectomized rats

Wang Wenyang¹, Zhang Liu^{2△}, Wang Zheyang¹, Miao Jiayuan², Cheng Tan², Tian Faming²

(1. Department of Pathology; 2. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of North China

Coal Medical College, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanism of calcitonin on disc degeneration in the ovariectomized rats.

Methods Fifty 3-month-old female Sprague-Dawley rats were randomly divided into 5 groups of 10 animals each: OVX group of 8 weeks (OVX8 group), Sham group of 8 weeks (Sham8 group), OVX group of 20 weeks (OVX20 group), Sham group of 20 weeks (Sham 20 group), and OVX of 20 weeks with Calcitonin treatment group (Calcitonin group). Rats in Calcitonin group received subcutaneous injection of salmon calcitonin (20 IU/kg) on alternate days for 12 weeks. Rats were sacrificed 8 weeks (Sham8 and OVX8 groups) or 20 weeks (OVX20 group, Sham 20 group, CT group) after ovariectomy/Sham operation. Vertebrae and intervertebral disc were harvested for BMD assessment, HE staining, toluidin blue staining, and immunohistochemical staining for collagen. **Results** (1) Compared to Sham group, rats in OVX Group showed obvious intervertebral disc degeneration with lower content of proteoglycans and fewer nucleus pulposus notochord cells, Calcitonin showed a curative effect on intervertebral disc degeneration. (2) Compared to Sham group, OVX Group showed significantly lower BMD of L4~5 vertebrae, CT treatment markedly increased BMD of L4~5 vertebrae compared to OVX 20 group. (3) Compared to Sham group, COL II expression in cartilage endplate, annulus fibrosus, nucleus pulposus notochord cells of OVX group were significantly lower, while Calcitonin treatment could upregulate COL II expression compared to OVX20 group. **Conclusion** LVD occurs in the OVX rats, Calcitonin treatment (20 IU/kg) on alternate days for 12 weeks could prevent intervertebral disc degeneration in OVX rats, probably from maintaining bone mass of vertebrae and inhibiting the degradation of COL II and proteoglycans in intervertebral disc.

Key words: ovariectomy; intervertebral disc; immunohistochemistry; calcitonin

骨关节退变(osteoarthritis, OA)和骨质疏松症(osteoporosis, OP)是中老年人群特别是绝经后女性的常见疾病。有研究表明, 绝经后 OP 患者脊柱易于发生退变^[1-2], 去卵巢大鼠在骨量减少的同时发生腰椎间盘退变^[3-4]。当椎间盘发生退变时, I 型胶原(collagen type I, COL I)含量逐渐增加, 髓核中 II 型胶原(collagen type II, COL II)的含量减少并出现 COL I, 此改变与椎间盘退变程度呈正相关^[5]。降钙素(calcitonin)是一种公认的抗骨吸收剂, 长期以来一直被用来治疗骨质疏松^[6]。有研究证实, CT 可以延缓去卵巢大鼠腰椎间盘的退变^[4], 但具体的分子作用机制尚未明确。现将降钙素对去卵巢大鼠的疗效报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组 选择 3 月龄健康 1 级大鼠(Sprague Dawley, SD)50 只(北京大学医学部实验动物中心), 体质量(210±32)g。随机分为 5 组, 每组 10 只, Sham8 组、Sham20 组分别为假手术 8、20 周, OVX8 组、OVX20 组为卵巢切除 8、20 周, 降钙素组为卵巢切除加降钙素。

1.2 模型制备 在室温 20℃ 自然光照的动物房中饲养(自由饮食)1 周。Sham8 组和 Sham20 组的大鼠暴露卵巢但不切除。给予等剂量生理盐水皮下注射, 分别于 8、20 周后脱颈处死取椎体。OVX8 组和 OVX20 组手术切除卵巢后 3 d 内, 每日 1 次肌注青霉素 20 万 U/只, 8、20 周后处死大鼠取椎体。降钙

△ 通讯作者, Tel: (0315)3725186; E-mail: zhliu130@sohu.com。

素组术后 8 周开始给予 20 U/kg 降钙素隔日皮下注射,20 周处死取椎体。

1.3 标本收集及处理 按上述时段脱颈处死大鼠。切开大鼠背部皮肤,锐刀分离所有的软组织,切除棘突、横突等附件组织,切取 L₂₋₄ 椎体测量骨密度,L₄₋₅ 椎间盘置于 10% 中性甲醛缓冲液中准备苏木素-伊红(HE)染色、甲苯胺蓝染色及免疫组化。L₄₋₅ 用慢速锯在近端沿矢状面剖开骨髓腔一小部分,固定完成后,经乙二胺四乙酸二钠溶液(pH=7.4,4℃)脱钙,每 7 天更换脱钙液,鉴定脱钙情况以大头针刺入无阻力为适宜标准,表明脱钙完全。将标本依次脱水、透明、浸蜡、包埋,沿正中矢状面作 5 μm 连续切片用于 HE 染色、甲苯胺蓝染色及 COL II 免疫组化染色。甲苯胺蓝染色:组织常规脱蜡至水,水洗 5 min。入甲苯胺蓝染色液 5~20 min。95% 的乙醇速洗 2 次,每次 10 下。入纯乙醇 2 次,每次 1 分钟。透明,树脂封固。本染色使酸性黏多糖和糖蛋白染成紫红色或浅蓝色,以观察其在椎间盘中的分布及表达。免疫组化染色(SP 法):石蜡切片常规脱蜡至水。(1)复合消化酶室温下抗原修复 15 min。(2)滴加内源性过氧化物酶阻断剂。(3)滴加正常非免疫动物血清。(4)滴加一抗(1:100),4℃ 冰箱过夜。(5)滴加生物素标记的二抗。(6)滴加链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液。(7)DAB 显色。(8)苏木素复染。(9)中性树脂封固。每次实验均以 PBS 液代替一抗作阴性对照。利用半定量方法测定平均灰度值。

1.4 骨密度检测 应用 Norland-XR36 双能 X 线骨密度测量仪(DEXA,美国),采用小物体扫描模式,准确度 0.01%,扫描速度 60 mm/s,分辨率 1.0 mm×1.0 mm,扫描宽度 5.0 cm 的参数值,进行 L₂₋₄ 腰椎整体骨密度的测量。为了评价精确度,随机选取 1 例,在位置不变的情况下,连续测量 tBMD 5 次。精确度用变异系数(coefficient of variation,CV)表示。

1.5 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

骨密度的 CV 值为 0.51%。Sham8 组、OVX8 组、Sham20 组、OVX20 组和降钙素组骨密度值分别为(0.153 8±0.014)、(0.140 8±0.021)、(0.142 5±0.011)、(0.125 3±0.009)和(0.140 1±0.008)。OVX8 和 OVX20 组大鼠的骨密度分别与 Sham8 和 Sham20 组比较,显著降低($P < 0.05$);降钙素组大鼠的骨密度与 OVX20 组比较,显著增加($P < 0.05$)。椎间盘的组织学表现及退变程度见插 II 图 1,2。COL II 在椎间盘 3 个组成部分中皆有表达,且表达趋势一致:OVX8 组和 OVX20 组分别与 Sham8 组和 Sham20 组比较,COL II 阳性表达显著下调($P < 0.05$);降钙素组与 OVX20 组比较,COL II 阳性表达显著上调($P < 0.05$),但仍低于 Sham20 组(插 II 图 3,插 III 图 4,5)。见表 1。

表 1 ICOL II 免疫组织化学染色积分吸光度 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	终板	髓核	纤维环
Sham8 组	220.291±15.545 [#]	210.161±15.368 [#]	225.703±14.214 [#]
OVX8 组	196.273±17.326	197.811±14.634	187.647±15.372
Sham20 组	210.516±16.324 ^{&}	205.901±13.563 ^{&}	218.902±17.238 ^{&}
OVX20 组	143.634±16.495	131.511±17.439	151.326±14.351
降钙素组	179.812±14.275 ^{&*}	178.402±15.387 ^{&*}	177.319±16.422 ^{&*}

[#]: $P < 0.05$,与 OVX8 组比较;[&]: $P < 0.05$,与 OVX20 组比较;*: $P < 0.05$,与 Sham20 组比较。

3 讨 论

卵巢切除大鼠是一个模仿人类绝经后骨质疏松^[7-8] 的公认模型。有研究发现,成年大鼠卵巢切除后,由于雌激素缺乏使骨改建呈高转换型,骨吸收和骨形成均增高,但骨吸收大于骨形成,骨形成相对减少,骨改建呈负平衡。本实验 OVX8 组采用 3 月龄成熟大鼠卵巢切除,大鼠腰椎骨密度显著下降。

椎间盘退变作为与年龄相关的退行性病之一^[9],与同为中老年高发疾病的骨质疏松症的关系尚存争议。有研究发现,骨量丢失明显的绝经后女性椎间盘退变程度也更为严重,椎体骨量丢失很可能是椎间盘退变的病因之一^[10-11]。本研究发现,OVX 组大鼠不仅表现为椎体骨量下降,椎体骨密度显著低于 Sham 组大鼠,而且椎间盘发生明显退变。雌激素水平的降低不仅可以提高骨转换水平并使骨代谢平衡倾向于骨丢失,同时其对炎性因子的活性和功能的抑制作用亦随之减弱,这很可能是去卵巢大鼠发生椎间盘退变的病理因素之一^[6]。此外,因雌激素缺乏引起的椎体和软骨终板骨量变化进而导致椎间盘生物力学环境改变可能是去卵巢大鼠发生椎间盘退变的另一主要病理因素。目前,对降钙素的研究仍以其对骨代谢的影响为主,大多数实验目的也集中在对破骨细胞的作用。近年来,有研究表明,降钙素具有保护软骨细胞及细胞外基质,抑制关节软骨退变的作用^[12-17]。

本研究中,OVX8 组和 OVX20 组大鼠除椎体骨量下降外,腰椎间盘发生严重退变,降钙素组大鼠也呈现一定程度的椎间盘退变,但程度明显减轻。这表明降钙素治疗不仅能够延缓 OVX 大鼠骨量丢失,也有助于延缓其腰椎间盘退变。本研究推测,其机制不仅与降钙素对骨代谢的作用有关,也很可能与其对软骨细胞代谢的调节有关。

细胞外基质成分的丢失和软骨终板的钙化均为椎间盘退变的病理改变^[17],椎间盘中细胞外基质成分主要包括蛋白多糖和胶原蛋白。退变椎间盘中胶原总量变化不明显,但胶原类型及分布发生很大的变化^[18],在 Sham8、Sham20 组软骨终板,髓核及内层纤维环中 COL II 的含量高,随椎间盘退变程度的加重,OVX8 组 OVX20 组软骨细胞生成的 COL II 明显减少。甲苯胺蓝染色各组椎间盘细胞外基质中蛋白多糖含量与 COL II 的表达具有相同的趋势。而基于降钙素对软骨细胞及其细胞外基质的保护作用以及椎间盘、软骨终板的细胞和基质成分与其他部位尤其是关节软组织的成分相近,本研究推测,降钙素对去卵巢大鼠腰椎间盘退变的抑制作用,不仅与其抑制骨吸收、降低骨转换维持椎体骨量及其微观结构进而改善椎间盘组织的生物力学环境有关,还可能与其保护椎间盘软骨尤其是抑制软骨终板的钙化及保护椎间盘细胞外基质成分有关,但这些推测还有待进一步的研究证实。

参考文献:

[1] Verstraeten A, Van-Ermen H, Haghebaert G, et al. Osteoarthritis retards the development of osteoporosis; observation of the coexistence of osteoarthritis and osteoporosis[J]. Clin Orthop,1991(264):169-177.
 [2] Margulies JY, Payzer A, Nyska M, et al. The relationship between degenerative changes and osteoporosis in the lumbar spine[J]. Clin Orthop,1996(324):145-152.
 [3] Wang T, Zhang L, Huang C, et al. Relationship between osteopenia and lumbar intervertebral disc degeneration in

- ovariectomized rats[J]. *Calcif Tissue Int*, 2004, 5(3): 205-213.
- [4] 王文雅, 张柳, 汪滔, 等. 降钙素治疗延缓卵巢切除大鼠腰椎间盘退变[J]. *解剖学杂志*, 2008, 31(2): 158-161.
- [5] Ahsan R, Tajima N, Chosa E, et al. Biochemical and morphological changes in herniated human intervertebral disc[J]. *J Orthop Sci*, 2001, 6(6): 510-518.
- [6] 王勇, 魏平, 王海慧. 降钙素治疗骨质疏松症 43 例观察[J]. *重庆医学*, 2006, 35(9): 795-796.
- [7] Vondracek SF. Managing osteoporosis in postmenopausal women[J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2010, 67 (7 Suppl 3): S9-19.
- [8] 谢肇, 吴雪晖, 许建中, 等. PEMF 对 OVX-OP 大鼠骨组织 IL-6 表达的影响及意义[J]. *重庆医学*, 2007, 36(9): 790-792.
- [9] Singh K, Masuda K, Thonar EJ, et al. Age-related changes in the extracellular matrix of nucleus pulposus and annulus fibrosus of human intervertebral disc[J]. *Spine*, 2009, 34(1): 10-16.
- [10] Verstraeten A, Van-Ermen H, Haghebaert G, et al. Osteoarthritis retards the development of osteoporosis: observation of the coexistence of osteoarthritis and osteoporosis[J]. *Clin Orthop*, 1991(264): 169-177.
- [11] Margulies JY, Payzer A, Nyska M, et al. The relationship between degenerative changes and osteoporosis in the lumbar spine[J]. *Clin Orthop*, 1996(324): 145-152.
- [12] Bagger YZ, Tanko LB, Alexandersen P, et al. Oral salmon calcitonin induced suppression of urinary collagen type II degradation in postmenopausal women: a new potential treatment of osteoarthritis[J]. *Bone*, 2005, 37(3): 425-430.
- [13] Khaldi L, Karachalios T, Galanos A, et al. Morphometric changes in the epiphyseal plate of the growing and young adult male rat after long-term salmon calcitonin administration[J]. *Calcif Tissue Int*, 2005, 76(6): 426-432.
- [14] Di Nino DL, Linsenmayer TF. Positive regulation of endochondral cartilage growth by perichondrial and periosteal calcitonin[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(5): 1979-1983.
- [15] Sondergaard BC, Wulf H, Henriksen K. Calcitonin directly attenuates collagen type II degradation by inhibition of matrix metalloproteinase expression and activity in articular chondrocytes[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(8): 759-768.
- [16] Chen Y, Shyu JF, Santhanagopal A, et al. The calcitonin receptor stimulates Shc tyrosine phosphorylation and Erk1/2 activation. Involvement of Gi, protein kinase C, and calcium[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(31): 19809-19816.
- [17] 张楠, 张柳, 郑桓, 等. 降钙素在体内和体外实验中对兔关节炎关节软骨的保护作用[J]. *中国矫形外科杂志*, 2008, 6(1): 66-69.
- [18] Zhang YG, Sun ZM, Liu JT, et al. Features of intervertebral disc degeneration in rat's aging process[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2009, 10(7): 522-527.

(收稿日期: 2011-01-09 修回日期: 2011-04-01)

(上接第 2607 页)

水平是否能确定扩弓后牙周组织改建的稳定性, 有待更深入的研究。

参考文献:

- [1] Thomas M, Robert L. 腔正畸学: 现代原理与技术[M]. 徐芸, 译. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1996: 370-372.
- [2] 傅民魁. 口腔正畸专科教程[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 554-555.
- [3] McCulloch CA. Host enzymes in gingival crevicular fluid as diagnostic indicators of periodontitis[J]. *J Clin Periodontol*, 1994, 21(7): 497-506.
- [4] Chambers DA, Imrey PB, Cohen RL, et al. A longitudinal study of aspartate aminotransferase in human gingival crevicular[J]. *Periodont Res*, 1991, 26(2): 65-74.
- [5] 张慧宇, 杨鑫, 向学熔, 等. rhBMP2 对牙髓成纤维细胞增殖及 ALP 活性的影响[J]. *重庆医学*, 2008, 37(5): 459-460.
- [6] Perinetti G, Paolanotoni M, D'Archivio M, et al. Alkaline phosphatase activity in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2002, 122(5): 548-556.
- [7] Isik F, Sayinsu K, Arun T, et al. Bone marker levels in gingival crevicular fluid during orthodontic intrusive tooth movement: a preliminary study[J]. *J Contemp Dent Pract*, 2005, 6(2): 27-35.
- [8] Darendeliler MA, Strahm C, Joho JP. Light maxillary expansion forces with the magnetic expansion device: A preliminary investigation[J]. *Eur J Orthod*, 1994, 16(6): 479-490.
- [9] Frank SW, Engel GA. The effects of maxillary quad-helix appliance expansion on cephalometric measurements in growing orthodontic patients[J]. *Am J Orthod*, 1982, 81(5): 378-389.
- [10] Darendeliler MA, Strahm C, Joho J P. Light maxillary expansion forces with the magnetic expansion device. A preliminary investigation[J]. *Eur J Orthod*, 1994, 16(6): 479-480.
- [11] Arat FE, Arat ZM, Tompson B. Muscular and condylar response to rapid maxillary expansion. Part 2: magnetic resonance imaging study of the temporomandibular joint[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2008, 133(6): 823-829.

(收稿日期: 2011-04-26 修回日期: 2011-05-27)