

去势大鼠血和骨 TNF α 、E $_2$ 含量及骨形态计量^①

李伟民^② 傅祖植 钟光恕 程 桦 杨荣泽

(中山医科大学孙逸仙纪念医院内分泌科; 广州, 50120)

摘 要 目的: 探讨肿瘤坏死因子 α (TNF α)雌二醇(E $_2$)的动态变化对绝经后骨质疏松症骨形态计量学的影响。方法: 40只SD大鼠随机分去势和假去势2组, 术后第4、10、16、22周分别检测血清和骨组织中TNF α , 血清E $_2$ 含量, 同步用IBAS计算机全自动图象分析系统对不脱钙骨组织作形态计量学测量。结果: 去势后早期(<4 周)血及骨组织中即有TNF α 升高和E $_2$ 下降($P < 0.05$)。随着去势时间的延长(4~22周), 血中TNF α 与E $_2$ 呈高度负相关($\gamma = -0.63$, $P < 0.01$), 骨组织中TNF α 浓度高于血中浓度($P < 0.05$)。骨小梁体积(TBV)和平均厚度(MTT)减小, 骨吸收表面(RS)增大($P < 0.002$), 骨吸收指标和骨组织TNF α 含量在去势后第4~22周升高的程度无显著性。结论: 血和骨组织中TNF α 可能参与绝经后骨质疏松症的发生和发展, 并造成骨组织形态的改变。

主题词 骨质疏松, 绝经后/病因学; 肿瘤坏死因子; 雌二醇/血液; 大鼠, Sprague-Dawley; 疾病模型, 动物

中图分类号 R 681; 322.6

The Effects of Contents of Tumor Necrosis Factor- α and Estradiol in Serum and Bone on Bony Histomorphometry in Ovariectomized Rats

Li Weimin Fu Zuzhi Zhong Guangshu Chen Hua Yang Rongze

(Department of Endocrinology, Sun Yat-sen Memorial Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510120)

Abstract Objective: To observe the effects of bony histomorphometry in postmenopausal osteoporosis (PMO) with dynamic change of TNF α and E $_2$. **Methods:** 40 female SD rats were randomly divided into 4 groups, each group was divided into ovariectomized(OV) and sham-OV subgroups. Tumor necrosis factor- α (TNF α) level in serum and bony culture was measured with ELISA, and RIA method was adopted to determine estradiol (E $_2$) in serum and bone, bony histomorphometry was measured with whole automobile imaging analysis system. **Results:** In the early period (≤ 4 weeks) after amenorrhea, TNF α in serum and bone began to increase with decrease of E $_2$. By 4-22 weeks the concentration of TNF α in bone became higher than that in blood ($P < 0.05$), and TNF α and E $_2$ appeared in highly negative connection ($\gamma = -0.63$, $P < 0.01$), bony histomorphometry began to change gradually. There were no significant changes in the concentration of TNF α in bones and resorption surface (RS) of ovariectomized rats (within 4-22 weeks). **Conclusion:** The bone of the OV rat discharged more TNF α , which might be related to the development of PMO and lead to the change of the shape of the bone.

Subject headings osteoporosis, postmenopausal/etiology; tumor necrosis factor; estradiol/blood; rats, Sprague-dawley; disease model, animal

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMO)发病原因目前还不十分清楚, 有学者认为与雌二醇(estradiol, E $_2$)水平下降有关, 但它如何影响骨代谢仍未阐明。有报道肿瘤坏死因子 α

(tumor necrosis factor- α , TNF α)等细胞因子与骨吸收关系密切^[1], 但绝经后骨质疏松患者外周血, 特别是骨组织中TNF α 含量, 它与E $_2$ 的关联及其与骨形态计量学参数的变化关系未见报道。本研究

① 美国中华医学基金会(CMB)资助课题; ② 访问学者, 现在湖北咸宁医学院(437100)

以去势大鼠为模型,从上述3个方面的动态观察加以探讨。

1 材料和方法

1.1 实验动物

40只3月龄雌性SD大鼠,中山医科大学实验动物中心提供,体质量为(192 \pm 12)g,随机分为4组,每组10只,每组再分实验组5只和对照组5只。各组动物分笼,标准固体饲料和双蒸水自由摄食喂养,室温为(25 \pm 2) $^{\circ}$ C。

1.2 实验方法

每只腹腔注射戊巴比妥40mg/kg麻醉。实验组行开腹输卵管峡部结扎后切除双侧卵巢。对照组单纯开腹假去势。术后第4、10、16周和第22周为实验周。分别于每实验周获取标本前14d和前4d于各鼠皮下注射四环素50mg/kg双重标记。在各实验周将实验组和对照组各5只麻醉后获取下列3项标本:①每只经股动脉抽血3mL,离心后取血清-20 $^{\circ}$ C保存待测。②处死后各取左侧股骨下端3g,经甲醛固定,乙醇梯度脱水,丙酮脱脂,二甲苯透明24h后用甲基丙烯酸甲酯包埋;每个标本分别切7 μ m和10 μ m的切片,脱去包埋剂,中性树脂封片。③无菌分离各鼠右侧股骨下端3g,HanK'S液反复冲洗,用骨钳将其分离为1mm 3 碎块,置于3mLRPMI1640培养液的12孔培养板,放在37 $^{\circ}$ C,100%湿度, ϕ =5%CO $_2$ 培养箱中48h。吸取培养液离心后取上清液,置-20 $^{\circ}$ C保存待测。

1.3 测定方法

双抗夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清和骨组织培养液的TNF α 浓度,检测药盒购自深圳晶美公司,灵敏度(4fg/L),批内及批间变异系数分别为2.7%和4.3%,回收率103%。采用EL-312型酶标仪(美国产)测定溶液在 λ =450nm处吸收率。RIA法检测血清雌二醇,试剂盒购自天津九鼎医学生物公司,自动 γ 计数RIA程序绘出标准曲线并打印样品浓度,批内及批间变异系数分别为6.0%和6.8%,回收率99.5%。观测骨形态计量学用IBAS计算机全自动图象分析系统(中山医科大学生理学图象分析室提供),不脱钙骨组织切片[7 μ m厚切片在显微镜下,10 μ m厚切片在荧光显微镜下(\times 200,360波长)],每张切片在骨生长

线下1mm的范围,选择2~3个视野,求得下述参数:骨小梁体积比(trabecular bone volume, TBV, %),骨小梁平均厚度(mean trabecular thickness, MTT, μ m),骨形成表面(formation surface, FS, %),骨吸收表面(resorption surface, RS, %),四环素标记百分比(tetracycline labeled surface, TLS, %),骨矿化沉积速率(mineralization apposition rate, MAR, μ m/d)。

2 结果

2.1 大鼠去势后体内TNF α 、E $_2$ 量的变化

结果见表1。①去势组(ovariectomized, OV)与假去势组(sham-OV)比较,OV组血或骨组织TNF α 含量均有显著升高(P <0.001),去势第4周即有明显差异(P <0.01)。②去势组骨组织与血清TNF α 含量比较,骨组织中有明显增高(P <0.05)。③OV组血E $_2$ 显著低于sham-OV组(P <0.01),第4周即有差异(P <0.05)。去势后4~22周TNF α 和E $_2$ 含量动态改变,结果见表2。

表1 血和骨组织TNF α 、血E $_2$ 含量2组比较

Table 1 Comparisons of TNF α and E $_2$ in the serum or bone between OV and sham-OV group ($\bar{x} \pm s$, fg/L)

	OV (n = 20)	Sham-OV (n = 20)	P
TNF α (serum)	387.45 \pm 192.62	48.90 \pm 9.55	0.001
TNF α (bone)	550.29 \pm 99.75	54.72 \pm 18.57	0.001
E $_2$ (serum)	15.96 \pm 6.09	137.59 \pm 70.17	0.001

表2 去势后4~22周TNF α 和E $_2$ 含量动态变化

Table 2 The dynamic change of TNF α and E $_2$ within 4~22 weeks after ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s$, fg/L)

Week	TNF α (serum)	TNF α (bone)	E $_2$ (serum)
4	201.11 \pm 43.08 ¹⁾	520.81 \pm 10.16 ²⁾	20.41 \pm 5.50 ³⁾
10	340.47 \pm 75.23	545.58 \pm 12.41	16.26 \pm 2.71
16	351.58 \pm 82.06	582.93 \pm 11.03	14.06 \pm 6.22
22	656.63 \pm 15.30	551.79 \pm 81.23	13.12 \pm 7.72

note: 1) while compared 4 week with 22 week, P <0.05; while compared 4 week with 10 and 16 week, P >0.05; 2), 3) while compared 4 week with 10, 16 and 22 week, P >0.05

2.2 骨形态计量学测量

TBV、MTT在术后第4~22周,去势组均低于

假去势组, $P < 0.002$, 假去势组逐渐增加, 而去势组逐渐下降, $P < 0.05$ 。RS 去势第 4 周起高于假去势组, $P < 0.02$ 。RS 在去势后 22 周内变化无显

著性, $P > 0.05$ 。FS 在术后第 10 周去势组逐渐高于假去势组, $P < 0.05$ 。骨形态计量学参数动态改变见表 3。

表 3 去势后第 4~22 周骨形态计量学参数动态变化

Table 3 The Dynamic change of date by bony histomorphometry within 4~22 weeks after ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s$)

Week	FS(%)	RS(%)	TBV(%)	MTT(μm)	LS(%)	MAR($\mu\text{m}/\text{d}$)
4	0.91 \pm 0.28	4.25 \pm 0.51 ¹⁾	19.61 \pm 11.20	98.42 \pm 6.30	19.07 \pm 3.70 ²⁾	0.94 \pm 0.08 ³⁾
10	1.34 \pm 0.32	4.92 \pm 1.38	15.68 \pm 2.80	88.21 \pm 2.50	15.03 \pm 1.80	0.90 \pm 0.18
16	2.05 \pm 0.38	5.90 \pm 1.27	15.62 \pm 2.80	79.10 \pm 1.98	14.98 \pm 1.70	0.78 \pm 0.14
22	2.29 \pm 0.30 ⁴⁾	5.95 \pm 1.00	10.65 \pm 0.70 ⁵⁾	70.00 \pm 2.10 ⁶⁾	14.50 \pm 4.50	0.80 \pm 0.15

note: 1), 2), 3) while compared 4 week with 10, 16 and 22 week, $P > 0.05$; 4), 5), 6) while compared 22 week with 4, 10 and 16 week, $P < 0.05$

去势后第 4 周即有骨质疏松的结构改变, 术后第 10 周这种改变更明显, 见图 1、图 2。

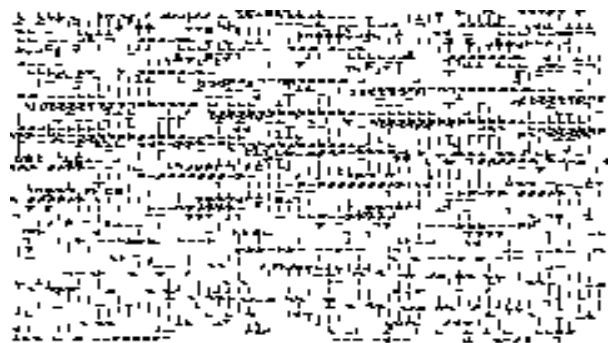


图 1 第 10 周假去势组镜下骨组织学改变

Fig. 1 The change of bony tissue of sham-OV by microscope in 10 weeks ($\times 200$)

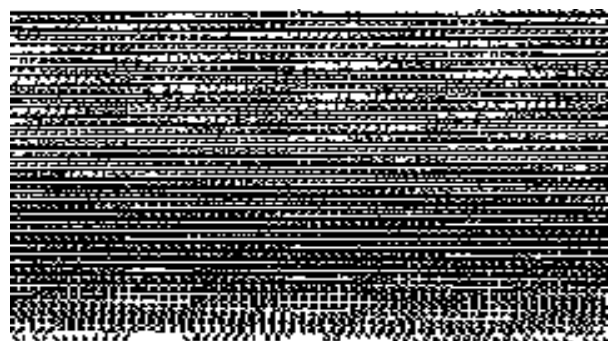


图 2 第 10 周去势组镜下组织学改变

Fig. 2 The change of bony tissue of OV by microscope in 10 weeks

The trabecular bone disappeared generally under the region of onemial epiphysis board; Like sticks and buttons is remained; The join of trabecular bone is broken ($\times 200$)

2.3 去势组各检测项目的相关性

血清 TNF α 与血清 E₂ 含量呈高度负相关($r =$

-0.63 , $P < 0.01$); 骨组织 TNF α 与血清 E₂ 含量呈高度负相关($r = -0.71$, $P < 0.01$); TBV 与血清 TNF α 呈负相关($r = -0.48$, $P = 0.05$), MTT 和 TBV 与骨组织中 TNF α 呈负相关($r = -0.60$, $P = 0.005$ 和 $r = -0.46$, $P = 0.039$)。RS 和 FS 与骨组织 TNF α 呈正相关($r = 0.75$, $P = 0.01$ 和 $r = 0.47$, $P = 0.034$), LS 和 MAR 与骨组织 TNF α 无相关性。

3 讨论

大鼠骨组织在组织和器官水平对力学和激素的反应与人类相似, 12 周龄大鼠骨重建活动酷似人类骨骼, 多数研究者在大鼠卵巢切除后 5~7 周即观察到骨质疏松。雌激素减少导致破骨细胞数量和活性增加已得到证实^[2]。在破骨细胞分化和活化中, TNF α 等细胞因子发挥着重要作用^[3]。雌激素抗骨吸收效应很可能也就是抑制 TNF α 等促进骨吸收的细胞因子的分泌^[4]。本研究去势后第 4 周即有血清和骨组织 TNF α 含量升高, 血清 E₂ 水平开始下降, 伴骨质疏松的结构改变, 第 10 周这种改变更明显。骨形态计量学方面, 特别是 RS 增加, 而 TBV 和 MTT 降低, 提示卵巢切除后早期体内发生骨质疏松可能与上述因素有关。据报道, 此时期若能适时地给予 TNF 抑制剂, TNF 结合蛋白(TNF-binding protein, TNF-bp)可以通过阻滞破骨细胞分化 TNF 的数量及活性达到减轻 PMO 程度的效果^[3]。

本研究在去势后血清 TNF α 与血清 E₂ 呈高度负相关($r = 0.63$), 骨组织 TNF α 与血清 E₂ 呈高度负相关($r = -0.71$), 而骨组织 TNF α 较之血清

更高, $P < 0.05$, 提示骨微环境中释放局部细胞因子 TNF α 可能参与绝经后骨质疏松症的发生。去势后可能由于雌激素水平下降, 对破骨细胞和骨髓基质细胞合成、分泌 TNF α 抑制作用去除, 使骨微环境 TNF α 的浓度增加。这些变化虽随去势时间延长而呈增高(TNF α)和下降(E $_2$)趋势, 但无显著性, 表明 TNF α 所致的骨吸收是在一定浓度基础上持续进行的。

结果还发现, 去势后第4周 TBV, MTT(反映骨结构)比假去势组明显降低, RS 显著升高, FS 至去势第10周才明显升高, 说明绝经早期虽有成骨作用开始但相对骨吸收作用而言较缓慢。根据相关系数绝对值的大小, 推断骨组织中 TNF α 含量与各形态计量学参数的相关程度依次为: RS > MTT > FS > TBV > MAR > LS。这些结果显示, 去势后血清和骨组织 TNF α 水平升高, 可能使骨吸收增加, 骨吸收和骨形成的耦联失衡, 骨吸收超过骨形

成, 骨量丢失, 产生骨质疏松。

参 考 文 献

- 1 Weide R, Ehlenz K, Lorenz W, *et al.* Successful treatment of osteoporosis in systemic mastocytosis with interferon alpha-2b. *Ann Hematol*, 1996, 72(1): 41
- 2 Horowitz M C. Cytokines and Estrogen in Bone: Anti-osteoporotic effects. *Science*, 1993, 260(30): 626
- 3 Kimble RB, Matayoshi A B, Vamice J L, *et al.* Simultaneous block of interleukin-1 and tumor necrosis factor is required to completely prevent bone loss in the early postovariectomy period. *Endocrinology*, 1995, 136(7): 3054
- 4 Girasole G, Jilka R L, Passeri G, *et al.* 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro; a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest*, 1992, 89(3): 883

(1998-07-31 收稿 1998-10-06 修回)

· 简 讯 ·

国家重点科技研究项目 荧光基因探针 PCR 诊断试剂盒通过检定

中山医科大学达安基因诊断中心所承担的国家重点科技项目“病原体荧光探针 PCR 诊断试剂盒研究”, 日前已有结核菌等5个诊断试剂盒经中国药品生物制品检定所质量检定合格。

卫生部医药生物工程技术研究中心所属的中山医科大学达安基因诊断中心, 几年来一直把基因诊断技术及其产品的开发作为自己的应用研究战略目标, 继传统 PCR 诊断试剂盒5个项目通过国家检定合格后, 组织了10多位博士、硕士和留学回国人员进行攻关, 积极投入新一代 PCR 诊断试剂盒的开发研究。该中心开展的“病原体荧光探针 PCR 诊断试剂盒的研究”, 分别于1996年列入国家“九五”生物技术重点攻关课题, 1997年列入国家重点科技研究项目, 1998年又列入国家高新技术产业项目, 均获得国家及广东省资助。经过2年多的努力, 荧光基因探针 PCR 诊断试剂盒的开发研究已与国外实验室处于同一水平。

该中心在卫生部和中山医科大学直接领导和支持下, 研究进展迅速, 现第一批通过国家检定合格的有结核菌、乙肝病毒、丙肝病毒、沙眼衣原体、淋球菌等5个项目。肝炎病毒等病原体诊断试剂盒灵敏性、特异性和稳定性已达到规模生产的要求; 以结核杆菌 PCR 试剂盒为例, 其检测人型结核杆菌的灵敏度高, 可检出每毫升1个细菌, 而17个非结核杆菌均为阴性。该中心现尚有20多个病原体诊断试剂盒研究工作均已达到申报检定水平, 对推动 PCR 这一高新技术的临床应用, 提高疾病的诊断水平将起到不可估量的积极作用。

(冯世容)