

· 基础研究 ·

运动对去势雌性大鼠骨质疏松的保护作用

李靖 陈一冰 张颖

【摘要】 目的 探讨运动训练对去势雌性大鼠骨质疏松的保护作用及相关机理。方法 将 24 只 6 月龄雌性大鼠分为 3 组:对照组、去势组及运动组。去势组和运动组大鼠均行双侧卵巢切除手术,对照组为假手术组。对照组和去势组大鼠术后正常活动,运动组大鼠术后则在跑台上进行中等强度运动训练(跑步速度为 18 m/min,每天 1 h,每周训练 5 d)。各组大鼠分别于术后 12 周时处死并对其股骨骨密度(bone mineral density, BMD)进行测定;对股骨转子区域骨组织进行胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor-1, IGF-1)免疫组织化学染色;并结合计算机图像分析系统对骨细胞 IGF-1 表达强度进行评定;应用原位凋亡法检测股骨转子区骨细胞凋亡。结果 对照组、去势组及运动组 BMD 分别为 $(0.170 \pm 0.011) \text{ g/cm}^2$, $(0.154 \pm 0.013) \text{ g/cm}^2$ 和 $(0.167 \pm 0.013) \text{ g/cm}^2$, 运动组 BMD 与对照组比较差异无显著性,去势组 BMD 显著低于对照组及运动组(P 均 < 0.05)。运动组骨细胞 IGF-1 表达强度显著高于对照组及去势组(P 均 < 0.05),去势组骨细胞 IGF-1 表达强度与对照组比较差异无显著性。对照组、去势组及运动组的骨细胞凋亡率分别为 2.1%、5.3% 及 1.8%,运动组骨细胞凋亡率与对照组比较差异无显著性,去势组骨细胞凋亡率显著高于对照组及运动组(P 均 < 0.01)。结论 大鼠雌激素缺乏可使其骨细胞凋亡数目增加。运动可缓解因雌激素缺乏引起的骨质疏松,其机理可能与运动抑制骨细胞凋亡、促进骨细胞 IGF-1 表达有关。

【关键词】 运动; 骨质疏松; 凋亡; 胰岛素样生长因子-1; 骨细胞

The protective effect of exercise on osteopenia in ovariectomized rats LI Jing*, CHEN Yi-bin, ZHANG Ying.

* Department of Orthopedics, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of exercise on osteopenia female rats caused by ovariectomy and its mechanism. Methods Twenty-four female rats aged 6 months were randomly divided into 3 groups: control group(CON), ovariectomized model group(OVX) and exercise group(Ex). The ovariectomy operation was performed with rats in OVX and Ex groups. Rats in Ex group were trained on a treadmill at a velocity of 18m/min for 1h, once daily for 5 days a week. Each group of rats were sacrificed at 12 weeks postoperatively and Dual-energy X-ray absorptiometry was carried out to measure the bone mineral density(BMD) of the femur. IGF-1 proteins in trabecular bone of proximal femur were examined by using immunochemical stain and the intensity of IGF-1 was determined by use of imaging analysis techniques. The apoptotic osteocytes in the trabecular bone of proximal femur were detected by using terminal-deoxynucleotidyl mediated nick end labeling (TUNEL) technique. Results The BMD of CON, Ex and OVX group was $(0.170 \pm 0.011) \text{ g/cm}^2$, $(0.154 \pm 0.013) \text{ g/cm}^2$ and $(0.167 \pm 0.013) \text{ g/cm}^2$, respectively. The difference of the BMD level between Ex and CON groups was not significant, however, the BMD level in OVX group was significantly lower than that of the Ex and CON groups ($P < 0.05$). Immunohistochemistry stain of IGF-1 was more intensive in osteocytes of Ex group than that of CON and OVX groups ($P < 0.05$), however, no difference was found between CON and OVX groups. The apoptotic rate of osteocytes in CON, Ex and OVX groups was 2.1%, 5.3% and 1.8%, respectively. Apoptotic osteocyte in trabecular bone was significantly higher in the OVX group when compared with the CON and Ex groups ($P < 0.01$). No statistical difference in apoptotic osteocytes was found between the CON and Ex group. Conclusion Increment of apoptotic osteocytes was detected in rats with estrogens deficiency. Exercise could inhibit the apoptosis of osteocytes and increase the expression of IGF-1 in osteocytes, it may be one of the mechanisms that exercise protects the rats with estrogens deficiency from osteoporosis.

【Key words】 Exercise; Osteoporosis; Apoptosis; IGF-1; Osteocyte

临床实践证明,运动可预防骨量丢失,目前已作为骨质疏松症的有效治疗手段之一。本实验通过去势技

术建立绝经后骨质疏松大鼠动物模型,以研究跑步运动对去势后大鼠骨量丢失的保护作用,并同时检测大鼠雌激素缺乏时以及运动训练对骨细胞凋亡及骨细胞胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor-1, IGF-1)表达变化的影响并探讨其意义。

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院骨科(李靖);陕西师范大学体育学院暨运动生物研究所(陈一冰);第四军医大学唐都医院感染科(张颖)

材料与方法

一、实验动物及分组

共选取 24 只 6 月龄雌性大鼠,根据其体重大小均匀分成 3 组:对照组、单纯去势组(去势组)及去势后运动组(运动组),每组各 8 只。各组大鼠一般情况经统计学分析,差异无显著性意义。

二、动物模型建立及处理

去势组及运动组大鼠均行双侧卵巢切除,对照组为假手术组,仅行开腹手术并缝合。运动组大鼠术后在倾角为 7° 的跑台上进行中等强度运动,大鼠跑步速度为 18 m/min,每天练习 1 h,每周训练 5 d,连续训练 12 周;去势组及对照组大鼠术后均无特殊处理。各组大鼠均于室温下采用标准饲料饲养,自由饮水、摄食。各组大鼠均于术后 12 周处死并取其股骨组织作骨密度(bone mineral density, BMD)检测、细胞凋亡检测以及 IGF-1 蛋白免疫组化染色。

三、检测方法

1. BMD 测定:采用双能 X 线骨密度仪及小动物软件(Lunar 公司)对各组大鼠股骨进行 BMD 测定。

2. IGF-1 蛋白表达及强度测定:将大鼠股骨近端组织置于 10% 中性福尔马林液中固定 16 h 后,脱钙处理 72 h。标本常规脱水、浸蜡后沿股骨纵轴进行包埋,每例标本制作不连续切片 4 张,厚度为 5 μ m,平铺于经 APES 及多聚赖氨酸双重处理过的载玻片上,其中 2 张用于细胞凋亡检测,另 2 张用于 IGF-1 免疫组化染色。免疫组化检测采用 SABC 法,一抗为兔抗鼠 IGF-1 抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc,工作浓度 1:100),SABC 法免疫组化试剂盒购自武汉博士得生物工程有限公司,各实验步骤严格按说明书进行,DAB 显色,逐级脱水、透明、封片;用 PBS 替代一抗做空白对照,将待检图像通过 Leica 图像处理系统输入,对 IGF-1 表达强度采用灰度值表示。每个标本随机取 5 个视野,观察骨小梁内免疫阳性骨细胞的染色灰度值,取其平均灰度值为该标本的阳性细胞灰度值,灰度值越小,阳性染色越强,表明免疫反应性越强。

3. 骨细胞凋亡检测:采用原位 DNA 片段末端标记法(TUNEL 法)对股骨转子区凋亡细胞进行染色及计数,原位凋亡试剂盒购自华美公司,操作步骤严格按试剂盒说明进行。在显微镜下观察细胞核呈棕黄色的凋亡细胞,在 100 倍视野下,每张切片均观察 5 个不同部位,计数骨细胞及凋亡骨细胞总数。

四、统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学分析,正态计量数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,偏态分布资料采用 M($Q_U - Q_L$)表示。采用 Kolmogorov-Smirnov 作正态性检验,

Levene 法作方差齐性检验。各组骨密度结果采用单因素方差分析(one way ANOV)进行比较,有显著性差异时采用 Student-Newman-Keuls 法作两两比较。IGF-1 蛋白表达强度比较采用多个独立样本的非参数检验。各组骨细胞凋亡率比较采用 χ^2 检验。

结 果

一、BMD 测定结果分析

经过检测,我们发现对照组、去势组以及运动组大鼠的 BMD 分别为 $(0.170 \pm 0.011) \text{ g/cm}^2$, $(0.154 \pm 0.013) \text{ g/cm}^2$ 和 $(0.167 \pm 0.013) \text{ g/cm}^2$ 。3 组间比较差异有显著性意义($F = 3.62, P = 0.045 < 0.05$)。经进一步分析后发现,对照组 BMD 高于去势组,差异有显著性意义($P = 0.021 < 0.05$);运动组 BMD 高于去势组,差异有显著性意义($P = 0.045 < 0.05$);运动组 BMD 和对照组间差异无显著性意义($P = 0.721 > 0.05$)。

二、IGF-1 蛋白表达及强度测定

IGF-1 阳性表达信号主要定位于骨细胞胞浆及胞膜中,靠近骨小梁表面的骨细胞染色程度较位于骨小梁中央的骨细胞染色深。各组 IGF-1 的表达强度分别为:对照组 132.5 (134.75 ~ 121.50)、去势组 135.5 (137.00 ~ 118.25)、运动组 125.6 (126.75 ~ 116.25)。经统计学分析后发现,运动组 IGF-1 表达强度高于对照组,差异有显著性意义($P = 0.010 < 0.05$);运动组 IGF-1 高于去势组,差异亦有显著性意义($P = 0.040 < 0.05$);对照组 IGF-1 与去势组比较差异无显著性意义($P = 0.429 > 0.05$)。

三、原位凋亡检测结果比较

在显微镜下,原位凋亡骨细胞阳性染色呈棕黄色。对照组、去势组及运动组的骨细胞凋亡率分别为 2.1%, 5.3% 及 1.8%。经进一步研究后发现,去势组骨细胞凋亡率显著高于对照组($\chi^2 = 18.54, P = 0.000 < 0.01$);运动组骨细胞凋亡率极显著低于去势组($\chi^2 = 24.08, P = 0.000 < 0.01$);运动组和对照组骨细胞凋亡率间差异无显著性意义($\chi^2 = 0.52, P = 0.476 > 0.05$)。

讨 论

临床表明绝经后妇女骨质疏松最危险的并发症为骨量降低及骨强度下降所导致的骨质疏松性骨折风险增加,常见的骨折部位包括股骨颈、桡骨远端以及椎体等部位^[1]。鼠类为四肢着地活动动物,和直立运动的人类在力学感应上存在一定差别,故本研究选择大鼠与人类应力感受相似的股骨作为骨密度测定部位。结果发现去势组大鼠股骨骨密度显著低于对照组及去势后运动组;而去势后运动组和对照组间差异无显著性意义,说明大鼠雌激素缺乏可导致骨质疏松的发生,而

运动可以缓解由雌激素缺乏而导致的骨量丢失。

众所周知,骨细胞的数量及活性对于骨代谢平衡及骨量维持具有重要意义。多项研究表明骨细胞凋亡在骨代谢调节中具有重要作用^[2]。原位凋亡法可以准确地对凋亡细胞进行定性、定量检测。本实验通过原位凋亡法在各组大鼠中检测凋亡骨细胞,同时发现去势组大鼠骨细胞凋亡率显著高于对照组,提示骨细胞凋亡可能参与了雌激素缺乏后骨组织的病理变化过程。骨小管-骨细胞系统组成的网络与骨小梁表面的成骨细胞及衬里细胞相联络,骨细胞可能通过感受力学载荷、微损伤并且转导这些刺激而激活骨重建。Tomkinson 等^[3]研究证实雌激素可以抑制骨细胞凋亡并保持骨细胞活性,如雌激素缺乏可导致骨细胞凋亡增加,并可通过损害骨细胞-骨小管力学感应网络活性,从而降低骨对应力载荷的反应性,临床上则表现为机体在发生显著骨量丢失之前其骨骼脆性增加——原因即为骨组织缺乏发现微损伤的能力。我们在实验中发现去势后运动组大鼠骨细胞凋亡率与对照组比较,差异无显著性,但对照组显著低于单纯去势组,说明运动训练可以明显缓解由雌激素缺乏而导致的骨细胞凋亡增加。Jilka 等^[4]研究发现:间断性注射 PTH 可增加正常或由于成骨源性缺乏所致的骨质稀少组织的骨量,该过程是由 PTH 抑制骨细胞凋亡而实现的。结合本次实验结果,我们推测运动训练抑制雌激素缺乏后骨量的丢失可能部分与运动降低局部骨组织内骨细胞的凋亡数量有关。

成骨、破骨细胞通过骨小管与骨细胞相互连接并构成网络系统,骨细胞能感受力学刺激并产生细胞因子 IGF-1,以旁分泌作用方式刺激成骨细胞增殖及骨基质合成^[5]。Reed 等^[6]发现血浆 IGF-1 水平与成骨细胞活性密切相关,Zhang 等^[7]证实 IGF-1 在废用性骨质疏松中起主要作用,提示力学刺激可通过调节 IGF-1 的表达而影响骨代谢水平。本实验发现 IGF-1 水平在对照组及去势组间差异无显著性,而去势后运动组 IGF-1 表达水平则显著高于其它两组,说明雌激素缺乏对骨细胞 IGF-1 表达的影响不大,而运动训练

通过力学刺激可显著促进骨细胞 IGF-1 表达。相关研究表明,IGF-1 有增强成骨细胞分化的作用,同时 IGF-1 不但可刺激 I 型胶原合成、提高基质含量,而且还能抑制胶原降解,这对新骨形成及维持骨基质都具有重要意义;此外 IGF-1 还可阻止成骨细胞凋亡^[8]。综上所述,本实验结果表明运动训练可增加骨细胞 IGF-1 的表达,推测靠近骨重建表面的骨组织其高水平 IGF-1 可显著加强成骨细胞的增殖、分裂能力,抑制骨细胞凋亡,加强骨形成作用,以上可能是运动训练对抗雌激素缺乏后骨量丢失的重要机制之一。

参 考 文 献

- 1 Takahashi M, Naitou K, Ohishi T, et al. Effect of vitamin K and/or D on undercarboxylated and intact osteocalcin in osteoporotic patients with vertebral or hip fractures. Clin Endocrinol, 2001, 54:219-224.
- 2 Nable BS, Stevens H, Loveridge N, et al. Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone. Bone, 1997, 20:273-282.
- 3 Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, et al. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. J Clin Endocrinol Metab, 1997, 82:3128-3135.
- 4 Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, et al. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. J Clin Invest, 1999, 104:439-446.
- 5 Lean JM, Jagger CJ, Chambers TJ, et al. Increased insulin-like growth factor-I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation. Am J Physiol, 1995, 268:318-327.
- 6 Reed BY, Zerwekh JE, Sakhaee K, et al. Serum IGF-1 is low and correlated with osteoblastic surface in idiopathic osteoporosis. J Bone Miner Res, 1995, 10:1218-1224.
- 7 Zhang R, Supowit SC, Klein GC, et al. Rat tail suspension reduces message RNA level for growth factor and osteopontin and decreases the osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. J Bone Miner Res, 1995, 10:415-423.
- 8 Hill PA, Tumber A, Meikle MC, et al. Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. Endocrinology, 1997, 138:3849-3858.

(收稿日期:2003-06-15)

(本文编辑:易 浩)

· 征 订 ·

《中华物理医学与康复杂志》2003 年合订本征订启事

《中华物理医学与康复杂志》2003 年合订本新鲜出炉,分上、下两册,每套定价 120.00 元。本刊内容丰富,资料新,一册在手,将有助于您全面了解我国物理医学与康复的最新进展与研究成果。合订本外观精美,便于查阅、收藏或赠送,欢迎订购。欲购从速,数量有限,售完为止。

欲购者请直接汇款至本刊编辑部,于汇款单附言栏注明“订购 2003 年合订本 × × 套”字样,我们将免费为您邮寄。

联系地址:(430030)武汉市解放大道 1095 号(同济医院内)《中华物理医学与康复杂志》编辑部

联系电话:027-83662874

E-mail:cjpmr@tjh.tjmu.edu.cn

《中华物理医学与康复杂志》编辑部