

# 去卵巢大鼠不同时期骨量、骨转换指标、雌激素水平的变化规律及相关性

沈耿杨<sup>1</sup>, 任辉<sup>1</sup>, 江晓兵<sup>2</sup>, 梁德<sup>2</sup>, 杨志东<sup>2</sup>, 唐晶晶<sup>1</sup>, 崔健超<sup>1</sup>, 林顺鑫<sup>1</sup>, 庄洪<sup>2</sup>, 张顺聪<sup>2</sup>, 姚珍松<sup>2</sup>(<sup>1</sup>广州中医药大学, 广东省广州市 510405; <sup>2</sup>广州中医药大学第一附属医院, 广东省广州市 510405)

## 文章亮点:

1 既往研究并未清楚描述大鼠去卵巢后不同时期骨量、骨转换状态及血清雌激素水平的变化规律。本实验通过模拟建立大鼠的绝经后骨质疏松模型, 分析不同时期骨量、骨形成指标(I型前胶原氨基末端前肽)、骨吸收指标(I型胶原羧基端肽)及雌激素水平的变化规律, 并探讨各因素之间的相互关系。

2 结果提示去卵巢后大鼠腰椎、股骨骨量变化呈先快速降低、再缓慢回升的趋势, 其中L<sub>1</sub>及股骨转子部受影响最大; 骨转换指标在去卵巢后显著加快、后期逐渐回归正常; 雌激素水平变化规律为第1个月先升高、后期快速降低; 体质量、骨转换指标及雌激素水平与骨量密切相关。

## 关键词:

组织构建; 骨组织工程; 去卵巢大鼠; 不同时期; 骨量; I型前胶原氨基末端前肽; I型胶原羧基端肽; 雌激素; 变化规律; 相关性; 绝经后骨质疏松症; 广东省自然科学基金

## 主题词:

骨质疏松, 绝经后; 雌激素; 卵巢切除术

## 基金资助:

广东省教育厅学科建设专项基金(育苗工程)(2013LYM-0012); 广东省科技厅资助项目(2012B031800208); 广东省自然科学基金项目(S2013010015870); 广州中医药大学优秀青年学者科研基金项目(KAB110133K04)

## 摘要

**背景:** 目前对去卵巢大鼠的研究较多, 而对不同时间点大鼠骨量、骨转换指标、雌激素水平的变化规律及各因素的相关性研究报道较少。

**目的:** 分析去卵巢大鼠不同时期骨量、骨转换指标、雌激素水平的变化规律并探讨其相关性。

**方法:** 34只3月龄雌性SD大鼠, 随机分为基线组、假手术组和去卵巢组。实验开始先将基线组处死, 假手术组及去卵巢组于术后第4, 8, 12周分次处死。双能X射线吸收法(DXA)测定L<sub>1-3</sub>及股骨不同分区(头颈部R1区、转子部R2区、股骨干R3区、股骨整体R4区)的骨矿含量、骨密度、骨面积; 酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清I型前胶原氨基末端前肽、I型胶原羧基端肽及雌激素水平。对大鼠体质量、离体骨密度、I型前胶原氨基末端前肽、I型胶原羧基端肽、雌激素水平、月龄间的相关性进行分析。

**结果与结论:** ①去卵巢后4周去卵巢组离体腰椎及股骨骨矿含量、骨密度均较基线组、假手术组明显降低( $P < 0.05$ ), 第8, 12周时均显著改善( $P < 0.05$ ), 腰椎、股骨各区域骨量丢失幅度最大的为L<sub>1</sub>及股骨转子区。②去卵巢后4周去卵巢组血清I型前胶原氨基末端前肽、I型胶原羧基端肽水平较基线组、假手术组均显著升高( $P < 0.05$ ), 第8, 12周差异无显著性意义。③去卵巢组第8, 12周血清雌激素较假手术组及基线组明显降低( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。④月龄与大鼠体质量、腰椎及股骨骨密度呈正相关, I型前胶原氨基末端前肽、I型胶原羧基端肽与腰椎及股骨骨密度呈负相关( $P < 0.01$ )。提示去卵巢后大鼠腰椎、股骨骨量变化呈先快速降低、再缓慢回升的趋势, 其中L<sub>1</sub>及股骨转子部受影响最大; 骨转换指标在去卵巢后显著加快、后期逐渐回归正常; 雌激素水平变化规律为第1个月先升高、后期快速降低; 体质量、骨转换指标及雌激素水平与骨量密切相关。

沈耿杨, 任辉, 江晓兵, 梁德, 杨志东, 唐晶晶, 崔健超, 林顺鑫, 庄洪, 张顺聪, 姚珍松. 去卵巢大鼠不同时期骨量、骨转换指标、雌激素水平的变化规律及相关性[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(2):170-176.

## Change rules and correlation between bone mass, bone turnover markers and estrogen levels in different periods of ovariectomized rats

Shen Geng-yang<sup>1</sup>, Ren Hui<sup>1</sup>, Jiang Xiao-bing<sup>2</sup>, Liang De<sup>2</sup>, Yang Zhi-dong<sup>2</sup>, Tang Jing-jing<sup>1</sup>, Cui Jian-chao<sup>1</sup>, Lin Shun-xin<sup>1</sup>, Zhuang Hong<sup>2</sup>, Zhang Shun-cong<sup>2</sup>, Yao Zhen-song<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** There are so many studies about ovariectomized rats at present, but the research on the change rules of bone mass, bone turnover markers, estrogen levels and their correlation in different periods of ovariectomized rats is rarely reported.

**OBJECTIVE:** To analyze the change rules of bone mass, bone turnover markers, estrogen level and their correlation in different periods of ovariectomized rats.

沈耿杨, 男, 1990年生, 广东省汕头市人, 汉族, 广州中医药大学第一临床医学院在读硕士, 主要从事中医骨伤科学的研究。

通讯作者: 江晓兵, 博士, 主治医师, 广州中医药大学第一附属医院脊柱骨科, 广东省广州市 510405

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.02.002  
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2015)02-00170-07

稿件接受: 2014-12-16

Shen Geng-yang, Studying for master's degree, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Corresponding author: Jiang Xiao-bing, M.D., Attending physician, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Accepted: 2014-12-16

**METHODS:** Thirty-four 3-month-old female Sprague Dawley rats were randomly divided into three groups: baseline group, ovariectomized group and sham operated group. At the beginning of the experiment, the rats in the baseline group were sacrificed, then rats in the ovariectomized group and sham operated group were executed at 4, 8, 12 weeks postoperative respectively. The bone mineral density, bone mass content, area of different zones of the L<sub>1-3</sub> lumbar vertebrae and femurs were detected by dual-energy X-ray absorption method, and meanwhile the serum levels of type I procollagen amino-terminal pro-peptide, I collagen carboxy-terminal peptide and estrogen were determined by ELISA. At last, we analyzed the correlation between body mass, bone mineral density *in vitro*, type I procollagen amino-terminal pro-peptide, I collagen carboxy-terminal peptide and estrogen levels and the age of ovariectomized rats.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) The bone mineral density and bone mass content of the lumbar vertebral and femurs in the ovariectomized group were significantly lower than those in the sham operated group and baseline group at the 4<sup>th</sup> week after operation ( $P < 0.05$ ). The bone mineral density and bone mass content in the ovariectomized group were ameliorated obviously at the 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> weeks compared with those at the 4<sup>th</sup> week after operation ( $P < 0.05$ ). The bone mass loss was highest in the L<sub>1</sub> and intertrochanteric regions. (2) Serum levels of type I procollagen amino-terminal pro-peptide and I collagen carboxy-terminal peptide in the ovariectomized group were significantly higher than those in the baseline group and sham operated group at the 4<sup>th</sup> week after operation, but there was no difference at the 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> weeks. (3) The serum estrogen level in the ovariectomized group was prominently lower than that in the sham operated group and baseline group at the 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> weeks after operation ( $P < 0.01$  at the 8<sup>th</sup> week,  $P < 0.05$  at the 12<sup>th</sup> week). (4) The age was positively correlated with body mass and bone mineral density of the lumbar vertebrae and femurs *in vitro*, while the serum levels of type I procollagen amino-terminal pro-peptide and I collagen carboxy-terminal peptide were negatively correlated with the bone mineral density of the lumbar vertebrae and femurs *in vitro* ( $P < 0.01$ ). These results suggested that the bone mass of the lumbar vertebrae and femurs in ovariectomized rats was decreased rapidly firstly, and then rose slowly with time; the bone mass in the L<sub>1</sub> and intertrochanteric regions lost seriously; the bone turnover markers showed a significant increase at the beginning of ovariectomy and reduced gradually to normal condition, while the estrogen level was increased at the first month after ovariectomy and then decreased rapidly. In addition, the body mass, bone turnover markers and estrogen level were associated with the change of bone mass.

**Subject headings:** Osteoporosis, Postmenopausal; Estrogens; Ovariectomy

**Funding:** the Discipline Construction Fund of Guangdong Education Bureau, No. 2013LYM-0012; the Funded Project of Guangdong Science and Technology Bureau, No. 2012B031800208; the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. S2013010015870; the Excellent Youth Research Foundation of Guangzhou University of Chinese Medicine, No. KAB110133K04

Shen GY, Ren H, Jiang XB, Liang D, Yang ZD, Tang JJ, Cui JC, Lin SX, Zhuang H, Zhang SC, Yao ZS. Change rules and correlation between bone mass, bone turnover markers and estrogen levels in different periods of ovariectomized rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(2): 170-176.

## 0 引言 Introduction

绝经后骨质疏松症是绝经后女性所发生的以骨量减少、骨微细结构破坏、骨脆性增高为主要特征的全身性疾病, 现已成为严重的公共健康问题。切除动物双侧卵巢是目前国内外常用的绝经后骨质疏松症模型建立方法, 去卵巢动物的骨代谢和组织学病理变化与临床上绝经后骨质疏松症症状极为相似<sup>[1]</sup>。去卵巢后大鼠骨量、骨转换指标、雌激素水平在不同时间点表现出一定的变化规律, 各因素之间可能存在着某些相关性。

目前, 绝经后卵巢合成雌激素减少是引起骨质疏松症的主要危险因素<sup>[2]</sup>, 据报道国内绝经后女性发病率约为27%, 女性的骨质疏松高患病率应引起足够的重视<sup>[3]</sup>。切除双侧卵巢建立绝经后骨质疏松症大鼠模型已成为绝经后骨质疏松症的研究基础, 骨量丢失、骨转换加快及雌激素减少的病理特点均可以在动物模型中模拟<sup>[4]</sup>, 但既往研究并未清楚描述大鼠去卵巢后不同时期骨量、骨转换状态及血清雌激素水平的变化规律。

本研究将对去卵巢后大鼠不同时期骨量、骨形成指标(I型前胶原氨基端原肽: PINP)、骨吸收指标(I型胶原羧基端肽:  $\beta$ -CTX)及雌激素水平的变化规律进行分析, 并探

讨其相互关系。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于2012年12月至2014年12月在广州中医药大学第一附属医院完成。

**材料:**

去卵巢大鼠不同时期骨量、骨转换指标、雌激素水平的变化规律及相关性试剂及仪器

| 试剂及仪器                                 | 来源                 |
|---------------------------------------|--------------------|
| 大鼠 I 型前胶原氨基端原肽 ELISA Kit              | 华美, CSB-E12774r    |
| 大鼠 I 型胶原羧基端肽( $\beta$ -CTX) ELISA kit | 华美, CSB-EQ027521RA |
| 大鼠雌激素水平检测 Estradiol EIA Kit           | cayman, 582251-96  |
| 双能X线骨密度仪 (DXA仪)                       | 美国hologic公司        |

**实验动物:** SPF级3月龄雌性SD大鼠34只, 体质量(191.92±32.01)g, 购于广州中医药大学第一附属医院动物中心[SCXK(粤)2013-0034]。无菌手术在广州中医药大学第一附属医院实验动物中心屏障动物实验设施进行[SYXK(粤)2013-0092]。在25℃, 12h昼夜照明节律的环境中饲

养, 并按实验动物使用的3R原则给予人道关怀。

#### 实验方法:

**动物分组及处理:** 适应饲养1周后, 随机分为基线组( $n=6$ )、假手术组( $n=14$ )、去卵巢组( $n=14$ )。

去卵巢组及假手术组大鼠均禁食12 h, 腹腔注射体积分数10%水合氯醛麻醉, 去卵巢组从背部切除双侧卵巢, 假手术组不摘除卵巢, 在相同部位剪除与卵巢等大的脂肪组织。实验开始时先将基线组6只大鼠处死, 假手术和去卵巢组分别于去卵巢后第4, 8周随机处死4只, 第12周处死剩余6只。

**组织样本和血清收集:** 实验结束后, 各组大鼠均禁食12 h, 按体质量腹腔注射体积分数10%水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血, 于4 °C环境静置20 min以上, 离心获取血清; 迅速游离肾上腺及子宫, 称质量; 根据解剖位置截取第1, 2, 3腰椎及左侧股骨, 小心去除附着肌肉和结缔组织, 剥离干净后以湿生理盐水纱布包裹标号, 塑料袋密封后置于-80 °C超低温冰箱冻存。

**离体骨DXA扫描:** 将腰椎(L<sub>1-3</sub>)和左侧股骨标本从-80 °C冰箱取出, 常温下解冻, 应用双能X线骨密度仪高清晰度条件下进行离体局部扫描。

根据股骨及腰椎解剖结构分别设定股骨感兴趣区域(ROI): 股骨头颈(R1)、股骨转子(R2)、股骨干(R3)、股骨全段(R4)和腰椎ROI(L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>、L<sub>3</sub>、L<sub>1-3</sub>), 分别测量各区域的骨密度、骨矿含量、骨面积。见图1。

**生化指标测定:** 血清I型前胶原氨基端原肽、I型胶原羧基端肽及雌激素水平测定采用酶联免疫吸附测定法(ELISA), 实验操作完全按照试剂盒说明书, 试剂盒包括大鼠I型前胶原氨基端原肽ELISA Kit、大鼠I型胶原羧基端肽ELISA kit、大鼠雌激素水平检测Estradiol EIA Kit。

**主要观察指标:** ①术后不同时期大鼠体质量及子宫、肾上腺质量。②术后不同时期大鼠离体腰椎、股骨DXA扫描结果。③术后不同时期大鼠雌激素及骨生化指标变化。④去卵巢大鼠体质量、骨量、骨转换指标、雌激素水平、月龄间的相关性分析。

**统计学分析:** 采用SPSS 19.0软件进行统计学分析。各指标以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间均数先进行 $\chi^2$ 正态分布和方差齐性检验, 若符合正态分布和方差齐性, 则采用单因素方差分析, 多重比较采用LSD-*t* 检验。骨量、骨转换生化指标、雌激素水平间的关系采用双变量相关分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 实验选用SD大鼠34只, 分为3组, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

**2.2 术后不同时期大鼠体质量及子宫、肾上腺质量** 见表1。

假手术组大鼠体质量增长较快, 在术后4, 8, 12周时较

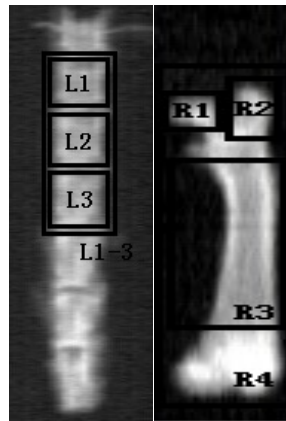


图1 DXA 测量大鼠离体腰椎和股骨的分析图像

Figure 1 Analytic images of the lumbar vertebrae and femurs of rats using dual-energy X-ray absorption method *in vitro*

图注: 股骨感兴趣区域: 股骨头颈(R1)、股骨转子(R2)、股骨干(R3)、股骨全段(R4)和腰椎感兴趣区域: L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>、L<sub>3</sub>、L<sub>1-3</sub>。

0周分别增长了16.97%, 27.52%, 46.33%。大鼠去卵巢后体质量增加更为迅速, 在术后4, 8, 12周时较0周分别增长了44.50%, 65.60%, 83.73%, 从术后4周开始体质量显著重于同时期的假手术组大鼠( $P < 0.01$ )。

术后第4, 8, 12周去卵巢组子宫质量较基线组( $P < 0.05$ )、假手术组显著降低( $P < 0.01$ ); 术后第4, 8, 12周去卵巢组肾上腺质量与基线组、假手术组差异均无显著性意义( $P > 0.05$ )。

### 2.3 术后不同时期大鼠离体骨DXA扫描结果

#### 2.3.1 不同时期离体腰椎DXA扫描结果 见图2。

去卵巢后4周去卵巢组离体腰椎各感兴趣区域骨矿含量、骨密度和骨面积均较基线组、假手术组明显降低( $P < 0.05$ ), 与基线组比较, 腰椎各感兴趣区域骨量丢失幅度依次为15.77%(L<sub>1</sub>)、14.11%(L<sub>2</sub>)、13.45%(L<sub>3</sub>)。

去卵巢后第8, 12周时L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>、L<sub>3</sub>及L<sub>1-3</sub>的骨密度、骨矿含量较假手术组降低( $P < 0.05$ ), 但骨面积与假手术组比较差异无显著性意义, 同时相对去卵巢后第4周而言均显著改善( $P < 0.05$ )。

大鼠在去卵巢后腰椎骨量呈先快速降低、再缓慢回升的趋势, 但整个观察期内都比假手术组要低。

#### 2.3.2 不同时期离体股骨DXA扫描结果 见图3。

去卵巢后4周去卵巢组大鼠离体股骨各感兴趣区域骨矿含量、骨密度、骨面积较基线组、假手术组均显著降低( $P < 0.05$ ), 与基线组比较, 股骨各感兴趣区域骨量丢失幅度依次为12.44%(R2转子区)、11.60%(R1头颈区)、3.24%(R3股骨干区)。

去卵巢后第8, 12周时R1、R2、R3、R4的骨矿含量、骨密度较假手术组降低( $P < 0.05$ ), 但骨面积与假手术组比较差异无显著性意义, 同时相对去卵巢后第4周而言均显著改善( $P < 0.05$ )。

大鼠在去卵巢后股骨骨量变化呈先快速降低, 再缓慢回升的趋势, 但整个观察期内都比假手术组要低。

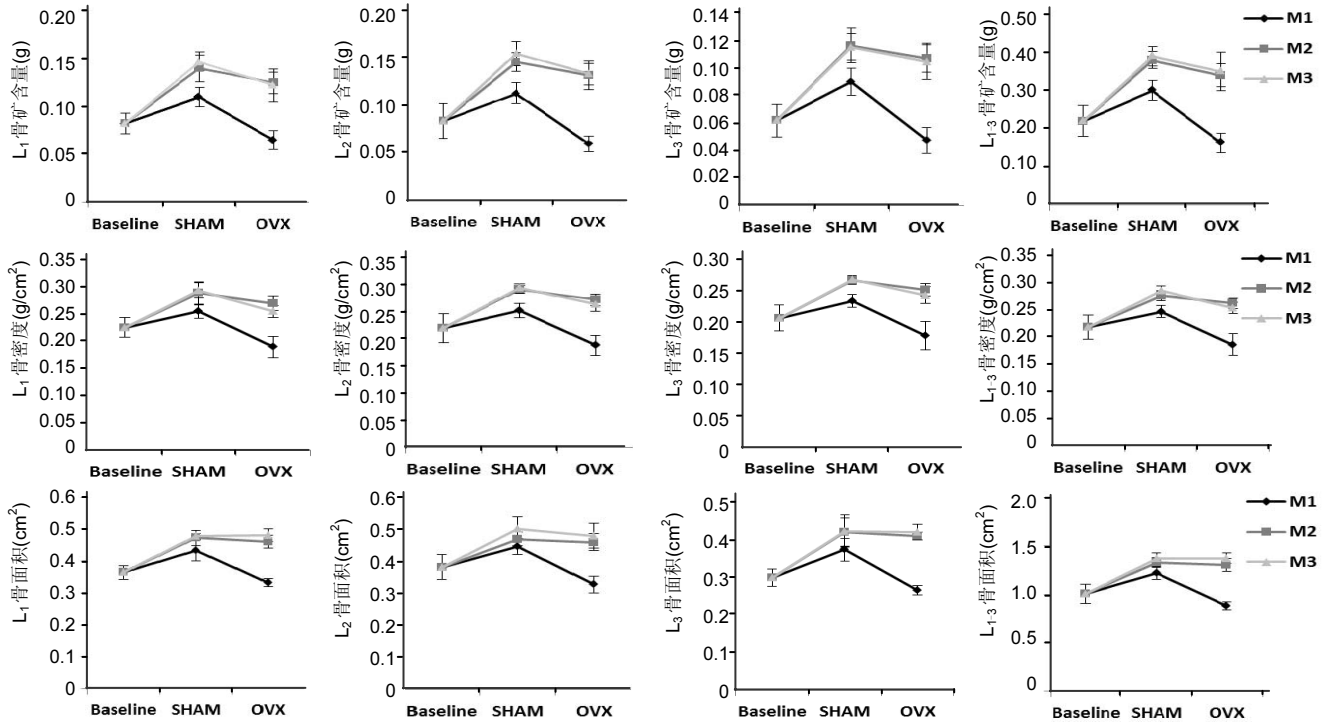


图2 大鼠离体腰椎各节段不同时期 DXA 扫描结果

Figure 2 The scanning results of the lumbar vertebral range of interest *in vitro* of rats in different groups at different time using dual-energy X-ray absorption method

图注: Baseline: 基线组; SHAM: 假手术组; OVX: 去卵巢组。大鼠在去卵巢后腰椎骨量呈先快速降低、再缓慢回升的趋势, 但整个观察期内都比假手术组要低。

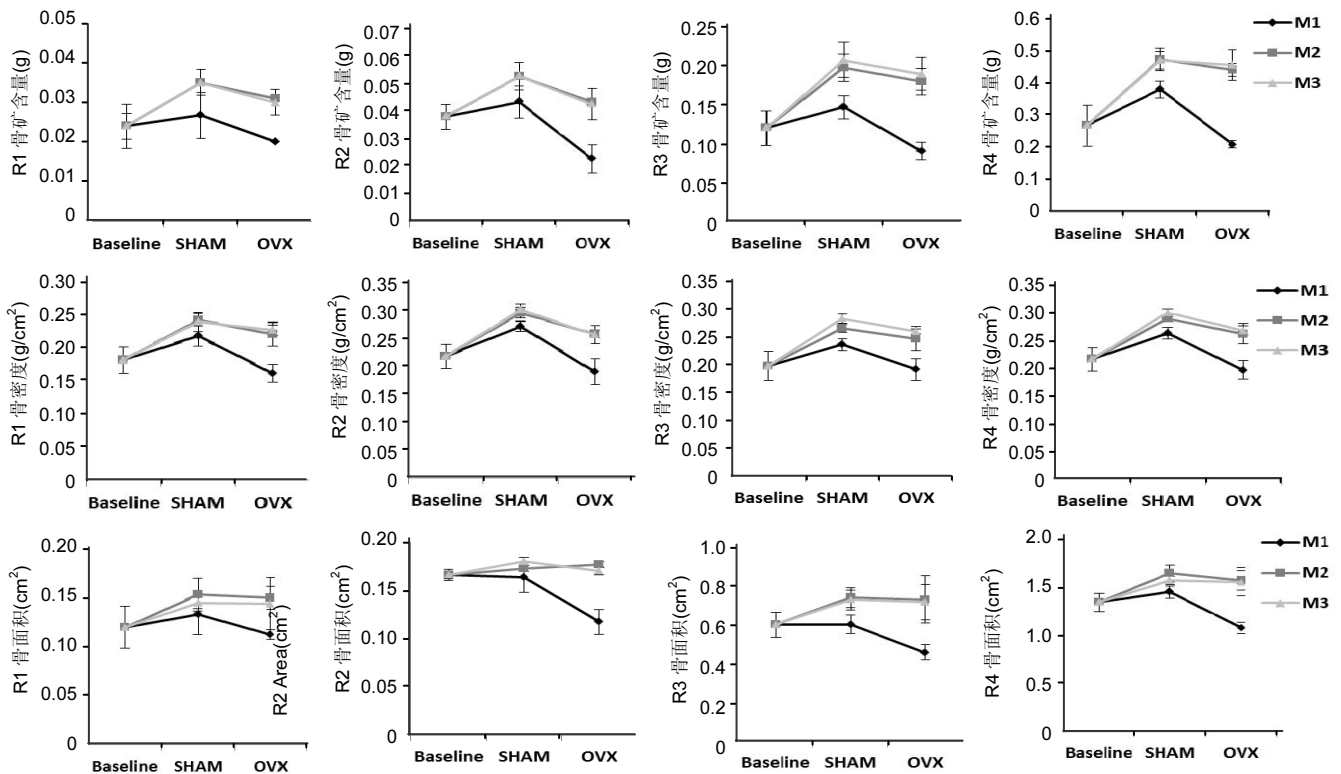


图3 大鼠离体股骨各感兴趣区域不同时期 DXA 扫描结果

Figure 3 The scanning results of the femoral range of interest *in vitro* of rats in different groups at different time using dual-energy X-ray absorption method

图注: Baseline: 基线组; SHAM: 假手术组; OVX: 去卵巢组; R1: 股骨头颈; R2: 股骨转子; R3: 股骨干; R4 股骨全段。大鼠在去卵巢后股骨骨量变化呈先快速降低、再缓慢回升的趋势, 但整个观察期内都比假手术组要低

表3 去卵巢大鼠体质量、离体骨密度、I型前胶原氨基端原肽、I型胶原羧基端肽、雌激素水平与月龄的相关性分析结果 (r)  
Table 3 The correlation analysis among body mass, bone mineral density *in vitro*, type I procollagen amino-terminal pro-peptide, I collagen carboxy-terminal peptide and estrogen and age of ovariectomized rats

|                      | 年龄                  | 体质量                 | L <sub>1</sub> 骨密度  | L <sub>2</sub> 骨密度  | L <sub>3</sub> 骨密度  | L <sub>1-3</sub> 骨密度 | R1骨密度               | R2骨密度               | R3骨密度               | R4骨密度               | I型前胶原氨基端原肽         | I型胶原羧基端肽           | 雌激素 |
|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-----|
| 年龄                   | 1                   |                     |                     |                     |                     |                      |                     |                     |                     |                     |                    |                    |     |
| 体质量                  | 0.849 <sup>b</sup>  | 1                   |                     |                     |                     |                      |                     |                     |                     |                     |                    |                    |     |
| L <sub>1</sub> 骨密度   | 0.744 <sup>b</sup>  | 0.868 <sup>b</sup>  | 1                   |                     |                     |                      |                     |                     |                     |                     |                    |                    |     |
| L <sub>2</sub> 骨密度   | 0.799 <sup>b</sup>  | 0.885 <sup>b</sup>  | 0.994 <sup>b</sup>  | 1                   |                     |                      |                     |                     |                     |                     |                    |                    |     |
| L <sub>3</sub> 骨密度   | 0.766 <sup>b</sup>  | 0.827 <sup>b</sup>  | 0.990 <sup>b</sup>  | 0.991 <sup>b</sup>  | 1                   |                      |                     |                     |                     |                     |                    |                    |     |
| L <sub>1-3</sub> 骨密度 | 0.788 <sup>b</sup>  | 0.870 <sup>b</sup>  | 0.996 <sup>b</sup>  | 0.997 <sup>b</sup>  | 0.996 <sup>b</sup>  | 1                    |                     |                     |                     |                     |                    |                    |     |
| R1骨密度                | 0.862 <sup>b</sup>  | 0.892 <sup>b</sup>  | 0.960 <sup>b</sup>  | 0.975 <sup>b</sup>  | 0.959 <sup>b</sup>  | 0.966 <sup>b</sup>   | 1                   |                     |                     |                     |                    |                    |     |
| R2骨密度                | 0.802 <sup>b</sup>  | 0.818 <sup>b</sup>  | 0.954 <sup>b</sup>  | 0.973 <sup>b</sup>  | 0.972 <sup>b</sup>  | 0.970 <sup>b</sup>   | 0.954 <sup>b</sup>  | 1                   |                     |                     |                    |                    |     |
| R3骨密度                | 0.870 <sup>b</sup>  | 0.845 <sup>b</sup>  | 0.896 <sup>b</sup>  | 0.920 <sup>b</sup>  | 0.899 <sup>b</sup>  | 0.909 <sup>b</sup>   | 0.967 <sup>b</sup>  | 0.929 <sup>b</sup>  | 1                   |                     |                    |                    |     |
| R4骨密度                | 0.856 <sup>b</sup>  | 0.848 <sup>b</sup>  | 0.931 <sup>b</sup>  | 0.954 <sup>b</sup>  | 0.939 <sup>b</sup>  | 0.944 <sup>b</sup>   | 0.980 <sup>b</sup>  | 0.966 <sup>b</sup>  | 0.985 <sup>b</sup>  | 1                   |                    |                    |     |
| I型前胶原氨基端原肽           | -0.725 <sup>a</sup> | -0.742 <sup>b</sup> | -0.940 <sup>b</sup> | -0.948 <sup>b</sup> | -0.968 <sup>b</sup> | -0.960 <sup>b</sup>  | -0.903 <sup>b</sup> | -0.966 <sup>b</sup> | -0.865 <sup>b</sup> | -0.903 <sup>b</sup> | 1                  |                    |     |
| I型胶原羧基端肽             | -0.619 <sup>a</sup> | -0.659 <sup>b</sup> | -0.872 <sup>b</sup> | -0.876 <sup>b</sup> | -0.898 <sup>b</sup> | -0.891 <sup>b</sup>  | -0.828 <sup>b</sup> | -0.928 <sup>b</sup> | -0.822 <sup>b</sup> | -0.857 <sup>b</sup> | 0.917 <sup>b</sup> | 1                  |     |
| 雌激素                  | -0.496              | -0.594              | -0.425              | -0.409              | -0.447              | -0.432               | -0.369              | -0.466              | -0.397              | -0.411              | 0.877 <sup>b</sup> | 0.947 <sup>b</sup> | 1   |

表注: 双变量相关分析显示月龄、体质量、腰椎及股骨各区域骨密度间呈正相关; I型前胶原氨基端原肽、I型胶原羧基端肽与腰椎、股骨各区域骨密度呈负相关。  
<sup>a</sup>表示在0.05水平(双侧)上显著相关; <sup>b</sup>表示在0.01水平(双侧)上显著相关。

表1 各组大鼠不同时期体质量、子宫及肾上腺质量变化 ( $\bar{x}\pm s$ , g)  
Table 1 The change of body mass, adrenal and uterine mass in different groups at different time points

| 组别   | 时间(年龄) | 体质量                        | 子宫质量<br>(Adrenal weight)  | 肾上腺质量<br>(Uterine weight) |
|------|--------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 基线组  | 实验开始时  | 218.20±12.62               | 0.546±0.152               | 0.059±0.012               |
| 假手术组 | 术后4周   | 255.50±5.36 <sup>bc</sup>  | 0.640±0.240 <sup>c</sup>  | 0.061±0.014               |
|      | 术后8周   | 276.00±5.51 <sup>bc</sup>  | 0.702±0.260 <sup>c</sup>  | 0.052±0.005               |
|      | 术后12周  | 319.00±24.25 <sup>bc</sup> | 0.746±0.133 <sup>bc</sup> | 0.053±0.014               |
| 去卵巢组 | 术后4周   | 315.25±41.06 <sup>b</sup>  | 0.200±0.089 <sup>a</sup>  | 0.053±0.007               |
|      | 术后8周   | 361.25±44.55 <sup>b</sup>  | 0.151±0.031 <sup>a</sup>  | 0.067±0.004               |
|      | 术后12周  | 394.25±47.28 <sup>b</sup>  | 0.123±0.052 <sup>b</sup>  | 0.040±0.013               |

表注: 各时间点假手术组和大鼠去卵巢组体质量均显著增加; 各时间点去卵巢组子宫质量较基线组、假手术组显著降低。与基线组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与去卵巢组比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$ 。

## 2.4 术后不同时期大鼠雌激素及骨生化指标变化 见表2。

去卵巢后4周时, 去卵巢组大鼠血清I型前胶原氨基端原肽及I型胶原羧基端肽水平较基线组、假手术组均显著升高( $P < 0.01$ ); 至术后8, 12周时, 去卵巢组大鼠血清I型前胶原氨基端原肽及I型胶原羧基端肽水平与基线组、假手术组比较, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); 去卵巢后骨转换状态变化规律为第1个月显著加快、后期逐渐回归正常。

术后4周, 去卵巢组及假手术组的血清雌激素水平比较差异无显著性意义, 但均高于基线组数值( $P < 0.05$ ); 去卵巢后第8, 12周去卵巢组较假手术组及基线组均明显降低(8周时 $P < 0.01$ , 12周时 $P < 0.05$ ); 去卵巢后雌激素水平变化规律为第1个月先升高、后期快速降低。

表2 不同时期各组大鼠I型前胶原氨基端原肽、I型胶原羧基端肽及雌激素水平的变化 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 The changes in type I procollagen amino-terminal pro-peptide, I collagen carboxy-terminal peptide and estrogen of rats in different groups at different time

| 组别   | I型前胶原氨基端原肽    | I型胶原羧基端肽                    | 雌激素                       |
|------|---------------|-----------------------------|---------------------------|
| 基线组  | 274.41±102.49 | 31.30±15.04                 | 126.30±17.68              |
| 假手术组 | 术后4周          | 173.00±125.12 <sup>d</sup>  | 19.05±13.22 <sup>c</sup>  |
|      | 术后8周          | 235.74±89.98                | 25.93±11.06               |
|      | 术后12周         | 161.31±115.34               | 17.99±11.63               |
| 去卵巢组 | 术后4周          | 1166.89±545.49 <sup>b</sup> | 106.78±68.68 <sup>a</sup> |
|      | 术后8周          | 213.25±57.95                | 22.39±7.08                |
|      | 术后12周         | 257.79±122.12               | 29.90±16.73               |

表注: 去卵巢后血清I型前胶原氨基端原肽及I型胶原羧基端肽水平变化规律为第1个月显著升高、后期逐渐回归正常; 去卵巢后雌激素水平变化规律为第1个月先升高、后期快速降低。与基线组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与去卵巢组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ 。

## 2.5 去卵巢大鼠体质量、骨量、骨转换指标、雌激素水平、月龄间的相关性分析 见表3。

双变量相关分析显示月龄、体质量、腰椎及股骨各区域骨密度间呈正相关( $P < 0.01$ ); I型前胶原氨基端原肽、I型胶原羧基端肽与腰椎、股骨各区域骨密度呈负相关( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论 Discussion

3.1 去卵巢后骨量变化规律 本实验发现, 去卵巢后4周去卵巢组离体腰椎、股骨各区域骨密度、骨矿含量结果均明显下降( $P < 0.05$ ), 且腰椎骨密度下降较股骨更为显著其

中局部又以L<sub>1</sub>、股骨转子部骨量丢失最严重,因此大鼠骨量减少尤以松质骨为主,与既往文献报道相符<sup>[5-7]</sup>。既往研究发现大鼠去卵巢后骨量丢失加快,4周后丢失60%<sup>[8]</sup>,骨丢失幅度较本研究结果高,可能与研究物种及月龄相关<sup>[9]</sup>。因而临床上对于绝经后女性患者,积极监测腰椎及股骨转子部的骨量变化,及早预防骨质疏松症的发生,同时重点评估绝经后骨质疏松症患者该部位的骨折风险尤为重要。

研究表明,生长发育与性激素、生长激素水平密切相关<sup>[10]</sup>,而骨面积是骨骼扫描区域矢状面的面积(高度和横断面直径的乘积),可反映骨骼的生长发育状况。本实验中大鼠切除卵巢后,雌激素总体呈下降趋势,通过影响胰岛素样生长因子轴从而影响生长激素的分泌和功能,抑制骨骼发育,故大鼠腰椎、股骨骨面积较假手术组呈下降趋势,由于本实验大鼠正值生长发育期(3月龄),为促进骨骼发育则骨面积代偿性升高,故总体来说去卵巢大鼠腰椎、股骨骨面积变化呈现先下降后上升的规律(图2, 3)。因此,单独依据骨矿含量或者骨密度全面评价骨量变化具有一定局限性,骨面积作为直接评价骨量改变的重要参数,可与骨转换指标共同参与评估骨代谢失衡。

**3.2 去卵巢后体质量的变化规律及其对骨量的影响** 本实验中,大鼠去卵巢后体质量随增龄快速增加,且增加幅度显著大于假手术组,该结果与韩天雨等<sup>[11]</sup>报道的结果基本上吻合。提示,切除卵巢是导致体质量增加的重要因素,与临床上绝经后女性容易出现肥胖或有肥胖倾向这一现象类似。研究表明由于绝经后卵巢萎缩,功能下降,雌激素分泌不足,继发一系列糖和脂肪代谢紊乱,因而体脂分布异常<sup>[12]</sup>。Rogers等<sup>[13]</sup>发现大鼠切除双侧卵巢后,血清雌激素水平下降,对下丘脑-垂体的反馈抑制作用减弱,导致大鼠进食量增加,体质量增加。本研究基于去卵巢后不同时间点对大鼠体质量变化进行观察,进一步佐证绝经/去卵巢可导致机体体质量增加甚至肥胖。

通过对体质量与骨密度相关性的研究,发现体质量与腰椎、股骨各感兴趣区域骨密度呈正相关,与既往临床研究报道一致<sup>[14-16]</sup>,进一步证实了体质量对骨量具有保护效应,因而健康、有效地维持绝经后女性体质量对于延缓骨量下降、降低骨折风险具有重要作用。

**3.3 去卵巢后骨转换状态变化规律及与骨量丢失的关系** 骨代谢或骨转换过程是成骨细胞形成新骨和破骨细胞吸收旧骨的过程,骨量的多少取决于同一骨重建单位中骨形成与骨吸收的平衡。目前,I型前胶原氨基端原肽及I型胶原羧基端肽是常见的骨形成及骨吸收生化标志物<sup>[17-18]</sup>,能动态反映全身骨代谢变化,较骨密度变化早、变化程度大,已被广泛地应用于骨质疏松防治及药物疗效监测。本实验发现,术后4周去卵巢大鼠I型前胶原氨基端原肽、I型胶原羧基端肽显著升高,说明成骨细胞及破骨细胞活性均增强,骨形成与骨吸收活跃,同时骨密度呈下

降趋势,表明去卵巢大鼠骨转换加快,骨吸收率大于骨形成率,表现为高转换型骨量丢失<sup>[19]</sup>。因此,I型前胶原氨基端原肽、I型胶原羧基端肽可用于临床上判定绝经后骨质疏松症患者的骨丢失情况。

本实验中,去卵巢大鼠I型前胶原氨基端原肽、I型胶原羧基端肽水平在8, 12周时与假手术组及基线组无统计学差异,总体表现为先升后降的规律,与临床上绝经后骨质疏松症患者I型前胶原氨基端原肽、I型胶原羧基端肽的变化趋势基本吻合<sup>[17]</sup>,表明I型前胶原氨基端原肽、I型胶原羧基端肽对早期骨量丢失非常敏感;同时,相关性分析显示,去卵巢大鼠I型前胶原氨基端原肽、I型胶原羧基端肽与腰椎及股骨骨密度呈负相关( $P < 0.01$ ),此结果与许爱萍等<sup>[20]</sup>的报道结果相似,结合大鼠骨量早期下降而后回升的特点,提示动态的I型前胶原氨基端原肽、I型胶原羧基端肽检测联合静态的骨密度测定,可更准确地预防早期骨量丢失及评估骨折风险。并且在治疗的过程中,I型前胶原氨基端原肽、I型胶原羧基端肽能比骨密度更早地反应治疗后骨代谢的改变,故三者联用在指导、调节用药,判断药物是否具有治疗反应,尽快调整患者的治疗方案等方面具有重要意义。

**3.4 去卵巢后雌激素水平的变化及与骨量丢失的关系** 既往研究表明,去卵巢大鼠骨质疏松模型中,摘除双侧卵巢而导致雌激素缺乏是引起骨量严重丢失的重要原因<sup>[21]</sup>。然而在本研究中发现,术后4周时去卵巢大鼠雌激素水平骤然升高,之后随月龄增加而降低,推测雌激素水平与腰椎、股骨骨密度呈负相关的研究结论应该是假象,这可能与去卵巢术后短期内雌激素水平应激性升高有关,根据既往文献报道,去卵巢术会促使雄烯二酮(主要由肾上腺皮质分泌)及雄烯二醇(由卵巢皮质间质细胞在高促性腺激素影响下产生)在脂肪组织中经芳香化酶作用而衍生成雌激素,但这种应激性作用只是暂时的,雌激素水平仍表现为总体下降趋势<sup>[16]</sup>。

本实验中实验大鼠正值生长发育及代谢旺盛期,骨量在去卵巢后快速下降,之后随月龄逐渐上升,但始终低于假手术组,因此,去卵巢后短期内应激性升高的雌激素对骨量丢失并未起到保护作用,其具体机制仍需进一步深入探讨。这样的规律提示如果绝经后女性雌激素水平不降反升,亦不可忽视绝经后骨质疏松症发生的可能性,应综合分析雌激素、骨转换状态及其他因素,积极监测雌激素水平变化,预防骨量减少及骨质疏松症的发生。

综上所述,本实验对去卵巢后大鼠骨量、血清雌激素水平及骨转换状态变化规律进行了清晰描述,这为进一步研究绝经后骨质疏松症的病理特点、发病机制及干预措施提供了一定的理论依据,但在后期研究中,仍应在临床研究中观察绝经后女性或去卵巢女性是否存在类似规律,以评估本实验所证实规律的临床参考价值,同时,对其发生机制应进行深入探讨。

**作者贡献:** 第一、二、三、六、七、八作者主要进行实验实施, 第四、五、九、十、十一作者收集资料, 第一作者成文, 第三作者审核。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 实验获得广州中医药大学第一附属医院动物伦理学委员会批准, 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

**学术术语:** 双能 X 线吸收测定法(DEXA)-通过 X 射线管球经过一定的装置所获得两种能量、即低能和高能光子峰。此种光子峰穿透身体后, 扫描系统将所接受的信号送至计算机进行数据处理, 得出骨矿物质含量。该仪器可测量全身任何部位的骨量, 精确度高, 对人体危害较小, 检测一个部位的放射剂量相等于一张胸片 1/30, QCT 的 1%。不存在放射源衰变的问题,

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, et al. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med.* 2008;58(5): 424-430.
- [2] Hamidi MS, Corey PN, Cheung AM. Effects of vitamin E on bone turnover markers among US postmenopausal women. *J Bone Miner Res.*2012;27(6):1368-1380.
- [3] 马俊岭,郭海英,阳晓东.骨质疏松症的流行病学概况[J].*中国全科医学*,2009,12(18):1744-1746.
- [4] 李素萍.骨质疏松动物模型的研究现状[J].*中国组织工程研究与临床康复*,2011,15(20):3767-3770.
- [5] Yoon KH, Cho DC, Yu SH, et al. The Change of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats: Analyses of Micro-CT Scan and Biochemical Markers of Bone Turnover. *J Korean Neurosurg Soc.*2012;51(5): 323-327.
- [6] Kim HK, Kim MG, Leem KH. Osteogenic activity of collagen peptide via ERK/MAPK pathway mediated boosting of collagen synthesis and its therapeutic efficacy in osteoporotic bone by back-scattered electron imaging and microarchitecture analysis. *Molecules.*2013;18(12): 15474-15489.
- [7] Ma B, Zhang Q, Wu D, et al. Strontium fructose 1,6-diphosphate prevents bone loss in a rat model of postmenopausal osteoporosis via the OPG/RANKL/RANK pathway. *ActaPharmacol Sin.*2012;33(4): 479-489.
- [8] Waarsing JH, Day JS, van der Linden JC, et al. Detecting and tracking local changes in the tibiae of individual rats: a novel method to analyse longitudinal in vivo micro-CT data. *Bone.* 2004;34(1):163-169.
- [9] Li CY, Schaffler MB, Wolde-Semait HT, et al. Genetic background influences cortical bone response to ovariectomy. *J Bone Miner Res.*2005;20(12): 2150-2158.
- [10] De Groot LJ, Jameson JL. *Growth hormone deficiency in adults: De Croot' Textbook of Endocrinology.* Philadelphia, Saunders.2006;1: 755-765.
- [11] 韩天雨,朴淑敏.去卵巢大鼠血清和骨髓细胞碱性磷酸酶水平变化的动态观察[J].*中国实验动物学报*,2014,22(4):37-40.
- [12] Schneider JG, Tompkins C, Blumenthal RS, et al. The metabolic syndrome in women. *Cardiol Rev.*2006;14: 286-291.
- [13] Rogers NH, Perfield JW, Strissel KJ, et al. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology.* 2009;150(5): 2161-2168.
- [14] Pinheiro MM, Reis Neto ET, Machado FS, et al. Risk factors for osteoporotic fractures and low bone density in pre and postmenopausal women.*Rev SaudePublica.*2010;44(3): 479-485.
- [15] Gourlay ML, Hammett-Stabler CA, Renner JB, et al. Associations between Body Composition, Hormonal and Lifestyle Factors, Bone Turnover, and BMD. *J Bone Metab.* 2014;21(1):61-68.
- [16] 朱锐,沈霖,杨艳萍.年龄、身高、体重、体重指数与武汉地区绝经后骨质疏松症患者骨密度的关系[J].*中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*,2010,3(4):234-238.
- [17] Li M, Li Y, Deng W, et al. Chinese bone turnover marker study: reference ranges for C-terminal telopeptide of type I collagen and procollagen I N-terminal Peptide by age and gender. *PLoS One.*2014;9(8):1-7.
- [18] 欧萌萌,黄建荣.绝经后妇女骨质疏松症患者血清β-Crosslaps、PINP和N-MID检测的评价[J].*标记免疫分析与临床*,2011,18(4): 238-240.
- [19] 赵玺,赵文,孙璟,等.骨代谢指标与骨关节炎及绝经后骨质疏松症的关系[J].*中国组织工程研究*,2014,18(2):245-250.
- [20] 许爱萍.骨代谢标志物与绝经后妇女骨质疏松症的相关性研究[J].*检验医学与临床*,2009,12(24):2019-2110.
- [21] 高植明.去卵巢大鼠骨质疏松模型特点及尼尔雌醇对其干预作用的研究[J].*中国医药导报*,2011,8(2):14-17.