

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

韩天雨, 卜淑敏

(首都体育学院, 北京 100191)

【摘要】 目的 动态观察去卵巢大鼠血清和骨髓细胞碱性磷酸酶(ALP)水平的变化。**方法** 将 80 只 3 月龄雌性 SD 大鼠按体重分层后随机分为基础组以及假手术和去卵巢 3、6、12、24 周组。分别在手术前(0)和手术后 3、6、12、24 周腹主动脉取血处死各组大鼠,分离血清,制备骨髓细胞甩片,用 721 分光光度计检测血清 ALP 水平的变化;用显微镜计数骨髓细胞甩片 ALP 阳性染色细胞的数目。**结果** 在假手术组大鼠中,血清 ALP 水平在手术后 3 周显著上升并持续到手术后 6 周,但在手术后 12 周开始显著下降并持续到手术后 24 周;骨髓细胞 ALP 阳性染色细胞数目在手术后 3 周显著上升并持续到手术后 12 周,但在手术后 24 周却显著下降。在去卵巢组大鼠中,血清 ALP 水平在手术后 3 周显著上升,到手术后 6 周开始显著下降并一直持续到手术后 24 周;骨髓细胞 ALP 阳性染色细胞数目在手术后 3 周显著下降并持续到手术后 24 周。从手术后 3 周开始,去卵巢组大鼠血清 ALP 水平均显著高于假手术组大鼠,但骨髓细胞 ALP 阳性染色细胞数目均显著低于假手术组大鼠。**结论** 假手术组大鼠血清和骨髓细胞 ALP 水平变化趋势基本相似,但去卵巢大鼠血清和骨髓细胞 ALP 水平变化趋势不同。

【关键词】 去卵巢大鼠;碱性磷酸酶;骨质疏松;骨髓细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 04-0037-04

Doi:10. 3969/j. issn. 1005-4847. 2014. 04. 009

Dynamic changes of serum and bone marrow alkaline phosphatase levels in ovariectomized rats

HAN Tian-yu, BU Shu-min

(Capital University of Physical Education and Sports, Beijing 100191, China)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to observe the dynamic changes of serum and bone marrow levels of alkaline phosphatase (ALP) in ovariectomized (OVX) rats. **Methods** Eighty 3-month-old non-pregnant female Sprague Dawley rats were randomly divided into following groups by body weight: baseline group, sham-operation (Sham), and ovariectomized (OVX) rat groups. The rats were killed at 0, 3, 6, 12 or 24 weeks after operation. The changes of serum and bone marrow alkaline phosphatase (ALP) levels were detected with photometer-721 and the number of ALP-positive bone marrow cells was detected with a research grade upright fluorescence microscope. **Results** In the sham group, the serum ALP levels were significantly increased in the weeks 3 until the week 6. However, the serum ALP levels were significantly decreased in the week 12 until the week 24. The ALP-positive cell number in the bone marrow was significantly increased in the week 3 until week 12, but significantly decreased in the week 24. In the OVX group, the serum ALP levels were significantly increased in the week 3, but significantly decreased in the week 6 until the week 24. The number of ALP-positive bone marrow cells was significantly decreased in the week 3 until the week 24. In addition, the serum ALP

【基金项目】北京市市属高等院校校长城学者培养项目(CIT&TCD20130337)和北京市教委科技创新平台项目(No. PXM2012-014206-000051)资助。

【作者简介】韩天雨(1989-),男,运动人体科学专业硕士研究生。

【通讯作者】卜淑敏(1967-),女,教授,博士,硕士生导师。主要从事运动医学研究。Tel: 13691446652;Email: boshumin@163.com。

levels in the OVX group were significantly higher than that of the sham group. However, the number of ALP-positive bone marrow cells was significantly lower than that of the sham group. **Conclusions** The change tendency of serum ALP in the sham group is similar with that of bone marrow cells. But the change tendency of serum ALP in OVX rats is different from that of bone marrow cells.

【Key words】 Ovariectomized rats; Alkaline phosphatase; Osteoporosis; Bone marrow cells

骨质疏松是一种常见的慢性骨代谢性疾病,最典型的骨质疏松是由绝经引发雌激素缺乏导致的绝经后骨质疏松^[1]。绝经后骨质疏松的预防和治疗目前仍具有挑战性,正日益成为一个公众健康问题。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP),可由成骨细胞分泌,是反映骨形成和骨转换的一个重要骨代谢生化指标,常用作骨质疏松诊断和治疗的参考指标^[2]。鉴此,本实验采用国内外通用的去卵巢大鼠模型^[3,4],动态观察了去卵巢大鼠血清 ALP 水平和骨髓细胞 ALP 阳性染色细胞数目的变化,旨在揭示 ALP 在去卵巢大鼠血清和骨髓细胞中的变化规律,为探讨绝经后骨质疏松的发病机制提供理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

721E 型分光光度计:上海光谱仪器厂;尼康高级研究级正置生物显微镜:尼康仪器(上海)有限公司;细胞涂片离心机:湘雅离心机厂;碱性磷酸酶检测试剂盒:南京建成生物科技有限公司(A059-1);NBT-BCIP 染色试剂盒:北京中杉金桥生物科技有限公司(ZLI-9041)。

1.2 动物手术与分组

SPF 级 3 月龄雌性未孕 SD 大鼠 80 只,体重(263.91 ± 11.93) g,由北京维通利华实验动物中心提供[SCXK(京)2011-0012]。无菌手术在北京大学医学部实验动物科学部进行[SYXK(京)2011-0039],并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。自由饮水及进食,标准啮齿类动物饲料。

适应性喂养 1 周后,按体重分层后随机分为基础组、假手术 3、6、12、24 周组以及去卵巢 3、6、12、24 周组,共计 9 组。除基础组外,其他各组都进行手术,手术前三组大鼠均禁食 12~18 h,腹腔注射 10% 水合氯醛(3 mL/kg)麻醉,去卵巢组大鼠从背部切除双侧卵巢,假手术组不切除卵巢,而将卵巢旁与卵巢等大的脂肪组织切除。术后自由进食水,实验过程中,假手术 3 周组 2 只、去卵巢 6 周组 2 只大鼠因腹部粘连在手术后 2 周内死亡,最后纳入实验的各组大鼠的数目分别为:基础组 7 只,假手术 3 周

组 8 只,假手术 6 周组 10 只,假手术 12 周组 9 只,假手术 24 周组 8 只,去卵巢 3 周组 8 只,去卵巢 6 周组 7 只,去卵巢 12 周组 9 只,去卵巢 24 周组 10 只,共计 76 只。

1.3 血清 ALP 水平的检测

基础组大鼠在适应性喂养 1 周后处死,其他大鼠分别在手术后 3、6、12 和 24 周处死。处死前,大鼠禁食 12 h,腹腔注射 10% 水合氯醛(3 mL/kg)麻醉,腹主动脉取血后,分离血清。血清 ALP 水平的测定采用 721E 型分光光度计,实验操作完全按照试剂盒说明书完成。此试剂盒仅适用于科研、实验室的人与动物血清及组织匀浆样本中的 ALP 水平检测,不可用于临床诊断,货号 A059-1。

1.4 全骨髓细胞 ALP 染色

大鼠腹主动脉取血处死后,迅速游离子宫并称重以确定手术的成功。游离右侧股骨和胫骨,用咬骨钳剪去股骨和胫骨两端的骨骺,用装有 PBS 的 5 毫升注射器反复冲洗骨髓腔,将冲出的骨髓液,1000 r/min,室温离心 5 min,弃上清液,沉淀用 PBS 洗 2 次后,用细胞涂片离心机制备细胞涂片。细胞涂片用 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, PBS 冲洗两次,每次 5 min,滴加 NBT/BCIP 显色液,显微镜下观察显色结果,流水冲洗后,用水溶性封片剂封片,然后照相。每组随机取 3 只大鼠的 3 张骨髓细胞涂片,每张片子在高倍镜下计数 6 个视野中 ALP 阳性染色的细胞的数目,每组累计计数 500 个细胞。

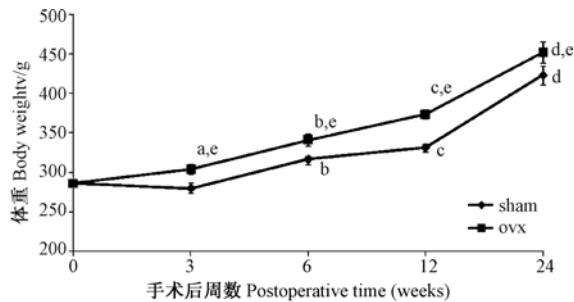
1.5 统计学处理

实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计,进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 大鼠体重的动态变化

由图 1 可知,与基础组比较,假手术 3 周组体重无显著变化($P < 0.05$),去卵巢 3 周组体重显著增加($P < 0.05$);在手术 3 周后,假手术和去卵巢组大鼠体重随着饲养时间的延长均连续显著增加;从手术后 3 周开始,去卵巢组大鼠体重均显著高于假手术组大鼠($P < 0.05$),并在 12 周时出现极显著差异($P < 0.05$)。



注:与0周4组比较;a, $P < 0.05$;与3周组比较;b, $P < 0.05$;与6周组比较;c, $P < 0.05$;与12周组比较;d, $P < 0.05$;与假手术组比较:e, $P < 0.05$ 。

图1 各组大鼠手术后体重的变化

Note. Compared with the baseline group: a: $P < 0.05$; Compared with the third week group: b: $P < 0.05$; Compared with the sixth week: c: $P < 0.05$; Compared with the twelfth week group: d: $P < 0.05$; Compared with the sham group: e, $P < 0.05$.

Fig. 1 Changes of body weight in the rats after operation

2.2 大鼠血清 ALP 水平的动态变化

由图2可知,在假手术组大鼠中,手术后3周血清 ALP 水平显著上升($P < 0.05$)并持续到手术后6周,但手术后12周血清 ALP 水平却显著下降($P < 0.05$)并持续到手术后24周;在去卵巢组大鼠中,手术后3周血清 ALP 水平显著上升($P < 0.05$),但手术后6周血清 ALP 水平显著下降($P < 0.05$)并持续到手术后24周($P < 0.05$);从手术后3周开始,去卵巢组大鼠血清 ALP 水平均显著高于假手术组大鼠($P < 0.05$),并在3周、12周时出现极显著差异($P < 0.01$)。

表1 各组大鼠骨髓细胞 ALP 阳性染色细胞数目的比较/每500个

Tab. 1 Comparison of the numbers of ALP-positive bone marrow cells in all groups

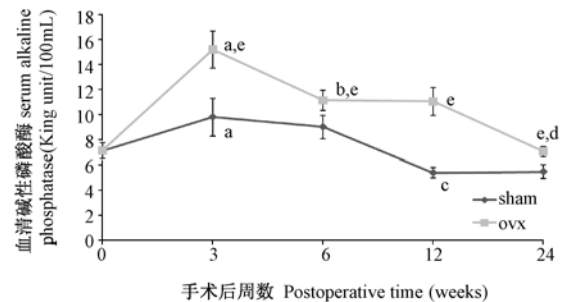
组别 Groups	0周	3周	6周	12周	24周
假手术组 Sham groups	169	201 ^a	200	197	153 ^d
去卵巢组 OVX groups	169	139 ^{a, e}	135 ^e	133 ^e	91 ^{d, e}

注:与0周组比较;a, $P < 0.05$;与12周组比较;d, $P < 0.05$;与假手术组比较:e, $P < 0.05$ 。

Note. a: $P < 0.05$, compared with the baseline group; d: $P < 0.05$, compared with the 12-week group; e: $P < 0.05$, compared with the sham group.

3 讨论

假手术3周后,大鼠体重与基础组比较无显著变化,在6周后显著增加并持续到实验结束。提示,大鼠体重随增龄而增加,但手术可短暂阻止大鼠体重的增加。在去卵巢组中,手术后3周体重就显著高于0周组,其随增龄上升的趋势一直持续到实验结束。提示,尽管有去卵巢手术的影响,但也抑制不了因缺乏雌激素而导致的体重上升。此外,在整个实验进程中,去卵巢组大鼠体重始终显著高于假手



注:与0周组比较;a, $P < 0.05$;与3周组比较;b, $P < 0.05$;与6周组比较;c, $P < 0.05$;与12周组比较;d, $P < 0.05$;与假手术组比较:e, $P < 0.05$ 。

图2 各组大鼠手术后血清 ALP 水平的变化

Note. a: $P < 0.05$, compared with the baseline group; b: $P < 0.05$, compared with the 3-week group; c: $P < 0.05$, compared with the 6-week group; d: $P < 0.05$, compared with the 12-week group; e: $P < 0.05$, compared with the sham group.

Fig. 2 Changes of serum alkaline phosphatase in the rats after operation

2.3 大鼠骨髓细胞 ALP 阳性染色细胞数目的动态变化

由图3(彩插4)和表1可知,在假手术组大鼠中,手术后3周骨髓细胞 ALP 阳性染色细胞数目显著增加($P < 0.05$)并持续到手术后12周,但在手术后24周却显著下降($P < 0.05$);在去卵巢组大鼠中,手术后3周骨髓细胞 ALP 阳性染色细胞数目显著下降($P < 0.05$)并持续到手术后24周;从手术后三周开始,去卵巢组大鼠骨髓细胞 ALP 阳性染色细胞数目均显著低于假手术组大鼠($P < 0.05$)。

术组,此结果与 Carey 等人的报道结果相似^[5]。

血清 ALP 是一种同工酶糖蛋白,主要来源于肝脏和骨骼,其中来源于骨骼的占40%~75%,由成骨细胞产生。血清 ALP 活性测定主要用于诊断肝胆和骨骼系统疾病,临床上除肝脏疾患、妊娠等因素外,血清 ALP 还可反映成骨情况。在骨代谢旺盛时,成骨细胞活跃,ALP 分泌量增加,并存在于成骨细胞的周围及其表面,极易释入血中,使血清 ALP 活性上升。因此,血清 ALP 可作为骨重建活跃性改变的标志之一^[6-9]。本研究发现,假手术组大鼠血

清 ALP 水平呈先升高后下降的趋势,即在手术后 3 周出现显著上升并维持到 6 周,但在手术后 12 周出现显著下降。提示,增龄能导致大鼠血清 ALP 水平呈现动态变化,在峰值保持一段时间后随着最大生育日龄的迫近而出现下降。去卵巢大鼠血清 ALP 水平呈现先升高后下降的趋势,在手术后 3 周出现显著上升,在手术后 6 周出现显著下降并持续到手术后 24 周。该结果与于志锋等^[10]报道的结果基本上吻合,即大鼠去卵巢后,血清 ALP 出现较大幅度的波动性变化,表现为先升、后降、再升并保持平稳状态。提示,大鼠在去卵巢手术后早期,由于骨转换加快,破骨分化加剧,代偿性地引起成骨分化加剧,骨骼中的 ALP 释放到血液导致血清 ALP 显著上升,而增龄到 24 周时,血清 ALP 水平较 12 周,又显著下降,说明大鼠骨骼的成骨分化减弱,已产生大规模的骨量丢失,骨质疏松症完全形成。比较假手术组和去卵巢组大鼠,发现两组大鼠血清 ALP 变化趋势虽然相似,但去卵巢组大鼠血清 ALP 水平始终高于假手术组,且变化幅度较大。提示,去卵巢组大鼠的骨转换明显快于假手术组,这可能是造成去卵巢大鼠骨质疏松的主要原因。

虽然血清 ALP 是一项衡量骨代谢水平的重要生化指标,测试简便的同时还可以在保证实验动物生存的情况下进行取材检测,但是骨髓 ALP 比血清 ALP 更具有代表性,更能直接显示成骨分化的状况^[11]。因此,国内外相关研究一致认为,骨髓 ALP 水平是反映骨转换过程更特异、更准确、更灵敏的指标。为此,本研究镜下统计了大鼠全骨髓细胞中 ALP 阳性染色细胞的数目。结果显示,假手术组大鼠骨髓 ALP 阳性染色细胞数目呈先上升后下降的趋势,即在手术后 3 周出现显著上升,在手术后 24 周出现显著下降,变化趋势与假手术大鼠血清 ALP 动态变化相似。提示,假手术组大鼠血清 ALP 水平可间接反应骨髓细胞 ALP 的变化趋势。其科学意义在于可以预示用正常人群血清 ALP 水平间接反映其骨髓细胞骨代谢的情况。本实验中,去卵巢组大鼠骨髓 ALP 阳性染色细胞数目呈阶梯式下降趋势,即在手术后 3 周出现显著下降,在手术后 24 周再次出现显著下降,变化趋势与去卵巢组大鼠血清 ALP 动态变化不同。提示,大鼠去卵巢后骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化能力下降,成骨能力减弱,同时,在去卵巢手术后早期由代偿性成骨分化引起的 ALP 分泌上升可能迅速释放入血液,并未积聚在骨髓中。此外,自手术后 3 周开始,去卵巢组大鼠骨

髓 ALP 阳性染色细胞数目始终显著低于假手术组。提示,去卵巢大鼠骨质疏松的发生与骨髓基质细胞成骨分化能力的减弱有关。

综上所述,本实验的结果表明,假手术组大鼠血清和骨髓细胞 ALP 水平变化趋势基本相似,但去卵巢大鼠血清和骨髓细胞 ALP 水平变化趋势不同。提示,去卵巢能导致大鼠全骨髓细胞 ALP 水平的改变,即成骨分化能力的改变。

(本文图 3 见彩插 4。)

参 考 文 献

- [1] Hidaka S, Okamoto Y, Uchiyama S, et al. Royal jelly prevents osteoporosis in rats: beneficial effects in ovariectomy model and in bone tissue culture model [J]. *Evid Based Complement Alternat Med* 2006, 3(3):339-348.
- [2] Wysocki A, Butler M, Shamliyan T, et al. Whole-body vibration therapy for osteoporosis: state of the science [J]. *Ann Intern Med*. 2011, 155(10):680-686.
- [3] Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss [J]. *Bone Miner*. 1991, 15(3):175-191.
- [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] Carey DG, Jenkins AB, Campbell LV, et al. Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women: direct measures reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM [J]. *Diabetes*, 1996, 45:633-638
- [6] Flieger J, Karachalios T, Khaldi L, et al. Mechanical stimulation in the form of vibration prevents postmenopausal bone loss in ovariectomized rats [J]. *Calcif Tissue Int*, 1998, 63(6):510-514.
- [7] Alborzi A, Mac K, Glackin CA, et al. Endochondral and intramembranous fetal bone development: osteoblastic cell proliferation and expression of alkaline phosphatase, m-twist, and histone H4 [J]. *J Craniofac Genet Dev Boil*, 1996, 16(2):94-106.
- [8] Choi MJ. Effects of taurine supplementation on bone mineral density in ovariectomized rats fed calcium deficient diet [J]. *Nutr Res Pract*, 2009, 3(2):108-113.
- [9] Lee YB, Lee HJ, Kim KS, et al. Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(5):1040-1045.
- [10] 于志锋, 顾淑珠, 高建军, 等. 去势大鼠血清 ALP 动态及骨髓细胞骨形成相关基因表达研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2004, 10(2):152-154.
- [11] Srikantha P, Nagrajappa SH, Viswanatha GL, et al. Anti-osteoporotic activity of methanolic extract of an India herbal formula NR/CAL/06 in ovariectomized rats [J]. *J Chin Integr Med*, 2011, 9(10):1125-1131.

[收稿日期] 2014-01-24