



外源性 H₂S 供体 GYY4137 对 OVX 大鼠骨转换标志物的影响

彭 斌, 谭光华, 杨俊涛, 符 勇, 谭文甫^{通讯作者} (南华大学附属第二医院创伤骨科, 湖南衡阳 421001)

摘要: 目的 观察硫化氢 (H₂S) 供体 GYY4137 对双侧卵巢切除 (OVX) 大鼠骨转换标志物水平的影响。方法 选取 6 月龄 SPF 级健康雌性 SD 大鼠随机分成 5 组: 假手术组 (SHAM)、模型对照组 (OVX)、GYY4137 高、中、低剂量组, 每组 8 只。假手术组大鼠行双侧卵巢探查术, 其他大鼠行双侧卵巢摘除术以建立骨质疏松模型。随后 GYY4137 组大鼠给予 10, 30 和 50mg/kg GYY4137。12 周后留取相应标本并处死大鼠, 测定血清中 Ca²⁺、P、E₂ 浓度, 以及碱性磷酸酶 (ALP)、骨钙素 (OC) 和抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRACP) 的含量。结果 卵巢切除大鼠 4 周后, OVX 组大鼠血清 Ca²⁺、P、E₂ 的含量明显降低。GYY4137 干预后, Ca²⁺、P、E₂ 水平随之增高; OVX 组大鼠血清中 ALP、OC 含量明显低于假手术组 (P<0.05), 而 TRACP 较对照组有所升高 (P<0.05)。经 GYY4137 处理后, 与 OVX 组相比, ALP 和 OC 明显增高 (P<0.05), TRACP 显著降低 (P<0.05)。结论 GYY4137 可以增加去卵巢大鼠能显著提高血清中 Ca²⁺、P、E₂ 浓度, 改善骨转换标志物水平。

关键词: 硫化氢 护骨素 细胞核因子 κ B 受体活化因子配体

中图分类号: R713.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-5187 (2016) 09-101-02

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是由多种原因引起的一种代谢性骨病变, 临床上主要表现为骨折或骨骼疼痛^[1]。因此寻找新的有效的骨质疏松症治疗策略和方法对防治本病具有重要意义。近年来, 气体分子硫化氢 (hydrogen sulfide, H₂S) 在细胞中作为一种新的信息传递分子, 已经引起学者们的关注^[2]。H₂S 广泛分布于机体各组织, 并具有极其广泛的生理作用, 亦与较多种疾病的发生、发展有关^[3]。H₂S 在骨骼中表达和分布, 这表明 H₂S 可能参与了骨骼的代谢^[4]。研究显示 H₂S 能减少 H₂O₂ 对成骨细胞 (Osteoblasts) MC3T3-E1 细胞系发生的氧化损伤从而增强成骨的作用^[5]。故以 H₂S 为出发点, 有望成为治疗 OP 的一种新策略。本研究通过双侧卵巢切除 (OVX) 建立骨质疏松大鼠模型, 观察外源性 H₂S 供体 GYY4137 对大鼠骨转换标志物水平的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

将 SPF 级大鼠购自大鼠 (动物许可证号: SCXK (湘) 2015-0001, 体重 260 ~ 290g) 购自南华大学实验动物中心。钙、磷检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品, 血清骨钙素试剂盒购自上海纪宁生物科技有限公司; 雌激素 E₂ 检测试剂盒购自上海慧佳生物科技有限责任公司。

1.2 骨质疏松动物造模的建立

采用手术摘除大鼠双侧卵巢的方法建立骨质疏松动物模型 (去势法)。即, 大鼠予以 10% 水合氯醛 (300mg/kg) 腹腔注射全身麻醉后将其固定于手术台上, 消毒铺巾后取腹部正中切口, 沿腹直肌正中进入腹腔进入腹腔。从手术视野中寻找乳白色脂肪团, 寻找并分离卵巢组织并切除。术后每只大鼠术后注射 20000U 青霉素, QD, 连用 3 日。假手术 (SHAM) 大鼠仅切除卵巢周围部分脂肪组织, 其他条件与模型组相同。所有大鼠饲养条件相同, 自由饮食、饮水。双侧卵巢切除后 12 周, 检测骨密度, 判断绝经期骨质疏松症动物模型是否建立成功。

1.3 实验分组

根据处理因素的不同, 将存活的大鼠分为 5 组, 每组 8 只。(1) 假手术组 (SHAM): 腹腔注射等体积生理盐水; (2) 模型组 (OVX 组): 腹腔注射等体积生理盐水; (3) GYY4137 低剂量组: 腹腔注射 GYY4137 10mg/kg; (4) GYY4137 中剂量组: 腹腔注射 GYY4137 30mg/kg; (5) GYY4137 高剂量组: 腹腔注射 GYY4137 50mg/kg。实验分组后 1d 开始给药 (QD), 12 周后处死大鼠。实验期间每周称量体重 1 次, 观察期间自由摄食和饮水。

1.4 骨矿物质和骨密度的测定

大鼠处死后, 获取右侧股骨, 并剔除上面附着的肌肉筋膜 (保留完整的骨膜), 置于 10% 福尔马林溶液中固定。采用双能 X 线骨密度测定仪测量大鼠股骨的骨密度 (g/cm²), 其中扫描速度是 10mm/s, 扫描间距为 0.5mm×0.5mm。根据软件计算单位面积内的骨矿物质含量 (g/cm²)。

1.5 血清骨转换指标测定

血清碱性磷酸酶 (ALP) 和抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRACP) 采用本院检验科全自动生化分析仪测定。血清骨钙素 (OC) 采用放免法测量, 即获取血清, 充分混匀后 4℃ 3000rpm 离心 5min, 获取上清, 按照试剂盒提供的步骤在聚苯乙烯管中构建反应体系, 室温静置 15min; 4℃ 3000rpm 离心 25min, 获取上清置于液体闪烁计数器用于测定 OC。

1.6 大鼠血清 Ca²⁺、P、E₂ 的检测

SD 大鼠造模并采用 GYY4137 干预 12 周后, 颈静脉获取全血 3ml, 离心制备血清, 采用全自动生化分析仪测定血清中 Ca²⁺ 和 P 的浓度, 并采用电化学发光免疫分析技术检测 E₂ 的浓度。

1.7 统计学分析

用 SPSS22.0 软件包对 3 次重复实验获得的数据进行统计学分析, 结果以均数 ± 标准差表示, 并对其进行 one way ANOVA 方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况与造模情况

各组大鼠均能自由活动, 未见明显的行为学上异常。无拒食、胀气、腹泻、眼球突出等正常。卵巢切除组大鼠 (OVX 组) 精神略显萎靡, 体毛有轻度的干枯不齐。其余各组大鼠一般状态良好。在喂养过程中, 假手术组 (Sham)、GYY4137 高剂量组各死亡 2 只, OVX 组、GYY4137 低剂量组各死亡 1 只, 取材时发现 GYY4137 高剂量组有 1 只大鼠卵巢未完全摘除, 以上大鼠均未列入统计范畴。获取股骨行骨密度测定, 结果显示 OVX 大鼠骨密度明显低于假手术组。这表明造模成功。

2.2 GYY4137 对骨转换指标的影响

与 SHAM 组相比, OVX 组 ALP 和 OC 显著降低, 而 TRACP 明显升高。经 GYY4137 治疗后, 随着 GYY4137 浓度的增高, TRACP 逐渐降低, 而 ALP 和 OC 则逐渐增高。其中 50mg/kg GYY4137 处理后, TRACP、ALP 和 OC 均与 SHAM 组相比无统计学意义 (P<0.05), 见表 1。

表 1: GYY4137 对骨转换指标的影响

	TRACP (U/L)	ALP (IU/L)	OC (μg/L)
SHAM 组	19.21±3.24	10.02±1.44	2.43±0.25
OVX 组	29.32±4.22*	7.17±1.85*	0.97±0.11*
GYY4137 (10mg/kg)	26.65±3.05	8.14±0.97	1.26±0.37
GYY4137 (30mg/kg)	24.08±2.87#	8.98±0.15#	1.78±0.41#
GYY4137 (50mg/kg)	21.17±2.36* [△]	9.34±0.62* [△]	2.34±0.19#

与 SHAM 组相比, *P<0.05; 与 OVX 组相比, #P<0.05; 与 SHAM 组相比, [△]P>0.05

2.3 GYY4137 对血清 Ca²⁺、P、E₂ 的影响

大鼠造模 12 周且 GYY4137 干预 12 周后, 获取全血测定血清中 Ca²⁺、P 和 E₂ 的浓度。与 SHAM 组相比, OVX 组大鼠血清 Ca²⁺、P、E₂ 的含量明显降低。而 GYY4137 干预后, 随着其浓度的增高, Ca²⁺、P、E₂ 水平也随之增高 (表 2)。

表 2: GYY4137 对血清 Ca^{2+} 、P、 E_2 的影响

	Ca^{2+}	P	E_2
SHAM 组	3.49 ± 0.57	1.99 ± 0.32	12.66 ± 0.71
OVX 组	$1.38 \pm 0.28^*$	$0.42 \pm 0.19^*$	$4.57 \pm 0.35^*$
GYY4137 (10mg/kg)	1.44 ± 0.25	$0.68 \pm 0.21^{\#}$	5.34 ± 0.44
GYY4137 (30mg/kg)	$2.41 \pm 0.17^{\#}$	$1.35 \pm 0.11^{\#}$	$7.62 \pm 0.26^{\#}$
GYY4137 (50mg/kg)	$3.02 \pm 0.23^{\# \Delta}$	$1.78 \pm 0.16^{\# \Delta}$	$9.87 \pm 0.32^{\#}$

与 SHAM 组相比, $^*P < 0.05$; 与 OVX 组相比, $^{\#}P < 0.05$; 与 SHAM 组相比, $^{\Delta}P > 0.05$

3 讨论

去卵巢大鼠模型的优点较多, 如可重复性、手术简单、周期短等, 在模拟正常妇女绝经后高转换型 OP 的效果较理想。故该模型已被一致认定为绝经早期骨丢失的经典模型^[6, 7]。研究发现模拟成年大鼠 OP 模型的合适年龄为 3 ~ 9 月龄。本实验切除 6 月龄 SD 雌鼠卵巢, 制造 OP 模型, 观察 OPG/RANKL 的表达是否需要 H_2S 调节, 治疗绝经后的 OP 有理想的效果。

钙、磷等无机盐是参与调控骨代谢的重要因素, 为了观察 H_2S 对去势骨质疏松模型大鼠抗骨质疏松作用, 本研究通过 GYY4137 干预 OVX 大鼠后, 对血清 Ca^{2+} 、P 和 E_2 的浓度进行了测定。结果显示, OVX 大鼠血清中 Ca^{2+} 、P、 E_2 浓度显著降低。而给予不同浓度 GYY4137 处理后, Ca^{2+} 、P、 E_2 水平有不同程度增加, 这表明在去势大鼠模型当中, GYY4137 能显著提高血清中 Ca^{2+} 、P、 E_2 浓度, 从而增加 Ca^{2+} 、P 在骨骼中的沉积量, 促进体内分泌雌激素, 提高抗骨质疏松相关因子在体内的作用。

为了进一步观察 H_2S 对骨质疏松的治疗效果, 随后对骨转换标志物进行了检测。与钙、磷等无机盐相比, 骨转换标志物能反映瞬间的骨代谢状态, 同时, 骨吸收标志物通常在 1 ~ 3 个月内即开始降低, 比骨盐含量发生时间更早。ALP 是成骨细胞活性的标志, 通常与骨矿化密切相关。OC 是由成骨细胞和成牙质细胞合成的特殊骨蛋白, 它由成骨细胞合成后, 约 20% 的 OC 直接进入血液, 反应的是尚未与骨结合的游离蛋白。因此血中 OC 是评价骨形成的特异性指标。TRACP 来源于破骨细胞, 是骨吸收和破骨细胞活性的良好标志物, 测定血清中 TRACP 的浓度, 有助于了解生理条件和各种病理条件下的骨代谢状况^[8]。本研究发现, OVX 组 ALP 和 OC 显著降低, 而 TRACP 明显升高。经 GYY4137 治疗后, 随着 GYY4137 浓度的增高, TRACP 逐渐降低, 而 ALP 和 OC 则逐渐增高, 这表明 H_2S 能抑制骨吸收, 从而维持一定的骨形成。

(上接第 99 页)

一系列具有重要生理、病理学作用的自由基及硝基化合物。氧自由基会攻击生物膜中的不饱和脂肪酸, 从而引起脂质过氧化作用, 而且由此而形成脂质过氧化物。脂质过氧化物作用不仅将活性氧转化为活性化学剂, 而且通过链式反应, 增强了活性氧的作用。SOD 则可以激发超氧离子自由基发生歧化反应, 从而阻断了该自由基损伤组织以及降解 NO。SOD 对机体的氧化与抗氧化平衡具有比较重要的作用, 其能够催化超氧自由基转化为氧及 H_2O_2 , 对超氧氢离子自由基具有很好地清除作用, 从而很好地保护细胞免疫损伤。SOD 水平属于外周神经组织抗自由基影响力的一项十分重要的指标, SOD 活力大小与炎症及自身免疫疾病存在较为紧密的关系。本研究结果显示: 观察组疗效显著优于对照组, 且观察组治疗前后 SOD 及 NO 水平变化程度显著大于对照组。

(上接第 100 页)

[1] 张天毅, 闻成艳. 他汀类药物治疗心血管疾病依从性相关因素临床分析[J]. 中国医学工程, 2014, 01:7-8.

[2] 吴菁华. 他汀类联合心血管药物治疗心血管疾病的临床效果分析[J]. 当代医学, 2014, 03:151-152.

总之, OP 症是目前疾病中对人类健康有严重影响的一类疾病, 故研发防治 OP 症高效、安全的药物是形势所迫。该实验发现 GYY4137 可提高 OPG/RANKL 比值, 通过使破骨细胞的活性降低而减少骨吸收, 该过程可能与 GYY4137 在治疗绝经后 OP 关联密切。目前尽管研究仅处于初步阶段, 但高效和安全的 GYY4137 可能具有临床应用潜力, 特别是在骨质疏松症防治中其应用前景一片光明。

参考文献

[1] Lin TH, Lung CC, Su HP, et al. Association between periodontal disease and osteoporosis by gender: a nationwide population-based cohort study[J]. Medicine (Baltimore), 2015,94(7):e553.

[2] Fang H, Jing T, Liu Z, et al. Hydrogen sulfide interacts with calcium signaling to enhance the chromium tolerance in *Setaria italica*[J]. Cell Calcium, 2014,56(6):472-481.

[3] Martelli A, Testai L, Marino A, et al. Hydrogen sulphide: biopharmacological roles in the cardiovascular system and pharmaceutical perspectives[J]. Curr Med Chem, 2012,19(20):3325-3336.

[4] Okada M, Ishkitiev N, Yaegaki K, et al. Hydrogen sulphide increases hepatic differentiation of human tooth pulp stem cells compared with human bone marrow stem cells[J]. Int Endod J, 2014,47(12):1142-1150.

[5] Xu ZS, Wang XY, Xiao DM, et al. Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H_2O_2 -induced oxidative damage-implications for the treatment of osteoporosis[J]. Free Radic Biol Med, 2011,50(10):1314-1323.

[6] 李晨春, 刘祖德, 戴力扬, 等. microPET/CT 评价去卵巢大鼠骨代谢变化的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(8):875-879.

[7] 崔燎, 陈槐卿, 许善莲, 等. 去卵巢大鼠椎骨组织形态计量学、生物力学特点及相关性研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2004, 21(2):178-183.

[8] RODRIGUEZ AK. [Oxidation of tartaric acid in wine in the presence of heavy metal salts (activation of oxygen by iron)][J]. Izv Akad Nauk SSSR Biol, 1951,3:115-128.

综上所述, 阿立哌唑治疗精神分裂症患者的临床疗效显著, 可能是通过改善 SOD 及 NO 水平来发挥作用。

参考文献

[1] 郭育军. 温胆汤加味协同治疗精神分裂症的疗效[J]. 中国当代医药, 2013, 20(3):112-113.

[2] 周旭辉, 李冬凤, 周霞峰, 等. 阿立哌唑与利培酮治疗麻谷丸所致精神障碍的疗效及安全性[J]. 临床精神医学杂志, 2013, 23, (1): 19-22.

[3] 吴东, 熊文博, 彭岚等. 中西医结合治疗对精神分裂症患者认知功能的影响[J]. 中国中医药现代远程教育, 2014, 12(9):54-55.

[4] 荆环荣, 张黎明, 贾靖, 等. 礞石滚痰汤加味与利培酮治疗精神分裂症的临床观察[J]. 临床医药文献杂志, 2014, 1(9): 769-771.

[3] 冯雪梅. 他汀类药物序贯疗法治疗心血管疾病的疗效观察[J]. 实用心脑血管病杂志, 2013, 10:70-71.

[4] 张成娟. 他汀类联合心血管药物治疗心血管疾病的临床效果研究[J]. 心血管病防治知识(学术版), 2014, 09:62-63.