

尼尔雌醇对去势雌性大鼠 1,25 双羟 维生素 D 水平的影响

周轶¹ 蒲画华² 徐小雅¹ 李斌³ 高建军¹ 金慰芳^{1Δ}

(¹复旦大学放射医学研究所骨代谢研究室 上海 200032; ²上海市徐汇区中心医院 上海 200031;

³复旦大学附属妇产科医院妇产科 上海 200040)

【摘要】 目的 研究卵巢摘除(ovariectomy, OVX)后大鼠血清 25(OH)D、1,25 双羟维生素 D[1,25(OH)₂D]水平和骨表型的变化及雌激素干预效果。方法 采用 6 月龄 SD 雌性大鼠双侧卵巢摘除术建立去势骨质疏松模型并随机分为去势模型组(OVX 组)和去势后雌激素干预组(OVX-E 组),另设假手术对照组(SHAM 组),每组 10 只。术后 5 周 OVX-E 组开始灌服尼尔雌醇(1 mg/kg, 2 次/周),其他组灌服饮用水作为对照,均给药 13 周。采用酶免法(EIA)检测血清 25(OH)D 和 1,25(OH)₂D 水平,用体积骨密度(volume bone mineral density, vBMD)和骨小梁面积(BV/TV)等指标进行骨表型分析。结果 OVX 组血清 25(OH)D 水平保持稳定,与 SHAM 组比较差异无统计学意义。去势后 1,25(OH)₂D 水平显著升高,OVX 组为 63.1 pmol/L,较 SHAM 组的 38.5 pmol/L 增加了 64%($P < 0.001$)。OVX 大鼠骨密度降低,较 SHAM 组分别减少 9.5%(股骨, $P < 0.001$)和 9.8%(腰椎, $P < 0.001$)。同时出现骨小梁面积减少和尿吡啶酚增加(58.7%, $P < 0.05$)等骨质疏松表型。口服雌激素后,血清 1,25(OH)₂D 水平较 OVX 组明显下降 60.8%($P < 0.001$),甚至低于 SHAM 组($P < 0.01$),同时延缓骨丢失和改善骨微结构。结论 去势影响大鼠维生素 D(vitamin D, VD)代谢,致血清 1,25(OH)₂D 水平明显升高,小剂量雌激素对 VD 代谢改变和骨丢失具有显著纠正作用。

【关键词】 卵巢摘除; 1,25 双羟维生素 D; 雌激素; 骨质疏松

【中图分类号】 R 336; R 589.5 **【文献标志码】** A

Changes of 1,25 dihydroxyvitamin D levels in ovariectomy female rats after Nilestriol treatment

ZHOU Yi¹, PU Hua-hua², XU Xiao-ya¹, LI Bin³, GAO Jian-jun¹, JIN Wei-fang^{1Δ}

(¹Department of Bone Metabolism, Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²Xuhui Central Hospital of Shanghai, Shanghai 200031, China; ³Department of Obstetrics and Gynecology,

Obstetrics and Gynecology Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 **Objective** To study the changes of renal vitamin D metabolism and skeleton phenotypes in ovariectomized rats and effects of estrogen treatment. **Methods** Female SD rats ($n = 30$) were randomly divided into 3 groups ($n = 10$ for each). Bilateral ovariectomy for ovariectomy (OVX) and OVX-estrogen (OVX-E) groups, and sham surgery for SHAM group were performed at 6 month of age respectively. Meanwhile, estrogen (1 mg/kg Nilestriol in 2 mL drink water) in OVX-E group was administered twice a week by gavages from 6 to 18 weeks after operation. Same volume of drink water was used as the control for OVX and SHAM groups. The serum vitamin D levels, calcium and phosphate, and skeleton phenotypes were investigated at the middle or end of experiments. **Results** The serum 1,25(OH)₂D level in OVX rats was 63.1 pmol/L, increased by 64% ($P < 0.001$) compared with 38.5 pmol/L in SHAM. The high 1,25(OH)₂D level was back down to 24.7 pmol/L by estrogen treatment in OVX-E (-60.8% versus OVX, $P < 0.001$), which was lower than that in SHAM ($P < 0.01$). The osteoporotic phenotypes in OVX rats were showed by the decrease (-9.5% in femur, $P < 0.001$ and -9.8% in lumbar, $P < 0.001$) of volume bone mineral density (vBMD), and the decrease of bone volume as determined by histomorphometry analysis. Bone resorption was activated after ovariectomy as showed by the increased urine PyD excretion (58.7%, $P < 0.05$). Meanwhile,

^ΔCorresponding author E-mail: jinwf@shmu.edu.cn

the calcium levels in serum and urine of OVX rats were lower than that in SHAM. The skeleton phenotypes were improved by Nilestriol treatment showed by increased vBMD and bone volume, increased serum calcium and decreased urine PyD excretion, while the urine Ca excretion still kept in lower level (-60% , versus SHAM, $P<0.01$). **Conclusions** The serum 1,25(OH)₂D level was increased in ovariectomized osteoporotic rats, which was fell down by estrogen treatment along with improved bone quality and structure.

【Key words】 ovariectomy; 1,25 dihydroxyvitamin D; estrogen; osteoporosis

雌激素缺乏是绝经后骨质疏松(postmenopausal osteoporosis, PMOP, I型骨质疏松症)发生、发展的基本原因,但其确切的内分泌机制仍未完全阐明^[1-2]。维生素 D(vitamin D, VD)是钙磷平衡和骨代谢调节的基本激素之一^[3-5],雌激素缺乏如何影响 VD 代谢等问题值得关注。这些问题的阐明对认识绝经后骨量丢失的机制和骨质疏松症防治研究有意义。为此,本文通过卵巢切除术(ovariectomy, OVX)建立雌激素缺乏骨质疏松大鼠模型,分析血清 25 羟基维生素 D [25(OH)D]和 1,25 双羟维生素 D [1,25(OH)₂D]水平变化及其与骨代谢指标的关系,并观察了雌激素干预的影响。

材料和方法

模型建立与分组 4月龄雌性 SD 大鼠(上海斯来克实验动物有限公司,许可证:SCXK 沪 20022-002)清洁级喂养至 6 月龄,选取体重 280~300 g 大鼠 30 只,参考文献^[6]方法,经氯胺酮(100 mg/kg,江苏恒瑞医药股份有限公司)腹腔注射麻醉,背侧切口行双侧卵巢摘除,切除少量卵巢周围脂肪组织为假手术对照组(SHAM 组)。卵巢摘除大鼠随机分为单纯卵巢去势组(OVX 组)和尼尔雌醇干预组(OVX-E 组),每组 10 只。

尼尔雌醇干预 术后 35 天起 OVX-E 组大鼠灌服尼尔雌醇(上海医药集团有限公司华联制药厂,批号 070401,溶于 2 mL 消毒饮用水),每周 2 次,每次 1 mg/kg 体重。SHAM 组和 OVX 组大鼠同时灌服消毒饮用水,每次 2 mL/只。干预 13 周。给药中期(给药后 6 周)收集晨尿标本 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存待测。干预结束后大鼠经 11% 乌来糖(中国医药集团上海化学试剂公司)1 mL/100 g 体重腹腔注射麻醉,颈动脉取全血并处死后取腰椎、股骨等标本。血清标本分装后 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

25(OH)D 和 1,25(OH)₂D 测定 25(OH)D 测定采用山羊抗鼠 25(OH)D 酶免测定试剂盒(QRCT-301330130221EIA,美国 ADL 公司)一次完成。批内 CV $<8\%$,检测下限 5 nmol/L。1,25(OH)₂D 测定采用 OCTEIA 1,25-(OH)₂-Vit D 酶免测定试剂盒(英

国 IDS 公司)一次完成。批内 CV $<10\%$,检测下限 6 nmol/L。

骨表型分析 参考文献^[7-8]方法,取左股骨和腰椎 L2,应用固体物理密度仪(AG204,瑞士)测量体积骨密度值(g/cm^3);取左胫骨塑料包埋行不脱钙切片(Leitz 1600,德国),Von Kossa 染色,光镜下观察和摄片(Nikon E600,日本)。

血尿生化分析 血清 E₂:采用 E₂ 放免试剂盒(深圳拉尔文生物工程公司)一次完成。尿吡啶酚(Pyd):给药 6 周后避光收集尿液标本,应用 Pyd 试剂盒酶免法(美国 QUIDE 公司)检测尿吡啶酚(Pyd),自动生化仪检测肌酐(Cr),结果以 Pyd/Cr ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)比值表示。血清钙、磷:应用自动生化仪(日立 7170,日本)测试,结果以每升国际单位或摩尔浓度表示。

统计学分析 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据以 Excel 录入,并采用学生 *t* 检验(student *T*-test)进行组间差异显著性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

血清 25(OH)D 和 1,25(OH)₂D 水平比较 卵巢去势 5 周、药物干预 13 周后,OVX 组大鼠血清 25(OH)D 水平为 221 nmol/L,与对照组比较未出现明显变化(图 1A),OVX 组 1,25(OH)₂D 浓度为 61 pmol/L,较 SHAM 组的 38.5 pmol/L 增加了 64.1% ($P<0.001$) (图 1B)。尼尔雌醇干预组,1,25(OH)₂D 水平明显下降至 24.7 pmol/L,较 OVX 组减少 60.8% ($P<0.001$),甚至低于 SHAM 组 ($P<0.01$)。

骨表型分析比较 卵巢去势组大鼠随着血清 E₂ 水平降低(图 2A),骨吸收增强,尿 Pyd 排泄增加(58.7%, $P<0.05$, 图 2B),骨小梁面积减少(图 2C),股骨和腰椎体积骨密度明显减低(-9.5% 和 -9.8% , $P<0.001$, 图 2D)。口服尼尔雌醇可一定程度提高血清 E₂ 水平(87.5%, $P<0.05$),有效降低 Pyd 排泄至 SHAM 组水平,股骨骨小梁面积明显增加,同时股骨和腰椎骨密度较 OVX 组分别增加(6.6% 和 6.3%, $P<0.05$)。

血钙磷水平比较 鉴于卵巢摘除后 1,25(OH)₂D 水平的变化,我们进一步分析了血钙、磷水平。结果表明,血钙水平较对照组降低 9.1%($P<0.05$,图 3A),血磷水平维持稳定(图 3B),同时尿 Ca/Cr 减少 53%

($P<0.001$,图 3C),提示可能存在轻度的 PTH 代偿作用。给予尼尔雌醇干预后血钙、磷水平显著恢复,血磷明显高于 SHAM 组和 OVX 组($P<0.001$)。尿 Ca/Cr 仍维持低水平,与 SHAM 比较减少 60%($P<0.01$)。

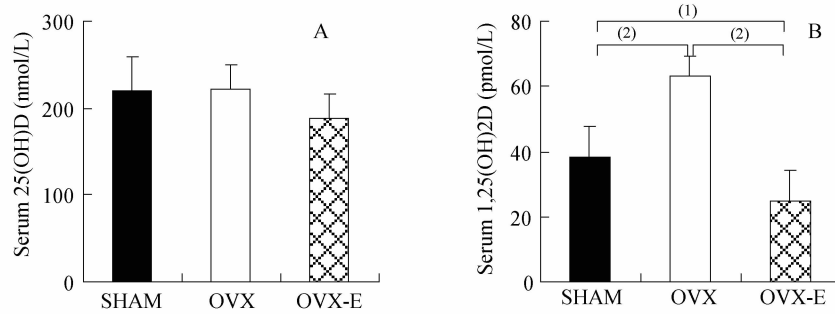


图 1 大鼠血清 25(OH)D 和 1,25(OH)₂D 水平
Fig 1 Serum 25(OH)D and 1,25(OH)₂D levels in rats
 $n = 10$, ⁽¹⁾ $P < 0.01$, ⁽²⁾ $P < 0.001$.

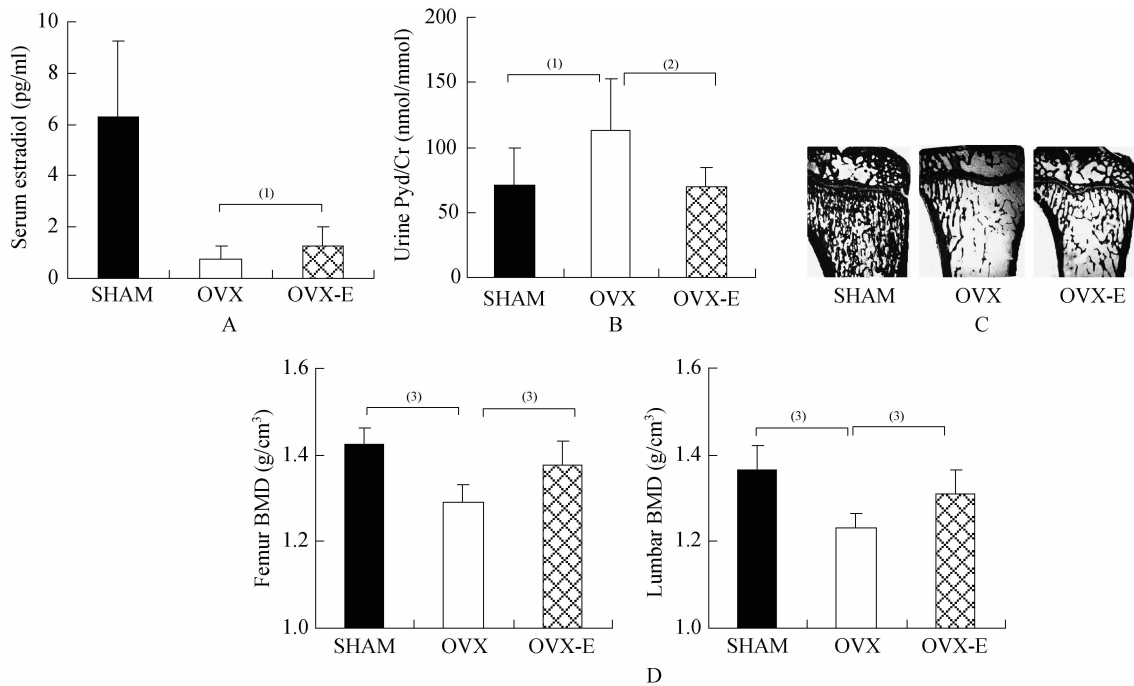


图 2 大鼠骨表型分析比较
Fig 2 The skeleton phenotypes in OVX rats

A: Serum estradiol levels; B: Urine PyD levels (/Cr); C: Tibiae trabecular bone volume (von Kossa staining, $\times 40$); D: The vBMD of femur; E: The vBMD of lumbar. $n = 10$, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$, ⁽³⁾ $P < 0.001$.

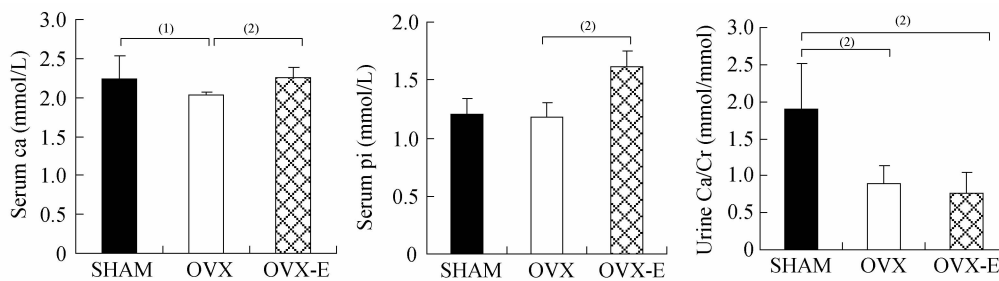


图 3 大鼠血清钙、磷水平生化分析比较
Fig 3 The calcium and phosphonate levels in serum and urine of rats

A: Serum calcium levels; B: Serum phosphonate levels; C: Urine calcium levels (/Cr). $n = 10$, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.001$.

讨 论

维生素 D 前体通过食物和皮肤光照获得并储存于脂肪组织,经肝脏 25-羟化酶催化生成的 25(OH)D 是其主要循环形式,后者再经肾 1 α -羟化酶催化生成的 1,25(OH) $_2$ D 是其主要活性形式^[9]。VD 是首先作为一种抗佝偻病因子被发现和使用的,至今仍作为骨质疏松症防治的基础药物之一。大量研究表明,1,25(OH) $_2$ D 具有刺激骨形成、促进矿化的骨正性效应,这些效应很大程度上是通过钙磷间接发挥的^[3]。近年来 1,25(OH) $_2$ D 对骨代谢影响的直接作用也逐渐得到认识^[5,10]。作为钙磷平衡和骨代谢调节的基本激素之一,VD 在 PMOP 发生发展中作用和机制仍未阐明。绝经后妇女常伴有 VD 缺乏,其中 25(OH)D 水平和 1,25(OH) $_2$ D 水平的变化和意义可能不尽相同^[11-13]。OVX 作为模拟 PMOP 的经典动物模型常用于骨质疏松发病机制和抗骨质疏松药物的药效评价研究。OVX 后 VD 代谢的变化势必会对骨代谢和药物药效研究产生影响。为此,我们利用 OVX 大鼠模型观察了雌激素缺乏状态下血清 25(OH)D 和 1,25(OH) $_2$ D 水平变化及骨密度、骨小梁面积和血钙磷等指标变化,并给予小剂量雌激素干预后观察以上指标的改变,以期对雌激素缺乏状态下 VD 代谢变化有初步认识。

去势大鼠血清 1,25(OH) $_2$ D 水平变化的报道并不一致。Chen 等^[14]采用 3 月龄大鼠于 OVX 后 21 天检测分析,未发现 OVX 对血清 1,25(OH) $_2$ D 有影响,而 O'Loughlin 等^[15]也曾有类似报道,其差别可能与实验大鼠月龄和饲料中钙含量或其他组分差异有关。O'Loughlin 等^[15]发现采用低钙饲料(0.02% Ca)喂养时,OVX 组血清 1,25(OH) $_2$ D 明显高于对照组,也高于高钙饲料(0.4% Ca)喂养组。本研究采用常规饲料(0.5% Ca)喂养,去势 18 周大鼠血清 25(OH)D 水平维持稳定,血清 1,25(OH) $_2$ D 水平升高,反映肾 VD 合成代谢增强,与 Liel 等^[16]实验结果类似。提示在雌激素缺乏状态下,由于 VD 抵抗^[17-18]或由于雌激素缺乏直接引起肠钙吸收障碍^[19-20],刺激 PTH 分泌,后者促进肾 1,25(OH) $_2$ D 合成,但高水平的 1,25(OH) $_2$ D 不能有效改善肠钙吸收。低血钙、高 1,25(OH) $_2$ D 与 PTH 等一起激活骨吸收,动员骨组织钙流出,使实验鼠尿 Pyd 排泄增加(图 2B),维持血钙处于正常低水平(图 3A),血磷基本稳定,而尿钙却明显降低。给予尼尔雌醇干预后肠钙吸收恢复,血清 1,25(OH) $_2$ D 显著减低,与文献报道一致^[14-16]。血钙、磷水平的有效恢复,特别是血磷水平升高,增加了

骨组织钙沉积,促进骨形成和矿化,同时骨吸收减低,延缓了骨量丢失。

OVX 引起骨吸收增强的内分泌机制仍未完全阐明,1,25(OH) $_2$ D 水平升高在其中的作用和意义有待进一步研究。此外,本研究中给予 OVX 大鼠雌激素后尽管血钙已恢复正常,尿钙水平仍维持低水平,提示仍存在继发的钙磷调控变化,这些变化产生的确切机制值得继续关注。

参 考 文 献

- [1] Martin TJ, Gaddy D. Bone loss goes beyond estrogen[J]. *Nat Med*, 2006, 12(6): 612-613.
- [2] Eastell R. Pathogenesis of postmenopausal osteoporosis [M]// Favus MJ. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 6th ed. 2006 American Society for Bone and Mineral Research, Washington DC, USA, 259-262.
- [3] Hendy GN, Hruska KA, Mathew S, et al. New insights into mineral and skeletal regulation by active forms of vitamin D [J]. *Kidney Int*, 2006, 69(2): 218-223.
- [4] Tenenhouse HS. Phosphate transport: molecular basis, regulation and pathophysiology[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, 103(3-5): 572-577.
- [5] St-Arnaud R. The direct role of vitamin D on bone homeostasis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 473(2): 225-230.
- [6] 金慰芳, 高建军, 王洪复. 临床前体内药效研究[M]//王洪复. 骨质疏松症药效研究方法与技术. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 40-54.
- [7] 周轶, 高建军, 金慰芳, 等. 骨质疏松动物实验中的骨物理密度检测[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2003, 9(1): 4-5, 42.
- [8] 王洪复, 金慰芳, 高建军, 等. 重组人甲状旁腺激素对去卵巢大鼠骨质疏松的治疗作用[J]. *中国医学科学院学报*, 2003, 25(3): 275-279.
- [9] Holick MF. Vitamin D deficiency[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(3): 266-281.
- [10] Masuyama R, Stockmans I, Torrekens S, et al. Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(12): 3150-3159.
- [11] Anderson PH, Sawyer RK, Moore AJ, et al. Vitamin D depletion induces RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone loss in a rodent model[J]. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(11): 1789-1797.
- [12] Jesudason D, Need AG, Horowitz M, et al. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and bone resorption markers in vitamin D insufficiency[J]. *Bone*, 2002, 31(5): 626-630.
- [13] Need AG, O'Loughlin PD, Morris HA, et al. Vitamin D metabolites and calcium absorption in severe vitamin D deficiency[J]. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(11): 1859-1863.
- [14] Chen C, Kalu DN. Modulation of intestinal estrogen receptor by ovariectomy, estrogen and growth hormone[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 286(1): 328-333.