

大鼠不同部位骨骼对外源性甲状腺激素反应性的研究

李红¹ 高妍² 马红¹ 罗小云¹

(1. 贵阳医学院附属医院, 贵州 贵阳 550004; 2. 北京大学第一临床医院)

【摘要】 目的 用左旋甲状腺素(L-T₄)制备实验性甲状腺功能亢进(甲亢)大鼠模型,以探讨甲亢大鼠的胫骨和椎骨对外源性甲状腺激素的反应性,为临床监测长期L-T₄治疗提供依据。方法 9周龄雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 18只,随机分为甲亢组 11只、对照组 7只。甲亢组予L-T₄腹腔内注射,对照组予生理盐水注射,连续注射3周后取大鼠的胫骨近端、第四腰椎用非脱钙骨组织形态计量法进行同期观察和研究。结果 在胫骨甲亢组的骨小梁数量降低,骨形成表面、吸收表面均增加,但骨吸收表面增加更明显,骨小梁平均宽度、骨纵向生长率降低,而骨矿化率增加。椎骨未观察到此变化。结论 L-T₄引起继发性胫骨骨量减少,骨转换增加,椎骨无反应,表明不同部位的骨骼对甲状腺激素的反应存在异质性。

【关键词】 甲状腺激素; 骨组织形态计量学; 骨质疏松

Responses in different skeletal sites of the rats to exogenous thyroid hormone LI Hong, GAO Yan, MA Hong, et al. *The Affiliated Hospital of Guiyang Medical College(Guizhou Guiyang, 550004)*

【Abstract】 Objective To determine the skeletal response in different sites to exogenous thyroid hormone in rat models of hyperthyroidism by administrating levo-thyroxine(L-T₄) **Methods** 18 male Sprague-Dawley (SD) rats of 9 weeks old were randomly divided into hyperthyroid group (n = 11) and control group (n = 7). After 3 weeks of L-T₄ treatment of hyperthyroid group, histomorphometric parameters of trabecular bone remodeling were assessed in the proximal tibia and in the fourth vertebra. **Results** In tibia, trabecular bone volumes, mean trabecular thickness, and longitudinal bone growth rate were decreased, trabecular formation surfaces and resorption surfaces increased significantly. Whereas these change were not apparent in the vertebra. **Conclusion** It is concluded that L-T₄ caused secondary bone loss, in tibia, associated with increased bone turnover. There exists some heterogeneity in the different parts of skeleton in response to thyroid hormone.

【Key Words】 Thyroid hormone; Histomorphometry; Osteoporosis

世界人口日益老龄化,骨质疏松症已跃居世界常见病、多发病的第七位^[1]。在英国,目前有超过两万的骨质疏松患者,仅英格兰和威尔士,骨质疏松性骨折总医疗费用即高达 6.14 亿英镑^[2]。在美国,每年总的医疗费用估计为 100 亿美元^[3]。目前骨质疏松症已是一项日益严重的公众健康问题。1947 年 Albright 等明确指出甲亢可以有骨质疏松,到 70 年代已明确甲亢引起的代谢性骨病在组织学上有明显的特征^[4],但至今对甲状腺激素与骨的关系仍未完全阐明。

甲亢时,过高的内源性甲状腺激素使骨转换增加,出现钙负平衡,骨量减少^[5]。

近年来,Paul^[6]、Ross^[7]、Greenspan^[8]等先后发现外源性左旋甲状腺素(L-T₄)使股骨骨密度(BMD)降低 12.8%,桡骨

BMD降低9%,而椎骨BMD无改变。对于长期服用L-T₄治疗的病人,是否不同部位的骨骼对外源性甲状腺激素的反应存在异质性,尚不完全清楚。于1998年9月~1999年4月,我们制备了实验性甲状腺功能亢进(甲亢)的大鼠模型,用骨组织形态计量学的方法,观察了大鼠胫骨、椎骨对L-T₄的反应性。

1 材料和方法

1.1 实验动物 雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 18只,9周龄,体重 150~200g,由北京医科大学动物中心提供。每只鼠分别饲养在代谢笼中,每日给予 10 小时光照,自由摄食。饲料由北京医科大学第一医院动物室提供,其中钙含量约 1.2%,磷含量约 0.8%。

1.2 实验分组 新购 SD 大鼠适应本实验条件喂养 1 周后,随机分为对照组 7 只、甲亢组 11 只,实验前所有鼠用毛细管

留取眼眶内眦静脉血置 - 20 保存。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制备 甲亢组每日给予 L-T₄ (Sigma 公司) 250μg/kg 体重腹腔内注射, 对照组每日仅给予生理盐水腹腔内注射, 所有鼠每周测量体重一次。连续注射 L-T₄ 3 周后处死。每只鼠于处死前 6 天给予盐酸四环素 (Promega 公司) 30mg/kg 体重腹腔内注射, 间隔 3 天后, 再重复注射一次。处死前, 用苯巴比妥麻醉, 心脏取血后, 迅速取出右胫骨, 第四腰椎置 70% 乙醇中固定。

1.3.2 T₃、T₄、TSH 测定 放射免疫法 (中国原子能科学院 401 所)

1.3.3 非脱钙骨标本制备 大鼠骨经不同浓度乙醇脱水, 制成不脱钙骨标本, 用甲基丙烯酸甲酯包埋后, 用 Polycuts B 型切片机 (West Germany) 平行于骨的纵轴行非连续切片, 普通切片厚度为 5μm, 荧光检查切片厚度为 10μm, 厚切片不脱塑直接封片行荧光检查, 薄切片经脱塑后, 用甲苯胺蓝染色封片。

1.3.4 骨组织形态计量测定 分别用目镜内装有 A100 单方格网格尺和直线测微尺的 OPTON RS (West Germany) 显微镜在 400 倍视野下作形态计量测定。测定区域限定在距骺板下缘 1mm 以外的干骺端, 每只动物测定面积为 16mm², 采用的参数如下: (1) 骨小梁体积百分比 (TBV %): 骨小梁体积占被测骨髓腔总体积的百分比。(2) 类骨质体积百分比 (TOV %): 类骨质体积占骨小梁体积的百分比。(3) 骨小梁表面百分比 (TBS %): 骨小梁表面占被测量总表面的百分比。(4) 类骨质表面百分比 (TOS %): 类骨质表面占骨小梁表面的百分比。(5) 骨小梁形成表面百分比 (TFS %): 有成骨细胞覆

盖的类骨质表面占骨小梁表面的百分比。(6) 骨小梁吸收表面百分比 (TRS %): 不规则, 凹凸不平的骨小梁表面占骨小梁表面的百分比。(7) 骨小梁平均宽度 (MTPT): 骨小梁两侧面之间的平均距离。(8) 纵向骨生长率 (LBGR): 平行于骺板的荧光标记带至骺板上缘的平均距离除以最后一次标记至处死的天数。(9) 骨小梁矿化率 (MAR): 骨小梁表面荧光双标记带的距离除以两次标记相间隔的天数。

骨小梁计量参数 LBGR、MAR 均用荧光显微镜测得。

1.4 统计学处理 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异用 *t* 检验。

2 结果

2.1 大鼠体重的变化 用 L-T₄ 制备的甲亢组 SD 大鼠, 在第一、二周内体重增加虽较缓, 但与对照组相比, 差异无显著意义; 第三周, 甲亢组 SD 大鼠体重 (302.36 ± 38.63) kg 增加缓慢, 与对照组体重 (323.57 ± 25.61) kg 相比, 有显著性差异 (*P* < 0.05)。

2.2 大鼠甲状腺功能的测定 3 周后, 甲亢组 SD 大鼠的甲状腺功能与对照组相比, 血清 T₄ 水平明显增高 (*P* < 0.05), 血清 T₃ 水平也增高 (*P* < 0.05), 均有显著性差异。

2.3 大鼠胫骨骨组织形态计量 甲亢组与正常对照组相比, 骨小梁数量明显减少 (*P* < 0.05), 类骨质数量减少 (*P* < 0.05), 骨样组织接合面增加 (*P* < 0.01), 骨小梁表面无明显变化, 而骨小梁形成表面增加 (*P* < 0.05), 吸收表面也明显增加 (*P* < 0.01), 二者增加的幅度分别为 47.37%, 112.77%, 以吸收表面增加更明显。骨小梁平均宽度降低 (*P* < 0.05), 四环素标记的纵向骨生长率下降 (*P* < 0.01), 骨矿化率增高 (*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 甲亢组 (n = 11) 与对照组 (n = 7) 大鼠胫骨骨组织形态计量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TBV (%)	TOV (%)	TBS (%)	TOS (%)	TFS (%)	TRS (%)	MTPT (um)	LBGR (um/d)	MAR (um/d)
甲亢组	16.01 ± 4.10	0.81 ± 0.61	11.31 ± 3.31	1.55 ± 1.25	0.77 ± 0.50	1.95 ± 1.05	21.19 ± 0.47	42.41 ± 24.52	3.05 ± 0.84
Hyper thyroid 对照组	22.38 ± 3.29	0.28 ± 0.35	17.74 ± 2.01	0.97 ± 0.99	0.33 ± 0.15	1.12 ± 0.91	31.63 ± 6.01	66.25 ± 16.19	2.30 ± 0.38
Control									
<i>P</i>	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

2.4 大鼠椎骨骨组织形态计量 甲亢组与正常对照组相比, 骨小梁数量、类骨质数量、骨小梁表面、骨小梁形成表面、吸收

表面、骨小梁平均宽度、四环素标记的骨纵向生长率、骨矿化率均无明显变化, 类骨质表面增加 (*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 甲亢组 (n = 11) 与对照组 (n = 7) 大鼠椎骨骨组织形态计量 (均值 ± 标准差) ($\bar{x} \pm s$)

组别	TBV (%)	TOV (%)	TBS (%)	TOS (%)	TFS (%)	TRS (%)	MTPT (um)	LBGR (um/d)	MAR (um/d)
甲亢组	31.10 ± 4.60	0.36 ± 0.28	18.15 ± 1.57	1.45 ± 0.81	0.53 ± 0.40	1.45 ± 0.81	19.47 ± 2.64	38.74 ± 15.95	2.24 ± 0.61
Hypert hyroid 对照组	30.55 ± 2.76	0.59 ± 0.34	16.80 ± 1.91	1.08 ± 0.57	0.38 ± 0.30	1.10 ± 0.61	19.53 ± 1.81	44.50 ± 4.38	2.03 ± 0.57
Control									
<i>P</i>	N	N	N	< 0.05	N	N	N	N	N

N: *P* > 0.05

3 讨论

已经有许多的临床研究和动物实验证实甲亢合并骨矿代谢紊乱, 内源性甲状腺激素可导致骨量减少^[9], BMD 降低^[10]。但对于长期服用甲状腺激素治疗的患者, 是否外源性

的甲状腺激素对其骨骼的完整性有负面的影响, 增加骨质疏松的危险, 目前尚有争议。临床长期服用 T₄ 治疗的患者有两类。一类是甲状腺功能减退患者的替代治疗。此外尚有许多患者服用抑制剂量的甲状腺片或 L-T₄ 治疗, 以收缩或抑制异

常的甲状腺组织的生长,如甲状腺结节、弥漫性或结节性甲状腺肿、甲状腺良性或恶性病变外科术后的患者。他们有可能服用剂量较高的 T₄,处于亚临床甲亢或临床甲亢状态。目前只有极少量的实验同步研究不同部位的骨骼对外源性甲状腺激素的反应。

本实验对 SD 大鼠连续注射 L-T₄ (250ug/ kg/ d) 制备成外源性甲亢大鼠模型,经 3 周观察,甲亢组 SD 大鼠在第一、二周体重虽增长缓慢,但与对照组相比无明显差异。在第三周甲亢组 SD 大鼠体重增长明显减慢,与对照组相比有显著差异,且血清 T₃、T₄ 是增高的。这表明用外源性 L-T₄ 制备的甲亢大鼠模型是成功的。

对骨组织形态计量的研究表明,甲亢大鼠胫骨有继发性骨小梁数量减少,类骨质数量减少,骨样组织接合面、骨形成表面和骨吸收表面均增多,但以骨吸收表面增多更明显,而椎骨并未观察到明显的骨量减少及骨转换的增加。Balena 等对 T₄ 所致的甲亢大鼠的研究证实,桡骨骨小梁体积减少 45%,而 T₄ 对椎骨却无此影响。这些与 Eriksen 等^[11]对内源性甲状腺激素的研究相符,甲状腺激素使激活频率增加,吸收时间缩短,骨吸收率增加。也与国内赵新宇等^[12]的临床观察相符:甲亢存在骨量丢失,前臂远端 1/3 和 1/10 部位的低骨量和骨质疏松的比例明显高于中轴骨。

内源性或外源性甲状腺激素对骨骼的作用存在异质性。许多年前就知道甲状腺激素可能影响骨细胞的活性,对大鼠骨肉瘤成骨样细胞系 ROS17/2.8、前成骨细胞系 UMR106、小鼠骨肉瘤成骨细胞系 MC3T3-E 的研究表明^[13],成骨细胞是甲状腺激素作用的靶细胞,它有甲状腺激素的核受体。这能解释我们观察到的外源性甲状腺激素导致大鼠胫骨骨形成增加。Allain^[14]、Abu^[15]等证实破骨细胞上有甲状腺激素受体。外源性甲状腺激素通过作用于破骨细胞,引起骨吸收增强,在每一重建周期中吸收超过形成,导致骨量负平衡。

Ongphiphadhanakul 等^[16,17]报道,对大鼠使用 3 周或 12 周的 L-T₄ 降低股骨 BMD,而椎骨 BMD 无变化。在股骨,代表成骨细胞活性的碱性磷酸酶、骨桥蛋白、骨钙素,以及代表破骨细胞活性的抗酒石酸酸性磷酸酶的 mRNA 的水平均增高,而在椎骨,各 mRNA 的水平却无改变,非骨性细胞的变化不可能改变这些细胞特异性基因的表达。

对骨细胞上甲状腺激素受体 (T₃R) 的研究表明,在股骨和椎骨均有 T₃R 各亚型的表达。Kang 等^[18]对骨髓细胞核苷酸序列测定发现,在椎骨成骨细胞上有 cerbA₂ mRNA 的表达,且高于股骨成骨细胞。这表明不同部位骨骼的确存在异质性。这可能是造成 T₄ 所致的甲亢大鼠胫骨、桡骨与椎骨骨组织形态计量不一致的根本原因。

本实验从组织学上证实了过量外源性甲状腺激素致胫骨骨转换增加,骨吸收大于骨形成;而椎骨变化不大。外源性甲状腺激素对外周骨和中轴骨的影响不一致。

临床不能用某一部位骨骼的变化来说明全身骨骼的状况。临床对长期服用 L-T₄ 治疗的患者应密切监测甲状腺功

能,防止亚临床甲亢或临床甲亢的产生,最终防止继发性骨质疏松的出现。

参考文献

- 1 张伦. 骨质疏松症防治药物现状及展望. 医学经济信息, 1998, 271: 1-5.
- 2 Ongphiphadhanakul B, Alex S, Braverman LE, et al. TSH suppressive L-thyroxine therapy decreases bone density in the rat: effect of hypogonadism and calcitonin. J Bone Mineral Res, 1992, 7: 1227-1231.
- 3 Consensus Development Conference: Diagnosis, Prophylaxis and Treatment of Osteoporosis. Am J Med, 1993, 94: 646-650.
- 4 Mosekilde L, Melsen F. A tetracycline based histomorphometric evaluation of bone resorption and bone turnover in hyperthyroidism and hyperparathyroidism. Acta Med Scand, 1978, 204: 97.
- 5 Rosen HN, Sullivan EK, Middlebrooks VL, et al. Parenteral pamidronate prevents thyroid hormone induced bone loss on rats. J Bone Min Res, 1993, 8: 1255-1261.
- 6 Paul TL, Kerrigan J, Kelly AM, et al. Long-term L-thyroxine therapy is associated with decreased hip bone density in premenopausal women. JAMA, 1988, 259: 3137.
- 7 Ross DS, Neer RM, Ridgeway EC, et al. Subclinical hyperthyroidism and reduced bone density as a possible result of prolonged suppression of the pituitary-thyroid axis with L-thyroxine. Am J Med, 1987, 82: 1167-1170.
- 8 Greenspan SL, Greenspan FS, Resnick NM, et al. Skeletal integrity in premenopausal and postmenopausal women receiving long-term L-thyroxine therapy. AM J Med, 1991, 91: 5-14.
- 9 Melsen F, Mosekilde L. Morphometric and dynamic studies of bone change in hyperthyroidism. Acta pathol Microbiol Scand, 1977, 85: 4.
- 10 Mosekilde L, Eriksen EF, Charles P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. Endocrinol & Meta Clin North Am, 1990, 19: 35-63.
- 11 Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Trabecular bone remodeling and bone balance in hyperthyroidism. Bone, 1985, 6: 421.
- 12 赵新宇, 孟迅吾, 白耀, 等. 甲状腺功能亢进患者的钙、磷和骨代谢改变. 中华内科杂志, 1998, 37(3): 175-178.
- 13 Rizzoli R, Poser J, Burgi U. Nuclear thyroid hormone receptors in cultured bone cells. Metabolism, 1986, 35: 71-74.
- 14 Allain TJ, Yen PM, Flanagan AM, et al. The isoform-specific expression of the triiodothyronine receptor in osteoblast and osteoclast. Eur J Clin Invest, 1996, 26: 418-425.
- 15 Abu EO. The express of thyroid hormone receptors in human bone. Bone, 1997, 21: 137.
- 16 Ongphiphadhanakul B, Jenis LG, Braverman LE, et al. Etidronate inhibits the thyroid hormone-induced bone loss in rats assessed by bone mineral density and messenger ribonucleic acid markers of osteoblast and osteoclast function. Endocrinology, 1993, 133: 2502-2507.
- 17 Suwanwalaikorn S, Ongphiphadhanakul B, Braverman LE, et al. Differential responses of femoral and vertebral bones to long-term excessive L-thyroxine administration in adult rats. Eur J Endocr, 1996, 134: 655-659.
- 18 Kang M, Lee KW. Site differential responses of osteoblast to thyroid hormone. Sino-Japan-korea Thyroid Conference. 1998, 88: 304.

(收稿: 2002-01-10 编辑: 李为农)