

微型 CT 检测血清素对雌性小鼠骨皮质和骨小梁参数的影响

代守前, 韦永中*, 余利鹏

(南京医科大学第一附属医院骨科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨不同剂量血清素对雌性小鼠微型 CT 检测骨皮质和骨小梁参数的影响。方法:给予 2 月龄雌性 C57BL/6 小鼠皮下注射不同剂量(0、5、10、20、50、100 mg/kg)的血清素,3 个月通过微型 CT 定量分析各组小鼠第 5 腰椎体、股骨远端干骺端和股骨中段的相关骨参数。结果:与对照组相比,10~100 mg/kg 血清素处理组小鼠骨小梁数量、骨小梁体积分数和面积分数、骨小梁矿物质密度和骨矿含量明显降低,骨小梁分离度明显升高;50~100 mg/kg 血清素处理的小鼠骨皮质体积分数、骨矿含量以及骨皮质厚度明显降低。结论:血清素对小鼠骨代谢具有重要的负性调节作用。

[关键词] 血清素;小鼠;骨皮质;骨小梁;微型 CT

[中图分类号] R681

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)01-048-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130110

Effects of serotonin on cortical and trabecular bone parameters of female mice detected by Micro-CT

Dai Shouqian, Wei Yongzhong*, Yu Lipeng

(Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of serotonin of different doses on cortical and trabecular bone parameters of female mice. **Methods:** Wild-type(wt)C57BL/6 female mice with 2-month-old were injected with serotonin of different doses (0,5,10,20,50 and 100 mg/kg)subcutaneously(s.c.)daily for 3 months. Micro-CT(μ CT)was used to quantitatively analyze bone parameters of the fifth lumbar bodies, distal femurs and midshafts of the femurs of each group of mice. **Results:** Compared to the control groups mice, the 10-100 mg/kg groups had significantly reduced trabecular numbers, trabecular bone volume and surface density, and increased trabecular separation, leading to a decrease of trabecular bone mineral density and bone mineral capacity. Mice in the 50-100 mg/kg groups caused significantly decreased cortical bone mineral capacity secondary to reduced cortical thickness and cortical bone volume density. **Conclusion:** Serotonin has a significantly negative regulation on bone metabolism in mice.

[Key words] serotonin; mice; cortical bone; trabecular bone; Micro-CT

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(1): 048-052]

骨质疏松是骨科常见疾病,骨形成和骨吸收的平衡对于维持正常骨量非常关键。骨代谢的平衡可以被很多因素调节,包括维生素 D₃、雌激素、甲状旁腺素等激素以及很多局部生成的生长因子和细胞因子^[1-3]。近年来的研究发现,一种全身广泛存在的神经递质血清素,也称 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)也能够影响骨代谢。临床观察提示,多种影响中枢及外周组织血清素水平的药物均可影响

骨折风险^[4-6],血液血清素水平与骨密度呈负相关^[6]。很多研究报道了血清素在骨组织中的作用,但是结果并不一致。Yadav 等^[7]发现,血清素通过作用于成骨细胞上的 5-HT_{1B} 受体抑制其增殖能力^[7],进而抑制骨形成。而其他研究人员发现血清素具有与之不同甚至完全相反的作用^[8-15]。这种相互矛盾的原因目前还不清楚。本研究目的是探讨不同浓度血清素对小鼠骨代谢的生理作用。为了研究血清素在体内对骨量和骨微结构的作用,我们通过给野生雌性小鼠皮下注射不同剂量的血清素,取其第 5 腰椎(L5)和股骨,进行微型 CT(Micro-CT, μ CT)扫描分析。结果显示,血清素在体内骨骼生理的调节中具有重要作用。

[基金项目] 江苏省卫生厅医学科技发展基金(H2005512)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: wyy1996202@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料

选取 2 月龄雌性 C57BL/6 小鼠 36 只 (由南京医科大学实验动物中心提供),分笼饲养于标准的动物实验室,相对湿度(55 ± 5)%,温度(24 ± 2)℃,12 h 昼夜循环,自由饮水及进食(啮齿动物饲料,南京医科大学实验动物中心提供)。动物购回适应性喂养 1 周后开始实验。本实验所有步骤均采用南京医科大学实验动物伦理委员会批准的实验程序,并且符合美国国立卫生研究所实验动物看护使用指南。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与给药

小鼠随机分为 6 组($n = 6$):生理盐水组(正常对照组);5 mg/kg 血清素组;10 mg/kg 血清素组;20 mg/kg 血清素组;50 mg/kg 血清素组;100 mg/kg 血清素组。血清素处理组根据体重皮下注射相应剂量的血清素,每天 1 次,持续 3 个月。

1.2.2 μ CT 扫描与分析

给药 3 个月后,所有小鼠麻醉后处死。收集每只小鼠的腰椎和右下肢进行皮质骨和骨小梁参数分析。参考前人方法^[16-17],采用日立实验室 CT 扫描系统(LCT-200,日本日立公司)检测骨量和骨微结构。每只小鼠分别扫描 L5 股骨远端干骺端和股骨中段 3 个部位。L5 和股骨远端用来分析骨小梁参数,包括骨小梁体积密度 (trabecular bone bone volume/tissue volume, Tb. BV/TV)、骨表面密度(bone surface to tissue volume ratio, BS/TV)、骨小梁骨矿密度 (trabecular bone bone mineral density, Tb. BMD)、骨小梁骨矿含量 (trabecular bone bone mineral capacity, Tb. BMC)、骨小梁数量 (trabecular bone number, Tb. N)、骨小梁厚度 (trabecular bone thickness, Tb. Th) 和骨小梁分离度 (trabecular bone space, Tb. Sp)^[18-19]。皮质骨参数

(即股骨中段)包括皮质骨体积密度 (cortical bone bone volume/tissue volume, Ct. BV/TV)、皮质骨骨矿密度 (cortical bone bone mineral density, Ct. BMD)、皮质骨骨矿含量 (cortical bone bone mineral capacity, Ct. BMC)、皮质骨厚度 (cortical bone thickness, Ct. Th) 等。数据分析采用 LaTheta 软件 (日本日立公司),三维重建图像采用 3D 图像分析软件 (日本 TRI/3D-BONE 公司)。

1.3 统计学方法

数据以统计软件 SPSS 13.0 进行统计分析,各组参数以均值 ± 标准误 ($\bar{x} \pm s_x$) 表示。组间差异显著性采用 ANOVA 和 Dunnett post hoc 进行分析, $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清素对骨小梁参数的影响

为了研究血清素对小鼠骨小梁结构的影响,我们收集每只小鼠的 L5 和右侧股骨远端干骺端进行 μ CT 扫描分析骨小梁参数,结果见表 1、2。结果显示,与对照组相比,5 mg/kg 血清素组的各项骨小梁参数的差异并无统计学意义 ($P > 0.05$)。但从 10 mg/kg 起,各实验组数据与对照组差异较为明显,10 mg/kg 血清素组的 BV/TV、Tb.BMC 比对照组显著降低,而 Tb.Sp 显著升高 ($P < 0.05$)。而 20~100 mg/kg 血清素组骨小梁参数除 Tb.Th 外,基本都明显低于对照组 ($P < 0.05$)。而且同一参数的各组数据显示,血清素对骨小梁的影响具有剂量依赖性。这说明一定浓度的血清素在体内可以影响骨小梁微结构进而影响骨矿含量。

2.2 血清素对骨皮质参数的影响

与骨小梁相比,血清素对骨皮质参数的影响较小。如表 3 所示,5~20 mg/kg 血清素组的小鼠骨皮质参数与对照组相比,并没有明显变化,50 mg/kg

表 1 各组腰椎(L5)骨小梁骨结构特征分析

Table 1 Analysis of lumbar (L5) trabecular bone parameters of experimental and control mice ($n=6$)

| 观察指标 | 对照组 | 血清素处理组 | | | | |
|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|----------------|----------------|---------------|
| | | 5 mg/kg | 10 mg/kg | 20 mg/kg | 50 mg/kg | 100 mg/kg |
| BV/TV (%) | 52.60±0.75 | 50.90±1.44 | 47.79±0.98* | 47.82±0.75* | 48.93±0.87* | 40.64±1.21** |
| BS/TV (1/cm) | 1.53±0.01 | 1.55±0.07 | 1.45±0.02 | 1.32±0.04* | 1.33±0.04* | 1.24±0.07** |
| Tb. BMD (mg/cm ³) | 487.70±9.53 | 473.10±6.08 | 452.80±5.59 | 424.10±10.17** | 383.40±10.66** | 406.90±9.23** |
| Tb. BMC (mg) | 4.51±0.26 | 4.27±0.25 | 3.24±0.09** | 3.49±0.11** | 3.08±0.13** | 2.71±0.16** |
| Tb.N (1/cm) | 0.77±0.02 | 0.77±0.02 | 0.73±0.01 | 0.70±0.01* | 0.65±0.02** | 0.65±0.02** |
| Tb.Th (cm) | 0.68±0.02 | 0.66±0.02 | 0.66±0.01 | 0.68±0.02 | 0.74±0.02 | 0.61±0.02 |
| Tb.Sp (cm) | 0.61±0.02 | 0.64±0.02 | 0.71±0.02* | 0.75±0.02** | 0.78±0.02** | 0.92±0.02** |

与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

表 2 各组股骨远端骨小梁骨结构特征

Table 2 Analysis of distal femur trabecular bone parameters of experimental and control mice (n=6)

| 观察指标 | 对照组 | 血清素处理组 | | | | |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|---------------|
| | | 5 mg/kg | 10 mg/kg | 20 mg/kg | 50 mg/kg | 100 mg/kg |
| BV/TV (%) | 68.86±1.81 | 64.29±1.02 | 60.37±2.21* | 58.26±1.55* | 53.03±1.63** | 46.55±3.30** |
| BS/TV (1/cm) | 2.26±0.10 | 2.28±0.11 | 2.02±0.08 | 1.74±0.14* | 1.64±0.10** | 1.60±0.13** |
| Tb. BMD(mg/cm ³) | 596.20±23.01 | 577.20±15.09 | 557.90±17.87 | 571.10±14.28 | 453.40±15.48** | 503.90±9.74** |
| Tb. BMC (mg) | 5.16±0.16 | 5.15±0.05 | 4.13±0.14** | 4.87±0.13 | 3.21±0.20** | 3.07±0.10** |
| Tb.N (1/cm) | 1.16±0.05 | 1.15±0.04 | 1.01±0.10 | 0.85±0.37** | 0.84±0.02** | 0.82±0.04** |
| Tb.Th (cm) | 0.60±0.03 | 0.60±0.02 | 0.57±0.02 | 0.68±0.02 | 0.65±0.03 | 0.57±0.03 |
| Tb.Sp (cm) | 0.26±0.03 | 0.31±0.01 | 0.38±0.02* | 0.48±0.02** | 0.54±0.03** | 0.64±0.04** |

与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

表 3 各组股骨中段皮质骨结构特征

Table 3 Analysis of middle femur trabecular bone parameters of experimental and control mice (n=6)

| 观察指标 | 对照组 | 血清素处理组 | | | | |
|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|
| | | 5 mg/kg | 10 mg/kg | 20 mg/kg | 50 mg/kg | 100 mg/kg |
| BV/TV (%) | 37.63±1.39 | 38.58±0.89 | 38.35±1.61 | 34.10±1.65 | 31.29±1.91* | 29.55±1.28** |
| Ct. BMD (mg/cm ³) | 1 081.43±43.43 | 1 109.90±53.69 | 1 078.21±43.95 | 1 052.89±41.08 | 1 011.74±16.89 | 970.52±40.09 |
| Ct. BMC (mg) | 1.94±0.08 | 1.84±0.09 | 1.84±0.06 | 1.90±0.07 | 1.31±0.08** | 1.53±0.10* |
| Ct.Th (cm) | 0.017±0.001 | 0.016±0.001 | 0.016±0.001 | 0.016±0.001 | 0.012±0.001** | 0.013±0.001* |

与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

和 100 mg/kg 血清素组与对照组相比,具有明显降低的 BV/TV、Ct.BMC 和 Ct. Th($P < 0.05$)。各组 Ct.BMD 虽然随着血清素剂量的增加有逐渐减少的趋势,但差别均无统计学意义($P > 0.05$)。说明血清素也可以影响小鼠骨皮质参数,但其作用较骨小梁弱。

2.3 三维重建结果

为了更加直观形象地展示血清素对小鼠骨小梁和骨皮质结构的影响,分别选择具有代表性的对照组和 100 mg/kg 血清素处理组小鼠各 1 只,通过图像处理软件对扫描结果进行三维重建(图 1)。如图所示,相比对照组,血清素组的 L5 和股骨远端的骨小梁数目明显减少,骨小梁间距明显增加,因此小梁骨的面积分数和体积分数相应减少,导致骨矿密度和骨矿含量降低。类似地,血清素也明显降低了股骨中段骨皮质的厚度,继而降低了皮质骨体积分数和皮质骨矿含量。三维重建结果和 μ CT 分析结果一致,进一步证实了血清素对骨皮质及骨小梁的调节作用。

3 讨论

骨质疏松症是一种以骨量减少、骨强度降低、骨折风险增加为特征的骨骼系统疾病^[20]。作为世界上最常见的退化性疾病之一,预防和治疗骨质疏松症已经成为重要的公共健康议题。骨量降低和骨折风险增加是骨吸收增强而骨补偿没有相应增加所

致^[21]。因此,针对骨质疏松症的治疗策略主要有两个方面,减缓骨丢失速度和增加骨形成速率。临床观察发现,血液血清素对骨形成具有重要调节作用。比如,外周血清素水平升高的自闭症儿童其骨皮质厚度明显降低^[22-23]。1 项包含 275 例女性的人群调查发现,校正年龄和体重后,股骨颈总骨矿密度和骨小梁骨矿密度,以及桡骨骨小梁厚度都与血液血清素水平有关^[24]。

为了探讨血清素与骨重构的关系,我们给予雌性小鼠皮下注射不同剂量的血清素,然后通过 μ CT 扫描影像学分析小鼠骨小梁和骨皮质参数的变化。本研究显示,皮下注射血清素可以明显减少雌性小鼠的骨量,改变小梁骨和皮质骨微结构。为了比较不同大小的样本,我们采用标准化了的 BV/TV 和 BS/TV。血清素导致的骨小梁骨体积分数和骨面积分数降低,意味着成骨活性降低。这种活性降低以及骨小梁骨矿密度和骨矿含量的降低,可能是骨小梁数量减少和骨小梁分离度增加的缘故。而各处理组中骨小梁厚度并没有明显改变,说明血清素对单个骨小梁影响不大。这些结果共同表明,血清素具有抗骨合成或者促骨吸收的作用,从而使骨小梁形成减少。同样,血清素可以降低皮质骨的骨矿含量,而这主要源于皮质骨厚度和骨体积分数的减少。这些说明,血清素可以在体内降低骨量,改变骨微结构。而这种影响在小梁骨更为显著。

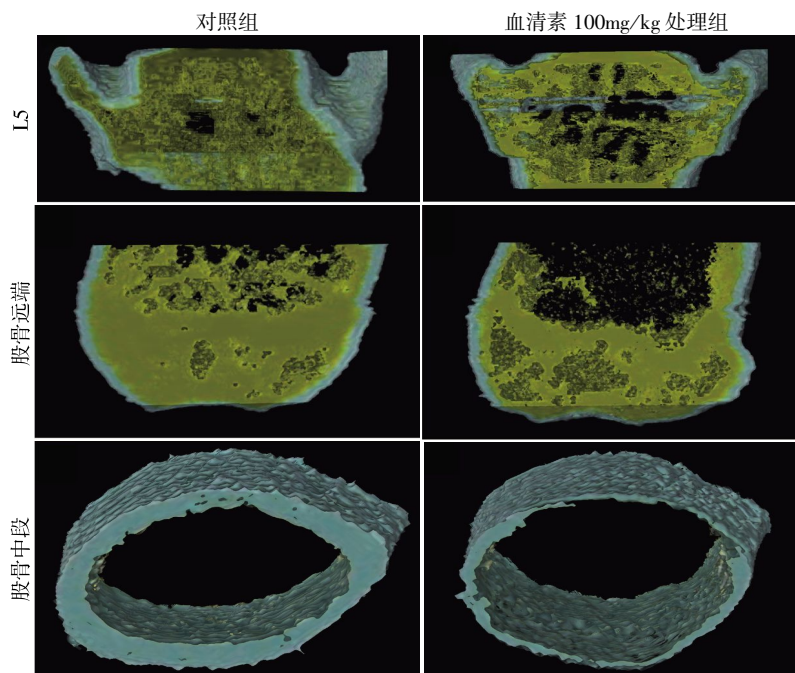


图 1 血清素处理组和对照组小鼠骨皮质及骨小梁 μ CT 重建
Figure 1 μ CT reconstruction of cortical and trabecular bones of experimental and control mice

我们的结果与以往的一些研究相一致。Warden 等^[25]发现,5-HT 转运体敲除的突变小鼠具有骨量降低、骨微结构改变、机械强度减弱的表型,而提高细胞外血清素水平,可使生长期小鼠的骨骼矿化能力受损。肠道外周血清素合成的限速酶敲除的小鼠表现为成骨细胞数量和骨形成率增加的继发的高骨量表型^[7]。此外,还有研究发现血液血清素水平与血液雌激素水平呈负相关^[20-21],而雌激素对于骨骼系统的骨量维持是正性调控的,这可能是血清素调节骨量的一个重要途径。有趣的是,Gustafsson 等^[13]报道长期应用血清素可以引起骨矿密度和皮质骨厚度升高,影响骨微结构,这不同于我们的结果。这种结果差异可能来源于实验动物(成年 C57BL/6 小鼠和生长期 SD 大鼠)和血清素干预剂量(5~100 mg/kg 和 5 mg/kg)的不同;此外还可能存在遗传背景的差异。这些研究表明,血清素对骨代谢的调控是复杂的,虽然其确切机制尚未阐明,但是血清素的确与骨代谢和骨发育有着密切的联系。

本实验的结果以及前人研究的成果支持血清素是骨形成的负性调节物这一观点。因此,通过药物特异性降低外周血清素的合成或者浓度可能是一种治疗骨质疏松症的新策略。事实上,类似的化合物 LP533401 已经产生,它能够抑制外周血清素合成的限速酶的活性进而抑制外周血清素的生成,而不影响中枢血清素的水平^[26]。然而从临床观点来看,

很多问题还有待解决。例如,还需阐明外周血清素对人体骨量的调节是否和小鼠相同或类似。由于血清素受体在体内的广泛分布,循环血清素水平的变化是否会对其他部位如胃肠道、肺和心脏产生不良影响等。

由于本研究刚刚起步,现在预测调节血清素是否具有临床应用价值还为时尚早。目前还没有相关文献报道调节血清素水平或者活性用来治疗骨质疏松性疾病,本研究结果提示继续探索血清素在骨重构过程中的作用会是一个有价值的研究方向。为此,还需要更多更深入的研究和探索。

[参考文献]

- [1] Somjen D. Vitamin D modulation of the activity of estrogenic compounds in bone cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2007, 17(2): 115-147
- [2] Vescini F, Grimaldi F. PTH 1-84: Bone rebuilding as a target for the therapy of severe osteoporosis [J]. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 2012, 9(1): 31-36
- [3] Anastasilakis AD, Polyzos SA, Delaroudis S, et al. The role of cytokines and adipocytokines in zoledronate-induced acute phase reaction in postmenopausal women with low bone mass [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2011, 77(6): 816-822
- [4] Ryan ND. Medication treatment for depression in children and adolescents [J]. *CNS Spectr*, 2003, 8(4): 283-287
- [5] Ambrosini PJ. A review of pharmacotherapy of major de-

- pression in children and adolescents[J]. *Psychiatr Serv*, 2000, 51(5): 627-633
- [6] Kastelic EA, Labellarte MJ, Riddle MA. Selective serotonin reuptake inhibitors for children and adolescents[J]. *Curr Psychiatry Rep*, 2000, 2(2): 117-123
- [7] Yadav VK, Ryu JH, Suda N, et al. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum [J]. *Cell*, 2008, 135(5): 825-837
- [8] Bliziotis MM, Eshleman AJ, Zhang XW, et al. Neurotransmitter action in osteoblasts; Expression of a functional system for serotonin receptor activation and reuptake [J]. *Bone*, 2001, 29(5): 477-486
- [9] Westbrook I, van der Plas A, de Rooij KE, et al. Expression of serotonin receptors in bone[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(31): 28961-28968
- [10] Cui Y, Niziolek PJ, MacDonald BT, et al. Lrp5 functions in bone to regulate bone mass [J]. *Nat Med*, 2011, 17(6): 684-691
- [11] Collet C, Schiltz C, Geoffroy V, et al. The serotonin 5-HT_{2b} receptor controls bone mass via osteoblast recruitment and proliferation [J]. *FASEB J*, 2008, 22(2): 418-427
- [12] Hirai T, Tokumo K, Tsuchiya D, et al. Expression of mRNA for 5-HT₂ receptors and proteins related to inactivation of 5-HT in mouse osteoblasts [J]. *J Pharmacol Sci*, 2009, 109(2): 319-323
- [13] Gustafsson BI, Thommesen L, Stunes AK, et al. Serotonin and fluoxetine modulate bone cell function *in vitro* [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 98(1): 139-151
- [14] Locker M, Bitard J, Collet C, et al. Stepwise control of osteogenic differentiation by 5-HT (2b) receptor signaling: Nitric oxide production and phospholipase A₂ activation [J]. *Cell Signal*, 2006, 18(5): 628-639
- [15] Baudry A, Bitard J, Mouillet-Richard S, et al. Serotonergic 5-HT (2b) receptor controls tissue-nonspecific alkaline phosphatase activity in osteoblasts via eicosanoids and phosphatidylinositol-specific phospholipase C [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(34): 26066-26073
- [16] Kimura S, Sasase T, Ohta T, et al. Characteristics of bone turnover, bone mass and bone strength in spontaneously diabetic Torii-Lepr fa rats [J]. *J Bone Miner Metab*, 2012, 30(3): 312-320
- [17] Maitra R, Follenzi A, Yaghoobian A, et al. Dendritic cell-mediated *in vivo* bone resorption [J]. *J Immunol*, 2010, 185(3): 1485-1491
- [18] Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the asbmr histomorphometry nomenclature committee [J]. *J Bone Miner Res*, 1987, 2(6): 595-610
- [19] Hildebrand T, Laib A, Muller R, et al. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone; Microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus [J]. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(7): 1167-1174
- [20] Ebeling PR, Russell RG. Teriparatide (rhPTH 1-34) for the treatment of osteoporosis [J]. *Int J Clin Pract*, 2003, 57(8): 710-718
- [21] Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases [J]. *Science*, 2000, 289(5484): 1508-1514
- [22] Hediger ML, England LJ, Molloy CA, et al. Reduced bone cortical thickness in boys with autism or autism spectrum disorder [J]. *J Autism Dev Disord*, 2008, 38(5): 848-856
- [23] Hanley HG, Stahl SM, Freedman DX. Hyperserotonemia and amine metabolites in autistic and retarded children [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 1977, 34(5): 521-531
- [24] Modder UI, Achenbach SJ, Amin S, et al. Relation of serum serotonin levels to bone density and structural parameters in women [J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(2): 415-422
- [25] Warden SJ, Robling AG, Sanders MS, et al. Inhibition of the serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter reduces bone accrual during growth [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(2): 685-693
- [26] Shi ZC, Devasagayaraj A, Gu K, et al. Modulation of peripheral serotonin levels by novel tryptophan hydroxylase inhibitors for the potential treatment of functional gastrointestinal disorders [J]. *J Med Chem*, 2008, 51(13): 3684-3687

[收稿日期] 2012-10-10