

甲状旁腺激素对去卵巢大鼠牙槽骨吸收的抑制作用

李 冰*, 陈 宁, 刘盘龙

(南京医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 观察甲状旁腺激素(human parathyroid hormone, PTH)对去卵巢大鼠牙槽骨的影响。方法: 选用 60 只 5 月龄雌性大鼠随机分 3 组, 其中两组作为药物治疗组和对照组均行全麻手术去除卵巢(ovariectomized, OVX), 建立骨质疏松模型, 另一组假手术组(sham-ovariectomized, sham-OVX)作为空白对照。6 周后药物治疗组(PTH 组)每日皮下注射人重组甲状旁腺激素(1-34)[recombinant human parathyroid hormone, rhPTH(1-34)], 模型组(OVX 组)和空白对照组(sham-OVX 组)每日注射定量生理盐水, 40 d 后处死各组大鼠制取下颌骨标本。分析 X 线投照影像比较各组牙槽骨丧失程度; 观察第一磨牙周围牙槽骨组织形态; 检测牙槽骨破骨细胞数目进行比较。结果: 影像学显示 OVX 组第一磨牙远中牙槽骨丧失(1.34 ± 0.89)mm 多于 PTH 组骨丧失量(0.78 ± 0.62)mm 和 sham-OVX 组骨丧失量(0.67 ± 0.54)mm, 差异具有统计学意义(P 均 < 0.05); 组织形态学染色显示 OVX 组牙槽骨骨质吸收较 PTH 组和 sham-OVX 组骨质吸收多; 破骨细胞计数显示 OVX 组破骨细胞数(38.6 ± 20.2)个分别多于 PTH 组(23.3 ± 13.0)个和 sham-OVX 组(25.0 ± 11.4)个, 差异具有统计学意义(P 均 < 0.01)。结论: PTH 对骨质疏松大鼠牙槽骨的吸收有抑制作用。

[关键词] 甲状旁腺激素; 去卵巢大鼠; 牙槽骨

[中图分类号] R392.12

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)12-1666-04

Parathyroid hormone (PTH) inhibits absorption of alveolar bone in ovariectomized rats

LI Bing*, CHEN Ning, LIU Pan-long

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of human parathyroid hormone(PTH)on alveolar bone of ovariectomized(OVX) rats. **Methods:** Sixty female 5-month-old rats were divided into three groups randomly, two groups, which were ovariectomized and developed into osteoporotic models, were named as PTH treated group (PTH group) and the control group (OVX group). Another group was sham ovariectomized (sham-OVX) as the blank control group (sham-OVX group). Six weeks later, the PTH group was injected with recombinant human parathyroid hormone(1-34)[rhPTH(1-34)] once daily for forty days, while the other two groups were injected with saline. Then they were sacrificed and their mandibles were separated respectively for radiological imaging, histomorphological observation and osteoclastic cell counting. **Results:** The radiological imaging analysis showed that the loss of the distal alveolar bone of the first molar in OVX group was more than that of either PTH group or sham-OVX group [(1.34 ± 0.89) mm vs. (0.78 ± 0.62) mm, (0.67 ± 0.54) mm], both $P < 0.05$. Meanwhile, the histomorphological observation suggested that the bone of OVX group was absorbed more than the other two groups. Besides, the cell counting results indicated that OVX group had more osteoclast than both PTH group and sham-OVX group (38.6 ± 20.2 vs. 23.3 ± 13.0 and 25.0 ± 11.4 respectively, both $P < 0.01$), which showed significant statistical differences. **Conclusion:** The absorption of alveolar bone of the osteoporotic rats can be inhibited by PTH.

[Key words] PTH; ovariectomized rats; alveolar bone

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(12): 1666-1669]

骨质疏松是临床较常见的疾病, 全世界骨质疏松症的发病率在慢性病中已上升至第 7 位, 患病人

数超过 2 亿, 其中尤以绝经后妇女发病更为多见, 且其发病率随年龄增长逐渐增高^[1]。骨质疏松是一种以单位体积内骨组织量减少为特点的代谢性骨病变, 既往已有不少研究致力于骨质疏松症的药物治疗, 2002 年一种人工合成的甲状旁腺激素(parathyroid

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK2011764)

*通讯作者, E-mail: icecreamyz@163.com.cn

hormone, PTH) 成为迄今唯一被美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)批准的用于促进骨形成的药物。颌骨是人体骨骼系统中最为活跃的部分,骨质疏松患者的牙槽骨会发生怎样的关联性的变化,PTH 药物对牙槽骨变化会造成什么样的影响,为了部分解答这些问题,本实验通过去除卵巢建立大鼠骨质疏松模型^[2],观察这些大鼠的牙槽骨变化,检测 PTH 的使用对该状况下的牙槽骨的作用情况^[3-5]。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究选用 5 月龄健康雌性 SD 大鼠(南京医科大学动物中心)60 只,体质量(210 ± 20)g,随机分为药物治疗组(PTH 组)、模型组(OVX 组)和空白对照组(sham-OVX 组),每组 20 只。

1.1 方法

1.2.1 模型建立及治疗方法

PTH 组和 OVX 组大鼠常规全麻下行双侧卵巢切除术(ovariectomized, OVX),以建立骨质疏松动物模型。sham-OVX 组大鼠打开腹腔后不切除双侧卵巢(sham-ovariectomized, sham-OVX),仅切除卵巢附近小部脂肪组织,然后分层缝合。术后 6 周,PTH 组大鼠予以每天皮下注射人重组甲状旁腺激素(1-34)[recombinant human parathyroid hormone(1-34), rh-PTH(1-34)](Sigma-Aldrich 公司,美国),剂量 100 μg/kg,每天 1 次。OVX 组和 sham-OVX 组每天皮下注射生理盐水 0.2 ml,持续 40 d。40 d 后 3 组大鼠同时处死,取出右侧下颌骨,剔净软组织,固定于 40 g/L 多聚甲醛中 72 h 后,修整标本保留磨牙区段及其牙槽骨。

1.2.2 X 线检测第一磨牙远中牙槽骨

各组标本以 X 线投射。标本平放,采用 Focus 数字化口腔 X 线仪进行 X 线投照,参数 I=7 mA, T=0.080 s, U=70 kV,射线方向与右下颌第一磨牙颊面垂直,球管平面中心与第一磨牙远中釉牙骨质界(cemento-enamel junction, CEJ)连线与该磨牙颊面垂直,球管平面距离标本颊面 5 cm,以 SOPRO IMAGING 系统采集图像,软件测量 CEJ 至牙槽嵴顶之间的距离(CEJ-B)。

1.2.3 组织形态学观察

将标本于 15%乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙液中脱钙 1 个月。脱水、透明、石蜡包埋、取右下颌第一磨牙颊舌向切片,制成厚约 5 μm 的组织切片。行苏木精-伊红染色(HE 染色);苏木精染色,1%盐酸酒

精分化,流水冲洗泛蓝,伊红复染,常规脱水透明,中性树胶封片。

1.2.4 检测破骨细胞数量

如上将制备好的各组切片,脱蜡水化、脱水,行耐酒石酸酸性磷酸酶染色(TRAP 染色):酒石酸盐缓冲液孵育标本 20 min, TRAP 染色液孵育 15 min,流水冲洗 3 min,甲基绿复染 5 min,冲洗,中性树胶封固。光镜下观察,以 TRAP(+)多核细胞(3 个或 3 个以上)为破骨细胞。每个颌骨样本取 5 张切片。每张切片在 400 倍光镜下随机取 10 个视野进行破骨细胞计数,其计数和作为整张切片破骨细胞数,5 张切片细胞计数结果的平均数为该样本的最终结果。

1.3 统计学方法

分别比较各组 CEJ-B 测量结果和破骨细胞计数结果,使用 SPSS17.0 统计软件,采用单因素方差分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 X 线投射影像测量

OVX 组第一磨牙远中牙槽骨高度明显降低,牙槽嵴顶与釉牙骨质界之间距离增大,3 组 CEJ-B 测量值分别为 PTH 组:(0.78 ± 0.62)mm;OVX 组:(1.34 ± 0.89)mm;Sham-OVX 组(0.67 ± 0.54)mm。OVX 组 CEJ-B 测量值分别大于 PTH 组($P = 0.014$)和 sham-OVX 组($P = 0.04$),差异具有统计学意义(均为 $P < 0.05$),而 sham-OVX 组和 PTH 组这两组的距离值相似($P = 0.627$),无明显差异($P > 0.05$,表 1,图 1)。

2.2 组织形态学观察

HE 染色结果可见,PTH 组与 sham-OVX 组第一磨牙根分叉之间牙槽嵴形态尚完整,OVX 组根分叉间牙槽骨丧失比较明显,存在较多骨吸收陷窝,陷窝内可见破骨细胞(图 2)。

2.3 破骨细胞染色计数

对破骨细胞进行 TRAP 染色计数,3 组计数值分别为 PTH 组:(23.3 ± 13.0)个;OVX 组:(38.6 ± 20.2)个;Sham-OVX 组:(25.0 ± 11.4)个。OVX 组的破骨细胞数分别多于 PTH 组($P = 0.003$)和 sham-OVX 组($P = 0.007$),结果具有明显差异(均为 $P < 0.01$),而 sham-OVX 组与 PTH 组之间破骨细胞数比较($P = 0.722$)无明显差异($P > 0.05$,表 1,图 3)。

3 讨论

骨质疏松症主要分为原发性和继发性两大类。

表 1 各组大鼠牙槽骨 CEJ-B 测量值及各组样本破骨细胞计数

Table 1 The CEJ-B distance of alveolar bone and the osteoclastic cell counting of samples of different groups ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	CEJ-B 测量值(mm)	破骨细胞计数(个)
PTH 组	0.78 ± 0.62*	23.3 ± 13.0**
OVX 组	1.34 ± 0.89	38.6 ± 20.2
Sham-OVX 组	0.67 ± 0.54*	25.0 ± 11.4**

与 OVX 组比较, *P < 0.05, **P < 0.01。

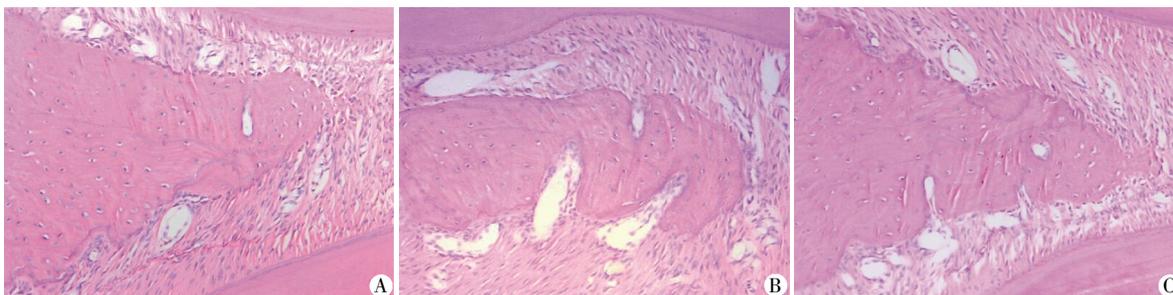
原发性骨质疏松是由于年龄增加或妇女绝经后骨质逐渐减少,其中尤以绝经后骨质疏松多见^[6]。骨质疏松患者的颌骨牙槽骨可能出现与该疾病相关联的变化。部分动物实验和临床研究已经证明了骨质疏松对牙槽骨的矿物质含量和剩余牙槽骨体积都有明显影响^[7-9]。发现去卵巢大鼠的股骨和牙槽骨密度均降低,二者呈正相关。并发现去卵巢大鼠第一磨牙根分叉区的骨小梁体积、数量、硬度显著降低^[10]。另亦有研究表明绝经后骨质疏松症妇女牙槽骨高度明



A:PTH 组;B:OVX 组;C:sham-OVX 组。

图 1 各组大鼠右下磨牙及牙槽骨 X 线投射影像

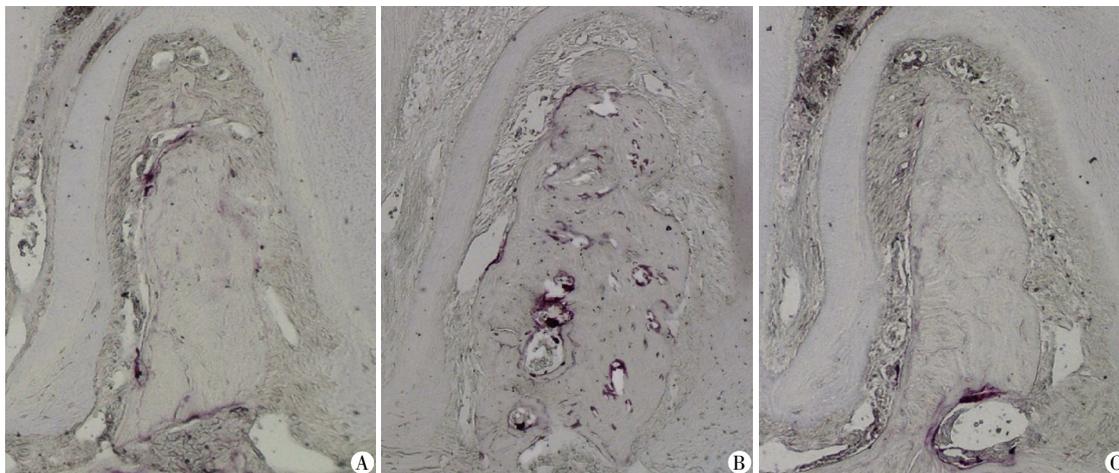
Figure 1 The radiological imaging of the right mandibular molars and alveolar bone of different groups



A:PTH 组;B:OVX 组;C:sham-OVX 组。

图 2 各组大鼠第一磨牙牙槽骨组织形态(HE,× 200)

Figure 2 Histological morphology of the alveolar bone of the first molar of different groups(HE staining, × 200)



A:PTH 组;B:OVX 组;C:sham-OVX 组。

图 3 各组大鼠第一磨牙牙槽骨破骨细胞染色(TRAP,× 100)

Figure 3 Osteoclastic staining of alveolar bone of the first molar of different groups (TRAP staining, × 100)

显降低, 骨密度减少。

本实验结果提示了对去卵巢大鼠使用 PTH 可以减少第一磨牙根周牙槽骨的骨丧失。大鼠去除卵巢以后, 在观察结果的时间点, 牙槽骨表现出的征象为骨质吸收; 同等条件但使用 PTH 的动物这种骨质吸收并不明显, 所观察到的破骨细胞活动少于骨质疏松的大鼠。这个结果的机制可能与 PTH 双向骨作用机制有关。PTH 抑制成骨细胞凋亡^[11], 延长成骨细胞寿命, 间断使用 PTH 可以增加成骨细胞活性^[12], 并有可能增加成骨细胞数量; PTH 同时可以对破骨细胞起诱导作用, 活化破骨细胞, 而 PTH 的骨合成效应有可能需要依赖骨吸收的诱导来实现^[13]。

有研究发现, PTH 带来的骨代谢作用, 与给药方式有关, 间歇给药时主要起到骨合成效应, 而 PTH 的持续灌注且大剂量时, 可能造成骨吸收, 使皮质骨量丢失^[14], 这两种使用方式导致相反结果的原因尚不清楚。既往研究表明 PTH 直接通过与成骨细胞上的甲状旁腺激素受体 (parathyroid hormone receptor, PTHR) 结合促进骨形成作用^[15]。个体的长骨和颌骨对 PTH 刺激的反应敏感性可能不同, 间断给药刺激去卵巢大鼠时, 它对长骨的骨形成效应可能远大于牙槽骨。这可能与 PTHR 在不同组织中的表达差异有关^[16], 或者是不同胚胎来源的骨组织对于 PTH 的敏感性不同。

本实验主要关注骨质疏松动物牙槽骨的变化以及药物作用全身以后牙槽骨受到的影响。而发生于个体的颌骨牙槽骨的吸收可能并不能归于单一原因, 骨质疏松等系统疾病可能与局部牙周炎因素协同造成骨的丧失, 有时二者不能完全割裂, 尤其老年患者。牙槽骨吸收是牙周炎的主要病理变化之一, 对于绝经后妇女来说, 牙槽骨吸收究竟是以局部因素为主, 还是全身骨骼系统的病理改变在口腔局部的表征, 目前还不能给出定论^[17], 骨质疏松对牙周炎的发生发展是否起到促发或推进作用也有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Zhang J, Ge N, Huang XL, et al. Review of drugs treatment for osteoporosis [J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 2006, 26(4): 313-315
- [2] Kanako S, Elsubeihi ES, Heersche JNM. Effects of variectomy on turnover of alveolar bone in the healed extraction socket in rat edentulous mandible[J]. Archives of Oral Biology, 2011, 56(2): 114-120
- [3] 丁 晨, 唐维坤, 孙茂盛, 等. 重组人甲状旁腺激素(1-84)对去卵巢大鼠骨质疏松模型的影响[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(6): 1185-1187
- [4] 郭淑娟, 王耀生, 李晓菁, 等. 雌激素对去卵巢大鼠牙槽骨组织结构和 MT1 - MMP 表达的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2009, 19(3): 132-135
- [5] 张晓燕, 崔 燎, 吴 铁. 丹参素防治去卵巢大鼠牙槽骨骨量的丢失[J]. 口腔医学研究, 2008, 24(2): 148-151
- [6] 徐 进, 荣海钦, 季 虹, 等. 甲状旁腺激素相关蛋白对去卵巢大鼠骨组织中 OPG、RANKL 基因表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(12): 854-858
- [7] Binte Anwar R, Tanaka M, Kohno S. Relationship between porotic changes in alveolar bone and spinal osteoporosis [J]. J Dent Res, 2007, 86(1): 52-57
- [8] Jiang GZ, Matsumoto H, Mami Hori, et al. Correlation among geometric, densitometric, and mechanical properties in mandible and femur of osteoporotic rats [J]. J Bone Miner Metab, 2008, 26: 130-137
- [9] Brennan-Calanan RM, Genco R J, Wilding GE, et al. Osteoporosis and oral infection; independent risk factors for oral bone loss [J]. J Dent Res, 2008, 87(4): 323-327
- [10] Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, et al. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone [J]. J Periodontal Res, 2002, 37(2): 161-165
- [11] Thomas T. Intermittent parathyroid hormone therapy to increase bone formation [J]. Joint Bone Spine, 2006, 73(3): 262-269
- [12] Wang Y, Nishida S, Boudignon BM, et al. IGF-I receptor is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on bone [J]. J Bone Miner Res, 2007, 22(9): 1329-1337
- [13] 栾明亮, 陈 宁, 杨笑哈, 等. 内源性甲状旁腺激素抑制实验性小鼠牙周炎牙槽骨的吸收 [J]. 口腔医学, 2009, 29(4): 186-189
- [14] Soung YD, Naik A, Kaback LA, et al. Teriparatide (1-34 human PTH) regulation of osterix during fracture repair [J]. J Cell Biochem, 2008, 105(1): 219-226
- [15] Wang Y, Nishida S, Boudignon BM, et al. IGF-I receptor is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on bone [J]. J Bone Miner Res, 2007, 22(9): 1329-1337
- [16] 刘 洪, 王子露, 王琰玲, 等. 1, 25(OH)₂D₃ 缺乏对小鼠下颌骨体及髁突骨形成的影响 [J]. 实用口腔医学杂志, 2011, 27(5): 597-602
- [17] Sidiropoulou-Chatzigiannis S, Kourtidou M, Tsalikis L. The effect of osteoporosis on periodontal status, alveolar bone and orthodontic tooth movement. A literature review [J]. J Int Acad Periodontol, 2007, 9(3): 77-84

[收稿日期] 2012-05-17