论著

文章编号:1000-5404(2010)14-1512-04

氯化锂对尾吊大鼠骨丢失的防护作用

崔 猛[1],牛银波[1],刘广兴[2],王婷梅[1],黄 勇[1],梅其炳[1,3] (710072 西安,西北工业大学生命科学院空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室[1];215163 苏州,中国科学院苏州生物医学工程技术研究所[2];710072 西安,第四军医大学药学系药理教研室[3])

[摘要] 目的 研究GSK3特异性抑制剂氯化锂(lithium chloride,LiCl)对尾吊大鼠骨密度的影响。方法 SD雄性大鼠18只,分为3组:正常对照组(Control)、尾吊对照组、尾吊LiCl组,每组6只。尾吊LiCl组大鼠每日灌胃给予LiCl 20 mg/(kg·d)。分别于第1天和第15天使用双能X线骨密度测量仪测定大鼠左股骨骨密度(bone mineral density,BMD);第15天处死大鼠取左胫骨近心端进行组织包埋切片,HE染色,进行骨组织计量学测量,包括骨小梁面积百分率(Tb. Ar%)、骨小梁数量(Tb. N)、骨小梁平均厚度(Tb. Th);对大鼠右股骨进行三点弯曲实验,测量骨力学指标。采用Western blot观察骨组织中β-catenin蛋白的表达。结果 实验结束后,尾吊对照组和尾吊LiCl组大鼠BMD均低于正常对照组($P<0.05$),而尾吊对照组大鼠BMD明显低于尾吊LiCl组($P<0.01$);骨组织计量学结果,尾吊对照组大鼠骨小梁平均厚度低于正常对照组($P<0.05$),骨小梁面积百分率、骨小梁数量明显低于正常对照组($P<0.01$),而尾吊LiCl组大鼠三项参数均高于尾吊对照组($P<0.05$);骨力学测试结果,尾吊对照组大鼠股骨弹性模量低于正常对照组($P<0.05$),刚性系数明显低于正常对照组($P<0.01$),而尾吊LiCl组大鼠股骨弹性模量高于尾吊对照组($P<0.05$),刚性系数明显高于尾吊对照组($P<0.01$)。Western blot结果显示,尾吊对照组β-catenin蛋白表达量明显低于正常对照组,而尾吊LiCl组β-catenin蛋白表达量明显高于尾吊对照组。结论 尾部悬吊能够造成大鼠废用性骨丢失,而LiCl能有效地预防尾吊所导致的骨质疏松。

[关键词] 失重模拟;大鼠;氯化锂;骨密度;骨和骨组织;生物力学

[中图法分类号] R-332;R681.05;R914.3 [文献标志码] A

Protective effects of lithium chloride on bone loss in hindlimb unloading rats

Cui Meng[1], Niu Yinbo[1], Liu Guangxing[2], Wang Tingmei[1], Huang Yong[1], Mei Qibing[1,3] ([1]Key Laboratory for Space Bioscience and Biotechnology, Faculty of Life Science, Northwest Polytechnical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710072; [2]Institute of Biomedical Engineering Technology of Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu Province, 215163; [3]Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710072, China)

[Abstract] Objective To investigate the effect of lithium chloride (LiCl), a special inhibitor of GSK-3 in Wnt signal pathway, on the bone loss of hindlimb unloading rats. Methods Eighteen male SD rats were randomly divided into 3 groups: control group, hindlimb unloading (HU) group, and HU + LiCl group. The HU + LiCl group were intragastric administrated with LiCl [20 mg/(kg·d)]. Bone density (BMD) of the rats' left femurs on the 1st and 15th days was measured by dual energy X-ray absorptiometry (DEXA). On day 15, all rats were sacrificed to remove the proximal part of the left femur for HE staining. Then the morphological changes were observed, and bone histomorphometry including percent trabecular area (Tb. Ar%), trabecular number (Tb. N), and trabecular thick (Tb. Th) was carried out. Rats' right femurs were resected to measure the bone biomechanical indexes in three-point bending experiments. The expression of β-catenin protein of bone was tested by Western blotting. Results BMD of the HU group and HU + LiCl group were lower than that of the control group ($P<0.05$), while that of the HU group were significantly lower than the HU + LiCl group ($P<0.01$). Tb. Th of HU group was lower than that of control group ($P<0.05$), while the Tb. Ar% and

[基金项目] 陕西省自然科学基金(200900277);西北工业大学种子基金项目(Z200985)

[通信作者] 梅其炳,电话:(029)84779212,E-mail:qbmei@nwpu.edu.cn

Tb. N of HU group were significantly lower than those of control group ($P<0.01$), but these 3 indexes of the HU + LiCl group were higher than HU group ($P<0.05$). The elastic modulus of HU group were lower than control group ($P<0.05$), and the stiffness coefficient of HU group were significantly lower than control group ($P<0.01$), while the elastic modulus of HU + LiCl group were higher than those of HU group ($P<0.05$) and the stiffness coefficient of HU + LiCl group were significantly higher than HU group ($P<0.01$). Western blotting showed that the expression of β-catenin of HU group was lower than control group, while HU + LiCl group was higher than HU group. **Conclusion** Hindlimb unloading can cause bone loss in rats with disuse. LiCl may be used to prevent rats' osteoporosis caused by hindlimb unloading.

[Key words] weightlessness simulation; rats; Lithium chloride; bone mineral density; bone and bone tissue; biomechanics

Supported by the Natural Science Foundation of Shaanxi Province (2009C0303) and the Seed Foundation of Northwest Polytechnical University (Z200985).
Corresponding author: Mei Qibing, Tel: 86-29-84779212, E-mail: qbmei@nwpu.edu.cn

废用性骨丢失引起的骨质疏松症是指长期卧床、制动或失重等活动因素而导致的骨量减少,骨细微结构退化引起的骨脆性增加,易发生骨折的一种全身性或局部性骨骼系统疾病[1,2]。在航天失重环境下,骨代谢功能紊乱,骨密度降低,骨骼脱矿,骨力学性能下降,骨丢失主要发生在承重骨,如跟骨、胫骨、股骨和腰椎。微重力条件下骨形成参数Ⅰ型胶原、骨碱性磷酸酶和骨钙素明显下降,而骨吸收参数前胶原C端肽、脱氧吡啶往往正常或仅轻度升高,因此骨形成减少和骨基质成熟障碍是微重力(去负荷)引起骨丢失的根本原因[3,4]。研究[5-10]表明,Wnt信号途径在骨形成和骨代谢平衡调控中发挥着极其重要的作用。氯化锂(lithium chloride,LiCl)作为Wnt信号通路中GSK-3的抑制剂,可使GSK-3的底物β-catenin免受降解,β-catenin在胞内大量累积并进入核内,进而启动靶基因的表达,刺激骨髓间质干细胞向成骨细胞分化,增加骨形成率,使成骨细胞数目明显增加[11]。然而,Wnt信号途径是否参与废用性骨丢失性骨丢失,是否能防治模拟失重引起的骨丢失尚需探明。本实验对此进行了研究,重点观察LiCl对大鼠骨生物力学及骨代谢的影响,以期为抗失重引起的骨丢失的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SD雄性大鼠18只,体质量266~289 g,购自第四军医大学实验动物中心。饲养条件:温度22~26 ℃,相对湿度50%~70%,光照12 h,用全价营养颗粒饲料(由第四军医大学实验动物中心提供),自由饮用自来水;实验前适应性饲养1周,开始实验。

1.2 药物及试剂

LiCl(WOLSEN公司),β-actin及β-catenin抗体(Santa Cruz公司),戊巴比妥钠(Sigma公司)。

1.3 动物模型的建立

选择健康动物分为3组:正常对照组、尾吊对照组、尾吊LiCl组,每组6只。尾吊对照组、尾吊LiCl组大鼠进行尾吊造模。采用陈杰等[12]方法将尾吊对照组、尾吊LiCl组大鼠尾部悬挂于悬吊笼横梁,使躯干与地面成30°角,大鼠前肢可自由活动,获取水和食物,身体可以360°水平旋转。配制1% LiCl溶液,尾吊LiCl组大鼠分别按20 mg/(kg·d)剂量灌胃给予LiCl;正常对照组与尾吊对照组大鼠给予2 ml/(kg·d)生理盐水。在第1天和实验结束时(第15天),用3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,进行骨密度(BMD,g/mm^3)测量;实验结束后,大鼠腹主动脉放血处死,分离大鼠胫骨、股骨,10%福尔马林保存;取大鼠股骨用于骨力学指标测量;取大鼠左胫骨近心端进行常规石蜡包埋、组织切片以及HE染色;取大鼠右胫骨近心端用于Western blot检测。

1.4 大鼠骨密度(BMD)测量

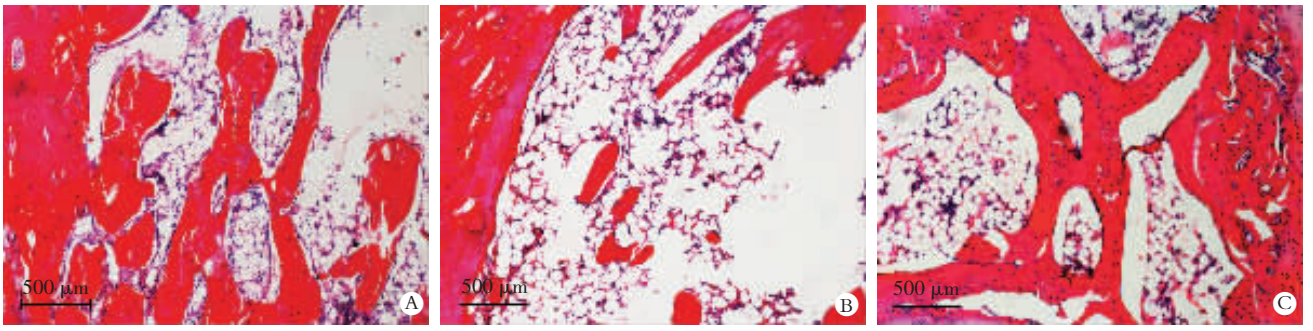
用30 mg/kg戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,四肢展开平置于美国Lunar公司生产的双能X线吸收测量仪平台上,通过小动物软件测定系统测定大鼠股骨近心端股骨颈BMD。

1.5 大鼠胫骨形态学观察及形态计量学分析

光镜下观察大鼠胫骨组织切片形态学特征。使用尼康公司全自动图像采集系统对HE染色组织切片进行图像采集,Image Pro-Plus 6.0图像分析软件进行数据分析,测量骨参数:①骨小梁面积百分率骨小梁面积百分率(Tb. Ar%);②骨小梁数量(Tb. N,个/mm);③骨小梁平均厚度(Tb. Th,μm)。

1.6 大鼠股骨生物力学指标测定

使用SANS CMT8502型电子万能试验机对大鼠股骨进行三点弯曲实验,加载速度为2 mm/min,支点跨距为2 cm。函数记录分析软件得出载荷-变形曲线,游标卡尺测量标本最大、最小内外径,计算弹性载荷及刚度系数[13]。



A :正常对照组;B :尾吊对照组;C :尾吊 LiCl 组

图 1 各组大鼠胫骨切片 HE 染色光镜观察

1.7 Western blot 检测

将胫骨碾磨成粉末,后加入 RIPA(含 PMSF 蛋白酶抑制剂)细胞裂解液提取总蛋白,用 Bio-Rad 酶标仪进行蛋白定量(Beyotime Institute of Biotechnology)。蛋白变性后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜。NC 膜用 5% 脱脂牛奶室温封闭 3 h,加 1∶200 兔抗 β-catenin 及鼠抗 β-actin 一抗室温孵育 30 min,之后 4 ℃过夜,TBST 洗膜后加 1∶3 000 相应的 HRP 标记二抗室温孵育 1 h,TBST 及 TBS 洗膜后暗室进行化学发光。最后进行灰度分析以观察 β-catenin 蛋白相对表达水平的变化。

1.8 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件处理实验数据,各组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 大鼠股骨 BMD 检测

由表 1 可见,实验前各组大鼠 BMD 均无显著性差异;实验结束后,尾吊对照组与尾吊 LiCl 组大鼠 BMD 均低于正常对照组($P<0.05$);尾吊对照组大鼠 BMD 明显低于尾吊 LiCl 组($P<0.01$)。

表 1 各组大鼠股骨密度比较(g/mm^3, $n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	1 d	15 d
正常对照组	0.149 ± 0.006	0.150 ± 0.005
尾吊对照组	0.148 ± 0.015	0.141 ± 0.016[a]
尾吊 LiCl 组	0.147 ± 0.006	0.146 ± 0.005[ab]

a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,与尾吊对照组比较

2.2 大鼠胫骨形态学观察

大鼠胫骨近心端 HE 染色切片在光镜下观察,可见正常对照组小梁骨纵横交错呈网状,排列整齐,骨小梁粗壮、饱满,形态结构完整,骨髓腔相对较小。尾吊对照组骨小梁稀疏、纤细,数量明显减少且形态结构完整性差,骨小梁连接点减少,游离末端增多,骨小梁间隙增大,骨髓腔相对扩大,部分区域骨小梁消失;与尾吊对照组相比,尾吊 LiCl 组骨小梁数量及小梁密集程度明显增高。见图 1。

2.3 大鼠骨计量学参数

由表 2 可见,尾吊对照组骨小梁面积百分率明显低于正常对照组($P<0.01$),尾吊 LiCl 组骨小梁面积百分率与正常对照组相比无显著差异;尾吊对照组骨小梁数量明显低于正常对照组($P<0.01$),尾吊 LiCl 组骨小梁数量低于正常对照组($P<0.05$);尾吊对照组骨小梁平均厚度低于正常对照组($P<0.05$),尾吊 LiCl 组骨小梁平均厚度与正常对照组相比无显著差异。尾吊 LiCl 组大鼠骨小梁面积百分率、骨小梁数量、骨小梁平均厚度均高于尾吊对照组($P<0.05$)。

表 2 各组大鼠骨计量学参数比较($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	骨小梁面积百分率(%)	骨小梁数量(个/mm)	骨小梁平均厚度(μm)
正常对照组	30.91 ± 1.69	4.82 ± 0.81	32.68 ± 2.94
尾吊对照组	21.46 ± 4.95[b]	3.05 ± 0.75[b]	30.26 ± 3.8[a]
尾吊 LiCl 组	28.05 ± 2.88[c]	3.57 ± 0.52[ac]	33.21 ± 2.3[c]

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与正常对照组比较;c:$P<0.05$,与尾吊对照组比较

2.4 大鼠股骨力学测试

由表 3 可见,大鼠股骨弹性模量,尾吊对照组低于正常对照组($P<0.05$),尾吊 LiCl 组与对照组相比无显著差异;大鼠股骨刚性系数,尾吊对照组明显低于正常对照组($P<0.01$),尾吊 LiCl 组与对照组相比无显著差异($P>0.05$)。尾吊 LiCl 组大鼠股骨弹性模量高于尾吊对照组($P<0.05$),刚性系数明显高于尾吊对照组($P<0.01$)。

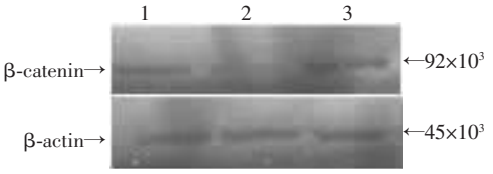
表 3 各组大鼠股骨力学指标比较($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	弹性模量(MPa)	刚性系数($\times 10^4$ N/mm^2)
正常对照组	8 337.67 ± 972.46	2.82 ± 0.32
尾吊对照组	7 252.33 ± 631.02[a]	2.11 ± 0.11[b]
尾吊 LiCl 组	8 404.57 ± 707.34[c]	2.73 ± 0.30[d]

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与正常对照组比较;c:$P<0.05$, d:$P<0.01$,与尾吊对照组比较

2.5 LiCl 对大鼠骨组织中 β-catenin 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,尾吊对照组 β-catenin 蛋白表达量明显低于正常对照组,而尾吊 LiCl 组 β-catenin 蛋白表达量明显高于尾吊对照组。见图 2。



1：正常对照组；2：尾吊对照组；3：尾吊 LiCl 组

图 2 Western blot 检测大鼠骨组织中 β-catenin 蛋白的表达

3 讨论

骨质疏松症以低骨量和骨组织微细结构破坏为特征，骨质中的钙逐渐流失，骨量减少，骨组织的细微结构被破坏，骨脆性增加。作为衡量骨质状况的重要指标，骨密度、骨组织计量学指标及力学指标在很大程度上能够反映骨的代谢情况。经典 Wnt/β-catenin 信号通路在骨形成和骨代谢过程中发挥着极其重要的调控作用，通路中的关键核心分子 GSK3 的底物 β-catenin 在细胞质中积聚转入核内时，可刺激 Wnt 信号下游一系列靶基因的转录，调控细胞生长[14]。调节 β-catenin 在胞内的稳定以及它在胞内的累积是 Wnt 信号通路中最关键的事件之一。许多 GSK3 的小分子抑制剂（LiCl，Chir99021 和 LY603281-31-8）可使 GSK-3β 的底物 β-catenin 免受降解，β-catenin 在胞内大量累积并进入核内，进而启动靶基因的表达，促进体外成骨细胞发育及体内的骨形成。LiCl 作为 GSK-3β 磷酸化抑制剂，有可能促进 Wnt/β-catenin 信号途径靶基因表达，从而抑制骨丢失[7,9]。

本实验结果显示，尾吊 2 周后，大鼠股骨骨密度、骨力学指标显著下降。胫骨近心端骨质以骨松质为主，骨小梁多呈纵向分布。现已证实，骨松质中的小梁骨按主应力方向排布[15]。大鼠形态计量学分析结果显示，尾吊组大鼠胫骨近端骨小梁面积比、骨小梁数量均有所下降，骨小梁明显变稀疏，小梁间距增大，部分区域骨小梁消失，表明去负荷可造成骨小梁显微结构退化，骨量减少。本实验结果显示，尾吊 LiCl 组大鼠骨小梁数量及小梁密集程度明显高于尾吊对照组，骨小梁面积百分率、骨小梁数量、骨小梁平均厚度亦明显高于后者。与此同时，尾吊 LiCl 组大鼠骨生物力学指标股骨弹性模量和刚性系数均高于尾吊对照组。骨密度测试和 Western blot 结果表明 LiCl 可促进尾吊大鼠成骨细胞上 β-catenin 蛋白的表达，从而确保了 β-catenin 的入核量而促进骨形成，增加尾吊大鼠的骨密度，最终达到改善骨质量的作用。

LiCl 属低毒类物质，大鼠经口半数致死剂量（LD_{50}）为 526 mg/kg。在本实验中，未观察到大鼠明显的毒副反应。本研究证明，通过口服 LiCl 能够有效延缓尾吊大鼠的骨丢失，防止骨密度降低。可以设想，通过 LiCl 活化 Wnt/β-catenin 通路，无疑是开发预防卧床不起、中长期航天等废用性骨质疏松药物的可行途径。由于 Wnt 信号转导过程尚未完全阐明，尚需进一步探究 LiCl 促进 Wnt/β-catenin 信号途径，从而抑制骨丢失的详细机制。

参考文献：

[1] 唐学阳，彭明惺，刘利君. 废用性骨质疏松症的运动疗法[J]. 现代康复，2001，5(3)：24－25.

[2] 郭世绂. 废用性骨质疏松症[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志，2008，1(2)：81－84.

[3] Marie P J，Jones D，Vico L，*et al*. Osteobiology，strain，and microgravity：part I. Studies at the cellular level[J]. Calcif Tissue Int，2000，67(1)：2－9.

[4] Vico L，Hinsenkamp M，Jones D，*et al*. Osteobiology，strain，and microgravity. Part II：studies at the tissue level[J]. Calcif Tissue Int，2001，68(1)：1－10.

[5] Glass D A 2nd，Karsenty G. *In vivo* analysis of Wnt signaling in bone[J]. Endocrinology，2007，148(6)：2630－2634.

[6] Yavropoulou M P，Yovos J G. The role of the Wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation[J]. Hormones (Athens)，2007，6(4)：279－294.

[7] Gaur T，Lengner C J，Hovhannisyan H，*et al*. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression[J]. J Biol Chem，2005，280(39)：33132－33140.

[8] Bodine P V. Wnt signaling control of bone cell apoptosis[J]. Cell Res，2008，18(2)：248－253.

[9] Urano T. Wnt-beta-catenin signaling in bone metabolism[J]. Clin Calcium，2006，16(1)：54－60.

[10] Nelson W J，Nusse R. Convergence of Wnt，beta-catenin，and cadherin pathways[J]. Science，2004，303(5663)：1483－1487.

[11] Clement-Lacroix P，Ai M，Morvan F，*et al*. Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2005，102(48)：17406－17411.

[12] 陈杰，马进，丁兆平，等. 一种模拟长期失重影响的大鼠尾部悬吊模型[J]. 空间科学学报，1993，13(2)：159－162.

[13] 陈孟诗，赖胜祥，李良，等. 大鼠的骨生物力学指标选取及测试[J]. 生物医学工程学杂志，2001，18(4)：547－551.

[14] Tulac S，Nayak N R，Kao L C，*et al*. Identification，characterization，and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium[J]. J Clin Endocrinol Metab，2003，88(8)：3860－3866.

[15] 陈冬平，李培静. 限制运动对大鼠股骨、胫骨物理性状、生物力学指标及骨形成蛋白 2 表达的影响[J]. 第四军医大学学报，2007，28(11)：964－967.

（收稿 2009-12-16 修回 2010-01-25）

（编辑 吴培红）