论著

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201502029

模拟空间环境X射线和微重力对大鼠骨丢失的影响

杨晓勇[1,2],唐 辉[2],徐永清[2],蔡志军[3],赵庆凯[1,2],汤 逊[1,2] (400038 重庆,第三军医大学研究生管理大队[1];650032 昆明,成都军区昆明总院附属骨科医院,全军创伤骨科研究所[2];650032 昆明,昆明医科大学昆明总院临床分院[3])

[摘要] **目的** 探讨辐照和微重力对于骨代谢是否存在交互作用。**方法** 2月龄雄性Wistar大鼠分为正常对照组、X射线辐照组(X-ray组)、尾吊模型组(HLS组)及尾吊结合X射线辐照组(HLS+X-ray组)。分别对HLS组和HLS+X-ray组进行4 Gy X射线全身辐照,对HLS+X-ray组进行尾吊实验来模拟空间环境下辐射和微重力的条件,检测骨密度、骨小梁的数目、骨小梁的分离程度、骨小梁的厚度、骨体积分数、结构模型指数等参数并检测了骨碱性磷酸酶(ALP)、酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)、骨钙素(OCN)的及骨调节基因Rankl、Runx2、Nfatcl的表达变化,研究两种因素所引起的骨丢失是否有相应的交互作用。**结果** 尾吊和X射线辐照在骨丢失方面引起了显著的变化,同正常对照组相比,HLS组和X-ray组的骨密度、骨小梁的数目、骨小梁的厚度、骨体积分数均表现为降低趋势($P<0.05$),HE染色显示HLS组、X-ray组和HLS+X-ray组中都出现骨小梁数量减少等特征,说明各个模型组都存在骨丢失现象,以HLS+X-ray组最为明显($P<0.05$)。Rankl、Nfatcl以及酒石酸酸性磷酸酶的表达在HLS组、X-ray组及HLS+X-ray组均上升($P<0.05$)。碱性磷酸酶和骨钙素的表达在HLS组、X-ray组及HLS+X-ray组均有所下降($P<0.05$)。而作为成骨细胞特异性表达的Runx2基因在HLS组和X-ray组却没有任何改变,在HLS+X-rays组发生了显著的下调($P<0.05$)。**结论** 尾吊和X射线双因素能够引起骨密度更大的丢失,两者存在交互作用,破坏程度会更加严重。

[关键词] 骨丢失;模拟微重力;X射线辐照;骨小梁参数

[中图法分类号] R322.71;R852.22;R852.7 [文献标志码] A

Effect of X-ray radiation and microgravity on bone loss

Yang Xiaoyong[1,2], Tang Hui[2], Xu Yongqing[2], Cai Zhijun[3], Zhao Qingkai[1,2], Tang Xun[1,2] ([1]Administration Office for Graduate Students, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Institute of Orthopaedic Trauma, Affiliated Orthopaedics Hospital of Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming, Yun Nan Province, 650032; [3]Kunming General Hospital Clinical Branch, Kunming Medical University, Kunming, Yun Nan Province, 650032, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of X-ray radiation and microgravity on bone metabolism. **Methods** Male Wistar rats were divided into a control group, an X-ray radiation group (X-ray group), a hindlimb suspension group (HLS group), and a hindlimb suspension and X-ray radiation group (HLS+X-ray group). The X-ray radiation dose was 4 Gy, and the hindlimb suspension was adopted to simulate microgravity environment. The bone mineral density, trabecular number, trabecular separation, trabecular thickness, bone volume/trabecular volume, and structural model index were detected, and the changes of bone alkaline phosphatase (ALP), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), osteocalcin (OCN), and bone regulatory genes (Rankl, Runx2 and Nfatcl) were analyzed. **Results** The hindlimb suspension and X-ray radiation caused significant reduction ($P<0.05$) in bone mineral density, trabecular number, trabecular thickness, and bone volume/trabecular volume in the HLS group, X-ray group and HLS+

[基金项目] 云南省科技厅支持项目(2010BC006)

[通信作者] 汤 逊,E-mail:dsjyyxj@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150514.1137.002.html(2015-05-14)

X-ray group. The bone loss was the most severe in the HLS + X-ray group ($P < 0.05$). The expression of Rankl, Nfatcl and TRAP were significantly increased ($P < 0.05$) in the HLS group, X-ray group and HLS + X-ray group, while the expression of ALP and OCN was significantly decreased ($P < 0.05$). Moreover, Runx2 was not changed in the HLS group and X-ray group, but was down-regulated in the HLS + X-ray group ($P < 0.05$). **Conclusion** The combination of hindlimb suspension and X-ray radiation can more severe bone loss than alone.

[**Key words**] bone loss; microgravity; X-ray radiation; trabecular parameters

Supported by the Project of Yunnan Provincial Department of Science and Technology(2010BC006). Corresponding author: Tang Xun, E-mail: dsjyyxj@163.com

人们对太空的探索不断深入,如建立空间实验室和空间站,宇航员出舱活动越来越频繁,出舱活动的时间也越来越长,但对于太空环境所引起的骨代谢问题还处于研究之中[1]。目前,已有较多研究证明微重力可以引起严重的骨丢失[2-3]。微重力环境会导致宇航员出现持续的骨丧失和负钙平衡现象,称为失重性骨丧失。失重性骨丧失是人类长期太空停留和探索其他星球的主要障碍之一,主要表现为骨量丢失、骨骼脱矿、骨密度降低、骨生物力学性能下降[4-5]。研究还证明作为太空环境因素之一的辐射也能引起骨丢失[6-8]。有学者在小鼠中证明了不同类型的 2 Gy 太空福照射线,包括质子、光子和重离子都会对骨小梁起到负面作用[9]。但是,关注微重力和辐照的协同作用对骨影响的研究很少。本研究拟观察 X 辐照条件下是否引起大鼠骨丢失,并通过尾吊模拟微重力条件,分析辐照和微重力对于大鼠骨代谢是否存在交互作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及配制

EDTA Na2(美国 Amresco 公司),Runx2、Rankl(香港 Abeam 公司),DEPC(美国 Sigma-Aldrich 公司),TRIzol(美国 Ambion 公司),氯仿、无水乙醇、异丙醇、异戊醇(Merck 公司),逆转录试剂盒、实时定量 PCR 试剂盒以及 Nfatcl、Rankl、Runx2、Gapdh 引物(美国 Invitrogen 公司),大鼠抗酒石酸酸性酸酶 ELISA 试剂盒、大鼠碱性磷酸酶 ELISA 试剂盒(上海原叶生物科技有限公司),1 000 bp DNA Marker(大连 TaKaRa 公司)。

1.2 动物分组及辐照和尾吊处理

选用 2 月龄的性成熟 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 40 只,体质量(200.0 ± 14.8)g,由第三军医大学西南医院实验动物中心提供[许可证号:SYXK(渝)2012 - 0015]。分为正常对照组、X 射线辐照组(X-ray 组)、尾吊模型组(HLS 组)及尾吊结合 X 射线辐照组(HLS + X-ray 组),每组 10 只。正常对照组,4 周后处死;X-ray 组:一次性接受 4 Gy 的 X 射线照射,剂量率为 0.87 Gy/min,4 周后处死;HLS 组:进行尾吊处理,持续 4 周后处死。HLS + X-ray 组:在一次性接受了 4 Gy 的 X 射线照射后,进行尾吊处理,采用 Morey-Holton 提出的尾吊方法[10],持续 4 周后处死。

1.3 骨小梁参数分析

大鼠处死后,将左边腔骨剥离下来,固定于 10% 中性福尔马林的固定液中,除尽周围的肌肉和其他组织,使用 ZKKS-MCT-SHARP-Ⅳ仪器对样品进行扫描,扫描条件:电压为 90 kV,电流为 80 μA,360°旋转扫描,扫描时间为 30 min/样,微焦斑 X 光源为 20 μm 之后基于三维医学影像处理与分析开发包(MITK)进行图像处理。对于腔骨选取距离生长板 0.029 mm × 0.03 mm × 0.07 mm 的骨组织区域为兴趣区域进行三维重建和数据测量。测量的骨参数包括骨密度(bone mineral density, BMD),骨小梁的参数包括骨小梁的数目(trabecular number, Tb. N)、骨小梁的分离程度(trabecular seperation, Tb. Sp)、骨小梁的厚度(trabecular thickness, Tb. Th)、骨体积分数(bone volume/trabecular volume, BV/TV)以及结构模型指数(structural model index, SMI)。

1.4 HE 染色

大鼠处死后,将其左边股骨单独剥离下来,剔除上面残余的肌肉,然后浸泡于 EDTA 脱钙液(乙二胺四乙酸 5.5 g,4% 中性甲酸溶液 100 mL),每 5 天换 1 次液,持续 28 d,以大头针的针尖可以刺入骨干、无沙粒感为宜,再进行组织切片。在骨组织固定、脱钙后,进行熬蜡、脱水、透明和包埋过程,将股骨以骨干为中轴线纵向切成 4 μm 厚的连续切片,HE 染色,封片后,光镜下观察骨小梁的结构。

1.5 酶联免疫反应(ELISA)

大鼠处死前麻醉,从其股动脉中收集血液样本,3 000 × g 离心 10 min 分离出血清,分装至 1.5 mL 的离心管中,进行酶联免疫反应,分别对碱性磷酸酶(ALP)、酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)、骨钙素(OCN)进行定量分析。

1.6 实时定量 PCR

本实验测试了成骨细胞形成的控制因子以及破骨细胞的活性,包括 NF-κB 配体的激活因子(Rankl)。破骨细胞的形成,成熟以及破骨细胞的活性是 Rankl/

Rank 受体来激活的,同时这个受体信号通路可以被很多因子所调控[11-12]。Runx2 是一种成骨细胞特异性表达的基因。Nfatcl 则是一种可以调控破骨细胞成熟以及分化的蛋白因子,一旦 Nfatcl 被激活,它会转录进核内并且作为一个破骨细胞特异性的转录因子。

大鼠处死之后,单独剥离其右边股骨,浸泡于生理盐水中 10 s,再迅速置于液氮中冷存,24 h 之内采用 TRIzol 法提取组织总 RNA,然后 RNA(1 μg)通过 Invitrogen 公司的 M-MLV 第 1 链合成系统进行反转录实验,1 μg 的 cDNA 用于 PCR 反应。实时定量 PCR 选用 Invitrogen 公司的 Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix-UDG 系统,体系设定为 50 μL 体系:1.3 μL 的 cDNA,0.2 μL 的上下游引物,25 μL 的 SYBR Green 混合液以及 23.3 μL 的无菌蒸馏水。PCR 循环体系:50 ℃,2 min 激活 UDG 的系统之后,95 ℃ 预变性 5 min,95 ℃变性 20 s,61.5 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,总计进行 45 个循环,之后的溶液曲线读取从 65~95 ℃,每隔 0.5 ℃读取 1 次数据,每次数据读取时间为 6 s。GAPDH 为内参。引物的序列见表 1。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各个模型组之间的比较选用单因素方差分析,对于尾吊和辐照的交互作用运用单因素方差分析中的析因分析。

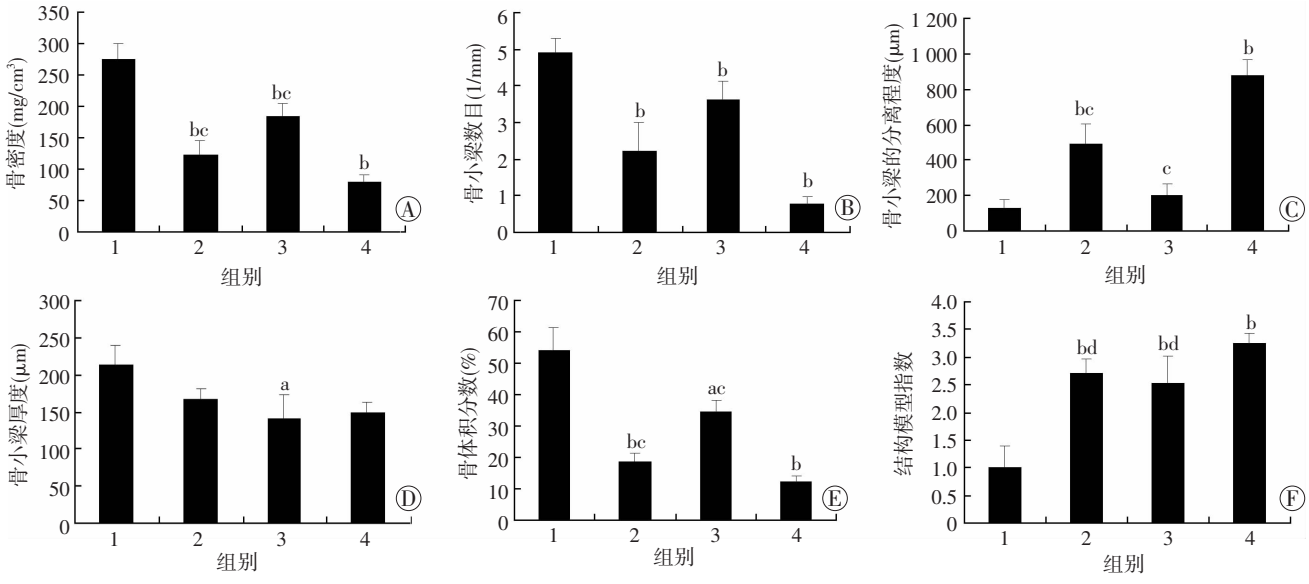
2 结果

2.1 骨小梁参数检测

和正常对照相比,HLS 组出现了明显的骨小梁结构的恶化情况(图 1)。仅对于左边的腔骨而言,当和正常对照组相比,HLS 组骨密度、骨小梁数目,以及骨体积分数分别减少了 56.6%、54.7%、65.7%,而骨小梁的分离程度和结构模型指数分别增加了 279.6%、170.2%,在一系列的骨小梁指标中只有骨小梁的厚度保持不变。X-ray 组和正常对照组相比,骨密度、骨小梁的数目、骨体积分数,以及骨小梁的厚度分别下调了 30.7%、25.6%、36.2%、34.2%,同时结构模型指数发生了显著的上调(105.3%),而骨小梁的分离程度则没有出现和正常对照组的差异。HLS + X-ray 组的骨小梁结构与正常对照组的比较和 HLS 组及 X-ray 组相比差异是最大的,HLS + X-ray 组的骨小梁结构遭到了最严重的破坏:骨密度、骨小梁的数目、骨体积分数和骨小梁的厚度分别减少 64.8%、84.1%、77.6%、30.1%,骨小梁的分离程度和结构模型指数却发生了明显的增加(576.1%、223.7%)。析因分析尾吊与 X 射线的交互作用显示,骨密度、骨小梁的分离程度、骨体积分数,以及结构模型指数这几个骨参数指标存在显著的交互作用。

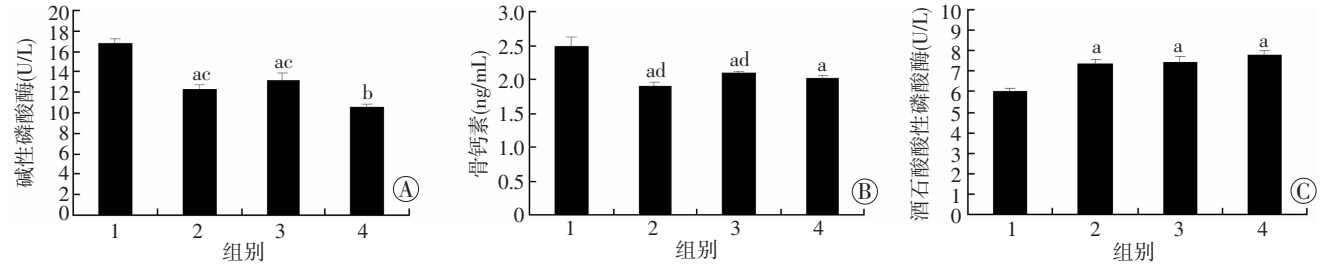
表 1 实时定量 PCR 的引物及长度

基因	上游引物	下游引物	引物长度(bp)
Gapdh	5′-CCTGCACCACCAACTGCTTAGC-3′	5′-GCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3′	143
Runx2	5′-CTTCGTCAGCGTCCTATCAGTTC-3′	5′-TTCCATCAGCGTCAACACCAT-3′	245
Rankl	5′-TGGGCCAAGATCTCTAACATGA-3′	5′-TGGGATTTTGATGCTGGTTTT-3′	180
Nfatcl	5′-ACCAGCATTTCACGTACCTTCCT-3′	5′-GAGGCGCGGTGAGTTGTT-3′	145



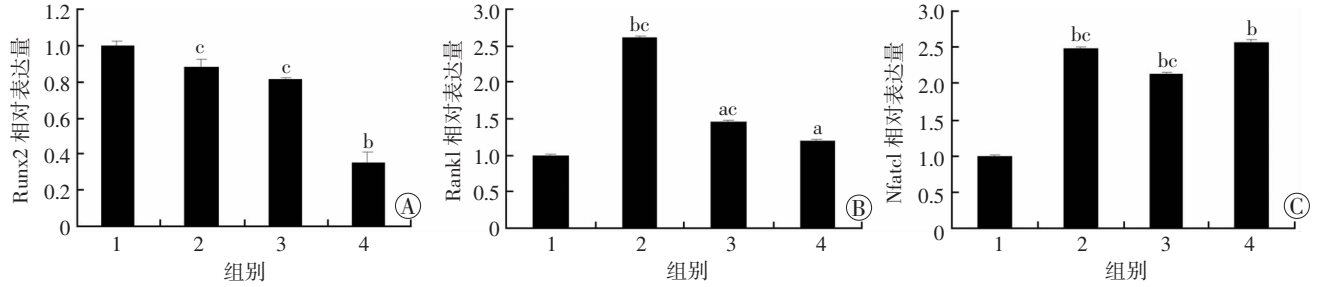
1:正常对照组;2:HLS 组;3:X-ray 组;4:X-ray + HLS 组;A:骨密度;B:骨小梁的数目;C:骨小梁的分离程度;D:骨小梁的厚度;E:骨体积分数;F:结构模型指数;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常对照组比较;c:$P<0.01$,d:$P<0.05$,与 X-ray + HLS 组比较

图 1 各组大鼠的骨参数检测结果比较



1:正常对照组;2:HLS 组;3:X-ray 组;4:X-ray + HLS 组;A:ALP;B:OCN;C:TRAP a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常对照组比较;c:$P<0.01$,d:$P<0.05$,与 X-ray + HLS 组比较

图 3 ELISA 检测血液中 ALP、OCN 以及 TRAP 的表达

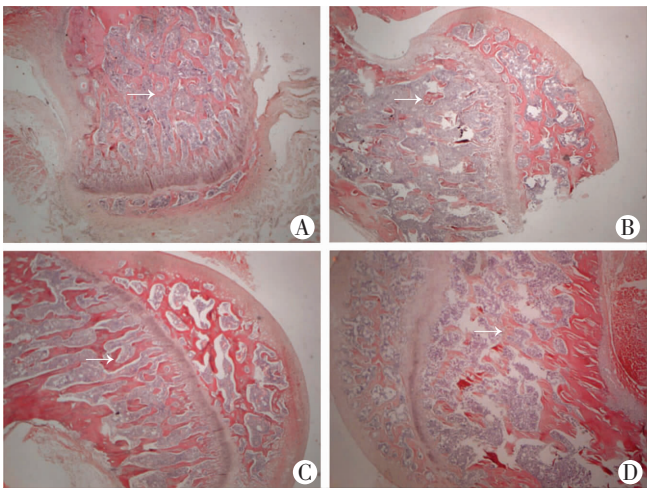


1:正常对照组;2:HLS 组;3:X-ray 组;4:X-ray + HLS 组;A:Runx2 的相对表达;B:Rankl 的相对表达;C:Nfatcl 的相对表达 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常对照组比较;c:$P<0.05$,与 X-ray + HLS 组比较

图 4 不同处理组骨调节基因 Runx2、Rankl 和 Nfatcl 的表达

2.2 对骨小梁结构的影响

对骨小梁进行 HE 染色,发现 HLS 组、X-ray 组、HLS + X-ray 组与正常对照组相比,骨小梁结构均有不同程度的减少,以 HLS + X-ray 组最为严重(图 2)。



A:正常对照组;B:HLS 组;C:X-ray 组;D:HLS + X-rays 组;黑色箭头示骨小梁的结构

图 2 各组大鼠骨小梁的病理变化 (HE ×40)

2.3 ELISA 检测蛋白的表达

和正常对照组的 ALP 活性比较,HLS 组、X-ray 组、HLS + X-rays 组分别下降了 26.6%、21.9%、36.9%;和正常对照组 OCN 的表达水平比较,HLS 组、X-ray 组和 HLS + X-ray 组分别下降了 23.9%、16.5%、19.3%。酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)的表达水平在和正常对照相比,HLS 组、X-ray 组以及 HLS + X-ray 组分别增加了 23.2%、23.7%、30.6%(图 3)。

2.4 骨调节基因的表达

如图 4 所示,Runx2 的表达在 HLS 组和 X-rays 组没有改变,但在 HLS + X-rays 组发生了显著的下调(下调 64.9%)。Rankl 的表达则更加的复杂,和正常对照组相比,HLS 组、X-ray 组、HLS + X-ray 组的表达量分别增加了 161.4%、46.7%、20.1%。和正常对照组相比,HLS 组、X-ray 组、HLS + X-ray 组 Nfatcl 的表达量分别增加了 147.9%、112.4%、156.9%。与正常对照组相比,X 射线和尾吊双因素明显增加了 Nfatcl 和 Rankl 的表达量,同时某种程度上进一步减弱了 Runx2 的表达。

3 讨论

本研究探讨了尾吊、4 Gy 的 X 射线辐照及 4 Gy 的 X 射线辐照后伴随 4 周的尾吊等不同条件下骨丢失的情况,发现各模型组的骨丢失皆出现了严重的增加,骨小梁的参数也发生了显著的改变。鉴于 X 射线和尾吊的交互作用非常明显,HLS + X-ray 模型组的骨参数变化幅度最大,并且其骨丢失情况最为严重。

本实验中,与正常对照组相比,各模型组除了骨密度发生了显著减少之外,结构模型指数表现出了明显

的统一增长趋势,而其他骨小梁三维参数在各模型组中都不同,但通过HE染色可以看出HLS组、X-ray组、HLS+X-ray组都出现了骨小梁数量减少、变细、断裂、连接中断、孔隙不断增大的特征,说明了各个模型组都存在骨丢失现象,以HLS+X-ray组最为明显,该组的各项参数和正常组相比,差距最为显著。通过对HLS+X-ray组进行单因素方差的析因分析,发现存在着尾吊和辐射之间的交互作用,它对骨的影响程度可能要比单独的某个因素都要强的多,可能是由于成骨细胞表达减少导致骨形成的抑制,也有可能是由于破骨细胞过量表达引起的骨吸附增加。我们推测,在单独尾吊或辐射的基础上,破骨细胞的表达已经开始增加,第2个因素的添加不仅仅是简单的叠加效应,可能还会加速破骨细胞的表达。

本实验还发现作为成骨细胞的标记性物质碱性磷酸酶和骨钙素的表达量在各模型组中均有下降,说明骨形成的过程在各模型组中被减弱了,而破骨细胞的标记物酒石酸酸性磷酸酶在各个模型组出现了不同程度的上升,说明骨吸附的过程得到了增强。研究证实,骨丢失的主要原因是骨吸附的增加而非骨形成的减少[13-18]。

进一步研究发现,与成骨细胞息息相关的基因Runx2的表达只是HLS+X-ray组中出现了下降,而和破骨细胞表达相关的基因Rankl和Nfatcl则在各模型组中发生了显著的上升。据此不难得出骨形成的减缓并不会影响成骨细胞表达的减少,成骨细胞可以向软骨细胞方向转化,因此模型组出现骨丢失的原因可能在于大量的成骨细胞向软骨细胞进行了分化。

综上所述,尾吊和X射线辐射模拟的空间环境下可以加速骨的丢失,特别是当两者共同作用的时候,由于交互作用的存在,破坏程度会更加严重。但尾吊和X射线辐射加速骨丢失的机制还没有研究透彻,所以在尾吊和X射线辐射条件下,成骨细胞/破骨细胞的分化机制还需要进一步研究。

参考文献:

[1] Blaber E A, Dvorochklin N, Lee C, *et al*. Microgravity induces pelvic bone loss through osteoclastic activity, osteocytic osteolysis, and osteoblastic cell cycle inhibition by CDKN1a/p21[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61372.

[2] Nagaraja M P, Risin D. The current state of bone loss research: data from spceflight and microgravity simulators[J]. J Cell Biochem, 2013, 114(5): 1001-1008.

[3] Hu L F, Qian A R, Wang S M, *et al*. Inhibitory effect of simulated microgravity on differentiating preosteoblasts[J]. Adv Space Res, 2013, 51(1): 107-114.

[4] Stein T P. Weight, muscle and bone loss during space flight: another perspective[J]. Eur J Appl Physiol, 2013, 113(9): 2171-2181.

[5] Arfat Y, Xiao W Z, Iftihar S, *et al*. Physiological effects of microgravity on bone cells[J]. Calcif Tissue Int, 2014, 94(6): 569-579.

[6] Wang H, Ji B, Liu X S, *et al*. Analysis of microstructural and mechanical alterations of trabecular bone in a simulated three-dimensional remodeling process[J]. J Biomech, 2012, 45(14): 2417-2425.

[7] Rana T, Schultz M A, Freeman M L, *et al*. Loss of Nrf2 accelerates ionizing radiation-induced bone loss by upregulating RANKL[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 53(12): 2298-2307.

[8] LeBlanc A, Schneider V, Shackelford L, *et al*. Bone mineral and lean tissue loss after long duration space flight[J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2000, 1(2): 157-160.

[9] Azzam E I, de-Toledo S M, Little J B. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to nonirradiated cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(2): 473-478.

[10] Morey-Holton E R, Globus R K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects [J]. J Appl Physiol (1985), 2002, 92(4): 1367-1377.

[11] To T T, Witten P E, Renn J, *et al*. Rankl-induced osteoclastogenesis leads to loss of mineralization in a medaka osteoporosis model [J]. Development, 2012, 139(1): 141-150.

[12] O'Brien C A, Nakashima T, Takayanagi H. Osteocyte control of osteoclastogenesis [J]. Bone, 2013, 54(2): 258-263.

[13] Caetano-Lopes J, Canhao H, Fonseca J E. Osteoblasts and bone formation [J]. Acta Reumatol Port, 2007, 32(2): 103-110.

[14] Gallagher J C, Sai AJ. Molecular biology of bone remodeling: implications for new therapeutic targets for osteoporosis [J]. Maturitas, 2010, 65(4): 301-307.

[15] Bandstra E R, Pecaut M J, Anderson E R, *et al*. Long-term dose response of trabecular bone in mice to proton radiation [J]. Radiat Res, 2008, 169(6): 607-614.

[16] Hamilton S A, Pecaut M J, Gridley D S, *et al*. A murine model for bone loss from therapeutic and space-relevant sources of radiation[J]. J Appl Physiol (1985), 2006, 101(3): 789-793.

[17] Kondo H, Yumoto K, Alwood J S, *et al*. Oxidative stress and gamma radiation-induced cancellous bone loss with musculoskeletal disuse[J]. J Appl Physiol (1985), 2010, 108(1): 152-161.

[18] Smith S M, Wastney M E, O'Brien K O, *et al*. Bone markers, calcium metabolism, and calcium kinetics during extended-duration space flight on the Mir space station [J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(2): 208-218.

(**收稿**:2015-02-14;**修回**:2015-03-05)

(编辑 龙 亮)