

损毁弓状核对幼年大鼠骨生长发育的影响

周 涛¹ 刘锡仪² 郭 义³

摘要 目的:观察新生期注射谷氨酸单钠(MSG)破坏下丘脑弓状核大鼠,35 日龄及 70 日龄股骨、胫骨生长、发育的情况。**方法:**新生期 SD 大鼠皮下注射 10%谷氨酸单钠,饲养至第 35 天、第 70 天处死,检测各项指标。**结果:**MSG 大鼠 35 日龄时,弓状核神经细胞大面积损毁,损毁率达 50%—60%,伴有垂体、睾丸重量减轻、四肢骨明显变短($P<0.05$),其余指标开始变化。至 70 日龄时,MSG 大鼠上述各项指标进一步发展,弓状核神经细胞损毁率达 70%—80%,血清中 T、E₂ 水平显著下降,伴有股骨湿重、干重、体积骨密度明显减轻,胫骨骨小梁面积、数量、宽度显著下降,而分离度明显升高。**结论:**损毁弓状核首先导致骨生长发育障碍,继而发生骨质疏松。前者主要与下丘脑-GH-IGF-I 轴有关,后者主要与下丘脑-垂体-性腺轴有关。

关键词 左旋谷氨酸单钠;下丘脑弓状核;骨代谢;骨生长发育;骨质疏松

中图分类号:R49,R681 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-06-0484-04

Effects of damaging of arcuate nucleus on bone growth and development in male juvenil rats/ZHOU Tao, LIU Xiyi, GUO Yi//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(6):491—493

Abstract Objective:To research the effects of damaging of arcuate nucleus(ARC) on bone growth and development in 35d and 70d rats.**Method:**Newborn SD rats were injected with monosodium glutamate hypodermically once every other day.After surviving 35d and 70d,the rats were killed and examine the changes of markers.**Result:**Compared with control group(35d),the lesion degree of hypothalamic in MSG group of 35d approximately 50%—60% the average, body length is evidently shorter and the femur was shorter and slimmer. The lesion degree of the hypothalamic ARC in MSG group of 70d is approximately 70%—80%. Meanwhile, MSG rats (70d) were stunted, and had smaller pituitaries and testis. The level of serum E₂ and T were both lower. The wet weight,dry weight and BMD of the femur obviously reduced. The parametes had significant changes, and the difference were significant compared with control group (70d).**Conclusion:**The study provides evidence that the effects of lesion of arcuate nucleus firstly lead to the disorder of bone growth,then osteoporosis.The former has an intimate correlation with the hypothalamus-GH-IGF-I axis;the latter has an intimate correlation with the hypothalamus-pituitary-gonad axis.

Author's address Dept of Physiology to Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300193

Key words monosodium L-glutamate;hypothalamus arcuate nucleus;bone metabolism;bone growth and development;osteoporosis

新生期谷氨酸单钠(monosodium L-glutamate, MSG)处理的大鼠导致生长发育迟缓已有很多报道,研究发现,新生期大鼠注射 MSG 100 天后发生骨质疏松。对于骨质疏松问题的研究,越来越多的学者开始认为,骨质疏松的“种子”可能在母体胎儿期就已经埋下了,而其发病的病理生理学过程则可能在 20 岁之前就已经开始了,特别是在青春期间骨量和骨骼发育的这一快速阶段。因此,研究骨质疏松应研究骨骼发育生长期、青壮年期和衰老期的骨代谢及其调控。本文研究新生期注射 MSG 损毁下丘脑弓状核(hypothalamus arcuate nucleus, ARC)后,大鼠不同发育时期骨代谢及骨生长发育的特点。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

新生雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 23 只(广东医学院实验动物中心提供),采用同窝对照的方法按体重随机分为 MSG 35 日龄组(M35 组,5 只),对照组 35 日龄组(N35 组,5 只),MSG 70 日龄组(M70 组,7 只),对照组 70 日龄组(N70 组,6 只)。MSG 组大鼠出生后第 1、3、5、7、9 天隔日颈部皮下注射 10%谷氨酸单钠(4g/kg BW),共 5 次;对照组同法皮下注射等体积的生理盐水。每次注射后两组大鼠均放回原窝,由原母鼠哺乳。

1 天津中医药大学生理学教研室,300193

2 广东医学院生理学教研室

3 天津中医药大学针灸教研室

作者简介:周涛,男,硕士,助教

收稿日期:2005-12-28

1.2 动物饲养及处理

24天断奶,在完全相同的条件下分别饲养至35日龄及70日龄时将大鼠处死,取血清、脑、睾丸、右侧股骨、胫骨,放入10%的福尔马林液中固定。

1.3 检测指标及方法

取下丘脑作石蜡冠状切片,厚度为4 μ m,HE染色后光镜下(40 $\times$ 10)观察,在弓状核-正中隆起层面圈定同一范围,利用LEICA Qwin图像分析软件计算弓状核细胞数;采用放射免疫分析法测定血清中雌二醇(E₂)、睾酮(T)的水平;置于1/10万电子天平上称骨湿重/100g体重,110℃下烤至恒重后称骨干重/100g体重,并计算体积骨密度(干重/骨体积);胫骨上1/3段经脱钙、脱水、透明、石蜡包埋,矢状面连续切片,厚度为5 μ m,行胶原特殊染色后采用半自动图像数字化分析仪测定骨小梁面积百分数(%Tb.Ar)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)和骨小梁分离度(Tb.Sp),将上1/3段胫骨的HE染色片在高倍视野下(400 $\times$ 10)进行破骨细胞计数。

1.4 统计学分析

测量数据使用SPSS10.0统计软件,先行方差齐性检验,方差齐者使用 t 检验,方差不齐的经变量转换后使用 t 检验或直接使用非参数检验。

2 结果

2.1 MSG幼年大鼠ARC的细胞计数

ARC细胞计数,N35组91.2 $\pm$ 8.5,M35组37.0 $\pm$ 5.4,N70组90.8 $\pm$ 10.6,M70组22.4 $\pm$ 6.0。MSG大鼠35日龄时,ARC神经细胞数明显减少,损毁程度达50%—60%,而邻旁的腹内侧核和背内侧核无明显变化;至70日龄时,MSG大鼠ARC神经细胞数进一步减少,损毁程度达70%—80%,差异具有显著性

意义(图1—4)。

2.2 损毁下丘脑弓状核幼年大鼠骨重、体积骨密度及几何参数的改变

MSG大鼠35日龄时,股骨的横径、纵径明显低于N35组($P<0.05$, $P<0.01$),股骨湿重、干重、体积骨密度有减小的趋势,但差异无显著性意义($P>0.05$);至70日龄时,MSG大鼠股骨湿重、干重、体积骨密度、横径、纵径较N70组均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)(表1)。说明35日龄MSG大鼠股骨长度,横径已明显减小,湿重、干重、体积骨密度有减小趋势,至70日龄,这些变化明显加重,提示这些变化是渐进性的。

2.3 损毁下丘脑弓状核幼年雄性大鼠胫骨干骺端松质骨的改变

MSG大鼠35日龄时,胫骨干骺端松质骨的%Tb.Ar、Tb.N、Tb.Th已出现下降趋势,而Tb.Sp呈升高趋势,但与N35相比差异没有显著性意义($P>0.05$)。至70日龄时,MSG大鼠%Tb.Ar、Tb.N、Tb.Th明显降低,而Tb.Sp明显升高,光镜下观察,小梁骨稀少、变细,连接性中断,小梁间距加大,同时胫骨干骺端小梁表面破骨细胞数明显增加($P<0.001$)(表2,图5—8)。说明MSG大鼠35日龄时松质骨骨量开始减少;70日龄时骨量明显减少。

2.4 损毁下丘脑弓状核幼年大鼠血清中性激素水平的改变

MSG大鼠35日龄时,血清中睾酮(T)及雌二醇(E₂)的水平已经开始下降,但与N35组比较差异无显著性意义($P>0.05$)。至70日龄时,MSG大鼠血清中睾酮及雌二醇的水平明显地低于N70组,差异有显著性意义($P<0.05$)(表3)。

图1 M35组大鼠下丘脑弓状核(HE染色, $\times 400$)

图2 M70组大鼠下丘脑弓状核(HE染色, $\times 400$)

图3 N35组大鼠下丘脑弓状核(HE染色, $\times 400$)

图4 N70组大鼠下丘脑弓状核(HE染色, $\times 400$)

注:图1—4中Ⅲ表示第三脑室,ARC表示下丘脑弓状核

图5 M35组大鼠胫骨干骺端骨小梁胶原(特殊染色, $\times 40$)

图6 M70组大鼠胫骨干骺端骨小梁胶原(特殊染色, $\times 40$)

图7 N35组大鼠胫骨干骺端骨小梁胶原(特殊染色, $\times 40$)

图8 N70组大鼠胫骨干骺端骨小梁胶原(特殊染色, $\times 40$)

表 1 MSG 对各组幼年大鼠股骨生长发育、骨量的影响

($\bar{x} \pm s$)

组别	湿重(g/100g)	干重(g/100g)	体积(ml/100g)	骨密度(g/ml)	横径(mm)	纵径(mm)
N35 组	0.32±0.025	0.250±0.019	0.180±0.011	1.193±0.192	4.068±0.09	26.03±0.65
M35 组	0.303±0.032	0.222±0.023	0.179±0.02	1.057±0.213	3.804±0.135 ^②	24.91±0.57 ^①
N70 组	0.296±0.021	0.223±0.014	0.164±0.02	1.301±0.297	4.379±0.187	34.58±1.07
M70 组	0.261±0.031 ^③	0.180±0.017 ^④	0.154±0.014	1.171±0.126 ^③	4.005±0.133 ^④	31.99±1.05 ^④

与 N35 组比较① $P<0.05$, ② $P<0.01$; 与 N70 组比较③ $P<0.05$, ④ $P<0.01$

表 2 损毁 ARC 幼年大鼠胫骨干骺端骨组织形态计量学参数及破骨细胞计数的比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Tb.Ar(%)	Tb.Th(μ m)	Tb.N(#/mm)	Tb.Sp(μ m)	破骨细胞计数
N35 组	5	20.464±3.104	34.664±2.348	6.437±0.463	129.51±20.038	1.004±0.126
M35 组	5	19.393±4.564	32.012±2.064	6.227±0.569	136.41±31.159	1.306±0.183
N70 组	6	25.388±3.296	40.198±2.891	7.668±0.613	137.74±14.387	1.034±0.109
M70 组	7	20.986±4.45 ^①	34.623±2.711 ^②	6.546±0.623 ^①	150.423±15.685 ^①	1.632±0.126 ^③

与 N70 组比较① $P<0.05$, ② $P<0.01$, ③ $P<0.001$ 表 3 损毁 ARC 对幼年大鼠血清性激素水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	雌二醇(pg/ml)	睾酮(ng/dl)
N35 组	11.50±2.64	113.62±17.67
M35 组	9.83±2.97	105.7±13.80
N70 组	17.84±4.22	322.75±62.57
M70 组	12.82±2.68 ^①	232.33±39.45 ^②

与 N70 组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$

3 讨论

MSG 是一种神经毒素,能选择性地破坏新生期大鼠、小鼠等动物 ARC 神经胞体,而对路过或终止于 ARC 的神经纤维无明显影响。许多研究表明,通过外周给予新生大鼠 MSG 可作为损毁 ARC 的动物模型^[1-4]。MSG 兴奋性毒性作用机制可能与下面几方面有关。MSG 作用于细胞膜上的 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异唑-丙酸盐 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate,AMDA)、KA (kainic acid)受体,使 Na^+ 通透性增加, Na^+ 大量内流,使膜电位发生变化,使 Cl^- 顺电位差大量内流,水大量内流引起神经元急性肿胀。MSG 作用于细胞膜上 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate ,NMDA)受体,使 Ca^{2+} 通透性增加, Ca^{2+} 大量内流,并通过亲代谢受体导致细胞内三磷酸肌醇生成量增多,后者刺激内质网 Ca^{2+} 释放,激活磷酸酶及蛋白酶,使细胞受损害,引起一系列生化反应,最终导致迟发性神经元坏死^[5-6]。

结果表明,MSG 大鼠 35 日龄时 ARC 神经细胞损毁率达 50%—60%,至 70 日龄时,下丘脑 ARC 的细胞数进一步减少,ARC 细胞损毁率达 70%—80%,这与 Olney、吕永利等报道的结果基本一致^[7],而对紧邻 ARC 的下丘脑内侧基底部其他核团未见明显损伤,这与吴开云报道的结果相一致^[8]。说明本实验损毁 ARC 的实验动物模型是成功的,适用于研究弓状核的功能,本实验用于研究 ARC 对骨代谢的调控。

MSG 大鼠 35 日龄时垂体变轻、四肢骨变短变细,而睾丸重量、血清 T 和 E_2 水平、骨量和骨组织计

量学参数未有明显变化,说明 MSG 大鼠 35 日龄骨生长发育迟缓主要是垂体改变引起的。本文由于条件所限未能检测生长激素水平,但根据以往的研究,可以认为 MSG 损毁弓状核,垂体发生改变,垂体分泌生长激素减少,GH-IGF-I 轴功能下降所致。

MSG 大鼠 70 日龄时,除垂体变轻、四肢骨变短变细外,出现睾丸重量明显减轻,血清 T、 E_2 水平显著下降,伴有骨量和骨组织计量学参数的显著变化,出现骨质疏松。说明 MSG 大鼠 70 日龄骨代谢异常的改变主要是由于下丘脑-垂体-性腺功能下降,性激素水平降低,骨转化增加所致。

已经证实弓状核可以通过下丘脑-GH-IGF-I 轴和下丘脑-垂体-性腺轴调控骨代谢和骨的生长发育^[9-10]。本研究进一步观察到,损毁 ARC 首先导致骨生长发育障碍,继而发生骨质疏松。前者主要与下丘脑-GH-IGF-I 轴有关,后者主要与下丘脑-垂体-性腺轴有关。

参考文献

- [1] 刘浩宇, 刘锡仪. 新生期大鼠注射谷氨酸单钠后导致骨质疏松[J]. 中国骨质疏松杂志, 2000, 6(4): 10—12.
- [2] Sanchis-Segura C, Aragon CM. Consequences of monosodium glutamate or goldthioglucose arcuate nucleus lesions on ethanol-induced locomotion [J]. Drug Alcohol Depend, 2002, 68 (2): 189—194.
- [3] Florent Eleftheriou, Shu Takeda, Xiuyun Liu, et al. Monosodium Glutamate-Sensitive Hypothalamic Neurons Contribute to the Control of Bone Mass [J]. Endocrinology, 2003, 144: 3842—3847.
- [4] 高唱, 王景周, 向静. 左旋单钠谷氨酸致肾阴虚模型大鼠神经细胞凋亡的变化[J]. 中国医药学报, 2003, 18(12): 719—720.
- [5] Hsu C, Hsieh YL, Yang RC, et al. Blockage of N-methyl-D-aspartate receptors enhances postnatal neuronal apoptosis in rats [J]. Neuroendocrinology, 2000, 71 (5): 301—307.
- [6] Shen W, Slaughter MM. Synaptically released glutamate activates extrasynaptic NMDA receptors on cells in the ganglion cell layer of rat retina [J]. Neurosci, 2002, 22 (6): 2165—2171.
- [7] 吕永利, 赵书芬, 李集, 等. 谷氨酸单钠对新生期大鼠下丘脑内侧基底部神经元的神经毒性作用[J]. 中国医科大学学报, 1992, 21 (4): 247.
- [8] 吴开云, 李耀斌. 谷氨酸单钠对新生期大鼠弓状核神经元损毁的实验研究[J]. 解剖学杂志, 1999, 22(4): 273—275.
- [9] 蔡定芳, 刘彦芳, 陈晓红, 等. 新生期大鼠皮下注射谷氨酸单钠后下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴的改变[J]. 中国病理生理学杂志, 1998, 14: 342—343.
- [10] Brooke AM, Monson JP. Adult growth hormone deficiency [J]. Clin Med, 2003, 3(1): 15—19.