

来曲唑对青年 ISA 蛋鸡髓质骨形成的影响

邓益锋, 陈秀霞, 胡云峰, 陶庆树, 侯加法*

(南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

摘要: 为研究来曲唑对蛋鸡髓质骨形成的影响, 阐明髓质骨形成的机制, 选用 210 羽 14 周龄伊莎母鸡, 预饲 1 周后随机杀 10 羽取骨骼样本作为背景对照; 剩余母鸡随机平均分为 2 组, 试验组经口给予来曲唑 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{只}^{-1}$, 另一组作为对照组, 试验为期 18 d。结果显示, 与对照组相比, 来曲唑可极显著降低鸡体内雌激素水平和雌激素受体的表达 ($P < 0.01$), 显著提高雄激素水平 ($P < 0.05$); 显著提高胫骨骨皮质指数, 降低骨放射密度 ($P < 0.05$); 胫骨外骨膜周长、内骨膜周长、皮质骨面积、平均皮质骨厚度、皮质骨面积比例差异不显著 ($P > 0.05$)。本研究表明来曲唑能抑制雌激素合成, 阻止髓质骨的形成, 减缓骨骼生长。

关键词: 来曲唑; 雌激素; 髓质骨; ISA 蛋鸡

中图分类号: S858.31

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)09-1395-05

Effect of Letrozole on Medullary Bone Osteogenesis in Young ISA Hens

DENG Yi-feng, CHEN Xiu-xia, HU Yun-feng, TAO Qing-shu, HOU Jia-fa*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to study the effect of letrozole on medullary bone osteogenesis and elucidate the mechanism of medullary bone osteogenesis in layer, 210 ISA pullets of 14-week old were fed for one week before experiment, then 10 birds selected randomly from the total group were killed for collecting bone samples; the rest were averagely divided into two groups at random, control and the treated group. Animals of the treated group were fed with letrozole at $0.5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{hen}^{-1}$, and the experiment lasted for 18 days. The results showed that letrozole could decrease the level of estrogen and the expression of estrogen receptor extremely significant ($P < 0.01$), increase the level of androgen significantly ($P < 0.05$), increase the bone cortex index significantly ($P < 0.05$) and decrease the bone radiographic density of tibia significantly ($P < 0.05$). However, the periosteum and endosteum perimeter, cortical width and cortical area ratio of both the two groups were not significant ($P > 0.05$). It revealed that letrozole can inhibit the synthesization of estrogen, decrease the growth of bone and prevent the osteogenesis of medullary bone.

Key words: letrozole; estrogen; medullary bone; ISA hens

髓质骨 (Medullary bone, MB) 是雌禽所特有的结构, 在生殖期间形成, 与禽类产蛋功能密切相关。随着产蛋周期的变化, 髓质骨发生周期性的吸收与重建, 为蛋壳钙化提供约 40% 的钙源^[1]。研究表明, 髓质骨的形成与雌激素水平有关, 但其确切机理

仍不详^[2]。作者通过雌激素抑制剂——来曲唑 (Letrozole) 来控制髓质骨的形成, 以研究其对髓质骨形成及雌激素受体 (Estrogen receptor, ER) 的影响, 为进一步探讨笼养蛋鸡骨质疏松症的发病机理提供理论依据。

收稿日期: 2009-02-04

基金项目: 国家自然科学基金 (30671546); 高校博士点基金项目 (2004037036); 南京农业大学青年科技创新基金 (KJ07016)

作者简介: 邓益锋 (1974-), 男, 江苏东台人, 讲师, 博士, 主要从事畜禽骨骼生物学和小动物外科学研究, E-mail: dengyif@njau.edu.cn

* 通讯作者: 侯加法, Tel: 025-84396584, E-mail: jfhou@njau.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

从南京某鸡场购入 14 周龄(98 日龄)ISA 蛋鸡 210 羽,预饲 1 周后,随机杀 10 羽取骨样本,作为背景对照。剩余 200 羽随机平均分为 2 组,A 组为对

照组,正常饲喂;B 组为试验组,经口给予来曲唑 0.5 mg · d⁻¹ · 只⁻¹,试验为期 18 d。试验日粮参照 NRC 标准,根据等氮、等能原则配制,日粮配方及营养水平见表 1。鸡舍维持室温(20±5)℃,光照不少于 11 h · d⁻¹,每只鸡定量采食 100 g · d⁻¹,自由饮水。

表 1 日粮配方及营养水平

Table 1 The composition and nutrition levels of diets

成分 Composition	含量 Content	营养成分 Nutrient content	含量 Content
玉米 Corn	65	代谢能(MJ · kg ⁻¹) Metabolic energy	11.54
麸皮 Bran	25	粗蛋白 Crude protein	12.79
豆粕 Bean pulp	5	钙 Ca	0.61
国产鱼粉 Fishmeal of China	2.1	总磷 Total phosphorus	0.55
贝壳粉 Shell powder	0.85	有效磷 Available phosphorus	0.30
磷酸氢钙 CaHPO ₃	0.70	赖氨酸 Lysine	0.51
食盐 NaCl	0.35	蛋氨酸 Methionine	0.18
添加剂预混料 Additive	1	蛋氨酸+胱氨酸 Methionine + Cystine	0.42

1.2 主要试剂

来曲唑(武汉远城科技发展有限公司),每天用药前将原粉溶解于水中,使其终浓度为 0.125 mg · mL⁻¹。ER I 抗(Santa Cruz, USA)、ABC 免疫组化试剂盒(武汉博士德公司),血清雌二醇(E₂)、睾酮(T)放射免疫试剂盒(北京福瑞生物工程公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 样品采集 A、B 组分别在用药后第 2、4、6、8、10、12、14、16、18 天随机各取 10 羽,翼静脉采血,断头处死,将右侧胫骨剔除肌肉,从中间锯 1 段约 0.5 cm 长骨段置于预冷的 4%多聚甲醛磷酸缓冲液中固定,供组织学和免疫组织化学观察;完整取出左侧股骨和胫骨,固定于 70%乙醇中,用于骨形态计量学和骨放射密度测定。

1.3.2 脱钙骨切片观察髓质骨形成的变化^[3] 将骨组织从多聚甲醛中取出,水冲过夜,10%硝酸脱钙,5%硫酸锂碱处理,脱水,浸蜡,石蜡包埋后切片,甲苯胺蓝染色,观察髓质骨的形成。

1.3.3 免疫组织化学观察雌激素受体的变化^[4] 将上述白片用 ABC 法进行免疫组织化学染色,用 PBS 代替 ER I 抗作为阴性对照。每张片子连续取 10 个视野,用 Image J1.40(美国国家卫生研究院开发)软件进行雌激素受体表达的半定量分析。

1.3.4 雌激素、雄激素测定 采用放射免疫法,运用智能放射 γ 测量仪(型号为 SN-695B,上海原子核研究所日环仪器厂)测定血浆雌二醇(E₂)与睾

酮(T)水平。

1.3.5 骨形态计量学测定^[5] 将骨组织从乙醇中取出,干燥后,在胫骨中点处用微型电锯锯一 3 mm 厚骨环,用 MICROTEK5600 透射扫描仪(上海中晶科技有限公司)扫描骨环,Image J 软件分析骨环图像。测定外骨膜面周长(Periosteum Perimeter, P. Pm)、内骨膜面周长(Endosteum Perimeter, En. Pm)、平均皮质骨厚度(Cortical Width, CW)、骨皮质指数(Bone Cortex Index, BCI)、皮质骨面积(Cortical Area, CA)、皮质骨面积比例(Cortical Area Ratio, CAR)。

1.3.6 骨放射密度测定^[6-7] 股骨从乙醇中取出,干燥后将其按编号排列于暗盒上,在暗盒一端放置 16 级铝阶(英国 Roslin 研究所馈赠)。调整摄片参数:焦点胶片距 80 cm,球管电压 44 kv,毫安秒 3.88,用 MiKASAHF200A 型小动物专用 X 射线机(日本米卡萨公司)进行摄片。X 线片经透射扫描后,用 Image J 软件进行灰度值测定,换算成相应铝阶厚度来表示其放射密度(mm Al)。

1.4 数据分析

试验数据采用 SPSS13.0 统计软件处理。方差分析进行差异显著性判定。各组数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

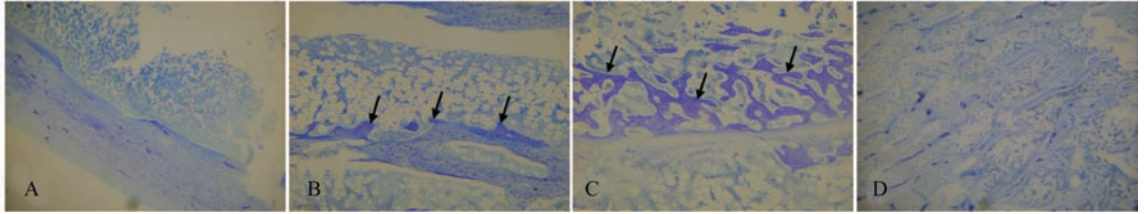
2 结 果

2.1 髓质骨形成的变化

脱钙骨切片经甲苯胺蓝染色以观察髓质骨形成

的变化。在 105 日龄时,皮质骨被淡染,外环骨板颜色相对较淡,内环骨板颜色较深。在皮质骨可见致密的哈佛氏系统和哈佛氏管,偶见窝通管穿行其中。在内侧骨板附近未见髓质骨生成。骨髓腔内组织呈

蓝色蜂窝状结构(图 1A)。A 组在试验第 12 天(117 日龄)时开始有少量髓质骨形成(图 1B),到试验第 18 天(123 日龄)时,形成大量的髓质骨(图 1C)。B 组服用来曲唑后,在试验期间一直未出现髓质骨(图 1D)。



A. 第 1 天骨切片(40 \times),可见淡染的皮质骨,致密的哈佛氏系统和窝通管,未见髓质骨形成;B. 第 12 天对照组骨切片(100 \times),髓质骨开始形成(箭头);C. 第 18 天对照组骨切片(100 \times),小梁上形成大量髓质骨(箭头);D. 第 18 天来曲唑处理组骨切片(100 \times),未见髓质骨形成

A. The bone slice on the 1st day of experiment (40 \times), showing the light dyeing cortex bone, compact Haversian's system and Volkmann's canal; B. The bone slice of control group on the 12th day of experiment (100 \times), showing the medullary bone began to form (arrow); C. The bone slice of control group on the 18th day of experiment (100 \times), showing the abundant medullary bone formed on the bone trabecula (arrow); D. The bone slice of letrozole treated group on the 18th day of experiment (100 \times), no medullary bones formed

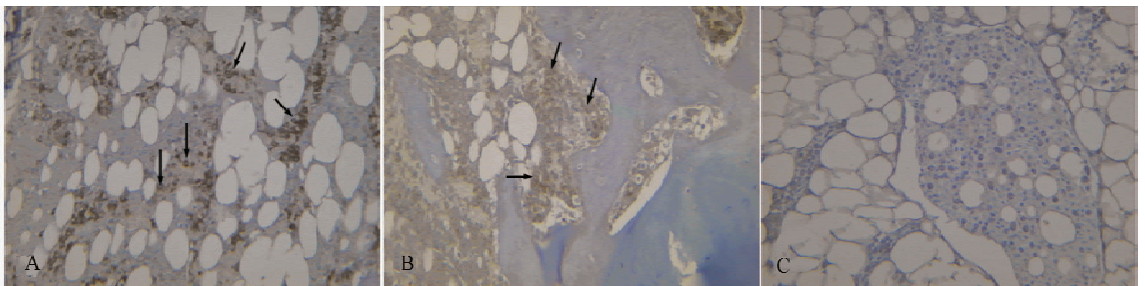
图 1 脱钙骨切片的甲苯胺蓝染色

Fig. 1 The decalcified bone slice by toluidine blue staining

2.2 雌激素受体的变化

雌激素受体免疫组化染色显示,胫骨中雌激素受体主要分布在骨小梁周围的成骨细胞、破骨细胞以及骨髓中未分化的间充质细胞中,在胞核、胞质中均有表达,但胞质着色较深;皮质骨和骨小梁中未见

阳性细胞(图 2A)。雌激素受体半定量结果表明,试验开始时阳性细胞率为 0.439 ± 0.051 ;试验结束时 A 组阳性细胞率升高为 0.514 ± 0.042 (图 2B),差异极显著($P < 0.01$);B 组未见阳性细胞(图 2C)。



A. 试验第 1 天骨切片,可见棕色阳性细胞(箭头);B. 试验结束时对照组骨切片,可见棕色阳性细胞(箭头);C. 试验结束时来曲唑处理组骨切片,未见棕色阳性细胞

A. The bone slice on the 1st day of experiment, showing the brown stained positive cells (arrow); B. The bone slice of control group at the end of experiment, showing the brown stained positive cells (arrow); C. The bone slice of letrozole treated group at the end of experiment, no positive cell was found

图 2 骨切片雌激素受体免疫组化染色(100 \times)

Fig. 2 The bone slice by ER immunohistochemical staining (100 \times)

2.3 血浆雌、雄激素的变化

试验期间,A、B 组雌激素水平随蛋鸡日龄的增加而上升,但 B 组雌激素水平整体低于 A 组;用药 4 d 后,B 组雌激素水平极显著低于 A 组($P < 0.01$)。A 组雄激素水平变化差异不明显,B 组雄激素水平随用药的持续而显著上升;在用药 12 d 后,B 组雄激素水平显著高于 A 组($P < 0.05$)(表 2)。

2.4 骨形态计量学变化

表 3 结果显示,B 组骨皮质指数显著高于 A 组($P < 0.05$),而胫骨外骨膜周长、内骨膜周长、平均皮质骨厚度、骨皮质指数、皮质骨面积、皮质骨面积比例均差异不显著,随蛋鸡日龄增加而增加。

2.5 骨放射密度测定结果

表 4 结果显示,随着日龄的增长,骨放射密度都

表 2 不同时间血浆雌、雄激素水平(n=10)

Table 2 The estrogen and androgen concentrations in plasma at different time(n=10)

采样时间/d Sampling time	雌激素/(pg·mL ⁻¹) Estrogen		雄激素/(ng·mL ⁻¹) Androgen	
	对照组	来曲唑处理组	对照组	来曲唑处理组
	Control group	Letrozole treated group	Control group	Letrozole treated group
0	190.726±196.904		0.251±0.094	
2	286.534±219.830	182.894±110.597	0.123±0.021	0.170±0.037
4	371.951±177.323	137.472±88.172**	0.253±0.069	0.193±0.037
6	413.048±231.428	255.798±235.130	0.185±0.066	0.288±0.173
8	412.073±212.095	117.066±74.301**	0.150±0.063	0.598±0.095
10	447.381±137.484	230.999±126.331**	0.197±0.046	0.349±0.156
12	544.104±211.502	211.317±197.375**	0.177±0.070	0.384±0.195
14	582.572±172.081	274.019±195.735**	0.204±0.087	0.426±0.629*
16	560.241±82.110	272.222±108.232**	0.198±0.059	0.475±0.158*
18	555.131±108.664	235.959±167.863**	0.161±0.079	0.727±0.306*

与对照组比较, * 表示差异显著($P<0.05$), ** 表示差异极显著($P<0.01$)。下表同

*. $P<0.05$, **. $P<0.01$, compared with control group. The same as below

表 3 骨形态计量学变化

Table 3 Changes of bone histomorphometry

指标 Parameter	试验开始时 (n=10) Starting value	试验期间总平均(n=90) Average value during the experiment	
		对照组	来曲唑处理组
		Control group	Letrozole treated group
胫骨外骨膜周长/mm Tibia P. Pm	21.976±0.720	22.206±1.369	21.934±0.730
胫骨内骨膜周长/mm Tibia En. Pm	17.078±0.838	17.613±1.379	17.326±0.824
胫骨平均皮质骨厚度/mm Tibia CW	0.725±0.049	0.732±0.061	0.734±0.048
胫骨骨皮质指数 Tibia BCI	0.206±0.154	0.207±0.021	0.210±0.017*
胫骨皮质骨面积/mm ² Tibia CA	14.031±0.836	14.559±1.544	14.396±0.931
胫骨皮质骨面积比例 Tibia CAR	36.764±2.100	37.079±3.238	37.554±2.507

有增长的趋势。与 A 组相比, B 组用药 6 d 后, 其放射密度显著降低($P<0.05$); 从总平均结果看, B 组放射密度显著低于 A 组($P<0.05$)。

3 讨论

雌激素参与机体骨骼生理和病理的相关过程, 对蛋鸡骨骼的生长发育、成熟以及骨量的维持有重要的调节作用。动物体内雌激素是由雄激素经芳香化酶转化而来^[8], 来曲唑为第三代芳香化酶抑制剂, 与雄激素竞争, 可逆性结合到芳香化酶细胞色素 P450 的血红素上, 从而使雌激素生成受阻^[9-10]。本试验结果显示, 来曲唑抗鸡雌激素作用非常明显, 在用药后第 2 天 B 组雌激素水平即明显低于 A 组, 在用药第 4 天极显著低于 A 组, 且在整个试验过程中, B 组雌激素水平都维持在一个相对较低的水平, 这与以往报道相似^[9,11]。B 组雄激素水平上升, 是

表 4 不同时间骨放射密度(n=10)

Table 4 The bone radiographic density at different

采样时间/d Sampling time	时态(n=10)		mm AL
	组别/Group		
	对照组	来曲唑处理组	
	Control group	Letrozole treated group	
0 d	1.278±0.021		
2 d	1.371±0.223	1.289±0.182	
4	1.508±0.178	1.354±0.089	
6	1.703±0.129	1.404±0.007*	
8	1.962±0.524	1.358±0.990*	
10	2.229±0.390	1.412±0.486*	
12	2.238±0.385	1.417±0.094*	
14	2.010±0.340	1.583±0.067*	
16	1.821±0.130	1.589±0.211	
18	2.239±0.306	1.549±0.794*	
总平均 Gross mean	1.836±0.440	1.423±0.212*	

由于来曲唑竞争性与芳香化酶结合,使雄激素被阻滞而在体内积聚增多所致。

据报道,来曲唑可抑制哺乳动物 98% 以上的雌激素合成,可使雌激素降低至无法检测的水平^[12]。本试验结果显示,来曲唑可将 ISA 蛋鸡体内雌激素降低到约正常水平的 1/3~1/2,但没有达到难以检测的程度,这是来曲唑在蛋鸡体内不能充分吸收,血药浓度较低,还是蛋鸡对其不敏感,而使鸡体芳香化过程仍在部分进行,其确切机理还有待进一步的研究。来曲唑同时可以通过抑制雌激素合成,来影响雌激素受体的表达。本试验 A 组雌激素水平上升,其受体阳性细胞率也增加;B 组雌激素水平下降,其受体表达也下降,试验结束时,B 组免疫组化切片上几乎找不到雌激素受体的阳性细胞,其试验结果与理论推导相吻合。

髓质骨的形成,与雌激素有着密切的关系,只有当雌激素达到一定水平后,通过雌激素受体,才能诱发髓质骨产生^[13]。有研究表明,蛋鸡在性成熟前 10 d 左右,体内雌激素水平急剧上升,从而诱发髓质骨产生^[1]。从本试验结果分析,A 组蛋鸡在 117 日龄时开始形成髓质骨,到 123 日龄时大量形成;ISA 蛋鸡性成熟日龄约在 126 日龄(18 周龄),其髓质骨形成也是在性成熟前 10 d 左右开始。B 组无髓质骨的产生,主要是因为来曲唑抑制了雌激素合成,去除了髓质骨产生的诱发因素;特别是来曲唑几乎完全抑制雌激素受体的表达,从而阻断了雌激素发挥作用的途径,因而来曲唑能有效阻滞髓质骨的产生。

在髓质骨形成初期,B 组骨皮质指数显著高于 A 组,皮质骨厚度和皮质骨面积比例也有高于 A 组的趋势,说明 A 组皮质骨在整个骨体内的比例在下降,这也证实了“髓质骨的产生和维持是以动员皮质骨为代价”的推论^[14]。本试验 A、B 两组皮质骨面积比较差异不显著,但 A 组骨放射密度却显著大于 B 组($P < 0.05$),说明髓质骨具有一定的放射密度,髓质骨的存在可以增加骨放射密度。B 组外骨膜周长、内骨膜周长、皮质骨面积均小于 A 组,提示来曲唑可阻滞蛋鸡骨骼的生长。它通过与芳香化酶结合,使雌激素合成减少,从而导致蛋鸡钙、磷吸收减少,引起钙、磷在骨骼上的沉积下降,肾脏钙、磷排泄增加,最终使骨骼生长缓慢^[15]。

上述研究表明,来曲唑可显著降低鸡体内雌激素水平,减少雌激素受体的合成,从而使骨骼生长缓慢;同时能有效抑制髓质骨的形成,为髓质骨形成的研究提供良好的动物模型。但来曲唑—雌激素—髓

质骨之间的作用机理尚待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] WILSON S, DUFF S R I. Morphology of medullary bone during the egg formation cycle [J]. *Res in Vet Sci*, 1990, 48:216-220.
- [2] WHITEHEAD C C, WILSON S. Bone biology and skeletal disorders in poultry [M]. Oxfordshire, England: Carfax Publishing Company, 1992.
- [3] 席越,黄啸原,孟淑琴. 骨组织病理解剖学技术 [M]. 北京:人民卫生出版社,1997.
- [4] 刘世新. 实用生物组织学技术 [M]. 北京:科学出版社,2004.
- [5] 周振雷,邓益锋,陈鹏峰,等. 骨疏康对蛋鸡骨代谢的影响 [J]. 畜牧兽医学报,2006,37(12):1345-1348.
- [6] FLEMING R H, MCCORMACK H A, WHITEHEAD C C. Bone structure and strength at different ages in laying hens and effects of dietary particulate limestone, vitamin K and ascorbic acid [J]. *Br Poult Sci*, 1998, 39(3):434-440.
- [7] WEBSTER A B. Welfare implications of avian osteoporosis [J]. *Poult Sci*, 2004, 83(2):184-192.
- [8] ZILLI M, GRASSADONIA A, TINARI N, et al. Molecular mechanisms of endocrine resistance and their implication in the therapy of breast cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009,1795(1):62-81.
- [9] CHOW L W, YIP A Y, LOO W T, et al. Evaluation of neoadjuvant inhibition of aromatase activity and signal transduction in breast cancer [J]. *Cancer Lett*, 2008, 262: 232-238.
- [10] LÖNNING P L, GEISLER J. Aromatase inhibitors: Assessment of biochemical efficacy measured by total body aromatase inhibition and tissue estrogen suppression [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008, 108: 196-202.
- [11] 徐兵河,孙燕,宋恕平,等. 来曲唑治疗绝经后妇女晚期乳腺癌临床研究 [J]. 中国新药杂志, 2001,10(10):763-766.
- [12] GOSS P E, INGLE J N, MARTINO S, et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early stage breast cancer [J]. *New Engl J of Med*, 2003, 349(6): 191-205.
- [13] HART L L, DAVIE J R. The estrogen receptor: more than the average transcription factor [J]. *Biochem Cell Biol*, 2002, 80(3): 335-341.
- [14] 周振雷,陶庆树,胡丹,等. 伊莎笼养蛋鸡骨代谢的增龄性改变 [J]. 南京农业大学学报,2007,30(1): 105-108.
- [15] ARJMANDI B H, HOLLIS B W, KALU D N. In vivo effect of 17 β -estradiol on intestinal calcium absorption in rats [J]. *Bone Miner*, 1994, 26:181.