

[文章编号] 1000-4718(2007)04-0725-04

## 损毁弓状核对大鼠骨组织形态计量学的影响

刘锡仪, 刘浩宇, 张 巍

(广东医学院生理研究室, 广东 湛江 524023)

**[摘要]** 目的: 研究损毁下丘脑弓状核对大鼠骨组织形态计量学的影响。方法: SD 大鼠于出生后第 1、3、5、7、9 d 皮下注射 10% 谷氨酸单钠(MSG) (4 g/kg BW), 对照组同法注射等体积生理盐水, 并设 MSG 毒性对照组, 于 70 d 龄同法注射 MSG, 各组大鼠皆存活至 160 d。用 3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉, 用 4% 多聚甲醛经左心室行全身灌注, 取脑作下丘脑弓状核冠状面切片, HE 染色。取右侧胫骨常规脱钙, 石蜡包埋, 矢状面连续切片, 胶原特殊染色, 用于显示骨小梁结构。HE 染色用于破骨细胞计数。图像分析仪对弓状核正中隆起切面和骨组织进行照片和计量。用放免法测血清中 GH(生长素)、E<sub>2</sub>(雌二醇)和 T(睾酮)含量。结果: MSG 大鼠弓状核神经细胞数量显著减少, GH 和 E<sub>2</sub>、T 水平明显降低, 骨量显著减少, 发生骨质疏松, NS 组和 MSG 毒性对照组弓状核、GH、E<sub>2</sub>、T 和骨组织无明显改变。结论: ①MSG 大鼠骨组织的改变不是 MSG 对垂体和骨组织的毒性作用所致; ②下丘脑弓状核参与骨代谢的调控; ③通过 GH 和性激素作用是 ARC 参与骨代谢调控的重要途径。

**[关键词]** 大鼠; 谷氨酸; 下丘脑; 弓状核; 骨和骨组织

**[中图分类号]** R338.2; R322.81

**[文献标识码]** A

## Effect of hypothalamic arcuate nucleus damaged by monosodium glutamate on bone histomorphometry parameters in rat

LIU Xi-yi, LIU Hao-yu, ZHANG Wei

(Department of Physiology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China. E-mail: Liuxiyi@Tom.com)

**[ABSTRACT]** AIM: To investigate the effect of hypothalamic arcuate nucleus (ARC) damaged by monosodium glutamate (MSG) on bone histomorphometry parameters in rats. **METHODS:** (1) Newborn SD rats of experimental group were hypodermically injected 10% MSG (4 g/kg BW) on the postnatal 1st, 3rd, 5th, 7th, 9th day. Meanwhile, the newborn rats of the control group were given equal volume of normal saline and the rats after the postnatal 70th, 72th, 74th, 76th and 78th day were hypodermically injected 10% MSG (4 g/kg BW) as the MSG toxicity control group. After survival for 160 days, all rats were killed. (2) Morphological methods were used to estimate the ARC neurons and the bone histomorphometry parameters. (3) Radioimmunoassay was used to measure the levels of the serum growth hormone (GH), estradiol (E<sub>2</sub>) and testosterone (T). **RESULTS:** The number of the hypothalamic arcuate nucleus neurons, the levels of serum E<sub>2</sub>, T, GH and the %Tb·Ar, Tb·Th, Tb·N of proximal tibial metaphysis (PTM) significantly decreased, while Tb·Sp of proximal tibial metaphysis (PTM) significantly increased, and the osteoporotic alterations appeared obviously. All these changes did not appear in the rats of NS group and MSG toxicity control group. **CONCLUSION:** (1) The changes of the bone in MSG group rats are not the effect of the MSG toxicity on the bone directly. (2) The hypothalamic arcuate nucleus participates in the regulation of the bone metabolism. (3) ARC regulates bone metabolism via altering the functions of the hypothalamus-GH-IGF-1 axis and the hypothalamus-pituitary-gonal axis.

**[KEY WORDS]** Rats; Glutamic acid; Hypothalamus; Arcuate nucleus; Bone and bones

对谷氨酸单钠(monosodium glutamate, MSG)神经毒作用研究的不断深入,推动了神经解剖学、神经生理学和神经病理学的发展。

新生期大鼠注射 MSG 可选择性损毁下丘脑弓状核(ARC)神经元<sup>[1,2]</sup>。于大鼠出生后第 1、3、5、7、9 d 皮下注射 10% MSG (4 g/kg BW), 存活至第 5 周, ARC 神经细胞消亡约 80%, 存活至第 10 周, ARC

内残存的神经细胞不到 10%, 呈现基本无细胞的空白区<sup>[2]</sup>。MSG 对新生期大鼠 ARC 神经元有特异性损毁作用, 可用作复制 ARC 的实验动物模型<sup>[2,3]</sup>, 许多作者用此模型进行 ARC 功能的研究<sup>[2-6]</sup>。我们曾报道新生期注射 MSG 可导致大鼠骨质疏松<sup>[7]</sup>, 本研究进一步观察新生期注射 MSG 对大鼠骨组织形态计量学的影响, 探讨 ARC 对骨代谢的调控作用。

[收稿日期] 2005-08-29 [修回日期] 2005-12-18

Tel: 0759-2388579; E-mail: Liuxiyi@Tom.com

## 材 料 和 方 法

### 1 实验动物

新生 Sprague - Dawley (SD) 大鼠由 1 只雄鼠与另 1 窝 6 只姐妹鼠(广东医学院实验动物中心提供)所生。选用体重为 5.5 - 6.5 g 的新生鼠,用同窝对照的方法,随机分为:MSG 组(12 只)、NS 组(12 只)、MSG 毒性对照组(10 只),每组雌雄各半。并分别用龙胆紫作好标记。

MSG 组大鼠于出生后第 1、3、5、7、9 d 皮下注射 10% MSG (4 g/kg BW),NS 组用同法注射等体积生理盐水,MSG 毒性对照组,不做任何注射,待至第 71 d 时再处理。每次注射前,检查标记,确保标记明显。注射完毕,放回原窝仍由原母鼠哺养。为使各幼鼠受乳条件相近,每窝保持 8 只幼鼠哺乳,至第 30 d 断乳分笼。雌雄分笼饲养至 160 d 处死取材。所有实验动物自由摄食(标准固体饲料)、摄水,在 24 - 28 °C,湿度 60% - 80%,通风、光照良好的相同环境下饲养。MSG 毒性对照组,分笼饲养至 71 d 起至 79 d 止,隔日皮下注射 10% MSG (4 g/kg BW),注射完毕放回原笼饲养至第 160 d,处死取材。

将各组 160 d 龄实验动物称重后,用 3% 戊巴比妥钠 ip 麻醉,固定动物,开胸,用连接肝素生理盐水的针头插入左心室,进行灌注,在右心房剪一开口,待流出液不带血色时,接着用 4% 多聚甲醛灌注,至四肢僵硬为止。剪取大鼠头部,去除皮肤及软组织,剪开双侧颞骨,放入 10% 中性甲醛中固定。取出并剥出全脑,截取由视交叉至乳头体这段脑组织,进行常规石蜡包埋,冠状面连续切片,片厚 4 μm,每隔 12 片裱片一张,HE 染色。参照《大鼠脑立体定位图谱》<sup>[8]</sup>在光学显微镜下找出下丘脑弓状核正中隆起切面。在正中隆起切面内侧部紧邻第 3 脑室底部弓状核内,见图 1,在 600 倍视野下计算神经细胞数,每张切片取 1 个视野,每只动物取 3 张切片。然后算出平均每个视野的神经细胞数(个/视野)。

取各组大鼠右侧胫骨,剔净附着的软组织,在 10% 中性甲醛中固定一周,取上 1/3 段制备常规脱钙骨组织蜡块,作矢状面连续切片,片厚 5 μm,HE 染色,用于破骨细胞计数。在高倍(40 × 10)视野下进行破骨细胞计数。每只动物随机取 2 张切片,每张切片随机取 3 个视野,然后算出平均每个视野的破骨细胞数(个/视野)。另裱 2 张切片作胶原特殊染色,用于显示骨小梁结构。骨组织形态计量学检测,参照文献<sup>[9]</sup>方法,用半自动图像数字分析仪测量及计算骨小梁面积(%Tb · Ar)、骨小梁数(Tb · N)、骨小梁厚度(Tb · Th)和骨小梁分离度(Tb · SP)。测量范围为距近端胫骨干骺端生长板最下缘

0.5 mm 至 3.5 mm。

心脏灌注前,从左心室抽血,取血清 -20 °C 保存待测。用放射免疫法测定血清中 GH(生长素)、E<sub>2</sub>(雌二醇)和 T(睾酮)含量。放免试剂盒购自卫生部上海生物制品研究所。所有样品同批测定。严格按照试剂盒使用说明书操作。

### 2 统计学处理

实验数据用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SPSS 11.5 统计软件包进行成组 *t* 检验。

## 结 果

### 1 MSG 对 ARC 神经细胞的毒性损毁作用

1.1 ARC 组织形态改变 从图 1 可见,MSG 组 ARC 神经细胞明显少于 NS 组,而 MSG 毒性对照组 ARC 神经细胞无明显改变。

1.2 ARC 神经细胞计数 从表 1 可见,MSG 组大鼠 ARC 神经细胞数显著少于对照组,而 MSG 毒性对照组的变化无统计学意义。

表 1 ARC 神经细胞计数

Tab 1 The number of neuron in ARC ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	Female	Male
		Number of ARC	Number of ARC
NS	6	60.2 ± 11.5	63.0 ± 8.2
MSG	6	20.3 ± 4.8*	27.2 ± 7.1*
MSG toxicity control	5	66.0 ± 7.2	55.2 ± 8.4

\* *P* < 0.01 vs NS group.

### 2 血清激素水平的改变

#### 2.1 各组雌性大鼠血清激素水平的改变

表 2 各组雌性大鼠血清激素水平的改变

Tab 2 Changes of hormone level in female groups ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	GH(μg/L)	E <sub>2</sub> (ng/L)
NS	6	6.08 ± 2.69	16.66 ± 9.99
MSG	6	2.53 ± 0.29**	2.74 ± 1.99**
MSG toxicity control	5	4.79 ± 2.19	20.06 ± 13.46

\* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 vs NS group.

2.2 各组雄性大鼠血清激素水平的改变 从表 2、3 可见,MSG 组大鼠血清生长素、性激素水平显著低于对照组,而 MSG 毒性对照组的变化无统计学意义。

### 3 骨组织形态学和骨组织形态计量学的改变

3.1 骨组织形态学的改变 从图 2 可见,与对照组比较,MSG 大鼠骨小梁稀少,变细、中断、间距增大,而 MSG 毒性对照组无明显变化。

3.2 骨组织形态计量学的改变 从表 4、5 结果可见,MSG 组大鼠 %Tb · Ar、Tb · Th、Tb · N 显著少于对照组,Tb · SP 显著大于对照组,而 MSG 毒性对

照组这些改变无统计学意义。

#### 4 破骨细胞的改变

4.1 各组大鼠胫骨干骺端破骨细胞计数的改变  
从表6可见,MSG组大鼠破骨细胞显著多于NS对照组,而MSG毒性对照组大鼠破骨细胞数的变化无统计学意义。

表3 各组雄性大鼠血清激素水平的改变

Tab 3 Changes of hormone level in male groups ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	GH( $\mu\text{g/L}$ )	E <sub>2</sub> (ng/L)	T(ng/L)
NS	6	6.04 $\pm$ 3.92	10.50 $\pm$ 3.46	376.67 $\pm$ 69.27
MSG	6	2.02 $\pm$ 0.49*	4.17 $\pm$ 2.61**	244.50 $\pm$ 53.71**
MSG toxicity control	5	4.48 $\pm$ 1.94	9.40 $\pm$ 3.10	384.20 $\pm$ 74.07

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NS group.

### 讨 论

新生期大鼠的血脑屏障尚未发育完善,皮下注射MSG可引起急性神经元变性和迟发性死亡。损伤脑区的范围,由于MSG剂量、给药途径、方法等不同,各家报道不一。10%MSG(4g/kg BW),于大鼠

新生期10d内,隔天皮下注射1次,共5次,可选择性地破坏下丘脑弓状核。可用作复制损毁弓状核的实验动物模型<sup>[2,3]</sup>,目前国内外许多学者利用此实验动物模型研究ARC的功能<sup>[2-6]</sup>。

本研究用新生SD大鼠,在其出生后第1、3、5、7、9d皮下注射10%MSG(4g/kg BW),存活至160d。结果发现ARC神经细胞数明显减少,雌性大鼠减少70%~80%,雄性大鼠减少60%~70%,而邻旁神经细胞无明显变化。用放射免疫分析测定法,测定各组大鼠血清中激素,结果发现MSG组与NS对照组比较,MSG组雌性大鼠GH、E<sub>2</sub>、FSH水平显著降低(分别为 $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),雄性大鼠GH、E<sub>2</sub>、T(睾酮)水平均显著降低(分别为 $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ )。骨组织切片发现MSG组大鼠胫骨干骺端的骨小梁结构明显破坏,小梁骨稀少、变细、连接中断,小梁骨间距增大,骨组织形态计量学发现骨小梁面积百分数、骨小梁宽度、骨小梁数量明显降低(均 $P < 0.05$ ),而骨小梁分离度明显增大( $P < 0.05$ )。破骨细胞计数明显增多( $P < 0.01$ )。

表4 各组雌性大鼠胫骨干骺端骨组织形态计量学参数

Tab 4 Parameters of PTM histomorphometry in female rats ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	%Tb·Ar(%)	Tb·Th( $\mu\text{m}$ )	Tb·N( $\text{n} \cdot \text{mm}^{-1}$ )	Tb·SP( $\mu\text{m}$ )
NS	6	0.194 $\pm$ 0.022	42.360 $\pm$ 3.512	4.590 $\pm$ 0.615	178.804 $\pm$ 29.063
MSG	6	0.141 $\pm$ 0.021**	37.660 $\pm$ 0.710*	3.609 $\pm$ 0.620*	242.464 $\pm$ 43.126*
MSG toxicity control	5	0.169 $\pm$ 0.028	41.672 $\pm$ 3.793	4.032 $\pm$ 0.310	207.060 $\pm$ 22.942

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NS group.

表5 各组雄性大鼠胫骨干骺端骨组织形态计量学参数

Tab 5 Parameters of PTM histomorphometry in male rats ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	%Tb·Ar(%)	Tb·Th( $\mu\text{m}$ )	Tb·N( $\text{n} \cdot \text{mm}^{-1}$ )	Tb·SP( $\mu\text{m}$ )
NS	6	0.174 $\pm$ 0.065	56.116 $\pm$ 9.338	3.191 $\pm$ 0.848	277.167 $\pm$ 86.651
MSG	6	0.103 $\pm$ 0.013*	45.270 $\pm$ 6.910*	2.305 $\pm$ 0.368*	397.196 $\pm$ 60.827*
MSG toxicity control	5	0.202 $\pm$ 0.034	53.612 $\pm$ 3.575	4.032 $\pm$ 0.358	213.542 $\pm$ 35.008

\* $P < 0.05$  vs NS group.

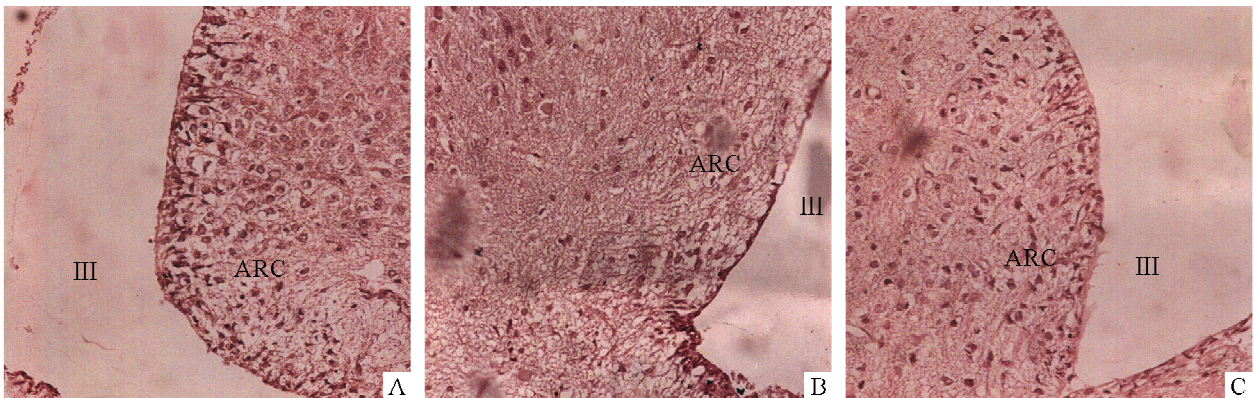


Fig 1 The lesion effect of MSG on ARC in rat (HE,  $\times 200$ ). A: NS control; B: MSG; C: MSG toxicity control. III: III ventricle of brain; ARC: hypothalamic arcuate nucleus.

图1 MSG对大鼠弓状核神经细胞的毒性损毁作用

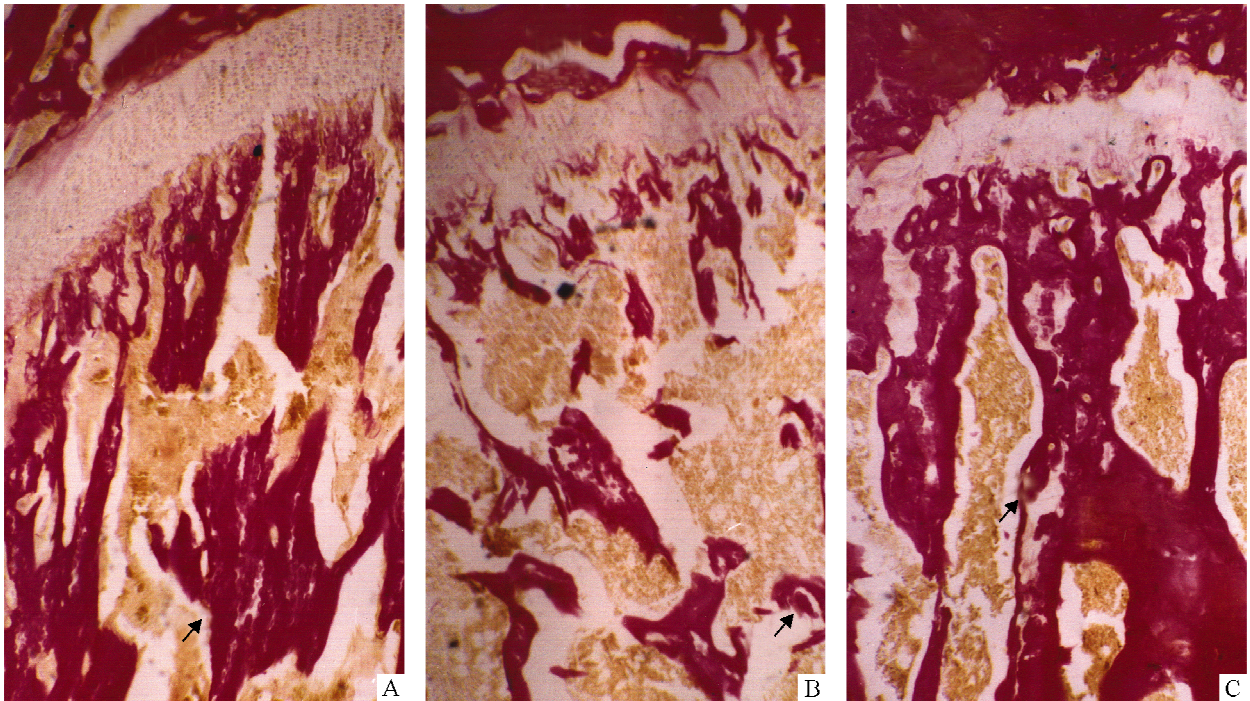


Fig 2 Changes of the bone trabecula of tibia metaphysic in MSG rat. A: NS control; B: MSG; C: MSG toxicity control; ↑: bone trabecula.

图2 MSG大鼠胫骨干骺端骨小梁的改变(胶原特殊染色×40)

表6 各组大鼠胫骨干骺端骨髓腔中破骨细胞计数

Tab 6 The number of osteoclast in medullary cavity of PTM in various group ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	Female	Male
NS	6	1.020 ± 0.168	1.013 ± 0.238
MSG	6	2.900 ± 0.548**	2.617 ± 0.752*
MSG toxicity control	5	1.004 ± 0.180	1.060 ± 0.241

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs NS group.

为了观察MSG对垂体和骨组织是否有毒性作用,本研究设置了2个对照组,即NS对照组和MSG毒性对照组。NS对照组用生理盐水取代MSG,作对照。MSG毒性对照组是70d龄大鼠同法注射与MSG组等剂量的MSG(4g/kg BW),存活90d,即与NS组和MSG组同为160d龄时处死取材检测。结果发现,MSG组ARC神经细胞明显损毁,血清GH、性激素水平显著降低,骨组织形态学和骨组织形态计量学明显改变,破骨细胞数量显著增多。而NS组和MSG毒性对照组没有这些变化。说明这些改变是MSG作用于新生期大鼠引起的,对70d龄大鼠不能引起这些变化,所以血清GH、性激素水平和骨组织的改变不是MSG对垂体或骨组织的毒性作用引起的。本研究结果表明只有当ARC神经细胞明显损毁时,才引起血清GH和性激素水平和骨组织的改变,没有ARC神经细胞的损毁则没有血清激素水平和骨组织的改变。结果提示:(1)ARC参与骨代谢的调控;(2)通过GH和性激素作用是ARC参与

骨代谢调控的重要途径。

[参考文献]

[1] Kizer JS, Nemeroff CB, Yongblood WW. Neurotoxic amino acids and structurally related analogs [J]. Pharmacol Rew, 1977, 29(4): 301-308.

[2] 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, 2(4): 273-275.

[3] 刘彦芳,蔡定芳. 左旋谷氨酸单钠对神经内分泌免疫系统的影响[J]. 国外医学:内分泌分册, 1997, 17(3): 143-145.

[4] 李瀚旻,杨木兰,梅家俊,等. MSG-肝再生-大鼠下丘脑神经细胞凋亡及相关基因TGF-β的表达[J]. 中国应用生理学杂志, 2003, 19(1): 46-47.

[5] 杨木兰,李瀚旻. Dig标记探针原位杂交检测MSG-肝再生-大鼠下丘脑弓状核TGF-β1 mRNA[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2002, 11(2): 202-204.

[6] 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-垂体-肾上腺胸腺轴的改变[J]. 中国病理生理杂志, 1998, 14(4): 342-346.

[7] 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.

[8] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京:人民卫生出版社, 1991.

[9] Li QN, Liang NCi, Wu T, et al. Effects of total coumarins of Fructus cnidii on skeleton of ovariectomized rats [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 1994, 15(6): 528-532.