



青藏高原环境下大鼠骨骼微结构的基础研究*

赵思斯¹, 王哲涛¹, 尹红科¹, 王春华², 索靖航³, 梁博深⁴, 王磊⁵, 郅发宝^{1, 5Δ}

1. 四川大学华西医院 放射科(成都 610041); 2. 四川省肿瘤临床医学研究中心 四川省肿瘤医院研究所 四川省癌症防治中心

电子科技大学附属肿瘤医院 影像科(成都 610041); 3. 嘉兴大学(嘉兴 314001); 4. 云南中医药大学(昆明 650500);

5. 四川大学华西医院 分子影像研究室(成都 610041)

【摘要】目的 在真实的高原环境建立低压缺氧大鼠模型,应用Micro CT、血液生化、病理等多种手段,了解真实高原环境对于大鼠骨量以及骨微结构的影响,并探讨其可能的机制。**方法** 将SD大鼠运送至青海玉树高原实验室(海拔4250 m),分别饲养4、8、18个月,将动物运回成都四川大学华西医院分子影像实验室(海拔500 m),与同期对照组大鼠进行相关检测。检测方法包括:血液生化学;影像学Micro CT;病理学ELISA、Western blot、HE和TRAP染色等病理检查。**结果** 与同期对照组大鼠相比,高原饲养4个月(高原-4)、高原饲养18个月(高原-18)组大鼠体重下降[高原-4组vs.平原-4组:(513.75±35.10) g vs. (649.18±60.03) g, $P<0.01$;高原-18组vs.平原-18组:(535.58±66.65) g vs. (670.86±44.96) g, $P<0.01$];高原饲养8个月(高原-8)组、高原-18组血清中 Ca^{2+} 浓度较对照组升高[高原-8组vs.平原-8组:(2.48±0.09) mmol/L vs. (2.38±0.07) mmol/L, $P<0.05$;高原-18组vs.平原-18组:(2.55±0.11) mmol/L vs. (2.13±0.27) mmol/L, $P<0.05$], P^{3+} 差异无统计学意义。骨代谢指标 I 型胶原交联羧基末端肽(cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen, CTX-I):高原各组较平原组均增高[高原-4组vs.平原-4组:(1.44±0.08) ng/mL vs. (0.70±0.13) ng/mL, $P<0.01$;高原-8组vs.平原-8组:(1.52±0.10) ng/mL vs. (0.75±0.10) ng/mL, $P<0.01$;高原-18组vs.平原-18组:(2.70±0.13) ng/mL vs. (1.94±0.15) ng/mL, $P<0.01$]。此外CT结果显示高原3组骨小梁的骨体积分数降低[高原-4组vs.平原-4组:(7.48±2.35)% vs. (10.40±2.93)%, $P<0.05$;高原-8组vs.平原-8组:(7.17±2.68)% vs. (10.09±2.95)%, $P<0.05$;高原-18组vs.平原-18组:(2.90±2.91)% vs. (8.68±4.11)%, $P<0.01$]以及骨小梁分离度增大[高原-4组vs.平原-4组:(0.70±0.12) mm vs. (0.60±0.06) mm, $P<0.05$;高原-8组vs.平原-8组:(0.68±0.07) mm vs. (0.59±0.05) mm, $P<0.01$;高原-18组vs.平原-18组:(0.80±0.09) mm vs. (0.70±0.09) mm, $P<0.05$]。TRAP染色高原-4、高原-18组破骨细胞增多,Western blot提示高原环境中核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的表达增高,而骨保护素(osteoprotegerin, OPG)的表达受到抑制。**结论** 高原环境对于大鼠股骨的影响主要在于减少松质骨骨量,破坏骨微结构。

【关键词】 低压缺氧 骨微结构 Micro CT 骨代谢

Basic Research on the Microstructure of Rat Bones in the High-Altitude Environment of Qinghai-Tibet Plateau

ZHAO Sisi¹, WANG Zhetao¹, YIN Hongke¹, WANG Chunhua², SUO Jinghang³, LIANG Boshen⁴, WANG Lei⁵, GAO Fabao^{1, 5Δ}

1. Department of Radiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Radiology, Sichuan Clinical Research Center for Cancer, Sichuan Cancer Hospital & Institute, Sichuan Cancer Center, and Affiliated Cancer Hospital of University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610041, China; 3. Jiaxing University, Jiaxing 314001, China; 4. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 5. Department of Molecular Imaging Laboratory, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Δ Corresponding author, E-mail: gaofabao@wchscu.cn

【Abstract】 Objective To establish a hypobaric hypoxia rat model in a real high-altitude environment, to investigate the effects of the real high-altitude environment on rat bone mass and bone microstructure using multiple methods such as Micro CT, blood biochemistry, and pathology, and to explore the potential mechanisms involved. **Methods** Sprague Dawley (SD) rats were transported to the Yushu Plateau Laboratory (at 4250 m above sea level) in Qinghai Province and kept there for 4, or 8, or 18 months. These groups were designated as H-4, H-8, and H-18, respectively. Upon completion of the high-altitude exposure, these animals were transported to the Molecular Imaging Laboratory, West China Hospital, Sichuan University (at 500 m above sea level) in Chengdu for relevant testing and comparison with the control animals raised in a low-altitude environment for the same durations (designated L-4, L-8, and L-18). The tests performed included blood biochemistry, Micro CT imaging, and pathological assessments such as

* 国家自然科学基金(No. 81930046)和西藏自治区科学技术厅重点研发计划(No. XZ202402ZY0003)资助

Δ 通信作者, E-mail: gaofabao@wchscu.cn

出版日期: 2024-11-20

ELISA, Western blot, and HE and TRAP staining. **Results** Compared with that of the control group, the body mass of rats in the H-4 and H-18 groups decreased significantly (H-4 group vs. L-4 group: $[513.75 \pm 35.10]$ g vs. $[649.18 \pm 60.03]$ g, $P < 0.01$; H-18 group vs. L-18 group: $[535.58 \pm 66.65]$ g vs. $[670.86 \pm 44.96]$ g, $P < 0.01$). The serum Ca^{2+} concentration was higher in the H-8 group and H-18 group compared to that in the control group (H-8 group vs. L-8 group: $[2.48 \pm 0.09]$ mmol/L vs. $[2.38 \pm 0.07]$ mmol/L, $P < 0.05$; H-18 group vs. L-18 group: $[2.55 \pm 0.11]$ mmol/L vs. $[2.13 \pm 0.27]$ mmol/L, $P < 0.05$). No statistically significant difference was observed in the concentration of P^{3+} . Bone metabolism indicator cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (CTX-I) was significantly increased in all high-altitude groups compared to the low-altitude groups (H-4 group vs. L-4 group: $[1.44 \pm 0.08]$ ng/mL vs. $[0.70 \pm 0.13]$ ng/mL, $P < 0.01$; H-8 group vs. L-8 group: $[1.52 \pm 0.10]$ ng/mL vs. $[0.75 \pm 0.10]$ ng/mL, $P < 0.01$; H-18 group vs. L-18 group: $[2.70 \pm 0.13]$ ng/mL vs. $[1.94 \pm 0.15]$ ng/mL, $P < 0.01$). In addition, CT results showed a decrease in bone volume fraction of trabecular bone in the three high-altitude groups (H-4 group vs. L-4 group: $[7.48 \pm 2.35]\%$ vs. $[10.40 \pm 2.93]\%$, $P < 0.05$; H-8 group vs. L-8 group: $[7.17 \pm 2.68]\%$ vs. $[10.09 \pm 2.95]\%$, $P < 0.05$; H-18 group vs. L-18 group: $[2.90 \pm 2.91]\%$ vs. $[8.68 \pm 4.11]\%$, $P < 0.01$), and increased trabecular separation in the three high-altitude groups (H-4 group vs. L-4 group: $[0.70 \pm 0.12]$ mm vs. $[0.60 \pm 0.06]$ mm, $P < 0.05$; H-8 group vs. L-8 group: $[0.68 \pm 0.07]$ mm vs. $[0.59 \pm 0.05]$ mm, $P < 0.01$; H-18 group vs. L-18 group: $[0.80 \pm 0.09]$ mm vs. $[0.70 \pm 0.09]$ mm, $P < 0.05$). TRAP staining showed an increase in osteoclasts in the H-4 and H-18 groups. Western blot results indicated an increase in the expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in high-altitude environment, while the expression of osteoprotegerin (OPG) was inhibited. **Conclusion** The impact of high-altitude environment on rat femurs is characterized primarily by a reduction in trabecular bone mass and damage to bone microstructure.

【Key words】 Hypobaric hypoxia Bone microstructure Micro CT Bone metabolism

近年来,随着高原医学的发展,越来越多的研究者重视高原环境对机体的影响。高原地区强紫外线和昼夜温差大等复杂的自然环境会引起机体多种生理和病理反应及应激^[1]。在这些反应中,对身体影响最大的是低压缺氧。目前高原的医学研究主要集中在对缺氧较为敏感的器官(心脏、脑、肺等)^[2-4],而暴露于高原环境对骨骼的影响并未得到很好的观察或研究。动物研究和对登山者的人体研究表明,暴露在高海拔环境中会降低骨量和强度,导致骨质疏松的发病危险性增加。很多研究者认为低压缺氧会改变骨重塑,但已发表的研究结果并不一致^[5]。

大多数观察高海拔对骨骼影响的研究都是使用低氧减压室进行的,仅少数研究是在高海拔地区进行^[6-7]。虽然缺氧对骨组织代谢的影响尤为重要,但其他高海拔地区因素,也不能被忽略,这是一个复杂的多因素共同作用的结果。在人类中,没有关于低压缺氧对骨代谢影响的良好模型^[8]。鉴于动物模型对于探索低压缺氧相关人类疾病的病理生理学结果具有重要价值,在本实验中,低压缺氧大鼠模型是在真实的高原环境下建立。基于低压缺氧大鼠模型,探究高海拔地区长期慢性低压缺氧环境下骨微结构以及骨量的变化,以更好地了解骨对低压缺氧的反应及其对骨代谢的潜在后果。

1 材料与方法

1.1 实验动物及标本准备

选择体质量(200 ± 20) g、8周龄雄性SD大鼠,购于成

都达硕生物科技有限公司。实验组利用配备恒温控制系统的专业运输车,将大鼠运输至位于青海省玉树藏族自治州的高原动物实验室(海拔4250 m)。实验室内环境湿度大约维持在50%水平,温度稳定在23℃左右,并且每笼饲养4~5只大鼠。所有大鼠可自由获取无菌饮用水和食物,并处于12 h的光照/黑暗循环和通风良好的环境中。依据GPower_3.1.9.7_143软件计算样本量,将55只大鼠随机分为实验组($n=28$)和对照组($n=27$)。实验组分为3亚组,分别在高原环境饲养4个月、8个月以及18个月[高原-4($n=7$)、高原-8($n=9$)、高原-18组($n=12$)],同时在四川大学华西医院分子影像实验室(海拔500 m)动物房饲养对应时间的对照组大鼠[平原-4($n=11$)、平原-8($n=9$)、平原-18组($n=7$)],对照组饲养条件同实验组。实验和操作流程经四川大学华西医院动物实验伦理委员会审核通过(伦理号:20240718003)。后续检测时,先用戊巴比妥钠麻醉,称量大鼠体质量并记录。然后采集腹主动脉血,并以3000 r/min的转速离心15 min后,取血清于-80℃冰箱保存。取血后处死大鼠,分离双侧股骨,尽量剔除周围软组织,一侧于-80℃冰箱保存,另一侧置于体积分数为4%多聚甲醛溶液中固定24 h。

1.2 血清检测

血清标本:使用全自动生化分析仪(Mindray, 中国)检测血清中 Ca^{2+} 、 P^{3+} 的含量。并采用酶联免疫吸附测定ELISA试剂盒(Elabscience Biotechnology)检测血清中骨代谢指标I型胶原交联羧基末端肽(cross-linked carboxy-

terminal telopeptide of type I collagen, CTX- I) 的质量浓度。

1.3 Micro-CT 扫描以及分析方法

所有股骨标本采用Micro Computed Tomography (Micro CT) 进行扫描(Perkin Elmer, QUANTUM GX)。扫描参数为: 管电压80 kV, 管电流100 μA, FOV 25 mm, Voxel size 50 μm, 图像重建采用High Resolution。扫描完后, 使用后处理软件Calipers Analyze分析股骨相关参数。选用高度为2.5 mm的VOI(the volume of interest), 分析从股骨远端生长板上开始延伸至近端处。分析参数包括骨矿物质密度(BMD, 单位g/cm³)、骨小梁的骨体积(BV, 单位mm³)、骨小梁相对体积(BV/TV, 单位%)、骨表面积组织体积比值(BS/TV, 单位mm⁻¹)、骨小梁厚度(Tb.Th, 单位mm)、骨小梁数量(Tb.N, 单位mm⁻¹)、骨小梁分离度(Tb.Sp, 单位μm)、骨小梁连接密度(Conn.D, 单位mm³)。通过分析骨皮质面积(Ct.Ar, 单位mm²)和骨皮质厚度(Ct.Th, 单位μm)评估皮质骨。

1.4 组织病理学分析

将取材后的新鲜骨组织用多聚甲醛固定24 h。固定后的组织, 采用EDTA慢脱钙, 脱钙完成后进行脱水、包埋在石蜡中。然后使用切片机将包埋的组织切成3 μm的切片。这些切片随后用HE染色用于组织学分析骨小梁损伤。为了观察股骨干骺端生长板附近的破骨细胞, 采用TRAP染色。破骨细胞被染成紫色加以区分。

1.5 Western blot分析

从股骨中提取蛋白质。通过蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度后, 用10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

分离总蛋白。将样品转移到PVDF膜上, 在4 ℃下与不同的一抗孵育12 h。随后, 将膜在室温下暴露于HRP标记的山羊抗兔(稀释度1 : 10 000, GAR0072, Multi sciences)或山羊抗鼠(稀释度1 : 10 000, GAM0072, Multi sciences) 1 h。用TBST在室温下脱色摇床上洗3次, 每次5 min。用于孵育的一抗包括: 核因子κB受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor-κB ligand, RANKL)(稀释度1 : 1000, Affinity, AF0313)、骨保护素(osteoprotegerin, OPG)(稀释度1 : 1000, Affinity, DF6824)、缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α, HIF-1α)(稀释度1 : 500, Affinity, BF8002)。

1.6 统计学方法

本研究采用GraphPad Prism 10.0统计学软件对数据进行分析, 符合正态分布采用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述, 反之采用中位数(四分位数)表示。正态性检验用Shapiro-Wilk检验, 方差齐性检验用Bartlett检验。对于满足正态分布且方差齐的数据, 采用独立样本t检验, 否则采用Mannwhitney检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体质量、血生化以及ELISA结果

高原-4以及高原-18组较对应平原组体质量降低($P < 0.001$), 而在8个月组间差异无统计学意义。高原-8以及高原-18组较对应平原组血清中Ca²⁺浓度升高($P < 0.05$), 而在4个月组间差异无统计学意义。P³⁺浓度各组间差异均无统计学意义。高原-4、高原-8、高原-18组CTX- I 较对应平原组均降低($P < 0.001$)。详见表1。

表 1 大鼠体质量以及血清中Ca²⁺、P³⁺、CTX- I 含量
Table 1 Rat body mass and the levels of Ca²⁺, P³⁺, and CTX- I in serum

Factor	Duration	High altitude group (n=28)	Low-altitude group (n=27)	t/z	P
Body mass/g	4 months	513.75±35.10	649.18±60.03	5.687	<0.001
	8 months	658.38±32.73	684.22±55.36	1.151	0.268
	18 months	535.58±66.65	670.86±44.96	4.749	<0.001
Ca ²⁺ /(mmol/L)	4 months	1.80 (1.60, 2.50)*	2.52 (2.30, 2.50)*	-1.761	0.078
	8 months	2.48±0.09	2.38±0.07	2.487	0.032
	18 months	2.55±0.11	2.13±0.27	3.575	0.005
P ³⁺ /(mmol/L)	4 months	1.65±0.46	1.78±0.31	-0.556	0.590
	8 months	2.44±0.43	2.46±0.35	-0.096	0.926
	18 months	1.54±0.26	1.54±0.26	0.033	0.974
CTX- I / (ng/mL)	4 months	1.44±0.08	0.70±0.13	11.746	<0.001
	8 months	1.52±0.10	0.75±0.10	13.762	<0.001
	18 months	2.70±0.13	1.94±0.15	9.435	<0.001

* Median (P₂₅, P₇₅).

2.2 Micro CT分析结果

详见表2、图1和图2。高原组大鼠BV、BV/TV、BS/TV、Tb.N较对应平原组均有不同程度的降低,Tb.Sp较对应平原组升高(P 均 <0.05)。CortexMean BMD在高原-4以及

高原-8组中增高($P<0.05$),而在18个月组间差异无统计学意义。Conn.D在高原-4、高原-18组中出现了增大($P<0.05$),而在8个月组间差异无统计学意义。Trabeculae Mean BMD、Tb.Th、Ct.Th、Ct.Ar在高原3组中均未发现

表 2 股骨CT相关参数结果
Table 2 Results of CT related parameters of femur

Factor	Duration	High-altitude group ($n=28$)	Low-altitude group ($n=27$)	t	P
CortexMean BMD/(g/cm ³)	4 months	1 636.60±73.07	1 566.19±34.85	-2.395	0.045
	8 months	1 651.63±41.31	1 615.15±28.36	-2.184	0.044
	18 months	1 673.39±72.01	1 626.70±44.40	-1.543	0.141
TrabeculaeMean BMD/(g/cm ³)	4 months	1 115.68±90.98	1 106.48±41.35	-0.253	0.807
	8 months	1 095.29±71.01	1 079.67±46.53	-0.552	0.588
	18 months	1 141.88±97.97	1 111.76±86.61	-0.673	0.510
BV/mm ³	4 months	2.42±1.17	3.76±1.27	2.237	0.040
	8 months	2.59±1.23	3.95±1.18	2.402	0.029
	18 months	1.12±1.01	3.13±1.59	3.387	0.004
(BV/TV)/%	4 months	7.48±2.35	10.40±2.93	2.217	0.042
	8 months	7.17±2.68	10.09±2.95	2.196	0.043
	18 months	2.90±2.91	8.68±4.11	3.600	0.002
(BS/TV)/mm ⁻¹	4 months	2.31±0.94	3.25±0.69	2.431	0.027
	8 months	2.37±0.84	3.23±0.81	2.186	0.044
	18 months	1.01±0.93	2.67±1.17	3.413	0.003
Tb.N/mm ⁻¹	4 months	0.57±0.23	0.79±0.18	2.226	0.041
	8 months	0.58±0.18	0.82±0.19	2.732	0.015
	18 months	0.24±0.22	0.58±0.22	3.290	0.004
Tb.Th/mm	4 months	0.16±0.03	0.16±0.03	0.088	0.931
	8 months	0.14±0.04	0.16±0.02	1.174	0.258
	18 months	0.16±0.03	0.16±0.04	0.474	0.641
Tb.Sp/mm	4 months	0.70±0.12	0.60±0.06	2.342	0.033
	8 months	0.68±0.07	0.59±0.05	2.949	0.009
	18 months	0.80±0.09	0.70±0.09	2.472	0.024
Conn.D/mm ³	4 months	18.32±9.84	29.37±11.24	2.128	0.049
	8 months	23.49±14.55	28.18±13.93	0.698	0.495
	18 months	13.61±17.02	29.75±12.64	2.174	0.044
Ct.Th/mm	4 months	0.55±0.06	0.58±0.04	1.063	0.303
	8 months	0.59±0.06	0.54±0.06	1.894	0.778
	18 months	0.55±0.07	0.59±0.07	1.249	0.229
Ct.Ar/mm ²	4 months	8.06±1.15	8.72±0.67	1.543	0.142
	8 months	8.71±0.94	8.50±0.86	0.481	0.638
	18 months	8.73±1.31	9.74±1.15	1.682	0.111

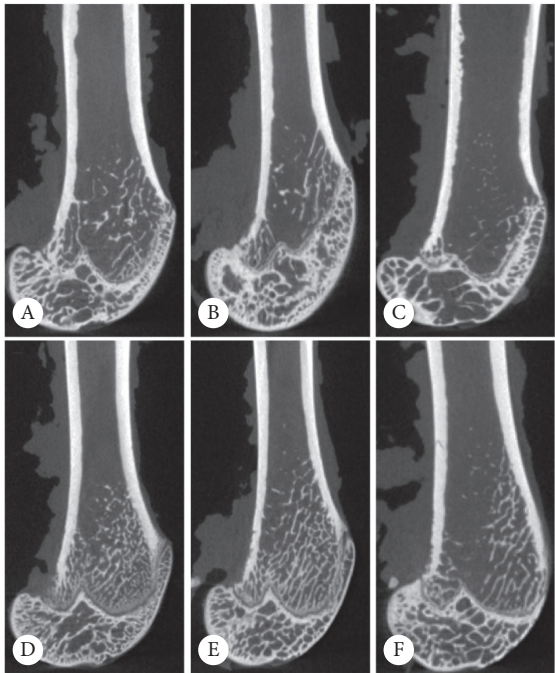


图 1 股骨的Micro CT矢状位图

Fig 1 Micro CT sagittal image of femur

A, B, and C show rats raised in high-altitude environment for 4, 8, and 18 months, respectively, with the three groups designated as H-4, H-8, and H-18; D, E, and F show rats raised in low-altitude environment for 4, 8, and 18 months, respectively, with the three groups designated as L-4, L-8, and L-18.

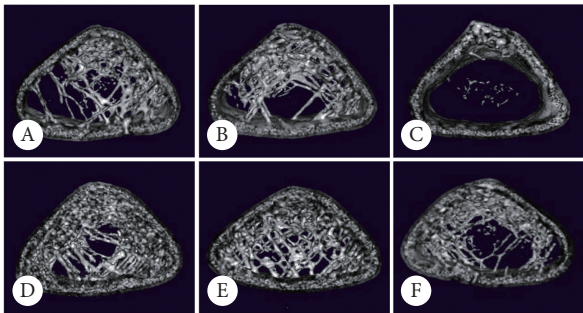


图 2 骨小梁的3D图

Fig 2 3D image of bone trabeculae

The same notes as those for Fig 1.

与对应平原组间的差异。

2.3 组织病理分析结果

2.3.1 HE染色结果

在同一时间点,高原组骨小梁普遍较平原组稀疏,断面上密度更低。高原组骨小梁表面的类骨质层普遍较平原组更薄,有的样本较难辨认,详见图3。此外,在HE染色上截取相同位置的切片观察骨髓脂肪细胞,高原组普遍较平原组骨髓脂肪细胞增多,并且18个月组脂肪细胞直径普遍较大,详见图4。

2.3.2 TRAP染色结果

在高原-4、高原-18组中可观察到破骨细胞的高表达

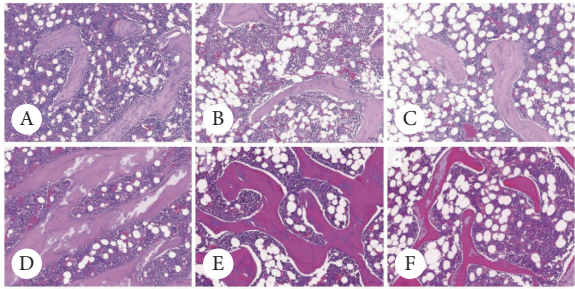


图 3 HE染色骨小梁的代表性切片 (×200)

Fig 3 Representative section of HE stained bone trabeculae (original magnification ×200)

The same notes as those given in Fig 1.

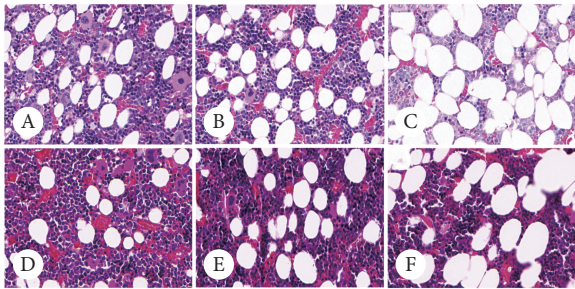


图 4 HE染色骨髓脂肪细胞的代表性切片 (×400)

Fig 4 Representative sections of HE stained bone marrow adipocytes (original magnification ×400)

The same notes as those for Fig 1.

($P<0.05$),而在8个月组间差异无统计学意义。提示低压缺氧促进了大鼠的破骨细胞分化(表3,图5)。

表 3 TRAP染色破骨细胞的面积百分比				
Table 3 Area percentage of TRAP stained osteoclasts				
Duration	High-altitude group/ %, n=6	Low-altitude group/ %, n=6	t/z	P
4 months	1.23±0.50	0.80±0.40	-2.866	0.007
8 months	0.76 (0.20, 1.30)*	0.63 (0.20, 1.10)*	-0.728	0.467
18 months	2.69±0.92	0.93±0.29	-7.726	<0.001

* Median (P_{25} , P_{75}).

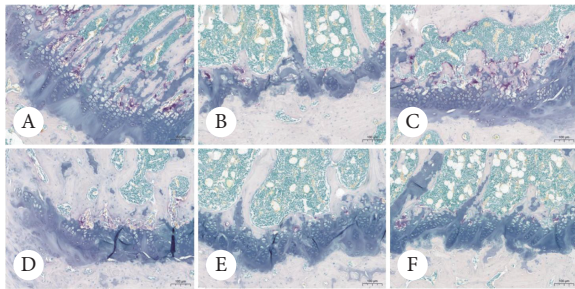


图 5 TRAP染色破骨细胞的代表性切片 (×200)

Fig 5 Representative sections of osteoclasts stained with TRAP (original magnification ×200)

The same notes as those for Fig 1.

2.4 Western blot结果

高原3组大鼠RANKL、HIF-1 α 的表达高于对应平原组,而OPG表达低于对应平原组,详见图6。

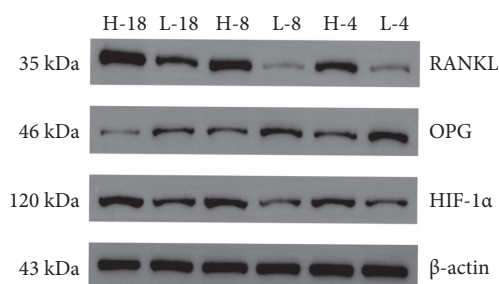


图6 Western blot检测高原组与平原组中RANKL、OPG及HIF-1 α 的表达水平

Fig 6 Expression levels of RANKL, OPG, and HIF-1 α in the high-altitude and the low-altitude groups

Group designations are explained in the notes to Fig 1.

3 讨论

骨是一种高度动态的组织,通过骨重塑不断更新,维持骨生物力学稳定性和骨功能^[9]。既往研究显示低压缺氧与骨重塑的改变有关,但已发表的结果不一。海拔2500 m以上的地区被认为是高海拔环境,而极高海拔环境是指海拔3500 m至5500 m的高度,海拔6000 m以上的地区被称为极端海拔^[5,10]。BRENT等^[11]将16周龄的小鼠暴露在500 mbar(对应海拔5500 m)低压氧舱中,发现模拟高海拔主要影响股骨皮质骨,而股骨小梁骨影响不太明显。BOZZINI等^[12]将幼年大鼠暴露于模拟海拔(1850、2900、4100、5450 m)6周,高于2900 m的模拟高海拔,与平原大鼠相比股骨长度、皮质骨形态参数无明显变化。YAN等^[13]将3月龄大鼠暴露于模拟6000 m的低压氧舱中9周,发现总骨量、骨小梁数量明显下降,骨小梁分离度增大。在本研究中采用Micro CT对暴露于极高海拔环境(海拔4250 m)不同时间的3组大鼠股骨进行分析,观察骨微结构的改变。结果发现骨小梁骨量、数目均明显降低,骨小梁分离度加大,结构损害,然而高原组皮质骨结构未发现明显的改变。导致不同结果可能的原因存在于以下几方面:一是模拟高原环境的低压氧舱和真实高原环境的区别;二在于海拔高度的不同;三是缺氧的方式,间歇性缺氧还是持续缺氧及暴露时间长短,均会对研究结果产生影响^[8,14]。现有的研究暴露时间一般是4~12周,其中最长时间达到了32周^[15],而本研究最长时间达到了18个月。结果显示无论时间长短,暴露于低压缺氧环境均会因骨微结构的恶化以及骨量的降低而对骨完整性产生不利影响。

骨重塑由骨合成代谢和骨分解代谢之间的动态平衡调节,成骨细胞、破骨细胞和骨髓间充质干细胞参与。其

中,骨髓间充质干细胞是骨髓脂肪细胞和成骨细胞的前体^[16]。骨髓脂肪细胞不仅能储存大量脂肪,同时能够产生脂肪因子(如脂联素、瘦素等)引起成骨细胞的凋亡,并增强破骨细胞代谢^[17-18]。既往研究表明,骨髓脂肪含量的增加与骨量丢失、骨质疏松发生风险紧密相关^[19],在本研究中同样观察到了高原组大鼠骨量丢失的同时伴随着骨髓脂肪细胞含量的增加。由于骨重塑系统涉及多种信号通路,低压缺氧导致骨代谢变化的因素仍需研究^[20]。在本研究中高原各组大鼠血清中CTX-I质量浓度升高,与已发表的研究结果一致^[11],同样反映了骨吸收活性的增强^[21]。TRAP染色中发现了破骨细胞面积百分比的增高,结果表明低压缺氧促进了大鼠的破骨细胞分化。由于破骨细胞生成由成骨细胞通过OPG、RANKL/RANK信号通路调节^[22-23],低压缺氧增强了破骨细胞信号的表达(RANKL增加,OPG水平降低),这表明低压缺氧使成骨细胞具有更高的诱导破骨细胞分化以及提高破骨细胞活性的能力。当破骨细胞的骨吸收超过成骨细胞的骨形成时,就会发生骨丢失和骨骼微结构的恶化,或一般骨形成减少^[24]。其次在缺氧条件下,氧化应激的增加和活性氧(reactive oxygen species, ROS)的释放,导致破骨细胞活性增加和成骨细胞活性降低,对骨重塑产生影响^[25]。HIF-1 α 作为ROS的下游因子,在骨重塑中起着关键作用,本研究中发现高原组HIF-1 α 的高表达,提示低压缺氧环境诱导的骨量减少与HIF-1 α 紧密相关。总之结果表明,高海拔低压缺氧环境可能会损害成骨细胞分化并增强破骨细胞形成。

值得注意的是, BV、BV/TV、BS/TV、Tb.N、Tb.Sp不同程度的降低,揭露了低压缺氧对于骨微结构的损坏以及骨量的降低,尤其是骨小梁。但CortexMean BMD在高原-4以及高原-8组中呈现增高,在18个月组间未发现明显差异。TrabeculaeMean BMD虽未得到具有统计学意义的结果,但是高原各组也有增高的趋势。BRENT等^[11]将22周龄雌性小鼠暴露在低压氧舱中,利用双能X线吸收法发现小鼠股骨BMD降低。然而LIESEGANG等^[26]对在高海拔牧场放牧绵羊的研究中发现骨矿物质含量增加。作者提出了高海拔地区放牧的3个典型因素可能导致这一差异:高海拔地区运动应变;矿物质摄入(与低海拔地区相比,高海拔地区的草具有更高的钙和更低的磷浓度);UV-B促进皮肤中VitD的形成。本研究中与LIESEGANG等的研究同为真实的高原环境,但本实验高原大鼠与平原大鼠均是笼养,并且饮食一致,排除了运动应变、矿物质摄入的差异。导致皮质骨BMD增高的原因可能与高海拔地区强紫外线以及UV-B相关。其次皮质骨和松质骨

对于高海拔地区环境(低压缺氧、强紫外线、昼夜温差大、日照时间长等)的反应不尽相同,矿化度也存在差异。骨量的明显降低,以及骨微结构的变化(骨小梁分离度等参数),都会降低骨的强度。然而皮质骨作为承力最重要的部分,BMD增高是一种代偿的表现,可能与应力相关,也可能与长日照、骨矿化机制相关,其中的原理待后续研究。这也提示在早期评估高原居民骨质疏松发生风险时,定量CT(quantitative computed tomograph, QCT)可以区别皮质骨和松质骨,相较于传统的骨密度仪可能更适用于高原居民骨密度的测定以及分析。

在本研究中设计了3个时间段,虽然各时间段高原组大鼠均表现出了骨量的降低,骨微结构的改变,但是并没有发现随着低压缺氧暴露时间的延长,骨量持续下降。适应环境的过程启动了许多生理机制,增加了细胞的氧气供应并促进对一定程度缺氧的耐受性。在高原-4和高原-18组中发现了更多的阳性指标。高原-4、高原-8组骨量以及骨小梁数目相当。提示低压缺氧对于骨小梁的影响达到一定程度后,就会在该基础上维持一段时间成骨与破骨的代谢平衡,直至随着年龄的增长,这种代谢平衡被重新打破,从而出现更严重的骨质破坏^[27]。高原-8组与对应平原组相比,均未发现体质量、破骨细胞的表达以及骨小梁连接密度Conn.D的差异有统计学意义,但是趋势与高原-4以及高原-18组一致。低压缺氧暴露8个月后,体质量、破骨细胞的表达以及骨小梁连接密度Conn.D与对应平原组的差异缩小,说明长期在低压缺氧环境中,机体会建立一定程度的耐受性以及修复。虽然大鼠在进入老年期后,会出现与年龄相关的骨骼变化,但本研究设置了相同月龄的平原对照组,将结果差异的来源最大程度控制在只有高海拔环境这一个变量,从而论证其对骨的影响。在本研究中高原-18组,破骨细胞表达以及RANKL、OPG水平与对应平原组相比表现出了更大的差异证实了这一观点。

本研究的不足之处在于低压缺氧大鼠模型虽然是在真实高原环境下建立,由于高原条件有限,大鼠运回成都分子实验室进行后续检测。虽然尽量在最短时间内完成所有实验,但不可避免大鼠模型回到平原恢复常压常氧对于实验结果的影响。其次本研究作为探索性分析,仅初步探讨了低压缺氧对大鼠骨微结构以及骨代谢的影响,未来应做更深入的通路研究。

* * *

作者贡献声明 赵思斯负责论文构思、数据审编、正式分析、调查研究、研究方法、可视化、初稿写作和审读与编辑写作,王哲涛负责正式分析、调查研究、可视化和审读与编辑写作,尹红科负责正式分析、调查研究、研究方法和审读与编辑写作,王春华和索靖航负责正式分析、调查

研究和审读与编辑写作,梁博深负责正式分析、研究方法和审读与编辑写作,王磊负责研究项目管理、提供资源、监督指导和审读与编辑写作,邵发宝负责论文构思、数据审编、经费获取、调查研究、研究方法、研究项目管理、提供资源、监督指导、验证和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution ZHAO Sisi is responsible for conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, visualization, writing--original draft, and writing--review and editing. WANG Zhetao is responsible for formal analysis, investigation, visualization, and writing--review and editing. YIN Hongke is responsible for formal analysis, investigation, methodology, and writing--review and editing. WANG Chunhua and SUO Jinghang are responsible for formal analysis, investigation, and writing--review and editing. LIANG Boshen is responsible for formal analysis, methodology, and writing--review and editing. WANG Lei is responsible for project administration, resources, supervision, and writing--review and editing. GAO Fabao is responsible for conceptualization, data curation, funding acquisition, investigation, methodology, project administration, resources, supervision, validation, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] BASNYAT B, MURDOCH D R. High-altitude illness. *Lancet*, 2003, 361(9373): 1967-1974. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13591-X.
- [2] CHEN H, CHEN C, QIN Y, *et al.* Protective effects of epigallocatechin-3-gallate counteracting the chronic hypobaric hypoxia-induced myocardial injury in plain-grown rats at high altitude. *Cell Stress Chaperones*, 2023, 28(6): 921-933. doi: 10.1007/s12192-023-01386-1.
- [3] FANG X, JI Y, LI S, *et al.* Paeoniflorin attenuates cuproptosis and ameliorates left ventricular remodeling after AMI in hypobaric hypoxia environments. *J Nat Med*, 2024, 78(3): 664-676. doi: 10.1007/s11418-024-01781-7.
- [4] CHEN C, LI B, CHEN H, *et al.* Epigallocatechin-3-gallate ameliorated iron accumulation and apoptosis and promoted neuronal regeneration and memory/cognitive functions in the hippocampus induced by exposure to a chronic high-altitude hypoxia environment. *Neurochem Res*, 2022, 47(8): 2254-2262. doi: 10.1007/s11064-022-03611-2.
- [5] BRENT M B. A review of the skeletal effects of exposure to high altitude and potential mechanisms for hypobaric hypoxia-induced bone loss. *Bone*, 2022, 154: 116258. doi: 10.1016/j.bone.2021.116258.
- [6] TERRIZZI A R, RUGOLO G, BOZZINI C, *et al.* Mandibular biomechanical behavior of rats submitted to chronic intermittent or continuous hypoxia and periodontitis. *Sleep Breath*, 2021, 25(1): 519-527. doi: 10.1007/s11325-020-02158-2.
- [7] KOHLER M, LEIBER F, WILLEMS H, *et al.* Influence of altitude on vitamin D and bone metabolism of lactating sheep and goats1. *J Anim Sci*,

- 2013, 91(11): 5259-5268. doi: 10.2527/jas.2013-6702.
- [8] USATEGUI-MARTÍN R, DEL REAL Á, SAINZ-AJA J A, *et al.* Analysis of bone histomorphometry in rat and guinea pig animal models subject to hypoxia. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 12742. doi: 10.3390/ijms232112742.
- [9] WANG X M, LIU H, LI J Y, *et al.* Rosamultin attenuates acute hypobaric hypoxia-induced bone injuries by regulation of sclerostin and its downstream signals. *High Alt Med Biol*, 2020, 21(3): 273-286. doi: 10.1089/ham.2019.0113.
- [10] LUKS A M, SWENSON E R, BÄRTSCH P. Acute high-altitude sickness. *Eur Respir Rev*, 2017, 26(143): 160096. doi: 10.1183/16000617.0096-2016.
- [11] BRENT M B, EMMANUEL T, SIMONSEN U, *et al.* Hypobaric hypoxia deteriorates bone mass and strength in mice. *Bone*, 2022, 154: 116203. doi: 10.1016/j.bone.2021.116203.
- [12] BOZZINI C, CHAMPIN G M, ALIPPI R M, *et al.* Static biomechanics in bone from growing rats exposed chronically to simulated high altitudes. *High Alt Med Biol*, 2013, 14(4): 367-374. doi: 10.1089/ham.2013.1038.
- [13] YAN C, WANG Z, LIU W, *et al.* Resveratrol ameliorates high altitude hypoxia-induced osteoporosis by suppressing the ROS/HIF signaling pathway. *Molecules*, 2022, 27(17): 5538. doi: 10.3390/molecules27175538.
- [14] ZHANG L, YIN Y, GUO J, *et al.* Chronic intermittent hypobaric hypoxia ameliorates osteoporosis after spinal cord injury through balancing osteoblast and osteoclast activities in rats. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1035186. doi: 10.3389/fendo.2023.1035186.
- [15] BOZZINI C, PICASSO E O, CHAMPIN G M, *et al.* Structural and material mechanical quality of femoral shafts in rats exposed to simulated high altitude from infancy to adulthood. *High Alt Med Biol*, 2016, 17(1): 50-53. doi: 10.1089/ham.2015.0105.
- [16] TEISSIER T, TEMKIN V, POLLAK R D, *et al.* Crosstalk between senescent bone cells and the bone tissue microenvironment influences bone fragility during chronological age and in diabetes. *Front Physiol*, 2022, 13: 812157. doi: 10.3389/fphys.2022.812157.
- [17] APARISI GÓMEZ M P, BAZZOCCHI A. Bone marrow and metabolic bone disease. *Semin Musculoskelet Radiol*, 2024, 28(5): 515-527. doi: 10.1055/s-0044-1788692.
- [18] XU J, HUANG Z, SHI S, *et al.* Glial maturation factor- β deficiency prevents oestrogen deficiency-induced bone loss by remodelling the actin network to suppress adipogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis*, 2024, 15(11): 829. doi: 10.1038/s41419-024-07234-z.
- [19] XIE L, CHENG Y, HU B, *et al.* PCLAF induces bone marrow adipocyte senescence and contributes to skeletal aging. *Bone Res*, 2024, 12(1): 38. doi: 10.1038/s41413-024-00337-5.
- [20] ZOU W, YANG S, ZHANG T, *et al.* Hypoxia enhances glucocorticoid-induced apoptosis and cell cycle arrest via the PI3K/Akt signaling pathway in osteoblastic cells. *J Bone Miner Metab*, 2015, 33(6): 615-624. doi: 10.1007/s00774-014-0627-1.
- [21] 《中国骨质疏松杂志》骨代谢专家组; 张萌萌, 马倩倩, 等. 骨代谢生化指标临床应用专家共识(2023修订版). *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(4): 469-476. doi: 10.3969/j.issn.1006-7108. doi: 10.3969/j.issn.1006-7108. Bone Metabolism Expert Group of 《Chinese Journal of Osteoporosis》; ZHANG M M, MA Q Q, *et al.* Expert consensus on clinical application of biochemical indicators of bone metabolism (2023 Revision). *Chin J Osteoporosis*, 2023, 29(4): 469-476. doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.
- [22] BADARY D M, GALAL H A, ABDELRAHEIM M H, *et al.* The combination of olive oil and *Lepidium sativum* improves the deleterious effects resulting from dexamethasone-induced osteoporosis in rats. *Eur J Med Res*, 2022, 27(1): 267. doi: 10.1186/s40001-022-00904-8.
- [23] MA Y L, CAIN R L, HALLADAY D L, *et al.* Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology*, 2001, 142(9): 4047-4054. doi: 10.1210/endo.142.9.8356.
- [24] CLARKE B L, KHOSLA S. Physiology of bone loss. *Radiologic Clinics of North America*, 2010, 48(3): 483-495. doi: 10.1016/j.rcl.2010.02.014.
- [25] DOMAZETOVIC V. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 2017, 14(2): 209-216. doi: 10.11138/ccmbm/2017.14.1.209.
- [26] LIESEGANG A, HÜTTENMOSER D, RISTELI J, *et al.* Influence of high-altitude grazing on bone metabolism of growing sheep. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2013, 97(1): 58-66. doi: 10.1111/j.1439-0396.2011.01242.x.
- [27] ZHANG Y B, ZHONG Z M, HOU G, *et al.* Involvement of oxidative stress in age-related bone loss. *J Surg Res*, 2011, 169(1): e37-e42. doi: 10.1016/j.jss.2011.02.033.

(2024-07-19收稿, 2024-10-24修回)

编辑 汤洁



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© 2024 《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*