

# 骨麟抗去势雌鼠骨质疏松研究

郑承杰 李洪洋 付乙 谭建三

**摘要** 切除8月龄雌性大鼠双侧卵巢后,皮下注射骨麟12周,与单纯卵巢切除组(OVX组)、假手术组(sham组)及口服尼尔雌醇组(E<sub>3</sub>组)比较,用骨生物力学、骨密度测量、骨形态计量学等方法对骨麟的药效进行综合评价。结果表明,与sham组比较,OVX组骨灰重、骨干重、骨钙含量及骨密度、抗弯力、骨小梁体积密度、宽度均明显降低,而成骨细胞指数和破骨细胞指数、尿羟脯氨酸则明显增高。骨麟和E<sub>3</sub>对上述指标有显著改善作用。

**关键词** 骨麟 卵巢切除 骨质疏松 骨生物力学 骨形态计量学

## Experimental study on anti-osteoporosis effect of clodronate in ovariectomized female Rats

Zheng Chengjie Li Hongyang Fu Yi and Tan Jiansan

Occupational diseases Prevention and Treatment Centre

West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041

**Abstract** In order to evaluate the anti-osteoporosis effect of clodronate in ovariectomized female rats, 44 female Wistar rats aged 8 months were divided randomly into 4 groups; a) simple ovariectomized the (OVX) group; b) sham-operated group; c) the E<sub>3</sub> group which were subjected to bilateral ovariectomy and treated on the next day with nilestriol 1mg/kg BW by gavage once a week for 12 weeks, and d) the clodronate group which were subjected to bilateral ovariectomy and treated on the next day with clodronate 5mg/kg BW by subcutaneous injection twice a week for 12 weeks. All the animals were sacrificed 12 weeks after the operation. The blood and urine samples were collected for determination of biochemical indices. The humeri and tibiae were prepared for determination of net weight, ash weight, calcium and phosphorus content, bone density, as well as bone histopathology and histomorphometry. The left femora were processed for bone anti-curve power. The results showed that as compared with the sham group, the net weight, ash weight, calcium content, density and bending resistance of bones, the trabecular bone volume and thickness were all significantly reduced in the OVX group, while its osteoblast index, osteoclast index and urine hydroxyproline content were obviously increased. In the E<sub>3</sub> group and the clodronate group, however, these indices were close to normal levels. The data indicated that clodronate and E<sub>3</sub> can all effectively prevent bone loss in ovariectomized female rats, and it seems that the effect of clodronate is stronger than that of nilestriol.

**Key words** Clodronate Ovariectomy Osteoporosis Bone biodynamics Bone histomorphometry

骨麟(clodronate)为骨吸收抑制剂,对肿瘤性骨质溶解具有较强的抑制活性<sup>[1]</sup>,且能有效抑制因雌激素缺乏所致的大鼠失骨<sup>[2]</sup>。为进一步了解骨麟的抗失骨作用,本文应用卵巢切除

大鼠,观察对骨质疏松的防治作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用药

尼尔雌醇(E<sub>3</sub>),上海第十二制药厂出品,批号940112,5mg/片;骨麟针剂,芬兰 Leiras oy公司生产,批号410502-0397,60mg/ml。

### 1.2 动物分组及处理

作者单位:610041 华西医科大学公共卫生学院病理教研室(郑承杰 李洪洋 谭建三)

610041 成都体育学院解剖教研组(付乙)

8月龄雌性 Wistar 大鼠 44 只,随机分为 4 组麻醉,每组 11 只:卵巢切除组(简称 OVX 组,开腹后切除双侧卵巢)、假手术组(简称 sham 组,开腹后关腹)、尼尔雌醇组(简称 E<sub>2</sub> 组)和骨磷组。E<sub>2</sub> 组去势术后次日起给与 E<sub>2</sub> 灌胃,剂量 1mg/kg,每周 1 次,共 12 周;骨磷组去势术后次日起皮下注射骨磷,剂量 5mg/kg,每周 2 次,共 12 周。各组均饲以常规饲料,自由饮水。术后 12 周行股动脉放血处死。

1.3 观察指标

(1)体重及子宫湿重

每周称动物体重一次。处死后从子宫与阴道交界处剪断,仔细分离出子宫,用 TN-100B 型托盘式扭力天平称湿重。

血及尿生化检测

(2)处死前 24 小时用代谢笼收集动物尿液。麻醉处死时由动物股动脉取血。用美国 Beckman 700 型自动生化仪、台湾标佳试剂测定血钙、血磷、血碱性磷酸酶(AKP)和尿钙、尿磷。用李立群等介绍的方法测定尿羟脯氨酸<sup>[4]</sup>。

(3)骨干重、灰重及骨灰钙、磷含量测定分离右肱骨,剥净软组织,放入坩锅中,烤干后称干重[1/(10 万)天平]。在电炉上炭化后置马福炉中 700℃6 小时,充分灰化在 1/(10 万)天平上称灰重。用钙电极法测量骨灰中钙元素含量;采用美国 Beckman 700 型自动生化仪、台湾标佳试剂测定骨灰中磷元素含量。

(4)骨生物力学测量

每组随机取 5 只动物,分离左股骨,除去软组织,置-20℃冰箱中。次日进行股骨三点弯曲

试验,仪器型号由福州华侨机电厂生产,精度±0.5%。骨抗弯力的最大负荷以牛顿(N)值表示。

(5)骨密度测量

每组随机取 5 只动物,采用美国 Lunar 公司生产的 DPX-L 骨密度仪测定右后肢骨密度(g/cm<sup>2</sup>)。测定条件为:扫描模式 slow;扫描区大小 60×30mm;电压 76kV;150mA。

(6)病理组织学检查及骨形态计量学测定

取各组大鼠左胫骨固定于 20%福尔马林液中 3~5 天后,用牙科电锯从矢状面剖开,暴露骨髓腔,近端制备常规脱钙骨组织蜡块,用日本产滑动式切片机切 3μm 厚切片,HE 染色。镜下观察骨组织形态改变,随机每组取 5 只动物骨切片采用方格测试系统测量骨小梁体积密度(Vr%)、骨小梁平均宽度(MTH,μm)、成骨细胞指数(OBI,个/mm)、破骨细胞指数(OCI,个/mm)。

1.4 统计学分析

参数均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,应用方差分析法比较其差异。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 体重及子宫湿重的变化

表 1 示出,各组动物给药后与给药前比较,体重均明显增加( $P<0.05$ ),但其增长率在各组间无显著性差异。OVX 组与 sham 组比较,子宫湿重显著减轻( $P<0.01$ )。骨磷组子宫湿重接近 OVX 组;E<sub>2</sub> 组子宫较 OVX 组显著增重,但显著低于 sham 组。

2.2 血及尿生化指标的变化

表 1 骨磷对去势雌鼠体重及子宫湿重的影响

组 别	动 物 (只)	动物体重变化(g)		体重增长率(%)	子宫湿重(g)
		给药前	给药后		
Sham	11	330.5±15.6	378.4±11.5 <sup>▲</sup>	12.7	0.63±0.07
OVX	11	341.7±14.6	379.0±16.2 <sup>▲</sup>	9.8	0.15±0.09 <sup>▲*</sup>
E <sub>2</sub>	11	327.1±8.9	357.5±10.3 <sup>▲</sup>	8.5	0.30±0.08 <sup>##</sup>
骨磷	11	341.6±14.4	374.1±16.3 <sup>▲</sup>	8.8	0.18±0.09 <sup>##</sup>

▲:各实验组给药前后体重比较  $P<0.05$ ; \* : sham 组比  $P<0.01$ ; ## :与 OVX 组比  $P<0.01$ ; ++ :与 E<sub>2</sub> 组比  $P<0.01$

结果见表 2。除 E<sub>2</sub> 组血磷明显低于 OVX 组( $P<0.05$ )外,其它各组血钙、磷、AKP 及尿

钙、磷均无显著性差异。OVX 组尿羟脯氨酸含量明显高于 sham 组, 而 E<sub>2</sub> 和骨麟组则明显低

表 2 骨麟对去势雌鼠血尿生化指标的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物(只)	血钙 (mg/dL)	血磷 (mg/dL)	血 ALP (U/L)	尿钙 (mg/dL)	尿磷 (mg/dL)	尿羟脯氨酸 (mg/dL)
sham	7	7.0 ± 1.2	8.7 ± 1.1	21.1 ± 11.5	31.3 ± 10.0	105.7 ± 208.3	0.33 ± 0.08
OVX	7	7.8 ± 1.5	8.9 ± 0.8	1.1 ± 1.7	62.4 ± 10.2	323.0 ± 100.0	0.45 ± 0.12*
E <sub>2</sub>	8	7.4 ± 1.5	9.2 ± 1.1	10.1 ± 11.1	49.3 ± 11.2	469.4 ± 137.4	0.31 ± 0.18**
骨麟	8	7.7 ± 1.9	6.7 ± 1.7	7.3 ± 8.6	78.8 ± 57.1	373.5 ± 224.7	0.30 ± 0.09***

\*: 与 sham 组比  $P < 0.05$ ; \*\*: 与 sham 组比  $P < 0.01$ ; #: 与 OVX 组比  $P < 0.05$ ; ##: 与 OVX 组比  $P < 0.01$

### 2.3 骨干重、灰重及骨灰钙、磷含量的变化

结果见表 3。右肱骨干重与体重之比, OVX 组明显低于 sham 组, 而 E<sub>2</sub> 组及骨麟组则明显高于 OVX 组。骨灰重与体重之比, OVX 组较

sham 低, 但无显著性变化, 而骨麟组明显高于 OVX 组。OVX 组骨钙含量, 明显低于 sham 组, E<sub>2</sub> 组及骨麟组明显高于 OVX 组。

表 3 骨麟对去势雌鼠右肱骨干重、灰重及骨灰钙、磷含量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物(只)	右肱骨重(mg)	右肱骨灰重(g)	右肱骨灰重(体千g)	骨钙 (mg/g 骨)	骨磷 (mg/g 骨)
sham	8	8.4 ± 0.4	7.2 ± 0.5	0.85 ± 0.06	297.0 ± 44.99	514.6 ± 45.5
OVX	8	7.1 ± 0.4	6.4 ± 0.3	0.90 ± 0.09	253.8 ± 18.61*	502.3 ± 15.5
E <sub>2</sub>	8	8.0 ± 0.5	7.5 ± 0.3	0.93 ± 0.11	294.5 ± 14.31***	519.6 ± 53.6
骨麟	8	8.1 ± 0.6	7.3 ± 0.5	0.90 ± 0.08	300.7 ± 16.30***	529.8 ± 49.8

\*: 与 sham 组比  $P < 0.05$ ; \*\*: 与 sham 组比  $P < 0.01$ ; #: 与 OVX 组比  $P < 0.05$ ; ##: 与 OVX 组比  $P < 0.01$

### 2.4 骨密度及骨生物力学测量

结果见表 4。与 sham 组相比, OVX 组右胫骨骨密度及左股骨抗弯力均减少约 20% 以上, E<sub>2</sub> 组及骨麟组骨密度及抗弯力明显大于 OVX 组, 并接近 sham 组水平。

表 4 骨麟对去势雌鼠右胫骨骨密度及左股骨抗弯力的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物(只)	右胫骨骨密度 (g/cm <sup>3</sup> )	左股骨抗弯力 (N)
sham	5	0.179 ± 0.009	113.3 ± 15.5
OVX	5	0.156 ± 0.007*	85.96 ± 19.7
E <sub>2</sub>	5	0.174 ± 0.009**	109.88 ± 27.3
骨麟	5	0.172 ± 0.013*	113.2 ± 11.62*

\*: 与 sham 组比  $P < 0.05$ ; \*\*: 与 sham 组比  $P < 0.01$ ; #: 与 OVX 组比  $P < 0.05$ ; ##: 与 OVX 组比  $P < 0.01$

### 2.5 骨病理组织学检查及骨形态计量学测定结果

OVX 组左胫骨病理组织学检查可见骨小梁明显减少、变细, 有的显纽扣样改变(图 1); 骨小梁表面成骨细胞及破骨细胞均可见增生活跃, 而 E<sub>2</sub> 组及骨麟组的骨小梁病理学检查所见则与 sham 组结构类似(图 2, 3, 4)。

骨形态计量学测定, OVX 组与 sham 组比较, 骨小梁体积密度下降约 50%, 骨小梁平均宽度也明显减少( $P < 0.01$ )。E<sub>2</sub> 组及骨麟组的骨小梁体积密度均明显高于 OVX 组( $P < 0.01$ ), 几乎接近 sham 组水平。E<sub>2</sub> 组骨小梁宽度明显大于 OVX 组( $P < 0.05$ )。骨麟组骨小梁宽度也有所改善。OVX 组 OBI 和 OCI 均高于其余三组, 其中 OCI 改变尤为显著, 为其余三组的 2~3 倍; 其余三组 OBI 和 OCI 改变无明显差别(表 5)。



图1 OVX组:胫骨骺板下区骨小梁大量消失,髓腔中残留棒状或纽扣样骨小梁结构 (HE, 1·)



图3 骨龄组:胫骨骨量接近正常水平。(HE, 4·)



图2 sham组:胫骨正常小梁结构。(HE, 1·)

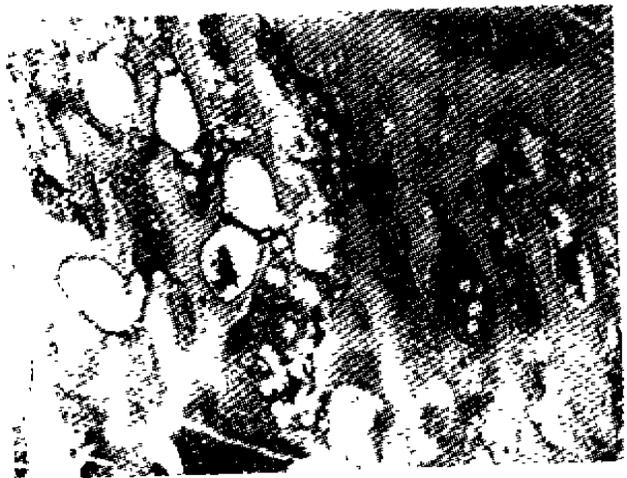


图4 E1组:与OVX组比较,胫骨小梁明显增多。(HE, 4·)

表 5 骨麟对去势雌鼠左胫骨形态计量学的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物 (只)	骨小梁体积密度 ( $V_r, \%$ )	骨小梁平均宽度 (MTH, $\mu\text{m}$ )	成骨细胞指数 (OBI, 个/mm)	破骨细胞指数 (OCL, 个/mm)
sham	5	40.8 ± 8.7	36.5 ± 1.8	55.0 ± 17.5	1.23 ± 1.64
OVX	5	17.2 ± 4.7**	28.8 ± 8.8*	69.9 ± 15.6*	3.37 ± 1.51*
E <sub>3</sub>	5	38.0 ± 8.1**	41.3 ± 4.5 <sup>#</sup>	53.0 ± 8.7	1.21 ± 0.58 <sup>#</sup>
骨麟	5	37.6 ± 9.3 <sup>#</sup>	37.8 ± 6.3	58.2 ± 13.5 <sup>#</sup>	1.08 ± 0.62 <sup>#</sup>

\*: 与 sham 组比  $P < 0.05$ ; \*\*: 与 sham 组比  $P < 0.01$ ; #: 与 OVX 组比  $P < 0.05$ ; ##: 与 OVX 组比  $P < 0.01$

### 3 讨论

8 月龄健康雌性大鼠切除双侧卵巢后, 由于雌激素缺乏而导致骨量丢失, 是研究绝经后骨质疏松最常用的动物模型。该模型与人类绝经后骨质疏松特征基本相似, 表现为骨矿含量减少, 骨小梁体积密度及骨小梁宽度下降, 股骨抗弯力明显下降。而成骨细胞指数和破骨细胞指数明显增加, 尤以破骨细胞指数增加更显著, 并与尿羟脯氨酸含量升高相一致, 高转换型骨质疏松的特点<sup>[4]</sup>。病理上又称之为活动性骨质疏松(active osteoporosis)<sup>[5]</sup>。尼尔雌醇(E<sub>3</sub>)已被证实通过抑制过高的骨转换而防止去势雌鼠的骨流失效应<sup>[6]</sup>。

骨麟是国外 80 年代产品, 亲骨性强, 在骨内半衰期可达数年之久, 它对骨瘤相关的高钙血症具有治疗作用, 还可抑制肿瘤性溶骨及由 Walker 瘤引起的骨吸收, 此外对去势雄鼠、雌鼠的失骨具有预防作用<sup>[1,2,7,8]</sup>。本实验结果表明, 骨麟能有效预防去势雌鼠的骨丢失, 与国外文献报道一致。其作用与 E<sub>3</sub> 类似, 且在抑制破骨细胞数量及活性、提高骨灰重和骨钙含量以

及提高骨生物力学性能等方面似优于 E<sub>3</sub>, 并对动物子宫无刺激效应。因此可作为临床上预防和治疗绝经后骨质疏松的有效药物。

### 参 考 文 献

- 1 Andre Jung, Jacqueline Bornand, Bernadette Mermillod et al. Inhibition by diphosphonates of bone resorption induced by the Walker tumor of the rat. *Cancer Research*, 1984 Jul; 44: 3007—3011
- 2 Gregory Seedor J, Quartuccio HA and Thompson DD. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1991; 6(4): 339—346
- 3 上海市医学化验所主编. 临床生化检验(上册). 第二版, 上海科技出版社, 1982 年 5 月: 95
- 4 李洪洋, 谭建三和张银柱等. 去势雌鼠骨质疏松模型研究. *现代预防医学*, 1992; 19(1): 5—7
- 5 Kissane JM. *Anderson's Pathology*. 9th ed. 2Vol. Toronto 1990; 1958—1965
- 6 刘宏伟, 李洪洋, 杨式之等. 尼尔雌醇预防大鼠卵巢切除后骨质疏松. *华西医学报*, 1993; 24(1): 40—44
- 7 Robert S Witte, Jim Koeller, Thomas E. et al. Clodronate—a randomized study in the treatment of cancer-related hypercalcemia. *Arch Intern Med*, 1987 May; 147: 937—939
- 8 Wink S, Onge M. St and Parker B. The effects of dichloromethylene bi-phosphonate on osteoporotic femora of adult castrate male rats. *Acta Anat*, 1985; 124: 117—121

### 国 际 会 议 消 息

1. 日本第二届国际骨质疏松研讨会 日本·大阪·1997 年 11 月 13—16 日
2. 骨质疏松症、骨病与社会经济发展研讨会 比利时·列日市·1997 年 12 月 4—6 日
3. 美国骨矿研究第 19 届年会 美国俄亥俄州辛辛那提市·1997 年 9 月 10—14 日
4. 韩国 Oak Valley 骨研讨会 韩国 Oak Valley, 1998 年 6 月 26—28 日
5. 欧洲第六届国际骨质疏松研讨会 德国·柏林·1998 年 9 月 11—15 日
6. 中国第三届国际骨质疏松研讨会 中国·西安·1999 年 3 月 21—26 日

上述国际会议大会组委会中方秘书处 中国北京民族饭店 3525 房间 朱松代先生  
邮编 100031 电话(010)66063048, (010)66014466~3525, Fax(010)66063048