

骨质疏松药物研究指南(美国-FDA)的方案简介 附去卵巢模型及联合用药

李青南 梁念慈 胡 彬 李朝阳 吴 铁 张志平

目前仍未有理想的防治骨质疏松的药物,各国研究骨质疏松的学者都在致力于这方面的工作,用什么标准来评价新的药物,是一个很重要的问题。现将美国食品药品监督管理局(FDA)的方案介绍如下。

美国FDA的指南:Guidelines for Preclinical and Clinical Evaluation of Agents Used in the Prevention and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis: Draft (1994),提出对于新的骨质疏松药物,需做临床前的动物实验来检测其有效性和安全性。此文主要讨论骨的新药的临床前实验。在FDA指南中提出检测新药的目的是看此药对骨质量(bone quality)的影响,骨质量包括骨的结构、骨量和骨的强度。FDA指南认为只有动物实验能提供可能性来直接检测骨的这三方面参数。

FDA认为目前没有一种动物模型能复制人类骨质疏松的所有特性,因而提出必须同时进行二种不同种类动物实验,一种是去卵巢大鼠,以观察骨建造;另一种是非啮齿类的动物模型,如猪、狗、猴,以观察骨的再建。原因是大鼠只有骨建造,而不像人类骨组织那样具有哈佛氏系统,因而需要非啮齿类的动物来研究骨再建问题。

去年在美国爱达荷州太阳谷召开第27届国际硬组织研讨会,会上专门用了一个单元讨论了FDA对动物模型的要求。现将FDA指南的提纲和讨论的结果总结如下。

1 主要目的

临床前的研究须显示长期应用测定的新药不会引起骨质量的损害。骨的质量被认为由三方面组成:骨结构、骨量、骨强度。动物研究是能直接检测这三个因素,因而新药的动物实验研究是必不可少的。

2 实验设计

(1) 实验起始时间:要考虑目的是预防或治疗。作为预防实验,给药在动物去卵巢(OVX)后就开始,以预防OVX诱导的骨丢失;治疗实验,给药须在OVX已诱导了骨质疏松开始后,恢复(Restore)OVX所致的骨丢失。

(2) 治疗的计划:要考虑是持续的还是间断的。根据药物的自身的特性来决定。

(3) 剂量:用对某种动物最适合的剂量和5倍于适合的剂量,以显示其安全性。

(4) 时间:在大鼠为12个月,灵长类为16个月,这相当于人类的4年骨的变化。

讨论认为:动物实验的结果是希望知道新药短期内对大鼠的影响,并知道何时达到新的稳定阶段,而以上的时间相当人类4年骨的变化。

3 动物模型

要求二个种类:大鼠(骨建造);大动物(骨再建)。各类又可分为两种模型:

(1) 加速骨丢失的模型:如去势的雄大鼠,急性切除卵巢的雌大鼠(骨建造);哺乳期的猪及去卵巢的灵长类(骨再建)。

(2) 降低骨形成的模型:如老年大小鼠及糖皮质激素处理的大鼠(骨建造),老龄的狗或糖皮质激素处理的猪(骨再建)。

讨论认为:是否需要用大动物作为必须的

模型仍有争议。有文献报道^[1]大鼠也有骨再建,因而认为大鼠是一种很有用的人类骨质疏松模型,并能引起类似人类骨骼的损坏。去卵巢大鼠是较好的动物模型(后面章节详细介绍)。

4 骨转化的生化指标

(1) 至少要测量一种骨吸收的指标和一种骨形成的指标。

(2) 骨吸收的指标:尿吡啶交联产物(urinary pyridinium cross-links),显示胶原蛋白分解状况

(3) 骨形成的指标:血清热不稳定碱性磷酸酶(serum heat-labile alkaline phosphatase),鼓励测量骨钙素(osteocalcin)。

讨论认为:去卵巢诱导的骨质疏松多限制在松质骨,全身测量的生化指标的敏感性值得考虑。

5 骨质/密度测量

以下方法都能监测动物骨骼的变化

- (1) 骨灰重
- (2) 单光子骨密度仪
- (3) 双光子骨密度仪
- (4) 双能 X 线骨密度仪(DEXA)
- (5) 定量 X 线断层照相术(QCT)

讨论认为:DEXA 用于临床较好。考虑 QCT 的参数是否能用于计算转动惯量(moment of inertia)和抵抗惯量(moment of resistance),预测骨强度的变化。

6 骨结构和骨组织的分析

(1) 建议测破骨细胞的抗酒石酸酸性磷酸酶

- (2) 光学显微镜
- (3) 偏振光显微镜
- (4) 四环素荧光标记骨组织形态学分析(动态参数)

讨论认为:应重视其他形态学的参数:类骨质、编织骨、松质骨、密质骨、骨的结构、密质骨中小孔、吸收表面、成骨细胞、破骨细胞等。

7 骨强度的生物力学测定

- (1) 弯曲(bending);三到四个点为好
- (2) 扭转(torsion);通常测长骨

(3) 压缩(compression);常用于椎骨

讨论认为:还应该增加股骨颈的检测以及其他易引起骨折的部位的测定。

OVX 大鼠的模型已被公认为“gold standard”模型,这种由于雌激素减少所致大鼠的骨质疏松与人类绝经后的骨量丢失有许多相似之处^[2]:(1)骨高转化率,表现为骨吸收超过骨形成;(2)OVX 早期出现骨量的快速丢失阶段,然后进入缓慢丢失阶段;(3)松质骨的骨量丢失远远大于密质骨;(4)降低肠钙的吸收;(5)肥胖可预防少量的骨量丢失;(6)对一些药物有相同的骨骼反应,如雌激素、二磷酸盐类药物、PTH、降钙素和锻炼。国外已有大量的文献^[3~15]报道 OVX 引起骨高转化的改变。

骨骼分为松质骨和密质骨:松质骨只占全身骨的 20%,存在于各骨的中央区,含有骨髓。而密质骨则占全身骨量的 80%,存在于所有骨的外壳。常用胫骨作为测量骨。

大鼠 OVX 引起松质骨骨高转化,在骨组织形态计量学测量中表现为:

骨小梁面积减少、骨小梁的构造变差。骨吸收和骨形成的同时增加,其参数表达如下:

静态指标:

- 骨小梁面积百分率(%Tb. Ar)
- 骨小梁宽度(Tb. Wi)
- 骨小梁数量(Tb. N)
- 骨小梁分离度(Tb. Sp)

动态指标:

- 骨形成的参数:
- 四环素荧光标记百分率(%L. Pm)
- 骨矿化沉积率(MAR)
- 骨形成率(BFR)
- 类骨质百分率(%O. Pm)
- 骨吸收的参数:
- 骨吸收周长百分(%Er. Pm)
- 骨的激活频率升高;activation frequency (骨再建单位(BRUs)形成率被称为 activation frequency)

人出生时所形成的骨是初级形式,随着年龄的增长,骨骼也会出现衰老和微损伤,因而,

像其他组织器官一样,骨骼也具有自我更新的特性。这种将不成熟的和衰老的骨骼更新的过程,是由骨吸收和后续的新骨形成的过程而完成的。这个过程称为:激活(A)—吸收(R)—形成(F),也称为骨再建。它能产生和维持骨的生物力学和代谢的完整性。在人的一生中骨再建是不停止的。在松质骨,骨小梁发生的骨再建,骨量随着年龄的增长而减少,因为骨吸收造成一些骨小梁的穿孔和丢失,使A—R—F过程不能偶联,也无骨表面来完成后续的骨形成。在人类松质骨随着年龄的增长有一个自然丢失的过程,而OVX则在短期内加速这个丢失,造成骨质疏松。在密质骨,内膜面骨丢失;而骨外膜面有少量的增加而补偿了内膜面的骨丢失。

大鼠OVX诱导骨质疏松模型的手术很容易,松质骨骨质疏松出现快,有文献报道^[17]最短出现的时间为15天。对于活体动物实验来说,此模型非常适用。我室重复此模型多次均获满意的结果,与国外报道相符^[18-19],但OVX诱导密质骨的疏松还不尽人意^[16-19],基本不引起骨丢失。

密质骨观察指标如下:

(1) 静态指标:

胫骨横断组织总面积(T. Ar)

骨髓腔面积(Mr. Ar)

密质骨面积(Ct. Ar)

%Ct. Ar 和 %Mr. Ar

(2) 动态指标:

① 骨外膜:

四环素荧光标记百分率(%L. Pm)

矿化沉积率(MAR)

骨形成率(BFR)

② 骨内膜:

四环素荧光标记百分率(%L. Pm)

矿化沉积率(MAR)

骨形成率(BFR)

类骨质百分率(%O. Pm)

骨吸收周长百分率(%Er. Pm)

由于密质骨的变化是由内外两方面因素所决定的,因而其静态指标中的百分率(%Ct. Ar, %Mr. Ar)没有很大的意义,而绝对值则显得很重要。因此对密质骨的分析要注意其内膜和外膜都有变化的特点,一定要注意绝对值的变化(T. Ar, Mr. Ar, Ct. Ar)。如要建立密质骨的骨质疏松模型可考虑其他方法,如用维甲酸、糖皮质激素、羟基脲等药物所致的骨质疏松模型,可出现密质骨的骨量丢失。

8 应用OVX模型进行骨质疏松药物研究的一些策略

目前用于骨质疏松的药物分为两大类:

(1) 合成代谢类药(Anabolic agents): PGE₂, PTH等,停药后,不能维持原有的骨量,骨量快速丢失。而长期使用有非常严重的副作用。

(2) 抗骨吸收类药物(Anti-resorption drugs):

雌激素(Estrogen):需长期用药,但停药后,骨量快速丢失。

二磷酸盐类药物(Bisphosphonate):是一类非常有效的抗骨吸收类药物,由于它的高亲和力,停药后仍能维持相当长的一段时间。

但有人认为:长期抑制骨吸收——→导致无后续骨形成,解偶联(uncoupling)的结果是可保持原有的骨,但无骨的更新,出现骨的老化,骨的微损伤及停止骨重建,骨慢慢老化,脆性增加,骨的质量不高。因而有人采用一些策略来使用此类药。

(1) 用一周,停三周,再重复(1W on, 3W off, repeat)^[20]。

(2) 用60天,停90天(60 days on, 90 days off)^[11]。

(3) 用80天,停180天(80 days on, 180 days off)^[21]。

Dr. Webster SS Jee 提出如下概念^[22]:

(1) ARM 或 LRM

ARM

化>健康对照组,从而提示血清钙含量从中年期(老年前期)开始有明显降低,并随年龄增长而降低明显的趋势,尤其以脑梗塞组更明显,支持脑梗塞及动脉硬化与钙在动脉壁内沉积有关的论点。

骨矿物质主要成分是钙,故又称骨钙。人体中钙元素的99%以上存在于骨骼中,主要用于人体的骨骼的物理强度,而且与循环中可溶性钙保持动态平衡,严格控制细胞外和血液中钙离子浓度的平衡。其余主要分布于细胞外液,其中45%与血浆蛋白结合,为非扩散钙,游离型钙可以扩散,是发挥生理效应部分^[2]。中老年人由于生理机能逐渐衰退,性激素降低,肠道对钙的吸收减少等原因使血钙水平降低,进而激发甲状旁腺素分泌增多,使骨溶解过程加速而致骨质疏松和高钙血症在软组织内沉积^[1]。本研究结果显示,脑梗塞组和动脉硬化组骨密度含量明显低于健康对照组,各组中,老年组又低于老年前期组,且骨密度含量随血钙降低而降低(呈正相关),与上述变化规律一致。

血钙之所以能经常恒定在正常水平,主要靠甲状旁腺激素、维生素D的活性代谢产物及降钙素等对钙的吸收、排泄和骨转换的综合作用,而血清钙浓度又是调节甲状旁腺机能的主要因素,当血钙过低时,刺激甲状旁腺增生和促

进甲状旁腺素分泌,抑制降钙素的合成和分泌,使骨钙向血钙转移,骨密度含量降低,血钙升高;同时由于破坏了细胞膜的稳定性,使胞外 Ca^{2+} 进入胞内,胞内线粒体钙库释放,使胞内 Ca^{2+} 浓度升高,结果导致或加重脑损伤、动脉硬化、高血压、骨质疏松、冠心病、老年性和血管性痴呆^[3,5,6]。

综合上述,血钙降低是关键环节,因此对老年人采用增加钙质摄入及促进钙质吸收,可消除或防止缺钙,扭转钙负平衡,以降低甲状旁腺素分泌,减慢以致制止骨钙丢失,达到增加骨密度、降低血钙的目的。本研究为应用钙剂和维生素D₃防治动脉硬化、骨质疏松及心脑血管病提供了理论依据。

参 考 文 献

- 1 王新德. 脑血管疾病分类草案. 中华神经精神科杂志, 1988, 21(1): 59~60
- 2 赵玉堂主编. 骨矿与临床. 第一版. 济南: 黄河出版社, 1995, 113, 167, 173, 304~306页
- 3 Khachaturian Z, PhD. Calcium and the aging brain. Geriatrics, 1991, 46(11): 78~83
- 4 郭成浩, 康德仁. 钙代谢与 Alzheimer 氏病. 国外医学神经病学神经外科学分册, 1995, 22(4): 197~199
- 5 林兆香, 戴自英主编. 实用内科学(下册). 第七版. 北京: 人民卫生出版社, 1981, 2424页
- 6 朱宪彝主编. 内科讲座—内分泌系统疾病. 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 1984, 232~233页

(上接第78页)

- 15 Thompson D D et al. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. Bone 1995 Vol. 17, No. 4S 125S-133S
- 16 Li Qing-Nan, Liang Nian-ci et al. Effects of total coumarins of *Fructus cordii* on skeleton of ovariectomized rats 中国药理学报(英文版)1994 15(6): 528-532
- 17 李朝阳, 黄连芳, 李青南, 林相云. 尼尔雌醇对去卵巢大鼠骨代谢影响的定量研究. 中国老年学杂志, 1996, 16(4): 227-229
- 18 Carl Christian Danielsen, Lis Mosekilde, and Birgit Svenstrup. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. Calcif Tissue Int 1993 52: 26-33
- 19 Pan Z, et al. Intermittent treatments of PGE₂ plus risdrionate and PGE₂ alone are equally anabolic on tibial shaft of OVX rats. Bone. 1995 Vol. 17, No 4 s 291s-296s
- 20 Q. N. Li, W. S. S. Jee, et al. Risedronate pretreatment does not hamper the anabolic effects of PGE₂ in OVX rats. Bone. 1995 vol. 17, No 4 s 261s-266s
- 21 Wronski T J, L. M. Dann, et al. Skeletal effects of withdrawal of estrogen and diphosphonate treatment in ovariectomized rats. Calcif. Tissue Int. 1993 53: 210-216
- 22 Jee W S S, Y. F. Ma and S. Y. Chow. Maintenance therapy for added bone mass or how to keep the profit after withdrawal of therapy of osteopenia. Bone. 1995 Vol. 17, No 4s 309s-319s