

依普拉芬和雌激素对实验性骨质疏松作用的初步观察

韦永中 陶松年 杨国平 包丽华

【摘要】目的 探讨依普拉芬和雌激素对绝经后骨质疏松症的防治作用。**方法** 将SD雌性大鼠32只随机分为4组,每组8只,Ⅰ组:假手术组(Sham),Ⅱ组:切除卵巢组(OVX),Ⅲ组:切除卵巢加雌激素组,Ⅳ组:切除卵巢加依普拉芬组。术后12周测定腰椎、股骨的骨密度;停药12周(即到术后24周)再行腰椎、股骨的骨密度测定及组织形态图像分析。**结果** 术后12周Ⅱ组大鼠体重增加明显与其他组差异有显著性($P < 0.01$),Ⅲ、Ⅳ两组之间无显著性差异。术后24周Ⅲ、Ⅳ两组体重增加明显,与Ⅰ组、Ⅱ组体重增加相比差异有显著性($P < 0.05$)。术后12周Ⅱ组腰椎、股骨骨密度下降明显,与Ⅲ、Ⅳ组差异有显著性($P < 0.01$);术后24周,Ⅲ组骨密度下降明显,Ⅳ组无显著下降,两者之间差异有显著性($P < 0.01$);组织形态图像分析示Ⅳ组椎骨骨小梁面积增加,百分比增加,与Ⅱ组、Ⅲ组差异有显著性($P < 0.001$)。Ⅲ组、Ⅳ组股骨皮质骨厚度增加,骨小梁面积及百分比增加与Ⅱ组差异有显著性($P < 0.001$)。**结论** 依普拉芬和雌激素能有效地防止去势后大鼠的骨量丢失。依普拉芬有抑制骨吸收,又有促进骨形成的作用;其作用机理不同于雌激素。

【关键词】 骨质疏松症; 依普拉芬; 雌激素类

Effect of ipriflavone in experimental osteoporosis: a comparison with estrogen WEI Yongzhong, TAO Songnian, YANG Guoping et al. Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China.

【Abstract】Objective To evaluate the effect of ipriflavone and estrogen on postmenopausal osteoporosis. **Methods** 32 female SD rats were allocated randomly into four groups. Group I underwent sham operation (sham); group II was ovariectomized (OVX); group III received OVX + nilestriol and group IV received OVX + ipriflavone 7 days after operation, group III was given nilestriol. Group IV was given ipriflavone 12 weeks after operation, bone mineral density (BMD) of each group was measured 24 weeks after operation, BMD measurement and microdensitometrical analysis of each group were made. **Results** BMD increased in groups III and IV, with significant differences, compared with group II ($P < 0.01$) 12 weeks after operation 24 weeks after operation, BMD of group III decreased obviously but group IV did not. Microdensitometrical analysis indicated that lumbar trabecular area and percentage of group IV increased with significant differences, compared with group II ($P < 0.01$); femur cortical thickness and trabecular area and percentage of groups III and IV increased, with significant differences, compared with group II ($P < 0.001$). **Conclusions** Both ipriflavone and estrogen are effective in preventing and treating osteoporosis induced by ovary excision. Ipriflavone not only depresses bone resorption, but also promotes bone formation. The mechanism of ipriflavone is different from that of estrogen.

【Key words】 Osteoporosis; Ipriflavone; Estrogens

和绝经有关的骨量加速丢失,进而发展为绝经后骨质疏松日益受到重视,激素替代疗法防治绝经后骨质疏松已得到人们的肯定。但其存在一定的适应症和禁忌症。有关其防治的研究尚需进一步深入。依普拉芬是异黄酮衍生物,为7-异丙氧基异黄酮,它在动物和人体中均没有雌激素活性,但能增加雌激素的活性。尚未正式用于国内临床。作者在建

立绝经后骨质疏松模型的基础上,对其和雌激素的作用作了对比性评估。

材料和方法

1. 实验动物及模型制备:将32只雌性3月龄SD大鼠,体重(200 ± 15.19)g随机分为4组,组间大鼠的体重无统计学差异。Ⅰ组为假手术组,Ⅱ组为去除卵巢组,Ⅲ组为切除卵巢加雌激素组,Ⅳ组为切除卵巢加依普拉芬组。每组均为8只。所有大鼠均

作者单位:210029 南京医科大学一附院骨科(韦永中、陶松年),动物实验中心(杨国平),骨密度测定室(包丽华)

以3%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔内注射麻醉,除 I 组单纯开腹术外,其余 3 组均行去势术(切除双侧卵巢),置于恒温(18~20℃)分笼饲养(每笼 4 只)。饲料为标准饲料,动物及饲料均来自江苏省实验动物中心。

2. 用药:实验用药依普拉芬为依普拉芬(Ipriflavone),由武汉滨湖制药厂生产,雌激素为尼尔雌醇(Nilestriol),上海华联制药有限公司生产。术后 1 d 起各治疗组大鼠用药,所有药物制成混悬液,灌胃,摄完药液前停止供水,剂量 III 组尼尔雌醇片 1 mg·kg⁻¹·w⁻¹, IV 组依普拉芬片 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹。用药时间为术后 12 周,然后停药 12 周(即到术后 24 周),分别称重。

3. 骨密度测定:用 3% 戊巴比妥钠 35 mg/kg 腹腔内注射麻醉后用细线将四肢伸直,固定于特制的铁框上,置于双能 X 线吸收骨密度测定仪(Lunar 公司)测定腰椎、股骨骨密度,分别于术后 12 周及术后 24 周测定 2 次。测定时避免射线接触铁框。

4. 组织形态图像分析:术后 24 周处死大鼠后,取其腰椎、股骨,剔除其软组织用甲醛固定,经脱钙,

脱水后,石蜡包埋,切片,HE 染色,置于低倍视野下,以 LEICA Q500MC 图像分析仪观察椎骨的骨小梁,股骨的皮质骨厚度、股骨骨小梁,并测定每一视野下骨小梁面积及其百分比。

皮质骨厚度(μm) = 内骨板至外骨板的垂直距离

骨小梁面积(μm²) = 每个低倍视野下骨小梁面积

百分比 = $\frac{\text{骨小梁面积}}{\text{低倍视野下截面总面积}} \times 100\%$ (代表骨小梁密度)

5. 统计学处理:各组大鼠参数均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用方差分析法, *t* 检验, *P* < 0.05 被认为有显著性。

结 果

1. 大鼠体重变化(表 1)

实验开始时各组大鼠体重无统计学差异,术后 12 周去势组大鼠体重增加明显,与其他组差异有显著性(*P* < 0.01), III、IV 两组之间差异无显著性。术后 24 周 III、IV 两组体重增加明显,与 I 组、II 组体重增加相比有统计学意义(*P* < 0.05)。

2. 骨密度测定结果(表 2)

表 1 各组大鼠手术前后体重比较($\bar{x} \pm s$)

项目	I	II	III	IV
样本数(n)	8	8	8	8
BW1(g)	200.00 ± 9.26	220.00 ± 21.60	221.20 ± 18.05	205.00 ± 10.10
BW2(g)	216.70 ± 15.20	305.00 ± 25.10**	238.70 ± 16.40	248.60 ± 23.40
BW3(g)	245.50 ± 21.20	343.00 ± 15.25	318.00 ± 25.80*	304.00 ± 23.00*

注:BW1 - 术前体重, BW2 - 术后 12 周体重, BW3 - 术后 24 周体重

** 与其他各组比较 *P* < 0.01, * 与其他各组体重增加比较 *P* < 0.05

表 2 各组大鼠术后 12、24 周腰椎、股骨骨密度($\bar{x} \pm s$)

项目	I	II	III	IV
样本数(n)	8	8	8	8
BMD1(g/cm ²)	0.261 ± 0.016	0.226 ± 0.016**	0.242 ± 0.021	0.247 ± 0.013
BMD2(g/cm ²)	0.252 ± 0.012	0.233 ± 0.013	0.226 ± 0.026*	0.241 ± 0.029
BMD3(g/cm ²)	0.301 ± 0.019	0.252 ± 0.016**	0.315 ± 0.030	0.305 ± 0.039
BMD4(g/cm ²)	0.335 ± 0.010	0.303 ± 0.014	0.300 ± 0.019*	0.320 ± 0.023

注:与其他各组比较 ** *P* < 0.01, 与其他各组骨密度下降比较 * *P* < 0.05

BMD1 为术后 12 周腰椎骨密度, BMD2 为术后 24 周腰椎骨密度, BMD3 为术后 12 周股骨骨密度, BMD4 为术后 24 周股骨骨密度

术后 12 周腰椎骨密度以 II 组下降最为明显, II 组与 I、III、IV 组之间差异有显著性(*P* < 0.01), 而 III 组、IV 组之间差异无显著性(*P* > 0.05); 术后 24 周, III 组骨密度下降最为明显, IV 组无明显下降。

术后 12 周股骨骨密度 II 组下降最明显, 与其他组间差异有显著性(*P* < 0.01), 而 III、IV 组差异无显

著性; 术后 24 周, III 组骨密度下降明显, IV 组有轻度升高。

3. 组织形态图像分析(表 3)

II 组椎骨骨小梁面积减少, 百分比降低, III 组与 II 组间差异无显著性, IV 组椎骨骨小梁面积增加, 百分比增加, 与 II 组、III 组差异有显著性(*P* < 0.001);

Ⅲ组、Ⅳ组股骨皮质骨厚度增加,骨小梁面积及百分比增加与Ⅱ组差异有显著性($P < 0.001$)。

表3 各组大鼠术后24周骨小梁面积、百分比、皮质骨厚度比较($\bar{x} \pm s$)

项目	I	II	III	IV
样本数(n)	8	8	8	8
椎骨骨小梁面积(μm^2)	45811.25 ± 61.23	38323.48 ± 65.71	39040.12 ± 89.72	47111.18 ± 79.48*
百分比	30.97 ± 1.07	25.91 ± 0.41	26.39 ± 1.10	31.01 ± 1.25*
股骨皮质骨厚度(μm)	66.31 ± 2.23	50.80 ± 1.50	55.08 ± 0.91*	56.98 ± 1.61*
股骨骨小梁面积(μm^2)	24155.90 ± 49.31	16375.93 ± 39.28	28940.33 ± 70.10*	31917.53 ± 67.43*
百分比	16.32 ± 1.03	11.07 ± 0.97	19.58 ± 2.10*	21.19 ± 2.37*

注:与Ⅱ组比较 * $P < 0.001$

讨 论

双侧卵巢去势形成绝经后骨质疏松模型已在国内外广泛运用,已有3月龄SD大鼠去卵巢后成功地形成骨质疏松模型的报道^[1,3]。本实验开始时各组大鼠体重无显著差异,去势后大鼠体重明显增加,应用雌激素或依普拉芬以有效地抑制这种趋势,停药后体重又有所增加。有作者认为^[2]去势后大鼠经历早期快速骨量丢失和后期相对低骨量稳定时期。在快速骨量丢失时期,血中雌激素水平降低,肾上腺分泌雌酮在脂肪组织加速转化为雌激素,以弥补血中的不足。大鼠体重的增加与选用大鼠的年龄也有一定的关系。大鼠体重的增加对骨量减少有部分防护作用。

为了初步比较依普拉芬和雌激素对实验性骨质疏松的预防作用。本研究在去势后1d开始给去势的SD大鼠喂食依普拉芬和尼尔雌醇,在去势术后12周测定骨密度,结果表明依普拉芬和尼尔雌醇都有防治骨密度下降的作用;停药12周后尼尔雌醇对骨密度下降的阻止作用逐渐消失,而依普拉芬仍能维持相当的骨密度或者是下降较慢,术后24周处死大鼠行组织形态图像分析椎骨骨小梁面积、百分比在依普拉芬和尼尔雌醇组有显著差异,提示依普拉芬和尼尔雌醇对骨质疏松防治机理有一定的差别。石明健等^[3]观察依普拉芬可增加股骨远端骨密度、骨干皮质厚度、皮质密度、骨干髓质密度及骨密度,增加骨干重、灰重和骨钙含量等改善鼠的骨质疏松现象。Civitellir的实验^[4]表明依普拉芬的治疗可提高骨密度,改善骨的生物学特性而不改变骨的微量成分。其作用机理可能是促进成骨细胞增生,增加BMD;抑制成熟破骨细胞,减少破骨细胞前体增

生^[5]。其能在较长时间内维持一定的骨量水平,不仅有抑制骨吸收作用,也有刺激骨形成的作用。

去势12周后,Ⅱ组大鼠骨密度下降尤为明显,停药12周后,Ⅱ组大鼠的骨密度无明显下降,反而有所增加,可能的原因是该组大鼠去势后体重增加;同时该组大鼠未服用药物与食欲良好有一定的关系。这并不影响我们的观察,在用药12周后主要观察依普拉芬和尼尔雌醇对骨密度下降的阻止作用,与去势不用药组(Ⅱ组)差异有显著性($P < 0.001$);停药12周后主要是观察依普拉芬组与尼尔雌醇组之间骨密度下降的差异,尼尔雌醇组下降较快,而依普拉芬组下降较慢。在术后24周(即停药12周)的图像分析也说明这一点。

本文仅从防治骨质疏松的角度对依普拉芬和尼尔雌醇行初步的对比观察。应用于临床的雌激素制剂有天然与合成之分,给药方式也不完全一样,尼尔雌醇属于合成的制剂,本研究选择的是口服的给药方式。因此,对其他制剂的雌激素及不同给药方式带来的防治效果与依普拉芬之间的对比及联合用药防治骨质疏松的作用需要进一步研究。

参 考 文 献

- 1 韦永中,陶松年,杨国平等.去势对不同月龄雌性大鼠骨丢失的影响.南京医科大学学报,1998,3:203-205.
- 2 Wronki TJ, Citron M, Doherty AL, et al. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinology*, 1988, 123:681-686.
- 3 石明健,刘维尧,李宗桃,等.依普拉芬对摘除卵巢所致大鼠骨质疏松的作用.中国骨质疏松杂志,1996,2(1):70-72.
- 4 Civitellir. *In vitro* and *in vivo* effects of ipriflavone on bone formation and bone biomechanics. *Calcif Tissue Int*, 1997, 61 Suppl: S12-14.
- 5 刘忠厚主编.骨质疏松学.科学出版社,1998.274-280.