

## · 药物研究 ·

## 药物干预去势雌性大鼠骨质疏松症发生效果的评价

张荣军 蔡明明 谭成 陶永辉 胡名扬 梁高林 张莲芬

蒋孟军 俞惠新 赵燕 肖晔 王博诚 金坚

**【摘要】 目的** 评价阿仑磷酸钠、埃本磷酸钠、酪蛋白磷酸肽对去势雌性大鼠骨质疏松症的预防作用。**方法** 59周龄去势SD雌性大鼠随机分为4组,即阿仑磷酸钠组、埃本磷酸钠组、酪蛋白磷酸肽组和对照组。分别给予相应干预药物持续处理6个月后测定骨密度及灰重,并进行骨组织形态计量学及骨生物力学研究。**结果** 连续给药6个月后,全身、腰椎和股骨头骨密度分析显示埃本磷酸钠组显著高于对照组( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ );胸椎、胫骨骨小梁面积测量也以埃本磷酸钠组为优( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ );股骨灰重检测表明埃本磷酸钠组也明显高于对照组( $P < 0.05$ )。阿仑磷酸钠组的骨小梁面积显著高于对照组( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ),但消化道毒性反应较重。酪蛋白磷酸肽组除全身骨密度外( $P < 0.05$ ),其它所测参数与对照组比较无明显差异。**结论** 埃本磷酸钠是一种较好的预防绝经后骨质疏松症的药物。对于阿仑磷酸钠的使用,建议可通过改变药物剂型和给药途径来完善。酪蛋白磷酸肽作为骨质疏松症的单一预防用药尚有局限性,可以辅剂形式参与预防。

**【关键词】** 骨质疏松症; 双膦酸盐; 酪蛋白磷酸肽; 预防

**Evaluation of preventive effect of drug intervention on osteoporosis in ovariectomized rats.** ZHANG Rongjun, CAI Gangming, TAN Chen, et al. State Key Laboratory of Nuclear Medicine, Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China.

**【Abstract】 Objective** To evaluate the preventive effect of alendronate, ibandronate and casein phosphopeptides (CPP-III) on osteoporosis in ovariectomized rats. **Methods** 59 week-old SD female rats were ovariectomized and divided into four groups randomly: alendronate, ibandronate, CPP-III and control groups. The treatment groups were fed with the above drugs for consecutive six months. Later, bone mineral density (BMD) and ash weights were measured, and bone histomorphometry was performed. **Results** The best BMDs of total body, lumbar spine and femoral head were found in ibandronate group, and they were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ , respectively); larger trabecular area of thoracic vertebra and tibia ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ , respectively) and higher ash weight of femur were also obtained in the ibandronate group ( $P < 0.05$ ). The trabecular area in alendronate group was much larger than that in control group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), but the toxicity to alimentary tract was severe. No significantly higher parameters were found in CPP-III group except the BMD of total body ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Bisphosphonates are now well established as efficacious antiresorptive agents for the prevention of osteoporosis. In particular, ibandronate has been proved to be able to increase bone mass and improve bone physical condition with slight toxicity. Alendronate may be improved by altering dosage form and mode of administration. CPP-III still has limited use, but may be a good adjuvant for prevention of osteoporosis.

**【Key words】** Osteoporosis; Bisphosphonates; Casein phosphopeptides; Prevention

骨质疏松症是一种多发于绝经后妇女及老年人的常见病,以骨量减少、骨微结构退化为特征,致使骨脆性增加,易发生骨折<sup>[1]</sup>。由于骨质疏松症危害

性大,且为常见的慢性疾病,绝经前后妇女的预防用药十分必要。目前预防用药主要有雌激素类、活性钙类和双膦酸盐类,其中后两类用药颇受重视。本文以去势雌性大鼠为实验模型,考察了我室合成的两种双膦酸盐阿仑磷酸钠、埃本磷酸钠及日本进口的酪蛋白磷酸肽对绝经后骨质疏松症的预防作用。

基金项目:卫生部科研基金资助项目(98-2-318)

作者单位:214063 江苏 无锡,核医学国家重点实验室原子医学研究所,第一作者现为复旦大学研究生

## 材料和方法

### 1. 材料与主要试剂

阿仑膦酸钠和埃本膦酸钠由本实验室合成(经结构确证,化学分析表明其纯度均大于97%)。酪蛋白磷酸肽(CPP-Ⅲ)为日本明治制果公司产品。硫酸钡为上海新亚制药厂产品。雌激素放射免疫分析试剂盒为美国DPC公司产品。其余试剂均为国产分析纯。

雌性SD大鼠由浙江大学农学院提供,江苏省原子医学研究所实验动物中心饲养,动物环境及质量合格证号为苏动(环)97020和苏动(质)97028。大鼠普通饲料配方:玉米、豆饼、小麦各占30%,鱼粉5%,豆油1%,奶粉1.6%,鱼肝油1%和食盐0.5%。经无锡轻工业大学食品工程系测定,饲料中水份占12.4%,蛋白质21.26%,粗脂肪4.75%,总糖47.27%,灰份15.41%;其中Ca含量为1.01%,P为0.78%。主要仪器有DEXA骨密度仪(型号为DPX IQ240),美国Lunar公司产品;1122万能材料试验机,英国Inston公司产品。

### 2. 动物模型建立

59周龄雌性SD大鼠50只,1%硫酸钡50 mg/kg腹腔注射麻醉后,10只行假性卵巢切除术(SHAM),其余行卵巢切除术(OVX)。手术切除物经病理学证实为大鼠卵巢组织,且包膜完整。术后恢复性饲养2周,取血清进行放射免疫分析雌二醇、雌三醇和雌酮,并进行全身BMD定量。淘汰因麻醉意外死亡、雌激素下降不明显和体重差别过大的动物15只,其中SHAM组3只,OVX组12只。

### 3. 预防模型干预方案

35只经筛选的术后SD大鼠,将SHAM组7只编成E组,普通饮食饲喂。OVX组28只SD大鼠随机等份分成4组:A组和B组分别为双膦酸盐阿仑膦酸钠和埃本膦酸钠药物干预组,两组每日灌喂1次,给药剂量分别为10 mg/kg和1 mg/kg;C组为CPP组,每日饲喂含8% CPP-Ⅲ普通饲料;D组为对照组,每日灌喂适量生理盐水。每只大鼠均单笼饲养;除C组外,其余各组均饲喂普通饲料。每周称量体重一次,计算新的给药量,持续处理6个月。

### 4. 骨密度测定

药物干预6个月后,将大鼠麻醉,用胶带俯卧固定,用DEXA骨密度仪测定全身骨密度(BMD)。处死后,取右侧股骨、腰椎离体测定BMD。

### 5. 骨干、灰重分析

药物干预6个月后处死所有大鼠,取左侧股骨、去除肌肉、结缔组织和骨髓后,120℃恒温烘烤。以2份氯仿和1份甲醇的混合液脱脂,每次脱24 h,共脱脂4次。然后将样品转至已恒重的瓷坩埚内,120℃恒温烘6 h,置干燥器内冷却至室温,用万分之一电子天平称量各样品的干重。然后将样品置800℃马福炉内灰化6 h,置干燥器内冷却至室温,用万分之一电子天平称量各样品的灰重。

### 6. 骨组织形态计量学和骨生物力学分析

取右侧股骨用1122万能材料试验机测定最大抗弯曲载荷(测试条件为弯曲跨距24 mm,试验速度10 mm/min)。取第12胸椎和右胫骨近侧干垢,戊二醛固定,制成骨切片,观察骨组织形态结构变化并测量骨小梁面积。

### 7. 数据的统计分析

与对照组的比较采用几个处理组对同一个对照组比较的Dunnett法,组间比较采用Student-Newman-Keuls法。

## 结 果

### 1. 干预药物毒性分析

模型动物在药物干预期间,A组体重明显下降,总体约下降21.02%,且每日进食量也明显减少(约16%左右);B组体重稍有增加( $\leq 5\%$ );C组、D组及E组体重明显增加( $\geq 10\%$ )。A组大鼠死亡3只,病理剖检发现食道大面积糜烂性溃疡。

### 2. 模型动物死亡率分析

除上述A组3只因干预药物消化道毒性反应致死外,B、C、D和E组分别为2、3、2和2只SD大鼠死亡。其中麻醉意外死亡3只,分别分布在B、C和E组;自发性肿瘤死亡2只,分布在C组和E组;急性肺炎死亡3只,分布在B、C和D组;眼部感染10只,D组死亡1只。

### 3. 模型动物药物干预后骨密度分析

全身BMD分析显示D组最低,符合实验设计要求。全身、腰椎和股骨头BMD均以B组最高,与D组比较,均有显著性差异( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),腰椎BMD结果C组最低,且A组、B组和E组均高于D组。股骨头BMD测量表明A组最低,且只有B组、C组和E组高于D组(表1),A组与B组相比全身、腰椎及股骨头均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

表1 各组骨密度分析

| 组别 | n | BMD(g/cm <sup>2</sup> ) |                 |                |
|----|---|-------------------------|-----------------|----------------|
|    |   | 全身                      | 腰椎              | 股骨头            |
| A  | 4 | 0.304 ± 0.014           | 0.099 ± 0.042   | 0.106 ± 0.007  |
| B  | 5 | 0.311 ± 0.009**         | 0.147 ± 0.039** | 0.196 ± 0.059* |
| C  | 4 | 0.305 ± 0.006*          | 0.060 ± 0.024   | 0.125 ± 0.032  |
| D  | 5 | 0.287 ± 0.012           | 0.062 ± 0.025   | 0.116 ± 0.014  |
| E  | 5 | 0.296 ± 0.010           | 0.091 ± 0.049   | 0.166 ± 0.056  |

注:与对照组比较 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 

## 4. 模型动物药物干预后骨小梁面积分析

第12胸椎骨小梁面积分析 A组、B组和E组均高于D组,且有统计学意义,而C组最低。胫骨骨小梁面积测量显示四个组均高于D组,除C组外均具有显著性差异(表2)。

表2 各组骨小梁面积分析

| 组别 | n | 骨小梁面积(μm)      |                |
|----|---|----------------|----------------|
|    |   | 第12胸椎          | 胫骨             |
| A  | 4 | 177.4 ± 2.7**  | 158.0 ± 5.4**  |
| B  | 5 | 148.9 ± 19.0** | 144.8 ± 12.1** |
| C  | 4 | 92.6 ± 16.4    | 122.5 ± 29.7   |
| D  | 5 | 96.7 ± 13.2    | 95.0 ± 9.4     |
| E  | 5 | 125.8 ± 12.7*  | 135.8 ± 13.1** |

注:与对照组比较 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 

## 5. 模型动物药物干预后骨灰重及生物力学分析

股骨灰重测量表明四个组均高于D组,只有B、E组有统计学价值( $P < 0.05$ )。股骨弯曲载荷也出现类似情况(表3)。

表3 各组骨灰重及生物力学分析

| 组别 | n | 灰重             | 股骨弯曲载荷        |
|----|---|----------------|---------------|
| A  | 4 | 0.356 ± 0.073  | 124.5 ± 54.3  |
| B  | 5 | 0.346 ± 0.040* | 112.0 ± 13.6* |
| C  | 4 | 0.298 ± 0.042  | 97.3 ± 17.4   |
| D  | 5 | 0.291 ± 0.034  | 95.4 ± 12.9   |
| E  | 5 | 0.352 ± 0.040* | 115.0 ± 10.9* |

注:与对照组比较 \*  $P < 0.05$ 

## 讨 论

在骨质疏松症的预防用药中,钙类制剂的使用一直受到关注。由于钙吸收的主要部位小肠下段环境 pH 偏碱性,易使钙沉淀,常导致老年人每天钙摄入量不足,容易发生骨质疏松症。目前的钙类制剂设计均以活性 D<sub>3</sub> 和增加肠道钙溶解助吸收思维为主。CPP-III 是从牛奶酪蛋白水解产物中分离纯化出来的一种富含磷酸丝氨酸的多肽,体外离体小肠吸

收分析它能提高钙在小肠下部的溶解度,每分子 CPP-III 可使近 40 倍的钙离子保持在溶液中,促进钙的被动吸收<sup>[2]</sup>。实验结果显示 CPP-III 除了对全身 BMD 略有影响外,其它分析指标未有优势。提示其作为骨质疏松症的单一预防用药尚有局限性,建议以辅剂形式参与预防,增加骨钙含量。

双膦酸盐类药物能选择性地吸附在骨矿物质表面,抑制磷酸钙晶体的形成、聚集和溶解,并抑制软组织的异位钙化<sup>[3]</sup>。骨质疏松症的主要病理生理机理是破骨细胞介导的骨吸收增加,使骨重建出现负平衡<sup>[4]</sup>。体外研究发现双膦酸盐类药物能明显抑制破骨细胞的骨吸收作用,对骨质生长和矿化作用无明显影响。埃本膦酸钠和阿仑膦酸钠均是近年设计的较为有效地治疗骨质疏松症的双膦酸盐类药物,细胞药效学表明前者的药效是后者的 10 倍<sup>[5]</sup>。本实验的结果支持埃本膦酸钠优良的预防骨质疏松症作用,具有明显增加骨密度的作用,且无明显的副作用。阿仑膦酸钠在防止骨质疏松症方面也有良好的效果,但存在着较为严重的双膦酸盐类化合物对消化道刺激的副作用。同时提示结合体外细胞药效学结果设计的阿仑膦酸钠体内用药剂量不适于预防用药的指导<sup>[6,7]</sup>,或者可通过改变药物剂型和给药途径来完善阿仑膦酸钠的使用。

致谢:感谢苏州大学第一临床学院吴翼伟教授、王栋梁老师在本实验中协助测定骨密度;上海第一医科大学王洪复教授帮助完成骨生物力学参数的测定;无锡轻工业大学冯凤琴博士协助完成饲料成份的测定;江苏省江原医院王铁生主任帮助完成骨病理切片

## 参 考 文 献

- 1 赵燕玲.原发性骨质疏松症的概述及诊断标准.见:刘忠厚主编.骨质疏松学,北京:科学出版社,1998,142-166.
- 2 Sato R, Noguchi T, Naito H. Casein phosphopeptides enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. J Nutri Sci Vitaminol, 1986, 32: 67-70.
- 3 姚吉龙,王洪复,黄丽敏.双膦酸盐抑制骨吸收机制及其防治骨质疏松症的研究进展.中国骨质疏松杂志,1998,4: 78-80.
- 4 孟迅吾.双膦酸盐治疗原发性骨质疏松症.中华内分泌代谢杂志,1998,14: 345-347.
- 5 Watts NB. Treatment of osteoporosis with bisphosphonates. Endocrinol Metab Clin North Am, 1998, 27: 419-439.
- 6 金慰芳,高建军,王洪复,等. BM<sub>210055</sub>对破骨细胞骨吸收的抑制作用.中国骨质疏松杂志,1999,5(1): 25-28.
- 7 Lalla S, Hothorn LA, Haag N, et al. Lifelong administration of high doses of ibandronate increases bone mass and maintains bone quality of lumbar vertebrae in rats. Osteoporosis Int, 1998, 8: 97-103.