

· 药物研究 ·

三苯氧胺治疗去势大鼠骨质疏松的实验研究

王素伟 李海平

【摘要】 目的 探讨去势大鼠骨质变化规律及三苯氧胺对去势大鼠骨质疏松骨量变化的影响。方法 选用健康2月龄雌性SD大鼠30只,随机分为假手术组、卵巢切除组(去势组)和三苯氧胺治疗组,所有动物手术后第11周和第12周先后二次行腹腔注射茜素红以作活体荧光标记,第二次标记后第二天处死所有动物,取尾椎近节制作不脱钙骨切片进行骨组织形态学的观察,了解骨量变化情况。结果 去势组骨量明显减少,骨吸收增强,成骨作用减弱,三苯氧胺组骨量接近正常。结论 三苯氧胺可以对抗因雌激素缺乏而引起的骨量变化。

【关键词】 骨质疏松症; 三苯氧胺; 大鼠

Osteoporosis and treatment with tamoxifen: an experimental study WANG Suwei, LI Haiping. Department of Orthopedics, The Third Affiliated Hospital of Medical College, Jinan University. Zhuhai 519000, China.

【Abstract】 Objective To study the developmental regulation of osteoporosis in ovariectomized rats and the antagonism of tamoxifen to bone mass alteration in estrogen deficient condition. **Methods** Post-menopausal osteoporosis rat model was designed by bilateral ovariectomy. Thirty 2-month-old female SD rats were randomly divided into three groups: sham-operated, bilaterally ovariectomized, and treated with tamoxifen. The effects of 12 weeks' treatment with tamoxifen on trabecular bone mass of vertebrae were studied histomorphometrically. Alizarin was injected i.p. to each rat on two separate occasions to label the sites of bone formation. All rats were sacrificed two days after the second injection. Two proximal vertebrae of the tail were processed and sectioned undecalcifiedly for static and dynamic quantitative bone histomorphometric study, in order to observe bone mass alteration. **Results** The skeletal alteration in the ovariectomized rats was obvious bone loss with decreased bone formation and increased bone resorption. The bone mass in the tamoxifen treated group was close to normal. **Conclusion** Tamoxifen can effectively antagonize the bone mass alteration caused by ovarian hormone deficiency.

【Key words】 Osteoporosis; Tamoxifen; Rats

绝经后骨质疏松症是发生在中老年妇女的常见病。随着人类寿命的延长,绝经后骨质疏松影响妇女身体健康的问题逐渐突出,防止骨质疏松现已成为普遍关切的课题。本文作者在一个肯定的绝经后骨质疏松的动物模型基础上,应用静态、动态相结合的骨组织形态计量学的方法,来观察雌激素缺乏时骨骼的计量变化及三苯氧胺的防治作用。

材料和方法

1. 动物准备

实验动物选用30只成熟雌性纯种SD大白鼠(由湖南医科大学实验动物中心提供),体重在210g左右(8周大小),随机分成3组,每组10只,各组大鼠分笼喂养。所有动物用3%戊巴比妥钠腹腔注射

麻醉,剂量为40 mg/kg。

第1组为正常组,进行假手术,无菌操作下经腹腔入路取出双侧卵巢于体外置放1 min后还纳,喂以动物室配制的标准饲料;第2组为双侧卵巢切除组(去势组),以同样入路切除双侧卵巢,标准饲料喂养;第3组为三苯氧胺治疗组,以同样方法切除双侧卵巢,喂以治疗饲料,即每100 g标准饲料中含2 mg三苯氧胺。切除卵巢均经病理学证实。所有动物允许随意饮用自来水,实验动物切口均无感染,按期愈合,第2组中有2只动物手术后4周死亡,原因不明,其余均生长良好。

所有动物手术后第11周和第12周先后两次行腹腔注射茜素红以作活体荧光标记,第2次标记后第二天处死所有动物,立即取近段两节尾骨,去除软组织后置入70%酒精固定24~48 h,以后依次用梯度酒精脱水,二甲苯透明塑料液浸润包埋,制成不脱钙骨切片,半自动图像分析系统进行静态和动态的

组织形态计量学观察,所得结果用均值 $\pm$ 标准差表示,医学统计分析软件进行方差分析, P 值小于0.05时具有统计学意义。

2. 选用参数及其意义^[1]

(1)静态参数:①TBV% 小梁骨体积占总骨体积的百分比。②D-TRAB 平均骨小梁的宽度。单位: μm 。③OS% 骨小梁中骨样组织覆盖的百分比。(骨样组织表面积/骨小梁总面积)。④SV-OSB 骨样组织被活跃成骨细胞覆盖的表面密度。(成骨细胞覆盖的骨样组织表面积/总骨体积)。单位: mm^2/cm^3 。⑤OBI 成骨细胞指数(成骨细胞数/ mm^3 小梁骨)。⑥OCL% 骨小梁表面被吸收陷窝(内含破骨细胞)覆盖的百分数(骨-破骨细胞接合处)。⑦SV-OCL 破骨细胞陷窝的表面密度(骨-破骨细胞接合处/总骨体积)。单位: mm^2/cm^3 。⑧OCI 破骨细胞指数(破骨细胞数/ mm^3 小梁骨)。

(2)动态参数:①MD-d 双重标记间的平均距离。单位: μm 。②MTH-s 单个标记的平均厚度。单位: μm 。③LAB-TS-d 骨小梁表面呈现双重标记的分数。单位:分数 $\times 1000$ 。④LAB-TS-s 骨小梁表面呈现单个标记的分数。单位:分数 $\times 1000$ 。⑤AR/D 每日帖附率(矿化速率)。单位: $\mu\text{m}/\text{d}$ 。⑥

MIN/LAG·T 矿化延迟时间(平均骨样组织接合处宽度/双重标记间贴附率)。单位:d。

结 果

静态测定数据显示:去势大白鼠12周后,TBV%较正常下降了42.4%,而三苯氧胺治疗组TBV%接近正常组,表明三苯氧胺可有效地抑制小梁骨丢失,与去势组比较有统计学差异($P < 0.05$)。小梁内平均直径在3组之间无统计学差异,但从绝对值来看,去势组较其他两组低,说明去势白鼠骨量的丢失是匀质的。代表成骨细胞数量的OBI和活性的OS%、SV-OSB参数中,除OS%在3组之间无差别外,其他在去势组与正常组、治疗组之间比较均存在有统计学差别,其中,SV-OSB在正常组和治疗组之间也存在有差异($P < 0.05$),表明三苯氧胺以提高成骨细胞活性为主;代表骨吸收的参数OCL%,SV-OCL和OCI中,去势组均明显高于其他两组($P < 0.01$,见表1)。

在两动态观察量数值显示,MD-d和AR/D在去势组均低于其他两组,MIN/LAG·T在去势组明显增高,但在MTH-S、LAB-TS-d和LAB-TS-s中,3组之间无统计学差异,见表2。

表1 去势大鼠尾椎松质骨静态计量变化($\bar{x} \pm s$)

骨量变化	正常组	双侧卵巢切除组	P_a	三苯氧胺治疗组	P_a	P_b
TBV%	25.94 $\pm$ 4.83	14.93 $\pm$ 3.77	<0.01	22.87 $\pm$ 7.92	NS	<0.05
D-TRAB(μ)	112.02 $\pm$ 19.00	101.41 $\pm$ 16.62	NS	108.45 $\pm$ 18.42	NS	NS
OS(%)	16.15 $\pm$ 5.40	13.71 $\pm$ 5.77	NS	15.85 $\pm$ 4.67	NS	NS
SV-OSB(mm^2/cm^3)	346.04 $\pm$ 160.45	182.20 $\pm$ 71.98	<0.05	490.27 $\pm$ 218.52	<0.05	<0.01
OBI($^\circ/\text{mm}^3$)	552.10 $\pm$ 235.59	321.14 $\pm$ 198.87	NS	750.28 $\pm$ 265.27	NS	<0.01
OCL(%)	1.09 $\pm$ 0.74	1.45 $\pm$ 0.67	NS	0.67 $\pm$ 0.42	NS	<0.01
SV-OCL(mm^2/cm^3)	117.08 $\pm$ 96.61	157.95 $\pm$ 36.73	<0.01	87.78 $\pm$ 61.64	NS	<0.01
OCI($^\circ/\text{mm}^3$)	127.10 $\pm$ 98.80	265.52 $\pm$ 88.02	<0.05	96.77 $\pm$ 50.85	NS	<0.01

注: P_a 去势组、治疗组与正常组比较; P_b 去势组与治疗组之间的比较

表2 去势大鼠尾椎松质骨动态组织形态计量变化($\bar{x} \pm s$)

骨量变化	正常组	去势组	P_a	三苯氧胺治疗组	P_a	P_b
MD-d(μ)	5.07 $\pm$ 0.98	3.77 $\pm$ 1.49	<0.05	6.24 $\pm$ 0.75	NS	<0.01
MTH-s(μ)	1.36 $\pm$ 0.25	1.20 $\pm$ 0.38	NS	1.42 $\pm$ 0.30	NS	NS
LAB-TS-d($\times 10^3$)	90.28 $\pm$ 65.11	55.94 $\pm$ 37.33	NS	93.67 $\pm$ 39.93	NS	NS
LAB-TS-s($\times 10^3$)	147.99 $\pm$ 41.62	117.89 $\pm$ 44.41	NS	151.40 $\pm$ 35.23	NS	NS
AR/D(μ/d)	0.53 $\pm$ 0.10	0.39 $\pm$ 0.16	<0.05	0.65 $\pm$ 0.08	NS	<0.01
MIN/LAG·T(D)	1.51 $\pm$ 0.44	2.89 $\pm$ 1.34	<0.01	1.03 $\pm$ 0.34	NS	<0.01

注: P_a 去势组、治疗组与正常组比较; P_b 去势组和治疗组之间的比较

讨 论

Baron^[2]等证明,12周左右的大白鼠其二级松质

骨的再建酷似人类髂骨,因此,以研究人类为目的而用大白鼠为实验模型是可行的。

雌激素在维护骨偶联平衡方面起重要作用。

Albright 早在 40 年代初就提出骨质疏松的发生与雌激素的缺乏有密切关系。正常骨再建是骨形成和骨吸收周而复始进行且二者维持平衡,雌激素的缺乏,使骨形成和骨吸收这一偶联失衡,骨吸收的作用超过了骨形成的作用,最终导致骨量的减少。本实验结果说明:卵巢切除后因雌激素的缺乏,在很大程度上增加了破骨细胞的数量和活性,且小梁骨转换中成骨作用下降,大鼠去势 12 周后,小梁骨体积下降 42.4%。

雌激素是一种甲状旁腺激素(PTH)的拮抗剂^[3]。在钙代谢调节剂中,1,25-(OH)₂D₃ 和 PTH 起重要作用;1,25-(OH)₂D₃ 对骨骼的作用表现在 2 个方面,既能刺激成骨细胞促进骨形成,也可和 PTH 协同促进破骨细胞的溶骨作用,但在 PTH 缺乏的情况下,1,25-(OH)₂D₃ 动员骨钙,其促进骨吸收的作用明显减低,也就是说 PTH 在促进骨吸收作用上起主导作用。去势白鼠因雌激素的缺乏,这种拮抗作用消失,使甲状旁腺激素的作用增强,从而使骨吸收增加。本实验结果也表明,去势后白鼠的破骨细胞数及其活性明显增加。

雌激素可以逆转卵巢切除后引起的骨骼变化,其作用途径主要是通过抑制骨吸收来增加小梁骨,即通过对破骨细胞产生抑制作用来减少骨吸收^[4]。IL-1 主要是由外周单核细胞分泌的一种多肽细胞因子,IL-6 则是骨组织中多种细胞分泌的生物活性广泛的一种细胞因子,二者均可促进破骨细胞前体形成细胞的增殖、分化,引起骨吸收活性的增强;而雌激素则可通过受体接合途径来抑制这二种细胞因子的分泌,从而达到阻止骨量的丢失。近来研究表明^[5],雌激素还可通过受体结合途径直接作用于破骨细胞前体形成细胞的聚集和分化,产生抑制破骨细胞活性的作用,从而抑制骨吸收。

Komm 和 Erikson 在蛋白水平和 mRNA 水平证明了成骨细胞上存在有雌激素受体^[6,7],并发现雌激素通过调节骨基质蛋白、细胞因子和转录因子对成骨细胞产生作用,为雌激素直接作用于成骨细胞,参与骨代谢提供了有力依据。卵巢切除可以使小梁骨体积的百分比下降 31%~81%,17β-雌二醇可以使小梁骨体积增加 121%^[8],这就说明骨骼对雌激素较为敏感。

三苯氧胺是一种非类固醇类的选择性雌激素受体调节剂,原主要用来治疗乳腺癌。它与 17β-雌二醇具有类似的分子结构,因此既可以阻碍雌激素与

其受体结合,又可以在雌激素不足的情况下产生雌激素样作用,也就是说三苯氧胺可以直接作用于成骨细胞促进骨形成,抑制破骨细胞,减少骨吸收^[9,10]。因此,它可以提高小梁骨体积,预防骨量的丢失。

本研究结果证明了这一点。应用三苯氧胺治疗后,维护了骨组织形态学测量的参数值,防止了小梁骨体积的下降,在 SV-OSB、三苯氧胺组还高于正常对照组($P < 0.05$)。去势后白鼠在组织学上的表现为骨吸收的增加和成骨作用的抑制,而三苯氧胺能有效地抑制因雌激素缺乏所致的骨组织变化。

总之,卵巢切除是绝经后骨质疏松的良好动物模型,其组织形态计量变化与人类相似,且小梁骨变化明显高于皮质骨^[8]。本研究表明:去势后白鼠骨吸收明显增加,成骨作用表面上表现为正常,实际上处于抑制状态,使小梁骨量下降;三苯氧胺可以有效地抑制因卵巢切除后雌激素缺乏引起的骨量变化,其作用途径可能是:一是通过直接作用于成骨细胞和破骨细胞,促进骨形成,抑制骨吸收;一是通过抑制甲状旁腺激素和骨吸收调节细胞因子(IL-1、IL-6等),间接抑制骨吸收;以此来提高小梁骨体积。因此,绝经后骨质疏松症是一种高转换型骨质疏松症,三苯氧胺是绝经后骨质疏松症的良好抑制剂。

参 考 文 献

- 1 Malluche HH. A new semiautomatic method for quantitative static and dynamic bone histology. *Calcif Tissue Int*, 1982, 34: 439-448.
- 2 Baron R. Evidence of sequential remodelling in rat trabecular bone: morphology, dynamic histomorphometry, and changes during skeletal maturation. *Ann Rec*, 1984, 208: 137-145.
- 3 刘忠厚,主编.骨质疏松症.北京:化学工业出版社,1992,110.
- 4 Suda T. Modulation of osteoclast differentiation. *Endoc rev*, 1995, 266.
- 5 Shevde NK. Estrogen modulates the recruitment of myelopoietic cell progenitors in rat through a stromal cell-independent mechanism involving apoptosis. *Blood*, 1996, 87: 489.
- 6 Eriksen EF. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science*, 1988, 241: 84.
- 7 Komm BS. Estrogen binding: receptor mRNA and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science*, 1988, 7: 81.
- 8 Turner RT. Tamoxifen inhibits osteoclast mediated resorption of trabecular bone in ovarian hormone-deficient rat. *Endocrinology*, 1988, 122: 1146-1150.
- 9 Ke HZ, Chen HK, Simons HA, et al. Comparative effects of droloxifene, tamoxifen and estrogen on bone, serum, cholesterol and uterine histology in the ovariectomized rat model. *Bone*, 1997, 20: 31.
- 10 Frolik CA, Bryant HU, Black EC, et al. Time dependent changes in biochemical bone markers and serum cholesterol in ovariectomized rats: effects of raloxifene, tamoxifen, estrogen and alendronate. *Bone*, 1996, 18: 621.