

· 药物研究 ·

他莫西芬对去卵巢骨质疏松大鼠影响的实验研究

支会英 李恩

【摘要】 目的 探讨选择性雌激素受体调节剂他莫西芬对去卵巢造成的骨质疏松大鼠性激素及骨密度的影响。**方法** 通过切除大鼠卵巢造成骨质疏松模型,观察他莫西芬对骨质疏松大鼠血清雌二醇(E_2)、卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、泌乳素(PRL)、孕酮(PROG)、皮质醇(COR)、睾酮(T)及骨密度(BMD)的影响,并与尼尔雌醇(nilestriol)做阳性对照。**结果** 他莫西芬治疗的去卵巢骨质疏松大鼠血清 E_2 水平高于病理对照组($P < 0.05$), LH水平低于病理对照组($P < 0.05$),左侧后肢股骨胫骨及平均骨密度均高于模型组($P < 0.01, P < 0.1, P < 0.05$)。**结论** 他莫西芬能提高去卵巢骨质疏松大鼠骨密度,其作用机制可能与其拟雌激素样作用有关。

【关键词】 骨质疏松症; 去卵巢大鼠; 选择性雌激素受体调节剂; 他莫西芬; 雌激素

Effects of tamoxifen on ovariectomized osteoporotic rats ZHI Huiying, LI En. Department of Biochemistry Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China.

【Abstract】 Objective To observe the effects of tamoxifen on ovariectomy-induced osteoporotic rats. **Methods** SD rats were ovariectomized and administered tamoxifen and nilestriol for 12 weeks. Radioimmunoassay kits for E_2 , FSH, LH, PRL, PROG, COR and T were used to detect the values of the hormones in grouped rats including control, pathological, tamoxifen and nilestriol groups. **Results** Tamoxifen and estrogen could increase the BMD of the osteoporotic rats. The values of E_2 , LH, PROG and COR in ovariectomized osteoporotic rats significantly decreased, compared with those of normal control rats ($P > 0.05$), while in the tamoxifen treated rats the values of E_2 increased and the level of LH decreased. **Conclusion** Tamoxifen can increase the BMD in ovariectomized osteoporotic rats, possibly due to its estrogen-like effect.

【Key words】 Osteoporosis; Ovariectomized rats; Selective estrogen receptor modulators; Estrogen

骨质疏松是老年人的常见病之一,尤以绝经后妇女发病率最高。雌激素缺乏是绝经后骨质疏松发生的直接诱因^[1],也是其发展的主要因素,因此雌激素替代治疗(estrogen replacement therapy, ERT)被认为是最适合的治疗方法之一^[2],但是雌激素长期应用会出现明显的毒副作用尤其是使发生乳腺癌和子宫内膜癌的危险性增加,限制了患者对它的使用^[3]。因此寻找安全、有效、可以长期应用的药物是医学的重要研究课题之一。他莫西芬(Tamoxifen, TAM)是一种选择性雌激素受体调节剂(selective estrogen receptor modulators, SERM),通过作用于雌激素受体(estrogen receptor, ER)发挥生物学作用。SERM是一类在生殖道组织中有拮抗雌激素作用,而对骨骼和脂类代谢却有着类似雌激素的有益作用的化合物^[4]。近来研究提示将此类药物用于预防绝经后妇

女骨质疏松和心血管疾病将消除人们对乳腺及子宫病变的顾虑,有望成为治疗绝经后综合征的较为理想的临床用药。本文通过大鼠去卵巢造成骨质疏松动物模型,观察TAM对骨质疏松的影响并与尼尔雌醇做比较。

材料和方法

1.1 动物的选择和分组

选用8月龄健康雌性大鼠,体重300~400g(河北实验动物中心提供)。随机分为:假手术组10只,卵巢切除组29只。大鼠经1%戊巴比妥腹腔注射麻醉,卵巢切除组从背部切除双侧卵巢,假切除组手术过程与切除组相同但不切除卵巢而切除小块脂肪组织。6周后同时各组随机取两只大鼠的股骨和腰椎进行病理切片观察以确定骨质疏松模型的建立。然后将剩余的卵巢切除组随机分为病理对照组8只,尼尔雌醇治疗组9只,TAM治疗组10只。

1.2 药物:他莫西芬:波兰产,批号:951461。
 尼尔雌醇:北京四环制药二厂生产,批号:990719。

1.3 给药方法

造模6周后,卵巢切除加TAM治疗组给予TAM, $2.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 1次/日,卵巢切除加尼尔雌醇治疗组给予尼尔雌醇灌胃 $0.21 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 1次/两周,药物剂量均按体表面积折算为成人等效剂量,假手术组、模型对照组每天灌胃等体积的生理盐水,连续给药12周。

1.4 观察指标及方法 (1)骨密度测定:使用美国Lunar公司生产的双能X线吸收骨密度检测仪,测定大鼠左后肢股骨和胫骨的骨密度。(2)第1腰椎、股骨骺端形态学观察:第1腰椎常规石蜡包埋,HE染色,光镜观察。股骨干骺端进行扫描电镜观察。(3)激素测定:检测大鼠血清中的血清雌二醇(E_2)、卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、泌乳素(PRL)、孕酮(PROG)、皮质醇(COR)、睾酮(T)的水平变化。采用Ria法^[5],放射免疫试剂盒均由中国医学科学院核医学技术中心提供,按试剂盒说明书进行操作。

1.5 统计学处理:采用方差分析。

结 果

1. TAM对去卵巢大鼠骨组织的形态学的影响:第1腰椎及股骨的石蜡切片显示:假手术组骨小梁多而完整,病理对照组骨小梁稀疏,变薄,骨髓腔增大,说明骨质疏松的模型建立成功(见图1,2)。TAM和尼尔雌醇治疗组骨组织形态明显改善,接近假手术组。扫描电镜观察,TAM和尼尔雌醇治疗大鼠股骨骺端骨小梁致密,断点减少(见图3~5)。



图1 假手术组大鼠第一腰椎的光镜形态(20×10)

2. TAM对去卵巢实验性骨质疏松大鼠骨密度的影响:见表1。病理对照组大鼠与假手术组比较,



图2 病理对照组大鼠第一腰椎的光镜形态(20×10)



图3 假手术组大鼠股骨干骺端
扫描电镜观察(×70倍)



图4 病理对照组大鼠股骨干骺端
扫描电镜观察(×70倍)

股骨和胫骨的骨密度明显降低($P < 0.05$),TAM治疗组可以提高去卵巢大鼠股骨胫骨骨密度($P < 0.01$, $P < 0.1$),而尼尔雌醇治疗组仅可以提高去卵



图 5 TAM 治疗组大鼠股骨干骺端
扫描电镜观察 ($\times 70$)

巢大鼠股骨骨密度 ($P < 0.05$), 但胫骨的骨密度却未见改变 ($P > 0.1$)。

表 2 TAM 对去卵巢实验性骨质疏松大鼠血清激素的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	E_2 (pg/ml)	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	PROG (ng/ml)	COR (mol/ml)	T (ng/ml)
假手术组	8	22.622 ± 14.147	3.805 ± 0.820	0.344 ± 0.196	31.941 ± 18.375	13.940 ± 9.843	0.674 ± 0.278
病理对照	8	$10.723 \pm 6.777^*$	$4.664 \pm 0.820^*$	$0.546 \pm 0.310^*$	$3.381 \pm 1.325^*$	$4.461 \pm 2.613^*$	0.566 ± 0.433
尼尔雌醇	9	$56.875 \pm 25.538^{\Delta}$	4.813 ± 1.034	0.586 ± 0.222	3.072 ± 1.254	3.288 ± 2.532	0.543 ± 0.173
他莫西芬	7	$29.966 \pm 27.591^{\Delta}$	$3.112 \pm 1.458^{\Delta}$	0.672 ± 0.548	2.423 ± 2.139	$6.423 \pm 2.139^{\Delta}$	6.253 ± 4.933

注:与假手术组比 $^* P < 0.05$;与病理对照组比 $^{\Delta} P < 0.05$

讨 论

1. 骨质疏松动物模型的建立

早在 40 年代 Albright 就提出了雌激素缺乏与骨质疏松的关系,之后在人和动物中均已得到证实,即雌激素缺乏导致骨的转换失衡,骨吸收快于骨形成。去势大鼠与人类绝经骨质疏松症有着许多相似之处,大多数学者认为去势大鼠模型适合于骨质疏松的研究和防治骨质疏松的药物评价。本实验采用 8 月龄雌性大鼠,手术切除卵巢造成人工绝经,卵巢切除后,股骨和胫骨的骨密度均明显降低 ($P < 0.05$),骨的微细结构发生改变,排列不整,骨髓腔增大,骨髓腔与骨小梁面积比增大。证实了骨质疏松的模型建立成功。

2. TAM 与尼尔雌醇对骨质疏松的治疗作用

伴随停经和卵巢功能丧失,骨丢失急剧增加,表明雌激素缺乏是骨质疏松发生的重要原因之一,所以雌激素替代治疗可以有效的防止骨量的丢失。本实验结果也证实了尼尔雌醇可以提高骨质疏松大鼠的骨密度,这与以前的研究结果相一致^[6]。研究发

3. TAM 对去卵巢实验性骨质疏松大鼠内分泌相关激素的影响:见表 2。病理对照组 E_2 、PROG、COR 水平与假手术组相比明显降低 ($P < 0.05$),而 FSH、LH 水平明显升高 ($P < 0.05$);TAM 治疗组与病理对照组相比 E_2 、COR、T 水平明显升高 ($P < 0.05$),而 LH 水平却明显降低 ($P < 0.05$)。

表 1 TAM 对去卵巢大鼠骨密度变化的影响 ($\bar{x} \pm s$, g/cm²)

组别	例数	股骨	胫骨	平均
假手术组	8	0.276 ± 0.034	0.247 ± 0.029	0.263 ± 0.031
病理对照	8	$0.241 \pm 0.013^*$	$0.222 \pm 0.013^*$	$0.232 \pm 0.013^*$
尼尔雌醇	10	$0.254 \pm 0.016^{\Delta}$	0.229 ± 0.010	$0.238 \pm 0.008^{\Delta}$
他莫西芬	9	$0.259 \pm 0.013^{\Delta}$	$0.232 \pm 0.013^{\nabla}$	$0.246 \pm 0.008^{\Delta}$

注:与假手术组比 $^* P < 0.05$;与病理对照组比 $^{\Delta} P < 0.01$; $^{\nabla} P < 0.05$; $^{\Delta} P < 0.1$

现 TAM 能够提高去卵巢大鼠股骨、胫骨的骨密度 ($P < 0.01$, $P < 0.1$),改善骨组织的病理变化,对骨质疏松有明显的治疗作用。

3. 从雌激素作用角度探讨 TAM 对去卵巢大鼠骨质疏松的治疗机理

健康成年雌性大鼠其生殖内分泌受时间节律的影响,因此本实验动物处死均选择在同一时相进行,以消除时间的混杂因素的影响。研究结果发现,TAM 治疗组与尼尔雌醇一样可以提高去卵巢大鼠的 E_2 水平,说明 TAM 具有拟雌激素样作用,这可能是二者均能提高大鼠骨密度的原因之一。从各组大鼠骨密度检测结果不难看出,TAM 比尼尔雌醇更能提高大鼠的骨密度,而 TAM 对大鼠血清 E_2 水平的提高却不及尼尔雌醇 ($P < 0.05$),所以只是用拟雌激素样作用还不能完全解释 TAM 对骨质疏松大鼠的治疗作用。近年来研究发现在骨细胞、成骨细胞、破骨细胞上都存在 ER^[7],雌激素不仅通过间接方式而且通过直接方式对骨代谢发挥调节作用,本研究通过对大鼠骨密度、相关内分泌激素的测定从侧面

(下转第 252 页)

使反映成骨表型水平的 BGP 含量显著增加,提示增骨 I、Ⅲ号有促进骨形成的作用。

2. 增骨 I、Ⅱ、Ⅲ号在序贯疗法中的作用机理。

在骨重建活动周期中、每个骨重建基本单位(BMU)要经历激活-吸收-逆转-形成 4 个时相。ADFR 序贯疗法治疗骨质疏松症是分别针对其 4 个时相而应用不同的药物治疗,从而使骨形成大于骨吸收,达到增加骨量的目的^[4]。

增骨 I、Ⅱ、Ⅲ号是根据现代骨重建理论和 ADFR 序贯疗法设计而成,在临床应用中已证实能有效防止骨质疏松症。增骨 I、Ⅱ、Ⅲ号以补肾中药为主,补肾中药可增强下丘脑-垂体-性腺功能,提高成骨样细胞 DNA 合成。在前期增骨 I、Ⅱ、Ⅲ号的骨计量学^[5]、体外成骨细胞及破骨细胞的药效观察和对 I、Ⅱ型胶原基因的表达影响^[6]的实验研究中已证实:增骨 I 号激活骨重建基本单位(BMU)、增骨Ⅱ号为骨吸收抑制剂,增骨Ⅲ号可促进骨形成。增骨 I、Ⅱ、Ⅲ号按 ADFR 程序进行序贯疗法,可使骨重建始终处于正性平衡之中,有效防治骨丢失、增加骨形成,治疗骨质疏松症。

本实验是在不同的条件下观察成纤维细胞的增殖及成骨表型的表达,并观察其对 rhBMP-2 诱导成纤维细胞成骨的影响。实验结果表明增骨 I、Ⅲ号可明显增强 rhBMP-2 诱导成纤维细胞成骨,表明增骨 I、Ⅲ号对骨形成的影响有可能是通过介导 rh-BMP-2 而发挥作用。

参 考 文 献

- 1 范保荣,方家椿,高捷.我国小儿包皮成纤维细胞原代及传代培养的研究.细胞生物学杂志,1984,6:77-81.
- 2 梁克玉,魏玉玲,郭帮富,等.中药增骨 I、Ⅱ、Ⅲ号序贯疗法治疗绝经后骨质疏松症-附 120 例临床观察.中医正骨,1999,11(1):9-11.
- 3 Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. Science, 2000, 289: 1501-1504.
- 4 Frost HM. Coherence treatment of osteoporosis. Orthop Clin North Am, 1981, 12: 649-651.
- 5 魏玉玲,郭帮富,梁克玉,等.增骨 I、Ⅱ、Ⅲ号序贯疗法防治骨质疏松症组织形态计量学分析.中医正骨,1999,11(9):8-11.
- 6 魏玉玲,王炳南,梁克玉,等.增骨Ⅲ号对 I、Ⅱ型胶原基因表达的实验研究.中国骨伤,2000,13:459-460.