

去势雌性大鼠骨质疏松症的药物干预疗效的评价

陶永辉 谭成 蔡刚明 张荣军 胡名扬 梁高林
张莲芬 俞惠新 蒋孟军 肖晔 金坚 王博诚

【摘要】 目的 评价阿仑膦酸钠、埃本膦酸钠和泰舒对去势雌性大鼠骨质疏松症的治疗效果。方法 手术切除雌性大鼠卵巢制成骨质疏松模型,随机分为4组,即阿仑膦酸钠组、埃本膦酸钠组、泰舒组和对照组,分别给予相应干预药物持续处理6个月。治疗模型给药前、给药后2个月和6个月,分别测定全身骨密度。治疗结束后,进行股骨干重、灰重、骨矿含量、骨生物力学和骨组织形态计量学测定。结果 阿仑膦酸钠和埃本膦酸钠组治疗6个月后全身骨密度有明显升高,分别增高6.49%和7%;而泰舒组仅上升1.7%,对照组几无变化。埃本膦酸钠治疗大鼠全身、腰椎骨密度及股骨干重、灰重、最大抗弯曲载荷和骨小梁面积均较其他组高。结论 埃本膦酸钠是比阿仑膦酸钠更有效的一种骨质疏松症治疗药物。

【关键词】 骨质疏松症; 阿仑膦酸钠; 埃本膦酸钠; 治疗

Evaluation of therapeutic effect of drug intervention on osteoporosis in ovariectomized rats TAO Yonghui, TAN Cheng, CAI Gangming, et al. National Laboratory of Nuclear Medicine, Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China

【Abstract】 Objective To evaluate the therapeutic effect of alendronate, ibandronate and Taishu on osteoporosis in ovariectomized rats. Methods Osteoporotic rat models were established by ovariectomy. The rats were divided into four groups randomly: alendronate, ibandronate, Taishu, a preparation of chlorotrianisene, and control groups. The treatment groups were fed with the above drugs for consecutive six months. The whole body bone mineral density (BMD) was measured three times during the treatment. After the treatment was finished, the dry weight, ash weight, calcium and phosphorus contents of femoral bone were measured, and histomorphometry of lumbar spine and tibia was performed. Results The whole body BMD after the treatment with alendronate and ibandronate increased by 6.49% and 7%, respectively, while the increasing rate in Taishu group was 1.7%, and no increase was found in the control group. The dry weight, ash weight, calcium and phosphorus contents of the femoral bone, and the trabecula area in ibandronate group were all higher than in other groups. Conclusion Ibandronate, which is better than alendronate, has therapeutic effect on osteoporosis.

【Key words】 Osteoporosis; Alendronate; Ibandronate; Therapy

骨质疏松症是常见的老年病之一,是严重危害老年人健康、致残的重要原因,随着人类社会的老齡化趋势,骨质疏松症的防治日益重要。目前用于防治骨质疏松症的药物可分三类:第一类是抗骨吸收药物,如雌激素、降钙素、双膦酸盐等;第二类是促进骨形成的药物如氟化物、甲状旁腺激素等;第三类是矿化作用的药物,如钙剂和维生素D活性剂等^[1]。由于骨质疏松症的主要病理生理机制为破骨细胞所介导的骨吸收增加,因此国内外学者更加注重抑制

骨吸收类药物的开发和研究^[2]。我们以去势雌性SD大鼠为骨质疏松症实验模型,考察了我室合成的两种双膦酸盐阿仑膦酸钠、埃本膦酸钠及雌激素替代品泰舒对绝经后骨质疏松症的治疗作用。

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室自行合成,纯度均 $\geq 97\%$ 。泰舒为苏州第一制药厂产品。茶油为上海第九制药厂产品。硫酸妥钠为上海新亚药业有限公司产品。基准级碳酸钙为无锡羊尖化学厂产品。雌激素和雄激素放射免疫分析试剂盒为美国

基金项目:卫生部科研基金项目资助(98-2-318)

作者单位:214063 无锡,江苏原子医学研究所

DPC 公司产品。骨钙素、降钙素和甲状旁腺激素放射免疫分析试剂盒为中国原子能研究院产品。其余试剂均为国产分析纯。

雌性 SD 大鼠由南通医学院提供,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。SD 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%。其中钙含量为 1.01%,磷为 0.78%。SD 大鼠低钙饲料配方:玉米和小麦各占 31%,豆饼 31.5%,鱼粉 2.5%,奶粉 1.67%,鱼肝油 1%,豆油 1%和食盐 0.5%。经测定,饲料中水份占 12.1%,蛋白质 19.94%,粗脂肪 5.11%,总糖 46.88%,灰份 15.19%,其中钙含量 0.36%,磷为 0.53%。主要仪器有 DEXA 骨密度仪(DPX-IQ240),Lunar 公司产品。CX4CE 全自动生化分析仪,美国 Beckman 公司产品。

2. 骨质疏松症模型建立

12 周龄雌性 SD 大鼠 41 只,1%硫酸妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉后,行卵巢切除术(OVX)。手术切除后经病理学证实为大鼠卵巢组织,且包膜完整。术后低钙饲料饲养 4 个月。术前和术后 2 和 4 个月取血清进行放射免疫分析雌二醇、雌三醇、孕酮、睾酮、骨钙素、降钙素和甲状旁腺激素,并进行全身 BMD 定量,确诊骨质疏松症发生。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 5 只。

3. 药物干预方案

36 只经筛选的骨质疏松症模型大鼠,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,两组每日灌喂一次,给药剂量分别为 5 mg/kg 和 1 mg/kg^[3-5];C 组为泰舒组(用茶油溶解泰舒),按 1 mg/kg 体重每周灌喂 2 次;D 组为对照组,每日灌喂适量生理盐水。上述各组饲料均为 SD 大鼠普通饲料。每周称量 SD 大鼠体重一次,计算新的给药量,持续处理 6 个月。

4. 骨密度测定

分别于药物干预前、干预后 2 个月和后 6 个月将大鼠麻醉,用 DEXA 骨密度仪测定全身骨密度(BMD)。最后一次骨密度测定后,处死大鼠,取右侧股骨、腰椎离体测定 BMD。

5. 骨干、灰重及骨钙、磷含量分析

(1)药物干预 6 个月后处死所有 SD 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,置于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,置于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。

(2)将各灰化样品磨碎,精确称取 0.1g 左右的样品,用 3 ml 4 mol/L HCl 充分溶解后,用蒸馏水定容至 500 ml;同法制备钙、磷标准品及空白对照品。用 CX4C 全自动生化分析仪测定各样品的钙、磷含量。

(3)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(测绘条件为弯曲跨距 24 mm,试验速度 10 mm/min)。取第 4 腰椎(L₄)和左胫骨上 1/3 段,戊二醛固定,制成骨切片,观察骨组织形态结构的变化并测量骨小梁面积。

结 果

1. 模型动物死亡率分析

在药物干预期间,共有 8 只模型动物死亡。其中麻醉意外死亡 4 只,分布在 D 组 2 只和 A 组 2 只;肺炎死亡 2 只,分布在 B 组和 D 组;C 组因灌喂操作失误,呛死 1 只;A 组不明原因死亡 1 只。从 4 组模型动物在药物干预期间的一般情况看,A 组精神萎靡,体重持续性下降,其中最严重者体重下降达 27%。说明本实验剂量下阿仑膦酸钠对消化道的毒性很严重。

2. 模型动物药物干预期间的骨密度分析

全身 BMD 分析显示 D 组最低,符合实验设计的要求。动态观察发现 A 组和 B 组随着药物干预时间的延长,全身 BMD 持续增高;B 组平均净增加达 7% (Dunnett 法作统计分析,与对照组比较 $P < 0.01$);A 组也平均增加了 6.49% (与对照组比较 $P < 0.01$),C 组仅上升了 1.7% (与对照组比较差异无统计学意义);对照组 D 组变化不显著(图 1)。

3. 模型动物药物干预后骨生物力学分析

左股骨干重和灰重测量显示 A 组、B 组和 C 组均高于 D 组,且以 B 组最高。骨钙磷含量和钙磷比分析发现前三组均高于 D 组,尤以 A 组和 B 组较突

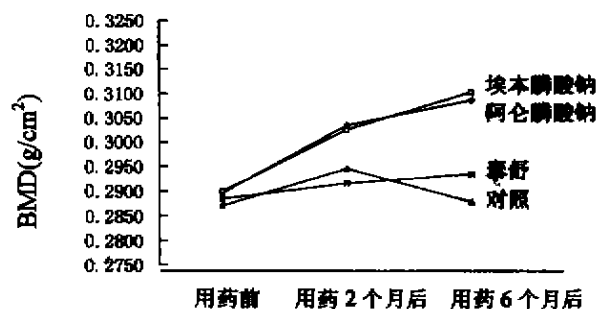


图 1 模型动物药物干预前后骨密度的变化

出。弯曲载荷测定表明 B 组和 A 组为优, C 组未有改善(表 1)。

2.4 模型动物药物预后骨组织形态计量学分析

各组骨切片镜下形态学显示 A 组和 B 组骨显微结构改善明显, 骨小梁连结性较好, 饱满和粗壮; 髓腔内造血细胞数量较多。C 组和 D 组骨小梁纤细、连结性差(图 2)。

骨小梁面积测绘视野面积为 $66\ 100\ \mu^2$, 各组的骨小梁面积见表 2。

表 1 模型动物药物干预后骨生物力学(均以 $\bar{x} \pm s$)

组别	阿仑膦酸钠 (n = 6)	埃本膦酸钠 (n = 8)	泰舒 (n = 8)	对照 (n = 6)
股骨干重(g)	0.561 ± 0.054	0.591 ± 0.048	0.496 ± 0.058	0.469 ± 0.029
股骨灰重(g)	0.406 ± 0.039	0.425 ± 0.045	0.354 ± 0.045	0.332 ± 0.021
骨钙含量 (mmol/L/g 灰重)	17.855 ± 0.239	17.568 ± 0.093	17.596 ± 0.2630	17.507 ± 0.095
骨磷含量 mol/L/g 灰重	9.608 ± 0.078	9.576 ± 0.144	9.990 ± 0.734	10.961 ± 0.116
骨钙磷比	1.858	1.835	1.761	1.597
骨弯曲载荷(N)	100.1 ± 14.08	113.1 ± 14.19	97.20 ± 14.74	90.24 ± 7.47

表 2 模型动物药物预后骨组织形态计量学(均以 $\bar{x} \pm s$)

骨小梁面积 (μ^2)	阿仑膦酸钠组 (n = 6)	埃本膦酸钠组 (n = 8)	泰舒组 (n = 8)	对照组 (n = 6)
第 4 腰椎	49.32 ± 12.75	56.43 ± 9.76	40.89 ± 8.53	38.53 ± 0.04
胫骨	67.21 ± 26.81	68.04 ± 35.2	45.05 ± 1.00	48.44 ± 13.56

统计分析表明(Student-Newman-Keuls 法)埃本膦酸钠组与阿仑膦酸钠组第 4 腰椎差异有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

在绝经后骨质疏松症(I 型)的治疗用药研究中,激素替代疗法(HRT)可抑制骨丢失已得到肯定^[6]。成骨细胞存在雌激素受体的确证为 HRT 的使用提供了理论基础,但副作用的顾虑(主要是雌激素依赖性肿瘤、肝功能障碍、血栓形成倾向者等)使 HRT 的应用受到限制^[7]。泰舒的基本结构是氯烯雌酚醚,是一种非甾体类的拟雌激素药物,临床上主要用于妇女更年期综合症的症状缓解,它能否抑制雌激素低落时的骨丢失现象颇受关注^[7]。本实验结果

显示,泰舒对去势骨质疏松症大鼠模型的骨丢失略有作用。它的基本观察指标均较对照组略好,但统计差异不显著。提示这种非甾体类拟雌激素化合物虽然有妇科疾病治疗的有效性,但对骨质疏松症的防治作用尚不能肯定。

埃本膦酸钠和阿仑膦酸钠都是含氮的双膦酸盐类药物。它们可选择性地吸附在骨矿物表面,干扰破骨细胞的作用,多途径地影响破骨细胞介导的骨吸收^[8]。迄今它们的确切机理尚未明了,多数学者认为它们不能被机体代谢,当被破骨细胞内吞后,可通过影响甲羟戊酸途径等干扰破骨细胞的形态、细胞骨架重排和膜折叠,引起细胞凋亡,抑制骨吸收^[9]。根据埃本膦酸钠和阿仑膦酸钠对抑制骨吸收

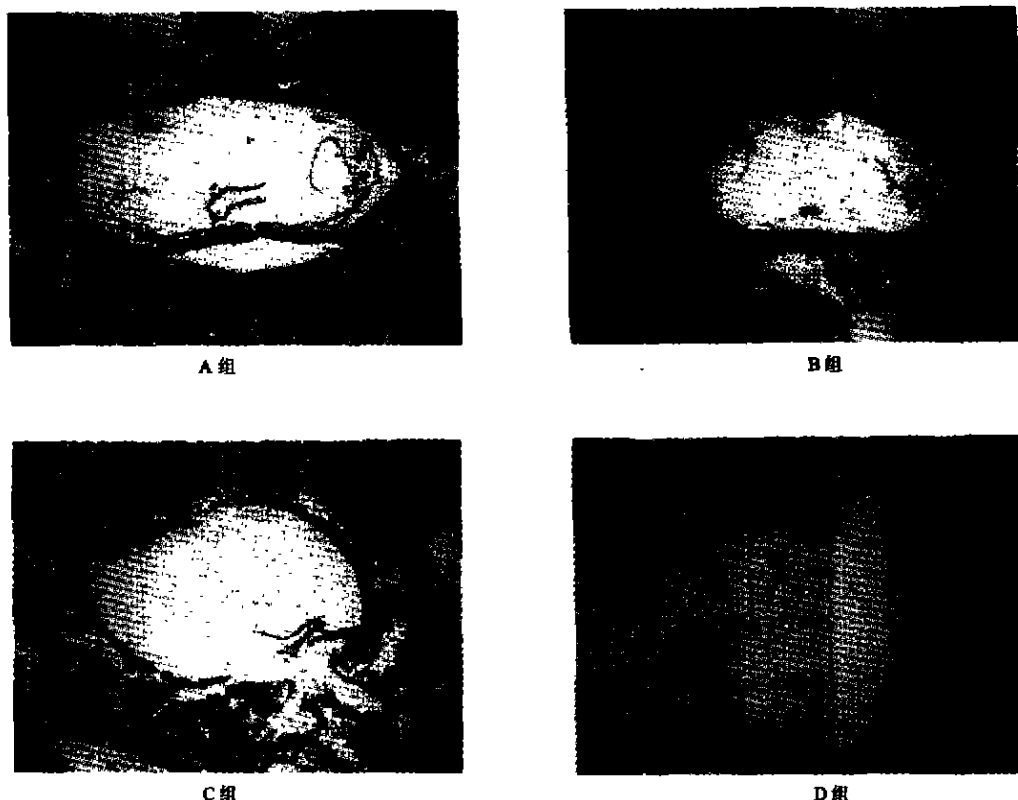


图2 模型动物药物干预后腰椎(L₄)骨切片图

效能的不同^[10],我们分别设计了它们的治疗剂量(1 mg/kg 和 5 mg/kg)^[3-5]。本实验的结果表明,两者均有抑制骨吸收,增加骨量的作用;同组自身药物干预前后比较,全身动态 BMD 有高度显著性差异($P < 0.01$);与对照组比较也有高度显著性差异($P < 0.01$)。我们观察到阿仑膦酸钠对消化道有一定毒性,可能会影响到实验组大鼠的钙摄入,造成组间差异,我们根据监视其体重来确定相应给药量以尽量减小差异,并认为单纯钙摄入量的因素不足以影响骨密度的较大变化。综合骨密度、骨物理和生物力学参数、骨组织形态计量学结果看,埃本膦酸钠较阿仑膦酸钠对骨质疏松症的治疗效果略佳,毒副作用更小。

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协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分的测定;江苏省江原医院王铁生教授协助完成骨病理切片

参 考 文 献

1 金世鑫,丁桂芝,周勇,等.药物治疗.见:刘忠厚,主编.骨质疏

松学.北京:科学出版社,1998.234-291.

- 2 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.
- 3 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.
- 4 Raven P, Christensen JO, Baumann M, et al. Changes in biochemical markers and bone mass after withdrawal of ibandronate treatment: prediction of bone mass changes during treatment. Bone, 1998,22:559-564.
- 5 Schlosser K, Scigalla P. Biochemical markers as surrogates in clinical trials in patients with metastatic bone disease and osteoporosis. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1997,227:21-28.
- 6 Watts NB. Postmenopausal osteoporosis. Obst Gynecol Surv, 1999,54:532-538.
- 7 徐苓.雌激素.见:刘忠厚,主编.骨质疏松学.北京:科学出版社,1998.251-254.
- 8 Watts NB. Treatment of osteoporosis with bisphosphonates. Endocrinol Metab Clin North Am, 1998,27:419-439.
- 9 Russell RG. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. Bone, 1999,25:97-106.
- 10 Bell NH, Johnson RH. Bisphosphonates in the treatment of osteoporosis. Endocrine, 1997,6:203-206.