

· 药物研究 ·

XW630 对去势大鼠骨组织力学性能及骨小梁结构参数的影响

费伟 王大章 郑虎 翁玲玲

【摘要】 目的 探讨抗骨质疏松新药 XW630 对去势大鼠骨组织力学性能及骨小梁结构参数的影响。**方法** 3月龄 SD 雌性大鼠 36 只,随机分为 Sham 组、OVX 组、OVX + CFT 组和 OVX + XW630 组,每组 3 只。取左侧股骨作三点弯曲力学强度测试,左侧胫骨作骨小梁结构参数测定。**结果** 整个观察期内,OVX 组股骨三点弯曲强度呈下降趋势,与 Sham 组存在显著性差异 ($P < 0.01$),两个治疗组骨强度则呈上升趋势,与 OVX 组存在显著性差异 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。胫骨骨小梁结构参数测定结果显示,OVX 组骨形成参数 (V_v , Tb , Tb , Tb , N) 逐渐下降,而骨吸收参数 (Tb , Sp) 逐渐增加,呈骨量丢失状态,而两个治疗组骨形成参数逐渐增加,骨吸收参数逐渐下降,与 OVX 组之间存在显著性差异 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。两个治疗组同期各项测定结果无显著性差异 ($P > 0.05$)。**结论** XW630 能有效地促进去势大鼠骨组织的成骨和预防骨质疏松性骨折的发生,显示出良好的应用前景。

【关键词】 骨质疏松症; 去势术; 参数; 骨质量

Effect of XW630 on mechanical properties and trabecular structure parameters of bone tissue in ovariectomized rats FEI Wei, WANG Dazhang, ZHENG Hu, et al. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of anti-osteoporotic new drug XW630 on mechanical properties and trabecular structure parameters of bone tissue in ovariectomized rats. **Methods** Thirty-six female SD rats, three months old, were randomly divided into sham-operated group (sham), ovariectomized group (OVX), estrogen-therapy group (OVX + CFT) and XW630-therapy group (OVX + XW630). Three rats in each group were killed at 30, 60, 90 days after operation. The left femora were taken for three-point bending resistance tests, and left tibiae were taken for trabecular structure parameter tests. **Results** During the observation period, the three-point bending resistance of OVX group gradually decreased and there was a significant difference compared with sham group ($P < 0.01$), while the three-point bending resistance of two therapy groups gradually increased, which was significantly different from that of OVX group ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). Results of trabecular structure parameter tests showed that V_v , Tb , Tb , Tb , N gradually decreased while Tb , Sp gradually increased in OVX group, which indicated the state of bone loss. There were significant differences between OVX group and two therapy groups ($P < 0.05$ and $P < 0.01$), of which the bone formation parameters increased and bone absorption parameters decreased gradually. At the same stage, there was no significant difference between OVX + CFT group and OVX + XW630 group ($P > 0.05$). **Conclusion** XW630 can effectively promote osteogenic action and prevent osteoporotic fracture in ovariectomized rats, which indicates a widespread prospect in use of XW630 as a new anti-osteoporosis drug.

【Key words】 Osteoporosis; Ovariectomy; Parameters; Bone quality

临床上最为常见的骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是绝经后骨质疏松症, 亦称 I 型骨质疏松症, 它是绝经后妇女的一种常见病、多发病, 严重地威胁着

中老年人的身体健康, 由此引起的骨折除给患者本人造成极大的痛苦外, 给社会和家庭也带来沉重的经济和生活负担。据报道, 美国每年由于 OP 造成的经济损失达近百亿美元。我国老年人的绝对数量占世界第 1 位, 并随着生活水平的提高和人口寿命的增长, 我国的老龄人口正急剧增多。因此, 作为老年疾病之一的骨质疏松症的预防和治疗显得十分重要

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (39430120)

作者单位: 610072 成都, 四川省人民医院口腔颌面外科 (费伟); 610041 四川大学华西口腔医学院颌面外科 (王大章), 四川大学华西医学院药物化学研究室 (郑虎、翁玲玲)

要。

雌激素替代治疗 (estrogen replacement therapy, ERT) 是目前国际公认的预防和治疗绝经后骨质疏松症的首选疗法, 同时也是目前被认为能降低骨质疏松性骨折发生率的唯一药物^[1,2]。本研究在抗骨质疏松新药 XW630 促进去势大鼠骨组织成骨获得初步肯定作用的基础上^[3], 旨在进一步探讨 XW630 对去势大鼠骨组织力学性能及骨小梁结构参数的影响。

材料和方法

1. 主要试剂: XW630 系四川大学华西药学院郑虎教授研究室合成的抗骨质疏松新药, 已获中华人民共和国专利 ZL94111687.5 和美国专利 US5698542; 雌酚酮 (CFT) 由四川大学华西骨质疏松研究实验室提供。

2. 实验动物及分组: 3 月龄 SD 雌性大鼠 36 只, 体重 200 g 左右, 由四川大学华西动物实验中心提供。适应性饲养 1 周后, 随机按 30、60、90 d 观察期分为 3 组, 每组 12 只。同一观察期的动物随机分为 4 组: (1) 正常对照组 (Sham); (2) 空白对照组 (OVX); (3) OVX + 雌酚酮组; (4) OVX + XW630 组, 每组 3 只。

3. 去势大鼠动物模型的制备: 以 2.5% 戊巴比妥钠按 10~15 mg/kg 行腹腔内麻醉, 按外科手术常规备皮、消毒, 切开暴露输卵管, 顺输卵管找到双侧卵巢后完整切除即建立 OVX 去势动物模型。正常对照组在找到卵巢后即分层缝合, 关闭创口。术后两周, 治疗 I 组动物每天按雌酚酮 3.8 mg/kg 灌胃 1 次, 治疗 II 组动物按 XW630 12 mg/kg 灌胃 1 次, Sham 组和 OVX 组则予以等量生理盐水。术后 30、60、90 d 各处死 1 组动物, 取左侧股骨作三点弯曲力学测试, 左侧胫骨作骨小梁结构参数测定。

4. 三点弯曲力学测试: 新鲜股骨标本置于 YJD-

I 型应变力学测试仪上测试, 以股骨近 3/5 和远 2/5 交接部为加力点, 支点跨距为 2.0 cm, 加载速度为 1 mm/min, 直至骨折, 并制作相应的应力-应变曲线。

5. 骨小梁结构参数测定: 以金刚砂片切取左侧胫骨干中段 1 cm 大小骨段, 标本置于 10% 甲醛溶液中固定 24 h, EDTA 溶液中脱钙 1 周, 经乙醇逐级脱水, 石蜡包埋, 沿骨长轴方向连续切片, HE 染色, 从中等距抽取 3 张供体视学测量。体视学测量在川北医学院新型体视学测量系统上完成, 所用显微镜系 Olympus BX-50 型生物显微镜, 通过装载在显微镜上的摄像机将切片图像摄入, 经图形数字化仪输入 win-95 平台支持的电脑中并转换成图像显示在显示屏上, 然后通过图像上迭加各种体视学测试网格来进行测量分析。所测骨小梁结构指标包括截面骨小梁平均体积分数 (Vv)、骨小梁平均厚度 (Tb.Th)、骨小梁平均数目 (Tb.N) 及骨小梁平均分隔距离 (Tb.Sp)。

6. 统计学处理: 所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异显著性采用 q 检验进行统计学分析。

结 果

1. 三点弯曲力学测试

表 1 示不同时期各组股骨三点弯曲强度测试结果。整个观察期间, OVX 组股骨三点弯曲强度呈下降趋势, 与 Sham 组之间存在显著性差异 ($P < 0.01$), 而两个治疗组股骨三点弯曲强度则呈逐渐上升趋势。CFT 治疗组术后 30 d、60 d 与 Sham 组之间存在显著性差异 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 至术后 90 d 则接近正常, 且与 OVX 组之间存在差异 ($P < 0.05$)。XW630 治疗组仅术后 30 d 与 Sham 组之间存在差异 ($P < 0.05$), 术后 60 d 即接近正常, 术后 90 d 其强度恢复至正常, 且与 OVX 组之间存在显著性差异 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。两个治疗组同期股骨三点弯曲强度差异无显著性 ($P > 0.05$)。

表 1 不同时期各组股骨三点弯曲强度 (MPa) 测定值 ($\bar{x} \pm s$), $n = 3$

时间 (d)	Sham 组	OVX 组	OVX + CFT 组	OVX + XW630 组
30	424.65 ± 14.23	370.92 ± 11.23 ^{**}	376.86 ± 16.68 ^{**}	382.38 ± 12.02 [*]
60	430.23 ± 9.80	354.86 ± 13.54 ^{**}	388.43 ± 14.09 [*]	406.56 ± 12.16 [△]
90	426.46 ± 11.96	336.90 ± 14.67 ^{**}	401.73 ± 10.33 [△]	428.29 ± 12.49 ^{△△}

注: 与 Sham 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 OVX 组比较 [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

2. 骨小梁结构参数测定

表 2~5 示不同时期各组胫骨骨小梁结构参数测定结果。OVX 组骨小梁平均体积分数 (Vv)、厚度

(Tb.Th)、数目 (Tb.N) 均逐渐减少, 而骨小梁平均分隔距离 (Tb.Sp) 逐渐增加, 与 Sham 组之间存在显著性差异 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。两个治疗组骨小梁

平均体积分数(V_v)、厚度($Tb.Th$)、数目($Tb.N$)均逐渐增加,而骨小梁平均分隔距离($Tb.Sp$)逐渐减少,表明 CFT 和 XW630 均促进去势大鼠骨组织成骨,与 OVX 组之间存在显著性差异($P < 0.05$ 和 $P <$

0.01)。整个观察期内,XW630 治疗组成骨作用稍优于 CFT 治疗组,但两者同期各项骨小梁结构参数测定值之间无显著性差异($P > 0.05$)。

表 2 不同时期各组胫骨骨小梁平均体积分数($V_v, \%$)($\bar{x} \pm s$), $n = 9$

时间(d)	Sham 组	OVX 组	OVX + CFT 组	OVX + XW630 组
30	40.20 $\pm$ 3.28	32.86 $\pm$ 3.15 [*]	33.79 $\pm$ 3.24 [*]	34.25 $\pm$ 3.21
60	40.67 $\pm$ 3.02	25.34 $\pm$ 3.32 ^{**}	35.60 $\pm$ 3.09 [△]	36.08 $\pm$ 3.25 [△]
90	40.88 $\pm$ 3.21	17.65 $\pm$ 3.20 ^{**}	37.54 $\pm$ 3.16 ^{△△}	38.67 $\pm$ 3.42 ^{△△}

注:与 Sham 组比较^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与 OVX 组比较[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

表 3 不同时期各组胫骨骨小梁平均厚度($Tb.Th, \mu m$)($\bar{x} \pm s$), $n = 9$

时间(d)	Sham 组	OVX 组	OVX + CFT 组	OVX + XW630 组
30	36.95 $\pm$ 1.64	28.74 $\pm$ 1.71 [*]	30.87 $\pm$ 1.74 [*]	33.50 $\pm$ 1.67
60	36.89 $\pm$ 1.57	26.52 $\pm$ 1.84 ^{**}	34.26 $\pm$ 1.80 [△]	36.95 $\pm$ 1.85 ^{△△}
90	37.20 $\pm$ 1.72	24.41 $\pm$ 1.68 ^{**}	37.58 $\pm$ 1.65 ^{△△}	40.12 $\pm$ 1.90 ^{△△}

注:与 Sham 组比较^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与 OVX 组比较[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

表 4 不同时期各组胫骨骨小梁平均数目($Tb.N, 1/mm$)($\bar{x} \pm s$), $n = 9$

时间(d)	Sham 组	OVX 组	OVX + CFT 组	OVX + XW630 组
30	4.63 $\pm$ 0.08	2.76 $\pm$ 0.09 [*]	3.01 $\pm$ 0.10 [*]	3.24 $\pm$ 0.08
60	4.60 $\pm$ 0.07	1.95 $\pm$ 0.11 ^{**}	3.49 $\pm$ 0.08	3.70 $\pm$ 0.12 [△]
90	4.66 $\pm$ 0.09	1.08 $\pm$ 0.10 ^{**}	4.02 $\pm$ 0.09 ^{△△}	4.21 $\pm$ 0.10 ^{△△}

注:与 Sham 组比较^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与 OVX 组比较[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

表 5 不同时期各组胫骨骨小梁平均分隔距离($Tb.Sp, mm$)($\bar{x} \pm s$), $n = 9$

时间(d)	Sham 组	OVX 组	OVX + CFT 组	OVX + XW630 组
30	24.08 $\pm$ 2.32	40.76 $\pm$ 2.45 [*]	35.42 $\pm$ 2.50	33.59 $\pm$ 2.43
60	24.25 $\pm$ 2.48	63.39 $\pm$ 2.64 ^{**}	32.07 $\pm$ 2.46 ^{△△}	29.73 $\pm$ 2.65 ^{△△}
90	24.16 $\pm$ 2.44	85.50 $\pm$ 2.78 ^{**}	28.46 $\pm$ 2.43 ^{△△}	25.78 $\pm$ 2.35 ^{△△}

注:与 Sham 组比较^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与 OVX 组比较[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

讨 论

骨质疏松症是以全身系统性骨量减少、骨组织显微结构退变为特征的慢性代谢性骨病。通常成人在 40 岁以前,骨吸收与骨形成大致相等,全身骨量处于正常生理动态平衡。随年龄增长,尤其妇女绝经后相对骨吸收大于骨形成,导致骨量减少,从而引起 OP 的发生^[4]。ERT 能有效地预防和治疗绝经后骨质疏松症已得到理论和实践的证实,并为绝大多数学者所认同。然而,由于骨组织与子宫内膜和乳腺组织中所含雌激素受体的结构同源性^[5,6],致使临床上应用雌激素治疗 OP 的同时,引起接受 ERT 病员罹患子宫内膜癌和乳腺癌的危险性增加^[7-9],在很大程度上限制了雌激素的应用。如何利用雌激素的强效抗 OP 作用而减少其在非骨组织中的副作

用,一直是学者们努力研究并亟待解决的重要课题。

国内郑虎教授研究室根据四环素对骨组织的极强亲和性及其潜在的成骨作用,将哌嗪雌酮与四环素通过桥连接方式而合成了一种新型的抗骨质疏松化合物 2-(3-雌酮-N-乙基哌嗪甲基)四环素即 XW630,使之主要作用于骨组织,而对非骨组织的不良作用极度降低,从而为临床治疗 OP 提供了一条新的途径。美国食品药品监督管理局(FDA)认为评价一种新型抗骨质疏松药物的有效性,主要根据该药物对骨质量(bone quality)的影响^[10]。骨质量包括骨强度、骨结构和骨量 3 个方面。单纯骨矿盐含量的增加,骨质量并不一定相应的增加,有的反而降低^[11]。本研究对去势大鼠股骨的三点弯曲力学测试结果表明,OVX 组股骨强度呈下降趋势,与 Sham 组存在显著性差异($P < 0.01$)。应用 CFT 和 XW630 治疗后,

去势大鼠股骨强度逐渐增大,其中,XW630组术后60 d 股骨强度已与 Sham 组接近,与 OVX 组之间存在差异($P < 0.05$),且高于 CFT 组,而术后 90 d 股骨强度则恢复至正常。由此可见,XW630 具有预防骨质疏松性骨折发生的作用。

骨组织的力学特性不仅决定于骨质密度,还与骨小梁的微观结构有着非常密切的关系^[12,13]。骨小梁体积分数(Vv)、骨小梁厚度(Tb、Th)、骨小梁数目(Tb、N)、骨小梁分隔距离(Tb、Sp)等参数指标可以反映骨小梁的基本结构特点及其与骨组织整体结构的关系。本研究对不同时期各组胫骨骨小梁结构参数测定结果显示,OVX 组的 3 个骨形成参数 Vv、Tb、Th、Tb、N 均逐渐下降,而骨吸收参数 Tb、Sp 则逐渐增加,表明骨吸收大于骨形成,呈骨量丢失状态。两个治疗组骨形成参数均逐渐增加,而骨吸收参数则逐渐减小,与 OVX 组比较存在不同的显著性差异($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),表明 CFT 和 XW630 均有促进去势大鼠骨组织成骨的作用。其中,XW630 组胫骨骨小梁平均厚度(Tb、Th)测定值在术后 90 d 高于正常对照组,这一结果与其相应的组织学和 SEM 观察结果相符,表明 XW630 促进去势大鼠骨组织的成骨作用较雌酚酮强,至术后 90 d,骨小梁数目基本恢复至正常,且骨小梁的形态更显粗壮^[3]。由此可见,XW630 可以有效地促进去势大鼠骨组织的成骨和预防骨质疏松性骨折的发生,预示着 XW630 有可能成为临床上广泛应用的新一代抗骨质疏松症和促进

骨修复的药物。

参 考 文 献

- 1 涂桂生 防治骨质疏松症药物研究进展. 化学医药工业信息, 1995, 11(7): 1-5.
- 2 Riggs BL. Tibolone as an alternative to estrogen for the prevention of postmenopausal osteoporosis in selected postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab, 1996, 81: 2417-2418.
- 3 费伟, 王大章, 郑虎, 等 XW630 促进去势大鼠骨组织成骨作用的实验研究. 华西口腔医学杂志, 2001, 19(6): 383-387.
- 4 Riggs BL, Melton LJ. Involutional osteoporosis. N Engl J Med, 1986, 314: 1676-1680.
- 5 Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. Science, 1988, 214: 84-86.
- 6 Komm BS, Terperung CM, Benz DJ, et al. Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. Science, 1988, 214: 81-84.
- 7 Grady D, Gebretsadik T, Kerlikowske K, et al. Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. Obstet Gynecol, 1995, 85: 304-313.
- 8 Rubin G, Peterson H, Lee N, et al. Estrogen replacement therapy and the risk of endometrial cancer. Am J Obstet Gynecol, 1990, 162: 148-154.
- 9 Steinberg K, Thacker S, Smith S, et al. A meta-analysis of the effect of estrogen replacement therapy on the risk of breast cancer. JAMA, 1991, 265: 1985-1990.
- 10 Thompson DD, Simon HA, Pirie CM, et al. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. Bone, 1995, 17(4S): 125S-133S.
- 11 SØgaard CH, Mosekilde L, Schwartz W, et al. Effect of fluoride on rat vertebral body biomechanical competence and bone mass. Bone, 1995, 16: 163-168.
- 12 Dempster DW, Ferguson-Pell MW, Mellish RWE, et al. Relationships between bone structure in the iliac crest and bone structure and strength in the lumbar spine. Osteoporos Int, 1993, 3: 90-96.
- 13 Odgaard A. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. Bone, 1997, 20: 315-328.