

复方尼尔雌醇片预防去卵巢大鼠骨质疏松的实验研究

廖慧娟 廖二元 伍贤平 刘锡玖 孙瑞元

【摘要】 目的 探讨复方尼尔雌醇片(Compound nylestriol tablet, CNT;每片含尼尔雌醇 0.5 mg,左炔诺酮 0.15 mg)对去卵巢(OVX)大鼠骨质疏松的预防作用。方法 建立 OVX 大鼠骨质疏松模型,分组剂量予以 CNT,尼尔雌醇和左炔诺酮治疗 14 周,观察其对全身、左股骨骨密度校正指数(ADJBMD;adjusted bone mineral density),骨 Ca、P 和血清 Ca、P、ALP 的影响。结果 CNT 0.039 ~ 0.39 mg/kg 可增加全身及离体左股骨 ADJBMD,且具有剂量依赖性;CNT 0.117 ~ 0.39 mg/kg 可增加骨 Ca 含量,增高血 Ca 水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。单用 CNT 中所含相应剂量的尼尔雌醇,也可增加 ADJBMD,增加骨 Ca 含量及增高血 Ca 水平的作用,但程度不如 CNT。结论 CNT 对 OVX 大鼠骨质疏松模型有预防作用,其疗效优于单独使用尼尔雌醇及左炔诺酮。

【关键词】 复方尼尔雌醇片; 尼尔雌醇; 左炔诺酮; 去卵巢大鼠; 骨质疏松

Experimental study of compound nylestriol tablet on rats with osteoporosis induced by ovariectomy LIAO Huijuan, LIAO Eryuan, WU Xianping, et al. Institute of Metabolism and Endocrinology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of compound nylestriol tablet (CNT) which contains 0.5 mg of nylestriol(NYL) and 0.15 mg of levonorgestrel(LNG) per tablet on preventing osteoporosis in OVX rats. **Methods** Four-month-old SD rats were allotted to 12 groups ($n = 10$ each). Sham-operated and control OVX groups received vehicle, whereas other OVX groups received respectively CNT(0.039 mg/kg, 0.117 mg/kg, 0.390 mg/kg qod orally), NYL (0.03 mg/kg, 0.09 mg/kg, 0.30 mg/kg qod orally), LNG(0.009 mg/kg, 0.027 mg/kg, 0.090 mg/kg qod orally) and ethinylestradiol (0.014 mg/kg qod orally) for 14 weeks. Whole body adjusted bone mineral density (ADJBMD), left femoral ADJBMD *in vitro*, serum calcium (Ca)、phosphorus(P)、alkaline phosphatase (ALP), bone Ca、P were measured. **Results** 0.039-0.39 mg/kg CNT increased whole body ADJBMD and left femoral ADJBMD dose-dependently. Bone and serum Ca enhanced at 0.117 - 0.39 mg/kg ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Single use of nylestriol at the dose corresponding to that contained in CNT increased the ADJBMD, bone Ca and serum Ca as well, but did less than that of CNT. **Conclusion** CNT prevents bone loss in OVX rats, which is better than nylestriol alone or levonorgestrel does.

【Key words】 Compound nylestriol tablet; Nylestriol; Levonorgestrel; Ovariectomized rats; Osteoporosis

雌激素替代治疗(ERT)是目前防治雌激素缺乏所致疾病的首选用药,它不仅能缓解更年期症状,更能防治骨质疏松,还能降低心脑血管的突发性死亡率。但它最显著的不良反应用于子宫内膜增生和阴道流血。长期应用雌激素会增加子宫内膜癌的发生率,并与雌激素的种类、剂量和使用长短有关。合用

孕激素能防止子宫内膜增生,减少阴道流血;另一方面的一些研究认为,孕激素本身能诱导骨形成而起到防治骨质疏松的作用^[1-3]。本实验将以 OVX 大鼠为动物模型,探讨复方尼尔雌醇(Compound nylestriol tablet, CNT;每片含尼尔雌醇 0.5 mg,左炔诺酮 0.15 mg)对 OVX 大鼠骨质疏松的预防作用,同时与其中所含相应剂量的尼尔雌醇和左炔诺酮进行对比分析。

作者单位:410011 长沙,中南大学湘雅二医院代谢内分泌研究所(廖慧娟、廖二元、伍贤平);皖南医学院药物研究所(刘锡玖、孙瑞元)

材料和方法

一、材料和主要试剂

CNT为本研究所提供,批号:970503;尼尔雌醇为北京四环制药厂产品,批号:960528;左炔诺酮为北京第三制药厂产品,批号:940315;炔雌醇为上海信谊制药厂产品,批号:960301。骨磷测定试剂:钼酸铵为合肥工业大学化学试剂厂产品;钒酸铵为上海第三试剂厂产品。雌性SD大鼠购自中科院上海实验动物中心,合格证号:中科院动管会005号。饲养环境温度为 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$,通风良好,自然光照,自由进水进食(按下列配方制成标准饲料:粗面粉50%,鱼肝油1%,盐1%,碎米10%,麸皮10%,精米松5%,碳酸钙1%,鱼粉5%,豆饼17%)。主要仪器有QDR-4500A型扇形束DEXA骨密度仪(美国Hologic公司)及所附小动物梯级标准模型和分析软件,仪器分析大鼠全身、股骨BMD精密度(CV)分别为 $(0.71 \pm 0.44)\%$ 、 $(0.52 \pm 0.27)\%$ ^[4];722S分光光度计(上海分析仪器厂)SX-2.5-10 M马福氏炉(上海实验电炉厂)。

二、动物模型建立

4月龄雌性SD大鼠120只,体重 $(220 \pm 12)\text{g}$,随机分成12组。以3%戊巴比妥钠按 $0.1\text{ ml}/100\text{ g}$ 经腹腔注射麻醉,选任意一组行假性卵巢切除术设为正常对照组(Sham组),其余行卵巢切除术。术后16周出现骨质疏松。

三、模型干预方案

CNT人用剂量为1片 $0.65\text{ mg}/\text{周}$,按 65 kg 及动物折算系数计算出大鼠的有效剂量约 $0.07\text{ mg}/\text{kg}$,以此为中心剂量设置小剂量为 $0.039\text{ mg}/\text{kg}$,中剂量为 $0.117\text{ mg}/\text{kg}$,按中剂量增3.3倍取大剂量为 $0.39\text{ mg}/\text{kg}$ 。按CNT各剂量组中尼尔雌醇和左炔诺酮相应含量设置尼尔雌醇和左炔诺酮各剂量组。故12组分别为:①CNT小剂量组: $0.039\text{ mg}/\text{kg}$;②CNT中剂量组: $0.117\text{ mg}/\text{kg}$;③CNT大剂量组: $0.390\text{ mg}/\text{kg}$;④尼尔雌醇小剂量组: $0.03\text{ mg}/\text{kg}$;⑤尼尔雌醇中剂量组: $0.09\text{ mg}/\text{kg}$;⑥尼尔雌醇大剂量组: $0.30\text{ mg}/\text{kg}$;⑦左炔诺酮小剂量组: $0.009\text{ mg}/\text{kg}$;⑧左炔诺酮中剂量组: $0.027\text{ mg}/\text{kg}$;⑨左炔诺酮大剂量组: $0.090\text{ mg}/\text{kg}$;⑩炔雌醇组: $0.014\text{ mg}/\text{kg}$;⑪模型对照组(OVX组):等容量0.5%阿拉伯胶液;⑫正常对照组(Sham组):等容量0.5%阿拉伯胶液。根据大鼠与人的性周期比例,人每周用药1次,大鼠则取隔日给药1次,据体重调整药物剂量,术后2周开始连续给

药14周。

四、观察指标及方法

末次给药后24 h,将大鼠麻醉,用DEXA骨密度仪测定全身BMD,腹主动脉取血,分离血清,测定血钙(Ca)、血磷(P)、碱性磷酸酶(ALP)活性。处死后,取左侧股骨测定BMD,然后将该股骨浸入氯仿-乙醇(2:1)液中脱脂,每次3 h,共2次。置 120°C 烘箱中8 h,取出称干重。再将干骨置马福炉中,分别于 250°C , 400°C , 600°C 各加热30 min,最后 800°C 1 h灰化,置干燥器冷却30 min,称骨灰重。再将灰粉溶于浓盐酸-硝酸(20:3)液中,加热煮沸消解。用EDTA滴定法测定骨Ca含量,用磷钒钼黄分光光度法测定骨P含量。根据大鼠BMD和重量按下列公式计算出骨密度校正指数(Adjusted bone mineral density, ADJBMD)。

骨密度校正指数 = 骨密度/体重

五、统计学处理

数据用NDST软件进行统计分析,资料用 t 值法分析。

结 果

1.OVX组与Sham组比较,全身及离体左股骨ADJBMD、骨Ca、血Ca均降低($P < 0.05$);血P增高($P < 0.05$),见表1~3。

表1 CNT对OVX大鼠全身及离体左股骨ADJBMD的影响

组别	全身 ADJBMD	左股骨 ADJBMD
正常对照组(Sham组)	$0.651 \pm 0.055^*$	$0.729 \pm 0.056^{**}$
模型对照组(OVX组)	0.590 ± 0.040	0.627 ± 0.043
CNT大剂量组	$0.728 \pm 0.064^{**}$	$0.725 \pm 0.065^{**}$
CNT中剂量组	$0.705 \pm 0.034^{**}$	$0.763 \pm 0.062^{**}$
CNT小剂量组	$0.665 \pm 0.059^{**}$	$0.722 \pm 0.084^{**}$
尼尔雌醇大剂量组	$0.687 \pm 0.058^{**}$	$0.744 \pm 0.074^{**}$
尼尔雌醇中剂量组	$0.667 \pm 0.065^{**}$	$0.698 \pm 0.075^*$
尼尔雌醇小剂量组	$0.656 \pm 0.051^{**}$	$0.701 \pm 0.049^{**}$
左炔诺酮大剂量组	$0.662 \pm 0.043^{\Delta\Delta}$	$0.664 \pm 0.049^{\Delta\Delta}$
左炔诺酮中剂量组	$0.605 \pm 0.026^{\Delta\Delta}$	$0.647 \pm 0.040^{\Delta\Delta}$
左炔诺酮小剂量组	0.615 ± 0.043	0.664 ± 0.043
炔雌醇	$0.668 \pm 0.033^{**}$	$0.722 \pm 0.051^{**}$

注:与模型对照组(OVX组)比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与大剂量组比较: $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$;与相应剂量的CNT比较: $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

2.CNT大、中、小各剂量组均可增加全身及离体左股骨ADJBMD。两组显著性检验表明CNT对全身

ADJBMD的影响具有一定的剂量依赖性;尼尔雌醇也可增加ADJBMD,达到显著水平,但较相应剂量的CNT作用弱。左炔诺酮可增加ADJBMD,但未达到显著水平。炔雌醇可增加全身及离体左股骨ADJBMD($P < 0.01$),见表1。

3. CNT大、中剂量组均可增加骨Ca含量,与OVX组相比有显著意义。尼尔雌醇也可增加骨Ca含量,但无统计学差异,见表2。

表2 CNT对OVX大鼠骨Ca和骨P含量的影响

组别	Ca(g/100g 骨灰)	P(g/100g 骨灰)
正常对照组(Sham组)	41.15 ± 4.57*	19.21 ± 5.40
模型对照组(OVX组)	36.14 ± 4.37	18.42 ± 3.79
CNT大剂量组	40.95 ± 4.29*	20.84 ± 2.39
CNT中剂量组	39.86 ± 0.89*	18.92 ± 4.73
CNT小剂量组	38.41 ± 1.87	18.78 ± 2.89
尼尔雌醇大剂量组	39.37 ± 3.17	17.77 ± 2.41
尼尔雌醇中剂量组	39.68 ± 0.84*	18.73 ± 1.96
尼尔雌醇小剂量组	37.40 ± 1.40	19.45 ± 2.51
左炔诺酮大剂量组	38.91 ± 3.59	20.16 ± 2.78
左炔诺酮中剂量组	38.67 ± 4.98	18.75 ± 2.08
左炔诺酮小剂量组	38.12 ± 3.01	18.31 ± 1.69
炔雌醇	38.95 ± 2.54	21.20 ± 3.31

注:与模型对照组(OVX组)比较;* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4. CNT大剂量组血Ca比OVX组增加,差异有显著性。尼尔雌醇和左炔诺酮各剂量组对血Ca、血P和ALP的影响差异无显著性。炔雌醇升高血Ca有显著意义,对血P和ALP的影响无统计学意义,见表3。

表3 CNT对OVX大鼠血Ca、血P及ALP的影响

组别	Ca(mmol/L)	P(mmol/L)	ALP(U/L)
正常对照组(Sham组)	2.52 ± 0.34*	2.02 ± 0.44*	164.4 ± 31.0
模型对照组(OVX组)	2.24 ± 0.04	2.54 ± 0.37	187.9 ± 59.9
CNT大剂量组	2.34 ± 0.06**	2.38 ± 0.36	216.4 ± 60.2
CNT中剂量组	2.31 ± 0.10	2.53 ± 0.23	163.6 ± 52.2
CNT小剂量组	2.28 ± 0.11	2.57 ± 0.30	188.5 ± 45.0
尼尔雌醇大剂量组	2.28 ± 0.06	2.25 ± 0.32	176.5 ± 62.3
尼尔雌醇中剂量组	2.31 ± 0.12	2.50 ± 0.32	192.4 ± 68.7
尼尔雌醇小剂量组	2.29 ± 0.06	2.41 ± 0.64	178.8 ± 25.4
左炔诺酮大剂量组	2.28 ± 0.08	2.37 ± 0.23	165.0 ± 60.0
左炔诺酮中剂量组	2.24 ± 0.06	2.22 ± 0.27	184.2 ± 40.9
左炔诺酮小剂量组	2.19 ± 0.38	2.19 ± 0.38	185.7 ± 41.4
炔雌醇	2.38 ± 0.12*	2.47 ± 0.33	171.1 ± 63.1

注:与模型对照组(OVX组)比较;* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

OVX大鼠是目前最常用的绝经后骨质疏松小动物模型,且用DEXA骨密度仪可准确地测量大鼠BMD。本研究用OVX大鼠骨质疏松模型评价了复方尼尔雌醇片、尼尔雌醇及左炔诺酮预防骨质疏松的作用。在OVX大鼠实验中,由于大鼠处于生长期,体重尚未恒定,加上雌激素缺乏,大鼠活动减少,能量消耗下降以及进食增多等因素的影响使大鼠的体重明显增加,因体重与BMD正相关,这样,OVX大鼠伴随体重的增加其BMD升高就可能掩盖雌激素缺乏后骨丢失加快而引起的BMD降低^[5],为了排除体重增加给实验带来的偏差,该实验对最后结果进行体重校正,即用ADJBMD来评价骨量。由于OVX组的全身及离体左股骨ADJBMD、骨Ca、血Ca比Sham组有显著降低,血P显著增高,由此说明建立OVX大鼠骨质疏松模型是成功的。

ERT作为防治绝经后骨质疏松的一线疗法,疗效肯定。由于ERT的长期性将增加患乳腺癌和子宫内膜癌的危险,而且与雌激素的剂量及周期性用药密切相关,但合用孕激素可减少雌激素所致的子宫内膜增生,故目前有人主张采用小剂量雌孕激素联合持续给药^[6-9],这样不仅能通过抑制骨重建单位的活性来预防和减少由于雌激素缺乏导致的骨量丢失,还能减轻子宫内膜增生。据此,CNT在小剂量尼尔雌醇(0.5 mg/片)的基础上伍以0.15 mg/片的左炔诺酮对抗雌激素引起的子宫内膜增生而成为抗骨质疏松新药。

尼尔雌醇又名戊炔雌醇,是我国自行研制的长效、强效雌激素,为雌三醇(E_3)的衍生物,其血浆半衰期为20 h左右,缓慢释放,作用时间持久。皮下注射时尼尔雌醇的雌活性为 E_3 的230倍,口服时为 E_3 的510倍;不论皮下注射还是口服尼尔雌醇的雌活性均接近皮下注射 E_2 的雌活性。尼尔雌醇的特点是选择性作用于阴道和宫颈管,对子宫实体及子宫内膜的作用小,内膜增殖作用也弱于 E_2 。尼尔雌醇在抗骨质疏松方面不仅有抑制骨吸收,防止骨量丢失,同时有刺激骨形成,进一步增加骨量的作用,即使小剂量的尼尔雌醇也能够有效达到预防骨质疏松的目的,这与本实验中单用尼尔雌醇组的研究结果相似:增加OVX大鼠全身及左股骨ADJBMD,增加骨Ca含量及增高血Ca水平。

左炔诺酮属甲睾酮类合成孕激素,血浆半衰期为10~24 h,体内亦有储存,作用时间长。具有一定

抗雌激素活性,且能增加骨形成^[10]。但本实验单用CNT中所含相应剂量的左炔诺酮虽可增加OVX大鼠全身及左股骨ADJBMD,但无统计学意义,这可能与左炔诺酮剂量小(本实验主要用于抗尼尔雌醇致子宫内膜增生的作用),且药物干预时间不长有关。

CNT在0.039~0.39 mg/kg剂量范围内,可增加OVX大鼠全身及离体左股骨ADJBMD,且具有剂量依赖性;在0.117~0.39 mg/kg剂量范围内,可增加骨Ca含量,提高血Ca水平,这些作用均强于单用尼尔雌醇,由此说明左炔诺酮可能与尼尔雌醇协同作用而增强抗骨质疏松的效应,使骨量进一步增加,但机理目前尚不明确。

综上所述,我们认为复方尼尔雌醇片对OVX大鼠骨质疏松有预防作用,其中小剂量已对动物产生效应,大剂量是小剂量的10倍,动物可以耐受。作为复方制剂,其疗效优于单独使用尼尔雌醇及左炔诺酮。

参 考 文 献

- 1 Naessen T, Oesson SE, Gudmundson J. Differential effects on bone density of progestogen-only methods for contraception in premenopausal women. *Contraception*, 1995, 52: 35-39.
- 2 Cromer BA, Blair JMA, Mahan JD, et al. A prospective comparison of bone density in adolescent girls receiving depot medroxyprogesteron acetate, levonorgestrel, or oval contraceptives. *J Pediatr*, 1996, 129: 671-676.
- 3 任芸芸, 朱关珍. 孕激素对绝经后妇女骨质代谢的影响. *中华妇产科杂志*, 1995, 30: 135-137.
- 4 伍贤平, 廖二元, 陆泽元, 等. 双能X线吸收法测定大鼠骨量的评价及去卵巢骨丢失敏感区的选择. *中华内分泌代谢杂志*, 2000, 16: 212-215.
- 5 刘忠厚, 主编. 骨质疏松学. 北京: 科学出版社, 1998.
- 6 Prestwood KM, Kenny AM, Unson C, et al. The effect of low dose micronized 17 α -estradiol on bone turnover, sex hormone levels and side effects in older women: a randomized, double blind placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85: 4462-4469.
- 7 Heikkinen J, Vaheri R, Kainulainen P, et al. Long-term continuous combined hormone replacement therapy in the prevention of postmenopausal bone loss: a comparison of high- and low-dose estrogen-progestin regimens. *Osteoporos Int*, 2000, 11: 929-937.
- 8 Delmas PD, Confavreux E, Garnero P, et al. A combination of low doses of 17 beta-estradiol and norethisterone acetate prevents bone loss and normalized bone turnover in postmenopausal women. *Osteoporos Int*, 2000, 11: 177-187.
- 9 Alexandersen P, Riis BJ, Stakkestad JA, et al. Efficacy of levometaxifene in the prevention of postmenopausal bone loss and on the lipid profile compared to low dose hormone replacement therapy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86: 755-760.
- 10 Christiansen C, Riis BJ, Nilas L, et al. Uncoupling of bone formation and resorption by combined oestrogen and progestogen therapy in postmenopausal osteoporosis. *Lancet*, 1985, 1: 800-801.

(收稿日期: 2002-10-08)