

# 不同剂量 NO 供体防治骨质疏松大鼠的实验研究

镐英杰 陈凤苞 唐煜 裴福兴

**【摘要】 目的** 探讨不同剂量的 NO 供体(硝酸甘油)对去卵巢大鼠骨质疏松的防治作用。**方法** 4月龄雌性大鼠随机分为假手术组(SO组)和骨质疏松模型组,其中骨质疏松模型组待造模成功1周后,再随机分为骨质疏松组(OVX组)和低剂量硝酸甘油组(low dose nitroglycerin, LNG组)、中剂量硝酸甘油组(middle dose nitroglycerin, MNG组)以及高剂量硝酸甘油组(high dose nitroglycerin, HNG组)。于灌胃给药12周后测量各组大鼠全身骨密度,右侧股骨干重、灰重及灰分钙含量,并测量血清生化指标等参数。**结果** OVX组大鼠相比SO组股骨干重、灰重、灰分钙含量及血清NO、Ca含量下降,血清P含量升高;LNG和MNG组大鼠密度升高后,与OVX组相比除血清P水平下降其余检测指标均显著升高;HNG组大鼠与OVX组相比血清NO水平显著升高,其余指标经统计学处理差异无显著性。**结论** 低、中剂量硝酸甘油具有明显防治去卵巢大鼠骨质疏松作用而高剂量硝酸甘油不能阻止去卵巢大鼠骨质退化,骨量丢失。

**【关键词】** 骨质疏松症;去卵巢;一氧化氮;NO供体;硝酸甘油

**Effects of different doses of nitric oxide donor on prevention of rat osteoporosis** HAO Yingjie\*, CHEN Fengbao, TANG Yu, et al. Department of Orthopaedics, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

**【Abstract】 Objective** To study the preventive effects of nitric oxide donor (nitroglycerin) on rat osteoporosis. **Methods** Four-month-old female SD rats were randomized into sham-operated (SO) group and ovariectomized (OVX) group. One week later, the OVX rats were further randomized into OVX-induced osteoporosis (OVX) group, low dose nitroglycerin (LGN) group, middle dose nitroglycerin (MNG) group, and high dose nitroglycerin (HNG) group. After the treatment, the whole body bone mineral density (BMD) and bone metabolism-associated biochemical markers were determined. The dry weight, ash weight and calcium content of femoral bone were measured. **Results** Compared with SO group, the dry weight, ash weight, calcium content of femoral bone, and the serum level of calcium and NO were significantly lower, while the level of serum phosphorus was significantly higher. After BMD in LNG group and MNG group increased, level of serum phosphorus was significantly lower than that in OVX group, while the other markers were significantly higher. All the markers other than serum NO were not significantly different between HNG group and OVX group. **Conclusions** Low dose nitroglycerin and middle dose nitroglycerin prevent bone loss in OVX rats but high dose nitroglycerin does not prevent osteoporosis induced by ovariectomy.

**【Key words】** Osteoporosis; Ovariectomy; Nitric oxide; Nitric oxide donor; Nitroglycerin

骨质疏松症是一种常见的老年疾病,尤其以骨折风险性增高导致髋部、脊椎和腕部骨折。随着人口老龄化骨质疏松日益受到重视。目前对骨质疏松症多应用药物治疗,虽然治疗的药物种类较多但都存在一定的局限性。随着人们对NO与骨质疏松症

关系的深入研究,NO供体类药物作为一类新近被提出用于骨质疏松症治疗的药物。本研究应用不同剂量硝酸甘油防治去卵巢大鼠骨质疏松,目的为NO供体类药物防治骨质疏松症提供实验依据。

## 材料和方法

### 1. 实验动物

作者单位:610041 成都,四川大学华西医院骨科(镐英杰、裴福兴);郑州大学第一附属医院骨科(陈凤苞);郑州大学医学院(唐煜)

4月龄雌性SD大鼠50只,由河南省动物实验中心提供。

2. 骨质疏松模型制作

1%戊巴比妥钠(30 mg·kg<sup>-1</sup>体重)腹腔注射麻醉成功后俯卧固定,于无菌条件下在背侧正中切口,进入腹腔在肾下极附近找到卵巢,用4号线结扎并摘除双侧卵巢,分层缝合切口。动物术后不使用抗生素,任其自由活动,统一条件喂养。术后连续3d经阴道做细胞涂片,无角化者证实双侧卵巢切除完全,否则弃去不用。

3. 分组

将实验动物随机分为假手术组(SO组)10只和去卵巢骨质疏松模型组40只,待造模成功1周后再随机分为骨质疏松组(OVX组)10只和低剂量硝酸甘油组(LNG组)10只、中剂量硝酸甘油组(MNG组)10只以及高剂量硝酸甘油组(HNG组)10只。

4. 仪器与试剂

XR-36型双能X线骨密度仪(美国Norland公司生产)、101-3型烘干机(南通县农业科学仪器厂生产)、TG328A型电子天平(温州天平仪器厂生产)、全自动化学发光免疫分析仪(天津DPC公司提供)、XZ0-4-10型马福炉(天津华北实验电炉厂生产)、WYX-9004型原子吸收分光光度仪(日本日立公司生产)。硝酸甘油片(北京益民制药厂)、NO试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

5. 给药方法

各组动物均于手术后1周开始灌胃给药。各组动物均每日1次,每周给药6次,统一给予0.6 mg·100 g<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。LNG组、MNG组和HNG组分别给予0.2 mg·kg<sup>-1</sup>、0.4 mg·kg<sup>-1</sup>和1.0 mg·kg<sup>-1</sup>的硝酸甘油混浊液,SO组和OVX组用蒸馏水灌胃。

7. 观察指标

(1)全身骨密度(bone mineral density, BMD);XR-36型双能X线骨密度仪扫描测量各组动物BMD;(2)大鼠股骨干重、灰重及灰分钙含量测定:采用陶永辉等<sup>[1]</sup>的方法,取出右侧股骨去除肌肉、结缔组织后置于烘箱在120℃下烘干1h,冷却后用万分之一电子天平称得干重,然后将股骨置于800℃的马福炉中烘烤6h达恒重后,用万分之一电子天平测量灰重。精确称取0.1g灰分溶于6mol/L盐酸中并稀释1000倍后置于原子吸收分光光度仪上测定灰分钙含量;(3)血清生化指标测定:下腔静脉取大鼠血液,置于37℃水浴30min加速血液凝固,然后置于3000 r/min离心机上离心20min,用吸管吸取上层血清分别

按试剂盒操作说明在全自动测定仪上检测Ca、P、碱性磷酸酶(ALP)含量,并用硝酸还原酶法测定血清NO水平。

8. 统计学处理

统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,在SPSS 10.0 for windows统计软件下处理,所有数据先行正态性和方差齐性检验,再对多组均数的比较采用单因素方差分析;组间两两比较采用LSD检验。

结 果

1. BMD测定:OVX组大鼠去卵巢13周后全身BMD相比SO组显著降低( $P < 0.05$ );LNG组、MNG组大鼠显著高于OVX组( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ );HNG组大鼠与OVX组相比差异无显著性( $P > 0.05$ ),结果见表1。

表1 各组大鼠骨密度检测( $\bar{x} \pm s$ , g/cm<sup>2</sup>)

组别	例数(只)	骨密度
SO组	10	0.193 ± 0.034*
OVX组	10	0.189 ± 0.026
LNG组	10	0.192 ± 0.027*
MNG组	10	0.194 ± 0.025*
HNG组	10	0.190 ± 0.022

注:与OVX组比较\*  $P < 0.05$ ,\*  $P < 0.01$

2. 股骨干重、灰重及灰分钙含量测定:OVX组大鼠股骨干重、灰重及灰分钙含量显著低于SO组( $P < 0.01$ );LNG组、MNG组大鼠与OVX组相比股骨干重显著升高( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ )、灰重显著升高( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ )、灰分钙含量也显著升高( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ );HNG组大鼠与OVX组相比差异无显著性( $P > 0.05$ ),结果见表2。

表2 各组大鼠股骨干重、灰重、灰分钙含量检测( $\bar{x} \pm s$ , mg)

组别	例数(只)	干重	灰重	灰分钙
SO组	10	554.6 ± 31.45*	325.45 ± 19.26*	17.81 ± 0.186*
OVX组	10	517.03 ± 18.03	301.41 ± 18.52	17.55 ± 0.087
LNG组	10	537.38 ± 21.99*	321.49 ± 14.64*	17.68 ± 0.150*
MNG组	10	543.00 ± 16.86*	318.11 ± 15.94*	17.75 ± 0.136*
HNG组	10	518.04 ± 18.13	309.79 ± 12.47	17.57 ± 0.114

注:与OVX组比较\*  $P < 0.05$ ,\*  $P < 0.01$

3. 血清生化指标测定

血清Ca含量:OVX组大鼠显著低于SO组( $P < 0.01$ );LNG组、MNG组大鼠均显著高于OVX组( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ );HNG组大鼠与OVX组相比差异无显著性( $P > 0.05$ )。血清P含量:OVX组大鼠显著高于SO组( $P < 0.01$ );LNG组、MNG组大鼠与

OVX组相比血清P含量显著降低( $P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ );HNG组大鼠与OVX组相比差异无显著性( $P > 0.05$ )。血清ALP水平:各组大鼠血清ALP值采用单因素方差分析后, $P > 0.05$ ;说明各组大鼠血清ALP水平差异无显著性。血清NO水平:OVX组大鼠血清NO水平比SO组显著降低( $P < 0.05$ );LNG组、MNG组和HNG组大鼠均显著高于OVX组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ),结果见表3。

表3 各组大鼠血清Ca, P, ALP, NO水平检测( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数 (只)	Ca(mmol/L)	P(mmol/L)	ALP(u/L)	NO( $\mu$ mol/L)
SO组	10	2.45 $\pm$ 0.14	2.49 $\pm$ 0.11*	162.3 $\pm$ 10.9	75.36 $\pm$ 7.49*
OVX组	10	2.24 $\pm$ 0.10	2.62 $\pm$ 0.14	175.8 $\pm$ 13.5	67.25 $\pm$ 8.28
LNG组	10	2.38 $\pm$ 0.12*	2.51 $\pm$ 0.07*	171.2 $\pm$ 11.3	76.75 $\pm$ 11.37*
MNG组	10	2.43 $\pm$ 0.12*	2.50 $\pm$ 0.10*	172.9 $\pm$ 15.3	80.49 $\pm$ 8.18*
HNG组	10	2.17 $\pm$ 0.08	2.58 $\pm$ 0.09	169.5 $\pm$ 17.6	81.44 $\pm$ 9.77*

注:与OVX组比较\*  $P < 0.05$ , \*  $P < 0.01$

## 讨 论

### 1. NO与骨代谢

NO是一种无机自由基气体,由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化L-Arg脱胍基而产生的。NO作为高级生物体调节的有效信号在循环、呼吸、消化及内分泌代谢等系统中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。近年来人们逐渐认识到NO与骨代谢有密切关系,目前已证实骨组织中存在内皮型NOS(eNOS)及诱生型NOS(iNOS)<sup>[3]</sup>。成骨细胞(OB)和破骨细胞(OC)以自分泌和旁分泌的方式分泌NO,参与成骨细胞和破骨细胞功能的调节。

NO的产生在很大程度上受细胞因子的调节。根据对NO作用方向可分为两类:一类可上调NO合成,包括TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 及LPS;另一类可下调NO合成,如IL-4、IL-10及TGF- $\beta$ 。它们主要作用于转录水平,改变破骨细胞和成骨细胞内的NO水平。

NO-NOS系统对骨代谢具有双向调节作用<sup>[4,5]</sup>,一方面,少量NO对维持成骨细胞和破骨细胞的正常功能是必需的,NOS低水平表达时合成低浓度NO,主要促进骨吸收,同时成骨细胞的增殖及其骨基质分泌功能也依赖于少量NO的存在,NO在成骨细胞的细胞内信号传导过程中,甚至在成骨细胞与破骨细胞之间的信号传导过程中均可能起重要作用;另一方面,当NOS高水平表达时合成高浓度NO有抑制破骨细胞骨吸收作用,而有研究表明高浓度的NO存在抑制成骨细胞的骨形成功能。

我们的研究结果表明,OVX组大鼠血清NO水平明显低于SO组P值有统计学意义( $P < 0.05$ )。这可能是由于低浓度的NO促进破骨细胞前体向破骨细胞转化,低浓度NO还可增强IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 诱导的破骨细胞骨吸收;同时低浓度NO还可影响成骨细胞的增殖,使骨吸收超过骨形成而致骨量减少骨质疏松<sup>[6]</sup>。当我们给予低剂量(参考Wimalawansa等<sup>[7]</sup>剂量)和中剂量NO供体(硝酸甘油)时相当于补充接近或稍高于生理浓度的NO。经过12周防治发现BMD较OVX组有显著性升高( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ),右侧股骨干重、灰重及灰分钙含量以及血清生化指标均较OVX组有统计学差异。这说明补充生理浓度或稍高浓度NO均可抑制骨吸收,阻止骨组织骨质疏松化。而当给予12周高剂量硝酸甘油后发现对大鼠骨质疏松无明显防治作用,可能由于过高浓度NO虽然可以抑制破骨细胞骨吸收,但对成骨细胞的增殖作用更加明显,使骨形成大大减少而致骨量减少骨质疏松。

### 2. 硝酸甘油防治骨质疏松

有研究表明以硝酸甘油为代表的一些硝酸类化合物,主要是在细胞内转变成NO<sup>[8]</sup>,其机制可能是促进NOS合成NO,而骨组织中存在的iNOS半衰期较长可以产生大量NO<sup>[9]</sup>,所以本研究采用硝酸甘油每日给药一次也可在骨组织中产生足量NO。骨质疏松症被认为是在老年患者中继冠心病之后的第二高发疾病。许多老年患者同时有骨质疏松症和其他疾病。硝酸甘油具有对心血管系统,消化系统,神经系统等多种老年疾病的防治作用。临床应用硝酸甘油防治骨质疏松症可以使这些患者“一药多用”,减少药物之间的相互作用,给他们带来方便。同时硝酸甘油作为一种已被临床广泛掌握的一线用药,其副作用如:搏动性头痛、皮肤潮红及偶见的体位性低血压引起的头晕、晕阙已被广大临床医师所熟悉<sup>[10]</sup>。

### 3. 骨质疏松症的治疗策略

虽然目前对骨质疏松症尚无理想的治疗方法,但预防应是治疗骨质疏松症的最好途径,其基本原则是:在少年时期获得最高骨峰值,成年时期避免各种骨量丢失的因素,老年期则加强自我保护意识,防止跌倒、碰撞,多做户外运动,定期检查,合理的膳食及加强体育锻炼等<sup>[11,12]</sup>。

本研究采用的NO供体进行对去卵巢大鼠骨质疏松的防治,就是注意到骨质疏松症的预防尤其重

(下转第301页)

人群峰位骨量减少 25% 以上为骨质疏松<sup>[4]</sup>。

本研究所测正常人群是与非高原地区生活方式、环境和种族有较大差异的藏族人群。结果显示拉萨地区健康藏族男女峰值骨量在 30~39 年龄段达峰值,标准差分别占峰值骨量均值的 13% 和 11%,高于 10%,骨量达到峰值以后,随年龄增加逐渐降低,女性骨量丢失速度明显快于男性,与国内其它地区的调查结果相似。与国内制定骨质疏松诊断标准比较,女性在 50~59 年龄段即表现为骨量减少,60~69 年龄段表现为骨质疏松;男性在 60~69 岁表现为骨量减少,70~79 岁接近骨质疏松;符合刘忠厚教授提出的生理年龄预诊法,既女性在 60~69 年龄段,男性在 70~79 年龄段可以诊断为骨质疏松<sup>[5]</sup>。

本研究测定的结果表明,虽然中国地域辽阔,民族众多,环境差异较大饮食及生活方式不同,测得不同人群的骨密度结果不同;不同仪器,不同测定部位,不同的操作人员所测得的结果也会有差异,但是所测结果的骨量丢失规律是相同的。用标准差诊断

方法难以准确反应骨丢失规律,骨量丢失百分率法不失为较好的反应骨量丢失规律的诊断方法。

虽然藏族人生活在高海拔地区,接受大量有利于抗骨质疏松的紫外线,但男女在更年期和更年期后仍表现为骨量减少和骨质疏松,说明内因(包括激素调节、生理衰老)在骨质疏松发病中仍起决定作用<sup>[6]</sup>。本研究数据可为西藏拉萨地区骨质疏松诊断标准制定提供参考依据。

#### 参 考 文 献

- 1 Advani S, Wimalawansa. Bones and nutrition: common sense supplementation for osteoporosis. *Curr Womens Health Rep*, 2003, 3(3): 187-192.
- 2 刘忠厚. 中国骨质疏松诊断的进展. 第九届全国骨质疏松年会会议文集, 成都: 2003.
- 3 刘忠厚. 骨质疏松学. 北京: 科学出版社, 1998. 142-160.
- 4 丁桂芝, 周勇. 骨质 公症病友康复指南. 110-112.
- 5 刘忠厚. 中国老年人口状况及骨质疏松诊断的过去、现在和未来. 第八届全国骨质疏松年会会议文集, 九江: 2002.
- 6 Albagha OM, Ralston SH. Genetic determinants of susceptibility to osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2003, 32: 65-81.

(收稿日期: 2004-05-19)

(上接第 292 页)

于治疗。当骨质疏松症患者并发骨质疏松性骨折时,只采用药物治疗往往难以起到理想的效果,而必须采取手术治疗<sup>[13,14]</sup>。从本研究也可看出,对早期雌激素缺乏的实验动物给予 NO 供体可以有效阻止其骨质疏松进程, BMD 没有明显下降,骨量无明显减少。本研究虽然从药物和给药剂量方面对去卵巢大鼠骨质疏松的影响作了深入研究,但在如何采用规律、周期的用药方法上还有待深入探讨。

#### 参 考 文 献

- 1 陶永辉, 谭成, 蔡刚明. 去势雌性大鼠骨质疏松症的药物干预疗效的评价. *中国骨质疏松杂志*, 2002, 8: 47-50.
- 2 Ziegler JW, Iry DD, Kinsella JP, et al. The role of nitric oxide, endothelin, and prostaglandins in the transition of the pulmonary circulation. *Clin in Perin*, 1995, 22: 387-403.
- 3 Helfrich MH, Evans DE, Grabowski PS, et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 1108-1115.
- 4 Kikkawa I, Saito S, Tominaga K, et al. Lipopolysaccharide (LPS) stimulates the production of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by osteoclasts (OCL) in murine bone marrow cell culture. *Microbiol Immunol*, 1998, 42: 591-598.
- 5 Van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology*, 2001, 103: 255-261.

- 6 Damoulis PD, Hauschka PV. Nitric oxide acts in conjunction with proinflammation cytokines cell death in osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 412-422.
- 7 Suk Jae Chung, Ho Leung Fung. Identification of the subcellular site for nitroglycerin metabolism to nitric oxide in bovine coronary smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990, 253: 614-619.
- 8 Wimalawansa S, Chapa MT, Yallampalli C, et al. Prevention of corticosteroid induced bone loss with nitric oxide donor nitroglycerin in male rats. *Bone*, 1997, 21: 275-280.
- 9 Robert J, De Marco, Gangula P, et al. Cytokine induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 1108-1112.
- 10 邵明立, 主编. 国家基本药物. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 368-371.
- 11 Body JJ. Management of primary osteoporosis. *Acta Clin Belg*, 2002, 57: 277-283.
- 12 薛延, 主编. 骨质疏松症诊断与治疗指南. 北京: 科学出版社, 1999. 364-495.
- 13 Rasmussen H, Bordier P, Marie L, et al. Effect of combined therapy with phosphate and calcitonin on bone volume in osteoporosis. *Metab Bone Distal Res*, 1980, 2: 107-111.
- 14 Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S, et al. Effects of 5-year treatment with elcatonin and alfacalcidol on lumbar bone mineral density and the incidence of vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: a retrospective study. *J Orthop Sci*, 2002, 7: 637-643.

(收稿日期: 2004-02-11)