

rhPTH₍₁₋₃₄₎ 治疗 OVX 大鼠骨质疏松延后效应的初步研究

于志锋 金慰芳 顾淑珠 高建军 周轶 王洪复

摘要: **目的** 观察重组人甲状旁腺激素(1-34)[rhPTH₍₁₋₃₄₎]对卵巢摘除(OVX)大鼠骨质疏松症的治疗作用及停药后效应。**方法** 应用双侧卵巢摘除方法建立模拟绝经后骨质疏松大鼠模型;给予皮下注射 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ rhPTH₍₁₋₃₄₎ 治疗 8 周,观察其骨量、骨生物力学、骨小梁形态计量及骨代谢相关血、尿生化指标,综合评价 PTH 对模型大鼠的治疗效果;同时观察停药 8 周后上述指标的变化。**结果** 外源性 PTH₍₁₋₃₄₎ 治疗能显著增加模型大鼠的骨量、骨力学性能,改善骨微结构、增加骨转换。用药组的骨密度、股骨三点弯曲与腰椎压缩最大载荷、腰椎骨小梁百分面积显著高于对照组 ($P < 0.05 \sim 0.001$);血 ALP ($P < 0.05 \sim 0.01$) 与尿 Pyd ($P < 0.05$) 保持高水平;PTH 停药 8 周后大鼠股骨与腰椎骨密度、股骨三点弯曲与腰椎压缩最大载荷及腰椎骨小梁百分面积均较停药前显著降低 ($P < 0.05 \sim 0.001$),但仍显著高于 OVX 对照组 ($P < 0.05 \sim 0.001$)。**结论** 外源性 PTH₍₁₋₃₄₎ 可显著增加 OVX 大鼠的骨量,提高骨力学性能,改善骨微结构,对卵巢摘除诱导的大鼠骨质疏松具有明显治疗作用;停药后出现骨量的快速丢失,骨力学性能下降等变化,但仍显示出其对 OVX 大鼠骨骼的保护作用。

关键词: 甲状旁腺激素;大鼠;骨质疏松;治疗作用;停药效应

Research on the withdrawal effect of rhPTH₍₁₋₃₄₎ on osteoporosis in ovariectomized rats YU Zhifeng, JIN Weifang, GU Shuzhu, et al. Department of Bone Metabolism, Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: Objective To elaborate the therapeutical effects of recombinant human parathyroid hormone (rhPTH₍₁₋₃₄₎) on osteoporosis (OP) in ovariectomy (OVX) rats and the changes after ceasation. **Methods** The model of osteoporosis was formed after 3 months of ovariectomy on 6-month old rats. rhPTH₍₁₋₃₄₎ was injected subcutaneously once daily (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) for 8 weeks. The bone mineral density, the bone biomechanical property, the trabecular area, the levels of alkaline phosphatase (ALP) in serum and urinary Pyridinoline/creatin (Pyd/Cr) ratio were measured at the end of therapy. **Results** (1) rhPTH₍₁₋₃₄₎ increased the bone weight, the bone mineral density, the bone biomechanical property, the trabecular area, the ALP levels and the urinary Pyd/Cr remarkably compared with the control group. (2) The bone mineral density, the bone biomechanical property and the trabecular area significantly decreased after drug withdrawal ($P < 0.05-0.001$), while remained higher than the control group ($P < 0.05-0.001$). **Conclusions** rhPTH₍₁₋₃₄₎ has remarkable therapeutic effects on OP in OVX rats. The protective effect of rhPTH₍₁₋₃₄₎ on bones remains although the bone loss was accelerated after drug withdrawal.

Key words: Parathyroid hormone(PTH); Rats; Osteoporosis(OP); Therapeutic effect; Effects of drug withdrawal

骨质疏松是一种需长期防治的慢性疾病。了解药物延后效应对综合评价骨质疏松治疗药物的疗效及指导临床应用具有重要意义。PTH 作为一种新的

骨质疏松治疗药物,以其显著的骨形成刺激作用而成为近年来研究的热点,有关停药后的骨量等维持为人们所关注。本研究在本实验室前期的研究基础上^[1]应用卵巢摘除方法建立模拟绝经后骨质疏松大鼠模型,给予由 ZT 公司研制的重组人甲状旁腺激素(1-34)[recombinant human parathyroid hormone₍₁₋₃₄₎, rhPTH₍₁₋₃₄₎]治疗,观察其骨密度、骨强度、骨微结构和骨代谢相关血、尿生化指标,比较停止治疗后上述

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170439)

作者单位:200011 上海第二医科大学附属第九人民医院骨科(于志锋);复旦大学放射医学研究所骨代谢研究室(金慰芳、顾淑珠、高建军、周轶、王洪复)

通讯作者:金慰芳,Email:jinfw@shsmu.edu.cn

指标的变化。旨在为 PTH 临床应用提供实验室依据。

1 材料和方法

1.1 药物与试剂

由 ZT 生物工程有限公司提供的 rhPTH₍₁₋₃₄₎, 规格 25 μg/支 (批号: 2003408); Pyd 酶免试剂盒 (购自 Q UIDE 公司 USA)。

1.2 主要仪器

固体物理密度仪 (METTLER TOLEDO AG204 Swiss)、双能 X 线骨密度仪 (LUNAR DXP-L USA)、万能材料测试仪 (INSTRON 5543 USA)、光学显微镜 (Nikon E 600 Japan)、形态计量软件 (Mediapiayer IPP. USA)、酶标仪 (Bio-TEK Elx 800 USA)、自动生化测试仪 (日立 7170 Japan)、GC-1200 γ 计数器 (中佳光电仪器分公司 中国)、万分子一天平 (SARTORIS BS 210 S German)。

1.3 实验动物与分组

6 月龄清洁级 SD 雌性大鼠 60 只 (复旦大学医学院实验动物部提供), 体重 230 ~ 270 g, 50 只大鼠在氯胺酮麻醉下行双侧卵巢切除术 (OVX), 10 只仅切除卵巢周围少量脂肪组织作为对照组 (Sham), 其余为手术组, 其中手术组在模型建立后分为给药组 (PTH) 与非给药组 (OVX); 自由饮水, 普通饲料饲养。术后 12 周 Sham 和 OVX 组各取大鼠 10 只, 颈动脉放血处死, 取子宫、股骨和腰椎作子宫重量、骨量和骨生物力学性能测定, 确认骨质疏松模型成立后进行实验分组。实验动物测量停药前 (皮下注射 PTH 20 μg/kg 每周 6 次, 共 8 周) 与停药后 (停药 8 周) 2 个时相点。

1.4 观察指标

各组大鼠处死前收集尿标本, 颈动脉采血收集血标本, 处死后获取子宫与骨标本作下列各项指标测定:

1.4.1 子宫湿重: 子宫标本获取后随即称取。

1.4.2 骨密度: 股骨 (左) 和腰椎 (1-5) 标本置固体物理密度仪测试 (g/cm³) 或双能 X 线骨密度仪 (精度 1%; CV < 1%, g/cm²) 测试。

1.4.3 骨强度: 新鲜股骨 (右) 与腰椎 (L₃) 标本分别在万能材料测试仪的三点弯曲装置 (跨度 18 mm; 速率 10.0 mm/min) 与压缩装置上测试最大弯曲与压缩载荷。

1.4.4 骨小梁形态计量: 椎体 (L₄) 标本脱钙后于 1/2 处切断取材、石蜡包埋、HE 染色、光镜下观察摄

影, 应用形态计量软件分析 (Image-Pro Plus 5.0, 镜下放大倍数为 40), 计算椎体骨小梁与椎体总面积比值, 结果以百分比表示。

1.4.5 血清 ALP 与尿吡啶酚 (Pyd): 分离血清后采用 PNPP 法测试 ALP, 尿标本采用酶免法测试 Pyd, 自动生化测试仪测试肌酐; 结果以吡啶酚与肌酐的比值 (nM/mM) 表示。

1.5 统计学处理

用 SPSS 11.0 软件建立数据文件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数比较采用独立样本的 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 OP 模型鉴定

大鼠双侧卵巢摘除后 12 周, 子宫湿重较 Sham 组明显下降 (*P* < 0.001); 股骨与腰椎骨密度、股骨三点弯曲载荷与腰椎压缩载荷均较 Sham 组明显下降 (*P* < 0.05 ~ 0.001), 表明卵巢摘除后大鼠骨质疏松模型成立, 见表 1。

表 1 大鼠子宫、骨密度与骨强度测定值 ($\bar{x} \pm s$)

测定指标	Sham	OVX
子宫湿重 (g)	0.697 ± 0.125	0.199 ± 0.061 [*]
股骨骨密度 (g/cm ³)	1.427 ± 0.038	1.322 ± 0.027 [*]
腰椎骨密度 (L ₂) (g/cm ³)	1.336 ± 0.043	1.263 ± 0.026 [*]
股骨三点弯曲载荷 (N)	184.2 ± 15.6	168.0 ± 17.0 [*]
腰椎压缩载荷 (L ₃) (N)	463.0 ± 43.6	411.6 ± 39.3 [*]

注: 与 Sham 组比较 * *P* < 0.05, ^{*} *P* < 0.001; *n* = 10

2.2 PTH 停药前后骨密度变化 (股骨与腰椎密度均为固体物理密度仪测试结果)

停药前 (用药 8 周), PTH 组与 OVX 组比较股骨与腰椎骨密度出现明显升高 (*P* < 0.001; *P* < 0.001); 停药后 (停药 8 周) 的股骨和腰椎骨密度较停药前出现较大下降 (-7.6%, *P* < 0.01; -25%, *P* < 0.001); 但仍显著高于同时相 OVX 对照组 (*P* < 0.001, *P* < 0.001)。见表 2。

表 2 PTH 停药前后股骨与腰椎骨密度 ($\bar{x} \pm s$, g/cm²)

组别	股骨		腰椎	
	停药前	停药后	停药前	停药后
OVX	0.269 ± 0.015	0.218 ± 0.016	0.255 ± 0.021	0.189 ± 0.010
PTH	0.314 ± 0.013 [*]	0.290 ± 0.019 ^{*△}	0.319 ± 0.010 [*]	0.239 ± 0.016 ^{△△}
		(-7.6%)		(-25%)

注: 与停药前 OVX 组比较 * *P* < 0.001; 与停药前 PTH 组比较^{*} *P* < 0.01, [△] *P* < 0.001; 与停药后 OVX 组比较[△] *P* < 0.001; (±%) 为与停药前比较; *n* = 10

2.3 PTH 停药前后骨强度比较

停药前 PTH 组与 OVX 对照组比较, 股骨三点弯曲与腰椎压缩载荷出现明显增加 (*P* < 0.01; *P* <

0.01);停药后 PTH 组大鼠的股骨三点弯曲和腰椎压缩载荷较停药前显著降低(−8.2%, $P<0.05$;−16.1%, $P<0.01$),而与同时相 OVX 组比较仍显著增高($P<0.001$, $P<0.001$),见表 3。

表 3 股骨三点弯曲载荷与腰椎压缩载荷测定($\bar{x}\pm s$,N)

组别	股骨		腰椎	
	停药前	停药后	停药前	停药后
OVX	175.2±15.7	155.2±15.9	405.7±86.3	331.1±78.9
PTH	204.7±21.1*	188.0±9.3*△	549.7±83.9*	461.2±33.2△△
		(−8.2%)		(−16.1%)

注:与停药前 OVX 组比较 * $P<0.01$;与停药前 PTH 组比较 △ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与停药后 OVX 组比较 △△ $P<0.001$; (±%)为与停药前比较; $n=10$

2.4 PTH 停药前后骨小梁形态计量观察

从表 4 可见,停药前 PTH 组较 OVX 对照组的腰椎骨小梁百分面积显著升高($P<0.001$);停药后较停药前显著降低(−36.7%, $P<0.001$),但仍显著高于 OVX 对照组($P<0.01$)。

表 4 L₃ 骨小梁百分面积($\bar{x}\pm s$)

组别	股 骨	
	停药前	停药后
OVX	22.0±3.6	16.6±3.3
PTH	42.8±7.0*	27.1±7.4*△(36.7%)

注:与停药前 OVX 组比较 * $P<0.001$;与停药前 PTH 组比较 △ $P<0.01$;与停药后 OVX 组比较 △ $P<0.001$; (±%)为与停药前比较; $n=10$

2.5 PTH 停药前后血 ALP 和尿 Pyd/Cr 变化

停药前 PTH 组与 OVX 对照组比较,血清 ALP 与尿 Pyd/Cr 均显著升高($P<0.001$, $P<0.001$);停药后血 ALP 显著下降($P<0.001$),与同时相 OVX 组水平相似,尿 Pyd/Cr 下降未显示统计学意义,见表 5。

表 5 血 ALP 与尿 Pyd/Cr($\bar{x}\pm s$)

分组	血 ALP		尿 Pyd/Cr	
	OVX	PTH	OVX	PTH
停药前	135.2±9.7	173.0±3.3*	0.115±0.007	0.175±0.010*
停药后	111.2±7.0	109.7±6.6*	0.106±0.092	0.076±0.083

注:与停药前 OVX 组比较 * $P<0.001$;与停药前 PTH 组比较 △ $P<0.01$; $n=4$

3 讨论

小剂量间隙应用 PTH 显著增加骨量,并提高骨生物力学强度已被大量研究所证实^[1,2],停药后的反应及药效的维持是大家关注的问题。研究表明大鼠卵巢切除后给予 PTH₍₁₋₃₄₎ 80 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,停药 4 周后骨密度、骨生物力学性能还维持在较高的水平,停药 14 周后仅松质骨骨量得以维持,而皮质骨密度和

骨生物力学出现较大幅度下降^[3]。以切除卵巢后为骨质疏松模型的研究表明,rhPTH₍₁₋₃₄₎ 间歇皮下给药 12 月可明显增加椎骨骨量和骨密度,增加肱骨中端皮质骨膜内矿化沉积率和胶原沉积率,并呈剂量依赖关系;改善其生物力学性能停药 6 个月各指标普遍下降,但仍然高于对照组^[4]。本研究应用卵巢摘除方法建立模拟绝经后骨质疏松大鼠模型,以观察国产 rhPTH₍₁₋₃₄₎ 对模型大鼠骨质疏松的治疗作用及停药后效应。以骨量(骨密度、骨干重与灰重)和抗骨折能力(股骨三点弯曲载荷与腰椎压缩载荷)为主要指标,结合骨小梁形态计量及血尿生化指标等综合评价药物效果。本研究表明,皮下给予 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ rhPTH₍₁₋₃₄₎ 治疗 8 周,用药组的股骨与腰椎骨密度、股骨三点弯曲与腰椎压缩最大载荷、腰椎骨小梁百分面积均显著高于对照组($P<0.05\sim 0.001$);结果显示 rhPTH₍₁₋₃₄₎ 对 OVX 骨质疏松大鼠具有显著的治疗效果。停药 8 周后,骨量、骨生物力学和骨形态等各项指标较停药前均有较大的下降;主要表现为骨密度明显减少,抗骨折能力降低,腰椎骨小梁面积百分比较停药前出现下降。但停药 8 周时 PTH 治疗组大鼠骨量、骨生物力学性能等仍显著优于不治疗(OVX)对照组,表明停药后一定时间内 PTH 对骨仍维持一定的保护作用。在我们实验室的前期研究^[2]中表明,rhPTH 治疗组骨形成指标 ALP 和骨矿化沉积率明显增加,而骨吸收指标 Pyd/Cr 值增加不明显,也说明 PTH 间隙应用的主要作用是促进骨转换过程中的成骨细胞骨形成功能。成骨细胞骨形成功能提高,不仅可以明显增加松质骨和皮质骨的骨密度,而且可以改善骨结构,提高抗骨折能力,从而明显减少椎体和非椎体骨折的风险。如何将此作用长期持续,有待进一步研究。

【参 考 文 献】

[1] 王洪复,金慰芳,高建军,等.重组人甲状旁腺激素(1-34)对去卵巢大鼠骨质疏松的治疗作用.中国医学科学院报,2003,25:275-279.

[2] Rubin Mr, Cosman F, Lindsay R, et al. The Anabolic effects of Parathyroid hormone. Osteoporos Int, 2002, 13:267-277.

[3] Paschalis EP, Burr DB, Mendelsohn R, et al. Bone mineral and collagen quality in humeri of ovariectomized cynomolgus monkeys given rhPTH₍₁₋₃₄₎ for 18 months. J Bone Miner Res, 2003, 18:769-775.

[4] Burr DB, Hirano T, Turner CH, et al. Intermittently administered human parathyroid hormone (1-34) treatment increases intracortical bone turnover and porosity without reducing bone strength in the humerus of ovariectomized cynomolgus monkeys. J Bone Miner Res, 2001, 16(1): 157-165.