

辛伐他汀防治颌骨吸收的实验研究

李文荟 郭莉 任肖华 周磊 王春先

摘要: **目的** 用骨质疏松及牙槽骨吸收动物模型评价辛伐他汀对骨吸收的防治作用。**方法** 建立骨质疏松及牙槽骨吸收的动物模型,建模手术后 6 周,实验组辛伐他汀 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 胃肠道给药 8 周,用血生化学、骨组织形态计量学指标和组织形态学方法进行药效评价。**结果** 辛伐他汀可抑制模型动物下颌骨骨丢失和骨小梁结构的破坏,下颌骨骨组织形态计量学指标、血生化指标均维持在假手术组水平。**结论** 辛伐他汀能减少骨质丢失,从而可以防止骨质疏松及病理性颌骨吸收。

关键词: 辛伐他汀;骨密度;骨质疏松;颌骨骨质丢失

An experimental study on Simvastatin in alveolar bone resorption LI Wenhui, GUO Li, REN Xiaohua, et al. The 458th Hospital of The PLA, Guangzhou 510602, China

Abstract: Objective To evaluate the anti-osteoporosis effect of simvastatin in rat. **Methods** The osteoporosis and alveolar bone resorption animal model were established in rats. The experimental groups were given simvastatin $5 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$ by oral gavage for 8 weeks since the sixth week after ovariectomy and dental ligature. **Results** The administration of simvastatin inhibited mandibular bone structure in OVX rats, with bone mineral density, cancellous bone area, trabecular width, trabecular number and trabecular separation of mandibles in OVX rats maintaining at the level of Sham-OVX rats. **Conclusions** Simvastatin can effectively prevent bone loss to reduce osteoporosis in ovariectomized rats and pathological alveolar bone resorption.

Key words: Simvastatin; Bone density; Osteoporosis; Alveolar bone loss

颌骨是人体骨骼系统中最为活跃的部分,担负着咀嚼功能,颌骨结构的改变势必会对口腔健康和生活质量带来严重危害。颌骨骨质疏松可加重牙周炎骨吸收,使牙缺失率增加^[1],也影响牙种植体早期骨性结合,是影响牙种植体成功的危险因素之一,因此颌骨骨质疏松现象正受到高度的关注。颌骨骨质疏松和全身骨质疏松的相关性已得到大量研究的证实。目前许多防治骨质疏松的药物已成功地应用到临床,但它们对颌骨骨量和结构变化的影响以及对口腔骨丢失的作用却少有报道。本研究试图通过去卵巢大鼠建立颌骨骨质疏松的动物模型,观察新近报道的具有骨合成代谢作用的他汀类药物对去卵巢大鼠下颌骨的影响,为辛伐他汀应用于颌骨骨质疏松的防治提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

3~4 月龄 SD 雌性大鼠 40 只(购自广东省医学实验动物中心),平均体重(210 ± 10) g;辛伐他汀片(杭州默沙东)。

1.2 分组

购入动物观察 1 周后随机分为 4 组:A 组(伪手术组),B 组(单纯去卵巢组),C 组(去卵巢后对照组),D 组(去卵巢后服用辛伐他汀组);每组 10 只。

1.3 建模方法

戊巴比妥钠腹腔麻醉,沿肩胛线分别于左右两侧肋下剪开腰肌,切开子宫角,摘出双侧卵巢,关闭切口;伪手术组仅暴露双侧卵巢切除约 1 g 脂肪后缝合关闭切口;动物自由进食饮水,自然光照。

1.4 给药方法

去卵巢 6 周后,实验组以辛伐他汀 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,辛伐他汀用蒸馏水配制成 1 mg/ml 的混悬液,用前摇匀,连续 8 周;对照组予同等体积蒸馏水灌胃。

作者单位:510602 解放军第 458 医院口腔科(李文荟、郭莉、任肖华);广东省口腔医院(周磊、王春先)

通讯作者:李文荟,Email: zhanghuimin0207@265.com

1.5 全部动物在同等条件下饲养,14 周称重,心脏穿刺取血处死。

血清生化检测:取血 2 ml,置 4℃冰箱中待凝固后 3000 r/min 离心 15 min,取上清液密封后置于 -20℃冰箱中保存,采用 CL 7200 型全自动生化分析仪测定。ALP 测定:以对硝基磷酸盐为底物,在 ALP 作用下生成对硝基酚和磷酸,在分光光度计 405 nm 处测定吸光度增加速率,计算样品中 ALP 活性。磷测定:直接紫外法检测。二者所用试剂盒由上海长征医学科学有限公司生产。Ca²⁺ 检测用邻甲酚酞络合酮法(比色法)。

左侧股骨下段、左侧颌骨体部进行组织形态学检查:标本 10% 中性甲醛固定 2 周,用混合酸脱钙液脱钙至满意,流动水冲洗 24 h,常规酒精上行梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,骨长轴方向切片(5 μm),苏木素伊红染色,光学显微镜观察。

左侧股骨上段、右侧颌骨体部进行骨组织形态计量学检查:标本用低速骨锯按骨长轴锯掉骨皮质充分暴露骨髓腔,10% 福尔马林磷酸缓冲液固定 24 h,酒精上行梯度脱水,二甲苯透明,甲基丙烯酸甲酯行不脱钙骨标本包埋。Leica 2155 型切骨机切片(5 μm),甲苯胺蓝染色,在光镜和荧光显微镜下观察,在 Leica 半自动组织形态分析系统中进行测量,测量范围为生长板下 2~4 mm 间的次级松质骨。

1.6 统计学处理

测定数据结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理使用 SPSS 11.0 软件,多标本均数间的比较用单因素方差分析,样本均数间的两两比较用 LSD 检验。

2 结果

2.1 生活状态观察

所有动物术后 3~5 d 恢复活动如术前,手术切口一期愈合,A 组动物在实验期间体重增加缓慢,毛色光亮,活动正常;B、C 组大鼠在术后 2~3 周即观察到体重增长迅速,活动减少,毛发乍起,毛色变灰暗;辛伐他汀组在给药后,大鼠体重增加缓慢,毛色渐渐恢复光亮,活动较给药前增加。各组间体重变化差异有显著性($P < 0.01$),观察期间未见动物发生自发性骨折,见表 1。

2.2 生化指标

各组大鼠血清中的碱性磷酸酶(ALP)、钙、磷的变化见表 2,D 组与 B 组、C 组比较 ALP 明显升高,差异有显著性($P < 0.01$),而血 Ca 和 P 差异无显著性($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠体重变化($\bar{x} \pm s$)

组别	0 周	6 周	14 周
A	209.6 ± 9.4	241.9 ± 7.7	
B	210.7 ± 9.2	292.3 ± 8.3 [*]	
C	211.2 ± 9.0	293.1 ± 9.24 [*]	345.9 ± 7.5
D	215.1 ± 8.7	296.4 ± 14.1 [*]	309.4 ± 11.9 [#]

注:与 A 组比较^{*} $P < 0.01$;与 C 组比较[#] $P < 0.01$

表 2 各组大鼠血清中 ALP、Ca、P 变化($\bar{x} \pm s$)

组别	ALP(U/L)	Ca (mmol/L)	P (mmol/L)
A	93.57 ± 14.96	2.80 ± 0.20	1.16 ± 0.31
B	168.22 ± 27.53 [#]	2.98 ± 0.28 [*]	0.93 ± 0.18 [#]
C	159.75 ± 8.67	3.00 ± 0.11	0.87 ± 0.13
D	152.21 ± 22.98 [△]	2.76 ± 0.20	1.15 ± 0.21

注:与 A 组比较^{*} $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$;与 B、C 组比较[△] $P < 0.01$

2.3 下颌骨骨组织形态计量学指标

单纯去卵巢组的骨小梁面积比(% Tb.Ar)、骨小梁数量(Tb.N)均较伪手术组显著下降,骨小梁分离度(Tb.Sp)显著增加,骨小梁厚度(Tb.Th)差异不显著。实验组与对照组比较,% Tb.Ar、Tb.N 均显著增加($P < 0.01$),Tb.Sp 显著减少($P < 0.01$),Tb.Th 差异无显著性,见表 3。

表 3 实验组大鼠松质骨静态参数的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	% Tb.Ar (%)	Tb.Th(μm)	Tb.N(mm ⁻¹)	Tb.Sp(μm)
C	13.87 ± 2.32	55.8 ± 5.0	2.12 ± 0.26	333.7 ± 34.7
D	22.43 ± 2.83 [*]	56.9 ± 6.4	3.72 ± 0.15 [*]	176.4 ± 15.7 [*]

注:与 C 组比较^{*} $P < 0.01$

2.4 组织学观察

辛伐他汀治疗组股骨干骺端生发层层数较多,层次变清晰,生发层中分化成熟的软骨细胞数目增多,骺板下骨小梁结构排列紧密,形态接近正常,小梁间连接呈网状,排列有序,颌骨骨小梁结构较成熟,牙槽骨表面光滑,骨小梁较粗密,髓腔中脂肪组织减少,脂肪空泡少,见图 1、2。

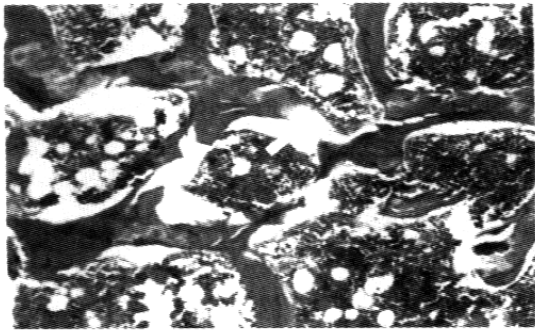


图 1 未用辛伐他汀组下颌骨骨小梁数目少,排列稀疏,断裂明显↑示骨小梁断头(HE, × 100)

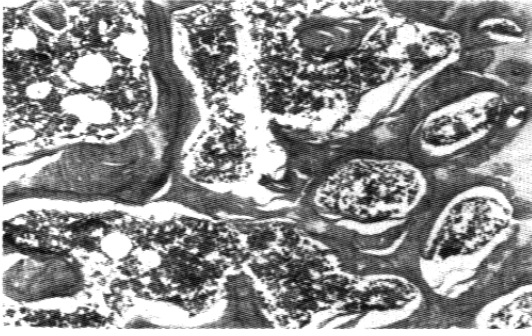


图 2 用辛伐他汀组下颌骨骨小梁
数目多,粗大,厚度较一致(HE, $\times 100$)

3 讨论

去卵巢大鼠动物模型是目前国际上公认的研究骨质疏松的代表动物模型^[2]。本研究中所建立的去卵巢大鼠动物模型成功地模仿了原发性骨质疏松骨代谢状态,可以用于评价辛伐他汀在防治骨质疏松症中的作用。

他汀类药物可以抑制胆固醇的合成,有效降低血清胆固醇,临床上广泛用于治疗高脂血症及心脑血管病的一级预防。近年的大量随机双盲对照试验的证据表明,他汀类药物还具有抗心率失常,抗血栓形成,降低糖尿病和骨折危险及抗炎等多种作用^[3]。Mundy 等^[4]在经筛选 30000 余种化合物后发现他汀类药物可引起成骨细胞 BMP-2 的高表达,局部注射于幼鼠头盖骨可增加新骨生成达 50%。大量的临床回顾性研究也表明他汀类药物可降低非暴力性骨折发生率^[5],增加骨密度^[6],减少大剂量皮质激素患者的骨坏死发生率^[7]。

在本组实验中,辛伐他汀组在给药后大鼠血清碱性磷酸酶明显升高,表明成骨细胞处于活跃状态,接近于伪手术组。骨形态计量学观察中,辛伐他汀组骨小梁面积比、骨小梁数目、骨小梁分离度均与去

势对照组差异有显著性,与伪手术组相当,说明辛伐他汀可以有效防止骨快速丢失,恢复骨量。本实验中观察到辛伐他汀明显增加骨形成,与 Mundy 等^[4]报道的在类似的实验中他汀类药物可使骨吸收指标下降有可能抑制破骨细胞活性的结果相一致。实验结果表明辛伐他汀具有抗骨质疏松作用,主要表现为促进骨形成,这可能与部分抑制骨吸收有关。

近年来研究发现,全身骨质疏松可致颌骨骨密度下降,出现骨质疏松样改变。由于口腔骨丢失与骨质疏松症发病机理密切相关,因此应用抗骨质疏松药物防治颌骨骨丢失有其合理性。本实验表明,去势可诱导下颌骨骨丢失,辛伐他汀通过全身用药可以改善颌骨结构,减少颌骨骨丢失。辛伐他汀成骨作用在口腔领域中的应用有待进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] Wactawski-Wende J, Grossi SG, Trevisan M, et al. The role of osteopenia in oral bone loss and periodontal disease. J periodontol, 1996, 67(Suppl 10):1076-1084.
- [2] Dike NK. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner, 1991, 18:175-192.
- [3] 袁志敏, 贺庆芳. 他汀类药物的非降脂作用治疗近况. 国外医学老年医学分册, 2002, 23:179-181.
- [4] Mundy G, Greet R, Harris, et al. Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by statins. Science, 1999, 286:1946-1949.
- [5] Chan KA, Andrade SE, Boles M, et al. Inhibitors of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and risk of fracture among elder women. Lancet, 2000, 283:3205-3210.
- [6] Edwards CJ, Hart DJ, Spector TD. Oral statins and increased bone mineral density in postmenopausal women. Lancet, 2000, 355: 2218-2219.
- [7] Prichett JW. Statin therapy decrease the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. Clin orthop, 2001, 386:173-178.

(收稿日期:2004-11-23)

欢迎参加第十一届全国骨质疏松年会