

# 双膦酸盐的长期治疗增加了骨单位的矿化程度

曹永平 Tasuku Mashiba Satoshi Mori

**摘要：**目的 评估双膦酸盐的长期应用对骨单位的次级矿化程度的影响。方法 30 只 1 岁龄猎犬按体重随机分成三组(每组雌雄各 5 只)：对照组犬每天口服乳糖，低剂量组和高剂量组犬分别每天口服因卡膦酸钠 incadronate 0.3 mg/kg 和 0.6 mg/kg。所有犬持续给药 3 a。处死前进行四环素双标，处死后取左侧第 9 肋骨进行组织形态计测和次级矿化程度评估。结果 组织形态计测表明两个双膦酸盐治疗组的骨激活频率(Ac.f)都明显低于对照组，分别降低了 40% 和 82%。矿化程度的测定表明，低剂量和高剂量双膦酸盐组骨单位内的平均矿化程度(MDMB)都明显高于对照组，分别增加了 22% 和 30%。双膦酸盐组 MDMB 分布曲线与对照组保持了相同的峰值，并且随治疗剂量的增大逐渐向高矿化端漂移。结论 双膦酸盐长期应用明显抑制了骨转换，增加了骨单位的矿化程度。

**关键词：**双膦酸盐；次级矿化；矿化程度；骨重建；骨转换；骨质量

**Long-term bisphosphonate administration increase the degree of mineralization in bone** CAO Yongping , Tasuku Mashiba , Satoshi Mori . Department of Orthopedic Surgery , Peking University First Hospital , Beijing 100034 , China

**Abstract : Objective** To evaluate the effects of long-term bisphosphonate( incadronate )administration on the mean degree of secondary mineralization in bone. **Methods** Thirty adult beagles were allocated randomly into three groups based on their body weight( 5 males and 5 females in each group. )Animals in CNT were given lactose 12 mg/kg/day orally ,while those in YML and YMH were given incadronate disodium at dose of 0.3 mg/kg/day and 0.6 mg/kg/day orally , respectively for three years. All animals were double-labeled intravenously with oxytetracycline hydrochloride( 20 mg/kg ) before sacrifice. After necropsy ,the left 9<sup>th</sup> ribs were excised for evaluation. **Results** Histomorphometry showed that the activation frequency in YML and YMH were significantly lower than that of CNT and decreased by 40% and 82% ,respectively. The mean degree of mineralization in bone ( MDMB ) in YML and YMH were significantly higher than that of CNT ,and increased by 22% and 30% , respectively. Moreover ,the distribution of MDMB showed that a dose-dependent shift toward the higher values in incadronate-treated animals concomitantly with preserved peaks when compared with controls. **Conclusions** Long-term bisphosphonate administration in higher dose significantly suppresses bone turnover ,which increases the degree of mineralization in bone.

**Key words :** Bisphosphonate ; Secondary mineralization ; Degree of mineralization ; Bone turnover ; Bone remodeling ; Bone quality

目前双膦酸盐( Bisphosphonates )作为骨吸收抑制剂被广泛用于治疗各种高吸收型骨骼疾患，例如原发性骨质疏松、Paget's 病以及继发性骨质疏松等<sup>[1-3]</sup>。双膦酸盐抑制了骨转换，减少了骨吸收，维持和增加了骨量，有效降低了发生骨折的风险。其作用机理主要是通过抑制破骨细胞的功能，进而抑

制骨重建( remodeling )的过程，降低了骨的转换频率，减少了骨重建的部位，从而使骨吸收陷窝得到更好的新生骨填充<sup>[4-6]</sup>。众多的实验和临床结果已证实应用阿仑膦酸钠( alendronate )、利塞膦酸钠( risedronate )、因卡膦酸钠( incadronate )等双膦酸盐治疗数周后，骨转换率可快速降至绝经前的水平<sup>[7-9]</sup>。但随着双膦酸盐应用时间的延长，其长期应用的安全性近来已引起了越来越多学者的重视<sup>[10]</sup>。因为双膦酸盐抑制了骨的转化，理论上讲，长期应用将增加骨结构单位( bone structure units ,BSUs )的生命周

作者单位：100034 北京 北京大学第一医院骨科(曹永平)；日本香川大学整形外科(Tasuku Mashiba, Satoshi Mori)

通讯作者：曹永平，Email : caoy04@yahoo.com.cn

期,延长了次级矿化的时间(secondary mineralization),从而增加了骨单位内矿盐的含量<sup>[11-13]</sup>。而骨强度和韧性(toughness)与骨基质内的矿物质含量呈密切的正相关,当骨组织过分矿化(如氟骨症)时,骨组织的脆性会增加。骨脆性的增加会使骨组织基质在力学负荷下更易发生微损伤(microdamage),并且骨组织脆性的增加也降低了骨组织吸收能量的能力从而更易发生骨折<sup>[14,15,23]</sup>。双膦酸盐的长期应用是否会导致骨的过度矿化,是否会因此而增加了骨的脆性,从而损害骨的生物力学强度?

本实验的目的在于检测大剂量双膦酸盐长期应用(3 a)抑制的骨转换是否会增加骨组织的矿化程度,是否会引起骨组织的过度矿化?

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物和实验设计

1岁龄的成年猎犬30只,雌雄各15只,体重在9~13 kg之间,饲养于标准动物间(温度 $26 \pm 4^\circ\text{C}$ ,湿度 $75 \pm 25\%$ ,12 h进行昼夜交替,动物可自由饮水,饲以标准干性犬饲料)。X线拍片验证其股骨和胫骨的生长板已全部闭合。犬适应环境1个月后,根据体重被随机分成3组(雌雄各5只):对照组(CNT),低剂量双膦酸盐组(YML)和高剂量双膦酸盐组(YMH)。对照组的动物给予口服乳糖 $12 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$ ,双膦酸盐组分别给予口服因卡膦酸钠(incadronate,日本山之内制药公司) $0.3 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$ 和 $0.6 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$ 。药物包裹在明胶胶囊中于早餐前4 h给药,每日1次,持续给药3 a。动物处死前第18 d和第7 d进行四环素荧光标记(tetracycline  $20 \text{ mg/kg}$ ,日本辉瑞)。动物处死后取第9肋骨进行评估。

### 1.2 非脱钙骨标本的制备

将切取的肋骨剔除软组织后在70%的乙醇中固定72 h,用Villanueva法进行大块标本染色2 w,然后逐级脱水,整段肋骨在丙酮中脱脂后包埋在甲基丙烯酸甲脂中。在整个标本的处理过程中,应避免接触酸性溶液以免引起矿盐的分解。将包埋好的标本用切片机直接切片(SP 1600,德国莱卡公司),注意保持切锯与哈佛式管(Haversian canals)的走向垂直。切片厚约 $150 \mu\text{m}$ ,然后用磨片机将切片磨至 $100 \mu\text{m}$ 以备进行接触显微照相(contact microradiography),另一套切片被磨至 $50 \mu\text{m}$ 以备进行组织形态学计测。

### 1.3 皮质骨内的组织形态计测

用半定量数字化图像分析仪对 $50 \mu\text{m}$ 厚的非脱钙骨磨片进行组织形态计量学测量(System Supply Co.,日本长野)。在100倍的显微镜下对整个标本的横断面进行测量,测出横截面积(cross-sectional area),皮质骨的面积(cortical area,Ct.Ar),经换算得出骨的激活频率(activation frequency,Ac.f)。

### 1.4 骨平均矿化程度的测定(Mean Degree of Mineralization in Bone,DMB)

利用X线衍射仪(SRO-M 50,日本)进行高分辨率接触显微照相(contact microradiograph,CMR)。将标本直接置于高分辨率的底片上(柯达S0-343),距离X线源1 cm,在10 kV 2 mA的条件下曝光20 min。然后底片在 $20^\circ\text{C}$ 的柯达D 19溶液中显影和定影各5 min,所得X线片在无尘环境下烘干后,用盖玻片将其封于载玻片中。用带有数字摄像系统(日本尼康DXM 1200)的显微镜(日本尼康ECLIPSE,E 800),在40倍放大率下从CMR上采集图像(如图1A),该系统装有图像处理软件Image-Pro Plus(Version 4.0011,Media Cybernetics Inc.,USA)。并且该系统装有大功率稳压器,以保证在各个标本的图像采集过程中电压始终保持一致。利用Adobe Photoshop(Version 6.0,Adobe,USA)选取数字化图像上的所有骨单位(如图1B),然后用Scion Image(Beta 4.0.2,NIH,USA)直接测定每一骨单位的灰度,即可自动得到骨单位的矿化密度,每一标本上所有骨单位的矿化密度的均值即是该标本的平均矿化程度(mean degree of mineralization)。

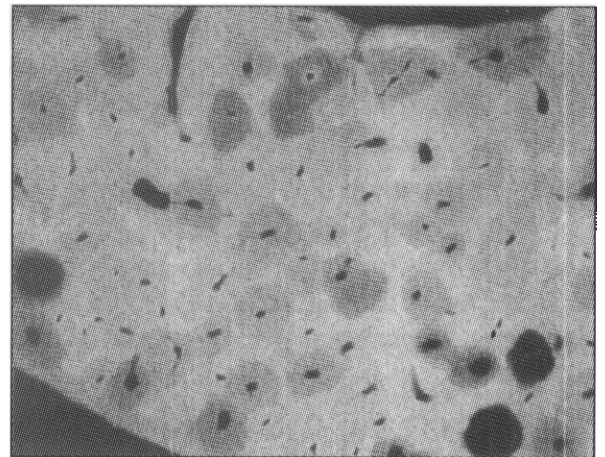


图1A 从接触显微照相采集的数字化图像(X25)。

### 1.5 统计学方法

利用Statview(SAS Institute Inc.,Cary,NC,U.S.A.)软件进行双因素方差统计学分析。如果总体有差异,再利用Fisher's protected least significant

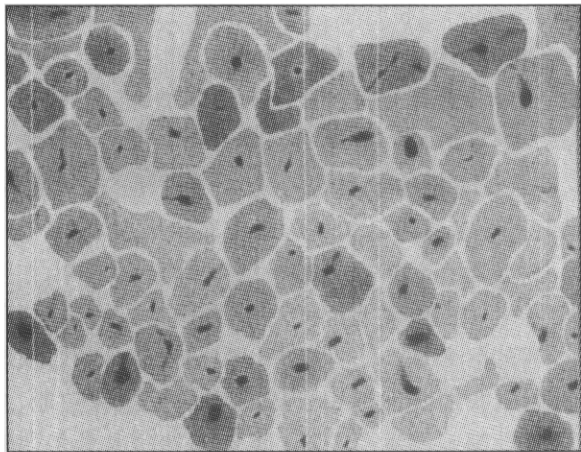


图 1B 利用 Adobe Photoshop 选取的骨单位  
(不包括正在骨重建的骨单位)

difference test(PLSD)进行组间分析。 $P < 0.05$  被认为有明显的统计学差异。

2 结果

组织形态计测结果表明两个治疗组的骨激活频率(Ac.f)都明显低于对照组,其中 YML 组的 Ac.f 较 CNT 组降低了 40%,YMH 组的 Ac.f 较 CNT 组降低了 82%。但骨的激活频率在两个治疗组之间无明显的统计学差异(图 2)。这表明 3a 双膦酸盐的应用明显抑制了皮质骨内的骨重建。

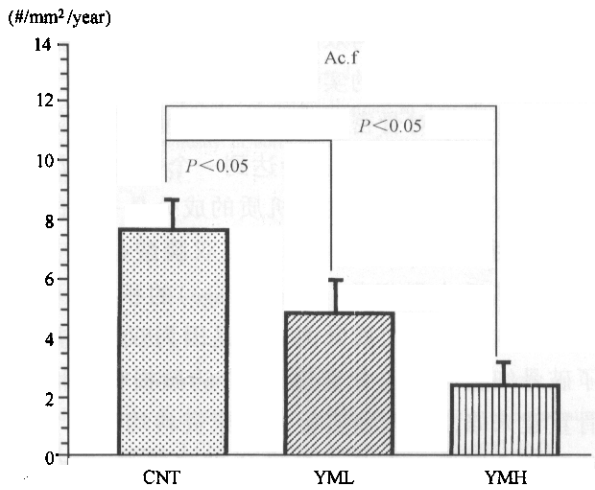


图 2 皮质骨内的骨激活频率(activation frequency)

对继发矿化的测定表明,低剂量和高剂量双膦酸盐组骨单位内的平均矿化程度(DMB)都明显高于对照组,其中 YML 组和 YMH 组的 DMB 较对照组分别增加了约 22% 和 30%。但是两个治疗组间无统计学的差异(图 3)。DMB 分布曲线(图 4)表明双膦

酸盐组的曲线随着治疗剂量的增大逐渐向高矿化端漂移,但是 3 个组曲线的形态基本一致,并且 3 组的峰值基本一致。这表明双膦酸盐的治疗增加了骨单位内矿盐的沉积,但没有改变低矿化和高矿化骨单位的原始比率,3 组的高矿化骨单位都在 23% 左右。这表明 3a 双膦酸盐的大剂量治疗增加了骨的平均矿化程度,但是并没有引起骨单位内的过度矿化。

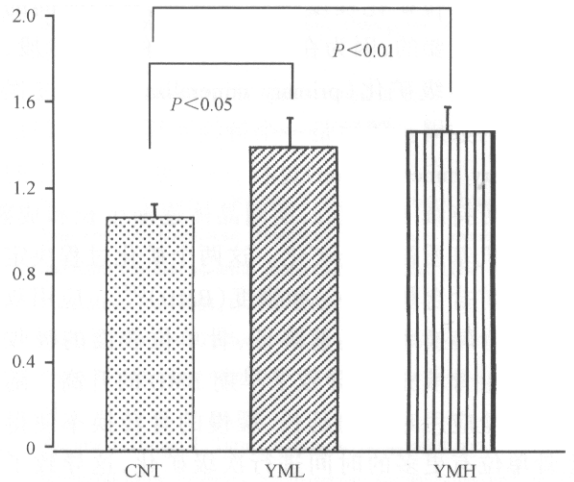


图 3 平均矿化程度

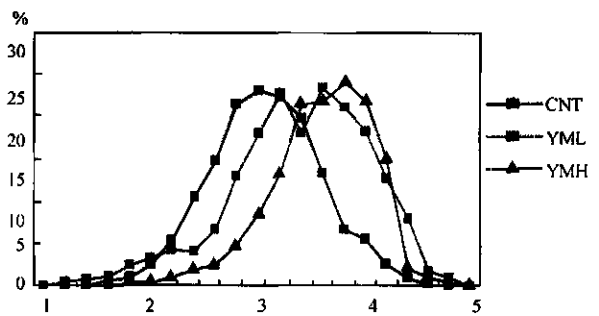


图 4 骨单位的平均矿化程度分布曲线

3 讨论

骨强度由骨密度和骨质量来决定,而骨质量是由骨转换率(turnover)、骨小梁的空间立体结构、骨基质内微损伤(microdamage)的程度、次级矿化程度(secondary mineralization)以及骨基质内矿盐和有机质的比率等决定的<sup>[16]</sup>。在骨质量的影响因素中,骨转换率起着决定性的作用。因为骨转换频率的降低将增加骨组织的平均年龄,并且有可能增加骨基质内矿盐晶体大小<sup>[17]</sup>。本实验就目前临床常用的一种双膦酸盐(因卡膦酸钠,incadronate)长期应用对矿化程度的影响进行了评估。

本实验结果表明 2.5 倍和 5 倍临床剂量的双膦酸盐分别将骨转换率降低了 40% 和 82%, 骨的平均矿化程度相应的增加了 22% 和 30%, 并且随着双膦酸盐治疗剂量的增大矿化程度分布曲线逐渐向高矿化端漂移。这表明 3 a 大剂量双膦酸盐的治疗的确如理论所预测, 明显增加了骨的矿化程度, 这主要是增加了陈旧的高矿化的骨单位数量。

对骨单位矿化程度进行评估时, 用药时间的长短是非常重要的, 因为在新生骨产生的初始阶段, 类骨质进行初级矿化 (primary mineralization) 的过程仅持续大约数周。随后是一个持续而缓慢的次级矿化 (secondary mineralization) 过程, 一个新生骨单位的次级矿化可持续 10 ~ 20 a, 期间晶体逐渐生长和成熟, 直至有机基质被完全矿化。这两个矿化过程决定了总体骨矿盐含量 (BMC) 和密度 (BMD)<sup>[18]</sup>。应用双膦酸盐后骨转换率可迅速降低, 骨单位表面的吸收陷窝被新生骨填充, 这导致了早期 BMD 的升高。随着双膦酸盐应用时间的延长, 缓慢的骨转换率使得新生骨单位有更多的时间进行次级矿化, 这导致了骨吸收陷窝在被完全填充后骨密度还可长时间地持续而缓慢地上升<sup>[11-13]</sup>。本实验组织形态学计测表明 3 a 因卡膦酸钠治疗明显抑制了骨转换, 两个治疗组的激活频率分别减低了 40% 和 82%。在以前的研究中<sup>[19]</sup> 我们曾对这 3 组标本进行了定量 CT (peripheral quantitative computed tomography, pQCT) 和生物力学测定, 发现两个治疗组的矿盐含量 (BMC) 和矿盐密度 (BMD) 都明显高于对照组, 并且两个治疗组骨的最大负荷 (ultimate load) 和硬度 (stiffness) 都较对照组明显增加, 这说明双膦酸盐治疗组力学强度的增加主要来自矿盐含量和密度的增加, 而 BMC 和 BMD 的增高主要来自次级矿化程度的增加和改善。

我们的发现与 Boivin 等<sup>[11]</sup>报道的 53 例绝经后骨质疏松妇女的髂骨活检结果是一致的, 他们发现 2 a 和 3 a 阿仑膦酸钠 (alendronate, 10 mg/d) 治疗使平均骨矿化程度分别增加了 9.3% 和 11.6%, 这都明显高于安慰剂组。并且 2 a 和 3 a 阿仑膦酸钠治疗增加了高矿化骨单位的比率。研究还发现阿仑膦酸钠组和对照组的 MDBM 的差异与这两组腰椎 BMD 的差异是相似的, 这说明 2 ~ 3 a 阿仑膦酸钠治疗后 BMD 的增加主要是来自骨单位的次级矿化。

但骨的矿盐含量并非越多越好, 如果 100% 矿化, 骨组织将变脆, 应力下发生变形的能力就会减弱。如果单位体积内矿盐的含量超过了 65%, 骨的

韧性 (toughness) 将减低。最近报道了阿仑膦酸钠长达 10 a 的临床随访资料<sup>[7]</sup>, 5 mg/d 和 10 mg/d 组都导致了椎体和股骨颈骨密度的持续增加, 但是 6 ~ 10 a 期间骨密度增加的效果不如刚开始前 3 a 的治疗效果, 并且抗骨折的效果也有随治疗时间的延长而减弱的趋势, 当然患者的年龄也在逐年增加。

并非所有的骨重建或骨吸收都是有害的, 在生理情况下通过骨重建清除受损的和陈旧的骨质, 代之以新的活力更强的骨组织。目前用于治疗骨质疏松的骨吸收抑制剂抑制了破骨细胞活性和功能, 缩短了破骨细胞的生命周期, 因为破骨和成骨是偶联在一起的, 从而可能会增加了成骨细胞的生命周期。如果骨重建受到过度抑制, 骨单位的矿化程度将更加完全和趋于一致, 骨的硬度将增加, 但骨的韧性将减低。从而抵挡微损伤累积的能力也将不可避免的减低。骨单位内矿化程度的同质性 (homogeneity) 将导致骨基质内更易发生微劈裂 (micro-crack) 以及微劈裂片断会更长<sup>[20]</sup>。

本研究的结果显示将骨转换率降低了 82% 的 3 a 双膦酸盐治疗增加了矿化程度, 但并没有导致过度矿化。至于更长期的应用是否会导致过度矿化, 目前尚未有报道。最近报道的阿仑膦酸钠应用 10 a 的临床资料<sup>[7]</sup>因为没有进行骨活检而未做这方面的研究, 有待以后进一步研究证实。尽管本实验 2.5 倍和 5 倍临床剂量的双膦酸盐的实验结果不能用来直接预测临床患者的实际情况。不过, 理论上来说, 双膦酸盐治疗对骨密度或骨矿化程度的增加随时间的增加会逐渐减弱, 并且会达到一个平台期, 因为骨基质内可供矿盐沉积的有机质的成分是一定的。尽管如此, 我们的实验<sup>[19, 21, 22]</sup>证实双膦酸盐的应用导致了骨基质内微损伤 (microdamage) 的积聚 (无论在皮质骨内还是在松质骨内), 这是因为双膦酸盐抑制了破骨细胞介导的骨重建, 而骨的微损伤恰恰需要骨重建来修复。动物实验和临床资料均证实<sup>[7-9]</sup>, 双膦酸盐应用后 3 个月内骨转换即可降低 50%, 6 个月后直至 10 a 以来一直维持在 73% 左右。骨转换率如此长时间的维持在低水平, 即便骨基质内的有机成分是一定的, 不会导致过度矿化, 但是骨微损伤的修复一直受到抑制, 一直处于累积的过程中, 累计到一定的程度将不可避免的影响骨的质量, 从而减弱双膦酸盐的抗骨折效果或是起到相反的效果。因此老年骨质疏松患者长期应用双膦酸盐的安全性值得进一步深入地研究。

## 【 参 考 文 献 】

- [ 1 ] Russell RG ,Rogers MJ. Bisphosphonates :From the laboratory to the clinic and back again. *Bone* ,1999 25 :97-106.
- [ 2 ] Fleisch HA. Bisphosphonates in Bone Disease. From the Laboratory to the Patient( 3rd Ed. ed. ). Parthenon ,New York( 1997 ).
- [ 3 ] Francis RM. Bisphosphonates in the treatment of osteoporosis in 1997 :A review. *Curr Ther Res* ,1997 58 :656-678.
- [ 4 ] Fleisch HA. Bisphosphonates :Mechanisms of action. *Endocrine Rev* ,1998 19 :80-100.
- [ 5 ] Rodan GA ,Fleisch HA. Bisphosphonates :mechanism of action. *J Clin Invest* ,1996 97 :2692-2696.
- [ 6 ] Fleisch HA. Bisphosphonates :mechanisms of action. *Endocr Rev* ,1998 19 :80-100.
- [ 7 ] Bone HG ,Hosking D ,Devogelaer JP ,et al. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *New Engl J Med* 2004 350 :1189-1199.
- [ 8 ] Delmas PD ,Recker RR ,Chesnut CH ,et al. Daily and intermittent oral ibandronate normalize bone turnover and provide significant reduction in vertebral fracture risk :results from the BONE study. *Osteoporos Int* 2004 15 :792-798.
- [ 9 ] Harris ST ,Watts NB ,Genant HK ,et al. Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis :a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* ,1999 282 :1344-1352.
- [ 10 ] Rodan G ,Alfred R ,Ellis G ,et al. Bone Safety of Long-Term Bisphosphonate Treatment. *Curr Med Res Opin* 2004 20 :1291-1300.
- [ 11 ] Boivin GY ,Chavassieux PM ,Santora AC ,et al. Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. *Bone* 2000 5 :687-694.
- [ 12 ] Roschger P ,Rinnerthaler S ,Yates J ,et al. Alendronate increases degree and uniformity of mineralization in cancellous bone and decreases the porosity in cortical bone of osteoporotic women. *Bone* ,2001 2 :185-191.
- [ 13 ] Burr DB ,Miller L ,Grynpas M ,et al. Tissue mineralization is increased following 1-year treatment with high doses of bisphosphonates in dogs. *Bone* 2001 29 :185-191.
- [ 14 ] Currey JD. The mechanical properties of bone. *Clin Orthop Rel Res* ,1970 73 :210-231.
- [ 15 ] Heaney RP. Remodeling and skeletal fragility. *Osteoporos Int* 2003 14( S5 ) :S12-S15.
- [ 16 ] NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention ,Diagnosis and Therapy. *JAMA* 2001 285 :785-795.
- [ 17 ] Boskey A. Bone mineral crystal size. *Osteoporos Int* ,2003 14( 5 ) :S16-S21.
- [ 18 ] Boivin G ,Meunier PJ. The mineralization of bone tissue :a forgotten dimension in osteoporosis research. *Osteoporos Int* ,2003 14( S3 ) :S19-S24.
- [ 19 ] Komatsubara S ,Mori S ,Mashiba T ,et al. Suppressed bone turnover by long-term bisphosphonate treatment accumulates microdamage but maintains intrinsic material properties in cortical bone of dog rib. *J Bone Miner Res* 2004 19 :999-1005.
- [ 20 ] Boivin G ,Meunier PJ. Changes in bone remodeling rate influence the degree of mineralization of bone. *Connect Tissue Res* 2002 43 :535-537.
- [ 21 ] Mashiba T ,Hirano T ,Turner CH ,et al. Suppressed bone turnover by bisphosphonates increases microdamage accumulation and reduces some biomechanical properties in dog rib. *J Bone Miner Res* 2000 15 :613-620.
- [ 22 ] Mashiba T ,Turner CH ,Hirano T ,et al. Effects of suppressed bone turnover by bisphosphonates on microdamage accumulation and biomechanical properties in clinically relevant skeletal sites in beagles. *Bone* 2001 28 :524-531.
- [ 23 ] Currey JD ,Brear K ,and Zioupos P. The effects of aging and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora. *J Biomech* ,1996 29 :257-260.

( 收稿日期 :2005-06-15 )