

糖皮质激素对大鼠骨密度的影响

刘石平 陈晶 杨淑敏 伍贤平 廖二元 莫慧 戴如春 盛志峰

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)07-0474-04

摘要:目的 探讨糖皮质激素(GC)对大鼠骨密度(BMD)的影响。方法 52 只 3.5 月龄雌性 SD 大鼠随机分为基线组 10 只、糖皮质激素造模组(GCT)22 只和对照组(Control)20 只。基线组 10 只实验开始时即处死,GCT 组和 Control 组分别在实验开始后 1 周、9 周各处死 11 只和 10 只,应用 QDR-4500A 扇形束双能 X 射线吸收法(DXA)测量大鼠全身、离体股骨及其兴趣区(FROI)的 BMD。结果 ①1 周和 9 周 GCT 组的全身、离体股骨整体及兴趣区 BMD 均较 Control 组下降(1 周时,FROI-1 例外),其中 9 周时,全身、股骨整体和 FROI-5 的 BMD 在两组间有显著性差异($P < 0.05$)。②大鼠造模 9 周后与 Control 组比较,骨量变化率从大到小依次为:FROI-2(-11.43%)>FROI-5(-9.83%)>FROI-7(-9.21%)>FROI-1(-8.71%)>股骨整体(-8.33%)>FROI-3(-8.12%)>FROI-4(-6.10%)>全身(-5.77%)>FROI-6(-5.18%)。③Control 组随增龄出现全身、股骨整体及兴趣区 BMD 的增加,但 GCT 组 BMD 变化不大。结论 GC 所致骨丢失以松质骨含量丰富的兴趣区明显,GC 可影响生长期大鼠骨量的获得。
关键词:骨密度;大鼠;双能 X 射线吸收法

Effect of glucocorticoid on bone mineral density in rats LIU Shiping, CHEN Jing, YANG Shumin, et al. Institute of Metabolism and Endocrinology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China

Abstract: Objective To investigate the effect of glucocorticoid(GC) on bone mineral density(BMD) in rats.

Methods Fifty-two 3.5-month-old female SD rats were recruited: ten of them were killed as the baseline group; and the others were randomly assigned to the GC-treated group(GCT) or control group, and each group included 22 rats or 20 rats. Whole body BMD *in vivo*, the BMD of femur and femoral regions of interest(FROI) were all measured by dual energy X-ray absorptiometry(DXA) using QDR-4500A equipment in the baseline group at the beginning, the first week and ninth week post-experiment in GCT and control groups respectively. **Results** ① Compared with the control rats at each time-point, there was a decrease in body BMD *in vivo*, the femoral BMD *in vitro* and FROI(at one week post-experiment, except FROI-1), but whole body BMD *in vitro*, the femoral BMD *in vitro* and FROI-5 in GCT at nine weeks post-experiment was significantly lower than that in the control group($P < 0.05$). ② At the ninth week post-experiment, the change rate of bone mass was listed in order in GCT group as compared with the control group: FROI-2(-11.43%)>FROI-5(-9.83%)>FROI-7(-9.21%)>FROI-1(-8.71%)>femoral BMD *in vitro*(-8.33%)>FROI-3(-8.12%)>FROI-4(-6.10%)>whole BMD *in vivo*(-5.77%)>FROI-6(-5.18%). ③ Whole body BMD *in vivo*, the BMD of femur and femoral regions of interest(FROI) increased significantly in the control group with age, but there was no significant change in GCT group. **Conclusions** ① The regions of interest which are rich in trabecular bone are affected most markedly by glucocorticoid treatment. ② Glucocorticoid may affect bone accumulation in the growing rats.

Key words: Bone mineral density; Rats; Dual energy X-ray absorptiometry

基金项目:湖南省科技厅计划项目(05SK3017)

作者单位:410011 长沙 中南大学湘雅二医院代谢内分泌研究所

通讯作者:刘石平,Email:shipingliu119@126.com

骨质疏松的发生是骨形成和骨吸收不平衡使骨量丢失、骨微结构衰败所致。糖皮质激素(GC)一方面通过降低成骨细胞的活性和增加成骨细胞的凋亡抑制骨形成 ,另一方面通过延长破骨细胞的生命而增加骨吸收 此外 ,GC 还通过对肠道、肝脏和肾脏的影响 ,使钙磷代谢紊乱 ,从而导致 GC 使用者的骨量丢失 ,甚至发生糖皮质激素性骨质疏松症(GIOP)^[1]。由于 GC 在临床上的广泛使用 ,GIOP 的发病率逐年上升 ,已成为最常见的继发性代谢性骨病^[2]。对绝经后骨质疏松症和老年性骨质疏松症的研究发现 :无论是人类还是动物 ,不同骨骼部位或骨结构不同的区域达峰值骨量的年龄以及骨量丢失开始的时间和速度存在明显差异^[3-4]。GC 对骨骼的影响是否存在骨骼部位和时间的特异性呢 ? 本研究应用先进的扇形束 QDR-4500A 型双能 X 射线吸收法(DXA)测量大鼠全身、离体股骨及其兴趣区骨密度(BMD) ,了解 GC 影响大鼠骨密度的特点。

1 材料和方法

1.1 大鼠分组与处置

52 只 3.5 月龄雌性 SD 大鼠(湘雅二医院动物实验中心提供) ,平均体重(288.2 ± 17.5)g。在动物室适应 2 周后 ,随机分为基线组 10 只、糖皮质激素造模组(GCT)22 只和对照组(Control)20 只。普通大鼠标准饲料喂养 ,控制食量每只 22g/d ,自由饮水 ,饲养环境温度 25℃ ,12h 昼夜照明节律。GCT 组每日一次皮下注射甲基泼尼松龙 3.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹^[5] ,

Control 组每日一次皮下注射等剂量的生理盐水。

1.2 全身 BMD 和离体股骨 BMD 的测量

实验开始后 ,用 30g/L 戊巴比妥钠按 1ml/kg 体重腹腔注射麻醉基线组大鼠 ,待麻醉成功后 ,用 QDR-4500A 型扇形 DXA(Hologic 公司)及所附带的小动物软件测量大鼠全身 BMD ,然后经腹主动脉放血处死大鼠 ,剥离右侧股骨 ,用 DXA 扫描测量其 BMD ,从股骨远端将股骨等分成 7 个感兴趣区(ROI)。GCT 组和 Control 组中一半大鼠于实验开始 1 周时 ,另一半于 9 周时按上述方法测量全身 BMD 和离体股骨 BMD。DXA 测量大鼠全身 BMD 的批内、批间 CV 分别为 0.71% 和 0.99%^[6] ;DXA 测量大鼠离体股骨整体 BMD 的批内、批间 CV 分别为 2.02% 和 2.81%^[6]。

1.3 统计学处理

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有统计学分析用 SPSS 13.0 软件包完成 ,同一时间点下 ,GCT 组与 Control 组间比较用独立样本的 *t* 检验 ;GCT 组、Control 组各时间点与基线组以及时间点之间的比较用单因素方差分析。 *P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 GCT 组与 Control 组不同骨骼区域 BMD 和骨量变化率比较

造模后 1 周和 9 周 ,GCT 组与 Control 组全身、离体股骨整体及其兴趣区 BMD 的差异见表 1。1 周和

表 1 GCT 组和 Control 组全身、离体股骨及其兴趣区不同时间点的骨密度($\bar{x} \pm s$,g/cm²)

组别 Group	<i>n</i>	全身 Whole body	离体股骨 Total femur in vitro							
			整体 Total	FROI-1	FROI-2	FROI-3	FROI-4	FROI-5	FROI-6	FROI-7
基线组 Baseline group	10	0.144 ± 0.008	0.225 ± 0.009	0.287 ± 0.016	0.198 ± 0.014	0.180 ± 0.010	0.208 ± 0.014	0.221 ± 0.009	0.243 ± 0.014	0.219 ± 0.018
GCT										
1 周 First week	11	0.141 ± 0.003	0.219 ± 0.008	0.279 ± 0.021	0.193 ± 0.014	0.177 ± 0.012	0.197 ± 0.015	0.218 ± 0.014	0.235 ± 0.010	0.209 ± 0.014
9 周 Ninth week	11	0.147 ± 0.006 [#] ▽	0.220 ± 0.011 ▽	0.283 ± 0.023	0.186 ± 0.014	0.181 ± 0.010	0.200 ± 0.011	0.211 ± 0.008 ▽	0.238 ± 0.012	0.217 ± 0.016
Control										
1 周 First week	10	0.145 ± 0.006	0.224 ± 0.013	0.276 ± 0.019	0.196 ± 0.016	0.184 ± 0.020	0.204 ± 0.018	0.227 ± 0.019	0.239 ± 0.015	0.214 ± 0.017
9 周 Ninth week	10	0.156 ± 0.008 ^{** ##}	0.240 ± 0.024 [#]	0.310 ± 0.032 ^{** ##}	0.210 ± 0.031	0.197 ± 0.019 [*]	0.213 ± 0.021	0.234 ± 0.021	0.251 ± 0.028	0.239 ± 0.025 ^{* ##}

注 :与基线组比较 Compared with baseline group ,^{*} *P* < 0.05 ,^{**} *P* < 0.01 ;与同组 1 周比较 Compared with the same group at the first week ,[#] *P* < 0.05 ,^{##} *P* < 0.01 ;与同一时间点的 Control 组比较 Compared with control group at the same time ,[▽] *P* < 0.05

9 周 GCT 组的全身、离体股骨整体及兴趣区 BMD 均较 Control 组下降(1 周时, FROI-1 例外), 其中 9 周时, 全身、股骨整体和 FROI-5 的 BMD 在两组间有显著性差异($P < 0.05$)。大鼠造模 9 周后与 Control 组比较, 骨量变化率从大到小依次为: FROI-2(-11.43%)、FROI-5(-9.83%)、FROI-7(-9.21%)、FROI-1(-8.71%)、股骨整体(-8.33%)、FROI-3(-8.12%)、FROI-4(-6.10%)、全身(-5.77%)、FROI-6(-5.18%)。

2.2 GCT 组与 Control 组不同骨骼区域 BMD 随时间的变化

GCT 组与 Control 组全身、离体股骨整体及其兴趣区 BMD 随时间变化的比较见表 1。Control 组随增龄出现全身、股骨整体及兴趣区 BMD 的增加, 其中全身、股骨整体、FROI-1、FROI-3 和 FROI-7 的 BMD 增加尤为显著($P < 0.05 \sim 0.01$)。GCT 组随造模时间的延长, 股骨整体及兴趣区 BMD 变化不大, 但全身 BMD 仍有显著性增高($P < 0.05$)。

3 讨论

为了探讨代谢性骨病的病因, 科研中大量使用动物模型来模拟人类的疾病。美国食品和药品管理局(FDA)明确提出大鼠和灵长类是研究骨质疏松的常用模型, 因其反应与人类最为相似, 而灵长类的实验费用昂贵, 故最常用大鼠来复制模型。目前, 雌性大鼠被认为是研究代谢性骨病的较好动物模型。DXA 直接测量小实验动物的 BMD, 具有较高的精密度和准确度^[7]。用 DXA 作为测量手段, 以 BMD 作为指标, 已被全世界的研究者广泛接受。BMD 的测量是诊断骨质疏松、估计骨质疏松的程度、评价骨质疏松的疗效的必要手段。

大鼠去卵巢^[4]与女性绝经^[3]引起的雌激素缺乏导致不同骨骼部位或骨结构不同的区域骨丢失方式和骨量变化率存在明显差异。生长期大鼠去卵巢后松质骨显著丢失, 主要由皮质骨组成的区域 BMD 显著增加^[8]。而骨组织形态计量学研究显示: 原发性甲状旁腺功能亢进病例的骨皮质多孔性明显, 厚度下降, 松质骨的病变不均一, 从整体组织上看, 松质骨的大体结构变化不明显, 有时甚至是骨形成多于骨吸收(轻型病例)^[9]。由此看来, 不同原因所致骨质疏松, 主要受累骨骼部位和区域可能是不同的。目前认为 GIOP 的发生原因有 GC 对组成不同的不同部位骨骼的影响如何呢? 本研究采用甲泼尼龙龙 3.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 雌性 SD 大鼠腹部皮下注射, 发现

甲泼尼龙龙皮下注射后 1 周就可引起大鼠全身、股骨整体及其兴趣区 BMD 的下降, 到 9 周时, 全身、股骨整体和 FROI-5 的 BMD 较对照组显著下降($P < 0.05$)。提示 GC 相关的骨丢失在治疗早期就可发生, BMD 下降的程度与 GC 的持续时间或累积剂量有关, 这与 GC 在临床中应用对 BMD 的影响存在剂量和时间依赖性相一致^[10]。另外, 本研究再次证实甲泼尼龙龙 3.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 雌性 SD 大鼠腹部皮下注射 9 周后, 用 DXA 评价可成功复制 GIOP 模型^[5]。雌性大鼠的全身整体 BMD 与在体和离体腰椎 BMD 具有较好的一致性^[11], 因此, 尽管本研究未测量大鼠活体和离体腰椎 BMD, 但仍可推导出: GC 可引起主要由松质骨组成的腰椎 BMD 的下降。对骨量变化率进行排序, 本研究发现大鼠 GC 注射 9 周后 FROI-2 的骨量变化率(-11.43%)最大, 其次分别是 FROI-5(-9.83%)、FROI-7(-9.21%)和 FROI-1(-8.71%), 而这些部位主要以松质骨组成占优势, 提示 GC 所致骨丢失以松质骨含量丰富的兴趣区明显。Iwamoto 等^[12]发现给 3 月龄 SD 大鼠皮下注射甲泼尼龙龙每周 3 次持续 4 周可引起松质骨骨量减少, 而对皮质骨无显著影响, 但上述治疗持续 8 周后也可引起皮质骨的骨量减少, 这也提示 GC 引起骨量丢失是从松质骨开始的。这是因为机体尽管只有 20% 的骨骼由松质骨构成, 但由于其骨表面积明显大于皮质骨, 在骨代谢中起主要作用。该研究结果也能很好解释 GIOP 所致骨折通常好发于富含松质骨的腰椎、髋部等部位。

不同时间点 BMD 的比较显示: 对照组从干预后 1 周到 9 周全身 BMD 和股骨整体及各兴趣区 BMD 明显增加, 而 GCT 组 BMD 变化不大(见表 1), 提示 3.5 月龄大鼠为生长期鼠, 在生长期给予 GC 治疗会影响大鼠随增龄骨量的获得。Pennisi 等^[13]也用 DXA 发现氢化可的松 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 每周 5 天肌肉注射可抑制生长期大鼠所测量骨骼部位骨量的获得, 而且发现这种抑制作用可被一氧化氮的供体(左旋精氨酸)阻止。因此, 对青少年、儿童使用 GC 者, 要密切关注 GC 对患者峰值骨量获得的影响, 及早进行干预。

GC 可增加骨折危险, 不完全依赖于对 BMD 的影响^[14,15]。GC 使用者发生骨折的 BMD 高于原发性骨质疏松症患者, BMD 大约为正常年轻成人均值的 80% 时就可发生骨折^[16]。因此, 开展 GC 对骨质量的影响研究, 显得更为重要, 这方面的工作我们将在以后的论文中进行报道。

【 参 考 文 献 】

- [1] Popp AW, Isenegger J, Buerger EM, et al. Glucocorticosteroid-induced spinal osteoporosis: scientific update on pathophysiology and treatment. *Eur Spine J*, 2006, 15(7):1035-1049.
- [2] Curtis JR, Saag KG. Prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*, 2007, 5(1):14-21.
- [3] Wu XP, Liao EY, Huang G, et al. Establishment of bone mineral density reference plots and peaks for different skeletal sites in women. *Chin J Osteoporosis*, 2004, 10(1):30-34. (in Chinese)
- [4] Lu ZY, Liao EY, Wu XP, et al. Effect of ovariectomy on bone mineral density in rats. *Chin J Osteoporosis*, 2002, 8(1):13-15. (in Chinese)
- [5] Hulley PA, Conradie MM, Langeveldt CR, et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis in the rat is prevented by the tyrosine phosphatase inhibitor, sodium orthovanadate. *Bone*, 2002, 31(1):220-229.
- [6] Lu ZY, Liao EY, Wu XP, et al. Dual-energy X-ray absorptiometry of rats: precision and measurement of bone loss *in vivo*. *Chin J Osteoporosis*, 2001, 7(3):199-201, 229. (in Chinese)
- [7] Griffin MG, Kimble R, Hopfer W, et al. Dual-energy x-ray absorptiometry of the rat: accuracy, precision, and measurement of bone loss. *J Bone Miner Res*, 1993, 8(7):795-800.
- [8] Wu XP, Liao EY, Lu ZY, et al. Evaluation of rat bone mass measurement by dual-energy X-ray absorptiometry and determination of sensitive regions of bone loss in ovariectomized rats. *Chin J Endocrinol Metab*, 2000, 16(4):212-215. (in Chinese)
- [9] Mosekilde L. Primary hyperparathyroidism and the skeleton. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2007, Dec 20. [Epub ahead of print]
- [10] Steinbuch M, Youket TE, Cohen S. Oral glucocorticoid use is associated with an increased risk of fracture. *Osteoporos Int*, 2004, 15(4):323-328.
- [11] Zhang N, Liao EY, Wang WB, et al. Investigation of the consistency of bone mineral density between whole-body and lumbar spine in female rats. *Chin J Endocrinol Metab*, 2002, 18(2):120-122. (in Chinese)
- [12] Iwamoto J, Seki A, Takeda T, et al. Effects of alfacalcidol on cancellous and cortical bone mass in rats treated with glucocorticoid: a bone histomorphometry study. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2007, 53(3):191-197.
- [13] Pennisi P, D'Alcamo MA, Leonetti C, et al. Supplementation of L-arginine prevents glucocorticoid-induced reduction of bone growth and bone turnover abnormalities in a growing rat model. *J Bone Miner Metab*, 2005, 23(2):134-139.
- [14] Lane NE, Yao W, Balooch M, et al. Glucocorticoid-treated mice have localized changes in trabecular bone material properties and osteocyte lacunar size that are not observed in placebo-treated or estrogen-deficient mice. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(3):466-476.
- [15] Kaji H, Yamauchi M, Chihara K, et al. The threshold of bone mineral density for vertebral fracture in female patients with glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocr J*, 2006, 53(1):27-34.
- [16] Tanaka I, Oshima H. Glucocorticoid-induced osteoporosis and bone mineral densimetry. *Clin Calcium*, 2004, 14(12):77-82.

(收稿日期:2008-06-09)