

# 硝酸甘油间断性给药对大鼠糖皮质激素性骨质疏松模型骨密度及血清 NOS 水平影响的初步研究

颜廷振 黄朝梁 邓忠良 陈世荣 柯珍勇 蔺超

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)07-0482-04

**摘要:**目的 观察大鼠糖皮质激素性骨质疏松模型血清一氧化氮合酶(NOS)变化及硝酸甘油(Nitroglycerin, NG)对糖皮质激素性骨质疏松的防治作用。方法 健康 3 月龄 SD 雄性大鼠 30 只, 体重( $251 \pm 12.5$  g) 随机分为 3 组, 每组 10 只。模型组(A)给予生理盐水和地塞米松, 实验组(B)给予地塞米松和硝酸甘油, 对照组(C)给予生理盐水。试验 8 周后测量各组大鼠第 3 腰椎及右股骨中段骨密度, 并行切片 HE 染色观察骨组织显微结构, 测量大鼠体重、血清一氧化氮合酶(NOS)、碱性磷酸酶含量。结果 8 周后 3 组体重差异明显( $P < 0.01$ ) 模型组体重低于实验组, 实验组低于对照组。实验组第 3 腰椎骨密度值明显高于模型组( $P < 0.01$ )。对照组骨密度值与实验组比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。各组股骨骨密度值无明显差异( $P > 0.05$ )。实验组第 3 腰椎骨小梁形态结构与对照组相似, 模型组骨小梁稀疏、断裂。模型组 ALP 较对照组及实验组明显升高( $P < 0.01$ ), NOS 各组差异不明显( $P > 0.05$ )。结论 血清 NOS 水平不宜作为激素性骨质疏松症的评价指标, 硝酸甘油可有效预防糖皮质激素性骨质疏松的发生。

**关键词:** 骨质疏松症; 糖皮质激素; 硝酸甘油; 一氧化氮合酶

**Effect of intermittent administration of Nitroglycerin on BMD and serum NOS levels in glucocorticoid-induced osteoporosis** YAN Tingzhen, HUANG Chaoliang, DENG Zhongliang, et al. The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Department of Orthopaedics, Chongqing 400016, China

**Abstract:** **Objective** To observe the effect of NG on serum NOS levels in rat model with glucocorticoid-induced osteoporosis and its effectiveness on preventing glucocorticoid-induced osteoporosis. **Methods** Thirty male SD rats, weighing( $251 \pm 12.5$  g) each, were randomly divided into 3 groups (10 rats for each group). The experiment group A rats were given natrium chloride and dexamethasone. The group B were given dexamethasone and NG. Control group C rats were given only natrium chloride. Eight weeks later, the bone mineral density of the third lumbar vertebral bodies and the femur of all the rats were measured, and the structure of bone trabeculae, the body weight, NOS, ALP in serums were measured too. **Results** The values of bone mineral density in Group C were significantly higher than that of Group B ( $P < 0.01$ ). No significant difference was observed in bone mineral density between Group A and Group C ( $P > 0.05$ ). The bone mineral density of femur between the groups presented no significant difference. The structure of bone trabeculae of Group C was similar to that of Group B, and Group A presented the feature of osteoporosis. ALP levels of Group A were significantly increased compared with the corresponding value of Group B and Group C ( $P < 0.01$ ). The serum NOS between the three groups was of no significant difference( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The change of serum NOS is not suitable for evaluating the bone loss in rat model with glucocorticoid-induced osteoporosis. Intermittent administration of NG can prevent the osteoporosis induced by glucocorticoid effectively.

**Key words:** Osteoporosis; Glucocorticoid; Nitric oxide synthetase; Nitroglycerin

糖皮质激素性骨质疏松(Glucocorticoid-induced osteoporosis, GC-OP)是常见的继发性骨质疏松。随着糖皮质激素广泛用于临床,糖皮质激素性骨质疏松(GC-OP)发病率剧增,目前仅次于绝经后及老年性骨质疏松症而居第 3 位<sup>[1]</sup>,且常引起病理性骨折,致残率较高。

近年来,生物医学界发现一氧化氮(NO)及一氧化氮合成酶(NOS)在参与和促进骨质疏松症的病理生理过程中起着重要的作用<sup>[2]</sup>。NOS 低水平表达时,合成低浓度 NO,促进骨吸收,进而引起骨质疏松。NO 供体药物硝酸甘油(NG)对去卵巢大鼠骨质疏松模型骨密度的影响已经得到试验证实,其可以预防去卵巢大鼠骨密度的丢失。临床上骨质疏松症的发病机制复杂,各型骨质疏松发病机理并不完全相同。NO 供体药物硝酸甘油对去卵巢大鼠骨质疏松模型的治疗性作用研究较多,而对激素性骨质疏松骨密度的影响尚不明确。目前已经证实骨组织主要存在 eNOS 和 iNOS 两种亚型<sup>[2]</sup>,且糖皮质激素可以造成 eNOS 基因的低表达,从而使 eNOS 依赖性 NO 的低表达可能是糖皮质激素性骨质疏松(GCOP)的重要发病机制<sup>[3]</sup>。故我们推论 NO 供体药物硝酸甘油可能具有预防大鼠激素性骨质疏松模型骨丢失的作用,且试验证实 NG 的治疗性作用与 NG 的使用量及使用频率并不成正比,增加用药剂量及用药频率甚至会起相反作用,引起大鼠骨质疏松模型骨量的进一步丢失。故我们采用中等剂量硝酸甘油(NG),间断性给药的方法,观察其对激素性骨质疏松(GCOP)大鼠体重、腰椎骨股骨密度(BMD)和血清 NOS 及 ALP 的影响,探讨其对激素性骨质疏松的预防及治疗性作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及主要仪器

硝酸甘油注射液(北京益民药业有限公司,批号 20070227)地塞米松注射液(西南药业股份有限公司,批号:07050073);ALP 试剂盒(南京建成生物工程研究所),NOS 试剂盒(南京建成生物工程研究所),双能 X 线骨密度仪(美国 NORLAND,型号 XR-46),全波长酶标仪(美国 Multiskan spectrum Thermo)。

### 1.2 试验动物分组及给药方法

取健康 3 月龄 SD 大鼠 30 只,体重( $251 \pm 12.5$ )kg,重庆医科大学试验动物中心提供,饲养于清洁级环境中,自由摄食标准饲料和饮水。随机分

为 3 组,每组 10 只。模型组(A)隔天 1 次腹腔注射给予等量生理盐水,每周 2 次肌肉注射地塞米松,每次 2.5 mg/kg 体重。实验组(B)隔天 1 次腹腔注射间断给予硝酸甘油 0.4 mg/kg 体重,每周 2 次肌肉注射地塞米松 2.5 mg/kg 体重。对照组(C)隔天 1 次腹腔注射等量生理盐水,每周 2 次肌肉注射生理盐水 2.5 mg/kg 体重。各组试验动物每周测量体重变化。试验 8 周后处死动物。

### 1.3 大鼠第三腰椎及股骨骨密度测定

10%水合氯醛麻醉动物后置于动物手术台上,计数大鼠 6 腰椎,切取第三腰椎,去除附着的肌肉筋膜组织、椎间盘及椎孔内神经束,保留完整椎体、棘突、椎板,置于 10%福尔马林溶液中固定。取大鼠右侧股骨干,去除附着肌肉组织,置于 10%福尔马林溶液中固定。立即送检测定骨密度(由重庆医科大学附属第二医院核医学科骨密度室完成)。采用美国 NORLAND XR-46 型双能 X 线骨密度仪人体感兴趣部位软件测定(软件名称:Norland Bone Densitometer, Host Software Version:3.9.6, Scannce Software Version:2.3.1),电脑自动分析结果。为统一测定部位,股骨骨密度取股骨中段测定。

### 1.4 血清 NOS、ALP 含量测定

大鼠下腔静脉取血 5 ml,4℃过夜,3000 r/min 离心机上离心 15 min 分离血清,按照试剂盒说明书进行测定操作,全波长酶标仪测定样品管和标准管消光值,计算 ALP、NOS 含量。测定由重庆医科大学附属第一医院神经外科实验室完成。

### 1.5 骨组织形态学观察

取大鼠第 3 腰椎及右股骨中段于 10%福尔马林溶液中固定 48 h 后,0.5%硝酸脱钙,每天更换 1 次脱钙液,直至大头针可刺入为止,流水冲洗 24 h,梯度酒精脱水,透明石蜡包埋,切片由重庆医科大学组织胚胎学教研室完成,常规 HE 染色,依据病理学骨质疏松症镜下诊断标准定性观察骨小梁结构大体形态的改变。

### 1.6 统计学处理

数据均以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{X} \pm s$ )表示,所有数据先行正态性(小样本 W 检验)和方差齐性检验(Lenvene 检验),各组间比较采用单因素方差分析,样本均数间的两两比较采用 LSD 方法检验,统计软件 SPSS 13.0 for Windows。

## 2 结果

### 2.1 两组大鼠以体重作为基线资料比较,各组间差

异无显著性( $P > 0.05$ ), 8 周后 3 组体重差异有显著性( $P < 0.01$ ), 模型组 A 实验组 B 体重与对照组减低, 实验组 B 体重与模型组 A 比较差异有显著性( $P < 0.05$ ), B 组体重高于 A 组, 但小于 C 组。

表 1 各组大鼠体重

组别	鼠数(只)	试验前(g)	8 周后(g)
模型组	10	249 ± 12.6	281 ± 19.4 <sup>△*</sup>
实验组	10	252 ± 12.6	304 ± 16.0
对照组	10	251 ± 12.5	355 ± 13.8

注:与对照组比较, <sup>△</sup>  $P < 0.05$ , 与实验组比较, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*</sup>  $P < 0.01$

## 2.2 大鼠腰椎及股骨 BMD

模型组 A 大鼠腰椎骨密度低于对照组( $P < 0.05$ ), 实验组 B 腰椎 BMD 与对照组无明显差异性( $P > 0.05$ ), 模型组及实验组股骨骨密度明显低于对照组( $P < 0.01$ ), 模型组与实验组股骨骨密度无明显差异( $P > 0.05$ ), 但实验组股骨骨密度均值要高于模型组。

## 2.3 血清 NOS 及 ALP

3 组血清 cNOS 含量差异性不明显( $P = 0.049$ ),

但模型组 A 血清 cNOS 有下降的趋势。模型组血清 ALP 较实验组及对照组明显升高( $P < 0.01$ )。

表 2 大鼠腰椎及股骨 BMD

组别	鼠数(只)	腰椎 BMD	股骨 BMD
模型组	10	0.11977 ± 0.0039 <sup>△*</sup>	0.1069 ± 0.0062 <sup>△</sup>
实验组	10	0.12612 ± 0.0029	0.1079 ± 0.0069
对照组	10	0.12715 ± 0.0027	0.1181 ± 0.0049

注:与对照组比较, <sup>△</sup>  $P < 0.05$ , 与实验组比较, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*</sup>  $P < 0.01$

表 3 不同组大鼠血清 NOS、ALP 变化

组别	鼠数(只)	血清 cNOS(U/ml)	血清 ALP(金氏单位/ml)
模型组	10	15.79 ± 2.34	24.64 ± 4.15 <sup>△*</sup>
实验组	10	16.55 ± 2.30	20.80 ± 4.45
对照组	10	16.90 ± 2.64	17.58 ± 2.37

注:与对照组比较, <sup>△</sup>  $P < 0.05$ , 与实验组比较, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*</sup>  $P < 0.01$

## 2.4 大鼠腰椎及股骨形态学观察

模型组 A 骨小梁纤细, 多呈扭曲撕裂状, 连接性较差, 髓腔增大。实验组 B 与正常组 C 相似, 骨小梁较粗壮, 连接性好, 骨基质清晰, 髓腔大小均匀。

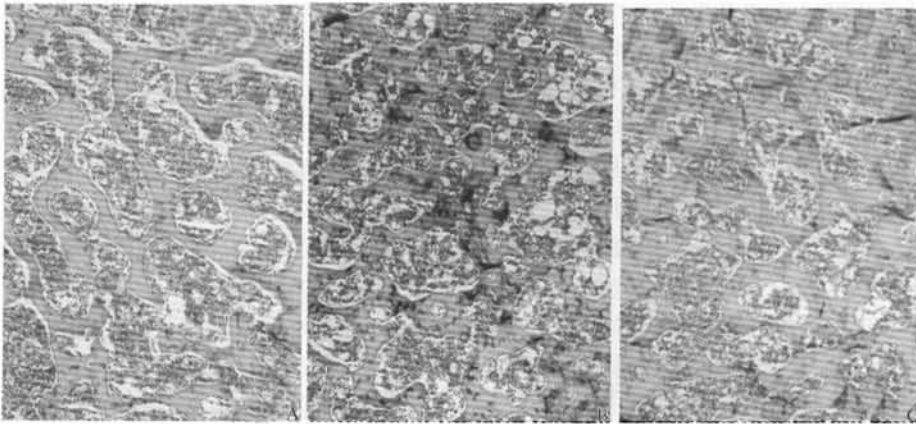


图 1 大鼠腰椎组织切片染色(HE×100 光镜)(A 为模型组、B 为实验组、C 为对照组)

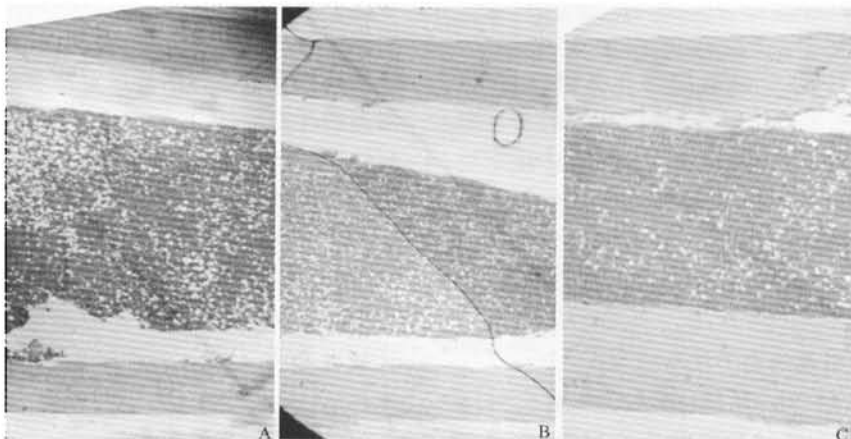


图 2 大鼠股骨组织切片(HE×40 光镜)(A 为模型组、B 为实验组、C 为对照组)

模型组 A 与实验组 B 相似,其股骨干髓腔较大,皮质较薄。对照组 C 骨皮质较厚,股骨干髓腔较小。

### 3 讨论

一氧化氮(NO)是一种生物信息传递体,具有第二信使和神经递质作用,在体内介导和调节多种病理生理反应。NO 的研究引起了世界医学界的普遍关注,研究证明 NO 在骨的吸收与重建中也起着重要作用。

NO 在体内由 NO 前体物质 L-精氨酸在一氧化氮合酶(NOS)的催化下与氧分子作用生成,其中, NOS 是体内 NO 合成的限速酶,其活性与 NO 水平直接相关<sup>[4]</sup>。而试验也证明, eNOS 的合成对骨质疏松治疗有益<sup>[5]</sup>。一氧化氮合酶(NOS)有 3 种亚型:神经元型(nNOS)、内皮细胞型(eNOS)和诱生型(iNOS),分别有不同的基因编码。目前已经证实骨组织主要存在 eNOS 和 iNOS<sup>[2]</sup>。正常生理情况下, eNOS 产生低浓度的 NO(pmol 级)具有生理作用<sup>[5]</sup>。iNOS 在正常生理情况下不表达,其在炎症因子如 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  作用下可产生高浓度的 NO,从而介导炎症性疾病的骨丢失<sup>[7]</sup>。在长期应用糖皮质激素情况下,炎症反应被抑制,从而抑制 iNOS 依赖的多种细胞因子的释放,致使 iNOS 不表达,只有 eNOS 表达。因此,血清 eNOS 的浓度与血清 eNOS 浓度呈正相关。试验证明,糖皮质激素可以导致 eNOS 活性降低,进而使 eNOS 依赖性 NO 低表达,是 GC-OP 的重要发病机制<sup>[3]</sup>。NO 是一种小分子气体,尽管其半衰期较短,但由于其透膜性非常好,所以其作用半径往往比较大。外源性给予 NO 供体产生的 NO,可迅速弥散至组织局部而发挥作用。极微量的组织局部 NO(pmol 级)即可起到正常生理作用。试验结果表明 3 组血清 eNOS 无明显差异( $P > 0.05$ ),由于正常 iNOS 只在炎症等病理状态下表达,从而血清 eNOS 含量与 eNOS 呈正相关,血清 eNOS 与血清 eNOS 正相关。血清 eNOS 3 组无明显差异,其原因可能为:①eNOS 在其他组织细胞如内皮细胞中也存在,骨组织 eNOS 的低达程度尚不足以引起血清 eNOS 含量的重大变化,因此血清 eNOS 也没有太大变化;②试验时间较短,数据表明实验组血清 eNOS 已有下降趋势,如延长试验时间实验组血清 eNOS 浓度可能与正常组存在差异。因此,血清 eNOS 变化并不是反应糖皮质激素性骨质疏松疾病程度的敏感指标,不宜用来评价糖皮质激素性骨质疏松的治疗效果。

硝酸甘油已被多次试验证明对去卵巢大鼠骨质疏松有很好的治疗性作用,其作用机制跟 NG 在体内产生的 NO 有关。硝酸甘油是治疗心血管疾病的传统药物,其在临床上的应用表明,在连续应用时极易形成耐受性,导致后期治疗过程中药效减弱甚至消失,这可能也是造成研究中实验结果不一致的原因。研究也表明,增加 NG 的使用量及频率对去卵巢大鼠骨质疏松的治疗性作用上并没有增强,甚至会起相反作用<sup>[8]</sup>。临床上预防或减缓硝酸甘油耐受性可以采取调整用药剂量、减少用药频率或间歇用药的方法,但间断给药对预防 GIOP 骨丢失的治疗性效果尚不得知。本次试验采用隔天给药的方式,结果表明,采用隔天给药的方式,其可在一定程度上抑制大鼠体重的减轻,实验组 B 体重明显要高于模型组 A( $P < 0.05$ )但低于对照组 C( $P > 0.05$ ),其具体机制尚不清楚。给药 8 周后,实验组大鼠第三腰椎骨密度及股骨骨密度与模型组差异有显著性( $P < 0.01$ ),而与对照组无明显差异( $P > 0.05$ ),从而表明,间断性给予 NG 可明显增加实验组大鼠腰椎骨密度,预防糖皮质激素引起的骨丢失。模型组及实验组股骨骨密度明显低于对照组( $P < 0.01$ ),模型组与实验组股骨骨密度无明显差异( $P > 0.05$ ),但实验组股骨骨密度均值要高于模型组。其原因可能为,硝酸甘油主要对松质骨作用明显,而对皮质骨的作用显效较慢。

大鼠血清 ALP 模型组较实验组及对照组明显升高( $P < 0.01$ ),血清 ALP 主要来自于骨及肝脏,小部分来自小肠及其他组织。血清 ALP 与骨钙素的变化呈正相关,与骨密度呈负相关,与以往研究报道相一致。

组织学观察显示,模型组腰椎骨小梁骨呈骨质疏松表现,股骨皮质变薄,而实验组小梁骨组织纤维结构与对照组相似。由此可见,硝酸甘油在增加骨密度的同时,也明显的改善了腰椎松治骨的微结构,从而能更加有效的防止骨折并发症的发生。

本实验表明,间断性给予硝酸甘油,对大鼠激素性骨质疏松具有明显的增加腰椎骨密度,改善松质骨微结构的作用。而且可在一定程度上阻止大鼠体重的减轻,改善了其生活质量。采用间断性给药的方式,在保证治疗效果的同时,不仅可起到减缓硝酸甘油耐受性的发生,而且降低了低血压、搏动性头痛等不良反应的发生,提高了用药的安全性。NO 供体药物在治疗激素性骨质疏松还有许多待解决的问题。

(下转第 470 页)

(上接第 485 页)

题,比如如何解决 NO 多靶向问题引起的不良反应,控制 NO 供体药物在体内持续释放低浓度的 NO,以及 NO 供体药物合理的给药途径,则是我们下一步研究的重点。

### 【参 考 文 献】

- [ 1 ] LIAO Eryuan , TAN Lihua , Metabolic Osteology , The First Edition , BeiJing :People's Medical Publishing House. 2003 ,1052-1056.[ In Chinese ]
- [ 2 ] Rob J ,Van TH ,Stuart H. Nitric oxide and bone. Immunology ,2001 , 103 255-261.
- [ 3 ] LI Yuebai ,HU Xinyong ,WANG Weidong ,et al. Effects of nitric oxide on development of glucocorticoid-induced osteoporosis and simvastation on bone medabolism. Chinese Journal of Experimental

Surgey 2006 ,23 :144-146( in Chinese ).

- [ 4 ] Marietta MA , Hurshman AR. Catalysis by nitric oxide synthase. Curt Opin Chem Biol ,1998 ,2( 5 ) 656-663.
- [ 5 ] Das' U N. Nitric oxide as the mediator of the antiosteoporotic actions of estrogen ,stains ,and essential fatty acids. Exp Biol Med ,2002 , 227 88-93.
- [ 6 ] Evans DM , Ralston SH. Nitric oxide and bone. J Bone Mineral Res , 1996 ,11( 3 ) 300-305.
- [ 7 ] Armour KE , Hofvan 't RJ. Evidence for a Pathogenic Role of Nitric Oxide in Inflammation-Induced Osteoporosis. Journal of Bone and Mineral Research ,1999 ,14 2137-2142.
- [ 8 ] Wimalawansa S ,Chapa T ,Fang L ,et al. Frequency-dependent effect of nitric oxide donor nitroglycerin on bone. Bone Miner Res ,2000 , 15 :1119-1125.

( 收稿日期 :2008-01-08 )