

两种糖皮质激素导致骨质疏松过程中骨量、骨转换标志物及雌激素水平的差异

杨志东¹ 崔健超² 江晓兵^{1*} 任辉² 魏秋实³ 梁德¹ 张顺聪¹ 林顺鑫² 唐晶晶² 沈耿杨²

1. 广州中医药大学第一附属医院二骨科, 广州 510405

2. 广州中医药大学, 广州 510405

3. 广州军区广州总医院博士后科研工作站, 广州 510000

中图分类号: R681.5+3 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015)02-0135-07

摘要: **目的** 对比泼尼松龙(PRE)和地塞米松(DXM)致骨质疏松过程中对大鼠骨量和骨转换标志物、雌激素水平的差异。**方法** 选取3月龄SPF级雌性大鼠46只,随机分成4组:基线组(BL组)6只、年龄对照组(AM组)12只、泼尼松龙组(PRE组)14只、地塞米松组(DXM组)14只。BL组于实验开始时麻醉处死,其余各组分别予常规饲养,PRE组以5mg/kg PRE每天一次皮下注射,DXM组以1mg/kg DXM每周两次皮下注射,于干预后1、2、3个月(M1、M2、M3)分3批麻醉处死取材。每次取材时立即取子宫、肾上腺称重,并收集血清以检测血清内雌激素、PINP及β-CTX水平、收集腰1-3椎体以检测腰椎骨密度(BMD)。**结果** PRE组各时间点BMD值[(0.183±0.027、0.230±0.005、0.259±0.014)g/cm²]及DXM组各时间点BMD值[(0.191±0.010、0.208±0.012、0.200±0.004)g/cm²]均较AM组[(0.251±0.014、0.275±0.009、0.281±0.008)g/cm²]明显下降($P<0.05$),其中DXM组下降更为显著($P<0.01$),且在M2及M3,DXM组BMD值明显低于PRE组(M2: $P<0.05$; M3: $P<0.01$)。PRE组干预初期,其血清雌激素水平(36.54±20.40μg/L)较AM组(148.74±40.33μg/L)明显降低($P<0.01$),但随着干预时间延长,M3时(130.85±18.95μg/L)增长至与AM组(126.64±69.12μg/L)相接近水平($P>0.05$),但在DXM干预下,雌激素水平在各时间点[(93.13±31.27、91.77±33.14、98.83±10.58)μg/L]均低于AM组[(148.74±40.33、140.01±28.46、126.64±69.12)μg/L] ($P<0.05$)。两种GC干预下,PINP及β-CTX均显著高于AM组($P<0.01$),且PRE干预后各时间点PINP水平[(1410.33±882.40、2089.23±1623.61、1546.88±644.68)μg/L]显著高于DEX组[(258.70±139.42、220.89±92.82、483.36±225.82)μg/L] ($P<0.05$)。**结论** 地塞米松诱导骨量减少的能力明显强于泼尼松龙,这可能与其更大程度地降低血清雌激素水平以及更有效地限制成骨有关。

关键词: 糖皮质激素;骨质疏松;雌激素;骨转换指标;骨密度

Effect of two kinds of glucocorticoid on the difference of bone mass and the levels of bone turnover markers and estrogen during the process of osteoporosis

YANG Zhidong¹, CUI Jianchao², JIANG Xiaobing¹, REN Hui², WEI Qiushi³, LIANG De¹, ZHANG Shuncong¹, LIN Shunxin², TANG Jingjing², SHEN Gengyang²

1. The Second Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China

2. Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China

3. Post-Doctoral Scientific Research Workstation, Guangzhou Military General Hospital, Guangzhou 510000, China

Corresponding author: JIANG Xiaobing, Email: spinedrjxb@sina.com

Abstract: Objective To study the difference in the bone mass and the levels of bone turnover markers and estrogen in the prednisolone- and dexamethasone-induced osteoporosis. **Methods** Forty-six 3-month-old female SD rats were randomly divided to 4 groups, baseline group (BL group, 6 rats), age-matched control group (AM group, 14 rats), prednisolone-treated group (PRE

基金项目: 广东省教育厅学科建设专项基金(育苗工程)[2013LYM-0012]; 广州中医药大学优秀青年学者科研基金项目(KAB110133K04)

* 通讯作者: 江晓兵, Email: spinedrjxb@sina.com

group, 14 rats), and dexamethasone-treated group (DXM group, 14 rats). Rats in BL group were euthanized at the beginning of the experiment. Rats in PRE group and DXM group were injected with PRE 5 mg/kg per day and DXM 1mg/kg twice per week, respectively, for 3 months. Rats in AM, PRE, and DXM groups were euthanized in 1 month (M1), 2 months (M2), and 3 months (M3) after the treatment. The uterus and adrenal were collected for weight calculation. Serum estrogen, PINP, and β -CTX were examined. Bone mineral density (BMD) of the lumbar 1-3 were isolated and examined. **Results** BMD of rats at each time point in PRE (0.183 ± 0.027 , 0.230 ± 0.005 , 0.259 ± 0.014 g/cm²) and DXM (0.191 ± 0.010 , 0.208 ± 0.012 , 0.200 ± 0.004 g/cm²) was lower than that of rats in AM (0.251 ± 0.014 , 0.275 ± 0.009 , 0.281 ± 0.008 g/cm², $P < 0.05$). The decrease was more notably in DXM rats ($P < 0.01$). Moreover, BMD in DXM rats decreased significantly compared with PRE rats at M2 and M3 (M2, $P < 0.05$; M3, $P < 0.01$). Estrogen level in PRE rats (36.54 ± 20.40 μ g/L) was lower than that in AM rats (148.74 ± 40.33 μ g/L) at M1 ($P < 0.01$). However, it increased to the similar level of AM rats at M3 ($P > 0.05$). Estrogen level in DXM rats sustained in the lower level at each time point (93.13 ± 31.27 , 91.77 ± 33.14 , 98.83 ± 10.58 μ g/L) compared with AM rats (148.74 ± 40.33 , 140.01 ± 28.46 , 126.64 ± 69.12 μ g/L, $P < 0.05$). The levels of PINP and β -CTX in two glucocorticoid-treated groups were significantly higher than those in AM rats at each time point ($P < 0.01$). Additionally, the level of PINP in PRE rats (1410.33 ± 882.40 , 2089.23 ± 1623.61 , 1546.88 ± 644.68 μ g/L) was higher than that in DEX rats at each time point (258.70 ± 139.42 , 220.89 ± 92.82 , 483.36 ± 225.82 μ g/L, $P < 0.05$). **Conclusion** The effect of DXM on bone mass loss is more powerful than PRE, which might be caused by more reduction of estrogen level and bone formation activity.

Key words: Glucocorticoid; Osteoporosis; Estrogen; Bone turnover markers; Bone mineral density

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是由多种因素所致、发生在骨骼组织的、以骨量减少为主要病理特点的全身性、代谢性疾病^[1]。已经证实,长期应用糖皮质激素(Glucocorticoid, GC)以及绝经后的患者均可出现骨量减少^[2]。GC所致的骨量减少是通过抑制成骨细胞的骨形成作用和刺激破骨细胞的骨吸收作用来形成的^[3,4]。既往文献报道,在建立糖皮质激素性骨质疏松(Glucocorticoid-induced Osteoporosis, GIOP)大鼠模型实验中,应用地塞米松(Dexamethasone, DXM)和泼尼松龙(Prednisolone, PRE)都能获得比较满意的结果^[5,6]。然而,DXM属于长效糖皮质激素,其药效是短效糖皮质激素PRE的6倍^[7],即使使用同等药效剂量,两者在导致骨质疏松方面也许仍存在差异,但关于这一点国内外文献均鲜有报道。同时,雌激素是体内诱导成骨的重要物质^[8],而不同GC是否对雌激素分泌水平也有不同影响亦有待系统研究。本研究拟评价两种GC对大鼠骨量影响程度以及探讨长、短效激素导致OP过程中对雌激素水平及骨转换指标的影响,并分析雌激素水平及骨转换状态变化与骨量减少的相关性,从而探讨其可能机制。

1 材料和方法

1.1 动物分组

3月龄SD雌性大鼠(南方医科大学实验动物中心提供)46只,体重为 191.92 ± 32.01 g。动物饲养于广州中医药大学第一附属医院的SPF级动物实

验室,室内温度保持在 $21 \sim 23^{\circ}\text{C}$,湿度保持在 $50 \sim 70\%$ 。动物购入后在实验室饲养1w以适应环境。称重后,体重分层法随机分成4组,分组具体如下:①基线组(BL组)6只:入组后马上予以麻醉,采集血清、肾上腺、子宫以及骨标本(具体采集方法见1.2);②年龄对照组(AM组)12只:入组后,常规饲养,不予任何措施干预;③泼尼松龙组(PRE组)14只:予5 mg/kg PRE皮下注射,每天一次,连续3个月;④地塞米松组(DXM组)14只:予1 mg/kg DXM皮下注射,每周两次,连续3个月。

1.2 实验设计

标本选择:在药物干预1月、2月后,在末次药物干预后1天,对剩余大鼠称重,并在②③④组中分别利用随机数生成器抽取4只大鼠,第3月末次药物干预后1d,则处理剩余大鼠。

取材办法:应用10%水合氯醛以 0.35 mL/100 g腹腔注射麻醉,心脏取血后置于干燥管中,静置20 min后,以 3000 r/min离心20 min后取上清液,放于 -80°C 冰箱中,待所有样本收集完毕后统一作雌激素、PINP、 β -CTX检测。大鼠放血处死后,腹部切开,分离子宫和肾上腺,剔除表面脂肪组织后称重;游离出腰1-3椎体,剔除干净表面软组织,冻存于 -80°C 冰箱内,待所有样本收集完毕后统一检测。

1.3 BMD检测方法

取出腰1-3椎体解冻至室温,平铺于双能X线吸收骨密度检测仪(美国Hologic公司),使用高清低速扫描模式,分别测量出腰1、腰2、腰3及整体的

参数,参数包括 BMD。所有 BMD 数据分析均使用小动物安可模块软件(V13.2:3)。

1.4 血清雌激素、PINP 和 β -CTX 检测方法(ELISA 法)

试剂盒放置于室温(20~25℃),取出酶标本后,以标准品顺序分别向空白微孔中滴入 50 μ L 标准品,随之加入 50 μ L 血清样品,空白对照孔则滴入 50 μ L 蒸馏水。然后,除空白对照孔外,向其余各孔滴入 100 μ L 酶标记溶液。加样完成后,用封口胶密封酶标板,放入酶标仪中维持 37℃ 环境下孵育 1 h。孵育后,倒出孔内液体,取稀释好的洗涤液洗涤酶标板 5 次,随之用吸水纸拍干孔内液体。确认液体被吸干后,向各孔内依次滴入显色剂 A 和显色剂 B 各 50 μ L。于室温避光条件下发生反应,10~15 min 后,向各孔滴入 50 μ L 中止液使之反应终止。最后置于设定波长为 450 nm 的酶标仪内读取所测样本的 OD 值,并记录分析。其中,所用的试剂盒包括大鼠 PINP ELISA Kit(华美,CSB-E12774r)、大鼠 β -CTX ELISA kit(华美,CSB-EQ027521RA)、大鼠雌激素水平检测 Estradiol EIA Kit(cayman,582251-96)。

1.5 统计学处理

本文数据用 SPSS19.0 软件统计分析,数值资料运用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较运用单因素方差分析,两两比较运用 LSD 或 SNK 法分析;计数资料运用率或中位数表示,组间比较运用卡方检验或秩和检验分析。

2 结果

2.1 实验动物基本情况

PRE 组大鼠在 PRE 干预后第 10 周死亡 1 只,鼻腔黏膜红而干燥,死亡前精神状态较差,主要考虑为机体免疫力下降出现呼吸系统感染;而第 11 周死亡 2 只,形体消瘦,主要考虑为高代谢状态下,大鼠营养不良所致。余大鼠均无死亡。

2.2 骨密度的变化

随着月龄的增加,可以发现 AM 组大鼠腰椎各椎体 BMD 及整体 BMD 呈逐月递增,且差异大体均有明显统计学意义($P < 0.01$)。PRE 组(M1)大鼠腰椎 BMD 较 BL 组有所降低($P < 0.05$),较 AM 组(M1)则显著降低($P < 0.01$)。尽管随着月龄增加,PRE 组 BMD 逐渐增高,且已明显高于 BL 组($P < 0.01$),但其 BMD 仍低于同时时间点的 AM 组($P < 0.05$)。而 DXM 组的 BMD 值不随月龄增加而明显

改变,且显著低于同时时间点的 AM 组($P < 0.01$),并且从 M2 开始,其 BMD 值也低于 PRE 组($P < 0.05$),而在 M3 时,其差异更为显著($P < 0.01$)。具体如表 1。

表 1 各组大鼠在每个时间点的骨密度检测结果

Table 1 The result of BMD of rats in each group at each time point

组别	标本	骨密度值(g/cm^2)		
		M1	M2	M3
BL 组	L1-L3	0.215 \pm 0.020	0.215 \pm 0.020	0.215 \pm 0.020
	L1	0.221 \pm 0.017	0.221 \pm 0.017	0.221 \pm 0.017
	L2	0.215 \pm 0.024	0.215 \pm 0.024	0.215 \pm 0.024
	L3	0.202 \pm 0.019	0.202 \pm 0.019	0.202 \pm 0.019
AM 组	L1-L3	0.251 \pm 0.014 ^a	0.275 \pm 0.009 ^{aa}	0.281 \pm 0.008 ^{aa}
	L1	0.259 \pm 0.016 ^{aa}	0.276 \pm 0.020 ^{aa}	0.289 \pm 0.011 ^{aa}
	L2	0.255 \pm 0.014	0.282 \pm 0.007 ^{aa}	0.290 \pm 0.008 ^{aa}
	L3	0.235 \pm 0.011 ^{aa}	0.265 \pm 0.007 ^{aa}	0.263 \pm 0.007 ^{aa}
PRE 组	L1-L3	0.183 \pm 0.027 ^{a bb}	0.230 \pm 0.005 ^{bb}	0.259 \pm 0.014 ^{aa b}
	L1	0.184 \pm 0.028 ^{aa bb}	0.239 \pm 0.005 ^{bb}	0.265 \pm 0.016 ^{aa b}
	L2	0.189 \pm 0.029	0.233 \pm 0.007 ^{bb}	0.268 \pm 0.016 ^{aa}
	L3	0.176 \pm 0.024 ^{a bb}	0.216 \pm 0.008 ^{bb}	0.243 \pm 0.011 ^{aa b}
DXM 组	L1-L3	0.191 \pm 0.010 ^{bb}	0.208 \pm 0.012 ^{bb c}	0.200 \pm 0.004 ^{bb cc}
	L1	0.189 \pm 0.012 ^{a bb}	0.215 \pm 0.013 ^{bb c}	0.200 \pm 0.003 ^{aa bb cc}
	L2	0.145 \pm 0.097 ^{a bb}	0.210 \pm 0.013 ^{bb}	0.208 \pm 0.005 ^{bb}
	L3	0.187 \pm 0.008 ^{bb}	0.198 \pm 0.010 ^{bb}	0.195 \pm 0.006 ^{bb cc}

注:a: $P < 0.05$ vs BL, aa: $P < 0.01$ vs BL;b: $P < 0.05$ vs AM, bb: $P < 0.01$ vs AM;c: $P < 0.05$ vs PRE, cc: $P < 0.01$ vs PRE

2.3 肾上腺、子宫称重

2.3.1 肾上腺称重:AM 组中各时间点的肾上腺重量不随月龄增大而明显改变($P > 0.05$)。而 PRE 组(M1)的肾上腺重量则显著低于 BL 组及 AM 组(M1)($P < 0.01$),且维持在一个相对稳定的水平($P > 0.05$)。与 PRE 一样,DXM 组(M1)也显著下降($P < 0.01$),但是随着干预时间的延长,其肾上腺重量也显著降低($P < 0.05$)。而 PRE 组与 DXM 组在各时间点均无明显统计学差异($P > 0.05$)。具体如表 2。

表 2 各组大鼠每个时间点的肾上腺称重的结果

Table 2 The weight of the adrenal gland of rats in each group at each time point

组别	肾上腺重量(g)		
	M1	M2	M3
BL 组	0.0567 \pm 0.0122	0.0567 \pm 0.0122	0.0567 \pm 0.0122
AM 组	0.0613 \pm 0.0116	0.0523 \pm 0.0046	0.0532 \pm 0.0110
PRE 组	0.0243 \pm 0.0070 ^{aa bb}	0.0278 \pm 0.0078 ^{aa bb}	0.0217 \pm 0.0015 ^{aa bb}
DXM 组	0.0313 \pm 0.0050 ^{aa bb}	0.0208 \pm 0.0065 ^{aa bb}	0.0172 \pm 0.0015 ^{aa bb}

注:a: $P < 0.05$ vs BL, aa: $P < 0.01$ vs BL;b: $P < 0.05$ vs AM, bb: $P < 0.01$ vs AM;c: $P < 0.05$ vs PRE, cc: $P < 0.01$ vs PRE

2.3.2 子宫称重

随着月龄的增大,AM组中大鼠子宫的重量呈逐渐增加趋势,但差异无明显统计学意义($P > 0.05$)。而PRE组(M1)的子宫重量明显低于BL组和AM组(M1)($P < 0.01$),但随着月龄的增大,而子宫重量得到回升。而DXM组(M1)则缓慢下降,与BL组及AM组(M1)有差异($P < 0.05$),而随着月龄增大,其子宫重量进一步降低,与BL组及同时时间点的AM组有显著差异($P < 0.01$)。尽管M2和M3中DXM组与PRE组之间的差异无统计学意义,但其平均水平仍低于PRE组。具体如表3。

表3 各组大鼠每个时间点的子宫称重的结果

Table 3 The weight of the uterine of rats in each group at each time point

组别	子宫重量(g)		
	M1	M2	M3
BL组	0.5583 ± 0.1389	0.5583 ± 0.1389	0.5583 ± 0.1389
AM组	0.6030 ± 0.2100	0.7018 ± 0.2597	0.6912 ± 0.1337
PRE组	0.2498 ± 0.0566 ^{aa bb}	0.4855 ± 0.1275	0.4093 ± 0.1580 ^{bb}
DXM组	0.3465 ± 0.1306 ^{a b}	0.2640 ± 0.0788 ^{a bb}	0.2645 ± 0.0526 ^{aa bb}

注:a; $P < 0.05$ vs BL, aa; $P < 0.01$ vs BL;b; $P < 0.05$ vs AM, bb; $P < 0.01$ vs AM;c; $P < 0.05$ vs PRE, cc; $P < 0.01$ vs PRE。

2.4 血清雌激素的变化

AM组大鼠在每个时间点的血清雌激素均保持较为平稳的水平。PRE组M1时的血清雌激素水平与BL组、AM组相比均有明显下降($P < 0.01$)。但随着干预时间的延长,M2、M3时其雌激素水平较M1有明显上升($P < 0.05$)。尽管PRE组(M2)仍明显低于AM组(M2),但在M3时两者均无明显差异。DXM组在每个时间点的雌激素水平均较BL组和AM组有明显下降($P < 0.05$),且保持在相对低水平。且其与PRE组对比,尽管M1时明显高于PRE组($P < 0.05$),但随着PRE组血清雌激素水平的稳步提高,直到M3时已显著低于PRE组。具体如表4。

表4 各组大鼠每个时间点的血清雌激素检测结果

Table 4 The result of serum estrogen levels of rats in each group at each time point

组别	血清雌激素浓度($\mu\text{g/L}$)		
	M1	M2	M3
BL组	147.93 ± 35.62	147.93 ± 35.62	147.93 ± 35.62
AM组	148.74 ± 40.33	140.01 ± 28.46	126.64 ± 69.12
PRE组	36.54 ± 20.40 ^{aa bb}	86.93 ± 10.41 ^{aa b}	130.85 ± 18.95
DXM组	93.13 ± 31.27 ^{a b c}	91.77 ± 33.14 ^{aa b}	98.83 ± 10.58 ^a

注:a; $P < 0.05$ vs BL, aa; $P < 0.01$ vs BL;b; $P < 0.05$ vs AM, bb; $P < 0.01$ vs AM;c; $P < 0.05$ vs PRE, cc; $P < 0.01$ vs PRE

2.5 血清骨转换指标的变化

2.5.1 血清PINP水平的检测结果:在各时间点里,AM组的血清PINP结果均无明显差异($P > 0.05$)。而PRE组中,在各时间点的血清PINP水平均明显上升,且明显高于同时时间点的其他各组($P < 0.01$)。而DXM组(M1、M2)时的血清PINP结果较BL组和同时时间点的AM组均无明显差异($P > 0.05$),仅在M3时高于同时时间点的AM组且有统计学意义($P < 0.05$)。具体如表5。

表5 各组大鼠每个时间点的血清PINP检测结果

Table 5 The result of serum PINP levels of rats in each group at each time point

组别	血清PINP浓度($\mu\text{g/L}$)		
	M1	M2	M3
BL组	202.95 ± 32.17	202.95 ± 32.17	202.95 ± 32.17
AM组	220.16 ± 139.04	235.74 ± 89.98	179.93 ± 108.22
PRE组	1410.33 ± 882.40 ^{aa bb}	2089.23 ± 1623.61 ^{aa bb}	1546.88 ± 644.68 ^{aa bb}
DXM组	258.70 ± 139.42 ^{cc}	220.89 ± 92.82 ^{cc}	483.36 ± 225.82 ^{b cc}

注:a; $P < 0.05$ vs BL, aa; $P < 0.01$ vs BL;b; $P < 0.05$ vs AM, bb; $P < 0.01$ vs AM;c; $P < 0.05$ vs PRE, cc; $P < 0.01$ vs PRE

2.5.2 血清 β -CTX水平检测结果:AM组中,血清 β -CTX在各时间点中无明显波动($P > 0.05$),且与BL组相近($P > 0.05$)。但是,在各时间点中,PRE组的血清 β -CTX指标均明显高于AM组和DXM组($P < 0.01$)。而尽管DXM组(M1、M2)与BL组、AM组无明显差异($P > 0.05$),但是其在M3时间点则明显高于BL组和AM组($P < 0.05$)。具体如表6。

表6 各组大鼠每个时间点的血清 β -CTX检测结果

Table 6 The result of serum β -CTX levels of rats in each group at each time point

组别	血清 β -CTX浓度($\mu\text{g/L}$)		
	M1	M2	M3
BL组	20.77 ± 3.40	20.77 ± 3.40	20.77 ± 3.40
AM组	25.24 ± 16.42	25.93 ± 11.06	19.92 ± 10.95
PRE组	144.68 ± 73.43 ^{aa bb}	238.33 ± 168.01 ^{aa bb}	176.90 ± 52.67 ^{aa bb}
DXM组	29.58 ± 21.04 ^{cc}	24.13 ± 11.58 ^{cc}	57.36 ± 26.63 ^{a b cc}

注:a; $P < 0.05$ vs BL, aa; $P < 0.01$ vs BL;b; $P < 0.05$ vs AM, bb; $P < 0.01$ vs AM;c; $P < 0.05$ vs PRE, cc; $P < 0.01$ vs PRE

3 讨论

OP是长期应用GC的副作用,目前GIOP已成为除绝经后骨质疏松和老年性骨质疏松外影响人类生存质量最严重的一种骨质疏松类型^[2]。临床上,服用GC超过半年后,有超过1/4的患者出现骨量减少^[9]。通过GC来建立GIOP大鼠模型,成为GIOP研究的基础。既往对GC药效的研究发现,

DXM 的药物效能比 PRE 强 5~6 倍。但是,利用其建模的研究中均集中在 GIOP 的机理探讨,而没有对这两种药物诱导骨量减少效果进行对比。本文纳入 BMD 检测作为对评价骨量变化的主要评价指标,并检测雌激素、骨转换指标以探讨两种 GC 对成骨-破骨耦联作用的影响程度。

BMD 检测能够间接评价骨质健康情况及骨强度^[10],是诊断骨质疏松症的“金标准”^[11]。同时它能够提示超过 60% 的骨量变化,可以较好地预测骨折风险^[12]。腰椎在骨量丢失过程中尤为显著^[13],这已被证实是这个部位富含松质骨所致^[14],因此本研究选择腰椎作为骨密度检测标本。本研究中,在两种 GC 干预初期,BMD 即明显低于 BL 组及对应的 AM 组($P < 0.01$)。同样,早年已有大量研究证明长期使用 GC 的患者,其早期骨量会快速丢失达 12%~14%^[15]。本研究中发现,尽管 PRE 能够明显降低腰椎 BMD,但可以看出,M3 时 PRE 组与 AM 组的差距已较前缩小。与之不同的是,随着 DXM 应用时间的增加,尽管其 BMD 与 BL 组无明显差异($P > 0.05$),但是其与 AM 组之间的差异则愈加显著($P < 0.01$)。并且发现,从 M2 开始,DXM 组的腰椎 BMD 已经低于 PRE 组,两者之间的差异有统计学意义($P < 0.05$),并在 M3 时,差异更为明显($P < 0.01$)。目前已知,GC 的作用持续时间与骨量丢失呈正相关^[16],其中 PRE 的半衰期约为 2~3 h,而 DXM 的半衰期约为 36~54 h^[7],而两种药物的用药间隔分别 24 h 和 72 h,以半个用药间隔去计算,体内所剩 PRE 的含量仅约为 1.6%~6.25%;相比之下,若使用 DXM 者,体内所剩含量仍有 50%~60%。而整个用药间隔过后,PRE 组的体内所剩含量几乎为 0,但 DXM 组则仍有约 25%~40%。其次,DXM 经过肝脏代谢后,会转换为 PRE,并与未代谢的 DXM 共同作用于各大途径,从而介导 OP 过程。故这可能是 DXM 组骨量较 PRE 组丢失更为严重的原因之一。

既往有文献报道,GC 可不同程度地影响雌激素在内的性激素分泌^[17,18],所以,两种 GIOP 过程中造成的骨量差异可能与雌激素分泌水平有关。为综合评价两种 GC 在建立 GIOP 大鼠模型时的特点和机理,本研究同时对雌激素水平进行了测定。研究以证实,GC 对性激素的影响是 GIOP 出现的一个重要机制^[19],长期大量使用 GC 可通过抑制下丘脑-垂体-性腺轴,导致促性腺激素释放激素分泌减少、促黄体激素活性降低、性腺上促性腺激素结合位点数

目减少以及抑制性激素的产生,最终导致性激素不足^[16,20]。同样地,由于雌激素具有调节成骨细胞活性和凋亡的作用,并且能够很好的抑制骨吸收,当雌激素分泌不足,则成骨-破骨平衡被打破,骨量就会因此而下降,GC 导致骨质疏松可能与其影响雌激素分泌有关^[16]。本研究中发现,PRE 组(M1)及 DXM 组(M1)在干预后即较 AM 组明显下降($P < 0.05$),但随着月龄的增大,PRE 组(M2、M3)的雌激素水平逐步提升,在 M3 时与 AM 组已无明显差异($P > 0.05$),而 DXM 组各时间点的雌激素水平一直维持在低水平($P < 0.05$ vs AM)。另外,由于雌激素是促进子宫生长发育的调节剂,子宫的发育状况也可以反映雌激素水平。在研究中可以发现,两种激素干预组(M1)的子宫重量均有所下降($P < 0.05$),并且如雌激素水平一样,PRE 组(M2、M3)的子宫重量也有所增加($P < 0.05$),而 DXM 组(M2、M3)则无明显改变。由于 DXM 对于雌激素的影响是平稳而持续的,体内代谢后残余 GC 量仍足以影响内源性 GC 的分泌;相比之下,PRE 干预初期,可能由于机体对外源性 GC 的加入未能作出适当的调节,与内源性激素共同作用下,抑制下丘脑-垂体-性腺轴的效果得到叠加;但是,随着干预时间的延长,内源性 GC 通过体内调节而减少。既往资料也显示,超生理剂量的 GC 通过下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)抑制内源激素的分泌及导致肾上腺萎缩^[21,22],而其中 DXM 抑制 HPA 的效果是 PRE 的 2~2.5 倍^[7]。尽管 DXM 组和 PRE 组之间无统计学差异,但是,DXM 组的肾上腺重量水平还是低于 PRE 组,这说明 DXM 可以更强地抑制 HPA 的分泌效果。结合两种 GC 组的 BMD 结果共同分析可以发现,PRE 组的 BMD 值在 M1 时则有所下降,但随着月龄增大和干预时间延长,则 BMD 稳步提升,这与 PRE 组的雌激素水平变化趋势相似。而同样地,DXM 组干预下的 BMD 与雌激素水平在各时间点均保持在较低水平。可以推断,GC 介导大鼠骨量减少的过程,除了既往研究各大通路之外,还可能通过调节雌激素水平而实现。

OP 发生时,骨细胞转换平衡被打破,导致骨量减少、骨微细结构被破坏,引起骨脆性增加。在此过程中,成骨、破骨标志物进入血清,且浓度发生变化。而检测有代表意义的骨转换指标,有利于分析药物对机体骨形成和骨吸收的作用机制^[23]。I 型胶原是成骨过程中所需的物质,同时可由 I 型胶原前肽分解出 PINP 和 PICP 并进入血液。而骨吸收时,胶原

裂解成不同的多肽(如 β -CTX)并释放入血液^[24]。故 PINP 和 β -CTX 是作为反映骨形成和骨吸收的动态指标,已经被广泛纳入骨转换的研究中^[24,25]。本研究中发现,PRE 干预后初期,血清 PINP 及 β -CTX 即显著提升,而在 M3 时有所下调,但仍明显高于 BL 组及 AM 组,提示其成骨活性及破骨活性均强于 AM 组,此时大鼠骨骼组织处于较为活跃的骨重建期。尽管与 Hyun Sook Hong 的研究指标有不同,但同样验证短效 GCs 能明显促进骨代谢^[26]。而随着雌激素水平下降,破骨和成骨活性增加,但破骨活性较后者强,从而形成高转换型 OP^[27]。随着月龄增加,雌激素水平回升,骨转换强度有所下降,但仍显著高于 AM 组,并且此时骨转换以成骨为主,故骨量上升。但是,DXM 组的骨转换指标在 M1、M2 时均无明显改变,仅在 M3 时才有轻度提升。根据此研究结果,可知尽管 DXM 诱导的骨质疏松同样属于高转换型,但是其成骨作用明显低于 PRE 组,这可能是导致 DXM 组骨量较 PRE 组低的原因。

总而言之,本研究通过长效 GC 和短效 GC 分别建立大鼠 OP 模型发现,DXM 在诱导骨质疏松时,其骨量丢失程度比 PRE 所诱导的更为严重,这可能与 DXM 通过明显而持续地降低雌激素水平且更大地限制成骨作用有关。

【 参 考 文 献 】

[1] Butler JS, Queally JM, Devitt BM, et al. Silencing Dkk1 expression rescues dexamethasone-induced suppression of primary human osteoblast differentiation. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010, 11: 210.

[2] den Uyl D, Bultink IE, Lems WF. Advances in glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Rheumatol Rep*, 2011, 13(3): 233-240.

[3] Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int*, 2007, 18(10): 1319-1328.

[4] Weinstein RS, Chen JR, Powers CC, et al. Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest*, 2002, 109(8): 1041-1048.

[5] Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest*, 1998, 102(2): 274-282.

[6] Liu MJ, Li Y, Pan JH, et al. Effects of zuogui pill (see text) on Wnt signaling transduction in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis. *Journal of traditional Chinese medicine = Chung i*

tsa chih ying wen pan / sponsored by All-China Association of Traditional Chinese Medicine, Academy of Traditional Chinese Medicine, 2011, 31(2): 98-102.

[7] Shefrin AE, Goldman RD. Use of dexamethasone and prednisone in acute asthma exacerbations in pediatric patients. *Can Fam Physician*, 2009, 55(7): 704-706.

[8] Lambrinouaki I, Christodoulakos G, Aravantinos L, et al. Endogenous sex steroids and bone mineral density in healthy Greek postmenopausal women. *J Bone Miner Metab*, 2006, 24(1): 65-71.

[9] Gudbjornsson B, Juliusson UI, Gudjonsson FV. Prevalence of long term steroid treatment and the frequency of decision making to prevent steroid induced osteoporosis in daily clinical practice. *Ann Rheum Dis*, 2002, 61(1): 32-36.

[10] Fonseca H, Moreira-Goncalves D, Coriolano HJ, et al. Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. *Sports Med*, 2014, 44(1): 37-53.

[11] McManus MM, Grill RJ. Longitudinal evaluation of mouse hind limb bone loss after spinal cord injury using novel, in vivo, methodology. *J Vis Exp*, 2011, 7(58): 3246.

[12] Ammann P, Rizzoli R, Meyer JM, et al. Bone density and shape as determinants of bone strength in IGF-I and/or pamidronate-treated ovariectomized rats. *Osteoporos Int*, 1996, 6(3): 219-227.

[13] Kim HK, Kim MG, Leem KH. Osteogenic activity of collagen peptide via ERK/MAPK pathway mediated boosting of collagen synthesis and its therapeutic efficacy in osteoporotic bone by back-scattered electron imaging and microarchitecture analysis. *Molecules*, 2013, 18(12): 15474-15489.

[14] Ma B, Zhang Q, Wu D, et al. Strontium fructose 1, 6-diphosphate prevents bone loss in a rat model of postmenopausal osteoporosis via the OPG/RANKL/RANK pathway. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(4): 479-489.

[15] LoCasco V, Bonucci E, Imbimbo B, et al. Bone loss in response to long-term glucocorticoid therapy. *Bone Miner*, 1990, 8(1): 39-51.

[16] Elvy Suhana MR FHS, Faizah O. Effect of 11 β -HSD1 dehydrogenase activity on bone histomorphometry of glucocorticoid-induced osteoporotic male Sprague-Dawley rats. *Singapore Med J*, 2011, 52(11): 786-793.

[17] Govindarajan P, Khassawna T, Kampschulte M, et al. Implications of combined ovariectomy and glucocorticoid (dexamethasone) treatment on mineral, microarchitectural, biomechanical and matrix properties of rat bone. *Int J Exp Pathol*, 2013, 94(6): 387-398.

[18] E Canalis GM, Giustina A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporosis International*, 2007, 18(10): 1319-1328.

[19] LI Hongtao YX, LI Dengyu. Research progress on pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2009, 15(2): 150-152.

[20] van Staa TP. The pathogenesis, epidemiology and management of

- glucocorticoid-induced osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 2006, 79: 129-137.
- [21] YANG Bo DUC, Yikai LI. The Effect of Epidural Steroid Injection on Adrenocortical Function and Morphology in Rats. *Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopeics*, 2012, 20(06): 1-3.
- [22] Zeng Yang DX, Sun Wei. Effects of Kidney-yang Tonifying Formula on Inhibition of HPA Axis and Catabolism by Glucocorticoids. *Asia-Pacific Traditional Medicine*, 2012, 08(8): 5-8.
- [23] Garnero P. New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis. *Bone*, 2014, 66C: 46-55.
- [24] S Vasikaran CC, Eastell R. International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine position on bone marker standards in osteoporosis. *Clin Chem Lab Med*, 2011, 49(8): 1271-1274.
- [25] Vasikaran S, Eastell R, Bruyere O, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int*, 2011, 22(2): 391-420.
- [26] Hong HS, Um J, Lee ZH, Son Y. Long-term comparative study of Substance-P with methylprednisolone on the development of osteoporosis. *J Toxicol Sci*, 2014, 39(3): 391-399.
- [27] D Hegedus VF, Lakatos PL. Decreased bone density, elevated serum osteoprotegerin, and beta-cross-laps in Wilson disease. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2002, 17(11): 1961-1967.

(收稿日期: 2014-09-13, 修回日期: 2014-10-26)

(上接第134页)

- [3] Muratli HH, Çelebi L, Hapa O, et al. Comparison of plasma endothelin levels between osteoporotic, osteopenic and normal subjects[J]. *BMC musculoskeletal disorders*, 2005, 6(1): 49.
- [4] Chinese Medical Association of Osteoporosis and Bone Mineral Disease Branch. Treatment guidelines of primary osteoporosis [J]. *Chin J Osteoporosis & Bone Miner Res*, 2011, 4(1): 2-17.
- [5] Chai Y, Ma LF, Hu CR, et al. Relationship between serum leptin, bone mineral density and bone biochemical turnover markers in aged males with osteoporosis [J]. *Helongjiang and Medicine Adn Pharmacy*, 2012, 35(1): 30-31.
- [6] Zheng J, Liu JL, Lin MF, et al. Effect of modified sijnunzi decoction on the bone metabolism of adriamycin induced nephropathy rats [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2013, 33(10): 1376-1381.
- [7] Aonuma H, Miyakoshi N, Hongo M, et al. Low serum levels of undercarboxylated osteocalcin in postmenopausal osteoporotic women receiving an inhibitor of bone resorption [J]. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2009, 218(3): 201-205.
- [8] Zeng G, Zhang Z, Lu L, et al. Protective effects of polygonatum sibiricum polysaccharide on ovariectomy-induced bone loss in rats [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 136(1): 224-229.
- [9] Hannon RA, Clowes JA, Eagleton AC, et al. Clinical performance of immunoreactive tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption [J]. *Bone*, 2004, 34(1): 187-194.
- [10] Lai CY, Sun YM. Related index change observation of type 2 diabetes correlation analysis mellitus induced osteoporosis [J]. *Chin J of Clinical Rational Drug Use*, 2012, 5(31): 48-49.
- [11] Tan Y, Li H, Sun Q, et al. Correlation study between insulin-like growth factor-I, BGP and insulin resistance in senile diabetes combine osteoporosis [J]. *Medical Innovation of China*, 2014, 11(09): 015-017.
- [12] Crane JL, Cao X. Function of matrix IGF-1 in coupling bone resorption and formation [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2014, 92(2): 107-115.
- [13] Yue JM, Zhou YZ, Zhou R, et al. Effects of fluvastation on serum E2, TNF- α , IGF-1 and BGP in experimental osteoporosis rats [J]. *Chongqing Medicine*, 2013, 42(28): 3366-3367.
- [14] Strong AL, Jiang Q, Zhang Q, et al. Design, synthesis, and osteogenic activity of daidzein analogs on human mesenchymal stem cells [J]. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 5(2): 143-148.
- [15] Liu HC, Zhao H, Chen J, et al. Role of recombinant plasmid pEGFP-N1-IGF-1 transfection in alleviating osteoporosis in ovariectomized rats [J]. *Journal of Molecular Histology*, 2013, 44(5): 535-544.
- [16] Qin MT, Qiu Q. Study on relationship between plasma endothelin-1 (ET-1) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in coronary heart diseases [J]. *Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2013, 13(6): 404-406.
- [17] Gruber HE, Farley SM, Baylink DJ. Predictions on future diagnosis and treatment of osteoporosis: results and discussion of a recent opinion poll [J]. *Calcified Tissue International*, 1995, 57(2): 83-85.
- [18] Wang B. Correlation between plasma endothelin level and bone mineral density in patients with postmenopausal osteoporosis [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2008, 12(11): 2173-2175.
- [19] Gulhan I, Kebapcilar L, Alacacioglu A, et al. Postmenopausal women with osteoporosis may be associated with high endothelin-1 [J]. *Gynecological Endocrinology*, 2009, 25(10): 674-678.

(收稿日期: 2014-06-26, 修回日期: 2014-08-25)