

· 论 著 ·

长期使用糖皮质激素对大鼠的骨生物力学影响

孙晓晖^{1*} 陈文双² 陈春玲² 吴天秀³

1. 广东医学院护理学院, 广东 东莞 523000

2. 广东医学院天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023

3. 广东医学院基础医学院, 广东 湛江 524023

中图分类号: R24 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 04-0418-04

摘要: **目的** 探讨长期使用糖皮质激素对大鼠的骨质量影响。**方法** 3 月龄 SD 大鼠共 38 只, 雌性。随机分成 4 组, 分别是: (1) 基础对照组(B 组, 8 只, 实验开始时处死, 建立本批大鼠底线); (2) 正常对照组(C 组, 10 只, 腹腔注射生理盐水 75 mg/kg); (3) 低剂量激素组(L 组, 10 只, 腹腔注射甲强龙 50 mg/kg); (4) 高剂量激素组(H 组, 10 只, 腹腔注射甲强龙 75 mg/kg)。实验开始时, 低剂量激素组和高剂量激素组连续使用甲强龙 3 天(75 mg/kg d), 停用一周后, 按计划使用甲强龙, 每周一次, 用药 24 周后取股骨和第三腰椎行骨生物力学实验。**结果** (1) 与正常对照组相比, 低剂量激素组和高剂量激素组的实验后体重明显减少($P < 0.05$); (2) 与正常对照组相比, 低剂量激素组和高剂量激素组股骨的结构力学参数(载荷、刚性)和材料力学参数(破断强度、刚性模量)均显著降低($P < 0.05$); (3) 与正常对照组相比, 低剂量激素组和高剂量激素组腰椎的材料力学参数(破断强度、刚性模量)均显著降低($P < 0.05$)。**结论** 长期使用糖皮质激素, 无论剂量高低, 均会导致大鼠股骨和腰椎骨质量下降。

关键词: 糖皮质激素性骨质疏松; 大鼠; 骨生物力学

The effect of long-term use of glucocorticoids on bone biomechanics of rats

SUN Xiaohui¹, CHEN Wenshuang², CHEN Chunling², WU Tianxiu³

1. School of Nursing, Guangdong Medical College, Dongguan 523000

2. Guangdong Medical College, Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Zhanjiang 524023, Guangdong

3. Basic Medical College, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, Guangdong, China

Corresponding author: SUN Xiaohui, Email: 451323416@qq.com

Abstract: **Objective** To determine the effect of long-term use of methylprednisolone on bone biomechanics of rats. **Methods** Thirty-eight 3-month-old female SD rats were chosen. They were randomly divided into basal control group (B group, 8 rats were sacrificed at the beginning of the experiment as baseline), normal control group (C group, 10 rats were given intraperitoneal injection of 75mg/kg normal saline), low dose methylprednisolone group (L group, 10 rats were given intraperitoneal injection of 50 mg/kg methylprednisolone), and high dose methylprednisolone group (H group, 10 rats were given intraperitoneal injection of 75 mg/kg methylprednisolone). Methylprednisolone was given in L group and H group for 3 days, and stopped for a week. Then the intraperitoneal injection was given once a week according to the plan. After 24 weeks of the treatment, the femurs and the lumbar spine L3 were collected for biomechanical experiment. **Results** (1) Compared to that in C group, the body weight in L group and H group decreased obviously after the experiment ($P < 0.05$). (2) Compared to those in C group, structural mechanical parameters (load and rigidity) and material mechanical parameters (breaking strength and modulus of rigidity) of the femurs in L group and H group significantly decreased ($P < 0.05$). (3) Compared to those in C group, structural mechanical parameters (load and rigidity) and material mechanical parameters (breaking strength and modulus of rigidity) of the L3 in L group and H group significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The long-term use of methylprednisolone, regardless of dose, results in the decrease of bone quality of the femur and the lumbar spine of rats.

基金项目: 广东省科技计划项目(2010B031600291, 2011B031800229)

* 通讯作者: 孙晓晖, Email: 451323416@qq.com

Key words: Glucocorticoid induced osteoporosis; Rat; Bone biomechanics

由于糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 治疗所导致的骨质疏松即称为糖皮质激素性骨质疏松 (glucocorticoid induced osteoporosis, GIO)。GIO 的发病率位列继发性骨质疏松的首位, 一直是限制糖皮质激素长期临床应用的难点^[1]。以往的动物实验中, 激素的使用时间较短^[2-3], 本文通过观察长期使用糖皮质激素对 SD 大鼠的骨生物力学影响, 希望探讨长期使用糖皮质激素对大鼠的骨质量影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养条件

SPF 级的 3 月龄 SD 大鼠共 38 只 [由广州中医药大学实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK (粤) 20110020], 雌性。饲养条件: 饲养室内温度保持 24℃ ~ 28℃, 湿度在 50% ~ 60%, 专室分笼饲养, 每笼两只, 隔日更换垫料, 自由饮水, 水源为蒸馏水, 饮食 (标准饲料, 广东医学院实验动物中心提供), 每周称体重一次。

1.2 主要试剂和设备

1.2.1 设备: 用 858 Mini Bionix 型材料测试系统分析所取材料的生物力学性能 (由南方医科大学生物力学国家重点实验室协助完成)。

1.2.2 主要试剂: 注射用甲泼龙琥珀酸钠 (甲强龙) 0.5 g/瓶/盒 (Pfizer manufacturing Belgium NV, 生产批号 Y05009)。

1.2.3 分组及给药: 将 38 只大鼠随机分成 4 组, 分别是: (1) 基础对照组 (8 只, 实验开始时处死, 建立本批大鼠底线); (2) 正常对照组 (10 只, 腹腔注射生理盐水 75 mg/kg); (3) 低剂量激素组 (10 只, 腹腔注射甲强龙 50 mg/kg); (4) 高剂量激素组 (10 只, 腹腔注射甲强龙 75 g/kg)。实验开始时, 低剂量激素组和高剂量激素组连续使用甲强龙 3 天 [75 g/(kg·d)], 停用一周后, 按计划使用甲强龙, 每周一次, 用药 24 周。

1.4 标本处理及测定方法

1.4.1 标本处理方法: 所有大鼠每周称体重一次, 自由饮水给食。实验结束后, 用 3% 异戊巴比妥钠 (1.5 ml/kg) 行腹腔注射麻醉后右心室彻底抽血处死 (以减少骨髓中红细胞, 排除干扰, 使骨片更易于观察分析), 用 4% 多聚甲醛灌注固定好的动物, 作全面尸体解剖。取大鼠左侧股骨和第 3 腰椎, 先用生理盐水纱布包裹后, 外面再用锡纸包裹超低温 -

20℃ 保存。

1.4.2 测定指标和测定方法: 测试时, 将 -20℃ 保存的股骨和腰椎常温解冻, 生理盐水复湿。用 858 Mini Bionix 型材料测试系统分析所取材料的生物力学性能 (由南方医科大学生物力学国家重点实验室协助完成), 将股骨进行三点弯曲试验, 将椎骨行压缩实验。(1) 三点弯曲试验: 将股骨置于 MTS 试验机上, 用 1 mm 直径的压头, 加载速度为 2.0 mm/min, 跨距 (L) 为 15 mm。仪器自动记录每个时刻点的载荷 (F) 和挠度 (d) 变化值, 绘制载荷-挠度曲线和应力应变曲线。并获得最大载荷 (The maximum load) 和刚性 (N/mm) 参数。(2) 压缩实验: 取大鼠脊柱第 3 腰椎, 去除椎骨棘突、横突和关节软骨 (注意保护椎体外皮质骨免于损害, 因为它对椎骨力学性能有重要影响)。将椎体制作成具有平行末端的约 6 mm 高的圆柱体, 这样制作的标本去除了软骨生长板和初级松质骨, 仅由中心的小梁骨和外周的皮质壳组成。最后腰椎放在 MTS 试验机上, 用 50.0 mm 直径的压头, 以 1.0 mm/min 的速度压入锥体的松质骨中。记录载荷-变形曲线和应力应变曲线, 获得最大压缩载荷 (Maximal compression load) 和刚性 (N/mm) 参数。从载荷-变形曲线得出结构力学参数, 从应力-应变曲线得出材料力学参数。

1.5 统计和分析

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 12.0 软件。正态分布数据的组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 方差齐采用 LSD 检验; 方差不齐则采用 Tamhane's T² 检验。

2 结果

2.1 糖皮质激素对大鼠体重的影响 (见表 1)

表 1 糖皮质激素对大鼠体重的影响

Table 1 Effect of glucocorticoid on the body weight in rats		
组别 (n)	实验前 (g)	实验后 (g)
基础对照组 (8)	184.6 ± 20.0	—
正常对照组 (10)	179.1 ± 14.9	285.0 ± 6.5
低剂量激素组 (10)	188.8 ± 21.6	230.7 ± 21.6▲
高剂量激素组 (10)	181.9 ± 11.8	224.6 ± 54.0▲

注: ▲ 实验后体重与正常对照组相比, P < 0.05

2.2 糖皮质激素对大鼠股骨的结构力学参数影响 (见表 2)

表 2 糖皮质激素对大鼠股骨的骨生物力学参数影响

Table 2 Effect of glucocorticoid on the bone biomechanical parameters of the femur in rats

组别 (n)	载荷 (N)	刚性 (N/mm)	破断强度 (N/mm ²)	弹性模量 (MPa)
基础对照组 (8)	91.3 ± 2.8	176.4 ± 21.2 [▲]	58.4 ± 2.6	4231.3 ± 31.2
正常对照组 (10)	98.3 ± 3.5	199.5 ± 30.5	68.4 ± 3.4	4013.4 ± 29.5
低剂量激素组 (10)	75.1 ± 13.3 [▲]	137.4 ± 26.1 [▲]	49.7 ± 1.7 [▲]	3336.3 ± 38.2 [▲]
高剂量激素组 (10)	74.7 ± 29.1 [▲]	141.5 ± 41.2 [▲]	50.9 ± 8.2 [▲]	3410.9 ± 68.7 [▲]

注: ▲ 与正常对照组相比: $P < 0.05$

2.3 糖皮质激素对大鼠椎骨的骨生物力学参数影响 (见表 3)

表 3 糖皮质激素对大鼠椎骨的骨生物力学参数影响

Table 3 Effect of glucocorticoid on the bone biomechanical parameters of the lumbar vertebrae in rats

组别 (n)	载荷 (N)	刚性 (N/mm)	破断强度 (N/mm ²)	弹性模量 (MPa)
基础对照组 (8)	296.32 ± 1.8	446.0 ± 68.7 [▲]	40.18 ± 2.3	587.7 ± 17.2
正常对照组 (10)	332.58 ± 86.2	538.2 ± 30.5	49.85 ± 0.6	630.0 ± 33.1
低剂量激素组 (10)	313.0 ± 79.3	511.4 ± 30.7	38.5 ± 2.8 [▲]	598.2 ± 91.2 [▲]
高剂量激素组 (10)	320.9 ± 44.2	528.7 ± 28.8	42.5 ± 7.7 [▲]	600.3 ± 18.8 [▲]

注: ▲ 与正常对照组相比: $P < 0.05$

3 讨论

现有观察 GC 对大鼠的骨质量的文献研究中, GC 的作用时间长短不一, 有学者观察 GC 短期使用 (30 天) 对大鼠骨质量的影响, 也有学者连续使用 GC 8 周, 甚至是 12 周^[4]。而且各实验所涉及的 GC 使用频率, 给药方式都各有不同^[2-3]。骨量的峰值、实验动物月龄与药物作用时间密切相关。据文献报道, 4 ~ 7 月龄大鼠的骨量达到峰值, 7 月龄以后大鼠的骨形成和骨吸收活跃程度下降, 但仍能达到平衡, 12 月龄以后大鼠骨量逐渐下降。因此, 本研究选择在大鼠骨量平衡期限内, 延长 GC 作用时间至 24 周, 以观察 GC 的长期使用对大鼠的骨质量影响。本研究通过基础对照组来建立本批大鼠骨量底线, 从表 2 和表 3 可见, 与基础对照组比较, 正常对照组的腰椎和股骨的刚性明显增加 ($P < 0.05$), 表明大鼠处于骨代谢稳定期。

骨组织是高度分化的结缔组织, 由骨细胞及钙化的基质与纤维构成, 具有一定力学强度的综合体, 同时具备弹性、抗张性和抗压性。骨生物力学是研究骨组织在外力作用下的力学特性及受力后生物学效应, 是综合反映骨质量的有效评价^[5]。骨生物力学参数包括材料力学和结构力学两方面^[6]。本文所收集的最大载荷和刚性属于骨的结构力学参数范畴, 而破裂强度和弹性模量则属于骨的材料力学参数范畴等。

由表 1 可见, 与正常对照组相比, 低剂量激素和

高剂量激素组的实验后体重明显减少 ($P < 0.05$), 这和文献报道一致^[7]。尽管体重和骨质量是两个不同指标, 但体重的下降可能提示骨质量下降。由表 1 和表 2 可见, 低剂量激素组与高剂量激素组相比时, 无论是大鼠的股骨或者腰椎的生物力学参数, 两者间的差异均无统计学意义, 说明两种剂量的激素使用对大鼠的骨生物力学影响一致, 在激素建模的过程中, 既要保证动物模型造模成功, 又要保证动物的存活率, 在激素剂量的选择上仍需要做大量的工作。

大鼠椎体以松质骨为主, 椎体的压缩实验是评价松质骨的有效手段。当椎体载荷超过一定程度时, 椎体将会发生塌陷或者压缩性骨折, 这正是骨质疏松的常见并发症之一。因此, 本文选用压缩实验来观察糖皮质激素的长期使用对大鼠腰椎的影响。由表 3 可见, 与正常对照组相比, 低剂量激素和高剂量激素组的材料力学参数 (破断强度和弹性模量) 都明显下降。材料力学参数反映的是骨材料本身的力学性能, 由骨自身构成成分和排列方式决定。弹性模量表示骨在弹性变形阶段内骨的塑性能力, 反映骨的内在应力。短期应用激素对骨细胞会有促进作用, 但长期使用激素对骨细胞的促进作用会转变成抑制作用, 导致骨吸收大于骨形成, 最终形成骨量减少, 骨质量下降的局面。同时, 长期使用激素使大鼠骨矿含量减少, 这也是导致大鼠腰椎骨结构力学参数减少的重要原因。

(下转第 451 页)

外,试验结果说明,金天格胶囊联合西药治疗效果更佳,不仅在一定程度上可以减少骨折的发生,还能良好改善患者的生活质量。

【 参 考 文 献 】

[1] The Chinese medical association of osteoporosis and bone mineral salt disease branch. Guide for diagnosis and treatment of primary osteoporosis (2011year). The disease osteoporosis and bone mineral salt magazine,2011,4(1):2-17.

[2] YANG Zijun, WU Xiaobo, XIAN Chuan. The clinical research of JIN TIANGE capsule in the treatment of osteoporosis. China Healthcare Innovation,2011,6(9):32-33.

[3] Schwartz AV. Diabetics mellitus;dose it affect bone ?. Calcified tissue international,2003,73(6):515-519.

[4] Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetics mellitus. Osteoporosis international, 2010,21(2):195-214.

[5] DING Zhizhen, CHEN Weidong. The pathogenesis of diabetic

nephropathy is reviewed. Chinese Journal of General Practice, 2011,9(2):284.

[6] TIAN Jinkun. Correlation research of the diabetes between osteoporosis and renal function. China Practical Medical,2011,6(18):81-82.

[7] HUANG Qiongfang, LIANG Xiaoping, WANG Xiaoping, et al. Patients with type 2 diabetes, osteoporosis related factors and nursing. Journal of Nurses Training,2007,22(4):307.

[8] CHEN Dong, LONG Pan, ZHOU Haiting, et al. Research status of traditional Chinese medicine treatment of osteoporosis. Chinese Journal of Osteoporosis,2007,22(4):307.

[9] FAN Yuming, LI Ruifen. Artificial tiger bone effect on osteoporosis of rats caused by tretinoin. Pharmacology of Chinese medicine and Clinical,2001,17(2):13-14.

[10] WANG Yuqing, HAN Dawei. Research progress of artificial tiger bone powder. Bone setting of traditional Chinese medicine,2006,18(2):72-73.

(收稿日期: 2014-09-17)

(上接第 420 页)

三点弯曲试验是检验大鼠股骨皮质骨的常用检验手段。最大载荷指骨断裂前所能承受的力值极限,刚性则指单位面积上所承受的载荷力值,代表骨抗变形能力。由表 2 可见,与正常对照组相比,低剂量激素和高剂量激素组的结构力学参数(最大载荷和刚性)均明显下降,表明骨质疏松后骨结构疏松,抵抗外力能力下降,骨脆性增加从而导致骨折风险增加。从表 2 和表 3 可见,长期使用糖皮质激素,无论剂量高低均会导致大鼠四肢骨和中轴骨骨质量下降,但由于大鼠的四肢骨与中轴骨的受力方式与人类有所不同,因此,其生物力学参数与人类相比仍有所不同,如何从现有实验本身更好地分析数据,获取更可信的资料,值得进一步深入研究。

【 参 考 文 献 】

[1] Hiren Patt, Tushar Bandgar, Anurag Lila, et al. Management issues with exogenous steroid therapy. Indian J Endocrinol Metab,2013,17(Suppl 3):S612-S617.

[2] CHEN Jun, LI Fenghua, YUAN Sunyi, et al. Effects of different

frequency glucocorticoid-induced osteopenia model on rat humerus. Chinese Pharmacological Bulletin, 2013, 29(3):393-397.

[3] CHEN Yan, LIU Yanzhi, ZHU Juexin, et al. Effect of dexamethasone on bone quality of the lumbar vertebra in rats. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2011, 25(2):166-168.

[4] YU Qiong, CUI Liao, WU Tie. The effect of three effective fractions of water extract of Danshen on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. Chinese Journal of Osteoporosis, 2012, 18(8):695-699.

[5] Masako Ito. Assessment of bone quality-present and future. Clin Calcium, 2004, 14(12):27-32.

[6] BAO Shengyong, YAN Deweng, ZHANG Shaojun, et al. The effect of “ Shuanggu Yitong ” acupuncture therapy on the bone biomechanics in postmenopausal osteoporosis rats. Chinese Journal of Osteoporosis, 2012, 18(2):108, 109-112.

[7] ZOU Liyi, WU Tie, WANG Hui, et al. Application of Grey Series Forecasting Model in the Study of Body Weight of Glucocorticoid Rats. Shanghai Laboratory Animal Science, 2003, 23(4):227-228, 232.

(收稿日期: 2014 - 07-08)