

· 论著 ·

联合使用甲状旁腺激素和辛伐他汀对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗有叠加效应

颜海彬* 张炳云

浙江省温岭市第一人民医院骨科, 温岭 317500

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 03-0300-04

摘要: 目的 探索联合使用甲状旁腺激素(PTH)和辛伐他汀(SIM)对去势大鼠骨质疏松的防治作用。方法 50 只健康雌性 SD 大鼠随机行假手术(Sham, N = 10)和切除双侧卵巢(OVX, N = 40)手术后, OVX 大鼠随机的分成 4 组: OVX 组、SIM 组、PTH 组、PTH + SIM 组。术后第 1 天开始给予药物治疗, SIM 组: SIM 灌胃(剂量 5 mg/kg, 每天 1 次), PTH 组: PTH 皮下注射(剂量 60 μ g/kg, 每周 3 次), PTH + SIM 组: SIM 灌胃和 PTH 皮下注射, 剂量和用药频率和 SIM 组、PTH 组相同, 直至手术后 12 周为止, 12 时所有大鼠处死取胫骨行 Micro-CT 检测。结果 结果表明 SIM 组、PTH 组、PTH + SIM 组和 OVX 组相比, 胫骨近端都有较高的 BMD、BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Conn. D 和较低的 Tb. Sp, 其中 PTH + SIM 组大鼠胫骨近端有最高的 BMD、BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Conn. D 和最低 Tb. Sp。SIM 和 PTH 单独使用的效果明显低于他们联合使用对去卵巢大鼠骨质疏松的防治作用。结论 联合使用甲状旁腺激素和辛伐他汀对去势大鼠骨质疏松的防治有叠加作用

关键词: 去势大鼠; 骨质疏松症; 甲状旁腺激素; 辛伐他汀

Combined treatment with parathyroid hormone (1-34) and simvastatin had an additive effect on osteoporosis healing in OVX rats

YAN Haibin, ZHANG Bingyun

Department of Orthopedics, the First People's Hospital, Wenling 317500, Zhejiang, China

Corresponding author: YAN Haibin, Email: tzs2081094@126.com

Abstract: **Objective** This study was designed to investigate the impact of combined treatment with Simvastatin (SIM) and Parathyroid hormone (PTH) on osteoporosis healing in OVX rats. **Methods** After bilateral ovariectomy (OVX, N = 40) and Sham-operation (Sham, N = 10), then all animals from OVX group randomly divided into four groups: group OVX, group SIM, group PTH and group PTH + SIM and received NS, SIM (5 mg/kg, daily), PTH (60 μ g/kg, three times a week), or PTH plus SIM until death 12 weeks. The distal femurs of rats were harvested for evaluation. The results of treatment for osteoporosis were evaluated by micro-computerized tomography. **Results** Comparison with group OVX, the tibia from groups SIM, PTH and PTH + SIM have a higher BMD, BV/TV, Tb. Th, Tb. N, Conn. D and a lower Tb. Sp. PTH + SIM produced strongest effects on BV/TV, Tb. Th, Tb. N, Conn. D, BMD and Tb. Sp. The effect of SIM and PTH using alone is significantly lower than their combined using for prevention and treatment of osteoporosis to ovariectomized rats. **Conclusion** These results seemed to indicate that PTH plus SIM had an additive effect on osteoporosis in OVX rat.

Key words: OVX rats; Osteoporosis; Parathyroid hormone; Simvastatin

随着世界人口老年化进一步加重, 骨质疏松症已经成为一种严重危害老年人群生活质量的社会公害, 其患病率预计在未来 10 年将显著增加。骨质疏松症大大增加髌部的骨折发生率, 相对于西方国家髌部的骨折发生率在下降, 亚洲大部分国家髌部骨

折发生率在明显增加^[1]。预计到 2050 年, 世界上有一半的髌部骨折会出现在亚洲的国家^[2]。这些表明对骨质疏松的防治在亚洲相对而言更为急迫。目前临床上存在很多治疗骨质疏松的药物, 主要有抑制破骨细胞活性和促进成骨细胞活性两类药物。目前最常见的抗骨质疏松药物如甲状旁腺素(PTH)、唑来膦酸、他汀类药物。研究表明小剂量间断使用

* 通讯作者: 颜海彬, Email: tzs2081094@126.com

PTH 可以加快机体的骨转换,促进成骨细胞的活性,最终会提高骨量,增加骨密度,改善骨质疏松^[3]。辛伐他汀(SIM)作为一种的降胆固醇药物,它可以促进成骨基因表达如血管内皮细胞生长因子、骨形态发生蛋白-2(BMP-2)、核心结合因子 $\alpha 1$ 等来促进骨形成^[4-8]。SIM 常常被用来治疗骨质疏松症,如今的研究表明其防治骨质疏松的效果显著^[9]。目前临床上有较多种类的抗骨质疏松药物,但这些药物尚不能完全治愈骨质疏松,为了能取得最大疗效,人们寻求联合或序贯治疗等方法防治骨质疏松症。本研究联合使用甲状旁腺激素和辛伐他汀来对骨质疏松进行干预,为临床上这两类药物的联合使用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

PTH, SIM (GIBCO 公司), Micro-CT (SkyScan1176, 苏州大学医学院骨科研究所), 手术操作器械(美国史塞克医疗器械公司)。

1.2 方法

1.2.1 骨质疏松动物模型的建立:50 只健康的雌性 Sprague-Dawley 大鼠(3 月龄, 体重 220 ~ 240 g。由上海实验动物中心提供)用于去卵巢(OVX, N = 40)制作骨质疏松模型和假手术(Sham, N = 10)。手术开始前,所有大鼠称重,根据体重,适量腹腔注射 10% 水合氯醛(3 ml/kg)进行麻醉,麻醉成功后,于大鼠背部正中线下 1/3 处作一长约 2 cm 纵行切口,向两侧钝性分离皮下软组织,于脊柱旁开 0.5 cm 处钝性分开肌肉组织,显露卵巢脂肪包被组织,轻轻提起卵巢,于输卵管卵巢交界处丝线结扎,完整摘除双侧卵巢,逐层缝合,关闭创口。术后前 3 天给予青霉素肌肉注射(2.5 万 U/kg)预防感染。术后所有的去卵巢(OVX)大鼠随机的分成 4 组:OVX 组、SIM 组、PTH 组、PTH + SIM 组。

1.2.2 术后治疗:术后第 1 天开始给予药物治疗, SIM 组:SIM 灌胃(剂量 5 mg/kg, 每天 1 次), PTH 组:PTH 皮下注射(剂量 60 μ g/kg, 每周 3 次), PTH + SIM 组:SIM 灌胃和 PTH 皮下注射, 剂量和用药频率和 SIM 组、PTH 组相同,直至手术后 12 周为止,每周称量大鼠体重,根据体重变化来调整药物剂量。本实验所使用的药物剂量参考以前发表的治疗骨质疏松效果明显的文献中所使用剂量^[10, 11]。

1.2.3 Micro-CT 检测:所有存活的大鼠在术后周时处死,完整取下大鼠双侧胫骨,剔除周围软组织,

生理盐水冲洗后,采用 10% 的多聚甲醛固定用于 Micro-CT 检测。将左侧胫骨置于扫描床上,扫描兴趣区为胫骨近端骺板下 2 mm 远端 2 mm 范围内松质骨。断层扫描后,3D 重建,去除骨皮质影像,分析软件定量分析。获得大鼠胫骨感兴趣区域骨微结构参数骨体积分数(bone volume/total volume, BV/TV)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th)、骨小梁数量(trabeculae number, Tb. N)、骨小梁分离度(trabecular spacing, Tb. Sp)、连接密度(connective density, Conn. D.)及骨密度(BMD)。

1.3 统计学处理

应用 SPSS19.0 统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 方式表示;采用两因素析因设计的方差分析;两组间比较采用两样本 t 检验;组间两两比较采用方差分析下的 LSD 方法, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 手术对大鼠的影响

截止到术后 12 周时,有 3 只大鼠由于手术不当、麻醉不当和伤口感染死亡,它们其中 1 只属于 OVX 组,1 只属于 PTH 组,一种属于 SIM,最终共有 47 只大鼠进入最终试验结果评估。12 周时 Sham 大鼠的胫骨骨密度为 233.67 ± 30.14 (mg/cm^2),而 OVX 组大鼠胫骨骨密度为 165.34 ± 27.34 (mg/cm^2)。相对于 Sham 组,OVX 组大鼠的骨密度下降 41.21% ($P < 0.05$),这表明我们的模型建立是成功的。

2.2 大鼠骨密度的改变

12 周时,大鼠胫骨近端的骨密度由 Micro-CT 检测的结果如表 1 所示,我们可以发现各治疗组的胫骨近端的骨密度都明显高 OVX 组。相对于 OVX 组, SIM 组、PTH 组、PTH + SIM 组分别增加了 22.5%、26.4%、34.3%,有明显的统计学意义($P < 0.05$)。从表 1 我们可以发现 PTH + SIM 组的骨密度最高,和 SIM 组、PTH 组比较也有明显的统计学意义($P < 0.05$),这表明联合使用 SIM 和 PTH 治疗骨质疏松有相互促进作用。

2.3 Micro-CT 三维重建分析及骨微观参数

我们通过 Micro-CT 对感兴趣区域进行三维重建,重建的结果如图 1 所示,通过内置软件计算的骨微观参数如表 2 所示。我们可以通过观察图 1 明显的发现相对而言 PTH + SIM 组骨小梁的数量明显多于其他组,而且骨小梁联系紧密,骨小梁更粗。骨微观参数更加明显的表明 PTH + SIM 组有最高的 BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Conn. D 和最低 Tb. Sp,而 OVX 组

表 1 大鼠胫骨近端骨密度的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The change of BMD of the proximal tibia in rats

Groups	Number	12 weeks (mg/cm ²)
OVX	9	169.43 ± 31.32
SIM	9	207.54 ± 34.19 * &
PTH	9	213.71 ± 32.39 * #
PTH + SIM	10	227.44 ± 34.38 * # &

*: 与 OVX 组比较有显著性差异 ($P < 0.05$); #: 与 SIM 组比较有显著性差异 ($P < 0.05$); &: 与 PTH 组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。

^s * $P < 0.05$, vs OVX group; # $P < 0.05$, vs SIM group; & $P < 0.05$, vs PTH group.

有最高的 Tb. Sp 和最低 BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Conn. D。和 OVX 组比较, SIM 组、PTH 组、PTH + SIM 组骨微观参数有明显的统计学意义, 这些表明联合使用 PTH 和 SIM 可以明显增加骨小梁的量。

3 讨论

骨质疏松症 (Osteoporosis, OP) 是一种由于体内雌激素代谢紊乱导致骨形成和骨吸收之间的平衡被打破, 结果使骨吸收增强, 最终导致骨量减少、骨骼

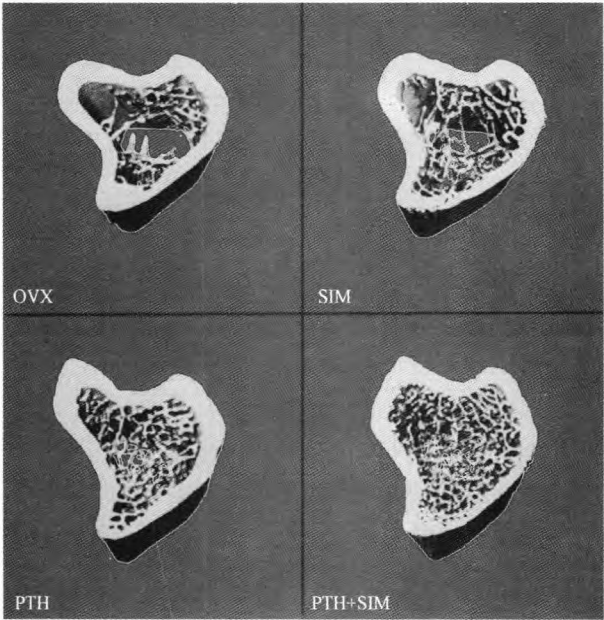


图 1 左胫骨近端骺线下 2 mm 感兴趣区域通过 Micro-CT 三维重建的结果。

Fig. 1 Image of 3-D reconstruction of micro-CT of interested area of 2 mm below epiphysis in the left tibia.

表 2 术后 12 周时, 各组大鼠左胫骨近端骺线下 2 mm 感兴趣区域骨微观参数

Table 2 Bone histomorphometry parameters at the interested area of 2 mm below epiphysis in the left tibia 12-week after the operation

Parameter	PTH + SIM	PTH	SIM	OVX
Tb. N	3.021 ± 0.112 * # &	2.775 ± 0.111 * #	2.384 ± 0.114 * &	2.220 ± 0.090
Tb. Th	0.168 ± 0.014 * # &	0.175 ± 0.011 * #	0.143 ± 0.010 * &	0.120 ± 0.011
BV/TV	0.419 ± 0.016 * # &	0.387 ± 0.027 * #	0.27 ± 0.016 * &	0.199 ± 0.016
Tb. Sp	0.299 ± 0.034 * # &	0.393 ± 0.047 * #	0.481 ± 0.085 * &	0.613 ± 0.126
Conn. D	94.421 ± 14.311 * # &	64.234 ± 6.675 * #	61.231 ± 5.589 * &	42.750 ± 8.970

*: 与 OVX 组比较有显著性差异 ($P < 0.05$); #: 与 SIM 组比较有显著性差异 ($P < 0.05$); &: 与 PTH 组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。

* $P < 0.05$, vs OVX group; # $P < 0.05$, vs SIM group; & $P < 0.05$, vs PTH group.

脆性增加和易发骨折为特征的代谢性骨病。参与调节骨重建主要有甲状旁腺激素 (PTH), 1,25 (OH)₂ D₃, 降钙素和雌激素这四种主要激素。连续给予 PTH 刺激机体会增强破骨细胞活性, 导致骨量丢失, 如最常见的原发性甲状旁腺功能亢进就是这种表现, 而间歇性小剂量使用 PTH 具有促进骨合成代谢作用, 并导致改善骨微结构, 增加骨量。大量的研究已经表明间歇性小剂量使用 PTH 确实具有提高骨质疏松状态下骨密度, 增加骨量, 降低骨折的发生率^[12, 13], 这可能与 PTH 的作用机制有关, PTH 可以抑制成骨细胞凋亡, 加速骨衬细胞对新分化成骨细胞的招募及破骨细胞的增殖, 这些作用主要通过 Wnt 信号通路来进行^[14]。我们的实验再一次证实了间歇性小剂量使用 PTH 确实可以对骨质疏松的防治效果显著, 不仅可以保持骨密度, 阻止骨小梁的

减少。

如今的研究已经表明 SIM 确实可以治疗骨质疏松, 我们的实验结果很好的证明了这点, 去卵巢 12 周后, 相对 OVX 组大鼠, SIM 组大鼠的骨密度以及骨量较高。研究表明 SIM 可以刺激骨髓来源的骨间充质干细胞形成^[15], 并能诱导骨髓细胞分化为成骨细胞^[16]。我们在实验中发现 SIM 相对于 PTH 的抗骨质疏松效果较差, 这可能和我们实验中使用的剂量有关, 我们 PTH 所使用的剂量明显大于日常预防骨质疏松常用的剂量, 同时 SIM 的给药方式也会影响疗效, 但是和 OVX 组对比有统计学意义, 这表明 SIM 使用来防治骨质疏松是有效的。

在实验中发现 PTH 联合 SIM 使用的效果明显好于它们任何一种药物单独使用的效果, 这说明它们同时使用有互相促进作用。具体的机制尚不

清楚,以前的研究表明 PTH 联合 SIM 使用可以协同增加成骨细胞活性^[17]。研究表明 SIM 可以显著的促进骨形态发生蛋白-2(BMP 2)的表达^[18],而 PTH 也可以刺激 BMP-2 mRNA 的表达,并显著提高 BMP-2 的活性和功能^[19, 20]。PTH 和 SIM 相互协同作用是可能是通过 BMP-2 来偶联,具体机制还需要进一步探讨。

本次试验也有其局限性,首先我们实验使用的大鼠数量有限,且时间较短,12 周之后动物骨质疏松的具体情况不知。我们没有进一步从微观结构如病理切片角度进一步观察骨骼的具体改变,同时也没有进一步探索机制。最后我们实验使用的药物剂量明显高于临床上这类药物使用的剂量,同时 PTH 和 SIM 联合使用效果最好的剂量组合也不得而知,进一步确定联合使用 PTH 和 SIM 最佳剂量也是下一步要考虑的事。

综上所述,本次试验虽然没有从机制,生化方面进一步研究 PTH 联合 SIM 可以协同防治骨质疏松,但是这次试验从体外很好的证实 PTH 联合 SIM 可以协同防治骨质疏松,为其在临床药物方面提供了可能性。但目前动物实验中用于治疗骨质疏松药物的剂量远高于临床上推荐剂量,因此在人体这个复杂环境,联合使用协同使用 PTH 和 SIM 治疗骨质疏松,仍需进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] COOPER C, COLE Z A, HOLROYD C R, et al. Secular trends in the incidence of hip and other osteoporotic fractures [J]. Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA, 2011, 22(5): 1277-88.
- [2] COOPER C, CAMPION G, MELTON L J, 3RD. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection [J]. Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA, 1992, 2(6): 285-9.
- [3] SKRIPITZ R, ASPENBERG P. Parathyroid hormone—a drug for orthopedic surgery? [J]. Acta orthopaedica Scandinavica, 2004, 75(6): 654-62.
- [4] HATANO H, MARUO A, BOLANDER M E, et al. Statin stimulates bone morphogenetic protein-2, aggrecan, and type 2 collagen gene expression and proteoglycan synthesis in rat chondrocytes [J]. Journal of orthopaedic science: official journal of the Japanese Orthopaedic Association, 2003, 8(6): 842-8.
- [5] EMMANUELE L, ORTMANN J, DOERFLINGER T, et al. Lovastatin stimulates human vascular smooth muscle cell expression of bone morphogenetic protein-2, a potent inhibitor of low-density lipoprotein-stimulated cell growth [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2003, 302(1): 67-72.

- [6] SONG C, GUO Z, MA Q, et al. Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bone marrow stromal cells [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2003, 308(3): 458-62.
- [7] WONG R W, RABIE A B. Early healing pattern of statin-induced osteogenesis [J]. The British journal of oral & maxillofacial surgery, 2005, 43(1): 46-50.
- [8] ALAM S, UEKI K, NAKAGAWA K, et al. Statin-induced bone morphogenetic protein (BMP) 2 expression during bone regeneration: an immunohistochemical study [J]. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics, 2009, 107(1): 22-9.
- [9] RIZZO M, RINI G B. Statins, fracture risk, and bone remodeling: what is true? [J]. The American journal of the medical sciences, 2006, 332(2): 55-60.
- [10] LI Y, ZHOU C, LI J, et al. The effects of combined human parathyroid hormone (1-34) and zoledronic acid treatment on fracture healing in osteoporotic rats [J]. Osteoporosis International, 2012, 23(4): 1463-74.
- [11] DAI L, XU M, WU H, et al. The functional mechanism of simvastatin in experimental osteoporosis [J]. Journal of bone and mineral metabolism, 2014,
- [12] KNEISSEL M, BOYDE A, GASSER J A. Bone tissue and its mineralization in aged estrogen-depleted rats after long-term intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) analog SDZ PTS 893 or human PTH(1-34) [J]. Bone, 2001, 28(3): 237-50.
- [13] PETTWAY G J, MEGANCK J A, KOH A J, et al. Parathyroid hormone mediates bone growth through the regulation of osteoblast proliferation and differentiation [J]. Bone, 2008, 42(4): 806-18.
- [14] BARON R, HESSE E. Update on Bone Anabolics in Osteoporosis Treatment: Rationale, Current Status, and Perspectives [J]. J Clin Endocr Metab, 2012, 97(2): 311-25.
- [15] SONOBE M, HATTORI K, TOMITA N, et al. Stimulatory effects of statins on bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Study of a new therapeutic agent for fracture [J]. Bio-medical materials and engineering, 2005, 15(4): 261-7.
- [16] MAEDA T, MATSUNUMA A, KAWANE T, et al. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2001, 280(3): 874-7.
- [17] JEON J H, PULEO D A. Alternating release of different bioactive molecules from a complexation polymer system [J]. Biomaterials, 2008, 29(26): 3591-8.
- [18] ALAM S, UEKI K, NAKAGAWA K, et al. Statin-induced bone morphogenetic protein (BMP) 2 expression during bone regeneration: an immunohistochemical study [J]. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2009, 107(1): 22-9.
- [19] TAKASE H, YANO S, YAMAGUCHI T, et al. Parathyroid hormone upregulates BMP-2 mRNA expression through mevalonate kinase and Rho kinase inhibition in osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. Hormone and metabolic research = Hormon-und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme, 2009, 41(12): 861-5.
- [20] NAKAO Y, KOIKE T, OHTA Y, et al. Parathyroid hormone enhances bone morphogenetic protein activity by increasing intracellular 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate accumulation in osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. Bone, 2009, 44(5): 872-7.

(收稿日期: 2015-08-16)