

不同双膦酸盐类药物在骨代谢的实验研究

李冬梅¹ 高克加^{2*}

1. 上海市同仁医院药学部, 上海 200336

2. 上海市黄浦区中心医院核医学科, 上海 200002

中图分类号: R817.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 03-0304-05

摘要: **目的** 合理选择双膦酸盐类药物为临床治疗骨质疏松提供依据。**方法** 通过实验兔肌肉注射地塞米松磷酸钠注射液方法制作骨质疏松动物模型,并对骨质疏松模型分别进行“⁹⁹Tc-MDP”、“阿仑膦酸钠”和“博宁”治疗后的疗效研究,实验室分析指标:病理骨组织学、骨密度、生物力学试验、骨形态计量、放射性“^{99m}Tc-MDP”骨骼显像 ROI 比值、X 线、CT 摄片及血清骨碱性磷酸酶(BALP)、骨钙素(BGP)。并与骨质疏松模型对照组比较,评判各组间的差异。采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理分析。**结果** 经肌肉注射盐酸地塞米松方法制作骨质疏松模型试验,在病理骨组织学、骨密度、生物力学试验、BGP 等指标均出现骨质疏松征象,证实骨质疏松模型成立。在骨质疏松的基础上,经“⁹⁹Tc-MDP”、“阿仑膦酸钠”和“博宁”各治疗组的治疗,均有较明显的改善,但存在不同程度的差异,改善程度依次为“⁹⁹Tc-MDP”治疗组、“阿仑膦酸钠”治疗组和“博宁”治疗组。**结论** 不同的双膦酸盐类药物在骨组织生理代谢不一样,所产生的疗效也不同。“阿仑膦酸钠”是在“博宁”的基础上研制的新一代治疗骨质疏松症的双膦酸盐,所以抑制骨吸收优于“博宁”。而“⁹⁹Tc-MDP”可能对骨组织还具有免疫调节价值。对不同的双膦酸盐在骨组织生理代谢作用的治疗价值将可为临床治疗方向提供依据。

关键词: 双膦酸盐;骨质疏松;动物模型;治疗

The comparison of different bisphosphonates in bone metabolism using animal models

LI Dongmei¹, GAO Kejia²

1. Department of pharmaceuticals, Tongren hospital, Shanghai 200002

2. Department of nuclear medicine, Huangpu central hospital, Shanghai

Corresponding author: GAO Kejia, Email: gaokejia@sohu.com

Abstract: **Objective** To validate the optimal bisphosphonate in the treatment of osteoporosis using animal models and provide evidence for more appropriate clinical uses of bisphosphonates. **Method** First we established osteoporotic rabbit models by injecting dexamethasone sodium phosphate intramuscularly. And then the animal models were divided into four different groups and treated with ⁹⁹Tc-MDP, alendronate and pamironate disodium respectively. The effects of the three different drugs were investigated by comparing with the control group and by analyzing laboratory test, bone histology, bone density, biomechanical test, ROI ratio of ^{99m}Tc-MDP bone scintigraphy, X ray, CT tomography, BALP as well as BGP. The statistical analysis was carried out using SPSS13.0. **Result** Although all the three methods had relieved the osteoporosis in our experimental groups, ⁹⁹Tc-MDP is the most effective therapy when compared with alendronate or pamironate disodium. **Conclusion** Depending on different mechanisms in bone metabolism, the effects of bisphosphonates vary among different therapies. Alendronate is the newly developed bisphosphonate based on pamironate disodium, as a result, it behaves much better when inhibiting bone absorbing in treating osteoporosis. In addition, ⁹⁹Tc-MDP may exerting therapeutic effects through immunization routes. Our research will provide value for more appropriate treatment of osteoporosis.

Key words: Bisphosphonate; Osteoporosis; Animal models; Treatment

随着城市人口的老龄化的增加,骨质疏松症及相关的并发症已成为全球关注的健康难题^[1-3]。虽然目前治疗骨质疏松症的方法不少,而双膦酸盐类

药物是治疗骨质疏松的一种主流药物,但不同的双膦酸盐药物治疗结果并不一样,并以实验分析。

*通讯作者: 高克加, Email: gaokejia@sohu.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

制作骨质疏松动物模型的实验兔由上海生旺实验动物养殖有限公司提供;动物实验场所为上海市交通大学第六人民医院动物实验室。

1.2 实验药品

放射性骨显像剂“ ^{99m}Tc -MDP”(锝-99-m-亚甲基二磷酸钠)由上海欣科药业有限公司提供;治疗药物“ ^{99m}Tc -MDP”(锝-99-亚甲基二磷酸钠)由成都云克药业责任有限公司提供;其中 A 瓶为 ^{99m}Tc 液 5.5 $\mu\text{g}/5\text{ml}$ /瓶, B 瓶 MDP 为 5 mg/瓶, 用于治疗类风湿性关节炎和骨性疾病;治疗骨质疏松症的代表药物“氨基二膦酸盐”(阿仑磷酸钠)由默沙东(意大利)美国默克公司分部提供 70 mg/片;治疗转移性骨肿瘤药物“帕米磷酸二钠”(博宁)由深圳海王药业有限公司购置, 15 mg/瓶(冻干粉剂);“地塞米松磷酸钠注射液”(DX) 5 mg/1 ml/支, 由辰欣药业股份有限公司生产。

1.3 检测仪器

骨密度测定仪(双能 X 线骨密度仪 LUNAR. DXP-L. USA)。骨生物力学测定(骨力学测试仪 INSTRON-5543. USA)。CT 为飞利浦 CT-SECURA, X 线摄片、病理、骨形态计量检测及生化仪均为常规设备。

2 方法

2.1 动物分组

健康雌性新西兰实验兔 56 只, 平均体重 3.0 ± 0.18 kg。实验分为二个阶段进行, 第一阶段(制作骨质疏松模型阶段), 按随机数字表排列形式将实验兔分为正常组 16 只, 骨质疏松模型组 40 只。制作骨质疏松模型第 6 周时, 二组各处死 8 只, 以证实骨质疏松模型成立。余下的试验兔在第二阶段(治疗观察阶段), 设计为: A 组(正常对照组, 余下的 8 只正常兔);另余下的骨质疏松模型组分为 B 组(骨质疏松对照组); C 组(“ ^{99m}Tc -MDP”治疗组); D 组(“阿仑磷酸钠”治疗组); E 组(“博宁”治疗组), 每组 8 只, 治疗观察总疗程为 16 周。

2.2 骨质疏松动物模型制作

参照相关制作兔骨质疏松模型资料^[4,5], 实验兔购入先适应性饲养 2 周, 对正常组采用生理盐水 2 ml 肌肉注射, 但不注射 DX 针剂; 对 40 只骨质疏松模型组的试验兔实行肌肉注射盐酸地塞米松针剂: 2

mg/kg/次肌肉注射, 每周 2 次, 连续 6 周, 两组各处死 8 只, 并进行相关实验室指标的检测, 用以证实骨质疏松模型成立。6 周后进行第二阶段试验: A 组(正常对照组, 与第一阶段的正常组同样操作), 其他 B、C、D、E 组第 7 周后继续维持 DX 肌肉注射, 但剂量改为 1 次/周, 直至试验结束。

2.3 治疗方法

“ ^{99m}Tc -MDP”治疗组, 参照临床成人治疗用药方法: 将 A 瓶中 ^{99m}Tc 液 5 ml 注入 B 瓶内, 摇匀 1 分钟后, 治疗量用生理盐水稀释后以 0.2 mg/5 ml/kg 对 C 组进行耳静脉推注治疗, 每周 1 次。“阿仑磷酸钠”治疗组, 按成人常规剂量, 0.2 mg/3 ml/kg 用水溶解后清晨给实验兔采用软管喂服, 1 次/周。“博宁”治疗组以 1 mg/10 ml/kg 剂量经实验兔耳静脉注射治疗, 每周 1 次。总疗程为 16 周。

2.4 实验室观察检测指标

病理骨组织学、骨密度、骨形态计量、生物力学试验、放射性“ ^{99m}Tc -MDP”骨骼显像 ROI 比值(此显像是一种成骨性的功能性显像, 升高是成骨需求的标志, 显像中放射性分布所感兴趣的区域称为 RIO, 取实验兔股骨头与股骨中段相比较值)、X 线、CT 摄片及血清骨碱性磷酸酶(BALP)、骨钙素(BGP)。

3 检测方法

3.1 取材方法

取第三腰椎(L_3)和右侧股骨头行病理细胞学、骨形态计量分析(骨小梁体积%)、第四腰椎(L_4)和左侧股骨行骨密度检测(分别采用整体股骨、单个椎体进行检测骨密度, g/cm^2)、生物力学试验(分别以股骨三点弯曲、腰椎压缩方法、最大压缩载荷试验, 单位为牛顿 N), 处死前进行 X 线摄片、CT 摄片、“ ^{99m}Tc -MDP”骨骼显像 ROI 比值、血清 BALP(骨碱性磷酸酶)、BGP(骨钙素)指标进行检测。

3.2 相对疗效评判

将治疗后的各组动物试验结果与 B 组相比较, 根据骨细胞学、骨密度、骨生物力学、形态计量和 X 线摄片、CT 摄片的骨小梁密度变化及“ ^{99m}Tc -MDP”骨骼显像 ROI 比值上升或下降、血清 BALP、BGP 值的增高或降低结果相对评判为为显效、有效和无效。

显效: 病理切片见骨组织中骨小梁增多、增粗, 骨密度、骨力学、骨形态计量增加 $\geq 5\%$, ^{99m}Tc -MDP 骨骼显像 ROI 比值降低率 $> 5\%$, 血清 BALP、BGP 在原来的基础上降低率 $> 15\%$, X 线摄片和 CT 摄片不变或略见密度提高。

有效:病理切片见骨组织中骨小梁密度略有所增加,骨密度、骨力学、骨形态计量增加 < 5% , > 0, ^{99m}Tc-MDP 骨骼显像 ROI 比值降低率 < 5% , > 0, 血清 BALP、BGP 在原来的基础上降低率 < 15% > 0;X 线摄片和 CT 摄片无改变。

无效:各治疗组与 B 组相比较,各指标改变不明显或加重。

3.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行方差分析和 *t* 检验分析数据,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本差采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

4 结果

4.1 第一阶段试验

第一阶段试验结果,正常组与骨质疏松模型组

之间试验指标存在较大的差异。骨病理学切片显示:正常组股骨头骨细胞和骨小梁排列规则,骨组织和关节表面未见骨质破坏。而骨质疏松动物模型组则表现为股骨头骨小梁稀疏明显,有断裂现象。X 线、CT 摄片示骨质疏松动物模型组的骨小梁略有所稀疏差异。骨密度、骨力学、骨形态计量、^{99m}Tc-MDP 骨骼显像 ROI 比值、BALP、BGP 等试验结果经二组间差异明显 (*P* < 0.05)。并存在一定的规律性改变,见表 1,由此证实经 DX 诱导的兔骨质疏松模型成立。

4.2 第二阶段试验

对 C、D、E 组实验兔进行治疗 16 周后,采用与第一阶段相似的实验室检测,病理切片显示:正常组与 A 组和骨质疏松动物模型组与 B 组结果基本相似;而 C、D、E 组在 B 组的基础上均有所改善,骨小

表 1 制模 6 周时实验室检测结果
Table 1 Laboratory test results were detected at 6 weeks after successful molding

	骨密度 (g/cm ²)		骨生物力学 (N)		骨形态 计量 (%)	骨显像 ROI 值	BALP (30 ~120IU/L)	BGP (0.0018 ~0.0084μg/L)
	左股骨头	L ₄	左股骨头	L ₄				
正常组 (N = 8)	0.304 ± 0.017	0.285 ± 0.019	412.163 ± 53.433	679.295 ± 79.671	132.982 ± 38.217	4.276 ± 0.682	8.875 ± 2.124	0.113 ± 0.016
骨质疏松组 (N = 7)	0.243 ± 0.021	0.239 ± 0.018	273.643 ± 54.138	356.986 ± 63.311	69.104 ± 28.744	7.108 ± 0.793	40.753 ± 16.438	0.168 ± 0.024
组间 <i>P</i> 值	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01

注:以上表格的数据存在较显著性的差异。以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的各组指标间比较存在显著差异,*t* 检验中 *t* 值均 ≥ 3.012, *P* 值均 < 0.01。
Note: Statistically significant differences were observed in the data from the above table. All data Were showed as $\bar{x} \pm s$ and each index between the two groups was significantly different with the *t* value ≥ 3.012 and *p* value < 0.01.

梁排列密度提高依次为 C 组、D 组和 E 组,见图 1。X 线摄片、CT 摄片摄片差异仍不明显,但 ^{99m}Tc-MDP 骨骼显像 ROI 比值、血清 ALP、BGP 检测结果均存在不同程度的差异。以 B 组为基础,各组的病理组织学、骨密度、生物力学、^{99m}Tc-MDP 骨骼显像 ROI 比值、血清 ALP、BGP 检测的改善程度, C 组改善最明显(显效), D 组和 E 组为有效,但 E 组变化较小。见表 2。

4.3 实验兔情况

在实验中,骨质疏松组有 1 只实验兔于第 5 周时死亡, A 组 1 只、B 组有 2 只、E 组 1 只实验兔分别于第 10、11、13、15 周因腹泻死亡,其他实验兔的一般情况尚属正常。

5 讨论

双膦酸盐类药物能够治疗骨质疏松症的关键是具有稳定 P-C-P 结构,能抵御生物酶解作用,对破骨

细胞发挥细胞毒作用,诱导成骨细胞分泌抑制因子,阻断破骨细胞启动的破骨过程,抑制骨吸收,强力亲和磷酸钙,吸附于骨组织中羟基磷灰石结晶表面,抑制其结晶和非结晶前体物质形成,阻止骨骼中钙盐“逸出”^[6],从而达到改善骨质疏松的现象。但抑制骨吸收的作用大小与各种双膦酸盐特点所不同。

“⁹⁹Tc-MDP”治疗组、“阿仑膦酸钠”和“博宁”都属于双膦酸盐类药物,但各有其治疗价值。“阿仑膦酸钠”在骨质代谢中能够明显抑制破骨细胞的活性作用,被认为与抑制破骨细胞的功能和抑制骨钙的流失有关^[7-8],是临床上治疗骨质疏松症的主要药物之一。“⁹⁹Tc-MDP”有较好的亲骨性,而且“⁹⁹Tc-MDP”中的微量元素锝-99(⁹⁹Tc)能够发生化学价态的变化,通过其失去或者获得电子的过程中而不断消除人体内的自由基。有报道⁹⁹Tc 在人体内具有调节机体的免疫功能的作用,保护过氧化歧酶(SOD)的活力,防止自由基对组织的破坏,并对炎症

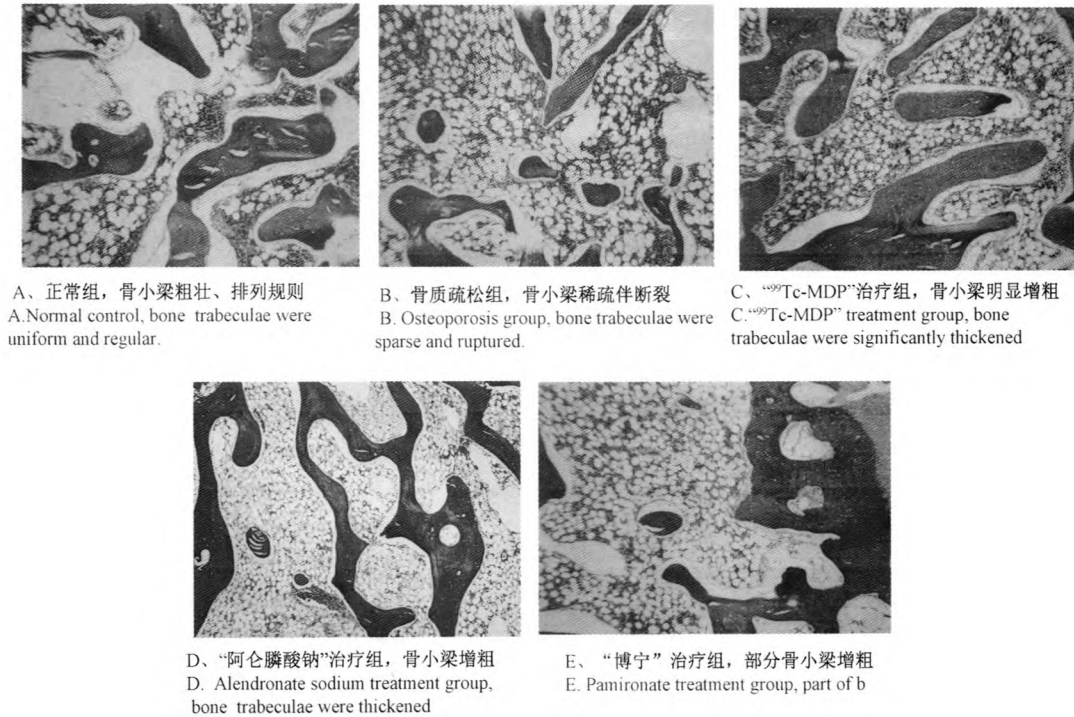


图 1 A、B、C、D、E 病理图片 (HE 染色 10 × 40)

Fig. 1 Pathohistology structure of femoral head in different groups (HE dyeing 10 × 40)

表 2 治疗 16 周实验室检测结果

Table 2 Laboratory test results were detected at 16 weeks with treatment

	骨密度 (g/cm ²)		骨生物力学 (N)		骨形态 计量 (%)	骨显像 ROI 值	BALP (30 ~ 120IU/L)	BGP (0.0018 ~ 0.0084 μg/L)
	左股骨头	L ₄	左股骨头	L ₄				
A 组 (N = 7)	0.309 ± 0.015	0.298 ± 0.017	404.434 ± 43.655	698.629 ± 77.520	121.671 ± 33.445	4.126 ± 0.816	9.000 ± 2.828	0.105 ± 0.015
B 组 (N = 6)	0.238 ± 0.011	0.233 ± 0.015	269.433 ± 40.595	349.350 ± 57.288	65.283 ± 21.907	6.734 ± 0.844	42.833 ± 14.552	0.176 ± 0.026
C 组 (N = 8)	0.288 ± 0.036	0.298 ± 0.053	386.551 ± 77.077	649.582 ± 126.859	132.406 ± 48.793	5.727 ± 0.729	12.753 ± 4.348	0.135 ± 0.013
D 组 (N = 8)	0.260 ± 0.030	0.271 ± 0.043	363.291 ± 66.512	451.377 ± 121.705	108.834 ± 43.213	6.450 ± 0.937	19.501 ± 6.852	0.148 ± 0.021
E 组 (N = 7)	0.244 ± 0.034	0.256 ± 0.040	3352.361 ± 65.182	398.483 ± 96.391	82.301 ± 2.27	6.194 ± 0.871	27.136 ± 4.355	0.139 ± 0.131

注：以上表格的数据存在较显著性的差异。以 $\bar{x} \pm s$ 表示，表中除 E 组与 B 组间的骨密度和骨生物力学 P 值均 > 0.05 外，其他组与 B 组的组间比较存在显著差异， P 值均 < 0.01 ；方差分析：生物力学 L_4 结果 $F = 22.035$ ，股骨头 $F = 12.690$ ； L_4 骨密度值 $F = 8.556$ ，股骨头 $F = 9.696$ ；形态计量 $F = 12.598$ ，BALPF = 31.608，BGPF = 10.931， P 值均 < 0.01

Note: Statistically significant differences were observed in the data from the above table and all data were showed as $\bar{x} \pm s$. The results of bone mineral density and biomechanics were different between group B and group E but statistical significance was not achieved ($p > 0.05$). Indexes in other groups were significantly different compared to those in group B ($P < 0.01$), the F value in Biomechanics of L_4 , head of femur, Mineral Density of L_4 , head of femur, bone histomorphometry, BALP and BGP was 22.035, 12.690, 8.556, 9.696, 12.598, 31.608 and 10.931, respectively).

介质和免疫调节因子白介素 I (IL-1) 的产生有抑制作用，从而起到调节人体免疫功能的作用^[9-11]。可见“⁹⁹Tc-MDP”在治疗骨质疏松中，不仅具有双膦酸盐抑制骨钙的流失的作用，可能存在更有价值的调节骨代谢的功效，对存在免疫性疾病的骨质疏松疗效更明显。“博宁”主要用于治疗转移性骨肿瘤，通过抑制破骨细胞吞噬骨质、抑制骨吸收从而起到阻

止骨溶解的作用，是骨磷作用的 10 倍^[12]。

通过动物实验显示，在骨质疏松模型的基础上经 C 组、D 组和 E 组治疗，均有较明显的改善，但疗效不一样。“博宁”虽然具有抑制破骨细胞吞噬骨质的作用，以往往往用于抑制转移性骨肿瘤的急性扩展和止痛；而“阿仑膦酸钠”是在药物“博宁”的疗效基础上研制的新一代治疗骨质疏松症的双膦酸盐

类药物,对骨组织过快的骨吸收进行抑制而提高了治疗价值,所以实验中“阿仑膦酸钠”治疗骨质疏松的疗效优于“博宁”。而“ $^{99}\text{Tc-MDP}$ ”是在双膦酸盐上标记一种稳定的微量元素锝-99,治疗骨质疏松疗效更明显,说明锝-99在P-C-P结构上功能键的结构差异,疗效价值也不同,在双膦酸盐分子上,螯合上微量元素锝-99以后,不光有抑制骨吸收外,可能对骨组织存在免疫调节价值。由此可见,对骨质疏松的治疗应该了解双膦酸盐类药物的疗效价值,针对性地选择双膦酸盐类药物将可为临床治疗骨质疏松症提供依据。

【参 考 文 献】

- [1] 刘忠厚. 骨质疏松学. 北京: 科学出版社, 1998: 142.
Liu houzhong. Osteoporosis. Beijing: Science Press, 1998: 142.
- [2] 中华医学会编著. 临床诊疗指南 骨质疏松和骨矿盐疾病分册. 北京: 人民卫生出版社, 第1版, 2006: 8-11.
China Medical Association. Guidelines for clinical practices. Osteoporosis and mineral disease Fascicule. People's medical Publishing house, 2006, first edition, 8-11.
- [3] 刘石平. 激素替代治疗绝经后骨质疏松的研究. 国外医学内分泌学分册, 2000, 20(6): 281.
Liu shiping. The investigation of hormone replacement therapy in the Postmenopausal Osteoporosis patients. Foreign Medical Science: Subvolume of endocrinology, 2000, 20(6): 281.
- [4] 周强, 李起鸿, 杨柳, 等. 糖皮质激素诱导性股骨头坏死模型的血管改变. 中华外科杂志. 2000, 38: 212-215.
Zhou qiang, Li qihong, Yang liu, et al. Changes of blood vessels in glucocorticoid-induced avascular necrosis of femoral head in models. Chin J Surg, 2000, 38: 212-215.
- [5] 高克加, 叶智卫, 王建华, 等. $^{99}\text{Tc-MDP}$ 治疗与骨生物力学关系的实验研究. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(9): 640-646.
Gao kejia, Ye zhiwei, Wang jianhua, et al. The experimental study of the relationship between $^{99}\text{Tc-MDP}$ therapy and bone biomechanics. Chin J osteoporos, 2010, 16(9): 640-646.
- [6] 邱贵兴, 赵宇. 双膦酸盐在骨质疏松症中的应用. 见: 郭世绶, 罗先正, 邱贵兴, 主编: 骨质疏松基础与临床. 天津科学技术出版社, 2001, 503-512.
Qiu guixing, Zhao yu. The application of diphosphonate in the treatment of osteoporosis: basis and clinical practices of osteoporosis. Tianjin Science and Technology press, 2001: 503-512.
- [7] 张众志, 陈璐璐, 李裕明. 二膦酸盐细胞分子作用机制的研究进展. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10: 390-392.
Zhang zhongzhi, Chen lulu, Li yuming. The advancement of the molecular mechanism of diphosphonate. Chin J Osteoporos, 2004, 10: 390-392.
- [8] Frith JC, Rogers MJ. Antagonistic effects different classes of hisphosphonates in osteoclasts and macrophages, in vitro. J Bone Miner Res, 2003, 18: 204-212.
- [9] 马寄晓, 刘秀杰主编: 实用临床医学. 北京: 原子能出版社, 2002, 5, 第1版, 516-521.
Ma jixiao, liu xiujiu. Practical clinical nuclear medicine. Atomic energy press, 2002, 5, first edition, 516-521.
- [10] 黄建敏, 潘莉萍, 李冬雪, 等. $^{99}\text{TcMDP}$ 治疗强直性脊柱炎的疗效观察. 中华核医学杂志, 2005, 25(3): 174-175.
Huang jianmin, Pan liping, Li dongxue, et al. Therapeutic effect of $^{99}\text{TcMDP}$ in the treatment of ankylosing spondylitis. Chin J Nucl med, 2005, 25(3): 174-175.
- [11] 张允平, 杨维淮, 叶新华, 等. “云克”与泼尼松治疗 Graves 眼病疗效比较. 中华核医学杂志, 2002, 22(4): 204-205.
Zhang yunping, Yang weihui, Ye weixin, et al. Evaluation of the therapeutic effectiveness of “yunke” and prednisone on Graves' disease. Chin J Nucl Med, 2002, 22(4): 204-205.
- [12] 李晓莉, 贾素文, 张丽杰. “博宁”合并化疗治疗骨继发性恶性肿瘤 98 例. 中国肿瘤临床, 2001, 28(3): 228-229.
Li xiaoli, Jia suwen, Zhang lijie. Treatment of 98 bone metastatic diseases using pamirionate disodium in combination with chemotherapy. Chin J Clin Onco, 2001, 28(3): 228-229.

(收稿日期: 2015-08-18)