

唑来膦酸、雷奈酸锶对去势大鼠股骨干骺端缺损修复的效果对比研究

周强 贺行文 柳维 陶周善 孙焱 白炳力 杨雷*

温州医科大学附属第二医院, 浙江 温州 325000

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 08-1039-05

摘要: 目的 研究不同抗骨质疏松药物唑来膦酸、雷奈酸锶对去势大鼠股骨干骺端缺损修复的影响。方法 选用 SPF 级 40 只健康雌性 SD 大鼠行手术建立去卵巢模型(OVX 组, $n = 35$)和假手术模型(Sham 组, $n = 5$)。手术后 3 个月处死随机选取的 5 只 OVX 组大鼠与 5 只 Sham 组大鼠, 测量其骨密度(BMD)来证实骨质疏松模型建立成功。随后所有的 OVX 组大鼠在双侧股骨干骺端建立直径为 3mm 的骨缺损模型后随机分为 3 组, 唑来膦酸治疗组 10 只(ZA 组, $1.5 \mu\text{g}/\text{w}$), 雷奈酸锶治疗组 10 只(SR 组, $625 \text{mg}/\text{kg}$, 每周 5 次), 空白对照组 10 只(Control 组, 等体积的生理盐水)。术后 6、12w 进行 Micro-CT 观察、组织病理学观察。结果 6、12w 时成骨效果: ZA 组和 SR 组在缺损区 HE 染色观察均可见大量骨小梁和较多成熟的骨细胞, 但 12w 时 Micro-CT 显示骨微观结构修复效果 ZA 组明显好于 SR 组, 新生骨密度也高于 SR 组。空白对照组 HE 染色观察可见骨组织生成较少, 骨小梁排列稀疏紊乱, Micro-CT 显示骨微观结构修复效果不佳, 新生骨密度也不够理想。结论 唑来膦酸较雷奈酸锶能够更好地修复骨质疏松骨缺损。

关键词: 唑来膦酸; 雷奈酸锶; 骨质疏松; 骨缺损; 去势大鼠; 股骨

A comparative study on the effects of Zoledronic acid and strontium ranelate on femoral metaphyseal defect repairing in ovariectomized rats

ZHOU Qiang, HE Xingwen, LIU Wei, TAO Zhoushan, SUN Tao, BAI Bingli, YANG Lei*

The Second affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

Corresponding author: YANG Lei, Email: wzmcy12015@sina.com

Abstract: Objective To investigate the effect of two anti-osteoporosis drug, zoledronic acid and strontium ranelate in bone defects repairing in osteoporotic rats. **Methods** 40 SPF-grade healthy female SD rats were used to establish ovariectomized (OVX, $n = 35$) and sham operation models (Sham, $n = 5$). Three months after the surgery, 5 rats randomly selected from OVX group and the 5 rats of the sham operation group were sacrificed, and BMD was measured to confirm the establishment osteoporosis model. In the remaining rats in the OVX group, bilateral femoral metaphyseal bone defect model with a diameter of 3mm were established. These rats were randomized into three groups, Zoledronic acid treatment group ($n = 10$) (ZA group, $1.5 \text{ mg}/\text{w}$), Strontium Ranelate treatment group ($n = 10$) (SR group, $625 \text{mg}/\text{kg}$ weekly 5 times) and Control group ($n = 10$) (received an equal volume of Physiological saline). Micro-CT and histopathological assessments were performed at 6 and 12 weeks after operation. **Results** Osteogenic effect at 6 and 12 weeks; in both ZA and SR groups, HE staining in the defect area was observed with a large number of long spindle shaped bone cells and a large number of trabecular bone. But at 12 weeks, Micro-CT showed that the effect of bone microstructure repairing of the ZA group was significantly better than that of the SR group, and the density of new bone was higher in the ZA group compared with that of the SR group. The Control group's HE staining showed that there was less bone formation, and trabecular bone was thin and in disorder. Micro-CT assessment showed that the bone structure repair was poor and the density of newly formed bone is not ideal in the control group. **Conclusion** Zoledronic acid was more effective than strontium ranelate in bone defect repairing in osteoporotic rats.

Key words: Zoledronic acid; Strontium ranelate; Osteoporosis; Bone defect; Ovariectomized rats; Femur

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)一种以骨量减少和骨微结构破坏为主要特征的疾病, 因其降低骨强

*通讯作者: 杨雷, Email: wzmcy12015@sina.com

度,容易导致骨折、骨缺损等相关并发症。常见的骨质疏松骨折是髌部骨折和脊柱,这使得死亡率增加了10%~20%,同时这类病人在经历如某些高能量的创伤后,关节翻修手术,或者肿瘤切除更易出现骨缺损。临床研究一致表明这类病人骨愈合能力较正常者时间延长,效果差。目前,治疗骨缺损的“金标准”是自体骨移植^[1]。但是由于接受骨移植病人的取材有限,以及取材区的感染风险增加,这一金标准已受到了巨大挑战,敦促医务人员尽快开发出治疗骨质疏松的新方法。目前全世界范围内可用于骨质疏松治疗的药物,主要包括抗骨吸收药物(例如双磷酸盐类药物、选择性雌激素受体调节剂、降钙素、狄诺塞麦等)和骨形成剂(例如甲状旁腺激素和雷奈酸锶)^[2]。唑来膦酸(zoledronate acid, ZA)是目前双磷酸盐类药物最强的骨吸收抑制剂,而雷奈酸锶(strontium ranelate, SR)是第一种研制出具有双重功效—抑制破骨细胞和促进成骨细胞的抗骨质疏松药物^[3],它似乎会有比ZA更好的抗骨质疏松效果?本研究采用ZA和SR对骨质疏松性大鼠股骨干骺端骨缺损进行干预,分别于缺损术后6、12w运用Micro-CT对缺损区进行检测定量分析骨质疏松骨缺损区域和HE染色大体观察缺损区域成骨情况。探讨ZA和SR对骨质疏松性大鼠股骨干骺端骨缺损修复的效果,为临床上骨质疏松骨缺损的治疗提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

医用慢速直流电钻(美国史塞克医疗器械公司提供);OLYMPUS多功能显微镜(温州医科大学骨科实验室提供);Micro-CT(SkyScan1176)(苏州大学医学院骨科研究所提供);ZA(瑞士Novartis Pharma AG提供);SR(法国OSSEOR[®], Les Laboratoires Servier Industrie提供)。

1.2 方法

1.2.1 骨质疏松模型的建立:40只健康的雌性Sprague-Dawley大鼠(3月龄,体重210~230g,由上海实验动物中心提供),温州医科大学动物实验中心饲养(SPF级)。分为假手术模型组(Sham组, $n=5$)和去卵巢模型组(OVX组, $n=35$),经过1w的环境适应后,Sham组进行不摘除卵巢的手术,OVX组进行骨质疏松模型的建立。在2%戊巴比妥钠溶液(50 mg/kg)腹腔注射满意后,经双侧腰背切口进入腹腔,行双侧卵巢切除术;术后将所切卵巢组

织制作成HE染色切片,光学显微镜观察证实为卵巢。术后3日均预防性注射青霉素钠盐(40000 UI/ml, 1 ml/kg),预防感染,均无发现任何感染迹象。饲养3个月,处死随机选取的OVX组大鼠5只和Sham组的5只大鼠,行骨密度检测,确认骨质疏松模型成功。将剩余30只OVX大鼠随机分成SR组、ZA组、Control组3组。

3组动物都要建立骨缺损模型,2%戊巴比妥钠溶液(50 mg/kg)腹腔注射,麻醉满意后,手术暴露股骨干骺端。利用医用慢速直流电钻由前往后钻一约2.5 mm直径的贯通性骨缺损,股骨远端形成圆柱形缺损(直径约2.5 mm)形成,位于股骨远端骺板。术后所有实验的大鼠均予以正常饲养,饲料为温州医科大学实验动物中心提供的标准饲料,每日摄食量相当饮水不限。室温(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度保持50%。每周称体重1次。分别于6w和12w处死各组5只大鼠后,完整取下双侧股骨,剔除周围软组织,生理盐水冲洗后,用10%的多聚甲醛固定于HE染色和Micro-CT检测。

1.2.2 Micro-CT检测及组织学检测:将骨缺损术后6w及12w股骨标本置于扫描床上,扫描参数设置为:电压50 kv,电流500 μA ,扫描方式为360 $^{\circ}$ 旋转,曝光时间250 ms,图像面分辨率1024 \times 1024。每次扫描约持续10分钟,扫描完成后,选择圆形骨缺损区域为感兴趣区(region of interest, ROI)得到皮质骨与松质骨的三维图像并用Micro-CT内置软件进行定量分析,获得大鼠骨缺损区域骨微结构参数骨体积分数(bone volume/total, 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),然后将标本放置在EDTA脱钙液中浸泡每3~4天换液1次连续脱钙4w, X线检测是否脱钙完全,然后充分水洗乙醇梯度脱水,二甲苯透明石蜡,包埋切片,HE染色,OLYMPUS BX51多功能显微镜下观察新生骨生长情况。

1.3 统计学处理

所有数据经过SPSS19.0软件进行统计分析,数据均以均数 \pm 标准差表示,数据检验采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 实验动物情况

大鼠实验期间均未发生意外死亡。术后均未出现伤口感染,无红肿、流脓等反应,伤口陆续愈合。

2.2 模型成功确认

卵巢切除后 8 w,OVX 组的 BMD 明显低于 Sham 组, (166.55 ± 28.78)mg/cm² VS(226.37 ± 31.34)mg/cm², $P < 0.05$,证实骨质疏松模型建立成功。

2.3 组织学观察

2.3.1 组织学定性分析:6 w 时,ZOL 组和 SR 组有少量的骨组织生成,可见骨小梁排列整齐和较多核深染的长梭形骨细胞,均延着缺损壁生长,未发现两者之间有明显的差别(图 1C、E);对照组由于缺损因素,新骨形成受限,只见少量骨形成,骨小梁排列稀疏紊乱,长梭形骨细胞较少和可见少部分空泡状的脂肪细胞,缺损区域主要被大量纤维组织填充(图 1A)。12 w 时 ZOL 组和 SR 组可见纤维组织减少,骨小梁数量增加,缺损区域被新生骨充盈,但是 ZOL 组可见丰富的连续骨小梁,排列较为规则,数量也较 SR 组多出许多,SR 组骨小梁排列较 ZOL 组稀疏(图 1D、F);对照组骨缺损中央含有少部分的新生骨,中间部分骨小梁排列紊乱,空泡状的脂肪细胞减少(图 1B)。

2.3.2 组织学定量分析:比较各组新生骨数据,采用分差分析,各组在术后 6、12 w 新骨密度见图 2。SR 组、ZA 组缺损区新骨的密度:第 6 w 增加 49.06%、49.22%;第 12 w 增加 47.78%、50.31%,在上述数据中,发现与 Control 组比较时,SR 组、ZA 组有明显高于 Control 组($P < 0.05$)。在第 6w 时,未能发现 ZA 组和 SR 组的新骨密度有显著性差异($P > 0.05$),12 周时,ZA 组和 SR 组的新骨密度有显著性差异($P < 0.05$)。

2.4 骨组织形态计量学检测结果分析

术后 6、12w,SR 组和 ZA 组较 Control 组 BV/TV、Tb. Th、Tb. N 都增高($P < 0.05$),Tb. Sp 降低($P < 0.05$),说明药物治疗后骨小梁的密度增加,连接更为紧密,促进了新骨的生长和矿化。SR 组和 ZA 组比较,ZA 组在 12w 时,BV/TV、Tb. Th、Tb. N 都高于 SR 组($P < 0.05$),Tb. Sp 降低($P < 0.05$),但在第 6w 时,未能发现有显著的统计学差异($P > 0.05$)。见图 3。

3 讨论

随着医学事业的不断发展和人们生活水平的不断提高,人们的平均寿命不断延长和出生率的不断降低,人口老龄化越来越严重,因此老年病日益增多,尤其是 OP。WHO 将其定义为骨密度低于成人骨量峰值 2.5 个标准差的骨疾病成为骨质疏松症。OP 主要表现在骨密度、骨微结构破坏和非胶原蛋白

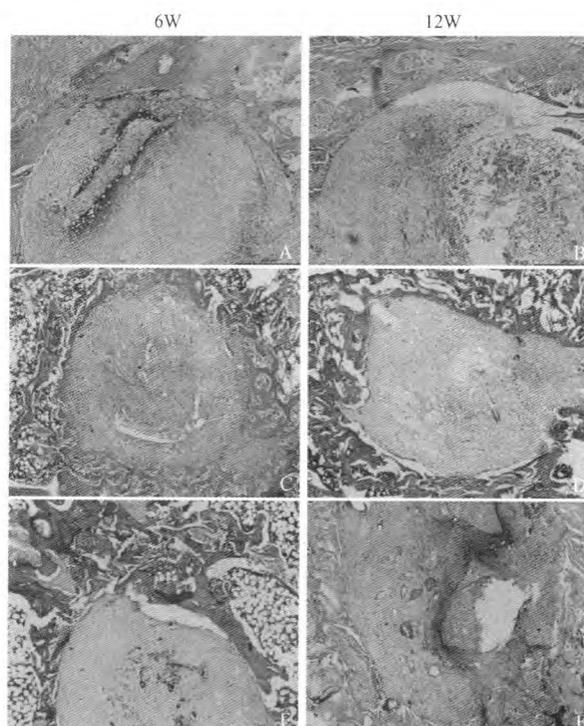


图 1 各组的切片图片。A、B 分别是空白对照组 6 周、12 周时缺损区图片;C、D 分别是 SR 组 6 周、12 周时缺损区图片;E、F 分别是 ZA 组 6 周、12 周时缺损区图片(HE × 20)

Fig. 1 Images of slides of each group at the defect region. A, B: Control group at 6 and 12 weeks; C, D: SR group at 6 and 12 weeks; E, F: ZA group at 6 and 12 weeks (HE × 20).

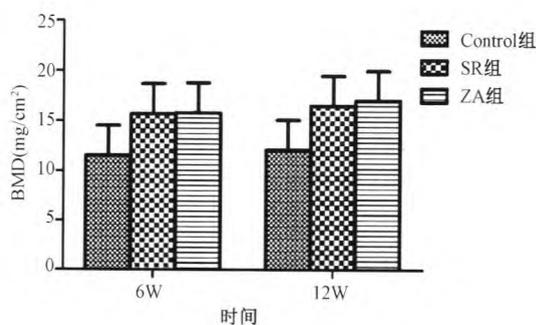


图 2 各组新生骨的 BMD 改变

Fig. 2 BMD changes of the new bone in each group

的减少,导致骨质量下降,极易发生骨质疏松性骨折的同时出现骨缺损。而且这类病人很难依靠自身骨代谢来修复缺损,甚至会造成骨延迟愈合或者不愈合,进而影响患肢功^[4]。鉴于骨质疏松对骨缺损的不利影响,临床治疗中除了对手术方法和植入物的改进和探索之外,常常积极应用抗骨质疏松药物来促进骨缺损的修复。目前,临床上抗骨质疏松药物

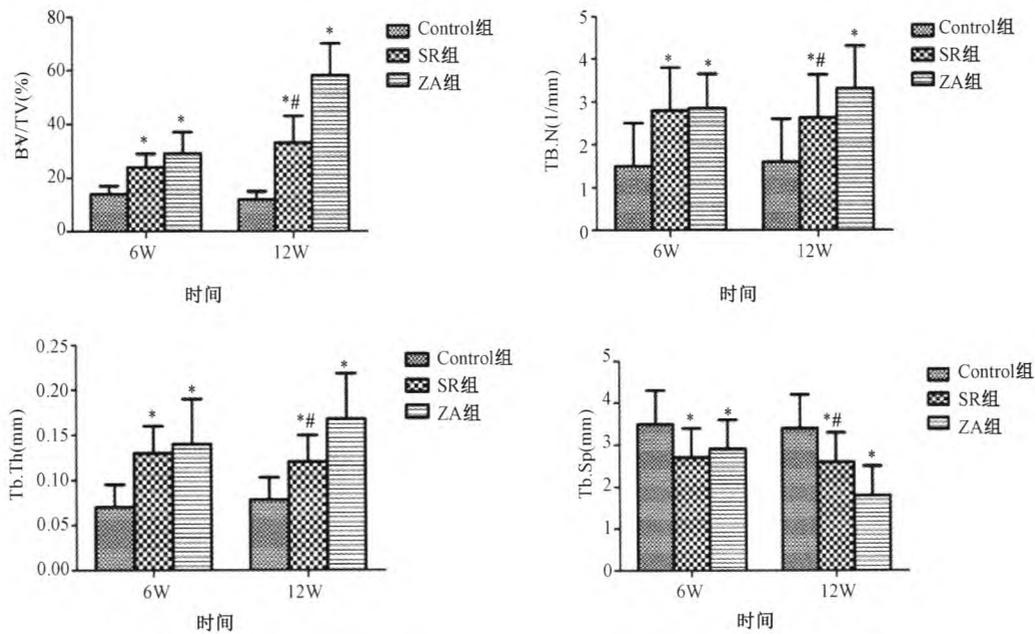


图3 各组骨微观结构的改变(* $P < 0.05$,与Control组比较;# $P < 0.05$,与ZA组比较)

Fig. 3 Bone microstructure changes in each group(* $P < 0.05$ vs Control group;# $P < 0.05$ vs ZA group).

主要有双磷酸盐、降钙素、雌激素、雷奈酸锶和甲状旁腺激素。有研究^[5]认为去势大鼠模型的骨骼及性激素改变与研究绝经后妇女改变相似,因此本实验选用去势的SD大鼠作为实验动物。本实验还涉及到临界骨缺损的问题:到底多大的骨缺损会超过自身修复能力,需要通过手术植骨?有研究表明直径在3 mm的骨缺损是临界骨缺损的标准^[6]。

本实验主要研究的是原发性骨质疏松,原发性骨质疏松分为绝经后骨质疏松和老年性骨质疏松。绝经后骨质疏松主要由于雌激素的不足,因此,骨形成较快,但破骨更快,属于高转化型。老年型骨质疏松骨量丢失较慢,属于低转化型^[7]。但无论哪种骨质疏松症,骨形成和骨吸收的平衡打破了,都将影响骨质疏松性骨缺损的修复。有研究^[5]表明,骨质疏松骨折6w后,由于破骨细胞仍然很活跃,在破骨细胞的作用下,骨矿化减少,骨胶原纤维生成不足,进而降低骨痂及新骨质量以及在生物力学检测中低于非骨质疏松骨折。本实验选用的抗骨质疏松药物唑来膦酸和雷奈酸锶在治疗骨质疏松症都有着不错的效果,是目前治疗骨质疏松症的一线药物^[2]。唑来膦酸已被证明是目前最有效的骨吸收抑制剂,主要应用于绝经后女性骨质疏松症、男性骨质疏松症及糖皮质激素诱发的骨质疏松症^[8]。唑来膦酸能够加速诱导破骨细胞的分化和生长,拮抗破骨细胞的骨吸收,从而能够减少骨吸收,增加骨组织^[9-11]。唑来膦酸的作用效果是阿仑膦酸的100倍,是依替膦

酸的将近10000倍,它能够降低骨转化指标,显著增加骨密度,具有良好的治疗效果以及长时间的作用效果^[2-3]。雷奈酸锶是目前最先研制出同时具有促进骨形成并抑制骨吸收的药物。Takahashi等^[12]研究表明雷奈酸锶可以诱导破骨细胞骨架的破坏和减少破骨细胞骨吸收的活性。实验研究和大规模的三期临床调查已经证明了雷奈酸锶具有良好的抗骨质疏松作用。其能够降低绝经后妇女髋部骨折相对风险度36%和椎体骨质疏松性骨折相对风险度降低41%^[13]。本实验中的ZA组和SR组,无论是在6w或者12w时,缺损区周围可以看见排列整齐的骨小梁以及成熟的骨细胞贴着缺损区域向中心生长,而Control组缺损区周围骨小梁排列紊乱稀疏,散落着少量的成熟骨细胞以及一些空泡状的脂肪细胞。另外,本试验还利用Micro-CT测定各组的新骨骨密度,ZA组和SR组的新骨密度要明显高于Control组($P < 0.05$)(图2)。通过Micro-CT对骨微观结构的观察,发现ZA组和SR组与Control组比较中,在BV/TV、Tb.Th、Tb.N都增高($P < 0.05$),Tb.Sp降低($P < 0.05$),表明治疗组在提高骨量的同时也改善了骨质量。

基于雷奈酸锶所具有的促进骨形成和抑制骨吸收的双重作用,可以有较其他抗骨质疏松药物更佳改善骨组织微结构和骨质量,包括组织学观察,新骨密度及骨组织形态学改变。但在本实验中HE染色等定性结果中,6w时并没有观察到雷奈酸锶对骨质

疏松骨缺损的修复效果好于唑来膦酸,在新骨密度和骨微观结构改变中也未有显著差异($P < 0.05$),反而在12w时,ZA组在新骨密度、HE染色、骨微观结构改变中均明显好于SR组。另有学者认为这与雷奈酸锶的化学结构有莫大关系^[14]。尽管雷奈酸锶具有抑制骨吸收的作用,但是这种作用是十分微弱的,比降钙素的作用还要弱^[3]。这可能是导致雷奈酸锶作用效果不如唑来膦酸的原因。也有学者^[15]认为这与骨缺损的愈合时间较短及SR的调控机制有关。在Rizzoli等^[16]的研究中,通过对比研究雷奈酸锶和阿伦磷酸盐对绝后后妇女抗骨质疏松作用。在3个月后,雷奈酸锶改善了骨的微观结构而阿伦磷酸盐对改善骨微观结构没有任何作用。这也证实了雷奈酸锶起效有一定时间性的特点。通过本实验研究发现,雷奈酸锶在修复骨质疏松骨缺损的作用并没有像预期高于唑来膦酸,但是在正常骨代谢下是否也是同样的结果?目前已有学者^[17]将唑来膦酸用于治疗正常的骨折,发现唑来膦酸可能存在促进正常骨折的愈合,其作用有待进一步的检验。而关于雷奈酸锶对于正常骨折的作用,国内外文献很少有报道过。

笔者对实验组的大鼠研究时间以12w为界,但是在12w之后雷奈酸锶和唑来膦酸对骨质疏松大鼠的骨缺损的研究尚需进一步研究。目前有关唑来膦酸和雷奈酸锶骨质疏松性骨缺损中的各种细胞因子及信号通路更为详细的研究,这方面仍需要进一步探索。

4 结论

雷奈酸锶和唑来膦酸治疗骨质疏松性骨缺损,不仅有良好抗骨质疏松的作用,同时有利于促进骨质疏松性骨缺损的修复组织的形成及生长,对骨微结构、形态的修复和骨密度提高效果明显,可以被用于有效预防及治疗骨质疏松和骨质疏松性骨缺损。虽然雷奈酸锶在后期(12w)的作用效果不及唑来膦酸,但是由于本实验研究时间的局限,有关12w之后的研究尚需进一步探讨。

【参 考 文 献】

- [1] Cao L, Liu G, Gan Y, et al. The use of autologous enriched bone marrow MSCs to enhance osteoporotic bone defect repair in long-term estrogen deficient goats. *Biomaterials*, 2012, 33(20): 5076-5084.
- [2] Brun LR, Galich AM, Vega E, et al. Strontium ranelate effect on bone mineral density is modified by previous bisphosphonate treatment. *Springer Plus*, 2014, 3(1): 676.
- [3] Chen B, Li Y, Yang X, et al. Zoledronic acid enhances bone-implant osseointegration more than alendronate and strontium ranelate in ovariectomized rats. *Osteoporosis International*, 2013, 24(7): 2115-2121.
- [4] 陶周善, 吕杨训, 崔伟, 等. β -TCP 修复骨质疏松性骨缺损的实验研究. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(10): 1178-1183.
Tao ZS, Lv YX, Cui W, et al. Experimental study on the repair of bone defect by β -TCP. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2014, 20(10): 1178-1183. (in Chinses)
- [5] Cao Y, Mori S, Mashiba T, et al. Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2002, 17(12): 2237-2246.
- [6] Rudert M. Histological evaluation of osteochondral defects: consideration of animal models with emphasis on the rabbit, experimental setup, follow-up and applied methods. *Cells Tissues Organs*, 2002, 171(4): 229-240.
- [7] 刘学军. 骨质疏松症. *中国矫形外科杂志*, 2006, 14(21): 1668-1670.
Liu XJ. Osteoporosis. *Orthopedic Journal of China*. 2006, 14(21): 1668-1670. (in Chinses)
- [8] 陈奇盛. 原发性骨质疏松的诊断与治疗. *中国老年学杂志*, 2009, 29(13): 1720-1722.
Chen QS. Diagnosis and treatment of primary osteoporosis. *Chinese Journal of Gerontology*, 2009, 29(13): 1720-1722. (in Chinses)
- [9] Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clinic Proceedings*, 2008, 83(9): 1032-1045.
- [10] Kwak HB, Kim JY, Kim KJ, et al. Risedronate directly inhibits osteoclast differentiation and inflammatory bone loss. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2009, 32(7): 1193-1198.
- [11] Rogers MJ, Gordon S, Benford H, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*, 2000, 88(S12): 2961-2978.
- [12] Takahashi N, Sasaki T, Tsouderos Y, et al. S 12911-2 inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2003, 18(6): 1082-1087.
- [13] Neuprez A, Hilgsmann M, Scholtissen S, et al. Strontium ranelate: the first agent of a new therapeutic class in osteoporosis. *Advances in therapy*, 2008, 25(12): 1235-1256.
- [14] Reginster J. Strontium ranelate in osteoporosis. *Current pharmaceutical design*, 2002, 8(21): 1907-1916.
- [15] 蒋梁华, 李晓林, 聂玮. 雷奈酸锶对大鼠骨质疏松性骨折愈合的骨密度及骨微结构影响. *中国骨质疏松杂志*, 2011, 17(10): 868-872.
Jiang LH, Li XL, Nie W, et al. Strontium ranelate affect bone density and bone microarchitecture on osteoporotic fracture healing in rats. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2011, 17(10): 868-872. (in Chinses)
- [16] Rizzoli R, Laroche M, Krieg MA, et al. Strontium ranelate and alendronate have differing effects on distal tibia bone microstructure in women with osteoporosis. *Rheumatology international*, 2010, 30(10): 1341-1348.
- [17] 龚冲丞, 关明, 孙贵新, 等. 唑来膦酸对兔胫骨骨折愈合的影响. *同济大学学报(医学版)*, 2014(5): 10.
Gong CC, Guan M, Sun GX, et al. Effect of zoledronic acid on rabbit tibial fracture healing. *Tongji University (Medical Edition)*, 2014(5): 10. (in Chinses)

(收稿日期: 2015-07-27)