

狄诺塞麦对去卵巢大鼠股骨干骺端骨缺损修复影响的实验研究

许九生^{1*} 荔婷婷² 刘辉¹

1. 河南科技大学第一附属医院骨科, 河南 洛阳 471000
2. 河南科技大学附属新区医院肝脏外科, 河南 洛阳 471000

中图分类号: R-332, R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016)12-1535-05

摘要: 目的 研究狄诺塞麦(DMab)对去卵巢大鼠股骨干骺端骨缺损修复的影响。方法 40只健康雌性SD大鼠随机行假手术(Sham, $n=15$)和切除双侧卵巢(OVX, $n=25$)手术,术后12w每组各取5只大鼠处死取股骨行双能X线骨密度仪检测来确定骨质疏松的建立情况,随后各组大鼠在双侧股骨干骺端建立3mm圆形缺损,术后随机分成3组:Sham、OVX组及DMab组。术后第一天DMab组给予DMab皮下注射一次,剂量为60mg,正常饲养12w后所有大鼠处死取股骨行Micro-CT、骨生物力学、组织切片检测。结果 和OVX组、Sham组股骨干骺端缺损愈合相比,DMab组大鼠股骨干骺端缺损区域有较高的最大载荷、骨密度(BMD)、骨体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)、连接密度(Conn.D)、骨矿化沉积率(MAR)和较低的骨小梁分离度(Tb.Sp),且各组之间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 DMab通过增加骨量,促进骨组织矿化及提高骨骼强度来加速去势大鼠股骨干骺端骨缺损的修复。

关键词: 去势大鼠;骨质疏松;骨缺损;狄诺塞麦;骨矿化;骨密度

Experimental study on the effects of denosumab on femoral metaphyseal defect repair in ovariectomized rats

XU Jiusheng^{1*}, LI Tingting², LIU Hui¹

1. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000
 2. Department of Liver Surgery, New District Hospital, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China
- Corresponding author: XU Jiusheng, E-mail: 1474888701@qq.com

Abstract: Objective This study was designed to investigate the impact of Denosumab (DMab) on the healing of femoral metaphyseal bone defects in OVX rats. **Methods** After bilateral ovariectomy ($n=25$) or sham operation ($n=15$), 12 weeks were allowed to pass before defect surgery for the establishment of standard osteoporotic animal models. Then five randomly selected OVX rats and five sham-operated ones were euthanized, and the femoral was harvested for BMD evaluation to confirm the establishment of osteoporotic animal model. Then all animals from the OVX group were randomly divided into three groups: OVX, DMab and Sham group. DMab group received a single dose of DMab 60 mg/kg until death at 12 weeks. The femurs of rats were harvested for evaluation. The results of treatment for osteoporosis were evaluated by micro-computerized tomography, histology and biomechanics. **Results** Compared with OVX and Sham groups, the defect area of the DMab group had higher BMD, BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Conn.D, bone mineral apposition rates, strength and lower Tb.Sp. **Conclusion** These results seemed to indicate that DMab can heal ovariectomized-induced osteoporosis defects by increasing bone mass, mineralization and strength.

Key words: OVX rats; Osteoporosis; Bone defect; Denosumab; Mineralization; Bone mineral density

骨质疏松症是一种以骨量降低,骨组织显微结构发生退变,导致脆性增加,骨强度下降,易导致骨折的骨骼疾病^[1]。近年来,骨质疏松的患病率越来越高,骨质疏松相关骨折及骨缺损延迟愈合或不

愈合发生率渐渐增高,如何有效地治疗骨质疏松骨缺损对临床医生来说是一项巨大的挑战^[2]。目前治疗骨质疏松的药物主要分为促进骨形成药物、抑制骨吸收药物或者既能抑制骨吸收又能促进骨形成的药物3大类,其中以甲状旁腺激素、双膦酸盐类、

*通讯作者:许九生,Email:1474888701@qq.com

锆盐等临床上使用最为常见,且都能促进骨缺损的愈合,但是各自都存在不足之处。狄诺塞麦(denosumab, DMAb)为最近开发用来抑制骨吸收药物,是一种靶向针对RANKL的人源化的单克隆抗体类生物制剂,减缓骨吸收过程,从而有效降低骨折发生的风险^[3]。综上所述,笔者假设,狄诺塞麦也可能有助于增加缺损区域骨量,减少骨吸收来加速去卵巢大鼠骨缺损的愈合。

本研究通过使用狄诺塞麦来治疗由去卵巢大鼠股骨干骺端骨缺损,观察其疗效,为临床上此抗体的使用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

狄诺塞麦(Amgen公司), Micro-CT (Sky-Scan1176, 荷兰), 双能X线骨密度仪(XR-600, 美国诺兰德), 手术操作器械(美国史塞克医疗器械公司)。钙黄绿素(sigma, 美国), 硬组织切片机(EX-AKT300, 德国), 显微镜(ZEISS Axio Imager M1, 德国), Image-Pro Plus 全自动图像分析仪(Media Cybernetics, 美国), 生物力学实验机(MTS-858, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 模型的建立及药物治疗:40只健康的雌性SD大鼠(3月龄, 体重220~240g。由上海实验动物中心提供)用于去卵巢(OVX, $n=25$)制作骨质疏松模型和假手术(Sham, $n=15$)。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中下1/3处作一长约2cm纵行切口, 向两侧钝性分离皮下软组织, 于脊柱旁开0.5cm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。正常环境下饲养12w后各组取5只大鼠处死股骨行双能X线骨密度仪(DEXA)检测来检验骨质疏松建立模型情况。

随后所有的大鼠在双侧股骨干骺端通过电钻建立一个3mm圆形单皮质缺损, 简单而言, 待麻醉满意后, 于大鼠大腿外侧近膝关节处作一长约1.5cm手术切口, 显露肌肉组织, 于大腿外侧肌群肌间隙钝性分离肌肉组织, 显露股骨干骺端, 并将大鼠髌骨向内侧推移, 暴露干骺端前部, 应用医用慢速直流电钻侧方钻一直径为3mm单皮质圆柱形骨缺损区域, 术中持续生理盐水冲洗, 随后逐层缝合。

术后随机分成3组: Sham组、OVX组、DMAb

组。DMAb组术后第1天开始给予皮下注射DMAb一次, 剂量70mg, Sham组和OVX组注射相同剂量的生理盐水, 直至手术后12w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。每次手术后前3d给予青霉素肌肉注射(2.5万U/kg)预防感染。所有大鼠在处死前第18天以及处死前第5天, 每日分别腹腔内注射15mg/kg剂量的钙黄绿素。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的剂量^[4]。

1.2.2 Micro-CT检测:所有存活的大鼠在术后四周时处死, 完整取下大鼠双侧股骨, 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。将左侧股骨置于扫描床上, 扫描兴趣区为扫描完成后, 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(CT An software)进行定量分析。获得大鼠股骨远端缺损区域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)。

1.2.3 组织学检测:待所有股骨经过Micro-CT检测后, 所有标本用4%的多聚甲醛固定, EDTA脱钙液中浸泡, 每3~4d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。不脱钙骨组织包埋块修整后置于硬组织切片机沿股骨纵轴冠状面切片, 清洗打磨抛光, 切片最终厚度约为30~40 μ m, 切片在荧光显微镜及光镜下观察。使用Image-Pro Plus 6.0全自动图像分析仪对骨矿化沉积率(MAR)进行计算。

1.2.4 生物力学测定:股骨干骺端缺损区域最大压力载荷实验具体步骤参考已经发表的文献^[5], 每组各取7只(左侧股骨)采用牙托粉及特制磨具固定股骨近端, 固定到距离股骨干骺端最远端为1.0cm处, 在骨生物力学机(MTS-858)上进行缺损区最大压力载荷实验。实验开始时采用0.2mm每分钟的施压速度对标本进行载荷实验, 待缺损区域出现骨折时, 这时相应的力学记录软件记录生物力学机输出的结果就是最大载荷值。

1.3 统计学处理

计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 SPSS19.0 统计学软件进行分析, 2 组计量资料采用 *t* 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 手术对大鼠的影响

到实验截止时间, 有 4 只大鼠由于手术不当、麻醉不当和伤口感染死亡, 它们其中 2 只属于 OVX 组, 1 只属于 DMAb 组, 1 只属于 Sham 组, 最终共有 26 只大鼠进入最终实验结果评估。术后 12 w 时两组大鼠股骨的骨密度变化经过 DEXA 检测获得: Sham 组大鼠的股骨密度为 $(233.21 \pm 29.78) \text{ mg/cm}^2$, OVX 组大鼠的股骨密度为 (167.24 ± 27.31)

mg/cm^2 。相对 Sham 组, OVX 组大鼠的骨密度下降 42.59% ($P < 0.05$), 表明模型建立是成功的。

2.2 Micro-CT 三维重建分析及骨微观参数

通过 Micro-CT 对感兴趣区域进行三维重建, 重建的结果如图 1A 所示, 通过内置软件计算的骨微观参数如表 1 所示。通过观察图 1A 可发现, 相对而言 DMAb 组缺损区域新生骨明显多于 OVX 组, 而且新生骨组织联系紧密, 骨小梁更粗。骨微观参数更加明显地表明 DMAb 组有最高的 BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Conn. D 和最低的 Tb. Sp, 而 OVX 组有最高的 Tb. Sp 和最低的 BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Conn. D。和 OVX 组比较, DMAb 组、Sham 组骨微观参数有明显的统计学意义, 这些表明联合使用 DMAb 可以明显增加去卵巢大鼠骨小梁的量。

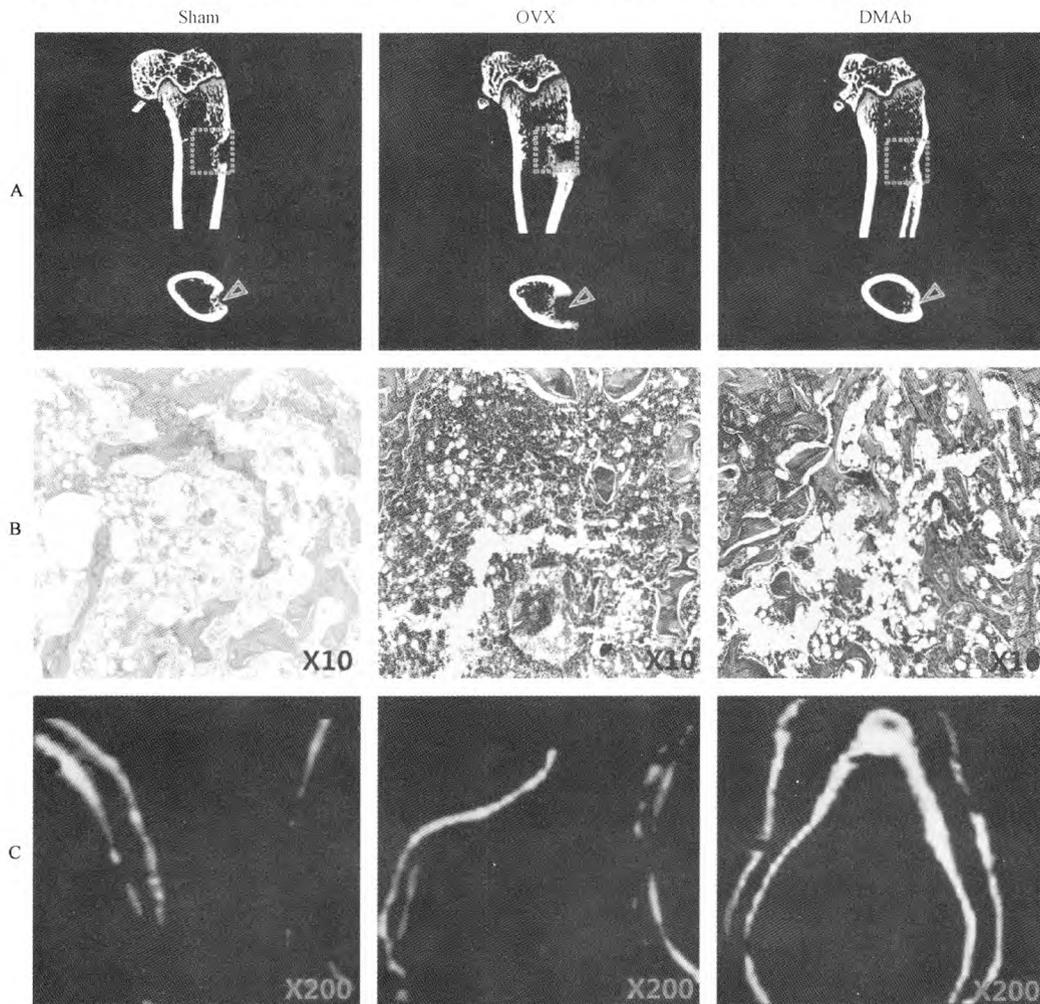


图 1 A: 药物治疗 12 w 各组大鼠股骨干骺端骨缺损 Micro-CT 扫描结果; B: 药物治疗 12 w 各组大鼠股骨干骺端骨缺损区域 HE 切片结果; C: 药物治疗 12 w 各组大鼠股骨干骺端骨缺损区域骨矿化情况
Fig.1 A: Micro-CT scan of the rats femoral metaphyseal bone defect 12 weeks after treatment; B: HE biopsy results of the rats femoral metaphyseal bone defect area 12 weeks after treatment; C: Bone mineralization of the rats femoral metaphyseal bone defect area 12 weeks after treatment.

表1 各组大鼠术后12w时左侧股骨干骺端感兴趣区域骨微观参数

Table 1 The left femoral metaphyseal bone microstructure parameters at region of interest in each group of rats at 12 weeks

Group	Tb. N	Tb. Th	BV/TV	Tb. Sp	Conn. D
Sham	2.783 ± 0.017 *	0.156 ± 0.0017 *	0.367 ± 0.023 *	0.423 ± 0.145 *	78.324 ± 10.23 *
OVX	2.280 ± 0.015	0.126 ± 0.013	0.198 ± 0.019	0.623 ± 0.131	47.324 ± 9.45
DMAb	2.991 ± 0.121 **	0.176 ± 0.021 **	0.411 ± 0.021 **	0.352 ± 0.041 **	92.423 ± 13.32 **

注: * :与 OVX 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); * :与 Sham 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 组织切片观察结果

大鼠左侧股骨缺损区域经过 HE 染色结果如图 1B 所示,由图 1B 可以清楚发现 DMAb 组股骨远端缺损区骨小梁的量远远大于 OVX 组,且骨小梁之间联系紧密,排列有规律,切片的观察结果进一步证实 Micro-CT 的结果。荧光共聚焦显微镜的观察结果如图 1C 所示,通过 Image-Pro Plus 6.0 计算结果如表 2 所示,通过 SPSS 软件统计表明各组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$),这表明 DMAb 可以加速缺损区域新生骨组织的矿化。

2.4 骨生物力学检测

股骨干骺端缺损区域最大载荷的结果如表 2 所示,DMAb 组骨缺损有最大的压力载荷,和 Sham 组及 OVX 组比较差异有明显的统计学意义 ($P < 0.05$),这表明 DMAb 可以增加股骨干骺端缺损区最大力学强度,降低骨折发生率。

表2 各组大鼠股骨(右)干骺端缺损区最大载荷及矿化结果

Table 2 Maximum load and mineralization results of the femur of rats (right) metaphyseal defect area

组别	最大载荷(N)	MAR($\mu\text{m}/\text{day}$)
Sham	97.9 ± 13.5 *	1.27 ± 0.15 *
OVX	63.8 ± 10.3	0.92 ± 0.12
DMAb	151.3 ± 29.2 **	1.46 ± 0.14 **

注: * :与 OVX 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); * :与 Sham 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究通过去卵巢手术来诱导绝经后高骨吸收导致的骨质疏松模型,正常状况下饲养3月后通过双能X线骨密度仪检测股骨骨密度变化来确保骨质疏松建立是成功的。随后在大鼠双侧股骨干骺端侧方建立一个直径为3mm的圆形缺损,术后通过使用DMAb来干预骨质疏松骨缺损,DMAb使用12w后处死大鼠取股骨行Micro-CT、组织切片及骨生物力学等评估。笔者的实验结果表明DMAb可以明显增加去卵巢大鼠股骨干骺端缺损的修复,加速新生骨组织的矿化,增加股骨干骺端的强度。

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^[6]。但无论哪种骨质疏松症,骨形成和骨吸收的平衡被打破了,都将影响骨质最终导致一系列的病理性骨折或骨缺损,如常见的骨质疏松骨缺损,且其愈合能力大大下降,不愈合或延迟愈合的发生率明显增加。本实验选用的治疗骨质疏松骨缺损的药物DMAb是首个被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于治疗骨质疏松的单克隆抗体^[7]。人体正常的骨代谢通过OPG/RANK/RANK-L系统的相互作用予以精密地调节破骨细胞骨吸收和骨形成达到动态平衡。骨质疏松状态下破骨细胞骨吸收强于骨形成,狄诺塞麦可以特异性靶向RANK-L来抑制其作用,即通过对抗骨吸收来阻止局部骨侵蚀和骨质溶解的药物,作用机制与骨保护素类似^[3]。狄诺塞麦还可以通过抑制破骨细胞的形成、功能及存活来抑制骨吸收^[8]。

在本实验中的DMAb组药物使用12w时,可以看见缺损区域有大量新生骨组织,且骨组织更加成熟且骨组织之间联系紧密,而OVX组干骺端骨缺损区域只有少量的新生骨组织形成,且骨组织排列紊乱稀疏,且缺损区域还有大部分区域没有被骨组织充填。同时,本实验通过Micro-CT对骨微观结构的观察中,发现DMAb组与OVX组比较中,在骨小梁体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)都增高($P < 0.05$),骨小梁分离度(Tb.Sp)降低($P < 0.05$),表明DMAb在提高缺损区域骨量的同时也改善了骨质量^[9]。硬组织切片进一步证实Micro-CT的结果,同时发现DMAb明显可以加速缺损区域骨组织的矿化,增加骨质强度^[9]。骨生物力学指标是骨量、形态、结构和完整程度的综合体现,能直接反映骨强度和抗骨折能力,已成为评价骨骼特性和抗骨质疏松药物治疗不可缺少的指标。本次实验中股骨缺损区最大载荷结果表明DMAb可以明显提高干骺端缺损区域的骨强度,这对预防骨

折有着重大的意义。

本实验也有其局限性,首先实验使用的大鼠数量有限,且时间较短,12 w后动物骨质疏松的具体情况不知。笔者没有从生化角度进一步观察骨骼的具体改变,同时也没有进一步探索其机制。最后实验使用的药物剂量参考别的实验中使用的剂量,同时治疗大鼠最佳的药物剂量也不得而知,进一步确定最佳剂量也是下一步要考虑的问题。

综上所述,本实验虽然没有从机制、生化方面进一步研究 DMAb 治疗骨质疏松骨缺损,但是本实验从体内很好地证实了 DMAb 可以促进骨量的增加、加速骨组织的矿化、提高骨密度及骨强度来加速骨质疏松骨缺损的愈合,为其在临床的使用提供了理论基础。

【参 考 文 献】

- [1] Kawate H, Takayanagi R. Efficacy and safety of bazedoxifene for postmenopausal osteoporosis. *Clin Interv Aging*, 2011, 6(1): 151-160.
- [2] Russel B, Bess DH, Solomon DH, et al. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *Journal of Bone & Mineral Research*, 2007, 22(3): 465-475.
- [3] E Michael L. Treatment of osteoporosis with denosumab. *Maturitas*, 2010, 66(2): 182-186.
- [4] Lin T, Wang C, Cai X, et al. Comparison of clinical efficacy and safety between denosumab and alendronate in postmenopausal women with osteoporosis: a meta-analysis. *International Journal of Clinical Practice*, 2012, 66(4): 399-408.
- [5] Yang N, Cui Y, Tan J, et al. Local injection of a single dose of simvastatin augments osteoporotic bone mass in ovariectomized rats. *Journal of Bone & Mineral Metabolism*, 2013, 32(3): 252-260.
- [6] 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 Chinese)
- [7] Anonymous. Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause-the Journal of the North American Menopause Society*, 2010, 17(1): 25-54.
- [8] 孙金堂, 魏见伟, 隋光善, 等. 狄诺塞麦 (Denosumab) 治疗绝经后骨质疏松症的研究进展. *中国矫形外科杂志*, 2015, 23(11): 1007-1010.
- Sun JT, Wei JW, Sui GS, et al. Research progress of denosumab (Denosumab) in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Orthopedic Journal of China*, 2015, 23(11): 1007-1010. (in Chinese)
- [9] Reginster JY. Antifracture efficacy of currently available therapies for postmenopausal osteoporosis. *Drugs*, 2011, 71(1): 65-78.
- (收稿日期: 2016-06-25; 修回日期: 2016-08-15)
- (上接第 1515 页)
- Zhao HB, Liang HS, Hu M, et al. The Osteoking promote necrosis of femoral head in BMP-2 gene expression research in Chinese. *Pharmacol Chin Mater Med*, 2006, 22(6): 61-63. (in Chinese)
- [8] 胡敏, 赵宏斌, 钱传云, 等. 恒古骨伤愈合剂对兔激素性股骨头坏死模型超微结构的影响. *中华中医药杂志*, 2011, 26(3): 486-489.
- Hu M, Zhao HB, Qian CY, et al. The influence of the Osteoking to ultrastructure of rabbit model of glucocorticoid-induced avascular necrosis in Chinese. *Chinese medicine*, 2011, 26(3): 486-489. (in Chinese)
- [9] 赵宏斌, 胡敏, 梁红锁, 等. 恒古骨伤愈合剂促进兔坏死股骨头内核心结合因子 $\alpha 1$ 基因表达的实验研究. *中国中西医结合杂志*, 2006, 26(11): 1003-1006.
- Zhao HB, Hu M, Liang HS, et al. The study of Osteoking to promote rabbit femoral head necrosis internal core combined factor $\alpha 1$ expression in Chinese. *Integr Med*, 2006, 26(11): 1003-1006. (in Chinese)
- [10] Cao YP, Satoshi M, Tasuku M, et al. Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *Bone Miner research*, 2002, 17(12): 2237-2246.
- [11] Peng ZQ, Vaananen HK, Zhang HX, et al. Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. *Bone*, 1997, 20(3): 207-212.
- [12] Castañeda S, Calvo E, Largo R, et al. Characterization of a new experimental model of osteoporosis in rabbits. *Bone Miner Metab*, 2008, 26(1): 53-59.
- (收稿日期: 2016-05-31; 修回日期: 2016-08-28)