

# 联合使用固力康和特立帕肽对去卵巢大鼠股骨干骺端骨量、骨强度的影响

谢辉\*

湖北省荆门市第一人民医院创伤手足外科,湖北 荆门 448000

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 02-0227-05

**摘要:** 目的 探索联合使用特立帕肽(PTH)和固力康(KKI)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、KKI组、PTH组、PTH+KKI组。术后第一天开始给予药物治疗, KKI组:固力康灌胃(剂量6 mg/kg,每天1次),PTH组:PTH皮下注射(剂量60  $\mu$ g/kg,每周3次),PTH+KKI组:固力康灌胃和特立帕肽皮下注射,剂量和用药频率和KKI组、PTH组相同,直至术后12 w为止,12 w时所有大鼠处死取股骨行Micro-CT、HE染色切片及骨生物力学检测。结果 结果表明KKI组、PTH组、PTH+KKI组和OVX组相比,股骨干骺端都有较高的BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N、Conn. D、最大的载荷、刚度和较低的Tb.Sp,其中PTH+KKI组大鼠胫骨有最高的BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N、Conn. D、最大的载荷、刚度和最低Tb.Sp。KKI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 联合使用固力康和特立帕肽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;固力康;特立帕肽

## The influence of combined treatment with Teriparatide and Menatetrenone on bone mass and strength of the metaphysis of femur in OVX rats

XIE Hui\*

Department of Orthopedic Surgery, Jingmen No. 1 People's Hospital, Jingmen 448000, China

Corresponding author: XIE Hui, Email:1474888701@qq.com

**Abstract: Objective** This study was designed to investigate the effect of combined treatment with Menatetrenone and Teriparatide on osteoporosis in OVX rats. **Methods** After bilateral ovariectomy (OVX,  $n=40$ ) or sham operation (Sham,  $n=10$ ) in healthy female SD rats, the rats in OVX group were randomly divided into 4 groups: group OVX, group KKI, group PTH, and group PTH + KKI. One-day after the operation, the rats in groups PTH, KKI, PTH + KKI received Teriparatide (60  $\mu$ g/kg, 3 times a week), or Menatetrenone soft capsules (6mg/kg/d), or Teriparatide (60  $\mu$ g/kg, 3 times a week) plus Menatetrenone soft capsules (6mg/kg/d), respectively, for 12 weeks. The femurs of the rats were harvested and HE stained for micro-computerized tomography, histology, and biomechanical evaluation. **Results** Comparison with those in group OVX, the metaphysis of the femurs from groups KKI, PTH, and PTH + KKI had a higher BMD, BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Conn. D, maximum load, and stiffness, but a lower Tb.Sp. The maximal BMD, BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Conn. D, maximum load, and stiffness, and the minimal Tb.Sp were found in PTH + KKI group. The effect of Menatetrenone or Teriparatide use alone was significantly lower than their combined use for prevention and treatment of osteoporosis in OVX rats. **Conclusion** The application of Teriparatide plus Menatetrenone has an additive effect on osteoporosis in OVX rat.

**Key words:** OVX rats; Osteoporosis; Menatetrenone; Teriparatide

骨量严格受骨形成和骨吸收的平衡调控,当两者之间的平衡被打破时就会出现一系列的疾病包括骨质疏松。骨质疏松表现为骨吸收相对增强,渐渐

出现骨量减少、骨脆性增加,容易在低能量创伤下出现骨折,这也是这类疾病的主要危害<sup>[1]</sup>。目前抗骨质疏松药物主要通过促进骨吸收和/或抑制骨吸收来防治骨质疏松,如甲状旁腺激素(1-34, PTH),双膦酸盐类,然而对于严重的骨质疏松,PTH和双膦

\*通讯作者: 谢辉, Email:1474888701@qq.com

酸盐类联合使用对患者的骨密度提高并没有叠加作用,可能是双膦酸盐类降低骨转换和限制了骨重建的进程<sup>[2]</sup>。组织蛋白酶 K 是在破骨细胞中高表达的半胱氨酸蛋白酶,对 I 型胶原的降解起着重要的作用<sup>[3]</sup>。早期的研究表明组织蛋白酶 K 抑制剂 (KKI),它选择性抑制骨吸收,对骨形成影响很小<sup>[4,5]</sup>。综上所述,我们假设,组织蛋白酶 K 抑制剂和 PTH 联合使用可能有助于增加骨量,骨强度。

本研究通过联合使用 KKI 和 PTH 来治疗去卵巢大鼠,观察其对大鼠股骨干骺端的疗效,为临床上两者药物联合的使用提供实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

12 周龄 SPF 级 SD 雌性大鼠 50 只,体重 225 ~ 250 g,由上海斯莱克动物公司提供许可证号: (SCXK (沪) 2007-0005,合格证号: 2007-000548429)。所有动物在温度为 (24.0 ± 0.5) °C,湿度为 45% ~ 50%,通风良好的环境下饲养,每周称重 1 次。每次手术后前 3 天所以大鼠给予青霉素肌肉注射 (2.5 万 U/kg) 预防感染。

### 1.2 材料

固力康 (日本卫材株式会社); PTH (GIBCO 公司); Micro-CT (SkyScan1176, 荷兰), 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)。

### 1.3 骨质疏松动物模型的建立及治疗

50 只大鼠随机分成 2 组即 OVX 组 ( $n = 45$ ) 切除双侧卵巢以建立骨质疏松动物模型和 Sham 组不切除双侧卵巢建立假手术模型。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 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。正常环境下饲养 12 w 后各组取 5 只大鼠处死股骨行骨密度测量仪检测来检验骨质疏松建立模型建立情况。随后所有的去卵巢 (OVX) 大鼠随机的分成 4 组: OVX 组、KKI 组、PTH 组、PTH + KKI 组。KKI 组、PTH 组、PTH + KKI 组大鼠术后给予固力康 6 mg/(kg·d) 灌胃,特立帕肽 60 μg/kg 皮下注射,每周 3 次、固力康 6 mg/(kg·d) 灌

胃加特立帕肽 60 μg/kg 皮下注射,每周 3 次直至去卵巢术后 12 w。随后所有大鼠处死取股骨行 Micro-CT、骨生物力学、HE 组织切片检测。

### 1.4 Micro-CT 检测

所有存活的大鼠在术后 12 w 时处死,完整取大鼠双侧股骨,剔除周围软组织,生理盐水冲洗后,采用 10% 多聚甲醛固定用于 Micro-CT 检测。扫描条件为:图像矩阵为 2048 × 2048,整合时间为 200 ms,能量/强度为 70 kVp、114 μA、8 W。以 0° 旋转,进行扫描。扫描完成后,选取生长板远端 1.0 mm、层厚 2.0 mm 的骨组织为松质骨感兴趣区域 (region of interest, ROI) 进行三维重组,最低阈值为 160 提取图像信息。获得大鼠股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)。

### 1.5 HE 组织切片

待所有股骨经过 Micro-CT 检测后,所有标本用 4% 多聚甲醛固定,梯度酒精脱水,甲基丙烯酸甲酯包埋。包埋块修整后置于硬组织切片机沿胫骨纵轴冠状面切片,清洗打磨抛光,切片最终厚度约为 30 ~ 40 μm,切片在荧光显微镜及光镜下观察。然后将标本放置在 EDTA 脱钙液中浸泡,每 3 ~ 4 d 换液 1 次,连续脱钙 4 w, 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股骨干骺端骨生长情况,骨小梁的微观结构及分布。

### 1.6 生物力学测定

取右侧股骨,将其置于 MTS-858 型生物力学实验机上,支点跨距 17 mm,中点为加压点,加载速度为 2 mm/min,计算机记录载荷-位移曲线,根据曲线计算最大载荷和刚度。

### 1.7 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;采用单因素析因设计的方差分析;组间比较采用 *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

至实验截止时间,有 2 只大鼠由于手术不当、麻醉不当和伤口感染死亡,它们都属于 OVX 组,最终

共有 38 只大鼠进入最终试验结果评估。术后 12 w 时两组大鼠股骨的骨密度变化由骨密度测量仪检测所得, Sham 组大鼠的股骨骨密度为  $241.21 \pm 31.78$  ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ), 而 OVX 组大鼠股骨骨密度为  $171.24 \pm 28.31$  ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ )。相对 Sham 组, OVX 组大鼠的骨密度下降 40.93% ( $P < 0.05$ ), 结果表明骨质疏松模型建立是成功的。

### 2.2 股骨骨密度的改变

药物治疗 12 w 时, 大鼠股骨干骺端通过 Micro-CT 扫描后通过内置软件所得的各组股骨骨密度如表 1 所示; 相对于 OVX 组, KKI、PTH、PTH + KKI 各组股骨骨密度分别增加了 19.09%、28.62%、39.26%, 有明显的统计学意义 ( $P < 0.05$ )。从结果可以发现相对于单独使用 PTH 和 KKI, 联合使用两者对去卵巢大鼠股骨骨密度提高更明显。

表 1 药物治疗 12 w 时各组大鼠左侧股骨干骺端感兴趣区域骨密度及骨微观参数情况

Table 1 BMD and micro-structure parameters in the metaphysis of the left femurs of the rats in each group after 12-week treatment

Parameter	OVX	KKI	PTH	PTH + KKI
BMD	$168.56 \pm 30.12$	$200.74 \pm 32.43^{* \&}$	$206.81 \pm 33.15^{* \#}$	$234.74 \pm 35.78^{* \# \&}$
Tb. N	$2.410 \pm 0.097$	$2.774 \pm 0.114^{* \&}$	$2.775 \pm 0.111^{* \#}$	$3.021 \pm 0.112^{* \# \&}$
Tb. Th	$0.120 \pm 0.011$	$0.143 \pm 0.010^{* \&}$	$0.147 \pm 0.011^{* \#}$	$0.168 \pm 0.014^{* \# \&}$
BV/TV	$0.199 \pm 0.016$	$0.334 \pm 0.016^{* \&}$	$0.342 \pm 0.027^{* \#}$	$0.419 \pm 0.016^{* \# \&}$
Tb. Sp	$0.613 \pm 0.126$	$0.481 \pm 0.085^{* \&}$	$0.463 \pm 0.047^{* \#}$	$0.299 \pm 0.034^{* \# \&}$
Conn. D	$42.750 \pm 8.970$	$67.231 \pm 5.589^{* \&}$	$70.234 \pm 6.675^{* \#}$	$94.421 \pm 14.311^{* \# \&}$

注: 与 OVX 组比较,  $^{*}P < 0.05$ ; 与 SIM 组比较,  $^{\#}P < 0.05$ ; 与 PTH 组比较,  $^{\&}P < 0.05$

### 2.3 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 1 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 1 可以明显发现: 相对 OVX 组而言, KKI、PTH、PTH + KKI 各组的骨小梁数量明显增多, 而且骨小梁联系紧密, 骨小梁更粗。骨微观参数更加明确的表明 PTH + KKI 组有最

高的 BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Conn. D 和最低 Tb. Sp, 而 OVX 组有最高的 Tb. Sp 和最低 BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Conn. D。和 OVX 组比较, KKI、PTH、PTH + KKI 各组骨微观参数有明显的统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 从结果可以发现相对于单独使用 PTH 和 KKI, 联合使用两者对去卵巢大鼠股骨骨量提高更明显。

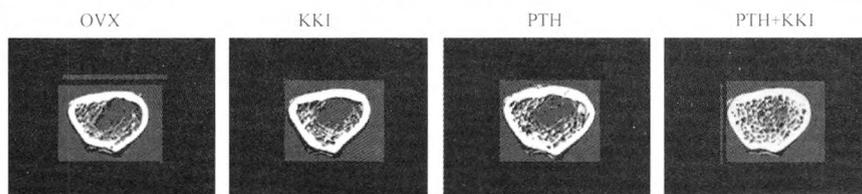


图 1 药物治疗 12 w 时各组大鼠股骨干骺端 Micro-CT 三维重建结果

Fig. 1 3D reconstruction of micro-CT images in the metaphysis of the left femurs of the rats in each group after 12-week treatment

### 2.4 HE 组织切片结果

大鼠左侧股骨切片经过 HE 染色结果如图 2 所

示, 结果表明 KKI、PTH、PTH + KKI 各组干骺端的骨量远远大于 OVX 组, 且骨小梁之间联系紧密, 排列

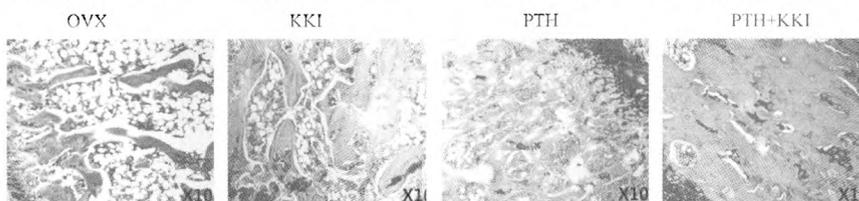


图 2 药物治疗 12 w 时各组大鼠股骨干骺端 HE 组织切片结果

Fig. 2 The results of HE staining of the histological slices in the metaphysis of the left femurs of the rats in each group after 12-week treatment

有规律;而 OVX 组骨小梁稀疏,且骨小梁纤细,部分骨小梁出现断裂,这表明 KKI 和 PTH 明显增加股骨干骺端骨量,HE 切片的观察结果进一步证实 Micro-CT 的结果。

## 2.5 骨生物力学结果

表 2 药物治疗 12 w 时各组大鼠股骨(右)三点弯曲试验的结果

Table 2 The 3-point bending test results of the right femurs of the rats in each group after 12-week treatment

Parameter	OVX	KKI	PTH	PTH + KKI
最大载荷(N)	97.9 ± 13.5	171.3 ± 29.2 <sup>* &amp;</sup>	176.81 ± 33.15 <sup>* #</sup>	198.7 ± 35.78 <sup>* # &amp;</sup>
刚度(N/mm)	188.6 ± 17.4	274.4 ± 27.7 <sup>* &amp;</sup>	284.4 ± 27.7 <sup>* #</sup>	334.4 ± 27.7 <sup>* # &amp;</sup>

注:与 OVX 组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与 SIM 组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与 PTH 组比较,<sup>&</sup> $P < 0.05$

## 3 讨论

本次实验中使用雌性 SD 大鼠经过去卵巢 12 w 来建立骨质疏松模型,经过全身使用 PTH 及 KKI 来改变去卵巢大鼠的骨代谢,药物治疗 12 w 后处死大鼠取下双侧股骨行 Micro-CT、HE 切片及骨生物力学检测,实验的结果表明相对于单独使用 PTH 及 KKI,联合使用两者可以明显增加股骨 BMD,提高股骨干骺端微观参数,保护骨小梁的质和量,增加股骨最大载荷及刚度;这暗示联合使用 PTH 及 KKI 对骨质疏松的治疗有叠加作用。

骨质疏松症是一种以骨量降低,骨组织显微结构发生退变,导致骨脆性增加,骨强度下降,易导致骨折的骨骼疾病<sup>[6]</sup>。随着世界老年化进展,骨质疏松的患病率越来越高,骨质疏松相关骨折已经成为很大的世界性难题,防治骨质疏松对临床医生来说是一项巨大的挑战<sup>[7]</sup>。虽然双膦酸盐类、地诺单抗、雌激素在治疗骨质疏松都有不错的疗效,但是常常会出现一些不利因素影响其临床应用,如双膦酸盐类人体吸收率低,不适用于有血栓栓塞性疾病或肾功能不全者<sup>[8]</sup>;地诺单抗使用时出现下颌骨坏死率<sup>[9]</sup>;雌激素会加大妇科肿瘤的发病率。其严重后果是发生骨折及骨折后难以愈合,严重影响患者的生活质量。为了取得最大疗效,人们寻求联合治疗或序贯治疗的方法防治骨质疏松症。间歇性小剂量使用 PTH 具有促进骨合成代谢作用,并可改善骨微结构,增加骨量。本研究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。

本实验中使用 KKI 是一种四烯甲萘醌合成物,它可以有效抑制组织蛋白酶 K 形成,促进骨形成作用,同时抑制破骨形成,可以有效提高血清骨钙素浓度<sup>[10]</sup>。我们发现联合使用 PTH 和 KKI 可以明显的增加股骨骨量及骨强度,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,这可能和两者的促进骨形成的机制有关。PTH 具有强烈的促进成骨作用和破骨细胞有偶联系性,而 KKI 抑制破骨细胞的作用并不影响 PTH 成骨作用,这与 PTH 和双膦酸盐类联合使用不同,双膦酸盐类抑制破骨细胞的活性的同时也会影响到 PTH 的成骨效果;而 KKI 抑制骨吸收且不影响到破骨细胞的数目,增加骨形成<sup>[11,12]</sup>,因此并不会影响 PTH 的作用,这种结果导致两者联合使用有叠加作用。

本次试验也有其局限性,首先实验大鼠数量有限,且时间较短,12w 之后动物骨质疏松的具体情况不知。我们没有进一步进行机制探索,但是这次试验从体外很好的证实 PTH 联合 KKI 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效果较好,但是在人体这个复杂环境,且联合使用 PTH 和 KKI 治疗骨质疏松会进一步增加治疗成本,临床上具体实施仍需进一步研究。

## 【参 考 文 献】

- [1] Garnero P, Delmas PD. Contribution of bone mineral density and bone turnover markers to the estimation of risk of osteoporotic fracture in postmenopausal women. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2004(4):50-63.
- [2] Black DM, Greenspan SL, Ensrud KE, et al. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*, 2003, 349:1207-1215.
- [3] Nishi Y, Atley L, Eyre DE, et al. Determination of bone markers in pycnodysostosis: effects of cathepsin K deficiency on bone matrix degradation. *J Bone Miner Res*, 1999, 14:1902-1908.

(下转第 247 页)

程<sup>[6]</sup>。大量 NF- $\kappa$ B 的活化,使骨形成受抑制,导致 OP 发生。

### 3.3 中医不同治法对骨质疏松症大鼠骨骼、骨骼肌 I $\kappa$ B $\alpha$ 含量影响的比较研究

从本实验结果来看,与模型组比较,经中医不同治法治疗的骨质疏松症大鼠骨骼的 I $\kappa$ B $\alpha$  含量明显升高,其中补肾组升高程度比较明显,其次为健脾组;说明补肾和健脾方法,通过提高骨骼的 I $\kappa$ B $\alpha$  含量可以抑制 NF- $\kappa$ B 异常活化,减缓成骨细胞的凋亡过程,使骨形成多于骨吸收,有效的防治骨质疏松症。经中医不同治法治疗的骨质疏松症大鼠骨骼肌的 I $\kappa$ B $\alpha$  含量虽然与与模型组比较无统计学意义,但可以看到补肾组和健脾组有升高的趋势,说明补肾和健脾方法,通过提高骨骼肌的 I $\kappa$ B $\alpha$  含量可以抑制 NF- $\kappa$ B 表达,从而提高肌肉的能量。

从上述结果来看,补肾和健脾方法,通过提高骨骼、骨骼肌的 I $\kappa$ B $\alpha$  含量,提高骨骼和肌肉的协调性,从而有效的防治骨质疏松症,说明提示补肾方法是临床治疗骨质疏松症的根本方法。健脾方法是辅助补肾方法治疗骨质疏松症的一个重要治法。

### 【参 考 文 献】

- [ 1 ] Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(10): 749-759.
- [ 2 ] Courtois G, Gilmore TD. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*, 2006, 25(5): 6831-6843.
- [ 3 ] Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27(4): 693-733.
- [ 4 ] 吴昆鹏,戴永武,杨巧珠,等. NF- $\kappa$ B 信号通路与骨质疏松. *中国老年学杂志*, 2011, 31(19): 3852-3855.  
Wu KP, Dai YW, Yang QZ, et al. NF- $\kappa$ B signaling pathway and osteoporosis. *Chinese Journal of Gerontology*, 2011, 31(19): 3852-3855.
- [ 5 ] Harnish DC. Estrogen receptor ligands in the control of pathogenic inflammation. *Cur Opin Inv Drug*, 2006, 7(11): 997-1001.
- [ 6 ] Xing L, Carlson L, Story B, et al. Expression of either NF-kappaB p50 or p52 in osteoclast precursors is required for IL-1-induced bone resorption. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(2): 260-269.

(收稿日期: 2016-06-12; 修回日期: 2016-07-28)

(上接第 230 页)

- [ 4 ] Eastell R, Nagase S, Small M, et al. Effect of ONO-5334 on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal osteoporosis: 2-year results from the OCEAN study. *J Bone Miner Res*, 2014, 29: 458-466.
- [ 5 ] Williams DS, McCracken PJ, Purcell M, et al. Effect of odanacatib on bone turnover markers, bone density and geometry of the spine and hip of ovariectomized monkeys: a head-to-head comparison with alendronate. *Bone*, 2013, 56: 489-496.
- [ 6 ] Kawate H, Takayanagi R. Efficacy and safety of bazedoxifene for postmenopausal osteoporosis. *Clin Interv Aging*, 2011, 6: 151-160.
- [ 7 ] Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, et al. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(3): 465-475.
- [ 8 ] Warriner AH, Saag KG. Osteoporosis diagnosis and medical treatment. *Orthopedic Clinics of North America*, 2013, 44(2): 125-135.
- [ 9 ] Yee AJ, Raje NS. Denosumab, a RANK ligand inhibitor, for the management of bone loss in cancer patients. *Clinical Interventions in Aging*, 2012, 7(12): 331-338.
- [ 10 ] Li CY, Jepsen KJ, Majeska RJ, et al. Mice lacking cathepsin K maintain bone remodeling but develop bone fragility despite high bone mass. *J Bone Miner Res*, 2006, 21: 865-875.
- [ 11 ] Pennypacker B, Shea M, Liu Q, et al. Bone density, strength, and formation in adult cathepsin K (-/-) mice. *Bone*, 2009, 44: 199-207.
- [ 12 ] Li CY, Jepsen KJ, Majeska RJ, et al. Mice lacking cathepsin K maintain bone remodeling but develop bone fragility despite high bone mass. *J Bone Miner Res*, 2006, 21: 865-875.

(收稿日期: 2016-06-10; 修回日期: 2016-08-05)