

· 药物研究 ·

三种不同他汀类药物对去卵巢诱导骨质疏松大鼠骨密度的影响

龚海虹* 林志航 林志强

福建省泉州市第一医院药剂科,福建 泉州 362000

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 04-0518-05

摘要: **目的** 研究三种不同的他汀类药物对卵巢切除 (OVX) 雌性 Sprague-Dawley 大鼠的治疗效果,并比较其对大鼠骨密度的影响。**方法** 在切除大鼠卵巢 12 周后,分别用生理盐水、阿托伐他汀、辛伐他汀和洛伐他汀治疗 OVX 大鼠。治疗 2 个月后,在实验结束时对大鼠进行安乐死,获取其血清和股骨。通过生物力学测试、Micro-CT 扫描和血清生化分析评估治疗的效果。**结果** 与未处理的 OVX 大鼠相比,辛伐他汀、阿托伐他汀和洛伐他汀的全身给药显著增加了血清成骨指标、骨密度 (bone mineral density, BMD) 和生物力学指标 ($P < 0.05$)。**结论** 辛伐他汀、阿托伐他汀和洛伐他汀能有效改善 OVX 诱导的骨质疏松症。此外,经辛伐他汀治疗的动物的 BMD、血清骨代谢指标和生物力学性能都显示了较好的结果。

关键词: 骨质疏松症;辛伐他汀;洛伐他汀;阿托伐他汀;全身给药

Effects of three different types of statin on bone mineral density in ovariectomized rats with osteoporosis

GONG Haihong*, LIN Zhihang, LIN Zhiqiang

Department of Pharmacy, First Hospital of Quanzhou City, Quanzhou 362000, China

* Corresponding author: GONG Haihong, Email: 1059473702@qq.com

Abstract: **Objective** We investigated the therapeutic effects of the most important types of statin administered orally for 2 months to ovariectomized (OVX) female Sprague-Dawley rats and compared the effects on bone mineral density. **Methods** 12 months after ovariectomy, the OVX rats were treated with normal saline, atorvastatin, simvastatin and lovastatin. The osteoporotic animals were treated daily for 2 months and euthanized at the end of experiments. The effectiveness of these treatments was evaluated by biomechanical testing, micro-CT scan and serum biochemical analysis. **Results** The result and statistical analysis showed that systemic delivery of simvastatin, atorvastatin and lovastatin significantly increased serum osteogenic indexes, bone mineral density (BMD) and biomechanical properties in comparison with the untreated OVX rats ($P < 0.05$). In all treatment groups, the SIM group achieved the best result. **Conclusion** It was concluded that simvastatin, atorvastatin and lovastatin could efficiently ameliorate the OVX-induced osteoporosis. Moreover, the simvastatin-treated animals showed the best result in terms of BMD, serum bone metabolic indexes and biomechanical properties.

Key words: osteoporosis; Simvastatin; Lovastatin; Atorvastatin; systemic drug delivery

骨质疏松症是一种常见的健康问题,其特征在于低骨量和骨结构退变,导致脆性增加和易于发生骨折^[1]。女性比男性更容易发生骨质疏松症。与绝经前女性相比,绝经后的女性更易患上这种系统性骨骼疾病,并伴有更高的并发骨折的风险^[2]。具有降脂作用的他汀类药物经常用于心血管疾病,

有研究^[3-4]表明它们可以增强骨祖细胞向成骨细胞分化,下调成骨细胞的凋亡,并上调骨形成蛋白-2 (BMP-2) 的表达,有助于骨再生。进一步研究^[5]发现他汀类药物可以通过促进骨形成和抑制骨重吸收双重作用模式来促进成骨。阿托伐他汀、辛伐他汀和洛伐他汀是最常见的他汀类药物,多数研究^[6-7]评估了他汀类药物对骨密度的有益作用,但是三种药物谁的效果更佳,目前尚未有研究报道。本研究将全面比较阿托伐他汀、辛伐他汀和洛伐他汀对去

* 通信作者: 龚海虹, Email: 1059473702@qq.com

卵巢诱导的骨质疏松大鼠的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物和实验设计

30只12周龄成年雌性 Sprague-Dawley 大鼠 (220~250 g/只)用于本研究。在整个实验期间,动物可随意获得标准饲料颗粒和水。通过肌肉注射 (50 mg/kg) 盐酸氯胺酮 (10% 氯胺酮, Alfasan Co., Woerden, 荷兰) 进行去卵巢手术 (OVX, $n=25$) 和假手术 (Sham, $n=5$)。剃去双侧背部区域的毛发后,借助直手术镊子通过 2 mm 切口暴露卵巢。行血管结扎后,用手术剪将卵巢切除,并将其他暴露的组织重新放回原来位置。使用 3.0 丝线以常规方式缝合肌肉和皮肤的切口。通过皮下注射美洛昔康和头孢唑林钠 (剂量 1 mg/kg, 每天 1 次) 进行术后镇痛和抗感染治疗。在手术后 12 周,来自正常大鼠和去卵巢组的各 5 只动物被安乐死,并对它们的骨组织进行双能 X 线检测以确定骨质疏松症的形成。随后将剩下的大鼠分为四组即对照组 (CON)、阿托伐他汀组 (ATR)、辛伐他汀组 (SIM) 和洛伐他汀组 (LOV); 分别给予生理盐水、阿托伐他汀 [25 mg (kg·d)]、辛伐他汀 [25 mg (kg·d)] 和洛伐他汀 [25 mg (kg·d)] 治疗 2 个月, 每组 5 只动物。治疗 2 个月, 在过量的异氟烷下处死大鼠, 通过腹主动脉取血, 离心获取血清及股骨进行检测。

1.2 Micro-CT 检测

使用 Scanco μ CT 35 扫描仪 (Scanco, Wangen-Brüttli-sellen, 瑞士), 在扫描参数设定为电压 70 kv, 电流 114 μ A 下获取左侧股骨的微型计算机断层扫描图 (Micro-CT), 持续 800 ms。通过显微 Micro-CT (每个切片的厚度 = 6 μ m, 体素大小 = 10 μ m) 评估远侧生长板下方 1 mm 处选择的 3 mm 厚的感兴趣的体积 (VOI)。根据显微 CT 扫描结果评估骨体积分数 (bone volume ratio, BV/TV)、骨密度 (bone mineral density, BMD)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁数量 (trabecular number, Tb.N)、骨小梁分离度 (trabecular separation, Tb.Sp)。

1.3 血液生化分析

通过腹主动脉取血, 离心获取血清进行生化指标分析, 包括碱性磷酸酶 (ALP)、骨钙素、C 端端肽 I 型胶原 (CTX)、OPG 和 RANKL。采用酶联免疫吸

附试验 (ELISA) 试剂盒 (北京北方生物技术公司, 北京, 中国) 测定血清 ALP、骨钙素、CTX、OPG 和 RANKL 浓度。

1.4 生物力学评估

Micro-CT 扫描后将样本取右侧股骨, 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, 从载荷-变形曲线计算极限载荷 (N), 能量 (J) 和刚度 (N/mm)。

1.5 统计学分析

研究数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用单因素方差分析 (ANOVA) 来检验组间差异。方差分析和 Tukey 检验用于判断比较的统计学差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 去卵巢手术对大鼠骨密度影响

来自 Sham 和 OVX 组的大鼠股骨干骺端的 BMD 为 (231.12 $\pm$ 30.32) mg/cm² 和 (182.23 $\pm$ 27.98) mg/cm²。在定量分析中, 来自 Sham 组的大鼠股骨干骺端的 BMD 比 OVX 大鼠的高 28.7%。这些数据证实实验中 OVX 大鼠骨质疏松症模型的建立是成功的。

2.2 Micro-CT 检测结果

治疗 2 个月后大鼠的股骨 Micro-CT 扫描结果如图 1A 所示, 微观参数如图 1B~图 1F 所示。与 CON 组相比, LOV、ATR 和 SIM 组的股骨远端骨量和小梁厚度明显增加 ($P < 0.05$); 而 CON 组的小梁间距增加 ($P < 0.05$), 但在 LOV、ATR 和 SIM 组中均降低 ($P < 0.05$)。骨组织形态计量学参数显示, SIM 对去卵巢大鼠股骨骨量和骨密度保护作用效果最佳。

2.3 各种治疗方案对去卵巢大鼠血清骨钙素、CTX、OPG 和 RANKL 的影响

各种治疗方案对去卵巢大鼠血清骨钙素、CTX、OPG 和 RANKL 的影响如表 1 所示, 与 CON 组比较, LOV、ATR、SIM 组的骨钙蛋白、CTX 和 RANKL 被观察到显著增加 ($P < 0.05$); 观察到 LOV、ATR、SIM 组 OPG 和 OPG/RANKL 比值与 CON 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); SIM 组的 OPG 和 OPG/RANKL 比值明显高于 LOV、ATR、CON 组 ($P < 0.05$)。

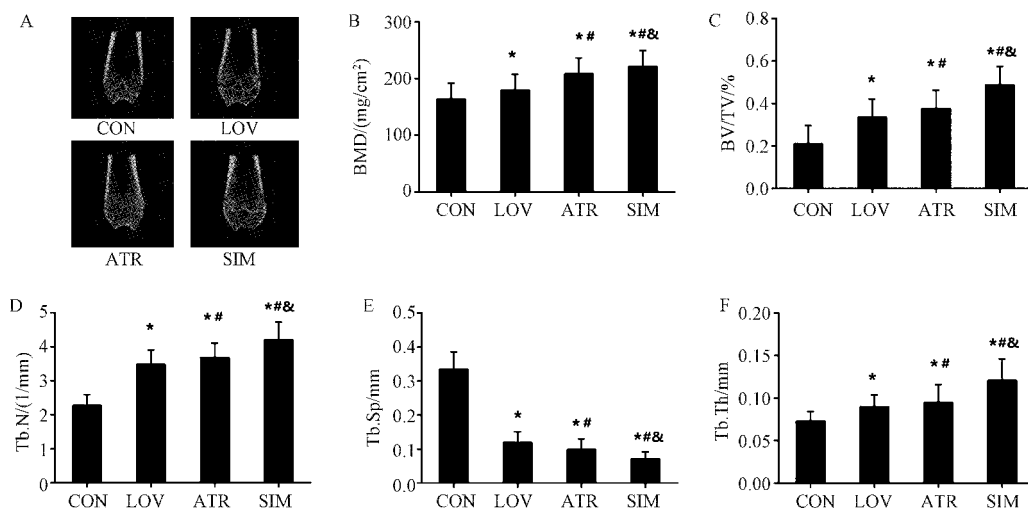


图 1 治疗 2 个月后大鼠股骨干骺端 Micro-CT 扫描结果和微观参数

Fig.1 Micro-CT scans and microscopic parameters of femoral metaphysis of rats after 2 months of treatment

表 1 治疗 2 个月后大鼠血清骨钙素、CTX、OPG 和 RANKL 的含量改变

Table 1 Changes of serum osteocalcin, CTX, OPG, and RANKL levels after 2 months of treatment

组别	骨钙素/(ng/mL)	CTX/(ng/mL)	OPG/(ng/mL)	RANKL/(ng/mL)	OPG/RANKL
CON	1765±3.45	28.47±4.35	2.95±0.17	1.96±0.18	1.03±0.54
LOV	15.43±2.3*	24.45±3.46*	3.38±0.57*	1.45±0.11*	2.72±0.23*
ATR	13.22±2.64*#	23.21±2.45*#	4.45±0.17*#	1.35±0.08*#	3.48±0.33*#
SIM	11.43±1.94*#&	20.34±2.94*#&	5.16±0.34*#&	1.18±0.04*#&	4.87±0.34*#&

注:与 CON 组比较,* $P<0.05$;与 LOV 组比较,# $P<0.05$;与 ATR 组比较,& $P<0.05$ 。

2.4 生物力学性能

通过生物力学测试获得的数据见图 2。SIM 组具有最高的极限载荷、能量和刚度,与 CON、LOV 和 ATR 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

广泛用于预防心血管疾病并具有其他治疗作用,包括对骨骼有积极的生物学作用^[9]。去卵巢大鼠已被证实^[10]是模拟绝经后人骨组织临床情况的最佳模型之一。在笔者的研究中,OVX 诱导的骨质疏松

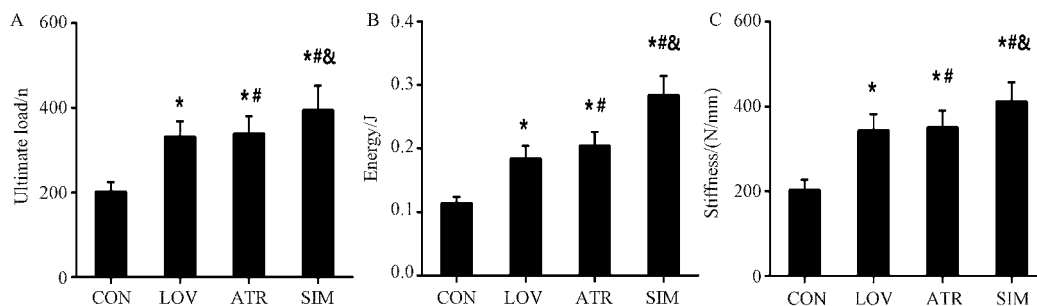


图 2 不同治疗方案对四组大鼠股骨生物力学的影响 A:极限载荷;B:能量;C:刚度

Fig.2 Effects of different treatment regimens on femur biomechanics of rats in the four groups

3 讨论

骨质疏松症被认为是老年人群最常见的疾病之一,必须考虑对这种疾病进行有效的治疗。心血管疾病也被认为是与年龄密切相关的疾病,可能与骨质疏松症有共同的生物学途径^[8]。他汀类药物被

症模型通过卵巢切除后 3 个月的骨密度检测得到证实。

关于他汀类药物在骨愈合应用中的许多问题,如最有效的他汀类药物、有益浓度和潜在的副作用仍未得到解答^[11]。在此次研究中,笔者比较分析了阿托伐他汀、辛伐他汀和洛伐他汀这三种最常用的

他汀类药物治疗骨质疏松症的效果。研究结果表明,和其他两种他汀类药物相比,辛伐他汀可以更好的提高大鼠股骨骨密度,增加股骨的生物力学性能。此外,辛伐他汀比阿托伐他汀和洛伐他汀明显提高了成骨标志的表达。辛伐他汀和洛伐他汀的应用导致血清 CTX 水平降低,表明这些治疗方案在改善骨质疏松症方面的效率。

2001 年的一项调查^[12]表明,他汀类药物可以以剂量依赖性方式影响骨转换。该调查介绍了一种关于他汀类药物对骨转换有效性的新观点,表明了低剂量他汀类药物可以通过增加破骨细胞的活性而导致骨转换为吸收。另一方面,这些药物的高剂量同样可以增加骨形成和再吸收,而 BMD 的净变化很小^[12]。因此,在这项研究中,笔者使用高剂量的亲脂性他汀类药物来预防 OVX 动物的骨质疏松症。关于药代动力学,考虑到啮齿类动物的代谢进程比人类快 8~10 倍^[13],以前的文献认为 10 mg/(kg·d)剂量的他汀类药物作用于大鼠,相当于人类使用剂量为 70 mg/d。根据先前体内研究中报道的高于临床应用中的常规剂量的有益作用,选择 20~25 mg/(kg·d)的他汀类药物(相当于人 140 mg/d)作为大鼠的治疗剂量,应在未来的临床试验中针对人类患者的剂量进行调整。

与其它组相比,组织形态计量学和显微 CT 扫描分析显示辛伐他汀组的骨显微结构和骨量显著改善;而阿托伐他汀组改善不明显。以前的文献^[14]表明,阿托伐他汀导致骨重塑减少,可导致各种标志物如骨保护素(OPN)、BMP-2 和胶原蛋白 1 型的明显减少。与正常骨组织相比,阿托伐他汀治疗骨中胶原 1 型表达水平较低^[14]。相反,阿托伐他汀会导致健康或血脂异常^[15]大鼠胫骨近端 BMP-2 的高表达。虽然此项研究中 Micro-CT 检测结果显示应用辛伐他汀和洛伐他汀后与对照组比较骨质疏松症改善更为明显,但与经过洛伐他汀治疗的动物相比,这种改善在辛伐他汀治疗的动物身上表现的更多。以往的研究^[16]表明,洛伐他汀与其他生物活性分子的组合可以通过协同有益作用显著改善 BMD。在关于 OVX 大鼠骨折部位骨愈合的研究中发现,单次剂量的洛伐他汀可以提高骨痂强度;而向洛伐他汀添加生育三烯酚不仅可以提高生物力学性能,还可以增强愈合组织的矿化作用^[17]。

总的来说,笔者的研究结果表明,辛伐他汀和洛伐他汀与阿托伐他汀治疗相比,改善 OVX 大鼠骨密度更为明显。此外,基于对成骨标志物的评估,辛伐

他汀可以积极促进骨形成。总体而言,与其他治疗方案相比,辛伐他汀显示出对改善 OVX 大鼠骨质疏松症的最佳治疗效果。

【参 考 文 献】

- [1] Onnick LB. Osteoporosis in men and women [J]. Clinical cornerstone, 2006, 8(1): 28-39.
- [2] Cole ZA, Dennison EM, Cooper C. Osteoporosis epidemiology update[J]. Current rheumatology reports, 2008, 10(2): 92-96.
- [3] Moshiri A, Sharifi AM, Oryan A. Role of Simvastatin on fracture healing and osteoporosis: a systematic review on in vivo investigations [J]. Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology, 2016, 43(7): 659-684.
- [4] Tsatsalis AN, Dokos C, Kaiafa GD, et al. Statins, bone formation and osteoporosis: hope or hype? [J]. Hormones, 2012, 11(2): 126-139.
- [5] Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, et al. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions [J]. Journal of Orthopaedic Surgery & Research, 2014, 9(1): 18.
- [6] Majima T, Komatsu Y, Fukao A, et al. Short-term effects of atorvastatin on bone turnover in male patients with hypercholesterolemia [J]. Endocrine Journal, 2007, 54(1): 145-151.
- [7] Ogasawara R, Furuya Y, Sasaki H, et al. Effects of Oral Administration of Simvastatin on Bone Formation in Senile Osteoporosis Rat [J]. Journal of Hard Tissue Biology, 2013, 22(4): 461-472.
- [8] Oryan A, Bighamsadegh A, Abbasitshnizi F. Effects of osteogenic medium on healing of the experimental critical bone defect in a rabbit model [J]. Bone, 2014, 63(3): 53-60.
- [9] Wang Z, Ying L, Zhou F, et al. Effects of Statins on Bone Mineral Density and Fracture Risk: A PRISMA-compliant Systematic Review and Meta-Analysis [J]. Medicine, 2016, 95(22): e3042.
- [10] Kharode YP, Sharp MC, Bodine PV. Utility of the Ovariectomized Rat as a Model for Human Osteoporosis in Drug Discovery [M]. Humana Press, 2008.
- [11] Shah SR, Werlang CA, Kasper FK, et al. Novel applications of statins for bone regeneration [J]. Natl Sci Rev, 2015, 2(1): 85-99.
- [12] Maritz FJ, Conradie MM, Hulley PA, et al. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents [J]. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 2001, 21(10): 1636-1641.
- [13] Park JB. The use of simvastatin in bone regeneration [J]. Medicina Oral Patologia Oral Y Cirugia Bucal, 2009, 14(9): e485.
- [14] Gradosova I, Zivna H, Palicka V, et al. Protective effect of atorvastatin on bone tissue in orchidectomised male albino Wistar rats [J]. European Journal of Pharmacology, 2012, 679(1-3):

144-150.

- [15] Lin S, Huang J, Fu Z, et al. The Effects of Atorvastatin on the Prevention of Osteoporosis and Dyslipidemia in the High-Fat-Fed Ovariectomized Rats[J]. *Calcified Tissue International*, 2015, 96(6): 541-551.
- [16] Abdulmajeed S, Mohamed N, Soelaiman IN. Effects of Tocotrienol and Lovastatin Combination on Osteoblast and Osteoclast Activity in Estrogen-Deficient Osteoporosis [J].

Evidence-Based Complementray and Alternative Medicine, 2012 (4): 960742.

- [17] Ibrahim NI, Khamis MF, Yunoh MFM, et al. Targeted Delivery of Lovastatin and Tocotrienol to Fracture Site Promotes Fracture Healing in Osteoporosis Model: Micro-Computed Tomography and Biomechanical Evaluation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e115595.

(收稿日期: 2018-03-12;修回日期: 2018-06-14)

(上接第 508 页)

- [9] MK Garg. The intestinal calcitactat[J]. *Indian Endocrinol Metab*, 2013, 17(10): 25-28.
- [10] 马勇, 司誉豪, 徐力立, 等. 强骨胶囊与维生素 d 对骨质疏松性骨折患者治疗有效性及安全性的系统评价[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(9): 1218-1223, 1249.
- [11] DC Simes, MK Williamson, JB Ortiz-Delgado, et al. Purification of matrix Gla protein from a marine teleost fish, *Argyrosomus regius*: calcified cartilage and not bone as the primary site of MGP accumulation in fish[J]. *Bone Miner Res*, 2003, 18(2): 244-259.
- [12] 李永念, 姚加平. 老年女性骨质疏松症患者血清 BCP、CT、E2、

Ca 和 P 检测的临床意义[J]. *放射免疫学杂志*, 2013(3): 267-269.

- [13] P Morillas, J Quiles, H de Andrad. Circulating biomarkers of collagen metabolism in arterial hypertension: relevance of target organ damage[J]. *Hypertens*, 2013, 31(8): 1611-1617.
- [14] 陈小香, 谭新, 邓伟民. 骨质疏松症患者骨密度与血清 25 羟维生素 d 的相关性研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(7): 851-855.
- [15] Zhang W, Stoecklin E, Eggersdirfer M, et al. A glimpse of vitamin D status in mainland China[J]. *Nutrition*, 2013, 29(7/8): 953-957.

(收稿日期: 2018-04-30;修回日期: 2018-07-23)

(上接第 511 页)

- [8] Yates AA. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids[J]. *Journal of the American Dietetic Association*, 2002, 102(11): 1621-1630.
- [9] Francis JJ, Klitzke CJ. Dietary Reference Intakes: Cutting Through the Confusion[M]. Humana Press, 2010.
- [10] Cashman KD. Diet, nutrition, and bone health[J]. *Journal of Nutrition*, 2007, 137(11 Suppl): 2507S.
- [11] Sousa GC, Cravo M, Costa AR, et al. A comprehensive approach to evaluate nutritional status in Crohn's patients in the era of biologic therapy: a case-control study[J]. *American Journal of Gastroenterology*, 2007, 102(11): 2551-2556.

- [12] Ojuawo A, Keith L. The serum concentrations of zinc, copper and selenium in children with inflammatory bowel disease[J]. *Central African Journal of Medicine*, 2002, 48(9-10): 116-119.
- [13] Bakker SF, Dik VK, Witte BI, et al. Increase in bone mineral density in strictly treated Crohn's disease patients with concomitant calcium and vitamin D supplementation[J]. *Journal of Crohns & Colitis*, 2013, 7(5): 377-384.
- [14] Lima CA, Lyra AC, Rocha R, et al. Risk factors for osteoporosis in inflammatory bowel disease patients[J]. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 2015, 6(4): 210-218.
- [15] 贾小玥, 郑黎薇, 袁泉, 等. 肠道菌群: 绝经后骨质疏松防治新靶点[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(3): 392-401.

(收稿日期: 2018-05-24;修回日期: 2018-07-05)