

# 周期性与连续性给予羟乙膦酸钠对去势大鼠骨质疏松症治疗作用的比较

章明放 张乃鑫 谭郁彬 王晓燕 赵天如 赵秀兰

**摘要** 用不脱钙骨切片的骨组织形态计量学方法比较周期性口服、周期性腹腔注射和连续性口服羟乙膦酸钠(HEBP)对去势雌性大鼠骨质疏松的治疗作用。剂量均为每日 36mg/kg。周期为连续 5 日,停药 25 日后重复循环,共 90 日。结果表明周期性口服 HEBP 的大鼠较单纯去势大鼠的骨转换率降低,胫骨骨小梁骨量显著增加,从而可减缓骨质疏松程度;连续性口服 HEBP 的大鼠虽然骨小梁骨量也显著增加,但骨转换率不仅较单纯去势大鼠,也较正常大鼠显著降低,骨小梁质量欠佳,骨重建受损;周期性腹腔注射 HEBP 的大鼠骰板显著增厚,骨小梁类骨质显著增加,软骨基质和骨矿化均受损。此为临床应用 HEBP 防治骨质疏松提供可借鉴的资料。

**关键词** 骨质疏松 大鼠 形态计量

## The effect of intermittent cyclical and continuous treatment of etidronate disodium on experimental Osteoporosis in ovariectomized rats

Zhang Mingfang, Zhang Naixin, Tan Yubin et al.

(Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070)

**Abstract** To compare the effect of intermittent cyclical with continuous administration of etidronate disodium(HEBP), 57 female Wistar rats, weighing an average of 265g, were randomly divided into 5 groups. Group 1 was bilateral sham-ovariectomized; group 2 was bilateral ovariectomized (OVX); group 3 was OVX and then the intermittent cyclical HEBP was given orally; group 4 was OVX and then the continuous HEBP was given orally; group 5 was OVX and the intermittent cyclical HEBP was given by intraperitoneal injection. HEBP was given during fasting for 5 days followed by a rest period of 25 days and the intermittent cycles were continued for 3 and 90 days, respectively. The proximal tibial metaphyses were processed undecalcified for quantitative bone histomorphometry and histological observation.

The results are as follows. Group 3 presents more trabecular bone volume than that of group 2, and the elevated bone turnover by OVX is reduced properly indicating the scheme of group 3 could retard the degree of osteoporosis. Group 4 presents more trabecular bone volume, but its bone turnover is more lower than that of not only group 2 and 3 but also group 1, the appearance and arrangement of trabeculae are irregular, meaning the disturbance of bone remodeling. Group 5 exhibits the accumulation of cartilage matrix in epiphyseal plate resulting in abnormally thickened and the increase of osteoid in metaphyses indicating the highly inhibition of mineralization of bone.

**Key Words** Osteoporosis Rat Histomorphometry

羟乙膦酸钠(Etidronate disodium, 简称 HEBP)是一种无机焦磷酸盐衍生的二膦酸盐

化合物,其特有的 P-C-P 结构可特异地结合于矿化基质的羟磷灰石结晶中,对骨矿化、破骨细胞活性和骨吸收等骨代谢产生诸多影响。其在防治绝经后骨质疏松方面展示良好前景,但如何有效地应用有待进一步探讨<sup>[1]</sup>。我们利用切

除双侧卵巢(以下称去势)大鼠骨质疏松模型探讨相同剂量、不同给予方法对于骨形态计量参数的影响。

## 1 材料和方法

将 57 只平均体重 265g (249~278g) 的雌性近交系 Wistar 大鼠(天津市实验动物中心提供)随机分为五组: I 组, 单纯假性去势对照组; II 组, 单纯去势对照组; III 组, 去势后周期口服 HEBP 组; IV 组, 去势后连续口服 HEBP 组; V 组, 去势后周期腹腔注射 HEBP 组。HEBP 由天津药物研究院提供。II、IV 和 V 组剂量均为每日 36mg/kg。连续口服为每日灌胃一次。周期性为每日空腹给药一次, 连续 5 日后停药 25 日, 如此重复共三个周期, 共计持续 90 日。灌胃药液用蒸馏水配制, 腹腔注射药液用无菌生理盐水配制。实验期间, 各组大鼠自由摄食标准固体饲料(天津市实验动物中心提供)和饮用自来水。

各组大鼠于实验结束时经股动脉放血处死。取血清测定雌二醇水平(放免法, DPC 药盒, 美国产), 钙、磷浓度和碱性磷酸酶(AKP)活性(COBAS 自动生化分析仪, 荷兰产); 取右股骨测骨干重和骨钙、磷相对含量(mg/g 干重)<sup>[2]</sup>。

各组大鼠于处死前 8 天和 2 天分别两次腹腔注射盐酸四环素水溶液(20mg/kg 体重)行荧光标记。大鼠处死后取右股骨上端 1/3, 去除软组织和磨去前后侧部分皮质后固定于 70% 乙醇内, 经 Villanueva 染液浸染 72 小时, 逐级脱水脱脂后以甲基丙烯酸羟乙基酯包埋。用 Leitz1516 切片机制备 5 $\mu$ m 厚并行甲苯胺蓝复染和 9 $\mu$ m 厚的纵向不脱钙骨切片, 分别在普通

显微镜和荧光显微镜下, 用已报道过的形态计量方法<sup>[2]</sup>进行计量和一般组织学观察。每例胫骨切片的测定面积为 10.8mm<sup>2</sup>。形态计量参数包括: (1)骨小梁体积百分比(TBV%); (2)骨小梁表面百分比(TBS%); (3)类骨质体积占骨小梁体积百分比(TOV%); (4)骨小梁形成表面百分比(TFS%); (5)骨小梁吸收表面百分比(TRS%); (6)骨小梁平均宽度(MPT); (7)骺板平均厚度(EPT); (8)纵向骨生长率(LBGR); (9)骨小梁活性生成表面百分比(AFS%); (10)骨小梁矿化速率(MAR); (11)骨小梁骨生成率(BFR)

## 2 结果

2.1 去势的四个组大鼠体重均显著高于假性去势组( $P<0.01$ )。(表 1)

2.2 血清测定: 去势的四个组雌二醇浓度均值为 9.45pg/ml, 假去势组的均值为 41.37pg/ml, 二者的差异显著( $P<0.01$ )。各组的钙、磷浓度无显著差异。(表 1)

2.3 股骨钙、磷含量: I、IV 和 V 组大鼠的骨钙较 V 组显著减少( $P<0.01$ ), III 组较 V 组也显著减少( $P<0.05$ ), 但较 IV 组显著增加( $P<0.05$ )。各组的骨磷含量无显著差异。(表 1)

2.4 一般组织学观察: I、III 和 IV 组的干骺端骨小梁密度不同程度降低, 网络状结构不同程度减少, 以干骺端髓腔中央处明显。I 和 III 组的骺板成骨区初级骨小梁不同程度减少。IV 组的骺板成骨区初级骨小梁未见明显减少, 但排列紊乱、不规则, 干骺端骨小梁粗细不均, 表面欠光滑, 少见成骨细胞和破骨细胞被覆。V 组的骺板增厚, 骺板下和干骺端多量类骨质堆积, 骨小梁外缘多量类骨质包绕。

表 1 各组大鼠体重和血清生化测定结果( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别  | 只数 | 体重(g)        | 血钙(mg/dl)        | 血磷(mg/dl)       | 血 AKP(U/L)         | 骨钙(mg/g)           | 骨磷(mg/g)           |
|-----|----|--------------|------------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| I   | 14 | 287 $\pm$ 26 | 10.69 $\pm$ 2.08 | 4.35 $\pm$ 2.02 | 59.74 $\pm$ 28.53  | 245.00 $\pm$ 23.97 | 122.81 $\pm$ 3.96  |
| II  | 10 | 351 $\pm$ 28 | 10.46 $\pm$ 1.55 | 4.49 $\pm$ 0.72 | 132.18 $\pm$ 34.19 | 210.10 $\pm$ 11.91 | 116.26 $\pm$ 4.46  |
| III | 10 | 337 $\pm$ 21 | 10.06 $\pm$ 2.67 | 4.04 $\pm$ 1.75 | 71.51 $\pm$ 13.92  | 220.07 $\pm$ 56.47 | 121.32 $\pm$ 10.31 |
| IV  | 13 | 347 $\pm$ 21 | 11.98 $\pm$ 1.62 | 4.88 $\pm$ 1.24 | 62.37 $\pm$ 21.32  | 196.04 $\pm$ 29.91 | 131.98 $\pm$ 9.49  |
| V   | 10 | 337 $\pm$ 19 | 11.39 $\pm$ 0.97 | 4.31 $\pm$ 1.54 | 111.69 $\pm$ 34.63 | 201.61 $\pm$ 21.43 | 119.49 $\pm$ 27.16 |

**2.5 胫骨形态计量结果(表2和表3):**(1)Ⅱ组与Ⅰ组相比,TBV%、TBS%和LBGR显著减少( $P<0.01$ ),TFS%、TRS、AFS%和BFR显著增加( $P<0.01$ );(2)Ⅱ组同Ⅰ组相比,TBV%、TBS%、TFS%和LBGR显著减少( $P<0.01$ );同Ⅱ组相比,TBV%和TBS%显著增加( $P<0.05$ ),TOV%、TFS%、TRS%、AFS%和BFR显著减少( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ );(3)Ⅳ组的TBV%和TBS%较Ⅰ组显著减少( $P<0.05$ );较Ⅱ组显著增加( $P<0.01$ , $P<0.05$ ),TOV%、TFS%、TRS%、MPT、AFS%和BFR较Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ组显著减少( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ );(4)V组的TBV%、TFS%、EPT较其它四个组显著增加( $P<0.01$ ),TRS%、LBGR和AFS%极少或未检见,MAR和BFR亦无法得出。

### 3 讨论

本实验中Ⅱ组的结果表明,雌性大鼠去势后骨小梁的骨吸收增加,骨形成也增加,但骨吸收超过骨形成,使骨小梁网络结构受损,骨量减少。以往的实验多侧重次级骨小梁的改变,我们观察到骺板成骨区由于骨吸收占优势,使纵向骨生长率降低,初级骨小梁生成减少,这也是骨小梁减少的一个重要因素。

羟乙磷酸钠可抑制破骨细胞活性,减少骨吸收。应用不当会出现骨矿化障碍<sup>[3]</sup>。依据骨重

建学说,骨形成有赖于破骨细胞的作用,如果破骨细胞活性长期受抑制,必然会影响随之的骨形成,导致骨重建受损。上述不利作用的出现和剂量和给药方法密切相关。本实验所用剂量依据人试用剂量(400mg/日)<sup>[4]</sup>按体表面积折算得出。HEBP的药代动力学研究表明,口服吸收率为1%~10%,其中的20%~50%定位于骨组织,其余的经尿排出<sup>[5]</sup>。注射给药的吸收量是口服的几十倍。本实验V组的结果证实,尽管采用周期性给药,腹腔注射大量吸收后也导致软骨基质堆积,骺板显著增厚,干骺端骨小梁的类骨质显著增加,骨动力学指征如LBGR和AFS%未呈现,表明该剂量腹腔注射后对骨矿化的高度抑制<sup>[6]</sup>。

本实验Ⅲ组的大鼠采用周期口服,旨在避免体内高浓度药物对骨矿化和破骨细胞长期受抑制对骨形成和骨重建的影响。结果表明,尽管其骨小梁骨量较假切对照组显著减少,但较Ⅱ组大鼠显著增加,TFS%、TRS%、AFS%和BFR较Ⅱ组也显著减少,亦无矿化障碍,说明破骨细胞活化频率减少,增加的骨转换率降低,从而可减少骨丢失,减轻骨质疏松的程度。

连续口服HEBP的Ⅳ组大鼠尽管其骨小梁骨量较Ⅱ组显著增加,较Ⅲ组也增加,但其TOV%、TFS%、TRS%、MPT、AFS%和BFR较Ⅲ组和Ⅰ组显著减少。同时,初级和次级骨小

表2 各组大鼠胫骨形态计量结果( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别 | TBV(%)           | TBS(%)           | TOV(%)           | TFS(%)           | TRS(%)          | MPT( $\mu$ m)     |
|----|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-------------------|
| I  | 24.87 $\pm$ 4.02 | 39.53 $\pm$ 5.38 | 0.93 $\pm$ 0.27  | 7.85 $\pm$ 3.31  | 1.06 $\pm$ 0.30 | 72.84 $\pm$ 3.11  |
| Ⅰ  | 8.81 $\pm$ 2.06  | 19.36 $\pm$ 4.26 | 1.15 $\pm$ 0.11  | 15.26 $\pm$ 3.28 | 2.70 $\pm$ 0.48 | 62.51 $\pm$ 4.54  |
| Ⅱ  | 17.06 $\pm$ 2.71 | 26.66 $\pm$ 7.19 | 0.60 $\pm$ 0.14  | 3.26 $\pm$ 2.01  | 1.07 $\pm$ 0.94 | 65.39 $\pm$ 4.72  |
| Ⅳ  | 20.85 $\pm$ 3.23 | 32.14 $\pm$ 5.11 | 0.18 $\pm$ 0.03  | 1.43 $\pm$ 1.02  | 0.32 $\pm$ 0.11 | 49.83 $\pm$ 23.40 |
| V  | 45.90 $\pm$ 4.72 | 31.34 $\pm$ 6.32 | 47.50 $\pm$ 3.86 | 59.07 $\pm$ 6.28 | 极少              | 69.20 $\pm$ 11.23 |

表3 各组大鼠胫骨形态计量结果( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别 | EPT(mm)         | LBGR( $\mu$ m/天) | AFS(%)           | MAR( $\mu$ m/天) | BFR( $\mu$ m/ $\mu$ m/天) |
|----|-----------------|------------------|------------------|-----------------|--------------------------|
| I  | 0.14 $\pm$ 0.01 | 12.90 $\pm$ 3.98 | 7.93 $\pm$ 2.57  | 1.59 $\pm$ 0.16 | 0.13 $\pm$ 0.04          |
| Ⅰ  | 0.13 $\pm$ 0.02 | 7.56 $\pm$ 1.56  | 14.32 $\pm$ 6.23 | 1.91 $\pm$ 0.31 | 0.27 $\pm$ 0.14          |
| Ⅱ  | 0.15 $\pm$ 0.01 | 6.90 $\pm$ 1.71  | 7.23 $\pm$ 3.92  | 1.13 $\pm$ 0.16 | 0.08 $\pm$ 0.01          |
| Ⅳ  | 0.17 $\pm$ 0.03 | 8.52 $\pm$ 2.52  | 2.74 $\pm$ 0.23  | 1.15 $\pm$ 0.21 | 0.03 $\pm$ 0.01          |
| V  | 0.56 $\pm$ 0.52 | 未检出              | 未检出              | —               | —                        |

梁结构紊乱,排列不规则,小梁粗细不匀,表面粗糙。说明药物对破骨细胞的长期抑制使骨重建失去平衡,形成的骨小梁质量欠佳,骨小梁生物力学特性受损。此提示我们对于破骨细胞作用的抑制在程度上和时间上要掌握好限度,以利于有效地减缓骨质疏松的程度而不影响正常的骨代谢。

### 参考文献

- 1 Papapoulos SE, Landman JO, Bijvoet OLM, et al. The use of bisphosphonate in the treatment of osteoporosis. *Bone*, 1992, 13: S41.
- 2 章明放, 张乃鑫, 谭郁彬. 运动对雌性大鼠去势后骨质疏松症的作用. *中华骨科杂志*, 1994, 14: 365.
- 3 Heaney RP, Saville PO. Etidronate disodium in postmenopausal osteoporosis. *Clin Pharmacol Thera*, 1976, 20: 593.
- 4 Watts NB, Harris ST, Genant HG, et al. Intermittent cyclical etidronate treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*, 1990, 323: 73.
- 5 Michael WR, King WR, Wakim JM. Metabolism of disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (disodium etidronate) in the rat, rabbit, dog and monkey. *Toxic Appl pharmacol*, 1972, 21: 503.
- 6 Steiniche T, Hasling C, Charles P, et al. The effects of etidronate on trabecular bone remodeling in postmenopausal spinal osteoporosis; a randomized study comparing intermittent treatment and an ADFR regime. *Bone*, 1991, 12: 155.