DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.040
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
1214 2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)10-1214-03

胰淀素治疗糖皮质激素性骨质疏松大鼠的实验研究

孟 萍[1],陆邦超[1],张忠辉[2],黄 妹[1],乔 飞[3] ([1]第三军医大学附属西南医院内分泌科,重庆 400038;[2]卫生部北京医院,北京 100730;[3]解放军第81医院内科,南京 210002)

提 要:目的 探讨胰淀素对糖皮质激素性骨质疏松的治疗作用。方法 采用3月龄Wistar大鼠地塞米松肌注法建立糖皮质激素性骨质疏松症动物模型,随机分为4组:正常对照组、地塞米松组、胰淀素治疗组、维生素D组。12 h后行骨密度、骨生物力学及血、尿生化检查。结果 ①骨密度:与地塞米松组相比,胰淀素治疗组腰椎骨密度增加35%,股骨骨密度增加17%,其效果优于维生素D。②骨力学:胰淀素能显著提高类固醇大鼠股骨的生物力学性能。③生化指标:胰淀素治疗组骨钙素明显升高,同时尿羟脯氨酸/肌酐、尿钙/肌酐、尿磷/肌酐均普遍降低。结论 胰淀素可以有效地阻止糖皮质激素性骨质疏松大鼠的骨量丢失,不仅可以促进骨形成,同时还具有抑制骨吸收的作用。

关键词:胰淀素;糖皮质激素性骨质疏松;骨密度;生物力学
中图法分类号:R681.05;R977.11 文献标识码:A

Experimental study on therapeutic effects of amylin on glucocorticoid induced osteoporosis in rats

MENG Ping, LU Bang-chao, ZHANG Zhong-hui, HUANG Shu, QIAO Fei (Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract **Objective** To study the therapeutic effects of amylin (AMY) on glucocorticoid induced osteoporosis in rats. **Methods** Four groups of female Wistar rats (3 months old) were treated for 12 weeks as follows: normal control, dexamethasone (DXM), DXM+AMY, and DXM+Vitamin D3 groups. By intramuscular injection of DXM at 1 mg/kg twice a week during the first 8 weeks, the animal model of glucocorticoid induced osteopoprosis was made. After 12 weeks, bone mineral density (BMD) of the lumbar vertebrae and the femur were measured with DEXA. Bone biomechanics and bone markers in serum and urine were also determined. **Results** BMD was significantly increased by 35% in the lumbar spine and by 17% in the femur in AMY group than in DXM group, and that of the lumbar vertebrae in DXM+VitD was also obvious higher than in DXM rats, but no difference was seen in BMD of the femur between these 2 groups. Compared with DXM group, the biomechanical properties were markedly increased in DXM+AMY group. The highest plasma osteocalcin concentration was measured in DEX+AMY rats. Simultaneously, urinary HOP/Cr, uCa/Cr and uP/Cr were lower in DXM+AMY than in DXM rats. **Conclusion** These results indicate that AMY treatment inhibits bone loss both by inhibiting resorption and stimulating osteoblastic activity in GIO rats.

Key words: amylin; glucocorticoid induced osteoporosis; bone mineral density; biomechanics

糖皮质激素已广泛用于临床,而长期使用类固醇激素造成的骨质疏松,成为继发性骨质疏松症最主要的病因[1,2]。临床这类患者骨代谢主要表现为低骨形成和高骨吸收状态[2,3]。目前治疗手段有限,主要是采用钙剂和维生素D制剂,但疗效不太理想。因此,如何治疗糖皮质激素性骨质疏松症(Glucocorticoid-induced osteoporosis, GIO)已成为临床亟待解决的课题。

胰淀素(Amylin),是由胰岛β细胞分泌的一种肽类激素。既往细胞培养和动物实验,均揭示胰淀素具有有强大的促成骨细胞增生作用和降钙素样骨吸收抑制作用[4-7]。但胰淀素是否对GIO有治疗作用,尚有待研究。本实验采用大鼠地塞米松肌注法建立糖皮质激素性骨质疏松动物模型,分别从骨密度、骨力学、骨生化等观察了胰淀素对其骨量丢失的治疗效果,以期为糖皮质激素性骨质疏松症的治疗提供新的思路和途径。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

地塞米松磷酸钠注射液[鄂卫药准字(1991)第000139号],湖北襄樊恒生药业有限公司生产。维生素D_3注射液[沪卫药准字(1995)第009010号],上海第九制药厂生产。Amylin试剂由美国Sigma公司提供。血清骨钙素放免试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放免所。羟脯氨酸测试盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验动物及分组

3月龄雌性Wistar大鼠32只,体重150 g左右,由第三军医大学实验动物中心提供。随机分为4组:(1)正常对照组(NC);(2)地塞米松组(DXM);(3)胰淀素治疗组(DXM+AMY);(4)维生素D治疗组(DXM+VitD),每组8只。实验共12周。前8周:DXM、DXM+AMY、DXM+VitD组大鼠分别予地塞米松0.1 mg/100 g皮下注射每日1次;DXM+VitD组予维生素D_3 6 000

作者简介:孟 萍(1962-),女,四川省隆昌市人,硕士,主任医师,教授,主要从事胰淀素治疗糖皮质激素性骨质疏松大鼠的实验方面的研究。电话:(023) 68754138

收稿日期:2002-05-08;修回日期:2002-07-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

U/100 g 肌肉注射每两周 1 次; NC 组和 DXM 组不给药。所有动物在同等条件下饲养, 自由摄食(饲料由第三军医大学实验动物中心提供)和饮水, 每周称体重 1 次。实验结束后, 四组大鼠统一处死取材。

1.3　标本制备

实验 12 h 后, 4 组大鼠统一处死。处死前 1 d 置于代谢笼中收集 24 h 尿液, -10℃保存待测。1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 3 ml/kg, 大鼠活体先行双能 X 线吸收法(DEXA)腰及股骨骨密度测定后, 再打开胸腔, 注射器穿右心室抽血 5~6 ml, 2 500 r/min 离心, 分离出血清后置-40℃保存, 待行各项生化检查。

1.4　生化指标测定

血清钙(Ca)、磷(P); 尿钙、磷; 尿肌酐(Cr)均采用 BECKMAN 自动生化分析仪测定。血清骨钙素(BGP)、尿羟脯氨酸(HOP)测定, 具体参照试剂盒说明。

1.5　骨密度(BMD)测定

处死前, 给予大鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠麻醉 3 ml/kg, 当大鼠呈稳定的昏睡状态达 5 min 以上时, 置于 CHALLENGER 双能 X 线骨密度仪的探头下, 应用动物软件进行腰椎和股骨, 测定骨密度值。

1.6　生物力学实验(股骨三点抗弯实验)

做生物力学实验测试前取出冰箱中冻存的大鼠股骨, 室温下复温。首先用游标卡尺测量股骨的长度、股骨中段的直径, 然后将股骨置于 INSTRON 1011 型万能材料试验机的特制支架上(跨距= 17 mm), 以 2 mm/min 的速度下压于股骨中段, 直到股骨断裂为止。计算机自动打印输出测定结果。

1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 百分率(%)用($\bar{x}_2-\bar{x}\ \sqrt{k_1}$)× 100%公式计算。采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　大鼠体重的变化

各组大鼠实验结束时体重均增加。DXM 组体重较 C 组显著下降($P<0.05$), 其它各组之间无统计学差异, 见表 1。

表 1　各组大鼠体重变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of body weight in every group($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Body weight at the beginning of experiment(g)	Body weight at the end of experiment (g)
Normal control	8	150.0±10.7	260.0±40.0
DXM	8	155.0±9.3	237.5±40.0 *
DXM+AMY	8	155.0±9.3	255.0±40.7
DXM+Vitd	8	153.8±9.2	248.8±46.1

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* Normal control;　#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* DXM

2.2　大鼠骨密度的测定

与 NC 组相比, DXM 组腰椎、股骨骨密度均显著下降($P<0.01$, $P<0.05$)。Amylin 治疗后腰椎、股骨骨密度均显著性升高($P<0.01$)。腰椎骨密度增加 35%, 股骨骨密度增加 17%, 与 NC 组的骨密度无显著相异。维生素 D 治疗后腰椎骨密度明显升高($P<0.05$), 见表 2。腰椎骨密度增加 17%, 而股骨骨密度则无显著性差异。

表 2　各组大鼠腰椎(L)和股骨(F)骨密度测定结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Bone mineral density of the lumbar vertebrae and the femur in every group($\bar{x}\pm s$)

Group	n	L-BMD(g/cm²)	F-BMD(g/cm²)
Normal control	8	0.280±0.052	0.207±0.026
DXM	8	0.191±0.026 **	0.166±0.023 *
DXM+AMY	8	0.258±0.028 ##	0.194±0.018 ##
DXM+VitD	8	0.028±0.036 *#	0.189±0.037

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* Normal control;　#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* DXM

2.3　大鼠生化指标的测定

与 NC 组相比, DXM 组血骨钙素水平明显下降($P<0.05$), 尿钙/肌酐、尿磷/肌酐、尿羟脯氨酸值均显著升高($P<0.01$)。Amylin 治疗后尿钙/肌酐、尿磷/肌酐、尿羟脯氨酸值均显著下降($P<0.01$), 血骨钙素升高($P<0.05$), 血钙、血磷无显著改变。维生素 D 治疗后血钙、血磷、血骨钙素升高, 尿羟脯氨酸水平略下降, 但无显著差异。尿钙/肌酐、尿磷/肌酐则显著性降低($P<0.01$), 见表 3。

表 3　各组大鼠血清及 24 h 尿生化结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Biochemical markers in the serum and 24-hour urine in every group($\bar{x}\pm s$)

Group	n	sCa(mmol/L)	sP(mmol/L)	BGP(μg/L)	uCa/Cr	uP/Cr	uHOP/Cr(g/mol)
NC	8	2.22±0.32	2.36±0.32	1.30±0.35	0.17±0.13	0.33±0.26	9.51±2.78
DXM	8	2.16±0.17	2.05±0.40	0.90±0.29 *	1.50±0.22 **	2.31±0.45 **	15.78±3.17 **
DXM+AMY	8	2.12±0.73	2.15±0.38	1.20±0.45 #	0.241±0.13 ##	0.41±0.38 ##	11.26±5.49 #
DXM+VitD	8	2.24±0.51	2.45±0.30	1.15±0.36	0.12±0.03 ##	0.21±0.08 ##	12.87±5.64

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* Normal control;　#: $P<0.05$,　##: $P<0.01$ *vs* DXM

2.4　骨生物力学指标

与 NC 组相比: DXM 组直径、最大负荷、面积矩、抗弯截面模量均显著性下降($P<0.01$), 长度、最大挠度、最大应变、最大应力也出现下降, 但无显著差异。DXM+VitD 组各参数虽然表现出上升趋势, 但无显著性差异, 见表 4。

表 4　各组大鼠股骨三点弯曲试验力学参数结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Biomechanical parameters of fermoral 3-point bending test in every group ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Diameter(mm)	Length(mm)	Displacement(mm)	Peak load (N)	JZ(mm⁴)	Wz(mm³)	Max-strain	Max-stress (MPa)
NC	8	3.76±0.16	33.74±1.61	0.94±0.34	78.9±15.7	9.88±1.68	5.23±0.68	0.07±0.029	64.1±10.5
DXM	8	3.36±0.20 **	33.34±3.30	0.92±0.12	55.5±10.6 **	6.36±1.52 **	3.75±0.67 **	0.06±0.01	62.9±4.5
AMY	8	3.66±0.25 #	33.60±0.99	0.93±0.15	68.1±7.6 ##	8.89±2.50 #	4.85±1.01 #	0.07±0.014	60.8±6.6
VitD	8	3.48±0.46	32.75±2.52	0.93±0.12	63.4±14.1	7.74±2.96 *	4.30±1.36	0.07±0.012	68.8±24.1

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* Normal control;　#: $P<0.05$,　##: $P<0.01$ *vs* DXM

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

骨质疏松症是以骨量减少为特征、骨组织显微结构改变、骨折危险频度增加的一种系统性骨骼疾病。糖皮质激素可抑制骨基质蛋白合成，尤其抑制胶原合成以及抑制成骨细胞前身向成骨细胞的转变，使骨形成减少。此外，还可通过减少性激素的分泌、抑制肠道对钙的吸收、增加肾对钙与磷的排泄、继发甲状旁腺功能亢进等因素，进一步增加骨的吸收，减少骨形成。在总体上使成骨作用减弱，破骨作用加强，导致骨质疏松[8]。

本实验观察了胰淀素治疗肾上腺皮质激素性骨质疏松症大鼠骨代谢指标的变化。结果显示，应用胰淀素30 μg/kg 30 d后，大鼠腰椎和股骨骨密度较地塞米松组明显升高($P<0.01$)，腰椎骨密度增加35%，股骨骨密度增加17%，与正常对照组的骨密度无显著差别。维生素D治疗后仅增加了腰椎骨密度($P<0.05$)，腰椎骨密度增加17%，股骨骨密度的升高无统计学意义。说明胰淀素能有效地增加GIO大鼠的骨量，其效果优于维生素D。

大鼠生物力学变化：开展骨生物力学实验的研究，不但有助于对骨质量进行直接的评价，而且也是评定各种对抗骨丢失措施的最佳方法之一。本实验采用常用的股骨三点抗弯实验，提示胰淀素能显著提高GIO大鼠股骨的结构力学性能(最大负荷 $P<0.01$)，而对其材料力学性能无影响(最大应力无显著差异)。结构力学性能的提高主要是由于骨面积矩、截面惯性矩增加所致。Ferreti等[9]研究也提出骨截面惯性矩是影响骨力学性能的首要因素，它与骨结构力学呈正相关而与材料力学呈负相关。许多研究提示：骨的几何特性对骨结构力学的贡献有时大于骨的材料特性[10]。本实验结论与这些观点一致：胰淀素正是通过改变骨的几何特性来增加股骨整骨的力学性能的。

大鼠生化指标变化：骨代谢或骨转换的过程是成骨细胞形成新骨和破骨细胞吸收旧骨的过程，骨量多少取决于同一骨重建单位中骨形成与骨吸收的平衡。与骨形成有关的代谢指标有：骨钙素、骨碱性磷酸酶等，与骨吸收有关指标有尿羟脯氨酸、尿吡啶酚等[11]。本实验生化指标结果：胰淀素治疗组骨钙素明显升高，同时尿羟脯氨酸、尿钙/肌酐、尿磷/肌酐均普遍降低($P<0.05$)，说明胰淀素能够促进骨形成、抑制骨吸收，同时减少了地塞米松造成的肾脏对钙、磷的大量排出。维生素D抑制骨吸收作用不明显，表现为尿羟脯氨酸与模型组处于同一水平，但降低尿钙、磷排泄的作用强于胰淀素。各组血钙、磷无显著性差异，推测虽然各组大鼠尿钙、磷差异甚大，但机体有自身的调控机制，维持体内血浆钙、磷水平保持稳定。

综上所述，胰淀素治疗后可以增加GIO大鼠骨密度，不同程度恢复骨小梁三维结构，骨的生物力学性能大大提高，其治疗效果优于维生素D。生化检查提示胰淀素不仅可以促进骨形成，同时还具有抑制骨吸收的作用。纵观目前骨质疏松治疗药物，骨量的增加主要是通过抑制骨吸收作用实现的。刺激骨形成的药物很少，两种作用都具备的药物则没有。相信，胰淀素在骨质疏松症的治疗领域有着广阔的前景，尤其是对糖皮质激素性骨质疏松症的治疗。

参考文献：

[1] Weinstein R S, Jilka R L, Parfitt A M, *et al*. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone[J]. J Clin Invest, 1998, 102(2): 274-282.

[2] Clowes J A, Peel N, Eastell R. Glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2001, 13(4): 326-332.

[3] Manelli F, Giustina A. Glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. Trends Endocrinol Metab, 2000, 11(3): 79-85.

[4] Cornish J, Callon K E, Cooper G J, *et al*. Amylin stimulates osteoblast proliferation and increases mineralized bone volume in adult mice[J]. Biochem Biophys Res commun, 1995, 207(1): 133-139.

[5] Cornish J, Callon K E, King A R, *et al*. Systemic administration of amylin increases bone mass, linear growth, and adiposity in adult male mice[J]. Am J Physiol, 1998, 275(4 Pt1): 694-699.

[6] Horcajada Molteni M N, Davicco M J, Lebecque P, *et al*. Amylin inhibits ovariectomy induced bone loss in rats[J]. J Endocrinol, 2000, 165(3): 663-668.

[7] Horcajada-Molteni M N, chanteranne B, Lebecque P, *et al*. Amylin and bone metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. J Bone miner Res, 2001, 16(5): 958-965.

[8] Patschan D, Loddenkemper K, Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. Bone, 2001, 29(6): 498-505.

[9] Ferretfi J C, Capozza R F. Interrelationships between densitometric, geometric and mechnical properties of rat femora: inferences concerning mechanical regulation of bone modeling[J]. J Bone Miner Res, 1993, 8(11): 1 389-1 396.

[10] Rubin C T. Skeletal strain and the functional significance of bone architecture[J]. Calcif Tissue int, 1984, 36(Suppl 1): 11-18.

[11] 孟迅吾. 全方位地关注原发性骨质疏松症的研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2000, 16(4): 201-202.

(编辑 张 宁)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net