

骨生长肽羧基端5肽衍生物H13D联合阿仑膦酸钠对去卵巢模型大鼠骨代谢的影响

陈玲*, 蔡旺(辽宁医学院附属第一医院, 辽宁锦州 121000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)17-1563-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.17.10

摘要 目的:探讨骨生长肽羧基端5肽衍生物H13D联合阿仑膦酸钠(Alen)对去卵巢模型大鼠骨代谢的影响。方法:将大鼠随机分为假手术组、模型组、H13D(10 nmol/100 g)组、Alen(10 μg/100 g)组及其联用组,每组8只,皮下注射相应药物,12周后检测各组大鼠腰椎骨(L1~L4)和股骨的骨密度(BMD)、血清生化指标[Ca、P、碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(BGP)]、骨形态学变化。结果:各组大鼠血清中Ca、P水平比较均无明显变化。与假手术组比较,其余各组大鼠ALP、BGP水平均升高,仅模型组和联用组有统计学差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,其余各组大鼠ALP、BGP水平均降低,仅H13D组和Alen组有统计学差异($P<0.05$);骨密度和骨形态学比较表明,联用组优于假手术组($P<0.05$),假手术组优于Alen组($P<0.05$),Alen组优于H13D组,H13D组优于模型组($P<0.05$)。结论:H13D联合Alen治疗可明显增加去卵巢模型大鼠骨密度,改善骨微结构,具有明显的协同作用。

关键词 骨质疏松症;大鼠;骨生长肽羧基端5肽衍生物H13D;阿仑膦酸钠;骨密度;骨形态学;骨代谢

Effects of Osteogenic Growth Peptide C-terminal Pentapeptide Derivatives H13D Combined with Alendronate on Bone Metabolism in Ovariectomized Rats

CHEN Ling, CAI Wang (The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Liaoning Jinzhou 121000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the effect of osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide derivatives H13D combined with alendronate (Alen) on bone metabolism in ovariectomized (OVX) rats. METHODS: SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, H13D (10 nmol/100 g) group, Alen (10 μg/100 g) group and drug combination group with 8 rats in each group. They were given relevant medicine subcutaneously. 12 weeks later, BMD, serum biochemical indicator (Ca, P, ALP, BGP) and bone morphological changes of lumbar spinal segment (L1~L4) and femur were measured. RESULTS: The levels of Ca and P in serum of rats had no significant change. Compared with sham operation group, the levels of ALP and BGP increased in other groups, and there was statistical difference in model group and drug combination group ($P<0.05$ or $P<0.01$); compared with model group, the levels of ALP and BGP decreased in other groups, and there was statistical difference in H13D group and Alen group ($P<0.05$). BMD and bone morphology showed drug combination group was better than sham operation group ($P<0.05$); sham operation group was better than Alen group ($P<0.05$); Alen group was better than H13D group; H13D group was better than model group ($P<0.05$). CONCLUSIONS: H13D combined with Alen can significantly increase BMD of OVX rats, improve the micro-structure of the bone, which have obvious synergies.

KEY WORDS Osteoporosis; Rats; Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide derivatives H13D; Alendronate; BMD; Bone morphology; Bone metabolism

- 2003, 38(3):161.
- [18] 李国英, 买尔丹·马合木提, 古丽仙·胡加. 新疆紫草提取物脂质体制备工艺的初步筛选[J]. 中国药房, 2010, 21(15):1376.
- [19] Banakar UV. Advances and opportunities in delivery of therapeutic proteins and peptides[J]. *J Biomater*, 1997, 11(4):377.
- [20] Chen L, Wu CL, Chen DH. Pyrene fluorescence study on flocculation mechanism of chitosan[J]. *Environ Prot Sci*, 2002, 28(114):34.
- [21] Heriksen I, Våagen SR, Sande SA, et al. Interactions between liposomes and chitosan II: effect of selected parameters on aggregation and leakage[J]. *Int J Pharm*, 1997, 146(2):193.
- [22] Lal B, Gangopadhyay AK, Gidwani RM, et al. Interaction between a novel amphiphilic polymer and liposomes[J]. *Supermol Sci*, 1989, 5(5):777.
- [23] Vasavada AR, Cherian M, Yadav S, et al. Lens epithelial cell density and histomorphological study in cataractous lenses[J]. *J Cataract Refract Surg*, 1991, 17(6):798.
- [24] 李立梅. 过氧化氢酶基因抑制活性氧诱导晶体上皮细胞凋亡的实验研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2004:16.
- [25] Afanasev VN, Korol BA, Mantsygin YA, et al. Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death[J]. *FEBS Lett*, 1986, 194(2):347.
- [26] Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry[J]. *Cytometry*, 1992, 13(8):795.

* 主治医师。研究方向:骨代谢。电话:0416-4197451。E-mail: clryq1998@yahoo.com.cn

(收稿日期:2012-05-16 修回日期:2012-11-06)

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)的预防药物主要有2种:骨吸收抑制剂和骨形成促进剂。目前临床治疗OP大部分为骨吸收抑制剂^[1]。阿仑膦酸钠(Alen)属骨吸收抑制剂,可抑制骨吸收、增加骨密度(Bone mineral density, BMD)、降低骨折发生率^[2]。骨生长肽(Bone growth peptide, OGP)羧基端5肽衍生物H13D是对OGP(10~14)分子内位点进行结构改造而获得的衍生物,具有促进骨形成作用。体内外实验证实,H13D可加快骨重建频率、促进骨形成,进而维持去卵巢模型大鼠的骨密度^[3],是一个极具临床应用前景的抗OP治疗药物。H13D和Alen联合应用如果能够避免后者抑制骨形成的不良效应、增加OP大鼠骨密度、改善骨形态,那么就找到一个治疗OP的新方法。所以本实验对H13D联合Alen对去卵巢模型大鼠骨代谢的影响进行了研究,以期寻找治疗OP的新方法提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Prodigy型Dexa骨密度仪(美国Lunar公司);SN-682型放射免疫 γ 计数器(上海核福光电仪器有限公司);全自动图像分析仪(德国Kontron公司);荧光显微镜(日本Olympus公司);硬质骨切片机(德国Polycut公司)。

1.2 药品与试剂

H13D原料药(由中国医学科学院药物研究所王德心教授提供,纯度:99%);Alen原料药(陕西汉江万全公司,批号:121268-17-5,纯度:99%);骨钙素(BGP)放射免疫分析试剂盒(北京原子高科股份有限公司)。

1.3 动物

SD大鼠40只,♀,3月龄,体质量(226±26)g,购自中国医学科学院放射医学研究所,SPF级,合格证号:SCXK(津)2005-0001。

2 方法

2.1 分组、建模与给药

将40只大鼠用腹腔注射水合氯醛(0.3 ml/100 g)麻醉,32只行双侧卵巢切除术,另8只将卵巢取出后再送回,为假手术组。卵巢切除术后大鼠按体质量分层随机分为模型组、H13D(10 nmol/100 g)^[4]组、Alen(10 μ g/100 g)^[5-6]组及其联用组,每组8只,除模型组和假手术组大鼠每日皮下注射等体积的磷酸盐缓冲液(PBS)外,其余大鼠皮下注射相应药物。所有大鼠饲养于不锈钢金属笼内,室温(24±2)℃,自由摄入标准骨头饲料和自来水,给药12周。

2.2 标本的收集与处理

末次给药后各组大鼠称质量后股动脉放血处死,取血清分离血清,-20℃保存;分离双侧胫骨,70%乙醇固定,制作成不脱钙骨切片;左侧股骨和腰椎骨(L1~L4)生理盐水浸透纱布包裹,-20℃保存,用作骨密度的测定。

2.3 指标测定

2.3.1 骨密度。将各组大鼠左侧股骨和腰椎骨(L1~L4)沿长轴放置于骨密度仪的小动物平台上,采用双能X线骨密度仪小动物软件测定各组大鼠给药后离体左侧股骨全段及腰椎骨(L1~L4)的骨密度,扫描速度为8 mm/s。

2.3.2 血清生化指标。在Vitalab-micro半自动生化分析仪上连续监测各组大鼠给药后血清中Ca、P、碱性磷酸酶(ALP)水

平。采用BGP放射免疫分析试剂盒和SN-682型放射免疫 γ 计数器监测各组大鼠给药后血清中BGP活性。

2.3.3 骨形态。取各组大鼠给药后左胫骨上段,用水砂纸纵向磨平至厚度为2 mm(暴露骨髓腔),70%乙醇洗净。1%Vil-laneuva染色,再洗净乙醇,梯度脱水脱脂。过氧化苯甲酰5 g、甲基丙烯酸甲酯350 ml、甲基丙烯酸丁酯150 ml、聚甲基丙烯酸甲酯150 g混合后制成包埋剂包埋,用硬质骨切片机将标本沿纵向切成20 μ m厚,光学树脂胶封片,置于光学显微镜,用Kontron Ibas 2.0全自动图像处理系统测量自骺板线远端1~3 mm范围内骨形态。主要参数:BV/TV:单位体积骨量(%),Tb.Th:平均骨小梁厚度(μ m),Tb.Sp:平均骨小梁间距(μ m),Tb.N:平均骨小梁接点数(个/视野)。

2.4 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.5统计软件进行处理。组间比较采用方差分析法,多组间两两比较在方差齐时用最小显著差法(Least significant difference, LSD),方差不齐时采用Dunnett's *t*检验。统计学显著性水准 $\alpha=0.05$,双侧检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 骨密度比较

大鼠左侧股骨和腰椎骨的骨密度:模型组<H13D组<假手术组<Alen组<联用组。其中联用组大鼠左侧股骨和腰椎骨的骨密度最高,与其余各组比较均有统计学差异($P<0.01$);Alen组大鼠左侧股骨的骨密度明显高于H13D组($P<0.01$);模型组大鼠左侧股骨和腰椎骨的骨密度最低。各组大鼠腰椎骨和左侧股骨的骨密度比较见表1。

表1 各组大鼠腰椎骨和左侧股骨的骨密度比较($\bar{x} \pm s, n=8$)
Tab 1 Comparison of BMD of lumbar spinal segment and the left femur in rats of each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	腰椎骨骨密度, g/cm ²	左侧股骨骨密度, g/cm ²
联用组	0.177 1±0.010 6 ^{▲▲*}	0.187 6±0.007 9 ^{▲▲*}
H13D组	0.156 8±0.074 4	0.160 6±0.006 7*
Alen组	0.165 3±0.068 4 [▲]	0.172 1±0.007 4 [▲]
模型组	0.149 6±0.009 8 [▽]	0.154 0±0.012 5
假手术组	0.160 9±0.008 4	0.162 8±0.008 9

与假手术组比较:▽ $P<0.05$,▼ $P<0.01$;与模型组比较:▲ $P<0.01$;与Alen组比较:* $P<0.01$;与H13D组比较:◆ $P<0.01$

vs. sham operation group:▽ $P<0.05$,▼ $P<0.01$; vs. model group:▲ $P<0.01$; vs. Alen group:* $P<0.01$; vs. H13D group:◆ $P<0.01$

3.2 血清生化指标比较

各组大鼠血清中Ca、P水平均无明显变化。与假手术组比较,其余各组大鼠ALP、BGP水平均升高,仅模型组和联用组ALP有统计学差异,4组大鼠BGP均有统计学差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,其余各组大鼠ALP、BGP水平均降低,仅H13D组和Alen组大鼠ALP有统计学差异,H13D组大鼠BGP有统计学差异($P<0.05$)。ALP和BGP是血清骨形成标志,BGP更是直接反映骨生长和骨再建的特异性生化指标^[7]。本实验模型组大鼠雌激素缺乏,骨转换增强^[8],骨吸收大于骨生长,ALP、BGP水平增加。与模型组比较,H13D组、Alen组和联用组大鼠ALP、BGP水平明显下降,说明模型大鼠给药后,使过度加速的骨转换减慢,有利于骨重建。各组大鼠Ca、P、ALP和BGP水平的比较见表2。

表2 各组大鼠Ca、P、ALP和BGP水平的比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Comparison of Ca, P, ALP and BGP levels in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	Ca, mol/g	P, mol/L	ALP, U/L	BGP, ng/ml
联用组	4.92 ± 0.77	2.11 ± 0.42	132.25 ± 27.95 [▽]	4.97 ± 1.24 [▼]
H13D组	6.13 ± 1.04	2.38 ± 0.37	122.25 ± 46.98 [△]	3.90 ± 1.36 [▲]
Alen组	6.02 ± 1.60	2.33 ± 0.24	124.56 ± 37.85 [△]	4.75 ± 1.31 [▽]
模型组	6.05 ± 1.73	2.48 ± 0.48	165.00 ± 57.24 [▼]	5.55 ± 1.43 [▼]
假手术组	5.68 ± 1.73	2.38 ± 0.49	91.38 ± 24.76	2.58 ± 0.73

与假手术组比较: [▽] $P < 0.05$, [▼] $P < 0.01$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$, [▲] $P < 0.01$

vs. sham operation group: [▽] $P < 0.05$, [▼] $P < 0.01$; vs. model group: [△] $P < 0.05$, [▲] $P < 0.01$

3.3 骨形态学比较

与假手术组比较,模型组大鼠BV/TV、Tb.Th、Tb.N减少,Tb.Sp明显增加($P < 0.05$),表明骨小梁骨量下降、骨小梁变薄、连接性降低,骨切片可见骨小梁游离端增多。联用组大鼠的骨形态指标均优于假手术组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,Alen组、H13D组、联用组大鼠的BV/TV、Tb.Th、Tb.N均增加,Tb.Sp减少,表明骨小梁骨量增加、骨小梁增厚、连接性好,骨切片可见骨小梁游离端减少,其中联用组差异有统计学意义($P < 0.01$)。与Alen组比较,联用组大鼠的BV/TV($P < 0.05$)、Tb.Th、Tb.N($P < 0.01$)均增加,Tb.Sp明显减少($P < 0.01$);与H13D组比较,联用组大鼠的BV/TV($P < 0.05$)、Tb.Th、Tb.N($P < 0.01$)均增加,Tb.Sp减少。各组大鼠骨形态学参数的比较见表3。

表3 各组大鼠骨形态学参数的比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 3 Comparison of bone measurement morphological parameters of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	BV/TV, %	Tb.Th, μm	Tb.Sp, μm	Tb.N, 个/视野
联用组	35.450 ± 12.889 ^{▲*◇}	203.495 ± 41.937 ^{▼**}	369.317 ± 73.052 ^{▲**}	1.865 ± 0.225 ^{▼**}
H13D组	25.747 ± 8.268	136.160 ± 12.303	438.234 ± 89.064 [▲]	1.770 ± 0.294 ^{▼▲}
Alen组	24.242 ± 6.126	166.520 ± 50.128	483.408 ± 97.622 [▲]	1.600 ± 0.147 [△]
模型组	17.881 ± 5.743	126.835 ± 43.517	586.533 ± 47.404 [▽]	1.352 ± 0.168
假手术组	26.007 ± 7.053	150.143 ± 41.894	499.213 ± 59.615	1.497 ± 0.112

与假手术组比较: [▽] $P < 0.05$, [▼] $P < 0.01$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$, [▲] $P < 0.01$; 与Alen组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{*} $P < 0.01$; 与H13D组比较: [◇] $P < 0.05$, [◇] $P < 0.01$

vs. sham operation group: [▽] $P < 0.05$, [▼] $P < 0.01$; vs. model group: [△] $P < 0.05$, [▲] $P < 0.01$; vs. Alen group: ^{*} $P < 0.05$, ^{*} $P < 0.01$; vs. H13D group: [◇] $P < 0.05$, [◇] $P < 0.01$

4 讨论

H13D是肽类衍生物,目前处于动物试验阶段,一般通过静脉注射或者皮下注射方式给药,但皮下注射的给药方式更为方便。临床上Alen有2种给药方式:口服或静脉给药。本次实验为了保证给药方式的一致性,保证不会因为给药方式的不同,导致生物利用度不一致而影响疗效,所以H13D、Alen和PBS均选择皮下注射。

与模型组比较,Alen组、H13D组和联用组大鼠的腰椎骨(L1~L4)及股骨骨密度均增加,依次为H13D组 < Alen组 < 联用组。骨形态学结果表明,Alen组和H13D组大鼠治疗效果相当,接近假手术组水平,联用组大鼠治疗效果优于假手术组。综合骨密度和骨形态学指标说明,Alen组大鼠的治疗效果优于H13D组,联用组大鼠的治疗效果优于Alen组和H13D组。

Alen是临床常用治疗OP的药物,但长期应用二膦酸盐会过度抑制骨吸收,可导致骨矿化时间相对延长,矿化过度可使骨脆性增加及骨重建过缓,不利于骨组织内微损伤的修复和骨更新而导致骨质老化和脆性增加^[9]。骨形成促进剂可直接刺激骨形成,增加骨量和改善骨质量,降低骨折发生率。H13D是对OGP(10~14)分子内位点进行结构改造而获得的衍生物,抗酶降解的能力强,生物利用度增加。研究^[9]证实,H13D在体外可明显促进大鼠成骨细胞(Osteoblast, OB)增殖,对OB I型胶原蛋白的表达有上调作用;在体内通过加快骨再建频率,促进骨形成,增加模型大鼠的骨量。Alen与H13D联用既保留了Alen抑制骨吸收和增加骨量的作用,又避免了其降低骨再建频率和抑制骨形成的不良效应,最终使骨量增加,骨微结构改善。

参考文献

- [1] 沈谦,朱玲琦.我院2004年6月—2006年6月抗骨质疏松药利用分析[J].中国药房,2007,18(26):2 018.
- [2] Chapurlat RD, Palermo L, Ramsay P, et al. Risk of fracture among women who lose bone density during treatment with alendronate. The fracture intervention trial I [J]. *Osteoporos Int*, 2005, 16(7): 842.
- [3] 马芸.成骨生长肽羧基端五肽衍生物对大鼠骨代谢的影响:在体和离体研究[D].天津:天津医科大学,2005: 11-24.
- [4] 戴晨琳,张鑫,张鹏.骨形成肽羧基端衍生物G351对成骨细胞和破骨细胞的体外影响[J].天津医药,2005,33(3): 129.
- [5] 李梅,矫杰,孟迅吾.甲状旁腺素片段与阿仑膦酸钠对骨质疏松大鼠骨转换和骨密度的影响[J].中华医学杂志,2005,85(5):335.
- [6] 王舒婷,戴晨琳,卢飏.成骨生长肽羧基端5肽衍生物G48A和阿仑膦酸钠的序贯治疗对去卵巢大鼠的影响[J].基础医学与临床,2010,30(10):1 016.
- [7] 黄江渝,胡汶竹.血清骨钙素水平检测的临床应用现状[J].现代预防医学,2007,4(9):1 674.
- [8] Seeman E. Reduced bone formation and increased bone resorption: rational targets for the treatment of osteoporosis [J]. *Osteoporos Int*, 2003, 14(Suppl 3): S2.
- [9] 孟迅吾,夏维波.骨质量[J].国外医学内分泌分册,2003, 23(2):73.

(收稿日期:2012-07-24 修回日期:2012-10-26)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅