

文章编号:1004-7220(2012)06-0619-05

# 辛伐他汀对增龄大鼠椎体骨形成功能的影响

刘 铭, 朱振安, 汤亭亭, 于志锋

(上海市骨科内植物重点实验室, 上海交通大学医学院附属第九人民医院 骨科, 上海 200011)

**摘要:** **目的** 观察辛伐他汀对增龄大鼠腰椎椎体骨形成功能的影响, 评价辛伐他汀对躯干骨骼的骨质疏松是否具有预防和治疗作用。 **方法** 15月龄雄性SD大鼠60只, 分为剂量组(以不同剂量辛伐他汀5、10、20、40 mg/kg/d进行灌胃)、对照组(灌服等量生理盐水)和基线组(于灌胃开始时即处死取材)共计6组, 每组10只。3个月后分别行腰4椎体的双能X线骨密度测试、矿化沉积率测定、周围定量CT(pQCT)纵向扫描和第5腰椎椎体的生物力学压缩测试。 **结果** 10 mg剂量组的骨密度、矿化率及pQCT测量值较高, 但与对照组相比无统计学差异; 10 mg和20 mg剂量组骨骼的材料特性略好于对照组, 但无统计学差异。 **结论** 10 mg剂量组(相当人体口服辛伐他汀12~24 mg/d)在多数指标中好于其他剂量组, 但未发现明显统计学差异。说明辛伐他汀对增龄大鼠的躯干骨骼并不具有明显的骨形成促进作用, 即对脊柱椎体的骨质疏松并不具有预防和治疗的作用。

**关键词:** 辛伐他汀; 骨形成; 增龄大鼠; 骨质疏松; 生物力学

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

## Effect from simvastatin on osteogenesis of the lumbar vertebra in aging rats

LIU Ming, ZHU Zhen-an, TANG Ting-ting, YU Zhi-feng (Shanghai Key Laboratory of Orthopaedic Implants, Department of Orthopaedics, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the role of simvastatin in preventing and curing osteoporosis vertebrae by examining the effect from simvastatin on osteogenesis of the lumbar vertebrae in aging rats. **Methods** Sixty 15-month-old male SD rats were divided into six groups: the control group (injected with normal saline for three month), the baseline group (executed upon the gastric irrigation), the simvastatin-treated group (gastric irrigation with simvastatin at the dose of 5, 10, 20 and 40 mg/kg/d, respectively, for three month). L4 vertebrae were checked by Dual-Energy X-ray Absorptionmetry (DXA), Peri-quantiy CT (pQCT) and mineral apposition rates test. L5 vertebrae were checked by mechanical compression test. **Results** The value of DXA, pQCT and mineral apposition rate of 10 mg simvastatin group were slightly higher than that of the control group, but no significant differences were found between the two groups. The bone material properties of 10 mg and 20 mg simvastatin group were better than those of the control group, with no significant differences. **Conclusions** Although 10 mg simvastatin group (equivalent to 12~24 mg/d for human) seemed to have better properties than the other simvastatin groups, but there were no significant differences among these simvastatin-treated group. It is indicated that simvastatin doesn't play a positive role in promoting osteogenesis of the lumbar vertebrae in aging rats, so it may have no preventing or curative effect for osteoporosis of the lumbar vertebrae.

**Key words:** Simvastatin; Osteogenesis; Aging rats; Osteoporosis; Biomechanics

收稿日期:2012-01-08; 修回日期:2012-03-28

基金项目:上海市自然科学基金项目(10ZR1417600), 上海教委重点学科建设基金(J50206)。

通讯作者:朱振安, Tel: (021)23271699-5581; E-mail: zhuzhenan2006@126.com。

他汀类药物是一种传统的降血脂药物,属于3-羟基3-甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶抑制剂,可通过抑制胆固醇代谢的限速酶HMG-CoA 遏制甲羟戊酸(MVA)的产生,从而降低有害的低密度脂蛋白(LDL-C)的水平<sup>[1]</sup>。Mundy等<sup>[2]</sup>于1999年首次报道了他汀类药物具有促进骨代谢合成的生物学作用,此后他汀类药物成为了促进骨形成药物研发的新兴热点。目前临床中应用最广泛的是辛伐他汀,故选取辛伐他汀作为研究对象,具有突出的现实意义。近年来,辛伐他汀在体外对细胞系或骨髓基质干细胞具有促进成骨分化和抑制成脂分化的双向作用已被证实<sup>[3]</sup>,但他汀类药物在增龄动物模型的体内研究报道甚少<sup>[4]</sup>。此外,骨质疏松症所致的骨折中腰椎椎体的发生率为最高,约占50%,选择腰椎椎体为研究对象则更具有较为现实的临床意义。本研究选择15月龄的老年雄性大鼠构建增龄模型(Ⅱ型老年性骨质疏松),依据他汀类药物的临床毒性试验和等效药量换算比例选择不同剂量的辛伐他汀,观察其对腰椎椎体骨形成功能的影响,以期能够真实地评价辛伐他汀对骨质疏松症的躯干骨骼是否具有促进骨形成的防治作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

14月龄雄性SPF级SD大鼠,由中英合资上海BK实验动物中心提供。

### 1.2 主要设备和试剂

双能X线骨密度仪(HOLOGIC,美国),周围定量CT(XCT Research SA,德国),万能材料试验机(LLOYD EZ20,英国),硬组织切片机(Leica SPI600,德国),辛伐他汀片(杭州默沙东,美国),盐酸四环素(华美制药,中国)。

### 1.3 实验动物模型建立及分组

14月龄雄性SD大鼠60只,经消毒饲料(Ca 0.5%, P 0.4%)喂养1个月得实验用15月龄大鼠。

辛伐他汀片以生理盐水制成混悬液灌胃,现用现配,分为5、10、20、40 mg/kg/d 4个剂量。15月龄雄性SD大鼠每组10只,包括剂量组、对照组(灌

服等剂量的生理盐水)和基线组共计6组。剂量组和对照组观察时间为3个月,18月龄时取材。基线组于灌胃开始时即处死取材。各组动物饲养期间每两周测量体重以调整用药量,均以2.5%戊巴比妥钠麻醉过量致死,处死前12d及2d腹腔内皆注射盐酸四环素25 mg/kg。

### 1.4 观察指标

**1.4.1 双能X线骨密度仪检测** 动物处死后,取第4腰椎利用双能X线骨密度仪(HOLOGIC,美国)进行骨密度(bone mineral density, BMD)测定。检测后置入70%酒精,4℃固定。

**1.4.2 周围定量CT(pQCT)检测** 上述70%酒精固定第4腰椎送检pQCT。扫面层厚0.8 mm,分辨率0.09 mm。椎体:正中冠状面。检测后置于4℃保存。

检测指标:总骨含量(TOT\_CNT),总骨密度(TOT\_DEN),总面积(TOT\_A),小梁骨含量(TRAB\_CNT),小梁骨密度(TRAB\_DEN),小梁骨面积(TRAB\_A),皮质骨含量(CRT\_CNT),皮质骨密度(CRT\_DEN),皮质骨面积(CRT\_A),皮质厚度(CRT\_THK\_C),皮质骨外周长(PERI\_C),皮质骨内周长径(ENDO\_C),X、Y、Z 3个轴向的模拟骨强度力学性能(SSI)。

**1.4.3 不脱钙组织包埋及矿化沉积率测定** 第4腰椎乙醇逐级脱水:80%、90%和95%酒精各24 h,最后100%酒精48 h;二甲苯透明24 h;纯甲基丙烯酸甲酯(MMA)浸泡3 d,甲基丙烯酸甲酯(MMA) + 1 g 过氧化苯甲酰(BPO)浸泡3 d,甲基丙烯酸甲酯(MMA) + 2.5 g 过氧化苯甲酰(BPO)浸泡3 d,转至37℃烘箱内至固化。硬组织切片机切片至50 μm。Image Plus 5.0 计算四环素标记双线间距离/标记间隔时间。

**1.4.4 生物力学测定** 将第5腰椎自-20℃冰箱中取出后逐级复温,剪去周围附件,以低速电锯修整头尾两端为互相平行的截面,以千分尺分别测量头尾两端的前后径、内外径和椎体高度,置于水平金属平台上,传感器最大量程500 N,预加载荷5 N,最大应变为3 mm,试验机加载速度0.5 mm/min,设定负荷下降至60%为样品破裂。

## 1.5 统计分析

用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差检验,各动物组间的差异用 Tukey 法比较,  $P < 0.05$  为显著差异。

## 2 结果

### 2.1 双能 X 线骨密度测定

**2.1.1 剂量组 VS 对照组** 10 mg 组 BMD 等于对照组,其余各组皆低于对照组;其中,5 mg 组与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ ),其余组间无明显差异。

**2.1.2 剂量组间** 40 mg 组、20 mg 组、10 mg 组随剂量下降 BMD 呈上升趋势,5 mg 组 BMD 则下降,5 mg 组的 BMD 明显低于 10 mg 组 ( $P < 0.05$ ),其余组间无明显差异。

**2.1.3 基线组 VS 对照组** 对照组 BMD 低于基线组,但无明显差异(见表 1)

表 1 骨密度及矿化率测定

Tab.1 Values of DXA and mineral apposition rates

组别	骨密度/( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	矿化沉积率/( $\mu\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$ )
5 mg 组	0.177 ± 0.011	2.82 ± 0.31
10 mg 组	0.199 ± 0.009*	2.95 ± 0.22
20 mg 组	0.185 ± 0.026	2.83 ± 0.27
40 mg 组	0.189 ± 0.007	2.62 ± 0.15
对照组	0.199 ± 0.012*	3.08 ± 0.24
基线组	0.216 ± 0.01	

注: \* 与 5 mg 组相比,  $P < 0.05$

### 2.2 pQCT 分析(见图 1)

**2.2.1 剂量组 VS 对照组** 总骨含量、皮质骨含量和松质骨含量对照组最高,其中松质骨含量对照组与 5 mg 组差异显著,其余组间无明显差异。总骨密度和松质骨密度对照组低于 10 mg 组,但组间无明显差异;皮质骨密度对照组最高,与 20 mg 组差异明显。总骨面积、皮质骨面积和松质骨面积对照组最高,其中松质骨面积对照组与 5 mg 组差异显著,其余组间无明显差异。模拟压缩强度对照组最高,但组间无明显差异。

**2.2.2 剂量组间** 总骨含量随剂量降低逐渐升高,10 mg 组最高,5 mg 组则开始下降,组间无明显差异;皮质骨含量 10 mg 组最高,但组间无明显差异;

松质骨含量呈剂量依赖性下降,40 mg 组最高,5 mg 组与其他组相较差异显著。

总骨密度 10 mg 组最高,5 mg 组最低,5 mg 组与 10、40 mg 组差异显著;松质骨密度随剂量降低逐渐升高,5 mg 组开始下降,各组间无明显差异;皮质骨密度组间几近相等,无明显差异。

骨总面积 10 mg 组最高,组间无明显差异;松质骨面积 5 mg 组最低,40 mg 组最高,5 mg 组与其他组相较差异显著;皮质骨面积 5 mg 组最低,40 mg 组最高,各组间无差异。

模拟压缩强度 10 mg 组最高,各组间无差异。

**2.2.3 对照组 VS 基线组** 基线组松质骨含量和皮质骨面积低于对照组,其余指标皆大于对照组,但组间无明显差异。

综上所述,10 mg 剂量组在多数指标中优于其他剂量组,但同对照组相比较并没有明显改善骨的密度及结构,基线组多数指标均好于对照组。

### 2.3 矿化率测定

大鼠处死前两次腹腔注射盐酸四环素,间隔时间 10 d,双线间距离表示矿化沉积量,除以间隔时间即矿化沉积率。结果显示,对照组矿化沉积率最高,10 mg 组略好于其他剂量组,但各组间无明显差异(见表 1)。

### 2.4 生物力学测试(见表 2)

**2.4.1 剂量组 VS 对照组** 负荷值对照组低于 10 mg 组,且与 5 mg 组差异显著;应力值对照组低于 10、40 mg 组,但组间无差异;刚度和弹性模量值对照组最低,与 5 mg 组差异显著;能量与强度值对照组低于 20 mg 组,其中,能量对照组与 5 mg 组差异显著,其余组间无明显差异。

**2.4.2 剂量组间** 负荷值随剂量降低逐渐升高,5 mg 组开始下降,5 mg 组 10、20、40 mg 组间差异显著;应力值随剂量增加呈升高趋势,但组间无差异;刚度随剂量降低呈升高趋势,但组间无差异;弹性模量随剂量增加呈升高趋势,5 mg 组与 10、40 mg 组差异显著;能量与强度值 20 mg 组最高,但组间无差异。

**2.4.3 对照组 VS 基线组** 基线组负荷和应力值低于对照组,其余指标皆高于对照组;其中,负荷基线组与对照组差异显著,其余组间则无明显差异。

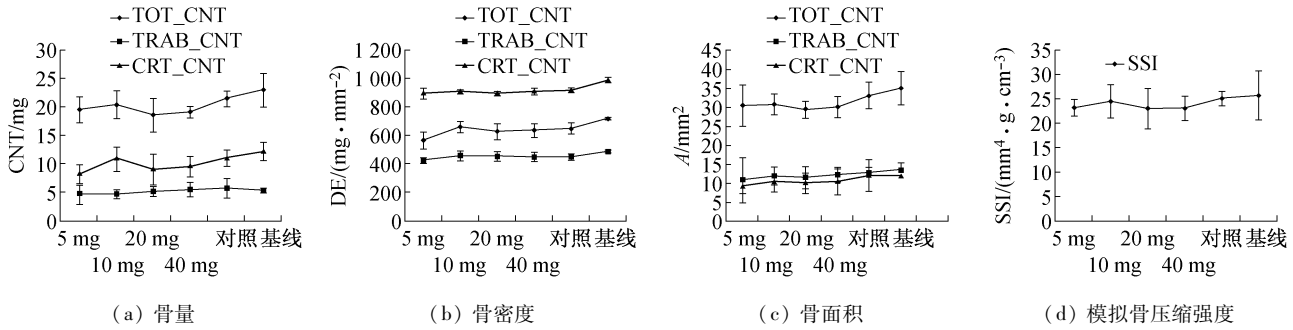


图1 腰椎L4 pQCT分析

Fig.1 Analysis of the fourth lumbar vertebrae by pQCT (a) Bone mass, (b) BMD, (c) Bone area, (d) Simulated bone compressive strength

表2 椎体的结构和材料特性

Tab.2 Values of vertebral structure and material characteristic

组别	负荷/N	刚度/(N·mm <sup>-1</sup> )	能量/MJ	应力/GPa	强度/(kJ·m <sup>-3</sup> )	弹性模量/MPa
5 mg 组	170.72 ± 13.84	146 ± 354.78	36.13 ± 17.97	9.81 ± 1.24	313.20 ± 148.83	426.20 ± 129.63
10 mg 组	245.12 ± 28.22**	863.71 ± 402.31	53.85 ± 13.86	12.53 ± 2.09	417.11 ± 145.66*	286.12 ± 105.07
20 mg 组	238.88 ± 45.87**	888.33 ± 238.16	103.98 ± 43.65	12.17 ± 1.35	814.44 ± 374.15	300.25 ± 55.83
40 mg 组	200.06 ± 20.33**	785.29 ± 275.32	50.29 ± 20.45	12.68 ± 1.32**	432.68 ± 216.62*	289.75 ± 119.42
对照组	233.36 ± 31.42**	651.60 ± 120.02*	55.30 ± 14.42	12.24 ± 0.56	445.30 ± 140.43*	227.60 ± 36.89
基线组	166.00 ± 8.60	897.62 ± 240.43	69.45 ± 27.37	9.20 ± 1.13	558.95 ± 258.23	350.89 ± 103.80

注: \* 与5 mg组相比, \*\* 与基线组相比,  $P < 0.05$

## 3 讨论

### 3.1 动物模型的选择与药物剂量的确定

大鼠的生命周期一般为3~4年,6月龄以后,股骨BMD与钙的变化已极小,到12月龄时各项骨参数均已达平台水平<sup>[5]</sup>,随后骨密度开始降低,但比较缓慢。Wang等<sup>[6]</sup>认为,9月龄时雄性SD大鼠骨骼已完全成熟,与增龄相关的骨丢失从此刻即已发生;这一过程与男性骨质疏松类似,故推荐超过9月龄的雄性SD大鼠即可作为增龄性骨丢失模型。Banu等<sup>[7]</sup>和Ke等<sup>[8]</sup>在相关试验中亦证明9月龄以上雄性SD大鼠是有效的增龄模型。因此,本试验选择15月龄大鼠作为增龄模型是有效的。

人与动物对同一药物的耐受性的差别是很大的;一般说来,动物的耐受性要比人大,即单位体重的用药量动物比人要大。可按下列比例换算:人用药量为1,小白鼠、大白鼠为25~50,兔、豚鼠为15~20,狗、猫为5~10<sup>[9]</sup>。目前,口服辛伐他汀的临床安全极限用量是80 mg/d,常用剂量是10、20和

40 mg/d,根据上述比例及Illingworth等<sup>[10]</sup>就他汀类药物的临床毒性试验和等效分析的报告,按60 kg的成人标准体重计算,本试验将口服剂量分为5、10、20和40 mg·(kg·d)<sup>-1</sup>作为大鼠的灌胃剂量,在安全范围内已完全能够覆盖人体临床常用剂量。因此,本试验辛伐他汀用药量的选择具有安全性和临床可比性,可为临床用药提供一定的参考。

### 3.2 DXA、pQCT及矿化沉积率分析

DXA主要用于整体骨密度的测定,能够快速地对所测标本的宏观印象,多为骨骼定量分析的初步检测方法。本试验结果提示,增龄大鼠腰椎的骨密度随剂量减小出现逐渐升高的趋势,其中10 mg组最高,但剂量组骨密度皆略低于对照组,且无明显统计学差异。

pQCT能够准确地区分皮质骨和松质骨,对观察骨骼对药物治疗的反应较DXA更敏感,利于了解药物干预后不同骨骼成分的反应<sup>[11]</sup>。基线组多数指标好于对照组,提示随着增龄骨量有逐渐丢失的趋势。各个剂量组同对照组相比较差异不明显,

10 mg组虽在多数指标中优于其他剂量组和对照组,但没有显著差异。说明辛伐他汀并没有明显改善骨的密度及结构,这同 DXA 试验所得的结果相吻合。

矿化沉积率可直接反映骨的矿化沉积速率,还可间接反映类骨质的生成量,这是 pQCT 所无法检测的。Wang 等<sup>[6]</sup>报告,在增龄 SD 大鼠模型中,腰 L4 椎体的变化比较明显,故本文测定了腰 L4 椎体的矿化速率。结果显示,各个剂量组同对照组相比较无明显差异;虽 10 mg 组略好于其他剂量组,但各组间仍无明显差异。

综合 DXA、pQCT 和矿化沉积率的测定结果,从骨的结构和骨的重建两方面表明,辛伐他汀并没有促进增龄模型的椎体内成骨。然而,衡量骨骼的变化和反映骨骼质量的最终指标是骨骼的生物力学性能<sup>[12-13]</sup>,必须以生物力学分析作为最终检测和评价手段,才能够得出较为确切的结果。

### 3.3 生物力学分析

数年的研究和临床资料总结发现,骨密度测量仅可以代表 60%~80% 的骨力学强度,其对骨质疏松疗效的预测正确率不超过 70%;若再同时进行骨力学强度分析,则可使预测正确率提高 20%<sup>[14]</sup>。防止骨质疏松的最终目的就是要提高骨的生物力学性能,故从生物力学角度分析骨骼强度就非常有必要。本实验结果发现,对于增龄大鼠,各个剂量组同对照组相比较,在多数指标中差异不明显;虽然骨骼的材料特性在 10 mg 和 20 mg 组略好于对照组,但并没有统计学差异。因此,生物力学的最终检测结果亦与上述各试验结果相符合。

## 4 结语

综合 DXA 和 pQCT 定量骨结构分析、矿化率沉积和生物力学测定等诸多检测指标的结果,本文认为,对于老年性骨质疏松动物模型—雄性增龄 SD 大鼠而言,辛伐他汀对脊椎椎体并没有明显的骨形成促进作用,即对脊柱椎体的骨质疏松并不具有预防和治疗的作用。

### 参考文献:

[1] Bauer DC. HMG CoA reductase inhibitors and the skeleton: A comprehensive review [J]. *Osteoporos Int*, 2003,

14(4): 273-282.  
[2] Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins [J]. *Science*, 1999, 286(5446): 1946-1949.  
[3] Liu M, Tang T, Zhu Z, et al. The effect of simvastatin on the differentiation of marrow stromal cells from aging rats [J]. *Pharmazie*, 2009, 64(1): 43-48.  
[4] 简小冲, 陈江, 黄文秀, 等. 辛伐他汀对去卵巢骨质疏松大鼠股骨生物力学的影响 [J]. *医用生物力学*, 2007, 22(3): 255-259.  
Jian XC, Chen J, Huang WX, et al. Effect of simvastatin on bone biomechanical characteristics in ovariectomized rats [J]. *J Med Biomech*, 2007, 22(3): 255-259.  
[5] Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, et al. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss [J]. *Endocrinology*, 1989, 124(1): 7-16.  
[6] Wang L, Banu J, McMahan CA, et al. Male rodent model of age-related bone loss in men [J]. *Bone*, 2001, 29(2): 141-148.  
[7] Banu J, Kalu DN. Effects of cerivastatin and parathyroid hormone on the lumbar vertebra of aging male Sprague-Dawley rats [J]. *Bone*, 2002, 31(1): 173-179.  
[8] Ke HZ, Qi H, Chidsey-Frink KL, et al. Lasofoxifene (CP-336,156) protects against the age-related changes in bone mass, bone strength, and total serum cholesterol in intact aged male rats [J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(4): 765-773.  
[9] 施新猷. 医用实验动物学 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1989: 2.  
[10] Illingworth DR, Tobert JA. A review of clinical trials comparing HMG-CoA reductase inhibitors [J]. *Clin Ther*, 1994, 16(3): 366-385.  
[11] Fujita T, Fujii Y, Goto B. Measurement of forearm bone in children by peripheral computed tomography [J]. *Calcif Tissue Int*, 1999, 64(1): 34-39.  
[12] Ferretti JJ, Capozza RF, Mondelo N, et al. Interrelationships between densitometric, geometric, and mechanical properties of rat femora: Inferences concerning mechanical regulation of bone modeling [J]. *J Bone Miner Res*, 1993, 8(11): 1389-1396.  
[13] Bauss F, Lalla S, Endeke R, et al. Effects of treatment with lbandronate on bone mass, architecture, biomechanical properties, and bone concentration of lbandronate in ovariectomized aged rats [J]. *Rheumatol*, 2002, 29(10): 2200-2208.  
[14] 杨定焯. 骨定量手段诊断骨质疏松的进展 [J]. *实用老年医学*, 2000, 14(3): 121-123.