

文章编号:1004-7220(2016)01-0067-06

## 不同剂量糖皮质激素对大鼠骨密度和生物力学性能的影响

朱觉新, 黄连芳\*, 陈艳

(广东医学院 广东省天然药物研究与开发实验室, 湛江 524023)

**摘要:** **目的** 通过双能 X 射线骨密度仪(dual energy X-ray absorptiometry, DXA)、骨生物力学测试及骨组织计量学等方法研究不同剂量糖皮质激素摄入对正常 3 月龄大鼠骨骼的影响。**方法** 31 只 SPF 级 3 月龄 SD 雌性大鼠,随机分为正常对照组、地塞米松(Dex)1、2.5、5 mg/kg 组,每周尾静脉注射给药 2 次,共 8 周,对照组给予生理盐水对照。给药结束后,离体股骨和第 3 腰椎通过 DXA 进行骨矿含量(bone mineral content, BMC)、骨矿密度(bone mineral density, BMD)测定,全股骨和第 5 腰椎分别进行三点弯曲和压缩力学实验,并通过骨组织病理切片观察胫骨近端骨小梁的显微结构并定量分析。**结果** 与正常组相比,所有激素组大鼠体重均明显降低,腰椎 BMC、BMD 及最大压缩载荷均未明显下降,全股骨 BMC 均有所降低,但只有 Dex 1 mg 组全股骨和股骨远端、近端 BMD 降低;Dex 1 mg 组三点弯曲实验断裂载荷、最大载荷和弹性载荷都明显降低,而 Dex 2.5 mg、Dex 5 mg 组只有弹性载荷仍低于正常对照组。激素组骨小梁有空间密度分布不均现象,骨代谢处于低转换。**结论** 应用糖皮质激素 8 周对 3 月龄大鼠骨骼的不利影响股骨较腰椎明显,股骨骨量丢失,力学性能下降,两者均无剂量依赖性。更高剂量 Dex 并没有增加骨量丢失和力学性能改变。力学性能特别是弹性载荷下降以及骨小梁密度分布不均,提示糖皮质激素更多的是引起骨质量下降。临床上应用糖皮质激素时,应使用多种方法评价其对骨骼的副作用。

**关键词:** 糖皮质激素; 骨密度; 微观结构; 大鼠; 力学性能

中图分类号: R318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2016.01.067

## Effects of glucocorticoid with different dosage on bone mineral density and biomechanical properties in rats

ZHU Jue-xin, HUANG Lian-fang, CHEN Yan (*Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, Guangdong, China*)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of exposure to glucocorticoids with different dosage on skeleton of normal 3-month-old rats by dual energy X-ray absorptiometry (DXA), biomechanical testing and bone histopathology. **Methods** Thirty-one 3-month-old female clean level SD rats were randomly divided into 3 GC-treated groups, with tail intravenous injections of dexamethasone (Dex) at the dosage of 1, 2.5, 5 mg/kg twice per week for 8 weeks, respectively, and 1 normal control group treated with saline. At the end of experiment, bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) of the femur and the 3rd lumbar vertebrae in rats were measured by DXA. The 3-point bending test of the total femur and compression test of the 5th lumbar vertebrae were also conducted, respectively. Microstructure of the trabecula in proximal metaphysis of the tibia was observed by bone pathological section for quantitative analysis. **Results** Compared with control group, the body weight was significantly decreased in all Dex-treated groups, while no obvious decrease in vertebral BMC, BMD

收稿日期:2015-07-31; 修回日期:2015-10-10

基金项目:湛江市科技攻关项目(2013B01079),广东医学院科研基金项目(M2013009)。

通信作者:陈艳,助理研究员,E-mail:chenyan8182@163.com。

\* 为共同第一作者

and maximum compressive loads was found. The total femoral BMC was also reduced significantly in all Dex-treated groups, while the total femoral BMD, proximal and distal femoral BMD were reduced only in Dex 1mg group. The fracture load, maximum load and elastic load for 3-point bending test were all evidently decreased in Dex 1mg group, while the Dex 2.5mg group and Dex 5mg group only showed a decline in elastic load. All Dex-treated groups showed an unevenly spatial distribution of the trabecula, which indicated a low bone metabolic state. **Conclusions** The exposure to GC for 8 weeks brings negative effects on skeleton of the 3-month old rats, which will cause more bone loss and worse mechanical properties in femur than in lumbar vertebrae. Higher dosage of Dex does not increase bone mass loss or change the mechanical properties. Both the decline in bone mechanics, especially elastic load, and unevenly density distribution of trabecula indicate that Dex will affect more bone quality other than bone mass. The side effects of GCs on skeleton in clinical application should be evaluated with various methods.

**Key words:** Glucocorticoid; Bone mineral density (BMD); Microstructure; Rat; Mechanical properties

糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 在临床广泛应用,且经常是长期使用。不论通过何种途径给药,长期接受 GC 治疗者都有发生骨质疏松的危险,严重者可导致椎体、肋骨及髌部等多部位骨折,称为糖皮质激素性骨质疏松 (glucocorticoid induced osteoporosis, GIOP),是继发性骨质疏松的首要原因,也是继绝经后和退行性骨质疏松症之后最常见的骨质疏松症<sup>[1]</sup>。因此,GIOP 成为目前骨质疏松症研究的热点。

影响 GCs 对骨骼作用的因素非常复杂。临床资料表明,这种复杂性至少受到激素使用剂量大小、累积用量、给药方式等因素的影响。动物实验表明,性别、年龄也是重要的影响因素。而且即使在同一条件下,不同部位的骨骼表现也有所不同。本文通过双能 X 射线骨密度仪 (dual energy X-ray absorptiometry, DXA) 检测、骨生物力学测试、骨组织形态等方法,进一步探讨 GC 使用剂量与年龄在 GIOP 发展中对骨量、力学参数及骨微结构的影响和相互关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

地塞米松 (dexamethasone, Dex) 磷酸钠粉针剂 (内布拉斯加大学药学院提供);慢速锯 (Buehler 公司,美国),Leica2155 硬组织切片机 (Leica 公司,德国);骨密度仪 (GE lunar PRODIGY 型,美国);MTS 万能材料测试系统 (858 Mini Bionix, MTS 公司,美国)。

### 1.2 分组及给药

3 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 31 只,雌性,体重为 170 ~ 210 g (广东医学院动物中心提供,合格证号

A2009029)。将 SD 大鼠随机分为 4 组,对照组 7 只,尾静脉注射医用葡萄糖生理盐水对照;对照组为 3 个 Dex 剂量组,分别命名为 Dex 1 mg 组、Dex 2.5 mg 组和 Dex 5 mg 组,每组各 8 只 SD 大鼠。Dex 用葡萄糖生理盐水溶解配制成 1、2.5、5 mg/kg 3 种浓度,尾静脉注射,每周 2 次,连续给药 8 周。饲养条件室温保持在 (24 ~ 28) °C,湿度为 50% ~ 60%,分笼饲养。实验期间每周称重记录 2 次。实验结束时,心脏抽血处死大鼠并马上取材。

### 1.3 骨矿含量及骨矿密度检测

右股骨及第 3 腰椎 (L3) 剔除肌肉及软组织,迅速用纱布蘸生理盐水包好,锡纸包裹,置入小袋中,置于 -20 °C 冻存备用。之后经 DXA 骨密度仪进行离体骨矿含量 (bone mineral content, BMC) 及骨矿密度 (bone mineral density, BMD) 的测定,股骨测定部位为股骨远端 1.5 cm、股骨近端 1.5 cm 及全股骨,使用附带软件对测量结果进行分析。

### 1.4 生物力学参数测定

左侧股骨及第 5 腰椎 (L5) 剔除肌肉及软组织,用纱布蘸生理盐水包好,锡纸包裹,置入小袋中,置于 -20 °C 冻存备用。之后分别在 MTS 电子万能材料试验机进行生物力学检测。股骨进行三点弯曲力学实验<sup>[5]</sup> 支点跨距 18 mm;中点为加压力点,加载速率 5.0 mm/min;温度 23 °C;湿度 60% ~ 70%,得出最大载荷、断裂载荷、弹性载荷及弹性模量等参数。L5 进行椎体压缩力学实验,检测最大载荷值<sup>[3]</sup> (由南方医科大学生命学院协助完成)。

### 1.5 骨组织病理切片制作及计量学

分离出一侧胫骨,除净肌肉和软组织,低速锯暴露胫骨上段骨髓腔,固定后逐级脱水,脱脂进行塑料

包埋, 打磨处理后经硬组织切片机切成  $10.5 \mu\text{m}$  的骨切片。薄片经三色染色法 (Goldners Trichrome 法) 染色后进行骨小梁的镜下 (Olympus BX43, 日本) 观察。测量范围为生长板往下扣除  $1 \text{mm}$ , 避开初级海绵体, 再延伸  $3 \text{mm}$  以内的区域, 分别测量成骨细胞和破骨细胞周长。

### 1.6 统计学分析

所有数据以均数  $\pm$  标准差表示, 使用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析, 并进行组间两两比较,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 不同剂量 GCs 对正常大鼠股骨和腰椎 BMD 和力学性能的影响

3 个 Dex 剂量组与对照组相比, 股骨面积均下降了  $9\%$  ( $P < 0.05$ ), 股骨 BMC 分别下降  $-22.0\%$ 、 $-14.6\%$ 、 $-14.6\%$  ( $P < 0.05$ )。Dex  $1 \text{mg}$  组全股骨、股骨近端、股骨远端 BMD 均明显下降 (见图 1)。

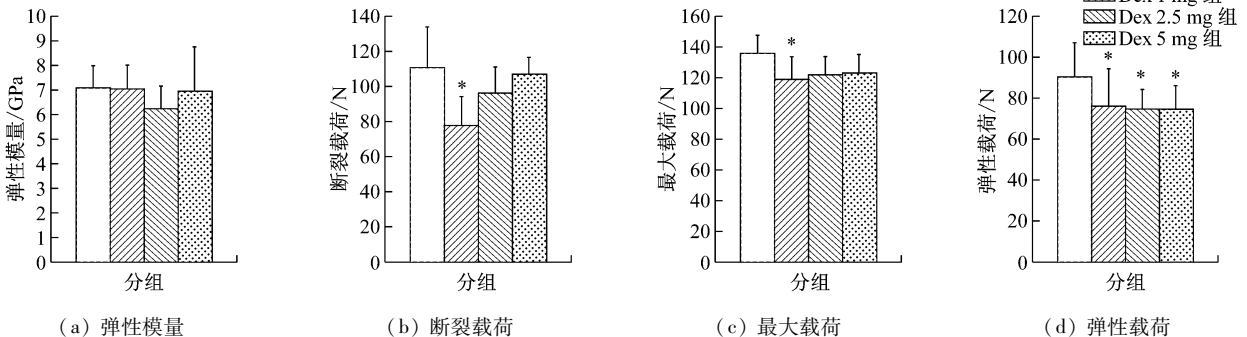


图 2 不同剂量 Dex 各组大鼠的股骨三点弯曲力学测试结果 (\*  $P < 0.05$ , 与对照组相比)

Fig. 2 Results of three-point bending test of femur in rats treated with different Dex dosage

(a) Elastic modulus, (b) Bending load, (c) Maximum load, (d) Elastic load

腰椎 BMD 和力学检测结果显示, 除了 Dex  $5 \text{mg}$  组的腰椎面积 [ $(0.46 \pm 0.05) \text{cm}^2$ ] 与对照组 [ $(0.54 \pm 0.06) \text{cm}^2$ ] 相比下降了  $15\%$ , Dex  $1 \text{mg}$  及 Dex  $2.5 \text{mg}$  组 BMC、BMD 及最大压缩载荷都没有明显改变。

### 2.2 不同剂量 Dex 对大鼠体重的影响

正常对照组体重随周龄增长逐渐增加, Dex 各组体重增加不多或不增, 实验结束时与正常组相比有显著性差异, 各剂量组之间无统计学差异 (见图 3)。

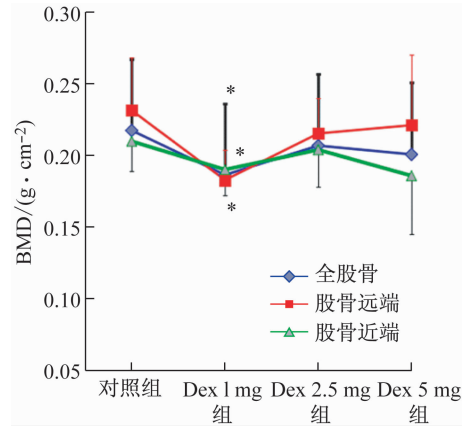


图 1 不同剂量 Dex 各组大鼠股骨 BMD 的比较 (\*  $P < 0.05$ , 与对照组相比)

Fig. 1 Comparison of femoral BMD in rats treated with different Dex dosage

三点弯曲实验中, Dex  $1 \text{mg}$  组的断裂载荷、最大载荷和弹性载荷都有明显降低, Dex  $2.5 \text{mg}$  和 Dex  $5 \text{mg}$  组只有弹性载荷比对照组低 (见图 2)。

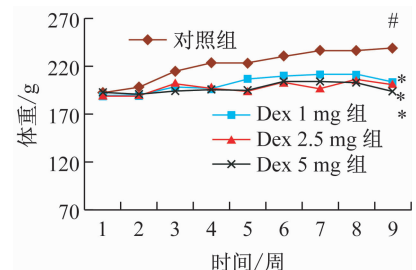


图 3 不同剂量 Dex 对大鼠体重变化的影响 (\*  $P < 0.05$ , 与对照组相比; #  $P < 0.05$ , 对照组实验终点与实验起点相比)

Fig. 3 Effects of Dex with different dosage on body weight in rats

### 2.3 不同剂量 Dex 对松质骨小梁微结构及骨代谢参数的影响

如图4所示,镜下观察可见正常组骨小梁排列规整、致密,骨髓腔正常,小梁分布均匀并连接有序。激素组骨小梁排列不够整齐,分布不均,部分分布密

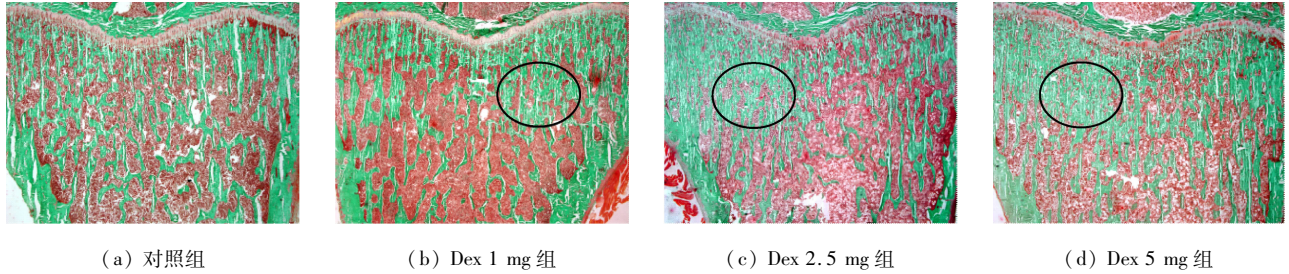


图4 正常组和 Dex 各组骨小梁显微结构图(骨三色染色,10×4倍)

Fig. 4 Microstructural images of trabecular bone in normal and Dex-treated rats (a) Control group, (b) Dex 1 mg group, (c) Dex 2.5 mg group, (d) Dex 5 mg group

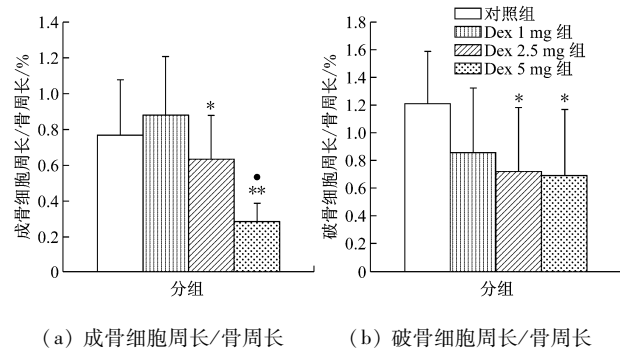


图5 不同剂量 Dex 对大鼠骨形成和骨吸收的影响 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ,与对照组相比; •  $P < 0.05$ ,与 Dex 1 mg 组相比)

Fig. 5 Effects of Dex with different dosage on bone formation and resorption in rats (a) Osteoblast surface/bone surface, (b) Osteoclast surface/Bone surface

## 3 讨论

### 3.1 不同剂量 GCs 长期使用对骨骼的影响

只要是长期使用,不同剂量的 GCs 对骨骼的影响都是不利的。影响 GCs 对骨骼作用的因素非常复杂,首先受到激素剂量、累积用量、给药方式等因素的影响,口服激素引起骨丢失的危险性就要小于肌注方式<sup>[2]</sup>。另外,使用者的性别和年龄都是影响激素作用的因素之一,有时甚至会出现矛盾的结果。在 Ogoshi 等<sup>[3]</sup>的实验中,每日注射 Dex (2、20 mg/kg)4 周后,3 月龄大鼠全身骨骼 BMD 增加,

集(如黑圈内部分),其余部分则见小梁稀疏,连续性变差,游离末端增多,髓腔增大。

图5所示分别反映骨形成和骨吸收的情况,激素组骨形成和骨吸收均明显下降。

骨形成率增加,而6月龄大鼠则表现为BMD及骨形成率下降,低剂量和高剂量均如此。本实验结果则显示,3月龄大鼠注射3个剂量(1、2.5、5 mg/kg)的Dex,8周后股骨部位骨量丢失和力学性能下降,腰椎部位的则不明显;该实验表明,激素短时间运用对骨形成和骨量增加有一定的促进作用。确实也有一些体外实验证实,在一定剂量范围内,Dex具有一定的促成骨分化作用<sup>[4]</sup>,但其体内的促进骨形成作用还未得到证实,多数实验均显示激素对成骨细胞具有直接抑制作用<sup>[5]</sup>。如果使用的时间还不够长,激素的抑制作用就没有显现出来<sup>[6]</sup>。本实验结果也证明了这点,使用GCs 8周,股骨BMD下降,胫骨骨形成和骨吸收下降,不管剂量大小,对骨骼都出现了不利的影响。这与最新提出的“激素使用没有最低安全剂量”的观点是一致的<sup>[7]</sup>。

### 3.2 骨量及力学性能下降与激素剂量的相关性

本实验结果表明,骨量及力学性能下降与激素剂量之间无明显相关性,更高的剂量并不增加其骨量及力学性能下降的程度。体内和体外实验都表明,激素使用剂量大小与抑制成骨细胞功能或者骨量丢失程度之间确实有一定的剂量依赖性<sup>[8]</sup>,最明显的骨丢失通常发生在每日7.5 mg(以泼尼松为例)或者更高的激素摄入量,剂量越大,骨量丢失越多<sup>[9]</sup>。在评价GIOP骨折风险时,除了激素剂量之外,激素的累积剂量与骨密度之间的关系更为密

切<sup>[10]</sup>。Dex 1 mg 组股骨 BMD 下降和力学改变反而较 Dex 2.5 mg 及 Dex 5 mg 组更明显。虽然激素剂量的大小确实决定着骨细胞的命运,但并不是所有骨细胞功能的改变(如自噬和凋亡)都有剂量依赖性<sup>[11]</sup>,综合作用的结果也不会表现出明显的剂量相关性。临床资料也发现,摄入较低剂量激素的妇女,其骨量丢失比高剂量摄入的更为严重,推测是遗传基因在发挥作用<sup>[12]</sup>。因此,本实验中更高剂量组的大鼠 BMD 反而没有降低,力学性能也没有普遍下降,极有可能与动物种属及基因特异性有一定关系。

### 3.3 相同 GCs 剂量对不同部位骨骼的影响

相同 GCs 剂量时,股骨的骨量和力学性能下降较腰椎明显。大鼠的生长期可一直持续到 6~8 月龄,7~12 月龄达到骨密度峰值区间,股骨和腰椎的趋势是一致的。7~12 月龄的骨生物力学特点主要表现为内在力学结构的调整。12 月龄时,股骨和腰椎都达到最优的骨力学性能。股骨近端、远端以及腰椎都是属于松质骨为主的部位,而松质骨构成全部骨骼 80% 的骨表面,故以往的实验研究多数集中在松质骨,认为 GC 主要以损伤骨小梁为主,并且长骨干骺端的松质骨量下降比腰椎的更明显。越来越多的研究也发现,GC 同样降低皮质骨厚度,增加皮质内小孔的数量,对骨强度降低的影响甚至大于松质骨<sup>[13]</sup>。也有研究认为,GCs 对骨骼的作用具有部位特异性,导致了激素在不同部位骨骼作用的差异<sup>[14]</sup>。这些都解释了既有松质骨又有皮质骨的股骨其骨密度和力学性能下降为何要比腰椎(松质骨为主)明显。

### 3.4 不同剂量 GCs 对体重及骨微结构的影响

不同剂量 GC 的应用导致大鼠体重降低和骨微结构的分布异常。Bozzini 等<sup>[15]</sup>实验发现,使用高剂量 Dex(20 mg)的大鼠虽然骨质量增加,但体重已出现下降。本实验应用糖皮质激素 8 周,不管剂量大小,体重都明显下降,骨质量也显现出变差的迹象,提示体重和骨质量的改变是两个相对独立发展的因素,体重的降低可能预示着骨质量的最终下降。

镜下的观察显示,所有激素组的骨小梁存在分布不均现象,说明不同区域的骨代谢状态是不同的,小梁分布密集处的骨形成暂时超过了骨吸收,致使局部区域小梁数增加,小梁间隙缩窄,而小梁稀疏处的骨吸收超过了骨形成,骨转换加快,故小梁数量减

少,间隙增宽。Liu 等<sup>[16]</sup>研究发现,过量使用激素使骨小梁的厚度和分离度都增加,两个相对矛盾的结果同时存在,这或许可以通过小梁分布密集区和稀疏区域的平均计算结果来解释。至于小梁分布不均的原因,需要通过进一步的实验研究探讨。分布不均最终的结果是导致力学结构的不平衡<sup>[17]</sup>,力学性能下降主要是弹性性能的下降,因为只有弹性负荷在所有剂量组都降低。

## 4 结语

3 月龄大鼠应用不同剂量 GC 8 周对骨骼的影响是不利的。不同部位松质骨检测结果不同,股骨骨量的丢失和力学性能下降较腰椎明显,Dex 1 mg 组的骨量丢失和力学改变反而较更高剂量组明显,没有明显的剂量依赖性。体重、力学性能下降和骨微结构分布异常提示糖皮质激素更多的是引起骨质量下降。临床医生在使用激素时,需综合评价其对骨骼的副作用,注意不同剂量使用时激素作用的复杂性。

## 参考文献:

- [1] 张学武. 2010 年美国风湿病学会最新糖皮质激素诱导的骨质疏松共识备受关注[J]. 中华风湿病学杂志, 2011, 1(3): 145-146.
- [2] 魏秋实, 邓伟民, 何伟, 等. 不同途径摄取糖皮质激素大鼠骨髓基质干细胞生物活性研究[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2014, 29(4): 160-163.
- [3] Ogoshi T, Hagino H, Fukata S, et al. Influence of glucocorticoid on bone in 3-, 6-, and 12-month-old rats as determined by bone mass and histomorphometry [J]. Mod Rheumatol, 2008, 18(6): 552-561.
- [4] 庞金辉, 黄煌渊, 张权, 等. 不同浓度地塞米松对骨髓间充质干细胞的生物学特性的影响[J]. 创伤外科杂志, 2009, 11(3): 248-252.
- [5] Shi C, Huang P, Kang H, et al. Glucocorticoid inhibits osteoblasts proliferation by microRNA-199a targeting WNT signaling [J]. J Mol Endocrinol, 2015, 54(3): 325-337.
- [6] Olsson A, Oturai D, Sørensen P, et al. Short-term, high-dose glucocorticoid treatment does not contribute to reduced bone mineral density in patients with multiple sclerosis [J]. Mult Scler, 2015, 21(12): 1557-1565.
- [7] Rasch LA, Bultink IE, van Tuyll LH, et al. Glucocorticoid safety for treating rheumatoid arthritis [J]. Expert Opin