

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.06.009

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.06.009

咪达普利对实验性骨质疏松大鼠的骨代谢和生物力学的影响

杨平, 尚晓强

(武汉市红十字会医院骨科, 武汉 430000)

[摘要] 目的: 探讨咪达普利对维甲酸所致的实验性骨质疏松的大鼠骨代谢和生物力学的影响。方法: 将60只SD雌性大鼠随机分为3组: 对照组(I组)、维甲酸诱导骨质疏松模型组(II组)、咪达普利组(III组), 每组20只。对II组和III组的大鼠用维甲酸80mg/(kg·d)连续灌胃21 d建立实验性骨质疏松模型。造模后, III组给予按大鼠体重10 mg/(kg·d)咪达普利灌胃, I组和II组采用生理盐水对照, 持续7 d后处死大鼠, 分别检测各组大鼠的体重、股骨骨密度和干湿重、骨代谢指标和骨生物力学指标。结果: 与I组相比, II组在大鼠体重、股骨骨密度、股骨干湿重、骨代谢指标上差异均有统计学意义($P < 0.05$)。咪达普利干预后, 与II组相比, III组大鼠的体重增加, 股骨干湿重增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 股骨中钙和磷的含量明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 血清中骨钙素(bone gamma-carboxyglutamic-acid-containing proteins, BGP)浓度降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)浓度下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 肱骨生物力学最大载荷(P_{max})、最大挠度(L_{max})、最大弯矩(M_{max})、骨应力(σ)和骨应变增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 咪达普利能增加维甲酸所致的实验性骨质疏松大鼠骨密度, 增加股骨干湿重, 减少骨质流失, 促进骨形成和矿物质的沉积, 增加骨的生物力学强度, 减少骨折的发生, 对骨质疏松具有保护作用。

[关键词] 咪达普利; 骨质疏松; 碱性磷酸酶; 骨钙素; 骨生物力学

Effect of imidapril on bone metabolism and biomechanics in rats with experimental osteoporosis induced by retinoic acid

YANG Ping, SHANG Xiaoqiang

(Department of Orthopaedics, Wuhan Red Cross Hospital, Wuhan 430000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effects of ACEI on bone metabolism and biomechanics in rats with experimental osteoporosis induced by retinoic acid. **Methods:** Sixty female SD rats were randomly divided into for three groups, control group (group I) and retinoic acid induced osteoporosis model group (group II) and imidapril intervention group (group III), 20 rats in each group. The rats in group II and III rats were gastro gavage by retinoic acid 80 mg/(kg·d) lasting for 21 days to establish experimental osteoporosis model. After constructing animal models, group III rats were given imidapril 10 mg/(kg·d) orally, group I and II rats received placebo-controlled, continued for 7 days. After that, the rats were killed, the body weight of rats in each group were detected. The body weight, femoral bone mineral density (BMD),

收稿日期 (Date of reception): 2017-03-16

通信作者 (Corresponding author): 杨平, Email: yangping8768@126.com

and wet and dry weight, bone metabolic markers and bone biology mechanics parameters was also measured. **Results:** Compared with group I, the differences of the body weight, the femoral BMD, wet and dry weight, bone metabolism index of rats in group II were all statistically significant. After the intervention of ACEI imidapril, compared with group II, imidapril had increased body weight of rats, increased wet and dry weight, the difference was statistically significant ($P<0.05$) in group III. In group III, Femur calcium and phosphorus content increased significantly ($P<0.05$), the concentration of serum BGP increased significantly ($P<0.05$), the concentration of TRAP decreased ($P<0.05$), the femoral biomechanics, including Pmax, Lmax, Mmax, bone strain and bone strength increased ($P<0.05$), comparing with group II. **Conclusion:** In an experimental osteoporosis rats model induced by retinoic acid, imidapril can elevate the rats' body weight, increase BMD and wet and dry weight, reduce bone loss, promote bone formation and mineral deposition, increase bone biomechanical strength, and reduce the occurrence of fracture. Imidapril exerts a protective effect on osteoporosis.

Keywords imidapril; osteoporosis; alkaline phosphatase; osteocalcin; bone biomechanics

骨质疏松症是一种以骨量减少、微结构破坏、骨脆性增加和骨折危险度增加为特征的骨代谢疾病,目前缺乏有效的药物治疗方法^[1]。骨质疏松主要发病于绝经后妇女或老年人,随着人口的增加和老龄化,全世界骨质疏松症患者总人数超过2亿,寻找新的治疗方法已刻不容缓^[2]。骨质疏松症的发病基础是正常的破骨细胞不断清除旧骨的同时成骨细胞形成类骨质并进行矿化,在时间和空间上紧密偶联的动态平衡被打破,破骨大于成骨作用。骨吸收和骨形成过程受成骨细胞的调控,骨量的多少取决于骨的重建单位中骨形成与吸收的动态平衡^[3]。维甲酸是维生素A的一种衍生物,对雌性大鼠骨代谢的影响是骨吸收大于形成,导致类似骨高转换状态,维甲酸诱导的骨质疏松大鼠在发病症状、组织学表现及对雌激素的骨反应上与人类骨质疏松有较好的相似性^[4]。

全身肾素-血管紧张素系统(renin angiotensin system, RAS)调节着机体血压及水、电解质平衡^[5],局部RAS存在于许多组织器官中。骨组织中局部RAS对骨代谢有着重要的调节作用^[6],如其可以通过抑制成骨细胞的骨形成作用和促进破骨细胞的骨吸收作用导致骨量和骨质下降^[7]。临床流行病学表明血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)类抗高血压药物在降血压的同时,能降低老年患者骨折的风险,提示对高血压相关的骨质疏松具有一定的保护作用^[8]。新近研究^[9]表明ACEI类药物同时具有促进软骨细胞的生成和促进骨折的愈合作用。尽管如此,ACEI类药物对骨质疏松中骨质量、骨代谢和骨生物力学特性方面的影响尚无探索。本研究探讨ACEI类药物咪达普利对维甲酸所致的实验性骨质

疏松大鼠中骨质量、骨代谢生化指标和骨的生物力学的影响,旨在探索新的骨质疏松治疗方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

10~12周的SPF级SD雌性大鼠60只,体重(250±30)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物生产许可证号为SCXK(沪)2012-002。

1.2 试剂和主要仪器

维甲酸购于陕西省森佛生物技术有限公司;咪达普利购自天津田边制药有限公司。骨钙素(bone gamma-carboxyglutamic-acid-containing proteins, BGP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)ELISA检测试剂盒购于上海百蕊生物科技有限公司;双能X线骨密度检测仪购自美国GE公司;全自动生化分析仪购自美国Beckman公司;分析天平AL-204购自瑞士梅特勒-托利多公司;游标卡尺(德国Exploit);紫外分光光度计UV-2550(日本岛津);自动控制电子万能试验机购自日本岛津公司。

1.3 动物分组造模和药物干预

观察1周,无死亡和精神异常后,随机将大鼠分为阴性对照组(I组)、维甲酸诱导骨质疏松模型组(II组)及咪达普利组(III组),每组20只,在相同的条件下饲养。II组和III组大鼠给每天80 mg/kg的维甲酸灌胃,连续给药21 d。第22天开始,I组和II组给予生理盐水灌胃,III组大鼠给予咪达普利每

天10 mg/kg灌胃, 持续1周。咪达普利给药结束后观察7 d。

1.4 大鼠体重和骨密度测定

观察期结束后, 将3组大鼠取出, 用10%水合氯醛腹腔注射麻醉。麻醉后将大鼠俯卧于扫描平台上, 展开四肢, 使用双能X线骨密度检测仪测定大鼠的股骨密度, 称重后, 眼球剥脱取血, 离心后血浆存于-20℃冰箱备用。

1.5 大鼠骨钙、磷含量测定

右侧股骨放入干烤箱内烘干后在电炉上碳化, 然后置于马福炉中温度800℃灰化2.5 h, 冷却至室温后分别称取0.05 g和0.1 g骨灰, 在骨灰中加入3%硝酸溶液10 mL移至比色皿中, 室温放置48 h, 采用钼比色法测定骨磷的含量, 火焰原子吸收法测定骨钙的含量。

1.6 ELISA法检测大鼠BGP和TRAP含量

将离心备存好的大鼠血清, 按试剂盒的说明书, ELISA法检测血清BGP和TRAP的浓度。

1.7 大鼠骨生物力学比较

AG-107A型自动控制电子万能试验机测量大鼠左侧肱骨最大载荷(P_{max})、最大挠度(L_{max})、最大弯矩(M_{max})、骨应力(σ)和骨应变。

1.8 统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用SPSS19.0统计软件分析, 采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠的肱骨的形态学观察

正常大鼠的股骨的HE染色如图1A所示。维甲酸所致的大鼠骨质疏松在组织形态学表现为骨小梁稀疏、断裂、间隙扩大, 骨皮质变薄和骨髓腔扩大(图1B); 咪达普利能显著的减轻维甲酸所致的骨组织学改变(图1C)。

2.2 各组大鼠体重和骨密度的比较

与I组大鼠相比, II组大鼠体重降低、骨密度降低、股骨湿重和干重降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 与II组相比, III组体重增加、骨密度显著增加、股骨湿重增加、股骨干重增加, 差异均有统计学意义($P<0.05$, 表1)。

2.3 各组大鼠骨钙、骨磷和生化代谢指标比较

与I组相比, II组中大鼠股骨的骨钙降低, 骨磷含量降低, 血清中BGP含量显著增加, TRAP的含量增加, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 与II组相比, III组大鼠骨钙增加, 骨磷含量增加, 血清中的BGP降低, TRAP降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$, 表2)。

2.4 各组大鼠的肱骨的生物力学指标的比较

与I组相比, II组中大鼠肱骨的 P_{max} , L_{max} , M_{max} , σ 和骨应变均降低, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。与II组相比, III组的大鼠肱骨的 P_{max} , L_{max} , M_{max} , σ 和骨应变增加, 差异具有统计学意义($P<0.05$, 表3)。

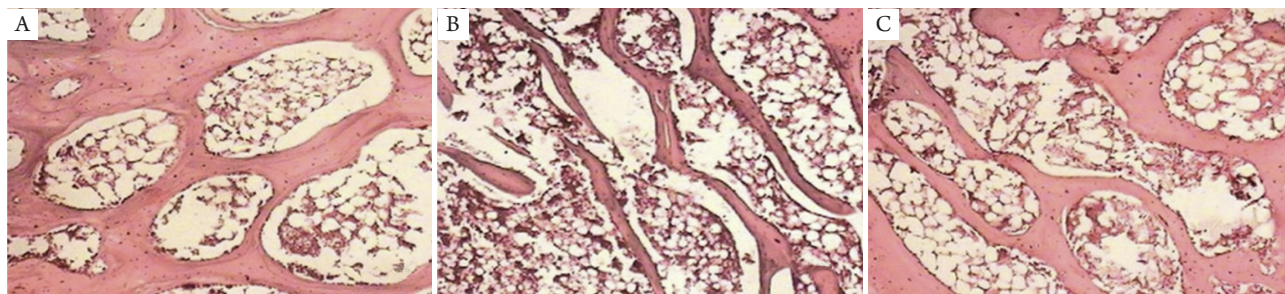


图1各组大鼠的肱骨的HE染色图($\times 40$)

Figure 1 HE staining of humerus of the three groups ($\times 40$)

(A)I组; (B)II组; (C)III组。

(A) Group I; (B) group II; (C) group III.

表1 各组大鼠体重、骨密度的比较($n=20, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of body weight and femoral bone mineral density in the three groups ($n=20, \bar{x} \pm s$)

组别	体重/g	骨密度/(g·cm ⁻²)	湿重/mg	干重/mg
I组	262 ± 11.36	0.198 ± 0.005	0.79 ± 0.08	0.64 ± 0.08
II组	239 ± 10.19*	0.173 ± 0.007*	0.49 ± 0.10*	0.51 ± 0.06*
III组	247 ± 14.23 [#]	0.185 ± 0.003 [#]	0.57 ± 0.03 [#]	0.58 ± 0.07 [#]

与I组比较, * $P<0.05$; 与II组比较, [#] $P<0.05$ 。

Compare with group I, * $P<0.05$; compare with group II, [#] $P<0.05$.

表2 三组大鼠骨钙、磷和血清中BGP和TRAP的比较($n=20, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of BGP and TRAP in femur calcium and phosphorus content in the three groups ($n=20, \bar{x} \pm s$)

组别	骨质钙/(mg·g ⁻¹)	骨质磷/(mg·g ⁻¹)	BGP/(ng·mL ⁻¹)	TRAP/(pg·mL ⁻¹)
I组	207.5 ± 15.8	168.9 ± 9.3	2037.5 ± 168.8	290.7 ± 17.5
II组	129.9 ± 9.7*	115.7 ± 7.6*	2689.6 ± 195.3*	389.6 ± 20.3*
III组	162.5 ± 10.6 [#]	139.3 ± 8.5 [#]	2380.9 ± 155.6 [#]	317.5 ± 16.2 [#]

与I组比较, * $P<0.05$; 与II组比较, [#] $P<0.05$ 。

Compare with group I, * $P<0.05$; compare with group II, [#] $P<0.05$.

表3 各组大鼠的肱骨生物力学比较($n=20, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of femoral biomechanics in the three groups ($n=20, \bar{x} \pm s$)

组别	P _{max}	L _{max}	M _{max}	σ /(N·mm ⁻²)	骨应变/%
I组	103.41 ± 7.28	0.98 ± 0.24	465.6 ± 40.5	99.41 ± 12.65	4.52 ± 1.35
II组	86.46 ± 6.85*	0.85 ± 0.35*	380.4 ± 36.4*	82.25 ± 11.60*	4.04 ± 1.20*
III组	96.83 ± 6.89 [#]	1.23 ± 0.13 [#]	455.3 ± 50.2 [#]	98.61 ± 12.94 [#]	4.66 ± 0.87 [#]

与I组比较, * $P<0.05$; 与II组比较, [#] $P<0.05$ 。

Compare with group I, * $P<0.05$; compare with group II, [#] $P<0.05$.

3 讨论

骨质疏松症骨骼中骨量减少、微结构破坏、骨脆性增加、骨折危险度增加, 严重威胁绝经妇女和老年人健康^[10], 急需寻找新的药物治疗方法^[11]。维甲酸是维生素A的衍生物, 实验表明其可影响骨的生长、发育和代谢, 其既可增加成骨细胞的数量, 又可刺激破骨细胞使其活性增强, 骨代谢呈现高转换型改变, 趋势是骨吸收大于骨生成^[12]。有研究^[13]报道: 与其他的骨质疏松动物模型相比, 维甲酸所致的大鼠骨质疏松在病因上与人类骨质疏松虽不同, 但与人类在对雌激素的骨反应、发病症状及组织形态学表现上极为相似, 如明显的骨小梁稀疏、断裂、间隙扩大, 骨皮质变薄和骨髓腔扩大、骨密度降低。维甲酸所致的

骨质疏松实验动物模型操作简便、时间短、成功率高、可复制性好^[14]。本实验采用每天80 mg/kg的维甲酸连续灌胃21 d后, 见模型组大鼠的体重、骨密度、骨的干湿重较对照组显著降低, 同时肱骨的骨钙和磷矿物质的含量降低; 大鼠肱骨P_{max}、L_{max}、M_{max}、 σ 和骨应变降低, 提示维甲酸降低大鼠骨骼的结构力学特性和材料力学性能, 使其在遭受外力的情况下本身的抵抗性能减弱, 容易发生骨折, 与临床的骨质疏松患者的易骨折的特点相符, 证实维甲酸实验性大鼠骨质疏松模型是成功有效的。在正常的机体当中, 骨的吸收和生成处于一个动态稳定的平衡之中, 而骨质疏松的患者这一动态平衡被打破, 骨的吸收大于生成。在本研究中血清中反映骨生成的指标BGP和骨吸收的指标TRAP在模型组中较对照组均显著增高, 进

一步提示成骨细胞和破骨细胞均呈活跃的高转换状态^[15]。

咪达普利是常见ACEI类药物, 广泛应用于抗高血压治疗^[5]。新近的流行病学研究^[16]表明在老年患者中, ACEI类药物能够降低服用者骨折的风险, 其机制尚不清楚。骨组织中存在局部的肾素血管紧张素系统^[17], 且成骨和破骨细胞均可表达合成血管紧张素酶和其受体^[18]。有研究^[19]表明: 血管紧张素II能促进破骨细胞的分化和增殖, 破坏骨吸收和形成的平衡, 骨吸收大于生成, 最终骨量下降、骨微结构破坏。研究^[19]证实血管紧张素II能够抑制骨钙素, 降低ALK的活性, 减少骨质矿化和钙沉积。也有学者^[20]认为血管紧张素II能够刺激破骨细胞的成熟和分化而影响骨代谢, 同时部分学者认为血管紧张素II影响骨质疏松可能与骨的微环境的炎症和血管生成相关, 部分学者^[21]报道ACEI类药物也可促进骨折愈合。在本研究中发现, 与模型组对比, 咪达普利能显著拮抗维甲酸所致的大鼠体重降低。咪达普利组骨干湿重较模型组无统计学差异, 但骨密度显著增加, 但在咪达普利组其明显能拮抗维甲酸所致的大鼠的骨质丢失, 如骨密度增加、骨干湿重增加。咪达普利组较模型组骨中矿物质钙、磷含量增加, 血清中BGP的浓度增加, 而TRAP的浓度较模型组降低, 提示在咪达普利对维甲酸所致的大鼠的骨质疏松具有一定的拮抗作用。我们推测, ACEI类药物咪达普利能够抑制血管紧张素转化为血管紧张素II, 从而调节成骨细胞和破骨细胞的代谢, 促进骨的形成、抑制骨的吸收, 对骨质疏松发挥一定的保护作用。

骨质疏松患者的最大并发症是意外骨折的发生率增加, 而骨折与骨的生物力学特性密切相关^[22]。维甲酸处理后的大鼠肱骨的最大载荷、最大挠度、最大弯矩、骨应力和骨应变降低均较对照组降低。而本研究发现: 咪达普利组的大鼠的肱骨在骨的最大载荷、最大挠度、最大弯矩、骨应力和骨应变降低均较模型组改善, 其可能的原因与咪达普利能拮抗维甲酸所致大鼠骨质流失, 增加骨质, 与钙、磷矿物质的沉积有关^[23], 其结果与临床的流行病学中服用ACEI类抗高血压药物的患者骨折较对照组低相吻合, 但具体的详细机制尚待进一步研究^[24]。

综上所述, 咪达普利对维甲酸所致的大鼠实验性骨质疏松具有拮抗作用: 其能增加大鼠的体重, 改善骨密度, 增加干湿重, 减少骨质流失, 促进骨形成和矿物质的沉积, 增加骨的生物力学强度, 减少骨折的发生。同时, ACEI为RAS系统的一

员, 进一步研究RAS系统在骨质疏松中的作用, 为寻找骨质疏松的治疗药物提供了新方向。

参考文献

1. Nakagami H, Morishita R. Hypertension and osteoporosis[J]. *Clin Calcium*, 2013, 23(4): 497-503.
2. Verbruggen SW, Vaughan TJ, McNamara LM. Mechanisms of osteocyte stimulation in osteoporosis[J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2016, 62: 158-168.
3. Cairoli E, Zhukouskaya VV, Eller-Vainicher C, et al. Perspectives on osteoporosis therapies[J]. *J Endocrinol Invest*, 2015, 38(3): 303-311.
4. Zhao S, Niu F, Xu CY, et al. Diosgenin prevents bone loss on retinoic acid-induced osteoporosis in rats[J]. *Ir J Med Sci*, 2016, 185(3): 581-587.
5. Marc Y, Llorens-Cortes C. The role of the brain renin-angiotensin system in hypertension: Implications for new treatment[J]. *Prog Neurobiol*, 2011, 95(2): 89-103.
6. Gebru Y, Diao TY, Pan H, et al. Potential of ras inhibition to improve metabolic bone disorders[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 932691.
7. Yamamoto S, Kido R, Onishi Y, et al. Use of renin-angiotensin system inhibitors is associated with reduction of fracture risk in hemodialysis patients[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0122691.
8. Solomon DH, Ruppert K, Zhao Z, et al. Bone mineral density changes among women initiating blood pressure lowering drugs: A swan cohort study[J]. *Osteoporos Int*, 2016, 27(3): 1181-1189.
9. Bayar A, Turan A, Gulle K, et al. The effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril and the angiotensin ii type 1 receptor blocker losartan on fracture healing in rats[J]. *Clin Invest Med*, 2015, 38(4): E164-E172.
10. Leigh L, Byles JE, Chojenta C, et al. Late life changes in mental health: A longitudinal study of 9683 women[J]. *Aging Ment Health*, 2016, 20(10): 1044-1054.
11. Reginster JY, Neuprez A, Dardenne N, et al. Efficacy and safety of currently marketed anti-osteoporosis medications[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2014, 28(6): 809-834.
12. Ranhotra HS. The interplay between retinoic acid receptor-related orphan receptors and human diseases[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2012, 32(4): 181-189.
13. Liu RH, Kang X, Xu LP, et al. Effects of the combined extracts of herba epimedii and fructus ligustri lucidi on bone mineral content and bone turnover in osteoporotic rats[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 112.
14. Komori T. Animal models for osteoporosis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 759: 287-294.

15. Szulc P. The role of bone turnover markers in monitoring treatment in postmenopausal osteoporosis[J]. Clin Biochem, 2012, 45(12): 907-919.
16. Tang Y, Hu X, Lu X. Captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, possesses chondroprotective efficacy in a rat model of osteoarthritis through suppression local renin-angiotensin system[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(8): 12584-12592.
17. Goto M, Hoxha N, Osman R, et al. The renin-angiotensin system and hypertension in autosomal recessive polycystic kidney disease[J]. Pediatr Nephrol, 2010, 25(12): 2449-2457.
18. Zhang FY, Yang FJ, Yang JL, et al. Renin inhibition improves ovariectomy-induced osteoporosis of lumbar vertebra in mice[J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37(12): 1994-1997.
19. Lee K, Kim H, Park HS, et al. Targeting of the osteoclastogenic rankl-rank axis prevents osteoporotic bone loss and soft tissue calcification in coxsackievirus b3-infected mice[J]. J Immunol, 2013, 190(4): 1623-1630.
20. Shimizu H, Nakagami H, Morishita R. Activation of osteoclasts by raas and strategy of target therapy on bone metabolic diseases[J]. Nihon Rinsho, 2012, 70(9): 1524-1529.
21. Zhao X, Wu Z, Zhang Y, et al. Locally administrated perindopril improves healing in an ovariectomized rat tibial osteotomy model[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33228.
22. Danila MI, Outman RC, Rahn EJ, et al. A multi-modal intervention for activating patients at risk for osteoporosis (apropos): Rationale, design, and uptake of online study intervention material[J]. Contemp Clin Trials Commun, 2016, 4: 14-24.
23. Donmez BO, Ozdemir S, Sarikanat M, et al. Effect of angiotensin ii type 1 receptor blocker on osteoporotic rat femurs[J]. Pharmacol Rep, 2012, 64(4): 878-888.
24. Egund L, McGuigan F, Onnby K, et al. High prevalence of osteoporosis in men with distal radius fracture: A cross-sectional study of 233 men[J]. Calcif Tissue Int, 2016, 99(3): 250-258.

本文引用: 杨平, 尚晓强. 咪达普利对实验性骨质疏松大鼠的骨代谢和生物力学的影响[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(6): 1130-1135. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.06.009

Cite this article as: YANG Ping, SHANG Xiaoqiang. Effect of imidapril on bone metabolism and biomechanics in rats with experimental osteoporosis induced by retinoic acid[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2017, 37(6): 1130-1135. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.06.009