



泼尼松灌胃与肌肉注射对大鼠骨密度、骨生物力学性能及骨代谢的影响

梁德^{1,2}, 唐晶晶¹, 江晓兵^{1,2}, 姚珍松^{1,2}, 张顺聪^{1,2}, 杨志东^{1,2},
魏秋实¹, 崔健超¹, 任辉¹, 沈耿杨¹, 林顺鑫¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

【摘要】 目的 观察泼尼松灌胃与肌肉注射两种不同给药方法对大鼠骨密度、骨生物力学及骨代谢的影响。方法 将45只SPF级雄性SD大鼠随机分为3组(正常组15只、灌胃组15只、肌肉注射组15只),其中正常组大鼠作为阴性对照,予0.9%生理盐水灌胃2 mL/d;灌胃组大鼠给予泼尼松0.5 mg/(kg·d)灌胃;肌肉注射组大鼠给予泼尼松0.5 mg/(kg·d);12周后测定离体的大鼠椎体骨密度及血清 β -CTX、PINP水平变化,采用三点弯曲试验测量股骨皮质骨最大载荷、弹性载荷、断裂载荷等生物力学指标。结果 与正常组相比,灌胃组及肌肉注射组大鼠椎骨骨密度值均显著性降低($P < 0.05$);与灌胃组相比,肌肉注射组大鼠椎骨骨密度显著下降($P < 0.05$);与正常组相比,灌胃组及肌肉注射组大鼠股骨的弹性载荷、最大载荷、断裂载荷均显著降低($P < 0.05$),肌肉注射组与灌胃组大鼠的弹性载荷、最大载荷、断裂载荷相比差异无显著性($P > 0.05$)。与正常组相比,灌胃组及肌肉注射组大鼠血清 β -CTX水平均显著升高($P < 0.05$)而PINP水平均显著降低($P < 0.05$),与灌胃组相比,肌肉注射组大鼠血清 β -CTX水平显著升高($P < 0.05$)而PINP水平显著降低($P < 0.05$)。骨组织切片HE染色显示:肌肉注射组大鼠的骨小梁明显纤细疏松,造血组织明显减少,脂肪组织明显增多。结论 泼尼松对大鼠的骨密度、骨生物力学及骨代谢指标都有影响,而肌肉注射泼尼松比口服对骨密度、骨强度、骨代谢的影响更大,更易造成骨质疏松症。因此,建议临床使用泼尼松时选择口服作为给药方式更安全。

【关键词】 不同给予途径;泼尼松;大鼠;骨密度;骨生物力学;骨代谢

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014)06-0085-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.06.015

Comparison of the effects of gastric gavage and intramuscular injection of prednisone on bone mineral density, skeletal biomechanical properties and bone metabolism in rats

LIANG De^{1,2}, TANG Jing-jing¹, JIANG Xiao-bing^{1,2}, YAO Zhen-song^{1,2}, ZHANG Shun-cong^{1,2},
YANG Zhi-dong^{1,2}, WEI Qiu-shi¹, CHUI Jian-chao¹, REN Hui¹, SHEN Geng-yang¹, LIN Shun-xing¹

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405)

【Abstract】 Objective To compare the effects of gastric gavage and intramuscular injection of prednisone on the bone mineral density, skeletal biomechanical properties and bone metabolism in rats. **Methods** A total of 45 SPF rats were randomly divided into three groups: normal group, intragastric administration group, and intramuscular injection group. The normal group, as a control group, was administrated with normal saline 2 mL per day, both the intragastric administration group and i. m. injection group received prednisone 0.5 mg/(kg·d) for 12 weeks. All rats were examined for bone mineral density (BMD) and the

【基金项目】 广东省教育厅学科建设专项基金(育苗工程)(2013LYM-0012);广州中医药大学优秀青年学者科研基金项目(KAB110133K04);广东省自然科学基金(S2013010015870)。

【作者简介】 梁德(1961-),男,主任医师,博士研究生导师,广州中医药大学第一附属医院。E-mail: 249943192@qq.com。

【通讯作者】 江晓兵。E-mail: 374595810@qq.com。

level of serum β -CTX and PINP. The femoral cortical biomechanical properties (elastic load, maximal load, rupturing load) were measured by three point bending test. **Results** After 12 weeks, compared with the normal group, BMD and elastic load, maximal load, and rupturing load of the femur were significantly decreased. Compared with the intragastric gavage group, BMD was significantly decreased, while the elastic load, maximal load, and rupturing load of the femur were not significantly changed in the i. m. injection group ($P < 0.05$ for all). Compared with the normal group, the level of serum β -CTX was significantly raised ($P < 0.05$) and the level of serum PINP was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the intragastric gavage group, the level of serum β -CTX was also significantly raised ($P < 0.05$), the level of serum PINP was significantly decreased ($P < 0.05$), the bone trabecula and hemopoietic tissue were obviously decreased, while the adipose tissue increased obviously.

Conclusions Both intragastric gavage and intramuscular injection of prednisone affect the level of BMD, skeletal biomechanical properties and bone metabolism. However, i. m. injection of prednisone decreases the BMD and bone strength more significantly, leading to a higher bone turnover with increased bone resorption, and leads to osteoporosis earlier. Our results may suggest that oral administration of prednisone is more safe in clinical treatment.

【Key words】 Prednisone; Oral administration; Intramuscular injection; Rat; Bone mineral density; Skeletal biomechanical properties; Bone metabolism

糖皮质激素在结缔组织病、免疫系统疾病、肾脏疾病、器官移植、哮喘、休克等领域被广泛应用,超生理剂量的皮质醇对骨组织的发育、生长有着明显不利的影响。20 世纪 30 年代一些美国学者就对糖皮质激素所致的骨质疏松 (glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 有了详细描述。GIOP^[1-3] 是临床常见的继发性骨质疏松的首要原因,也是骨质疏松的第三位原因^[4]。GIOP 随着糖皮质激素的广泛应用也越来越常见,因此对于 GIOP 寻找有效的干预措施具有重要意义,也因此成为医学界急待解决的课题。在维持激素用量的条件下,作者观察了相同时间内不同的给药方法是否可以减少激素对骨密度、骨生物力学、骨代谢、病理形态等方面的影响,为临床运用激素的给药方式提供参考依据。

1 实验材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 45 只,5~7 周龄,雄性,体重 (200 ± 20)g,购于广州中医药大学动物中心【SCXK(粤)2013-0020】。实验在广州中医药大学第一附属医院实验动物中心屏障动物实验设施进行【SYXK(粤)2010-0092】,饲养温度 (22 ± 3) $^{\circ}\text{C}$,湿度 55%~75%,自然光节律,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 药物与仪器

泼尼松(厂家:广东三才石岐制药有限公司,批号:国药准字 H14020327);生理盐水(厂家:四川科伦药业股份有限公司,批号:N14011602-1);双能 X 线吸收骨密度仪(美国 Hologic 公司)等。

1.3 动物分组与造模

将 SPF 级雄性 SD 大鼠 45 只随机分为正常组、

灌胃组、肌内注射组($n = 15$),其中正常组大鼠作为阴性对照,给予生理盐水灌胃 2 mL/d,灌胃组大鼠给予泼尼松 0.5 mg/(kg·d)灌胃;肌内注射组大鼠给予泼尼松 0.5 mg/(kg·d),连续干预 12 周后,将各组大鼠 10% 利多卡因腹腔注射麻醉处死,取大鼠血清、腰椎骨、股骨,剔除肌内和结缔组织,用生理盐水浸泡的湿纱布包裹, -80°C 密封保存,用于骨生物学及骨 BMD 检测。

1.4 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件进行数据统计与分析。数据结果采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间数据比较采用 t 检验或单因素方差分析 (one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为有显著性统计学差异,以 $P < 0.01$ 为有极显著性统计学差异。

2 结果

2.1 血清 β -CTX、PINP 水平及椎骨骨密度

取各组大鼠血清测定 β -CTX、PINP 水平、椎骨采用双能 X 线吸收骨密度仪(美国 Hologic 公司)检测各组大鼠腰 4~6 椎体的 BMD,采用单位面积内的骨矿物质含量 (g/cm^2) 表示。结果,与正常组相比,灌胃组及肌内注射组大鼠中血清 β -CTX 水平均显著升高 ($P < 0.05$) 而 PINP 水平均显著降低 ($P < 0.05$),与灌胃组相比,肌内注射组大鼠血清 β -CTX 水平显著升高 ($P < 0.05$) 而 PINP 水平显著降低 ($P < 0.05$)。与正常组相比,灌胃组、肌内注射组大鼠椎骨骨密度值均明显下降 ($P < 0.05$);与灌胃组相比,肌内注射组大鼠椎骨骨密度值降低 ($P < 0.05$),见表 1。

2.2 生物力学指标

采用三点弯曲试验:取各组大鼠的左侧股骨,解

冻,作为试样,将其置于微机控制电子万能试验机支座上,跨距 20 mm,加载速度 1 mm/min。用游标卡尺测量股骨中段的长轴、短轴及长短轴方向的壁厚,由载荷形变曲线可以得出最大载荷、断裂载荷、弹性载荷等数

值。结果,与正常组相比,灌胃组及肌内注射组大鼠股骨的弹性载荷、最大载荷、断裂载荷均明显降低($P < 0.05$),肌内注射组与灌胃组大鼠的弹性载荷、最大载荷、断裂载荷相比差异无显著性($P > 0.05$),见表 2。

表 1 血清 β -CTX、PINP 水平及骨密度测定结果($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Tab. 1 Measurement results of BMD, β -CTX, and PINP in the rats

组别 Groups	BMD 骨密度	β -CTX I 型胶原羧基端肽	PINP I 型前胶原氨基端前肽
正常组 Normal control	0.314 \pm 0.0020	20.77 \pm 3.4100	267.89 \pm 42.8100
肌内注射组 i. m. injection	0.274 \pm 0.0082 ^{a b}	66.23 \pm 6.2200 ^{a b}	202.95 \pm 32.1700 ^{a b}
灌胃组 i. g. administration	0.289 \pm 0.1136 ^a	45.34 \pm 4.9300 ^a	235.74 \pm 38.9700 ^a

注:与正常组相比,^a $P < 0.05$;与灌胃组相比,^b $P < 0.05$ 。

Note. ^a $P < 0.05$, vs. normal group; ^b $P < 0.05$, vs. intragastric administration group.

表 2 三点弯曲试验力学参数变化($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Results of three-point bending test of the bones

组别 Groups	弹性载荷 Elastic load	最大载荷 Maximal load	断裂载荷 Rupturing load
正常组 Normal control	110.55 \pm 1.51	146.26 \pm 4.29	125.95 \pm 2.72
肌内注射组 i. m. injection	88.69 \pm 8.50 ^{cd}	108.89 \pm 2.94 ^{cd}	93.27 \pm 3.56 ^{cd}
灌胃组 i. g. administration	96.25 \pm 7.14 ^c	112.09 \pm 3.53 ^c	102.14 \pm 7.58 ^c

注:与正常组相比,^c $P < 0.05$;与灌胃组相比,^d $P > 0.05$ 。

Note. ^c $P < 0.05$, vs. normal group; ^d $P > 0.05$, vs. intragastric administration group.

2.3 骨组织形态学检测

(采用日本 Olympus 显微镜观察神经根组织的病理改变并摄影)组织切片 HE 染色显示 12 周后,正常组大鼠骨小梁饱满,形态结构完整,骨髓细胞数量较多。灌胃组大鼠骨小梁疏松,形态结构欠完整,造血组织减少,脂肪细胞较正常大鼠组增多。肌内注射组大鼠的骨小梁明显纤细疏松,形态结构断裂、扭曲,造血组织明显减少,脂肪组织大量增多(见图 1,彩插 14)。

3 讨论

目前,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,在该疾病病因病理探讨及防治上,很多国内外学者进行了大量的动物模型实验,建立激素性骨质疏松动物模型^[5],运用各种药物进行干预,取得了一定的研究进展。相关实验表明长期服用激素导致骨质疏松症的患病率仅次于绝经后骨质疏松症,为 20 ~ 40 岁人群骨质疏松症最常见原因之一^[6-7],然其具体发病机制尚不明确。部分学者认为过量的糖皮质激素会抑制成骨细胞前体细胞的分化和影响成熟成骨细胞的功能,促进成骨细胞和骨细胞的凋亡,使骨细胞数目减少。糖皮质激素的使用时间及总量是导致骨质疏松的观点尚存在争论^[8-10],很多学者认为长期使用糖皮质激素为诱发骨质疏松的重要因素,然而 Hall 和 Lane 等^[11-12]的研究表明,曾经使用过糖皮质激素的患者停用一段

时间后与未使用过糖皮质激素者 BMD 相同。这说明骨量的丢失是可逆的,停用糖皮质激素后 BMD 会逐渐增加。目前大多数争议都围绕在糖皮质激素的使用时间和剂量对骨密度及其他相关指标的研究上,而对于不同途径的给药方式对骨密度、骨生物学、骨代谢方面的影响的研究尚不多见。由于大多数患者因不同的急慢性疾病而需要长时间服用激素,很多患者达到维持量后减药困难,找到一种合理的激素摄取方式可能会减少对骨密度、骨生物学、骨代谢的影响,从而减少骨质疏松的发生风险。吴天秀^[13]也通过实验发现长期使用高剂量糖皮质激素,不论是每日给药还是隔日给药均可以引起大鼠骨量减少,发生骨质疏松。与此同时,骨质疏松除了骨量减少的因素外,还与骨结构因素和骨内微损伤的数量有关,骨微损伤存在于活体骨中并影响骨组织微结构性质和功能。骨小梁退行性改变与显微骨折导致了骨小梁结构强度下降。因此骨显微结构的改变可以更直接地反映骨质疏松情况。近年来,国内外很多研究显示骨形成标志物 I 型前胶原氨基端前肽^[14] (procollagen type I N-propeptide, PINP) 及骨吸收标志物 I 型胶原羧基端肽^[15] (C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen, β -CTX) 灵敏度、特异性、准确性均较高,是评价骨代谢的良好指标。测定血清 PINP、 β -CTX 的含量不仅对了解骨代谢变化,观察成骨细胞的功能状态和破骨细胞的活性具有重要意义,而且为骨质疏松的诊断及治疗提供了有价值的指标。Engvall 等^[16]通过一项临床

研究发现长期服用低剂量的泼尼松龙对早期内风湿性关节炎的患者会导致骨密度快速的降低, PINP、 β -CTX 的含量都降低, 但 PINP 下降更明显和快速, 反映成骨能力显著降低, 从而导致骨质疏松的产生。

本实验通过不同的途径给予泼尼松, 并于 12 周时测定大鼠相关指标, 进行统计学分析。实验结果显示, 无论是口服或肌内注射泼尼松都会导致大鼠骨密度降低, 且肌内注射组大鼠椎骨骨密度降低最显著。这表明肌内注射泼尼松的给药方法能更快的降低骨密度, 从而可能更快诱发骨质疏松。骨生物力学指标是骨量、形态、结构和完整程度的综合体现, 能直接反映骨强度和抗骨折能力^[17-18], 已成为评价骨骼特性和抗骨质疏松药物疗效不可缺少的指标生物力学特性包括骨的材料特性和结构特性两个方面。由于结构特性已经可以反映骨骼抵抗外力的能力, 所以在本实验中, 我们只检测骨的结构特性指标, 运用股骨三点弯曲试验分别测定了弹性载荷、最大载荷、断裂载荷等指标, 研究显示, 口服组及肌内注射组大鼠股骨的弹性载荷、最大载荷、断裂载荷均明显低于正常组, 肌内注射组大鼠的弹性载荷、最大载荷、断裂载荷等指标与口服组相比无显著差异。这表明由于激素的运用使得骨表面骨吸收活动的增强, 造成松质骨骨量减少, 尤其是造成骨结构破坏是导致 GIOP 大鼠松质骨骨强度明显下降。此外, 在本次研究中发现血清 PINP 水平明显降低、 β -CTX 的含量升高, 且都具有统计学差异, 这与部分学者报道有所差异, 这可能是由于早期激素的使用导致了一个高转换的骨代谢状态, 成骨和破骨的稳态失衡所致。由此可见, 肌内注射泼尼松可能会更快破坏骨稳态和骨细微结构, 更快导致骨质疏松的产生, 本次实验的病理组织切片观察也显示口服组与肌内注射组大鼠的骨小梁纤细疏松, 造血组织减少, 脂肪组织增多, 且肌内注射组表现更明显, 从而进一步印证了这一论点。

上述实验结果表明激素的运用会影响大鼠骨密度、骨生物力学及骨代谢的变化, 且不同的激素给药方式所造成的影响存在一定的差异性。肌内注射泼尼松会更快的减低骨密度、降低骨强度, 破坏骨细微结构, 从而更早期的诱发骨质疏松, 由此可为临床上一些不得不长期或短期使用激素的患者在用药方式的选择上提供一定的实验依据, 以期更好的达到预防骨质疏松并发症的目的。

(本文图 1 见彩插 14)。

参 考 文 献

- [1] Govindarajan P, Khassawna T, Kampschulte M, et al. Implications of combined ovariectomy and glucocorticoid (dexamethasone) treatment on mineral, microarchitectural, biomechanical and matrix properties of rat bone [J]. *Int J Exp Pathol*. 2013, 94(6): 387-398.
- [2] Feldstein AC, Elmer PJ, Nichols GA, et al. Practice patterns in patients at risk for glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Osteoporos Int*, 2005, 16(12): 2168-2174.
- [3] 张凤丽, 邢小平. 糖皮质激素所致骨质疏松症的临床研究进展 [J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2007, 27(1): 62-64.
- [4] Hansen LB, Vondracek SF. Prevention and treatment of non-postmenopausal osteoporosis [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2004, 61(24): 2637-2654.
- [5] Li BF, Yuan Z, Chen B, et al. Characterization of a rabbit osteoporosis model induced by ovariectomy and glucocorticoid [J]. *Acta Orthop*, 2010, 81(3): 396-401.
- [6] Vestergaard P, Reinmark L, Mosekilde L. Fracture risk associated with systemic and topical corticosteroids [J]. *Intern Med*, 2005, 257(4): 374-384.
- [7] 廖二元. 糖皮质激素所致骨质疏松症的预防和治疗 [J]. *药品评价*, 2012, 9(7): 28-35.
- [8] Van Everdingen AA, Siewertsz van Reesema DR, Jacobs JW, et al. Low-dose glucocorticoids in early rheumatoid arthritis: discordant effects on bone mineral density and fractures [J]. *Clin Exp Rheumatol*. 2003, 21(2): 155-160.
- [9] Kelly C, Bartholomew P, Lapworth A, et al. Peripheral bone density in patients with rheumatoid arthritis and factors which influence it. *Eur J Intern Med*, 2002, 13(7): 423.
- [10] Kirwan JR. The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. The Arthritis and Rheumatism Council Low-Dose Glucocorticoid Study Group [J]. *N Engl J Med*. 1995, 333(3): 142-146.
- [11] Hall GM, Spector TD, Griffin AJ, et al. The effect of rheumatoid arthritis and steroid therapy on bone density in postmenopausal women [J]. *Arthritis Rheum*, 1993, 36(11): 1510-1516.
- [12] Lane NE, Pressman AR, Star VL, et al. Rheumatoid arthritis and bone mineral density in elderly women. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group [J]. *J Bone Miner Res*. 1995, Feb; 10(2): 257-263.
- [13] 吴天秀, 王宏芬, 谢华, 等. 骨形态计量学观察糖皮质激素的不同剂量和不同的给药方法对大鼠松质骨的影响 [J]. *国际医药卫生报*, 2006, 12(04): 7-9
- [14] Krege JH, Lane NE, Harris JM, et al. PINP as a biological response marker during teriparatide treatment for osteoporosis [J]. *Osteoporos Int*, 2014, 25(9): 2159-2171.
- [15] Saag K, Lindsay R, Knegman A, et al. A single zoledronic acid infusion reduces bone resorption markers more rapidly than weekly oral alendronate in postmenopausal women with low bone mineral density [J]. *Bone*, 2007, 40: 1238-1243.
- [16] Engvall IL, Svensson B, Tengstrand B, et al. Impact of low-dose prednisolone on bone synthesis and resorption in early rheumatoid arthritis: experiences from a two-year randomized study [J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(6): R128.
- [17] 鞠大宏, 张春英, 吕爱平, 等. 滋补肾阴方与温补肾阳方对卵巢切除所致骨质疏松大鼠治疗作用的对比研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2002, 10(4): 215-218.
- [18] 谢伟平, 梁晓萍, 李岚, 等. 降钙素对骨质疏松大鼠骨密度形态计量学与骨代谢的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2006, 14(4): 285-286.

[收稿日期] 2014-08-25