

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01402

马来酸罗格列酮对去势大鼠骨微结构的影响

陈胜广, 张倩, 盛春君, 程晓云, 杨篷, 曲仲, 吴国亭, 李文君*

同济大学附属上海市第十人民医院内分泌科, 上海 200072

[摘要] **目的:** 研究马来酸罗格列酮对去势大鼠骨微结构的影响。**方法:** 21只24周龄Wistar大鼠双侧卵巢切除, 随机分为对照组、罗格列酮A(RA)组、罗格列酮B(RB)组, 每组7只。RA组、RB组每只大鼠分别给予马来酸罗格列酮0.35 mg/d、0.70 mg/d(以生理盐水溶解灌胃), 对照组以相同体积生理盐水灌胃。给药4周后使用micro-CT分别测定股骨、胫骨、椎骨的骨量/组织量(BV/TV)、骨小梁数目(Tb. N)、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁分离度(Tb. Sp)、骨表面积/骨量(BS/BV)。**结果:** 与对照组相比, RA组及RB组各部位(股骨、胫骨、椎骨)Tb. N、Tb. Th和BS/BV(RA组胫骨除外)均减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 胫骨、椎骨Tb. Sp增加($P < 0.05$), 股骨Tb. Sp无改变($P > 0.05$); 各部位BV/TV差异无统计学意义($P > 0.05$)。上述检测指标在RA组与RB组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:** 使用罗格列酮后, 骨微结构受到损伤, 且主要集中于松质骨。

[关键词] 罗格列酮; 卵巢切除术; 骨; X线微型计算机断层扫描

[中图分类号] R 588.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)12-1402-04

Effect of rosiglitazone on bone microarchitecture of bilaterally ovariectomized rats

CHEN Sheng-guang, ZHANG Qian, SHENG Chun-jun, CHENG Xiao-yun, YANG Peng, QU Shen, WU Guo-ting, LI Wen-jun*
Department of Endocrinology, the 10th People's Hospital of Shanghai, Tongji University, Shanghai 200072, China

[ABSTRACT] **Objective:** To study the effect of rosiglitazone on the bone microarchitecture of bilaterally ovariectomized(OVX) rats. **Methods:** Twenty-one 24-week-old skeletally mature rats were bilaterally ovariectomized, and were randomly divided into three groups ($n=7$): Control group(C group), Rosiglitazone A group(RA group), and Rosiglitazone B group (RB group). Rats in RA group were given i. g 0.35 mg/d rosiglitazone for four weeks and those in the RB group were given i. g 0.70 mg/d rosiglitazone. Rats in the control group were given normal saline in the same manner. The rats were sacrificed four weeks later. The bone volume/tissue volume (BV/TV), the trabecular number (Tb. N), the trabecular thickness (Tb. Th), the trabecular separation (Tb. Sp), and the bone surface/bone volume (BS/BV) of the femur, tibia, and lumbar were determined by micro-computered tomography(micro-CT). **Results:** Compared with the control group, the Tb. N, Tb. Th, and BS/BV of the femur, tibia, and lumbar all decreased significantly in RA group (except for the BS/BV of tibia) ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the Tb. Sp of tibia and lumbar in the RA group were significantly increased ($P < 0.05$); and there were no differences in BV/TV between the two groups. Compared with control group, the Tb. N, Tb. Th, and BS/BV of the femur, tibia, and lumbar were decreased significantly in RB group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the Tb. Sp of tibia and lumbar increased significantly ($P < 0.05$); and the BV/TV had no differences between the two groups. There were no significant differences between the RA group and RB group concerning all the parameters. **Conclusion:** Rosiglitazone can cause injury to the bone microarchitecture, especially to the cancellous part of the bone.

[KEY WORDS] rosiglitazone; ovariectomy; bone; micro-CT

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(12):1402-1405]

罗格列酮用于治疗2型糖尿病, 主要药理作用是改善肌肉和脂肪组织对胰岛素的敏感性以及抑制肝糖异生^[1]。一般情况下, 该药物具有很好的耐受

性, 但长期使用会导致包括水肿、贫血、肿瘤等在内的不良反应^[1-2]。糖尿病终点进展试验(ADOPT)结果显示罗格列酮增加骨折风险^[3]。Grey等^[4]研究证

[收稿日期] 2009-03-26 **[接受日期]** 2009-10-28

[基金项目] 上海市科委自然科学基金项目(07411963100), Supported by Foundation of Science and Technology Committee of Shanghai(07411963100).

[作者简介] 陈胜广, 硕士. E-mail: csg0720@yeah.net

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-66302531, E-mail: XYH1960@SH163.net

明罗格列酮能导致骨量丢失,骨密度明显降低伴随骨形成指标中等程度减少。既往研究已注意到骨量变化,但没有对骨的微结构作出进一步的研究。另外,罗格列酮抑制成骨细胞分化和骨形成的同时也促进脂肪细胞分化和脂肪细胞形成,导致模型动物骨髓脂肪化^[5-6]。因此通过双能 X-线吸收(DXA)值来反映骨密度进而评估骨丢失可能不准确,也无法真实反映骨骼内部结构。本研究使用 micro-CT 进行三维骨成像,并定量测定容量骨密度、骨小梁参数,评估罗格列酮对骨微结构的损伤,为临床合理用药提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组处理 雌性 Wistar 大鼠 21 只,24 周龄,体质量 180~200 g,SPF 级条件下饲养,室温 25℃,标准实验室饲料喂养,自由摄食及饮水,适应性饲养 1 周后用 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射行全身麻醉,从大鼠双侧背部肋下入路切除双侧卵巢。手术 1 周后开始给药,随机分成 3 组($n=7$),即对照组(C 组)、罗格列酮 A 组(RA 组)、罗格列酮 B 组(RB 组)。RA、RB 组每只大鼠分别给予马来酸罗格列酮(文迪雅,4 mg/片,葛兰素史克公司生产,批号:08050134)0.35、0.70 mg/d^[7]溶于 2 ml 生理盐水灌胃,C 组以相同体积生理盐水灌胃。给药 4 周。

1.2 取样 给药 4 周后,腹腔内注射 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)行全身麻醉,处死大鼠,取第 4 腰椎、股骨远端、胫骨近端各 1 cm 长度,10% 甲醛固定、低温冰箱 -20℃ 中保存 1 周后进行 micro-CT (μ -CT20,Scanco Medical,Bassersdorf,Switzerland) 检测。

1.3 Micro-CT 测定各指标 浸泡于甲醛溶液中的骨标本,取股骨远端和胫骨近端各 1 cm 置于样本盒中,扫描仪沿骨表面方向在高分辨模型下扫描。Micro-CT 值:最大像素 1 024×1 024;扫描厚度 20 μ m;分辨率 20 μ m。选择有意义的部位(VOI)扫描,扫描后通过扫描软件自动获得 2D 和 3D 图像,根据三维重建图像获得骨小梁数目(Tb. N, mm^{-1})、骨小梁厚度(Tb. Th,mm)、骨小梁分离度(Th. Sp,mm)、骨量/组织量(BV/TV,%)、骨表面积/骨量(BS/BV, mm^{-1})。

1.4 统计学处理 所有数据经 SPSS 13.0 软件处理。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,所得数据先作方差齐性检验,如果方差齐,采用单因素方差分析组间差别, F 检验有统计学意义时,使用 S-N-K 组内多重比较分析组内差别。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体质量测定及 micro-CT 检测结果 比较基线时 3 组动物体质量差异无统计学意义($P=0.613$)。比较基线时 2 组动物体质量差异无统计学意义($P=0.613$)。重复测量资料的组间效应方差分析结果: $F=2.856$, $P=0.113$,表明给药后大鼠体质量的差异无统计学意义(图 1)。

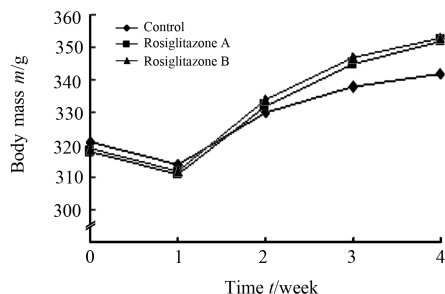


图 1 给药前后大鼠体质量变化

Fig 1 Weight of rats before and after medication
 $n=7, \bar{x}\pm s$

micro-CT 结果(图 2)表明:图 2C-2F 同图 2A、2B 相比,骨质密度减少,骨小梁分布变得稀疏,骨小梁由板状变成柱状,骨小梁数量明显变少,甚至出现骨小梁断裂、消失。

2.2 股骨测定结果 所有数据方差齐($P<0.05$)。组间比较显示,3 组间 Tb. N、Tb. Th、BS/BV 差异有统计学意义($F=4.832$, $P=0.038$; $F=4.479$, $P=0.045$; $F=6.106$, $P=0.021$),而 3 组间 BV/TV 和 Tb. Sp 差异无统计学意义(表 1)。组内多重比较显示,RA 组、RB 组 Tb. N、Tb. Th、BS/BV 均较 C 组明显减少($P=0.038$, $P=0.023$; $P=0.031$, $P=0.027$; $P=0.020$, $P=0.011$),但 RA 组与 RB 组之间差异无统计学意义($P=0.946$; $P=0.928$; $P=0.714$)。

2.3 胫骨测定结果 所有数据方差齐($P<0.05$)。组间比较显示,3 组间 Tb. N、Tb. Th、Tb. Sp、BS/BV 差异均有统计学意义($F=4.298$, $P=0.049$; $F=5.328$, $P=0.030$; $F=5.660$, $P=0.026$; $F=4.320$, $P=0.048$),而 3 组间 BV/TV 差异则无统计学意义(表 1)。组内多重比较显示,RA 组、RB 组 Tb. N、Tb. Th、Tb. Sp 均较 C 组明显减少($P=0.042$, $P=0.025$; $P=0.035$, $P=0.013$; $P=0.013$, $P=0.025$),RA 组与 RB 组之间差异无统计学意义($P=0.771$; $P=0.564$; $P=0.696$);RB 组 BS/BV 较 C 组明显减少($P=0.021$),BS/BV 在 RA 组与 C 组之间差异无统计学意义($P=0.057$),RA 组与 RB 组之间差异也无统计学意义($P=0.555$)。

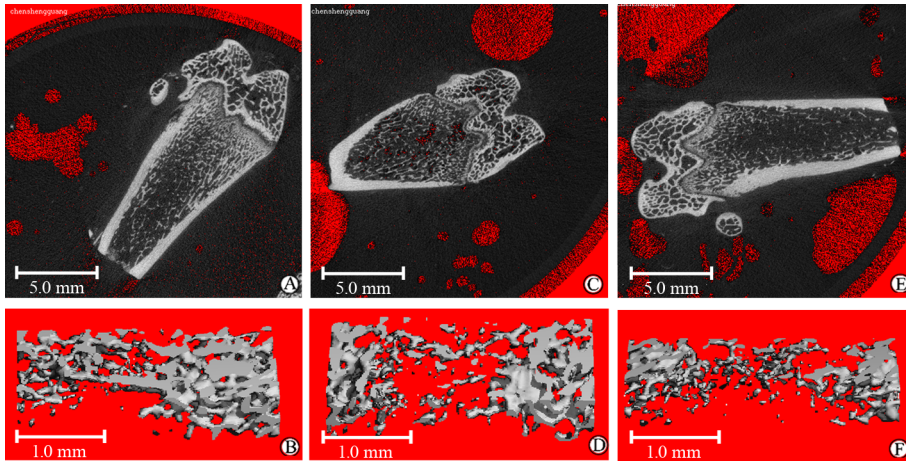


图 2 各组股骨 micro-CT 影像学表现

Fig 2 Micro-CT findings of femur in 3 groups

A,B;Control group; C,D; Rosiglitazone A group; E,F; Rosiglitazone B group; A,C,E;2D micro-CT; B,D,F;3D micro-CT

表 1 3 组动物股骨、胫骨、椎骨 micro-CT 检测结果比较

Tab 1 Comparison of micro-CT results on femur, tibia, and lumbar among three groups

(n=21, $\bar{x} \pm s$)

Index		BV/TV(%)	Tb. N(mm ⁻¹)	Tb. Th(l/mm)	Tb. Sp(l/mm)	BS/BV(mm ⁻¹)
C	Femur	0.081±0.030	3.532±0.350	0.081±0.025	0.311±0.043	42.623±3.534
	Tibia	0.125±0.025	4.086±0.485	0.064±0.005	0.229±0.032	45.439±8.919
	Lumar	0.363±0.061	3.894±0.434	0.099±0.008	0.252±0.037	22.905±2.177
RA	Femur	0.074±0.028	2.780±0.479	0.053±0.010	0.368±0.049	48.773±3.581
	Tibia	0.088±0.031	2.968±0.569	0.052±0.009	0.325±0.053	58.437±9.284
	Lumar	0.343±0.050	2.958±0.566	0.053±0.009	0.317±0.049	26.968±1.884
RB	Femur	0.076±0.189	2.781±0.323	0.518±0.020	0.369±0.026	49.599±1.802
	Tibia	0.091±0.027	2.827±0.877	0.049±0.004	0.313±0.045	61.947±5.576
	Lumar	0.331±0.022	3.036±0.306	0.051±0.007	0.333±0.029	27.861±2.918
P	P1	0.927	0.038	0.045	0.122	0.021
	P2	0.165	0.046	0.030	0.026	0.048
	P3	0.627	0.029	0.000	0.037	0.017

P₁: Value vs C, RA and RB group on femur; P₂: Value vs C, RA and RB group on tibia; P₃: Value vs C, RA and RB group on lumbar

2.4 椎骨测定结果 所有数据方差齐(P<0.05)。组间比较显示,3组间 Tb. N、Tb. Th、Tb. Sp、BS/BV差异均有统计学意义(F=5.374, P=0.029; F=45.719, P=0.000; F=4.851, P=0.037; F=6.636, P=0.017)。而3组间 BV/TV 差异均无统计学意义(表1)。组内多重比较显示,RA组、RB组 Tb. N、Tb. Th、Tb. Sp、BS/BV 均较C组明显减少(P=0.016, P=0.024; P=0.000, P=0.000; P=0.043, P=0.016; P=0.021, P=0.008), RA组与RB组相比差异无统计学意义(P=0.811; P=0.649; P=0.565; P=0.553)。

3 讨论

女性绝经后体内雌激素急剧下降,雌激素缺乏

导致骨量丢失增加或发生骨质疏松症^[6]。美国FDA推荐使用去势雌性大鼠作为研究绝经后女性骨骼情况的动物模型^[7]。本研究选择双卵巢切除大鼠作为研究对象,通过组间比较来反映罗格列酮对骨骼的影响。本研究采用非糖尿病的大鼠作为实验对象是为了减少糖尿病对骨骼代谢及微结构的影响,增加本研究结论的可信度。同时,罗格列酮对正常大鼠的血糖影响较小,已有临床研究证实罗格列酮也能导致没有糖尿病或骨质疏松症的绝经后健康女性骨量丢失,参与者股骨骨密度明显降低伴随骨形成指标中等程度减少^[4]。结合本研究目的,故在实验过程中没有监测血糖变化。关于罗格列酮对糖尿病大鼠骨骼的影响将是我们的下一步研究的内容。

本研究给予双侧卵巢切除大鼠罗格列酮4周后,

使用 micro-CT 对股骨远端、胫骨近端和椎骨进行成像, 检测指标包括 Tb. N、Tb. Th、Tb. Sp、BS/BV、BV/TV, 其中 Tb. N、Tb. Th、Tb. Sp、BS/BV 主要反映松质骨, BV/TV 主要反映皮质骨。Micro-CT 分析得到同一部位的二维、三维图像及相关骨结构数据。Rzonca 等^[5]报道, 每天给予 6 个月鼠龄的非糖尿病 C57BL/6 罗格列酮 20 mg/kg, 7 周后, 全身骨密度明显减少(24%), 并伴有骨形成受损的组织学证据, 如骨小梁宽度、骨小梁数目减少。Sottile 等^[6]在动物模型上的研究结果也显示罗格列酮可使双侧卵巢切除大鼠骨丢失增加, 给予罗格列酮 10 mg/kg 12 周后, 外周定量 CT(pQCT)检测显示, 治疗组比对照组骨丢失增加 31%。本研究结果证实罗格列酮导致骨微结构损伤。从统计数据看, 受损的骨小梁主要表现在其厚度变薄、数量减少、分离度增加^[5,8-11], 结合过氧化物酶体增殖物受体 γ (PPAR- γ)分子研究结果, 我们推测可能的机制是: 罗格列酮通过激活 PPAR- γ 抑制成骨细胞形成, 促进脂肪细胞形成, 同时可能促进破骨细胞形成, 导致骨吸收增强, 骨形成减少, 骨丢失增加, 骨小梁变细、变薄。同时我们发现, 反映皮质骨的 BV/TV 均没有变化, 提示罗格列酮对骨骼的影响可能有选择性, 其作用部位主要为松质骨或首先累及松质骨。人体研究发现, 罗格列酮导致的骨骼受损首先累及椎骨^[12], 而本研究没有发现首先累及椎骨, 推测是由于人类椎骨属于主要的负载部位, 因自身重力的影响而导致人体椎骨首先受累, 动物则并非如此。

本实验采用 micro-CT 测定骨结构, 有别于传统的研究方法。传统使用组织学方法获得骨组织切片, 进而获得二维图像, 计算出相关数据。相比而言, micro-CT 对骨组织无破坏性, 能得到较原始的数据, 且能得到三维结构数据。但 micro-CT 也有其自身的缺点, 如 VOI 有限, 所得到的只是代表整体的部分骨结构参数。

本研究明确了罗格列酮会导致大鼠骨骼受损, 但噻唑啉酮类药物(TZD)诱导的骨丢失作用于人体的程度和机制同相似年龄的啮齿动物是否有区别, 随着罗格列酮作用时间的延长, 受损的程度是否会

逐渐加重, 目前使用治疗骨质疏松的有效方法对此能否预防、治疗, 以及治疗停止后它是否会逆转等等, 对于上述问题, 我们正在进行研究。

(志谢 第二军医大学长征医院内分泌科顾明君教授对本文进行了指导, 特此感谢!)

[参考文献]

- [1] Stumvoll M, Haring H U. Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms[J]. *Ann Med*, 2002, 34:217-224.
- [2] Werner A L, Travaglini M T. A review of rosiglitazone in type 2 diabetes mellitus[J]. *Pharmacotherapy*, 2001, 21:1082-1099.
- [3] Kahn S E, Haffner S M, Heise M A, Herman W H, Holman R R, Jones N P, et al. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy[J]. *N Engl J Med*, 2006, 355:2427-2443.
- [4] Grey A, Bolland M, Gamble G, Wattie D, Horne A, Davidson J, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist rosiglitazone decreases bone formation and bone mineral density in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92:1305-1310.
- [5] Rzonca S O, Suva L J, Gaddy D, Montague D C, Lecka-Czernik B. Bone is a target for the antidiabetic compound rosiglitazone[J]. *Endocrinology*, 2004, 145:401-406.
- [6] Sottile V, Seuwen K, Kneissel M. Enhanced marrow adipogenesis and bone resorption in estrogen-deprived rats treated with the PPAR γ agonist BRL49653 (rosiglitazone)[J]. *Calcif Tissue Int*, 2004, 75:329-337.
- [7] Thompson D D, Simmons H A, Pirie C M, Ke H Z. FDA guidelines and animal models for osteoporosis[J]. *Bone*, 1995, 17(4 suppl):125S-133S.
- [8] Lazarenko O P, Rzonca S O, Hogue W R, Swain F L, Suva L J, Lecka-Czernik B. Rosiglitazone induces decreases in bone mass and strength that are reminiscent of aged bone[J]. *Endocrinology*, 2007, 148:2669-2680.
- [9] Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes—a meta-analysis[J]. *Osteoporos Int*, 2007, 18:427-444.
- [10] Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman E J, Kajkenova O, Lipschitz D A, Manolagas S C, et al. Inhibition of *Osf2/Cbfa1* expression and terminal osteoblast differentiation by PPAR- γ [J]. *J Cell Biochem*, 1999, 74:357-371.
- [11] Wan Y, Chong L W, Evans R M. PPAR- γ regulates osteoclastogenesis in mice[J]. *Nat Med*, 2007, 13:1496-1503.
- [12] Mosekilde L. Age-related changes in vertebral trabecular bone architecture—assessed by a new method[J]. *Bone*, 1988, 9:247-250.

[本文编辑] 尹 茶