

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00936

奈立膦酸钠对卵巢切除大鼠腰椎间盘退变的影响

吴 钊, 王 元, 王海波, 史建刚*

第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨奈立膦酸钠对卵巢切除大鼠骨质疏松相关腰椎间盘退变的影响。**方法** 3个月龄雌性SD大鼠随机分为3组($n=10$):假手术(Sham)组;卵巢切除+奈立膦酸钠(OVx+N)组,皮下注射奈立膦酸钠($15\ \mu\text{g}/\text{kg}$)每周2次,共6个月;卵巢切除+安慰剂(OVx+PBO)组,皮下注射相同剂量安慰剂。6个月后处死大鼠,进行骨密度(BMD)测定、骨组织形态计量学检测以及生物力学性能测试;通过组织学分析和评分确定椎间盘退化进程,并测量椎间隙高度和软骨终板厚度;采用蛋白质印迹法和 real-time RT-PCR 法测定卵巢切除大鼠椎间盘组织 I 型胶原(COL-I)、II 型胶原(COL-II)、基质金属蛋白酶1(MMP-1)、基质金属蛋白酶3(MMP-3)及基质金属蛋白酶13(MMP-13)的表达水平。**结果** 与OVx+PBO组相比,OVx+N组椎间盘骨密度、骨组织形态计量学指标以及生物学强度较好;组织学评估结果表明,OVx+N组大鼠椎间盘高度低于Sham组,软骨终板厚度高于Sham组,但差异无统计学意义,提示奈立膦酸钠有利于维持椎间盘高度,延缓软骨终板钙化程度;OVx+N组的组织学评分低于OVx+PBO组($P<0.05$),提示奈立膦酸钠可有效延迟椎间盘退化进程。分子生物学结果显示:与OVx+PBO组相比,OVx+N组椎间盘组织COL-I和COL-II水平升高($P<0.05$),且MMP-1、MMP-3及MMP-13在蛋白及基因表达水平均下降($P<0.05$)。**结论** 奈立膦酸钠能延迟卵巢切除大鼠腰椎间盘退化进程,可能与其保持腰椎结构完整性,促进COL-I和COL-II表达及抑制MMP-1、MMP-3、MMP-13表达有关。

[关键词] 奈立膦酸钠;卵巢切除术;腰椎;椎间盘;退变

[中图分类号] R 618.533 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)09-0936-07

Effect of neridronate on degeneration of lumbar disc in ovariectomized rats

WU Zhao, WANG Yuan, WANG Hai-bo, SHI Jian-gang*

Department of Orthopedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of neridronate on osteoporosis-associated degeneration of lumbar disc in ovariectomized rats. **Methods** Totally 30 female SD rats, aged 3 months old, were divided into three groups randomly: Sham group, OVx (ovariectomy) + N (neridronate) group (receiving a subcutaneous injection of $15\ \mu\text{g}/\text{kg}$ neridronate twice a week for 6 months), and OVx + PBO (placebo) group (receiving the same dosage of placebo). The rats were sacrificed and the bone mineral density (BMD), bone histomorphometry and biomechanical properties were measured 6 months later. The histological analysis and score were used to determine the process of lumbar disc degeneration, and the disc height index (DHI) and thickness of cartilage endplate (TCE) were also measured. The protein and mRNA expression levels of collagen type I (COL-I), collagen type II (COL-II), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) in the lumbar disc of ovariectomized rats were detected by Western blotting analysis and real-time RT-PCR, respectively. **Results** The BMD, bone histomorphometry and biomechanical properties were better in the OVx+N group compared with OVx+PBO group. Histological evaluation showed that the DHI of rats in the OVx+N group was shorter than that in the Sham group, and the TCE of rats in the OVx+N group was higher than that in the Sham group, but showing no significant difference, which indicated that neridronate could effectively maintain the DHI and delay the calcification of the cartilage endplate. The histological score of the OVx+N group was significantly lower than that of the OVx+PBO group ($P<0.05$), suggesting neridronate could delay the degeneration of lumbar disc. We also found that, compared with the OVx+PBO, the protein and mRNA expression levels of COL-I and COL-II in the OVx+N group were significantly higher and those of MMP-1, MMP-3 and MMP-13 were significantly reduced ($P<0.05$). **Conclusion** Neridronate can delay the process of lumbar disc degeneration in ovariectomized rats, which may be related to maintaining the integrity of

[收稿日期] 2015-01-20 **[接受日期]** 2015-05-22

[作者简介] 吴 钊, 硕士生. E-mail: wz461758450@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-818885631, E-mail: shijiangang616@163.com

lumbar, promoting COL- I and COL- II expression and suppressing MMP-1, MMP-3 and MMP-13 expression.

[Key words] neridronate; ovariectomy; lumbar vertebrae; intervertebral disc; degeneration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(9): 936-942]

骨关节退变(osteoarthritis, OA)和骨质疏松症(osteoporosis, OP)是老年人群,特别是绝经妇女面临的健康威胁^[1]。卵巢切除大鼠在骨量减少的同时发生腰椎间盘退变,提示绝经后骨质疏松也是促进骨关节退变发生的高危因素。研究表明,降钙素和雌激素对双侧卵巢切除大鼠均具有抑制骨量流失和延缓腰椎间盘退变的作用^[2-4];尼尔雌醇则可通过促进大鼠骨组织中 I 型胶原蛋白提高大鼠骨密度、改善骨质量^[5]。

阿仑膦酸钠作为一种氨基二膦酸盐类药物,具有抑制破骨细胞活性,减少骨量流失的作用,已被证实能改善骨关节退变^[6-7],并已广泛应用于骨质疏松症的治疗。奈立膦酸钠的结构与阿仑膦酸钠相似,同属于氨基二膦酸盐,二者结构差异在于侧链中甲基数量的不同^[8]。奈立膦酸钠在骨组织相关疾病中也有一定的功效,其对成骨不全患儿进行脊椎矫正的同时不会导致颌骨坏死^[9-10];在意大利奈立膦酸钠用于治疗成骨不全症和佩杰特病(变形性骨炎)等疾病^[11];适量的奈立膦酸钠在临床上有缓解急性 I 型局部疼痛综合征的功效,并且能提高地中海贫血症患者骨密度并减轻疼痛^[12-13]。

但目前尚未见关于奈立膦酸钠对卵巢切除大鼠腰椎间盘退变影响的文献报道。本研究首先建立双侧卵巢切除大鼠模型,再对其进行药物干预,并采用骨组织形态计量学、生物力学性能测试以及分子生物学等研究方法,评价奈立膦酸钠对双侧卵巢切除大鼠腰椎间盘退变的影响,为将其进一步开发为治疗腰椎间盘退变的潜在药物提供初步的数据支持。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理 3 个月龄雌性 SD 大鼠 30 只,购自上海医科大学实验动物中心,体质量 210~230 g,随机分为 3 组:假手术组(Sham 组),双侧卵巢切除(ovariectomy, OVx)+安慰剂组(OVx+PBO 组)和双侧卵巢切除+奈立膦酸钠组(OVx+N 组)。OVx+PBO 组和 OVx+N 组大鼠进行腹腔注射麻醉(1%戊巴比妥钠,40 mg/kg),在无菌条件下行背部肋下入路双侧卵巢切除,术后正常饲养满 1 周后开始用药;Sham 组大鼠卵巢暴露不切除。OVx+N 组皮下注射奈立膦酸钠(10 μg/kg),每周 2

次,持续 6 个月,OVx+PBO 组注射相同剂量的安慰剂。6 个月后处死所有大鼠并取标本。在处死前 10 d 和 4 d,大鼠皮下注射 30 mg/kg 盐酸四环素和 6 mg/kg 钙黄绿素作双荧光标记。

1.2 骨密度测定 切取大鼠第 3 腰椎(L₃)和第 4 腰椎(L₄),采用小物体模式扫描,双能 X 线骨密度仪(Norland-XR36, U. S.)测量大鼠 L₃、L₄ 脊柱节段骨密度。

1.3 骨组织形态计量学检测 分离 L₁,于 70%乙醇中固定,梯度乙醇脱水,乙醇和丙酮混合液(1:1, V/V)脱脂,用甲基丙烯酸甲酯包埋后,硬组织切片机(Leica SM 2000R, 德国)制备 5 μm 和 8 μm 切片,5 μm 切片采用 Masson-Goldner Trichrome 观察骨静态指标,再采用 H-E 染色观察破骨细胞数;非染色的 8 μm 切片用以动态观察组织形态计量学荧光双标记,在荧光显微镜下,沉积在骨表面的四环素荧光呈黄色,沉积在骨表面的钙黄绿素荧光显绿色,用来观察骨表面矿化程度及矿化沉积率,反映成骨细胞活性。然后用半自动图像数字化分析仪(Nikon, 日本)对骨组织作静态和动态测量及计算。

骨组织形态计量学静态参数:骨小梁相对体积、骨小梁厚度、骨小梁分离度;动态参数:矿化沉积率以及单位骨小梁面积上的破骨细胞数。

1.4 生物力学性能测试 分离 L₂,去除附着的肌肉和软组织,将磨制好的腰椎于生物力学测试机(Shimadzu AG-IS, 日本)进行生物力学性能测试。压缩速度为 1 mm/min,直至椎体断裂,检测指标包括:极限负荷(maximum load),屈服应力(yield stress),极限应力(maximum stress)及弹性模量(elastic modulus)。

1.5 椎间盘组织学评分 将 L₅ 节段在 10%中性缓冲甲醛液中固定,甲酸脱钙,正中矢状面切开,石蜡包埋,制备 5 μm 切片进行 Collagen van Gieson (VG)染色。显微镜下观察该脊柱节段的组织形态。参照椎间盘组织学评分系统^[14]对大鼠 L₅ 腰椎间盘退变程度进行评分,主要以大鼠椎间盘髓核、纤维环和骨赘的形态学退变程度进行评分,椎间盘评分为这 3 项得分的总和。

1.6 椎间盘高度和软骨终板厚度的测量 椎间盘高度:采用病理组织学方法检测各组大鼠 L₆ 椎间盘

高度,测量标本为 VG 染色切片,测量范围为椎间盘的头侧生长板至尾侧生长板间的区域,选取 3 个点进行测量,取平均值进行统计学分析。

软骨终板厚度:采用病理组织学方法检测各组大鼠 L₆ 椎体软骨终板厚度。VG 染色石蜡切片。检测范围为头侧生长板至软骨终板与髓核交接之间的范围。将终板 10 等分,测量每一点的软骨终板厚度,求平均值进行统计学分析。

1.7 骨组织相关基因的蛋白表达测定 细胞裂解法提取总蛋白, Folin-酚试剂法测定蛋白浓度; 100 μL 样品加入等体积缓冲液, SDS-PAGE 凝胶电泳, PVDF 膜印迹。加入一抗羊抗 TRPV5 多克隆抗体 (Santa Cruz, 美国, 1:800) 和二抗碱性磷酸酶标记的兔抗羊 IgG (北京中山生物公司, 1:1 200), 室温下分别孵育 2 h, DBA 显色法显色。采用凝胶成像系统成像。使用 Scion Image 软件对蛋白电泳带进行灰度值分析, 以 β-actin 作为内参蛋白, 通过目标蛋白灰度值/β-actin 灰度值来评价目标基因的相对蛋白表达水平。

1.8 骨组织相关基因转录水平的测定 通过 real-time RT-PCR 评价大鼠骨组织中 I 型胶原 (COL-I)、II 型胶原 (COL-II)、基质金属蛋白酶 1 (MMP-1)、基质金属蛋白酶 3 (MMP-3) 以及基质金属蛋白酶 13 (MMP-13) 的 mRNA 表达情况。参照高容量 cDNA 反转录试剂盒 (Life Technologies, NY) 说明书中所述的方法进行反转录, 并取 1 μL cDNA 产物进行 PCR 扩增反应。引物序列见表 1。

表 1 基因的正向和反向引物序列

Tab 1 Sequences of forward (Fw) and reversed (Rv) primers designed for the genes

Gene	Primer sequence	
<i>β-actin</i>	Fw	5'-GTAAAGACCTCTATGCCAACA-3'
	Rv	5'-GGACTCATCGTACTCCTGCT-3'
COL-I	Fw	5'-GGCAACCTCAAGAAGTCC-3'
	Rv	5'-GTGCAGCCATCCACAAGC-3'
COL-II	Fw	5'-TCATCGCCACGGTCTTACAA-3'
	Rv	5'-TTGTACCACGGTCACTCTG-3'
MMP-1	Fw	5'-GCCATTACTCACAACAATC-3'
	Rv	5'-TATCACCTTCCTCTCAA-3'
MMP-3	Fw	5'-TCTTCACTCAGCCAATGCT-3'
	Rv	5'-GGGAGGTCCATAGAGGGATT-3'
MMP-13	Fw	5'-GCAGCTCCAAAGGCTACAA-3'
	Rv	5'-CATCATCTGGGAGCATGAAA-3'

采用实时荧光定量 PCR 仪 (Eppendorf, NY) 进行扩增反应, 反应条件如下: 预变性 94°C 2 min; 变性 94°C 30 s, 退火 56°C 1 min, 延伸 72°C 30 s, 30 个循环; 最后延伸 72°C 7 min; 储存 4°C。

PCR 产物检测用 12% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分析, 溴乙啶染色 10 min, 应用 EC3 凝胶成像分析系统 (Ultra-Violet Products, 美国) 拍摄扩增条带。同时使用 Scion Image 软件对目的条带进行光密度峰值下的总灰度分析, 所得数值与相应内标物 β-actin 灰度值的比值即为 mRNA 的相对含量。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 Student's *t* 检验比较各组间差异, 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 骨密度测定 结果 (表 2) 显示: OV_x+PBO 组大鼠椎体骨密度低于 Sham 组 ($P < 0.05$); OV_x+N 组大鼠椎体骨密度低于 Sham 组, 但差异无统计学意义; OV_x+N 组大鼠椎体骨密度高于 OV_x+PBO 组 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠椎体骨密度

Tab 2 Bone mineral density values of vertebral body in the three groups

Vertebra	$g \cdot cm^{-2}, n=10, \bar{x} \pm s$		
	Sham group	OV _x +PBO group	OV _x +N group
L ₃	0.282±0.013	0.217±0.022*	0.280±0.019 Δ
L ₄	0.293±0.018	0.225±0.017*	0.285±0.012 Δ

OV_x: Ovariectomy; PBO: Placebo; N: Neridronate. * $P < 0.05$ vs Sham group; $\Delta P < 0.05$ vs OV_x+PBO group

2.2 骨组织形态计量学检测 结果 (表 3) 显示: Sham 组骨小梁相对体积、骨小梁厚度大于 OV_x+PBO 组和 OV_x+N 组 ($P < 0.05$); OV_x+N 组骨小梁相对体积、骨小梁厚度大于 OV_x+PBO 组 ($P < 0.05$)。OV_x+PBO 组和 OV_x+N 组骨小梁分离度均高于 Sham 组 ($P < 0.05$), OV_x+PBO 组骨小梁分离度又高于 OV_x+N 组 ($P < 0.05$)。与 OV_x+PBO 组相比, OV_x+N 组矿化沉积率和破骨细胞数较低 ($P < 0.05$)。

2.3 生物力学性能测试 结果 (表 4) 显示: OV_x+PBO 组大鼠 L₂ 椎体的极限负荷、屈服应力、极限应

力和弹性模量以及 OVx+N 组大鼠椎体极限应力低于 Sham 组 ($P < 0.05$); OVx+N 组大鼠椎体的极

限负荷、屈服应力、极限应力和弹性模量高于 OVx+PBO 组 ($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠骨形态计量学指标

Tab 3 Bone histomorphometry assay in the three groups

$n=10, \bar{x} \pm s$

Parameter	Sham group	OVx+PBO group	OVx+N group
Percent trabecular area (%)	46.1 ± 7.3	20.2 ± 19.4*	32.0 ± 4.5*△
Trabecular thickness $d/\mu\text{m}$	67.5 ± 14.3	40.5 ± 1.9*	56.5 ± 13.2*△
Trabecular separation $d/\mu\text{m}$	1 027.4 ± 116.3	1 485.4 ± 120.1*	1 265.4 ± 41.2*△
Mineral apposition rate ($\mu\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$)	0.701 ± 0.040	1.240 ± 0.088*	0.910 ± 0.022△
Osteoclast number/trabecular area (mm^{-2})	0.060 ± 0.001	0.220 ± 0.001*	0.130 ± 0.012△

OVx: Ovariectomy; PBO: Placebo; N: Neridronate. * $P < 0.05$ vs Sham group; △ $P < 0.05$ vs OVx+PBO group

表 4 各组大鼠椎体生物力学性能

Tab 4 Biomechanical properties of vertebral body in the three groups

$n=10, \bar{x} \pm s$

Parameter	Sham group	OVx+PBO group	OVx+N group
Maximum load F/N	191.1 ± 42.3	79.2 ± 19.4*	182.4 ± 34.5△
Yield stress P/MPa	17.5 ± 4.3	6.9 ± 1.9*	15.5 ± 3.2△
Maximum stress P/MPa	22.4 ± 6.3	8.4 ± 2.1*	15.4 ± 1.2*△
Elastic modulus P/GPa	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.1*	0.6 ± 0.1△

OVx: Ovariectomy; PBO: Placebo; N: Neridronate. * $P < 0.05$ vs Sham group; △ $P < 0.05$ vs OVx+PBO group

2.4 椎间盘退变的组织学观察、评分 组织学观察结果(图 1)显示; Sham 组椎间盘结构(包括纤维环、髓核以及骺板等)较正常,纤维环结构排列整齐、紧密,髓核含有大量的脊索细胞,黏变程度低且软骨终板排列规律。OVx+PBO 组骺板和软骨终板变薄,软骨细胞数量减少,排列紊乱,软骨终板和骺板钙化;髓核脊索细胞数量下降,出现大量团块状的软骨样细胞,髓核黏变;纤维环后部结构紊乱,间隙增宽。与 Sham 组相比,OVx+N 组椎间盘髓核黏变,髓核中脊索细胞数量下降,但其髓核状态明显优于 OVx+PBO 组,软骨终板的钙化和后部纤维环的紊乱程度较 OVx+PBO 组低。

椎间盘组织学评分结果显示:大鼠 L₅ 腰椎间盘组织学评分 OVx+PBO 组(3.21 ± 1.35)、OVx+N 组(1.74 ± 1.23)均高于 Sham 组(1.17 ± 0.76),差异有统计学意义($P < 0.05$); OVx+PBO 组大鼠 L₅ 腰椎间盘组织学评分高于 OVx+N 组 ($P < 0.05$)。

2.5 椎间盘高度和软骨终板厚度的测量 结果(表 5)显示: Sham 组大鼠 L₆ 椎间盘高度高于 OVx+

PBO 组 ($P < 0.05$), OVx+N 组大鼠椎间盘高度高于 OVx+PBO 组 ($P < 0.05$), Sham 组大鼠椎间盘高度高于 OVx+N 组,但差异无统计学意义。Sham 组大鼠软骨终板厚度低于 OVx+PBO 组 ($P < 0.05$), OVx+N 组大鼠软骨终板厚度低于 OVx+PBO 组 ($P < 0.05$), Sham 组大鼠软骨终板厚度低于 OVx+N 组,但差异无统计学意义。

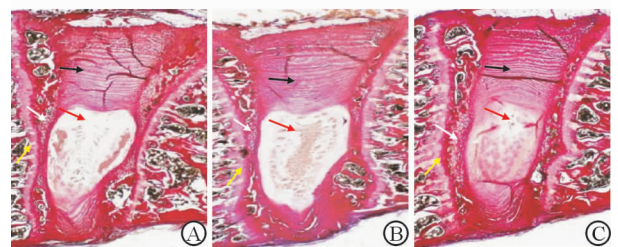


图 1 各组大鼠 L₅ 腰椎间盘组织形态学结果

Fig 1 VG staining of rat L₅ lumbar intervertebral disc in each group

A: Sham group; B: OVx+N group; C: OVx+PBO group. OVx: Ovariectomy; PBO: Placebo; N: Neridronate. Black arrows showed annulus fibrosus, red arrows showed nucleus pulposus, white arrow showed cartilage end plate, and yellow arrows showed epiphyseal plate. Original magnification: ×100

表5 大鼠 L₆ 椎间盘高度和软骨终板厚度

Tab 5 Measurement of the disc height index (DHI) and thickness of cartilage endplates(TCE)

d/μm, n=10, x̄±s

Parameter	Sham group	OVx+PBO group	OVx+N group
DHI	1 494.0±31.6	1 006.4±18.3*	1 346.0±21.6△
TCE	204.5±6.3	357.2±8.2*	259.1±7.2△

OVx: Ovariectomy; PBO: Placebo; N: Neridronate. * *P* < 0.05 vs Sham group; △ *P* < 0.05 vs OVx+PBO group

2.6 骨组织相关基因的蛋白表达 结果(图2)显

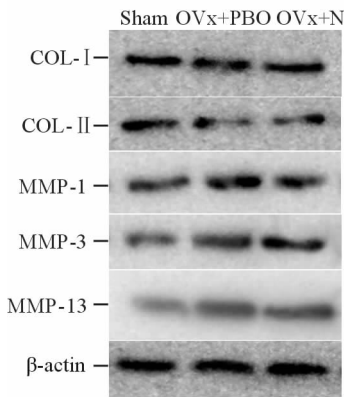


图2 各组大鼠骨组织 COL-I、COL-II、MMP-1、MMP-3 及 MMP-13 蛋白相对表达量

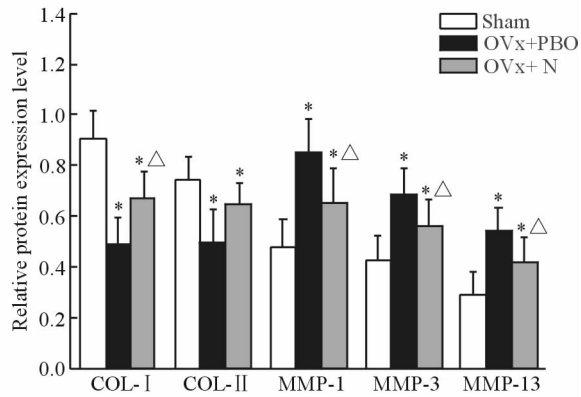


Fig 2 Protein expression of COL-I, COL-II, MMP-1, MMP-3 and MMP-13 in bone of rats in each group

OVx: Ovariectomy; PBO: Placebo; N: Neridronate; COL-I: Collagen type I; COL-II: Collagen type II; MMP-1: Matrix metalloproteinase-1; MMP-3: Matrix metalloproteinase-3; MMP-13: Matrix metalloproteinase-13. * *P* < 0.05 vs Sham group; △ *P* < 0.05 vs OVx+PBO group. *n*=10, *x̄*±*s*

2.7 骨组织相关基因的 mRNA 表达 结果(图3)

显示:OVx+PBO组和OVx+N组大鼠骨组织 COL-I 和 COL-II 基因表达量低于 Sham 组 (*P* < 0.05); OVx+PBO组和OVx+N组 MMP-1、MMP-3 以及 MMP-13 基因表达量高于 Sham 组 (*P* < 0.05); OVx+N 组大鼠骨组织 COL-I 基因表达量高于 OVx+PBO 组 (*P* < 0.05), COL-II 基因表达量高于 OVx+PBO 组但差异无统计学意义; OVx+N 组 MMP-1、MMP-3 及 MMP-13 基因表达量低于 OVx+PBO 组 (*P* < 0.05)。

示:OVx+PBO组和OVx+N组大鼠骨组织 COL-I 和 COL-II 蛋白的表达量低于 Sham 组 (*P* < 0.05); OVx+PBO组和OVx+N组大鼠骨组织 MMP-1、MMP-3 及 MMP-13 的蛋白表达量高于 Sham 组 (*P* < 0.05); OVx+N 组大鼠骨组织 COL-I 蛋白表达量高于 OVx+PBO 组 (*P* < 0.05), COL-II 蛋白表达量高于 OVx+PBO 组但差异无统计学意义; OVx+N 组 MMP-1、MMP-3 及 MMP-13 的蛋白表达量低于 OVx+PBO 组 (*P* < 0.05)。

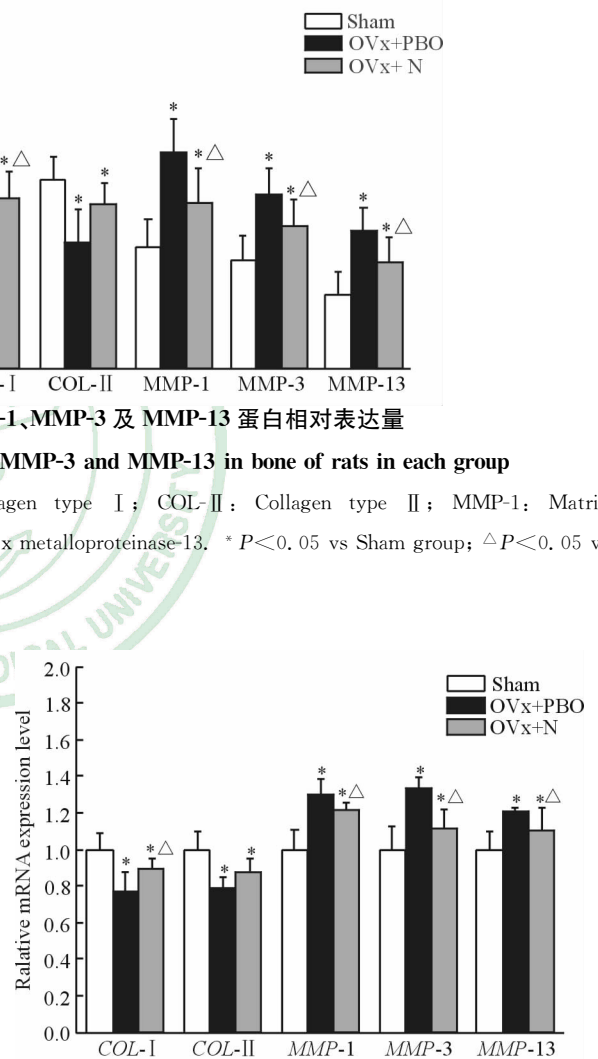


图3 各组大鼠骨组织 COL-I、COL-II、MMP-1、MMP-3 及 MMP-13 mRNA 相对表达量

Fig 3 mRNA expression of COL-I, COL-II, MMP-1, MMP-3 and MMP-13 in bone of rats in each group

OVx: Ovariectomy; PBO: Placebo; N: Neridronate; COL-I: Collagen type I; COL-II: Collagen type II; MMP-1: Matrix metalloproteinase-1; MMP-3: Matrix metalloproteinase-3; MMP-13: Matrix metalloproteinase-13. * *P* < 0.05 vs Sham group; △ *P* < 0.05 vs OVx+PBO group. *n*=10, *x̄*±*s*

3 讨论

本研究成功建立卵巢切除大鼠的骨质疏松模型,并研究奈立麟酸钠对骨质疏松相关的椎间盘退行性病变的作用及其可能存在的作用机制。与 Sham 组相比,OVx+N 组大鼠骨密度和骨量(骨小梁相对体积和骨小梁厚度)指标有所降低,但与 OVx+

PBO组相比,OV_x+N组大鼠骨密度和骨量指标升高,说明奈立膦酸钠对骨密度减退表现出明显抑制作用,但不能完全抑制骨量流失。有研究显示,椎间盘组织退化与骨小梁的结构密切相关^[15],本研究中,OV_x+N组大鼠骨小梁分离度较OV_s+PBO组低($P<0.05$),提示奈立膦酸钠在一定程度上有助于维持骨组织结构性能。

卵巢切除动物模型由于雌激素等其他卵巢激素缺乏导致成骨细胞和破骨细胞活力增强,骨吸收大于骨形成,从而引起骨量流失^[16-17]。矿化沉积率和破骨细胞数分别反映成骨细胞和破骨细胞的活性^[18-19],通过对骨形态计量学动态指标研究发现,奈立膦酸钠会导致成骨细胞和破骨细胞活性降低。结果说明经过奈立膦酸钠给药后,对切除卵巢引起的骨组织高转换状态具有一定的抑制作用,降低骨转换率,减少骨质流失^[20]。成骨细胞能介导奈立膦酸钠对破骨细胞骨吸收的抑制作用,其作用机制可能是奈立膦酸钠与体内羟基磷灰石结合对成骨细胞产生影响,使成骨细胞分泌某种因子,作用于破骨细胞干扰其骨吸收作用;也可能与直接改变破骨细胞活性有关^[21]。

极限负荷、屈服应力、极限应力和弹性模量指标反映骨组织的生物力学性能^[22],切除双侧卵巢导致大鼠腰椎间盘退化以及骨组织生物力学性能降低^[23-24]。与OV_x+PBO组相比,OV_x+N组大鼠骨组织极限负荷、屈服应力、极限应力和弹性模量指标较优,表现出较好的生物力学性能。因此,奈立膦酸钠能促进大鼠骨组织生物力学性能提升。结合椎间盘组织学观察及评分结果,奈立膦酸钠有助于卵巢切除大鼠模型腰椎间盘整体性能提高。

与Sham组相比,OV_x+N组椎间盘高度降低,可能是由骨密度降低所引起的椎体骨折导致;OV_x+N组软骨终板增厚,可能与钙化相关,同时软骨终板增厚会引起椎间盘营养供应减少,加速椎间盘退变的进程^[25]。但是OV_x+N组椎间盘高度和软骨终板厚度优于OV_x+PBO组,由此可知奈立膦酸钠能在一定程度上维持椎间盘高度,延缓软骨终板钙化程度,保持较优的椎间盘营养环境,从而达到抑制椎间盘退行性变的作用。

在腰椎间盘退变过程中,MMP-3可激活MMPs的前体^[26],导致MMPs的表达有所升高^[27-28],从而促进MMP-1、MMP-3、MMP-13等合成。COL-I和COL-II是构成骨组织细胞外基质的重要蛋白质,

有利于保持骨架完整性^[29]。然而,COL-I和COL-II分别能被MMP-1和MMP-13裂解^[30-31],细胞外基质被降解,加速骨量流失。

在本研究中,卵巢切除大鼠模型的骨组织中COL-I、COL-II表达水平降低,同时MMP-1、MMP-3以及MMP-13表达水平上升。与OV_x+PBO组相比,OV_x+N组骨组织中MMP-1、MMP-3以及MMP-13的蛋白和mRNA表达水平较低,而COL-I、COL-II的蛋白和mRNA表达水平较高。由此可见,奈立膦酸钠可能通过抑制腰椎间盘退变的过程中MMPs的表达,降低MMP-1、MMP-3以及MMP-13等合成,进一步保持细胞外基质(COL-I和COL-II)的完整性,降低骨量的流失,提高骨组织营养供应环境,改善腰椎间盘退化状态。

综上所述,本研究结果表明奈立膦酸钠对去卵巢骨质疏松大鼠的治疗作用在于提高骨质量,减少骨质流失,提高生物力学强度,改善骨结构以及有效调控COL-I、COL-II、MMP-1、MMP-3、MMP-13表达水平,以提高骨的整体性能,进而改善腰椎间盘退化状态。

[参考文献]

- [1] 王子江,向 川. 骨质疏松症与骨关节炎的相关性研究新进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20:310-314.
- [2] 张 蕾,徐振华,林顺新,贾吉光,陈 森,郑晓佐. 雌激素在大鼠颈椎间盘退变中的作用[J]. 武汉大学学报:医学版, 2009, 30: 788-790.
- [3] 刘彬彬,张 柳,田发明,王文雅. 椎间盘退变动物模型及降钙素治疗的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2014, 28: 1051-1054.
- [4] 王文雅,张 柳,汪 韬,张祥宏,张英泽. 降钙素治疗延缓卵巢切除大鼠腰椎间盘退变[J]. 解剖学杂志, 2008, 31: 158-161.
- [5] 朱志刚,郭向阳,张秀珍. 尼尔雌醇对去卵巢大鼠骨组织中I型胶原代谢及组织蛋白酶K表达的影响[J]. 中原医刊, 2006, 33: 30-32.
- [6] Neogi T, Nevitt M C, Ensrud K E, Bauer D, Felson D T. The effect of alendronate on progression of spinal osteophytes and disc-space narrowing[J]. Ann Rheum Dis, 2008, 67:1427-1430.
- [7] Luo Y, Zhang L, Wang W Y, Hu Q F, Song H P, Su Y L, et al. Alendronate retards the progression of lumbar intervertebral disc degeneration in ovariectomized rats[J]. Bone, 2013, 55:439-448.
- [8] Gatti D, Antoniazzi F, Prizzi R, Braga V, Rossini M, Tatò L, et al. Intravenous neridronate in children with osteogenesis imperfecta: a randomized controlled study

- [J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20: 758-763.
- [9] Semler O, Beccard R, Palmisano D, Demant A, Fricke O, Schoenau E, et al. Reshaping of vertebrae during treatment with neridronate or pamidronate in children with osteogenesis imperfecta[J]. *Horm Res Paediatr*, 2011, 76: 321-327.
- [10] Maines E, Monti E, Doro F, Morandi G, Cavarzere P, Antoniazzi F. Children and adolescents treated with neridronate for osteogenesis imperfecta show no evidence of any osteonecrosis of the jaw[J]. *J Bone Miner Metab*, 2012, 30: 434-438.
- [11] Gatti D, Rossini M, Viapiana O, Idolazzi L, Adami S. Clinical development of neridronate: potential for new applications[J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2013, 9: 139-147.
- [12] Varena M, Adami S, Rossini M, Gatti D, Idolazzi L, Zucchi F, et al. Treatment of complex regional pain syndrome type I with neridronate: a randomized, double-blind, placebo-controlled study [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2013, 52: 534-542.
- [13] Forni G L, Perrotta S, Giusti A, Quarta G, Pitrolo L, Cappellini M D, et al. Neridronate improves bone mineral density and reduces back pain in β -thalassaemia patients with osteoporosis: results from a phase 2, randomized, parallel-arm, open-label study [J]. *Br J Haematol*, 2012, 158: 274-282.
- [14] Wang T, Zhang L, Huang C, Cheng A G, Dang G T. Relationship between osteopenia and lumbar intervertebral disc degeneration in ovariectomized rats [J]. *Calcif Tissue Int*, 2004, 75: 205-213.
- [15] Ding Y, Jiang J, Zhou J, Wu X, Huang Z, Chen J, et al. The effects of osteoporosis and disc degeneration on vertebral cartilage endplate lesions in rats [J]. *Eur Spine J*, 2014, 23: 1848-1855.
- [16] 王 健, 陶海荣. 雌激素及相关化合物干预骨关节炎作用机制: 关节保护与骨软骨细胞的修复[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18: 5372-5376.
- [17] Lee E J, Kim J L, Kim Y H, Kang M K, Gong J H, Kang Y H. Phloretin promotes osteoclast apoptosis in murine macrophages and inhibits estrogen deficiency-induced osteoporosis in mice [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21: 1208-1215.
- [18] 查丁胜, 陈建庭, 邓轩庚, 孙学刚, 佟 丽, 王建钧, 等. 不同频率振动应变对成骨细胞增殖及分化能力的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2008, 14: 303-307.
- [19] 汪春风, 林柏云, 李朝阳. 实验骨组织形态计量学参数分析与意义[J]. *广东解剖学通报*, 1995, 17: 97-101.
- [20] 谢 肇, 李起鸿, 许建中, 孟 萍. BEMF 对卵巢切除骨质疏松大鼠治疗作用的骨形态计量学研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2007, 13: 236-238.
- [21] 程志强, 尹 潍, 马通军, 樊继援. 阿仑膦酸钠对兔破骨细胞功能的影响[J]. *基础医学与临床*, 2002, 22: 417-421.
- [22] Ito M, Nishida A, Koga A, Ikeda S, Shiraiishi A, Uetani M, et al. Contribution of trabecular and cortical components to the mechanical properties of bone and their regulating parameters [J]. *Bone*, 2002, 31: 351-358.
- [23] Wang Y X, Griffith J F, Ma H T, Kwok A W, Leung J C, Yeung D K, et al. Relationship between gender, bone mineral density, and disc degeneration in the lumbar spine: a study in elderly subjects using an eight-level MRI-based disc degeneration grading system [J]. *Osteoporos Int*, 2011, 22: 91-96.
- [24] de Almeida Jackix E, Cúneo F, Amaya-Farfan J, de Assunção J V, Quintaes K D. A food supplement of hydrolyzed collagen improves compositional and biodynamic characteristics of vertebrae in ovariectomized rats [J]. *J Med Food*, 2010, 13: 1385-1390.
- [25] Magnier C, Boiron O, Wendling-Mansuy S, Chabrand P, Deplano V. Nutrient distribution and metabolism in the intervertebral disc in the unloaded state: a parametric study [J]. *J Biomech*, 2009, 42: 100-108.
- [26] 杨春花, 黄 烽. 炎性关节疾病与基质金属蛋白酶-3 [J]. *军医进修学院学报*, 2005, 26: 147-149.
- [27] Le Maitre C L, Freemont A J, Hoyland J A. Human disc degeneration is associated with increased MMP 7 expression [J]. *Biotech Histochem*, 2006, 81(4-6): 125-131.
- [28] 张小卫, 郭团茂, 刘 森, 张银刚. 人颈椎间盘退变基因表达谱的研究 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2011, 32: 340-343.
- [29] Lee H S, Park S Y, Park Y, Bae S H, Suh H J. Yeast hydrolysate protects cartilage via stimulation of type II collagen synthesis and suppression of MMP-13 production [J]. *Phytother Res*, 2013, 27: 1414-1418.
- [30] Kook S H, Jang Y S, Lee J C. Involvement of JNK-AP-1 and ERK-NF- κ B signaling in tension-stimulated expression of type I collagen and MMP-1 in human periodontal ligament fibroblasts [J]. *J Appl Physiol (1985)*, 2011, 111: 1575-1583.
- [31] 王淑静, 赵 敏, 娄玉铃, 张广辉, 李 坚, 赵幸熬. 腱鞘丸含药血清对 IL-1 β 作用下兔关节软骨细胞 Type-II Collagen、MMP-1、MMP-13 蛋白表达的影响 [J]. *风湿病与关节炎*, 2014, 3: 17-20.