

范新昊,田发明,王婧瑶,等. 辛伐他汀联合利塞膦酸钠对尾悬吊诱导小鼠骨丢失的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29 (11): 58-64.

Fan XH, Tian FM, Wang JY, et al. Effects of risedronate sodium combined with simvastatin on tail suspension-induced bone loss in mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 58-64.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 009

辛伐他汀联合利塞膦酸钠对尾悬吊诱导小鼠骨丢失的作用

范新昊¹, 田发明², 王婧瑶², 张楠¹, 迟博婧², 张国彬^{2*}, 郭志斌³

(1.开滦总医院,河北唐山 063000; 2.华北理工大学,河北唐山 063000;
3.开滦总医院林西矿医院,河北唐山 063000)

【摘要】 目的 探讨和比较单独或联合应用辛伐他汀和利塞膦酸钠对地塞米松诱导的小鼠骨质疏松的作用。**方法** 12周龄雌性C57BL6小鼠30只,随机分成5组(每组6只):对照组(A组)、模型组(B组)、辛伐他汀组(C组)、利塞膦酸钠组(D组)和联合干预组(E组)。除A组外,通过尾悬吊制备小鼠骨质疏松模型,C、D、E组分别给予辛伐他汀(5 mg/(kg·d))、利塞膦酸钠(1 mg/(kg·d))和两者联合干预,3周后处死取材。微计算机断层扫描技术(micro-CT)检测左侧胫骨近端松质骨和皮质骨骨量及微结构参数,三点弯曲实验分析左侧股骨生物力学性能。提取右侧胫骨RNA,实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测OPG和RANKL的表达,提取右侧股骨蛋白,Western blot法检测OPG和RANKL蛋白的表达。**结果** Micro-CT:B组骨小梁体积比(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)显著低于其余各组,骨小梁分离度(Tb.Sp)显著高于其余各组($P<0.05$),C、D组BV/TV显著低于A、E组,Tb.Sp显著高于A组($P<0.05$);②生物力学:最大载荷、弹性模量B组显著低于A、E组($P<0.05$)、其余各组间比较无统计学差异($P>0.05$);③PCR检测结果:OPG的mRNA表达在C、E组显著高于B组($P<0.05$);RANKL在B组表达显著高于A组($P<0.05$);④Western blot:OPG在A组的表达显著高于其余各组($P<0.05$),E组显著高于B组($P<0.05$);RANKL在A组的表达显著低于其余各组($P<0.05$)。**结论** 尾悬吊可以造成小鼠骨丢失和骨质量下降,辛伐他汀和利塞膦酸钠联合应用能阻止该模型骨丢失和骨质量下降,效果优于单独用药。

【关键词】 利塞膦酸钠;辛伐他汀;骨丢失;生物力学;微结构;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0058-07

Effects of risedronate sodium combined with simvastatin on tail suspension-induced bone loss in mice

FAN Xinhao¹, TIAN Faming², WANG Jingyao², ZHANG Nan¹, CHI Bojing², ZHANG Guobin^{2*}, GUO Zhibin³

(1. KaiLuan General Hospital, Tangshan 063000, China. 2. North China University of Science and Technology, Tangshan 063000. 3. KaiLuan Linxi Hospital, Tangshan 063000)

【Abstract】 Objective To compare the efficiency of single or combined application of simvastatin and risedronate sodium on a disused osteopenia rat model with tail suspension. **Methods** Thirty 12-week-old C57BL6 mice were assigned

【基金项目】 国家自然科学基金(81773327);河北省自然科学基金(H2013209255);河北省医学科学研究重点课题(20160722)。

【作者简介】 范新昊(1985—),女,主治医师,主要从事骨质疏松发病机制和防治研究。E-mail: ricky130701@163.com

【通信作者】 张国彬(1980—),男,讲师,主要从事骨与关节退行性疾病的研究。E-mail: zgb826@163.com

to five groups of six mice each: control (A), tail suspension (B), simvastatin treatment (C), risedronate sodium treatment (D), and combined treatment (E). All but group A received tail suspension, and the groups were treated with the vehicle, simvastatin (5 mg/(kg·d)), risedronate sodium (1 mg/(kg·d)) or a combination of both, respectively. All mice were sacrificed after 3 weeks. Micro-CT was performed on the left tibia to determine the bone mass and microstructure of both the trabecular and cortical bones. Three-point bending test was used for biomechanical analysis of the left femur. The right tibias were subjected to RNA extraction and PCR analysis of *OPG* and *RANKL* expression, and the right femurs were used for protein level detection by western blot. **Results** Micro-CT: BV/TV and Tb.N in group B were significantly lower than those of the other groups ($P < 0.05$), the Tb.Sp in group B was significantly higher than that of the other groups. BV/TV in groups C and D were significantly lower than those in groups A and E, while Tb.Sp in groups C and D was significantly higher than that in group A ($P < 0.05$). ② Biomechanical test: maximal loading and the elastic modulus in group B were significantly lower than those of groups A and E ($P < 0.05$). ③ PCR: the mRNA level of *OPG* in groups C and E was significantly higher than that in group B ($P < 0.05$), and *RANKL* was expressed significantly higher in group B than that in group A ($P < 0.05$). ④ Western blot: the protein level of OPG in group A was markedly higher than that in the other groups ($P < 0.05$), OPG in group E was significantly higher than that in group B ($P < 0.05$), and the protein level of RANKL in group A was significantly lower than that in the other groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Tail suspension caused bone loss and deterioration of bone quality in mice, and simvastatin combined with risedronate sodium treatment showed more substantial attenuation of these effects than treatment with either drug alone.

【Keywords】 risedronate sodium; simvastatin; bone loss; biomechanics; micro-structure; mouse

一定的负荷刺激对于维持骨稳态和骨骼健康至关重要,适当应力刺激如体育锻炼可促进骨形成^[1],而失用造成的负荷刺激缺失往往会造成肌肉萎缩和骨量丢失,研究表明,长期卧床、瘫痪或航天飞行导致每月 1%~2% 的骨量丢失^[2]。目前对于该类骨丢失的治疗仍以二磷酸盐类药物为主,可以通过抑制骨吸收降低骨转换率部分抑制宇航员骨量下降,但该类药物对促进骨形成的作用有限^[3]。如果在干预方案中考虑抑制骨吸收与促进骨形成药物联合应用,可能疗效会优于单纯抑制骨吸收,也更适用于防治失用导致的骨丢失。

辛伐他汀是目前一线降血脂药物,其成骨作用潜能近年来备受关注。课题组前期研究证实辛伐他汀单纯体内干预虽表现出一定的骨保护作用^[4],但仅对大鼠股骨近端的骨丢失有抑制作用,如果联合应用骨吸收抑制剂如利塞膦酸钠,能否取得更好效果,尚有待进一步研究证实。基于以往研究,不同性质的骨代谢调节剂联合应用有可能取得更好的抗骨质疏松的作用^[5],我们推测辛伐他汀与利塞膦酸钠联合应用可以抑制失用性骨丢失,并较单独用药具有更好的效果。本研究拟通过尾悬吊法建立小鼠失用性骨丢失模型,并给予辛伐他汀和或利塞膦酸钠干预,观察单独用药与联合用药的干预效果,以期为进一步探索相关干预方案和作用机制等后续研究乃至相关临床干预提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本研究应用 SPF 级 12 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 30 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2017-0001],体重(25±3)g,所有小鼠在华北理工大学动物中心屏障环境中饲养[SYXK(冀)2015-0038]。本研究中涉及实验动物的处理和干预,均符合华北理工大学实验动物伦理委员会的相关规定,动物实验伦理审查证明编号为:LX201809,并遵照实验动物使用的 3R(减少、替代、优化)原则给予人道关怀。制备模型与处死时应用小动物多功能麻醉机进行诱导麻醉,麻醉药物为异氟烷,气体流量 500 mL/min,浓度 1.5%,处死时与其他动物隔离。

1.2 主要试剂与仪器

异氟烷(深圳市锐沃德生命科技有限公司);利塞膦酸钠(北京双鹭药业股份有限公司);辛伐他汀(浙江瑞邦药业有限公司生产);TRIzol(Invitrogen,美国);TaKaRa 逆转录试剂盒、Real-time PCR 试剂盒(大连宝生物有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(南京建成生物技术有限公司);小鼠 OPG(美国 Abcam 公司)、RANKL 抗体(美国 Santa Cruz 公司)、山羊抗兔二抗(美国 SAB 公司)。微计算机断层扫描(micro-CT,Skyscan,比利时);AG-IS 型万能试验机统(日本岛津公司);PCR 仪(Applied biosystems

美国);小动物多功能麻醉机(ZS-MV-I,北京众实迪创科技发展有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及处理

所有小鼠随机分成 5 组,每组 6 只:对照组(A 组)、模型组(B 组)、辛伐他汀组(C 组)、利塞膦酸钠组(D 组)和联合干预组(E 组)。除 A 组外,其余各组小鼠均采用尾部悬吊(躯体与地面呈 40°左右角度,以后肢伸直不能着地为准)制备尾悬吊拟失重模型,分别给予生理盐水(B 组),辛伐他汀(5 mg/(kg·d),C 组)、利塞膦酸钠(1 mg/(kg·d),D 组)和两者联合(E 组)灌胃干预,3 周后异氟烷麻醉处死取材。实验结束时各组均无小鼠死亡,所有动物纳入最终指标分析和结果统计。

1.3.2 Micro-CT 分析

应用 Sky Scan 1076 Micro-CT 对小鼠左侧胫骨进行扫描检测,收集数据,并利用 Micro-CT 配套软件对扫描图像进行三维重建及结果分析。胫骨近端松质骨兴趣区为上端生长板下 0.5~2 mm,皮质骨内侧的松质骨;胫骨中段皮质骨感兴趣区为胫腓骨连接处上方 1 mm。松质骨检测指标有:骨容积率(bone volume fraction, BV/TV)、骨小梁数量(trabecular number, Tb.N)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁分离度(trabecular separation, Tb.Sp)、结构模型指数(Structure Model Index, SMI)。皮质骨检测指标 BV/TV、皮质骨厚度(Cortical bone thickness, Ct.Th)。

1.3.3 生物力学检测

取所有小鼠的右侧股骨行生物力学分析,采用三点弯曲试验,支点跨距(L)为 6 mm,中央垂直(股骨与载荷成 90°角)加载负荷,速率 5 mm/min,直至股骨断裂,记录并分析最大压缩载荷及弹性模量。

1.3.4 聚合酶链反应

实验结束后提取小鼠右侧胫骨,制备组织匀浆,采用 TRIzol 法提取总 RNA,应用 TaKaRa 试剂盒进行逆转录合成 cDNA,实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测 OPG 和 RANKL 的表达。配制反应液:10 μL SYBR Premix Ex Taq II, 0.8 μL Forward Primer, 0.8 μL Reverse Primer, ROX Reference Dye II 0.4 μL, 2 μL cDNA, 6 μL 灭菌水,总体积为 20 μL;Real-time PCR 反应条件:95℃ 30 s;95℃ 5 s;60℃ 34 s,共 40 个循环;记录各标本扩增的 Ct 值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 作为统计数值,检测各基因与内参基因

GAPDH 的比值,得出目的基因表达的相对含量,公式如下: $\Delta\Delta Ct = Ct_{\text{处理组}}(\text{目的基因}-\text{内参基因}) - Ct_{\text{对照组}}(\text{目的基因}-\text{内参基因})$ 。引物序列 OPG 上游 5'-TTTCTTCTGGGCTGATCTTCTTCC-3',下游 5'-CATCCAAGACATTGACCTCTCTTGA-3';RANKL 上游 5'-CTGATGAAAGGAGGGAGCACAG-3',下游 5'-GGAAGGGTTGGACACCTGAATG-3';GAPDH 上游 5'-GACATCAAGAAGGTGCTGAAGC-3',下游 5'-GAAGGTGGAAGAGTGGGAGTT-3'。

1.3.5 Western blot

实验结束后,提取各组小鼠右侧股骨总蛋白,采用 BCA 定量蛋白,根据测定蛋白浓度计算上样量,经电泳及转膜后,取出 PVDF 膜置于 TBST 配制的 5%脱脂奶粉中孵育、漂洗 2 h,完成对非特异性抗原的封闭。封闭结束后将膜与 OPG 抗体(1:200)或 RANKL(1:200)抗体孵育,4℃过夜。次日加入 IgG 二抗稀释液(1:1000)中,37℃摇床孵育 2 h,然后置于 TBST 缓冲液摇床漂洗,控干 TBST 后,用 ECL 显色液显色,待蛋白条带清晰后立刻取出 PVDF 膜,置于清水中终止显色。采用 Image J 软件进行图像灰度扫描测定,测定目的蛋白 OPG、RANKL 与内参蛋白 β -actin 的 OD 值,计算两者比值作为其相对表达量,进行统计分析。

1.4 统计学方法

收集所有实验数据录入 Excel 表,采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。利用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验组间差异,两组间比较采用 LSD-*t* 检验。实验数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Micro-CT 检测结果

各组小鼠胫骨中段皮质骨及胫骨近端松质骨的 micro-CT 三位重建图如图 1 所示。相关参数的数据分析结果如下:皮质骨:骨容积率比较,B、C、D、E 组均显著低于 A 组($P < 0.05$);E 组显著高于 B、C、D 组($P < 0.05$),其余组间比较无显著差别($P > 0.05$)。皮质骨厚度,B、C 组显著低于 A 组($P < 0.05$),E 组显著高于 B、C 组($P < 0.05$),其余组间比较没有显著差异($P > 0.05$)。见表 1。

胫骨近端松质骨分析结果:骨容积率:B、C、D、E 组显著低于 A 组($P < 0.05$);C、D 组显著高于 B 组($P < 0.05$),E 组显著高于 B、C、D 组($P < 0.05$);

骨小梁数量:B、C、D 组显著低于 A、E 组($P<0.05$);骨小梁厚度:B 组显著低于 A 组($P<0.05$),C、D、E 组显著高于 B 组($P<0.05$);骨小梁分离度 B、C、D 组显著高于 A、E 组($P<0.05$);结构模型指数 B、C、D、E 组显著低于 A 组($P<0.05$)。见表 2。

2.2 生物力学

最大载荷:B、C、D、E 组显著低于 A 组($P<0.05$),E 组显著高于 B 组($P<0.05$),其余各组间两两比较无显著差别($P<0.05$);弹性模量:B、C、D 组显著低于 A 组($P<0.05$),B、E 组显著高于 B 组($P<0.05$),其余各组间两两比较无显著差别($P<0.05$)。见表 3。

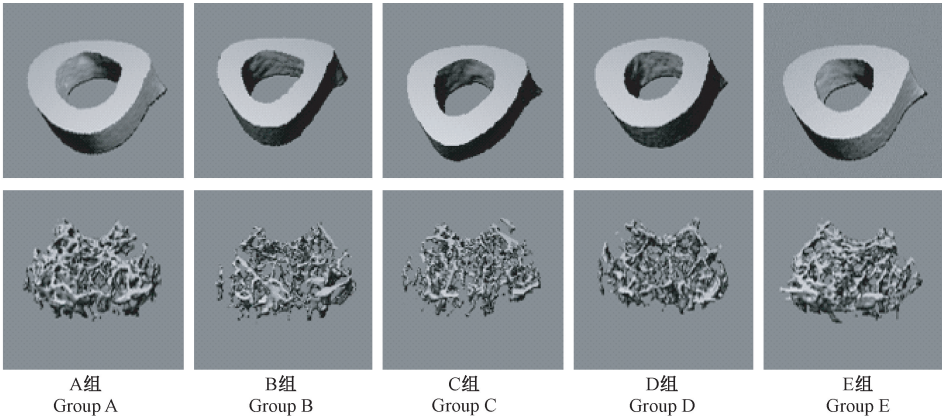


图 1 小鼠胫骨 micro-CT 三维重建图

Figure 1 Representative images for micro-CT of mouse tibia

表 1 胫骨中段皮质骨 micro-CT 分析结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Results of micro-CT of cortical bone in the middle shaft of the tibia

指标 Indices	对照组 (A 组) Control group (group A)	模型组 (B 组) Tail suspension group (group B)	辛伐他汀组 (C 组) Simvastatin treatment group (group C)	利塞膦酸钠组 (D 组) Risedronate sodium treatment group (group D)	联合治疗组 (E 组) combined treatment group (group E)
骨容积率(%) BV/TV	0.69±0.02	0.61±0.02 ^a	0.63±0.03 ^a	0.63±0.02 ^a	0.66±0.03 ^{abcd}
皮质骨厚度(μm) Ct.Th	230.3±11	213.7±10.5 ^a	214.8±8.5 ^a	225.1±14.8	231±13.1 ^{bc}

注:与 A 组比较,^a $P<0.05$;与 B 组比较,^b $P<0.05$;与 C 组比较,^c $P<0.05$;与 D 组比较,^d $P<0.05$ 。
Note. Compared with the group A, ^a $P<0.05$. Compared with the group B, ^b $P<0.05$. Compared with the group C, ^c $P<0.05$. Compared with the group D, ^d $P<0.05$.

表 2 胫骨近端松质骨 micro-CT 分析结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Results of micro-CT of the proximal tibia trabecular bone

指标 Indices	对照组 (A 组) Control group (group A)	模型组 (B 组) Tail suspension group (group B)	辛伐他汀组 (C 组) Simvastatin treatment group (group C)	利塞膦酸钠组 (D 组) Risedronate sodium treatment group (group D)	联合治疗组 (E 组) combined treatment group (group E)
骨容积率(%) BV/TV	0.18±0.02	0.08±0.02 ^a	0.11±0.01 ^{ab}	0.11±0.02 ^{ab}	0.14±0.02 ^{abcd}
骨小梁数量(mm ⁻¹) Tb.N	6.16±0.37	4.92±0.75 ^a	4.34±0.82 ^a	4.39±0.97 ^a	6.02±0.84 ^{bcd}
骨小梁厚度(μm) Tb.Th	43.13±3.94	33.55±9.7 ^a	41.58±2.9 ^b	41.41±6.17 ^b	41.53±4.29 ^b
骨小梁分离度(μm) Tb.Sp	152.56±9.1	235.27±38.2 ^a	213.8±40.8 ^a	217.02±60.1 ^a	163.7±22.03 ^{bcd}
结构模型指数 SMI	1.91±0.27	2.45±0.31 ^a	2.53±0.14 ^a	2.27±0.08 ^a	2.28±0.26 ^a

注:与 A 组比较,^a $P<0.05$;与 B 组比较,^b $P<0.05$;与 C 组比较,^c $P<0.05$;与 D 组比较,^d $P<0.05$ 。
Note. Compared with the group A, ^a $P<0.05$. Compared with the group B, ^b $P<0.05$. Compared with the group C, ^c $P<0.05$. Compared with the group D, ^d $P<0.05$.

2.3 PCR 检测结果

实时荧光定量 PCR 分析结果显示, *OPG* 的 mRNA 表达在 C、E 组显著高于 B 组 ($P<0.05$), 其余组间比较未见显著差异 ($P<0.05$); *RNKL* 在 B 组表达显著高于 A 组 ($P<0.05$), 其余组间比较未见显著差异 ($P<0.05$)。见表 4。

2.4 Western blot 检测结果

Western blot 分析 *OPG*、*RANKL* 蛋白表达结果显示: *OPG* 在 A 组的表达显著高于其余各组 ($P<0.05$), E 组显著高于 B 组 ($P<0.05$); *RANKL* 在 A 组的表达显著低于其余各组 ($P<0.05$)。如图 2 所示。

3 讨论

失用性骨质疏松在临床中多见于长期卧床的

患者, 骨量丢失、肌肉力量减弱和协调性下降会增加骨折风险。而一旦发生骨折, 往往对患者乃至其家庭带来沉重打击, 目前对于失用性骨质疏松的重视程度仍亟待提高, 其有效防治方案也在积极探索中。通过对小鼠尾部悬吊离地, 导致后肢应力缺失是目前常用的模拟失用性骨质疏松的动物模型^[6-7]。本研究经过三周尾悬吊成功制备了该小鼠模型, Micro-CT 分析发现该模型小鼠骨量下降, 微结构退变, 蛋白水平 *RANKL* 表达水平上调, *OPG* 水平下调, 提示该模型同时伴有骨形成下降和骨吸收活性增强, 这也与部分研究结果一致^[8-9], 由于失重导致的骨细胞凋亡分泌更多的 *RANKL* 是该模型骨吸收活跃并导致骨丢失的重要机制^[9]。

表 3 生物力学检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 3 Results of the biomechanical test

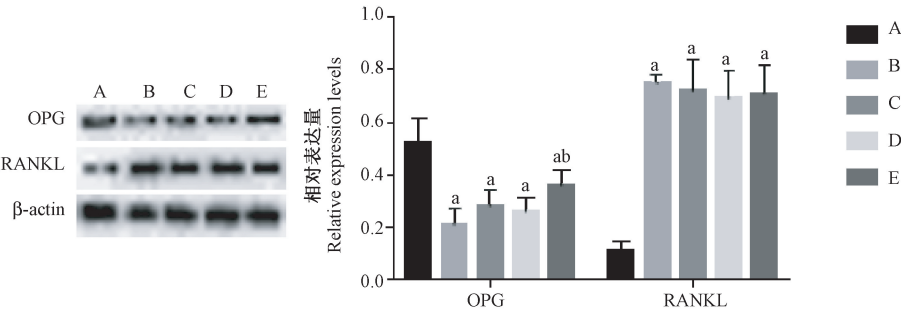
指标 Indices	对照组 (A 组) Control group (group A)	模型组 (B 组) Tail suspension group (group B)	辛伐他汀组 (C 组) Simvastatin treatment group (group C)	利塞膦酸钠组 (D 组) Risedronate sodium treatment group (group D)	联合治疗组 (E 组) combined treatment group (group E)
最大载荷 Maximal loading	21.1±2.7	12.5±2.2 ^a	13.4±1.6 ^a	13.6±2.0 ^a	15.1±1.4 ^{ab}
弹性模量 Elastic modulus	7.1±0.9	3.9±0.6 ^a	5.3±1.3 ^{ab}	5.1±0.9 ^a	6.2±1.5 ^b

注: 与 A 组比较, ^a $P<0.05$; 与 B 组比较, ^b $P<0.05$ 。
Note. Compared with the group A, ^a $P<0.05$. Compared with the group B, ^b $P<0.05$.

表 4 PCR 检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 4 Results of the PCR analysis

基因 Genes	对照组 (A 组) Control group (group A)	模型组 (B 组) Tail suspension group (group B)	辛伐他汀组 (C 组) Simvastatin treatment group (group C)	利塞膦酸钠组 (D 组) Risedronate sodium treatment group (group D)	联合治疗组 (E 组) combined treatment group (group E)
<i>OPG</i>	1.00±0.17	0.94±0.14	1.17±0.21 ^b	1.11±0.18	1.17±0.20 ^b
<i>RNKL</i>	1.00±0.16	1.29±0.21 ^a	1.2±0.13	1.12±0.19	1.14±0.15

注: 与 A 组比较, ^a $P<0.05$; 与 B 组比较, ^b $P<0.05$ 。
Note. Compared with the group A, ^a $P<0.05$. Compared with the group B, ^b $P<0.05$.



注: 与 A 组比较, ^a $P<0.05$; 与 B 组比较, ^b $P<0.05$ 。

图 2 Western blot 检测结果

Note. Compared with the group A, ^a $P<0.05$. Compared with the group B, ^b $P<0.05$.

Figure 2 Results of the Western blot analysis

他汀类药物,尤其是水溶性他汀类药物,除了降脂外,其他潜在作用也日益受到关注,其促进骨形成潜能目前已初步得到认可^[10-12],课题组在前期研究中发现辛伐他汀可部分阻止尾悬吊大鼠股骨近端骨丢失,但未能达到正常对照组水平,本研究中我们发现,辛伐他汀作用 3 周可部分组织小鼠胫骨近端松质骨的骨丢失,但对胫骨中段皮质骨丢失的抑制作用并不显著。但是 mRNA 水平对 *OPG* 和 *RANKL* 的分析发现,辛伐他汀可有效促进 *OPG* 在 mRNA 水平的表达,但进一步分析发现对蛋白水平的表达影响并不显著。鉴于蛋白水平不仅仅取决于生产效率及 mRNA 翻译过程,也同样收到降解相关因素的影响,因此虽然我们在该单一节点提取的蛋白表达水平为观测到显著差异,但 mRNA 表达水平的升高也初步提示了辛伐他汀的促进骨形成作用。辛伐他汀对 *OPG* mRNA 表达的促进作用和对 *RANKL* mRNA 抑制作用在以往研究中均有报道^[13-14]。

利塞膦酸钠作为第三代二磷酸盐类药物^[15-17],是目前一线应用的抗股指数松药物之一,但主要应用于绝经后骨质疏松症,对于失用性骨质疏松的干预效果报道较少。本研究发现,利塞膦酸钠可以部分阻止该模型松质骨和皮质骨骨量丢失,较之辛伐他汀,对于维持皮质骨厚度的作用更为显著。但生物力学进一步分析发现,两者单独干预均未能表现出显著效果,利塞膦酸钠对该模型小鼠组织学水平的影响并无显著优势。有研究比较了联合阿仑膦酸盐和辛伐他汀或单独用药对高脂饮食卵巢切除大鼠的抗骨质疏松和抗动脉粥样硬化作用,结果发现阿仑膦酸钠和辛伐他汀联合应用具有抗骨质疏松、抗血脂异常和抗动脉粥样硬化的作用^[18]。本研究中,与单独用药相比,多项检测均支持两者联合应用效果更好,部分指标包括微观结构参数和弹性模量等与正常对照组无显著差别,且均优于单独用药组,*OPG* 和 *RANKL* 蛋白水平的分析亦发现,联合用药促进 *OPG* 表达的作用更显著。在一项糖皮质激素诱发的大鼠骨质疏松模型的研究中,虽然利塞膦酸钠表现出一定的保护骨质量的作用,但合并辛伐他汀干预较单纯利塞膦酸钠表现出更好的效果^[19]。

然而,不同性质药物合并使用并非能取得叠加或协同效应,比如与单独使用利塞膦酸钠相比,维生素 K2 与利塞膦酸钠合并使用并不能显著降低骨

质疏松患者骨折发生风险^[20]。因此,本研究采用的干预方案对该类骨质疏松的干预效果尚有待更多的研究证实和探讨。此外,本研究存在一定的局限性。首先,两种药物选择单一剂量,并未探讨不同剂量配比的作用效果,不排除更佳药物剂量的联合应用方案。此外,本研究并未探讨联合用药方案对不同月龄大鼠模型的干预效果,且尾悬吊法不能完全模拟人类失用性骨质疏松。因此,干预方案的单一和动物模型的选择是本研究的主要局限,后续仍需更多研究深入探讨。

参考文献:

- [1] Willems HME, van den Heuvel EGHM, Schoemaker RJW, et al. diet and exercise: a match made in bone[J]. Curr Osteoporos Rep, 2017, 15(6):555-563.
- [2] Alexandre C, Vico L. Pathophysiology of bone loss in disuse osteoporosis[J]. Joint Bone Spine, 2011, 78(6):572-576.
- [3] Leblanc A, Matsumoto T, Jones J, et al. Bisphosphonates as a supplement to exercise to protect bone during long-duration spaceflight[J]. Osteoporos Int, 2013, 24(7):2105-2114.
- [4] 田发明, 张柳, 邢磊, 等. 辛伐他汀部分阻止尾悬吊大鼠股骨近端骨量的丢失[J]. 中国骨质疏松, 2013, 19(12):1228-1231.
- [5] Shao Y, Hernandez-Buquer S, Childress P, et al. Improving combination osteoporosis therapy in a preclinical model of heightened osteoanabolism[J]. Endocrinology, 2017, 158(9):2722-2740.
- [6] Colaiani G, Mongelli T, Cuscito C, et al. Irisin prevents and restores bone loss and muscle atrophy in hind-limb suspended mice[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):2811.
- [7] Bullock WA, Hoggatt A, Horan DJ, et al. Expression of a degradation-resistant β -catenin mutant in osteocytes protects the skeleton from mechanodeprivation-induced bone wasting[J]. J Bone Miner Res, 2019, 34(10):1964-1975.
- [8] Gerbaix M, Vico L, Ferrari SL, et al. Periostin expression contributes to cortical bone loss during unloading[J]. Bone, 2015, 71:94-100.
- [9] Cabahug-Zuckerman P, Frikha-Benayed D, Majeska RJ, et al. Osteocyte apoptosis caused by hindlimb unloading is required to trigger osteocyte RANKL production and subsequent resorption of cortical and trabecular bone in mice femurs[J]. J Bone Miner Res, 2016, 31(7):1356-1365.
- [10] Raafat SN, Amin RM, Elmazar MM, et al. The sole and combined effect of simvastatin and platelet rich fibrin as a filling material in induced bone defect in tibia of albino rats[J]. Bone, 2018, 117:60-69.
- [11] Kim AR, Kim JH, Kim A, et al. Simvastatin attenuates tibial bone loss in rats with type 1 diabetes and periodontitis[J]. J Transl Med, 2018, 16(1):306.

[12] Kaleağasıoğlu F, Olcay E, Onur R. Statins as potential agents for the prevention and treatment of osteoporosis [J]. Endocrine, 2018, 62(1):269.

[13] Liu S, Bertl K, Sun H, et al. Effect of simvastatin on the osteogenetic behavior of alveolar osteoblasts and periodontal ligament cells [J]. Hum Cell, 2012, 25(2):29-35.

[14] Kaji H, Kanatani M, Sugimoto T, Chihara K. Statins modulate the levels of osteoprotegerin/receptor activator of NFκB ligand mRNA in mouse bone-cell cultures [J]. Horm Metab Res, 2005, 37(10):589-592.

[15] Naylor KE, Jacques RM, Paggiosi M, et al. Response of bone turnover markers to three oral bisphosphonate therapies in postmenopausal osteoporosis: the TRIO study [J]. Osteoporos Int, 2016, 27(1):21-31.

[16] Liu GF, Wang ZQ, Liu L, et al. A network meta-analysis on the short-term efficacy and adverse events of different anti-osteoporosis drugs for the treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(6):4469-4481.

[17] Durden E, Pinto L, Lopez-Gonzalez L, et al. Two-year persistence and compliance with osteoporosis therapies among postmenopausal women in a commercially insured population in the United States[J]. Arch Osteoporos, 2017, 12(1):22.

[18] Sequetto PL, Gonçalves RV, Pinto AS, et al. Low doses of simvastatin potentiate the effect of sodium alendronate in inhibiting bone resorption and restore microstructural and mechanical bone properties in glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. Microsc Microanal, 2017, 23(5):989-1001.

[19] Mohamed MT, Abuelezz SA, Atalla SS, et al. The anti-osteoporotic and anti-atherogenic effects of alendronate and simvastatin in ovariectomized rats fed high fat diet: A comparative study of combination therapy versus monotherapy [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89:1115-1124.

[20] Tanaka S, Miyazaki T, Uemura Y, et al. Comparison of concurrent treatment with vitamin K2 and risedronate compared with treatment with risedronate alone in patients with osteoporosis: Japanese Osteoporosis Intervention Trial-03[J]. J Bone Miner Metab, 2017, 35(4):385-395.

[收稿日期] 2019-06-17

(上接第 57 页)

[3] 陶祥,郑芹,杨惠玲. S₁₈₀ 荷瘤鼠免疫器官等变化及小柴胡汤对其影响的研究[J]. 广东医学, 2004,25(12):1384-1385.

[4] 林帅,陈孟毅,刘冰,等. 环磷酸胺对不同年龄小鼠免疫细胞损伤及修复作用的影响[J]. 中国医药导报, 2016, 13(36):8-13.

[5] 路璐,张俊伶,李德冠,等. 6 Gy ¹³⁷Cs γ 射线照射对小鼠造血功能损伤的动态观察研究[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2015,39(5):393-396.

[6] 李德冠,樊赛军,孟爱民. 辐射导致长期骨髓抑制的研究进展[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2015,39(4):324-327.

[7] 管博文,卢延华,苏路路,等. 老年和青年 C57BL/6J 小鼠外周血及免疫细胞分型测定分析[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(7):24-28.

[8] Pang WW, Schrier SL, Weissman IL. Age-associated changes in human hematopoietic stem cells[J]. Semin Hematol, 2017, 54(1):39-42.

[9] 李德冠,王月英,路璐,等. 辐射对小鼠免疫系统损伤远期影响的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011,27(12):1362-1363.

[10] 李德冠,王月英,吴红英,等. 大剂量 γ 射线照射对小鼠免疫系统损伤远期影响的研究[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2012,36(2):109-112.

[11] 李德冠,王月英,王小春,等. p38 抑制剂对辐射损伤小鼠中免疫细胞的作用[J]. 天津医药, 2011,39(10):933-935.

[12] 崔玉芳,丁彦青,徐菡,等. 大剂量 γ 线照射对小鼠免疫功能近期、远期的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004,20(6):675-677.

[13] 吴安庆,陈秋,刘伟,等. X 射线全身照射对小鼠免疫系统的损伤效应[J]. 现代免疫学, 2013,33(3):193-196.

[14] He S, Sharpless NE. Senescence in health and disease[J]. Cell, 2017,169(6):1000-1011.

[15] Wang Y, Liu L, Pazhanisamy SK, et al. Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells[J]. Free Radic Biol Med,2010,48(2):348-356.

[16] Shao L, Wang Y, Chang J, et al. Hematopoietic stem cell senescence and cancer therapy-induced long-term bone marrow injury[J]. Transl Cancer Res,2013,2(5):397-411.

[17] Wood WA, Krishnamurthy J, Mitin N, et al. Chemotherapy and stem cell transplantation increase p16^{INK4a} expression, a biomarker of T-cell aging[J]. EBioMedicine, 2016, 11:227-238.

[收稿日期] 2019-06-17