

# 降钙素缓释剂髓腔内植入对大鼠骨质疏松的影响

虞陆超 李海旭 刘孚瑛 石文俊 周强 石继祥

**【摘要】 目的** 探讨降钙素缓释剂髓腔内植入对大鼠全身骨质疏松的影响。**方法** 将 40 只 3 月龄的雌性 SD 大鼠随机分为 4 组, A 组为卵巢切除联合低剂量降钙素组, B 组为卵巢切除联合高剂量降钙素组, C 组为卵巢切除联合空白磷酸钙载体组, D 组为假手术组, 每组各 10 只, 比较植入术后 2、4、8 周各组血钙和全身骨密度变化。**结果** 植入术后 8 周, 与 C 组相比, A 组和 B 组股骨近端骨密度均有显著改善( $P<0.05$ ), A 组和 B 组血钙浓度较 C 组显著下降( $P<0.05$ )。**结论** 降钙素缓释剂髓腔内植入可在大鼠体内稳定有效地释放降钙素, 降低血钙, 提高骨密度。

**【关键词】** 骨质疏松; 降钙素; 磷酸钙骨水泥; 缓释

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2017.02.013

**The effect of sustained-release salmon calcitonin on rat osteoporosis** YU Luchao, LI Haiyu, LIU Fuying, SHI Wenjun, ZHOU Qiang, SHI Jixiang. Department of Orthopaedics, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200333, China

Corresponding author: ZHOU Qiang E-mail: zhouqiang619@aliyun.com

SHI Jixiang E-mail: shijixiang75@sina.com

**【Abstract】 Objective** To evaluate the effect of intramedullary implantation of sustained-release salmon calcitonin on systemic osteoporosis of rats. **Methods** A total of 40 female SD rats aged 3 months were randomly divided into four groups; ovariectomized rats treated with low dose of calcitonin (Group A), ovariectomized rats treated with high dose of calcitonin (Group B), ovariectomized rats treated only with calcium phosphate carrier (Group C), and sham operation (Group D), with 10 rats in each group. Bone mineral density and serum calcium concentration were compared among the 4 groups at 2, 4, and 8 weeks after the operation. **Results** At 8 weeks after the operation, compared with Group C, the bone density at the proximal femur was improved significantly ( $P<0.05$ ) and the level of serum calcium was reduced significantly in Group A and Group B ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Intramedullary implantation of sustained-release salmon calcitonin can release the calcitonin in rats in an effective and stable manner to improve bone density and reduce serum calcium.

**【Key words】** Osteoporosis; Salmon calcitonin; Calcium phosphate cement; Sustained-release

骨质疏松症是一种以低骨量和骨组织微细结构破坏为特征, 并能导致骨的脆性及骨折危险性增加的疾病<sup>[1]</sup>。老年人尤其是绝经后妇女大多会出现进行性骨质疏松, 导致骨折风险增加<sup>[2-3]</sup>。骨折后由于成骨能力下降, 骨折愈合缓慢, 愈合后可能出现患肢废用性骨萎缩, 局部骨质疏松加重。药用鲑鱼降钙素由 32 个氨基酸残基组成, 生物活性较人降钙素高 20~40 倍, 可有效调节血钙浓度和骨代谢, 抑制破骨细胞骨吸收, 促进成骨细胞增殖和新骨生成, 减少骨质流失<sup>[4-5]</sup>。然而, 临床上常用的鲑鱼降钙素皮下注射或鼻腔吸入给药疗程过长, 患者难以坚持, 很少达到预期疗效。本实验旨在通过建立骨质疏松大鼠模型, 借助合适的缓

释递送载体将鲑鱼降钙素直接植入骨折部位以延长药物释放时间, 观察植入的降钙素缓释剂对大鼠血钙浓度及全身骨密度的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

所用的降钙素缓释剂全称为鲑鱼降钙素-聚乳酸-羟基乙酸共聚物/微球磷酸钙骨水泥复合物缓释载体, 为多孔表面, 呈圆柱状, 直径和长度均为 3 mm, 由复旦大学生命科学学院制备提供, 数量 30 粒, 每粒含鲑鱼降钙素 150 U (由上海苏豪逸明制药有限公司提供), 无菌消毒备用。

### 1.2 实验动物

SPF 级健康雌性 SD 大鼠 40 只, 3 月龄, 体质量 250~300 g, 由上海中医药大学附属普陀医院动物房提供, 实验前适应性 22℃ 温室饲养 1 周。实验过程中对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

作者单位: 200333, 上海中医药大学附属普陀医院骨科

通信作者: 周强 E-mail: zhouqiang619@aliyun.com

石继祥 E-mail: shijixiang75@sina.com

### 1.3 实验方法

将 40 只 3 月龄的雌性 SD 大鼠随机分为 4 组, A 组为卵巢切除联合低剂量鲑鱼降钙素组, B 组为卵巢切除联合高剂量鲑鱼降钙素组, C 组为卵巢切除联合空白磷酸钙载体组, D 组为假手术组, 每组各 10 只, 并予以荧光笔编号。用双能 X 线吸收骨密度测定仪(电压 76.0 KV, 电流 0.15 mA, 剂量  $1.8 \mu\text{Gy}$ )测定大鼠左侧股骨近端骨密度。然后对 A、B、C 组动物行腹部切口双侧卵巢切除术, D 组行假手术作为空白对照。术后 6 周测定相同部位骨密度, 骨密度平均值下降 20%(假手术组除外)提示骨质疏松模型建立<sup>[6]</sup>(图 1)。将建模成功的大鼠骨密度、血钙浓度作为本研究“治疗前”数据。

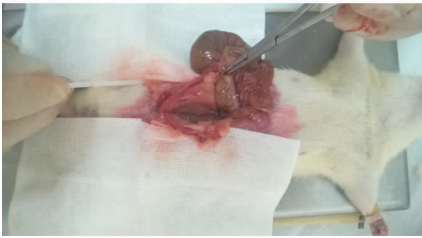


图 1 行大鼠腹部切口双侧卵巢切除术建立骨质疏松大鼠模型

腹腔注射 30 g/L 戊巴比妥溶液麻醉大鼠 (50 mg/kg), 刮除大鼠右下肢膝关节周边皮毛, 新洁尔灭棉球消毒 3 遍。作一长约 1.5 cm 的皮肤切口, 经膝关节前内侧入路暴露髌骨, 向外翻开髌骨及髌韧带, 屈膝  $90^\circ$ , 充分显露股骨髓, 自股骨内外髌中点用磨钻作一直径约为 2.5 mm 的开口, 将治疗药物植入大鼠右侧股骨髓腔内, A 组植入降钙素缓释剂 1 粒, B 组植入降钙素缓释剂 2 粒, C 组植入未载药的空白磷酸钙载体 1 粒, D 组不植入药物。伸膝后逐层缝合切口, 采用体积分数为 75% 的乙醇消毒, 术后分笼喂养, 并持续肌注青霉素 160 万单位 3 d(图 2~4)。

于植入术后 2、4、8 周分别取血进行血钙浓度检测, 其中第 2、4 周大鼠内眦取血, 取血量为 1 mL, 第 8 周心脏取血, 取血量大于 2 mL。每次取血前检测大鼠左侧股骨近端骨密度, 并对比用药前后骨密度变化。

植入术后 2、4 周取血时各有 2 只大鼠于取血当日或次日死亡, 可能原因包括内眦穿刺过深损伤大脑、取血量较大导致失血性休克及取血后大鼠互相舔舐伤口导致伤口持续失血等。植入术后 8 周共存活大鼠 36 只, 其中 A 组 9 只, B 组 8 只, C 组 9 只, D

组 10 只, 于第 3 次取血后采用过量麻醉法处死大鼠 (10% 水合氯醛溶液)。



图 2 用磨钻作大鼠右侧股骨髓开口

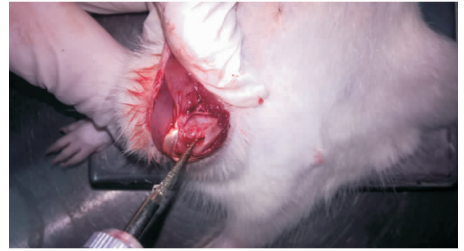


图 3 开口直径约 2.5 mm, 用锥形钻头调整开口大小



图 4 将降钙素缓释剂植入大鼠右侧股骨髓腔内

### 1.4 主要检测指标

主要检测指标包括: ①双能 X 线吸收骨密度测定仪测量大鼠股骨近端骨密度; ②术后 2、4、8 周分别取血进行大鼠血钙浓度检测, 分析其血钙浓度及骨密度动态变化。

### 1.5 统计学分析

所得计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析, 组间比较采用整组平均数对照分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 股骨近端骨密度变化

植入术后 8 周, A、B 组与 C 组股骨近端骨密度差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示降钙素缓释剂能显著改善骨质疏松大鼠模型骨密度; A 组与 B 组骨密度差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。比较 4 组植入术前后骨密度, 发现无论是低剂量鲑鱼降钙素还是高剂量鲑鱼降钙素, 均不能使卵巢切除大鼠骨密度恢复至正常大鼠骨密度水平 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

表 1 植入术前后 4 组股骨近端骨密度比较/ g · cm<sup>-3</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	植入术前	植入术后 2 周	植入术后 4 周	植入术后 8 周
A 组	0. 1849 ± 0. 1081	0. 1874 ± 0. 0085	0. 1956 ± 0. 0099	0. 2039 ± 0. 0118
B 组	0. 1857 ± 0. 0912	0. 1891 ± 0. 0119	0. 1977 ± 0. 0096	0. 2106 ± 0. 0150
C 组	0. 1861 ± 0. 0142	0. 1856 ± 0. 0096	0. 1805 ± 0. 0083	0. 1812 ± 0. 0084
D 组	0. 2801 ± 0. 0100	0. 2799 ± 0. 0112	0. 2804 ± 0. 0130	0. 2797 ± 0. 0096

表 2 植入术前后 4 组血钙浓度比较/ mmol · L<sup>-1</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	植入术前	植入术后 2 周	植入术后 4 周	植入术后 8 周
A 组	3. 012 ± 0. 173	2. 977 ± 0. 188	2. 853 ± 0. 227	2. 569 ± 0. 262
B 组	2. 993 ± 0. 212	2. 727 ± 0. 270	2. 662 ± 0. 314	2. 441 ± 0. 336
C 组	3. 004 ± 0. 146	3. 019 ± 0. 162	3. 024 ± 0. 078	3. 016 ± 0. 096
D 组	2. 239 ± 0. 106	2. 237 ± 0. 129	2. 242 ± 0. 127	2. 244 ± 0. 120

2.2 血钙浓度变化

植入术前 A、B、C 组血钙浓度显著高于 D 组 ( $P<0.05$ )。植入术后 8 周, A、B 组血钙浓度较 C 组显著下降 ( $P<0.05$ ), B 组血钙下降程度较 A 组更明显, 两者差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ) (表 2)。

3 讨论

目前国内外对于骨质疏松的研究主要方向是抑制破骨细胞活性和增强成骨细胞活性。降钙素作为成熟的临床药物, 被证实对老年骨质疏松有确切疗效且安全性高, 目前已广泛应用于临床<sup>[7]</sup>。降钙素属于调节血钙浓度的激素, 通过作用于破骨细胞表面降钙素受体来抑制成熟破骨细胞对骨吸收的作用, 减缓骨密度降低<sup>[8]</sup>。目前人工合成和生物重组降钙素有很高的生物活性, 对多种类型骨质疏松有预防和治疗作用。对于糖皮质激素缺乏导致的骨质疏松, 降钙素可起到阻止骨量进一步丢失的疗效<sup>[9]</sup>; 对绝经后雌激素缺乏导致的骨质疏松, 降钙素可有效增加松质骨强度, 维生素 D 与之可起到协同治疗的作用<sup>[10]</sup>。

降钙素属于多肽类激素, 生物学稳定性较差, 常规给药途径是皮下注射或鼻腔吸入, 患者依从性差, 费用高, 很大程度地限制了临床应用<sup>[11]</sup>, 对其给药途径、给药方式改进是近期研究热点。Tang 等<sup>[12]</sup>利用聚乳酸-羟基乙酸共聚物构建了鲑鱼降钙素缓释剂, 体外获得了 20~40 d 的缓释效果, 该缓释剂生物学活性稳定, 置于甲强龙诱发的骨质疏松大鼠模型皮下, 可有效减缓骨质疏松进展。近期许多学者研制了新型降钙素口服缓释剂, 期望可以减少胃肠道对多肽的破坏。Binkley 等<sup>[13]</sup>将新型降钙素口服缓释剂用于临床, 同时补充活性维生素 D, 取得了

不低于降钙素鼻喷剂的疗效, 不良反应低于 10%。然而 Maricic<sup>[14]</sup>报道, 应用降钙素口服缓释剂治疗骨质疏松的结果令人失望, 表明口服降钙素缓释剂尚未成熟。

磷酸钙骨水泥是自固化人工骨修复材料, 生理条件下可固化为羟基磷灰石, 化学结构类似于自然骨磷灰石, 具有可降解性和生物相容性等特点, 可作为药物缓释载体。此外, 磷酸钙骨水泥与聚乳酸-羟基乙酸共聚物载药微球复合后, 易形成大孔结构, 利于骨组织长入。因此, 鲑鱼降钙素-聚乳酸-羟基乙酸共聚物/微球磷酸钙骨水泥复合物缓释载体可在骨质疏松动物模型中达到较高的局部药物浓度, 并改善全身骨质疏松症状。

本实验采用了在临床上已广泛应用于骨质疏松患者的鲑鱼降钙素, 其使用剂量 (每日 5 U/kg) 经科学换算确定, 血药浓度近似人体每日 50 U/kg 剂量时的血药浓度, 而所制备的鲑鱼降钙素-聚乳酸-羟基乙酸共聚物/微球磷酸钙骨水泥复合物缓释载体在体外实验中 50 d 药物释放量约为载药量的 51.7%, 因此 A 组给予 150 U 的载药量, 而 B 组则给予 300 U 的载药量, 以探讨最适宜的给药剂量。本实验在去卵巢大鼠骨质疏松模型股骨髓内植入可稳定释放的鲑鱼降钙素缓释剂, 并检测术后血钙浓度及骨密度, 结果显示植入术后 8 周, 无论是 A 组还是 B 组, 大鼠股骨近端骨密度均显著提高 ( $P<0.05$ ), 且两组骨密度改善效果差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 认为髓腔内植入鲑鱼降钙素缓释剂可有效提高大鼠骨密度, 改善因内源性雌激素下降 (如绝经、卵巢切除等) 导致的骨质疏松症状。

本实验中所使用的鲑鱼降钙素-聚乳酸-羟基乙

酸共聚物/微球磷酸钙骨水泥复合物缓释载体可以恒定速率水解,并向血清中持续释放鲑鱼降钙素,抑制破骨细胞活性,提高骨密度,而 B 组与 A 组治疗效果差异不大可能是由于破骨细胞表面降钙素受体饱和造成,因此可以推测继续提高药量并不能进一步改善骨质疏松症状。值得注意的是,本实验中植入术后 8 周 B 组骨密度仍低于正常大鼠 20% 以上,依然可以诊断为骨质疏松症(人类骨质疏松症诊断标准为低于同龄正常人群 2.5 个标准差以上),因此未来的研究方向应着重于将鲑鱼降钙素与其他类型抗骨质疏松药物(如钙剂、双膦酸盐类、维生素 D 和维生素 K 等)联合应用,多种药物协同作用以进一步提高疗效。

血钙浓度主要受破骨细胞活性影响,破骨细胞活性增高,则钙离子释放增多,血钙浓度升高,骨质疏松症状加重,而降钙素降低血钙浓度最主要的途径是抑制破骨细胞活性。比较植入术前各组血钙浓度,可见去卵巢大鼠破骨细胞活性增强,骨质破坏后钙离子释放入血液中,使血钙浓度显著升高( $P < 0.05$ );植入术后 8 周,A、B 组血钙浓度较 C 组显著下降( $P < 0.05$ ),B 组血钙浓度下降程度较 A 组更明显,两者差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。降钙素降低血钙浓度有以下 4 条途径:①抑制小肠对钙离子的吸收;②抑制破骨细胞活性,减少骨骼中钙离子流失到血液中;③抑制肾小管对磷酸根离子的重吸收作用;④抑制肾小管对钙离子的重吸收作用,增加钙离子自尿液流失。由于破骨细胞表面降钙素受体存在饱和现象,高剂量降钙素不能进一步改善骨质疏松症状,却可使血钙浓度进一步下降,并导致低钙血症,本实验中未观察到大鼠出现四肢抽搐等症状,但临床应用中应将降钙素与钙剂联合使用,以减少可能出现的不良反应。

本实验设计源于在临床上老年骨质疏松骨折手术过程中可将鲑鱼降钙素缓释剂植入髓腔,这样可能可提供更有效的给药方式,同时不会增加患者创伤。本实验由于实验动物数量较少,并存在动物死亡的情况,采用了整组平均数对照分析,在接下来的研究中将采用配对设计的方法,进一步提高实验结果的准确性。本实验显示,鲑鱼降钙素缓释剂骨髓腔内局部应用可有效改善全身骨质疏松症状,但是否会有效促进局部骨折愈合尚待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 郭世拔,罗先正,邱贵兴. 骨质疏松基础与临床[M]. 天津: 科学技术出版社, 2001:522-531.
- [2] Espanol M, Perez RA, Montufar EB, et al. Intrinsic porosity of calcium phosphate cements and its significance for drug delivery and tissue engineering applications[J]. Acta Biomater, 2009, 5(7):2752-2762.
- [3] Low KL, Tan SH, Zein SH, et al. Calcium phosphate-based composites as injectable bone substitute materials [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2010, 94(1):273-286.
- [4] Victor SP, Sharma CP. Calcium phosphates as drug delivery systems[J]. J Biomater Tiss Eng, 2012, 2(4):269-279.
- [5] Park J, Lee G, Shin US. Self-hardening microspheres of calcium phosphate cement with collagen for drug delivery and tissue engineering in bone repair[J]. J Am Cera Soc, 2011, 94(9):3149.
- [6] 陈柏龄,廖威明,李佛保,等. 轻度承重活动对卵巢切除大鼠骨密度组织计量和生物力学的影响[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2001, 22(3):187-191.
- [7] Curtis JR, Safford MM. Management of osteoporosis among the elderly with other chronic medical conditions[J]. Drugs Aging, 2012, 29(7):549-564.
- [8] Lee HJ, Kim SY, Kim GS, et al. Fracture, bone mineral density, and the effects of calcitonin receptor gene in postmenopausal Koreans[J]. Osteoporos Int, 2010, 21(8):1351-1360.
- [9] Ezzat BA. Validity of prevention of glucocorticoid-induced alveolar bone loss in rat by either calcitonin or alendronate administration[J]. Arch Oral Biol, 2010, 55(10):788-796.
- [10] Andresen CJ, Moalli M, Turner CH, et al. Bone parameters are improved with intermittent dosing of vitamin D3 and calcitonin[J]. Calcif Tissue Int, 2008, 83(6):393-403.
- [11] Lewiecki EM. Emerging drugs for postmenopausal osteoporosis[J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2009, 14(1):129-144.
- [12] Tang Y, Singh J. Thermosensitive drug delivery system of salmon calcitonin: in vitro release, in vivo absorption, bioactivity and therapeutic efficacies[J]. Pharm Res, 2010, 27(2):272-284.
- [13] Binkley N, Bolognese M, Sidorowicz-Bialynicka A, et al. A phase 3 trial of the efficacy and safety of oral recombinant calcitonin: the oral calcitonin in postmenopausal osteoporosis (ORACAL) trial[J]. J Bone Miner Res, 2012, 27(8):1821-1829.
- [14] Maricic MJ. Oral calcitonin [J]. Curr Osteoporos Rep, 2012, 10(1):80-85.

(收稿:2016-09-12;修回:2016-11-28)

(本文编辑:翁洁敏)