



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102397550 B

(45) 授权公告日 2013. 05. 08

(21) 申请号 201110269822. 6

(22) 申请日 2011. 08. 30

(73) 专利权人 广东医学院

地址 524023 广东省湛江市霞山区文明东路
2 号

专利权人 湛江广医医药科技开发有限公司

(72) 发明人 吴铁 林思恩 黄健萍 吴玲芝
崔燎

(51) Int. Cl.

A61K 45/00(2006. 01)

A61K 31/616(2006. 01)

A61P 19/10(2006. 01)

A61K 31/05(2006. 01)

A61K 31/565(2006. 01)

A61K 31/566(2006. 01)

A61K 31/569(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1947719 A, 2007. 04. 18, 说明书第 2 页第
3 段.

CN 1279611 A, 2001. 01. 10, 说明书第 2 页第
2 段, 第 5 页第 2 段.

CN 1480142 A, 2004. 03. 10, 说明书第 2 页第
9-10 行, 第 24-27 行, 第 3 页第 4-6 段, 第 4 页第
13-14 行.

蔡小华, 等. 骨质疏松症药物研究进展. 《怀
化医学学报》. 2002, 第 1 卷 (第 1 期), 第 67-70
页.

DOUGLAS S. SCHERR, et al. THE
NONSTEROIDAL EFFECTS OF DIETHYLSTILBESTROL:
THE RATIONALE FOR ANDROGEN DEPRIVATION
THERAPY WITHOUT ESTROGEN DEPRIVATION IN THE
TREATMENT OF PROSTATE CANCER. 《THE JOURNAL
OF UROLOGY》. 2003, 第 170 卷第 1703-1708 页.

审查员 杨叶波

权利要求书1页 说明书9页

(54) 发明名称

一组由阿司匹林与雌激素组成的防治骨质疏
松症的药物组合物

(57) 摘要

本发明公开了一种由阿司匹林与雌激素组成
的用于预防及治疗骨质疏松的药物组合物及其配
方, 设计了用具有抗血小板和抗炎的双重效应的
阿司匹林与临床剂量的三分之一到十分之一的剂
量雌激素的药物组合物, 并证明了该组合物有明
显的抗骨质疏松作用。由于阿司匹林 100mg 剂
量在临床通过抗血小板能显著降低冠心病患者心
血管事件发生率已得到临床证实, 其减少在骨质
疏松患者中应用雌激素替代疗法导致的脑卒中, 心
脏病的发病率, 下肢和肺部发生血管栓塞的概率
将有明显的作用, 该复方与单用雌激素相比, 还
具有不抑制骨形成的优点, 是理想的抗骨质疏松
的新药物。

CN 102397550 B

1. 一组防治骨质疏松症的药物组合物,其特征是由阿司匹林与己烯雌酚两种药物配伍组成,阿司匹林与己烯雌酚的组成比例为 1000 : 1 ~ 2,加上药剂学方面的辅料,制成供临床应用的药物组合物。

一组由阿司匹林与雌激素组成的防治骨质疏松症的药物组合物

[0001] 技术领域本发明涉及用阿司匹林与雌激素组成的药物组合物,该药物组合物制备的复方制剂,对妇女绝经期后骨质疏松具有较好的预防及治疗作用。

[0002] 背景技术绝经期后骨质疏松属原发性骨质疏松症的其中一种。原发性骨质疏松症是一种以低骨量和骨组织微结构破坏为特征,导致骨骼脆性增加和易发生骨折的全身性疾病,可分为绝经后骨质疏松和老年性骨质疏松两型。绝经期后骨质疏松是60岁以上妇女的常见病,多发病,主要是由于雌激素缺乏所致,常发生于绝经后数年内的女性,其中多数患者的骨转换率增高,旧骨大量迅速丢失,新骨形成加快,骨的新旧转换速率加速,但由于骨丢失超过了骨形成,骨量以丢失为主,形成了骨质疏松,故该型的骨质疏松也称为高转换型骨质疏松。

[0003] 妇女在妊娠和哺乳期,对钙磷的需要量较正常妇女增加一倍,如得不到合理的补充,就容易骨量减少或骨质疏松,一般妇女到35岁时骨骼的质量通常达到顶点,从这时起,骨的重建过程仍继续进行,但质量开始减少。到围绝经期头3~5年间最迅速,以后丢失速度逐渐减慢,但持续进行,流行病学研究表明,50~69岁女性的骨质疏松症的发病率高于50%,这段期间刚好是绝经后的5~10年,妇女的雌激素水平明显降低,这与骨质疏松的发生率密切相关;80岁以上的老年妇女骨密度更低,有随时发生骨折的危险。老龄是骨折的重要危险因子,85岁组发生前臂、肱骨、椎体和髌部骨折的可能性为45岁组妇女的8倍,在男性为5倍。绝经期后老年妇女骨代谢的机制主要是由于骨髓基质细胞向成骨细胞方向分化受抑,成骨细胞分裂增殖缓慢及骨形成因子合成代谢受阻,由破骨细胞介导的成骨过程受到抑制、成骨细胞活性衰退致骨形成期延长,骨形成率降低;同时破骨细胞分化、成熟和骨吸收活性却仍相对处活跃状态,骨吸收能力超过了骨形成,骨转换率增加但骨丢失也增加,所以导致骨质疏松的发生。此外,随着年龄的增加活性氧簇水平增加,抗氧化能力减低,谷胱甘肽还原酶的水平下降,使成骨细胞及骨细胞的凋亡增加,加速了骨丢失,因此氧化应激可能是老年性骨质疏松发生的重要原因。

[0004] 自然绝经或卵巢切除后绝经均可导致骨量丢失,后者发展更快,小梁骨丢失更为明显,说明了雌激素与骨质疏松症有密切的关系,绝经期由于卵巢功能衰退,雌激素分泌减少。雌激素具有抗骨吸收作用,是维持骨矿含量的关键激素,其机制主要与雌激素对骨生成的直接作用及对抗甲状旁腺的骨吸收作用有关;目前认为,雌激素抗骨吸收可能与其抑制成骨细胞凋亡和促进破骨细胞凋亡的作用有关。雌激素减少一直被认为是绝经期后骨质疏松症发生的重要原因,雌激素能增强成骨型细胞的表达并减少诱导骨吸收的环磷酸腺苷形成,还能与特异的DNA结合,促进特异mRNA合成。通过对绝经后骨质疏松症妇女应用大剂量雌二醇治疗进行的临床观察,证明了较大剂量的雌激素可有效的增加骨密度,促进骨的再矿化,有利于骨质疏松症的治疗。雌激素影响骨代谢的作用机制主要是通过钙调节激素(甲状旁腺激素、1,25双羟维生素D₃、降钙素)而实现的。采用放射配基分析等方法在人和大鼠的成骨细胞、人初级成骨细胞、儿童骨膜分离的破骨细胞上发现雌激素受体,提示雌激素可能直接作用于骨细胞上的雌激素直接作用于成骨细胞和破骨细胞,通过各种细胞因子

(白细胞介素-6等)抑制破骨细胞骨吸收作用。绝经后妇女血胰岛素、IGF-I和瘦素水平与骨密度均无直接关系。

[0005] 雌激素替代疗法是指给绝经后妇女补充适量雌激素,以缓解雌激素缺乏造成的绝经后症状的一种疗法。雌激素与孕激素合用称为激素替代疗法,加用孕激素的目的是为防止子宫内膜增生。雌激素替代疗法和激素替代疗法是目前已知疗效最为确切的抗骨吸收疗法。雌激素及雌激素类似物刺激成骨细胞的增殖和胶原合成,抑制成骨细胞分泌骨吸收刺激因子,从而降低骨转换,抑制骨吸收。并可促进活性维生素D₃生成;降低破骨细胞对甲状旁腺素的敏感性,减少骨吸收;促进降钙素的合成。研究结果表明雌激素可防止80%~90%的绝经后妇女的骨丢失,保持骨量,预防骨质疏松。然而随着应用病例的增多,雌激素替代疗法的副作用逐渐暴露,长期单独服用雌激素可使乳腺癌、子宫内膜癌发生率增加5至7倍,使脑卒中和心脏病的发病率提高了40%和29%,并使下肢和肺部发生血管栓塞的概率增加了1倍。

[0006] 阿司匹林是常用的解热镇痛药,具有抗血小板和抗炎的双重效应,其通过抗血小板能显著降低冠心病患者心血管事件发生率已得到大量大规模临床试验的证实,本项目组近年的研究已证实该药还有预防骨质疏松的作用,并据此设计了小剂量阿司匹林和小剂量己烯雌酚组成复方制剂(简称A-D合剂),希望通过添加阿司匹林以减少雌激素的用量,在增加抗骨质疏松的同时,也能减少雌激素的血栓形成等心血管意外。

[0007] 发明内容 本发明提出用具有抗血小板和抗炎的双重效应的阿司匹林与雌激素联合应用防治“骨质疏松症”研究的理论和思路,我们发现阿司匹林与雌激素组成的方制剂,可以减少雌激素的临床用量,在抗骨质疏松疗效方面有协同作用,己烯雌酚与阿司匹林组方时,阿司匹林片用临床预防心血管意外的剂量100mg即可,己烯雌酚可用临床剂量的三分之一到十分之一的剂量即可,由于阿司匹林100mg剂量在临床通过抗血小板能显著降低冠心病患者心血管事件发生率已得到大量大规模临床试验的证实,其减少雌激素替代疗法导致的脑卒中,心脏病的发病率,下肢和肺部发生血管栓塞的概率必有明显的作用,该复方与单用雌激素相比,还具有不抑制骨形成的优点,是理想的抗骨质疏松药物。

[0008] 本发明提出用雌激素是指己烯雌酚,雌酮,戊酸雌二醇,尼尔雌醇,替勃龙,普瑞马林等,这些药物与阿司匹林组成复方制剂可用其临床常用剂量的二分之一到十分之一,其最佳的剂量是三分之一到五分之一,阿司匹林组成该复方的剂量为50mg到200mg,其最佳配方是100mg。

[0009] 本发明提出阿司匹林与雌激素组成的防治骨质疏松症的药物组合物,主要是指阿司匹林片和己烯雌酚组成的组合物,阿司匹林与己烯雌酚的组成比例为1000:1~2,即阿司匹林在该复合物中按重量计算为100毫克时,己烯雌酚在该复合物中按重量计算为0.1~0.2毫克。这种药物组合物可按药剂学的工艺添加片剂生产的必要的辅料,压制成片剂,供临床应用,也可按现代工艺制备成丸剂、颗粒剂、胶囊剂、注射剂和任何一种临床可接受的药物制剂,供临床应。

[0010] 本发明提出用阿司匹林与己烯雌酚组成的组合物,制备成片剂时,每片含阿司匹林100毫克,己烯雌酚0.1~0.2毫克。临床应用时每天1~2片。

[0011] 具体实施方式:实施例一

[0012] 为证实小剂量阿司匹林和小剂量己烯雌酚组成复方制剂(简称A-D合剂),具有抗

骨质疏松作用,本实验以大鼠去卵巢建立骨质疏松模型,通过血液生化、骨形态计量学、骨密度等研究方法,观察该复方制剂是否可对去卵巢大鼠骨质疏松有增效作用并减少不良反应,现报告如下:

[0013] 1 材料和方法

[0014] 1.1 材料

[0015] 1.1.1 实验动物及分组 选用4月龄SPF级雌性SD大鼠42只(广东医学院实验动物中心提供),体重(254±20)g。适应性喂养10d。于实验开始前随机挑选出6只作为基础组(BAS),于实验前进行取材。其余36只大鼠随机分为假手术组(SHAM),去卵巢组(OVX)、己烯雌酚组(OVX+D)、阿司匹林己烯雌酚复方组(OVX+A-D),每组9只。所有动物自由摄水及摄食(标准饲料,含钙1.33%,磷0.95%),在室温25~28℃,湿度75~80%清洁级环境中喂养。

[0016] 1.1.2 药物 己烯雌酚片,合肥久联制药有限公司,每片0.5mg;阿司匹林己烯雌酚复方制剂(A-D合剂):每片含阿司匹林100mg,己烯雌酚0.1mg。(由广东医学院医药科技开发中心配制);盐酸四环素,美国Sigma Chemical Co;Calcein,美国Sigma Chemical Co。

[0017] 1.1.3 仪器 美国Buehler LTD慢速锯;德国Leica2155硬组织切片机;德国Leica碳化钨钢刀;日本Nikon自动化图像数字分析仪;美国Osteometrics骨组织形态计量学软件;美国Norland公司p-DEXA Sabre scanner。

[0018] 1.2 方法

[0019] 1.2.1 动物处理 在动物全身麻醉条件下,参照文献方法^[5]对各实验组大鼠作双侧去卵巢手术,假手术组做同样手术,但不去除卵巢。术后三天开始随机分组,每组9只。正式实验:假手术组以生理盐水5ml·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,己烯雌酚组以己烯雌酚30μg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,A-D合剂按阿司匹林10mg·kg⁻¹·d⁻¹和己烯雌酚10μg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,各组大鼠均连续灌胃给药90d。动物每周称重一次,按照体重变化调整给药剂量。所有动物在处死前14、13天和4、3天分别皮下注射四环素30mg·kg⁻¹·d⁻¹和钙黄绿素10mg·kg⁻¹·d⁻¹进行体内荧光标记。实验结束时,大鼠麻醉后心脏抽血处死,取血液做生化指标测定,并取左胫骨做骨组织形态计量学研究,取左股骨做骨密度扫描。。

[0020] 1.2.3 血液生化检测 血液生化指标如总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和碱性磷酸酶(ALP)均通过试剂盒进行检测,试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。上述所有操作均按照试剂盒说明书要求进行。

[0021] 1.2.2 骨组织形态计量 取左侧胫骨,以慢速锯暴露骨髓腔,取其上段以10%福尔马林缓冲液固定24h、随后进行梯度酒精脱水,二甲苯透明以甲基丙烯酸甲酯进行不脱钙骨包埋。包埋剂硬化后以石膏打磨机打磨成合适的形状,随后用Leica 2155型硬组织切片机切成9μm厚片和5μm薄片。9μm厚片直接封片测量动态参数;5μm薄片行硝酸银染色,封片后测量静态参数,运用公式^[6,7]计算有关参数。

[0022] 为避开初级海绵体,胫骨上段测量范围为生长板远端1mm~4mm之间的松质骨区域。静态测量参数包括骨组织总面积(T.Ar)、骨小梁面积(Tb.Ar)、骨小梁周长(Tb.Pm)、破骨细胞个数(N.Oc)、破骨细胞贴壁长度(Oc.S)。动态测量参数包括单荧光周长(sL.Pm)、双荧光周长(dL.Pm)、双标记间隙(Ir.L.Wi)。参照相关公式,可以计算出计算参数:骨小梁

面积百分数 (% Tb. Ar) 降低、骨小梁厚度 (Tb. Th)、骨小梁数目 (Tb. N)、骨小梁分离度 (Tb. Sp)、每毫米破骨细胞数目 (Oc. N)、破骨细胞周长百分数 (% Oc. Pm)、标记周长百分数 (% L. Pm)、骨矿化形成率 (MAR)、骨形成率 (BFR/BV)、骨形成率 (BFR/BS)、骨形成率 (BFR/TV)。

[0023] 1.2.4 骨密度检测 采用美国 Norland 公司 p-DEXA Sabre 扫描仪对左股骨整体进行骨密度扫描,扫描参数包括骨组织面积 (Bone Area)、骨矿含量 (BMC),骨密度 BMD 按照以下公式计算 : $BMD = BMC / \text{Bone Area}$ 。

[0024] 1.3 统计 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS16.0 软件行 ANOVA 方差分析并以 LSD-t 检验进行组间比较, $P < 0.05$ 可认为具有统计学意义。

[0025] 2 结果

[0026] 2.1 己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠体重和子宫重量变化的影响

[0027] 己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠体重和子宫重量变化的影响见表 1 :

[0028] 表 1 :己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠体重和子宫重量变化的影响 ($\bar{x} \pm s$)

[0029]

组别	体重 (g)	子宫重量 (g)
基础组	254 \pm 20	—
假手术组	305 \pm 13	0.85 \pm 0.30
去卵巢组	339 \pm 30 ^b	0.18 \pm 0.04 ^{bb}
去卵巢+己烯雌酚组	284 \pm 30 ^{cc}	0.67 \pm 0.18 ^{cc}
去卵巢+A-D 合剂组	302 \pm 25 ^c	0.60 \pm 0.36 ^c

[0030] 注 :b :与假手术组比较, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$;c :与去卵巢组比较 ^c $P < 0.05$, ^{cc} $P < 0.01$ 。

[0031] 由表 1 结果可知,与假手术 (SHAM) 组相比,去卵巢 (OVX) 组大鼠体重增加 11.5% ($P < 0.01$),子宫重量降低 78.8% ($P < 0.01$) ;与 OVX 组相比,己烯雌酚组大鼠体重下降 16.2% ($P < 0.01$) ;A-D 合剂组大鼠体重下降 10.9% ($P < 0.05$) ;与 OVX 组相比,己烯雌酚组大鼠子宫重量增加 272.2% ($P < 0.01$),A-D 合剂组大鼠子宫重量增加 233.3% ($P < 0.05$)。两个用药组相比,大鼠体重与子宫重量没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

[0032] 2.2 己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠血脂及血清碱性磷酸酶的影响

[0033] 己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠血脂及血清碱性磷酸酶的影响见表 2 :

[0034] 表 2 己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠血脂及血清碱性磷酸酶的影响 ($\bar{x} \pm s$)

[0035]

组别	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	ALP (IU/L)
假手术组	1.62±0.58	1.20±0.38	0.33±0.16	30.57±15.82
去卵巢组	2.39±0.67 ^{bb}	1.27±0.24	0.31±0.10	47.44±12.23 ^b
去卵巢+己烯雌酚组	0.96±0.37 ^{bb,cc}	0.97±0.22 ^c	0.37±0.13	37.17±16.64
去卵巢+A-D 合剂组	1.13±0.30 ^{bb,cc}	0.71±0.15 ^{cc,d}	0.37±0.18	45.18±11.63

[0036] 注:b:与假手术组比较,^bP < 0.05, ^{bb}P < 0.01;c:与去卵巢组比较^cP < 0.05, ^{cc}P < 0.01.d:与己烯雌酚组比较:^dP < 0.05.

[0037] 由表 2 结果可知,与假手术组相比,去卵巢后大鼠血清总胆固醇 (TC) 显著增加了 47.5% (P < 0.01),低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 和高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 无显著变化;与去卵巢组相比,己烯雌酚组大鼠血清 TC 降低 59.8% (P < 0.01),LDL 降低 23.6% (P < 0.05);与假手术组相比,去卵巢组大鼠血清碱性磷酸酶 (ALP) 显著增高 (P < 0.05);己烯雌酚组或 A-D 合剂组与去卵巢组相比,均无统计学差异。两个用药组相比,各项血清学指标均无统计学差异。

[0038] 2.3 己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠胫骨上段骨组织静态参数的影响

[0039] 己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠胫骨上段骨组织静态参数的影响见表 3:

[0040] 表 3:己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠胫骨上段骨组织静态参数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

[0041]

组别	%Tb. Ar (%)	Tb. Th (μm)	Tb. N (#/mm)	Tb. Sp (μm)
基础组	27.30±4.34	48.31±2.72	5.65±0.85	132.11±29.27
假手术组	29.70±4.73	51.91±4.74	5.70±0.55	125.02±20.16
去卵巢组	8.90±4.27 ^{bb}	40.65±5.72 ^{bb}	2.12±0.87 ^{bb}	594.59±506.87 ^{bb}
去卵巢+己烯雌酚组	19.95±4.47 ^{bb,cc}	43.88±4.80 ^{bb}	4.51±0.62 ^{bb,cc}	181.45±32.96 ^{cc}
去卵巢+A-D 合剂组	18.53±4.71 ^{bb,cc}	44.53±4.12 ^{bb}	4.15±0.97 ^{bb,cc}	211.23±76.06 ^{cc}

[0042] 注:同表 2.

[0043] 从表 3 结果可见,与基础组相比,假手术组各静态参数和吸收参数均无显著性差异 (P > 0.05);与假手术组相比,去卵巢组骨小梁面积百分数 (% Tb. Ar) 降低 70.0% (P < 0.01),骨小梁厚度 (Tb. Th) 降低 21.7% (P < 0.01),骨小梁数目 (Tb. N) 降低 62.8% (P < 0.01),骨小梁分离度 (Tb. Sp) 增加 378.6% (P < 0.01),与去卵巢组相比,己烯雌酚组 % Tb. Ar 增加 124.2% (P < 0.01),Tb. N 增加 112.7% (P < 0.01),Tb. Sp 减少 69.5% (P < 0.01);与去卵巢组相比,A-D 合剂组 % Tb. Ar 增加 108.2% (P < 0.01),Tb. Th 无显著增加 (P > 0.05),Tb. N 增加 95.7% (P < 0.01),Tb. Sp 减少 64.5% (P < 0.01);两个用药组之间各静态均无统计学差异 (P > 0.05)。

[0044] 2.4 己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠胫骨上段骨组织骨吸收参数的影响

[0045] 己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠胫骨上段骨组织骨吸收参数的影响见表 4 ;
 [0046] 表 4 :己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠胫骨上段骨组织骨吸收参数的影响
 [0047]

组别	Oc.N (#/mm)	%Oc.Pm (%)
基础组	0.32±0.18	0.22±0.13
假手术组	0.42±0.28	0.38±0.17
去卵巢组	0.91±0.47 ^{bb}	1.04±0.56 ^{bb}
去卵巢+己烯雌酚组	0.50±0.24 ^{cc}	0.48±0.10 ^{cc}
去卵巢+A-D 合剂组	0.55±0.29 ^{cc}	0.56±0.23 ^{cc}

[0048] 注 :同表 2.

[0049] 从表 4 结果可见,与基础组相比,假手术组大鼠各吸收参数无显著性差异 ($P > 0.05$);与假手术组相比,去卵巢组大鼠每毫米破骨细胞数目 (Oc.N) 增加 116.7% ($P < 0.01$),破骨细胞周长百分数 (% Oc.Pm) 增加 173.7% ($P < 0.01$);与去卵巢组相比,己烯雌酚组 Oc.N 减少 45.1% ($P < 0.01$), % Oc.Pm 减少 53.8% ($P < 0.01$);与去卵巢组相比, A-D 合剂组 Oc.N 减少 39.6% ($P < 0.01$), % Oc.Pm 减少 46.2% ($P < 0.01$);两个用药组之间各静态及吸收参数均无统计学差异 ($P > 0.05$)。

[0050] 2.5 己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠胫骨上段骨组织动态参数的影响

[0051] 己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠胫骨上段骨组织动态参数的影响见表 5 :

[0052] 表 5 :己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠胫骨上段动态参数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

[0053]

组别	%L.Pm (%)	MAR ($\mu\text{m}/\text{d}$)	BFR/BS (%/yr)	BFR/BV (%/yr)	BFR/TV (%/yr)
基础组	18.3±1.2	0.91±0.18	16.8±3.3	211.0±37.6	57.2±10.9
假手术组	18.2±2.8	0.94±0.11	17.0±3.4	200.3±38.9	59.2±13.9
去卵巢组	24.3±6.8 ^b	0.84±0.15	20.5±8.3	302.4±105.6 ^b	61.8±17.6
去卵巢+己烯雌酚组	17.2±5.1 ^{cc}	0.98±0.18	17.2±7.8	242.2±101.7	46.8±18.7
去卵巢+A-D 合剂组	22.5±3.9 ^d	0.85±0.12	19.2±4.9	265.7±72.0	48.7±18.9

[0054] 注 :同表 2.

[0055] 从表 5 可见,与基础组相比,假手术组各动态参数无显著性差异;与假手术组相比,去卵巢组大鼠标记周长百分数 (% L.Pm) 显著增加 33.5% ($P < 0.05$), BFR/BV 增加 51.0% ($P < 0.05$), BFR/BS、BFR/TV 有所增加但无统计学差异;与去卵巢组相比,己烯雌酚组 % L.Pm 显著降低 29.2% ($P < 0.01$), BFR/BS、BFR/BV 和 BFR/TV 均有所减低但没有显著性差异 ($P > 0.05$);与去卵巢组相比, A-D 合剂组 % L.Pm、BFR/BS、BFR/BV 和 BFR/TV 均有所降低但无显著性差异,而与己烯雌酚组相比, A-D 合剂组荧光标记周长百分数 (% L.Pm)

显著增加 ($P < 0.05$), 除 MAR 稍低外 ($P > 0.05$), BFR/BS、BFR/BV 和 BFR/TV 均有所增高, 但差异无显著性 ($P > 0.05$)。

[0056] 2.6 己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠股骨骨密度的影响

[0057] 己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠股骨骨密度的影响见表 6:

[0058] 表 6: 己烯雌酚与 A-D 合剂对去卵巢大鼠股骨骨密度的影响

[0059]

组别	BMD (g/cm^2)
基础组	0.088±0.012
假手术组	0.125±0.013 ^{aa}
去卵巢组	0.100±0.020 ^{bb}
去卵巢+己烯雌酚组	0.126±0.015 ^{cc}
去卵巢+A-D 合剂组	0.126±0.018 ^{cc}

[0060] 注: a: 与基础组对比, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$, 其余同表 2.

[0061] 由表 6 结果可见, 与基础组相比, 假手术组大鼠左股骨骨密度 (BMD) 显著增加 ($P < 0.01$); 与假手术组相比, 去卵巢后大鼠左股骨 BMD 显著降低 ($P < 0.01$), 提示骨量明显降低; 与去卵巢组比较, 己烯雌酚组大鼠及 A-D 合剂组大鼠均能显著增加股骨骨密度 ($P < 0.01$), 提示药物预防后大鼠骨量显著增加。两个用药组之间的骨密度值接近, 无统计学差异 ($P > 0.05$)。

[0062] 3 讨论

[0063] 3.1 去卵巢可致大鼠产生明显的骨质疏松表现

[0064] 本实验通过骨组织形态计量学方法观察到, 大鼠去卵巢 12 周后, 骨小梁变得稀疏, 间隔增宽, % Tb. Ar 降低 70.0% ($P < 0.01$); 呈现典型的骨质疏松的静态表现, 对破骨细胞的观察可见 Oc. N 和 Oc. Pm% 显著增加 ($P < 0.01$), 提示该模型骨吸收活性是增加的, 对成骨指标观察, 骨形成参数 % L. Pm 和 BFR/BV 明显增加 ($P < 0.05$), 说明骨形成率增高, 这种去卵巢导致的骨质疏松骨吸收增加, 骨形成也增加, 属于高转换型的骨质疏松。通过骨密度检测, 也证实去卵巢后大鼠股骨骨密度显著降低; 另外, 研究还观察到去卵巢后大鼠体重明显增加, 子宫重量明显减轻、血清总胆固醇及低密度脂蛋白明显增加, 说明了这种骨质疏松伴随子宫萎缩及血脂增高等特征, 与人类绝经期骨质疏松相似, 与本课题组以往的报道相一致^[5,8]。

[0065] 3.2 雌激素替代疗法可以预防去卵巢所致的大鼠骨质疏松

[0066] 本研究观察到, 采用雌激素 $30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃替代预防, 经过 12 周后, 与模型组相比, 预防组大鼠 % Tb. Ar 和 Tb. N 显著增加 ($P < 0.01$), Tb. Sp 显著降低 ($P < 0.01$), 骨量丢失明显减少, 骨质疏松表现模型减轻, 此外, 预防组大鼠反映骨吸收指标的 Oc. N 和 % Oc. Pm 显著降低 ($P < 0.01$); 反映骨形成指标的 % L. Pm 明显降低 ($P < 0.01$), 说明了补充雌激素后, 破骨细胞活性降低, 成骨细胞成骨活性也降低, 使去卵巢导致的高转换型的骨质疏松受到抑制。研究还观察到, 预防组大鼠的股骨骨密度明显增高, 大鼠体重明显减轻, 子

宫重量增加,血脂显著降低。以上结果提示己烯雌酚替代治疗可以有效预防去卵巢后骨质疏松,此结果与我们以往报道相一致。雌激素替代疗法曾是临床上预防和治疗绝经后骨质疏松应用最广泛的方法,雌激素替代疗法可明显改善绝经后妇女的骨丢失,减轻绝经期症状和骨质疏松^[9]。但由于雌激素长期应用可以增加乳腺癌和子宫癌的发病率,还能显著增加血栓栓塞性疾病和心血管事件的风险,因此也限制了雌激素应用。

[0067] 3.3 阿司匹林和己烯雌酚联合用药可预防去卵巢所致的大鼠骨质疏松

[0068] 本研究观察到,采用低剂量的阿司匹林 ($10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 和低剂量的雌激素 ($30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 组成的 A-D 合剂灌胃替代预防,经过 12 周后,与模型组相比,A-D 合剂预防组大鼠 % Tb.Ar 增加 108.2% ($P < 0.01$), Tb.N 也显著增加 ($P < 0.01$), Tb.Sp 显著降低 ($P < 0.01$),骨量丢失明显减少,骨质疏松表现明显减轻;此外,A-D 合剂预防组大鼠反映骨吸收指标的 Oc.N 和 % Oc.Pm 显著降低 ($P < 0.01$);但反映骨形成指标的 Tb.Th、% L.Pm、MAR、BFR/BS、BFR/BV 和 BFR/BV 均没有显著性差异,说明了 A-D 合剂与单纯补充雌激素组不同,A-D 合剂可使破骨细胞活性降低,明显抑制骨吸收,但对成骨细胞成骨活性没有明显影响,也就是说,对去卵巢后导致的成骨细胞活性增加没有抑制作用。研究还观察到,A-D 合剂预防组大鼠的股骨骨密度明显增高,大鼠体重明显减轻,子宫重量增加,血脂显著降低。以上结果提示 A-D 合剂替代治疗可以有效预防去卵巢后骨质疏松,并不抑制骨形成的特点。关于阿司匹林预防骨质疏松已有文献报道,但阿司匹林与低剂量雌激素联合应用目前还没有报告,本实验通过去卵巢大鼠骨组织形态计量学研究初步证明了低剂量阿司匹林与低剂量雌激素联合应用预防骨质疏松的疗效。

[0069] 3.4 阿司匹林和己烯雌酚联合组方的优点及机制分析

[0070] 雌激素替代疗法预防去卵巢后骨质疏松的机制已得到充分论证。而目前对于阿司匹林对去卵巢大鼠骨量丢失的预防作用的相关机制还不明确。有学者在体外研究中证实,骨组织中成骨细胞及破骨细胞前体细胞表达的 COX-2 通过诱导 NF- κ B 配体受体活化子配基 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand,RANKL) 的表达和抑制骨保护素 (osteoprotegerin,OPG) 的表达,促进破骨细胞的分化,阿司匹林抑制了 COX-2 功能并调节 PGE2 表达,从而发挥预防骨质疏松作用。还有研究表明,阿司匹林可以有效防止离体骨髓基质干细胞 (MSCs) 凋亡,能有效减少 CFU-F 数量并使 MSCs 向成骨方向分化,并能抑制破骨细胞功能。有学者研究发现,体外运用阿司匹林能上调 MSCs 端粒酶的活性,而端粒酶活性增高有助于 MSCs 通过 Runx2 通路向成骨方向分化,其端粒酶活性的水平又远远较肿瘤细胞小。有学者还指出,阿司匹林防治去卵巢后骨质疏松的作用在于抑制 T 细胞活化,从而抑制了 Fas/FasL 通路介导的 MSCs 的凋亡和破骨细胞相关的骨吸收。本实验发现联合运用阿司匹林和己烯雌酚可以抑制破骨细胞活性,明显降低血清胆固醇和低密度脂蛋白含量,而对骨形成的影响不明显。进一步证实阿司匹林预防去卵巢后骨质疏松的机制与其抑制破骨细胞功能有关;此外,还可能与阿司匹林调节血脂代谢,预防动脉粥样硬化并促进骨髓血液循环有关。

[0071] 临床研究已经证明,长期应用小剂量阿司匹林可以安全、有效的预防心血管事件,包括急性心肌梗塞、缺血性休克及周围血管病变。近年来,小剂量阿司匹林还被发现具有预防结肠直肠癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、食管癌、风湿性关节炎等作用。因此,小剂量阿司匹林与己烯雌酚联用对于绝经期后妇女骨质疏松,有 3 个优点:(1) 减少雌激素用量,预防骨质疏

松 ;(2) 有效预防心脑血管疾病 ;(3) 可能有助于减少长期应用雌激素引发的乳腺癌等副作用发生率,增强用药安全性。本实验 A-D 合剂的阿司匹林的用药剂量 ($10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 与人类预防心血管事件的预防用药剂量 ($100\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) 等效,己烯雌酚的剂量 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 为预防去卵巢后骨质疏松正常剂量 ($30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 的三分之一,根据大鼠与人体用药的换算,大鼠 $30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 用量相当于人的 $0.25 \sim 0.3\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$,是人类雌激素补充疗法的低剂量,用于治疗骨质疏松一般用量为 $1.2\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$,本研究的己烯雌酚的剂量仅为其十分之一,因此,该复方的抗骨质疏松作用预示着其应用前景很好。