

骨康片治疗原发性骨质疏松症的实验研究

辛先贵¹, 李娇¹, 臧雪红², 刘玉明¹

1. 山东中医药高等专科学校, 山东 烟台 264199; 2. 莱阳市中心医院, 山东 莱阳 265200

[摘要] 目的: 探讨骨康片治疗原发性骨质疏松症的机理, 为临床应用提供依据。方法: 将6月龄健康雌性SD大鼠随机分为4组, 分别为假手术组、去势模型组、骨康片组、仙灵骨葆片组, 每组10只。除假手术组外, 其他各组建立去卵巢大鼠骨质疏松症模型。从模型建立第4天开始, 假手术组和去势模型组给予等容量氯化钠注射液 10 mL/(kg·d) 灌胃, 骨康片组按 2.5 g/(kg·d) 灌胃骨康片, 仙灵骨葆片组按 2.5 g/(kg·d) 灌胃仙灵骨葆片。给药3月后, 检测尿脱氧吡啶酚 (DPD) 和肌酐 (Cr) 的变化, 检测骨组织形态计量学指标, RT-PCR法检测骨钙素 (BGP) mRNA表达变化。结果: 与假手术组比较, 去势模型组大鼠 DPD 显著升高, DPD/Cr 的比值也显著升高, 骨小梁平均宽度和成骨细胞数显著降低, 骨小梁平均间距显著增大, 破骨细胞数显著增多, BGP mRNA 表达显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与去势模型组比较, 骨康片组和仙灵骨葆片组大鼠 DPD 显著降低, DPD/Cr 的比值也显著降低, 骨小梁平均宽度和成骨细胞数显著升高, 骨小梁平均间距显著降低, 破骨细胞数显著减少, BGP mRNA 表达显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 骨康片能够明显改善去势大鼠的骨结构及骨代谢指标, 它能够抑制骨吸收, 促进骨形成, 对骨质疏松症有明显的防治作用。

[关键词] 骨质疏松症; 去势大鼠; 骨组织形态计量学; 脱氧吡啶酚 (DPD); 骨钙素 (BGP); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2017) 05-0007-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.05.003

Experimental Study of Gukang Tablets for Primary Osteoporosis

XIN Xiangui, LI Jiao, ZANG Xuehong, LIU Yuming

Abstract: Objective: To discuss the mechanism of Gukang tablets in treating primary osteoporosis for providing the basis for clinical application. Methods: Selected six-month-old healthy female rats, and divided them into sham operation group, ovariectomy model group, Gukang tablets group, and Xianling Gubao tablets group with 10 cases in each randomly. Except for the sham operation group, other groups established ovariectomized rat osteoporosis model. From the fourth day of modeling, the sham operation group and the ovariectomy model group were given 10 mL/(kg·d) sodium chloride injection by gavage. The Gukang tablets group was given 2.5 g/(kg·d) Gukang tablets by gavage. The Xianling Gubao tablets group was given 2.5 g/(kg·d) Xianling Gubao tablets by gavage. After three months of medication, detected changes of deoxypyridinoline (DPD), Creatinine (Cr) and bone histomorphometry indexes, and observed changes of bone gla protein (BGP) expression of mRNA with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. Results: Comparing with those in the sham operation group, DPD and the ratio of DPD/Cr in the ovariectomy model group were increased significantly, mean width of trabecular bone and number of osteoblasts were decreased obviously, mean spacing of trabecular bone and the number of osteoclasts were increased significantly, BGP expression of mRNA were decreased significantly, the differences all being significant ($P < 0.05$). Comparing with those in ovariectomy model group, DPD and the ration of DPD/Cr in Gukang tablets group and Xianling Gubao tablets group were decreased significantly, mean width of trabecular bone and number of osteoblasts were increased obviously, mean spacing of trabecular bone and the number of osteoclasts were decreased significantly, BGP expression of mRNA were increased significantly, the differences all being significant ($P < 0.05$). Conclusion: Gukang tablets can improve bone structure and bone metabolic index effectively in that it can inhibit bone resorption, promote bone formation, and has obvious preventive and therapeutic effects on osteoporosis.

Keywords: Osteoporosis; Ovariectomized rats; Bone histomorphomet; Deoxypyridinoline (DPD); Bone gla protein (BGP); Animal experiment; Rats

[收稿日期] 2016-10-16

[基金项目] 山东省教育厅科研计划项目 (J110LF79)

[作者简介] 辛先贵 (1974-), 男, 副教授, 研究方向: 慢性病研究。

原发性骨质疏松症(osteoporosis, OP)是指骨组织骨量减少,骨的脆性增加及骨折危险性增高的全身骨骼系统代谢性骨病^[1],是老年人的一种常见病和多发病。这一侵袭性疾病最易发生于妇女,绝经后妇女由于卵巢功能低下,雌激素分泌减少,破骨细胞的骨吸收作用超过了成骨细胞骨形成作用,中医属骨痿、骨痹范畴。探讨本病的有效防治方法是国内外医学界高度关注的问题。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6月龄未经产健康雌性SD大鼠40只,清洁级,山东大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(鲁)20050015,平均体质量(260±20)g。各组大鼠分笼饲养,饲养环境通风良好,湿度温度恒定,自由饮水摄食,饲料由山东大学动物饲养中心提供的大鼠配方饲料。

1.2 骨质疏松模型的建立 将6月龄健康雌性SD大鼠随机分为4组,分别为假手术组、去势模型组、骨康片组、仙灵骨葆片组,每组10只。动物适应性饲养1周,之后对正常组仅切开腹腔后缝合,对其余各组进行造模。10%水合氯醛0.3 mL/100 g腹腔注射麻醉,于腹正中中线切开皮肤,逐层分离皮下组织及肌肉筋膜进入腹腔,于双侧肾下极处找到卵巢,结扎并切除双侧卵巢,术后所有大鼠肌注青霉素1次(8万单位/只),以预防感染。术后连续三天做阴道细胞涂片,经证实卵巢切除完全,去卵巢大鼠骨质疏松模型成功建立。术后各组大鼠分笼饲养,饲养环境通风良好,湿度温度恒定,自由饮水摄食。

1.3 试验药物与试剂 骨康片是山东中医药高等专科学校附属医院外科传统协定方,由山东省莱阳生物化学制药厂制备。仙灵骨葆片,贵州同济堂制药有限公司(批准文号:国药准字Z20025357)。大鼠脱氧吡啶酚/脱氧吡啶啉 ELISA 试剂盒,购自上海易利生物科技有限公司;SYBR Green I 荧光染料(罗氏公司)。PCR引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.4 给药方法 从模型建立第4天开始,假手术组和去势模型组给予等容量氯化钠注射液10 mL/(kg·d)灌胃。骨康片组按2.5 g/(kg·d)灌胃骨康片(用量是成年人临床口服用量);仙灵骨葆片组按2.5 g/(kg·d)灌胃仙灵骨葆片^[2]。所有动物均自由饮水、摄食。3个月后取材检测。

1.5 尿样的收集与检测 实验结束前1天,无菌条件下从膀胱抽取尿液,2 000转/分,离心20分钟左右,仔细收集上清。用酶联免疫吸附法(ELISA法)测定尿中脱氧吡啶酚(DPD)的量,用全自动生化分析仪测定尿中肌酐(Cr)的量。

1.6 骨组织形态计量学检测 采用颈椎脱臼快速处死大鼠。完整剔取大鼠股骨下1/3段,10%福尔马林固定24 h,经EDTA脱钙,常规包埋、切片和HE染色。

1.7 大鼠骨钙素(BGP) mRNA表达水平检测 根据已知大鼠骨钙素蛋白基因序列及引物设计原则,利用软件 primer 5.0和Oligo 6设计实时定量PCR引物,目的片段长度166

bp,引物序列:BGP上游:5'-TGCTCACTCTGCTGGCCCTGA-3';BGP下游:5'-TAGGGGGCTGGGGCTCCAAGT-3'。GAPDH作为内参进行对照,目的片段长度89 bp,引物序列:上游:5'-ATGATTCTACCCACGGCAAG-3';下游:5'-CTGGAAGATGGTGATGGGT-3'。PCR反应条件:94℃变性30 s,60℃退火15 s,72℃延伸1 min,35个循环后72℃终末延伸5 min,降温至4℃取出,电泳后测光密度值。使用总RNA提取试剂盒从大鼠骨组织中提取总RNA,用Oligo(dT)为引物按说明书进行逆转录反应,合成cDNA第1条链作为进行下一步PCR的模板。以上述大鼠骨组织进行逆转录反应合成cDNA第1条链,以此cDNA为模板进行实时定量RT-PCR。

1.8 统计学方法 应用SPSS13.0软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较用单因素方差分析,以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 各组大鼠尿脱氧吡啶酚(DPD)和肌酐结果比较 见表1。与假手术组比较,去势模型组大鼠DPD显著升高,DPD/Cr的比值也显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与去势模型组比较,骨康片组和仙灵骨葆片组大鼠DPD显著降低,DPD/Cr的比值也显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠尿脱氧吡啶酚(DPD)和肌酐结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	DPD(nmol/L)	Cr(mmol/L)	DPD/Cr
假手术组	10	128.005±12.564	62.356±8.756	2.051±0.162
去势模型组	10	193.987±25.321 ^①	63.525±10.256	3.042±0.236 ^①
骨康片组	10	113.426±16.578 ^②	66.125±7.896	1.721±0.681 ^②
仙灵骨葆片组	10	112.556±20.125 ^②	65.356±6.598	1.723±0.537 ^②

与假手术组比较,① $P < 0.05$;与去势模型组比较,② $P < 0.05$

2.2 各组大鼠骨组织HE染色结果 见图1。假手术组:骨小梁粗壮、饱满、排列整齐并连接成网,间隙较小,着色较深,形态结构完整,骨小梁密度、面积正常,骨髓腔相对较小,腔内造血细胞数量较多。去势模型组:骨小梁变细,骨皮质变薄,形态结构性差,有断裂,小梁间隙增大,骨密度和面积减少,腔内造血细胞数量减少,脂肪空泡多,呈典型的骨质疏松改变,说明造模成功,成骨细胞减少,破骨细胞增多。骨康片组:骨皮质无明显变薄,骨小梁无明显变细,且小梁连接性尚可,部分区域骨小梁间隙略增大,其面积无明显减少,髓腔内造血细胞数量较多,破骨细胞减少。仙灵骨葆片组:其骨微结构改善明显,与正常组接近,骨小梁致密、均匀,相互交织成网状,其面积无明显减少,髓腔内造血细胞数量较多,破骨细胞减少。

2.3 各组大鼠骨组织形态计量学指标比较 见表2。与假手

术组比较,去势模型组大鼠骨小梁平均宽度和成骨细胞数显著降低,骨小梁平均间距显著增大,破骨细胞数显著增多,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与去势模型组比较,骨康片组和仙

灵骨葆片组大鼠骨小梁平均宽度和成骨细胞数显著升高,骨小梁平均间距显著降低,破骨细胞数显著减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

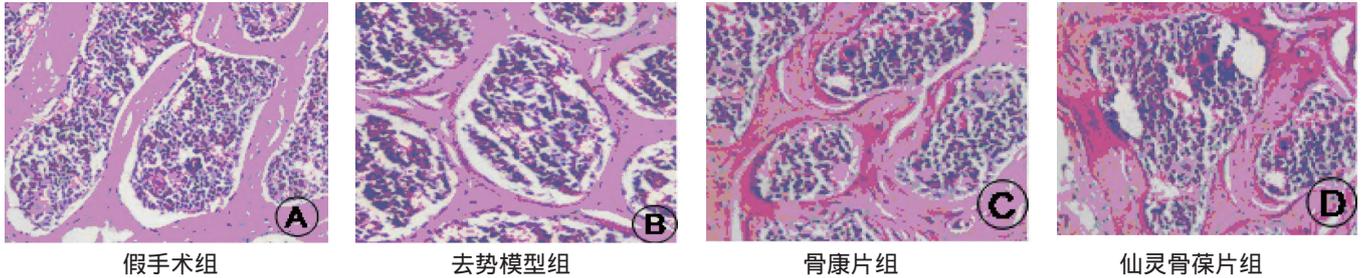


图1 各组大鼠骨组织 HE 染色图片 (×400)

表2 各组大鼠骨组织形态计量学指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	骨小梁平均宽度(μm)	骨小梁平均间距(μm)	成骨细胞数(个/mm ²)	破骨细胞数(个/mm ²)
假手术组	10	71.3± 9.63	83.38± 3.96	9.426± 1.645	0.759± 0.423
去势模型组	10	53.64± 10.32 ^①	106.23± 4.86 ^①	8.156± 1.366 ^①	2.250± 0.402 ^①
骨康片组	10	74.18± 11.45 ^②	81.27± 7.02 ^②	12.353± 1.025 ^②	0.769± 0.321 ^②
仙灵骨葆片组	10	74.32± 10.52 ^②	80.98± 6.67 ^②	12.445± 1.035 ^②	0.745± 0.522 ^②

与假手术组比较,① $P < 0.05$;与去势模型组比较,② $P < 0.05$

2.4 各组大鼠骨组织 BGP mRNA 表达水平比较 见表3。与假手术组比较,去势模型组大鼠 BGP mRNA 表达显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与去势模型组比较,骨康片组和仙灵骨葆片组 BGP mRNA 表达显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表3 各组大鼠骨组织 BGP mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BGP mRNA
假手术组	10	1.214± 0.085
去势模型组	10	0.847± 0.112 ^①
骨康片组	10	1.186± 0.175 ^②
仙灵骨葆片组	10	1.171± 0.132 ^②

与假手术组比较,① $P < 0.05$;与去势模型组比较,② $P < 0.05$

3 讨论

骨质疏松症患者多有下丘脑-垂体-性腺轴功能减退,导致性腺激素分泌减少,骨吸收增强,成骨细胞功能下降,单位体积内骨组织减少,最终导致骨质疏松。绝经早期骨量的快速丢失,以及雌激素替代疗法对绝经后骨质疏松症的防治效果,均提示雌激素降低是绝经后骨质疏松的主要病因^[3]。绝经后的妇女容易发生骨质疏松,主要因素是内分泌失衡,特别是雌激素水平的下降。绝经后卵巢功能衰退,体内雌激素水平降低,首先引起维生素D的生成与活性降低,从而干扰肠道内的钙吸收;其次,骨失去了雌激素的保护作用,对甲状旁腺激素的敏感性增强,骨吸收增多。骨吸收指标脱氧吡啶酚(DPD)仅见

于细胞外型胶原蛋白中,主要转换部位在骨,DPD几乎仅在骨中存在。DPD作为破骨细胞降解的副产品在尿中排泄。为了消除由于尿量增多或减少引起的尿稀释及尿浓缩而导致DPD数值偏差,测定尿DPD的同时,须检测尿Cr的浓度进行校正,并以DPD/Cr作为骨吸收的客观指标。实验中模型组DPD/Cr升高,说明通过卵巢切除,人为造成大鼠卵巢功能破坏,雌激素水平下降,骨吸收代谢明显加强,骨丢失率显著上升,导致骨质疏松的发生。骨康片治疗组DPD/Cr骨代谢指标明显降低,说明骨康片通过抑制骨转换率,减少骨的吸收,提高骨密度。

骨形态计量学指标是评价骨转换与骨结构的最直接最客观的指标^[4-5]。本研究以切除雌性大鼠双侧卵巢的方法复制骨质疏松模型大鼠,运用骨形态计量的方法测定各组动物的骨形态计量学指标,观察骨康片对去卵巢大鼠骨形态计量学指标的影响。研究结果显示,模型组大鼠去卵巢后骨小梁平均宽度、成骨细胞个数均有明显下降,骨康片组大鼠的上述指标经治疗均明显升高,说明骨的内部结构得到很好的恢复。

骨钙素是成骨细胞合成并分泌的,比较稳定,不受骨吸收因素的影响。通过骨钙素可以了解成骨细胞功能,特别是新形成的成骨细胞的活动状态。因此,骨钙素是一种特异和敏感的骨形成指标。实验结果表明,与去势模型组比较,骨康片组及仙灵骨葆片组骨钙素 mRNA 表达水平升高,提示骨康片能通过刺激骨髓微环境中成骨活性基因的表达,诱导成骨细胞分化,促进骨形成。

骨的形成由成骨细胞完成,骨的吸收受破骨细胞控制。大

鼠去卵巢后,成骨细胞数明显减少而破骨细胞数明显增多,经骨康片治疗后成骨细胞数升高,同时破骨细胞数降低,由此认为,骨康片既能抑制骨的吸收,又能刺激化增生骨细胞,产生较多的骨基质,使骨代谢转为正态平衡,在有效的维持骨量的同时,还能使已丢失的骨质得到一定程度的恢复。

中药骨康片可明显改善骨质疏松模型大鼠的骨计量学指标,对去卵巢大鼠骨质疏松具有治疗作用。骨康片的抗骨质疏松作用与其抑制骨的吸收、促进骨的形成、逆转骨的代谢平衡有关。骨康片组尿脱氧吡啶酚水平较去势模型组显著降低,骨钙素 mRNA 表达水平升高,反应出骨康片中的中药成分有发挥类雌激素样作用,与仙灵骨葆片类似,抑制骨吸收,降低骨转换率,促进骨形成,增加了骨密度,在相关的临床试验中也验证了这点^[6]。骨康片是依据肾主骨的基本理论,应用补肾壮骨、活血止痛方法,标本兼治,迅速改善临床症状,增加骨密度,防治骨质疏松症。

[参考文献]

[1] 张胜利,王全平. 雌激素在 型原发性骨质疏松症发病

机制中作用的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 1999, 5 (1): 86- 88.

[2] 朱太咏,张戈,付汝田,等. 仙灵骨葆改善骨质疏松大鼠股骨骨生物力学性能的作用及机制研究[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(21): 2089- 2092.

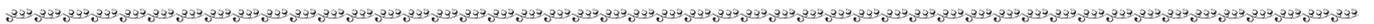
[3] 蒙珍,王维佳. 中西医对原发性骨质疏松症的认识与防治进展[J]. 医学综述, 2008, 14(24): 3786- 3789.

[4] 张金娟,文娱,张贵林,等. 淫羊藿苷对骨质疏松模型小鼠骨组织形态计量学指标的影响[J]. 贵州医药, 2010, 34(5): 404- 405.

[5] 黄芳,汪家梨,姜小鹰,等. 补肾中药组方对去卵巢大鼠骨微结构的影响[J]. 中国老年学杂志, 2005, 25(7): 814- 816.

[6] 陈璐璐,曾天舒,夏文芳,等. 补肾中药对去卵巢大鼠骨髓 IL- 6、IL- 6R 基因表达及骨髓源性破骨细胞形成的影响[J]. 中华老年医学杂志, 2003, 22(11): 677- 680.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)



《新中医》编委单位 (2017)

广州中医药大学, 中华中医药学会, 广州中医药大学第一附属医院, 广州中医药大学第二附属医院, 广州中医药大学第三附属医院, 广州中医药大学附属广东第二中医院 (广东省中医药工程技术研究院), 广州中医药大学附属深圳中医院, 广州中医药大学深圳医院, 广州中医药大学附属东莞中医院, 广州中医药大学附属高州中医院, 广州中医药大学附属深圳宝安中医院, 广州中医药大学附属广州中医院, 广州中医药大学附属新会中医院, 广州中医药大学附属广东省中西医结合医院, 广州中医药大学附属汕头中医院, 广州中医药大学附属茂名中医院, 广州中医药大学附属南海妇幼保健院, 广州中医药大学附属北碚中医院, 广州中医药大学附属海口中医院, 广州中医药大学附属湛江第二中医院, 广州中医药大学附属佛山中医院, 广州中医药大学附属顺德中医院, 广州中医药大学附属深圳平乐骨伤科医院, 广东省珠海市第二人民医院, 南方医科大学中医药学院, 广东省广州市正骨医院, 广东省韶关市中医院, 广东省台山市中医院, 广东省深圳市龙岗区中医院, 广东省普宁市中医院, 广东省广州市增城区中医院, 广东省广州市越秀区中医院, 广东省广州市萝岗中医医院, 广东省医药进出口公司珠海公司, 东莞亚洲制药有限公司, 康美药业股份有限公司, 广东和翔制药有限公司。