

壮骨伸筋胶囊对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗及其作用机制

孙晓丽^{1,2}, 李丽娟¹, 苏海峰¹, 郭庆¹, 周亚伟^{1*}, 王伟²

(1, 北大世佳研究中心, 北京 100084; 2, 北京中医药大学 中医学院, 北京 100029)

[摘要] **目的:**研究壮骨伸筋胶囊(Zhuanggu Shenjin capsule, ZGSJC)对去卵巢骨质疏松大鼠的治疗作用,探讨 ZGSJC 治疗绝经后骨质疏松的机制。**方法:**将去卵巢大鼠随即分为模型组,阳性药结合雌激素组,ZGSJC 高、中、低剂量组(生药 5.42, 2.71, 1.36 g·kg⁻¹),另设假手术组,每组 12 只。实验结束,取右侧胫骨制作不脱钙骨切片,用于骨形态计量学考察;左侧胫骨提取蛋白后用蛋白免疫印迹法测定 I 型胶原蛋白表达。**结果:**与假手术比,模型组大鼠骨小梁体积百分率(TBV)显著降低($P < 0.01$),骨小梁吸收表面百分率(TRS),骨小梁形成表面百分率(TFS),骨小梁矿化率(MAR),类骨质平均宽度(OSW),骨皮质矿化率(mAR)显著增高($P < 0.01$),I 型胶原蛋白表达显著降低($P < 0.01$);与模型组比,ZGSJC 能够显著抑制 TBV% 的降低($P < 0.01$),抑制 TRS, TFS, MAR, mAR 的升高($P < 0.01, P < 0.05$),提高 I 型胶原蛋白表达($P < 0.01$),对 OSW 则无明显作用。**结论:**壮骨伸筋胶囊对卵巢切除所致大鼠骨质疏松具有一定的治疗作用,具体体现在调节去卵巢所致的骨代谢高转换状态,能提高 I 型胶原蛋白表达含量。

[关键词] 壮骨伸筋胶囊; 骨质疏松; I 型胶原; 骨形态

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)18-0113-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181825

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180703.1641.003.html>

[网络出版时间] 2018-07-04 14:42

Effect and Mechanism of Zhuanggu Shenjin Capsule in Ovariectomized Osteoporosis Rats

SUN Xiao-li^{1,2}, LI Li-juan¹, SU Hai-feng¹, GUO Qing¹, ZHOU Ya-wei^{1*}, WANG Wei²

(1. Beijing University Bescholar Research Center, Beijing 100084, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Zhuanggu Shenjin capsule (ZGSJC) on bone histomorphometry and the expression of type I collagen protein in ovariectomized rats (OVX). And then to explore the mechanism of treating osteoporosis with ZGSJC. **Method:** 72 female SD rats were randomly divided into 6 groups after ovariectomy: sham group, model group, positive control group and ZGSJC treatment group with doses of 5.42, 2.71, 1.36 g·kg⁻¹. Each group included 12 rats. After treated 3 months, right tibia were dissected and undecalcified bone slice were made for bone histomorphometry detection, percentage of trabecular volume (TBV), bone trabecular absorption surface percentage (TRS), Bone trabecular surface percentage (TFS), average osteoid width (OSW), bone trabecular mineralization rate (MAR), bone cortical mineralization rate (mAR) were recorded. Used left tibia to extract protein and the expression of type I collagen protein was analyzed by

[收稿日期] 20180330(004)

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(2130302025YY)

[第一作者] 孙晓丽,博士,从事中西医结合心血管相关疾病、中药新药研究,E-mail:sdxhli@126.com

[通信作者] *周亚伟,教授,博士,从事中西医结合心血管相关疾病、中药新药研究,Tel:010-62538007,E-mail:ywzhou@pku.edu.cn

Western blot. **Result:** In contrast with sham rats, OVX rats showed significant decreased in tibia TVB%, significant increase in tibia TRS%, TFS%, MAR, OSW and mAR. And showed significant decrease in type I collagen protein expression; compared with model rats, ZGSJC can inhibit the decrease of TVB% in tibia, inhibit the increase of TRS%, TFS%, MAR, OSW and mAR in tibia and inhibit the decrease expression of type I collagen protein. **Conclusion:** ZGSJC has the therapeutic effect in OVX Osteoporosis which could regulate bone great rate of transformation in OVX Osteoporosis; ZGSJC can increase the expression of type I collagen protein, which are the mechanisms that ZGSJC can be treated for Osteoporosis.

[**Key words**] Zhuanggu Shenjin capsule; osteoporosis; type I collagen; bone histomorphometry

随着人均寿命的不断延长,骨质疏松症发病率呈逐年上升趋势,估计到2050年中国骨质疏松症或骨密度低的患者将达到2.12亿^[1]。老年人尤其以绝经后老年女性为主,绝经后骨质疏松(POP)的发病率正在呈增高趋势,并且严重威胁老年女性生命健康^[2]。壮骨伸筋胶囊是长春中医药大学附属医院骨科主任、全国著名骨科专家刘柏龄教授多年的临床经验方,多用于颈椎病、腰椎间盘突出、骨折等相关疾病^[3-5],近期研究表明,壮骨伸筋胶囊对维甲酸导致的小鼠骨质疏松以及波尼松导致的大鼠骨质疏松均有一定的疗效^[6-7]。为了进一步考察壮骨伸筋胶囊是否对POP有治疗作用,本文通过建立去卵巢大鼠骨质疏松模型,并给与不同剂量的壮骨伸筋胶囊进行治疗,通过考察壮骨伸筋胶囊对骨质疏松大鼠骨形态计量学及骨胶原蛋白的影响,探讨壮骨伸筋胶囊对POP的治疗作用以及可能的作用机制,以期对壮骨伸筋胶囊的二次开发提供数据支持,同时为壮骨伸筋胶囊的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康雌性SD大鼠,购自中国医学科学院实验动物研究所,动物合格证号SCXK(京)2009-0007,所有动物实验均经过动物伦理委员会批准。

1.2 药物与试剂 壮骨伸筋胶囊(通化金马药业集团股份有限公司,批号20140320);结合雌激素片(新疆新姿源生物制药有限责任公司,批号20130802);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号30037517);ECL发光液,组织裂解液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为418A0328,20151103);SDS,丙烯酰胺等(美国Sigma公司,批号分别为201600714,20150420); β -肌动蛋白(β -actin,兔抗鼠I型胶原(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为AA128,P0018)。

1.3 仪器 Reichert-Jung2040型切片机,OM2563型冰冻切片机(美国TBS公司);TDL-5-A型离心机

(上海安亭科仪器厂);SWCJ-A型超净工作台(苏州汇东精密仪器有限公司);Leica-Qwin图像分析系统,CTR6000型显微镜(德国Leica公司);DYY-6型电泳仪及电泳槽,WD-9413B型凝胶成像分析系统,蛋白转膜仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 模型构建 72只SD大鼠适应性喂养1周,按随机数字表分为2组,分别为假手术组(12只),造模组(60只)。参照文献[8]的方法,10%水合氯醛腹腔注射麻醉,手术摘除大鼠双侧卵巢;假手术组只暴露双侧卵巢但不切除。

2.2 分组及给药 造模结束,继续喂养1个月,将造模组按照随机数字表分为5组,分别为模型组、阳性药组(结合雌激素组)和壮骨伸筋胶囊高、中、低剂量组各12只。结合雌激素组灌胃给予质量浓度为 $0.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的结合雌激素,壮骨伸筋胶囊高、中、低剂量组分别灌胃给予质量浓度为 $0.542, 0.271, 0.136\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的壮骨伸筋胶囊药物混悬液;以上给药体积均为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。1周连续给药6d,休息1d,连续给药3个月。假手术组、模型组按同法灌服等体积的蒸馏水。

2.3 动物处理 各组大鼠处死前15d和前3d分别腹腔注射盐酸四环素 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,对骨进行荧光标记。给药结束后,将各组大鼠迅速处死。

2.4 骨组织形态计量学指标的测定 按照文献方法^[9-10]取右侧胫骨制作不脱钙骨切片,用于骨组织形态计量学指标的检测,采用Leica Qwin图像分析系统对骨小梁体积百分率(TBV),骨小梁吸收表面百分率(TRS),骨小梁形成表面百分率(TFS),类骨质平均宽度(OSW),骨小梁矿化率(MAR),骨皮质矿化率(mAR)进行计量分析。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定股骨I型胶原蛋白表达 取左侧胫骨液氮研碎,按组织裂解法提取蛋白,用Bradford法测定蛋白浓度;蛋白先进行10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,取出硝酸纤维

素薄膜置入 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛血清白蛋白/PBST 液中 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 封闭 2 h。分别加入 I 型胶原的一抗稀释液 (1:1 000), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱过夜, 次日漂洗硝酸纤维素薄膜 3 次, 每次 5 min, 再加入的二抗 (1:1 000), 室温 2 h, 取出再次漂洗 3 次, 每次 5 min, ECL 显色, X 射线胶片曝光显影。将 X 射线胶片置于 Gel Doc2 000 图像分析系统, 测定目的条带的平均吸光度, 以 β -actin 为内参蛋白计算蛋白的相对表达量。

2.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理, 所有结果数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

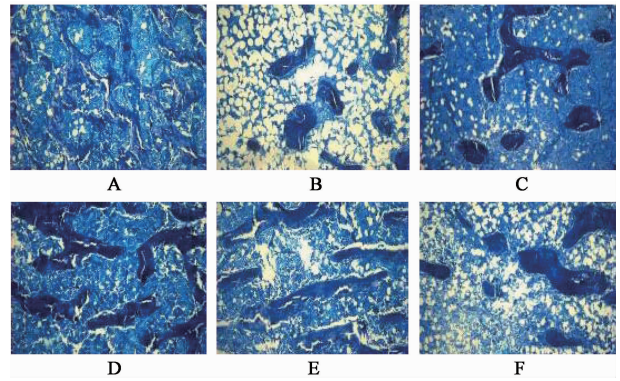
3.1 对去卵巢大鼠骨组织病理学的影响 假手术组骨组织结构完整, 骨小梁致密粗壮, 数目多, 形态规则, 间隙适中, 排列齐整; 模型组骨小梁稀疏, 骨小梁间有断裂并且分离, 间隙增大, 排列紊乱, 骨质疏松特征明显, 说明模型构造成功, 大鼠呈现骨质疏松症状; 结合雌激素组骨小梁粗壮, 结构完整, 形态规则, 骨小梁排列致密, 且骨小梁数目明显多于模型组, 说明结合雌激素能够明显改善骨质疏松大鼠骨小梁病变特征; 壮骨伸筋胶囊高、中剂量组可见骨小梁致密丰实, 间距较窄, 形态结构规整, 宽度和间隙与假手术组和结合雌激素组接近, 壮骨伸筋胶囊小剂量组骨小梁状态较模型组改善作用不明显。见图 1。荧光标记的骨小梁以及骨皮质图片中, 模型组两次标记的宽度明显的宽于假手术组、结合雌激素组, 壮骨伸筋胶囊各剂量组与假手术组及结合雌激素组结果接近。见图 2, 3。

3.2 对去卵巢大鼠骨组织形态计量学指标的影响

3.2.1 对去卵巢大鼠胫骨 TBV, TRS, TFS 的影响
与假手术组比较, 模型组大鼠胫骨 TBV 显著降低, TRS, TFS 显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 结合雌激素组、壮骨伸筋胶囊高、中、低剂量组 TBV 显著升高, TRS, TFS 明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

3.2.2 对去卵巢大鼠胫骨 MAR, mAR 和 OSW 的影响 模型组大鼠胫骨 MAR, mAR 和 OSW 显著高于假手术组 ($P < 0.01$), 结合雌激素组 MAR, mAR 和 OSW 与模型组比较明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 壮骨伸筋胶囊各剂量组的 mAR 与模型组比显著降低 ($P < 0.01$), 壮骨伸筋胶囊高、中剂量组 MAR 与模型组比较显著降低 ($P < 0.01$), 但 OSW 与模型组, 没有明显差异。见表 2。

3.3 对去卵巢大鼠骨组织 I 型胶原蛋白表达的影



A. 假手术组; B. 模型组; C. 结合雌激素组; D. 壮骨伸筋胶囊高剂量组; E. 壮骨伸筋胶囊中剂量组; F. 壮骨伸筋胶囊低剂量组 (图 2, 3 同)

图 1 壮骨伸筋胶囊对去卵巢大鼠骨小梁分布的影响 (甲苯胺蓝, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of Zhuanggu Shenjin capsule on trabecular distribution in OVX rats (toluidine blue, $\times 100$)

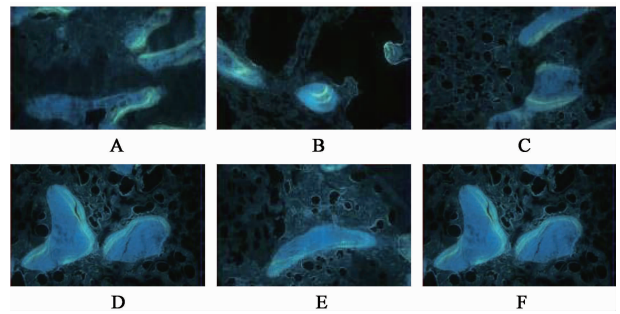


图 2 壮骨伸筋胶囊对去卵巢大鼠骨小梁矿化程度的影响 (免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of Zhuanggu Shenjin capsule on trabecular bone mineralization in OVX rats (immuno fluorescence, $\times 400$)

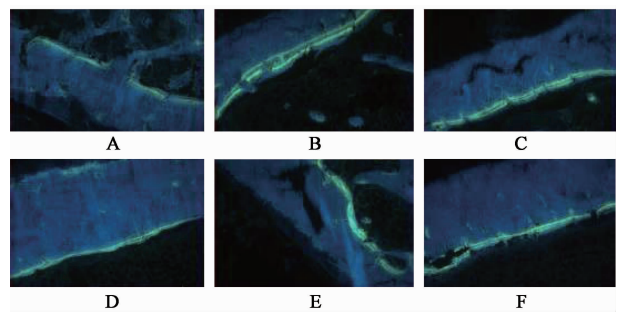


图 3 壮骨伸筋胶囊对去卵巢大鼠骨皮质矿化程度的影响 (免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of Zhuanggu Shenjin capsule on cortical bone mineralization in OVX rats (immuno fluorescence, $\times 400$)

响 与假手术组比较, 模型组股骨中 I 型胶原的蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 结合雌激素组, 壮骨伸筋胶囊高、中、低剂量组均能够显著升高股骨中 I 型胶原的蛋白表达水平 ($P <$

表 1 壮骨伸筋胶囊对去卵巢大鼠胫骨 TBV, TRS, TFS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of Zhuanggu Shenjin capsule on TBV, TRS, TFS in tibia of OVX rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$) %

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TBV	TRS	TFS
假手术	-	22.22 ± 7.27	4.95 ± 2.32	8.78 ± 0.92
模型	-	11.31 ± 4.87 ²⁾	8.95 ± 1.84 ²⁾	14.58 ± 1.42 ²⁾
结合雌激素	1 × 10 ⁻⁴	19.00 ± 4.68 ⁴⁾	3.55 ± 1.17 ⁴⁾	9.27 ± 0.76 ⁴⁾
壮骨伸筋胶囊	5.42	19.28 ± 5.94 ⁴⁾	4.93 ± 1.31 ⁴⁾	10.52 ± 1.51 ⁴⁾
	2.71	17.34 ± 3.12 ⁴⁾	5.01 ± 0.75 ⁴⁾	11.67 ± 0.84 ⁴⁾
	1.36	16.46 ± 3.61 ⁴⁾	6.17 ± 0.94 ⁴⁾	12.81 ± 0.46 ³⁾

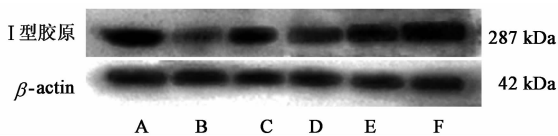
注:与假手术组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01;与模型组比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01(表 2,3 同)。

表 2 壮骨伸筋胶囊对去卵巢大鼠胫骨 MAR, mAR 和 OSW 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of Zhuanggu Shenjin capsule on MAR, mAR, OSW in tibia of OVX rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	MAR /μm·d ⁻¹	mAR /μm·d ⁻¹	OSW /μm
假手术	-	1.02 ± 0.21	2.67 ± 1.36	3.65 ± 0.85
模型	-	1.86 ± 0.46 ²⁾	3.79 ± 1.05 ²⁾	5.35 ± 1.07 ²⁾
结合雌激素	1 × 10 ⁻⁴	1.39 ± 0.24 ⁴⁾	2.55 ± 0.70 ⁴⁾	4.25 ± 0.65 ³⁾
壮骨伸筋胶囊	5.42	1.23 ± 0.27 ⁴⁾	2.76 ± 0.36 ⁴⁾	4.25 ± 0.86
	2.71	1.54 ± 0.33 ⁴⁾	2.81 ± 0.55 ⁴⁾	5.14 ± 1.19
	1.36	1.76 ± 0.29	2.96 ± 0.44 ⁴⁾	5.05 ± 1.45

0.01)。见图 4 和表 3。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 结合雌激素组; D. 壮骨伸筋胶囊低剂量组; E. 壮骨伸筋胶囊中剂量组; F. 壮骨伸筋胶囊高剂量组

图 4 各组大鼠胫骨组织 I 型胶原蛋白的表达电泳

Fig. 4 Protein expression of type I collagen in rats of each group

4 讨论

正常的骨组织有正常的钙化,钙盐与基质呈正常比例,骨质疏松中单位体积内骨组织量减少,而骨组织的减少主要由于骨质吸收增多所致。在摘除大鼠卵巢造成骨质疏松模型中, TBV 测定的是骨小梁体积占被测骨髓腔总体积的百分比,是衡量骨量水平的主要标志; TRS 测定的是不规则、凹凸不平的骨小梁表面占骨小梁表面的百分比,它可判断 OC 的

表 3 壮骨伸筋胶囊对去卵巢大鼠骨组织 I 型胶原蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of Zhuanggu Shenjin capsule on type I collagen protein expression in OVX rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	I 型胶原/β-actin
假手术	-	1.440 ± 0.021
模型	-	0.661 ± 0.025 ²⁾
结合雌激素	1 × 10 ⁻⁴	1.109 ± 0.013 ⁴⁾
壮骨伸筋胶囊	5.42	1.016 ± 0.019 ⁴⁾
	2.71	0.984 ± 0.024 ⁴⁾
	1.36	0.949 ± 0.025 ⁴⁾

活性; TFS 表示有 OB 被覆的类骨质表面占骨小梁表面的百分比, OSW 为皮质内表面有 OB 被覆的类骨质的平均宽度,两者均可判断 OB 的活性; MAR 和 mAR 分别表示骨小梁和骨皮质的矿化率。大量研究证实,卵巢切除可造成骨吸收大于骨形成的高转换型骨质疏松模型,其与人类绝经后骨质疏松症相似^[11-13]。在本次实验中,摘除大鼠卵巢后,模型组反映骨吸收参数的 TRS 显著增高,反映骨形成参数的 TFS, MAR, OSW 和 mAR 也显著增高,而反映骨量的 TBV 却显著降低,这一结果进一步证实了上述认识。给骨质疏松大鼠灌服壮骨伸筋胶囊 3 个月后,与模型组比较,壮骨伸筋胶囊组大鼠胫骨 TBV 显著增加,而 TRS, TFS, MAR, mAR 明显降低。这一结果表明,壮骨伸筋胶囊对卵巢切除所致的骨的高转换有明显的抑制效应,进而达到对骨质疏松症的治疗作用。

成骨细胞是骨形成和骨重建的重要功能细胞,属于蛋白分泌型细胞,能够产生 I 型胶原,合成分泌骨基质,提高 ALP 活性。I 型胶原构成了骨组织蛋白框架, I 型胶原的合成与分解也是骨组织形成与吸收的直接和特异性指标。I 型胶原作为骨的支架,它的质和量的任何病理变化均可导致骨骼疾病的发生^[14-15]。在正常情况下,骨胶原的生成和降解保持平衡状态。骨质疏松症中,除骨量减少以外,小梁骨的机械特性亦依赖于其微结构即组成它的有机物和无机物的分子结构。绝经后骨质疏松症由于雌激素缺乏,扰乱了骨髓中细胞因子的调节,同时雌激素启动破骨细胞凋亡的作用丧失^[16],导致 I 型胶原的减少。本实验显示,壮骨伸筋胶囊可以促进成骨细胞生长,提高 I 型胶原蛋白水平,从而促进骨形成,提高去卵巢骨质疏松大鼠骨小梁的形成,起到防治骨质疏松的作用。上述实验结果为壮骨伸筋胶囊

对绝经后骨质疏松症的治疗提供了实验依据,具有积极地意义。

[参考文献]

[1] 白璧辉,谢兴文,李鼎鹏,等.我国近5年来骨质疏松症流行病学研究现状[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(2):253.

[2] Setchell K, Lydeking-Olsen E. Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from *in vitro* and *in vivo*, human observational, and dietary intervention studies[J]. *Am J Clin Nutr*, 2003, 78(3S):593-609.

[3] 王立山. 壮骨伸筋胶囊治疗神经根型颈椎病的临床疗效研究[J]. 世界中医药, 2017, 12(1):109-111.

[4] 赵长伟, 闻辉, 黄丹奇, 等. 刘柏龄教授运用壮骨伸筋胶囊方治疗强直性脊柱炎临证经验[J]. 风湿病与关节炎, 2015, 4(6):34-36.

[5] 黎品基. 壮骨伸筋胶囊在腰椎间盘突出症术后康复治疗中的疗效观察[J]. 广西中医药, 2011, 34(4):17-18.

[6] 郭庆, 孙晓丽, 李丽娟, 等. 壮骨伸筋胶囊对维甲酸致小鼠骨质疏松的改善作用[J]. 中国药房, 2016, 27(16):2187-2189.

[7] 李丽娟, 孙晓丽, 苏海峰, 等. 壮骨伸筋胶囊对泼尼松致骨质疏松模型大鼠的改善作用及其机制研究[J]. 中国药房, 2016, 27(13):1788-1790.

[8] 鞠大宏, 吕爱平, 张春英, 等. 滋补肾阴方与温补肾阳方对卵巢切除所致骨质疏松大鼠 IL-1 和 IL-6 活性的

影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(4):284-288.

[9] 刘绍泉. 塑料包埋不脱钙骨组织玻璃刀切片技术[J]. 中华病理学杂志, 1996, 25(1):49.

[10] 章明放, 张乃鑫, 谭郁彬. 运动对雌性大鼠去势后骨质疏松症的作用—骨组织形态计量学观察[J]. 中华骨科杂志, 1994, 14(6):365-369.

[11] 徐丽瑛, 姚闯, 余华, 等. 右归胶囊防治去卵巢大鼠骨质疏松的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(14):151-154.

[12] 王立恒, 赵钢. 中药复方对骨质疏松大鼠雌激素受体 mRNA 及 I 型胶原 mRNA 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(12):913-915.

[13] 颜春鲁, 安方玉, 刘永琦, 等. 地黄饮子水煎剂对去势骨质疏松大鼠骨强度和股骨病理形态结构的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24):148-152.

[14] Hughes D E, DAI A, Tiggee J C, et al. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGFB[J]. *Nat Med*, 1996, 2(10):1132-1136.

[15] 李泽钊, 邓建强. 地伸强骨胶囊治疗肾虚兼气血不足型骨质疏松症的疗效及对骨代谢、骨转化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(8):159-164.

[16] Kamdea T, Mamo H, Yuasa T, et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of bone resorbing osteoclast [J]. *J Exp Med*, 1999, 186(4):489-495.

[责任编辑 周冰冰]