

补肾活血颗粒对维甲酸所致大鼠骨质疏松模型的药效学研究

沈晨啸¹, 章建华^{1*}, 尹华²

(1. 浙江中医药大学, 杭州 310006; 2. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

[摘要] 目的:明确补肾活血颗粒对维甲酸所致大鼠骨质疏松模型的药效作用,并探讨其作用机制。方法:48只SD大鼠随机分为正常组、模型组、补肾活血颗粒低、中、高剂量给药组、仙灵骨葆组6组,除空白组外,其余各组每日ig给予维甲酸70 mg·kg⁻¹,连续14 d。造模与给药同时进行,低、中、高剂量组分别给予补肾活血颗粒流浸膏10,20,40 g·kg⁻¹,仙灵骨葆组给予仙灵骨葆药液0.3 g·kg⁻¹,模型组、正常组ig等容积生理盐水。给药4周后,眼眶取血测血清骨碱性磷酸酶(BALP)、血清骨钙素(BGP)、血清抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP-5β);处死动物后取左、右股骨,左侧用于制作组织病理切片;右侧进行骨密度测定。结果:与正常组相比,模型组大鼠体重增加缓慢($P < 0.05$),BALP, TRACP-5β显著升高($P < 0.01$),BGP显著降低($P < 0.05$),骨密度显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组体重增加较快($P < 0.05$),均可明显下调BALP($P < 0.01$),补肾活血颗粒流浸膏中、高剂量组及仙灵骨葆组显著提高BGP($P < 0.05$),降低TRACP-5β($P < 0.01$),并显著升高骨密度($P < 0.05$)。结论:补肾活血颗粒具有防治骨质疏松的作用,调节骨生成与骨破坏的紊乱状态,改善骨组织显微结构,提高骨密度和骨更新率。

[关键词] 补肾活血颗粒; 维甲酸; 骨质疏松; 骨密度

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0154-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200154

Pharmacodynamics of Bushen Huoxue Granule on Osteoporosis Model Rats Induced by Retinoic Acid

SHEN Chen-xiao¹, ZHANG Jian-hua^{1*}, YIN Hua² (1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China; 2. College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Bushen Huoxue granule (BSHXG) on osteoporosis model induced by retinoic acid in rats, and to explore its mechanism of action. **Method:** Forty-eight SD rats were randomly divided into normal group, model group, BSHXG low, middle and high dose groups, and Xianling Gubao (XLGB) group. All other groups except the normal group were orally administered with retinoic acid daily 70 mg·kg⁻¹, continuous for 14 d. Modeling and administration were done at the same time. The low, middle and high dose groups were given with BSHXG 10, 20, 40 g·kg⁻¹; XLGB group was given with XLGB liquid 0.3 g·kg⁻¹; model group and normal group were administered with equal volume of normal saline. After 4 weeks of dosing, orbital blood was taken to measure the bone alkaline phosphatase (BALP), bone gamma-carboxyglutamic-acid-containing proteins (BGP), and tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP-5β) in serum; after the animals were sacrificed, left femur was taken to make tissue pathological slices and right femur was taken to measure bone mineral density. **Result:** Compared with the normal group, the body weight in the rats of model group increased slowly ($P < 0.05$); the serum levels of BALP, TRACP-5β increased significantly ($P < 0.01$); BGP decreased significantly ($P < 0.05$); and bone density was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, the body weight in various administration groups increased rapidly ($P < 0.05$) and BALP was significantly decreased ($P < 0.01$). BSHXG middle and high dose groups and XLGB group could significantly increase BGP

[收稿日期] 20150212(003)

[基金项目] 浙江省中药现代化专项基金(浙财企2011-347号)

[第一作者] 沈晨啸, 硕士生, 中医骨伤, Tel:13588289520, E-mail:417140351@qq.com

[通讯作者] *章建华, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 从事骨关节病的基础研究、临床诊治及骨伤中药新药的研发, Tel:13588193391, E-mail:Zhangjh311@163.com

($P < 0.05$), decrease TRACP-5 β ($P < 0.01$), and significantly increase bone mineral density ($P < 0.05$).
Conclusion: Bushen Huoxue granule has the effect in preventing and treating osteoporosis, regulating the disorder state of bone formation and bone destruction, improving bone microstructure, and increasing bone mineral density and bone turnover rate.

[**Key words**] Bushen Huoxue granule; retinoic acid; osteoporosis; bone mineral density

补肾活血颗粒是课题组正在研究开发的治疗骨质疏松的中药新药,处方源自浙江省中医院骨伤科的传统经验方,由经典古方右归饮添加桃仁、红花 2 味活血中药而成,具有补肾益精、活血化瘀、散寒止痛之功效,主要用于治疗早、中期骨质疏松症。项目组研究表明补肾活血颗粒对增强骨细胞分化增殖及活性功能作用明显,对于防治骨质疏松具有一定的疗效^[1];且补肾活血颗粒制备工艺科学先进、有效成分提取率高;质量稳定可控,安全性好^[2-3]。本文以维甲酸造成骨质疏松大鼠模型,通过大鼠的体重变化、骨密度、血清碱性磷酸酶(BALP)、骨钙素(BGP)、抗酒石酸盐酸性磷酸酶(TRACP-5 β)、骨组织形态学等药效指标检测,观察补肾活血颗粒对维甲酸所致大鼠骨质疏松模型的影响,为补肾活血颗粒的新药研发提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 健康清洁级 SD 大鼠,体重约 150 g,雌性,由浙江中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(沪)2008-0013。

1.2 药物及试剂 补肾活血颗粒(由浙江中医药大学药学院提供),维甲酸(上海邦成化工有限公司,批号 20121102),仙灵骨葆颗粒(贵州同济堂制药有限公司,国药准字 Z20025337),碱性磷酸酶(BALP) ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司,批号 E30037),骨钙素/骨谷氨酸蛋白(OT/BGP) ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司,批号 E60443),抗酒石酸盐酸性磷酸酶-5 β (TRACP-5 β) ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司,批号 E30288),苏术精-伊红染色液(浙江中医药大学动物实验中心配制)。

1.3 仪器 Carestream FXO 型小动物活体成像仪(美国 KODAK 公司),Eppendorf centrifuge 5408R 型高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司),Power Wave 340 型酶标仪(美国 Bio-Teck 公司),Sartorius BS110S 型 1/1 万电子天平(德国塞多利斯公司),SencoR 系列旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司),DLSB-2020 型低温冷却液循环泵(杭州大卫科技仪器有限公司),KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),LEICA RM2016 型切片机(上海

欧启电子科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组与模型制备 健康雌性 SD 大鼠,适应性饲养 1 周后,随机分为正常组、模型组、补肾活血低、中、高剂量组、仙灵骨葆组 6 组,每组 8 只,各组分笼饲养,自由饮水摄食。模型组及各给药组大鼠 ig 70 mg·kg⁻¹ 维甲酸(10 g·L⁻¹, 0.5% 羧甲基纤维素钠配制),每天 1 次,连续 2 周,正常组 ig 等体积 0.5% 羧甲基纤维素钠。2 周后正常组和模型组各随机选取 2 只大鼠,测定股骨骨密度,确认模型成立^[4]。

2.2 补肾活血颗粒流浸膏的制备及给药 处方:熟地黄 666 g,杜仲 444 g,炙附子 666 g,枸杞 444 g,肉桂 444 g,山茱萸 222 g,桃仁 444 g,红花 222 g,山药 444 g,甘草 444 g。实验前期通过松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛及羟基红花黄色素 A 转移率为质控指标,通过多指标综合评价法优选补肾活血颗粒的水提、醇提工艺。制法:取 10 个处方量的饮片,杜仲、红花等 8 味药浸泡 1 h,加入 12 倍量水回流提取 3 次,每次 1.5 h。提取液减压浓缩至相对密度为 1.05,再加入 95% 乙醇使含醇量为 60%,醇沉 24 h,回收乙醇。将醇提部分的饮片以 10 倍 60% 乙醇量浸泡 1 h,提取 3 次,每次 1.5 h。减压回收乙醇。合并水提取与醇提取药液,分别减压浓缩至含生药为 1, 2, 4 g·mL⁻¹, -20 °C 保存备用。于造模成功后开始连续 ig 给药,各给药组均按照 10 mL·kg⁻¹ ig 。补肾活血颗粒低、中、高剂量组分别给补肾活血流浸膏 10, 20, 40 g·kg⁻¹, 仙灵骨葆组 ig 给予仙灵骨葆药液 0.3 g·kg⁻¹, 模型组与正常组 ig 等容积生理盐水,各组均每日给药 1 次,连续 4 周,每 4 d 测体重 1 次,按体重调整给药剂量。

2.3 观察指标

2.3.1 体重及一般体征观察 每隔 4 d 监测各组大鼠体重,观察比较各组大鼠的行为活动、饮食、排便、皮毛肤色、精神状态。

2.3.2 血清学检测 给药 4 周后,各组大鼠眼眶取血,将血液静置 2 h 后,于 4 °C 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上层血清,按照试剂盒使用说明书操作,使用

酶标仪检测血清样本中 BALP, BGP, TRACP-5 β 含量。

2.3.3 骨密度检测 给药 4 周后,各组大鼠 3% 戊巴比妥钠麻醉,置于 Carestream FXO 小动物活体成像仪拍摄仓托盘上,调整右侧股骨使其位于托盘正中央,关闭仓门。通过 Carestream MI 软件及骨密度分析软件,计算大鼠股骨骨密度。

2.3.4 组织病理学观察 颈椎脱臼法处死各组大鼠,分离左侧股骨,剔除附着于骨骼表面的肌肉等软组织后,10% 的福尔马林固定。1 周后进行脱钙、脱水处理,取股骨头进行石蜡包埋,固定于切片机上,5 μm 连续切片,切片于烘片机上烘干后进行 HE 染色。光镜观察股骨头组织形态变化。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件包统计,各组数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

表 1 补肾活血颗粒对骨质疏松大鼠体重变化的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1 Effect of Bushen Huoxue granules on changes in weight of rats with osteoporosis ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	体重/g			
		0 d	12 d	24 d	28 d
正常	-	191.4 \pm 12.4	213.6 \pm 17.0	237.9 \pm 22.2	244.6 \pm 21.2
模型	-	194.2 \pm 7.9	191.5 \pm 9.3 ¹⁾	205.1 \pm 9.0 ¹⁾	217.4 \pm 8.5 ¹⁾
补肾活血颗粒	10	194.2 \pm 6.7	200.3 \pm 10.4	214.1 \pm 6.9 ²⁾	217.6 \pm 7.0
	20	199.4 \pm 7.7	198.1 \pm 12.9 ²⁾	223.6 \pm 12.1 ²⁾	242.0 \pm 17.1 ²⁾
	40	199.0 \pm 8.9	205.2 \pm 9.4 ³⁾	216.6 \pm 14.5	226.7 \pm 11.0
仙灵骨葆	0.3	197.7 \pm 5.4	205.3 \pm 11.4	225.1 \pm 8.1 ³⁾	236.4 \pm 7.6 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

表 2 补肾活血颗粒对骨质疏松大鼠血清 BALP, BGP, TRACP-5 β 的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Effects of Bushen Huoxue granules on BALP, BGP, TRACP-5 β in serum of rats with osteoporosis ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	BGP/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	BALP/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	TRACP-5 β / $\text{pg} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	142.35 \pm 20.83	2.87 \pm 0.36	542.18 \pm 44.67
模型	-	104.57 \pm 18.98 ¹⁾	3.28 \pm 0.31 ²⁾	642.24 \pm 50.08 ²⁾
补肾活血颗粒	10	114.93 \pm 23.97	2.58 \pm 0.27 ⁴⁾	593.86 \pm 31.63 ¹⁾
	20	148.74 \pm 27.80 ³⁾	2.55 \pm 0.22 ⁴⁾	501.14 \pm 24.28 ⁴⁾
	40	146.63 \pm 18.40 ³⁾	2.46 \pm 0.41 ⁴⁾	518.48 \pm 43.55 ⁴⁾
仙灵骨葆	0.3	108.33 \pm 16.46	2.76 \pm 0.29 ⁴⁾	521.59 \pm 73.96 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 骨密度测定 模型组大鼠与正常组比较,股骨骨密度显著降低($P < 0.05$)。除低剂量组外,其余各组大鼠与模型组相比,股骨骨密度均显著升高($P < 0.05$),其中以补肾活血颗粒中、高剂量组最为显著。见表 3。

3 结果

3.1 大鼠体重变化及一般体征观察 造模及给药期间,各组大鼠行为活动正常,毛顺光亮,粪便成型,无脱毛掉毛现象,精神状态良好。灌服维甲酸 12 d 后,模型组大鼠体重增长减缓($P < 0.05$),出现活动度减少、毛色枯槁、拱背等表现。与模型组比较,补肾活血低、中剂量组及仙灵骨葆组大鼠的体重增长较快($P < 0.05$),在 24 d 后出现显著性差异($P < 0.01$),活动度良好,排便成型,皮毛肤色正常。见表 1。

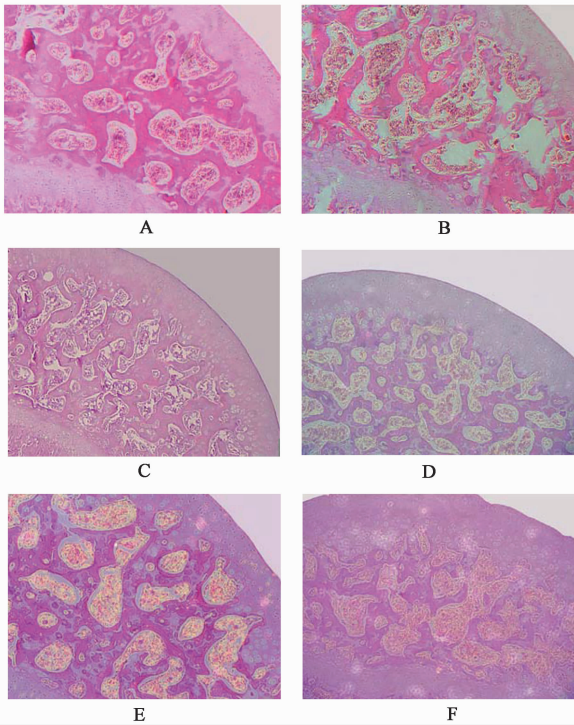
3.2 血清学检测 与正常组比较,模型组大鼠 BGP, BALP, TRACP-5 β 显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较,补肾活血颗粒中、高剂量组 BGP 均有显著上升($P < 0.05$),BALP 均有显著回落($P < 0.01$),中、高剂量组及仙灵骨葆组的 TRACP-5 β 显著降低($P < 0.01$)。见表 2。

3.4 组织形态学观察 正常组大鼠股骨骨小梁大小粗细均匀,排列整齐紧密,未见紊乱及断裂等情况。模型组与正常组相比有明显的病变差异,骨小梁破坏较为明显,数目明显减少,变窄变细且稀疏,骨小梁结构排列紊乱,出现断裂,呈典型的骨质疏松

表 3 补肾活血颗粒对骨质疏松大鼠股骨骨密度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)
Table 3 Effect of Bushen Huoxue granules on bone mineral density of femoral osteoporosis rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	骨密度/ $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$
正常	-	9.11 ± 0.21
模型	-	$7.93 \pm 0.51^{1)}$
补肾活血颗粒	10	8.16 ± 0.37
	20	$8.75 \pm 0.22^{2)}$
	40	$8.67 \pm 0.45^{2)}$
仙灵骨葆	0.3	$8.66 \pm 0.26^{2)}$

样改变。与模型组相比,补肾活血颗粒低、中剂量组骨组织形态学均有所改善,骨小梁数量增加,小梁间隙变小,排列较整齐,未见大面积的骨小梁断裂;高剂量组改善最为明显,骨小梁较粗,排列整齐,间隙小,与正常组无明显差异。仙灵骨葆组亦显示出骨组织一定程度的恢复,但与补肾活血颗粒高剂量组相比骨小梁的排列及粗细有一定的差别。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 补肾活血颗粒 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 补肾活血颗粒 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 补肾活血颗粒 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; F. 仙灵骨葆 $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图 1 补肾活血颗粒对骨质疏松大鼠股骨组织形态学的影响 (HE, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of Bushen Huoxue granule on osteoporotic femur tissue morphology (HE, $\times 100$)

4 讨论

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种单位体积

内骨量减少、骨的微观结构退化为特征所致的骨脆性增加及易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病^[5], 为骨科的常见病、多发病。中医学认为骨质疏松症属于“骨痹”“骨痿”范畴,肾精亏虚则骨髓的生化无力,骨骼得不到濡养而痞弱。肾气亏虚无以推动血液循环,日久致瘀,瘀血阻滞脉络,不通则痛,故肾精亏虚为本,瘀血阻滞为标,以补肾活血为治疗原则,本研究所用的补肾活血颗粒处方源自经验方,方中熟地黄益髓填精、杜仲补肝肾、壮筋骨,为君药;附子、肉桂补肾阳,山茱萸、枸杞养肝血,助主药以滋肾养肝,是为臣药;桃仁、红花活血以散瘀止痛,为佐药;山药、甘草补中养脾,为使药;诸药合用,共奏补肾益精、活血化瘀、散寒止痛之功效,切合骨质疏松症的中医发病机制。

维甲酸是维生素 A 的衍生物,是用于肿瘤和银屑病等治疗的药物,但对骨质有明显影响,具有致骨质疏松的副作用^[6],维甲酸可增加成骨细胞的数量,又刺激破骨细胞使其活性增强,使骨代谢呈现高转换型改变,但总结果是骨吸收大于骨形成^[7]。虽然在病因上与人类 OP 不同,但此模型在发病症状、组织形态学表现以及对雌激素的骨反应上与人类有极大的相似性,且周期短,骨质疏松明确,易于重复^[8]。本实验参照相关文献[4]给 SD 大鼠灌服 $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 维甲酸连续 2 周,从第 12 天起模型组大鼠出现体重增长减缓,活动度减少、毛色枯槁、拱背等表现,组织形态学观察结果提示骨小梁结构排列紊乱、稀疏断裂,骨密度测定结果也提示股骨骨密度显著降低 ($P < 0.05$),表明 OP 模型制备成功。

BALP 是骨形成标志物,是在成骨细胞分化增殖阶段产生分泌的一种酶,是最常用的评价骨形成和骨转换的指标;BGP 也是骨形成标志物,是骨组织中最丰富的非胶原蛋白,其主要是维持骨的正常矿化速率,维持骨量平衡;TRACP-5 β 水平可反映破骨细胞活性和骨吸收状态,是反映骨吸收的一个特异性标志^[9-10]。本实验结果显示,模型组大鼠 BALP, TRACP-5 β 显著升高, BGP 显著降低,提示模型组大鼠成骨细胞活性增强,破骨细胞活跃,骨吸收速率大于骨形成速率,骨吸收增强,骨更新降低。与模型组比较,各给药组均可明显下调 BALP, TRACP-5 β , 并提高 BGP, 提示补肾活血颗粒能有效降低破骨细胞活性,减少骨吸收,显著增高骨更新率。

骨密度是目前公认的诊断骨质疏松金标准,也是临床上用来评价骨质疏松治疗效果的客观指标^[11-12]。本研究测定的骨密度参数及其他指标,经

统计学分析具有显著意义,说明造模组骨质疏松症模型成立。补肾活血颗粒中、高剂量组及仙灵骨葆组与模型组比较均表现出具有明显升高维甲酸所致骨质疏松大鼠骨密度的作用。

综上所述,补肾活血颗粒可以有效的纠正维甲酸所致骨质疏松模型的骨代谢异常,抑制破骨细胞活性减少骨吸收,提高骨更新率。改善骨质疏松大鼠骨组织病理状态,提高骨质疏松大鼠股骨骨密度,从而对骨质疏松症起到良好的防治作用。

[参考文献]

[1] 刘慧,许兵,方剑利,等. 补肾活血颗粒对去势大鼠血生化的影响[J]. 中华中医药杂志,2012,27(5):1435-1438.
[2] 王玲,尹华,章建华,等. 多指标综合评价法优选补肾活血颗粒的醇提工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(15):22-24.
[3] 张成龙,李森,尹华,等. 补肾活血颗粒急性毒性实验研究[J]. 中华中医药学刊,2014,32(3):550-552.
[4] 吴波,徐冰,黄添友,等. 维A酸致大鼠骨质疏松模型

与机理研究[J]. 药学报,1996,31(4):241-245.
[5] 王亦聰,姜保国. 骨与关节损伤[M]. 北京:人民卫生出版社,2012:390.
[6] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2002:1560.
[7] Allen S P, Maden M, Price J S. A role for retinoic acid in regulating the regeneration of deer antlers[J]. Dev Biol,2002,251(2):409-423.
[8] 廖慧娟,廖二元. 骨质疏松症动物模型[J]. 国外医学:内分泌学分册,2004,24(1):60-62.
[9] 朱汉民. 骨代谢实验室诊断进展[J]. 上海医学检验杂志,2000,15(5):25:277-278.
[10] Qi W, Yan Y B, Lei W. Prevention of disuse osteoporosis in rats by Cordyceps sinensis extract[J]. Osteoporos, 2012, 23(9):2347-2357.
[11] Fukunaga M, Sone T, Yoshikawa K. Diagnostic criteria of male osteoporosis[J]. Clin Calcium, 2006,16(3):437-442.
[12] 杨伟民,邵斌. 骨代谢生化指标与骨质疏松症[J]. 中国骨质疏松杂志,2004,10(1):118-120.

[责任编辑 聂淑琴]

热烈祝贺中国中医科学院中药研究所屠呦呦研究员荣获
“2015年诺贝尔生理学或医学奖”
Congratulation to Youyou Tu on Her Receiving the 2015 Nobel
Prize in Physiology or Medicine