

右归胶囊防治去卵巢大鼠骨质疏松的作用

徐丽瑛, 姚闽, 余华, 丁琦, 肖小华, 周艳艳*
(江西省药物研究所, 南昌 330029)

[摘要] **目的:**观察右归胶囊防治去卵巢大鼠骨质疏松的作用,并探讨其相关的作用机制。**方法:**SPF级SD大鼠105只,其中15只大鼠作为假手术组,其余大鼠采用去卵巢大鼠复制骨质疏松模型,取造模后雌性大鼠随机分为模型组,右归胶囊低、中、高剂量组(0.71, 1.43, 2.85 g·kg⁻¹),雌激素组(己烯雌酚, 0.02 mg·kg⁻¹)和仙灵骨葆胶囊组(0.25 g·kg⁻¹),每组15只,于术后第7天开始ig给药,连续给药6个月。于末次给药后24 h大鼠眼眶采血,测定血清钙(Ca),磷(P),碱性磷酸酶(ALP),酸性磷酸酶(ACP)。完整取出大鼠左右股骨,用双能X射线吸收法骨密度仪测大鼠左股骨骨密度(BMD)和骨矿物质(BMC)。用WDW型电子万能实验机测大鼠右股骨力学性能指标挠度、最大力和抗弯强度。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠血清Ca, P, ALP及ACP水平明显升高,大鼠BMD及BMC含量明显降低,大鼠右股骨挠度、最大力和抗弯强度明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,右归胶囊低、中、高剂量组均能明显降低去势大鼠血清Ca, P, ALP及ACP水平,明显提高去势大鼠BMD及BMC含量,明显升高右股骨挠度、最大力和抗弯强度($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**右归胶囊能改善去势大鼠生物力学指标,并能够延缓大鼠骨量丢失,提示其具有预防骨质疏松症作用。

[关键词] 骨质疏松; 右归胶囊; 骨密度; 骨生物力学; 去势大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0151-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140151

Effect of Yougui Capsule on Osteoporosis in Ovariectomized Rats

XU Li-ying, YAO Min, YU Hua, DING Qi, XIAO Xiao-hua, ZHOU Yan-yan*
(Jiangxi Institute of Materia Medica, Nanchang 330029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Yougui capsule on osteoporosis in ovariectomized rats. **Method:** A total of 105 SPF-grade SD rats were selected, in which 15 were used in the sham-operated group, and the remaining were ovariectomized to reproduce the model of osteoporosis. The ovariectomized rats were divided into model group, Yougui capsule low, medium and high-dose groups (0.71, 1.43, 2.85 g·kg⁻¹), estrogen group (diethylstilbestrol, 0.02 mg·kg⁻¹) and Xianling Gubao capsule group (0.25 g·kg⁻¹), with 15 rats in each group. The rats were given the corresponding drugs on the 7th day after surgery for six months. Orbital blood in rats was collected to determine Ca, P, alkaline phosphatase (ALP), acid phosphatase (ACP) in serum. Right and left thighbones of the rats were collected to determine bone mineral density (BMD), bone mineral (BMC) with dual energy X-ray absorptiometry. WDW electronic universal testing machine was used to determine mechanical performance indexes of the right thighbone, such as deflection, maximum force and bending strength. **Result:** Compared with the sham-operated group, the model group showed significant increases in Ca, P, ALP, ACP levels in serum, and decreases in BMD, BMC and bone biomechanical indexes ($P < 0.05$, $P < 0.01$); compared with the model group, Yougui capsule groups can significantly decrease Ca, P, ALP, ACP level in serum, and increase BMD, BMC and bone biomechanical indexes ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Yougui capsule can improve biomechanical indexes of ovariectomized rats, and delay the rat bone mass loss, suggesting that Yougui capsule has

[收稿日期] 20150512(011)

[基金项目] 江西省卫生计生委计划项目(2014A034)

[第一作者] 徐丽瑛, 硕士, 副研究员, 从事新药的药理毒理研究工作, Tel:13979126755, E-mail:xly17435@foxmail.com

[通讯作者] *周艳艳, 硕士, 助理研究员, 从事新药的药理毒理研究工作, Tel:13361610502, E-mail:2212356388@qq.com

the preventive effect on osteoporosis.

[**Key words**] osteoporosis; Yougui capsule; bone mineral density; biomechanical property; ovariectomized rats

骨质疏松症(OP)是以低骨量及骨组织微结构退变为特征的一种全身性代谢骨病,伴有骨脆性增加。易于发生骨折,主要发生于中老年人,尤其是绝经后妇女^[1-3]。目前防治药物有4大类,如激素,双膦酸化合物,钙制剂,维生素D以及中西医结合的复方制剂。国外治疗骨质疏松症基本上采用激素疗法,这类药是防治骨质疏松症特别是对绝经期妇女是十分重要的药物,但由于激素的过多使用,妇女患绒毛膜癌、子宫内膜癌的几率上升。双膦酸盐毒副作用较大,可出现胃肠不适,低血钙及低磷血症及皮疹等症状。钙制剂对胃刺激性较大,长期应用柠檬酸钙可能有致铝中毒等,氨基酸螯合钙可使骨密度、骨长度和骨质量显著增加,但这2种钙剂价格较贵^[2]。从“肾”论治骨质疏松症已被中西医学者普遍接受,补肾中药能提升和维持机体性激素水平或发挥类性激素样作用。中医学认为骨质疏松症是肾精亏虚、骨骼失养所致。“肾为先天之本”、“肾主骨,生髓”,“肾藏精,精生髓,髓养骨,骨生髓,聚髓为脑”^[4-5]。右归胶囊源于《景岳全书》,是温阳补肾的代表方。右归胶囊方中用了大量滋阴药物(熟地黄、山药、山茱萸、枸杞子、菟丝子、杜仲、当归)和少量补阳药物(鹿角胶、肉桂、制附子)。滋阴药物填补真阴,以治命门火衰;补阳药温阳化气,直接温补肾阳。本研究旨在通过观察右归胶囊对去卵巢大鼠雌性骨密度及骨代谢指标的影响,探讨右归胶囊对绝经后骨质疏松症的防治作用^[6]。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,SPF级,105只,雌性,体重180~220g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号SCXK(湘)2013-0004。

1.2 药物及试剂 右归胶囊(每粒重0.45g,含生药1.425g,由江西银涛药业有限公司提供,批号130207,临床成人日用最大量为17.1g,按60kg体重计算,即 $0.285\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量。大鼠取其2.5,5,10倍,剂量分别为 $0.71, 1.43, 2.85\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。己烯雌酚片(合肥久联制药有限公司,批号20130518),仙灵骨葆胶囊(贵州同济堂制药有限公司,批号130229)。钙(Ca)试剂盒、磷(P)试剂盒及碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号分别为130141,130061,130161),酸性磷酸

酶(ACP)试剂盒(江西特康科技有限公司,批号1311128)。

1.3 仪器 TC6030型全自动生化分析仪(江西特康科技有限公司),QDR 4500A型双能X射线吸收法骨密度仪(美国Hologic公司),WDW1010型电子万能试验机(长春科新试验机研究所)。

2 方法

2.1 去卵巢大鼠骨质疏松模型的制备 大鼠购入后适应性喂养1周,检疫7d后取检疫合格大鼠,以 $0.04\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 戊巴比妥钠ip,麻醉后用碘伏棉球消毒皮肤表面,沿腹正中线剪开皮肤,分离肌肉、筋膜及腹腔脏层,暴露腹腔。除假手术组行假手术外,其余大鼠结扎并切除双侧卵巢组织,依次缝合内层肌肉和外层皮肤,术后3d每只每天给青霉素4万U肌肉注射,以预防感染。

2.2 动物分组及给药 取造模后大鼠随机分为模型组、右归胶囊 $0.71, 1.43, 2.85\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组,仙灵骨葆胶囊 $0.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组和己烯雌酚 $0.02\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组,另设假手术组。共7组,每组15只,分笼饲养,于术后第7天开始ig相应药物,假手术组及模型组给予蒸馏水,每日1次,自由饮食,连续给药6个月。

2.3 检测指标

2.3.1 血清生化指标测定 于末次给药后24h大鼠眼眶采血,离心取血清,用邻甲酚酞络合酮比色法和钼酸铵比色法测定血清Ca、P水平,用NPP底物-AMP缓冲液法和 α -萘基磷酸盐比色法测定血清ALP、ACP水平。

2.3.2 大鼠股骨骨密度(BMD)和骨矿物质(BMC)测定 动物采血后用颈椎脱臼法处死,剖腹后完整取出大鼠左侧股骨,剥离附着的肌肉和软组织,注意保护股骨头部位不受损伤,用双能X射线吸收法骨密度仪测大鼠左股骨骨密度和骨矿物质。

2.3.3 大鼠股骨生物力学性能测定 在取出大鼠左侧股骨后,同法取出大鼠右侧股骨,用WDW型电子万能试验机测大鼠右股骨力学性能指标。

2.4 统计学分析 采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对去势大鼠血清 Ca, P 的影响 与假手术组比较,模型组去势大鼠血清 Ca, P, ALP 及 ACP 水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较,右归胶囊

0.71, 1.43, 2.85 $g \cdot kg^{-1}$ 组、仙灵骨葆组均能明显降低去势大鼠血清 Ca, P, ALP 及 ACP 水平,已烯雌酚能明显降低去势大鼠血清 Ca, ALP 及 ACP 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 右归胶囊对去势大鼠血清 Ca, P, ALP, ACP 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Yougui capsules on Ca, P, ALP, ACP level in serum on ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	Ca/ $mmol \cdot L^{-1}$	P/ $mmol \cdot L^{-1}$	ALP/ $U \cdot L^{-1}$	ACP/ $U \cdot L^{-1}$
假手术	-	15	1.98 \pm 0.45 ²⁾	2.06 \pm 0.39 ²⁾	158.6 \pm 44.7 ²⁾	181.9 \pm 82.2 ²⁾
模型	-	12	2.79 \pm 0.60	2.73 \pm 0.20	245.8 \pm 55.5	370.1 \pm 125.7
右归胶囊	0.71	14	2.22 \pm 0.38 ²⁾	2.30 \pm 0.46 ²⁾	191.1 \pm 50.7 ¹⁾	230.8 \pm 107.1 ²⁾
	1.43	12	2.24 \pm 0.25 ²⁾	2.18 \pm 0.51 ²⁾	183.5 \pm 38.7 ²⁾	202.1 \pm 48.6 ²⁾
	2.85	13	2.12 \pm 0.34 ²⁾	2.19 \pm 0.47 ²⁾	172.1 \pm 66.0 ²⁾	186.7 \pm 60.4 ²⁾
仙灵骨葆	0.25	13	2.35 \pm 0.39 ¹⁾	2.21 \pm 0.42 ²⁾	177.0 \pm 53.4 ²⁾	192.8 \pm 86.3 ²⁾
已烯雌酚	2 \times 10 ⁻⁵	13	2.19 \pm 0.33 ²⁾	2.58 \pm 0.43	188.0 \pm 35.5 ²⁾	207.2 \pm 96.2 ²⁾

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

3.2 对去卵巢大鼠 BMD 及 BMC 水平的影响 与假手术组比较,模型组去势大鼠 BMD 及 BMC 水平明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较,右归胶囊各给药组及仙灵骨葆、已烯雌酚组均能明显提高去势大鼠 BMD 及 BMC 水平,其虽不及已烯雌酚,但优于仙灵骨葆胶囊 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2, 图 1。

表 2 右归胶囊对去势大鼠股骨 BMD 及 BMC 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of Yougui capsules on BMD, BMC levels on ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	BMD/ $g \cdot cm^{-2}$	BMC/g
假手术	-	15	0.272 \pm 0.014 ²⁾	0.516 \pm 0.057 ²⁾
模型	-	12	0.230 \pm 0.011	0.407 \pm 0.040
右归胶囊	0.71	14	0.247 \pm 0.014 ²⁾	0.478 \pm 0.055 ²⁾
	1.43	12	0.244 \pm 0.013 ²⁾	0.464 \pm 0.029 ²⁾
	2.85	13	0.247 \pm 0.018 ¹⁾	0.484 \pm 0.065 ²⁾
仙灵骨葆	0.25	13	0.244 \pm 0.014 ¹⁾	0.460 \pm 0.059 ¹⁾
已烯雌酚	2 \times 10 ⁻⁵	13	0.263 \pm 0.010 ²⁾	0.504 \pm 0.044 ²⁾

3.3 对去势大鼠股骨生物力学的影响 与假手术组比较,模型组去势大鼠挠度、最大力和抗弯强度明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较,右归胶囊 0.71 $g \cdot kg^{-1}$ 组能明显提高去势大鼠抗弯强度,右归胶囊 2.85 $g \cdot kg^{-1}$ 组能明显提高去势大鼠挠度,仙灵骨葆胶囊具有提高去势大鼠挠度,已烯雌酚具有提高去势大鼠最大力和抗弯强度作用 ($P < 0.05$)。见表 3。

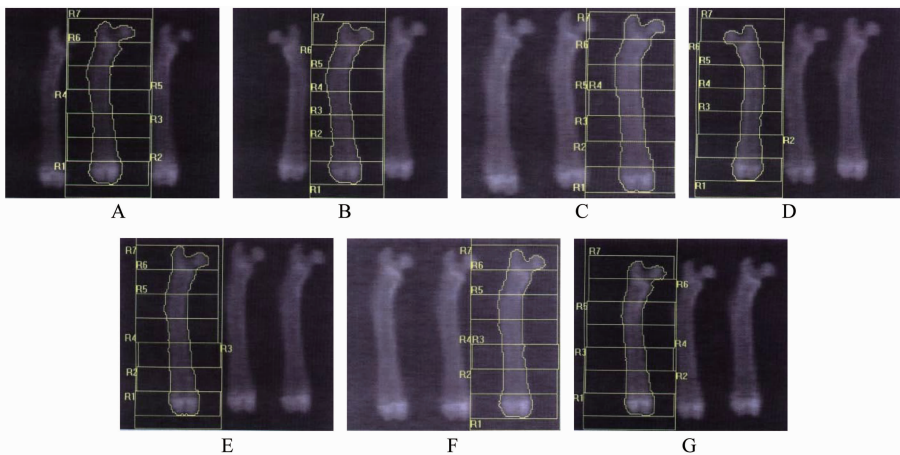


图 1 右归胶囊对去势大鼠股骨骨密度的影响 (X 射线)

Fig. 1 Effects of Yougui capsules on BMD index on ovariectomized rats (X-ray)

表 3 右归胶囊对去势大鼠股骨生物力学的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of Yougui capsules on bone biomechanical indexes on ovariectomized rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	挠度/mm	最大力/N	抗弯强度/MPa
假手术	-	15	$1.39 \pm 0.42^{1)}$	$114.97 \pm 8.03^{2)}$	$128.58 \pm 12.53^{2)}$
模型	-	12	1.11 ± 0.15	98.95 ± 15.78	102.81 ± 23.47
右归胶囊	0.71	14	1.31 ± 0.48	111.30 ± 18.46	$120.78 \pm 19.68^{1)}$
	1.43	12	1.35 ± 0.46	98.26 ± 21.67	100.75 ± 22.50
	2.85	13	$1.32 \pm 0.30^{1)}$	102.43 ± 22.11	101.70 ± 21.68
仙灵骨葆	0.25	13	$1.45 \pm 0.33^{2)}$	104.15 ± 12.52	110.97 ± 12.53
己烯雌酚	2×10^{-5}	13	1.28 ± 0.41	$115.37 \pm 18.81^{1)}$	$129.36 \pm 21.22^{2)}$

4 讨论

骨质疏松症是一种以单位骨量减少和组织细微结构退变为特征,并导致骨脆性增加、骨强度降低,易于骨折的全身代谢性疾病,其特点是骨矿物质和骨基质呈等比例减少^[7]。骨质疏松症分为原发性和继发性两类,原发性骨质疏松占 90% 以上,流行病学研究表明,这种骨质疏松的发病率在老年人中,尤其是绝经后妇女中是很高的。建立去卵巢雌鼠骨质疏松模型是绝经后骨质疏松的经典病理模型,并被广泛采用^[8]。大鼠切除卵巢(OVX)模型被认为与绝经后妇女骨质疏松症最为相似,雌性大鼠的卵巢被切除以后,骨代谢活跃,松质骨出现明显的骨丢失,骨强度下降,这些松质骨的骨丢失是伴随着转换增强而进行的,这种特性较好地模仿了人正常绝经时高转换型骨质疏松发生时的骨丢失状态^[9]。实验结果显示,大鼠在去除卵巢后,骨密度、骨生物学指标降低,骨丢失加快,与假手术组比较显著降低,提示去势骨质疏松大鼠模型的成功。与模型组比较,各给药组骨密度及骨矿含量均有不同程度的提高,其中己烯雌酚组,仙灵骨葆胶囊组,右归胶囊 0.71, 1.43, 2.85 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组有统计学差异。

生物力学指标能反映骨骼的物理特征和结构变化,因此对骨质疏松的诊断和治疗均有重要的价值^[10]。BMD 是目前临床上常用的评估骨脆性程度和力学性能的指标。骨质疏松是最常见的与年龄相关的疾病之一,具有高发病率和高死亡率特征。骨质疏松表现为 BMD 下降、骨体积分数下降、松质骨骨小梁分离度变大、变细变脆的骨小梁增多,骨量和微结构对力学刺激的敏感度高,而且存在外部负载和骨代谢之间的反馈调节机制^[11]。与假手术组比较,模型组大鼠股骨挠度、最大力、抗弯强度均明显降低,经给药治疗后,各给药组均有不同程度的升高,其中仙灵骨葆胶囊及右归胶囊 2.85 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组能

明显升高大鼠股骨挠度,己烯雌酚明显升高大鼠股骨最大力,己烯雌酚和右归胶囊 0.71 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组明显升高大鼠股骨抗弯强度。结果提示右归胶囊可以防治去卵巢所致骨质疏松大鼠生物力学性能的降低,可以增强骨的抗变形能力,减少骨折的发生,提高骨质量,具有预防骨质疏松症作用,详细的机制尚待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 刘忠厚. 骨质疏松学[M]. 北京: 科学出版社, 1998:142.

[2] 王昭洪,曾涛. 补肾中药治疗骨质疏松的实验研究进展[J]. 环球中医药, 2011, 4(3): 235-238.

[3] 赵丕文,牛建昭,王继峰,等. 中药及其活性成分对绝经后骨质疏松症的治疗及其作用机制[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12): 1693-1699.

[4] 宋根伟,张晓燕,姚霜,等. 补肾中药的药理作用研究概况[J]. 山西医药杂志, 2011, 40(15): 787-789.

[5] 张江,关雪峰. 中医药防治原发性骨质疏松症研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(2): 96-98.

[6] 闫川慧,李东明. 右归丸方义新解[J]. 山东中医药大学学报, 2005, 29(4): 270.

[7] 王方,邹德威,吴继功,等. 原发性骨质疏松症的病因学研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2012, 18(7): 675-679.

[8] 谭桂云. 更年期综合征实验研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2004, 20(6): 62-64.

[9] 吕音,杨玉彬. 绝经后骨质疏松大鼠模型文献回顾及实验初探[J]. 现代医院, 2010, 10(5): 21-22.

[10] 崔轶,李军,郭海,等. 骨质疏松模型的评价方法研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(4): 416-420.

[11] Ruimerman R, Huiskes R, Lenthe G H, et al. A computer simulation model relating bone-cell metabolism to mechanical adaptation of trabecular architecture[J]. Comput Biol Med, 2001, 4(5): 433-448.

[责任编辑 周冰冰]