

壮骨伸筋胶囊对去势大鼠骨密度及骨代谢的影响

解秀兰^{1,2}, 孙晓丽², 李丽娟², 苏海峰², 段重高², 周亚伟^{2*}

(1. 中国医药科技出版社, 北京 100082; 2. 北大世佳研究中心, 北京 100084)

[摘要] **目的:**研究壮骨伸筋胶囊(Zhuanggu Shenjin capsules, ZSJ)对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度及骨代谢的影响,并探讨其相关的作用机制。**方法:**将 72 只 SD 大鼠按随机分为假手术组(12 只)和造模组(60 只),模型组采用摘除大鼠双侧卵巢,将去卵巢大鼠随机分为模型组、阳性药结合雌激素组、壮骨伸筋胶囊高、中、低剂量组(5.42, 2.71, 1.36 g·kg⁻¹),每组 12 只。连续 ig 13 周,每周连续 ig 6 d,实验结束,取血和骨组织,测定骨密度及血清中血钙(Ca),碱性磷酸酶(ALP),抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP),雌二醇(E₂),骨钙素(BGP),降钙素(CT)的变化;甲苯胺蓝染色观察骨组织病理学。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠骨密度,血清 E₂ 含量明显降低,大鼠血清 ALP, TRAP, BGP 含量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),子宫系数明显降低($P < 0.01$),骨组织病理学观察显示模型组骨小梁稀疏,骨小梁间有断裂并且分离,间隙增大,排列紊乱,骨板层结构疏松,骨质疏松特征明显;与模型组比较,壮骨伸筋胶囊高、中剂量组能够显著增加模型大鼠的骨密度($P < 0.01$),增加模型鼠血清 E₂ 含量($P < 0.05$),降低模型大鼠血清 ALP, TRAP, BGP 含量($P < 0.05$),但是对血钙和 CT 作用却不明显,骨组织病理学观察显示骨组织结构趋于完整。**结论:**壮骨伸筋胶囊能提高去卵巢骨质疏松大鼠骨密度,提高雌激素水平,改善骨代谢水平,从而起到防治骨质疏松的作用。

[关键词] 壮骨伸筋胶囊; 骨密度; 骨代谢指标; 骨质疏松

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0121-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140121

Effect of Zhuanggu Shenjin Capsules on Bone Mineral Density and Bone Metabolism in Ovariectomized Rats

XIE Xiu-lan^{1,2}, SUN Xiao-li², LI Li-juan², SU Hai-feng², DUAN Chong-gao², ZHOU Ya-wei^{2*}

(1. China Medical Science and Technology Press, Beijing 100082, China;

2. Beijing University Bescholar Research Center, Beijing 100084, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Zhuanggu Shenjin capsules (ZSJ) on bone metabolism and bone mineral density (BMD) in ovariectomized rats. **Method:** Totally 72 SD rats were randomly divided into sham-operated group ($n = 12$) and modeling group ($n = 60$). Bilateral ovaries of rats were removed to establish the modeling group, and then the rats in modeling group were further ransomly divided into model group, positive drug + estrogen group, and ZSJ high dose, middle dose and low dose groups (5.42, 2.71, 1.36 g·kg⁻¹). Each group included 12 rats. The rats received corresponding drug by ig administration for continuous 13 weeks, 6 days/week. After the experiment, blood and bone tissues were taken to detect BMD, blood calcium (Ca), alkaline phosphatase (ALP), tartrate resistant acid phosphatase (TRAP), estradiol (E₂), bone gla protein (BGP) and calcitonin in blood serum. The bone tissue pathology was observed by toluidine blue staining. **Result:** As compared with sham-operated group, BMD level and serum E₂ level were significantly decreased, while serum ALP, TRAP and BGP levels were significantly increased in rats of model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), uterine coefficient was decreased significantly ($P < 0.01$), the bone tissue pathological observation showed that the trabecular bone was sparse in

[收稿日期] 20150506(006)

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(20130302025YY)

[第一作者] 解秀兰, 硕士, 从事中药新药研究, Tel:010-62537996, E-mail:sdxhli@126.com

[通讯作者] * 周亚伟, 教授, 博士, 从事中药新药研究, Tel:010-62538007, E-mail:ywzhou@pku.edu.cn

rats of model group, with fractures and separation between the trabecular bones, gaps enlarged with arrangement disorder, loose bone lamellar structure, and the characteristic of osteoporosis was obvious. As compared with the model group, ZSJ (high dose, middle dose) could significantly increase the BMD level of the rats ($P < 0.01$), increase the level of E_2 in blood serum ($P < 0.05$), and reduce ALP, TRAP and BGP levels ($P < 0.05$), but had no significant effect on the level of blood Ca and CT, the bone tissue pathological observation showed that the bone tissue structure was nearly complete. **Conclusion:** ZSJ can increase bone mineral density and E_2 levels, and improve bone metabolism, thus preventing and treating osteoporosis in rats with ovariectomy.

[Key words] Zhuanggu Shenjin capsules; bone mineral density; bone metabolism; osteoporosis

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种以低骨量、骨组织的微结构破坏为特征, 导致骨骼脆性增加和易骨折的全身性疾病。随着全球人口老龄化, 骨质疏松在全世界发病率逐年上升, 绝经后妇女发病率更高, 成为危害妇女健康的主要疾病之一, 而且其发病率仍在呈现出不断上涨的趋势^[1]。壮骨伸筋胶囊是长春中医学院附属医院骨科主任、全国著名骨科专家刘柏龄教授多年的临床经验方, 是治疗骨质增生、颈椎病、腰椎病、风湿骨痛、四肢麻木、颈肩痛、臂痛、手麻木的中成药。由淫羊藿, 熟地黄, 鹿衔草, 骨碎补 (炙), 肉苁蓉, 鸡血藤等组成, 近年来相关研究证明, 其成分中的淫羊藿、熟地黄、鹿衔草、骨碎补等都表现出不同程度的对骨质疏松的防治作用^[2-5]。本文通过研究壮骨伸筋胶囊对去卵巢骨质疏松大鼠防治作用, 为以后药物新的临床应用提供相应的理论基础及实验依据。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠, 雌性, SPF 级, 购自中国医学科学院实验动物研究所, 合格证号 SCXK (京) 2009-0007。

1.2 药物及试剂 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), 碱性磷酸酶 (ALP), 血钙 (Ca, 中生北控生物科技股份有限公司, 批号分别为 130361, 130561); 雌二醇 (E_2), 骨钙素 (BGP), 降钙素 (CT) 检测试剂盒 (北京百奥莱博科技有限公司, 批号 201502); 抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 检测试剂盒 (碧云天生物技术研究所, 批号 P0332)。

1.3 仪器 MK3 型酶标仪 (美国 Thermo 公司), 300 型半自动生化仪 (荷兰威图科学公司), TDL5A 型离心机 (上海安亭公司), Jung2040 型切片机 (德国 Reichert 公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 将 72 只 SD 大鼠按随机数字表

分为 2 组, 假手术组 (12 只) 和造模组 (60 只)。参照文献 [6] 的方法, 摘除造模组大鼠双侧卵巢; 假手术组只摘取少许脂肪组织。术后 1 个月, 再将造模组大鼠按随机数字表分为 5 组, 分别为模型组、阳性药组、壮骨伸筋胶囊高、中、低剂量组各 12 只。分组后, 开始 ig 给药。壮骨伸筋胶囊组 ig 给予质量浓度分别为 $0.542, 0.271, 0.136 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的壮骨伸筋胶囊药物混悬液; 阳性药组 ig 给予 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 结合雌激素。以上给药体积均为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重。1 周连续给药 6 d, 休息 1 d, 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。每周称重 1 次, 并根据体重调整药物用量。

2.2 检测指标与方法

2.2.1 骨密度 (BMD) 测定 结束实验前 3 d, ip 10% 水合氯醛麻醉大鼠, 进行两侧股 BMD 测定 (中国中医科学院基础理论研究所病理室鞠大宏研究员处协助测定)。

2.2.2 血清相关指标测定 实验结束日, 所有大鼠 ip 10% 水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血, 静置后 $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后分离血清, 根据各试剂盒中检测方法, 测定血 Ca, ALP, TRAP, E_2 , BGP, CT 变化。

2.2.3 子宫系数 打开腹腔, 从子宫与阴道分界处剪断, 仔细分离出双侧子宫, 除掉周围的脂肪组织, 用天平称取湿重, 计算子宫系数。

$$\text{子宫系数} = \text{子宫湿重} / \text{体重} \times 100\%$$

2.2.4 骨组织病理学检测^[7] 取左侧胫骨, 4% 多聚甲醛固定 48 h 后送至中国中医科学院基础理论研究所病理室进行骨切片制作, 查看病理变化。

2.3 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 所有结果数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对去卵巢骨质疏松大鼠 BMD 的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠 BMD 平均值显著降低 ($P <$

0.01), 给予阳性药结合雌激素、壮骨伸筋胶囊治疗 3 个月后发现, 结合雌激素、壮骨伸筋胶囊 5.42,

$2.71 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组显著提高卵巢切除大鼠股骨密度 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 壮骨伸筋胶囊对大鼠股 BMD 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effects of Zhuanggu Shenjin capsules (ZSJ) on BMD in rat ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

$\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	左侧股骨	右侧股骨	BMD
假手术	-	0.262 ± 0.043	0.250 ± 0.039	0.256 ± 0.039
模型	-	$0.212 \pm 0.031^{2)}$	$0.208 \pm 0.025^{2)}$	$0.210 \pm 0.024^{2)}$
结合雌激素	1×10^{-4}	$0.245 \pm 0.012^{4)}$	$0.235 \pm 0.020^{4)}$	$0.240 \pm 0.014^{4)}$
壮骨伸筋胶囊	5.42	$0.255 \pm 0.018^{4)}$	$0.251 \pm 0.037^{4)}$	$0.253 \pm 0.023^{4)}$
	2.71	$0.252 \pm 0.033^{4)}$	$0.235 \pm 0.031^{4)}$	$0.244 \pm 0.027^{4)}$
	1.36	0.223 ± 0.026	0.230 ± 0.042	0.226 ± 0.031

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 2~4 同)。

3.2 对去卵巢骨质疏松大鼠血清生化指标的影响

($P < 0.05$);与模型组比较,结合雌激素药、壮骨伸

3.2.1 对去卵巢大鼠血清 Ca, ALP, TRAP 水平的影响 各组动物血清 Ca 指标间无统计学意义;与假手术比较,模型组血 ALP, TRAP 水平均明显升高

筋胶囊高、中剂量组均能明显降低由于卵巢切除引起的血清 ALP, TRAP 水平的升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 壮骨伸筋胶囊对大鼠血清 Ca, ALP, TRAP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effects of ZSJ on Ca, ALP, TRAP in rat ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	血钙/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	ALP/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	TRAP/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
假手术	-	2.61 ± 0.13	123.39 ± 33.37	0.11 ± 0.03
模型	-	2.52 ± 0.15	$151.21 \pm 29.99^{1)}$	$0.16 \pm 0.04^{1)}$
结合雌激素	1×10^{-4}	2.51 ± 0.27	$126.42 \pm 26.72^{3)}$	$0.12 \pm 0.04^{3)}$
壮骨伸筋胶囊	5.42	2.43 ± 0.13	$126.29 \pm 29.75^{3)}$	$0.11 \pm 0.05^{3)}$
	2.71	2.65 ± 0.25	$125.61 \pm 28.86^{3)}$	$0.11 \pm 0.06^{3)}$
	1.36	2.49 ± 0.17	130.39 ± 33.36	$0.11 \pm 0.04^{4)}$

3.2.2 对去卵巢大鼠血清 E_2 , BGP, CT 的影响 与假手术组比较,模型组 E_2 显著降低, BGP 明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,结合雌激素药、壮骨伸筋胶囊高、中剂量组均能明显升高去卵巢

骨质疏松大鼠的血清 E_2 , 降低血清 BGP 的含量 ($P < 0.05$)。各组动物 CT 指标间虽无统计学意义,但是壮骨伸筋胶囊各组具有升高 CT 含量的趋势。见表 3。

表 3 壮骨伸筋胶囊对大鼠血清 E_2 , BGP, CT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effects of ZSJ on E_2 , BGP, CT in rat ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$E_2/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	BGP/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	CT/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
假手术	-	45.11 ± 10.35	529 ± 93	10.69 ± 1.96
模型	-	$28.48 \pm 7.54^{2)}$	$618 \pm 68^{1)}$	9.75 ± 0.57
结合雌激素	1×10^{-4}	$35.16 \pm 2.93^{3)}$	$489 \pm 141^{3)}$	10.41 ± 1.53
壮骨伸筋胶囊	5.42	$40.21 \pm 10.65^{3)}$	$533 \pm 99^{3)}$	10.32 ± 1.87
	2.71	$38.85 \pm 13.23^{3)}$	$542 \pm 102^{3)}$	11.09 ± 3.05
	1.36	27.74 ± 6.48	575 ± 151	10.20 ± 2.74

3.3 对去卵巢骨质疏松大鼠子宫系数的影响 与假手术比较,模型组子宫明显系数减小 ($P < 0.01$);结合雌激素与壮骨伸筋胶囊各剂量组均能够明显增加模型大鼠的子宫系数 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 4。

梁间有断裂并且分离,间隙增大,排列紊乱,骨板层结构疏松,骨质疏松特征明显;阳性药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;壮骨伸筋胶囊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。见图 1。

3.4 对卵巢切除大鼠骨小梁的影响 假手术组可见骨组织结构完整,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

4 讨论

骨质疏松是多重原因引起的一组骨病,以单位体

表 4 壮骨伸筋胶囊对大鼠子宫系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Effect of ZSJ on uterus index in rat ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	子宫系数/%
假手术	-	0.034 ± 0.012
模型	-	0.010 ± 0.010 ²⁾
结合雌激素	1 × 10 ⁻⁴	0.025 ± 0.011 ⁴⁾
壮骨伸筋胶囊	5.42	0.018 ± 0.014 ⁴⁾
	2.71	0.016 ± 0.004 ³⁾
	1.36	0.016 ± 0.006 ³⁾

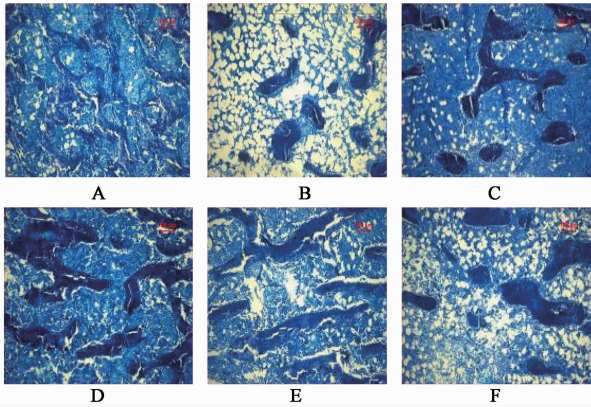


图 1 壮骨伸筋胶囊对大鼠骨小梁的影响 (甲苯胺蓝染色, ×100)
Fig.1 Effects of ZSJ on trabecular in rat (toluidine blue, ×100)

积内骨组织量减少为特点的代谢性骨病变。骨质疏松症分为原发性骨质疏松症 (primary osteoporosis, POP), 继发性骨质疏松症 (secondary osteoporosis, SOP) 和特发性骨质疏松症 (idiopathic osteoporosis, IOP) 3 大类。POP 又可分为绝经后骨质疏松症 (I 型) (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 和老年骨质疏松症 (II 型)。PMOP 一般发生在妇女绝经后 3 ~ 10 年内, 目前多数学者认为, 绝经后雌激素缺乏, 骨转换加快, 骨吸收大于骨形成是其主要病因。近年来有研究表明, 雌激素减少并非是引起 PMOP 的惟一因素, 绝经后骨代谢平衡失调也是引起骨质疏松的原因之一^[8-10]。

骨代谢平衡失调会导致骨小梁稀少, 骨小梁变细, 间距增宽, 骨小梁粗细不均, 骨密度降低, 骨型碱性磷酸酶的升高^[11-12]。本实验中壮骨伸筋胶囊能够明显抑制去卵巢大鼠所致的骨密度丢失以及骨小梁减少、变稀疏等的骨质疏松病变特征, 在骨质疏松防治方面显示出了一定的效果。其中淫羊藿为壮骨伸筋胶囊中的君药, 有关实验证明, 淫羊藿能够预防骨小梁断裂, 提高雌激素水平^[2]; 其他成分诸如

熟地黄、骨碎补、鹿衔草等, 也有文献^[3-5]证明能够抑制骨质疏松中骨密度的减少, 降低骨质疏松大鼠 BGP, ALP 含量, 升高 CT 含量, 本次实验中, 壮骨伸筋胶囊也表现出了相同的作用趋势, 壮骨伸筋胶囊给药治疗 3 个月后, 给药组大鼠的子宫系数明显比模型组有所增加, 且明显升高血清中 E₂, BGP 水平, 这些结果均与以往研究相一致。

综上所述, 壮骨伸筋胶囊在防治去势大鼠骨质疏松具有一定的作用, 这为壮骨伸筋胶囊进一步开发与利用奠定了基础, 并为骨质疏松的防治提供了思路和途径。

[参考文献]

[1] 杜艳萍, 朱汉民, 李慧林, 等. 绝经后妇女使用抗骨质疏松症药物的依从性及其影响因素分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2012, 18(2): 139-142.

[2] 刘波, 张睿, 徐彭, 等. 淫羊藿对去卵巢大鼠骨质疏松的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7): 178-181.

[3] 陶怡, 沈涛, 马晖. 熟地黄及其不同配伍药对治疗糖尿病大鼠骨质疏松的药效比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 249-251.

[4] 田刚, 张治国, 付小伟, 等. 骨碎补对卵巢切除所致大鼠骨质疏松症的治疗作用及其机理探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(1): 47-49.

[5] 李艳. 续断、鹿衔草、锁阳对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗作用及机理探讨[D]. 北京: 中国中医科学院, 2011.

[6] 鞠大宏, 张春英, 王安民, 等. 温补肾阳方对去卵巢所致骨质疏松症大鼠 IL-1 和 IL-6 活性的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(4): 29-31.

[7] 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[J]. 中华骨科杂志, 1994, 14(6): 365-367.

[8] 肖恩. 骨质疏松骨代谢生化指标的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(3): 212-216.

[9] 鞠大宏, 吴萍, 贾红伟, 等. 左归丸对卵巢切除所致骨质疏松大鼠骨钙素和降钙素含量的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(1): 16-17.

[10] 徐峰, 程坤, 张春芳. 绝经期妇女骨质疏松症的发病及中药治疗机理探究[J]. 中医药学报, 2010, 38(1): 46-48.

[11] 吴健雄, 黄崇博, 蔡桦, 等. 骨质疏松症中医证型与细胞因子、性激素、骨钙素的相关性临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2008, 16(6): 1-3.

[12] 戴鹏, 邓鸣涛, 张立超, 等. 杜仲叶对去势骨质疏松大鼠骨代谢的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2012, 18(12): 1127-1130.

[责任编辑 周冰冰]