

# 壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位 对去势雌鼠骨质疏松的疗效及机制研究

甘国兴<sup>1</sup>, 莫新民<sup>1\*</sup>, 李劲平<sup>2</sup>, 张国民<sup>1</sup>, 范娟娟<sup>1</sup>, 刘仕杰<sup>1</sup>

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410007; 2. 中南大学药学院, 长沙 410013)

**[摘要]** **目的:**观察壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位对去势雌鼠骨质疏松模型的疗效,并探讨其可能的作用机制。**方法:**选取 250 g 左右 SD 雌性大鼠 75 只,按体重随机分为模型组、假手术组、正常组、壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位组(0.12 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、壮骨止痛方组(13.2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),每组 15 只。去卵巢术后 5 d 开始给药,连续 13 周。取血和骨标本从骨密度、骨生物力学、病理形态学等几个方面研究其药效,从血清雌激素(E<sub>2</sub>)、骨钙素(BGP)、甲状旁腺素(PTH)、降钙素(CT)方面研究其作用机制。**结果:**壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位能明显增加去卵巢模型鼠股骨、腰椎骨的骨密度(P<0.05);显著提高股骨头平均骨小梁密度(P<0.01);显著增强模型大鼠胫骨的最大应力和最大抗弯强度(P<0.01);与去势模型组比较壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位明显增加子宫系数(P<0.05),能显著降低去势模型鼠血清 CT(P<0.01)。**结论:**壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位能增加模型鼠骨密度及骨最大应力和最大抗弯强度,逆转骨质疏松症的病理形态学改变。其作用机制之一可能是发挥药物自身的雌激素样作用,改善激素代谢紊乱,直接或间接调节了机体的骨代谢和细胞因子,降低了骨转换,促进骨形成,抑制骨吸收。

**[关键词]** 骨质疏松; 壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位; 疗效; 作用机制

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0147-04

## Efficacy of Ethanol Extracted Part A of Zhuanggu Zhitong Prescription for Osteoporosis in Mice

GAN Guo-xing<sup>1</sup>, MO Xin-min<sup>1\*</sup>, LI Jing-ping<sup>2</sup>, ZHANG Guo-min<sup>1</sup>, FAN Juan-juan<sup>1</sup>, LIU Shi-jie<sup>1</sup>

(1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

2. College of Pharmacy, Central South University, Changsha 410013, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of alcohol extracted part A of Zhuanggu Zhitong prescription for treatment of osteoporosis, and to explore the possible mechanism. **Method:** Seventy five female SD rats weighing about 250 g were randomly divided into control group, model group (induced by ovariectomy), sham operation group, ethanol extracted part A of Zhuanggu Zhitong prescription group (0.12 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) and Zhuanggu Zhitong prescription group (13.2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>). Five days after ovariectomy, different treatment were lasted for 13 weeks. Blood and bone samples of the rats were used to determine the bone mineral density, bone biomechanics, pathology and other aspects to evaluate the efficacy. Serum (estrone) (E<sub>2</sub>), bone gla protein (BGP), parathyroid gland (PTH), calcitonin (CT) were investigated for exploring the related mechanism. **Result:** Ethanol extracted part A of Zhuanggu Zhitong prescription showed significantly increase in femoral and lumbar bone mineral density (P<0.05); could significantly enhance the maximum stress and tibia maximum flexural strength (P<0.01);

**[收稿日期]** 20101231(006)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30873291);湖南中医药大学中医内科重点学科资助

**[第一作者]** 甘国兴,主要研究方向为中药新药开发与研究, Tel:15116383108, E-mail: guoxingg@yahoo.cn

**[通讯作者]** \*莫新民,教授,研究员,博士生导师,主要从事中医老年病学研究, Tel:0731-85539630, E-mail: moxinmin52@hotmail.com

Ethanol extracted part A had an increasing trend of serum  $E_2$  and uterine wet weight. Ethanol extracted part A could significantly increase the average trabecular bone-density of the femoral head ( $P < 0.01$ ). Ethanol extracted part A could significantly decrease the serum CT ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The ethanol extracted part A can increase the bone density, the maximum stress and the maximum bending strength. Part A may reverse osteoporosis with improved pathological evidences. The mechanism may be related to estrogen-like action of the drug with improved hormone metabolism, regulated bone metabolism and cytokines, reduced bone turnover, bone formation and inhibited bone resorption.

[**Key words**] osteoporosis; ethanol extracted part A of Zhuanggu Zhitong prescription; efficacy; mechanism

由壮骨止痛方依据中医理论结合现代药理研究研制而成的壮骨止痛胶囊,具有补益肝肾、壮骨止痛功效,能有效治疗骨质疏松症<sup>[1]</sup>,已获得国家新药证书[国药证字 Z20050125]。但是其药效成分和作用机制尚未明确,为了明确其药效成分及其作用机制,课题组用不同溶剂从壮骨止痛方药中提取了 6 个部位,本研究目的是观察壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位对去势雌鼠骨质疏松模型的疗效,并探讨其可能的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物与饲料** 3 月龄 SD 雌性大鼠 75 只、体重 250 g 左右,SPF 级(广东省医学实验动物中心提供)许可证号 SCXK(粤)2008-0002。饲料:标准普通饲料(湖南中医药大学实验动物中心提供)。

**1.2 药品与试剂** 壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位、壮骨止痛方(原材料购自九芝堂,由中南大学药学院天然药物化学系制备)、雌激素(HY-032)、PTH(HY-105)、CT(HY-085)、BGP(HY-084)SD 大鼠专用放免试剂盒(北京华英生物技术研究所)等。

**1.3 仪器** Unigamma 骨密度仪(意大利)、JY3002 型电子天平、低温离心机、LEICA DM LB<sub>2</sub> 型双目显微镜、超低温冰箱、万能力学仪、MIAS 医学图像分析系统、Motic B<sub>3</sub> 显微摄像系统、GC-1500  $\gamma$  放射免疫计数器、JEOL-1230 型透射电镜(日产)等。

## 2 方法

**2.1 分组及造模方法** 采用国内外公认的雌性大鼠去卵巢 3 个月造成绝经后骨质疏松症病理模型<sup>[1]</sup>。大鼠适应性饲养 1 周,随机分出正常组和假手术组各 15 只,除正常组外,其余的用 2% 的戊巴比妥钠( $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )麻醉,在无菌条件下摘除双侧卵巢,假手术组仅在卵巢周围切除相应质量的脂肪,去卵巢术后连续 3 d 大腿 im 青霉素,每只大鼠 4 万 u/d,饲养于室温 23 ~ 25  $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度 40% ~ 60% 的清洁

环境中,自由摄食和饮水。术后 5 d 将模型大鼠随机分为模型组、壮骨止痛方组、无水乙醇提取 A 部位组,加上假手术组和正常组,共 5 组,每组 15 只。

**2.2 给药方法** 各组均从第 5 天拆线后开始给药,ig 1 次/d,连续 13 周。除正常组、假手术组和模型组每天 ig 相应体积冷开水和油中王牌植物油,其余各组开始 ig 相应药物(水相  $6 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,油相  $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )。剂量按各药效相关物质相对壮骨止痛方的得率及大鼠体表面积折算确定。壮骨止痛方相当于生药  $13.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  为临床等效剂量的 4 倍;无水乙醇提取 A 部位  $0.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,是依据其相对壮骨止痛方生药提取的得率确定。

**2.3 指标检测** 连续 ig 13 周,每 10 d 称 1 次体重,13 周之后所有大鼠腹腔 ip 2% 戊巴比妥钠( $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )麻醉后,腹部切口,分离腹主动脉,用负压采血管采血 8 mL,静置 2 ~ 3 h,3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min 后分离血清以备放射免疫法检测相关指标。剖取左右后肢完整的股骨、胫骨及第 2 ~ 4 腰椎,去除上面附着的肌肉组织,保留骨膜,做相关检查。

**2.3.1 子宫称重** 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,用分析天平称取湿质量。

**2.3.2 血放免指标** 雌激素,PTH,CT,BGP,按试剂盒操作说明进行。

**2.3.3 骨密度检测** 取右侧股骨、T<sub>2</sub> ~ T<sub>4</sub> 腰椎骨用湿纱布包裹用湿纱布包裹,送湖南中医药大学附属第一医院骨密度室以 Unigamma 骨密度仪检测骨密度。

**2.3.4 骨生物力学检测** 取左侧胫骨,分干净肌肉,用湿纱布包裹,送国防科技大学物理系检测骨最大弹性应力、最大抗弯强度,采用三点弯曲法,跨度 16.5 mm,中间用力,速度:  $5 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

**2.3.5 骨组织病理学检测** 取左侧股骨,用 4% 的

多聚甲醛固定 48 h,然后用 5% 的硝酸脱钙 1 周,送湖南中医药大学病理检验中心检测股骨头区域的病理组织形态学变化,测量股骨颈梁髓比、股骨头平均骨小梁密度。在 400 倍光镜下通过显微形态学计算机测量骨小梁密度,每张切片取 5 个视野,取平均值。

**2.3.6 透射电镜检测右胫骨** 取材脱钙后送中南大学湘雅医学院电子显微镜室检测。

**2.4 统计方法** 数据处理采用 SPSS 16.0 统计软件进行方差分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对去势骨质疏松模型子宫湿质量的影响** 壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位有提高去势骨质疏松雌鼠子宫湿质量的趋势,没有统计学意义,但可明显

**表 1 壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位对去势骨质疏松模型子宫湿质量的影响** ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	子宫湿质量/mg	子宫系数/%
正常	-	1 000.2 ± 114.7 <sup>2)</sup>	0.28 ± 0.03 <sup>2)</sup>
假手术	-	1 045.6 ± 86.9 <sup>2)</sup>	0.31 ± 0.03 <sup>2)</sup>
模型	-	176.1 ± 7.5	0.04 ± 0.002
壮骨止痛方	13.2	467.1 ± 41.9 <sup>2)</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>2)</sup>
无水乙醇提取 A 部位	0.12	191.6 ± 13.7	0.05 ± 0.003 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

提高子宫系数( $P < 0.05$ ),见表 1。

**3.2 对去卵巢骨质疏松模型大鼠骨密度的影响** 与模型组大鼠比,壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位能明显增加去卵巢模型鼠股骨、腰椎骨的骨密度( $P < 0.05, P < 0.01$ ),见表 2。

**表 2 壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位对去势骨质疏松模型雌鼠骨密度的影响** ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	股骨密度/g·cm <sup>-2</sup>	腰椎骨密度/g·cm <sup>-2</sup>	骨小梁骨密度/mm <sup>2</sup> %
正常	-	0.369 8 ± 0.007 3 <sup>2)</sup>	0.380 8 ± 0.007 5 <sup>2)</sup>	0.890 4 ± 0.009 0 <sup>2)</sup>
假手术	-	0.338 6 ± 0.006 4 <sup>1)</sup>	0.401 6 ± 0.012 3 <sup>2)</sup>	0.896 0 ± 0.004 7 <sup>2)</sup>
模型	-	0.310 3 ± 0.008 6	0.341 8 ± 0.009 7	0.707 8 ± 0.016 0
壮骨止痛方	13.2	0.353 0 ± 0.007 8 <sup>2)</sup>	0.378 1 ± 0.012 7 <sup>1)</sup>	0.877 8 ± 0.013 5 <sup>2)</sup>
无水乙醇提取 A 部位	0.12	0.342 3 ± 0.009 8 <sup>1)</sup>	0.377 4 ± 0.010 7 <sup>1)</sup>	0.832 4 ± 0.014 1 <sup>2)</sup>

**3.3 对去卵巢雌性骨质疏松症大鼠左后支胫骨生物力学的影响** 与模型组大鼠比,壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位能够显著增强大鼠的胫骨最大应力及最大抗弯强度( $P < 0.01$ ),见表 3。

**3.4 对去卵巢雌性骨质疏松症大鼠血清 E<sub>2</sub>, BGP, PTH, CT 的影响** 与模型组比,壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位能够显著降低大鼠血清 CT 水平( $P < 0.01$ ),有降低血清 BGP, PTH 的趋势,有提高血清 E<sub>2</sub> 的去势,但没有统计学意义。见表 4。

**表 3 壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位对去势骨质疏松模型雌鼠左后支胫骨生物力学的影响** ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	胫骨最大应力 /MPa	胫骨最大抗弯 强度/MPa
正常	-	266.0 ± 10.9 <sup>1)</sup>	315.1 ± 12.2 <sup>1)</sup>
假手术	-	270.2 ± 12.9 <sup>1)</sup>	303.8 ± 8.8 <sup>1)</sup>
模型	-	227.0 ± 11.2	274.7 ± 8.7
壮骨止痛方	13.2	287.5 ± 12.1 <sup>2)</sup>	313.2 ± 8.0 <sup>2)</sup>
无水乙醇提取 A 部位	0.12	281.5 ± 7.8 <sup>2)</sup>	329.8 ± 12.6 <sup>2)</sup>

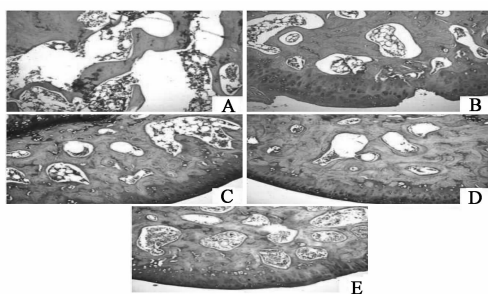
**表 4 壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位对去势骨质疏松模型雌鼠血清 E<sub>2</sub>, BGP, PTH, CT 的影响** ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	E <sub>2</sub> /ng·L <sup>-1</sup>	BGP/μg·L <sup>-1</sup>	PTH/ng·L <sup>-1</sup>	CT/μg·L <sup>-1</sup>
正常	-	4.00 ± 0.36 <sup>1)</sup>	3.67 ± 0.84 <sup>1)</sup>	2.12 ± 0.35 <sup>1)</sup>	510.17 ± 50.38
假手术	-	4.03 ± 0.30 <sup>2)</sup>	3.91 ± 0.53 <sup>2)</sup>	1.36 ± 0.17 <sup>2)</sup>	563.94 ± 44.66
模型	-	2.82 ± 0.09	7.98 ± 1.12	7.17 ± 1.41	623.00 ± 33.40
壮骨止痛方	13.2	5.81 ± 1.12 <sup>1)</sup>	4.66 ± 0.50 <sup>1)</sup>	2.20 ± 0.42 <sup>1)</sup>	505.31 ± 27.05 <sup>1)</sup>
无水乙醇提取 A 部位	0.12	3.55 ± 0.37	4.95 ± 0.90	4.06 ± 0.94	481.88 ± 22.78 <sup>2)</sup>

**3.5** 对去势骨质疏松模型雌鼠左股骨组织形态学的影响 模型组骨小梁稀疏、破坏,骨髓腔扩大,给药后,壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位组及壮骨止痛方组大鼠骨组织形态基本恢复正常,结果见图 1。

**3.5.1** 光镜检查骨小梁骨密度 与模型组比较,壮骨止痛方及无水乙醇提取 A 部位组均能显著增加骨小梁骨密度( $P < 0.05$ )。结果见表 2。

**3.5.2** 电镜检查 JEOL-1230 型透射电镜观察、照片。电镜扫描显示模型组大部分骨细胞胞核及胞浆浓缩明显,骨细胞的突起明显减少;骨陷窝椭圆形。给药后,无水乙醇提取 A 部位组骨细胞稍密集,细胞胞浆内线粒体结构正常。壮骨止痛方组骨细胞较正常,骨细胞突起无明显改变;骨陷窝明显缩小呈扁椭圆形。见图 1。



A. 模型组; B. 无水乙醇提取 A 部位  $0.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  组;  
C. 壮骨止痛方  $13.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  组; D. 正常组; E. 假手术组。

图 1 壮骨止痛方无水乙醇 A 部位对雌鼠左股骨组织形态结构的影响

#### 4 讨论

壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位是补骨脂和女贞子的提取物。杨荣平等<sup>[2]</sup>研究发现补骨脂 95% 乙醇提取物能增强成骨细胞 ALP 活性及成骨细胞的增殖活性,明显促进成骨细胞的生长及 ALP 的分泌,刺激骨形成从而发挥治疗骨质疏松的作用。王建华等<sup>[3]</sup>研究表明,补骨脂素具有明显的促进大鼠成骨细胞增殖和分化的作用。女贞子具有促成骨细胞增殖作用。秦腊梅等<sup>[4]</sup>研究发现,在促成骨细胞增殖方面,女贞子各浓度组较淫羊藿各浓度组不仅毫不逊色,反而显得作用更强。这一方面提示,以女贞子为代表的补肾阴类药物对骨质疏松症的治疗同样具有良好作用,其作用强度不仅与补肾阳药相近,甚至可能更好。

本实验中,与假手术组和空白组比较模型鼠股骨和腰椎骨密度都明显下降,差异有显著或非常显著意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );与正常组和假手术

组比较,模型组血清  $E_2$  含量明显下降( $P < 0.01$ )。而且模型组骨小梁稀疏、破坏,骨髓腔扩大,骨髓比明显下降,说明绝经后骨质疏松症病理模型复制成功。给药后,与模型组比较,壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位组及壮骨止痛方组骨密度明显增加;显微镜下观察骨小梁密度分布比较均匀,骨髓比基本恢复正常,镜下可见成骨细胞;电镜扫描显示模型组大部分骨细胞胞核及胞浆浓缩明显,骨细胞的突起明显减少;骨陷窝椭圆形。给药后,无水乙醇提取 A 部位组骨细胞稍密集,细胞胞浆内线粒体结构正常。壮骨止痛方组骨细胞较正常,骨细胞突起无明显改变;骨陷窝明显缩小呈扁椭圆形。证实壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位对骨质疏松症有良好疗效,但疗效不及壮骨止痛方。与模型组比,壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位能够非常显著降低去势骨质疏松模型雌鼠血清 CT( $P < 0.01$ )。提示壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位能降低骨转换,促进骨形成,抑制骨吸收;有提高去势骨质疏松模型雌鼠子宫湿重及血清  $E_2$  的趋势,明显增加去势骨质疏松模型雌鼠子宫系数( $P < 0.05$ )。根据实验结果和相关文献报道,作者推测壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位对去势骨质疏松模型雌鼠的作用机制之一可能是发挥药物自身雌激素样作用,一定程度上改善雌激素缺乏导致的激素代谢紊乱,直接或间接调节了机体的骨代谢和细胞因子,降低了骨转换,促进骨形成,抑制骨吸收,从而逆转去卵巢骨质疏松大鼠的骨组织病理形态学改变,增加去卵巢骨质疏松大鼠的骨密度和提高骨力学性能,降低骨折风险。

#### [参考文献]

[1] 莫新民,曾英,彭琼辉. 壮骨止痛胶囊治疗去卵巢雌鼠骨质疏松症疗效的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2007,13(3):195.  
[2] 杨荣平,寿清耀,王宾豪. 补骨脂对体外培养新生大鼠颅骨成骨细胞的影响[J]. 中国实用医药,2007(22):7.  
[3] 王建华,王艳,潘永梅. 补骨脂素对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 天然产物研究与开发,2007,19(6):844.  
[4] 秦腊梅,周丽珍,等. 4 味中药对体外培养成骨样细胞增殖的影响——对通补强骨方中主要组成药物的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(2):18.

[责任编辑 聂淑琴]