

中药坚骨液对卵巢切除后大鼠骨质疏松的影响

冯 坤 高子范 张灵菊 刘月桂

Effect of "Jiangu Ye" on experimental osteoporosis

Feng Kun, Gao Zifan, Zhang Lingju and Yaogui

(Luoyang Orthopedic-Traumatological Institute, Henan Province, Luoyang 471002, China)

Abstract In this study, the effect of "JIANGU YE" (JGY) (liquid for increasing bone density) on experimental osteoporosis was observed in aged rat models of ovarian-hormone-deficiency-induced bone loss.

Sixty 12-month-old female rats were divided into three groups: the test, control and blank groups. All animals of both test and control groups were ovariectomized but those of the blank sham-operated. The animals of the test group were given JGY through the stomach, while those of the control and blank given water.

Three months later, all indices in the three groups were observed and analysed. The results showed: (1) bone density of vertebra L₁, femur and tibia in the test group significantly higher than in the control ($P < 0.05$); (2) femur bone mineral density (BMC) and tibia bending ultimate strength of the test group significantly higher than in the control ($P < 0.05$; $P < 0.05$); and (3) unit-bone-volume content of tibial organic and inorganic matrix in the test group significantly higher than in the control ($P < 0.05$). Some biochemical indices related to bone resorption were detected. The urinary hydroxyproline of the test group was significantly lower than that of the control but higher than that of the blank; in comparison with the control, the plasma calcium level of the test group increased but the plasma phosphorus level did not change; the plasma ALP of the test group ascended but the ACP descended ($P < 0.05$).

The results suggested that JGY could inhibit the bone resorption of rat models of ovarian-hormone-deficiency-induced osteoporosis and efficaciously prevent the bone loss and bone strength reduction.

随着人口老龄化的增长,骨质疏松症已成为威胁老年人特别是绝经后妇女健康的常见疾患,也是影响人们生活质量的严重社会问题。治疗骨质疏松症的药物有多种,但都存在一些问题,如长期使用副作用大和价格昂贵等。传统医学认为,骨质疏松症属“骨萎”症,临床已有不少用中药治疗骨质疏松的报道,但对中药治疗骨质疏松进行详细的药理学研究却很少。我所根据多年筛选研究结果,研制了中药坚骨液制剂,用于实验性骨质疏松症的防治,取得良好效

果。本文仅从生化方面作的报告。

1 材料与方法

1.1 动物及造模:12月龄雌性Wistar大鼠,购自中国医科院动物研究所繁殖厂,平均体重300g(280~320g)。88只动物随机分成4组:造模空白组(简称空白组),造模对照组(简称对照组),雌激素治疗组(简称雌激素组),中药坚骨液治疗组(简称中药组)。对照组、雌激素组和中药组动物按文献方法^[1,2]摘除双侧卵巢,空白组做假手术(未切除卵巢)。

1.2 用药方法:手术1周后,中药组动物用中药坚骨液(由我所药物研究室提供,用淫羊藿、黄芪等几味中药经水提醇沉制备)灌胃,每次7ml/kg体重,每日2次。空白组、雌激素组和对照组动物用自来水灌胃。雌激素组动物隔日肌注苯甲酸雌二醇(上海第九制药厂生产)50 μ g。正常饲养4个月处死取样。

1.3 取样:所有动物停药3天后取样。(1)尿:处死前取24小时全尿,测定总尿钙(Ca)、磷(P)、肌酐(Cr)和羟脯氨酸(Hop)。(2)血浆:用戊巴比妥腹腔注射麻醉动物,取肝静脉血,肝素抗凝,置于冰水浴中,冷冻离心分离血浆,立即测定钙、磷、碱性磷酸酶(ALP)和酸性磷酸酶(ACP)。(3)骨标本:取股骨、L₁、胫骨,剔尽附着的软组织,4 $^{\circ}$ C保存。

1.4 分析方法:(1)血生化分析:血浆钙采用邻甲酚酞络合酮法,反应温度25 $^{\circ}$ C、波长570nm;血浆磷采用磷钼酸法,反应温度25 $^{\circ}$ C,波长340nm。钙、磷试剂盒均为北京中生生物工程高技术公司产品。血浆ALP、ACP采用对硝基苯磷酸二钠基质测定法^[5],酶活性单位为金氏单位。(2)尿生化分析:用碱性苦味酸盐法测定尿肌酐(Cr);用GBHA显色法^[3]测定尿钙(Ca);用氯氨-T氧化法^[4]测定尿羟脯氨酸(Hop)。(3)骨样分析:按文献^[6]方法,采用Archimedes原理测定骨标本体积后,室温真空干燥至恒重,用十万分之一分析天平称重,计算出骨密度。用

双能X线骨密度仪测定股骨骨矿密度。用三点弯曲法测定胫骨中段弯曲极限强度。样品用氯仿:甲醇=2:1作溶剂,用soushx提取器回流脱脂48小时,真空干燥后称重。再用10%三氯醋酸抽提脱脂骨的无机盐,真空干燥脱钙骨,称重,即为骨有机质重量。用6N HCl 100 $^{\circ}$ C消化骨有机质4小时。取一半消化液用改良Elson法^[6]测定氨基己糖,剩余一半在108 $^{\circ}$ C条件下继续消化16小时,用Newman^[7]法测定羟脯氨酸。测定股骨骨密度后,干燥,准确称重。用电感藕合等离子体发射光谱法测定骨中无机元素含量。(4)分析仪器:HP8452A紫外可见分光光度计(美国);RD-20IV高速冷冻离心机(日本);DPX型双能X线骨密度仪(美国);ICP-AE3电感藕合等离子体直读光谱仪(美国);Mettler H54AR十万分之一分析天平(瑞士);测力计(中国)。氨基己糖标准试剂为ACTUER公司产品,羟脯氨酸标准试剂为中科院上海生化所产品。分析试剂均为分析纯。

2 结果

骨密度及骨强度:各组动物L₁、胫骨、股骨骨密度测定结果见表1。对照组均明显低于空白组($P < 0.01$),表明造模成功;中药组和雌激素组骨密度及骨强度均高于对照组($P < 0.01$),表明中药坚骨液和雌激素对实验性骨质疏松有明显抑制作用。

表1 各组动物骨密度和骨强度测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	L ₁ 椎体密度	胫骨密度	股骨密度	胫骨强度
空白	1.038 \pm 0.07**	1.314 \pm 0.03**	1.260 \pm 0.06**	147.14 \pm 32.58**
对照	0.960 \pm 0.06	1.263 \pm 0.04	1.192 \pm 0.06	113.65 \pm 23.53
激素	1.046 \pm 0.07**	1.354 \pm 0.05**	1.300 \pm 0.07**	149.38 \pm 26.00**
中药	1.041 \pm 0.09**	1.335 \pm 0.04**	1.253 \pm 0.05**	135.00 \pm 29.00*

注与对照组比较($P < 0.05$, $P < 0.01$);下表同

血、尿样分析:空白组血浆钙、磷、ALP与对照组比较,差别均无显著意义($P > 0.05$),血浆ACP活性低于对照组,有显著意义($P < 0.05$)。中药组和雌激素组血浆钙高于对照组($P < 0.05$),血浆磷高于对照组但无统计学意

义($P > 0.05$),血浆ALP活性低于对照组,但无统计学意义,血浆ACP活性明显低于对照组,有显著差别($P < 0.05$),见表2。对照组动物24小时尿肌酐、钙和羟脯氨酸量均高于其它三组($P < 0.01$),但钙/肌酐、羟脯氨酸/肌酐比值

仅与雌激素组有差别,结果见表3。

表2 各组动物血浆生化指标测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	Ca(mmol/L)	P(mg/L)	ACP(u/L)	ALP(u/L)
空白	1.93±0.42	31.71±10.21	3.13±0.57*	8.43±2.43
对照	2.02±0.37	37.73±12.91	3.71±0.74	9.70±2.38
激素	2.25±0.13*	38.30±9.60	2.29±0.45*	0.66±1.80
中药	2.31±0.12*	41.16±17.63	3.13±0.61*	8.73±1.88

表3 尿肌酐(Cr)、钙(Ca)及羟脯氨酸(Hop)含量测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	Cr(mg)	Ca(mg)	Hop(μ g)	Ca/Cr	Hop/Cr
空白	5.49±1.78*	0.62±0.31*	91.11±35.55**	0.11±0.05	18.73±6.75
对照	6.36±1.55	0.99±0.48	144.40±32.44	0.14±0.08	22.66±5.66
激素	5.25±1.57*	0.42±0.24**	89.63±34.56**	0.08±0.05*	17.85±6.76*
中药	5.27±1.68*	0.66±0.40*	118.40±24.02*	0.12±0.06	21.37±4.81

骨基质:即单位体积中有机质和无机质含量,对照组胫骨中有机物和无机物含量均低于空白组($P < 0.01, P < 0.01$),雌激素和中药组含量均高于对照组($P < 0.01$),而与空白组含量相近($P > 0.05$);对照组L₃椎体骨中有机质

和无机质含量低于空白组($P < 0.01, P < 0.01$),中药组有机质含量与对照组无差别,无机质含量高于对照组而低于空白组,均有统计意义($P < 0.01$)。结果见表4。

表4 各组动物骨有机质和无机质测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	有机质(mg/cm ³)		无机质(mg/cm ³)	
	胫骨	椎体	胫骨	椎体
空白	343.5±16.5**	296.8±18.9**	893.8±44.8**	691.9±61.1**
对照	334.1±11.4	284.3±12.2	820.9±37.4	603.6±43.5
激素	357.1±15.8**	292.6±17.1**	907.1±61.6**	702.8±67.7**
中药	351.4±16.3**	288.1±17.0	872.6±41.3**	661.2±39.8**

羟脯氨酸和氨基己糖,对照组胫骨单位体积内羟脯氨酸含量与空白组、中药组相比均无统计学差别($P > 0.01$),而对照组L椎体羟脯氨酸含量低于空白组、激素组与中药组,有统计学差别($P < 0.01$)。胫骨氨基己糖测定结果表

明,对照组低于空白组、激素组和中药组,仅与激素组和中药组有统计差别($P < 0.01$);L椎体氨基己糖含量测定结果是各组间均无差别($P > 0.05$)。结果见表5。

表5 各组动物骨羟脯氨酸和氨基己糖含量测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	羟脯氨酸(μ g/cm ³)		氨基己糖(μ g/cm ³)	
	胫骨	椎体	胫骨	椎体
空白	29.61±1.92	26.04±3.09**	2.83±0.23	2.27±0.23
对照	28.43±1.24	23.16±3.25	2.68±0.26	2.23±0.46
激素	29.51±1.22	27.48±1.73**	2.98±0.26**	2.13±0.21
中药	28.84±1.73	27.18±2.69**	2.93±0.31**	2.23±0.19

骨钙磷含量:对股骨钙、磷含量分析结果表明,对照组股骨单位体积内所测定钙、磷含量均显著低于空白组($P < 0.05$),用药组含量均显著高于对照组($P < 0.05$)而与空白组相近。结果见表6。

表6 骨中钙、磷元素的测定($\bar{x} \pm s$)

组别	钙(mg/cm ³)	磷(mg/cm ³)
空白	259.81 ± 19.98*	140.81 ± 9.48*
对照	227.50 ± 24.88	127.17 ± 10.38
激素	274.00 ± 37.05*	144.21 ± 11.81*
中药	263.29 ± 22.11*	138.35 ± 7.79*

3 讨论

妇女绝经或卵巢切除后,由于体内雌激素水平降低,而使骨代谢呈负平衡状态——骨吸收相对增强,骨量逐步丧失,形成骨质疏松^[9]。目前常用卵巢切除的办法造成具有类似骨质疏松骨丧失现象的雌性大鼠模型为研究对象来进行骨质疏松的研究。从本文测定的大鼠L₃、胫骨、股骨骨密度结果来看,切除卵巢4个月后,动物骨骼已出现骨密度明显下降,对照组动物骨密度指标均低于空白组,差别具有统计学意义,说明用这种方法建立的骨质疏松模型成功。骨强度是指骨组织抵抗破坏的能力。骨强度的大小与骨折发生的危险性相关。有人测定骨质疏松大鼠股骨皮质骨厚度和其抗弯力,发现造模动物骨皮质变薄,抗弯力降低。我们对大鼠胫骨进行强度测定,结果也表明,对照组大鼠胫骨强度极度下降,说明动物去势4个月已明显出现了骨力学性能改变,抗外力能力减退。雌激素和中药坚骨液对这种强度下降有明显的阻抑作用。

血钙受多种内分泌激素调节而处于平衡状态。临床检查绝经妇女的血钙虽然有增加的倾向,但多在正常范围内波动。实验研究^[9]也指出,去势不影响血钙的水平。本文报告有相同结果。雌激素能够促进肾脏1 α -hydroxylase活性,增加肠道钙的吸收,使血钙略有上升。本文实验结果也表明,雌激素提高了模型动物的血钙水

平。经中药坚骨液治疗后的去势动物血钙也有升高现象,基于本文骨密度和血浆ACP测定结果,我们认为可能是坚骨液一方面提供了生物性可吸收性钙,另一方面又促进了肠钙吸收的结果,而不是骨吸收增强引起。体内磷85%存在与骨中,其主要作用是促进骨基质的合成和骨矿沉积。血浆无机磷的水平影响骨吸收速率。血磷的稳定是骨生长和矿化的必要条件^[10]。临床和实验研究都表明,雌激素水平低下对血磷影响不大^[3]。本文实验结果也有相同的结论。成骨细胞含有丰富的碱性磷酸酶,后者在骨钙化区水解磷脂,释放的磷酸根与钙以沉淀的方式沉积在胶原骨架上,发生骨矿化作用。成骨活跃时成骨细胞分泌了大量碱性磷酸酶,一部分参与骨的钙化,一部分释放到血液中,使血中酶活性升高。血清(血浆)中约50%碱性磷酸酶来源于骨,另一半来源于肝,极少量的碱性磷酸酶来源于小肠和胎盘。血清(血浆)ALP活性可以反映成骨细胞活跃情况。临床研究表明,绝经后骨质疏松症妇女,血清碱性磷酸酶活性比正常妇女高40%。实验研究也证明,去势后动物血碱性磷酸酶活性升高^[5]。一般认为这种血ALP的升高是伴随着骨吸收亢进而出现的代偿性骨形成增强引起的。所以,采用破骨抑制疗法治疗绝经后骨质疏松时,患者血清(血浆)碱性磷酸酶活性下降,采用成骨疗法治疗时血碱性磷酸酶活性升高。有报道应用尼尔雌醇可以降低模鼠血碱性磷酸酶活性,但在本研究中发现,雌二醇对模鼠血碱性磷酸酶活性影响不大,但不明显。所以,坚骨液治疗骨质疏松症的机理是否与成骨刺激有关目前尚没有直接的证据。

酸性磷酸酶主要存在于骨、前列腺、红细胞、血小板和脾脏中。血清ACP活性远高于血浆是由于在凝血过程中血小板内ACP释放入血所致。因此,我们采用雌性动物血浆,排除了前列腺、红细胞、血小板内ACP因素的影响,此时血浆ACP主要来源于骨。骨性ACP由破骨细胞释放,在骨吸收时对骨基质的溶解起重要作用,当骨吸收活跃时,反映在血中酶活性升高。有材料表明^[11],绝经后妇女患者血清ACP

较正常人高,与尿钙(Ca)、尿羟脯氨酸(Hop)呈正相关。雌激素通过降低甲状旁腺激素水平刺激降钙素分泌来抑制骨吸收、降低 ACP 活性。本文结果也表明去势动物血浆酸性磷酸酶明显增高,而经过雌激素和坚骨液治疗后动物酸性磷酸酶下降,说明中药坚骨液维持模鼠骨量的作用主要是通过抑制骨吸收而不是促进骨形成的方式来实现的。

尿钙的测定对骨矿代谢的研究有很重要的价值。尿钙是肠道钙吸收、骨钙溶解、肾小球滤过和肾小管重吸收多种生理生化过程的最后结果。24 小时尿钙测定对临床评价钙平衡有重要意义。但分析 24 小时尿钙时,饮食钙摄入量对测定值影响很大,因而临床 24 小时尿钙测定难以准确反映骨吸收的状态而不被应用。本文采取动物连续禁食方法收集 24 小时尿样进行分析,完全消除了饮食的影响,总尿钙基本上反映了骨吸收的状态。雌二醇通过抑制骨吸收降低了总尿钙。中药坚骨液治疗的动物尿钙排出量明显减少,表明坚骨液在抑制骨吸收上有明显的作用。

有人研究绝经后骨质疏松妇女的尿羟脯氨酸与骨吸收率正相关^[12]。雌激素通过抑制骨吸收使骨胶原水解降低,减少尿羟脯氨酸的排出量。根据本报告的数据统计结果,对照组动物 24 小时尿 Hop 量增加,说明造模后动物骨胶原分解加快,骨吸收增强。中药坚骨液同雌激素一样明显地抑制了模鼠的骨胶原分解,但作用强度弱于雌激素。

许多研究表明^[11],临床检查骨质疏松患者的尿 Ca/Cr、Hop/Cr 值高于正常人,在动物实验中也发现同样规律^[9]。引进肌酐指标的意义是校正尿量,但在本实验中发现,对照组尿总肌酐排出量高于其它组相近 20%,伴随尿 Ca、Hop 的升高,其 Cr 也升高,这样就降低了 Ca/Cr、Hop/Cr 指标在评价骨吸收时的准确性和灵敏性。除雌激素治疗组以外,空白组的正常动物及对维持骨量有明显作用的坚骨液组动物没有表现出在尿 Ca/Cr、Hop/Cr 指标上与对照组的差别,这就提示我们,卵巢切除不仅引起内分泌

泌失调,钙、磷及胶原代谢紊乱,而且对整个机体的吸收与排泄功能也有影响,在采用尿 Ca/Cr、Hop/Cr 指标时应全面考查影响尿肌酐的因素,以准确敏感地评价骨代谢。

本文测定结果表明,造模后,动物骨基质量均明显下降。中药坚骨液能明显抑制模型动物胫骨、L₃ 的骨基质丧失,但作用强度低于雌激素。

羟脯氨酸是骨胶原的生化标志物,在胶原中的含量约为 13.4%。测定羟脯氨酸的含量可计算出胶原的含量。骨有机质非胶原蛋白中以糖-蛋白质复合物为主,约占有机质的 10%,与骨的钙化和形成有密切关系。测定样品中的氨基己糖可以观察糖蛋白复合物含量变化。本研究表明,造模对松质骨的胶原代谢、对密质骨的糖蛋白复合物影响较大,中药坚骨液也是在这里起到平衡或抑制作用,使造模动物骨胶原和糖蛋白复合物恢复到正常。详细的机制目前尚不清楚。

骨无机物中钙、磷的量反映骨中羟基磷灰石的含量。破骨细胞首先移去矿物质,随后进行骨胶原分解。所以骨质疏松时表现为明显的骨矿溶解和骨钙含量下降。本实验中空白组动物股骨钙、磷含量严重降低,说明造模后动物出现骨矿丢失问题,而使用中药的动物没有出现严重的骨钙、磷丢失。雌激素和中药坚骨液能明显抑制骨矿的溶解和丢失。

参考文献

- 1 Kalu DN, et al. Evaluation of the pathogenesis of skeletal changes in ovariectomized rats. *Endocrinol*, 1984, 115: 507
- 2 Tabuchi C, et al. Bone defect in ovariectomized rats. *J Clin Invest*, 1986, 78: 633
- 3 上海市医学化验所. 临床生化检验(上). 上海科学技术出版社, 1979, 109, 222.
- 4 Stegemann H, et al. Determination of hydroxyproline. *Chm Chem Acta*, 1966, 18: 267.
- 5 Kalu DN, et al. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology*, 1989, 124: 7
- 6 Elson FE. Method for the determination of hexosamines in tissues. *J Biol Chem*, 1953, 204: 553.
- 7 Newman RF, et al. The determination of hydroxyproline. *J Biol Chem*, 1950, 184: 299.

(下转第 42 页)

- velopment of osteoporosis. J Biomech, 1973, 5:477.
- 10 Martin RB, et al. Age and sex related changes in the structure and strength of the human femoral shaft. J Biomech, 1977, 10: 215.
- 11 Cowin SC. Mechanical modeling of the stress adaptation process in bone. Calcif Tissue Int, 1984, 36: 98.
- 12 Rubin CT. Skeletal strain and the functional significance of bone architecture. Calcif Tissue Int, 1984, 36: s11.
- 13 Rubin CT, Lanyon LE. Regulation of bone formation by applied dynamic loads. J Bone Joint surg, 1984, 66: 397.

(上接第 45 页)

3 讨论

临床资料表明,在骨质疏松患者中并发骨质增生较多见。骨质疏松是一种全身性骨代谢疾病^[1],而骨质增生是由于劳损、应力以及骨代谢异常等多种原因引起的骨骼疾病,二者具有同样的激素基础。老年人甲状腺分泌过盛,降钙素分泌也明显增加,前者促进骨破坏,后者促进骨形成。降钙素的分泌增加是对甲状腺分泌过盛的代偿,而骨质增生也是对骨质疏松的一种代偿^[4,5]。我们的测定结果也证实了这一点,三个疾病组的碱性磷酸酶和尿钙、尿磷均高于对照组,骨质增生组和骨质疏松与增生并存组虽然存在着明显的失骨现象,但不如单纯骨

质疏松组严重。碱性磷酸酶的增高,主要表现成骨细胞活跃而部分患者合并骨软化。我们认为骨质疏松和骨质增生都是骨代谢紊乱所致,骨质疏松是骨质增生的主要诱因之一,同时提示骨质增生的临床治疗应强调骨代谢的调整。

参考文献

- 1 朱宪彝主编. 代谢性骨病学. 第 1 版, 天津科学技术出版社, 1989, 262~300.
- 2 王劼, 刘建立, 张全, 等. 老年骨代谢改变及其与雌激素的关系. 中华老年医学杂志, 1992, 11(5): 259.
- 3 朱爱军, 姚舜华, 林仙芝. 绝经后骨质疏松症. 颈腰痛杂志, 1994, 15(1): 13.