

骨疏康冲剂与钙剂联合应用防治 维甲酸所致大鼠骨质疏松的实验研究

崔少千 王海义 李书琴 张云岐 裴著果

摘要 目的 探讨骨疏康冲剂与钙剂联合应用防治维甲酸所致大鼠骨质疏松的疗效。**方法** 选用3~4月龄Wistar大鼠60只,随机分为正常对照组、模型组、骨疏康组、钙组和骨疏康加钙组。除正常对照组外,给其他各组灌服维甲酸($70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)2周,同时用药各组分别灌服骨疏康冲剂($8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、高效钙($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、骨疏康冲剂($8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)加高效钙($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。实验第4周末处死大鼠,测定股骨骨密度;取胫骨上段制作脱钙切片,进行骨组织形态观察;取股骨行三点弯曲试验,测骨生物力学性能指标。**结果** 模型组与正常组比较,股骨骨密度降低($P < 0.05$),胫骨上段骨组织形态发生典型骨质疏松改变,股骨生物力学性能降低($P < 0.05$)。骨疏康加钙组与模型组比较,股骨骨密度增高($P < 0.05$),胫骨上段骨组织病理变化明显改善,股骨生物力学性能增强($P < 0.05$)。**结论** 骨疏康冲剂与钙剂联合应用有防治骨质疏松症的作用,能提高骨的抗变形、抗破坏能力,从而降低骨折发生的危险性。

关键词 骨疏康冲剂 骨质疏松症 大鼠 骨密度 生物力学

Prevention and treatment of osteoporosis in rats induced by retinoic acid with Gushukang combined with calcium

Cui Shaoqian, Wang Haiyi, Li Shuqin, et al

Department of Orthopedics, No. 2 Clinical College, China Medical University, Shengyang 110003, China

Abstract Objective To study the therapeutic results of Gushukang (GK) combined with calcium in preventing and treating osteoporosis induced by retinoic acid in rats. **Method** 60 Wistar rats aged 3-4 months were randomly divided into five groups: control group, model group, GK group, Ca group and GK+Ca group. Except the control group, the other groups were given retinoic acid $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ by gastrogavage for 2 weeks. Meanwhile, the GK group was fed GK $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, the Ca group calcium $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, and the GK+Ca group GK $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and calcium $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 4 weeks. At the end of the 4th week, all rats were sacrificed. The femur bone mineral density (BMD) was measured. Three-point bending test was carried out for the measurement of the femur biomechanical properties. Proximal tibiae were decalcified for histomorphological observation. **Result** Compared with the control group, the femur BMD and biomechanical properties in the model group markedly decreased ($P < 0.05$); the tissue microstructure of the proximal tibiae showed obvious pathological changes of osteoporosis. In the GK+Ca group, compared with the model group, the femur BMD and biomechanical properties markedly increased ($P < 0.05$); the pathological changes of the proximal tibiae tissue mi-

本课题为“九五”国家科技攻关计划资助项目之一

作者单位:110003 沈阳,中国医科大学第二临床学院骨科(崔少千、王海义、张云岐),核医学科(裴著果),儿科研究所(李书琴),裴著果为本课题负责人

crostructure significantly improved. **Conclusion** GK combined with calcium is effective in preventing and treating osteoporosis, improving bone biomechanical properties and reducing the risk of fracture.

Key words Gushukang Osteoporosis Rat Bone mineral density Biomechanics

目前国内外防治骨质疏松症的药物(西药)种类颇多,但大多不能有效地增加骨量,降低骨折的发生率,而且副作用多、价格贵等诸多因素限制着它的广泛应用。中医学是我国的医学宝库,应用中药防治骨质疏松症有着广阔的发展前景。骨疏康冲剂就是根据中西医结合理论研制的一种旨在治疗骨质疏松症的药物,主要是由枸杞子、黄芪、熟地黄等中药组成。本实验采用给大鼠灌服大剂量维甲酸的方法建立骨质疏松模型,联合应用骨疏康冲剂与钙剂进行防治,研究其疗效并初步探讨其作用机理。

1 材料和方法

1.1 药物:骨疏康冲剂由辽宁中医研究院提供;维甲酸购自重庆华邦制药有限公司,批号为(95)卫药 X-140 号;高效钙粉购自北京多元医药研究所,生产许可证:京许证字第 039 号,每克钙粉含钙 400 毫克。配制成一定浓度的药物混悬液置于 4℃ 冰箱中避光保存备用。

1.2 实验动物:本实验选用体重 173~242g, 平均(208.5±18.3)g, 3~4 月龄 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 由中国医科大学第二临床学院实验动物部提供, 为一级实验动物, 合格证号:辽实动字第 004 号。饲料购自沈阳市实验动物饲料厂, 产品标准代号:DB-21-741-93。

1.3 仪器:XR-36 双能 X 射线骨密度测定仪(美国 Norland 公司);Olympus 光学显微镜(日本产);CSS-1101C 电子万能试验机(长春试验机研究所)。

1.4 动物分组及处理:将 60 只大鼠随机分成 5 组, 每组 12 只, 雌雄各半, 组间体重无统计学差异($P>0.05$)。分别设为正常对照组(CON), 模型组(MOD), 骨疏康冲剂防治组(GK), 钙剂防治组(Ca), 骨疏康冲剂、钙剂联合应用防治

组(GK+Ca)。所有动物饲养条件一致, 自由摄食、饮水。除 CON 组, 其他 4 组予以维甲酸 $70\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃, 连续 2 周后停用。给予维甲酸同时, GK 组予以骨疏康冲剂 $8\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃, Ca 组予以高效钙 $75\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃, GK+Ca 组予以骨疏康冲剂 $8\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 加高效钙 $75\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃, 连续用药 4 周。

1.5 标本采取:实验于第 4 周末结束, 以腹主动脉放血法处死大鼠。取右胫骨置于 70%乙醇中固定。取右侧股骨置于 4℃ 冰箱内保存。

1.6 股骨骨密度测定:用 XR-36 双能 X 射线骨密度测定仪测量大鼠右侧股骨骨密度(BMD)。条件设定:步距 $0.5\text{mm} \times 0.5\text{mm}$, 扫描速度 30mm/s 。

1.7 胫骨上段组织形态观察:取右胫骨上段, 固定于 70%乙醇中, 然后用 5%甲酸进行脱钙, 常规石蜡包埋, HE 染色, 光学显微镜下观察胫骨干骺端组织形态。

1.8 股骨生物力学指标的测定:取大鼠右侧股骨, 去除软组织, 在 CSS-1101C 电子万能试验机上进行三点弯曲试验, 试验参数设定:跨度 22mm, 载荷范围 0~200N, 试验速度 5mm/min , 数据跟踪方式载荷-挠度, X-Y 记录仪绘出载荷-挠度曲线, 用显微镜和网格测微尺测定断裂处截面的几何尺寸。根据试验所得载荷-挠度曲线及截面几何数据计算生物力学指标, 计算公式如下^[1,2]:

$$\text{截面惯性矩 } J = \pi(BH^3 - bh^3)/64$$

$$\text{截面模量 } W = \pi(BH^3 - bh^3)/32H$$

$$\text{刚性系数 } E_J = P_p L^3 / 48\delta_p$$

$$\text{弹性模量 } E = E_J / J$$

$$\text{弯矩 } M_{\max} = P_{\max} L / 4$$

$$\text{极限强度 } \sigma_{\max} = M_{\max} / W$$

公式中符号的意义如下:

B、H、b、h 分别为空心椭圆截面的内外长短径(mm)

L 为跨度(mm)

P_p 为比例载荷(N)

δ_p 为比例挠度(mm)

P_{max} 为最大载荷(N)

1.9 统计学处理:各组大鼠所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组均数之间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果

2.1 各组大鼠右侧股骨骨密度的比较(见表1)。MOD 组骨密度显著低于 CON 组($P < 0.05$)。表明给大鼠灌服维甲酸可造成骨量丢失,使大鼠骨密度降低。GK 组、Ca 组骨密度略

高于 MOD 组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明单纯应用骨疏康冲剂或钙剂,未能防止骨量丢失使骨密度维持于正常水平。GK+Ca 组骨密度显著高于 MOD 组($P < 0.05$),甚至超过 CON 组($P > 0.05$)。表明骨疏康冲剂与钙剂联合应用,可防止骨量丢失甚至增加骨量,从而使大鼠骨密度维持甚至高于正常水平。

表1 各组大鼠右侧股骨骨密度的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	骨密度(g/cm^3)
CON	10	0.1314 ± 0.0058
MOD	10	$0.1239 \pm 0.0053^{\#}$
GK	8	0.1255 ± 0.0086
Ca	10	0.1276 ± 0.0104
GK+Ca	10	$0.1361 \pm 0.0072^*$

注: # 表示与 CON 组比较 $P < 0.05$; * 表示与 MOD 组比较 $P < 0.05$

表2 各组大鼠右侧股骨生物力学性能指标的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 n	最大载荷 P_{max} (N)	刚性系数 EJ ($\times 10^4 N \cdot mm$)	极限强度 σ_{max} (N/mm^2)	弹性模量 E ($\times 10^4 N/mm^2$)
CON	10	64.77 ± 6.20	6.37 ± 0.89	98.58 ± 6.70	1.13 ± 0.12
MOD	10	$58.22 \pm 7.48^{\#}$	$5.09 \pm 0.6^{\#}$	$89.34 \pm 11.62^{\#}$	$0.91 \pm 0.11^{\#}$
GK	8	52.10 ± 3.61	5.21 ± 0.89	80.84 ± 6.91	0.95 ± 0.19
Ca	10	58.20 ± 6.58	5.38 ± 0.90	88.33 ± 5.64	0.96 ± 0.19
GK+Ca	10	$66.09 \pm 4.27^*$	$6.45 \pm 1.01^*$	$99.92 \pm 7.09^*$	$1.13 \pm 0.15^*$

注: # 表示与 CON 组比较 $P < 0.05$; * 表示与 MOD 组比较 $P < 0.05$

2.2 各组大鼠右股骨生物力学性能指标的比较(见表2),MOD 组最大载荷、刚性系数、极限强度、弹性模量等指标显著低于 CON 组($P < 0.05$)。表明给大鼠灌服维甲酸,可导致大鼠股骨生物力学性能的降低。GK、Ca 组各项指标与 MOD 组差异无显著性($P > 0.05$)。表明单纯应用骨疏康冲剂或 Ca 剂,并未改善大鼠股骨生物力学性能。

GK+Ca 组最大载荷、刚性系数、极限强度、弹性模量等指标显著优于 MOD 组($P < 0.05$)。表明骨疏康冲剂与钙剂联合应用,可明显改善大鼠股骨生物力学性能。

2.3 观察大鼠右胫骨上段干骺端组织形态学改变。CON 组骨小梁密集,排列整齐。MOD 组骨小梁稀疏,排列紊乱,骨小梁变细,呈典型的骨质疏松改变。GK、Ca、GK+Ca 组都存在类似 MOD 组的病理改变,但程度轻,GK+Ca 组病变程度最轻,接近于 CON 组。

3 讨论

有报道,给大鼠每日维甲酸 $70mg \cdot kg^{-1}$ 灌胃,2 周后即可建立骨质疏松模型^[3]。骨质疏松症是以骨量减少为特征,骨组织显微结构改变,骨折危险频度增加的一种系统性骨骼疾病^[4]。本实验采用此方法,结果表明给大鼠服用维甲

酸2周后,骨密度降低,骨量减少,骨组织显微结构发生了典型的骨质疏松改变,骨生物力学性能降低,外力作用下易发生骨折,说明大鼠骨质疏松症模型已复制成功。

本实验中单纯应用骨疏康冲剂或钙剂对大鼠骨质疏松症进行防治,未能有效地防止骨量丢失,骨组织显微结构仍呈骨质疏松病理改变,骨生物力学性能无改善,防治效果不理想。然而二者联合应用,却有效地防止了骨量丢失,甚至增加了骨量,使骨组织显微结构基本恢复正常,骨生物力学性能显著提高,说明骨疏康冲剂与钙剂联合应用具有协同作用,可以有效地防治骨质疏松症,提高骨的抗变形、抗破坏能力,从而降低骨折发生的危险性。由此可见,骨疏康冲剂对骨质疏松症的防治作用与钙的摄取有着密切关系。

钙是构成骨矿物质的重要成分。骨质疏松症是由很多因素引起的,但与钙代谢异常,特别是钙摄取量不足有着密切的关系。有流行病学研究表明钙摄取量少的地区骨质疏松症的发生率及其骨折发生率显著高于钙摄取量多的地区^[5]。当钙摄入不足或钙吸收功能低下使机体缺钙时,可继发引起甲状旁腺激素(PTH)分泌增多,使骨吸收亢进,长期缺钙将导致骨量丢失,发生骨质疏松症。补钙可以补充骨钙量,并能抑制因缺钙继发的甲状旁腺激素分泌亢进而引起的骨吸收。钙剂是骨质疏松症治疗中应用最广泛的药物^[6]。但Stevenson等认为单纯补钙对骨量无影响,不能降低骨折的发生率^[7]。因

此目前大多数学者主张将钙剂作为辅助治疗药物与其他治疗药物联合应用。本实验单纯应用钙剂未能有效地防止骨量丢失及降低骨折发生的危险性,这一结果支持了Stevenson的观点。骨疏康冲剂与钙剂联合应用防治骨质疏松症取得了理想效果,因此考虑骨疏康冲剂可能具有调节钙代谢,促进钙吸收、利用等作用。

至于本实验中单纯应用骨疏康冲剂防治效果不理想,除了考虑与钙摄入不足有关外,还考虑与用药时间过短有关,因为骨质疏松症的治疗应该是一个长期的过程。在今后的实验中,应适当延长治疗时间,以观察其长期疗效。

参 考 文 献

- 1 王以进,王介麟编. 骨科生物力学. 北京:人民军医出版社,1989,176-181.
- 2 Ferretti JL, Conry G, Capozza R, et al. Biomechanical effects of the full range of useful doses of APD on femur diaphyses and cortical bone tissue in rats. *Bone Miner*, 1990, 11:111.
- 3 邵金莺,尹钟株,许哲,等. 龙牡壮骨药对大鼠实验性骨质疏松的影响. *中药药理与临床*, 1989, 5(4):25.
- 4 Consensus development conference. Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med*, 1993, 94:646.
- 5 Matkovic V, Kostial K, Simonovic I, et al. Bone status and fracture rates in two regions of Yugoslavia. *Am J Clin Nutr*, 1979, 32:540.
- 6 Heaney RP. Bone mass, nutrition, and other lifestyle factors. *Am J Med*, 1993, 95:29s.
- 7 Stevenson JC, Whitehead M1, Padwick M, et al. Dietary intake of calcium and postmenopausal bone loss. *Br Med J*, 1988, 297:15.