

· 药物研究 ·

强骨颗粒剂对去卵巢大鼠骨生化药理作用的探讨

马永洁 刘春梅 孙丽萍 孙承琳

【摘要】 目的 观察中药制剂强骨颗粒剂防治去卵巢所致骨质疏松大鼠的疗效,探讨其生化药理作用。**方法** 30只雌性 Wistar 大鼠,分为模型组(去卵巢),假手术组(行假手术)、强骨颗粒(QGKL)组3组。观察了强骨颗粒对大鼠骨密度,血清骨钙素(S-BGP),骨中水含量,骨灰重,子宫指数(子宫重量/体重)和肾脏指数(肾脏重量/体重),红细胞和肾线粒体膜 Ca^{2+} -ATPase 活性、膜流动性的影响。**结果** 与去卵巢组比较,强骨颗粒可升高大鼠骨密度,抑制血清 BGP 升高,增加骨中水含量,增加肾脏指数、 Ca^{2+} -ATPase 活性和膜流动性。**结论** 强骨颗粒剂对去卵巢大鼠的骨质疏松有明显的防治作用,作用途径可能通过全身多方面的整体调节。

【关键词】 骨质疏松症; 去卵巢; 大鼠; 骨密度; 红细胞膜; 肾线粒体膜; Ca^{2+} -ATPase

Studies on bone biochemical pharmacology of Qiang Gu granules in ovariectomized rats. MA Yongjie, LIU Chunmei, SUN Liping, et al. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China.

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of Qiang Gu granules, a Chinese medicinal herbal preparation, on BMD and study the bone biochemical pharmacology of this preparation in ovariectomized Wistar rats. **Methods** Thirty 6-month-old female Wistar rats were randomly divided into three groups: the ovariectomized (OVX), the sham-operated, and the OVX plus administration of Qiang Gu granules (OVX + QG). BMD, serum osteocalcin (BGP), water content in femur, bone ash weight, uterine and renal weights, Ca^{2+} -ATPase activity and membrane fluidity of erythrocytes and kidney mitochondria were determined at the end of the experiment. **Results** Qiang Gu granules significantly increased BMD, water content in femur, bone ash weight, kidney weight/body weight ratio, Ca^{2+} -ATPase activity and membrane fluidity, while decreased the level of BGP in OVX + QG rats, compared with OVX group. **Conclusions** Qiang Gu granules can prevent and treat osteoporosis induced by ovariectomy. It improves the cell function by whole body regulation.

【Key words】 Osteoporosis; Ovariectomy; Rat; Bone mineral density; Erythrocyte membrane; Kidney mitochondria; Ca^{2+} -ATPase

强骨颗粒剂是由淫羊藿、党参等五味中药组成的纯中药制剂,是我校附属医院妇科专用防治绝经后骨质疏松症的验方。特点是补肾兼顾健脾,因肾为先天,脾为后天,健脾为补肾提供源泉,可增加补肾功效。我们前期实验已证明本方可明显防治去卵巢大鼠骨质疏松,疗效与尼尔雌醇接近,且以成人用药12倍量疗效最佳。本实验进一步验证了强骨颗粒剂的疗效,并探讨了其生化药理作用,以深入了解中药的多方面作用环节。

材料和方法

1. 实验动物

作者单位: 100094 北京 5104 信箱 13 室(马永洁),北京中医药大学中西医结合研究所(刘春梅、孙丽萍、孙承琳)

雌性 Wistar 大鼠,体重 250~280g,由中国医学科学院实验动物研究所繁育场提供,合格证号:医动字 01-3008 号。

2. 实验药物

强骨颗粒剂 由本校中药学院制剂教研室提供,使用前稀释成浓度为 1.44g 生药/ml。

3. 主要仪器和试剂

美国 Lunar 公司 DPX 型双能 X 线骨密度仪;国产多探头 γ 计数器 FT630G;日本产 MPF-4 荧光分光光度计。骨钙素放免试剂盒为中国原子能科学研究院产品;ATPNa₂ 为 Sigma 公司产品;1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH)为 Sigma 公司产品;其它试剂均为国产分析纯。

4. 动物处理及检测方法

30 只 6 月龄雌性 Wistar 大鼠随机分为 3 组:模型

组(手术切除双侧卵巢)、假手术组(行假手术)、模型加强骨颗粒预防组。术后一周,模型组和假手术组每日 3ml 生理盐水灌胃,强骨颗粒组每日 16 g 生药/kg 体重(相当于成人用药 12 倍量)灌胃,给药 12 周。

所有动物在同一条件下用普通鼠料饲养,实验期间动物每周称重一次,并根据体重变化调整给药量。实验结束,颈动脉取血处死大鼠,分离血清。放免法测定血清骨钙素含量。取左股骨以双能 X 射线骨密度仪测骨密度。取右股骨剔除附着软组织,立即称湿重(灵敏度 10^{-3})。然后在 105°C 烤恒重,再于 650°C 8h 灰化,冷却后称灰重。计算骨灰重/恒重值,并按下式计算骨中水含量(%): (湿重 - 恒重)/湿重 $\times 100$ 。同时取出完整子宫及双侧肾脏,剔除周围结缔和脂肪组织,称重。计算子宫指数(子宫重量/体重)和肾脏指数(肾脏重量/体重)。另制备红细胞膜^[1]和肾线粒体膜^[2],参照文献^[3]测定 Ca^{2+} -ATPase 酶活性。 Ca^{2+} -ATPase 可分解 ATP 成 ADP 和无机磷(Pi),以每毫克蛋白每小时所产生的 Pi 量($\mu\text{g Pi/mg 蛋白/h}$)为酶的活性单位。测磷采用钼酸法^[4],膜蛋白测定用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[5]。并用 DPH 法测定膜流动性。激发波长 362nm,发射波长 432nm,狭缝 8nm。

结 果

1. 强骨颗粒对大鼠股骨骨密度的影响

大鼠切除卵巢后骨密度明显降低,与假手术组相比有极显著差异($P < 0.001$)。强骨颗粒剂用药后较模型组骨密度明显增加,见图 1。

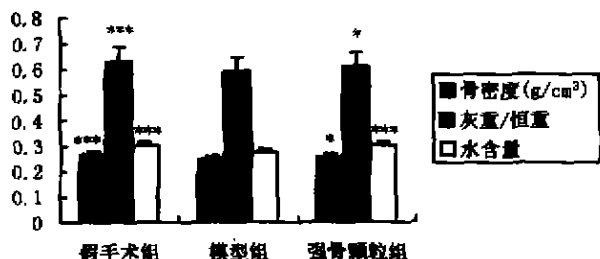


图 1 大鼠骨密度、骨灰重及水含量的变化

注:与模型组相比 * $P < 0.05$ ** $P < 0.001$

表 2 红细胞膜和肾线粒体膜 Ca^{2+} -ATPase 活性、微粘度变化

组别	红细胞膜		肾线粒体膜	
	Ca^{2+} -ATPase 活性 ($\mu\text{g Pi/mg 蛋白/h}$)	微粘度(η)	Ca^{2+} -ATPase 活性 ($\mu\text{g Pi/mg 蛋白/h}$)	微粘度(η)
假手术组(10)	$17.32 \pm 2.66^{**}$	$4.29 \pm 0.30^{*}$	$499.1 \pm 55.8^{*}$	$3.30 \pm 0.25^{*}$
模型组(10)	13.58 ± 1.73	4.58 ± 0.27	452.5 ± 43.6	3.66 ± 0.31
强骨颗粒组(9)	$15.78 \pm 2.40^{*}$	$4.33 \pm 0.21^{*}$	$476.7 \pm 49.3^{*}$	$3.35 \pm 0.26^{*}$

注:与模型组相比 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

2. 大鼠骨灰重和股骨水含量变化

模型组灰重值显著低于假手术组,有极显著差异($P < 0.001$)。强骨颗粒组股骨灰重值较模型组显著升高。骨中水含量模型组显著低于假手术组($P < 0.001$),强骨颗粒组水含量高于模型组,与假手术组接近,结果见图 1。

3. 大鼠子宫指数及肾脏指数变化

模型组大鼠肾脏指数、子宫指数明显低于假手术组($P < 0.001$),强骨颗粒组与模型组相比,肾脏指数明显增加,有显著差异;子宫指数未见明显增加,见表 1。

表 1 大鼠子宫指数及肾脏指数变化($\bar{x} \pm s$)

组别	体重(g)	肾脏指数 (mg/g)	子宫指数 (mg/g)
假手术组(10)	$296.3 \pm 15.8^{***}$	$6.39 \pm 0.67^{***}$	$1.50 \pm 0.304^{***}$
模型组(10)	352.1 ± 20.3	4.94 ± 0.23	0.19 ± 0.014
强骨颗粒组(9)	$322.0 \pm 18.9^{**}$	$5.19 \pm 0.46^{*}$	0.20 ± 0.017

注:与模型组相比 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

4. 血清骨钙素含量的变化

模型组血清骨钙素含量高于假手术组,有极显著差异($P < 0.001$),强骨颗粒组与模型组相比,骨钙素含量显著降低,见图 2。

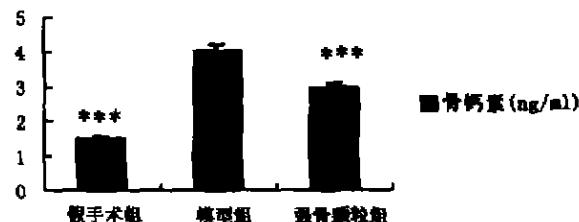


图 2 大鼠血清骨钙素含量的变化

注:骨钙素(ng/ml),与模型组相比

* $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

5. 红细胞和肾线粒体膜 Ca^{2+} -ATPase 活性变化

模型组大鼠红细胞膜、肾线粒体膜 Ca^{2+} -ATPase 活性显著低于假手术组($P < 0.05 \sim 0.01$),服用强骨颗粒后可显著升高红细胞膜及肾线粒体膜 Ca^{2+} -ATPase 活性,见表 2。

6. 红细胞膜和肾线粒体膜流动性变化

模型组大鼠红细胞膜、肾线粒体膜流动性显著低于假手术组,服用强骨颗粒后红细胞膜和肾线粒体膜流动性明显升高,见表2。

讨 论

绝经后骨质疏松症(PMO)是一种全身性骨代谢性疾病,表现为骨吸收增加,骨量的快速丢失,与雌激素在体内快速减少有关,但其发病机理目前仍不完全清楚。中医认为肾主骨,骨质疏松症病因首责于肾虚,对其治疗以补肾为主。我们认为绝经后妇女除“天癸竭,肾气虚”之外,亦并存脾虚因素;因此选用补肾健脾之强骨颗粒防治PMO。

大鼠去卵巢后,骨密度、骨灰重显著低于假手术大鼠,服用强骨颗粒使骨密度和骨灰重明显增加。骨密度是评价骨量最有说服力的指标之一,骨灰重可反映骨无机物含量。此结果表明强骨颗粒对去卵巢大鼠骨质疏松有明显的防治作用。子宫是雌激素的靶器官,大鼠去卵巢后子宫明显萎缩,服用强骨颗粒对子宫重量无影响,表明其不具有雌激素样作用,它增加骨密度等作用不是通过升高雌激素水平的环节实现的。血清BGP可作为评估骨转换率及骨形成的特异指标^[6]。模型组血清BGP显著升高,揭示骨转换率及骨形成明显增加,与绝经后骨质疏松症表现相符。强骨颗粒组血清BGP含量显著低于模型组,表明用药可降低骨转换率,从而减少了骨量丢失,使骨量增加。这也揭示了其防治去卵巢大鼠骨质疏松的作用机理。

骨质疏松症是一种老年病,人至老年,将发生一系列生理退行性变化,如老年肾脏逐渐萎缩,酶活性及细胞膜流动性下降,骨中有机质含量减少,骨髓性增加,易骨折。我们发现去卵巢大鼠肾脏指数显著低于假手术组($P < 0.001$),表明相同体重下去卵巢骨质疏松大鼠肾脏重量明显降低,可见骨质疏松时与老化时相似,也伴有肾脏的萎缩。强骨颗粒为补肾中药,可以抑制肾脏的萎缩,使其重量显著增加。古人对肾形态的认识与现代医学基本是一致的,如“腰为肾之府”(《素问》)、“肾有两枚,重一斤一两”(《难经》);“形如虹豆”(《类经图翼》)等等。考虑补肾中药强骨颗粒可改善肾脏功能,而机体内器官的形态与功能相对应,故而表现为肾脏指数增加。

实验中我们首次观察了骨中水含量与骨质疏松的关系。骨是由有机质、无机盐和水组成,早在十九

世纪人们就提出骨中水含量问题,但数据极为分散。如Neuman得出发育骨中密质骨的含水量为60%,衰老骨为10%,不同状态密质骨的含水量在此范围内变化^[7]。我们的计算方法得出相同月龄的大鼠,模型组骨中水含量(27.3 ± 0.6)%明显低于假手术组(30.1 ± 1.3)%, $P < 0.001$ 。此结果表明,骨中含水量的变化与骨质疏松的发生存在相关性。肾主水,肾有藏精和主持与调节水液代谢的功能,如骨骼缺乏水液滋养可发生骨质疏松。补肾中药可能通过发挥补肾填精、调节水液代谢的作用,使水液得以滋养骨骼,升高骨中水含量,延缓骨质疏松的发生。本实验因条件所限,未检测骨中有机质含量,但对骨中水含量的观察为骨质疏松机理研究提供了新思路。由于目前对骨中水含量的测试较少,测试方法、计算标准很难统一,本实验仅为初步探讨,有待于进一步完善。

Zaki等研究发现,大鼠门齿釉质的成釉细胞膜 Ca^{2+} -ATPase通过对矿化时可利用的 Ca^{2+} 调节,在牙釉质矿化中发挥作用^[8]。关于成骨细胞 Ca^{2+} -ATPase的体内研究目前尚未见到。推测 Ca^{2+} -ATPase在骨骼的矿化过程中也发挥一定作用。本实验试图通过红细胞膜、肾线粒体膜 Ca^{2+} -ATPase活性对本身细胞功能的反映,间接反映骨细胞、成骨细胞功能状态。实验发现,去卵巢大鼠两种膜 Ca^{2+} -ATPase活性、膜流动性显著低于假手术组和强骨颗粒组。 Ca^{2+} -ATPase对于维持胞质 Ca^{2+} 浓度极低的稳态有重要意义,酶活性下降,将引起细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,导致细胞损伤。如红细胞内 Ca^{2+} 浓度增加使红细胞变形性下降,线粒体膜钙泵可将 Ca^{2+} 泵入线粒体贮存,其活性下降,也加重了胞质内 Ca^{2+} 浓度升高,并可引起质膜和线粒体等部位损伤。强骨颗粒可增加 Ca^{2+} -ATPase活性,维持胞内 Ca^{2+} 浓度在较低水平,避免细胞损伤。推测在骨质疏松发病中细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化导致细胞功能异常,也包括骨骼细胞的病理改变。膜酶活性与膜流动性之间有密切关系,膜流动性降低则 Ca^{2+} -ATPase活性就会下降^[9]。膜流动性出现异常变化,可反映膜功能的早期损伤。去卵巢大鼠膜流动性降低,可能与膜磷脂组分含量改变有关^[10]。

骨质疏松症是伴随老化而出现的,衰老是其根本原因。我们发现骨质疏松时除有骨骼变化外,其他各组织细胞亦均有衰老的代谢变化。结果表明,服用强骨颗粒,在细胞水平表现为增加了膜流动性

(下转第243页)

组动物子宫内膜腺体数目与模型组及 Raloxifene 比较无差异,但子宫内膜有增宽趋势,少数有鳞状上皮化生和不典型增生发生,提示临床应用中应注意药物剂量及定期妇科检查。

为了避免雌激素的不良反应,国际上开发研究出新一代药物“选择性雌激素受体调节剂 SREM”——Raloxifene,选择作用于骨骼、心血管,而对子宫内膜及乳腺无副作用。本实验结果表明,该药对大鼠子宫内膜无影响。在美国、加拿大等国进行的长达 3 年的大规模临床试验 (more randomized trial) 显示 Raloxifene 能增加骨密度,降低骨折风险^[4],降低乳腺癌的风险^[5],可降低总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),对高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)无作用,但与雌激素相比,Raloxifene 的调脂作用较弱^[6],由于该药是近年开发用于临床的,其长期疗效及安全性有待进一步观察。

参 考 文 献

- 1 孙瑞元主编.《定量药理学》.北京:人民卫生出版社,1985:247.
- 2 Bjarnason NH, Bjarnason K, Haarbo J, et al. Tibolone: Influence on markers of cardiovascular disease. J Clin Endocrinol Metab, 1997, 82: 1752-1756.
- 3 李兰,周翎,邵晋康,等.绝经期骨质疏松雌激素替代治疗临床研究.中国骨质疏松杂志,2000,6(2):48-51.
- 4 Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, et al. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene. JAMA, 1999, 282: 637-645.
- 5 Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, et al. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women. JAMA, 1999, 281: 2189-2197.
- 6 Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, et al. Effect of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations and uterine endometrium in postmenopausal women. New Engl J Med, 1997, 337: 1641-1647.