

双骨胶囊对维甲酸致骨质疏松大鼠下颌骨结构影响的初步研究

张军芳 曹峻岭 夏永祥 郭雄 毕华银 张增铁 张富军 杜晓阳 谢龙 岳燕

【摘要】 目的 观察中药双骨胶囊对维甲酸所致骨质疏松大鼠下颌骨结构的影响。方法 选择3月龄SD雌性大鼠,采用 $85\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 维甲酸灌胃15 d复制模型,模型复制成功后,采用“双骨胶囊”进行治疗。治疗30 d,60 d后,取大鼠磨牙段下颌骨进行组织切片观察,并作形态计量学测量。结果 光镜观察显示,双骨胶囊组和雌激素组下颌骨骨小梁增宽,骨小梁间隙减小,骨髓腔缩小。组织形态计量学测量结果表明,两治疗组骨小梁平均宽度明显增加,骨小梁平均间隔宽度明显减小。结论 中药“双骨胶囊”可通过全身用药,改善颌骨结构,抑制破骨细胞活性增强引起的骨吸收,从而减缓下颌骨骨量丢失。

【关键词】 双骨胶囊; 维甲酸; 骨质疏松症; 下颌骨; 病理形态学

Effect of Shuanggu capsule on structure of mandibles in rats with osteoporosis induced by retinoic acid
ZHANG Junfang, CAO Junling, XIA Yongxiang, et al. Affiliated Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China; Institute of Endemic Diseases, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China (CAO Junling)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of the traditional Chinese medicine Shuanggu capsule on the mandibular structure of rats with osteoporosis induced by retinoic acid. **Methods** Female SD rats, three months old, were selected to duplicate the model with retinoic acid $85\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for 15 days intragastrically. After the model was successfully established, the therapeutic effect of Shuanggu capsule administered for 30 and 60 days was observed by pathomorphology and histomorphometry of the molar sections of the rat mandibles. **Results** On light microscopy, the trabecular bone of mandibles widened, and the trabecular interspace and medullary cavity decreased in rats of Shuanggu capsule group and estrogen group, compared with rats in no treatment control group. Histomorphometry analysis indicated that 30 and 60 days' treatment with the drug significantly increased the trabecular width of mandibles and decrease the trabecular space, compared with the control group. **Conclusion** Oral administration of the traditional Chinese medicine Shuanggu capsule can improve the structure of mandibles and inhibit bone resorption caused by osteoclasts, thus slowing down the mandibular resorption process.

【Key words】 Shuanggu capsule; Retinoic acid; Osteoporosis; Mandible; Pathomorphology

随着人口结构的老龄化,骨质疏松症已成为影响老年人以及绝经后妇女健康和生活质量的主要疾病之一。近年来,全身性骨质疏松与颌骨骨质疏松、牙周炎牙槽骨吸收、剩余牙槽嵴吸收等口腔骨丢失的关系已逐渐引起学者的重视。目前,大多数学者认为口腔骨丢失是全身骨质变化的局部表现^[1]。已有学者^[2,3]为通过全身用药改善颌骨结构、减缓颌骨骨量丢失进行了有益的探讨。采用中药治疗,副作用较小又可长期服用,作用持久,越来越引起人们的

重视。前期动物实验已证实^[4],经多年筛选、研制的中药制剂“双骨胶囊”能增加骨质疏松大鼠椎骨、股骨骨量。本文通过维甲酸灌药复制大鼠颌骨骨质疏松模型,进一步观测“双骨胶囊”对下颌骨结构的影响。

材料和方法

1. 材料

(1)实验动物:60只3月龄SD雌性大鼠(由西安交通大学动物实验中心提供,国家A级实验动物),体重190~260 g。为排除动物饲养条件差异对实验结果的影响,本实验所有动物于同等条件下分笼饲养,自由进食与饮水,各组饲料(由动物实验中

作者单位:210006 南京医科大学附属南京第一医院(张军芳、夏永祥);西安交通大学医学院地方病研究所(曹峻岭、郭雄、毕华银、张增铁、张富军、杜晓阳、谢龙、岳燕)

心配制)与饮用水(蒸馏水)完全相同。

(2)维甲酸片:购自上海第六制药厂,研磨成细粉,以蒸馏水配成一定浓度混悬液,避光保存备用。

(3)中药“双骨胶囊”:主要成分为骨碎补、透骨草、硼砂等,由西安交通大学医学院地方病研究所提供。

2. 方法

(1)动物分组:60只大鼠随机分为2组:正常对照组(正常组, A组, 15只);骨质疏松模型组(模型组, C组, 45只)。

(2)模型复制:模型组大鼠以 $85 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 维甲酸灌胃 15 d, 正常组大鼠用蒸馏水作空白对照。灌药 15 d 后, 分别从模型组与正常组中随机选取 5 只大鼠处死, 取血、下颌骨样本, 观察模型复制情况。

(3)动物处理和观察:模型建成后, 进入治疗阶段。正常对照组(A组, 10只)大鼠继续观察, 将模型组大鼠随机分为3组:无措施组(C组, 12只)、双骨胶囊组(D组, 16只)以及雌激素组(E组, 12只)。治疗方案:A组、C组给予常规饲料、蒸馏水;D组, 给予“双骨胶囊”混悬液 $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 灌胃;E组, 给予苯甲酸雌二醇 $50 \mu\text{g}/\text{只}$, 3次/周, 腹腔注射。治疗分二期, 治疗 30 d 为第一期, 治疗 60 d 为第二期。治疗结束, 腹腔静脉采血处死各组动物, 并取材。血标本离心取血清, 血清及时检测或置 -30°C 低温冰箱中保存待测;取下颌骨进行大体观察, 截取磨牙段下颌骨进行病理切片观察, 并作形态计量学分析。

(4)下颌骨病理形态观察:在解剖显微镜下进行下颌骨大体观察;取磨牙段下颌骨骨组织标本, 去净软组织, 4%多聚甲醛溶液固定, EDTA 脱钙, 常规石蜡包埋, 制片($7 \mu\text{m}$), HE 染色, 光镜观察。

(5)下颌骨骨组织形态计量学测量:上述各组大鼠磨牙段下颌骨常规制片, 在 CMIAS 型北航多功能病理彩色图像处理与分析系统中进行骨组织形态计量学指标测量, 包括以下指标:①松质骨面积比 Cancellous bone area (Cn. Ar%; Cn. Ar/Total. Ar%);②骨小梁平均宽度 Trabecular width (Tb. Wi, μm);③骨小梁平均间隔宽度 Trabecular separation (Tb. Sp, μm)

(6)血清生化检测:①血清雌二醇(E_2)测定:采用放免法, 用 FJ-2008P 型 γ 放射免疫计数器测定血清 E_2 (试剂盒由天津九鼎鑫医学生物工程有限公司提供)。②血清碱性磷酸酶(ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)测定:血 ALP 采用日立 7170 型全自动生化分析仪测定, 血 TRAP 采用对硝基磷酸法测定。

③血清硼(B)测定:采用姜黄素法测定。

(7)统计处理:所得数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析, 计算结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

1. 一般情况

灌服维甲酸 15 d 后, 灌药组大鼠体重比正常组体重下降 ($P < 0.05$); 灌胃期间, 大鼠食量明显减少, 到 15 d 时除体重未有明显增加外, 尚有活动减少, 拱背竖毛等表现; 双骨胶囊对其体重的影响不明显。

2. 各组大鼠血清生化指标测定结果:见表 1、2。

表 1 模型期两组大鼠血 E_2 、ALP、TRAP、B 含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	E_2 (pg/ml) **	ALP (U/L) *	TRAP (U/L) *	B (mg/L)
A	5	11.19 ± 4.50	152.60 ± 38.30	13.72 ± 3.38	0.25 ± 0.03
C	5	3.31 ± 2.52	354.62 ± 20.36	28.95 ± 8.96	0.22 ± 0.02

注:与 A 组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

表 2 治疗后各组大鼠血 E_2 、ALP、TRAP、B 含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	E_2 (pg/ml)	ALP (U/L)	TRAP (U/L)	B (mg/L)
A	6	41.25 ± 8.85	369.79 ± 265.99	16.50 ± 6.45	0.28 ± 0.07 **
C	6	31.47 ± 6.05	313.02 ± 251.47	13.12 ± 2.21	0.24 ± 0.05 **
D	6	42.05 ± 18.69	354.69 ± 186.84	14.99 ± 8.49	0.35 ± 0.07
E	8	99.88 ± 7.46 *	275.00 ± 198.73	12.96 ± 6.92	0.25 ± 0.05 **

注:与 C 组比较, * $P < 0.05$; 与 D 组比较, ** $P < 0.05$

由表可见, 与正常组相比, 模型组血清 E_2 水平显著降低, 血清 ALP、TRAP 活性明显升高。经“双骨胶囊”和雌激素治疗后, 与 C 组相比, E 组的雌激素水平明显升高, D 组无明显变化; D 组的血硼含量明显高于其他 3 组, 各组间血 ALP、TRAP 含量无显著性差异。

3. 下颌骨骨组织病理形态学观察:对下颌骨大体观察, 解剖显微镜下可见, 模型组大鼠下颌角下缘和下颌孔上缘可见骨膜下骨吸收区存在, 而正常组下颌骨未见异常(见图 1、2); 光镜下观察磨牙段下颌骨显示, 模型组大鼠下颌骨骨小梁稀少, 形成大的骨髓腔; 正常组则可见骨小梁粗壮、饱满(见图 3、4)。经“双骨胶囊”和雌激素治疗后, D、E 组可见下颌骨骨小梁数增多, 骨小梁增宽, 骨小梁间隙减小, 骨髓腔缩小(见图 5、6)。

4. 下颌骨骨组织形态计量:见表 3、4。



图1 维甲酸灌胃15 d后,正常组大鼠下颌骨解剖显微镜下观察:下颌体、下颌角下缘及下颌孔附近未见异常 2.5×0.8×0.5

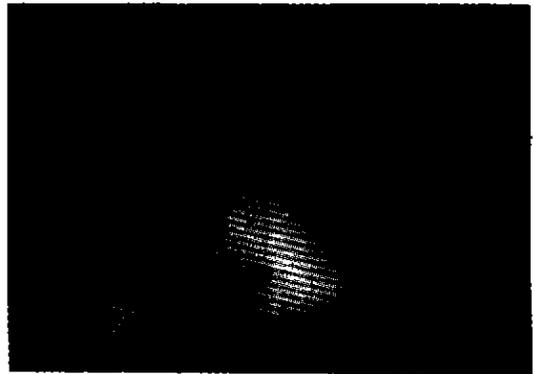


图2 维甲酸灌胃15 d后,模型组大鼠下颌骨解剖显微镜下观察:在下颌角下缘、下颌孔附近可见骨膜下骨吸收区存在 2.5×0.8×0.5



图3 维甲酸给药15 d后,正常组下颌骨组织形态学光镜观察:骨小梁粗壮,数目多,小梁间隔距离小 HE10×10



图4 维甲酸给药15 d后,模型组下颌骨组织形态学光镜观察:骨小梁稀疏、断裂,形成大的骨髓腔 HE 10×10

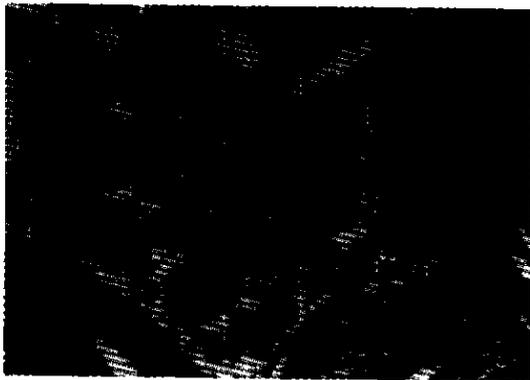


图5 雌激素治疗60 d后,大鼠下颌骨组织形态学光镜观察:骨小梁增宽,骨小梁间隙变小,骨髓腔缩小 HE 10×10



图6 双骨胶囊治疗60 d后大鼠下颌骨组织形态学光镜观察:骨小梁增宽,骨小梁间隙缩小,大的骨髓腔缩小 HE10×10

表3 模型期两组大鼠下颌骨骨小梁形态计量学结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Cn. Ar%	Tb. Wi(μm)	Tb. Sp(μm)
A	4	35.73 ± 6.62	10.38 ± 0.41	11.04 ± 0.29
C	4	24.05 ± 0.31	5.33 ± 0.26**	21.36 ± 1.25*

注与A组比较,* P < 0.05; ** P < 0.01

表4 治疗后各组大鼠下颌骨骨组织形态计量学结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Cn. Ar%	Tb. Wi(μm)	Tb. Sp(μm)
A	5	24.54 ± 2.29	10.22 ± 0.99*	15.02 ± 4.42*
C	5	25.29 ± 3.90	6.22 ± 0.65	25.11 ± 3.75
D	7	28.66 ± 5.20	8.90 ± 1.19*	13.38 ± 3.20*
E	6	28.89 ± 5.45	9.28 ± 0.30*	18.07 ± 1.38*

注与C组比较,* P < 0.05

由表可见,模型组大鼠下颌骨骨小梁平均宽度(Tb. Wi)显著低于正常组,骨小梁平均间隔宽度(Tb. Sp)显著大于正常组,松质骨面积比(Cn. Ar%)有降低趋势。治疗后,与C组相比,其余3组的骨小梁平均宽度(Tb. Wi)显著增加,骨小梁平均间隔宽度(Tb. Sp)明显减小。

讨 论

1. 口腔骨丢失与骨质疏松症的关系

1960年Groen等首次报道,口腔骨丢失和骨质疏松症有关联。近年来,全身性骨质疏松与颌骨骨质疏松、牙周炎牙槽骨吸收和剩余牙槽嵴吸收等口腔骨丢失的关系已逐渐引起学者的重视。目前,大多数学者认为口腔骨丢失是全身骨质变化的局部表现^[1]。Jeffcoat^[1]认为,牙槽骨吸收与年龄及雌激素水平有一定关联,牙槽骨吸收的严重程度随着年龄增加,原因可能与患者骨质减少的全身状况有关联。Gilles等^[6]的动物实验也显示,雌激素缺乏会加速大鼠的口腔骨丢失。Jonson等^[7]对卵巢切除动物的研究也显示,牙周炎可能与雌激素缺乏的全身因素密切相关。以往的研究也发现,骨质疏松症妇女全身骨量、下颌骨骨量与下颌余牙数目显著相关,骨质疏松患者的牙齿丢失率高于骨质正常组^[8]。

在本实验中,给予成年SD雌性大鼠灌服维甲酸 $85\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,灌药15d后,模型组大鼠血清雌二醇水平明显低于正常组,血清ALP、TRAP活性明显升高。下颌骨组织学上可见骨小梁稀疏,骨髓腔增大。组织形态计量学结果显示,与正常组相比,模型组骨小梁平均宽度显著减小,骨小梁平均间隔宽度显著增大,松质骨面积比有降低趋势,表明下颌骨呈现了明显的骨质疏松,与前期研究^[4]的股骨改变相一致,本实验结果证实大鼠下颌骨骨量与全身骨量密切相关。

2. 关于动物模型的建立

在诸多的骨质疏松动物模型中,因大鼠的骨代谢情况与人类十分接近,对各种致病因素和治疗药物的反应性与人类基本一致,在模型中使用最多,故本研究也采用大鼠复制动物模型。维甲酸在临床主要用于银屑病、痤疮、皮肤肿瘤等疾病的治疗,伴有骨质疏松副作用,利用这一特性,已有学者采用维甲酸成功复制大鼠骨质疏松模型^[9]。

本实验采用维甲酸 $85\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃复制大鼠颌骨骨质疏松模型,实验结果表明:维甲酸灌胃

15d后,模型组大鼠血清雌二醇水平明显降低,血TRAP活性明显升高,表明维甲酸损伤卵巢,使血清 E_2 明显降低,雌激素水平下降,其对破骨细胞的抑制作用降低,从而激活破骨细胞,使骨吸收增强。模型组血ALP明显高于正常组,表明成骨细胞活性增强,反映了骨改建的活跃状态。血ALP的升高可能是骨吸收亢进伴随着成骨细胞功能活跃的结果^[10],表明维甲酸所致的颌骨骨质疏松症动物模型骨吸收作用增强,代偿性骨形成作用也增强,表现了高转换型骨质疏松特征。组织学观察显示下颌骨骨小梁稀疏、细小,出现大的骨髓腔,呈现出典型的骨质疏松改变,组织形态计量学结果也证实了这点,进一步说明模型复制成功。

3. “双骨胶囊”对下颌骨结构的影响

根据中医“肾主骨”理论的指导及长期的医疗实践表明,骨质疏松症病本在肾,病因与肾虚相关。以骨碎补、透骨草、硼砂等为主要成分的双骨胶囊具有补肾壮骨、活血止痛之功效,对机体毒副作用小,是治疗骨质疏松比较理想的药物,李幼芬^[4]的研究也证实双骨胶囊可明显增加骨质疏松大鼠股骨骨量,由于口腔骨丢失与骨质疏松症的发病机理近似,因此,应用双骨胶囊进行防治颌骨骨量丢失的研究具有合理性。

在本实验中,大鼠灌服维甲酸后,解剖显微镜下观察,可见模型组大鼠下颌角下缘和下颌孔上缘有骨膜下骨吸收区存在,而正常组下颌骨未见异常。该骨吸收区是维甲酸损伤性腺,使血清 E_2 明显降低,雌激素水平下降,其对破骨细胞的抑制作用降低,从而激活破骨细胞,使破骨细胞骨吸收作用增强所致。光镜下观察下颌骨磨牙段切片,与正常组相比,下颌骨骨小梁细小、断裂,出现大的骨髓腔。下颌骨骨组织形态计量学结果显示,模型组骨小梁平均宽度明显减小,骨小梁平均间隔宽度则明显增大。双骨胶囊治疗后,组织学表现为:下颌骨骨小梁增宽,骨小梁间隙减小,骨髓腔也变小,破骨细胞数减少,表明双骨胶囊能明显抑制维甲酸所致颌骨骨质疏松大鼠骨量丢失和骨小梁结构破坏,说明该药不仅对全身其他骨的改建起作用,对颌骨的改建也有相似作用,组织形态计量学指标也显示其对维持颌骨骨小梁结构有一定的作用。虽然松质骨面积比没有明显变化,仍可认为“双骨胶囊”是一种比较理想的防治颌骨骨量丢失和结构破坏的药物。

(下转第81页)

该年龄段长期劳动有关。

3. 多次怀孕、多次分娩和哺乳与骨量变化无显著差异, 髌部 T、W 的 BMD 尚有上升, 怀孕与分娩、哺乳属正常生理过程不会影响骨量。

4. 口服避孕药未见骨量增加, 与未服药比较无统计学差异, 可能与间断服药和持续时间短有关。

5. 输卵管结扎术也不会引起骨量变化, 因为手术本身并未引起内分泌变化。

6. 广州地区与国内其它地区比较

广州地区女性 L_{2-4} 及 N、T、W 的 PBM 与北京^[1] 上海^[3] 接近而高于成都^[5], 低于沈阳^[2]。这些差异除可能与抽查时间、抽样方法和样本数量不同外还与生活习惯、地域营养等因素有关。广州地区男性

L_{2-4} 及 N、T、W 的 PBM 低于北京、上海、沈阳, 高于成都。不符合南方高于北方的趋势^[6]。

参 考 文 献

- 1 吴青, 陶国枢, 刘晓铃, 等. 北京地区 1333 人双能 X 线骨密度测定及骨质疏松患病情况调查. 中国骨质疏松杂志, 1995, 1(1): 76-79.
- 2 郭庆升, 张世斌, 等. 沈阳地区 537 例正常人双能 X 线骨密度测定结果. 中国骨质疏松杂志, 1996, 2(3): 70-72.
- 3 唐海, 罗先正, 任素梅, 等. 中国人原发性骨质疏松诊断标准探讨. 中国骨质疏松杂志, 1997, 3(1): 1-5.
- 4 马锦富, 李金祥, 等. 成都地区 1835 例女性骨密度研究. 中国骨质疏松杂志, 1999, 5(1): 63-65.
- 5 马锦富, 杨定焯, 安珍, 等. 成都地区骨峰值的研究. 中国骨质疏松杂志, 2000, 6(3): 16-18.
- 6 刘忠厚, 潘子昂, 王石麟, 等. 骨骼生长衰老规律和原发性骨质疏松预诊的研究. 中国骨质疏松杂志, 1995, 1(1): 1-7.