

坚骨颗粒对去卵巢骨质疏松大鼠股骨骨密度和股骨力学性能的影响

冯坤 王健智 陈宝龙 刘月桂

【摘要】 目的 进一步研究中药坚骨颗粒的抗骨质疏松作用。**方法** 采用以卵巢切除后雌激素缺失诱导的骨质疏松大鼠模型,用 DEXA 法分析股骨骨密度,用生物力学技术分析动物股骨的力学性能参数,对比观察了模型组、雌激素组、中药组动物股骨骨密度和股骨力学参数的变化。**结果** 用药 4 个月后雌激素组和中药组大鼠股骨的骨矿含量、骨密度、最大载荷、破坏载荷、能量吸收参数与造模对照组比较有显著提高($P < 0.05$)。**结论** 中药坚骨颗粒可拮抗模型动物的骨量丢失,维持造模后动物骨骼抵抗外力冲击的能力,改善骨质疏松大鼠骨的韧性,降低骨折发生的危险性。

【关键词】 骨质疏松; 中药治疗; DEXA; 生物力学; 三点弯曲实验; 大鼠

中药坚骨颗粒是我所根据中医理论和现代中医研究成果,经多年筛选研制出的纯中药制剂,临床用于骨质疏松症的防治效果满意。为了进一步评价坚骨颗粒对骨质疏松的治疗效果,我们采用卵巢切除后雌激素缺失诱导的骨质疏松大鼠为模型,研究了药物对大鼠股骨密度和骨力学性能方面的影响,现将研究结果报道如下。

材料和方法

1. 实验动物与药物制备:雌性 Wistar 大鼠 42 只(河南省实验动物中心提供),月龄 12 m,平均体重 300 g,皮毛色泽正常,于 SPF 级动物实验室常规标准饲料饲养 1 周,自由饮水,室温 28℃,湿度 65%。坚骨颗粒由我所药物室提供,用淫羊藿、黄芪、骨碎补等药材采用水提醇沉工艺提取后制备成颗粒剂。苯甲酸雌二醇为上海第九制药厂生产。

2. 实验设备:双能 X 线骨密度仪(HOLOGIC 4500A,美国),电子万能材料试验机(岛津 AGS-10KNG,日本),常规手术器械,医用生理盐水,精密游标卡尺。

3. 实验分组与造模:将动物随机分为 4 组:造模对照组(简称造模组)12 只;雌激素治疗组(简称激素组)10 只;坚骨颗粒治疗组(简称中药组)10 只。上述三组动物按文献[1,2]方法摘除双侧卵巢造成

骨质疏松模型。正常组动物(简称正常组)10 只。做假手术,切除卵巢附近的脂肪组织块。

4. 用药方法:实验动物分笼饲养,室温 27 ~ 29℃。手术 1 w 后,中药组动物用中药坚骨颗粒溶解液灌胃,每次每公斤体重 7 g 生药,每日 2 次。激素组动物隔日肌注苯甲酸雌二醇 5 μ g。正常组和对照组用自来水灌胃,灌入量和次数同中药组。所有动物正常饲养 4 个月处死取样。对处死大鼠取同侧股骨,去除表面软组织,冷生理盐水纱布冷藏保存。

5. 骨密度测定:取股骨样品,置双能 X 线骨密度仪扫描台上,用 SMALL ANIMAL ANALYZE 软件的高清晰度分析模式扫描分析,测得骨影面积(ARE)、骨矿含量(BMC)、骨密度(BMD)。

6. 力学测试方法:用游标卡尺测定股骨中段的宽度和厚度,计算截面面积。在电子万能试验机上进行三点弯曲实验,加载点在股骨中段,跨距 20 mm,加载速度 10 mm/min。实验条件全部通过计算机控制,实验过程计算机自动描记载荷-变形曲线,并根据选择的测量指标和输入的每个股骨不同的截面积运算出各指标参数。测得弹性模量、最大载荷、挠度、极限强度、破坏载荷、破坏应变、破坏强度、能量吸收参数。

7. 统计学处理:用 Office 98 对各组测量数据进行统计分析,结果用“均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)”表示,各组均数之间比较采用 t 检验法。

结 果

1. 骨密度分析:各组大鼠股骨骨密度测量结果

见表 1。

表 1 坚骨颗粒对骨质疏松大鼠股骨骨密度的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	骨影面积 (cm^2)	骨矿含量 (g)	骨密度 (g/cm^2)
正常组	10	1.198 ± 0.060	$0.233 \pm 0.028^*$	$0.194 \pm 0.020^*$
对照组	12	1.182 ± 0.058	0.207 ± 0.019	0.176 ± 0.013
激素组	10	1.204 ± 0.034	$0.234 \pm 0.021^*$	$0.194 \pm 0.017^*$
中药组	10	1.206 ± 0.041	$0.228 \pm 0.018^*$	$0.190 \pm 0.015^*$

注:与对照组比较 * $P < 0.05$

表 1 结果表明,模型对照组动物股骨骨矿含量和骨密度低于正常组大鼠股骨骨密度,差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明切除卵巢 4 个月的雌性大鼠,有明确的骨量丢失表现,模型成立。激素组和中药组动物股骨骨矿含量和骨密度高于模型对照组大鼠股骨骨密度,差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明中药坚骨颗粒可以拮抗切除卵巢 4 个月的雌性大鼠的股骨骨量丢失,具有明确的抗骨质疏松的效应。

2. 生物力学分析:各组大鼠股骨三点弯曲实验的结构力学和材料力学测试指标结果见表 2、3。

表 2 坚骨颗粒对骨质疏松大鼠股骨结构力学性能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	最大载荷 (N)	挠度 (mm)	破坏载荷 (N)	能量吸收 ($\text{N} \cdot \text{mm}$)
正常组	10	$111.89 \pm 11.70^*$	0.61 ± 0.11	$108.32 \pm 13.30^*$	$47.10 \pm 11.03^*$
对照组	12	$98.74 \pm 11.54^*$	0.57 ± 0.10	96.24 ± 10.94	37.70 ± 8.03
激素组	10	$113.03 \pm 12.17^*$	0.62 ± 0.17	$109.50 \pm 12.98^*$	$46.36 \pm 10.17^*$
中药组	10	$112.14 \pm 15.85^*$	0.62 ± 0.16	$106.13 \pm 13.04^*$	$45.99 \pm 10.38^*$

注:与对照组比较 * $P < 0.05$

表 3 坚骨颗粒对骨质疏松大鼠股骨材料力学性能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	弹性模量 ($\text{N} \cdot \text{mm}^2$)	极限强度 ($\text{N} \cdot \text{mm}^2$)	破坏强度 ($\text{N} \cdot \text{mm}^2$)	破坏应变 ($\text{N} \cdot \text{mm}^2$)
正常组	10	5313.60 ± 797.74	$126.99 \pm 8.65^*$	$125.74 \pm 9.59^*$	3.55 ± 0.78
对照组	12	5406.90 ± 662.35	114.75 ± 11.37	112.29 ± 14.71	3.25 ± 0.73
激素组	10	5431.44 ± 837.64	$128.84 \pm 10.65^*$	$126.38 \pm 10.07^*$	3.67 ± 0.81
中药组	10	5259.50 ± 869.40	114.98 ± 22.70	112.34 ± 29.96	3.66 ± 1.48

注:与对照组比较 * $P < 0.05$

与造模对照组比较,正常组的最大载荷、破坏载荷、能量吸收、极限强度和破坏强度均明显高于造模对照组,统计结果差别显著($P < 0.05$),表明切除卵巢的雌性大鼠股骨生物力学性能下降。激素组和中药组与造模对照组比较,动物股骨最大载荷、破坏载荷和能量吸收结构力学参数差别有统计意义($P <$

0.05),而中药组动物材料力学参数的改变无统计学意义($P > 0.05$),表明坚骨颗粒能够有效地增强整体骨的力学性能,而对骨材料力学性能的影响弱于雌激素的效应。

讨 论

骨质疏松是指骨的化学成分没有改变只是单位体积内骨量减少的病理变化,它是一种综合征。临床发现,切除卵巢的妇女与同年龄相比有较高的骨质疏松发生率。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。所以目前常用卵巢切除的办法造成具有类似骨质疏松骨量丧失现象的雌性大鼠模型为对象来进行骨质疏松的研究。经我们多年应用认为^[3],切除卵巢 4 个月后,动物骨骼已出现骨密度和骨矿密度明显下降,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。这种方法建立的骨质疏松模型,虽然试验周期较长,但成功率高、重复性好,是比较理想的研究模型^[4]。

Frost 认为,骨结构与骨量由机械负荷调节,即骨结构和骨量取决于机械力学中应力的大小。这一反馈的调动点因雌激素缺乏程度不同而改变^[5]。当雌激素缺乏时,假设的传感器将感觉到的机械负荷降低,致使相应的骨量降低,影响骨的力学性能。这种影响在大鼠去势 3 个月左右即明显表现出来^[6]。本实验中,造模对照组动物摘除卵巢 4 个月后,其结构力学性能参数和部分材料力学性能参数明显下降,表明雌性大鼠摘除卵巢后不仅使整体骨拮抗变形和破坏的能力下降,而且能够影响骨矿盐和骨胶原质量,使骨的硬度和韧性发生改变,这个结果与文献报道一致。雌激素在骨密度及最大载荷、破坏载荷、能量吸收、极限强度、破坏强度指标上表现有良好的骨保护效应,可以有效的拮抗去卵巢后雌激素降低引起的骨质量下降。

中药坚骨颗粒是以补肾为主的纯中药制剂,临床应用效果满意。其生化研究表明^[7],它能有效抑制骨吸收,对雌激素缺乏引起的骨质疏松有很好的防治作用。本文对动物股骨进行力学分析,结果显示骨质疏松大鼠用药 4 个月后,实验组动物股骨的骨密度指标与最大载荷、破坏载荷、能量吸收指标显示的结构力学性能得到维持,表明整体骨承受外力的能力和拮抗骨折的能力高于模型对照组,提示

(下转第 134 页)

and black Postmenopausal women. *Dis Mon*, 2002, 48: 637-646.

- 2 Erben RG. Embedding of bone samples in methylmethacrylate: an improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 1997, 45: 307-313.
- 3 李红, 高妍, 马红, 等. 大鼠不同部位骨骼对外源性甲状腺激素反应性的研究. *中国骨伤*, 2002, 15: 534-536.
- 4 Langaub MC, Momier-faugere MC, Qi Q, et al. Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide type 1 receptor in human bone. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 448-456.
- 5 Liao EY, Luo XH, Wang WB, et al. Effects of different nylestriol/levonorgestrel dosages on bone metabolism in female Sprague-Dawley rats with retinoic acid-induced osteoporosis. *Endocr Res*, 2003, 29: 23-42.
- 6 Liao EY, Luo XH. Effects of 17 beta-estradiol on the expression of matrix metalloproteinase-1, -2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human osteoblast-like cell cultures. *Endocrine*, 2001, 15: 291-295.
- 7 Holliday LS, Welgus HG, Fliszar CJ, et al. Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. *J Biol Chem*, 1997, 272: 22053-22058.
- 8 Uusitalo H, Hiltunen A, Soderstrom M, et al. Expression cathepsins B,

- H, K, L, and S and matrix metalloproteinases 9 and 13 during chondrocyte hypertrophy and endochondral ossification in mouse fracture callus. *Calcif Tissue Int*, 2000, 67: 382-390.
- 9 Sasano Y, Zhu JX, Tsubota M, et al. Gene expression of MMP8 and MMP13 during embryonic development of bone and cartilage in the rat mandible and hind limb. *J Histochem Cytochem*, 2002, 50: 325-332.
- 10 Uchida M, Yamato H, Nagai Y, et al. Parathyroid hormone increases the expression level of matrix metalloproteinase-13 *in vivo*. *J Bone Miner Metab*, 2001, 19: 207-212.
- 11 Delany AM, Jeffrey JJ, Rydziel S, et al. Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by Post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem*, 1995, 270: 26607-26612.
- 12 Breckon JJ, Papaioannou S, Kon LW, et al. Stromelysin (MMP-3) synthesis is up-regulated in estrogen-deficient mouse osteoblasts *in vivo* and *in vitro*. *J Bone Miner Res*, 1999, 14: 1880-1890.
- 13 Dobnig H, Turnerr RT. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology*, 1995, 136: 3632-3638.

(收稿日期: 2003-11-03)

(上接第 233 页)

中药坚骨颗粒治疗可以拮抗造模引起的骨骼抗外力能力的下降, 改善骨质疏松大鼠骨的韧性, 避免或减少骨折的发生, 有预防切除卵巢后引起的大鼠骨质疏松的作用。但对动物股骨的弹性模量、极限强度和破坏强度指标的影响不明确, 表明中药坚骨颗粒在此实验期间对骨的材料力学性能的影响小于雌激素的作用。所以, 如何提高中药治疗骨质疏松症的疗效是中药在骨质疏松症应用研究中的重要问题之一。

参 考 文 献

- 1 Kalu DN, Hardin RR. Evaluation of the pathogenesis of skeletal changes in

ovariectomized rats. *Endocrinology*, 1984, 115: 507.

- 2 Tabuchi C, Simmou DJ, Faust A, et al. Bone defect in ovariectomized rats. *J Clin Invest*, 1986, 78: 633.
- 3 冯坤, 刘月桂, 张灵菊, 等. 高转换型骨质疏松模型的生化特点. *中国骨质疏松杂志*, 1997, 3: 155.
- 4 冯坤, 陈宝龙. 骨质疏松研究中的动物模型. *中国实验动物杂志*, 1999, 9(1): 62.
- 5 Frost HM. The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporosis and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. *Bone*, 1997, 2: 73-85.
- 6 Dike N, Kalu. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral*, 1991, 15: 175-192.
- 7 冯坤, 刘月桂, 张灵菊, 等. 中药坚骨液对卵巢切除后骨质疏松大鼠血、尿生化的影响. *中医正骨*, 1996, 3(1): 3.

(收稿日期: 2004-01-08)

(上接第 235 页)

参 考 文 献

- 1 Taggart HM, Chesnut CH, Ivey JL, et al. Deficient calcitonin responses to calcium stimulation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet*, 1982, 1: 475-478.
- 2 Borges MF, Abelint NMA, Memusa FOM. Calcitonin deficiency in early stages of chronic autoimmune thyroiditis. *Clin Endocrinol*, 1998, 49: 69-75.
- 3 Poppe K, Verbruggen CA, Velkeniers B, et al. Calcitonin reserve in different stages of atrophic autoimmune thyroiditis. *Thyroid*, 1999, 9: 1211-1214.
- 4 Oishi S, Shimada T, Tajiri J, et al. Elevated serum calcitonin levels in patients with thyroid disorders. *Acta Endocrinol (Copenhagen)*, 1984,

107: 476-481.

- 5 Body JJ, Demester-Mirkine N, Brokowski A, et al. Calcitonin deficiency in primary hypothyroidism. *Clin Endocrinol Metab*, 1986, 62: 700-703.
- 6 Body JJ. Calcitonin: from the determination of circulation levels in various physiological and pathological conditions to the demonstration of lymphocyte receptors. *Horm Res*, 1993, 39: 166-170.
- 7 Guyetant S, Wion Barrbot N, Rousselet MC. C-cell hyperplasia: retrospective quantitative study of 112 cases. *Hum Pathol*, 1994, 25: 514-521.
- 8 Libbey NP, Nowakowski KJ, Tucci J. C-cell hyperplasia of thyroid in a patient with goitrous hypothyroidism and hashimoto's thyroiditis. *Am Surg Pathol*, 1989, 13: 71-77.
- 9 Pantazi H, Papapetrou PD. Calcitonin levels are similar in goitrous euthyroid patients with or without thyroid antibodies as well as in hypothyroid patients. *Eur J Endocrinol*, 1998, 138: 530-535.

(收稿日期: 2003-08-26)