

荣骨颗粒对卵巢切除后骨质疏松大鼠骨形态计量的影响

许昕 王莒生 戚团结

【摘要】 目的 探索补肾中药荣骨颗粒对去势大鼠骨质疏松症的防治作用。方法 摘除大鼠双侧卵巢造成骨质疏松症模型,分别灌服大、中、小剂量的荣骨颗粒,并与己烯雌酚和骨疏康组作对照,3个月后,进行骨形态计量测定和分析。结果 大中剂量的荣骨颗粒能使切除卵巢大鼠骨小梁体积百分比显著增高,骨小梁吸收表面百分比、骨小梁形成表面百分比、活性生成表面百分比、骨小梁矿化率、类骨质平均宽度及骨皮质矿化率均明显降低。结论 大、中剂量的荣骨颗粒对卵巢切除后的大鼠骨质疏松症具有一定的治疗作用;小剂量荣骨颗粒无明显作用,而大剂量则优于中剂量组的治疗作用。

【关键词】 骨质疏松大鼠;骨形态计量;中药荣骨颗粒

Rong Gu Granules effect on to the histomorphometric analysis of ovariectomy osteoporotic rats. XU Xin, WANG Jusheng, QI Tuanjie. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, 100010 China

【Abstract】 Objective To study the effect of Rong Gu Granules in the treatment of Osteoporosis. **Methods** Seventy-nine Sprague-Dawley rats were randomly divided into seven group: one normal control group, one model group, three Rong Gu Granules treated groups and two positive groups. osteoporotic rat models were established by ovariectomy. After 3 months treatment, all animals were killed. The proximal tibia were processed to undercalcify sections for histomorphometric analysis. **Results** The ovariectomy rat osteoporosis model is the one that rate of bone resorption is larger than that of bone formation, and bone transformation become faster than before. Rong Gu Granules can make this situation reverse; bone mass indexes of Rong Gu Granules treated groups are larger than that of model group, meanwhile, the bone resorption indexes decrease and the bone formation indexes increase. **Conclusions** Rong Gu Granules can inhibit the bone loss and protect the bone. It exerts dual effect in restraining bone absorption and bone formation, It can also reduce bone transformation and increase bone mass.

【Key words】 Osteoporosis; Histomorphometric analysis; Rong Gu Granules

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是一种以骨量减少,骨显微结构改变而导致骨脆性和骨折危险性增加的骨代谢疾病^[1]。OP多发于老年人尤其是绝经后妇女,主要临床表现为胸背部和腰部疼痛、畸形与并发骨折。我院根据传统中医理论及现代中药研究成果,结合名老中医的临床经验制成复方中药制剂荣骨颗粒,在临床应用有效的基础上设计本实验方案,现将实验过程及结果报道如下。

材料和方法

1. 材料

(1)实验动物

选用Wistar大鼠(由中国医学科学院实验动物研究所提供,许可证号:SCXK11-00-0008)79只,体重200~220g,雌性,清洁级。大鼠饲养和实验均在中国中医研究院基础理论研究所清洁级实验动物室内进行(实验动物室许可证号:SYXK 11-00-0039)。

(2)药物与配制

药物:荣骨颗粒(由北京中医医院中心制剂室提供)、骨疏康冲剂(东港市康辰制药有限公司生产,批号:010303)、己烯雌酚(北京益民制药厂生产,批号:990404)。

配制方法:实验前,用蒸馏水将各组中西药物配制成以下浓度:荣骨颗粒分别为0.131g/ml、0.262g/ml、0.524g/ml;骨疏康冲剂0.131g/ml;己烯雌酚

0.0016 mg/ml。

(3) 主要试剂与仪器

试剂:盐酸四环素(由华美生物工程公司提供,批号:020061)、戊巴比妥钠(北京通县育才精细化工厂生产,批号:950427)、甲基丙烯酸甲酯(北京益利精细化学品有限公司,批号:960523)、邻苯二甲酸二丁酯(北京化学试剂公司,批号:970628)、过氧化苯甲酰(北京金友化学试剂有限公司,批号:20000420)。

仪器:德国 Reicheit-Jung 2040 切片机、日本 Olympus, BH-2 光学显微镜、德国 Leica 图像分析系统。

2. 方法

(1) 分组及处理

将 79 只大鼠随机分为 7 组:正常对照组 11 只,模型组 11 只,己烯雌酚组 12 只,骨疏康组 10 只,荣骨颗粒大剂量组(简称大剂量组)12 只,荣骨颗粒中剂量组(简称中剂量组)11 只,荣骨颗粒小剂量组(简称小剂量组)12 只。

模型制作:以 45 mg/kg 的戊巴比妥钠进行大鼠腹腔注射麻醉,腹位固定;在其最末肋骨下、腋中线与距脊柱外侧约 1 cm 之交叉处备皮去毛;以 70% 的酒精和碘酊消毒后切开局部皮肤、肌肉和腹膜,轻轻将白色发亮脂肪团拉出并分离,暴露卵巢,结扎卵巢下端输卵管,摘除卵巢;缝合切口,外敷消炎粉。同法摘除对侧卵巢。

切除卵巢 3 个月后,按照大、中、小剂量分别给大鼠灌胃,药液浓度依次为 0.524 g/ml、0.262 g/ml、0.131 g/ml 的荣骨颗粒 1 ml/100 g(体重),相当于人体 5.24 g/kg、2.62 g/kg、1.31 g/kg(体重);己烯雌酚组灌胃,药液浓度为 0.0016 mg/ml 的己烯雌酚 1 ml/100 g,相当于人体 0.016 mg/kg;药液浓度为 0.131 g/ml 的骨疏康 1 ml/100 g,相当于人体 1.31 g/kg。各组给药每天 1 次,连续 6 d 后,休息 1 d;重复上法给药直至 3 个月为止。正常对照组、模型组分别以等容积的蒸馏水同法、同期灌胃。

各组大鼠分别于处死前 18 d、前 3 d 腹腔注射盐酸四环素 30 mg/kg,对骨进行荧光标记。给药 3 个月后,处死所有大鼠取血和胫骨进行不脱钙骨切片。

(2) 不脱钙骨切片的制作及染色

取大鼠左侧近端 1/3 胫骨,去除软组织。用乙醇逐级脱水,二甲苯透明,每组各 2 次,每次 24 h。浸透液的配制:Ⅰ液:甲基丙烯酸甲酯 75 ml,邻苯二甲酸二丁酯 25 ml;Ⅱ液:在Ⅰ液的基础上加过氧化

苯甲酰 1 g;Ⅲ液:在Ⅰ液的基础上加过氧化苯甲酰 2.5 g。以上 3 液,用磁力搅拌器充分搅匀。标本在Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ液各浸透 36 h。在青霉素小瓶中注入Ⅲ液约 5 ml,将标本按同一方向放入瓶中,然后置入 40℃ 烘箱聚合 3~4 d,待变为无色透明的坚硬包埋块后碎瓶,取出包埋块。修块后,在 Reicheit-Jung 2040 切片机上用钨钢刀分别切出 5 μm 和 10 μm 的纵向不脱钙骨切片。其中 5 μm 切片用二甲苯溶掉树脂后梯度乙醇脱水,用于甲苯胺染色。10 μm 切片用于荧光观察。

(3) 骨组织形态计量学指标的测定

按照章明放等^[1]的方法,采用 Leica Qwin 图像分析系统进行骨组织形态计量。

骨小梁组织形态计量:骨小梁体积百分比(TBV%):骨小梁体积占被测骨髓腔总体积的百分比,是骨量水平的主要标志;骨小梁吸收表面百分比(TRS%):不规则、凹凸不平的骨小梁表面占骨小梁表面的百分比;骨小梁形成表面百分比(TFS%):有成骨细胞被覆的类骨质表面占骨小梁表面的百分比;活性生成表面百分比(AFS%):有荧光标记带的骨小梁表面占骨小梁表面的百分比;骨小梁矿化率(MAR):骨小梁表面荧光双标记带的平均距离除以两次标记相隔的天数。

皮质内表面形态的计量:

类骨质平均宽度(OSW):皮质内表面类骨质的平均宽度;骨皮质矿化率(mAR):皮质内表面双标记带的平均距离除以两次标记相隔的天数。

(4) 统计学处理

计量结果皆以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析进行检验。

结 果

1. 荣骨颗粒对去卵巢大鼠胫骨 TBV% 的影响

与正常组比较,模型组、己烯雌酚组、骨疏康组及荣骨颗粒大、中、小剂量组的大鼠胫骨 TBV% 均显著降低;与模型组比较,己烯雌酚组、骨疏康组及荣骨颗粒大、中剂量组的 TBV% 均显著增高;与己烯雌酚组比较,骨疏康组、荣骨颗粒大、中、小剂量组的 TBV% 均显著降低。荣骨颗粒组间比较,大、中剂量组之间差异无统计学意义,但二者均显著高于小剂量组,见表 1。

2. 荣骨颗粒对去卵巢大鼠胫骨 TRS% 的影响

模型组、骨疏康组及荣骨颗粒大、中、小剂量组的大鼠胫骨 TRS% 较正常对照组均显著升高;与模

型组比较,己烯雌酚组、骨疏康组及荣骨颗粒大、中剂量组的 TRS% 皆显著降低;与己烯雌酚组比较,骨疏康组、荣骨颗粒大、中、小剂量组的 TRS% 虽然均显著增高,但荣骨颗粒大、中剂量组的 TRS% 较骨疏康组明显降低。荣骨颗粒大、中剂量组明显低于小剂量组,但前二者之间差异无统计学意义,见表 2。

表 1 各组大鼠胫骨 TBV% 的变化

组别	大鼠数(只)	TBV%
正常对照组	11	33.41 ± 4.87
模型组	11	14.23 ± 2.88**
己烯雌酚组	12	27.49 ± 4.32***△△
骨疏康组	10	17.64 ± 2.67***△△△
大剂量组	12	22.06 ± 3.26***△△△△△
中剂量组	11	19.19 ± 3.31***△△△△
小剂量组	12	15.54 ± 2.87***△△△△△

注:与正常组比较** P < 0.01;与模型组比较△ P < 0.05,△△ P < 0.01;与己烯雌酚组比较*** P < 0.01;与骨疏康组比较△△ P < 0.05;△△△ P < 0.01;与大剂量组比较△△△ P < 0.01;与中剂量组比较△△△△ P < 0.01;见表 2,3,4,5

表 2 各组大鼠胫骨 TRS% 的变化

组别	大鼠数(只)	TRS%
正常对照组	11	2.94 ± 0.90
模型组	11	10.19 ± 1.94**
己烯雌酚组	12	3.43 ± 1.03△△
骨疏康组	10	8.20 ± 1.86***△△△
大剂量组	12	5.22 ± 1.76***△△△△△
中剂量组	11	6.25 ± 1.71***△△△△△
小剂量组	12	8.80 ± 1.49***△△△△△

3. 荣骨颗粒对去卵巢大鼠胫骨 TFS%、AFS% 和 MAR 的影响

与正常对照组比较,模型组、骨疏康组及荣骨颗粒大、中、小剂量组的大鼠胫骨 TFS% 均明显增高;己烯雌酚组、骨疏康组及荣骨颗粒大、中剂量组的 TFS% 较模型组皆显著降低;与己烯雌酚组比较,骨疏康组及荣骨颗粒大、中、小剂量组的 TFS% 虽然均显著增高,但荣骨颗粒大剂量的 TFS% 明显低于骨疏康组。荣骨颗粒组间比较,大剂量组明显低于中、小剂量组,但后二者之间比较,差异无统计学意义,见表 3。

模型组、骨疏康组及荣骨颗粒大、中、小剂量组的大鼠胫骨 AFS% 较正常对照组皆显著增高。与模型组比较,己烯雌酚组、荣骨颗粒大剂量组的 AFS% 显著下降,其中剂量组有下降的趋势,但无统计学意义;骨疏康组、荣骨颗粒大、中、小剂量组的 AFS% 虽均显著高于己烯雌酚组,但荣骨颗粒大剂量组的 AFS% 比骨疏康组明显降低,而中、小剂量组则差异

无显著性。荣骨颗粒组间比较,大剂量组显著低于小剂量组,而大、中剂量组间,以及中、小剂量组间比较则差异无统计学意义。

表 3 各组大鼠胫骨 TFS% 的变化

组别	大鼠数(只)	TFS%
正常对照组	11	3.71 ± 1.09
模型组	11	11.32 ± 2.18**
己烯雌酚组	12	4.16 ± 1.00△△
骨疏康组	10	8.68 ± 2.10***△△△
大剂量组	12	6.31 ± 1.57***△△△△△
中剂量组	11	8.35 ± 1.99***△△△△△
小剂量组	12	9.57 ± 2.15***△△△△△

与正常对照组比较,模型组、骨疏康组及荣骨颗粒大、中、小剂量组大鼠的 MAR 皆显著增高,己烯雌酚组、骨疏康组及荣骨颗粒大、中剂量组的 MAR 明显低于模型组;荣骨颗粒小剂量组与模型组比较,差异无统计学意义;与己烯雌酚组比较,骨疏康组、荣骨颗粒中、小剂量组的 MAR 虽然明显增高,但与大剂量组之间差异无统计学意义。荣骨颗粒大、中剂量组的 MAR 明显低于骨疏康组,而小剂量组差异无统计学意义。荣骨颗粒组间比较,大、中剂量组的 MAR 显著低于小剂量组;但前二者比较,无统计学意义。以上结果见表 4。

表 4 各组大鼠胫骨 AFS% 和 MAR 的变化

组别	大鼠数(只)	AFS%	MAR(μm/d)
正常对照组	11	7.64 ± 3.00	0.93 ± 0.26
模型组	11	27.45 ± 5.65**	2.09 ± 0.31**
己烯雌酚组	12	7.29 ± 3.13△△	1.15 ± 0.27△△
骨疏康组	10	24.12 ± 5.00***	1.73 ± 0.29***△△△
大剂量组	12	18.64 ± 4.64***△△△△△	1.26 ± 0.24***△△△△△
中剂量组	11	22.37 ± 5.78***	1.42 ± 0.22***△△△△△
小剂量组	12	27.08 ± 5.90***△△	1.83 ± 0.33***△△△△△

4. 荣骨颗粒对去卵巢大鼠胫骨 OSW 和 MAR 的影响

除己烯雌酚组与正常对照组比较差异无统计学意义外,其他各组大鼠的 OSW 皆明显增高。与模型组比较,己烯雌酚组和荣骨颗粒大剂量组的 OSW 明显下降,其余各组则无显著性差异。荣骨颗粒 3 组间比较,差异无统计学意义。模型组、骨疏康组及荣骨颗粒大、中、小剂量组大鼠的 MAR 均显著高于正常对照组。与模型组比较,己烯雌酚组和荣骨颗粒大、中剂量组的 MAR 明显降低,而骨疏康组和荣骨颗粒小剂量组差异无统计学意义。荣骨颗粒组间比较,大、中剂量组显著低于小剂量组;但前二者比较,

差异无统计学意义。以上结果见表5。

表5 各组大鼠胫骨 OSW 和 MAR 的变化

组别	大鼠数(只)	OSW(μm)	MAR($\mu\text{m}/\text{d}$)
正常对照组	11	10.34 ± 2.99	1.46 ± 0.30
模型组	11	17.60 ± 3.41**	2.38 ± 0.44**
己烯雌酚组	12	12.69 ± 3.59 ^{△△}	1.27 ± 0.29 ^{△△}
骨疏康组	10	14.69 ± 3.36**	2.09 ± 0.37***
大剂量组	12	13.76 ± 3.17 [△]	1.87 ± 0.34** ^{△△**}
中剂量组	11	14.76 ± 3.03**	1.93 ± 0.42** ^{△△**}
小剂量组	12	15.73 ± 3.59**	2.46 ± 0.44*** ^{△△△▲▲}

讨 论

肾虚不足,骨失所养,是骨质疏松症发生的主要病机。《素问·宣明五气论》篇曰:“肾主骨”,《素问·阴阳应象大论》曰:“肾主骨髓”、“在体为骨”。《素问·六节脏象论》:又言“肾者,主蛰,封藏之本,精之处也,其华在发,其充在骨”。说明肾与骨有着密切的关系,肾之精气充足,则骨骼发育正常,骨质致密。若肾之精气不足,则髓枯骨痿,骨质疏松。荣骨颗粒的组成主要为仙灵脾、补骨脂、知母、黄柏等,其立法主要以补肾为主,兼清热泻相火,更适合绝经后妇女肾虚不足、虚中有热的生理病理特点,故用于临床初见疗效。

大量实验研究表明,补肾中药具有促进骨形成和抑制骨吸收,降低骨转换率,提高骨质量的作用^[3];并可促进骨质疏松大鼠的肠钙吸收^[4],具有促性激素或类性激素样作用^[5,6],以及抑制破骨细胞增殖分化^[7,8],调节微量元素平衡^[9]等。补肾中药尚可使脑组织总胆固醇、总磷脂含量及二者比值降低,提高去甲肾上腺素含量,通过延缓脑组织老化改变中枢神经递质水平,达到防治骨质疏松的目的^[9]。

本实验进一步从骨形态计量学的角度,更直观地证实了补肾中药荣骨颗粒对骨质疏松症的治疗作

用。骨组织形态计量学研究结果显示,切除大鼠卵巢后作为骨量主要标志的胫骨 TBV% 显著降低,而代表骨吸收参数的 TRS% 以及代表骨形成参数的 TFS%、AFS%、MAR、OSW 和 MAR 皆显著增高,显示卵巢切除所造成的是一种骨吸收大于骨形成的高转换型骨质疏松模型,己烯雌酚可明显抑制这一过程,这与绝经后妇女骨质疏松症的发病机理是一致的,也与国内外的报道相一致。大、中剂量的荣骨颗粒,能使上述指标发生逆转,即使 TBV% 明显增高,使 TRS% 及 TFS%、AFS%、MAR、OSW、MAR 均明显降低;小剂量组上述指标未发生明显变化。实验结果表明:大、中剂量的荣骨颗粒对卵巢切除所致的大鼠骨质疏松症具有一定的治疗作用;补肾中药荣骨颗粒能够防治骨质疏松症,其作用机理需要进一步研究验证。

参 考 文 献

- 1 Fleish H. Pathophysiology of Osteoporosis. Bone Mineral, 1993, 22(Suppl):S3.
- 2 章明放,张乃鑫,谭郁彬. 运动对雌性大鼠去势后骨质疏松症的作用. 中华骨科杂志, 1994, 14:365-369.
- 3 黄海,成翌,朱杭,等. 补肾中药防治去势大鼠骨丢失的组织学机理研究. 浙江中医学院学报, 2001, 25:52-54.
- 4 刘和娣,李恩,刘崑,等. 补肾中药对骨质疏松大鼠 LaBp - D₉K 基因及表达的影响. 中国骨质疏松杂志, 1996, 2(3):62-64.
- 5 穆刚,王平,穆妍健,等. 补肾强身丸治疗骨质疏松的临床研究. 中国中医骨伤科杂志, 2001, 9:21-22.
- 6 沈培芝,陈东煜,张戈,等. 补肾方防治地塞米松致雄性大鼠骨质疏松及其生化机制探讨. 中国中西医结合杂志, 1998, 18:290-292.
- 7 陈坤,于世凤,史凤芹,等. 黔岭藿对体外培养的破骨细胞作用的影响. 中国骨质疏松杂志, 1996, 2(3):59-61.
- 8 崔家鹏,郑洪新,刘景峰. 补肾中药对肾虚骨质疏松症大鼠红细胞膜 PKC, Ca²⁺ - Mg²⁺ - ATP 酶活性影响的实验研究. 中国骨质疏松杂志, 1997, 3(3):66-69.
- 9 于佳音,郑洪新,林庶茹. 补肾对去势大鼠神经内分泌调节作用的实验研究. 中国骨质疏松杂志, 2001, 7:285.

(收稿日期:2004-04-12)

(上接第 373 页)

- 24 邓伟民,贺杨淑,冯永佳. 补肾壮骨汤治疗绝经后骨质疏松症的临床研究. 中国中医药科技, 1997, 4(2):70-72.
- 25 王小云,徐珉,张春玲. 补肾益骨膏治疗更年期妇女骨质疏松症的临床观察. 广州中医药大学学报, 1998, 15(2):84-87.
- 26 王小云,张春玲,莫莉莉. 补肾健脾中药对围绝经期妇女骨代谢和雌激素的影响. 广州中医药大学学报, 2000, 17:230.

- 27 邓伟民,沈有高,贺杨淑. 补肾壮骨颗粒对绝经早期妇女性激素及骨代谢的影响. 广州中医药大学学报, 2001, 18:301-303.
- 28 朱立群,刘英华,周荫保,等. 补肾活血中药治疗中老年女性甲亢患者骨代谢紊乱的临床研究. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(8):467-469.
- 29 刘振义,汤淑英,陶兴华. 益肾膏治疗中老年女性甲亢患者骨代谢紊乱的临床研究. 湖南中医学报, 1998, 4(8):24-25.

(收稿日期:2004-01-18)