

淫羊藿总黄酮对去除卵巢大鼠股骨头作用的扫描电镜观察与图像分析

濮祖茂 李勇 李晶晶 季晖

摘要: **目的** 探讨淫羊藿总黄酮对去除卵巢大鼠骨质疏松防治作用。**方法** 对股骨头组织形态进行了扫描电镜观察和图像分析。**结果** 应用淫羊藿总黄酮治疗的大鼠骨小梁拱桥形结构有明显改善,骨小梁拱桥形结构恢复其圆形或卵圆形,骨小梁间的距离变小、骨小梁直径增粗、骨表面较平整光滑。与用尼尔雌醇(E_2)的治疗效果相似。**结论** 从骨组织形态上证明淫羊藿总黄酮确具抗骨质疏松症的作用。

关键词: 骨质疏松;淫羊藿总黄酮;扫描电镜;骨形态学

Study of effects of Epimedium Pubescen Flavonoid on femur of rat after ovariectomy PU zumao, LI Yong, LI Jingjing, et al. Pharmaceutical University of China, Naging 210009, China

Abstract: Objective To explore the effect of Epimedium Pubescen Flavonoid (EPF) on preventing and treating the osteoporosis of rat after ovariectomy. **Methods** The histomorphometry and image analysis were performed. **Results** After treatment with EPF, the arch-like structure in bone trabecula was improved, significantly and changed into round or oval. The distance between bone trabeculae changed into less and the diameter of them became thicker. The surface of bone became smooth. The effect of EPF was similar to that of nylestriol in control. **Conclusion** EPF has the effect resisting osteoporosis.

Key words: Osteoporosis; Epimedium Pubescens Flavonoids; Electron microscope; Bone histomorphometry

骨质疏松症(OP)是单位体积内骨量减少,骨组织显微结构异常,骨脆性增加而引发骨折的一种疾病。临床主要表现为周身骨骼疼痛,体态变形和骨折等症状。淫羊藿是我国传统的补肾壮骨中药,现代药理研究证明淫羊藿具有促进骨组织蛋白质合成及促进骨髓细胞生长等作用^[1]。在临床上许多治疗骨质疏松的方剂中均以淫羊藿为主药。本研究通过观察淫羊藿总黄酮对大鼠股骨形态学的影响,了解其在恢复骨结构方面的作用,探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物

Sprague-Dawley 清洁级大鼠,雌性6月龄,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物质量合

格证号:医动字第02-49-3号(上海医学实验动物管理委员会颁发)。饲养1w后使用。

饲养条件: 各组大鼠分笼饲养,自由摄取标准大鼠颗粒饲料,饮用自来水,室温(18 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,每周称体重一次。

1.1.2 药品

淫羊藿总黄酮:含量为62.5%,商品名:骨密宁,批号:G011003,浙江佐力药业有限公司。

尼尔雌醇(Nylestriol):商品名:维尼安,批号:010801,上海华联制药有限公司。

骨疏康:批号:000402,东港市康辰制药有限公司。

乌拉坦(氨基甲酸乙酯):批号880328,曹阳第二中学化工厂。

1.1.3 仪器

SX-40 扫描电子显微镜,日本明石公司;H66005 超声波清洗机,无锡超声电子设备厂;CMIAS-98A 型图像分析仪,北京航空航天大学。

作者单位:210009 南京,中国药科大学

通讯作者:濮祖茂,Email: puzumao@sina.com

1.2 方法

1.2.1 分组给药

雌性大鼠以20%乌拉坦1g/kg腹腔注射麻醉后,俯位固定,在背部脊柱两侧切口,于无菌条件下摘除双侧卵巢作为骨质疏松症模型大鼠;假手术组双侧切除一小块脂肪作为对照组。5d后取存活健康大鼠,随机分组,每组6只,分别经口给予以下药物。

假手术组(sham):0.5%羧甲基纤维素-钠(CMC-Na)溶液10ml/(kg·d);病理模型组(model):0.5%CMC-Na溶液10ml/(kg·d);阳性对照药组(E₃):尼尔雌醇1mg/kg,每周给药2次;阳性对照药组(GSK):骨疏康4g/(kg·d);受试药低剂量组(E_{PF-L}):淫羊藿总黄酮75mg/(kg·d);受试药中剂量组(E_{PF-M}):淫羊藿总黄酮150mg/(kg·d);受试药高剂量组(E_{PF-H}):淫羊藿总黄酮300mg/(kg·d)。

药物淫羊藿总黄酮的配制:将淫羊藿总黄酮溶于1%量的酒精中然后与羧甲基纤维素-钠液混匀。连续给药3个月。

1.2.2 扫描电镜样品制备

大鼠处死后,取同一侧股骨头置4%戊二醛溶液中固定数日,用牙科金刚石锯将股骨头矢面锯开,取其一片,经清洗,10%次氯酸钠溶液中浸泡6h,超声清洗15min,乙醇梯度脱水f,乙醚浸泡,空气干燥,IB-3型离子溅射仪镀金,SX-40扫描电

镜观察,加速电压20kV。

1.2.3 图像定量分析

图像分析是应用计算机技术和数学形态学方法,能较客观精确地用数据表达图像信息。本研究取统一放大倍率(80×)下进行,测试范围1.6×1.1mm²在统计场中满屏,目标面积为骨髓腔面积。骨髓腔面积的几何形态参数测量通过像素点进行,所有像素点长宽一致。通过校正测量,可得每个像素点的实际面积。骨髓腔内所有像素点之和的实际面积为: $P = K \sum_{i=1}^n L$,P:骨髓腔面积;K:每个像素代表的实际面积;L:骨髓腔内的像素点数。经CMLAS-98A图像分析仪分别对扫描电镜拍摄的照片进行骨面积百分比分析。

1.2.4 统计学方法

电镜测量各组大鼠股骨头骨小梁直径,所测结果均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组均数之间的比较,采用t检验。

2 结果

卵巢切除后的大鼠股骨头小梁间连接严重破坏,失去原来三维网架结构^[2]。松质骨结构的改变表现为进行性,骨小梁迅速变细、中断、被吸收仅有少量骨小梁残留,见表1。

表1 大鼠股骨头扫描电镜形态分析和骨小梁宽度、骨面积百分比计量学分析($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	骨小梁拱桥结构	骨表面形态	骨小梁平均直径	骨面积百分比
Sham	6	呈卵圆形或梭形,间隙较小	较平整,较光滑	105.00±13.78**	0.86±0.03**
Model	6	呈狭长卵圆形或狭长梭形,间隙较大	不平整,不光滑	35.00±6.78 t=11.16	0.64±0.03 t=12.90
E ₃	6	呈卵圆形或梭形,间隙较小	较平整,较光滑	100.33±5.13** t=18.83	0.85±0.04** t=9.49
GSK	6	呈卵圆形或梭形,间隙较小	较平整,较光滑	108.00±8.43** t=16.60	0.86±0.02** t=13.86
E _{PF-L}	6	呈狭长卵圆形或长梭形,间隙较大	不平整,不光滑	53.67±17.36* t=2.45	0.65±0.06 t=0.66
E _{PF-M}	6	呈卵圆形或梭形,间隙较小	较平整,较光滑	96.00±6.69** t=15.68	0.82±0.04** t=8.58
E _{PF-H}	6	呈卵圆形或梭形,间隙较小	较平整,较光滑	104.00±8.98** t=15.01	0.83±0.06** t=7.54

注:与model组比较,*P<0.05;**P<0.001.

2.1 骨小梁形态学分析

Sham组骨小梁的拱桥形结构呈圆形、卵圆形或梭形(图1, 1a、1b), 骨表面较平整(图1, 1c)。Model组骨小梁的拱桥形结构呈长卵圆形或狭长梭形(图1, 2a、2b), 骨髓腔变大, 骨表面不平整(图1, 2c)。E₃、GSK组骨小梁的拱桥形结构呈

圆形、卵圆形或梭形(图1, 3a、3b; 图1, 4a、4b), 骨表面较平整(图1, 3c、4c)。EFP-L组呈长卵圆形或狭长梭形(图2, 1a、1b), 骨表面较不平整(图2, 1c)。EFP-M、EFP-H组骨小梁的拱桥形结构呈圆形、卵圆形或梭形(图2, 2a、2b; 3a、3b), 骨表面较平整(图2, 2c、3c)。

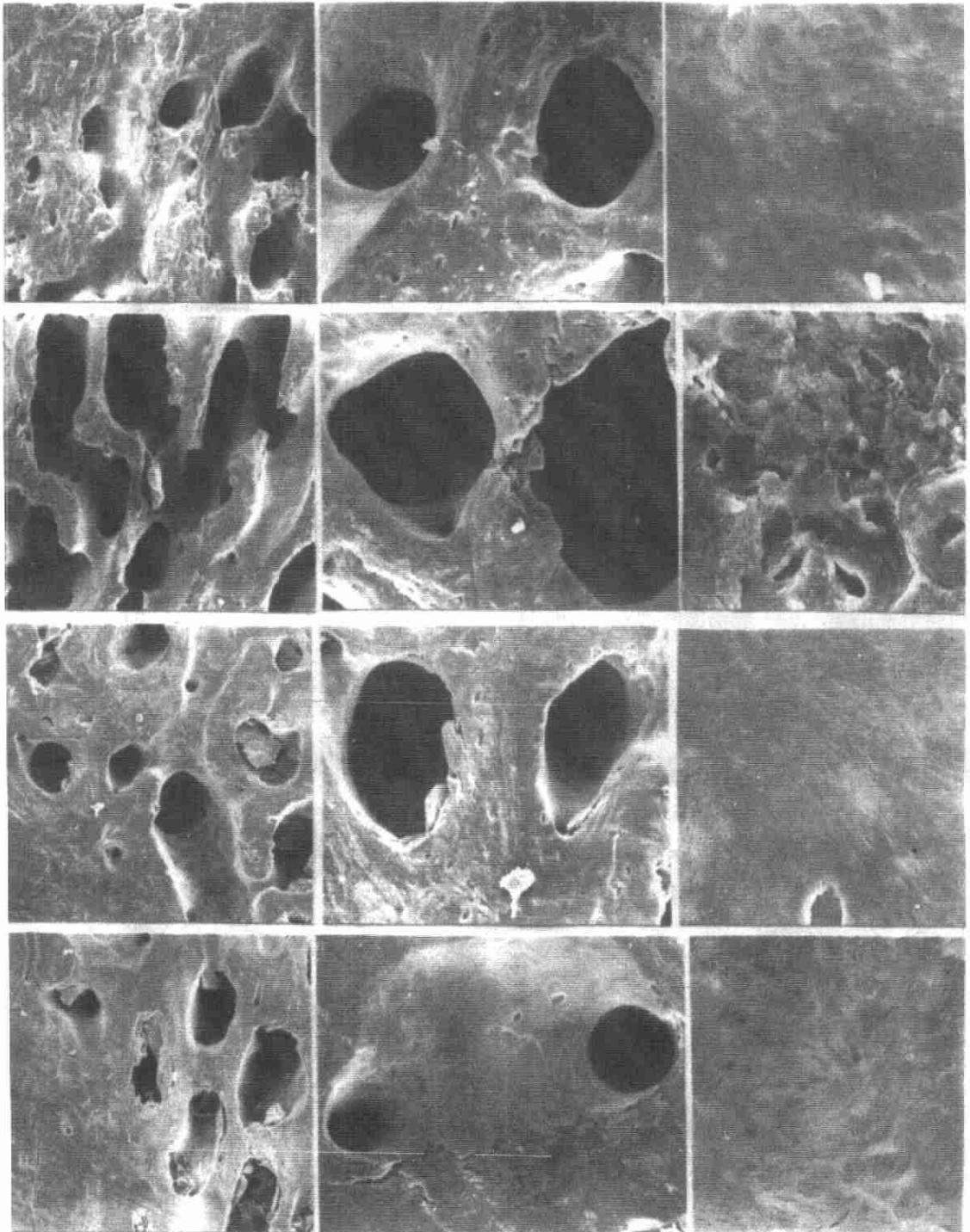


图1 大鼠股骨头 SEM 照片

1. Sham组 2. Model组 3. E₃组 4. GSK组

a. 剖面图: bar-125μm; b. 骨小梁: bar-33μm; c. 骨表面 bar-10μm

1a	1b	1c
2a	2b	2c
3a	3b	3c

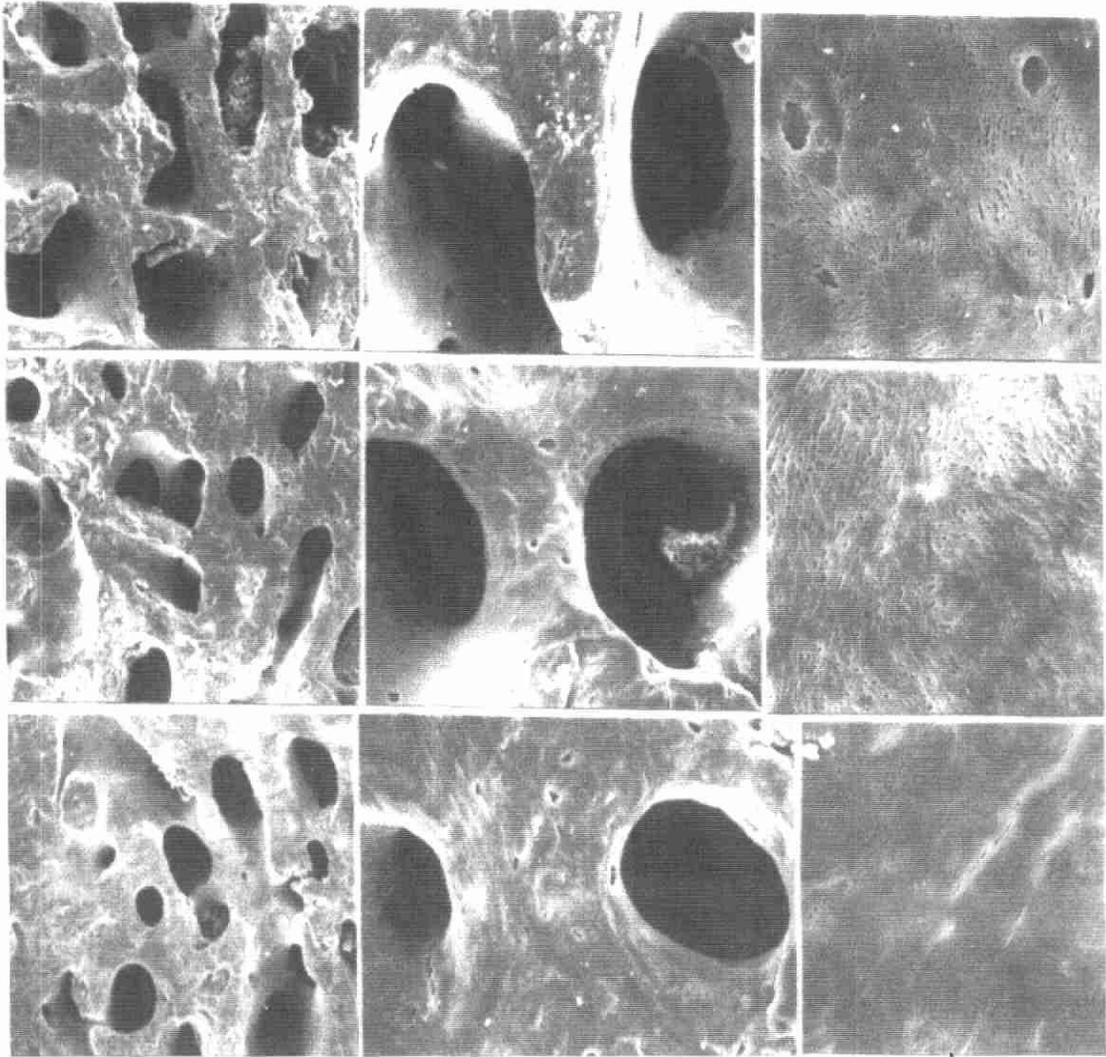


图2 大鼠股骨头 SEM 照片

1. EPF-L 组 2. EPF-M 组 3. EPF-H 组

a. 剖面图: bar-125 μ ; b. 骨小梁: bar-33 μ ; c. 骨表面: bar-10 μ

1a	1b	1c
2a	2b	2c
3a	3b	3c

2.2 对骨小梁平均直径 (MTT) 的影响

由表 3 可见 sham 组骨小梁平均宽度较粗, 而 model 组骨小梁平均宽度较细, 与模型组比较, 给予淫羊藿总黄酮低剂量组较 model 组骨小梁平均宽度增粗不明显 ($P < 0.05$), 而淫羊藿总黄酮中、高剂量组、E₃ 组、GSK 组的 MTT 均较模型组明显增粗 ($P < 0.001$).

2.3 对骨面积百分比 TS% 的影响

见表 1 和图 3, 由于去除卵巢模型组大鼠骨质丢失较多, 小梁间隙明显增大, 骨小梁壁变薄, 因而骨面积百分比 TS% 下降 ($P < 0.001$), 见图 4.

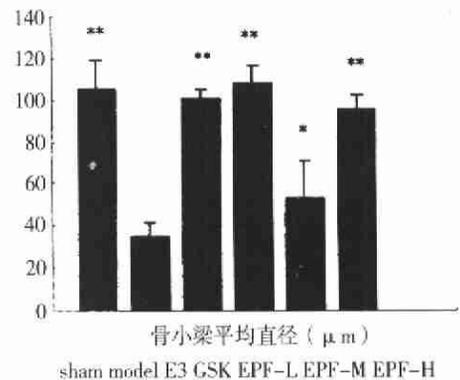


图3 对骨小梁平均直径 (MTT) 的影响 * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs Model

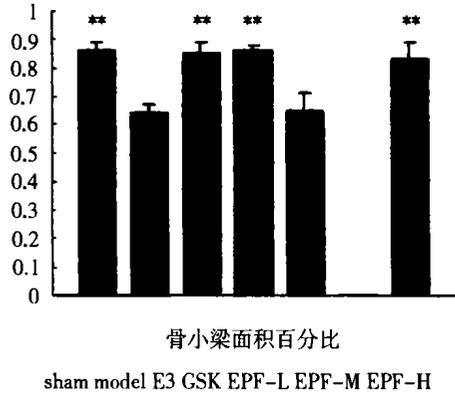


图4 对骨面积百分比 Ts%的影响 ** P<0.001 vs Model

3 讨论

骨的微细结构直接影响骨的材料力学性能^[3], 骨小梁呈网状立体结构, 这种立体结构的骨承受压力的能力很大。骨的几何形态决定了骨的力学特性, 骨小梁的变化就能使骨的强度明显下降^[4]。Frost^[5]认为显微骨折可以是正常生理性活动的结果。但大量发生并超过“生理”水平时即可发生疲劳骨折或增加骨折的危险。当发生骨质疏松时, 显微骨折的修复功能降低, 造成显微骨折的积累, 在受到轻微外力时即可产生骨折, 这可能就是骨质疏松并发症的重要原因。

骨形态学是评价骨转换与骨结构的有效手段, 而计量学能对松质骨进行客观的定量分析, 并能反映骨的力学性能变化。

本研究表明, 切除卵巢后大鼠股骨头骨小梁明显变细, 甚至部分小梁中断而逐渐被吸收, 使拱桥形结构从卵圆形变为狭长卵圆形或长梭形, 骨小梁表面粗糙, 骨小梁面积百分比较正常对照组显著降低, 骨小梁的三维网架结构被破坏, 以上变化导致质骨的整体力学强度下降。在骨生物力学的研究中, 模型组最大载荷、最大曲应力均较正常对照组

降低, 这表明了抗拉能力、抗弯能力下降也得到证实^[6]。淫羊藿总黄酮高中低剂量组的最大载荷弯曲弹性模量及抗弯刚度均较模型组有升高趋势。在model大鼠连续给予淫羊藿总黄酮3个月后其骨小梁结构恢复了圆形或卵圆形拱桥结构(骨小梁直径增粗, 且骨表面较光滑)。说明淫羊藿总黄酮能防止大鼠切除卵巢后骨质的丢失和改善骨生物力学(抗拉能力、抗弯能力)性能。

淫羊藿是传统壮肾壮骨中药, 其主要化学成分为黄酮与多糖。现代药理研究证明, 淫羊藿能增强下丘脑-垂体-性腺轴及肾上腺皮质轴、胸腺轴等内分泌系统的激素样作用, 能促进骨髓细胞DNA合成, 促进组织蛋白质合成及促进骨细胞生长等作用, 对破骨细胞有直接的抑制作用^[7], 因而能对抗动物去卵巢、去睾丸及长期大剂量服用肾上腺皮质激素所引起的骨质疏松症, 有促进骨形成防止骨丢失, 升高骨密度, 改善骨生物力学性能和骨小梁形态结构的作用。

【参考文献】

- [1] 季晖, 刘康, 龚晓健, 等. 淫羊藿总黄酮对摘除卵巢大鼠骨质疏松症的防治作用. 中国骨质疏松杂志, 2001, 7: 4-8.
- [2] 阎景龙, 戴尅戎, 裘世静. 卵巢切除和固定对大鼠松质骨的影响. 中华骨科杂志, 1995, 15: 273-274.
- [3] Martin RB. Determinants of the mechanical properties of bone. J Biomech, 1991, 24 (Suppl 1): 79-88.
- [4] Baji CM, Miller SC, Bovnmn BM, et al. differences in cortical bone in overloaded and under loaded femurs from ovariectomized rats: comparison of bone morphometry with torsional testing. Bone, 1992, 13: 35-40.
- [5] Frost HM. The pathomechanics of osteoporosis. Clin Orthop, 1985, 200: 198-225.
- [6] 崔伟, 刘成林. 基础骨生物力学(二). 中国骨质疏松杂志, 1998, 4: 90-92.
- [7] 陈坤, 于世凤, 史风芹, 等. 黔岭藿对体外培养的破骨细胞作用的研究. 中国骨质疏松杂志, 1996, 2 (3): 59-61.

(收稿日期: 2004-08-12)