

中药骨康对去卵巢大鼠腰椎骨形态计量学的影响

罗毅文 李爽 程英雄 黄宏兴

摘要：目的 探讨中药骨康对卵巢切除大鼠骨质疏松症的治疗作用。方法 选择 6 月龄 SD 大鼠 48 只，随机分为假手术模型组(Sham)、手术模型组(OVX)、尼尔雌醇组(E_2)、中药骨康组。切除大鼠卵巢 3 月后，大鼠骨质疏松症模型制备成功，分别给予尼尔雌醇、中药骨康灌胃治疗，并与 Sham 组和 OVX 组对照。治疗 3 月后，体内双荧光标记，取第 2 腰椎包埋切片，全自动图像分析及松质骨骨形态计量学软件处理，观察中药对骨形态计量学参数的影响。结果 卵巢切除后大鼠骨小梁面积百分数(% Tb.Ar)下降 35.84%，骨小梁数量(Tb.N)下降 16.60%，骨小梁宽度(Tb.Th)下降 25.79%，表明绝经后骨质疏松症动物模型成立。骨康治疗 3 个月，与 OVX 组相比，Oc.N/mm² 下降 42.80%，有显著性差异($P < 0.01$)；%Tb.Ar、Tb.Th、Tb.N 和 MAR 有上升趋势($P > 0.05$)；Tb.Sp、%L.Pm、BFR/BS、BFR/TV 和 Oc.N/mm、BFR/BV 有下降趋势($P > 0.05$)。结论 中药骨康具有降低骨转换以及促进骨形成和抑制骨吸收的双重作用，说明中药骨康对骨质疏松有明显的治疗作用。

关键词：中药；大鼠；卵巢切除术；骨组织形态计量学；骨质疏松症

Effect of Chinese herbal medicine (Gukang) on histomorphology of lumbar vertebra in ovariectomized rats LUO Yiwu, LI Shuang, CHENG Yingxiong, et al. The Affiliated Orthopedics Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510240, China

Abstract : Objective To explore the therapeutic effects of Chinese herbal medicine (Gukang) on osteoporotic ovariectomized(OVX) rat model. **Methods** Forty-eight femal 6-month-old SD rats were randomized into four groups (12 for each) :the sham-operating group, ovariectomized (OVX) group, E_2 treated group and Gukang group. All rats in the later three groups were ovariectomized, and the model of osteoporosis was established 3 months after. The later two groups were given E_2 and Gukang respectively. And 3 months after the intervention, double *in vivo* fluorochrome labeling was administered to all rats. At the end of study, the undecalcified second lumbar vertebra sections were cut and stained with Masson-Goldner Trichrome for bone histomorphometric analysis.

Results Compared with the sham group, remarkable reduction of the percentage of Tb.Ar (– 35.84%), Tb.N (– 16.60%), Tb.Th (25.79%) was found in the OVX rats ($P < 0.01$). After 3-month therapy, Oc.N/mm² decreased (– 42.80%) significantly in rats treated with Gukang compared with the OVX group ($P < 0.01$). In Gukang group, an increase of Tb.Ar, Tb.Th, Tb.N and MAR and decrease of Tb.SP, %L.Pm, BFR/BS, BFR/TV and Oc.N/mm were observed ($P > 0.05$). **Conclusions** Chinese herbal medicine (Gukang) may decrease the bone turnover to improve bone quality and has double effects in restraining bone absorption and promoting bone formation. Gukang is effective in treatment of osteoporosis.

Key words : Chinese herbal medicine ; Rat ; Ovariectomy ; Histomorphometry ; Osteoporosis

骨组织形态计量学是基于体视学技术发展而逐步发展起来的、研究骨重建的细胞和组织机制的一种较直接、细微的方法。它可直接观察骨组织水平

的微观形态,并可进行定量分析,通过四环素等标记提供骨组织动态的变化信息。在骨质疏松的研究中已经成为一项不可缺少的基本技术,无论在疾病的发生机理研究,还是在药物疗效的评价中都有着广泛的应用价值^[1,2]。本研究旨在通过观察中药骨康对去卵巢大鼠骨组织形态计量学各指标的影响,探

作者单位：510240 广州,广州中医药大学附属骨伤科医院(罗毅文、黄宏兴) 广州中医药大学(李爽、程英雄)

通讯作者：罗毅文, Email ilyw921@yahoo.com.cn

讨论中药治疗骨质疏松的作用机理。

1 材料和方法

1.1 材料

6 月龄清洁级健康雌性 SD 大鼠 48 只,体重 275 ± 20 g (由广州中医药大学实验动物中心提供,合格证号 2003 A 010)。随机分为 4 组,每组 12 只,分别为假手术模型组 (Sham)、手术模型组 (OVX)、尼尔雌醇治疗组 (E_2)、中药骨康治疗组。所有大鼠均饲养在恒温、恒湿的清洁环境中,环境温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,湿度为 70%,每天 12 h 光照/黑暗,任意进食饲养者提供的大鼠标准饲料和自来水。

1.2 方法

1.2.1 药物制备:中药骨康由淫羊藿、补骨脂、丹参、黄芪等 10 味中药组成,其提取的药物,含生药量 1.43 g/mL (由广州中医药大学附属骨伤科医院制剂室提供)。

1.2.2 模型制作:用 10% 水合氯醛溶液按 0.33 mL/100 g 腹腔注射麻醉,Sham 组行假手术,采用背侧入路,切除少量脂肪组织后立即关闭伤口。其余各组均采用同样的手术入路,摘除双侧卵巢,进行手术造模。

1.2.3 治疗方法:各组大鼠术后正常饲养满 3 m 后,Sham 组、OVX 组按 10 mL/kg 蒸馏水灌胃,骨康组灌服中药骨康溶液,药物以蒸馏水定容至所需浓度,即 10 mL/kg 灌服给药,每日 1 次; E_2 组给予尼尔雌醇 1 mg/kg 灌胃,使用前配成混悬液 (浓度为 0.167 mg/mL),1 次/周,其余时间给予蒸馏水 10 mL/kg 灌胃。共给药 3 个月。所有大鼠在处死前 13、14 d 及 3、4 d 分别于其背部皮下注射盐酸四环素 25 mg/kg 和钙黄绿素 (Calcein) 5 mg/kg 进行荧光标记^[3]。

1.2.4 标本制作 实验中因罐胃给药误入气管导致骨康组大鼠死亡 2 只,Sham 组大鼠死亡 1 只,剩余动物采用断头方法处死,留取第 2 腰椎,按文献^[3]的方法进行固定、脱水、不脱钙硬组织包埋。骨块用硬组织切片机 (Leica 2155, German) 切成 4 μm 和 10 μm 厚切片。

1.2.5 测量项目:4 μm 片以 Masson-Goldner Trichrome^[4] 染色封片,进行骨计量学静态参数测量。静态参数包括:骨小梁面积百分数 (% Tb.Ar)、骨小梁宽度 (Tb.Th)、骨小梁数量 (Tb.N)、骨小梁分离度 (Tb.SP)。10 μm 片不染色封片作荧光观察进行骨计量学动态参数测量。动态参数包括:荧光周长百分数 (% L.Pm)、矿化沉积率 (MAR)、骨形成率 (BFR/

BS、BFR/BV 及 BFR/TV)、每毫米破骨细胞数 (Oc.N/mm)、单位骨小梁面积破骨细胞数 (Oc.N/mm²)。测量范围为矢状切面上距上下生长板下 1 mm 之间的松质骨 (图 1)。骨形态学参数的命名与计算按国际标准进行^[5]。

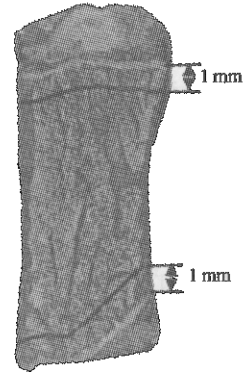


图 1 腰椎测量范围

1.3 统计学分析

数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,正态分布数据的组间比较采用单因素方差分析 (Oneway-ANOVA),预先用 Levene's test 法作方差齐性检验,如方差齐采用 LSD 法检验,方差不齐则采用 Games-Howell 法检验,所有数据均应用 SPSS 10.5 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 第 2 腰椎骨组织形态学变化

如图 2~5,第 2 腰椎骨组织切片显示,与 Sham 组比较,OVX 组的骨小梁的体积变小、变细,骨小梁的数目明显减少,吸收、断裂明显,排列不整,骨髓量增加。治疗 3 月后, E_2 组、骨康组的骨小梁的体积及数目、排列状况较 OVX 组明显改善,但与 Sham 组比较,各组大鼠的骨小梁的体积及数目、排列状况仍未达到正常水平。

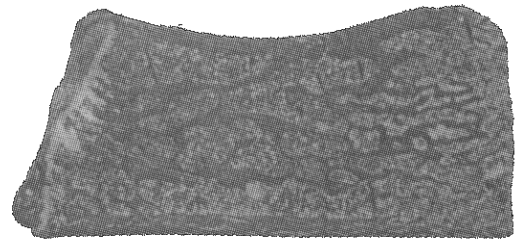


图 2 Sham 组第 2 腰椎骨小梁

2.2 去卵巢大鼠第 2 腰椎松质骨的骨形态计量学变化

由表 1,2 可见,与 Sham 组比较,OVX 组 % Tb.Ar

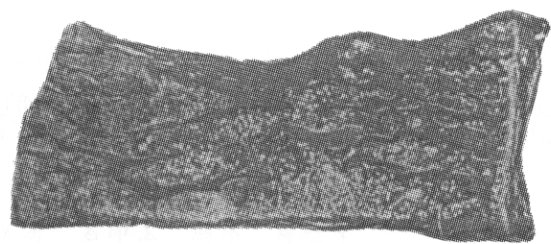


图 3 OVX 组第 2 腰椎骨小梁稀疏



图 4 E₂ 组第 2 腰椎骨小梁



图 5 骨康组第 2 腰椎骨小梁

25.79%,Tb.Sp 增加 42.97%,%L.Pm 增加 67.41%,BFR/BV 增加 110.42%,并有显著性差异($P < 0.01$)。BFR/BS、BFR/TV、Oc.N/mm² 有增加趋势($P > 0.05$) ;Oc.N/mm、MAR 有下降趋势($P > 0.05$),表明去卵巢模型建立成功。中药骨康治疗 3m 后,与 Sham 组比较,骨康组 %Tb.Ar 下降 21.63%,Tb.N 下降 16.06%,Tb.Sp 增加 34.19%,并有显著性差异($P < 0.01$),Tb.Th 下降 10.01%,无显著性差异($P > 0.05$) ;%L.Pm、BFR/BS、BFR/BV 有增加趋势($P > 0.05$) ;BFR/TV、MAR 有下降趋势($P > 0.05$),Oc.N/mm、Oc.N/mm² 分别下降 47.46%和 38.61%,并有显著性差异($P < 0.01$),表明中药骨康可明显降低破骨细胞数量。与 OVX 组比较,骨康组 Oc.N/mm² 下降 42.80% 并有显著性差异($P < 0.01$) ;%Tb.Ar、Tb.Th、Tb.N 和 MAR 均有上升趋势($P > 0.05$) ;Tb.Sp、%L.Pm、BFR/BS、BFR/TV、BFR/BV 和 Oc.N/mm 有下降趋势($P > 0.05$)。表明中药骨康可增加腰椎骨小梁面积和数量,且可降低单位面积和单位周长破骨细胞数,对骨质疏松有明显的治疗作用。与尼尔雌醇组比较,骨康组各静态及动态指标均无统计学差异,但 %L.Pm、BFR/BS、BFR/BV、BFR/TV、MAR 有升高趋势($P > 0.05$),Oc.N/mm 和 Oc.N/mm² 有下降趋势($P > 0.05$)。表明中药骨康在增加成骨细胞数量,提高成骨细胞活性,降低单位面积和单位周长破骨细胞数等方面优于尼尔雌醇。

下降 35.84%,Tb.N 下降 16.60%,Tb.Th 下降

表 1 治疗 3 月后大鼠第 2 腰椎静态指标($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	%Tb.Ar (%)	Tb.Th(μm)	Tb.N (#/mm)	Tb.Sp(μm)
假手术模型组	11	34.722 ± 5.322	114.239 ± 27.154	3.120 ± 0.494	214.110 ± 38.328
手术模型组	12	22.279 ± 5.709**	84.777 ± 14.334**	2.602 ± 0.329**	306.119 ± 65.635**
阳性对照组	12	25.349 ± 6.760**	93.469 ± 17.605**	2.696 ± 0.472**	292.314 ± 102.318**
中药骨康组	10	27.211 ± 10.885**	102.809 ± 33.571	2.619 ± 0.394**	287.319 ± 77.692**

注 与假手术模型组比较,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$

表 2 治疗 3 月后大鼠第 2 腰椎动态指标($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	%L.Pm (%)	MAR (μm/d)	BFR/BS (μm ³ /d * 100)	BFR/BV (%/year)	BFR/TV (%/year)	Oc.N/mm (N/mm)	Oc.N/mm ² (N/mm ²)
假手术模型组	11	11.323 ± 4.337*	0.658 ± 0.089 [#]	7.436 ± 3.029	42.191 ± 20.364**	14.140 ± 6.371	0.453 ± 0.159	6.848 ± 2.600
手术模型组	12	18.956 ± 7.652**	0.590 ± 0.138	11.803 ± 6.427	88.778 ± 54.300**	17.642 ± 7.828	0.354 ± 0.114	7.349 ± 3.146
阳性对照组	12	11.828 ± 7.065*	0.572 ± 0.108**	7.160 ± 5.514*	49.734 ± 43.050*	10.720 ± 6.594*	0.252 ± 0.100**	4.590 ± 1.695***
中药骨康组	10	13.415 ± 5.884	0.632 ± 0.094	8.536 ± 4.358	57.443 ± 37.925	13.800 ± 7.378	0.238 ± 0.101**	4.204 ± 2.106***

注 与假手术模型组比较,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$ 与手术模型组比较,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$

3 讨论

骨质疏松的主要原因是骨的成骨和破骨平衡发生改变,导致骨量丢失、骨结构强度下降。利用骨组织形态计量学研究骨质疏松有独特的优势,它能够

提供组织和细胞水平的骨细胞活性和骨组织转换率的定量评价,对于骨质疏松的诊断、病因、发病机理的认识能提供更准确的信息,有助于诊断水平的提高,在治疗药物评价中起着重要作用。在影响骨脆性的因素中,最重要的是骨组织的微结构状况,因为

微结构缺陷直接决定了局部的力学强度。而要了解骨微结构的变化,目前最好的方法仍然是骨组织形态计量技术^[6]。

骨组织形态计量学指标中松质骨各静态参数描述了骨量的多少和骨小梁的形态结构。实验结果显示去卵巢造模后,OVX 组的 % Tb.Ar 明显减少,反映卵巢切除后骨量明显减少。由于 Tb.N 和 Tb.Th 减少,Tb.Sp 显著增大,可导致骨组织结构退化。骨组织形态计量学指标中松质骨各动态参数可以动态了解骨骼的变化,实验结果骨形成参数 % L.Pm 升高,反映成骨细胞的数量增加,而 MAR 下降表明成骨细胞的活性下降,BFR/BV 增加表明成骨细胞的功能活跃。实验结果骨吸收参数 Oc.N/mm、Oc.N/mm² 增加,反映破骨细胞活性增加。说明卵巢切除后成骨作用与破骨作用均增强,卵巢切除后骨重建较不切除卵巢时活跃^[7]。分析其原因可能是卵巢切除术后因雌激素缺乏使骨吸收增加,骨小梁变薄变细^[8]所致。

中药骨康是以‘肾主骨’理论为指导,结合‘脾肾相关论’、“血瘀论”,针对骨质疏松症‘多虚多瘀’的病机特点,选用补骨脂、淫羊藿、黄芪、丹参等药组成,具有补肾壮骨、益气健脾、活血通络之功。实验结果显示中药骨康治疗后,荧光标记周长百分数具有明显的下降趋势,降低骨转换,可改善骨结构,提高骨质量,加强骨的机械强度。同时,骨康治疗组中与成骨有关的参数较 OVX 组增高,与破骨有关的参数较 OVX 组减少,导致骨量明显上升,骨小梁数目增多,骨小梁分离度下降,骨重建负平衡被纠正。由此证实中药骨康治疗骨质疏松症的机理既不同于西

医抑制骨吸收的药物(雌激素类),也不同于促进骨形成的药物(氟制剂类),而是一种对机体的整体调治过程,同时具有增强成骨活性和抑制骨吸收的双重作用。

【参 考 文 献】

- [1] FDA Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis (Draft). 1994.
- [2] Ott SM, Oleksik A, Lu Y, et al. Bone histomorphometric and biochemical marker results of a 2-year placebo-controlled trial of raloxifene in postmenopausal women. J Bone Miner Res, 2002, 17(2): 341-348.
- [3] 李青南,主编.骨质疏松实验动物研究-骨组织形态计量学.成都:四川大学出版社,2001:23-48.
- [4] Baron RA, Vignery A, Neff L, et al. Processing of undecalcified bone specimens for bone histomorphometry. In: Recker RR, editor. bone histomorphometry techniques and interpretation, Boca Raton, Florida: CRC Press. 1983:13-30.
- [5] Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols and units. J Bone Miner Res, 1987, 2: 595-610.
- [6] Barger Lux MJ, Recker RR. Bone microstructure in osteoporosis: transilial biopsy and histomorphometry. Top Magn Reson Imaging, 2002, 13(5): 297-305.
- [7] Robert RR. Architecture and vertebral fracture. Calcif Tissue Int, 1993, 53(suppl):139.
- [8] Baldock PAJ, Morris HA, Need AG, et al. Variation in the short-term changes in bone cell activity immediately following ovariectomy in three regions of the distal femur. J Bone Miner Res, 1998, 13:1451-1457.