

复方仙贞汤对去卵巢大鼠模型骨密度和骨形态的影响

周丽珍 王淑丽 秦腊梅 肖永华 张丽萍 陶黎 吕沛莹 姜良铎

摘要：目的 研究复方仙贞汤对去卵巢大鼠的骨密度和骨形态的影响。方法 3 月龄的雌性 SD 大鼠，普通饲料喂养 1 周后，随机分为假手术组(Sham)、模型组(OVX)、尼尔雌醇阳性药物对照组、复方仙贞汤小剂量组、复方仙贞汤中剂量组、复方仙贞汤大剂量组。除假手术组，其余都经背部切开后切除双侧卵巢，制造去卵巢模型(OVX)，假手术组则背部切开后切除部分脂肪组织再分层缝合。造模完成后，假手术组及模型组用生理盐水灌胃，阳性药物组用尼尔雌醇混悬液灌胃，复方仙贞汤小、中、大剂量组分别给以 6.5 g/kg、13 g/kg、26 g/kg 大鼠体重(按生药计算)的复方仙贞汤药液，每日固定上午九点灌胃 1 次。全部动物共持续喂养 3 个月后处死，测定股骨的骨密度和胫骨骨体积、胫骨类骨表面、类骨质宽、骨吸收表面。结果 复方仙贞汤组和尼尔雌醇组均较模型组的骨密度显著性增高($P < 0.01$)，而且复方仙贞汤中剂量组与尼尔雌醇阳性对照组接近。与模型组比较，中药组和尼尔雌醇组的骨体积显著上升($P < 0.01$)，而类骨表面、类骨质宽和骨吸收表面却显著下降(分别 $P < 0.01$)。结论 复方仙贞汤能提高去卵巢大鼠的骨密度和骨体积，减少类骨质宽、类骨质表面、骨吸收表面，提示复方仙贞汤能起到和尼尔雌醇相似的作用，即降低绝经后骨质疏松的高转换率，从而减慢骨质的丢失。

关键词：复方仙贞汤；尼尔雌醇；骨形态；骨密度

Effect of Compound Xianzhen Decoction on bone mineral density and bone morphology in ovariectomized osteoporosis rats ZHOU Lizhen, WANG Shuli, QIN Lamei, et al. Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100780, China

Abstract : **Objective** To study the effect of Compound Xianzhen Decoction on bone mineral density and bones morphology in ovariectomized osteoporosis rats. **Methods** The female Sprague-Dawley (SD) rats, three months old, were randomly selected as Sham-operated group, ovariectomized group(OVX group), Nilestriol group, Compound Xianzhen Decoction at low, medium and large dose group, respectively. All rats were ovariectomized except for those in the Sham-operated group. After operation, the rats in the Sham group and OVX group were fed with sodium chloride, the Nilestriol group with Nilestriol suspension, the Xianzhen Decoction at low, medium and large dose group with Xianzhen Decoction at 5.98 g/kg, 11.96 g/kg and 23.92 g/kg, respectively. All animals were killed after 3 months and the femoral bone mineral density and humeral volume, osteoid width, osteoid surface and the surface of bone absorption were tested. **Results** The bone mineral density of the Compound Xianzhen Decoction group and Nilestriol group increased significantly($P < 0.01$). However, the result of the medium dosage of Compound Xianzhen Decoction group was close to that of Nilestriol group. Compared with the model group, the bone volume in Chinese medicine and Nilestriol group increased significantly($P < 0.01$), but the bone volume, osteoid width of osteoid surface and the surface of bone absorption decreased significantly($P < 0.01$). **Conclusions** Compound Xianzhen Decoction can increase the bone mineral density and bone volume in ovariectomized rats. At the same time, it reduces the osteoid width, osteoid surface and the surface of bone absorption. Compound Xianzhen Decoction has the similar function as Nilestriol, that is, reducing the higher conversion rate of osteoblast and osteoclast in postmenopausal osteoporosis and slowing down the bone loss.

作者单位：100780 北京中医药大学东方医院老年病科(周丽珍、王淑丽)；北京中医药大学东直门医院中心实验室(秦腊梅、肖永华、张丽萍、陶黎、吕沛莹、姜良铎)

通讯作者：周丽珍, Email: zlz1996@sina.com

Key words: Compound Xianzhen Decoction; Nilestriol; Bones morphology; Bone mineral density

骨质疏松症是当今世界范围内严重危害公众健康,尤其是中老年人的一种常见病、多发病。随着人口平均寿命的提高和社会老龄化的进程,骨质疏松症的发病率呈上升趋势,骨质疏松的发病机理和防治的研究引起了医务工作者的重视。骨组织形态计量学是对骨组织形态进行定量分析的研究,可以从微观观察骨的形态和变化,为骨质疏松症的研究提供了许多的证据。但是,由于这种方法多数情况下,需要解剖取材,对活体进行测量具有一定难度,而进行动物实验研究骨形态,也就有很大的意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物

59 只 3 月龄雌性 SD 大鼠,平均体重在 220 ~ 250 g,由中国医学科学院动物中心购进。动物级别贰级(清洁级),许可证编号为 SCXK 11-00-0006。

1.2 动物饲养

各组大鼠分笼饲养,自由摄取标准鼠饲料,自由饮水,室温 22 ± 2 °C。

1.3 试剂和仪器

复方仙贞汤为本院制剂室自制,浓度为 2.5 g/mL。尼尔雌醇片(Tabellae Nilestrioli),1 mg/片,北京四环制药二厂生产,批号 991020。全自动生化分析仪及配套提供的生化试剂盒,美国贝克曼公司生产。SD-1000 骨矿物测定仪(已通过专家鉴定),核工业北京地质研究院提供。彩色图像分析仪,天津骨科研究所提供。重整切骨机,德国容哥生产。

1.4 分组

59 只大鼠普通饲料喂养 1 周后,随机分为 6 组,即假手术组(Sham)9 只、模型组(OVX)10 只、尼尔雌醇阳性药物对照组 10 只、复方仙贞汤小剂量组 10 只、复方仙贞汤中剂量组 10 只、复方仙贞汤大剂量组 10 只。

1.5 造模

所有大鼠用 3.5% 水合氯醛,按 1 mL/100 g 大鼠体重的剂量行腹腔麻醉后,除假手术组,其余都经背部切开完整切除双侧卵巢,制造去卵巢模型(OVX),假手术组则背部切开切除部分脂肪组织后再分层缝合。

1.6 给药方法

造模完成后,假手术组及模型组用生理盐水灌胃,每日上午 1 次,剂量为 1 mL/100 g 大鼠体重。尼

尔雌醇组用双蒸水溶解尼尔雌醇配制成 0.43 mg/mL 的混悬液,以 0.15 mg/100 g 大鼠体重的剂量,固定每周一上午九点灌胃 1 次。复方仙贞汤小、中、大剂量组分别按生药计算,给以 6.5 g/kg(相当于人临床等效剂量的 6.5 倍)、13 g/kg(相当于人临床等效剂量的 13 倍)、26 g/kg(相当于人临床等效剂量的 26 倍)大鼠体重的复方仙贞汤药液,每日固定上午九点灌胃 1 次。除尼尔雌醇组,其他组每周给药 6 次,固定在周日停药。每周称量体重 1 次,计算新的给药量,共持续喂养 3 个月。

1.7 取材和测量

全部动物在最后 1 次喂药后的 24 h 后处死,取大鼠左侧胫骨和左侧股骨,剔尽肌肉及筋膜,用 SD-1000 骨矿物测定仪以左侧股骨远端 1/3 处的同一位置为测量点,测定骨密度。将左侧胫骨置于 70% 酒精 4 °C 固定 7 d,然后分别置于 80%、90% 酒精和无水丙酮中脱水各 1 d,再经二甲苯透明 24 h 后,浸于 3/7 比例的甲基丙烯酸丁酯/甲酯溶液中 16 h,选择胫骨平面包埋、固化于 3/7 比例的半聚合的甲基丙烯酸丁酯/甲酯中(40 °C 约 1 周)。用 Jung K 型重型切骨机,于胫骨近端 1/3 处切 7 μ m 厚不脱钙连续切片 4 张,分别进行 Gemisa、von Kossa 染色,再用 MPIAS-1000 彩色病理图文仪,测定胫骨骨体积、胫骨类骨表面、类骨质宽、胫骨吸收表面等。

1.8 统计学处理

用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析,组间差异通过 *F* 检验和 *Q* 检验,结果以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 复方仙贞汤对去卵巢大鼠股骨骨密度(BMD)的影响

表 1 显示:与假手术组相比,模型组大鼠 BMD 显著降低($P < 0.01$),复方仙贞汤小剂量、中剂量、大剂量组均较假手术组增高($P > 0.05$),其中复方仙贞汤中剂量组 BMD,与尼尔雌醇阳性对照组最接近。

2.2 复方仙贞汤对去卵巢大鼠骨形态的影响

2.2.1 大鼠胫骨骨体积

表 2 表明:与假手术组相比,模型组的骨体积显著下降($P < 0.01$),中药组与假手术组无差异性。但与模型组比较,中药组和尼尔雌醇组骨体积显著

上升($P < 0.01$)。尼尔雌醇组比复方中药组骨体积增加明显。

表 1 复方仙贞汤对去卵巢大鼠股骨 BMD 的影响($\bar{x} \pm s$)	
组别	BMD(g/cm^2)
假手术组	0.4157 \pm 0.0187
模型组	0.3721 \pm 0.0209 ^{▲▲}
尼尔雌醇阳性对照组	0.4316 \pm 0.0129 ^{▲▲▲}
复方仙贞小剂量组	0.4252 \pm 0.0132 ^{▲▲}
复方仙贞中剂量组	0.4315 \pm 0.0189 ^{▲▲}
复方仙贞大剂量组	0.4278 \pm 0.0131 ^{▲▲}

注 :与假手术组相比较[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$;与模型组相比较^{▲▲▲} $P < 0.01$

表 2 复方仙贞汤对去卵巢大鼠胫骨骨体积的影响($\bar{x} \pm s$)	
组别	骨体积(%)
假手术组	46.1700 \pm 1.0517
模型组	23.1784 \pm 2.2178 ^{▲▲}
尼尔雌醇阳性对照组	45.8529 \pm 2.8756 ^{▲▲}
复方仙贞中剂量组	41.2226 \pm 1.7047 ^{▲▲▲}

注 :与假手术组相比较[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$;与模型组相比较^{▲▲▲} $P < 0.01$

2.2.2 大鼠类骨表面

表 3 表明 :与假手术组比较 ,模型组类骨表面显著增加($P < 0.01$)。尼尔雌醇组和复方中药组都比模型组显著下降($P < 0.01$)。

表 3 复方仙贞汤对去卵巢大鼠类骨表面的影响($\bar{x} \pm s$)	
组别	类骨表面(%)
假手术组	8.7712 \pm 1.3910
模型组	18.7092 \pm 1.8618 ^{▲▲}
尼尔雌醇阳性对照组	11.1493 \pm 1.4535 ^{▲▲}
复方仙贞中剂量组	11.4781 \pm 1.7650 ^{▲▲}

注 :与假手术组相比较^{▲▲} $P < 0.01$;与模型组相比较^{▲▲▲} $P < 0.01$

2.2.3 大鼠类骨质宽

表 4 表明 :与假手术组比较 ,模型组的大鼠类骨质宽显著增高($P < 0.05$),而复方中药组的类骨质宽却显著下降($P < 0.01$) ,并明显优于阳性对照组。

表 4 复方仙贞汤对去卵巢大鼠类骨质宽的影响($\bar{x} \pm s$)	
组别	类骨质宽(μm)
假手术组	4.2720 \pm 0.7269
模型组	5.5460 \pm 0.8053 [▲]
尼尔雌醇阳性对照组	5.4490 \pm 1.1178
复方仙贞中剂量组	2.5275 \pm 0.3952 ^{▲▲▲▲}

注 :与假手术组相比较[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$;与模型组相比较^{▲▲▲} $P < 0.01$

2.2.4 大鼠骨吸收表面

表 5 表明 :与假手术组比较 ,模型组的骨吸收表面明显增高($P < 0.01$),而中药组显著降低($P < 0.01$),并明显优于阳性对照组。

表 5 复方仙贞汤对去卵巢大鼠骨吸收表面的影响($\bar{x} \pm s$)	
组别	吸收表面(%)
假手术组	5.551 \pm 1.5848
模型组	10.383 \pm 1.4418 ^{▲▲}
尼尔雌醇阳性对照组	6.868 \pm 1.3122 [▲]
复方仙贞中剂量组	3.555 \pm 0.2461 ^{▲▲▲}

注 :与假手术组相比较[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$;与模型组相比较^{▲▲▲} $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$

3 讨论

骨组织形态参数主要由骨量静态参数、松质骨显微结构静态参数和骨形成静态参数这三类组成 ,骨形成静态参数主要指类骨质体积、类骨质表面和类骨质厚度。类骨质表面指未钙化的骨长度 ,类骨质厚度即类骨质宽度。骨的形成是动态的骨重建过程 ,绝经后的骨质疏松症 ,因为雌激素的缺乏使骨转换率增高 ,致使骨重建过程中的骨吸收大于骨形成 ,骨量丢失主要发生在松质骨 ,表现为骨小梁变细 ,变薄、断裂^[1]。因为骨重建发生在骨外膜、骨内膜和哈佛氏系统表面 ,骨量丢失一般发生在骨表面上 ,成为骨吸收表面。骨小梁类骨质表面 ,骨小梁吸收表面 ,骨内膜类骨质表面 ,骨内膜吸收表面的百分比变化 ,可以分别反应骨小梁和骨内膜的骨表面形成和吸收情况 ,所以我们的实验研究胫骨的骨体积 ,骨小梁类骨质表面、类骨质宽、骨小梁的吸收表面 ,能够明确的比较药物对骨形成和骨吸收情况。

去卵巢大鼠模型目前被公认为是与临床最接近的绝经后骨质疏松动物模型^[2] ,我们实验中测定骨密度后 ,发现切除双侧卵巢的大鼠骨密度比其他组显著降低 ,表明造模成功。由于我们在测定骨密度的试验中 ,发现复方仙贞汤中剂量组的骨密度比小剂量组和大剂量组的增高明显 ,而且与阳性对照药尼尔雌醇的结果相近 ,所以在以后的骨形态测量中 ,选择中剂量组为治疗组。

骨形态计量学在骨的研究中具有重要的意义 ,美国 FDA 把用骨组织形态计量学的方法观察药物对去卵巢大鼠骨形态计量学的改变作为评价新药的药效学的标准之一^{—[3]}。我们的实验中去卵巢的大鼠类骨质宽、类骨质表面、骨吸收表面增加 ,表明切除卵巢后 ,大鼠雌激素下降 ,骨转换率增加 ,但因为破骨细胞功能增强 ,骨吸收大于骨形成 ,骨量迅速减少 ,结果骨体积减少 ,骨密度下降。用复方仙贞汤和阳性药尼尔雌醇喂养后 ,结果显示 ,两药均能减少模型组类骨质宽、类骨质表面、骨吸收表面 ,增加其骨体积和骨密度 ,尤其在类骨质宽、骨吸收表面 ,中药

组明显优于尼尔雌醇组,提示复方仙贞汤能起到和尼尔雌醇相似的作用,或稍强的作用,即降低绝经后骨质疏松的高转换率,从而减慢骨质的丢失。

从中医学角度来说,骨质疏松症归属于“骨痹”、“骨痿”等病的范畴,与肾、脾、肝关系密切。肾为先天之本,经水之源,女子肾气衰而天癸竭,进入绝经;肝肾同源,脾为后天之本,气血化生之源,肾精亏虚则肝血不足,脾虚气血生化无源,血虚脉道失养,血行不畅而致血瘀,故骨髓不生,筋骨不坚,骨之变证生矣。因此,对于绝经后骨质疏松症的治疗,中医多以补益肝肾、益气活血为立法。复方仙贞汤是经过多年临床实践的经验方,以补益肝肾、益气化瘀为立法,主要由淫羊藿、女贞子等组成。淫羊藿味辛、甘、性温,归肝、肾经,功能补肾壮阳,祛风除湿《本草备要》曰:“补命门,益精气,坚筋骨”;女贞子味甘、苦、性凉,亦归肝、肾经,功专补益肝肾《本草纲目》曰能“强阴健腰膝”。淫羊藿与女贞子,一阳一阴,阴阳双补,补肾填精,强筋健骨,共同起到调补的作用。在

临床中复方仙贞汤治疗绝经后骨质疏松症,能有效地缓解腰腿疼痛、腰膝酸软、肢体乏力等症状,而且能明显提高患者的骨密度,几十年的临床实践中未发现明显的毒副作用。本实验也证实:复方仙贞汤具有减慢骨转换率的作用,但它是通过促进成骨细胞的形成还是抑制破骨细胞的吸收,是作用于雌激素受体还是通过其他细胞因子起作用,其具体作用机制还有待进一步深入的研究。

【参 考 文 献】

- [1] 张林,杨锡让,薛延.不同强度运动对骨质疏松大鼠形态计量学的影响.中国运动学杂志,1999,18(4):317-318.
- [2] 陈东,王连唐,陈国栋.去卵巢后大鼠不同部位的骨组织计量学与骨密度研究.中国骨质疏松杂志,2002,8:208-210.
- [3] 崔燎,陈槐卿,许碧连,等.去卵巢大鼠椎骨组织形态计量学、生物力学特点及相关性研究.生物医学工程学杂志,2004,21:178-183.

(收稿日期:2006-03-01)