

骨形态计量学观察丹参骨宝对环磷酰胺大鼠胫骨上段的影响

于琼 吴铁 崔燎 林坚涛 陈志东

摘要: **目的** 用环磷酰胺造成大鼠的骨丢失,观察丹参骨宝的影响。**方法** 用 $4.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的环磷酰胺灌胃给大鼠,连续 15 d,造成大鼠骨丢失;用丹参骨宝进行预防给药。实验结束后,取大鼠左侧胫骨上段进行不脱钙包埋切片作骨组织形态计量学测量。同时观察大鼠胸腺、脾脏的重量指数,以及外周血白细胞数量。**结果** 环磷酰胺可使大鼠外周血白细胞数量和脾脏指数明显下降,本实验剂量的丹参骨宝不能有效对抗这种免疫抑制。环磷酰胺通过明显抑制骨形成而导致骨量减少,骨显微结构退化等典型骨质疏松特征的出现。丹参骨宝能通过增加骨的沉积矿化率,促进成骨活性而增加环磷酰胺大鼠的骨量,改善骨微观结构。**结论** 丹参骨宝可有效预防环磷酰胺所引起的大鼠骨丢失,其预防机制与促进骨的矿化沉积率,增加骨形成活性有关。

关键词: 丹参骨宝; 环磷酰胺; 大鼠; 骨丢失; 骨形态计量学

Effect of Danshen Gubao on bone histomorphometry in cyclophosphamide-induced bone loss of rats YU

Qiong, WU Tie, CUI Liao, et al. Dept of Pharmacology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China

Abstract: **Objective** To study osteoporosis of rats induced by cyclophosphamide and investigate the preventive effects of Danshen Gubao on bone histomorphometry of the rats. **Methods** Cyclophosphamide at the dose of $4.5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ was given to the rats orally for 15 days while Danshen Gubao was given to cyclophosphamide-treated rats orally. At the experimental endpoint, bone histomorphometric analysis of the left shin bone were performed in undecalcified sections. The weights of spleen, thymus and the number of WBC in peripheral blood are also measured. **Results** The dose of Danshen Gubao in this experiment can not improve the decrease of the index of spleen and the number of WBC, which are induced by cyclophosphamide. Cyclophosphamide causes osteopenia and microstructure degradation in rats, which are the typical features of osteoporosis, by significantly inhibiting bone formation. Danshen Guabao can increase the number of bone trabecula and improve bone microstructure, through the multiplication of bone mineralization and enhancement of bone formation. **Conclusion** Danshen Gubao can protect cyclophosphamide-induced trabecular bone loss through stimulating osteoblast bone formation and bone mineralization.

Key words: Danshen Gubao; Cyclophosphamide; Rats; Bone loss; Bone histomorphometry

环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)作为一种免疫抑制剂,在临床上被广泛用于肿瘤和免疫变态反应的治疗,但患者使用环磷酰胺后骨密度迅速减少,继而出现骨质疏松(osteoporosis, OP)^[1],本项目组曾用环磷酰胺分别建立了大鼠和小鼠骨丢失的动物模型^[2,3],探讨环磷酰胺对骨的影响,并试图寻找到能预防环磷酰胺导致骨丢失的不良反应,同时又能增

强其药理作用的药物。本研究探讨了中药丹参骨宝对环磷酰胺致骨丢失的影响。丹参作为传统中药,具有抗氧化,改善微循环,抑制血栓形成、防治肝纤维化及抗肿瘤、抗炎和增强免疫等作用。近期研究报道丹参水提物^[4]和醇提成分中的丹参酮^[5]都能有效防治糖皮质激素所致的大鼠骨质疏松。为探讨丹参骨宝对环磷酰胺所介导的骨丢失的骨形态计量学的影响,本实验用环磷酰胺作为工具药物造成大鼠的骨丢失和免疫抑制模型,观察丹参骨宝的作用效果,现报道如下。

作者单位: 524023 湛江,广东医学院药理教研室(于琼、吴铁、林坚涛、陈志东);广东天然药物研究与开发重点实验室(崔燎)

通讯作者: 吴铁, Email: wutie@gdmc.edu.cn

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

1.1.1 药品:丹参中药材购自本地药房,产地为四川。环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:403501)。

1.1.2 试剂:丹参素标准品(中国药品生物制品检定所,批号 110855-200304);甲醇(色谱纯,天津四友化学试剂公司);水为双蒸水;冰醋酸(分析纯,汕头陇西化工厂);盐酸四环素(上海新亚制药厂生产,批号:891224-18);甲基丙烯酸甲酯(北京化工厂生产,批号:940117);Calcein(Sigma chemical Co. USA, lot:61 F 0527);骨组织染料(Masson-Goldner Trichrome; Ponceau Fuchsin Stock; Phosphotungstic acid-Oragne; Light green; Silver Nitrate 等均为 Sigma 产品)。

1.2 实验仪器

AE 240 电子天平(梅特勒-托利多仪器公司上海分公司生产),XSZ-0800 生物显微镜(广西梧州市光学仪器厂),血细胞计数板(上海求精生化仪器有限公司),低速锯(Buehler LTD USA),Leica 组织切片机(德国),LEICA QWN 半自动图像分析仪(德国莱卡),高效液相色谱仪:Agilent 1100 系列四元梯度泵、Agilent 1100 手动进样器,Agilent 1100 系列一极管阵列检测器,Agilent 1100 工作站(Agilent 公司),超声波清洗器。

1.3 实验方法

1.3.1 实验药物的制备:(1)丹参骨宝的制备工艺:取 426 g 丹参骨宝生药加 95%乙醇回流 1.5 h,提取液滤过,滤液回收乙醇浓缩至适量;取药渣加 50%乙醇加热回流 1.5 h,提取液滤过,滤液回收乙醇浓缩至适量;再次取药渣加水煎煮 2 h,提取液滤过,滤液浓缩至适量;合并 3 次提取液浓缩至 1 000 mL,密封消毒,4℃冰箱保存备用。

(2)丹参骨宝的质量控制:丹参骨宝的指纹图谱用高效液相法检测,色谱柱:Agilent C₁₈ (250 mm × 4.65 μm, 5 μm);流动相:甲醇-1%冰醋酸(1:9);流速:1 mL/min;温度为室温;检测波长:280 nm。检测同时采用丹参骨宝素标准品作为对照。根据丹参骨宝素标准品的图谱计算丹参骨宝制剂每克生药含丹参骨宝素的量。

1.3.2 实验动物与分组:3 月龄大鼠 30 只,雌雄各半,体重(208 ± 28)g,由广东医学院实验动物中心提供,SPF 级,动物合格证号:2005 A 023。按体重对等原则随机分成 3 组,每组 10 只。正常对照组:灌胃

给予 5 mL·kg⁻¹·d⁻¹生理盐水。环磷酰胺组:灌胃给予环磷酰胺 4.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹。丹参骨宝组:灌胃给予环磷酰胺 4.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 以及丹参骨宝 5 mL·kg⁻¹·d⁻¹。3 组动物均自由饮水和进食标准饲料。实验共给药 15 d,实验结束时,尾静脉取血做白细胞计数。后心脏取血处死,取胸腺和脾脏用 AE 240 电子天平称重,计算器官指数,脾脏指数指脾脏重量与体重的比值,胸腺指数指胸腺重量与体重的比值。取左侧胫骨进行骨组织形态计量学测量。

1.3.3 骨组织形态计量学测量:大鼠在处死前 11、10 d 和 4、3 d 分别给予四环素(30 mg·kg⁻¹)和 Calcein(8 mg·kg⁻¹)标记各 2 次,以在骨组织形成双荧光标记。大鼠给药 15 d 后测定体重,处死并取左侧胫骨,除尽肌肉与组织,用低速锯将其分为 2 段,取上段暴露骨髓腔,固定于 10% PBS 福尔马林液 24 h,按硬组织切片法用甲基丙烯酸甲酯包埋不脱钙骨^[6],切取两张 4 μm 薄片及 1 张 9 μm 厚片,薄片分别进行 Masson-Goldner 染色和 AgNO₃ 染色后封片,厚骨片则直接封片,厚、薄片皆在距骺线 1 mm 处至远端 3 mm 范围内进行松质骨的骨形态计量学参数测量。骨组织形态计量学静态参数包括:骨小梁面积百分数(%Tb.Ar),骨小梁厚度(Tb.Th),骨小梁数量(Tb.N),骨小梁分离度(Tb.SP),动态参数包括荧光标志周长百分数(%L.Pm),矿化沉积率(MAR),骨小梁周长形成率(BFR/BS),骨小梁面积形成率(BFR/BV),骨小梁体积形成率(BFR/TV),每毫米破骨细胞数量(Oc.N/mm),破骨细胞贴壁长度(Oc.S.Pm)。

1.3.4 统计学处理:参数值用($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 11.0 进行统计学分析。用变化率表示各实验组大鼠相对参数的变化[如:变化率 A = (待比较组/A 组 - 1) × 100%]。

2 结果

2.1 丹参骨宝的质量控制

根据 1.3.1 方法制备了供实验用的丹参骨宝,用高效液相色谱仪检测得到的指纹图谱见图 1,丹参素标准品的图谱见图 2。经检测及计算,丹参骨宝每克生药含丹参素 1.04 mg。

2.2 丹参骨宝对环磷酰胺大鼠体重、器官指数及血白细胞的影响

丹参骨宝对环磷酰胺大鼠体重、器官指数及血白细胞的影响见表 1。

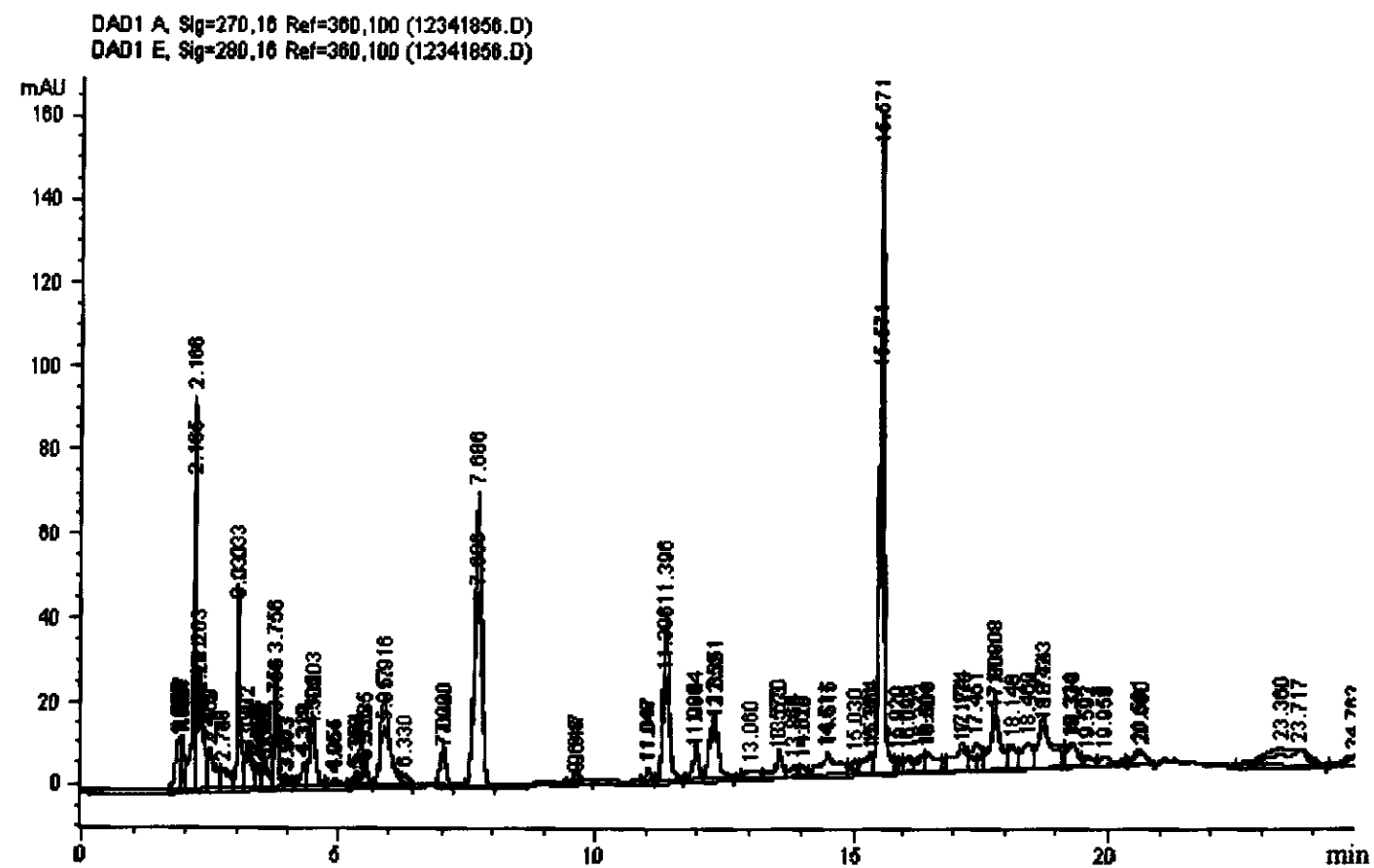


图 1 丹参骨宝的高效液相质量控制图谱

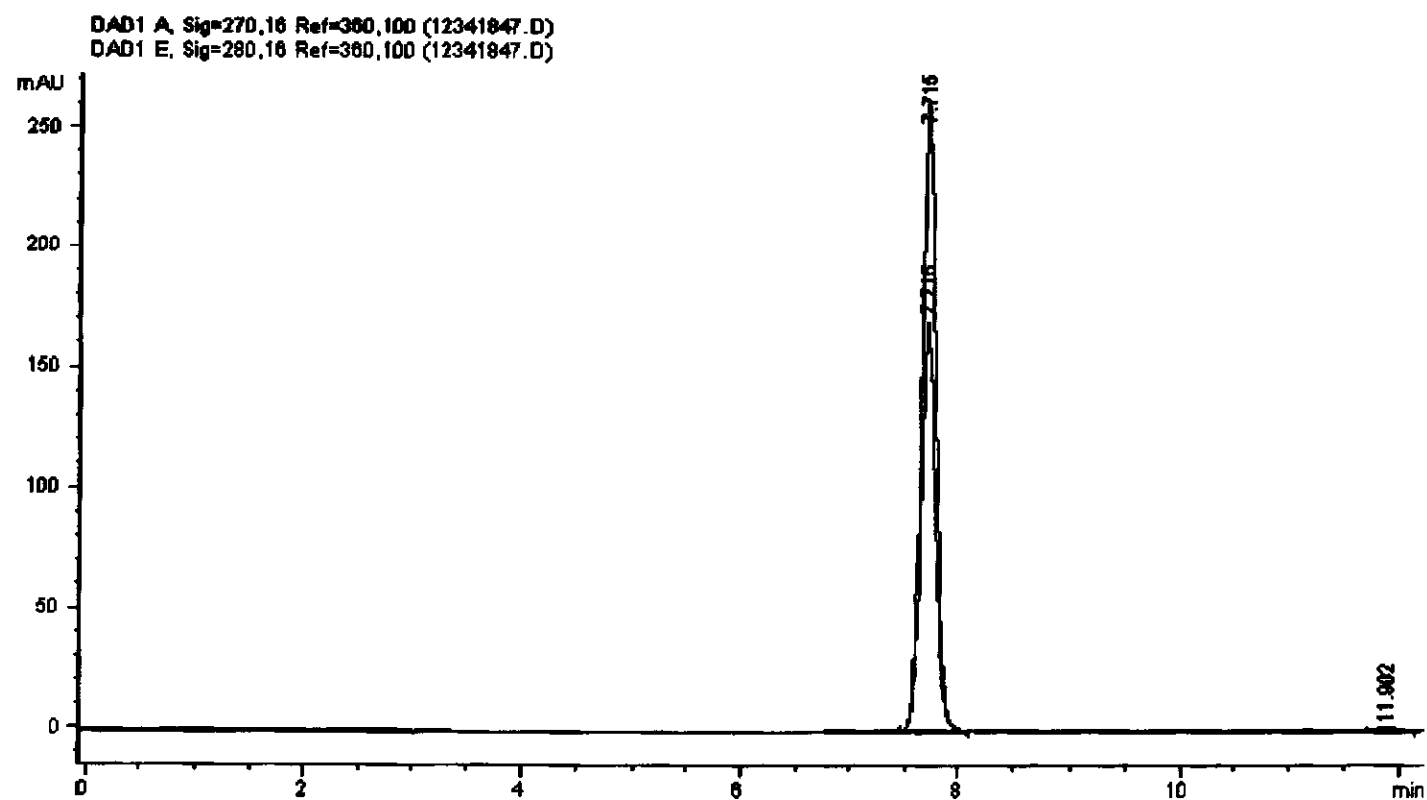


图 2 丹参骨宝素标准品的高效液相质量控制图谱

表 1 丹参骨宝对环磷酰胺大鼠体重、器官指数及血白细胞的影响

组别	体重(g)	脾脏指数(mg/g)	胸腺指数(mg/g)	血白细胞数(10 ⁹ /L)
正常对照组	290.2 ± 52.4	3.44 ± 1.27	1.23 ± 0.40	26.0 ± 7.79
环磷酰胺组	277.0 ± 60.1	2.23 ± 0.81	1.44 ± 0.43	13.1 ± 5.93
变化率 A(%)	-4.55	-35.2*	17.1	-49.6***
丹参骨宝组	284.9 ± 60.6	2.63 ± 0.92	1.07 ± 0.33	13.4 ± 7.05
变化率 A(%)	-1.83	-23.5	-13.0	-48.5**
变化率 B(%)	2.85	17.9	-25.7	2.29

注: n = 10; A、B 为变化率; A 是与对照组比较, B 是与环磷酰胺模型组比较; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

由表 1 结果可见, 环磷酰胺大鼠的体重没有改变, 胸腺指数无明显改变, 提示本实验剂量的环磷酰

胺对大鼠的毒性不大。但脾脏指数 (P < 0.05) 和血白细胞数 (P < 0.001) 都有明显下降, 提示环磷酰胺在本实验用量已对大鼠产生了明显的免疫抑制作用。而丹参骨宝组的这两项指标都只有轻微的上升, 差别无显著性 (P > 0.05), 提示丹参骨宝本实验剂量不能有效对抗环磷酰胺的免疫抑制作用。

2.3 丹参骨宝对环磷酰胺大鼠胫骨骨组织形态学的影响

丹参骨宝对环磷酰胺大鼠胫骨骨组织形态学的影响见图 3。

图 3a 为正常对照组, 该组的动物骨小梁呈现结构紧密、粗细均匀、连续性好; 图 3b 为环磷酰胺模型

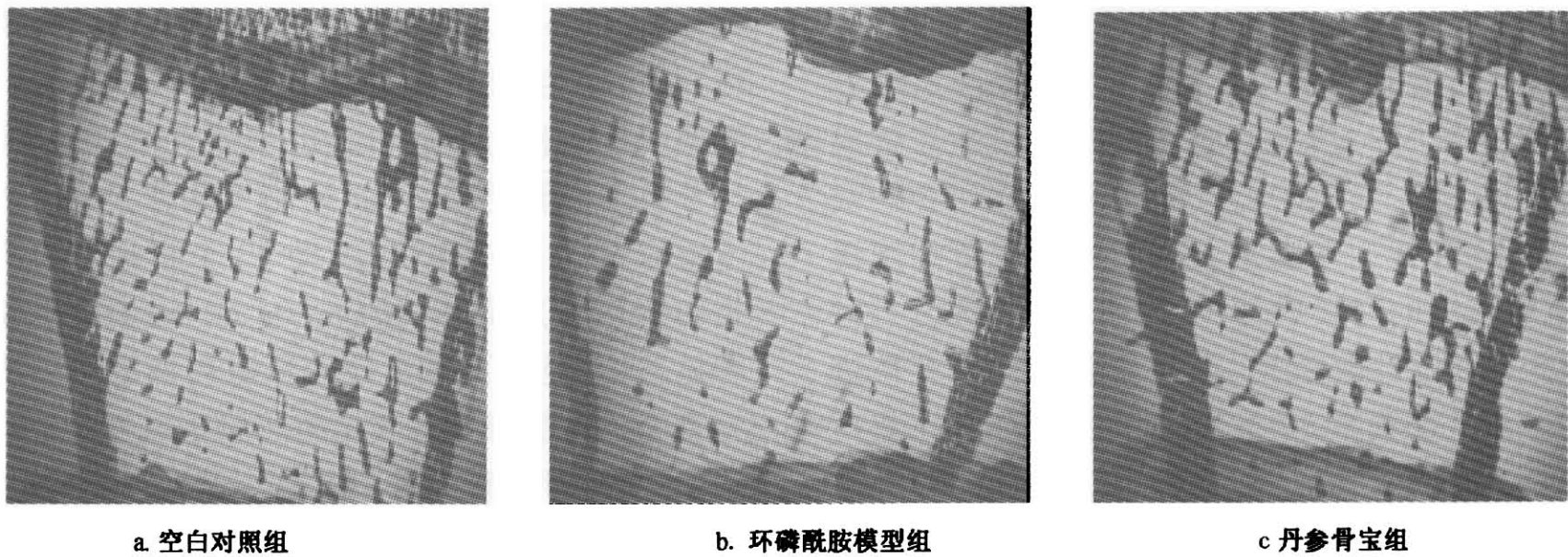


图 3 环磷酰胺和丹参骨宝对大鼠胫骨骨组织形态学影响

组,该组动物骨小梁结构明显稀疏、细小,个别呈结节或钮扣状,出现大片无骨小梁骨髓区;图 3c 为丹参骨宝组,该组动物的骨小梁结构紧密,连续性好,相对于模型组小梁骨明显增多增粗。

2.4 丹参骨宝对环磷酰胺大鼠胫骨骨组织形态计量学静态参数的影响

丹参骨宝对环磷酰胺大鼠胫骨骨组织形态计量学静态参数的影响见表 2。

由表 2 结果可见,环磷酰胺使大鼠胫骨上段松质骨小梁面积百分数、厚度和数量 3 个指标下降,骨小梁分离度上升,且差别均具有显著性;提示环磷酰胺致使大鼠骨量减少,骨微观结构退化。丹参骨宝组的上述 4 项指标均较环磷酰胺组呈反趋势改变,且差异有显著性;提示丹参骨宝预防组可有效对抗环磷酰胺所介导大鼠的骨丢失,明显增加骨量,改善

骨微观结构,与正常对照组大鼠相当。

2.5 丹参骨宝对环磷酰胺大鼠胫骨骨组织形态计量学动态参数的影响

丹参骨宝对环磷酰胺大鼠胫骨骨组织形态计量学动态参数的影响见表 3。

表 2 丹参骨宝对环磷酰胺大鼠胫骨骨组织形态计量学静态参数的影响

组别	骨小梁面积百分数(%)	骨小梁厚度(μm)	骨小梁数量(mm ⁻¹)	骨小梁分离度(μm)
正常对照组	11.9±4.08	51.5±6.74	2.33±0.8	422±143
环磷酰胺组	6.1±2.01	42.2±6.1	1.45±0.4	708±247
变化率 A(%)	-48.7**	-18.0**	-37.8*	67.8**
丹参骨宝组	13.0±5.53	52.9±12.6	2.40±0.7	384±112
变化率 A(%)	9.24	2.72	3.0	-9.0
变化率 B(%)	113.1**	24.8**	65.5**	-45.8**

注:n=10;A、B 为变化率:A 是与对照组比较,B 是与环磷酰胺模型组比较;* P<0.05,** P<0.01,*** P<0.001

表 3 丹参骨宝对环磷酰胺大鼠胫骨骨组织形态计量学动态参数的影响

组别	% L.Pm/%	MAR	BFR/BS	BFR/BV	BFR/TV	Oc.N/mm	Oc.S.Pm
正常对照组	7.78±3.5	0.868±0.12	7.00±3.8	84.2±43	9.35±5.0	1.45±0.4	3.53±1.5
环磷酰胺组	3.42±1.2	0.661±0.19	2.27±1.2	39.2±22	2.22±1.3	1.16±0.3	2.93±0.9
变化率 A(%)	-56.0**	-23.8*	-67.6**	-53.4*	-76.2**	-20.0	-17.0
丹参骨宝组	7.23±4.8	0.949±0.07	6.80±4.4	70.3±43	9.36±5.7	1.40±0.4	3.12±0.9
变化率 A(%)	-14.8	12.6	-5.82	-17.5	3.31	-3.45	-11.6
变化率 B(%)	73.0	43.6***	142.0*	65.0	271.4**	20.7	6.48

注:n=10;A、B 为变化率:A 是与对照组比较,B 是与环磷酰胺模型组比较;* P<0.05,** P<0.01,*** P<0.001

由表 3 结果可见,环磷酰胺对大鼠胫骨上段松质骨表示骨形成的% L.Pm、MAR、BFR/BS、BFR/BV、BFR/TV 5 项指标均明显下降,且差别具有显著性;而表示骨吸收的 Oc.N/mm、Oc.S.Pm 两项指标虽有一定下降趋势,但差别无显著性;提示环磷酰胺可降低成骨细胞的数量与活性,抑制骨的形成、矿化,而对骨吸收没有明显影响。丹参骨宝组的 5 项骨形成

指标和 2 项骨吸收的指标均较环磷酰胺组均呈上升趋势,但仅骨形成参数中 MAR、BFR/BS、BFR/TV 3 项指标差异有显著性;提示丹参骨宝可明显提高环磷酰胺大鼠骨矿化率,促进成骨活性。

3 讨论

3.1 丹参骨宝制备工艺稳定,质量可控

异率为 $3.2\% \pm 2.7\%$, vBMD 的差异率则扩大为 均低 $16.0\% \pm 2.14\%$ 、 $8.67\% \pm 2.87\%$ 和 $8.96\% \pm 9.6\% \pm 1.8\%$ 。从拟合曲线获得的峰值骨量见表 4, 1.97%。

本组女性比黑人、白人和美国墨西哥人女性分别平

表 2 中国女性髋部各骨骼区域年龄相关的 BMD、vBMD、BMC 和 BA($\bar{x} \pm s$)

年龄	例数	项目	股骨颈	大转子	转子间	总体髋部	股骨颈
BMD			vBMD				
20~29	488		0.785±0.092	0.637±0.083	0.990±0.120	0.858±0.097	0.173±0.024
30~39	534		0.794±0.104	0.633±0.088	1.002±0.135	0.862±0.108	0.171±0.025
40~49	1148		0.779±0.104	0.623±0.090	0.993±0.130	0.851±0.108	0.167±0.026
50~59	627		0.705±0.103	0.561±0.093	0.915±0.132	0.779±0.109	0.153±0.025
60~69	535		0.622±0.090	0.489±0.083	0.807±0.125	0.688±0.101	0.136±0.023
70~79	225		0.576±0.106	0.440±0.101	0.744±0.151	0.629±0.124	0.127±0.026
≥80	57		0.494±0.118	0.362±0.105	0.619±0.155	0.524±0.131	0.108±0.028
BMC							
20~29	488		3.59±0.47	5.65±1.08	17.23±2.85	26.49±3.88	
30~39	534		3.71±0.55	5.86±1.20	17.81±3.46	27.33±4.47	
40~49	1148		3.64±0.53	5.85±1.13	17.69±3.20	27.19±4.37	
50~59	627		3.27±0.51	5.30±1.14	16.41±3.02	24.97±4.19	
60~69	535		2.85±0.44	4.57±1.00	14.68±2.90	22.10±3.91	
70~79	225		2.62±0.47	4.19±1.13	13.33±3.18	20.14±4.45	
≥80	57		2.27±0.56	3.48±1.12	11.08±3.27	16.83±4.68	
BA							
20~29	488		4.57±0.32	8.88±1.20	17.43±2.35	30.90±2.91	
30~39	534		4.67±0.31	9.24±1.13	17.75±2.55	31.66±3.09	
40~49	1148		4.68±0.31	9.39±1.11	17.84±2.47	31.89±2.99	
50~59	627		4.64±0.31	9.42±1.17	17.99±2.42	32.03±2.93	
60~69	535		4.59±0.32	9.33±1.18	18.18±2.36	32.09±2.93	
70~79	225		4.56±0.30	9.51±1.22	17.97±2.31	32.00±2.86	
≥80	57		4.62±0.40	9.59±1.31	17.90±2.36	32.11±2.93	

表 3 不同种族女性髋部各区域 BMD、vBMD 和 BMC 的差异率(DR, %)($\bar{x} \pm s$)(95% CI)

配对种族	股骨颈	大转子	转子间	总体髋部	股骨颈
BMD-DR(%)			vBMD-DR(%)		
黑人-中国女性	22±4.4 (17~26)	28±12 (17~39)	27±5.8 (20~31)	25±7.2 (18~31)	18±4.1 (14~22)
黑人-白人女性	13±2.1 (11~15)	8.3±2.0 (6.5~10)	10±1.8 (8.4~12)	10±1.9 (8.3~12)	17±2.8 (15~20)
黑人-美国墨西哥女性	9.7±2.4 (7.5~12)	10±4.9 (5.6~15)	8.8±3.5 (5.6~12)	9.1±3.8 (5.6~13)	7.0±2.6 (4.6~9.4)
美国墨西哥-中国女性	11±1.8 (9.1~12)	16±6.0 (11~22)	15±2.5 (13~18)	12±2.4 (10~14)	10±2.2 (8.4~12)
美国墨西哥-白人女性	3.2±2.7 (0.7~5.7)	-1.5±4.7 (-5.8~2.8)	1.2±4.3 (-2.7~5.2)	0.9±4.3 (-3.0~4.9)	9.6±1.8 (7.9~11)
白人-中国女性	7.4±4.3 (3.4~11)	19±11 (8.3~29)	14±6.2 (8.5~20)	13±7.0 (6.7~20)	0.8±3.7 (-2.6~4.2)
BMC-DR(%)					
黑人-中国女性	26±6.0 (20~31)	43±17 (28~59)	28±10 (18~37)	31±11 (21~41)	
黑人-白人女性	9.5±3.3 (6.5~13)	7.9±1.7 (6.3~9.5)	8.5±1.7 (7.0~10)	8.5±1.9 (6.8~10)	
黑人-美国墨西哥女性	13±2.0 (11~14)	19±5.0 (14~23)	15±5.2 (11~20)	16±4.7 (11~20)	
美国墨西哥-中国女性	11±3.4 (8.3~15)	21±9.5 (12~29)	11±4.0 (7.0~14)	13±4.9 (8.3~17)	
美国墨西哥-白人女性	-2.7±3.4 (-5.9~0.4)	-8.9±4.3 (-13~-4.9)	-5.8±4.4 (-9.9~-1.7)	-6.2±4.3 (-10~-2.1)	
白人-中国女性	15±6.9 (8.5~21)	33±16 (18~48)	18±9.7 (8.9~27)	21±11 (11~30)	

注:差异率 DR(%)=(种族配对的前者/配对的后者-1)×100

丹参骨宝的制备工艺是依据药典中复方丹参片中丹参药材的提取制备方法,该方法醇提与水提方法相结合,可同时对丹参的脂溶性及水溶性有效成分进行全面提取,且该工艺稳定可靠、质量可控。我们过去的研究证明,丹参素是主要增加成骨细胞活性,对抗骨丢失的有效成分,故选用水溶性成分丹参素作为标志物及计算依据,而其他各关键峰有待进一步探讨其谱效关系,完善其指纹图谱的研究,将可用作丹参骨宝的质量控制标准。

3.2 丹参骨宝对环磷酰胺致实验大鼠产生免疫抑制的影响

环磷酰胺作为临床广泛使用的化疗药物,有明显的免疫抑制作用,本实验采用的环磷酰胺给药量对大鼠的体重和胸腺指数没有明显影响,提示了该实验大鼠还未产生明显的药物毒性作用,但该实验用量的环磷酰胺使大鼠的外周血白细胞数和脾脏指数显著地降低,已产生了明显的免疫抑制作用。按本实验工艺提取的丹参骨宝,在该实验用量时,对环磷酰胺大鼠的免疫抑制作用没有明显的影响。与文献报道丹参可增加机体免疫力^[7]不一致,其原因可能与丹参的提取方法和使用剂量有关,有待进一步研究。

3.3 丹参骨宝能有效预防环磷酰胺致大鼠骨丢失

从骨组织形态计量学研究的静态参数结果可见:环磷酰胺能使大鼠骨量减少,骨小梁结构疏松退化,提示环磷酰胺可使大鼠产生明显的骨丢失,导致典型的骨质疏松的形态学改变;而丹参骨宝可使骨小梁增多、变粗,增加环磷酰胺大鼠的骨量,改善骨微观结构,提示了丹参骨宝具有预防环磷酰胺致大鼠骨丢失的作用,该作用可能与丹参改善血流循环以及清除氧自由基等作用有关。

3.4 丹参骨宝的预防机制与促进骨的矿化沉积率有关

骨骼在整个生命过程都处于骨吸收和骨形成的动态平衡之中,这一平衡与破骨细胞和成骨细胞的功能密切相关。任何因素引起的成骨细胞生成减少、活性抑制或破骨细胞生成增加、过度活化,都将使骨形成弱于骨吸收,而引起骨丢失导致骨质疏松。从本实验骨组织形态计量学研究的动态参数结果显示:环磷酰胺组可反映成骨细胞数量和活性的荧光周长百分率 % L. Pm/ %、矿化沉积率 MAR 分别下降了 56.0%、23.8%,代表骨形成和骨转换活跃程度的主要指标 BFR/BV 也下降了 53.4%,而骨吸收参数

Oc. N/mm、Oc. S. Pm 却无明显改变。提示环磷酰胺诱导大鼠产生骨丢失是在不影响骨吸收的情况下,降低成骨细胞的数量和活性,使骨形成减少,骨形成与骨吸收平衡受破坏,而致使大鼠骨丢失。丹参骨宝组的 MAR、BFR/BS、BFR/TV 3 个指标都有大幅增长 ($P < 0.05$);而 Oc. N/mm、Oc. S. Pm 的改变都不具有显著性,提示了丹参骨宝预防环磷酰胺致大鼠的骨丢失是由于丹参骨宝拮抗了环磷酰胺抑制骨矿化和形成的作用,丹参骨宝具有上调成骨细胞功能,促进骨形成,提高骨的矿化沉积率的作用,从而预防了环磷酰胺导致的骨丢失。

环磷酰胺对骨形成和矿化的抑制作用,可能是因为:(1)骨细胞和免疫细胞通过各自新释放的细胞因子和体液因子,共同发挥着骨髓与骨之间的彼此关联的机能,保障骨钙平衡,支持骨形成和骨重建,一旦平衡破坏,骨形成则会被抑制。环磷酰胺作为免疫抑制剂,可明显减少骨髓有核细胞数量,破坏骨髓微环境^[8],极可能通过破坏骨与免疫的平衡,而抑制骨形成。(2)环磷酰胺所致的高浓度超氧自由基是造成骨髓损伤的主要机制之一^[9],自由基的大量沉积,势必将造成骨基质框架结构的破坏,使骨中矿物质沉积减少而导致骨的矿化作用减弱。同时环磷酰胺损伤胃肠道,使机体对钙质的吸收和利用减弱,可沉积的骨钙减少,进一步影响骨的矿化。

丹参骨宝能对抗环磷酰胺对骨的作用,可能的原因:(1)有效地提高机体免疫力,改善与骨重建密切相关的骨髓微环境,对抗环磷酰胺所介导的骨髓细胞成脂化,增强成骨细胞的活性^[10]。(2)丹参具有明显清除氧自由基的作用^[11],故可有效地对抗自由基大量沉积而造成的骨矿物在骨基质中的矿化沉积减少。同时丹参可调解胃肠组织的修复与再生^[12],增加肠钙的吸收与利用;并抑制血管的异位钙化,使钙沉积到骨骼^[13],促进骨形成与矿化。

3.5 丹参骨宝预防环磷酰胺致骨丢失的研究意义

(1)环磷酰胺临床应用广泛,副作用多,对其可能导致骨质疏松的危害没有受到应有的重视,本研究观察到环磷酰胺可通过抑制骨形成而诱导骨丢失。因此,及时寻找有效药物进行预防非常重要。

(2)丹参骨宝可激活成骨细胞活性,具有促进胶原矿化和刺激骨形成等作用,有效地对抗了环磷酰胺所导致的大鼠骨丢失,提示丹参骨宝可能成为临床抗骨质疏松和环磷酰胺不良反应的有效药物。

(下转第 351 页)

【参 考 文 献】

- [1] Michaud LB, Goodin S. Cancer-treatment-induced bone loss, part1. [Miscellaneous Article]. American Journal of Health-System Pharmacy, 2003, 63(5): 419-430.
- [2] Wang Y, Wu T, Liu X, et al. The effects of cyclophosphamide on bone histomorphometry in rats. Chinese Pharmacological Bulletin, 2001, 17(5): 575-578 (In Chinese).
- [3] Cui Y, Wu T, Liu Y. The effects of Tuber Fleeceflower root on bone metabolism in mice. Chinese Journal of Osteoporosis, 2004, 10(2): 165-168(In Chinese).
- [4] Cui L, Zou L, Liu Y, et al. Preventing cancellous bone loss in steroid-treated rats and stimulating bone formation by water extract of salvia miltiorrhiza and danshensu. Chinese Pharmacological Bulletin, 2004, 20(3): 286-291(In Chinese).
- [5] Cui L, Wu T, Liu Y, et al. Tanshinone prevents cancellous bone loss induced from ovariectomy in rats. Acta Pharmacol Sin, 2004, 5(5): 678-684.
- [6] 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.
- [7] Wong CK, Tse PS, Wong EL, et al. Immunomodulatory effects of yun zhi and danshen capsules in health subjects—a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. International Immunopharmacology, 2004, 4(2): 201-211.
- [8] Luo X, Chen D, YU M, et al. Influences of bazhen decoction and spatholobus suberectus on the bone marrow microenvironment damaged by cytoxan. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2006, 43(2): 441-444(In Chinese).
- [9] Gao C, Bai H, Jiang J. The role of superoxide(O_2^-) in the damage of bone marrow cells induced by cyclophosphamide in mice. Acta of XuZhou Medical College, 2001, 21(3): 212-214, 219(In Chinese).
- [10] Zou L, Wu T, Cui L, et al. Effect of salvia miltiorrhiza bge on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. Chinese Traditional Patent Medicine, 2006, 28(4): 537-540(In Chinese).
- [11] Guo D, Yang L, Wang D, et al. Experimental study on how salvia miltiorrhiza works on changes of free radical at early stage of spinal cord injury. China Microcirculation, 2005, 9(1): 38-40(In Chinese).
- [12] Qiu Z, LI R. Observation of sub-cell level of the effect of danshen on mitochondrial function of epithelial cells in intestinal mucosa of burnt rats. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2005, 9(46): 190-192(In Chinese).
- [13] Zhang J, Wang Y, Shen L, et al. Complex dribbling-pill of danshen on inhibition of vascular calcification. Chinese Journal of Arteriosclerosis, 2005, 13(5): 571-574(In Chinese).

(收稿日期: 2006-11-17)