

强骨饮对去势大鼠股骨颈骨形态计量学的影响

李春雯 毛应德龙 史晓林

摘要: **目的** 探讨中药强骨饮对去势大鼠骨形态计量学的影响。**方法** 选择雌性 SD 大鼠 60 只,随机分为强骨饮组(治疗组)、仙灵骨葆组(对照组)和空白对照组,切除大鼠卵巢 2 月后,给予中药强骨饮灌胃治疗,并与仙灵骨葆组和空白对照组对照治疗,后分别于 3 月、4.5 月、6 月取股骨颈包埋切片,全自动图像分析及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,骨小梁数量(Tb.N)下降,骨小梁宽度(Tb.Th)下降,经强骨饮治疗 3 月、4.5 月、6 月后,与空白对照组比较,Tb.Th 差异具有显著性($P < 0.01$)、与仙灵骨葆组比较,Tb.N 差异具有显著性($P < 0.05$)。**结论** 中药强骨饮具有增加骨量,提高骨质量的作用,说明中药强骨饮对骨质疏松有明显的治疗作用。

关键词: 中药; 卵巢切除术; 骨组织形态计量学; 骨质疏松症

Effect of Chinese herbal medicine (Qiangguyin) on histomorphology of femur neck in ovariectomized rats

LI Chunwen, MAOYING Delong, SHI Xiaolin. The Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Abstract: **Objective** To explore the histomorphology effect of Qiangguyin on ovariectomized rats. **Methods** Sixty female SD rats were divided randomly into three groups: Qiangguyin group(treatment group)、Xianlinggubao group (contrast group) and control group. All rats were ovariectomized, the Qiangguyin group、Xianlinggubao group and control group were given Qiangguyin、Xianlinggubao and distilled water after two weeks respectively. And 3、4、5、6 months after the treatment, the femur neck were cut and stained with Masson Golden Trichrome for bone histomorphometric analysis. **Results** The Tb.Ar、Tb.N、Tb.Th of ovariectomized rats were decreased. Compared with Tb.Th of control group ($P < 0.01$) and Tb.N of Xianlinggubao group($P < 0.05$), the differences were observed. **Conclusions** Chinese herbal medicine (Qiangguyin) can increase the bone quantity and quality. Qiangguyin is effective in treatment of osteoporosis.

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

骨质疏松症是世界上公认的“悄无声息的流行病”,2001 年美国国立卫生研究院(NIH)^[1]已重新定义为:“骨质疏松是一种骨骼异常,特征是骨强度降低,导致骨折危险性增高”。骨强度反映骨密度和骨质量两个主要特征的整合。而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,是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^[2,3]。本研究旨在通过观察中药强骨饮对去卵巢大鼠骨组织形态计量学各指标的影响,探讨中药强骨饮治疗骨质疏松的作用机理以及效果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物:取清洁级健康雌性 SD 大鼠 60 只,体重 200 ~ 220 g(由浙江中医药大学实验动物中心提供)随机分为 3 组,每组 20 只,分别为空白对照组,强骨饮治疗组,仙灵骨葆治疗组。所有大鼠均喂养

作者单位: 150086 哈尔滨,哈尔滨医科大学附属第二医院(李春雯);浙江中医学院附属新华医院骨科(毛应德龙、史晓林)

通讯作者: 史晓林, Email: xlshi-2002@163.com

在恒温、恒湿的清洁环境中,环境温度为 25℃,湿度为 70%,每天 12 h 光照/黑暗,任意进食,提供大鼠标准饲料和自来水。

1.2 方法

1.2.1 药物制备:中药强骨饮由黄芪、鹿角霜等 12 味中药组成,(由浙江中医药大学附属第二医院骨伤科试验室提供),仙灵骨葆由贵州同济堂制药股份有限公司提供。

1.2.2 模型制作:(1)测量体重。(2)麻醉:3%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔内注射麻醉。(3)手术方法:常规无菌操作,从下腹部正中切开,暴露出子宫,沿着子宫找到卵巢,结扎后切除双侧卵巢,逐层缝合。(4)普通饲料饲养 8 w,自由饮水,自然光照。

1.2.3 治疗方法:各组大鼠术后正常饲养满 2 m 后,对照组组按 2 mL/d 蒸馏水灌胃;强骨饮组灌服中药强骨饮 2 mL/d,仙灵骨葆组则给予 2 mL/d 灌胃。

1.2.4 标本制作:分别于灌胃 3 m、4.5 m、6 m 后,各取 5 只检测。动物采用断头方法处死,留取股骨颈送上海九院骨伤实验中心做骨组织切片,进行图象以及骨形态计量学软件的处理。

1.2.5 测量项目:4 μm 片以 Masson Golden Trichrome^[4]染色封片,进行骨计量学参数测量,测得:B.ar 骨小梁面积、T.ar 整体松质骨面积、B.Pm 骨小梁周长。根据公式计算得到:骨体积分数 BV/TV = 100 * B.ar/T.ar、骨小梁厚度(Tb.Th) = (B.ar/B.Pm)(π/2)、骨小梁数量(Tb.N) = (B.Pm/T.ar) * 10 骨小梁间距 Tb.sp = (1000 * T.ar - B.ar)/B.pm。

1.3 统计学处理

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,预先用 Levenepstest 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 11.0 统计软件进行分析。

2 结果

按统计学处理,数据以均值标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

表 1 3 个月 3 组骨形态计量学参数的比较(股骨颈)

	强骨饮组	仙灵骨葆组	空白组
BV/TV(%)	20.31	13.17	11.59
Tb.Th(μm)	38.44	35.63	33.91
Tb.SP(μm)	328.95*	343.96	353.63

注:与两个对照组比较,* $P < 0.05$

表 2 4.5 个月 3 组骨形态计量学参数的比较(股骨颈)

	强骨饮组	仙灵骨葆组	空白组
BV/TV(%)	45.65*	39.32	10.21
Tb.Th(μm)	71.53	63.55	30.55
Tb.SP(μm)	297.92	302.21	364.19

注:与两个对照组比较,* $P < 0.01$

表 3 6 三组骨形态计量学参数的比较(股骨颈)

	强骨饮组	仙灵骨葆组	空白组
BV/TV(%)	46.99	43.23	11.23
Tb.Th(μm)	85.24	70.60	30.65
Tb.SP(μm)	271.32*	288.45	356.15

注:与两个对照组比较,* $P < 0.01$

从以上的表中可以看出,去卵巢大鼠经过强骨饮治疗 3、4.5、6 个月后的数据以及骨组织切片显示,与空白组以及仙灵骨葆组相比,强骨饮组的骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)均有增加的趋势,而骨小梁间距(Tb.SP)则有降低的趋势,故强骨饮可明显增加腰椎和股骨颈骨小梁体积和数量,降低骨小梁间距,对骨质疏松有明显的治疗作用。

3 讨论

随着社会老龄化的进程,骨质疏松症的发病率呈上升趋势,据王洪复^[5]统计,60 岁~69 岁老年妇女骨质疏松的发生率高达 50%~70%,老年男性发生率约为 30%左右。因此骨质疏松的诊断和治疗具有高度的临床意义及紧迫性。

现代研究表明,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,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]。

中药强骨饮是以“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,强骨饮由黄芪、鹿角霜等 12 味中药组成,以益气、补肾、通经络为主。经过毒理学研究,证明该方无明显毒副作用,适合长期服用。经过临床观察应用研究,该方对促进骨的成骨细胞形成,抑制破骨细胞活性方面,以及骨质疏松症所致的疼痛、肌

痉挛等症状的疗效良好,应用后骨质疏松症的生化指标检测呈良性趋势,骨密度提高明显^[7]。强骨饮运用黄芪益气行滞,与鹿角霜补肾助阳共为君药,达到益气补肾之功,二者咸甘并用,均入肾经,而达到鼓舞肾阳的目的;恰与骨质疏松症的机理相合,因骨质疏松症多由年老体亏、肾气亏乏,不能主骨生髓所致。黄芪与鹿角霜并用,益气补肾以达到壮阳增髓生骨之效。臣以川芎、鸡血藤、忍冬藤、秦艽、露蜂房与肉桂温经通络,补血行血,通络以助气行,肉桂本性有补火助阳之功,以温熙肾阳助骨生长,诸药相和,温经通络,补肾助阳,能治疗腰背脊酸软、牵涉作痛、筋脉抽搐、腰背支撑不能、行走痛甚以治其标;又臣以川断、杜仲、骨碎补补肾壮骨,以助君药补肾益气之功,治其本;佐使以防风,以通达内外,标本互应,使益气补肾而不滞,温经行络而不过。诸药相伍,通达阴阳,标本相合,达到益气补肾,温经通络之效。

本实验研究结果表明,自拟强骨饮具有较强的促进骨形成的作用,同时亦有较强的抑制破骨细胞活性的作用。其中鹿角霜能够增加去卵巢大鼠松质骨骨量,黄芪能预防骨量丢失。从骨形态计量学参数的结果分析,本中药能明显改善骨质量,经过强骨饮治疗 3、4.5 和 6 个月,其骨体积分数 BV/TV、骨小梁间距(Tb.sp)、骨小梁厚度(Tb.Th)以及骨小梁数目均逐步平稳地增加,表明本方具有显著增加骨量,其作用机制可能是促进骨形成,同时又有抑制骨吸收作用。根据现代药理学研究和本方的组成可以看出,首先,从中医理论来说,骨质疏松症病因以肝肾亏虚,气血不足多见,本方中有黄芪等药物是补药之长,能补气固虚,维持整体平衡;而现代医学认为骨质疏松主要以性激素分泌减少导致破骨细胞吸收功能增强所致^[8],而国内报道李思等^[9]研究表明经补肾方药治疗后能显著增加骨小梁体积百分率,降低骨小梁形成表面百分率和骨小梁吸收百分率。本方是补肾方,故能够抑制破骨细胞的吸收功能,这与本次实验中骨小梁的变化符合,说明强骨饮具有增加股骨颈的骨小梁面积和数量。其次,从细胞学观点

来看,黄芪能使细胞生理代谢作用增强,细胞数量增多,能够显著促进造血细胞 DNA 的合成,加速有核细胞的分化过程,这一机制可能对促进骨髓前成骨细胞向成骨细胞的分化有一定作用。国内学者证明黄芪多糖对体外成骨细胞培养具有促进成骨增殖的作用,成骨细胞增多能够引起新骨合成的功能增强,再则,从性激素水平来看,黄芪具有性激素或促性激素样作用,可改善大鼠骨质疏松状态,提高动物体内雌激素、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 水平。因此,本方具有增强促进骨形成的作用,又同时能抑制部分骨吸收,它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,综合调节平衡,所以能够促进骨量的增加,有效地预防去卵巢大鼠骨质疏松症松质骨的丢失。

【参 考 文 献】

- [1] NIH Consensus. Development Panel on Osteoporosis Prevention Diagnosis and Therapy. JAMA, 2001, 285:785.
- [2] FDA: Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis (Draft). 1994.
- [3] 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.
- [4] 李青南,主编.骨质疏松实验动物研究 2 骨组织形态计量学.成都:四川大学出版社,2001;232-248.
- [5] 邱明才.骨质疏松研究的现状与进展.中华医学杂志,2001,81(14):833-835.
- [6] Barger Lux MJ, Recker RR. Bone microstructure in osteoporosis: transilial biopsy and histomorphometry. Top Magn Reson Imaging, 2002, 13(5):297-305.
- [7] George AC, Murrel MB, Martin M, et al. Nitric oxide: an important articular free radical. Bone Joint Surg, 1996, 78:265-273.
- [8] Chambers TJ, Chow JW, Lean JM. The anabolic action of estrogen on rat bone. In: Sex steroid and bone, Berlin:Springer, 1994:119.
- [9] 李思,孔德娟.补肾方药对骨质疏松防治的实验研究.中国骨质疏松杂志,2002,8:166-170.

(收稿日期:2007-02-24)