

# 密骨胶囊和健脾方对去卵巢大鼠骨结构和力学性能的影响

王立童 赵咏芳 王翔 徐宇 陈元川 詹红生

中图分类号: R274 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)01-0027-05

**摘要:**目的 观察密骨胶囊、健脾方对大鼠骨结构、生物力学性能的影响,探讨补肾、健脾不同功效的中药复方对骨结构、生物力学性能作用可能存在的差异性。方法 复制切卵巢大鼠骨质疏松模型,随机分为假切组、模型组、密骨胶囊组和健脾方组,术后 12 周开始灌胃,灌胃 12 周后取材。测定股骨骨密度、骨生物力学,观察骨组织形态学、骨超微结构。结果 密骨胶囊能提高切卵巢大鼠股骨骨密度( $P < 0.05$ ),提高骨生物力学性能( $P < 0.05$ ),改善骨的微结构,健脾方能维持大鼠股骨骨密度( $P > 0.05$ ),提高骨生物力学性能( $P < 0.05$ ),明显改善骨的微结构。结论 补肾中药复方对骨量的提高、生物力学性能改善方面较健脾方显著,而健脾中药复方较之在骨微结构的改善方面更有优势。

**关键词:** 补肾; 健脾; 切卵巢大鼠; 骨结构; 骨生物力学

**The effect of MiGu capsule and strengthening spleen prescription to bone structure and bone bio-mechanical property on ovariectomy rats** WANG Litong, ZHAO Yongfang, WANG Xiang, et al. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China

**Abstract:** **Objective** The study is to observe the effect of MiGu Capsule and Strengthening Spleen prescriptions on bone structure and bone biomechanics by using therapeutic drug delivery intervention osteoporosis model of Ovariectomized Rat and Chinese patent medicine complex prescriptions with different therapeutic principles such as MiGu Capsule and Strengthening Spleen prescriptions in the guidance of different principles such as invigorating the kidney and Strengthening the spleen. **Methods** All rats took Ovariectomy operation and were randomly divided into four groups, pseudo-resection group, model group, MiGu Capsule group and Strengthening Spleen prescriptions group. Drug delivery 12 weeks later. Stomach lavage lasts for 12 weeks. Then, to observe the effect of medicine on the rats' bone mineral density, bone biomechanics, bone tissue morphology, bone ultramicrostructure. **Results** MiGu Capsule can enhance bone mineral density( $P < 0.05$ ), increase bone bio-mechanical property( $P < 0.05$ ), improve bone structure and bone ultramicrostructure, Strengthening Spleen prescriptions can enhance bone mineral density( $P > 0.05$ ), increase bone bio-mechanical property( $P < 0.05$ ), better effect on improving bone structure and bone ultramicrostructure. **Conclusion** MiGu Capsule have a better effect on enhancing bone mineral density and bone bio-mechanical property, Strengthening Spleen prescriptions has a better effect on improving bone structure and bone ultramicrostructure.

**Key words:** Kidney-nourishing; Strengthening spleen; Ovariectomy rats; Bone structure; Bone bio-mechanical property

基金项目:“中医骨伤科学”国家重点学科和上海市重点学科项目(100508, T0303);国家自然科学基金资助项目(30371793, 30300459, 30472222, 30500674);教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET040438);教育部博士点基金(20040268012);上海市曙光计划(03SG61);上海市科委重点项目(04JC14071);上海市科委启明星计划课题资助(04qmx1434)

作者单位:200021 上海中医药大学附属曙光医院 上海市中医药研究院骨伤科研究所

通讯作者:詹红生, Email: shgsyjs@139.com

骨的微细结构破坏导致的骨生物力学性能下降,是骨质疏松性骨折发生的关键骨内因素。以往研究证实,补肾和健脾中药复方均具有一定的治疗骨质疏松症的临床疗效<sup>[1]</sup>,在骨矿密度方面,通常仅表现为维持或小幅升高的作用<sup>[2]</sup>。鉴于此,本研究主要观察补肾、健脾中药复方在改善骨结构和生物力学性能方面的作用特点。

1 材料和方法

1.1 材料

3 月龄未孕产的雌性 SD 大鼠 60 只,体重 220 ~ 250 g,采用随机数字表法随机分为 4 组:假切组、模型组、密骨胶囊组和健脾方组,其中假切组和模型组每组 20 只,余每组 10 只。用 0.05 g/ml 的氯胺酮(100 g/kg)腹腔注射麻醉,除假切组外,其余 3 组大鼠均行双侧卵巢切除术。切卵后 12 周开始治疗性给药,按体表面积换算大鼠用药量,用 0.5% CMC 配成悬浊液,连续灌胃 12 周。大鼠自由摄取标准饲料和蒸馏水,假切组、模型组灌胃同体积生理盐水。术后 12 周即灌胃时于假切组、模型组中各随机取 10 只进行取材,剩余 40 只于术后 24 周即灌胃 12 周后全部取材,见表 1。

表 1 动物分组、手术、给药、取材情况

| 组别    | 大鼠数<br>(只) | 手术方式    | 术后 12 周<br>取材只数 | 给药时间和剂量          | 术后 24 周<br>取材只数 |
|-------|------------|---------|-----------------|------------------|-----------------|
| 假切组   | 20         | 假切术     | 10              | —                | 10              |
| 模型组   | 20         | 双侧卵巢切除术 | 10              | —                | 10              |
| 密骨胶囊组 | 10         | 双侧卵巢切除术 | —               | 术后 12 周灌胃 2 ml/d | 10              |
| 健脾方组  | 10         | 双侧卵巢切除术 | —               | 术后 12 周灌胃 2 ml/d | 10              |

注:密骨胶囊由首乌、淫羊藿等组成,具有补肾壮骨作用,上海中医药大学附属曙光医院制剂室制备(批号 D40714),沪卫制剂 N(97)089(曙光),具有稳定的质控标准;健脾方由山药、麦芽等组成,具有健脾生肌作用,上海中医药大学附属曙光医院制剂室制备成片剂,已建立稳定的质控标准

1.2 方法

1.2.1 骨密度测定:以 DPX-L 型双能 X 线骨密度仪(附动物骨密度测定软件)进行骨密度(BMD)测定。

1.2.2 骨生物力学测定:完整的取出大鼠第 3 腰椎,剔除周围软组织,以游标卡尺测量其直径后输入 WinAGS-力学实验机计算机分析控制软件,以 2 mm/min 速度加载,跨度 20 mm,进行三点弯曲测试。

1.2.3 骨形态学观察:取大鼠左侧胫骨,剔除周围

软组织,以 4% 多聚甲醛固定过夜,更换 8% EDTA 脱钙,脱水、包埋,以 6 μm 厚度连续切片,HE 染色,采用荧光倒置相差显微镜观察骨组织形态结构。

1.2.4 扫描电镜(骨超微结构)观察:取大鼠第 3 腰椎,剔除周围软组织,用 4% 多聚甲醛、2.5% 戊二醛 1:1 混合固定液固定过夜,10% 次氯酸钠溶液处理 6 h,30% ~ 100% 乙醇逐级脱水,每次 2 h,100% 乙醚浸泡 6 h,室温下空气干燥 2 ~ 3 d,真空喷金,在 philips XL30 型扫描电镜下观察并摄片。

1.3 统计学处理

数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组测量数据两组间比较采用 *t* 检验,3 组间比较采用单因素方差分析,用 SPSS 13.0 统计处理软件包,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 股骨骨密度

剔除因意外导致大鼠中途死亡及因卵巢摘除不完全所致子宫重量异常偏大,最终共得 50 只大鼠股骨骨密度数据(表 2)。结果提示:卵巢切除 12 周后、24 周后模型组分别较同时间点假切组股骨骨密度显著降低(*P* < 0.05);术后 24 周与术后 12 周比较,假切组、模型组差异无统计学意义(*P* > 0.05);密骨胶囊组、健脾方组均较术后 12 周模型组显著升高(*P* < 0.05),卵巢切除 24 周后,与模型组比较,密骨胶囊组显著升高(*P* < 0.05),健脾方组有升高趋势(*P* > 0.05),但与假切组比较,健脾方组差异无显著性(*P* > 0.05)。

表 2 不同组别股骨骨密度测量结果( $\text{g}/\text{cm}^2, \bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 股骨 BMD   |                |          |                 |
|-------|----------|----------------|----------|-----------------|
|       | <i>n</i> | 术后 12 周        | <i>n</i> | 术后 24 周         |
| 假切组   | 10       | 0.247 ± 0.026  | 8        | 0.254 ± 0.018   |
| 模型组   | 8        | 0.219 ± 0.016* | 8        | 0.227 ± 0.011★  |
| 密骨胶囊组 | —        | —              | 8        | 0.241 ± 0.013●▲ |
| 健脾方组  | —        | —              | 8        | 0.237 ± 0.017●  |

注:与假切组比较,\**P* = 0.017;与假切组比较,★*P* = 0.003;与术后 12 周模型组比较,●*P* = 0.009,*P* = 0.040;与术后 24 周模型组比较,▲*P* = 0.037

2.2 腰椎生物力学检测结果

卵巢切除 24 周后与假切组比较,模型组腰椎最大载荷显著降低(*P* < 0.05);与模型组比较,密骨胶囊组、健脾方组腰椎最大载荷明显升高(*P* < 0.05);

此外 ,密骨胶囊组与假切组比较差异无显著性(  $P > 0.05$  ) ,而健脾方组与假切组比较差异有显著性(  $P < 0.05$  ) ,见表 3。

表 3 不同组别术后 24 周腰椎最大载荷结果 (  $N, \bar{x} \pm s$  )

| 组别    | 大鼠数( 只 ) | 最大载荷                         |
|-------|----------|------------------------------|
| 假切组   | 6        | 442.06 ± 47.76 <sup>▲</sup>  |
| 模型组   | 6        | 322.26 ± 52.92 <sup>★</sup>  |
| 密骨胶囊组 | 6        | 391.89 ± 60.80 <sup>▲</sup>  |
| 健脾方组  | 6        | 381.47 ± 62.55 <sup>★▲</sup> |

注 :与假切组比较 ,<sup>★</sup>  $P = 0.000$  , $P = 0.042$  ;与模型组比较 ,<sup>▲</sup>  $P = 0.000$  ; $P = 0.021$  , $P = 0.045$

2.3 胫骨病理形态学结果

术后 12 周、24 周假切组 HE 染色光镜下见骨小梁粗大、饱满 ,形态结构完整 ,排列呈网格状 ,骨髓腔相对较小 ;术后 12 周、24 周模型组骨小梁稀疏 ,变细 ,数目减少 ,形态结构完整性差 ,小梁排列为纵向 ,几乎看不到横行骨小梁 ,骨髓腔增宽 ;模型组前后两时间点比较 ,术后 24 周骨结构破坏更严重 ;密骨胶囊组、健脾方组骨小梁数目明显增多、粗大 ,横行骨小梁存在 ,形态结构完整性较好 ,小梁排列呈网状结构 ,健脾方组较密骨胶囊组更明显( 图 1 ~ 6 )。

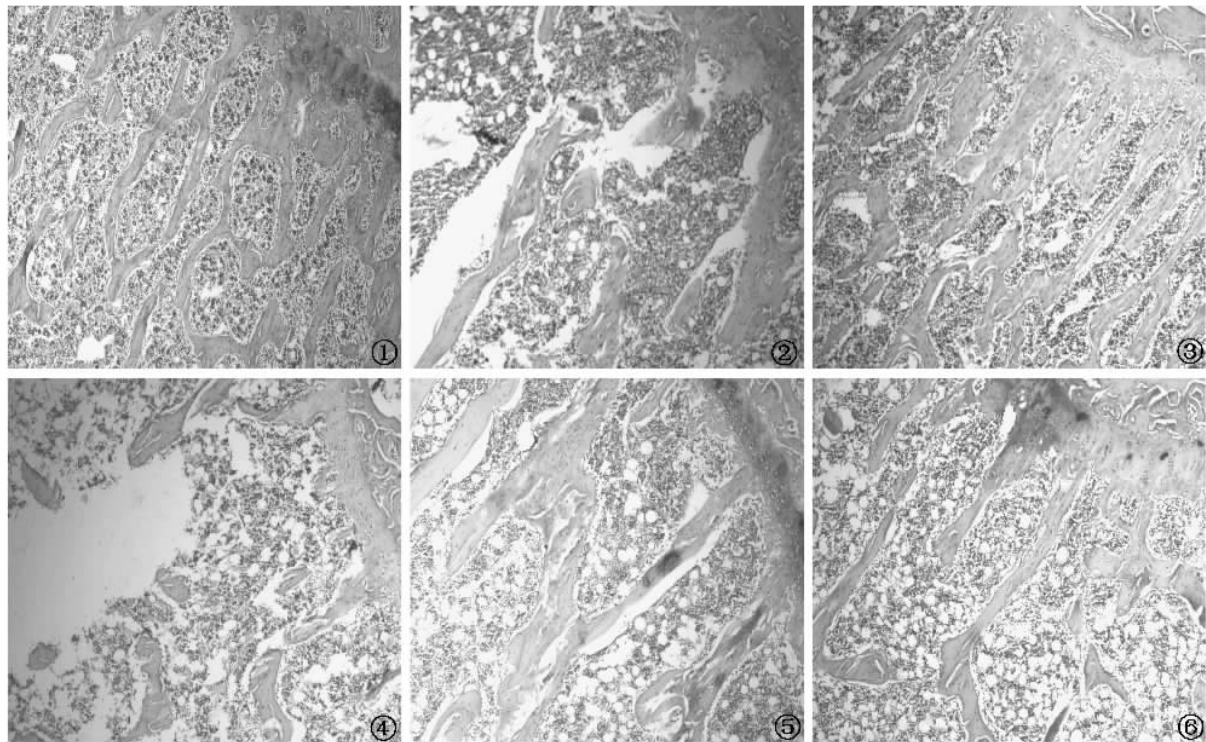


图 1 术后 12 周假切组骨小梁排列紧密可见大量横行骨小梁 ,结构完整 HE × 100 ; 图 2 术后 12 周模型组骨小梁稀疏 ,变薄变细 ,几乎无横行骨小梁 ,结构严重破坏 HE × 100 ; 图 3 术后 24 周假切组骨小梁排列紧密 ,可见大量横行骨小梁 ,结构完整 HE × 100 ; 图 4 术后 24 周模型组骨小梁稀疏 ,变薄变细 ,几乎无横行骨小梁 ,结构严重破坏 HE × 100 ; 图 5 密骨胶囊组骨小梁与模型组相比小梁明显粗大 ,横行骨小梁存在 ,小梁呈网状结构 HE × 100 ; 图 6 健脾方组骨小梁与模型组比较 ,横行骨小梁存在 ,小梁排列呈网格状 HE × 100

2.4 腰椎扫描电镜结果

术后 24 周假切组骨小梁呈柱状纵向排列 ,数量多 ,较粗大 ,骨小梁表面光滑 ,小梁之间的间距小 ,纵向小梁与横向骨小梁连接呈立体网状 ,三维结构完整 ,模型组三维结构破坏显著 ,骨小梁明显变薄、变细 ,数目明显减少 ,骨小梁表面可见较多因骨吸收形成的陷窝 ,小梁间距增大 ,排列稀疏紊乱 ,部分骨小梁出现断裂、残端游离 ;密骨胶囊、健脾方治疗性给药 12 周后能明显改善骨三维结构 ,健脾方的作用较密骨胶囊更显著( 图 7 ~ 10 )。

3 讨论

骨质疏松症常表现为骨量减少 ,以往研究较多地强调骨密度在骨质疏松性骨折发生、诊治以及疗效评价中的作用。随着研究的深入 ,临床上发现某些骨量很低的人并不发生骨折 ,而药物治疗后骨密度虽然大幅度提高 ,发生骨折的危险性却也同步增加 ,可见骨密度与骨折风险性并非直接相关。因此 ,近来在关注除骨密度的同时 ,对骨的微细结构、骨有机基质、矿物成分、微小损伤及修复状态这些骨量以

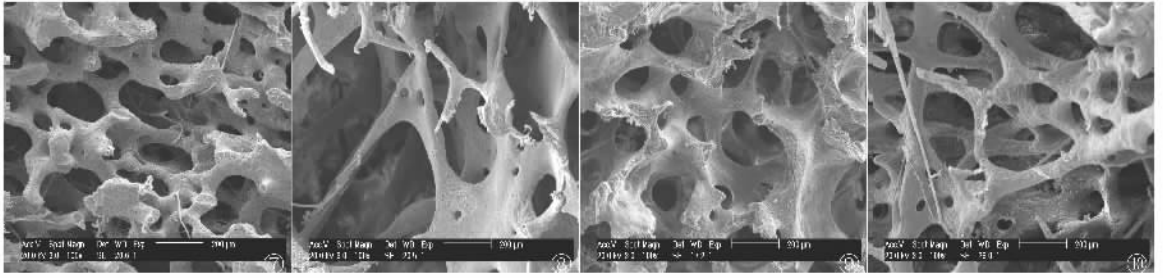


图7 假切组骨小梁呈柱状,数量多,较粗大,骨小梁表面光滑,间距较小,排列以纵向为主,其间有横向骨小梁连接,呈立体网状,三维结构完整,骨髓腔较小,扫描电镜 $\times 100$ ;图8 模型组骨小梁变薄、变细,数目明显减少,骨小梁表面可见较多因骨吸收形成的陷窝,表面凹凸不平,排列稀疏紊乱,间距增大,骨髓腔较大,部分骨小梁出现断裂、残端游离,三维结构破坏,扫描电镜 $\times 100$ ;图9 密骨胶囊组骨小梁三维结构明显好于模型组,基本呈立体网状,与假切除组比较接近,扫描电镜 $\times 100$ ;图10 健脾方组骨小梁三维结构明显好于模型组,三维结构基本完整,与假切除组更接近,扫描电镜 $\times 100$

外的因素也受到广泛重视。本研究正是从骨结构和骨生物力学的角度观察补肾、健脾中药复方的治疗骨质疏松症的作用特点。

骨组织是一种有生命力的按生物力学原理组成其内部结构的特殊结缔组织,骨强度除由骨量决定外,还与骨结构(微构筑的方式——骨小梁的强度与稳定性)有关。仅靠骨量测量无法全面提示骨骼的内在特征<sup>[3]</sup>。骨的微细结构成分是骨质量的直接反映,它既包括骨构成成分,也包括空间微细结构。绝经后雌激素水平低下,骨吸收明显加快,骨矿物质含量丢失的同时,也会出现骨小梁的退行性改变即骨小梁变细、穿孔甚至消失,骨小梁数目减少,间隔加大,骨体积下降。与此同时,还会出现骨小梁内的裂损即骨小梁的显微骨折。此外,骨小梁的基质主要由矿物质和胶原纤维构成,骨质疏松时随着胶原的病损和骨矿物含量的减少也造成了骨小梁本身材料性能的改变。因此,骨小梁强度下降,骨骼生物力学结构和性能遭到破坏,具体表现在骨骼特定的承载部位如股骨、腰椎骨形态功能失常,不足以承受正常的功能性载荷,导致轻微外力作用即可发生骨折<sup>[4]</sup>。

研究结果表明:密骨胶囊能提高骨密度,而健脾方能维持骨密度。肾主骨生髓,故以补肾为治则的密骨胶囊对提高股骨骨密度上较健脾方更明显。由去卵巢后致骨质疏松动物模型主要发生在骨转换率高的松质骨,如长骨的干骺端和椎体骨,而骨转换率低的皮质骨变化不明显。骨的重建活动即骨转换是在骨小梁表面进行,松质骨骨小梁表面大,发生在松质骨表面的骨转换比皮质骨高约9倍<sup>[5]</sup>。因此本实验取胫骨、腰椎分别进行骨微结构、骨超微结构的观

察,结果表明:卵巢切除后骨小梁稀疏、三维结构破坏,同谢肇等<sup>[6-8]</sup>研究结果相符。与模型组比较,密骨胶囊组、健脾方组对骨结构、骨超微结构都有明显的改善,小梁较粗,横行骨小梁存在,三维结构较完整,健脾方较密骨胶囊的作用更显著,可见具健脾作用的中药在骨强度的提高方面更倾向于改善骨结构,可能是因为脾统血,故对血运丰富的松质骨作用更显著。而补肾中药对骨量的提高作用更显著,是由于肾主骨所以补肾则骨健——骨密度升高。

实验中应用由雌性大鼠切除卵巢造成绝经后骨质疏松动物模型,但是由于大鼠缺乏哈弗氏系统,不发生由骨量减少而引起的骨折,这种缺陷可以通过生物力学实验使大鼠的骨力学性能改变,来替代对骨质疏松后脆性骨折的预防效果观察<sup>[9]</sup>。对骨生物力学性能的研究对于防治骨质疏松症具有十分重要的意义,骨生物力学是反映骨生长代谢情况的一个重要指标,是骨量、骨结构连续性、骨皮质厚度及骨的材料特性的综合指标。最大载荷是指试件受力点所能承受的最大外力,是结构力学指标,体现的是骨的结构力学性能,属于骨的内在质量,不受骨尺寸的影响<sup>[10]</sup>,它直接反映着骨小梁的骨质、结构的连续性、骨皮质的强度等,是对骨质量的综合反映<sup>[11]</sup>。本实验结果显示:切除卵巢后导致大鼠腰椎骨的最大载荷明显下降,再次证实了既往的研究结论<sup>[6,12,13]</sup>。当雌激素水平下降时,增强的骨转换导致松质骨丢失较皮质骨早且严重。以承重为受力方式的股骨其受力区域几乎均为皮质骨,股骨三点弯曲试验的生物力学参数和骨矿物质含量均无明显变化<sup>[14]</sup>。所以本实验取腰椎进行骨生物力学测定,结

果提示:密骨胶囊组、健脾方组都显著提高腰椎的最大载荷( $P < 0.05$ ),因为“脾主四肢肌肉”,具健脾生肌疗效的健脾方间接的增强了骨的生物力学性能;“腰为肾之府”,补肾之方直接作用于“肾之府”而达到提高腰椎最大载荷的目的。

综上所述,补肾、健脾中药复方都增加了骨量、改善骨结构、提高骨的生物力学性能,具有治疗骨质疏松症的作用,但二者存在着差异:补肾中药复方对骨量的提高、生物力学性能改善方面较健脾方显著,而健脾中药复方较之在骨微结构、骨超微结构更有优势,是否生物力学性能与骨密度的相关性比骨结构与骨密度的相关性更强?将有待于进一步证实,结合既往研究表明补肾、健脾中药复方非但具有多靶点作用,而且对不懂靶向器官的调节作用也有差异。这将为研究不同功效的中药在治疗骨质疏松症所引起的不同症状中的应用奠定了良好的理论基础。

### 【参 考 文 献】

- [1] 王立童,赵咏芳,王翔,等.具有补肾、健脾功效的中药复方对切卵巢大鼠肾脏、股骨中 VDRmRNA 表达的影响.中国中医骨伤科杂志,待发.
- [2] 王立童,赵咏芳,王翔,等.密骨胶囊和健脾方对切卵巢小鼠肠、腓肠肌中 VDRmRNA 表达的影响.中国骨伤,待发.

- [3] 赵文国,贺金玲.骨质疏松症的药物治疗新进展.中国综合临床 2003, 2(19):13-14.
- [4] 黄公怡.骨质疏松性骨折及其临床特点.中华骨科杂志 2008, 28(1):74-77.
- [5] 许碧连,吴铁,崔燎,等.大鼠去卵巢后对不同部位骨骼的影响.中国临床药理学与治疗学 2004, 9(10):1175-1178.
- [6] 谢肇,李起鸿,许建中,等.BEMF 对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织 bFGF 表达的影响及意义.中国骨质疏松杂志 2007, 13(2):96-100.
- [7] 张志平,谢华,吴铁,等.仙珍骨宝抗泼尼松致大鼠骨质疏松骨结构破坏的作用.解剖学研究 2007, 29(4):253-255.
- [8] 庞炜,李克坤,王晓兰,等.补肾固骨组方的元素含量测定及防治动物骨质疏松实验研究.西北国防医学杂志 2006, 27(1):51-53.
- [9] 刘忠厚.骨质疏松学.北京:科学出版社,1998.
- [10] 史念珂,富东慧,蔡霞.大鼠股骨生物力学实验研究.天津大学学报 2006, 39(4):458-462.
- [11] 王建华.补肾方药对去卵巢大鼠骨密度及血清雌激素水平影响的实验研究.河北中医医药学报 2003, 18(3):6-7.
- [12] 李盛华,刘忠何,姚正凯,等.陇中损伤散对去卵巢大鼠股骨和第一腰椎生物力学的影响.甘肃中医 2006, 19(11):43-44.
- [13] 邵敏,庄洪.骨密度、骨矿含量与椎体生物力学的相关性及中药骨康的干预作用.中医药临床杂志 2006, 18(3):249-251.
- [14] 许碧连,崔燎,吴铁,等.去卵巢大鼠股骨和腰椎骨生物力学特性及骨矿物含量的变化.中国老年学杂志 2005, 25:1526-1528.

(收稿日期:2008-10-29)