

补肾壮骨颗粒对去势大鼠骨质疏松症骨组织计量学的影响

李晓旻 林宁 邓伟民 黄海

中图分类号: R285.6 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)02-0171-04

摘要: 目的 观察补肾壮骨颗粒对骨质疏松症雄性与雌性大鼠的骨组织计量学的影响;探讨该药对不同性别大鼠骨质疏松症疗效差异的机制。方法 雄性大鼠 54 例,雌性大鼠 58 例,各设假手术组、模型组、阳性药组、补肾壮骨颗粒高剂量组、补肾壮骨颗粒低剂量组,采用去势方法造成雄雌性大鼠骨质疏松模型,给药 13w,观察不同性别各组大鼠骨组织计量学指标的变化。结果 与模型组对照,补肾壮骨颗粒高剂量组雌性大鼠骨小梁面积百分比有增加趋势($P > 0.05$),骨小梁数目明显增加($P < 0.05$),分离度明显减少($P < 0.05$);而高剂量组雄性大鼠各指标均未见明显的改变($P > 0.05$)。结论 补肾壮骨颗粒可改善去势造成的骨质疏松雌性大鼠模型的骨组织计量学指标,对雄性大鼠则无明显作用。

关键词: 中医药疗法;骨质疏松;骨组织计量学

Effect of Bushen Zhuanggu Granules on bone histomorphometry in rats with emasculation-induced osteoporosis LI Xiaohao¹, LIN ling², DENG Weiming¹, et al. ¹Department of Chinese Tradition Medicine, Chinese PLA General Hospital of Guangzhou Military Area, Guangzhou 510010; ²Department of Chinese Tradition Medicine, the Second People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510000, China

Corresponding author: DENG Weimin, Email: dengweimin1959@21cn.com

Abstract: **Objective** To observe the effect of Bushen Zhuanggu Granules on bone histomorphometry of female and male rats with emasculation-induced osteoporosis, and to explore the mechanism of efficacy difference of this drug on rats of different gender. **Methods** Fifty-four male rats and fifty-eight female rats were randomly divided into 5 groups, sham-operation group, model group, positive-drug control group, high-dosage group, and low-dosage group. Models of osteoporosis were induced by emasculation. The duration of drug administration was 13 weeks. The changes of bone histomorphometry of rats with different gender in different groups were observed. **Results** Compared to the model group, the percentage of bone trabecula area of the rats in female high-dosage group increased without statistically significance ($P > 0.05$). The number of bone trabecula of the rats in female high-dosage group significantly increased compared with the control group ($P < 0.05$). The trabecular separation of the rats in female high-dosage group significantly increased compared with the control group ($P < 0.05$). However, all factors of rats in the male high-dosage group showed no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** Bushen Zhuanggu Granules can ameliorate the bone histomorphometry of female rats with emasculation-induced osteoporosis, but without obvious effects on male rats.

Key words: TCM therapy; Osteoporosis; Histomorphometry

骨质疏松 (osteoporosis, OP) 亦称骨质缺少症,

是一种骨代谢性疾病。美国国立卫生实验院于 2000 年 3 月将骨质疏松症定义为以骨强度下降,骨折风险性增加为特征的骨骼系统疾病^[1]。随着社会经济的发展和生活水平的提高,我国已渐进入老龄化社会,骨质疏松患病率逐年增加,老年人骨质疏松患病率女性为 90%,男性为 61%。在骨质疏松症

基金项目:广东省自然科学基金(9152500002000003)

作者单位:510010 广州,广州军区广州总医院中医科(李晓旻、邓伟民、黄海);广东省第二人民医院中医科(林宁)

通讯作者:邓伟民,Email: Dengweimin1959@21cn.com

的防治中,中医药发挥了重要的作用,但临床上很少能针对不同性别给予不同的辩证施治;近年很多中医工作者对中医药干预骨质疏松症也进行了大量的动物实验研究,但其中有关不同性别动物骨质疏松症的比较研究也很少。本研究观察中医验方补肾壮骨颗粒对不同性别骨质疏松大鼠骨组织计量学的影响,并探讨不同性别骨质疏松症在中、西医发病机制上的差异。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:本实验采用 7 月龄大鼠共 112 只,其中雌性 58 只,雄性 54 只;给药时大鼠体重:雌性 322~407g,雄性 464~663g;由广东省医学实验动物中心提供,实验动物质量合格证号:0032537。

1.1.2 主要药品与试剂:注射用青霉素钠、戊巴比妥钠、0.9% 氯化钠注射液、蒸馏水、仙灵骨葆胶囊(贵州同济堂制药有限公司,批号 080205)、补肾壮骨颗粒(广州军区广州总医院,批号 071201),低剂量组用蒸馏水配成终浓度为 0.083g/mL 的药液,高剂量组用蒸馏水配成终浓度为 0.25g/mL 的药液。

1.1.3 主要仪器:高分辨率专业显微数码相机,型号:DP71-IPP6.0,日本奥林巴斯株式会社生产。病理图像分析软件:Image-Pro Plus 6.0,编制单位:Media Cybernetics 公司,编制日期:2005.10.31。

1.2 方法

1.2.1 模型制作:随机抽取雌、雄性各 12 只大鼠为假手术组;其余大鼠在检疫期结束后施行去势手术,手术方法:以 2% 戊巴比妥钠 0.20mL/100g (40mg/kg) 大鼠腹腔注射麻醉后(个别动物进行了 0.1~0.3 mL 的补充麻醉),雌性大鼠去势方法:在最后一根肋骨下、脊柱旁开纵向切口,找到卵巢,将卵巢剪除。卵巢必须是完整摘除不能有一点残留。另一侧的卵巢以同样的方式切除。术后伤口撒少量注射用青霉素抗感染,假手术组仅切除包裹卵巢的一小团脂肪组织。雄性大鼠去势手术方法:将大鼠的睾丸挤入阴囊底部,切开阴囊皮皮肤、内膜和总鞘膜。将睾丸挤出阴囊外。在睾丸上方的精索处结扎。在结扎线下方切断精索,摘除睾丸。将精索断端退入鞘膜管内。按同样方法摘除另侧睾丸。清理阴囊切口内的血凝块后,伤口撒青霉素少量抗感染,缝合关闭切口,用 2% 碘酊对创口进行消毒。术后第 2 天所有大鼠均连续肌注青霉素 3 日,每日 1 次,5 万 U/只预防感染。

1.2.2 动物的分组与治疗:除假手术组外,其余大鼠在实施去势手术后 2w 按体重进行随机均衡分组:模型对照组(雌性 12 只,雄性 12 只)、阳性药(仙灵骨葆胶囊)组(雌性 12 只,雄性 12 只)、补肾壮骨颗粒高剂量组(雌性 12 只,雄性 10 只)和低剂量组(雌性 11 只,雄性 10 只)。于手术后 2w 每日下午各组动物按所设计的剂量给予相应的受试药物,给药后每周称量 1 次体重,根据体重调整给予的受试药物的量,除假手术组、模型组给予等量蒸馏水外,其余各组每天给药 1 次,本试验给药周期设为连续给药 13w。

1.2.3 观察项目及方法:骨组织计量学的测定:取右侧胫骨近端 1/3,室温置于 10% 福尔马林中固定 24 h,流水冲洗 24h 后移入 10% EDTA 溶液中脱钙,至骨组织无气泡发生或软化为宜,或用大头针轻轻能刺进为度,自来水冲洗 24h(脱钙过程注意避光),然后转入 70% 酒精内脱水 3h,再以 80% 酒精脱水 3h,90%、95% 酒精 3 次脱水各 1h,100% 酒精 3 次脱水各 1h,投入苯甲酸甲酯中透明过夜,浸石蜡 50min 包埋,切片厚度 5 μ m。行 H-E 染色。在光镜 10x4 倍视野下每个病理片拍 1~3 张(如 1 张病理片不能把整个胫骨的病理片视野眼全部包括,则再拍第二张,如此类推),先应用病理图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 对胫骨上段松质骨的骨组织每张病理照片先用全自动图像分析系统直接测出的参数、单位及测量方法(见表 1),再通过国际通用的公式对直接测出的参数计算骨小梁面积百分数/(%)、骨小梁厚度(μ m)、骨小梁数量(个/mm²)和骨小梁分离度(μ m),观察胫骨上段病理形态学变化,最后取其平均值。静态参数计算方法见表 1,计算公式见表 2。

表 1 直接测出的参数、单位、及测量方法

参数	符号	单位	测量方法
组织面积	T. Ar	mm ²	测量范围内组织的面积
骨小梁面积	Tb. Ar	mm ²	测量范围内所有骨小梁的总面积
骨小梁周长	Tb. Pm	mm	测量范围内所有骨小梁的总周长

表 2 静态参数计算方法

参数	单位	计算公式
骨小梁面积百分比(Tb. Ar)	%	Tb. Ar/T. Ar $\times$ 100
骨小梁厚度(Tb. Th)	μ m	(2000/1.199) $\times$ Tb. Ar/Tb. Pm
骨小梁数目(Tb. N)	个/mm ²	(1.199/2) $\times$ < Tb. Pm/T. Ar
骨小梁分离度(Tb. SP)	μ m	(2000/1.199) $\times$ (T. Ar-Tb. Ar)/Tb. Pm

1.2.4 统计学处理:所有数据均输入 EXCEL2003 采用 t-检验进行统计处理,各组计量数据均采用表示。

2 结果

2.1 各组雌性大鼠骨组织计量学指标(见表3)

表3 补肾壮骨颗粒对去势雌性大鼠组织计量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数	骨小梁面积 百分比(%)	骨小梁厚度 (μm)	骨小梁数目 (个/ mm^2)	骨小梁分离度 (μm)
伪手术组	-	12	37.16 $\pm$ 8.11 **	52.89 $\pm$ 8.23 **	7.03 $\pm$ 1.13 **	93.31 $\pm$ 27.43 **
模型组	-	12	16.22 $\pm$ 5.39	44.63 $\pm$ 6.71	3.65 $\pm$ 1.06	251.73 $\pm$ 80.02
阳性药组	1.1	11	20.39 $\pm$ 9.18 *	46.07 $\pm$ 7.65	4.30 $\pm$ 1.24 *	204.27 $\pm$ 75.52 *
补肾壮骨颗粒高剂量组	2.5	12	21.66 $\pm$ 7.83 *	44.04 $\pm$ 5.70	4.84 $\pm$ 1.44 *	180.38 $\pm$ 72.32 * [△]
补肾壮骨颗粒低剂量组	0.83	11	16.26 $\pm$ 6.25	40.94 $\pm$ 3.98	3.90 $\pm$ 1.25	244.53 $\pm$ 102.80

注:与模型对照组相比,*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$;与阳性药组相比,[△]表示 $P < 0.05$

表4 补肾壮骨颗粒对去势雄性大鼠组织计量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数	骨小梁面积 百分比(%)	骨小梁厚度 (μm)	骨小梁数目 (个/ mm^2)	骨小梁分离度 (μm)
伪手术组	-	12	22.46 $\pm$ 5.77 **	52.87 $\pm$ 10.09	4.24 $\pm$ 0.77 **	192.04 $\pm$ 44.34 **
模型组	-	12	15.20 $\pm$ 6.01	50.92 $\pm$ 7.12	2.90 $\pm$ 0.93	347.28 $\pm$ 179.36
阳性药组	1.1	10	16.25 $\pm$ 7.90	48.48 $\pm$ 4.95	3.40 $\pm$ 1.89	325.55 $\pm$ 188.09
补肾壮骨颗粒高剂量组	2.5	10	15.37 $\pm$ 4.36	50.31 $\pm$ 8.20	3.04 $\pm$ 0.56	292.85 $\pm$ 68.92
补肾壮骨颗粒低剂量组	0.83	10	14.75 $\pm$ 2.49	51.71 $\pm$ 6.25	2.87 $\pm$ 0.52	313.15 $\pm$ 68.15

注:与模型对照组相比,*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$

3 讨论

骨质疏松症是以骨量减少,骨微观结构退化为特征的致使骨的脆性增加易于发生骨折的全身性骨骼疾病。中医认为属于“骨痿”范畴,认为肾为先天之本,主骨生髓,骨的生长、发育强劲与衰弱均与肾精有密切的关系。肾精的来源,一是禀赋生长;二是依赖后天气血之充养,而脾胃功能是后天气血充养保证。故认为骨质疏松症与肾精亏虚、脾气虚弱有密切关系,同时肾中精气不足,气虚则血运无力,渐可致血瘀,肾阳虚不能温煦推动血脉,血液运行不畅,阳虚生寒,更能凝滞血液而血瘀,进而产生全身骨及关节疼痛,故血瘀也是绝经后骨质疏松症的主要发病机制。根据肾脾虚、血瘀及瘀血形成的发病机制,组成了补肾壮骨颗粒。方中淫羊藿、鹿角胶、肉桂温肾壮阳,温通经脉,散寒止痛;山萸肉、龟板胶、生地益肾精、补阴血;巴戟、骨碎补肾壮阳、强骨温筋;山药、泽泻、茯苓健脾和胃益肾;三棱、水蛭活血祛瘀止痛。诸药合用共奏补肾壮骨、健脾和胃、活血祛瘀之功效,以达到治疗骨质疏松症的作用。

骨组织形态学是近年来发展的能定量地观察和研究骨组织形态及其结构的一门体视学技术,反映

的是骨骼微观表现,是早期发现骨病理生理改变或药理作用的重要指标,骨组织计量学的静态参数中骨小梁面积百分比指骨小梁占骨组织面积的百分率,反映骨量的多少;骨小梁厚度用于描述骨小梁结构形态,解释骨量的变化,其变化可影响骨量,在数量一定的条件下,厚度越宽,骨量越多。骨小梁数量用于描述骨小梁结构形态,解释骨量的变化。骨小梁分离度指骨小梁之间的平均距离,用于描述骨小梁结构形态,分离度越大,骨小梁之间距离就越大,骨就越疏松。本实验中,与伪手术组相比,模型组雌雄大鼠胫骨近端骨小梁面积百分数($P < 0.01$)、骨小梁数目均明显减少($P < 0.01$),骨小梁分离度均明显增大($P < 0.01$),提示雌雄大鼠去势后均成功地复制了骨质疏松症模型。与模型对照组相比,补肾壮骨颗粒高剂量组雌性大鼠骨小梁面积百分比有增加趋势($P > 0.05$, +33.5%),骨小梁数目明显增加($P < 0.05$, +32.7%),分离度明显减少($P < 0.05$, -28.3%),骨小梁厚度无明显改变;补肾壮骨颗粒高剂量雄性大鼠除骨小梁分离度略有减少外(-15.6%),其余指标均未未见明显的改变。与模型组相比,阳性药对照组雌性大鼠骨小梁面积百分比、数目均有增加的趋势($P > 0.05$, +25.7%、

+17.9%),骨小梁分离度有减少的趋势($P>0.05$, -18.9%),骨小梁厚度无明显改变;雄性大鼠仅骨小梁数目略有增加($P>0.05$, +17.2%),但上述改变均无统计学意义,其余指标未见明显改变。补肾壮骨颗粒低剂量组及阳性药组雌雄大鼠上述骨组织计量学指标均未见明显改变。

本实验结果显示高剂量补肾壮骨颗粒可显著改善雌性去势大鼠的骨组织计量学,其疗效与仙灵骨葆相当,在骨小梁分离度方面甚至优于阳性药组,而对雄性大鼠却无此作用,目前对这一结果尚难以给出满意的解释。近年来的临床病因学研究发现女性绝经后骨质疏松的主导病因是雌激素缺乏,男性的睾酮对于骨形成代谢同等重要,但是雌激素在调节骨吸收方面是主导激素,女性能够应用女性激素替代、或选择性雌激素受体调节剂治疗,而男性则否;女性绝经后雌激素水平进行性降低,而男性老年化过程中,血清总睾酮和总雌激素水平相对改变不大,但其生物活性成分进行性降低^[2]。可见不同性别动物骨质疏松形成机制不同,即同样由去势造成的骨质疏松模型,雌性和雄性大鼠体内激素水平及其生物活性变化不一,对骨代谢的影响也不同。既往的研究发现补肾药物含药血清中含有类雌二醇(E_2)样物质^[3],可能对雌性大鼠体内的雌激素水平有更显著的提升作用。现代药理研究发现,淫羊藿、骨碎补等补肾中药中含有黄酮类物质,其结构与己烯雌酚相似而具有雌性激素样作用^[4],其中异黄酮

具有雌激素受体调控剂的作用^[5,6],对成骨细胞分化和增殖均有促进作用^[7];而对雄性大鼠体内雌激素的生物活性增强作用可能不显著。同时临床研究也发现女性骨质疏松发病年龄较男性早,在同样的年龄阶段,女性患者骨质疏松较男性更严重^[8]。因此推测本实验中也可能存在雌鼠较雄鼠骨质疏松更为严重的状况,在同样按体重给药的状态下雌鼠的骨组织计量学改善也可能较雄鼠更显著。

【参 考 文 献】

- [1] 姬道序. 中医骨伤科学. 北京:学苑出版社,2000.
- [2] 王晓霞,潘琦,金世鑫. 男性老年性骨质疏松症发病和诊断现状. 中华保健医学杂志,2010,12(2):70-71.
- [3] 黄宏兴,魏合伟,刘庆思,等. 中药骨康对去势大鼠血清激素水平变化的影响. 广州中医药大学学报,1999,16(2):138-141.
- [4] 朱丹,袁芳,孟坤,等. 黄酮类化合物的研究进展. 中华中医药杂志,2007,22(6):387-389.
- [5] 高培君,蔡美琴. 联合补充大豆异黄酮和钙预防去势大鼠骨质疏松的实验研究. 中国骨质疏松杂志,2006,12(5):470-472.
- [6] 谢雁鸣,秦林林,邓文龙,等. 骨碎补总黄酮对成骨细胞体外培养作用的机制研究. 中华中医药杂志,2005,20(3):161-162.
- [7] 周轶琳,赵敏,杨杏芬,等. 大豆异黄酮对去势大鼠类雌激素样作用的研究. 华南预防医学,2007,33(3):20-25.
- [8] 田景伦,邓和,郑权,等. 成都地区 50 岁以上骨质疏松患者 QCT 骨密度在不同性别及体质量间的差异. 中国组织工程研究及临床康复,2007,11(36):7275-7277.

(收稿日期:2011-08-22)

补肾壮骨颗粒对去势大鼠骨质疏松症骨组织计量学的影响

作者: [李晓昊](#), [李宁](#), [邓伟民](#), [黄海](#)

作者单位: [李晓昊, 邓伟民, 黄海 \(广州军区广州总医院中医科, 广州, 510010\)](#), [李宁 \(广东省第二人民医院中医科, 广州, 510010\)](#)

刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 

英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年, 卷(期): 2012, 18(2)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201202019.aspx