

中药复方护骨胶囊对糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠骨密度和骨形态计量学的研究

王晓东 董群伟 洪曼杰 孙平 胡伶平 刘忠厚

中图分类号: R453 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)10-0880-04

摘要: **目的** 探讨中药复方护骨胶囊(主要由制何首乌、淫羊藿、熟地黄等多味中药加工而成的复方制剂)对糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠骨量丢失的影响。**方法** 3月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,随机平均分为 3 组:正常对照组(Nrm)、激素组(Met)和中药组(CH)。Met 组:皮下注射甲强龙(Met)5 mg/(kg·d),每周 5 次;CH 组:在 Met 组基础上给予中药复方护骨胶囊(150 mg/(kg·d))灌胃,实验期 12 w。大鼠右侧股骨和 L₅ 行骨密度(BMD)测定,右侧胫骨行骨形态计量学分析。**结果** Met 组 L₅ 和股骨 BMD 显著低于 Nrm 组;CH 组 L₅ 和股骨 BMD 显著高于 Met 组。Met 组 Tb. N、% Tb. Ar、MS/BS、MAR 和 BFRs 显著低于 Nrm 组,Tb. Sp、ES/BS 显著高于 Nrm 组;中药组 Tb. N、% Tb. Ar、MS/BS、MAR 和 BFRs 显著高于 Met 组,Tb. Sp、ES/BS 显著低于 Met 组。**结论** 中药复方护骨胶囊在提高激素诱导骨质疏松大鼠的骨密度,促进骨形成,降低骨吸收,延缓骨量丢失方面有积极作用,对继发性骨质疏松的预防和治疗有一定前景。

关键词: 骨质疏松;糖皮质激素;骨密度;骨形态计量学

Effect of Hugu capsule on BMD and histomorphometry in glucocorticoid-induced osteoporotic rats

WANG Xiaodong, DONG Qunwei, HONG Manjie, et al. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: SUN Ping, Email: sing_ping@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Hugu capsule (CH), mainly made of several kinds of traditional Chinese medicine including radix polygonum multiflorum preparataon, herba epimedii, and prepared rehmannia root, on bone loss in osteoporotic rats induced by glucocorticoid. **Methods** Thirty 3-month-old male Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups randomly: age-matched normal control group (Nrm), methylprednisolone group (Met), and Chinese medicine group (CH). The rats in Met group were given a subcutaneous injection of methylprednisolone (Met) with a dose of 5.0 mg/kg per day, 5 times per week. The rats in CH group were not only given the same treatment in Met group, but also given a gavage of Hugu capsule with a dose of 150 mg/kg per day. The experiment lasted for 12 weeks. BMD of the right femur and L₅ vertebrae was tested. Histomorphometry was performed on the right tibia. **Results** BMD of the right femur and L₅ vertebrae in Met group was significantly lower than that in Nrm group. BMD of the right femur and L₅ vertebrae in CH group was significantly higher than that in Met group. Tb. N, % Tb. Ar, MS/BS, MAR, and BFRs in Met group were significantly lower than those in Nrm group. Tb. Sp and ES/BS in Met group were significantly higher than those in Nrm group. Tb. N, % Tb. Ar, MS/BS, MAR, and BFRs in CH group were significantly higher than those in Met group. Tb. Sp and ES/BS in CH group were significantly lower than those in Met group. **Conclusion** CH has a positive effect on improving BMD in rats with osteoporosis induced by glucocorticoid, promoting osteogenesis, reducing bone resorption, and suspending bone loss. It has a potent application on the prevention and treatment of secondary osteoporosis.

Key words: Osteoporosis; Glucocorticoid; BMD; Histomorphometry

作者单位: 510080 广州,广东药学院附属第一医院骨科(王晓东、董群伟、洪曼杰、孙平、胡伶平);中国老年学学会骨质疏松委员会(刘忠厚)

通讯作者: 孙平, Email: sing_ping@163.com

糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 因具有强大的抗炎、抗免疫和抗休克作用,被广泛应用于器官移植、自身免疫疾病、炎症及肿瘤治疗等领域。但其导致的主要副作用之一——糖皮质激素性骨质疏松 (glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP), 已成为普遍存在的临床问题。GIOP 是继发性骨质疏松的首要原因,也是骨质疏松症的第 3 位原因,GIOP 发病机制及其防治也越来越受到关注^[1-4]。在祖国传统医学中,骨质疏松属于“骨萎”、“骨痹”、“骨枯”等范围,肾为先天之本,藏精主骨生髓,骨髓的生长发育,肾精充足则骨骼强健有力;反之则骨骼失养。护骨胶囊,是由制何首乌、淫羊藿、熟地黄等多味中药加工而成的复方胶囊制剂,本方根据中医“肾主骨生髓”的理论,采用补肝肾,益精血,调理阴阳的治则,辅养血活血,祛风除湿,强筋壮骨之法,兼止痛镇静组成的综合作用的方剂,用于治疗中医辨证属于肾精亏虚、筋骨失养证的骨质疏松症。我们用雌性大鼠去势建立绝经后骨质疏松症动物模型,探讨中药复方护骨胶囊对去势后大鼠骨量丢失的防治作用,为其进一步的应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物模型和实验分组

3 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,体重(205 ± 20)g,购于南方医科大学实验动物中心。适应喂养 1 w 后,随机等分为 3 组:正常对照组(Nrm);激素组(Met):皮下注射甲强龙 5 mg/(kg·d),每周 5 次^[5];中药组(CH):在 Met 组基础上给予中药复方护骨胶囊(150 mg/kg,按照体表面积折算人等效剂量)灌胃。各组大鼠均单笼喂养,自由进食和饮用纯净水,实验期为 12 w。实验期满后采用氯胺酮(100 mg/kg)腹腔麻醉,左心室放血处死大鼠,根据实验需要留取第五腰椎(L₅)、右侧股骨和胫骨。

1.2 股骨和 L₅骨密度测定

将 L₅和股骨置于 QDR4500A 型双能 X 线骨密度测定仪上,计算机采用小动物梯级标准分析软件,自动记录骨密度。扫描速度 10 mm/s,扫描间距 0.5 mm × 0.5 mm。

1.3 胫骨骨形态计量学分析

所有动物在实验结束前第 13、14 天和第 3、4 天分别给其皮下注射盐酸四环素(25 mg/kg)和 Calcein(5 mg/kg)。取右侧胫骨用低速锯(Buehler, USA)将其切开暴露骨髓腔,胫骨上段置于磷酸-福尔马林缓冲液中固定 24 h 后,骨染色后经乙醇脱水,最后行不脱钙骨包埋,包埋块用超薄切片机(Leica2155,德国)切成 4 μm 的薄片和 9 μm 的厚片,薄片用 Masson-Goldner Trichrome 染色,透明后封片,用于测量破骨细胞及观察骨小梁,厚片不染色直接封片观察,用于骨形态计量学测量。采用全自动图像数字化分析仪进行检测,包括光镜和荧光显微镜(Leica 德国),数字化板,电脑和形态学程序“Osteomesure”体视学软件(美国)。其测算参数之含义和计算公式见文献^[6]。

1.4 统计学处理

所有数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,采用组间两独立样本 *t* 检验及单因素方差分析(one-way ANOVA)进行统计分析,*P* < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 L₅和股骨骨密度的变化

Met 组 L₅和股骨 BMD 显著低于 Nrm 组(*P* < 0.01);CH 组 L₅和股骨 BMD 显著高于 Met 组(*P* < 0.01)(表 1)。

表 1 各组大鼠骨密度结果(g/cm²)($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Content of BMD in different groups		
分组	L ₅	股骨
Nrm 组	0.221 ± 0.005	0.241 ± 0.013
Met 组	0.205 ± 0.004 **	0.213 ± 0.008 **
CH 组	0.212 ± 0.005 ###	0.229 ± 0.007 ###

注:vs Nrm **P* < 0.05, ***P* < 0.01;vs Met #*P* < 0.05, ###*P* < 0.01

2.2 胫骨骨组织形态计量学的变化

Met 组的静态学指标% Tb. Ar、Tb. Sp 和 Tb. N 较 Nrm 组均显著降低(*P* < 0.01),CH 组各指标较 Met 组显著增加(*P* < 0.05)。静态学指标 Tb. Sp, Met 组较 Nrm 组显著增加(*P* < 0.01),CH 组较 Met 组显著降低(*P* < 0.01)(表 2)。

表 2 各组大鼠胫骨干骺端(松质骨)静态指标结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Static histomorphometry of cancellous bone in different groups

分组	% Tb. Ar (%)	Tb. Th (μm)	Tb. Sp (μm)	Tb. N (#/mm)
Nrm 组	32.89 ± 10.90	50.04 ± 10.10	177.01 ± 30.75	4.03 ± 0.51
Met 组	17.59 ± 9.11 **	36.22 ± 8.37 **	522.80 ± 147.22 **	2.16 ± 0.93 **
CH 组	25.15 ± 8.74 #	42.02 ± 11.62 #	400.42 ± 70.19 ###	3.12 ± 0.83 #

注:vs Nrm **P* < 0.05, ***P* < 0.01;vs Met #*P* < 0.05, ###*P* < 0.01

Met 组动态学指标 MS/BS、MAR 和 BFRs 较 Nrm 组均显著降低 ($P < 0.01$), CH 组各指标较 Met 组显著增加 ($P < 0.05$); 动态学指标 ES/BS, Met 组

较 Nrm 组显著增加 ($P < 0.01$), CH 组较 Met 组显著降低 ($P < 0.01$) (表 3)。

表 3 各组大鼠胫骨干骺端(松质骨)动态指标结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 3 Dynamic histomorphometry of cancellous bone in different groups

分组	MS/BS(%)	MAR($\mu\text{m}/\text{d}$)	BFRs($\mu\text{m}/\text{d} \times 100$)	ES/BS(%)
Nrm 组	10.89 $\pm$ 1.78	1.55 $\pm$ 0.20	11.98 $\pm$ 3.05	6.04 $\pm$ 1.31
Met 组	3.70 $\pm$ 0.78**	0.83 $\pm$ 0.16**	2.98 $\pm$ 0.98**	10.4 $\pm$ 2.84**
CH 组	5.47 $\pm$ 1.13*##	1.18 $\pm$ 0.18*##	5.18 $\pm$ 1.92#	7.22 $\pm$ 1.56##

注: vs Nrm * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs Met # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

糖皮质激素(GC)作为抗炎和免疫抑制药物广泛应用于慢性阻塞性肺病、哮喘、风湿免疫性疾病、炎性肠病等多种疾患及器官移植后的治疗中。而长期使用 GC 会引起全身明显的骨量丢失,导致骨质疏松的发生及骨折危险性增加,是继发性骨质疏松最主要的病因,成为其临床应用的主要障碍。糖皮质激素性骨质疏松(GIOP)的发病率仅次于绝经后骨质疏松及老年性骨质疏松。据统计,有 0.2% ~ 0.5% 的美国人使用 GC,超过 50% 的使用者并发骨量丢失及骨质疏松性骨折^[7]。长期服用 GC 是 20 ~ 44 岁年轻人发生骨质疏松的最常见原因^[8]。病人在接受 GC 治疗的前 6 个月骨量丢失最快,BMD 在治疗的第 1 年可降低 12%,随后每年约降低 3%^[9]。GIOP 引起骨折的发生率是未接受 GC 治疗患者的 1.3 ~ 2.6 倍,因此,如何对 GIOP 进行有效预防和治疗已成为临床医生和科研工作者亟待解决的问题。

祖国医学认为,补肾益精类中药方剂有增加成骨细胞活性,抑制破骨细胞活动,防治异常骨量丢失,调节骨代谢的作用^[10]。护骨胶囊,是由制何首乌、淫羊藿、熟地黄、龟甲、巴戟天、杜仲、续断、骨碎补、当归等多味中药加工而成的复方胶囊制剂。本方根据中医“肾主骨生髓”的理论,采用补肝肾,益精血,调理阴阳的治则,辅以养血活血,祛风除湿,强筋壮骨之法,兼止痛镇静组成的综合作用的方剂,用于治疗中医辨证属于肾精亏虚、筋骨失养证的骨质疏松症。本课题组在前期的对护骨胶囊治疗绝经后妇女骨质疏松症的临床研究中,观察到护骨胶囊通过激活成骨细胞的功能、促进新骨的形成、增加骨密度、明显改善骨痛等主要症状来治疗骨质疏松症^[11,12]。

BMD 测定可作为骨质疏松诊断、预测骨折发生的危险性及疗效评价的指标之一,是目前测量人体及实验动物骨密度的最好方法。GC 的累积剂量与

髋骨、腰椎的 BMD 丢失和骨折的发生率密切相关^[13]。本实验结果表明,中药复方护骨胶囊对激素诱导骨质疏松大鼠的股骨和腰椎 BMD 有显著提高作用,能够有效阻止激素诱导大鼠的骨量丢失。骨组织形态计量学(Bone histomorphometry)是研究药物在体内抗骨质疏松效应的重要手段,美国 FDA 对骨质疏松新药研究的药效学指南指出,提供骨组织形态计量学参数是确定药效的定量指标,必不可少,从骨组织形态计量学参数改变中必须提供该新药的作用机制和作用环节(如骨吸收抑制剂或促骨形成剂),其对于定量观察和研究骨组织形态及其结构有重要的意义。我们结果显示,松质骨计量学静态指标% Tb. Ar、Tb. Th 和 Tb. N,中药组较激素组均显著性增加;静态学指标 Tb. Sp,中药组较激素组降低,动态指标 MS/BS、MAR 和 BFRs,中药组各指标较激素组显著增加;动态学指标 ES/BS,中药组较激素组降低。说明中药复方护骨胶囊能够有效地预防糖皮质激素诱导的松质骨骨量的丢失,改善并维持骨显微结构。在骨吸收方面,中药组能拮抗 GC 诱导破骨细胞骨吸收增强的作用,抑制骨吸收,维持骨量。

GC 已广泛用于临床,而长期使用类固醇激素造成的骨质疏松,为继发性骨质疏松症的首要病因,且目前治疗手段有限。本实验首次观察了中药复方护骨胶囊对激素诱导骨质疏松大鼠有较好的防治作用,为其进一步的临床研究提供实验依据。

【参 考 文 献】

[1] Gennari L, Bilezikian JP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: hope on the horizon. Lancet,2009,373:1225-1226.
[2] van Brussel MS, Bultink IE, Lems WF. Prevention of glucocorticoid-induced osteoporosis. Expert Opin Pharmacother, 2009,10:997-1005.
[3] Silverman SL, Lane NE. Glucocorticoid-induced osteoporosis. Curr Osteoporos Rep,2009,7:23-26.

- [7] Diaz VA, Ma inous AG, C arek PJ, et al. The association of vitamin D def iciency and in sufficiency w ith diabetic nephropathy: implications for health disparities. J Am Board Fam Med, 2009, 22(5): 521-527.
- [8] Wolf M, Shah A, Gutierrez O, et al. Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. Kidney Int, 2007, 72:1004-1013.
- [9] Chonchol M, Scragg R. 25-Hydroxyvitamin D, insulin resistance, and kidney function in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Kidney Int, 2007, 71:134-139.
- [10] Kuhlmann A, Haas CS, Gross ML, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat. Am J Physiol Renal Physiol 2004, 286(3): 526-533.
- [11] Zhang Z, Sun L, Wang Y, et al. Renoprotective role of the vitamin D receptor in diabetic nephropathy. Kidney Int, 2008, 73(2):163-171.
- [12] Zhang Y, Deb DK, Kong J, et al. Long-term therapeutic effect of vitamin D analog doxercalciferol on diabetic nephropathy: strong synergism with AT1 receptor antagonist. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 297(3): 791-801.
- [13] Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, et al. Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomized controlled trial. Lancet, 2010, 376:1543-1551.
- [14] Sharma K, Ziyadeh FN. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor- β as a key mediator. Diabetes, 1995, 44 (10): 1139-1146.
- [15] Li Y, Spataro BC, Yang J, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D inhibits renal interstitial myofibro blast activation by inducing hepatocyte growth factor expression. Kidney Int, 2005, 68 (4): 1500-1510.
- [16] Pittas AG, Lau J, Hu FB, et al. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(6): 2017-2029.
- [17] Boucher BJ. Inadequate vitamin D status: does it contribute to the disorders comprising syndrome X? Br J Nutr, 1998, 79:315-327.
- [18] Borissova AM, Tankova T, Kirilov G, et al. The effect of vitamin D₃ on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. Int J Clin Pract, 2003, 57:258-261.
- [19] Peechakara SV, Pittas AG. Vitamin D as a potential modifier of diabetes risk. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2008, 4: 182-183.
- [20] Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, et al. Vitamin D and diabetes. Diabetologia, 2005, 48:1247-1257.
- [21] Flores M. A role of vitamin D in low intensity chronic inflammation and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. Nutr Res Rev, 2005, 18:175-182.
- (收稿日期:2012-04-01, 修回日期:2012-06-22)

(上接第 882 页)

- [4] Caplan L, Saag KG. Glucocorticoids and the risk of osteoporosis. Expert Opin Drug Saf, 2009, 8:33-47.
- [5] Hulley PA, Conradie MM, Langeveldt CR, et al. Glucocorticoid induced osteoporosis in the rat is prevented by thetyrosine phosphatase inhibitor, sodium orthovanadate. Bone, 2002, 31: 220-229.
- [6] Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Miner Res, 1987, 2:595-610.
- [7] Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Fracture risk associated with systemic and topical corticosteroids. J Intern Med, 2005, 257:374-384.
- [8] Kaji H, Yamauchi M, Chihara K, et al. The threshold of bone mineral density for Vertebral fracture in female patients with glucocorticoid-induced osteoporosis. Endocr J, 2006, 53:27-34.
- [9] Rehman Q, Lane NE. Effect of glucocorticoids on bone density. Med Pediatr OnCol, 2003, 41:212-216.
- [10] 丁桂芝, 刘忠厚, 周勇. 中西医结合防治骨质疏松症的基础与临床研究进展. 中国骨质疏松杂志, 1997, 3:81.
- [11] 洪曼杰, 卢丽, 王晓东, 等. 中药复方护骨胶囊治疗原发性骨质疏松症的临床研究. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14:891-895.
- [12] 王晓东, 邓伟民, 洪曼杰, 等. 护骨胶囊治疗骨质疏松骨折的临床疗效观察. 实用医学杂志, 2011, 27: 1662-1664.
- [13] Van Staa TP, Leufkens HG, Cooper C, et al. The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. Osteoporos Int, 2002, 13:777-787.
- (收稿日期:2012-04-02, 修回日期:2012-05-31)