

· 论 著 ·

强骨饮对去卵巢大鼠骨折愈合骨小梁 Micro-CT 改变研究

姚建亮 王博 吴鹏 刘康 史晓林*

浙江中医药大学附属第二医院骨伤科, 杭州 310005

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 11-1395-05

摘要: 目的 研究强骨饮对去卵巢大鼠骨折愈合骨小梁 Micro-CT 的影响。方法 将 32 只雌性 SD 大鼠随机分为 4 组: A 组(假手术组)、B 组(模型组)、C 组(强骨饮组)、D 组(基础用药组)。骨松造模组(B、C、D 组)术前随机取 8 只大鼠进行骨密度测量, 后骨松造模组摘除双侧卵巢, A 组切除少许脂肪后缝合, 3 月后随机取骨松造模组 8 只大鼠进行骨密度测量以证明造模成功; 将所有大鼠进行骨折造模, 后将 C 组强骨饮灌胃、D 组进行碳酸钙和维生素 D₃ 灌胃, A、B 两组用等量生理盐水灌胃; 在 6 周后时各取 8 只大鼠股骨骨折处骨痂进行 Micro-CT 分析, 参数包括 BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Tb. Sp。结果 B 组骨小梁数量、骨小梁厚度与骨体积分数低于 C、D 组($P < 0.05$), 骨小梁分离度指数高于 C、D 组($P < 0.05$); C 组与 D 组骨小梁数量、骨小梁厚度比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 而与 D 组的骨小梁分离度及骨体积分数比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 强骨饮能增加骨量、改善骨质疏松骨三维结构特别是增加骨小梁数量与厚度, 其可能机制是强骨饮通过抑制破骨细胞活性, 从而增强骨强度、促进骨折愈合。

关键词: 中医中药; 骨质疏松; 强骨饮; 骨折; Micro-CT; 动物实验

The effect of strengthening-bone receipt on the change of trabecular bone of fracture healing under micro-CT in rat osteoporotic model

YAO Jianliang, WANG Bo, WU Peng, LIU Kang, SHI Xiaolin*

Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, China

Corresponding author: SHI Xiaolin, Email: xlshi-2002@163.com

Abstract: **Objective** To study the effect of the strengthening-bone receipt on the trabecular bone in an osteoporotic rat model of fracture healing with micro-CT. **Methods** 32 female rats were randomly divided into 4 groups, group A (sham group), group B (OVX group), group C (strengthening-bone receipt group), and group D (basic treatment group). BMD was detected in 8 rats of model groups (B, C, and D group) before surgery. The rats in model groups were then ovariectomized. Rats in group A were excised small amount of fat and sewn. Eight rats were randomly selected for BMD measurement to prove the successful model establishment in 3 months. Fracture model was conducted in all rats. Rats in group C received the strengthening-bone receipt with gavage. Rats in group D received calcium and vitamin D with gavage. Rats in group A and B received normal saline. Rats were killed in 6 weeks. The femur fracture callus was collected and the parameters including bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb. Th), trabecular number (Tb. N), and trabecular separation (Tb. Sp) were analyzed using micro-CT. **Results** The Tb. N, Tb. Th, and BV/TV in group B were less than those in group C and D ($P < 0.05$), but the Tb. Sp was higher than that in group C and D ($P < 0.05$). The Tb. N and Tb. Th were significantly different between group C and group D ($P < 0.05$), while the Tb. Sp and BV/TV between group C and group D were not significantly different ($P > 0.05$). **Conclusion** The strengthening-bone receipt increases bone mass and improves three-dimensional structure of the bone, particularly Tb. N and Tb. Th. The possible mechanism of enhancing bone strength and promoting fracture healing may be through inhibiting the activity of osteoclasts.

Key words: Chinese medicine; Osteoporosis; The strengthening-bone receipt; Fracture; Micro-CT; Animal experiment

基金项目: 浙江省自然科学基金(Y14H270017)

* 通讯作者: 史晓林, Email: xlshi-2002@163.com

骨质疏松症最大危害是骨折的风险迅速增加, 骨质疏松性骨折愈合缓慢, 容易造成骨不愈合, 再骨折, 内固定失败, 其并发症严重限制患者活动, 导致

肢体残疾,严重者导致死亡,给家庭和社会造成了沉重的经济负担。强骨饮针对引起骨质疏松性骨折的病因病机,标本兼治,具有增加骨量、改善骨质量、维持骨微结构的完整程度、增加成骨细胞活性、促进钙沉积等作用^[1]。本实验采用卵巢切除致大鼠骨质疏松模型,以 Micro-CT 观察其骨结构参数的变化,并与碳酸钙 D₃ 和阿法骨化醇联合用药进行对比,从而评价其益气温经方在促进骨质疏松性骨折愈合中的作用。

1 实验材料及仪器

1.1 实验动物

本研究选取健康 6 月龄雌性大鼠 32 只,体重 230 g - 280 g,浙江中医药大学动物实验中心提供,实验动物编号为:SYXK(浙)2012-0127,动物饲料亦由该中心提供;各组大鼠分笼饲养,自由摄食、环境温度控制于 21℃,12 h 间隔照明,定期消毒和通风饮水,相对湿度 50% ~ 60%。

1.2 实验药物

强骨饮浓缩液(药物组成:黄芪 30 g、骨碎补 20 g、鹿角霜 20 g、杜仲 15 g、忍冬藤 25 g、川芎 20 g、鸡血藤 25 g、肉桂 10 g、露蜂房 20 g、川续断 30 g、秦艽 15 g、防风 15 g 等)由浙江省新华医院药剂科提供,每毫升含生药 2.48 g。碳酸钙 D₃ 咀嚼片(惠氏制药有限公司生产,每片含碳酸钙 1.5 g、维生素 D₃ 125 单位,国药准字 H10950029)与 1% 西黄耆胶混合配备成浓度为 15.4 mg/ml 的混悬液。阿法骨化醇胶囊(昆明贝克诺顿制药有限公司生产,每粒含阿法骨化醇 0.5 μg,国药准字 H20010320)溶解在体积分数为 100% 的乙醇中,质量分数为 100 mg/L,给药前用棉子油稀释为 0.1 μg/L。药物均避光,4℃ 冰箱保存。

1.3 实验仪器

Micro-CT,型号 SKYSCAN1176,德国 Bruker 公司生产,扫描参数:电压 65 kV,电流 385 μA,分辨率 18 μm,显示视野 200 μm,曝光时间 270 ms。

2 方法

2.1 实验动物分组

将大鼠随机分为四组每组 8 只:A 组(假手术/骨折组/生理盐水)、B 组(卵巢切除/骨折/生理盐水)、C 组(卵巢切除/骨折/强骨饮)、D 组(卵巢切除/骨折/钙维生素 D)。

2.2 造模方法

各组动物麻醉前禁食 6 小时,大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 0.02 ml/100 g。麻醉后各组大鼠俯卧并固定于手术台上,骨松组(B、C、D)麻醉后的动物置双能

X 线骨密度仪,利用小动物专用软件分析左侧股骨上段 1/3 骨密度,后进行腹部剃毛消毒后正中切口,进入腹腔后,推开肠管在肾下极附近找到卵巢,用丝线在输卵管峡部结扎并摘除双侧卵巢,分层缝合切口。A 组仅切除腹腔少许脂肪后分层缝合。大鼠喂养于清洁干燥环境中,饲以消毒食物和自来水,环境温度控制于 21℃,12 h 间隔照明,定期消毒和通风,SD 大鼠每周测量一次体重,饲养 6 周后再次对骨松造模组(B、C 组、D 组)随机取 8 只动物进行股骨骨密度测定以证明骨质疏松造模成功。骨折模型建立:骨松组造模成功后将所有实验动物进行骨折造模。实验动物在麻醉下取股骨外侧切口,切开骨外侧肌,于股骨干中 1/3 段线锯锯断股骨成横行骨折,克氏针逆行穿入骨折近端从后侧股骨大粗隆穿出,复位骨折端再顺行穿入克氏针至骨折远端髓腔,生理盐水冲洗。逐层关闭伤口。

2.3 造模后给药

造模后 3 个月,假手术组以生理盐水 0.041 ml/g 灌胃;强骨饮组以强骨饮浓缩液 0.041 ml/g 灌胃;基础用药组以碳酸钙 D₃ 混悬液 0.01 ml/g、阿法骨化醇溶液 0.037 ml/g 灌胃;每日 1 次,连续干预 6 周。

2.4 标本处理与检测方法

药物干预结束后,将大鼠左侧股骨固定于 Micro-CT 专用扫描垫上,扫描股骨头至股骨中段,层厚 18 μm。扫描旋转 180°,每旋转 0.5°拍摄 2 张图像。图像经 NRecon 软件进行三维重建后,经 CTAn 软件分析,获取骨表面积和体积比值(bone surface/bone volume, BS/BV)、骨体积分数(bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th)、骨小梁数量(trabecular number, Tb. N)及骨小梁分离度(trabecular separation, Tb. Sp)等参数。

2.5 统计学分析

表 1 数据处理采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,实验数据计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,表 2 采用 SPSS13.0 统计软件对所得数据进行统计学处理,各组同一指标比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

通过 Micro-CT 的数据结果分析显示,术后 6 周组与术前组比较大鼠骨密度值明显减低,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明模型组造模成功,4 组大鼠骨小梁数量、骨小梁分离度、骨小梁厚度及骨体积分数比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)同一指标组间比较:①B 组骨小梁数量低于 C、D 组($P =$

0.023; $P = 0.017$);②B 组骨小梁厚度低于 C、D 组($P = 0.025$; $P = 0.018$);③B 组骨小梁分离度高于 C、D 组($P = 0.027$; $P = 0.15$);④B 组骨体积分数低于 C、D 组($P = 0.011$; $P = 0.29$);⑤C 组与 D 组骨小梁数量、骨小梁厚度比较差异有统计学意义($P < 0.05$),而与 D 组的骨小梁分离度及骨体积分数比较差异无统计学意义($P > 0.05$),详细结果见表 1、表 2、图 1、图 2。

表 1 两组 SD 大鼠股骨骨密度值比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The comparison of BMD of the rat femur between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	数量(n)	体重(g)	股骨骨密度(g/cm ²)
手术前(CON)	8	0.3230 ± 0.0148	0.0766 ± 0.0221
手术后六周(OVX)	8	0.3564 ± 0.0637	0.0473 ± 0.0375 *

注:手术前与手术 6 周后比较,*表示 $P < 0.05$

表 2 四组大鼠股骨骨痂显微结构参数($\bar{x} \pm s$)
Table 2 The microscopic structural parameters of the callus of rat femur in four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	骨小梁数量 TB. N(1/mm)	骨小梁分离度 Tb. Sp(mm)	骨小梁厚度 Tb. Th(mm)	骨体积分数 BV/TV(%)
A 组	2.709 ± 0.052	0.289 ± 0.011	0.108 ± 0.015	27.524 ± 0.204
B 组	1.863 ± 0.041	0.427 ± 0.015	0.081 ± 0.063	11.304 ± 0.124
C 组	2.424 ± 0.047 *	0.0368 ± 0.018 *	0.098 ± 0.076 *	17.906 ± 0.185 *
D 组	2.138 ± 0.042 $\Delta \square$	0.370 ± 0.013 $\Delta \circ$	0.091 ± 0.071 $\Delta \square$	16.610 ± 0.216 $\Delta \circ$

注: Δ 表示 D 组与 B 组比较 $P < 0.05$;*表示 C 组与 B 组比较 $P < 0.05$; $\square$ 表示 D 组与 C 组比较 $P < 0.05$; $\circ$ 表示 D 组与 C 组比较 $P > 0.05$;A 组表示假手术组(Sham)、B 组表示模型组(OVX)、B 组表示强骨饮组(QGY)、D 组表示基础用药组(FTG)

4 讨论

骨质疏松性骨折的治疗是亟待解决的重大医学问题。标本兼治的有效之法——益气温经法的代表方自拟中药强骨饮具有益气补肾、活血温经、通络止痛的为主,强骨饮经多年应用于临床治疗骨质疏松症能明显改善患者骨密度,缓解症状,未见明显毒副作用,且药源广泛,价格低廉^[2-3]。

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。中医的辩证论治,科研和临床实验的数据收集,药理学的研究,长期有效性和安全性分析可见强骨饮可以补肾壮骨通筋活络、缓解骨性疼痛、提高骨密度、增加骨形态计量学参数、抑制破骨细胞对骨的吸收^[4]。

骨折愈合阶段由血肿机化演进期,原始骨痂形成期,骨痂改造塑型期三个连续而重叠变化过程。郝永强等^[5]研究表明与一般骨折愈合方式比较,骨质疏松模型动物骨折愈合过程中,软骨内成骨延缓,骨性骨痂改建(骨吸收 > 骨形成)加速,骨痂内胶原纤维疏松、排列紊乱,与主应力方向不一致。NAMKUNG-MATTHAI 等^[6]研究也表明在骨质疏松骨折愈合初期(3 周)骨痂量和骨痂密度都明显低于正常骨折组,组织形态学检查显示骨痂骨化成熟延迟。研究还发现骨质疏松骨折骨痂组织成熟小梁骨占骨痂面积比一般骨折组小,且小梁骨厚度变薄、小

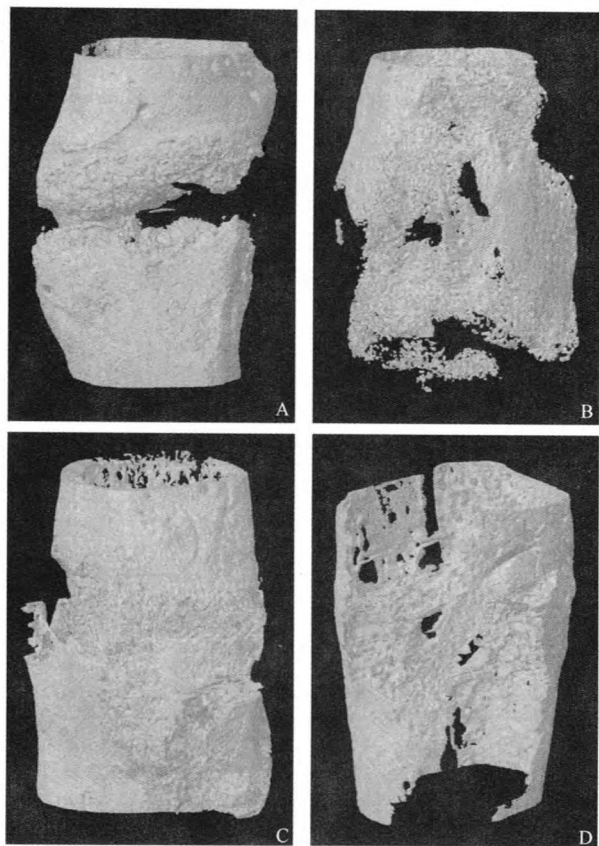


图 1 四组大鼠股骨三维重建图片

Fig. 1 The three-dimensional reconstruction image of the rat femur in four groups

注: A 组(假手术组)骨组织内骨小梁结构排列紧密、有序,骨小梁分离度低; B 组(模型组)骨小梁数量明显减少,排列稀疏或出现断裂,形态扭曲; C 组(强骨饮组)中药治疗后骨小梁数量,排列及形态有所改善; D 组(基础用药组)基础用药后骨小梁数量,排列及形态有所改善

梁骨间距较宽。目前临床工作中骨质疏松测量以双能 x 线检测法为主要方法。此方法检测时间短,精确度高,图像分辨率高,而且其放射剂量低,安全性高^[7]。双能 x 线检测法是通常用来检测腰椎、股骨近端和桡骨远端的骨密度值。由于 DXA 检测范围包含骨皮质部分,且为剖面投影技术,故骨密度值与真实情况尚存在一定的偏差, QCT 检测精确度高,能够早期观察骨矿含量的变化,其预测骨质疏松性骨折风险的可靠性由于 DXA^[8]。Micro-CT 是一种能全面、立体、精确、无创测量骨微结构,它是唯一可用于分别检测松质骨和皮质骨的定量检测方法^[9]。它可以分别测量小梁骨及皮质骨体积密度, Micro-CT 技术以体素为测试单元,在微米级水平高清晰地扫描重建骨小梁立体结构,除能精确计量标本整体骨量参数外,还能测试大量骨结构参数,可为骨质疏

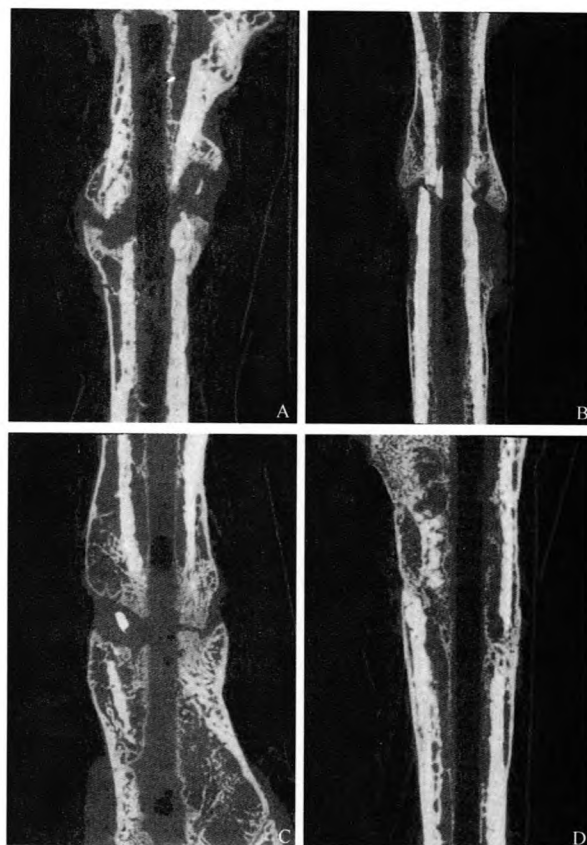


图 2 四组大鼠股骨 Micro-CT 切面图片

Fig. 2 The micro-CT images of the rat femur in four groups

注: A 组正常骨折; B 组骨质疏松骨折骨痂含量稀少; C 组中药治疗后骨痂量明显改善; D 组基础用药后骨痂量明显改善

松研究领域提供了全新的测试方法与手段。

本实验采用 6 月龄 SD 大鼠摘除卵巢模拟绝经后骨质疏松症模型,主要观察股骨的骨形态参数,研究结果说明去除卵巢大鼠之后骨量减少,指定长度内骨组织与非骨组织的交点数量与骨小梁的平局厚度值减少,骨小梁之间的髓腔平均宽度增加,骨小梁从板状向杆状转变,强骨饮能增加骨量、改善骨质疏松骨三维结构特别是增加骨小梁数量与厚度,其可能机制是强骨饮通过抑制破骨细胞活性,从而增强骨强度、促进骨折愈合。

【参 考 文 献】

- [1] 吴连国,王定,朱彦昭,等. 强骨饮治疗原发性骨质疏松的临床研究. 中国中医药科技, 2009, 16(3): 167-168.
Lianguo Wu, Wang Ding, Zhu Yanzhao, et al. Strong drink bone treatment of primary osteoporosis clinical research. China science and technology of Chinese medicine, 2009, 16(3): 167-168. (in Chinese)

(下转第 1403 页)

形式及身体胖瘦。在标准设置下,笔束式骨密度仪一个扫描部位 X 线曝光剂量在 0.05 mRem/h 到 3 mRem/h 之间,相当于一次常规 X 胸片射线剂量的 1/33,约 0.0017 mSv。采用美国 451P 型巡测仪测量正位腰椎的吸收剂量约为 0.61 μ Sv,髋关节的吸收剂量约为 1.08 μ Sv。每年我们接受的宇宙射线天然本底为 2.3 mSv,故复查一次骨密度所接受的剂量为每日天然本底的三分之一,尚不及机场的一次安检剂量,因此每三个月或半年做一次 Ward 区的骨密度检测,对患者无明显影响。美国 FDA 对 DXA 做了精密的剂量检测,尚未发现其剂量可能对人体造成伤害。

58 例患者 6 个月后复测血钙、血磷、ALP 等生化指标,均处于正常范围,治疗前后无显著变化,说明普通生化检查不能作为骨质疏松患者治疗过程中的随访指标。

Ward 区对骨密度变化敏感性高,DXA 测量操作简单,检查结果数据准确、分析直观,可了解短期及长期 BMD 变化百分比,适于临床推广。

【 参 考 文 献 】

[1] 马锦富,安珍,杨定焯,等. DXA 测定腰椎、股骨上端骨密度的关系及敏感性. 中国骨质疏松杂志, 1997,3(3):34-36.

Ma Jinfu, An Zhen, Yang Ding zhuo, etc. Relativity and susceptibility of bone mineral density of the femoral neck and lumbar spine by DXA, Chin J Osteoporos, 1997,3(3):34-36(in Chinese).

[2] 孙蕴,贺丽英,马兆坤,等. Ward 三角区再研究. 中国骨质疏松杂志, 2016,22(6):706-710.

Sun Yun, He Liying, Ma Zhaokun, etc. Further studies on bone mineral density in Ward's triangle region. Chin J Osteoporos, 2016,22(6):706-710(in Chinese).

[3] Yoshihashi, AK, Drake, AJ and Mohamed Shakir, KM. Ward's triangle bone mineral density determined by dual-energy x-ray absorptiometry is a sensitive indicator of osteoporosis. Endocrine Practice, 1998, 4:69-72.

[4] Wang, JM, Lin, JC and Sanchez, TV: Distribution of bone mineral density within the hip scan region. Journal of Clinical Densitometry. 2006, 9:242-243.

[5] 马锦富,王文志. 双能 X 线吸收法骨密度测定. 中国骨质疏松杂志, 2001,7(2):185-187.

Ma Jinfu, Wang Wenzhi. Determination of bone mineral density by dual energy X-ray absorption method. Chin J Osteoporos, 2001,7(2):185-187 (in Chinese).

[6] 朱晓颖,朱汉民,张雪梅. 关于 Ward's 三角区的探讨. 中国骨质疏松杂志,2005,11(4):460-463.

Zhu Xiaoying, Zhu Hanmin, Zhang Xuemei. Study of bone mineral density in Ward's region. Chin J Osteoporos,2005,11(4): 460-463(in Chinese).

(收稿日期:2016-06-16;修回日期:2016-07-28)

(上接第 1398 页)

[2] 史晓林,刘康,李胜利,等. 自拟强骨饮治疗骨质疏松性骨痛的例临床报告. 中国中医骨伤科杂志, 2007, 15(2): 9-10.

Xiaolin Shi, Liu Kang, Sheng-li li, et al. Since the proposed strong bone water treatment of osteoporotic bone pain patients clinical report. Chinese journal of traumatology, 2007, 15(2): 9-10. (in Chinese)

[3] 刘国泰,刘杰,张志强,等. 强骨饮治疗骨质疏松症的疗效和安全性分析. 中国药物警戒, 2013, 10(7): 393-395.

Guotai Liu, liu jie, Mr Zhang, et al. Strong bone water the efficacy and safety analysis for the treatment of osteoporosis. China pharmacovigilance, 2013, 10(7): 393-395. (in Chinese)

[4] 李旭云,孙峰,李静伟,等. 益气温经方强骨饮治疗原发性骨质疏松症的研究进展. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(8): 1003-1006.

Xuyun Li, Sun Feng, Jingwei Li, et al. Progress in Primary osteoporosis beneficial temperatures by the side Qiangguyin treatment. Chinese Journal of loose bone, 2014, 20(8): 1003-1006. (in Chinese)

[5] 郝永强,戴尅戎. 骨质疏松性骨折实验模型的设计与建立.

中国矫形外科杂志, 2002, 9(6): 569-572.

Yongqiang Hao, Kerong Dai, et al. Design and establishment of osteoporotic fracture in experimental models. Orthopedic journal of China, 2002, 9(6): 567-572. (in Chinese)

[6] Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. Bone2001, 28(1): 80-86.

[7] 杨乃龙,邓浩平. 双能线骨密度仪测量骨密度诊断骨质疏松症. 临床心身疾病杂志, 2007, 13(6): 22-24.

Nailong Yang, Deng Haoping, et al. Double can absorptiometry (dexa) to measure bone mineral density in the diagnosis of osteoporosis. Journal of clinical psychosomatic disease2007, 13(6): 22-24. (in Chinese)

[8] Zhang JK, Yang L, Meng GL, et al. Protection by salidroside against bone loss via inhibition of oxidative stress and bone-resorbing mediators. PLoS One2013, 8(2): e57251-e57251.

[9] Cann CE. Quantitative CT for determination of bone mineral density: a review. Radiology1988, 166(2): 509-522.

(收稿日期:2016-06-04;修回日期:2016-07-13)