

恒古骨伤愈合剂对去势雌性大鼠骨质疏松模型的影响

孙岩¹ 陈冉¹ 王小琦¹ 张洋¹ 蒋罡¹ 胡敏² 赵宏斌^{1*} 李文辉^{3*}

1. 昆明医科大学第一附属医院, 云南 昆明 650032

2. 昆明学院, 云南 昆明 650032

3. 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650032

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 12-1513-04

摘要: 目的 研究云南彝药恒古骨伤愈合剂对去势雌性大鼠骨密度的影响。方法 将 36 只雌性 SD 大鼠随机平均分为对照组、手术组、给药组, 每组 12 只。给药组和手术组大鼠行经腹双侧卵巢切除术, 同时对给药组予恒古骨伤愈合剂; 对照组大鼠经腹切除与卵巢重量相同的脂肪组织。术后第 1 周、第 10 周行双能射线骨密度测定, 以了解其骨密度 (bone mineral density, BMD)、骨矿盐含量 (bone mineral content, BMC)。术中术后 10w 内去势雌性大鼠无死亡情况。结果 第 10 周给药组对比手术组, 给药组全身 BMD 增加 1.84%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 给药组对比对照组, 给药组全身 BMD 下降 1.2%, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。全身骨矿盐含量给药组 > 手术组 > 对照组, 两两比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。给药组和手术组体重相近, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 但两组体重均大于对照组体重, 且差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 恒古骨伤愈合剂可以延缓去势雌性大鼠骨质疏松中骨量的丢失。

关键词: 中医中药; 恒古骨伤愈合剂; 骨质疏松; 骨密度; 骨矿盐含量

The effects of Osteoking on ovariectomized female rat model of osteoporosis

SUN Yan¹, CHEN Ran¹, WANG Xiaoqi¹, ZHANG Yang¹, JIANG Gang¹, HU Min², ZHAO Hongbin^{1*}, LI Wenhui^{3*}

1. The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032

2. Kunming College, Kunming 650032

3. Kunming Institute of Animal Science, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650032, China

Corresponding author: ZHAO Hongbin, Email: 596829191@qq.com; LI Wenhui, Email: leewh@mail.ac.cn

Abstract: Objective Osteoking, China Yunnan Yi, is a local Chinese herbal medicine. It has been used to treat osteoporotic fracture, but its therapeutic effect on osteoporosis is not clear. The purpose of this experiment is to study the effects of Osteoking on ovariectomized female rat osteoporosis model. **Methods** Thirty-six female SD rats were randomly divided into three groups (each group of 12): the control, the surgery and the dose groups. The dose and the surgery groups were operated with bilateral oophorectomy, and at the same time the dose group was fed with Osteoking. Bone mineral density and bone mineral salt content were measured at the first and 10th week. **Results** At 10 weeks the total BMD of the dose group was significantly higher than that of the surgery group (by 1.84%, $P < 0.05$). The total BMD of the dose group was 1.2% lower than the control group, which did not reach statistical significance ($P > 0.05$). For total BMC: the dose > the surgery > the control. The body weight of the dose group was similar to that of the surgery group, with no significant difference ($P > 0.05$). The body weight of both dose and surgery groups was significantly heavier than that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Osteoking could reduce the loss of bone mass in ovariectomized female rat model of osteoporosis.

Key words: Traditional Chinese Medicine; Osteoking; Osteoporosis; Bone mineral density; Bone mineral content

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是以骨量减少、

骨组织显微结构退化为特征, 以致骨骼脆性增高、骨折风险性增加的一种全身代谢性骨骼疾病^[1]。据估计, 全球目前约有 2 亿人患有骨质疏松症^[2], 骨质疏松症已经成为一个全球性的公共卫生问题。

目前治疗骨质疏松的西药主要有磷酸盐、雌激

基金项目: 国家自然科学基金委员会-云南省人民政府联合基金项目 (U1502227)

* 通讯作者: 赵宏斌, Email: 596829191@qq.com; 李文辉, Email: leewh@mail.ac.cn

素替代治疗、选择性雌激素受体调节剂等。中药如蛹虫草、陈皮、鳖甲等天然产物可预防和治疗骨质疏松的报告已经被证实^[3-5];植物内含有的抗氧化剂预防骨质疏松也已被应用^[6]。源自中国云南彝族的中草药——滇产彝药恒古骨伤愈合剂,已经在临床上证明了对于临床骨质疏松后骨折愈合后具有积极疗效。但是恒古骨伤愈合剂是否可以治疗骨质疏松症,相关研究还很少。本文建立去势雌性大鼠骨质疏松模型,通过口服恒古骨伤愈合剂,于第 1、10 周检测其骨密度(bone mineral density, BMD),来探讨恒古骨伤愈合剂对去势雌性大鼠骨质疏松模型的影响。

1 材料和方法

1.1 药品

根据中国药典(中国药典委员会,2002 年),彝药恒古骨伤愈合剂是由云南克雷斯天然药业有限公司(中国昆明)生产,批号 20150509,主要成分由陈皮、红花、三七、杜仲、人参、黄芪和鳖甲等组成,每毫升含生药 0.36 g。

1.2 造模

36 只 3 月龄 SD 雌性大鼠,SPF 级,(280 ± 20) g,购买自成都达硕实验动物有限公司(大鼠生产许可证号:sc 川-2013-24)并饲养于中国科学院昆明动物研究所,适宜饲养环境[温度(22 ± 4)℃,湿度(65 ± 5)%,昼夜周期 12h],采用不锈钢耳钉订于大鼠右耳软骨处。适应性饲养两周后,动物被随机平均分配到 3 个组,每组 12 只。即:对照组,经腹切除与卵巢质量相同的皮下脂肪;手术组,SD 大鼠行双侧卵巢切除术;药物组,SD 大鼠行双侧卵巢切除术后给恒古骨伤愈合剂。

手术组和药物组动物行双侧卵巢切除术,术前 12 h 禁食禁水,使用 10% 水合氯醛(购自 Life Science Products & Services)0.4 ml/100 g 麻醉,深度麻醉后固定、脱毛、消毒,严格遵守无菌原则。行腹正中切口双侧卵巢切除术,结扎输卵管,止血,逐层缝合;对照组切除与卵巢重量相同的皮下脂肪。于术后当日至术后 5 d 于青霉素 10000 单位/只,采用无菌医用棉垫作为饲养垫料。术后 7 d 伤口愈合,不拆线。所有大鼠术前、术中、术后、饲养过程中无死亡。

1.3 给药剂量和方法

给药组 SD 雌性大鼠术后 5 d 开始给药,根据动物给药折算系数、人与大鼠体表面积系数及误差系

数换算,换算公式为 $6.3 \times \text{体重} \times \text{人每日摄入量(按标准体重 60 kg 计算)} \times \text{误差(根据折算系数和体表面积系数,误差在 10\%)}$,即给药剂量为每只每两天 0.15 ml,灌胃给药。

1.4 DXA 双能射线骨密度测定

于术前、术后第 10 周行双能射线 DXA 骨密度测定(GE-Lunar 公司 DXA 骨密度仪 Prodigy 型及附带的小动物骨密度测定软件测量)。SD 大鼠使用 7% 的水合氯醛 0.35 ml/100 g 腹腔麻醉,俯卧位固定于双能射线骨密度测定实验台上,拉直脊柱后测定。

1.5 统计学分析

所有实验数据均使用 SPSS19.0 统计系统进行评估,实验数值表示使用均值 ± 标准差,精确到小数点后 3 位。组间比较选择单因素(ANOVA)方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有显著性统计学意义。

2 结果

2.1 骨密度和骨矿盐含量

于术后第 1 周、第 10 周对去势雌性大鼠行双能 X 线法测定 BMD、骨矿盐含量(bone mineral content, BMC)。第 10 周各组大鼠 BMD 较第 1 周均有所升高,差异有显著统计学意义($P < 0.01$);BMC 也有所升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。第 10 周给药组骨密度与对照组骨密度差异无统计学意义($P > 0.05$),与手术组骨密度差异存在统计学意义($P < 0.05$);给药组骨矿盐含量与对照组骨矿盐含量差异存在统计学意义($P < 0.05$);对照组骨矿盐含量与手术组骨矿盐含量差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。

表 1 各组骨密度、骨矿盐含量

Table 1 The BMD and BMC of each group

时间	全身骨密度(g/cm ²)	骨矿盐含量(g)
第 1 周(n=36)	0.155 ± 0.007	5.708 ± 0.276
第 10 周		
对照组(n=12)	0.168 ± 0.006 ^{△△}	7.113 ± 0.422
手术组(n=12)	0.163 ± 0.004 ^{△△}	7.543 ± 0.748
给药组(n=12)	0.166 ± 0.009 ^{△△}	7.715 ± 0.996

注:各因素间统计学分析均为第 10 周给药组、对照组、手术组分别与第 1 周相关因素进行比较。^{△△} $P < 0.01$,为两因素间差异存在统计学意义;无角标表示 $P > 0.05$,差异无统计学意义。

2.2 体重

第 10 周各组体重均大于第 1 周。给药组体重和手术组体重相近,差异无统计学意义($P > 0.05$);

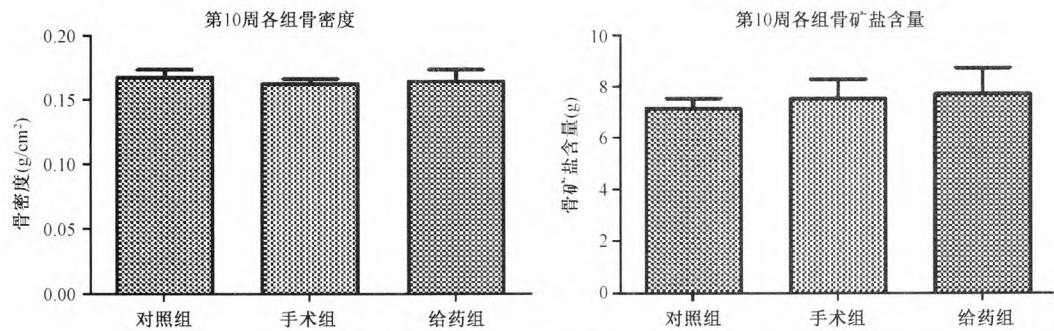


图1 第10周各组全身骨密度及骨矿盐含量
Fig.1 The BMD and BMC of each group at week 10

两组体重均大于对照组体重,差异存在显著统计学意义($P < 0.01$),见图2。

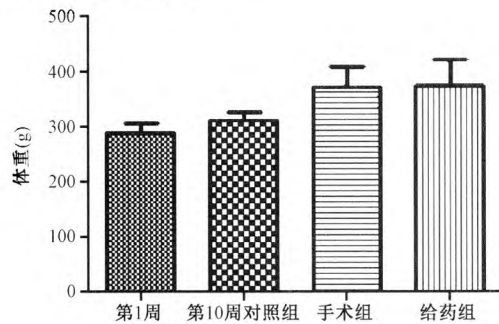


图2 各组体重情况
Fig.2 The body weight of each group

3 讨论

恒古骨伤愈合剂(osteoking)由三七、红花、陈皮、钻地风、洋金花、黄芪、人参、杜仲、鳖甲等配方制成。根据彝族医药关于哎哺、八宫、八极、六(八)色、天五行、地五行、人五行的理论,为治疗骨折、骨病等的内服方药。已有报道恒古骨伤愈合剂是通过TGF/BMP、Wnt通路来促进间充质干细胞向成骨细胞分化,并促进成骨细胞增殖和成熟^[7-9],临床上用来治疗骨质疏松后骨折的愈合已有确切疗效。

有报道称3月龄雌性大鼠双侧卵巢切除术后8w便会建成骨质疏松模型^[10]。本研究将给药组和手术组动物的双侧卵巢切除,建造了一个雌激素缺乏的骨质疏松模型,来模拟绝经后雌激素缺乏的妇女,并于术后第1周开始给药组喂药恒古骨伤愈合剂,观察恒古骨伤愈合剂是否会延缓骨量丢失。研究结果发现,实验第10周给药组全身骨密度高于手术组全身骨密度1.84%,差异有统计学意义($P < 0.05$);给药组全身骨密度低于对照组全身骨密度1.2%,但差异无统计学意义($P > 0.05$);全身骨矿

盐含量给药组>手术组>对照组。表明恒古骨伤愈合剂可以延缓去势雌性大鼠骨量丢失,对于治疗骨质疏松症有积极意义。

已有研究表明去势骨质疏松模型造模过程中,动物体质量会因卵巢切除有所增加^[11],这种代偿机制会导致机体机械负荷增加,有助于抑制骨吸收,增加骨量和骨密度^[12]。研究结果显示,第10周给药组体重、手术组体重均高于对照组体重,差异有统计学差异($P < 0.05$)。但是其作用机制还不明了,长期疗效还有待观察。

【参考文献】

[1] Testa G, Pavone V, Mangano S, et al. Normal nutritional components and effects on bone metabolism in prevention of osteoporosis. *Biol Regul Homeost Agents*, 2015, 29(3): 729-736.

[2] Reginster JY, Burlet N. Osteoporosis: a still increasing prevalence. *Bone*, 2006, 38 (Suppl 1): 4-9.

[3] Zhao Q, Shen X, Zhang W, et al. Mice with increased angiogenesis and osteogenesis due to conditional activation of HIF pathway in osteoblasts are protected from ovariectomy induced bone loss. *Bone*, 2012, 50(3): 763-770.

[4] Jungmee K, Ju-Young S, Joongyub L, et al. Comparison of the prescribing pattern of bisphosphonate and raloxifene in Korean women with osteoporosis: from a National Health Insurance Claims Database. *PLoS One*, 2015, 10(6): 127970.

[5] Liu RH, Kang X, Xu LP, et al. Effects of the combined extracts of *Herba Epimedii* and *Fructus Ligustri Lucidi* on bonemineral content and bone turnover in osteoporotic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 15(1): 1-8.

[6] Zhang Y, Yu L, Ao M, et al. Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp on osteoporosis in ovariectomized rat. *Ethnopharmacol*, 2006, 105(1-2): 274-279.

[7] 赵宏斌, 梁红瑛, 胡敏, 等. 恒古骨伤愈合剂促进坏死股骨头内 BMP-2 基因表达研究. *中药药理与临床*, 2006, 22(6): 61-63.

(下转第 1539 页)

折有着重大的意义。

本实验也有其局限性,首先实验使用的大鼠数量有限,且时间较短,12 w 后动物骨质疏松的具体情况不知。笔者没有从生化角度进一步观察骨骼的具体改变,同时也没有进一步探索其机制。最后实验使用的药物剂量参考别的实验中使用的剂量,同时治疗大鼠最佳的药物剂量也不得而知,进一步确定最佳剂量也是下一步要考虑的问题。

综上所述,本实验虽然没有从机制、生化方面进一步研究 DMAb 治疗骨质疏松骨缺损,但是本实验从体内很好地证实了 DMAb 可以促进骨量的增加、加速骨组织的矿化、提高骨密度及骨强度来加速骨质疏松骨缺损的愈合,为其在临床的使用提供了理论基础。

【参 考 文 献】

- [1] Kawate H, Takayanagi R. Efficacy and safety of bazedoxifene for postmenopausal osteoporosis. *Clin Interv Aging*, 2011, 6(1): 151-160.
 - [2] Russel B, Bess DH, Solomon DH, et al. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *Journal of Bone & Mineral Research*, 2007, 22(3): 465-475.
 - [3] E Michael L. Treatment of osteoporosis with denosumab. *Maturitas*, 2010, 66(2): 182-186.
 - [4] Lin T, Wang C, Cai X, et al. Comparison of clinical efficacy and safety between denosumab and alendronate in postmenopausal women with osteoporosis; a meta-analysis. *International Journal of Clinical Practice*, 2012, 66(4): 399-408.
 - [5] Yang N, Cui Y, Tan J, et al. Local injection of a single dose of simvastatin augments osteoporotic bone mass in ovariectomized rats. *Journal of Bone & Mineral Metabolism*, 2013, 32(3): 252-260.
 - [6] 刘学军. 骨质疏松症. *中国矫形外科杂志*, 2006, 14(21): 1668-1670.
Liu XJ. Osteoporosis. *Orthopedic Journal of China*, 2006, 14(21): 1668-1670. (in Chinese)
 - [7] Anonymous. Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause-the Journal of the North American Menopause Society*, 2010, 17(1): 25-54.
 - [8] 孙金堂, 魏见伟, 隋光善, 等. 狄诺塞麦 (Denosumab) 治疗绝经后骨质疏松症的研究进展. *中国矫形外科杂志*, 2015, 23(11): 1007-1010.
Sun JT, Wei JW, Sui GS, et al. Research progress of de Norse Mai (Denosumab) in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Orthopedic Journal of China*, 2015, 23(11): 1007-1010. (in Chinese)
 - [9] Reginster JY. Antifracture efficacy of currently available therapies for postmenopausal osteoporosis. *Drugs*, 2011, 71(1): 65-78.
(收稿日期: 2016-06-25; 修回日期: 2016-08-15)
-
- (上接第 1515 页)
- Zhao HB, Liang HS, Hu M, et al. The Osteoking promote necrosis of femoral head in BMP-2 gene expression research in Chinese. *Pharmacol Chin Mater Med*, 2006, 22(6): 61-63. (in Chinese)
 - [8] 胡敏, 赵宏斌, 钱传云, 等. 恒古骨伤愈合剂对兔激素性股骨头坏死模型超微结构的影响. *中华中医药杂志*, 2011, 26(3): 486-489.
Hu M, Zhao HB, Qian CY, et al. The influence of the Osteoking to ultrastructure of rabbit model of glucocorticoid-induced avascular necrosis in Chinese. *Chinese medicine*, 2011, 26(3): 486-489. (in Chinese)
 - [9] 赵宏斌, 胡敏, 梁红锁, 等. 恒古骨伤愈合剂促进兔坏死股骨头内核心结合因子 $\alpha 1$ 基因表达的实验研究. *中国中西医结合杂志*, 2006, 26(11): 1003-1006.
Zhao HB, Hu M, Liang HS, et al. The study of Osteoking to promote rabbit femoral head necrosis internal core combined factor $\alpha 1$ expression in Chinese. *Integr Med*, 2006, 26(11): 1003-1006. (in Chinese)
 - [10] Cao YP, Satoshi M, Tasuku M, et al. Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *Bone Miner research*, 2002, 17(12): 2237-2246.
 - [11] Peng ZQ, Vaananen HK, Zhang HX, et al. Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. *Bone*, 1997, 20(3): 207-212.
 - [12] Castañeda S, Calvo E, Largo R, et al. Characterization of a new experimental model of osteoporosis in rabbits. *Bone Miner Metab*, 2008, 26(1): 53-59.
(收稿日期: 2016-05-31; 修回日期: 2016-08-28)