

· 论 著 ·

雷洛昔芬联合仙灵骨葆对骨质疏松骨微结构和生物力学性能的影响

王丽随¹ 范哲华² 陈海英^{2*}

1. 福建莆田市第一医院药剂科, 福建 莆田 351100

2. 福建莆田学院, 福建 莆田 351100

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 11-1429-05

摘要: 目的 探讨雷洛昔芬联合仙灵骨葆对骨质疏松大鼠骨微结构及其生物力学性能的影响。探讨其调控骨吸收与骨形成及其防治骨质疏松症的作用机制。**方法** 6 月龄 40 只 SD 大鼠在骨质疏松造模之后, 随机分为正常组、假手术组、模型组、干预 1 组、干预 2 组, 每组 8 只。造模手术 1 周后, 干预 1 组采用经口灌胃雷洛昔芬 6.2 mg/(kg·d), 干预 2 组采用经口灌胃雷洛昔芬 6.2 mg/(kg·d) + 仙灵骨葆 250 mg/(kg·d), 而正常组、假手术组、模型组采用经口灌胃注射用水。12 周后应用组织病理学分析及组织计量学测定; 利用 Van Gieson 胶原纤维染色法观察胶原纤维沉积变化; ELISA 测定血清蛋白聚糖活性。分离右侧股骨进行三点弯曲试验, 检测股骨生物力学性能。**结果** 对照组骨小梁粗厚、有完整的成骨细胞区。模型组骨小梁稀疏细薄、细胞核固缩; 与对照组相比, 模型组胶原纤维明显减少, 蛋白聚糖含量明显增加, 最大载荷 (FM) 下降, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。干预组骨小梁排列较紧密。干预 2 组较干预 1 组, 胶原纤维明显增加, 蛋白聚糖活性降低, 最大载荷 (FM) 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 雷洛昔芬联合仙灵骨葆较雷洛昔芬单独用药可以显著改善骨质疏松大鼠的骨基质代谢, 促进成骨, 显著加强骨生物力学性能。

关键词: 雷洛昔芬; 仙灵骨葆; 骨质疏松; 骨小梁; 生物力学; 胶原纤维; 蛋白聚糖

The effect of raloxifene and Xianlinggubao on the micro-structure and biomechanical property of osteoporotic bone

WANG Lisui¹, FAN Zhehua², CHEN Haiying^{2*}

1. Department of Pharmacy, The First Hospital of Putian City, Putian 351100, China

2. Fujian Putian College, Putian 351100, China

* Corresponding author: CHEN Haiying, Email: chhyzw@163.com

Abstract: Objective To investigate the effects of raloxifene combined with Xianlinggubao on bone microstructure and biomechanical property of osteoporotic rats, and to explore its mechanism of regulation of bone resorption and bone formation and its prevention and treatment of osteoporosis. **Methods** Forty 6-month SD rats were randomly divided into normal group, sham operation group, model group, intervention group 1, and intervention group 2 after osteoporosis modeling. One week after model operation, the rats in intervention group 1 received oral raloxifene 6.2 mg / kg. d, and rats in the intervention group 2 received oral raloxifene 6.2 mg / kg. d plus Xianlinggubao 250 mg / kg. d. Rats in the normal group, the sham operation group, and the model group received water gavage. After 12 weeks, histopathological analysis and histomorphometry were performed. The deposition of collagen fibers was observed with van Gieson collagen fiber staining. The activity of serum proteoglycan activity was determined with ELISA. The right femur was separated for a three-point bending test to examine the biomechanical properties of the femur.

Results The control group had thick trabecular bone and a complete osteoblastic area. The trabecular bone in the model group was sparse and thin, and the nucleus was pyknosis. Compared with the control group, the collagen fibers in the model group significantly decreased, the proteoglycan content significantly increased, and the maximum load (FM) decreased. The difference was statistically significant (both $P < 0.05$). The trabecular bone in the intervention group arranged closely. Compared with the intervention group 1, the collagen fibers in the intervention group 2, increased significantly, the proteoglycan activity decreased, and FM was

* 通信作者: 陈海英, Email: chhyzw@163.com

significantly different ($P < 0.01$). **Conclusion** Compared with raloxifene alone, raloxifene combined with Xianlinggubao can significantly improve the bone matrix metabolism, promote osteogenesis, and significantly enhance the biomechanical properties of the bone in rats with osteoporosis.

Key words: raloxifene; Xianlinggubao; osteoporosis; trabecula bone; biomechanics; collagen fiber; proteoglycan

骨质疏松症是一种中老年人常见的骨量低、骨组织微结构损坏的骨骼疾病,绝经后女性发病率明显高于男性^[1]。绝经后骨质疏松症目前常用的雌激素替代疗法(HRT)会增加子宫内膜癌和乳腺癌的发生率。雷洛昔芬属于选择性雌激素受体调节剂(SERM),对骨组织有雌激素样功效,保持骨量和增加骨矿盐密度,但对于子宫、乳腺有抗雌激素功效^[2],可替代雌激素防治绝经后骨质疏松症。仙灵骨葆含淫羊藿、续断等中药成分,能增加骨密度、促进骨形成、抑制骨吸收、促进骨重建,且不刺激子宫^[3]。目前关于雷洛昔芬和仙灵骨葆对大鼠骨质疏松骨微结构和骨生物力学性能影响的研究较少,本研究选取雷洛昔芬和仙灵骨葆作为干预因素,通过观察骨质疏松大鼠骨微结构及大鼠骨生物力学性能的改变情况,探讨雷洛昔芬和仙灵骨葆调控骨吸收与骨形成及其防治绝经后骨质疏松症的作用机制。

1 材料和方法

1.1 大鼠骨质疏松模型的建立

选用清洁级 6 月龄 SD 雌性大鼠 40 只,体重 200 ~ 220 g,由福州吴氏动物中心提供。适应性喂养 1 周,摘除大鼠双侧卵巢,饲养 3 个月建立标准骨质疏松动物模型。随机分为正常对照组、假手术组、模型组、干预 1 组、干预 2 组,每组 8 只。干预 1 组大鼠给予雷洛昔芬(江苏恒瑞医药股份有限公司)6.2 mg/(kg·d)溶于 2 mL 注射用水形成溶液后经口灌胃,干预 2 组大鼠给予雷洛昔芬(江苏恒瑞医药股份有限公司)6.2 mg/(kg·d)联合仙灵骨葆(贵州同济堂制药有限公司)250 mg/(kg·d)溶于 2 mL 注射用水形成溶液后经口灌胃,正常组、假手术组、模型组给予经口灌胃注射用水。饲养 12 周。

1.2 骨标本的制备

组织学观察及图象分析:25%的乌拉坦麻醉后取股骨,4%多聚甲醛固定、脱水脱脂、脱钙、包埋(冠状面),酸处理,烘干。切片机(德国 Leica RM2015)连续切片(厚度 4 μm)。HE 染色,光学显微镜(日本 Olympus BX51T-PHD-J11)观察。进行 200 $\times$ 和 400 $\times$ 的显微照相,编号、采集存盘。观察并测量骨小梁。同样要求在不同多个视野各测定一

次,取平均值。

1.3 Van Gieson 胶原纤维染色

切片以 Van Gieson 进行胶原纤维染色,光镜下观察胶原纤维沉积情况。

1.4 血清蛋白聚糖检测

大鼠麻醉后腹主动脉取血,室温下离心 10 min,取上清液 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用比利时 Bisoure 公司生产的蛋白聚糖 ELISA 试剂盒,按说明书操作,蛋白聚糖测定免疫化学原理为间接夹心法。

1.5 生物力学实验

股骨三点弯曲力学试验及股骨生物力学指标测定:将所有右侧股骨置于 Instron 万能材料力学测试装置上作三点弯曲实验,中央垂直施加载荷,以 1 mm/min 的速度对股骨缓慢匀速加载直至股骨断裂。软件自动记录,数据分析换算得出最大载荷(FM)。

1.6 统计学处理

统计学分析测定和计量数据采用 SPSS13.0 统计软件进行。在该实验中,各组的个体之间相互独立,不存在联系,是独立样本。此外,样本均数都来自正态分布总体,样本符合正态分布。因此,采用两个独立样本 t 检验比较组间差异, $P < 0.01$ 表示差异有显著统计学意义。但是独立样本 t 检验包含两种情况。情况一:当两总体方差相等时,即方差齐性。按两独立样本数据的均值比较的检验进行分析。情况二:当两总体方差不相等,不满足方差齐性,即方差不齐。要使用校正的 t 检验方法,此时需要校正 t 值与自由度值。

2 结果

2.1 各组骨组织形态学比较

正常对照组和假手术组股骨骨小梁粗大稍厚,未见吸收或断裂现象(图 1A、图 1B)。模型组骨小梁排列稀疏变薄、骨髓腔变大、间距增大、结构紊乱,部分骨小梁断裂。可见空缺骨陷窝(图 1C)。干预 1 组骨小梁较多较厚,未见骨小梁断裂,可见少量空缺骨陷窝(图 1D)。干预 2 组骨小梁的量远远大于对照组组,且骨小梁之间联系紧密(图 1E)。

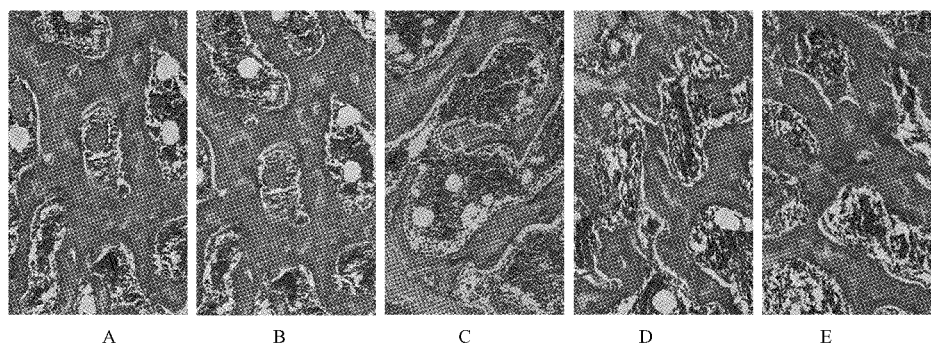


图 1 各组骨组织形态学

Fig. 1 Bone histomorphometry

2.2 骨膜胶原代谢的改变

Van Gieson 染色结果:正常对照组和假手术组骨基质胶原纤维染色深,紧致有序(图 2 A、图 2B)。模型组骨基质胶原纤维松散,染色浅,排列稀疏(图

2C)。干预 1 组骨基质胶原纤维积聚、紧密排列,方向有序(图 2D)。干预 2 组骨基质增厚增宽,胶原纤维积聚(图 2E)。

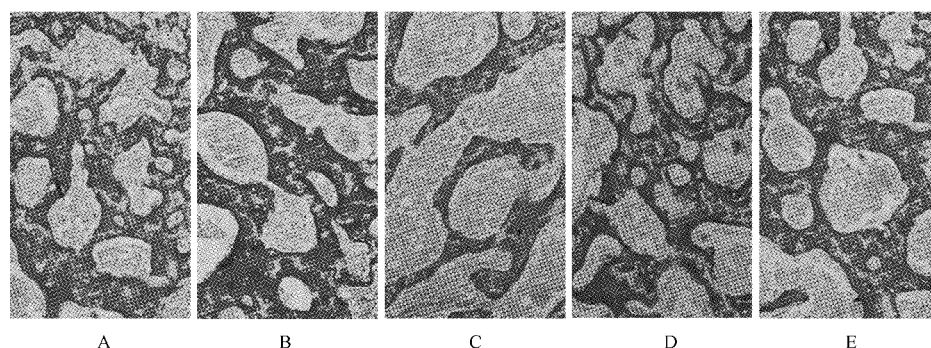


图 2 骨膜胶原代谢的改变

Fig. 2 The change of collagen metabolism in the bone

2.3 组织计量学指标测定统计学结果

与对照组相比:假手术组没有出现明显改变。模型组骨小梁厚度(Tb. Th)明显下降(均 $P < 0.05$)。干预 1 组 Tb. Th 明显升高(均 $P < 0.05$)。干预 2 组 Tb. Th 明显升高($P < 0.05$)(图 3)。

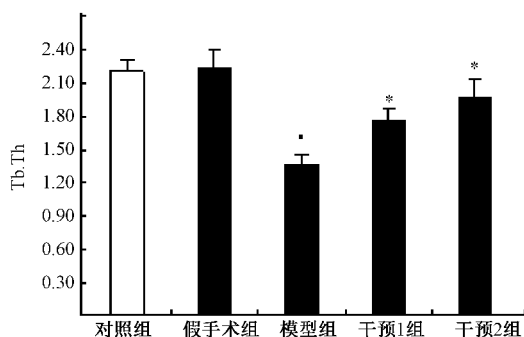


图 3 各组骨小梁厚度

Fig. 3 Comparison of Tb. Th

2.4 骨膜胶原面密度积分统计学结果

与对照组相比,假手术组胶原面密度积分没有出现明显改变。模型组胶原面密度积分明显下降(均 $P < 0.05$)。干预 1 组胶原面密度积分明显升高(均 $P < 0.05$)。干预 2 组胶原面密度积分明显升高($P < 0.05$)。

2.5 血清蛋白聚糖测定

与对照组相比,假手术组血清蛋白聚糖含量没有出现明显改变。模型组血清蛋白聚糖活性明显升高(均 $P < 0.05$)。干预 1 组血清蛋白聚糖含量明显下降(均 $P < 0.05$)。干预 2 组血清蛋白聚糖含量明显下降($P < 0.05$)(图 4)。

2.6 各组大鼠右股骨三点弯曲测试结果

与对照组相比,假手术组右股骨三点弯曲测试最大载荷(FM)没有出现明显改变。模型组最大载荷(FM)明显下降(均 $P < 0.05$)。干预 1 组最大载

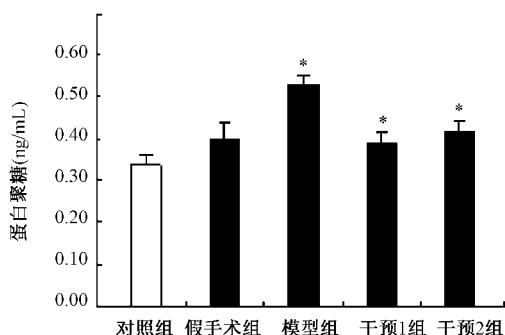


图 4 各组血清蛋白聚糖含量

Fig. 4 Serum proteoglycan

荷(FM)明显升高(均 $P < 0.05$)。干预 2 组最大载荷(FM)明显升高($P < 0.05$) (图 5)。

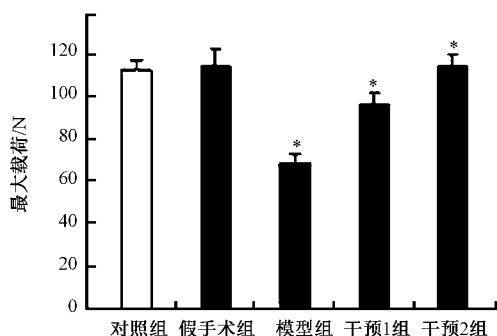


图 5 各组生物力学最大载荷

Fig. 5 The maximal load (FM) of biomechanical property)

3 讨论

机体的成骨细胞、骨细胞前体及破骨细胞上都存在雌激素受体,与女性绝经后雌激素下降导致的骨质疏松症具有相关性。雷洛昔芬是 SERM 的第二代非甾体苯并噻吩衍生物,可通过选择性地与骨细胞上的雌激素受体结合发挥作用,调节骨的形成、吸收与重建^[2];能增加骨密度,但不增加子宫内膜癌和乳腺癌的发生率^[4]。谢江涛等^[5]研究表明雷洛昔芬可减慢骨质丢失,显著改善显著改善去势大鼠骨材料力学和结构力学性能,维持较好的骨生物力学性能,防治骨质疏松症安全可靠。

仙灵骨葆具有植物雌激素样功能^[3],可改善骨转换,增加骨密度,抑制骨量流失^[6];还可促进成骨细胞增殖,优化骨小梁结构,改善骨质疏松症状^[7],不增加子宫肌瘤等疾病的风险^[8]。朱太咏等^[9]研究表明仙灵骨葆能提高股骨生物力学应答调节功能,改善骨力学结构,增强骨强度,有效预防骨折。

本实验结果显示,雷洛昔芬联合仙灵骨葆组相

比雷洛昔芬组,其防治骨质疏松症更具优势,更有效地提高骨质疏松动物局部骨密度,实验提示增加骨小梁的数量、厚度,增加骨股最大载荷,增强骨的生物力学强度;骨基质胶原纤维更积聚有序,胶原面密度积分升高更明显;血清蛋白聚糖含量下降更明显。骨小梁体积占全部骨组织体积百分比增加,反映了经雷洛昔芬联合仙灵骨葆组治疗后骨量增加,骨强度增强,骨股最大载荷也增大,有效改善其骨微结构,有效阻止生物力学性能受损。在骨基质矿化、骨质的形成与吸收、骨细胞的增值与分化等过程中,骨基质胶原纤维起着重要的作用,胶原面密度积分升高,在骨骼中相互交错,呈网状排列,为骨基质中无机物羟基磷灰石晶体提供沉积位点,对骨骼系统产生明显的影响。谢江涛等^[5]表示骨胶原纤维结构的改变及其性能下降都会导致骨生物力学性能的下降。另鉴于骨组织的生物学特性,骨生物合成的研究经常采用软骨组织进行研究^[10],骨质疏松症与蛋白聚糖关系密切,蛋白聚糖在维持骨功能中起着非常重要的调节和控制作用,其代谢与骨基质发育和退变等有着密切的关系,可促进软骨钙化来防治骨质疏松症^[11]。在生理条件下,蛋白聚糖带负电荷,可结合 Ca^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 等阳离子,能捕捉固定金属离子、半受体和生长因子等,并很大程度地影响它们在基质中的分布、传递和维持骨的功能及形状。蛋白聚糖与胶原纤维两者都决定骨的韧性及其抗压负荷的程度等。

雷洛昔芬是选择性雌激素受体调节剂,可代替雌激素防治绝经后骨质疏松症,安全可靠。仙灵骨葆可以通过调整人体的整体功能,调节体内多个系统,治疗骨质疏松^[12]。雷洛昔芬联合仙灵骨葆防治绝经后骨质疏松症,中西医结合,取长补短,既可增强疗效,又可减少不良反应,较单独使用雷洛昔芬具有更好的防治效果,更安全有效。

本研究具有局限性,我们还需要进一步探索骨骼生化性能变化,及其发生机制,进一步确定最佳治疗剂量等等。

【参考文献】

- [1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊治指南(2017) [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2017, 10 (5): 413-444.
- [2] 段永宏, 刘建. 选择性雌激素受体调节剂雷洛昔芬对去势后大鼠骨密度及股骨生物力学的影响 [J]. 西南国防医药, 2005, 15 (6): 593-596.

(下转第 1492 页)

独活、狗骨胶、淫羊藿、续断、大血藤、寻骨风、黄芪等十多味中药制作而成,具有较好的壮骨的效果。

本研究结果表明,杜仲壮骨胶囊可增强雷洛昔芬的效果,可以增加改善患者骨密度及骨代谢方面作用,同时对患者症状影响明显。关于我们认为这和杜仲壮骨胶囊发挥抗骨质疏松的作用有密切的联系,杜仲壮骨胶囊在调节患者骨转换、减少骨量丢失的同时,如淫羊藿类激素作用可以进一步降低雌激素水平对骨代谢的影响,骨吸收被强烈的抑制,因此治疗组的骨吸收指标更低,同时杜仲壮骨胶囊具有较好的补肾强骨的功效,促进骨形成,BALP 及 BGP 水平提高很好佐证这点,且未增加雷洛昔芬的不良反应,表明本研究所采取的药物剂量安全可靠。但是我们研究也有其不足之处,首先就是样本数量较少,且为一家医疗中心所得到数据;且观察治疗时间较短,只有 12 个月;再者患者的年龄区间较小,身体状况都较好。因此后续大样本,多家医院及深层次机制研究需要探索。

【参 考 文 献】

- [1] 孙艳格,阮祥燕,杜雪平,等. 骨质疏松性骨折风险预测简易工具筛查社区绝经后妇女骨量异常的效果评价[J]. 中国全科医学, 2016,19(14): 1620-1624.
 - [2] Chen H, Hayashi T, Zhou X, et al. Sophisticated imaging technology in the assessment of osteoporosis risk [M]. InTech, 2012.
 - [3] Yubo G, Yu L, Liming X, et al. Salvia miltiorrhiza: an ancient Chinese herbal medicine as a source for anti-osteoporotic drugs [J]. J Ethnopharmacol, 2014,155(3): 1401-1416.
 - [4] Chavassieux P, Portero-Muzy N, Roux JP, et al. Are biochemical markers of bone turnover representative of bone histomorphometry in 370 postmenopausal women [J]? J Clin Endocrinol Metabol, 2015,100(12): 4662.
 - [5] 陶周善,周皖舒,江云云,等. 骨形成蛋白联合雷奈酸锶对成骨细胞增殖和分化的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(2):165-169.
 - [6] Gallant MA, Brown DM, Hammond M, et al. Bone cell-independent benefits of raloxifene on the skeleton: a novel mechanism for improving bone material properties [J]. Bone, 2014,61(4): 191.
 - [7] 吴文. 2011 年原发性骨质疏松症诊治指南—新指南解读 [C]. 2011 广东康复科学学术大会暨广东省康复医学会科主任论坛, 2011.
 - [8] 涂艳,熊莉娜,柳湘洁,等. 复方淫羊藿口服液治疗原发性骨质疏松症临床研究[J]. 中医学报, 2017, 32(10): 1981-1984.
 - [9] Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases [J]. Science, 2000,289(5484): 1508.
 - [10] Brennan TC, Rizzoli RP. Selective modification of bone quality by PTH, pamidronate, or raloxifene [J]. J Bone Miner Res, 2009,24(5): 800.
 - [11] Iamas AZ, Caliman IF, Dalpiaz PL, et al. Comparative effects of estrogen, raloxifene and tamoxifen on endothelial dysfunction, inflammatory markers and oxidative stress in ovariectomized rats [J]. Life Sciences, 2015,124: 101-109.
 - [12] Zhu H, Ling Q, Garnero P, et al. The first multicenter and randomized clinical trial of herbal Fufang for treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. Osteoporos Int, 2012, 23(4): 1317.
- (收稿日期: 2018-03-02;修回日期: 2018-04-10)
-
- (上接第 1432 页)
- [3] 高峰,杜宁. 药物干预对去卵巢大鼠关节软骨代谢的影响[J]. 中国骨伤,2008,3(21):196-199.
 - [4] 侍晓辰,张卫东,周仕萍. 雷洛昔芬对绝经后乳腺癌 VEGF、Ki-67、CD34 抗原表达的影响[J]. 天津医药,2012,40(3): 206-208.
 - [5] 谢江涛,罗珊. 有氧运动配合雷洛昔芬对骨生物力学性能影响的研究[J]. 四川体育科学,2014,8(4):40-58.
 - [6] 覃裕,邱冰,朱思刚,等. 仙灵骨葆胶囊治疗骨质疏松症的疗效及其对骨代谢及骨转换指标的影响分析[J]. 中国骨质疏松杂志,2015,21(9):1056-1060.
 - [7] 张萌萌,张艳会,毛未贤,等. 1084 例女性 TRACP、CTX-1、BALP、BGP、钙磷代谢指标与 BMD 相关性[J]. 中国骨质疏松杂志,2013,19(9):902-906.
 - [8] 倪力刚,王伟,李春雯,等. 仙灵骨葆胶囊对骨质疏松性髋部骨折的研究近况[J]. 中国骨质疏松杂志,2011,17(11): 1014-1018.
 - [9] 朱太咏,张戈,付汝田,等. 仙灵骨葆改善骨质疏松大鼠股骨骨生物力学性能的作用及机制研究[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(11):2058-2092.
 - [10] 徐丛,徐飞,杜元良,等. 绝经后女性不同 Singh 指数骨扫描电镜特点[J]. 中国老年学杂志,2016, 36(2):936-938.
 - [11] 曹译. 鹿茸对去卵巢大鼠所致骨质疏松症治疗作用的研究及鹿茸中硫酸软骨素的提取[D]. 吉林大学,2005.
 - [12] 邢燕,毕宏焱,张倩楠,等. 骨质疏松常用中成药介绍[J]. 中国骨质疏松杂志,2013,19(1):83-85.
- (收稿日期: 2018-08-20;修回日期: 2018-08-24)