

· 论 著 ·

补肾壮骨方对去卵巢大鼠骨结构和骨代谢作用的研究

陈贝贝 郭鱼波 刘海霞 朱如愿 柳辰玥 贾强强 高思华 张东伟*

北京中医药大学中医学院糖尿病研究中心, 北京 100029

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 02-0163-07

摘要: **目的** 研究补肾壮骨方对骨质疏松大鼠骨结构和骨代谢的影响及其可能的作用机制。**方法** 用SD雌性大鼠复制去卵巢骨质疏松模型,然后分别灌服补肾壮骨方水提液高剂量(1.4 g/kg)和低剂量(0.7 g/kg)12周。用生化法测定血清钙(S-Ca)、血清磷(S-P)、尿钙(U-Ca/Cr)、尿磷(U-P/Cr)以及血清中高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)的含量;Elisa法测定I型胶原氨基端前肽(procollagen I N-terminal propeptide, PINP)、I型胶原羧基端肽(collagen I carboxyl terminal peptide, CTX-I)、尿脱氧吡啶啉(deoxypyridine, DPD)、骨钙素(osteocalcin, OCN)的含量;用放免法测定血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的活性;用双能X线(DEXA)法、Viva CT和万能试验机测定骨密度、骨微结构和骨生物力学特性;用Western blot法测定骨组织蛋白酶K表达。**结果** 补肾壮骨方水提液能升高血清中的钙、磷、HDL-C和PINP的含量,降低血清中TC、TG、LDL、ALP、OCN和CTX-I及尿液中的钙、磷、DPD的含量。同时,补肾壮骨方水提液可以升高去卵巢大鼠股骨的骨密度,改善骨微结构,增加骨强度,降低胫骨Cathepsin K的表达水平。**结论** 补肾壮骨方水提液能够抑制去卵巢大鼠的骨量丢失和骨强度下降,改善去卵巢大鼠的骨代谢,其作用机制可能与抑制Cathepsin K的表达有关。

关键词: 补肾壮骨方;骨质疏松;钙、磷代谢;骨代谢;骨结构;组织蛋白酶K

Effects of Bushen Zhuanggu compound on bone structure and metabolism in ovariectomized rats

CHEN Beibei, GUO Yubo, LIU Haixia, ZHU Ruyuan, LIU Chenyue, JIA Qiangqiang, GAO Sihua, ZHANG Dongwei*

Diabetes Research Center, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

* Corresponding author: Zhang DW, Email: zhdw1006@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the anti-osteoporotic effects of Bushen Zhuanggu compound on bone structure and bone metabolism in ovariectomized (OVX) rats. **Methods** Osteoporotic rats model was established by bilaterally ovariectomy in Sprague-Dawley female rats. Bushen Zhuanggu compound aqueous extract (0.7 and 1.4 g/kg) were orally given to OVX rats for 12 weeks. Biochemical method was used to determine serum levels of calcium (S-Ca) and phosphorus (S-P), urinary levels of calcium (U-Ca/Cr) and phosphorus (U-P/Cr) as well as serum levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein (LDL), total cholesterol (TC) and triglyceride (TG). ELISA was used to examine collagen I amino terminal peptide (PINP), collagen I carboxyl terminal peptide (CTX-I), osteocalcin (OCN) and urine deoxypyridine (DPD). The activity of serum alkaline phosphatase (ALP) was determined by radioimmunoassay. Western-blotting method was used to measure the expression of cathepsin K in the rat tibia. Bone mineral density, microstructure and biomechanics were determined by dual-energy X-ray (DEXA), VivaCT and bone biomechanical properties. **Results** Bushen Zhuanggu compound increased the serum levels of calcium, phosphorus, HDL-C and PINP, decreased the urinary levels of calcium and phosphorus and DPD, and reduced serum levels of TC, TG, LDL, ALP, OCN and CTX-I. At the same time, Bushen Zhuanggu Compound could increase the femur bone density, improve bone microstructure, increase bone strength and reduced the expression of tibia cathepsin K in OVX rats. **Conclusion** Bushen Zhuanggu Compound could exert anti-osteoporosis effect by increasing bone mineral density and strength and improving bone microstructure through regulation of bone metabolism and mineral content in OVX rats, and this effect might be related to inhibition of the cathepsin K expression in rat tibia.

Key words: Bushen Zhuanggu compound; osteoporosis; calcium and phosphorus metabolism; bone metabolism; bone structure; cathepsin K

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种以骨量降低,骨微结构破坏,导致骨脆性增加,骨折风险增高为特征的骨代谢性疾病^[1]。随着人口老龄化的加速,骨质疏松症发病率逐年增高,已成为人类第三大常发慢性病。最新研究显示,我国骨质疏松症患者将达到2.12亿^[2]。目前,市场上治疗骨质疏松的西药虽能在一定程度上抑制骨量的丢失,缓解腰痛等临床症状,但是大多数药物存在不同程度的不良反应^[3]。中药以其多靶点、安全性高、不良反应少的特点逐渐成为国内外研究的热点^[4]。

中医认为,骨质疏松症属于“骨痹、骨痿、骨枯”的范畴,其病因病机主要在于肾虚与血瘀,临床治则多以补肝肾和活血化瘀为主^[5]。补肾壮骨方是临床上常用的经验方,由丹参、淫羊藿等组成,初步临床观察发现,该方能明显提高骨质疏松患者的骨密度(bone mineral density, BMD)、降低骨折发生率,但是其详细的作用机理尚未清楚。因此,本研究拟以去卵巢大鼠为研究对象,观察补肾壮骨方对血清学指标、骨密度、骨微结构和病理结构的影响,探讨补肾壮骨方对去卵巢大鼠骨结构和骨代谢的作用和可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物和试剂。补肾壮骨方由丹参、淫羊藿等药物组成,所有饮片均购自北京同仁堂,经北京中医药大学中医药博物馆马泽新教授鉴定为正品。按临床常用方法,制成水提液,浓缩成终浓度为1.4 g(含药量)/mL, 4℃储存备用,使用前蒸馏水稀释灌胃。

钙(Ca)测定试剂盒、磷(P)测定试剂盒、肌酐(Cr)测定试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein, HDL)测定试剂盒、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)测定试剂盒、总胆固醇(total cholesterol, TC)测定试剂盒、甘油三酯(triglyceride, TG)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, Elisa试剂盒包括检测I型胶原氨基端前肽(procollagen I N-terminal propeptide, PINP)、I型胶原羧基端肽(collagen I carboxyl terminal peptide, CTX-I)、尿脱氧吡啶啉(deoxypyridine, DPD)和骨钙素(osteocalcin, OCN)均购自Cusabio BIO-Technology Co., Ltd., Cathepsin K抗体(H-130, sc-28867, Santa Cruz, 美国)。

1.1.2 动物。3月龄雌性SD大鼠,平均体重220~

240 g,购自斯贝福(北京)实验中心,饲养于北京中医药大学科研实验中心屏障级动物实验室(合格证号SCXK(京)2016-0038),室温20℃,相对湿度(55±5)%,光暗周期12 h/12 h,普通饲料喂养,实验期间大鼠自由进食和进水。

1.2 方法

1.2.1 去卵巢大鼠模型的建立。雌性大鼠适应性饲养一周后,参照郭鱼波等^[6]提供的方法进行。简述如下:大鼠用1%戊巴比妥钠(4 mL/kg)腹腔麻醉,摘除两侧子宫角末端粉红色菜花样卵巢。假手术组大鼠仅切除两侧卵巢附近等体积的脂肪组织,然后所有大鼠适应性饲养一周。

1.2.2 动物的分组及给药。造模一周后,进行阴道涂片实验,连续5 d无动情周期即为去卵巢实验成功。取造模成功的大鼠36只,按照体重随机等分为模型组(OVX)、阿仑膦酸钠组(ALN)、补肾壮骨方水提液低剂量组(SD)和补肾壮骨方水提液高剂量组(SG)。假手术组大鼠(SHAM)9只。其中,补肾壮骨方水提液低剂量组(SD)、高剂量组(SG)大鼠分别灌服0.7 g/kg和1.4 g/kg的补肾壮骨方水提液,阿仑膦酸钠组(ALN)灌服阿仑膦酸钠0.12 g/kg。假手术组和模型组大鼠给予等体积的蒸馏水。各组大鼠连续灌胃12周后,分别取血液、尿液、股骨、胫骨等进行相应的检测。

1.3 检测指标

1.3.1 血清和尿液生化指标的测定。取血液和尿液,按照试剂盒说明书测定血清中的Ca、P、HDL、LDL、TC、TG、PINP、CTX-I、OCN、DPD的含量;血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)用放免法测定。

1.3.2 骨密度的测定。采用双能X线(DEXA)小动物成像仪对大鼠股骨进行扫描,选定股骨远端为兴趣区域进行图像分析,得到股骨的BMD。

1.3.3 骨微结构的测定。采用VivaCT40(Scanco medical, 瑞士)扫描大鼠股骨,选定股骨头下0.5 cm为兴趣区域进行图像分析,得到骨表面积与体积分数比(BS/BV)、骨小梁体积分数比(BV/TV)、骨小梁分离度(Tb.Sp)、骨小梁数量(Tb.N)、结构模型指数(structure model index, SMI)和连接密度(Conn.D)参数值,并进行分析比较。

1.3.4 骨生物力学测定。采用微机控制电子万能试验机(WF-4005, 深圳市瑞格尔仪器有限公司)进行三点弯曲实验。将股骨生理弯曲面向上放置,并使股骨中心、两支点中心及加载点重合,然后按1

mm/min 下降速度加载负荷,根据载荷-位移曲线计算最大载荷、最大应力和弹性模量。

1.3.5 骨组织 HE 染色。取左侧股骨组织做成石蜡切片,按照王丽丽等^[7]提供方法进行 HE 染色,封片后置于 Olympus BX53 倒置显微镜拍照观察骨组织的病理变化。

1.3.6 Western blot 测定 Cathepsin K 的表达。参照 Ma 等^[8]描述的实验方法进行,并简述如下:提取胫骨蛋白,将 80 μg 蛋白溶液加到 12% 的 SDS-PAGE 电泳胶电泳,分离后转印至 PVDF 膜,然后将膜与 Cathepsin K (1:500) 和 β-actin (1:1000) 4 ℃ 共孵育过夜。然后将膜与相应的二抗室温共孵育 1 h,用 ECL 超敏发光液显色,Azure c300 化学发光成像系统拍照,并用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件进行半定量灰度值分析。

1.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS 23.0 软件处理,结果用平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。满足正态分布,且方差齐时用单因素方差分析 (one-way ANOVA);当方差不齐时,采用 Dunnett's T3 检验。不满足正态分布时,则采用非参数检验;两两比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 补肾壮骨方对去卵巢大鼠血液及尿液中钙和磷含量的影响

钙磷等矿盐是骨组织钙化的重要成分,其血清和尿液的含量变化可以间接反映出骨矿物质的代谢情况。补肾壮骨方对大鼠血清和尿液钙磷检测结果见表 1。从表 1 可知,与假手术组 (SHAM) 大鼠相比,模型组 (OVX) 大鼠血清中钙 (S-Ca) 和磷 (S-P) 水平均显著降低,尿液中的钙 (U-Ca/Cr)、磷 (U-P/Cr) 水平均显著增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 0.01)。与模型组 (OVX) 大鼠相比,阿伦磷酸钠组、补肾壮骨方水提液低剂量组 (SD) 血清中钙 (S-Ca) 和磷 (S-P) 水平均显著升高,尿液中的钙 (U-Ca/Cr) 和磷 (U-P/Cr) 水平均显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 0.01); 补肾壮骨方水提液高剂量组 (SG) 血清中钙 (S-Ca)、磷 (S-P) 水平均显著升高,尿液中 (U-P/Cr) 磷水平显著降低 ($P < 0.05$ 或 0.01),尿液中钙 (U-Ca/Cr) 含量虽有一定程度降低,但差异不具有统计学意义。这说明补肾壮骨方可以改善去卵巢大鼠的钙磷代谢,从而增加骨组织矿物质含量。

表 1 补肾壮骨方对去卵巢大鼠血清和尿液中钙和磷含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Bushen Zhuanggu Compound on calcium and phosphorus levels in the serum and urine in ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	S-Ca/ (mmol/L)	S-P/ (mmol/L)	U-Ca/Cr /(mmol/mmol)	U-P/Cr /(mmol/mmol)
SHAM	2.0400±0.0600 ^{**}	2.4300±0.3200 ^{**}	0.0270±0.0058 ^{**}	1.0084±0.3037 [*]
OVX	1.7500±0.0300 ^{##}	1.7400±0.1400 ^{##}	0.1233±0.1009 ^{##}	2.4581±1.6745 [#]
ALN	1.8900±0.0400 ^{* ** ##}	2.0700±0.1900 ^{* * ##}	0.0320±0.0258 [*]	1.0540±0.2256 [*]
SG	1.8700±0.0600 ^{* * ##}	2.4200±0.4700 ^{**}	0.0668±0.0582 [#]	1.1366±0.3681 [*]
SD	1.8900±0.0800 ^{* * ##}	2.4000±0.1200 ^{**}	0.0284±0.0114 ^{**}	1.1308±0.3533 [*]

注:与模型组大鼠相比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与假手术组大鼠相比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

2.2 补肾壮骨方对去卵巢大鼠血清中 TC、TG、HDL、LDL 含量的影响

脂代谢与骨代谢具有密切相关性^[9]。各组大鼠血脂代谢中相关指标检测结果见表 2。由表 2 可知,与假手术 (SHAM) 相比,模型组 (OVX) 大鼠血清中 TC、TG、LDL 含量明显升高, HDL 含量明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 0.01)。给予阿伦磷酸钠、补肾壮骨方水提液低剂量治疗 12 周后,与去卵巢组大鼠相比,大鼠血清中的 TC、TG、LDL 含量明显降低, HDL 含量明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);高剂量组大鼠血清中的 TC、TG、

LDL 含量明显降低 ($P < 0.05$ 或 0.01), HDL 含量升高。

2.3 补肾壮骨方对去卵巢大鼠血清 ALP、PINP、CTX-I、OCN 和尿液 DPD 的含量的影响

血清中的 ALP、PINP 和 OCN 反映骨形成,血清 CTX-I 和尿液 DPD 是反映骨吸收的生化指标。各组大鼠血清指标结果见图 1。由图 1 可知,与假手术组 (Sham) 大鼠相比,模型组 (OVX) 大鼠血清中 ALP、CTX-I、OCN、尿液中 DPD 含量明显升高 ($P < 0.05$ 或 0.01),血清中 PINP 含量明显下降 ($P < 0.05$)。与模型组 (OVX) 大鼠相比,去卵巢大鼠经

阿仑膦酸钠、补肾壮骨方水提液低剂量和高剂量治疗后,其血清中 ALP、CTX-I、OCN 和尿液中的 DPD

含量降低 ($P < 0.05$ 或 0.01), PINP 含量显著升高 ($P < 0.05$ 或 0.01)。

表 2 补肾壮骨方对去卵巢大鼠血清中 TC、TG、HDL、LDL 含量的影响 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Bushen Zhuanggu Compound on the levels of TC, HDL, TG, LDL in the serum of ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	TC	TG	HDL	LDL
SHAM	2.3701 $\pm$ 0.5437 ^{**}	1.0643 $\pm$ 0.1365 ^{**}	2.0549 $\pm$ 0.5350 [*]	3.5197 $\pm$ 0.9408 ^{**}
OVX	3.2750 $\pm$ 0.4419 ^{##}	1.3300 $\pm$ 0.1005 ^{##}	0.2950 $\pm$ 0.1788 [#]	5.1510 $\pm$ 0.6140 ^{##}
ALN	2.2572 $\pm$ 0.6334 ^{**}	0.8521 $\pm$ 0.2135 ^{**#}	1.4797 $\pm$ 0.3563 ^{**}	2.9208 $\pm$ 1.7215 ^{**}
SG	2.3598 $\pm$ 0.3661 ^{**}	1.0430 $\pm$ 0.3292 [*]	0.3563 $\pm$ 0.4671 [#]	3.9159 $\pm$ 0.8119 ^{**}
SD	2.4646 $\pm$ 0.5585 ^{**}	0.9620 $\pm$ 0.1318 ^{**}	1.2978 $\pm$ 0.3572 ^{**}	2.9593 $\pm$ 0.9890 ^{**}

注:与模型组大鼠相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与假手术组大鼠相比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

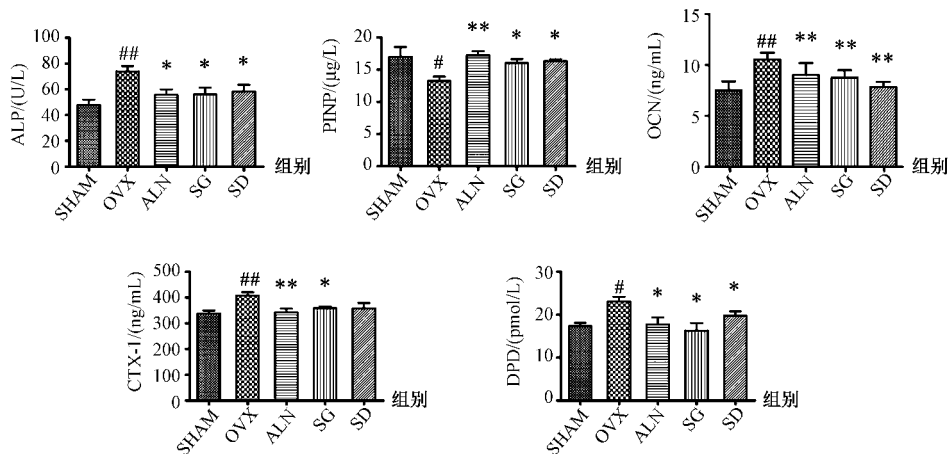


图 1 补肾壮骨方对去卵巢大鼠血清和尿液骨转换标志物含量的影响

Fig.1 Effect of Bushen Zhuanggu Compound on the levels of serum and urine turnover markers in ovariectomized rats

注:与模型组大鼠相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与假手术组大鼠相比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

2.4 补肾壮骨方对去卵巢大鼠股骨密度和骨组织微结构的影响

骨质疏松不仅导致骨量的降低,同时也会诱发骨组织微结构的破坏。各组大鼠的骨 CT 实验结果见表 3。与假手术组 (SHAM) 大鼠相比,模型组

(OVX) 大鼠的股骨骨密度显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组 (OVX) 大鼠相比,阿仑膦酸钠组、补肾壮骨方水提液低剂量组 (SD) 和高剂量组 (SG) 大鼠的股骨骨密度显著升高。

表 3 补肾壮骨方对去卵巢大鼠骨密度和骨微结构改变的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Bushen Zhuanggu Compound on the changes of micro-structures in ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	BMD/ (g/cm ²)	Tb.Sp/mm	SMI/ (1)	BV/TV/ (1)	BS/BV/ (1/mm)	Tb.N/ (1/mm)	Conn.D/ (1/mm ³)
SHAM	0.28 $\pm$ 0.01 ^{**}	0.18 $\pm$ 0.03 ^{**}	1.81 $\pm$ 0.53 ^{**}	0.60 $\pm$ 0.03 [*]	12.48 $\pm$ 0.54 ^{**}	5.49 $\pm$ 0.34 ^{**}	127.20 $\pm$ 10.69 ^{**}
OVX	0.26 $\pm$ 0.00 ^{##}	0.37 $\pm$ 0.08 ^{##}	3.94 $\pm$ 0.60 ^{##}	0.47 $\pm$ 0.01 [#]	8.56 $\pm$ 0.52 ^{##}	3.36 $\pm$ 0.10 ^{##}	54.70 $\pm$ 2.95 ^{##}
ALN	0.30 $\pm$ 0.01 ^{*##}	0.19 $\pm$ 0.02 ^{**}	2.03 $\pm$ 0.41 [*]	0.58 $\pm$ 0.04 ^{**}	10.89 $\pm$ 0.52 [*]	4.51 $\pm$ 0.22 ^{**}	110.20 $\pm$ 15.68 ^{**}
SG	0.28 $\pm$ 0.00 ^{**}	0.29 $\pm$ 0.09 ^{##}	3.15 $\pm$ 0.34 ^{##}	0.51 $\pm$ 0.05	11.53 $\pm$ 1.02 [*]	3.97 $\pm$ 0.34 [#]	104.30 $\pm$ 29.80 ^{**}
SD	0.28 $\pm$ 0.01 ^{**}	0.22 $\pm$ 0.04 ^{*##}	2.55 $\pm$ 0.61 ^{**}	0.53 $\pm$ 0.01 [*]	12.26 $\pm$ 1.46 [*]	4.45 $\pm$ 0.47 ^{**}	87.78 $\pm$ 17.98 ^{**}

注:与模型组大鼠相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与假手术组大鼠相比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

模型组 (OVX) 大鼠骨组织微结构破坏严重,与假手术组 (SHAM) 大鼠相比,其 BV/TV、BS/BV、Tb.

N、Conn.D 显著降低 ($P < 0.05$ 或 0.01), Tb.Sp、SMI 显著增加 ($P < 0.05$ 或 0.01)。与模型组 (OVX) 大鼠

相比,去卵巢大鼠经过阿仑膦酸钠治疗 12 周后,其 BS/BV、Conn.D 显著增加 ($P<0.05$ 或 0.01), Tb.Sp、SMI 显著降低 ($P<0.05$ 或 0.01)。补肾壮骨方水提液高剂量 (SG) 和低剂量 (SD) 治疗的去卵巢大鼠,其 BS/BV、Conn.D 显著增加 ($P<0.05$ 或 0.01)。同时,补肾健骨方低剂量 (SD) 能显著增加 BV/TV 和 Tb.N,降低 SMI、Tb.Sp ($P<0.05$ 或 0.01)。这说明补肾壮骨方对于去卵巢大鼠股骨的骨密度和骨微结构具有一定程度的保护作用,同时其低剂量治疗效果相对较好。

2.5 补肾壮骨方对去卵巢大鼠股骨的生物力学的影响

大鼠股骨生物力学实验结果见表 4。由表 4 可知,与假手术组 (SHAM) 相比,模型组 (OVX) 大鼠股骨最大载荷、弹性模量、最大应力明显降低 ($P<0.05$ 或 0.01)。与模型组 (OVX) 大鼠相比,阿仑膦酸钠组大鼠股骨的最大载荷、弹性模量、最大应力明显增加 ($P<0.05$)。去卵巢大鼠给予补肾壮骨方治疗 12 周后,与模型组 (OVX) 大鼠相比,补肾壮骨方水煎液低剂量组 (SD)、高剂量组 (SG) 大鼠股骨的最大载荷、弯曲强度显著增加 ($P<0.05$),但对弹性模量影响不明显。这说明补肾壮骨方能够增强去卵巢大

鼠的骨强度。

表 4 补肾壮骨方对去卵巢大鼠股骨生物力学改变的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Bushen Zhuanggu Compound on the changes of femur bone biomechanics in ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	弹性模量 /GPa	最大应力 /MPa	最大载荷 /N
SHAM	-	8.51±0.25 [*]	255.90±5.74 ^{**}	140.30±4.13 [*]
OVX	-	6.90±0.52 [#]	219.00±7.97 ^{**}	124.50±3.59 [#]
ALN	0.12	8.55±0.38 [*]	236.40±4.36 [#]	138.40±2.20 [*]
SG	1.30	7.80±0.16	256.80±9.08 [*]	138.70±4.44 [*]
SD	0.70	7.92±0.37	242.50±2.52 [*]	147.50±7.29 [*]

注:与模型组大鼠相比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与假手术组大鼠相比较,[#] $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

2.6 补肾壮骨方对去卵巢大鼠股骨病理形态的影响

大鼠股骨 HE 染色结果 (物镜×10) 如图 2 所示。由图 2 可知,假手术组 (SHAM) 大鼠股骨骨小梁排列紧密,结构完整。模型组 (OVX) 大鼠股骨骨小梁结构松散不规则,细长稀疏,出现断裂,脂滴增多。阿仑膦酸钠组、补肾壮骨方水提液高剂量 (SG) 和低剂量组 (SD) 大鼠股骨骨小梁增多,排列紧密,脂滴数量减少,骨微结构形态得到改善。

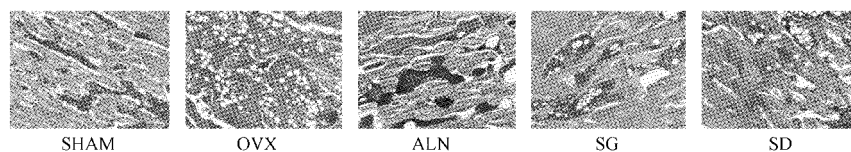


图 2 大鼠股骨 HE 染色 (物镜×10)

Fig.2 HE staining of femur in rat (objective len×10)

2.7 补肾壮骨方对去卵巢大鼠骨组织 Cathepsin K 表达的影响

各组大鼠骨组织中 Cathepsin K 的表达结果见图 3。由图 3 可知,与假手术组 (SHAM) 大鼠相比,模型组 (OVX) 大鼠股骨组织中的 Cathepsin K 的表达明显升高 ($P<0.05$);与模型组 (OVX) 大鼠相比,阿仑膦酸钠和补肾壮骨方 (低剂量和高剂量) 能显著降低去卵巢大鼠 Cathepsin K 的表达水平 ($P<0.05$),其中低剂量效果在降低 Cathepsin K 表达水平方面效果更明显 ($P<0.01$)。这说明补肾壮骨方可能通过抑制 Cathepsin K 表达进而改善骨质量。

3 讨论

中医认为,肾藏精主骨、肝藏血主筋、肝肾同源而精血互生。肾功能失常如肾精虚或肾气虚,则会

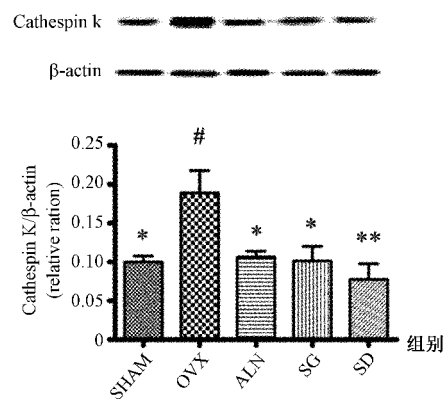


图 3 大鼠骨组织 Cathepsin K 的表达结果

Fig.3 Cathepsin K expression in bone tissue

注:与模型组大鼠相比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与假手术组大鼠相比较,[#] $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

导致骨骼失养,痿软无力。肝肾生理功能异常,则可能导致骨质疏松。肝血不足可导致肾精亏损。肝血虚则筋脉失养,肢体屈伸不利,筋骨运动失常,从而诱发骨痿^[10]。补肾活血方由丹参、淫羊藿、熟地等组成。其中,丹参能活血化瘀,熟地黄具有补肝肾强筋骨的功效,淫羊藿具有温肾精、强筋骨的功效。基础研究也表明,丹参^[11]、地黄^[12]、淫羊藿^[13]单独应用能明显改善骨质疏松动物的骨微结构和骨质量。临床观察也表明,该方能显著改善骨质疏松患者的临床症状,减轻患者骨量的丢失。

骨代谢的异常是诱发骨结构破坏和骨质疏松的主要原因。钙和磷是骨组织的主要成分,研究发现骨质疏松患者的钙和磷的排泄量明显增加。本实验研究也发现,补肾壮骨方能显著抑制去卵巢大鼠尿钙和磷的排泄,提高血清中钙和磷的含量。同时也发现,去卵巢大鼠骨胶原降解加速,表现为血清中 PINP 的含量明显降低,血液中的 CTX-I 和尿液中 DPD 的含量明显升高。给予去卵巢大鼠补肾壮骨方治疗 12 周,能明显逆转骨胶原血清学指标,抑制去卵巢诱发的骨吸收。同时,本研究用骨生物力学、骨密度和骨微结构评价补肾壮骨方对骨物理性质的影响。实验结果表明,该方能明显提高去卵巢大鼠股骨的最大载荷和弯曲强度,抑制骨量的丢失以及骨微结构的破坏。

去卵巢诱发的骨质疏松是一种高转换状态的骨代谢过程,表现为血清中 ALP 活性明显增高^[14]。补肾壮骨方能明显降低血清中 ALP 的活性,抑制骨代谢的高转换率。OCN 是由成骨细胞生成并特异性分泌的非胶原蛋白。研究发现,去卵巢大鼠的 OCN 含量明显降低^[15],这提示成骨细胞的骨形成能力明显降低。本实验研究发现,该方能提高去卵巢大鼠血清 OCN 的含量,从而促进骨形成。

Cathepsin K 活性的增高诱发破骨细胞骨吸收增强,是去卵巢诱发骨质疏松的主要原因之一^[16]。研究发现,淫羊藿的主要成分淫羊藿苷(icariin)能通过抑制 Cathepsin K 的活性而抑制胶原诱发的骨关节炎^[17]。笔者前期研究也发现丹参的主要水溶性成分丹酚酸 B 能降低高脂饮食小鼠牙槽骨组织 Cathepsin K 的表达水平改善骨代谢^[7]。丹参脂溶性成分丹参酮也能抑制 Cathepsin K 的活性^[18]。本实验研究也证明,以丹参和淫羊藿为主要成分的补肾壮骨方能降低骨组织 Cathepsin K 的表达。这说明该方抗去卵巢诱发的大鼠骨量降低的机理之一可能在于抑制 Cathepsin K 的活性。

4 结论

本实验通过观察补肾壮骨方对去卵巢大鼠血清和尿液的骨代谢指标、骨微结构和骨生物力学的影响,证明补肾壮骨方能够增强去卵巢大鼠的骨生物力学和改善骨微结构可能与改善骨代谢、抑制骨吸收和促进骨形成有关。这为其临床应用预防和治疗骨质疏松症提供了实验依据。这种骨组织的保护作用可能与抑制 Cathepsin K 的活性有关,但该方抗骨质疏松的深层次分子机制有待于进一步探讨。

【参 考 文 献】

- [1] Chen B, Wang L, Li L, et al. Fructus ligustri lucidi in osteoporosis: A review of its pharmacology, phytochemistry, pharmacokinetics and safety[J]. *Molecules*, 2017, 22(9): E1469.
- [2] 白璧辉,谢兴文,李鼎鹏,等.我国近 5 年来骨质疏松症流行病学研究现状[J].*中国骨质疏松杂志*,2018,24(2):253-258.
- [3] 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疗指南(2017)[J].*中国实用内科杂志*,2018,38(2):127-150.
- [4] 孙亚奇,卞艳芳,周春娜,等.中药治疗骨质疏松症研究进展[J].*中国临床医学*,2018,25(2):307-313.
- [5] 郭鱼波,王丽丽,马如风,等.骨质疏松的中医病因病机分析及其中医药治疗的前景探讨[J].*世界科学技术-中医药现代化*,2015,17(4):768-772.
- [6] 郭鱼波,王丽丽,马如风,等.女贞子水提液对去卵巢大鼠骨结构和骨代谢的影响研究[J].*中草药*,2016,47(7):1155-1162.
- [7] 王丽丽,马如风,于娜,等.丹酚酸 B 通过抗氧化作用改善高脂饮食小鼠牙槽骨骨质疏松的实验研究[J].*中国骨质疏松杂志*,2017,23(3):281-285,317.
- [8] Ma R, Wang L, Zhao B, et al. Diabetes perturbs bone microarchitecture and bone strength through regulation of Sema3A/IGF-1/ β -Catenin in rats[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017,41(1):55-66.
- [9] Tuazon M, Campbell S, Klein D, et al. Effects of ovariectomy and exercise training intensity on energy substrate and hepatic lipid metabolism, and spontaneous physical activity in mice[J]. *Metabolism*,2018,83:234-244.
- [10] 董世健,杨博文,刘晨,等.从脾肾论治绝经后骨质疏松症的研究进展[J].*光明中医*,2018,33(17):2620-2622.
- [11] 张晓,张国庆,顾伯林,等.丹参及其有效成分对骨代谢影响的实验研究进展[J].*中国骨质疏松杂志*,2015,21(1):112-116.
- [12] Liu C, Wang L, Zhu R, et al. Rehmanniae radix preparata suppresses bone loss and increases bonestrength through interfering with canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in OVX rats[J]. *Osteoporos Int*, 2018 Aug 27. doi: 10.1007/s00198-018-4670-y.

- [4] Kalhor M, Horowitz K, Gharehdaghi J, et al. Anatomic variations in femoral head circulation[J]. Hip Int, 2012, 22(3):307-312.
- [5] Buchholz RW, Jones A. Current concepts review: fractures of the shaft of the femur[J]. J Bone Joint Surg Am, 1991, 73: 1561-1565.
- [6] Winquist RA, Hansen ST Jr, Clawson DK. Closed intramedullary nailing of femoral fractures. A report of five hundred and twenty cases[J]. J Bone Joint Surg Am, 2001, 83(12):1912.
- [7] Helmy N, Jando VT, Lu T, et al. Muscle function and functional outcome following standard antegrade reamed intramedullary nailing of isolated femoral shaft fractures[J]. J Orthop Trauma, 2008, 22(1):10-15.
- [8] Bednar DA, Ali P. Intramedullary nailing of femoral shaft fractures: reoperation and return to work[J]. Can J Surg, 1993, 36(5):464-466.
- [9] Dodenhoff RM, Dainton JN, Hutchins PM. Proximal thigh pain after femoral nailing causes and treatment[J]. J Bone Joint Surg Br, 1997, 79(5):738-741.
- [10] Shahane SA, Farhan MJ. Avascular necrosis of the head of femur after intramedullary nailing for fracture of the shaft of the femur[J]. Injury, 1996, 27(9):663-665.
- [11] Wu CC, Yu CT, Hsieh CP, et al. Femoral head avascular necrosis after interlocking nail of a femoral shaft fracture in a male adult: a case report[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2008, 128(4):399-402.
- [12] Graves RM, Sands KC. Avascular necrosis of the femoral head following intramedullary nailing of the femur in a skeletally mature young adult: a case report[J]. Am J Orthop (Belle Mead NJ), 2008, 37(6):319-322.
- [13] Dora C, Leunig M, Beck M, et al. Entry point soft tissue damage in antegrade femoral nailing: a cadaver study[J]. J Orthop Trauma, 2001, 15(7):488-493.
- [14] Moein CMA, Verhofstad MHJ, Bleys R, et al. Soft tissue anatomy around the hip and its implications for choice of entry point in antegrade femoral nailing[J]. Clin Anat, 2008, 21(6):568-574.
- [15] Ansari Moein CM, Verhofstad MH, Bleys RL, et al. Soft tissue injury related to choice of entry point in antegrade femoral nailing: piriform fossa or greater trochanter tip[J]. Injury, 2005, 36(11):1337-1342.
- [16] Ansari Moein C, ten Duis HJ, Oey L, et al. Functional outcome after antegrade femoral nailing: a comparison of trochanteric fossa versus tip of greater trochanter entry point[J]. J Orthop Trauma, 2011, 25(4):196-201.
- [17] Lowe JA, Min W, Lee MA, et al. Risk of injury to the superior gluteal nerve when using a proximal incision for insertion of a piriformis-entry reamed femoral intramedullary nail: a cadaveric study[J]. J Bone Joint Surg Am, 2012, 94(15):1416-1419.
- [18] Farhang K, Desai R, Wilber JH, et al. An anatomical study of the entry point in the greater trochanter for intramedullary nailing[J]. Bone Joint J, 2014, 96(9):1274-1281.
- [19] Schottel PC, Hinds RM, Lazaro LE, et al. The effect of antegrade femoral nailing on femoral head perfusion: a comparison of piriformis fossa and trochanteric entry points[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2015, 135(4):473-480.
- [20] Kim JW, Oh JK, Byun YS, et al. Incidence of avascular necrosis of the femoral head after intramedullary nailing of femoral shaft fractures: a multicenter retrospective analysis of 542 cases[J]. Medicine, 2016, 95(5):4.
- [21] Mileski RA, Garvin KL, Huurman W. Avascular necrosis of the femoral head after closed intramedullary shortening in an adolescent[J]. J Pediatr Orthop, 1995, 15:24-26.
- [22] Gordon JE, Khanna N, Luhmann SJ, et al. Intramedullary nailing of femoral fractures in children through the lateral aspect of the greater trochanter using a modified rigid humeral intramedullary nail: preliminary results of a new technique in 15 children[J]. J Orthop Trauma, 2004, 18(7):416-422.
- [23] MacNeil JA, Francis A, El-Hawary R. A systematic review of rigid, locked, intramedullary nail insertion sites and avascular necrosis of the femoral head in the skeletally immature[J]. J Pediatr Orthop, 2011, 31(4):377-380.

(收稿日期: 2018-08-01; 修回日期: 2018-12-15)

(上接第 168 页)

- [13] 李建国, 谢兴文, 李鼎鹏, 等. 中药淫羊藿治疗骨质疏松症的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(3):389-393.
- [14] 卢建华, 卢焱超, 金红婷, 等. 红曲对去卵巢大鼠骨质疏松模型血清 ALP, TRAP 及骨组织 TNF- α , RANK 表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2017, 25(9):5-8.
- [15] 章明放, 黄凤歧, 谭郁彬, 等. 去势大鼠血清钙素水平及意义[J]. 中国骨质疏松杂志, 1999, 5(3):25-27.
- [16] Yuan H, Xiao L, Min W, et al. Bu-Shen-Tong-Luo decoction prevents bone loss via inhibition of bone resorption and

enhancement of angiogenesis in ovariectomy-induced osteoporosis of rats[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 220:228-238.

- [17] Sun P, Liu Y, Deng X, et al. An inhibitor of cathepsin K, icariin suppresses cartilage and bone degradation in mice of collagen-induced arthritis[J]. Phytomedicine, 2013, 20(11):975-979.
- [18] Panwar P, Law S, Jamroz A, et al. Tanshinones: A novel class of ectosteric anti-resorptives[J]. Br J Pharmacol, 2018, 175(6):902-923.

(收稿日期: 2018-10-30; 修回日期: 2018-11-12)