

仙珍骨宝对骨质疏松模型大鼠的保护作用研究[△]

邹丽宜^{1*}, 许碧莲^{1,2#}, 陈文双², 张新乐¹, 吴铁¹, 崔燎^{1,2} (1. 广东医学院药理教研室, 广东 湛江 524023; 2. 广东医学院广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023)

中图分类号 R285; R682 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)23-2130-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.23.07

摘要 目的: 研究仙珍骨宝对骨质疏松模型大鼠的保护作用。方法: 通过灌胃醋酸泼尼松(3.5 mg/kg)每天1次、连续12周以复制大鼠腰椎骨质疏松模型。实验分为正常对照(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)与仙珍骨宝高、低剂量(0.95、0.475 g/kg)组。灌胃给药, 每天1次, 连续12周。末次给药后取大鼠腰椎骨分别测定骨密度、骨生物力学参数和骨形态计量学参数。结果: 与正常对照组比较, 模型组大鼠腰椎骨密度和断裂载荷显著下降, 骨组织总面积、骨小梁面积、骨小梁周长、骨矿化率和生长板荧光标记间距显著减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与模型组比较, 仙珍骨宝高剂量组大鼠腰椎骨密度、生物力学参数、骨组织总面积、骨小梁面积、骨小梁周长、骨矿化率和生长板荧光标记间距均显著增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论: 仙珍骨宝对6月龄SD大鼠灌胃醋酸泼尼松所致的骨质疏松有较好的预防作用。

关键词 骨质疏松; 泼尼松; 仙珍骨宝; 骨密度; 骨生物力学; 骨形态计量学

Preventive Effect of Xianzhen Gubao on Osteoporosis Model Rats

ZOU Li-yi¹, XU Bi-lian^{1,2}, CHEN Wen-shuang², ZHANG Xin-le¹, WU Tie¹, CUI Liao^{1,2} (1. Dept. of Pharmacology, Guangdong Medical College, Guangdong Zhanjiang 524023, China; 2. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical College, Guangdong Zhanjiang 524023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study preventive effect of Xianzhen gubao on postmenopausal osteoporosis model rats. METHODS: Bone loss model of lumbar vertebrae was induced by intragastric administration of prednisone (3.5 mg/kg). All of them were treated intragastrically once a day for 12 weeks. Model rats were divided into 4 groups, i.e. normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline) and Xianzhen gubao high-dose and low-dose groups (0.95 g/kg, 0.475 g/kg). All of them were treated intragastrically once a day for 12 weeks. After last medication, BMD, biomechanical properties and bone histomorphometric parameters of lumbar vertebrae were determined. RESULTS: Compared with normal control group, BMD, biomechanical properties and histomorphometric parameters (TAr, TbAr, TbPm, MAR) and the interlabeled width of growth plate of lumbar vertebrae were significantly decreased in model group ($P < 0.05$). Compared with model group, BMD, biomechanical properties, bone histomorphometric parameters and the interlabeled width of growth plate of lumbar vertebrae were increased significantly in Xianzhen gubao high-dose group ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Xianzhen gubao has good preventive effect on prednisone-induced osteoporosis in 6 month old SD rats.

KEY WORDS Osteoporosis; Prednisone; Xianzhen gubao; BMD; Biomechanical properties; Bone histomorphometry

肾上腺糖皮质激素具有抗炎、免疫抑制与抗过敏、抗休克等作用, 临床上用于严重急性感染、自身免疫性疾病、过敏性疾病、呼吸系统疾病等。尽管糖皮质激素由于其疗效显著而成为现代医学治疗许多难治性、危重性疾病不可缺少的重要药物, 但由于其严重的不良反应而使其应用受到了影响。骨质疏松是长期应用糖皮质激素较为严重的不良反应之一, 至今仍未找到较为理想的预防药物。本课题组前期研究发现, 淫羊藿或蛇床子均可以预防泼尼松诱发的骨质疏松, 但效果不十分理想^[1-2]。淫羊藿促进骨形成的作用明显, 而蛇床子抑

制多核破骨细胞形成与分化作用明显, 仙珍骨宝以淫羊藿、蛇床子为主要成分, 有研究表明其可预防糖皮质激素诱发大鼠胫骨上段松质骨的丢失^[3-4], 但对腰椎骨的影响研究较少。为了完善新药报批所需的药学资料, 笔者通过测定骨形态计量学、骨生物力学、骨密度等方法观察仙珍骨宝对大鼠腰椎骨的影响, 为把仙珍骨宝开发成抗骨质疏松新药提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

低速锯(美国标乐有限公司); 2155型硬组织切片机、碳化钨钢刀(德国Leica公司); 自动化图像数字分析仪、90型光学显微镜、TE2000型荧光显微镜(日本Nikon公司); 骨组织形态计量学测量软件(美国KSS Scientific Consultants公司)。

1.2 药品与试剂

仙珍骨宝(广东医学医药科技开发中心, 批号: 20110608); 醋酸泼尼松(广东华南药业有限公司, 批号:

[△] 基金项目: 东莞市高等院校科研机构科技计划资助项目 (No.2008108101047)

* 副教授, 硕士研究生导师, 硕士。研究方向: 骨质疏松的药物防治。E-mail: zouliyi123@126.com

通信作者: 副教授, 硕士研究生导师, 硕士。研究方向: 骨质疏松的药物防治。E-mail: gdmcxu@126.com

100801);钙黄绿素、甲苯胺蓝染料均购自美国Sigma 公司。

1.3 动物

6月龄SPF级SD大鼠32只,♂,体质量(390±20)g,由广东医学院实验动物中心提供[动物使用合格证号:SCXK(粤)2008-0008]。

2 方法

2.1 复制模型与分组、给药

实验分为4组,即正常对照(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)与仙珍骨宝高、低剂量(0.95、0.475 g/kg)组。ig醋酸泼尼松(3.5 mg/kg)每天1次、连续12周以复制骨质疏松模型大鼠。复制模型成功1 h后ig给药,每天1次,连续12周。

2.2 骨密度(BMD)及生物力学参数的测定^[6]

所有大鼠在处死前第3、4天和第13、14天分别sc钙黄绿素(7.5 mg/kg)进行体内荧光标记。末次给药后大鼠ip戊巴比妥钠麻醉,心脏抽血,处死,迅速取出第4~6腰椎,剔除腰椎上面残存的肌肉,取第4腰椎进行BMD的测定;取第6腰椎进行椎体压缩试验,然后计算出生物力学参数断裂载荷。

2.3 骨组织形态计量学的测定

同“2.2”项下方法取第5腰椎,用低速锯暴露骨髓腔,进行固定、脱水、包埋,按文献^[6]制成5、8 μm切片,5 μm骨薄片采用甲苯胺蓝染色,染色后测定静态参数;8 μm骨厚片直接封片测量有关动态参数,然后按公式^[7]计算出相应的参数。

2.4 统计学方法

SPSS11.5软件进行数据统计,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间及组内差异采用成组资料 t 检验;计数资料均采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 仙珍骨宝对模型大鼠腰椎BMD和断裂载荷的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠BMD和断裂载荷均显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,仙珍骨宝高剂量组大鼠BMD、断裂载荷均显著增加($P < 0.05$)。珍骨宝对模型大鼠BMD和断裂载荷的影响见表1。

表1 仙珍骨宝对模型大鼠腰椎BMD和断裂载荷的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 1 Effects of Xianzhen gubao on BMD and crippling-load in model rats($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	BMD, g/cm ²	断裂载荷, N
正常对照组	0.064±0.006	207.7±27.9
模型组	0.056±0.006*	174.9±27.0*
仙珍骨宝高剂量组	0.061±0.003*	201.3±18.3*
仙珍骨宝低剂量组	0.057±0.005	189.6±28.0

与正常对照组比较: * $P < 0.01$;与模型组比较: # $P < 0.05$
vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: # $P < 0.05$

3.2 仙珍骨宝对模型大鼠腰椎骨形态计量学的影响

3.2.1 仙珍骨宝对模型大鼠腰椎静态参数[骨组织总面积(TAr)、骨小梁面积(TbAr)、骨小梁周长(TbPm)、骨小梁面积百分数(% TbAr)、骨小梁数量(TbN)、平均骨小梁厚度(TbTh)、平均骨小梁间隔(TbSp)]的影响 与正常对照组比较,模型组大鼠腰椎TAr、TbAr、TbPm均显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与模型组比较,仙珍骨宝高剂量组大鼠腰椎TAr、TbAr和TbPm均显著增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。仙珍骨宝对模型大鼠腰椎静态参数的影响见表2;大鼠第5腰椎矢状面形态显微照片见图1。

表2 仙珍骨宝对模型大鼠腰椎静态参数的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)
Tab 2 Effects of Xianzhen gubao on static parameters of LV5 in model rats($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	TAr, mm ²	TbAr, mm ²	TbPm, mm	% TbAr, %	TbN, mm	TbTh, μm	TbSp, μm
正常对照组	16.2±1.8	4.4±1.0	105.8±14.4	26.8±3.6	3.9±0.4	69.2±11.2	189.0±20.3
模型组	13.5±1.2**	3.6±0.3*	88.6±5.3**	26.6±1.5	4.0±0.3	67.2±3.4	186.4±15.6
仙珍骨宝高剂量组	15.4±1.1**	4.0±0.4**	99.6±11.7*	25.9±2.3	3.9±0.5	66.8±3.7	193.5±32.1
仙珍骨宝低剂量组	14.6±1.5	3.9±0.7	93.4±10.0	26.7±3.1	3.8±0.3	69.7±8.1	191.8±18.6

与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$
vs. normal control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

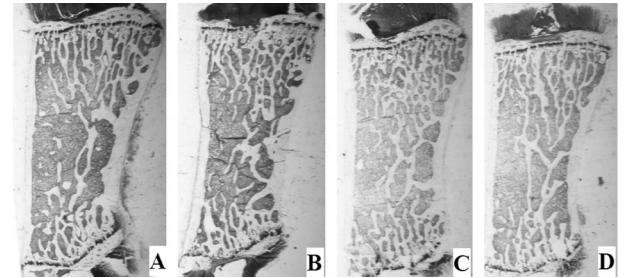


图1 大鼠第5腰椎矢状面形态显微照片
(甲苯胺蓝染色, 10×)

A.正常对照组;B.模型组;C.仙珍骨宝高剂量组;D.仙珍骨宝低剂量组
Fig 1 Micrographs of the sagittal section of fifth lumbar vertebrae (LV5) in rats (toluidine blue staining, 10×)

A. normal control group; B. model group; C. Xianzhen gubao high-dose group; D. Xianzhen gubao low-dose group

3.2.2 仙珍骨宝对模型大鼠腰椎动态参数[荧光标记百分率(LPm)、矿化率(MAR)、骨形成率(BFR/TV)、骨体积骨形成率(BFR/BV)、骨表面积骨形成率(BFR/BS)]的影响 与正常对照组比较,模型组大鼠腰椎骨MAR显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,仙珍骨宝高剂量组大鼠腰椎MAR显著增加($P < 0.05$)。仙珍骨宝对模型大鼠腰椎动态参数的影响见表3。

表3 仙珍骨宝对模型大鼠腰椎动态参数的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 3 Effects of Xianzhen gubao on dynamic parameters of LV5 in rats($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	LPm, %	MAR, μm/d	BFR/TV, %/year	BFR/BV, %/year	BFR/BS, %/year
正常对照组	23.4±4.7	1.1±0.1	58.1±9.8	219.8±43.1	9.0±2.0
模型组	25.0±3.7	0.9±0.1*	56.0±9.9	209.5±37.0	8.5±1.5
仙珍骨宝高剂量组	22.5±10.2	1.1±0.2*	60.7±28.7	214.9±145.8	9.8±5.8
仙珍骨宝低剂量组	22.9±5.7	1.0±0.1	56.3±17.2	216.6±79.5	8.7±2.5

与正常对照组比较: * $P < 0.01$;与模型组比较: # $P < 0.05$
vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: # $P < 0.05$

3.2.3 仙珍骨宝对模型大鼠腰椎生长板纵向生长荧光标记的影响 与正常对照组比较,模型组大鼠腰椎生长板荧光标记间距缩小;与模型组比较,仙珍骨宝高剂量组荧光标记间距增加。大鼠腰椎生长板荧光标记显微照片见图2。

4 讨论

骨质疏松症是以骨量减少、骨的微观结构退化为特征,致使骨的脆性增加以及易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病。骨质疏松症分为原发性、继发性和特发性三种。继发性骨质

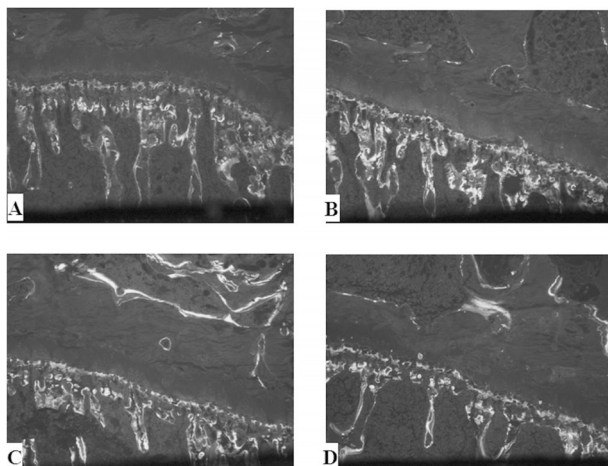


图2 大鼠腰椎生长板荧光标记显微照片(100×)

A.正常对照组;B.模型组;C.仙珍骨宝高剂量组;D.仙珍骨宝低剂量组

Fig 2 Micrographs of interlabeled width of growth plate of tibia in rats(100×)

A. normal control group; B. model group; C. Xianzhen gubao high-dose group; D. Xianzhen gubao low-dose group

疏松是由其他疾病或药物等因素诱发的骨质疏松,糖皮质激素诱发骨质疏松是最常见的继发性骨质疏松。据统计^[8],接受醋酸泼尼松 10 mg/d 治疗 2 月后即出现负钙平衡,而醋酸泼尼松累积剂量及日平均剂量则是导致骨质疏松、椎骨压迫性骨折及骨缺血性坏死的主要危险因素。

本研究表明,6 月龄 SD 大鼠 ig 醋酸泼尼松 3.5 mg/kg 12 周后腰椎 BMD 和断裂载荷均降低,静态参数和动态参数也均降低,生长板荧光标记间距缩小,提示醋酸泼尼松抑制大鼠的骨形成,导致 BMD、骨质量下降和骨量减少,其机制与抑制性激素、抑制肠内钙吸收、增加钙磷排泄及抑制成骨细胞活性致骨形成受阻有关^[8-9]。

本研究表明,与模型组比较,仙珍骨宝高剂量组大鼠腰椎 BMD、断裂载荷和动、静态参数及生长板荧光标记间距均增加,提示仙珍骨宝促进骨形成,可以对抗醋酸泼尼松所致的大鼠腰椎骨丢失。淫羊藿和蛇床子均具有“补肾壮阳、强筋骨”等功效,仙珍骨宝是由淫羊藿、蛇床子等组成的中药复方制剂,通过多方面对抗泼尼松诱发的骨质丢失:(1)淫羊藿和蛇床子均有类似性激素样的作用,提高性激素含量,对抗泼尼松引起的性激素分泌减少^[4],而性激素是骨的强大调节剂,促进骨的生长代谢;(2)蛇床子和淫羊藿均能促进蛋白质合成,蛇床子增加前列腺素的合成,对抗泼尼松所致的前列腺素 E 和环磷酸腺苷合成减少^[4],而前列腺素 E 能明显地促进骨形成,抑制骨吸收;(3)淫羊藿和蛇床子均能促进成骨细胞增殖、分化、矿化,促进骨形成^[10-14],对抗泼尼松引起的骨形成受阻;(4)淫羊藿和蛇床子均能减少破骨细胞数目,抑制骨吸收^[15-16]。

参考文献

- [1] 李青南,廖进民,吴铁,等.淫羊藿提取液防治激素所致大鼠骨质疏松的实验研究[J].中国药理学杂志,1996,31(8):467.
- [2] 谢华,李青南,黄连芳,等.蛇床子总香豆素对类固醇性骨质疏松的作用[J].中国药理学通报,1994,15(4):371.
- [3] 吴铁,张志平,李青南,等.仙珍骨宝抗骨质疏松药效学研究[J].中药新药与临床药理,1996,7(4):17.
- [4] 张志平,谢华,吴铁,等.仙珍骨宝抗泼尼松致大鼠松质骨结构破坏的作用[J].解剖学研究,2007,29(4):53.
- [5] 许碧莲,崔燎,陈文双,等.丹参骨宝对维甲酸模型大鼠股骨生物力学及骨密度的影响[J].生物医学工程学杂志,2010,27(2):307.
- [6] 许碧莲,徐道华,陈文双,等.小檗碱对糖皮质激素性骨质疏松大鼠松质骨和皮质骨的影响[J].中国药理学通报,2011,27(7):965.
- [7] Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee[J]. J Bone Miner Res, 1987, 2(6): 595.
- [8] Pereira RM, Carvalho JF, Canalis E. Glucocorticoid-induced osteoporosis in rheumatic diseases[J]. Clinics, 2010, 65(11): 1197.
- [9] 吴铁,冯冰虹.药理学[M].1版.北京:北京科学技术出版社,2010:405
- [10] 刘亦恒,张海英,臧洪敏,等.淫羊藿总黄酮对大鼠成骨细胞代谢调控的机制研究[J].中国中药杂志,2006,31(6):487.
- [11] 殷晓雪,陈仲强,党耕町,等.淫羊藿苷对人成骨细胞增殖与分化的影响[J].中国中药杂志,2005,30(4):289.
- [12] 明磊国,王鸣刚,陈克明,等.蛇床子素对体外培养成骨细胞成骨相关因子表达的影响[J].中药药理与临床,2011,27(2):53.
- [14] 王艳,潘永梅.蛇床子素对新生大鼠颅骨成骨细胞中 OPG、RANKL mRNA 表达的影响[J].山西中医学院学报,2008,9(3):12.
- [15] 张大威,程岩,张金超,等.淫羊藿苷对破骨细胞的分化及骨吸收功能的影响[J].中国药理学通报,2007,23(4):463.
- [16] Qin LP, Zhang QY, Tian YP, et al. Total coumarins from fruits of *Cnidium Monnieri* inhibit formation and differentiation of multinucleated osteoclasts of rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(2): 181.

(收稿日期:2012-07-18 修回日期:2012-11-29)

《中国药房》杂志——《中国科学引文数据库》(CSCD)来源期刊,欢迎投稿、订阅