

固本增骨方对卵巢切除模型大鼠骨代谢和骨微结构的影响*

董万涛¹, 巩彦龙², 宋敏^{2△}, 黄凯², 董平^{2,3}, 宋志靖², 王凯², 海云翔²

1. 甘肃中医药大学附属医院 关节外科(兰州 730020); 2. 甘肃中医药大学 中医临床学院(兰州 730000);
3. 内蒙古医科大学 中医学院(呼和浩特 010010)

【摘要】 目的 观察固本增骨方对卵巢切除大鼠骨代谢和骨微结构的影响,探讨固本增骨方防治绝经后骨质疏松症的作用机制。方法 采用卵巢切除法建立大鼠骨质疏松模型,随机分为模型对照组,戊酸雌二醇组,固本增骨方高、中、低剂量组,选取同龄大鼠作为空白对照组。用药干预12周后,腹腔麻醉,心脏采血,应用酶联免疫吸附法检测大鼠血清雌二醇(E2)、骨钙素(BGP)、I型前胶原羧基末端交联肽(PICP)、I型胶原吡啶交联终肽(ICTP)、抗酒石酸酸性磷酸酶-5b(TRAP-5b)水平;采用微型CT影像系统,对各组大鼠右侧股骨标本进行骨组织计量学分析。结果 与空白对照组比较,模型对照组大鼠E2、骨特异性碱性磷酸酶(BALP)含量及相对骨体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁数量(Tb. N)、连接密度(Conn. D)均降低($P<0.05$),BGP、ICTP、PICP、TRAP-5b及骨小梁分离度(Tb. Sp)、结构模型指数(SMI)明显升高($P<0.05$);给予药物干预后,与模型对照组相比,戊酸雌二醇组和固本增骨方各组E2、BALP及BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Conn. D均增高($P<0.05$),BGP、ICTP、PICP、TRAP-5b水平及Tb. Sp、SMI均下降($P<0.05$);且固本增骨方高剂量组优于固本增骨方低剂量组($P<0.05$),呈量效依赖关系。结论 固本增骨方可改善卵巢切除大鼠模型骨代谢及骨微结构,从而发挥绝经后骨质疏松症的防治作用。

【关键词】 绝经后骨质疏松症 固本增骨方 骨代谢指标 骨微结构

Effects of Guben Zenggu Decoction on Bone Metabolism and Bone Microstructure in Ovariectomized Rats DONG Wan-tao¹, GONG Yan-long², SONG Min^{2△}, HUANG Kai², DONG Ping^{2,3}, SONG ZHI-jing², WANG Kai², HAI YUN-xiang². 1. Department of Joint Surgery, the Second Affiliated Hospital of Gansu University of TCM, Lanzhou 730020, China; 2. Clinical College of TCM, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 3. College of TCM Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010010, China

△ Corresponding author, E-mail: sm@gszy.edu.cn

【Abstract】 Objective To test the effects of Guben Zenggu Decoction on bone metabolism and bone microstructure in ovariectomized rats for the purpose of preventing and treating postmenopausal osteoporosis. **Methods** Osteoporosis rat models were established by ovariectomy. The model rats were randomly divided into control, estradiol valerate treatment, and Guben Zenggu Decoction treatment groups with high, medium and low dosages. After 12 weeks of treatments, 10 rats from each group were randomly selected for cardiac blood sampling after abdominal anesthesia. The serum levels of estradiol (E2), osteocalcin (BGP), carboxyterminal of type I procollagen (PICP), collagen type I pyridine crosslinking peptide (ICTP) and acid tartaric acid phosphatase-5b (TRAP-5b) were determined by ELISA. Bone histomorphometric analysis was performed on the right femoral specimen of rats using micro-CT imaging. **Results** The models rats had lower levels of E2, bone alkaline phosphatase (BALP) and relative bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb. Th), number of trabeculae (Tb. N) and connectivity density (Conn. D), and higher levels of BGP, ICTP, PICP, TRAP-5b and degree of trabecular separation (Tb. Sp), structural model index (SMI) than their normal counterparts ($P<0.05$). Estradiol valerate and Guben Zenggu Decoction treatments increased the levels of E2, BALP, BV/TV, Tb. Th, Tb. N, and Conn. D significantly ($P<0.05$). Higher doses of Guben Zenggu Decoction resulted in higher changes ($P<0.05$). **Conclusion** Guben Zenggu Decoction can improve bone metabolism and bone micro-structure in ovariectomized rats, thus playing a preventive and therapeutic role in postmenopausal osteoporosis.

【Key words】 Postmenopausal osteoporosis Guben Zenggu Decoction Bone metabolic markers Bone microstructures

* 甘肃省自然科学基金(No. 17JR5RA056, No. 1506RJZA048)、甘肃省中医药防治慢性疾病重点实验室开放基金项目(No. GSMBKY2015-07)、甘肃省中医药管理局科研课题(No. GZK-2016-17)和甘肃省中药现代制药工程研究院项目(No. YWW-2015049)资助

△ 通信作者, E-mail: sm@gszy.edu.cn

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是以骨量减少、微结构破坏和骨组织退化为特征的代谢性骨病变,可影响骨的质量和强度、增加骨折风险,导致慢性疼痛、影响肌肉和骨骼系统功能^[1],降低患者生活质量。OP的发生发展是内分泌系统、免疫系统、神经系统等多组织多器官功能的紊乱,OP与NEI网络密切相关并可从脾肾进行论治^[2]。骨代谢指标能早期敏感反映患者骨形成与骨吸收情况,可早期评判骨代谢情况^[3]。固本增骨方为临床经验方,我们的前期实验研究^[4]证实,该方能调节去卵巢大鼠下丘脑、垂体、脾脏、股骨和肾上腺组织游离 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化水平,而促进成骨细胞的骨形成过程。本研究拟采用切除雌性大鼠双侧卵巢的方法建立骨质疏松动物模型,给予固本增骨方进行干预,旨在观察去势大鼠骨代谢和骨微结构的改善情况。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级SD大鼠60只,雌性,(180±20)g,甘肃中医药大学动物实验中心提供;动物合格证号:合格证号SCXK(甘)2011-0001;实验设施合格证号:SYXK(甘)2015-0005;本实验遵守国家健康与医学研究委员会(NHNRC)动物道德准则,并经甘肃中医药大学动物实验伦理委员会批准。

1.2 药物

固本增骨方(Guben Zenggu Decoction, GBZG):炙黄芪40g,白芍党参12g,岷当归12g,炙淫羊藿15g,烫狗脊12g,盐补骨脂12g,购于甘肃中医药大学附属医院中药房。取固本增骨方药材加8倍量的水,提取3次,每次1h,浓缩至1:1,减压干燥,恒重,粉碎。制得浓缩药粉。固本增骨方浓缩药粉1g=3.33g原生药。戊酸雌二醇片(补佳乐,拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号:208A);水合氯醛250g/瓶(上海展云化工有限公司,生产批号:20151023);注射用青霉素钠160U/支(华北制药股份有限公司,生产批号:201248)。

1.3 试剂及仪器

大鼠雌激素(E2)、骨特异性碱性磷酸酶(BALP)、骨钙素(BGP)、I型前胶原羧基端前肽(PICP)、I型胶原羧基端交联端肽(ICTP)、抗酒石酸酸性磷酸酶-5b(TRAP-5b)试剂盒,均购自上海蓝基(BlueGene)生物科技有限公司,批号20161101。连续波长酶标仪(美国Bio-Rad公司,型号: Benchmark Plus),实验动物微型CT影像系统

(西门子 Inveon, 德国)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物造模及分组 60只大鼠适应性喂养10d后,随机分为空白对照组(不做任何处理),模型对照组,戊酸雌二醇组,固本增骨方高、中、低剂量组,每组10只。除空白对照组外,其余大鼠均采用去卵巢法复制骨质疏松模型:10%水合氯醛溶液腹腔注射麻醉,成功后将大鼠俯卧位固定于手术台,术区剪毛、碘伏消毒皮肤,经背部正中切口入路切除双侧卵巢后,充分止血后逐层缝合切口,乙醇消毒,术后3d连续臀肌注射青霉素预防感染。

1.4.2 干预方法 术后3月,各组确定骨质疏松动物模型成功^[4]后分组进行灌胃给药治疗。固本增骨方低、中、高剂量组按人、鼠体型系数折算为成人等效剂量(生药含量分别为2.3g/kg、4.6g/kg、9.2g/kg,并以每千克体质量10mL蒸馏水稀释,制成混悬液于相应组灌胃),空白对照组和模型对照组以等剂量生理盐水灌胃,戊酸雌二醇组按人鼠等效剂量给予戊酸雌二醇,每日90μg/kg,每日1次,持续灌胃12周。

1.4.3 大鼠血清骨代谢指标检测 所有动物用药干预12周后,禁食水12h,腹腔麻醉后心脏取血2mL,严格按照试剂盒说明书运用酶联免疫吸附法检测大鼠血清E2、BGP、BALP、ICTP、PICP、TRAP-5b质量浓度。

1.4.4 Micro-CT测量 解剖分离右侧股骨标本,剔除标本周围肌肉、韧带等软组织,进行Micro-CT扫描和三维重建。将处理好的大鼠右侧股骨标本放入Micro-CT仪(QuantumGX perkinelmer),对股骨远端干骺端进行射线扫描。实验参数为:电压90kV;电流88μA;扫描时间14min。分辨率:26μm。扫描完成后,选取股骨远端干骺端至松质骨的近侧顶端为体积感兴趣区域(volume of interest, VOI),涵盖股骨远端的松质骨,进行三维重组,提取图像信息。扫描数据采用ABA软件(advanced bone analysis)进行骨组织计量学分析,获得松质骨微结构参数。主要参数包括:相对骨体积分数(bone volume/total volume, BV/TV),以%表示;骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th),以μm表示;骨小梁数量(trabecular number, Tb. N),以1/mm表示;骨小梁分离度(trabecular separation, Tb. Sp),以mm表示;结构模型指数(structure model index, SMI),测算骨骼表面的曲率,以描述板状骨小梁和杆状骨小梁的程度;连接密度(connection density,

Conn. D)。使用 Micview 软件进行三维重建, 获得可视化效果的三维立体图像。所有显微 Micro-CT 扫描、VOI 选取及软件分析等操作, 由同一位操作者完成, 操作者对实验内容单盲。

1.5 统计学方法

计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间数据分别采用独立样本 *t* 检验和单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清骨代谢指标比较

见表 1。与空白对照组比较, 模型对照组大鼠 E2、BALP 含量降低 ($P < 0.05$), BGP、ICTP、PICP、TRAP-5b 含量升高 ($P < 0.05$); 给予药物干预后, 与模型对照组相比, 戊酸雌二醇组和固本增骨方各组 E2、BALP 均增高 ($P < 0.05$), BGP、ICTP、

表 1 各组大鼠全身骨代谢指标比较
Table 1 Bone metabolism indices in rats

Group	n	E2/ (ng/mL)	BALP/ (ng/mL)	BGP/ (ng/mL)	ICTP/ (ng/mL)	PICP/ (ng/mL)	TRAP-5b/ (ng/mL)
Control	10	50.88±3.56	22.02±2.93	20.90±1.49	40.33±3.80	20.91±1.84	16.99±2.14
Model control	10	21.08±2.99*	17.87±2.64*	42.60±2.65*	87.07±2.44*	44.65±1.21*	41.99±2.96*
Estradiol valerate	10	52.13±3.13▲	22.11±2.84▲	19.12±2.13▲	39.78±2.00▲	21.87±2.03▲	18.08±1.79▲
GBZG low dose	10	40.53±3.25▲	24.59±2.59▲	29.93±2.26▲	53.07±2.36▲	28.90±1.94▲	27.01±1.85▲
GBZG medium dose	10	45.68±3.02▲	25.62±2.86▲	25.34±2.32▲	48.56±2.34▲	24.38±1.87▲	21.63±1.75▲
GBZG high dose	10	47.36±3.41▲△	29.81±2.52▲△	23.42±2.51▲△	42.13±2.04▲△	22.93±1.95▲△	19.13±1.58▲△

* $P < 0.05$, vs. control group; ▲ $P < 0.05$, vs. model control group; △ $P < 0.05$, vs. GBZG low dose group

PICP、TRAP-5b 含量均下降 ($P < 0.05$); 且高剂量组优于低剂量组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 大鼠股骨远端松质骨 Micro-CT 定量参数变化

见表 2。与空白对照组比较, 大鼠造模后 BV/TV、Tb. Th、Tb. N 及 Conn. D 均下降 ($P < 0.05$); 而 Tb. Sp 和 SMI 则升高 ($P < 0.05$)。药物干预后, 与模型对照组相比, 戊酸雌二醇组和固本增骨方各

组相对 BV/TV、Tb. Th、Tb. N 及 Conn. D 升高 ($P < 0.05$); 而 Tb. Sp、SMI 则降低 ($P < 0.05$); 且固本增骨方高剂量组与低剂量组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

6 组大鼠的右股骨远端骨组织三维图像重建见图 1, 三维重建图显示: 模型对照组大鼠骨小梁数量稀少、骨小梁间隙增大、骨小梁分离明显、可见大片

表 2 不同组别大鼠股骨远端 Micro-CT 定量参数比较 (n=10)

Table 2 Micro-CT quantitative parameters of distal femur in rats (n=10)

Group	(BV/TV)/ %	Tb. Th/ μm	Tb. N/ cm ⁻¹	Tb. Sp/ cm ⁻¹	SMI	Conn. D/ cm ⁻³
Control	0.39±0.06	54.30±9.36	6.32±0.88	0.35±0.02	0.66±0.04	107.29±8.22
Model control	0.14±0.02*	31.28±8.27*	3.29±0.46*	0.67±0.08*	1.37±0.12*	49.98±5.77*
Estradiol valerate	0.37±0.05▲	52.12±9.05▲	5.57±0.75▲	0.36±0.03▲	0.50±0.06▲	85.23±6.85▲
GBZG low dose	0.28±0.04▲	44.09±7.10▲	4.93±0.64▲	0.44±0.03▲	0.86±0.07▲	90.40±6.02▲
GBZG medium dose	0.34±0.05▲	48.53±8.14▲	5.52±0.65▲	0.39±0.02▲	0.56±0.05▲	91.31±6.97▲
GBZG high dose	0.37±0.04▲△	52.96±8.98▲△	5.68±0.67▲△	0.37±0.02▲△	0.56±0.04▲△	105.01±7.54▲△

* $P < 0.05$, vs. control group; ▲ $P < 0.05$, vs. model control group; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$, vs. GBZG low dose group

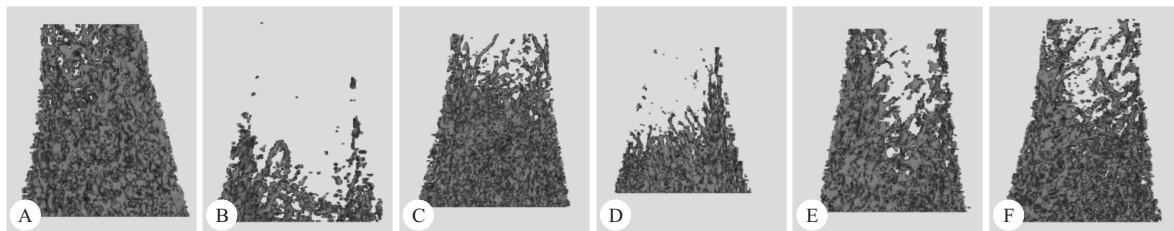


图 1 股骨远端三维重建图

Fig 1 Three-dimensional reconstruction of distal femur

A: Control group; B: Model control group; C: Estradiol valerate group; D: GBZG low dose group; E: GBZG medium dose group; F: GBZG high dose group

无骨连接的空洞,而戊酸雌二醇和固本增骨方不同剂量组骨小梁数量较模型对照组增多、骨小梁间隙变小、骨小梁分离不明显,其中以固本增骨方高剂量组较佳。

3 讨论

随着全球人口的老齡化,OP 在全球的发病率逐年增高,在我国 OP 发病率呈快速增长态势。绝经后骨质疏松症尤其令人关注,因它导致骨折的风险增加,对老年妇女的健康产生负面影响^[5]。随着女性绝经或人体衰老的进程,机体脾肾渐衰,从而出现“肾虚”、“脾肾亏虚”的各种表现,针对此种情况可用补益脾肾中药以益气健脾、补肾壮骨。

绝经后 OP 的发生主要由于绝经后机体雌激素水平低下,破骨细胞(osteoclast, OC)增殖、骨吸收增加导致的高转换型骨质疏松,其中 E2 是作用最强、最为主要的一种雌激素。血清 E2 浓度反映了机体雌激素水平。骨代谢标志物则体现了骨形成与骨吸收之间骨代谢的特点与水平,是评估骨质量的关键指标。研究认为^[6]:BGP 和 BALP 均由成骨细胞(osteoblast, OB)分泌产生,均可反映 OB 的活性,可作为骨形成的特异性指标。PICP 和 ICTP 是反映胶原代谢的标志物,血清 PICP 和 ICTP 水平直接反映了 I 型胶原的合成速度及骨转换的情况, PICP 和 ICTP 升高说明 I 型胶原合成加速,骨转换速率加快。PICP 反映了骨形成的情况, ICTP 则反映了骨吸收的情况^[7]。TRAP-5b 是骨吸收过程中 OC 释放的基质降解酶,是 OC 数量及功能活性的有效标志物^[8]。本研究结果显示,模型对照组大鼠血清 E2、BALP 明显降低、而 BGP、PICP、ICTP 和 TRACP-5b 含量均明显增高,说明大鼠卵巢切除后,雌激素水平下降, OC 和 OB 活性均增强,骨转换速率加快,骨量流失,表现为“高转换型”。而经过用药干预后,与模型对照组相比,戊酸雌二醇组(戊酸雌二醇为天然雌二醇的戊酸盐,具有雌二醇的药理作用,在老年女性骨质疏松患者几乎都伴有雌激素减少,而戊酸雌二醇对骨丢失有预防作用,所以本研究选择戊酸雌二醇为阳性对照组^[9-10])和固本增骨方各组血清 E2、BALP 明显升高、而 BGP、PICP、ICTP 和 TRACP-5b 含量均降低,且固本增骨方组呈量效依赖关系。

Micro-CT 是目前研究并分析骨微观结构的新兴技术,具有全面、直观、无破坏性等研究特征,是理想的研究骨微观结构形态学的工具^[11]。本研究结

果显示:与空白对照组比较,大鼠造模后 BV/TV、Tb. Th、Tb. N 及 Conn. D 均明显降低;而 Tb. Sp 和 SMI 则升高。提示卵巢切除大鼠骨质疏松;而经过固本增骨方治疗 12 周后,与模型对照组比较,戊酸雌二醇组和固本增骨方各组 BV/TV、Tb. Th、Tb. N 及 Conn. D 等参数明显上升, Tb. Sp 和 SMI 则明显降低,骨微观结构明显改善。提示戊酸雌二醇和固本增骨方均具有不同程度对抗卵巢切除大鼠骨质疏松引起的骨微结构改变的作用;三维重建图显示:模型对照组大鼠骨小梁数量稀少,骨小梁间隙增大,骨小梁厚度降低,骨小梁分离明显,可见大片无骨连接之空洞,骨质消溶严重,呈现出破坏的微观构筑。而戊酸雌二醇组和固本增骨方不同剂量组的骨微结构较好,骨小梁数量增多,骨小梁间隙变小,骨小梁厚度增加,骨小梁分离不明显,骨质消溶不明显,且固本增骨方高剂量组比固本增骨方低剂量组在骨微结构方面更佳。

固本增骨方是甘肃中医药大学宋敏教授经验方,由炙黄芪、白芍党参、岷当归、炙淫羊藿、烫狗脊、盐补骨脂组成,方中君药炙黄芪能补气升阳,生津养血,敛疮生肌;臣药党参可补中益气、生津和胃之功效,与黄芪配伍增强黄芪健脾补气之效;当归补血活血,与党参共为臣药,辅助黄芪,以增后天气血生化之源,脾肾互补。补骨脂温肾助阳,淫羊藿补肾壮阳、强筋健骨,烫狗脊补肝肾、强腰膝,三药合用,则可温肾助阳、益精填髓、强腰壮骨,共为佐药。诸药合用,共取益气健脾、补肾壮骨、活血通络之功效,标本兼顾,有效缓解脾肾两虚型骨质疏松症状。本研究结果显示:固本增骨方可改善卵巢切除大鼠雌激素低下状态,抑制骨代谢紊乱,使骨转换速率下降,从而调节骨代谢高转换状态,预防骨量丢失;还可改善卵巢切除大鼠骨微结构,对抗骨质疏松样微观改变的发生。

参 考 文 献

- [1] MOREIRA L D, OLIVEIRA M L, LIRANI-GALVÃO A P, *et al.* Physical exercise and osteoporosis: effects of different types of exercises on bone and physical function of postmenopausal women. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2014, 58(5):514-522.
- [2] 董万涛, 吕泽斌, 宋敏, 等. 从脾肾论治骨质疏松症的神经-内分泌-免疫网络平衡机制. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(11):1417-1418.
- [3] LAMBERT M N T, THYBO C B, LYKKEBOE S, *et al.* Combined bioavailable isoflavones and probiotics improve bone status and estrogen metabolism in postmenopausal

- osteopenic women; a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, 2017, 106(3): 909-920.
- [4] 董万涛, 周灵通, 宋敏, 等. 固本增骨方对去卵巢大鼠血清骨钙素和 NEI 网络组织中游离 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响. *中药药理与临床*, 2018, 34(1): 121-127.
- [5] BACCARO L F, CONDE D M, COSTA-PAIVA L, *et al.* The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis; a viewpoint from Brazil. *Clin Interv Aging*, 2015, 10(5): 583-591.
- [6] BARNUEVO M D, MARHUENDA J, ALDEGUER M, *et al.* *In vivo* randomized trial of three marketed milk preparations enriched with calcium and vitamins (D and K) on bone mass and bone turnover markers from biological fluids in premenopausal Caucasian women. *Nutr Hosp*, 2018, 35(5): 1174-1185.
- [7] CAVALIER E, BERGMANN P, BRUYÈRE O, *et al.* The role of biochemical of bone turnover markers in osteoporosis and metabolic bone disease: a consensus paper of the Belgian Bone Club. *Osteoporos Int*, 2016, 27(7): 2181-2195.
- [8] TAKIMOTO T, HATANAKA M, HOSHINO T, *et al.* Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 on bone mineral density in healthy postmenopausal Japanese women; a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Biosci Microbiota Food Health*, 2018, 37(8): 87-96.
- [9] RAN S Y, YU Q, CHEN Y, *et al.* Prevention of postmenopausal osteoporosis in Chinese women; a 5-year, double-blind, randomized, parallel placebo-controlled study. *Climacteric*, 2017, 20(4): 391-396.
- [10] COELINGH BENNINK H J T, VERHOEVEN C, ZIMMERMAN Y, *et al.* Pharmacodynamic effects of the fetal estrogen estetrol in postmenopausal women; results from a multiple-rising-dose study. *Menopause*, 2017, 24(6): 677-685.
- [11] KAMPSCHULTE M, LANGHEINIRCH A C, SENDER J, *et al.* Nano-computed tomography: technique and applications. *Rofo*, 2016, 188(2): 146-154.

(2019 - 03 - 11 收稿, 2019 - 06 - 23 修回)

编辑 汤 洁