

壮骨肾宝防治肾上腺皮质激素所致大鼠骨质疏松的实验研究*

吴 铁 廖进民 李青南 黄莲芳 张志平 崔 燎

内容提要 本研究采用 3 月龄 SD 雄性大鼠 24 只, 随机分为对照组(I 组)、激素组(II 组)和预防组(III 组)。II 组喂醋酸泼尼松 2 次/周; III 组除喂泼尼松外, 还同时喂壮骨肾宝。3 个月后对 3 组大鼠胫骨上段的骨片用图像分析仪进行测算和分析。激素组与对照组比较, 由于骨吸收大于骨形成, 出现骨小梁面积和数量减少, 骨小梁之间的空隙增加。出现明显的骨质疏松症状。用壮骨肾宝预防的激素组, 骨吸收率受到明显抑制, 新骨形成增加, 因而骨量明显增加。本研究提示壮骨肾宝能预防激素所致的骨质疏松。

关键词 醋酸泼尼松 骨质疏松 骨小梁 骨计量学 壮骨肾宝

Experimental Study on Zhuanggu Shengbao in Preventing Hormone-Induced Osteoporosis of Rats WU Tie, LIAO Jin-min, LI Qing-nan, et al *Guangdong Medical College, Zhangjiang (524023)*

Twenty four male Sprague-Dawley rats at 3 months of age were divided randomly into 3 groups. Prednisone acetate was given to the group B twice per weeks, Zhuanggu Shengbao(ZGSB) was added to the group C besides prednisone, the group A was control. The histomorphometric parameters of bone slides of proximal tibia were measured and calculated with image pattern analyser after 3 months of medication. Results showed that in comparing with group A, in group B the area and number of trabecula decreased, the intertrabecular space increased due to the bone resorption exceeded the bone formation, and the symptoms of osteoporosis revealed obviously. However, in group C, the bone resorption rate was markedly inhibited, and the formation of new bone accelerated so that the bone mass increased significantly. These results indicated the ZGSB could prevent the osteoporosis induced by prednisone acetate.

Key words prednisone acetate, osteoporosis, trabecula, Zhuanggu Shenbao, bone histomorphometry

糖皮质激素(GC)长期使用或间断用量过大, 都可引起骨质疏松。由于发病机理尚不清楚, 目前对该病的防治也无特效药, 国外主要用雌激素类、降钙素类、活性维生素 D₃类和异丙氧黄酮等预防, 其疗效都不令人满意。本研究采用激素致大鼠骨质疏松模型, 并用壮骨肾宝进行实验性预防, 以期为临床使用糖皮质激素时能提供增强疗效、降低毒副作用的新药。

材料与方 法

1 材料

1.1 药物 壮骨肾宝提取液: 由本院医药科技

开发中心从箭叶淫羊藿、黄芪和白术中提取(药材由湛江市药材公司提供), 制备成 1 ml 相当于 2.6 g 生药材(本复方已申请了国家专利)。醋酸泼尼松(批号 930907, 广东医学院附属医院生产)5 mg/片, 使用前用生理盐水配成 4.5 mg/ml 的混悬液。四环素(批号 89124-18, 上海新亚制药厂生产)0.25 g/支, 作为荧光标记物。

1.2 动物 3 月龄雄性 SD 大白鼠, 由广东省实验动物中心提供。

1.3 仪器 半自动图像数字化分析仪。由美国犹他大学放射骨生物研究室赠送。

2 方法

2.1 取上述 SD 大鼠 24 只, 随机分为对照组(I 组)、激素组(II 组)和防治组(III 组), 每组 8 只。

* 国家自然科学基金资助项目之一

广东医学院药理学教研室(广东湛江 524023)

I 组: 每天喂生理盐水 0.2 ml/100 g; II 组: 喂醋酸泼尼松 0.45 mg/100 g, 2 次/周(星期三、六); III 组: 除与 II 组同法喂泼尼松外, 每天还喂壮骨肾宝提取液 0.2 ml/100 g。所有动物在同等条件下饲养和给药共 90 天, 自由饮水和摄食。在处死大鼠前第 10 天和第 2 天分别皮下注射四环素(25 mg/kg)和 Calcitonin(5 mg/kg), 因其能螯合钙并主要沉积在新形成骨基质钙的起点, 这样在骨表面形成双层荧光, 表明了分两次注射标记物期间骨形成的情况。3 个月后, 用 2% 戊巴比妥钠(4~5 mg/100 g)麻醉并用注射器穿刺右心室抽血处死, 取胫骨用低速锯(Buehler LTD. USA)将其分为 3 段, 取上段在其骺间隆起前方行额状面锯开面将胫骨粗隆去掉, 以暴露骨髓腔利于渗透固定, 然后置 10% 磷酸缓冲液配制的福尔马林中固定 48 h。再经 70% 乙醇脱水后, 用特殊骨染料(Osteochrome Villaneuva Bone Stain, Polysciences, INC. USA)染色 5 天。以后从 50% 乙醇开始逐级脱水及丙酮脱脂。最后用甲基丙烯酸甲酯包埋不脱钙骨。包埋块干后用低速锯锯成 300 μ m 骨片, 经磨成 20 μ m 的薄片再次梯度脱水, 透明封片。

2.2 骨组织形态计量学检测用半自动图像数字化分析仪, 按文献^[1~3]方法对胫骨上段松质骨的骨组织作静态和动态测量及计算, 各参数值均进行组间 t 检验。

结 果

1 动物实验前后体重增长状况 见表 1。

应用 GC 后, 对大鼠体重及生长发育没有显著影响, 与对照组比较无差异, 而与壮骨肾宝合用, 动物体重有增加趋向, 实验后体重增加了 23.3%, 但经统计学检验, 差异无显著性意义。

表 3 壮骨肾宝对骨组织动态参数测量比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	标记周长 (mm)	骨矿化沉积率 (μ m)	骨形成率 (%·年)	类骨质周长 百分数(%)	骨吸收周长 百分数(%)	骨矿化延迟时间 (d)	标记周长/骨吸收周长 (比值)
对照	2.8 $\pm$ 1.2	1.1 $\pm$ 0.3	6.5 $\pm$ 2.2	4.0 $\pm$ 1.3	0.1 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 2.3	80.7 $\pm$ 66.5
激素	1.3 $\pm$ 0.4*	1.0 $\pm$ 0.4	4.6 $\pm$ 3.2	2.3 $\pm$ 1.2**	0.4 $\pm$ 0.2***	12.9 $\pm$ 5.3*	12.8 $\pm$ 4.4**
预防	3.3 $\pm$ 0.7 $\Delta\Delta$	1.1 $\pm$ 0.5	6.0 $\pm$ 4.1	4.3 $\pm$ 1.9 $\Delta\Delta$	0.1 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$	9.2 $\pm$ 4.7	61.0 $\pm$ 23.7 $\Delta\Delta\Delta$

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与激素组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

($P < 0.05$); 提示应用激素后成骨细胞功能受抑制, 骨基质的钙化受到明显影响; 类骨质周长减少 41% ($P < 0.01$), 提示应用激素后由于其抗合成作用, 促进蛋白质分解, 导致类骨质生成不足; 骨吸收周长增加 265% ($P < 0.001$), 提示应用激素后骨吸收活动明显增加; 骨矿化延迟时间增加 63% ($P < 0.05$), 提示

2 各组实验动物的骨静态参数测量结果 见表 2。激素组与对照组比较, 骨小梁面积减少 38% ($P < 0.05$), 骨小梁密度(计算公式: $(1.199/2) \times Tb \cdot Pm / T \cdot Ar$), 其中 $Tb \cdot Pm$ 为骨组织周长, $T \cdot Ar$ 为骨小梁面积)减少 37% ($P < 0.05$); 骨小梁间隙增加 70% ($P < 0.05$), 提示长期应用肾上腺皮质激素后, 大白鼠出现了显著的骨质疏松症的表现。预防组与激素组相比, 骨小梁面积增加 84% ($P < 0.01$), 骨小梁密度增加 78% ($P < 0.01$); 骨小梁间隙减少 54% ($P < 0.05$), 提示壮骨肾宝有对抗长期应用肾上腺皮质激素所致的骨质疏松作用。

表 1 壮骨肾宝对抗激素性大鼠骨质疏松前后体重变化 ($\bar{x} \pm S$)

组别	鼠数	实验前	实验后
对照	8	341 $\pm$ 41	394 $\pm$ 47
激素	8	337 $\pm$ 31	371 $\pm$ 53
预防	8	332 $\pm$ 24	409 $\pm$ 24

表 2 壮骨肾宝对骨组织静态参数测量比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	骨小梁面积 (%)	骨小梁厚度 (μ m)	骨小梁密度 (#/mm)	骨小梁间隙 (μ m)
对照	17.3 $\pm$ 6.0	62.8 $\pm$ 5.2	2.7 $\pm$ 0.9	342.1 $\pm$ 149.6
激素	10.8 $\pm$ 3.2*	63.1 $\pm$ 5.7	1.7 $\pm$ 0.5*	583.1 $\pm$ 264.6*
预防	19.9 $\pm$ 2.8 $\Delta\Delta$	65.2 $\pm$ 7.2	3.1 $\pm$ 0.6 $\Delta\Delta$	267.1 $\pm$ 46.6 Δ

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与激素组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 每组动物均为 8 只; 下表同

3 各组实验动物的骨动态参数测量结果 见表 3。激素组与对照组比较, 四环素标记周长减少 56%

应用激素后成骨细胞活性降低, 骨基质钙化延迟; 四环素标记周长与骨吸收周长之比减少 84% ($P < 0.01$), 提示应用激素后骨形成减少, 骨吸收增加的总趋势, 最终导致了骨质疏松。

4 预防组与激素组相比, 四环素标记周长增加 164% ($P < 0.01$), 提示壮骨肾宝不仅能对抗皮质激

素对成骨细胞的抑制作用,而且尚能促进成骨细胞的再生,增加其活性,加速骨的生成。类骨质周长增加 84% ($P < 0.01$),提示壮骨肾宝可对抗激素的抗合成作用,阻止蛋白质的分解,从而使类骨质合成增加,骨吸收周长减少 77% ($P < 0.01$),提示壮骨肾宝有对抗激素促进骨吸收的作用;标记周长与骨吸收周长之比增加 379% ($P < 0.001$),提示壮骨肾宝对激素所致的骨质疏松的综合作用是促进新骨的形成,同时减轻了骨的吸收,从而阻止肾上腺皮质激素所致的骨质疏松症的发生。

讨 论

实验表明,应用泼尼松后,大鼠胫骨近端骨小梁的骨形成明显减少,表现为类骨质分泌减少,矿化沉积速率下降,骨吸收明显增加,导致了骨小梁面积减少,骨小梁密度降低及骨小梁间隙明显增加等骨质疏松的现象,说明了该模型的建立是成功的。

中药复方制剂壮骨肾宝由淫羊藿、黄芪、白术组成,取其以补肾为主,达到壮骨之功效,研究表明本方能对抗肾上腺皮质激素所致的骨质疏松作用,可使骨形成明显增加,骨吸收显著减少,表现在骨小梁面积增加,四环素标记周长明显增加,类骨质周长明显增加及骨吸收周长明显减少。骨小梁面积、骨小梁密度和骨小梁间隙均达到正常对照组的水平,并且有

超过之倾向。淫羊藿温补肾阳为主药;黄芪补气固表、利尿、化毒、敛疮生肌,白术健脾益气,燥湿利水为辅药;现代医学研究表明此三药均为促进蛋白质合成的作用,以及促进免疫功能。三药合用可加强蛋白质的合成,增强其抗骨质疏松的作用,并能对抗肾上腺皮质激素的免疫抑制作用。黄芪、白术均有显著的降血糖作用,可对抗肾上腺皮质激素的升高血糖等不良反应;黄芪、白术均有护肝及防治胃和十二指肠溃疡的作用,对肾上腺皮质激素所致的消化道症状及胃十二指肠溃疡等不良反应也有良好的防治作用,黄芪、白术的镇静作用可对抗肾上腺皮质激素的中枢兴奋作用。此外,三药均有抑制血小板聚集,改善血液流变学的特性等的抗凝血作用,可对抗皮质激素的凝血作用。本研究初步证明,本方对肾上腺皮质激素所致的骨质疏松症有良好的防治作用。

参 考 文 献

1. 李青南,黄莲芳,谢 华,等.糖皮质激素所致大鼠骨质疏松症的定量研究.中国药理学通报 1993; 9(6): 475—477.
2. 廖进民,李青南,黄莲芳,等.泼尼松对大鼠骨骼影响的实验研究.解剖学杂志 1994; 17(4): 258—260.
3. 廖进民,李青南,吴 铁,等.羟基脲对雄大鼠密质骨代谢影响的定量研究.中国药理学通报 1995; 11(3): 202—204.

(收稿: 1995—04—19 修回: 1995—10—20)

· 征文通知 ·

▲中国中西医结合学会定于 1996 年 6 月在北京召开第五届全国农村基层中西医结合学术暨工作经验交流会,现将有关事项通知如下。

征文内容: (1)农村基层中西医结合防治疾病的经验; (2)农村基层开展中西医结合工作的经验; (3)农村基层在自然灾害性疾病中的防治经验; (4)农村科普。

征文要求: (1)全文(3000 字以内)及摘要(600~800 字)各一份,无摘要者不录用,请自留底稿,不退稿。(2)请用 400 字稿纸抄写,字迹清楚,写明作者姓名、单位及邮政编码。截稿时间: 1996 年 3 月 30 日。来稿请寄北京市东直门内北新仓 18 号中国中西医结合学会学术部收,邮编 100700。信封上请注明“农村基层学术会征文”。会议具体时间及地点另行通知。

▲中国中西医结合学会虚证与老年医学专业委员会定于 1996 年 10 月在湖北省宜昌市召开第五届全国中西医结合虚证与老年医学学术会议,现将有关事项通知如下。

征文内容: (1)虚证的临床和基础研究; (2)老年病的中西医结合临床和实验研究; (3)中西医结合衰老评估方案; (4)延缓衰老药物研究。

征文要求: 论文要求 4000 字以内,并附 800 字以内的论文摘要,注明作者及详细通信地址,盖所在单位公章。截稿日期: 1996 年 6 月 15 日(以邮戳为准)。来稿请寄上海市北京西路 1623 号上海市中西医结合学会高蕴玉同志收(邮编 200040)。会议的具体时间及地点另行通知。