

健骨颗粒对去卵巢骨质疏松模型大鼠骨质量的影响

林燕萍¹ 周瑞祥² 郭世明¹ 黄美雅¹ 张安桢¹

摘要 **目的** 探讨健骨颗粒对骨质疏松模型大鼠骨质量的影响。**方法** 运用切除大鼠卵巢方法建立去卵巢骨质疏松症模型,应用双能 X 线骨密度仪测定骨密度;运用不脱钙骨切片、甲苯胺蓝染色观察胫骨上端组织结构并作形态计量;运用光测弹性仪加力架测定第 1 腰椎压缩强度极限和弹性模量,以及股骨弯曲破坏荷载。**结果** 健骨颗粒能有效提高模型大鼠骨密度、骨小梁面积和骨皮质厚度/髓腔直径比值,提高椎体骨压缩强度极限和股骨弯曲破坏荷载。**结论** 健骨颗粒在增加骨质疏松模型大鼠骨密度的同时,能有效改善骨组织的结构状况,提高骨骼生物力学性能,提高骨质量。

关键词 骨质疏松症;骨质量;健骨颗粒

Effect of Jiangu Granule on Quality of Bone in Model Rats with Osteoporosis Induced by Ovariectomy LIN Yan-ping, ZHOU Rui-xiang, GUO Shi-ming, et al *Faculty of Orthopedics and Traumatology, Fujian College of TCM, Fuzhou (350003)*

Objective To study the effect of Jiangu granule (JGG) on quality of bone in model rats with osteoporosis.

Methods Osteoporosis model was established by means of ovariectomy. Bone mineral density (BMD) was measured with dual energy X-ray densitometry. Osseous tissue structure of upper tibia was observed by onodecalified section and toluidine blue staining, and morphometry was carried out. Compressive strength limit and elastic modulus of first lumbar vertebrae, and bend load of femur were measured by light-based elastometer.

Results JGG can significantly increase BMD, area of trabecula and thickness of bone cortex/diameter of marrow cavity ratio of model rats, to elevate the compressive strength limit of vertebrae and bend load of femur.

Conclusion JGG could increase BMD of osteoporosis model rats, and also could effectively improve the structure of osseous tissue, biomechanical property of bone and enhance the overall quality of bone.

Key words osteoporosis; bone quality; Jiangu granule

骨质疏松是一种严重危害中老年人身体健康的临床常见多发病,该病的严重后果是骨质量的下降,导致骨折的发生。因此治疗骨质疏松的重点在于保护和提高骨质量。骨质量包括骨组织的“质”和“量”两个方面^[1],骨密度代表骨“量”,骨骼微细结构和骨生物力学性能是判定骨“质”不可或缺的主要指标。骨的“质”和“量”共同决定着骨的强度^[2],即抵抗骨折的能力。所以骨质量也是作为判断药物疗效的重要客观指标。为能进一步客观评价纯中药制剂健骨颗粒的治疗作用,在前期研究基础上,本实验运用切除大鼠卵巢建立病理模型,随后进行药物干预,探讨健骨颗粒对骨质疏松模型鼠骨质量的影响。

材料和方法

1 实验药物 健骨颗粒是福建中医学院的经验方,由煅狗骨、淫羊藿、山茱萸、党参、骨碎补、山药、龟版、陈皮、红花组成,原药材由福建省药材公司提供,福建中医药研究院中试车间负责加工制备,每克颗粒含原生药 2.9g。阳性对照药骨松宝(组成:淫羊藿、川芎、牡蛎等)由贵州富华药业有限责任公司生产。

2 实验动物造模、分组、用药、取材 6 月龄 SD 雌性大鼠 50 只(上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供),体重 350~400g,随机分成模型组 40 只(腹部切口,切除双侧卵巢)和假手术组 10 只(腹部切口但不切除卵巢)。术后 12 周两组动物各取材 10 只,模型组余鼠 30 只再随机分成健骨颗粒组、骨松宝组和生理盐水组,每组 10 只,分别喂服健骨颗粒 $2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、骨松宝 $1.5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、生理盐水 $2\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,于术后第 13 周即模型成立后给药,所用颗粒制剂均溶于水后灌服,每天 1 次。实验大鼠均在相同条件下自由摄

基金项目:福建省自然科学基金项目(No. C9830001),福建省教育厅科技三项经费课题(No. K02083)

作者单位:1. 福建中医学院骨伤系(福州 350003);2. 福建医科大学基础医学院

通讯作者:林燕萍, Tel: 0591-3570823, Fax: 0591-3574177, E-mail: ypling@sina.com.cn

食饮水,于用药后 12 周全部处死取材。取材内容:全身骨骼行骨密度(bone mineral density, BMD)检测,随后取左侧胫骨上端约 1.5cm 长、右侧整段股骨以及第 1 腰椎,常规固定待检。

3 检测指标和方法

3.1 骨密度 应用双能 X 线骨密度仪(Hologic QDR-2000 型)测定全身(头颅除外)及腰椎、股骨颈、股骨、胫骨上段等区域 BMD。

3.2 骨骼生物力学性能检测

3.2.1 椎体骨抗压强度极限 先将第 1 腰椎上下截面磨平,保持两截面平行,并精确测定腰椎试件长度,再用印染方法读取上下截面椎体面积。在光测弹性仪(409-2 型)加力架上按级加载,读取数据,直至破坏。此时,所读得数据为椎体最大破坏荷载。椎体抗压强度极限=最大破坏荷载/椎体面积;椎体压缩弹性模量=应力增量/相应的应变变量。

3.2.2 股骨弯曲破坏荷载 采用电子液压万能机(型号:WED-20,长春电子精密仪器厂出品)。调整两个约束支座(相距 20mm),将大鼠股骨比较均匀的部位位置放在两个约束支座上,股骨的短轴方向与垂直方向平行。集中力作用在两个约束支座中点的股骨上。按级加载直至破坏,读取导致破坏的荷载数据。待测试件用生理盐水保持湿润。荷载测量精度为 0.1N(牛顿),变形测量精度为 0.001mm。

3.3 骨组织不脱钙切片及形态定量 取胫骨上段长约 1.5cm 的骨标本,剔尽骨周软组织,通过不脱钙骨组织切片,甲苯胺蓝染色,显微镜下观察胫骨干骺端骨小梁疏密情况、髓腔大小、骨皮质厚薄等情况,并运用 Leica Q550 型彩色图像分析仪测量紧靠骺线远端侧约 1.5mm 宽范围的骨小梁面积、骨小梁面积比(骨小梁面积比:是指在用 Leica Q550 型全自动真彩色图像分析仪进行测量时,每一视野测量框内的骨小梁面积与测量框总面积之比),同时在骺线骨干侧分别离骺线 6.2、6.4、8.2、8.4、10.2、10.4mm 的 6 个部位测量骨皮质厚度与髓腔直径之比值。

4 统计学方法 实验数据运用 SPSS 软件包处

理分析,参数值用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 t 检验。

结 果

1 各组骨密度变化 见表 1。术后 12 周模型组 BMD 明显下降,其中全身 BMD(颅骨除外)下降达 20% 以上,差异有显著性($P < 0.01$),从骨密度角度诊断,大鼠切除卵巢 12 周,骨质疏松症模型成立。用药 12 周后,健骨颗粒组、骨松宝组的骨密度均有提高,与生理盐水组比较差异有显著性($P < 0.01$)。健骨颗粒组与骨松宝组比较,腰椎、股骨部位的 BMD 差异有显著性(健骨颗粒组较高),其他如全身、股骨颈、胫骨上端等部位 BMD 均有升高趋势,但差异无显著性。

2 胫骨上端形态计量 见表 2。假手术组骨小梁分布均匀,排列规则,表现光整,未见有骨小梁中断,皮质骨较致密,内外表面光整。与假手术组比较,模型组骨小梁明显细小,萎缩,分布稀疏散乱,小梁间距增大,骨小梁面积及其比例均出现下降,多数骨小梁走行有中断,皮质骨变薄,皮质厚度/髓腔直径比值也出现下降。健骨颗粒组及骨松宝组骨小梁均较同期生理盐水组明显粗大,但仍比假手术组细小,骨小梁面积、比例和骨皮质厚度/髓腔直径都明显优于同期生理盐水组,差异有显著性($P < 0.01$)。

表 2 各组骨组织学静态参数变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	术后时间 (周)	骨小梁面积 (μm^2)	骨小梁面积比例	骨皮质厚度/ 髓腔直径比
假手术	10	12	77021.70 ± 13431.98	0.307 ± 0.016	0.702 ± 0.089
模型	10	12	50873.10 ± 5351.68 *	0.186 ± 0.024 *	0.482 ± 0.060 *
健骨颗粒	10	24	61598.60 ± 4642.93 [△]	0.230 ± 0.022 [△]	0.672 ± 0.053 [△]
骨松宝	10	24	59721.80 ± 2293.68 [△]	0.227 ± 0.022 [△]	0.650 ± 0.081 [△]
生理盐水	10	24	44356.90 ± 5285.82	0.179 ± 0.018	0.489 ± 0.050

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与生理盐水组比较,[△] $P < 0.01$

3 骨生物力学指标变化 见表 3。手术后 12 周模型组腰椎椎体的压缩强度极限和压缩弹性模量,以及股骨的弯曲破坏荷载均低于假手术组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。术后 24 周健骨颗粒组和骨松宝组 3 项力学指标都出现不同程度升高,与同期生理盐水组比较,除腰椎压缩弹性模量外,差异均有显著性($P < 0.05$)。

表 1 各组骨密度变化 ($\text{g}/\text{cm}^2, \bar{x} \pm s$)

组别	n	术后时间 (周)	骨密度				
			全身	腰椎	股骨颈	股骨	胫骨上端
假手术	12	10	0.115 ± 0.005	0.180 ± 0.013	0.170 ± 0.006	0.145 ± 0.006	0.216 ± 0.025
模型	12	10	0.089 ± 0.008 **	0.158 ± 0.005 **	0.156 ± 0.011 *	0.122 ± 0.022 *	0.176 ± 0.004 *
健骨颗粒	24	10	0.115 ± 0.006 [△]	0.212 ± 0.010 ^{△▲}	0.164 ± 0.010 [△]	0.154 ± 0.007 ^{△▲}	0.176 ± 0.015 [△]
骨松宝	24	10	0.110 ± 0.001 [△]	0.176 ± 0.003 [△]	0.160 ± 0.010 [△]	0.141 ± 0.003 [△]	0.172 ± 0.016 [△]
生理盐水	24	10	0.088 ± 0.001	0.118 ± 0.002	0.134 ± 0.003	0.111 ± 0.004	0.127 ± 0.006

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$;与生理盐水组比较,[△] $P < 0.01$;与骨松宝组比较,[▲] $P < 0.05$,^{△▲} $P < 0.01$

表 3 各组生物力学指标变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	术后时间(周)	椎体压缩强度极限(mPa)	椎体压缩弹性模量(GPa)	股骨弯曲破坏荷载(N)
假手术	10	12	60.10 ± 11.15	1.03 ± 0.36	115.00 ± 13.09
模型	8	12	34.91 ± 6.83 **	0.71 ± 0.21 *	96.25 ± 16.85 *
健骨颗粒	9	24	52.37 ± 5.56 △	1.71 ± 0.99	105.00 ± 10.49 △
骨松宝	10	24	49.25 ± 5.68 △	1.57 ± 0.70	103.33 ± 8.16 △
生理盐水	9	24	38.47 ± 13.82	1.09 ± 0.49	91.25 ± 8.35

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与生理盐水组比较,△ $P < 0.05$

讨 论

绝经后骨质疏松症是一种以骨强度降低、骨脆性增加、易致骨折为主要特征的代谢性骨病。目前应用骨矿含量(或骨密度)的变化作为效应指标来评价骨质疏松药物治疗的有效性已得到较广泛的认同。但近年的研究发现,单项骨矿含量的提高和骨质疏松治疗药物的实际疗效之间或实际骨质量改善之间存在明显偏差^[3],骨密度的提高和骨生物力学性能的改善之间不能划等号,所以如何提高和保护骨质量,是中医药治疗骨质疏松研究的一个重要课题。健骨颗粒是在中医学“肾主骨”、“补先天”理论指导下组方用药,具有补肾健脾,强筋壮骨之功。本实验通过骨密度、骨组织形态计量和骨骼生物力学性能等相关指标检测,证明健骨颗粒在增加骨质疏松模型大鼠骨密度的同时,能有效改善骨组织的结构状况,提高骨骼生物力学性能,提高骨质量。

1 卵巢切除对骨质量的影响 由于骨质疏松症的实质是骨量减少和骨组织显微结构的改变,而骨质疏松的严重结果是引起骨骼生物力学性能的改变,使骨骼脆性增加,从而导致骨折的发生,因此骨密度、骨组织形态结构以及骨骼生物力学性能等指标是骨质疏松最为直观和关键的判定指标。本实验结果显示,术后 12 周,模型组无论是全身骨密度(头颅骨除外),还是腰椎、股骨、股骨颈、胫骨上端等部位的骨密度,均比假手术组明显降低,下降幅度在 8.24% ~ 22.61% 之间,差异有显著性($P < 0.01$)。胫骨上端组织形态学指标显示,模型组骨组织显微结构出现典型病理改变,骨小梁明显稀疏,甚至断裂,骨皮质变薄。形态计量分析显示,模型组骨小梁面积及其比例均较假手术组显著降低($P < 0.01$)。同期生物力学性能检测结果表明,模型组椎体压缩强度极限、压缩弹性模量和股骨弯曲破坏荷载都低于假手术组,差异有显著性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。由于弹性模量是反映骨质内在特性的指标^[4],模型组椎体弹性模量显著低于假手术组,说明其椎体脆性增加、韧性下降,提示卵巢摘除后 12 周,模

型大鼠不仅出现骨密度和骨骼显微结构的显著性改变,而且伴有骨骼力学性能的降低,发生骨质疏松症。

2 健骨颗粒对骨质量的影响 骨密度是评价骨质疏松疗效的关键指标,BMD 虽然称为骨密度,但并不是单位体积的骨矿含量,而是单位面积的骨矿含量^[5]。有关研究指出面积骨密度并不逊色于体积骨密度^[6,7]。但骨密度、骨矿含量等参数仅从骨的“量”这一侧面描述骨的变化,而骨的生物力学性能和骨的显微结构则是骨质量的直接反映指标^[8]。不同药物虽然都可使骨质疏松骨的“骨量”或骨矿含量增加,但由于药物的作用机理或作用方式和作用部位不同,所达到的治疗效果和对骨的“质量”最终影响也将不同。为了达到“治疗骨质疏松的重点在于保护和提高骨质量”的目的,笔者认为对在药物疗效的评价上不宜单纯追求骨矿含量的增高,应将骨矿含量、骨组织显微结构和骨骼生物力学性能三者有机结合起来综合考虑,才能比较客观判断药物的真正效果。从本实验结果看,骨质疏松模型大鼠用药 12 周后,健骨颗粒组、骨松宝组的 BMD 都有不同程度提高,与同期生理盐水组比较差异有显著性($P < 0.01$)。从数字上看,健骨颗粒组均优于骨松宝组,而且两组间对比腰椎和股骨部位差异有显著性。说明健骨颗粒有较强的“密骨”之功,通过补肾健脾能有效提高骨质疏松模型大鼠的骨密度,尤其是松质骨的骨密度。

健骨颗粒组骨小梁明显比同期生理盐水组粗大(但仍比假手术组细小),骨小梁面积、面积比例和骨皮质厚度/髓腔直径也明显优于同期生理盐水组,差异有显著性($P < 0.01$)。同期透射电镜观察显示^[9],健骨颗粒组骨细胞活动逐渐由吸收转向成骨,同时成骨细胞胞体明显增大,细胞器发达,显示出较强的成骨活性,而生理盐水组骨细胞多表现为退变相,且骨质中还出现较典型的破骨细胞溶骨现象。提示健骨颗粒能有效抑制卵巢摘除后引起的骨质疏松发展,能明显促进骨形成过程,改善骨组织的结构状态。健骨颗粒组椎体压缩强度极限、股骨弯曲破坏荷载都明显优于生理盐水组,从数值上看,术后 24 周,健骨颗粒组的弹性模量最高,结合该组同时升高的椎体压缩强度极限,提示健骨颗粒在提高骨质疏松症模型鼠骨密度、改善骨组织显微结构的同时,还能增加骨质疏松骨骼的生物力学性能,提高骨折的阈值,减少骨折的危险性。说明健骨颗粒能较好地提高和保护骨质量,是一种应用前景乐观的纯中药制剂。

参 考 文 献

- 1 戴克戎.骨质疏松导致骨力学性能下降的机理.中华骨科杂

- 志 1997;17(6):405—406.
- Dai KR. The mechanism of decline in osseous biomechanical properties by osteoporosis. *Chin J Orthop* 1997;17(6):405—406.
- 2 肖鲁伟,詹红生.骨折风险预测与骨量、骨质量检测. *浙江中医学院学报* 2000;24(5):7—8.
- Xiao LW, Zhan HS. Fracture risk forecasting and inspection of bone amount and bone quality. *J Zhejiang Coll TCM* 2000;24(5):7—8.
- 3 朱太咏,石印玉,张戈,等.补肾益精方提高卵巢切除大鼠骨质疏松模型松质骨骨质量的实验研究. *中国中西医结合杂志* 2001;21(9):688—691.
- Zhu TY, Shi YY, Zhang G, et al. Experimental study on reinforcing effect of Bushen Yijing capsule of cancellous bone in ovariectomy caused rats osteoporosis model. *Chin J Integr Tradit West Med* 2001;21(9):688—691.
- 4 王晓达,张风华,符诗聪,等.健骨冲剂对去卵巢大鼠股骨及腰椎的生物力学作用. *中国骨伤* 2001;14(10):601—603.
- Wang XD, Zhang FH, Fu SC, et al. Biomechanical effects of Jiangu Chongji (a TCM decoction) on femur and lumbar vertebrae of ovariectomy female rats. *China J Orthop Trauma* 2001;14(10):601—603.
- 5 金鸿宾.骨质量对骨折及其治疗的影响. *中国骨伤* 2001;14(2):67—68.
- Jin HB. Effect of bone quality on fracture and its treatment. *China J Orthop Trauma* 2001;14(2):67—68.
- 6 Duan Y, Parfitt A, Seeman E. Vertebral bone mass, size, and volumetric density in women with spinal fractures. *J Bone Miner Res* 1999;14(10):1796—1802.
- 7 Tabensky AD, Williams J, DeLuca V, et al. Bone mass, areal, and volumetric bone density are equally accurate, sensitive, and specific surrogates of the breaking strength of the vertebral body: an in vitro study. *J Bone Miner Res* 1996;11(12):1981—1988.
- 8 费伟,王大章,郑虎,等.XW630 对去势大鼠骨组织力学性能及骨小梁结构参数的影响. *中国骨质疏松杂志* 2002;8(2):173—176.
- Fei W, Wang DZ, Zheng H, et al. Effect of XW630 on mechanical properties and trabecular structure parameters of bone tissue in ovariectomized rats. *Chin J Osteoporosis* 2002;8(2):173—176.
- 9 林燕萍,周瑞祥,张爱平,等.健骨颗粒对去卵巢骨质疏松模型鼠骨组织结构的影响. *解剖学杂志* 2001;24(6):521—525.
- Lin YP, Zhou RX, Zhang AP, et al. Effect of Jiangu granule on the bone tissue of ovariectomized rats. *Chin J Anat* 2001;24(6):521—525.

(收稿:2003-09-28 修回:2004-02-10)

全国中西医结合泌尿外科男科学学习班举办通知

中国中西医结合学会泌尿外科专业委员会、广东省中医院将于 2004 年 8 月在广州市举办全国中西医结合泌尿外科男科学学习班,属国家继续教育项目,学习期满,授予国家级一类学分 15 分。将聘请鲍镇美、梅骅、张亚强、崔学教、陈志强、王树声教授等泌尿外科男科专家授课。重点授课内容为前列腺疾病(包括前列腺炎、前列腺增生症、前列腺癌)、泌尿系结石的中西医结合治疗研究最新进展;腔内泌尿外科技术(经皮肾镜、输尿管镜、钬激光技术);围手术期的中西医结合处理;男科疾病的诊治技术等以及参观学习广东省中医院的特色专科和办院经验。报名方法:请来信或电话报名及索取招生简章。来信地址:北京宣武区北线阁 5 号(邮编:100053)中国中医研究院广安门医院泌尿外科杨志强、吴玉强收。电话:010-88001046(1126)或广东省广州市大德路 111 号(邮编:510120)广东省中医院泌尿外科王树声主任、王昭辉医师收,电话:020-87351238 转 63521(63522)。学习班具体地点另行通知。

全国中西医结合防治肺部感染性疾病

学术研讨会征文通知

由中国中西医结合学会呼吸病专业委员会主办的“全国中西医结合防治肺部感染性疾病学术研讨会”拟于 2004 年 10 月中旬在上海举行。现将征文具体事宜通知如下。

征文内容 (1)中西医结合防治 SARS 临床、实验、科研课题小结,文献研究,流行病学调查和 SARS 的多学科研究;(2) SARS 病例追踪观察(包括后遗症、药物不良反应、体质研究等);(3)中西医结合治疗间质性肺炎的基础理论、临床及实验研究;(4)中医药干预肺纤维化的实验研究;(5)中西医结合治疗肺炎的临床及实验总结;(6)中药抗感染静脉注射剂对急性呼吸系统感染的临床和实验;(7)中医理论对呼吸系统疾病的认识;(8)中西医结合研究和诊治呼吸系统疾病思路与方法探索;(9)慢性肺源性心脏病、慢性心衰的诊治经验和实验研究;(10)中西医结合治疗肺部肿瘤的临床及实验研究;(11)中西医结合应用机械呼吸设备指征、方法、经验和技术改进;(12)肺部感染性疾病的少见病种、典型病例、个案报告;(13)中医、中西医结合治疗肺部感染性疾病的临床误诊或教训总结。

征文要求 3 000 字左右全文以及 600 字左右摘要各 1 份。来稿请用 A4 纸打印,1.5 倍行距,论文请加盖单位公章。

截稿日期 2004 年 6 月 30 日(以邮戳为准);来稿请寄:上海宛平南路 725 号龙华医院吴银根教授或张惠勇主任收,邮政编码:200032;联系人及电话:吴银根,021-64385700 转 3416;张惠勇,021-64385700 转 1903;传真:021-64871761(自动);E-mail:wuyingensh@hotmail.com。

论文被录用并参加会议者,可获得论文证书及Ⅱ类继续医学教育学分。参加学习班可获得Ⅰ类继续医学教育学分。