

恒古骨伤愈合剂对骨质疏松性骨折兔骨密度及 DKK-1 蛋白的影响

王素彬¹ 赵宏斌² 胡敏³ 魏蔚² 钱传云² 蒋罡² 张洋² 赵林² 郭磊²

摘要 **目的** 探讨恒古骨伤愈合剂对骨质疏松性骨折(osteoporotic fracture, OPF)兔骨密度(bone mineral density, BMD)及血清 Dickkopf-1 (DKK-1)蛋白含量的影响。**方法** 45 只雌性日本大耳兔随机分为治疗组、OPF 模型组(模型组)和空白对照组(对照组),每组 15 只。治疗组和模型组兔切除双侧卵巢 24 周证实骨质疏松后再造成左侧桡骨骨折。于骨折手术次日治疗组每 2 天用恒古骨伤愈合剂灌胃 1 次,模型组使用等量生理盐水灌胃。各组于卵巢切除术前、术后 24 周及术后 48 周行全身 BMD 和血清 DKK-1 蛋白含量测定。**结果** 卵巢切除术后 24 周,模型组 BMD 低于对照组($P < 0.05$)。与模型组比较,治疗组干预后兔全身 BMD 提高($P < 0.05$),血清 DKK-1 蛋白含量降低($P < 0.05$);治疗组干预后血清 DKK-1 蛋白含量低于干预前($P < 0.05$)。**结论** 恒古骨伤愈合剂可提高 OPF 兔 BMD,降低血清 DKK-1 蛋白含量水平。

关键词 骨质疏松性骨折;骨密度;DKK-1 蛋白;恒古骨伤愈合剂

Effect of Osteoking on Bone Mineral Density and Dickkopf-1 Protein Levels in Rabbits with Osteoporotic Fracture WANG Su-bin¹, ZHAO Hong-bin², HU Min³, WEI Wei², QIAN Chuang-yun², JIANG Gang², ZHANG Yang², ZHAO Lin², and GUO Lei² 1 Department of Emergency, Yan'an Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming (650051); 2 Emergency Trauma Center, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming (650032); 3 Medical College of Kunming University, Kunming (650214)

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of Osteoking on bone mineral density (BMD) and serum Dickkopf-1 (DKK-1) protein levels in rabbits with osteoporotic fracture (OPF). **Methods** Totally 45 female Japanese big-ear rabbits were randomly divided into the treatment group, the model group, and the blank control group (as the control group), 15 in each group. Bilateral ovaries were ectomized for 24 weeks in the treatment group and the model group. Their left radial fractures were induced after confirmed osteoporosis. Rabbits in the treatment group were administered with Osteoking by gastrogavage, once per two days. Equal volume of normal saline was given to rabbits in the model group. The general BMD and serum DKK-1 protein levels were detected before ovariectomy, at week 24 and 48 after ovariectomy. **Results** There was significant difference in the general BMD at week 24 after ovariectomy between the model group and the control group, and it was lower in the model group. Compared with the model group, the general BMD significantly increased and serum DKK-1 protein levels significantly decreased in the treatment group after intervention. Serum DKK-1 protein levels were significantly lower after intervention than before intervention in the treatment group. **Conclusion** Osteoking could improve the BMD of OPF rabbits, and reduce their serum DKK-1 protein levels as well.

KEYWORDS osteoporotic fracture; bone mineral density; DKK-1 protein; Osteoking

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30860389, No. 81060361, No. 81460647);云南省应用基础研究重点资助项目(No. 2011FA033);云南省中青年学术带头人后备人才培养项目(No. 2010CZ014)

作者单位:1.昆明医科大学附属延安医院急诊医学科(昆明 650051);2.昆明医科大学第一附属医院急诊创伤中心(昆明 650032);3.昆明学院医学院(昆明 650214)

通讯作者:赵宏斌, Tel: 0871-65324888-2273, E-mail: 596829191@qq.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.08.1000

人口老龄化问题日趋严重,骨质疏松性骨折(osteoporotic fracture, OPF)因其在老年人中发病普遍及后果严重而受到广泛关注。在美国,约 2 名白人妇女中有 1 名在她的一生会经历一次 OPF^[1]。在我国,女性 OPF 的发病率达 40%。10 年间,北京市 50 岁以上居民髌部骨折率在男性和女性分别增加了 42% 和 110%^[2]。恒古骨伤愈合剂源自云南南部彝族古方,2002 年获国药准字 Z20025103 号,是我国拥有自主知识产权民族药物,其具有促进骨折愈合的作用。本研究通过测定 OPF 兔骨密度(bone mineral density, BMD)和血清 Dickkopf-1(DKK-1)蛋白含量,研究该药对 BMD 和 DKK-1 的影响。

材料与方法

1 动物 5 月龄雌性日本大耳白兔 45 只,清洁级,体重 2.20~2.60 kg,由昆明医科大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(滇)2005-0008,使用许可证号:SYXK(滇)2005-0004。实验兔在昆明医科大学实验动物中心标准化饲养。兔颗粒饲料由昆明医科大学实验动物中心提供。自由饮水,通风,单笼饲养。每天视动物摄食情况补充饲料。适应性喂养 1 个月,期间兔无死亡及异常情况。

2 药物 恒古骨伤愈合剂,组成:陈皮、红花、三七、杜仲、人参、洋金花、黄芪、钻地风、鳖甲。25 mL/瓶,每毫升含生药 0.36 g,云南克雷斯特天然药物制药有限公司生产,批号:20100412。

3 试剂及仪器 兔 DKK-1 酶联免疫分析试剂盒,武汉华美生物工程有限公司,编号:CSB-E16508Rb,批号:S20079499。骨密度检测仪:美国 GE 公司,型号:GE Lunar Prodigy 型;酶标仪:美国 BioTek 公司,型号:ELX800。

4 模型制备及分组 按随机数字表法分为 OPF 治疗组(治疗组)、OPF 模型组(模型组)和空白对照组(对照组),每组 15 只。参照文献[3]报道的方法,将治疗组和模型组兔行双侧卵巢切除术(ovariectomy, OVX)。OVX 术后 24 周,治疗组和模型组兔再造成左桡骨中段 3 mm 骨缺损使之成为 OPF 模型。本实验参照《中国人原发性骨质疏松症诊断标准》^[4],以对照组同期 BMD 作为正常值来对手术组进行诊断,若手术组 BMD 低于正常值 -2SD 即诊断为 OP。

5 干预方法 造模后次日开始给药,经人与兔体表面积用药量换算,计算每只兔所需药量。参考《中药药理研究方法学》^[5]根据人和兔的计量折算系数得出兔的公斤体重剂量约为人每公斤体重剂量的

3.36 倍。治疗组用恒古骨伤愈合剂灌胃,每 2 天 1 次,模型组及对照组用等量生理盐水灌胃,每 2 天 1 次。每周禁食 12 h 测体重 1 次,据体重变化调整用药剂量。共干预 24 周。

6 检测指标及方法

6.1 BMD 检测 于兔 OVX 术前(造模前)、术后 24 周(干预前)和术后 48 周(干预后)对各组兔行全身 BMD 检测。

6.2 血清 DKK-1 测定 于兔造模前、干预前和干预后对各组兔抽取耳缘静脉血 3~4 mL,离心, -80 °C 冰箱存放。采用 ELISA 法测定兔血清 DKK-1 蛋白含量,用酶标仪在 450 nm 波长测量光密度(OD 值)。

7 统计学方法 用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组一般状态比较 治疗组干预前死亡 2 只,干预后死亡 1 只。模型组干预前死亡 2 只,干预后死亡 2 只。对照组实验过程中死亡 1 只。实验动物死亡原因:切口感染、肠梗阻及肺部感染。

2 各组兔全身 BMD 比较(表 1) 各组造模前全身 BMD 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组同期比较,模型组干预前兔全身 BMD 降低($P < 0.01$)。与模型组同期比较,治疗组干预后兔全身 BMD 升高($P < 0.01$)。

表 1 各组兔全身 BMD 比较 (g/cm², $\bar{x} \pm s$)

组别	n	BMD		
		造模前	干预前	干预后
对照	15	0.227 ± 0.014	0.317 ± 0.012	0.328 ± 0.013
模型	15	0.225 ± 0.015	0.269 ± 0.011*	0.273 ± 0.016
治疗	15	0.229 ± 0.012	0.263 ± 0.013	0.312 ± 0.011 [△]

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组同期比较,[△] $P < 0.01$

3 各组各时间点兔血清 DKK-1 蛋白含量比较(表 2) 各组造模前兔血清 DKK-1 蛋白含量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与本组造模前比较,模型组及治疗组干预前兔血清 DKK-1 蛋白含量均升高($P < 0.01$)。与对照组同期比较,模型组干预前兔 DKK-1 蛋白含量升高($P < 0.01$)。与本组干预前比较,模型组干预后兔血清 DKK-1 蛋白含量升高($P < 0.01$)。治疗组干预后兔血清 DKK-1 蛋白含量降

低 ($P < 0.01$)。与模型组同期比较,治疗组干预后兔 DKK-1 蛋白含量降低 ($P < 0.01$)。

表 2 各组各时间点兔血清 DKK-1 蛋白含量比较
(ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	DKK-1		
		造模前	干预前	干预后
对照	15	2.1 ± 0.6	1.6 ± 0.7	1.7 ± 0.7
模型	15	1.9 ± 0.9	3.5 ± 0.3* [▲]	5.6 ± 1.0 [△]
治疗	15	2.0 ± 0.6	3.7 ± 0.3*	1.8 ± 0.4 ^{△○}

注:与本组造模前比较,* $P < 0.01$;与本组干预前比较,[△] $P < 0.01$;与对照组同期比较,[▲] $P < 0.01$;与模型组同期比较,[○] $P < 0.01$

讨 论

OPF 愈合过程虽与普通骨折相同,但 OPF 愈合中因骨形成减少,使骨痂质量差,愈合时间长,愈合后易再发骨折,更需要促骨形成药物治疗^[6]。寻找安全高效经济的骨形成促进剂是临床的迫切需求^[7]。已有一些靶向药物如钙敏感受体负向调节剂、富含脯氨酸的非受体酪氨酸激酶抑制剂、DKK-1 和硬骨素抑制剂正在研究中^[8]。已证实中药如小檗碱、淫羊藿具有促骨形成的作用^[9,10],一些复方如仙灵骨葆胶囊、左归丸等也有较好的促骨形成作用^[11,12]。中药促骨形成治疗骨质疏松和 OPF 适合中国国情,具有较广阔的应用前景。

恒古骨伤愈合剂由陈皮、红花、三七、杜仲、人参、黄芪、洋金花、钻地风、鳖甲组成,功能主治为活血益气、补肝肾、接骨续筋、消肿止痛,符合中医药治疗骨质疏松和 OPF 的治则。在临床多年应用中已发现恒古骨伤愈合剂可作为促骨形成药物促进 OPF 愈合^[13,14],可通过上调坏死股骨头内源性成骨关键基因——Runx2/Cbfa1、血管内皮生长因子和骨形态发生蛋白 2 的表达来促进坏死骨修复^[15,16],但该药治疗 OPF 的机制还待研究。

随着在分子水平对 OPF 调控进程研究的不断深入^[17],骨形成关键信号通路 Wnt 的研究越来越受到重视。经典 Wnt 信号通路即 Wnt/ β -catenin 通路与骨形成密切相关^[18]。Wnt 的活性受许多拮抗物调控,其中低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6 (low density lipoprotein receptor-related protein 5/6, Lrp5/6) 拮抗物——DKK 蛋白家族是 Wnt 信号通路的重要的调节因子,DKK-1 及 DKK-2 与骨代谢关系最为密切。DKK-1 通过与 Wnt 竞争结合 Lrp5/6 辅助受体,阻断 Wnt 信号通路,从而抑制骨形成^[19]。前期研究提示恒古骨伤愈合剂促进兔骨修复的作用可通过上调 Wnt 信号通路中内源性成骨关键的 Runx2

基因表达来实现^[15],但对该通路其他靶点的影响还不清楚。

本实验先采用 OVX 建立骨质疏松模型,时间为 6 个月,与文献报道^[3,20]一致,进而采用去除桡骨中段骨质 3 mm 建立 OPF 模型。模型组和治疗组干预前兔全身 BMD 低于对照组 BMD 均数 -2SD,提示骨质疏松模型达到造模标准。因 BMD 受体重、年龄等因素影响,不宜对 BMD 直接比较,故本实验未作组内比较。结果显示恒古骨伤愈合剂治疗 24 周,治疗组和模型组兔全身 BMD 差异有统计学意义,表明应用恒古骨伤愈合剂治疗可增加兔 BMD。与对照组比较,OVX 术后 24 周兔血清 DKK-1 显著升高;比较模型组不同时间的血清 DKK-1 变化,血清 DKK-1 随疾病进程逐渐升高;治疗组应用恒古骨伤愈合剂 24 周后血清 DKK-1 降低,结合全身 BMD 结果,提示通过下调血清 DKK-1 刺激 Wnt 信号通路促进骨质形成可能是恒古骨伤愈合剂治疗 OPF 的机制之一。

本研究不足之处在于样本量不大,检测指标单一,在后续的实验中将进一步加大样本量,完善实验内容及检测指标,使实验结论更具有说服力。

(致谢:感谢中国科学院昆明动物研究所李文辉研究员的指导)

参 考 文 献

- [1] U.S. Preventive Services Task Force. Screening for osteoporosis in postmenopausal women: recommendations and rationale [J]. *Ann Intern Med*, 2002, 137(6): 526-528.
- [2] 吕诺. 我国 60 岁以上老人骨质疏松发病率达 56% [EB/OL]. http://news.ifeng.com/society/news/detail_2011_10/16/9894581_0.shtml, 2011-10-16.
- [3] 方忠, 杨琴, 李锋, 等. 去势法兔骨质疏松模型建立的探讨 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2005, 11(2): 202-209.
- [4] 中国老年学学会骨质疏松委员会骨质疏松诊断标准学科组. 中国人原发性骨质疏松症诊断标准 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 1999, 5(1): 1-3.
- [5] 陈奇主编. 中药药理研究方法学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 31-33.
- [6] Khosla S, Westendorf JJ, Oursler MJ. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(2): 421-428.
- [7] Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP. Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(9): 905-916.
- [8] Mosekilde L, Tørring O, Rejnmark L. Emerging anabolic treatments in osteoporosis [J]. *Curr*

- Drug Safety, 2011, 6(2): 62-74.
- [9] Lee HW, Suh JH, Kim HN, et al. Berberine promotes osteoblast differentiation by Runx2 activation with p38 MAPK[J]. J Bone Miner Res, 2008, 23(8): 1227-1237.
- [10] 钱卫庆, 尹宏. 口服与骨折局部应用淫羊藿对骨质疏松大鼠骨折愈合的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(6): 822-826.
- [11] 张燕, 杨光, 孙国珍. 仙灵骨葆含药血清对小鼠成骨—破骨细胞共培养系统的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(7): 2670-2673.
- [12] 蒿长英, 任艳玲, 赵金茹. 左归丸含药血清通过 ERK/Smads 信号通路干预 MC3T3-E1 细胞的功能基因表达[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(6): 872-876.
- [13] 胡敏, 赵宏斌, 王兵, 等. 恒古骨伤愈合剂促进胫骨下段骨折术后愈合临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(2): 160-161.
- [14] 罗德军, 赵宏斌, 周旭, 等. 鲑鱼降钙素联合恒古骨伤愈合剂治疗腰椎骨质疏松性骨折疗效分析[J]. 中华内分
- 泌外科杂志, 2011, 5(3): 158-160.
- [15] 赵宏斌, 胡敏, 梁红锁, 等. 恒古骨伤愈合剂促进兔坏死股骨头内核心结合因子 a1 基因表达的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(11): 1003-1006.
- [16] 赵宏斌, 梁红锁, 胡敏, 等. 恒古骨伤愈合剂促进坏死股骨头内 BMP-2 基因表达研究[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(6): 61-63.
- [17] Li X, Quigg RJ, Zhou J, et al. Early signals for fracture healing[J]. J Cell Biochem, 2005, 95(1): 189-205.
- [18] Rawadi G. Wnt signaling and potential applications in bone diseases[J]. Curr Drug Targets, 2008, 9(7): 581-590.
- [19] Roux S. New treatment targets in osteoporosis[J]. Joint Bone Spine, 2010, 77(3): 222-228.
- [20] 刘世森, 苏方, 刘洪臣, 等. 去势法兔骨质疏松模型中下颌牙槽骨的改变[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2009, 7(3): 136-138.

(收稿:2013-09-03 修回:2014-11-20)

2015 国际中医药大会征文通知

为落实国家“一带一路”战略构想和规划,提升中医药国际影响力,推动中医药国际化进程,中国中医科学院将于 2015 年 10 月 16—17 日在北京会议中心举办“2015 国际中医药大会”。此次大会旨在为来自不同国家和地区的中医药专家提供广泛交流、沟通、成果转化的平台,共同分享中医学当前研究成果和经验,奠定进一步合作基础。大会将邀请来自美国、英国、加拿大、日本、澳大利亚等约 20 个国家及地区的世界知名大学、前沿性研究机构、国际组织的知名中医药研究和临床领域的国(境)外专家,以及国内各高校、医院、研究机构的专家学者参会并演讲。此次会议主要活动为开幕式、主旨报告、并设针灸、中药、临床、文化 4 个分论坛。现将征文要求如下。

征文内容 论文统一经大会官方网站在线提交。论文及摘要一律采用 Word 文档格式。论文必须数据可靠、内容详实、文责自负。正文字数不超过 5 000 字,中文或英文。并请提交 400 字以内的英文摘要。届时将由“大会学术委员会”对论文进行遴选,并编辑成大会论文集。会议论文将择优刊登在中国中医科学院主办杂志上。论文一经选入作为会议发言者,须在 2015 年 9 月 15 日前向大会提供演讲幻灯片(PPT),幻灯片原则上不超过 20 张,并制作中英文双语版本。投稿截止日期:2015 年 8 月 31 日。大会幻灯片提交截止日期:2015 年 9 月 15 日。

联系方式 (1) 论文投稿请登录大会官方网站:网址:<http://2015iccm.csp.escience.cn>; (2) 会务联系人:中国中医科学院国际合作处 蒋兆媛 张帆 张子隽,电话/传真:010-64016387; E-mail: gjhzc_cacms@163.com。