

骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠腰椎松质骨 骨形态计量学参数的影响

陈海啸, 梁军波, 伍海昭

(浙江省台州医院, 浙江 临海 317000)

摘要 目的:研究骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠腰椎松质骨骨形态计量学参数的影响。**方法:**将 40 只 SD 大鼠随机分为 4 组:假切除组(A 组)、模型组(B 组)、倍美力组(C 组)、骨碎补组(D 组), 每组 10 只。麻醉后 B、C、D 组从背部入路切除双侧卵巢; A 组仅切除腹部少许脂肪。造模后第 2 天开始, A、B 组标准饲料常规饲养; C 组在标准饲料常规喂养的同时, 每天灌服倍美力悬剂 2 mL (按人鼠体表面积换算, 相当于倍美力 0.017 mg); D 组在标准饲料喂养的同时, 每天灌服中药浓缩剂 2 mL (按人鼠体表面积换算, 相当于骨碎补总黄酮 0.02 g)。6 个月后取大鼠的 L₂ 椎体进行骨形态计量学检查。**结果:**4 组大鼠骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁间距、骨小梁节点数及游离末端数比较, 差异均有统计学意义 ($F=4.031, P=0.043; F=3.980, P=0.045; F=4.133, P=0.041; F=4.091, P=0.043; F=4.382, P=0.041$)。同一指标组间比较:①B 组骨体积分数低于 A、C、D 组 ($LSD-t=3.322, P=0.011; LSD-t=2.861, P=0.019; LSD-t=3.023, P=0.015$); ②B 组骨小梁厚度低于 A、C、D 组 ($LSD-t=3.360, P=0.011; LSD-t=2.925, P=0.019; LSD-t=3.066, P=0.017$); ③B 组骨小梁间距大于 A、C、D 组 ($LSD-t=3.417, P=0.011; LSD-t=2.981, P=0.019; LSD-t=3.108, P=0.013$); ④B 组骨小梁节点数少于 A、C、D 组 ($LSD-t=4.191, P=0.080; LSD-t=2.956, P=0.039; LSD-t=2.632, P=0.045$); ⑤B 组骨小梁游离末端数大于 A、C、D 组 ($LSD-t=4.021, P=0.008; LSD-t=2.237, P=0.048; LSD-t=2.510, P=0.038$); ⑥C 组与 D 组骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁间距、骨小梁节点数、骨小梁游离末端数比较, 差异均无统计学意义 ($LSD-t=0.138, P=0.868; LSD-t=0.116, P=0.901; LSD-t=0.186, P=0.712; LSD-t=0.239, P=0.611; LSD-t=0.381, P=0.589$)。结论:骨碎补总黄酮能通过增加骨量、改善骨三维结构, 从而增强骨强度。

关键词 骨质疏松 骨碎补 骨形态计量学 动物实验

Effect of drynaria fortunei flavonoids on bone histomorphometry parameters of lumbar cancellous bone in ovariectomized rat CHEN Hai-xiao*, LIANG Jun-bo, WU Hai-zhao. *Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Linhai 317000, Zhejiang China

ABSTRACT Objective: To study the effect of drynaria fortunei flavonoids on bone histomorphometry parameters of lumbar cancellous bone in ovariectomized rat. **Methods:** 40 SD rats were randomly divided into 4 groups as sham-resection group (group A), model group (group B), premarin group (group C) and drynaria fortunei group (group D), 10 cases in each group. Bilateral ovaries of rats in group B, group C and group D were removed from back approach after anesthesia, while the others in group A were administrated with resection of a little fat in belly only. From the 2nd day after molding, rats in group A and group B were fed on standard fodder normally, rats in group C were gavaged with 2mL premarin suspension agent (equivalent to 0.017mg premarin according to the conversion of human body surface area into rat body surface area) as well as fed on standard fodder every day, and rats in group D were gavaged with 2mL traditional Chinese medicine concentrate (equivalent to 0.02g drynaria fortunei flavonoids according to the conversion of human body surface area into rat body surface area) as well as fed on standard fodder every day. L₂ centrums of rats were took for examination of bone morphometry after 6 months.

Results: There was statistical difference in the following indexes as bone volume fraction, bone trabecular thickness, bone trabecular interval, number of bone trabecular nodes and number of bone trabecular free ends for the rats among the 4 groups ($F=4.031, P=0.043; F=3.980, P=0.045; F=4.133, P=0.041; F=4.091, P=0.043; F=4.382, P=0.041$). Comparison between groups for the same index: ①Bone volume fraction of rats in group B were lower than those of rats in group A, group C and group D ($LSD-t=3.322, P=0.011; LSD-t=2.861, P=0.019; LSD-t=3.023, P=0.015$); ②Bone trabecula of rats in group B were thinner than those of rats in group A, group C and group D ($LSD-t=3.360, P=0.011; LSD-t=2.925, P=0.019; LSD-t=3.066, P=0.017$); ③Bone trabecular interval of rats

in group B exceeded those of rats in group A, group C and group D ($LSD - t = 3.417, P = 0.011$; $LSD - t = 2.981, P = 0.019$; $LSD - t = 3.108, P = 0.013$); ④Bone trabecular nodes of rats in group B were less than those of rats in group A, group C and group D ($LSD - t = 4.191, P = 0.080$; $LSD - t = 2.956, P = 0.039$; $LSD - t = 2.632, P = 0.045$); ⑤Bone trabecular free ends of rats in group B were more than those of rats in group A, group C and group D ($LSD - t = 4.021, P = 0.008$; $LSD - t = 2.237, P = 0.048$; $LSD - t = 2.510, P = 0.038$); ⑥there was no statistical difference in bone volume fraction, bone trabecular thickness, bone trabecular interval, number of bone trabecular nodes and number of bone trabecular free ends of rats between group C and group D ($LSD - t = 0.138, P = 0.868$; $LSD - t = 0.116, P = 0.901$; $LSD - t = 0.186, P = 0.712$; $LSD - t = 0.239, P = 0.611$; $LSD - t = 0.381, P = 0.589$). **Conclusion:** *Drynaria fortunei* flavonoids can enhance bone strength through increasing bone mass and improving bone three-dimensional structure.

Key words Osteoporosis; *Drynaria fortunei*; Bone histomorphometry; Animal experimentation

骨质疏松症是一种以骨强度下降、骨折风险性增加为特征的骨骼系统疾病,严重影响中老年人生活质量甚至危及老年人生命^[1]。骨量和骨强度有很好的相关性,但骨量并非是骨强度的唯一决定因素。与骨量丢失同时存在的骨结构退变越来越受到重视^[2],如骨小梁的体积分数、厚度、间距、节点数和游离末端数能很好地反映力学强度。本实验以此为出发点,研究中药骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠椎骨骨形态计量学参数的影响。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 10 月龄雌性 SD 大鼠 40 只,体质量 350 ~ 380 g,由浙江中医药大学动物试验中心提供,实验动物编号 SYXK(浙)2007-0115。

1.2 实验药物 骨碎补总黄酮,由北京歧黄制药有限公司提供;倍美力,爱尔兰惠氏药厂提供(0706012)。

1.3 实验仪器 LEICA SP1600 切片机(德国);Leica DM 2000 显微镜(德国)。

2 方法

2.1 分组方法 将 40 只大鼠随机分为 4 组:假切组(A 组)、模型组(B 组)、倍美力组(C 组)、骨碎补组(D 组),每组 10 只。

2.2 造模方法 麻醉后 B、C、D 组从背部入路切除双侧卵巢;A 组仅切除腹部少许脂肪。

2.3 药物干预 造模后第 2 天开始,A、B 组标准饲料常规饲养;C 组在标准饲料常规喂养的同时,每天灌服倍美力悬剂 2 mL(按大鼠体表面积换算,相当于倍美力 0.017 mg);D 组在标准饲料喂养的同时,每天灌服中药浓缩剂 2 mL(按大鼠体表面积换算,相当于骨碎补总黄酮 0.02 g)。

2.4 检测方法 药物干预 6 个月后将各组大鼠处死取 L₂ 椎体,按以下顺序处理:4% 多聚甲醛固定 48 h → 75% 酒精脱水 48 h → 85% 酒精脱水 48 h → 95% 酒

精脱水 48 h → 100% 酒精脱水 48 h → 甲基丙烯酸甲酯(包埋)至硬化 → LEICA SP1600 切片机切出 100 μm 的切片 → 粘片(塑料覆盖) → 重物压 24 h → 磨至 50 μm → 氧化铝抛光粉抛光 → 0.1% 甲酸 3 min → 清水冲洗 2 min → 20% 甲醇 2 h → 清水冲洗 2 min → 品红苦味酸染色 → 100% 酒精固定。用 Leica DM 2000 显微镜在 200 倍视野下进行计量,并以计算机图像处理系统进行测量分析。

2.5 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件对所得数据进行统计学处理,各组同一指标比较采用方差分析,组间两两比较采用 $LSD - t$ 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

4 组大鼠骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁间距、骨小梁节点数及游离末端数比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。同一指标组间比较:①B 组骨体积分数低于 A、C、D 组($LSD - t = 3.322, P = 0.011$; $LSD - t = 2.861, P = 0.019$; $LSD - t = 3.023, P = 0.015$);②B 组骨小梁厚度低于 A、C、D 组($LSD - t = 3.360, P = 0.011$; $LSD - t = 2.925, P = 0.019$; $LSD - t = 3.066, P = 0.017$);③B 组骨小梁间距大于 A、C、D 组($LSD - t = 3.417, P = 0.011$; $LSD - t = 2.981, P = 0.019$; $LSD - t = 3.108, P = 0.013$);④B 组骨小梁节点数少于 A、C、D 组($LSD - t = 4.191, P = 0.08$; $LSD - t = 2.956, P = 0.039$; $LSD - t = 2.632, P = 0.045$);⑤B 组骨小梁游离末端数大于 A、C、D 组($LSD - t = 4.021, P = 0.008$; $LSD - t = 2.237, P = 0.048$; $LSD - t = 2.510, P = 0.038$);⑥C 组与 D 组骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁间距、骨小梁节点数、骨小梁游离末端数比较,差异均无统计学意义($LSD - t = 0.138, P = 0.868$; $LSD - t = 0.116, P = 0.901$; $LSD - t = 0.186, P = 0.712$; $LSD - t = 0.239, P = 0.611$; $LSD - t = 0.381, P = 0.589$)。(表 1、图 1)

表 1 各组大鼠骨形态计量学参数比较

组别	骨体积分数 (%)	骨小梁厚度 (μm)	骨小梁间距 (μm)	骨小梁节点数 (个·mm ⁻²)	骨小梁游离末端数 (个·mm ⁻²)
A 组(假切除组)	15.13 ± 0.22	26.33 ± 2.83	215.68 ± 11.27	43.21 ± 8.44	3.63 ± 0.81
B 组(模型组)	9.23 ± 0.09	16.27 ± 1.91	446.15 ± 19.52	18.33 ± 3.41	12.62 ± 2.82
C 组(倍美力组)	13.63 ± 0.18	21.13 ± 1.83	322.51 ± 10.62	32.50 ± 5.04	8.40 ± 1.22
D 组(骨碎补组)	13.29 ± 0.21	20.86 ± 2.43	342.58 ± 12.43	28.61 ± 4.83	7.21 ± 1.64
F 值	4.031	3.980	4.133	4.091	4.382
P 值	0.043	0.045	0.041	0.043	0.041

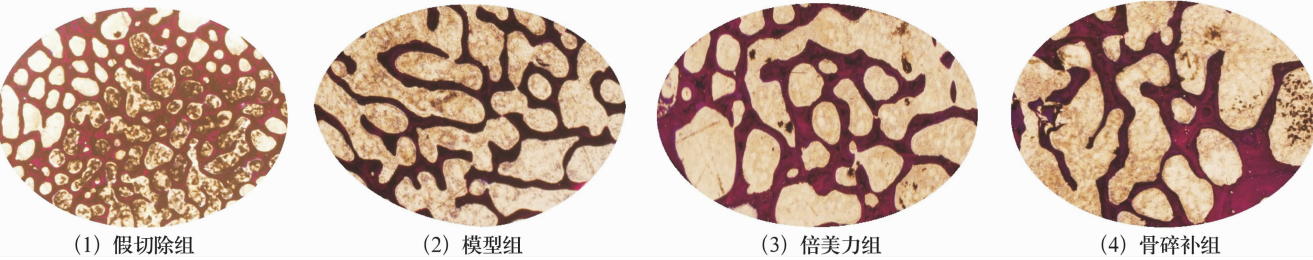


图 1 大鼠骨小梁三维结构观察(品红苦味酸染色 ×20)

(1)假切除组骨小梁游离末端很少而节点数很多 (2)模型组的骨小梁游离末端很多而节点数很少 (3)倍美力组的骨小梁游离末端较模型组少而节点数较模型组多,和骨碎补组相当 (4)骨碎补组骨小梁游离末端较模型组少而节点数较模型组多

4 讨论

骨质疏松症是老年人群及绝经后妇女的常见疾病,治疗较为棘手,而中医药在治疗该病方面有明显优势^[3]。骨碎补是补肾强骨中药,骨碎补总黄酮可能是其抗骨质疏松的主要成分,具有良好的促进骨形成、防止骨丢失作用,从而提高骨强度。

在骨质疏松的早期研究中,多数学者认为骨的力学强度主要由骨的矿物质含量决定。但后来的研究发现当骨量降低时,并不一定引起骨折,相反有些骨量相对高的患者却发生骨折,因此越来越多的研究者认为骨强度不仅与骨量有关,更重要的是与骨小梁的内部结构有关^[4]。

骨组织形态计量学是一种骨组织定量研究方法,主要通过对显微镜下骨组织二维平面的测量,根据体视学原理,推测或转换获得三维参数,包括静态参数和动态参数^[5]。骨体积分数表示骨小梁体积占被测骨组织总体积的百分比,是骨量水平的主要标志。骨小梁厚度表示骨小梁本身的厚度,骨小梁厚度越大,说明骨小梁越粗壮,结构越复杂,抵抗外力、损伤后修复的能力也越大,有较好的生物力学性能。骨小梁间距即平均骨小梁间距,表示相邻两个骨小梁间的距离,骨小梁间距越大,表示相邻骨小梁之间距离越远。椎体松质骨三维成像的结果显示,松质骨内为格栅样结构,即由很多垂直和横向排列的骨小梁组成,随着年龄的增长,横向的骨小梁逐渐消失而垂直的骨小梁变细,与周围的骨小梁逐渐失去连接性,成为游离末端,从而使骨强度变弱,甚至发生骨折。Hahn 等^[6]认为骨小梁的稳定性不仅取决于骨量的大小,还取决于其三维架构以及

小梁间连接程度;而且认为对节点数和游离末端的测量更能解释为什么骨量正常而力学强度下降。

本实验结果显示:①与 A 组相比,B 组骨体积分数、骨小梁厚度及骨小梁节点数减少,骨小梁间距、游离末端数增加,差异有统计学意义;②C、D 组骨体积分数、骨小梁厚度及骨小梁节点数高于 B 组,骨小梁间距、游离末端数少于 B 组,差异有统计学意义;③C 组与 D 组各指标比较,差异均无统计学意义。说明大鼠摘除卵巢之后骨量减少,骨小梁之间的连接程度下降;骨碎补总黄酮及倍美力均能提高大鼠骨量,增加骨小梁之间的连接,且二者的疗效相当。

据此,笔者认为骨碎补总黄酮能通过增加骨量、改善骨三维结构,从而增强骨强度。

5 参考文献

[1] 薛延. 骨质疏松防治指南[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:3-13.
[2] 郭世绂. 骨质量与骨质疏松症[J]. 国外医学:内分泌学分册,2005,25(5):295-297.
[3] 陈桂武,谢正兰. 骨质疏松症的中医药治疗概况[J]. 华夏医学,2007,20(3):634-637.
[4] 曹立,雍宜明,沈惠良. 骨质量在骨质疏松诊断中的意义[J]. 中国骨质疏松杂志,2000,6(3):84-87.
[5] 李青南. 骨质疏松实验动物研究——骨组织形态计量学[M]. 成都:四川大学出版社,2001:68-81.
[6] Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, et al. Trabecular bone pattern factor - a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture[J]. Bone,1992,13(4):327-330.

核心期刊证书(彩)