

· 基础研究 ·

强骨饮对去卵巢骨质疏松大鼠骨显微结构的影响

王博¹, 吴鹏¹, 史晓林²

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053;

2. 浙江省新华医院, 浙江 杭州 310005)

摘要 目的: 观察强骨饮对去卵巢骨质疏松大鼠骨显微结构的影响。方法: 将 36 只 10 周龄雌性 SD 大鼠随机分为假手术组、强骨饮组和模型组, 每组 12 只。假手术组切除卵巢周围脂肪, 其他两组均切除双侧卵巢。造模后 3 个月, 假手术组以生理盐水 $0.041 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 灌胃; 强骨饮组以强骨饮浓缩液 $0.041 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 灌胃; 模型组以碳酸钙 D3 混悬液 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 、阿法骨化醇溶液 $0.037 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 灌胃; 每日 1 次, 连续干预 2 个月。药物干预结束后, 采用 micro-CT 扫描大鼠股骨头至股骨中段, 对图像进行三维重建, 观察大鼠骨显微结构变化, 并对 3 组大鼠各项骨显微结构参数进行比较。结果: 药物干预 2 个月后, 假手术组骨组织内骨小梁结构排列紧密、有序, 骨小梁分离度低; 强骨饮组和模型组骨小梁数量明显减少, 排列稀疏或出现断裂, 形态扭曲。3 组间骨表面积 (bone surface, BS)、骨体积 (bone volume, BV)、骨表面积和体积比值 (bone surface/bone volume, BS/BV)、骨体积分数 (bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb. Th)、骨小梁数量 (trabecular number, Tb. N)、骨小梁分离度 (trabecular separation, Tb. Sp) 比较, 差异均有统计学意义 ($F = 63.243, P = 0.000; F = 10.290, P = 0.000; F = 43.774, P = 0.000; F = 10.685, P = 0.044; F = 10.489, P = 0.000; F = 140.827, P = 0.000; F = 382.812, P = 0.000$); 强骨饮组和模型组 BS、BV、BS/BV、BV/TV、Tb. Th、Tb. N 均小于假手术组 ($P = 0.000, P = 0.018, P = 0.000, P = 0.045, P = 0.004, P = 0.037; P = 0.000, P = 0.008, P = 0.000, P = 0.031, P = 0.004, P = 0.000$), Tb. Sp 均大于假手术组 ($P = 0.000; P = 0.000$); 强骨饮组 BS、BV、BS/BV、Tb. Th 大于模型组 ($P = 0.009, P = 0.007, P = 0.045, P = 0.000$), Tb. Sp 小于模型组 ($P = 0.000$), 2 组 BV/TV 和 Tb. N 的组间差异均无统计学意义 ($P = 0.104, P = 0.869$)。结论: 与碳酸钙 D3 和阿法骨化醇联用相比, 强骨饮更有利于改善去卵巢骨质疏松大鼠的骨显微结构, 具有更好的抗骨质疏松作用。

关键词 骨质疏松; 绝经后; 体层摄影术, X 线计算机; 成像, 三维; 骨显微结构; 强骨饮; 大鼠

Effect of Qianggu Yin (强骨饮, QGY) on bone microstructure in the ovariectomized osteoporosis rats

WANG Bo¹, WU Peng¹, SHI Xiaolin²

1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

2. Zhejiang Xinhua Hospital, Hangzhou 310005, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To observe the effect of Qianggu Yin (强骨饮, QGY) on bone microstructure in ovariectomized osteoporosis rats.

Methods: Thirty-six 10-week-old female SD rats were randomly divided into sham-operated group, QGY group and model group, 12 cases in each group. The lipectomy around the ovary were performed on rats in sham-operated group, while the bilateral ovariectomy were performed on rats in QGY group and model group. The rats in sham-operated group were intragastric administrated with normal saline (0.041 mL/g), and the rats in QGY group were intragastric administrated with QGY concentrated solution (0.041 mL/g), while the others in model group were intragastric administrated with calcium carbonate D3 suspensions (0.01 mL/g) and alfacalcidol solution (0.037 mL/g) at 3 months after the modeling, once a day for consecutive 2 months. After the end of drug intervention, the femoral head and middle segment of femur of the rats were scanned by micro-CT, and the images were inputed into the computer to build three-dimensional reconstructed images. Then the bone microstructure changes in rats were observed and the bone microstructure parameters were compared between the 3 groups. **Results:** After 2-month drug intervention, compact and orderly bone trabecula were found in the bone tissue in sham-operated group with low separation degree, while sparse or broken bone trabecula were found in QGY group and model group with distorted shape. There was statistical difference in bone surface (BS), bone volume (BV), ratio of bone surface to bone volume (BS/BV), bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb. Th), trabecular number (Tb. N) and trabecular separation (Tb. Sp) between the 3 groups ($F = 63.243, P = 0.000; F = 10.290, P = 0.000; F = 43.774, P = 0.000; F = 10.685, P = 0.044; F = 10.489, P = 0.000; F = 140.827, P = 0.000; F = 382.812, P =$

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20133322110005)

通讯作者: 史晓林 E-mail: xlshi-2002@163.com

0.000). BS, BV, BS/BV, BV/TV, Tb. Th and Tb. N were less and Tb. Sp were greater in QGY group and model group compared to sham-operated group ($P=0.000, P=0.018, P=0.000, P=0.045, P=0.004, P=0.037; P=0.000, P=0.008, P=0.000, P=0.031, P=0.004, P=0.000; P=0.000; P=0.000$). BS, BV, BS/BV and Tb. Th were greater and Tb. Sp were less in QGY group compared to model group ($P=0.009, P=0.007, P=0.045, P=0.000, P=0.000$), and there were no statistical difference in BV/TV and Tb. N between the 2 groups ($P=0.104, P=0.869$). **Conclusion:** QGY is more conducive to improving the bone microstructure in ovariectomized osteoporosis rats and it has better anti-osteoporotic effect compared to the combination therapy of calcium carbonate D3 and alfacalcidol.

Key words osteoporosis, postmenopausal; tomography, X-ray computed; imaging, three-dimensional; bone microstructure; Qianggu Yin; rats

骨质疏松症是以骨量减少、骨强度降低为特征的一种全身性骨骼疾病。绝经后妇女的发病率高达 30%~60%^[1]。强骨饮具有益气补血、温经通络、活血止痛的功效,可对绝经后骨质疏松症患者血清雌激素水平及骨密度产生影响,用于骨质疏松症的治疗可取得良好疗效^[2-4]。为进一步研究强骨饮对绝经后骨质疏松症的影响,为临床应用提供依据,笔者采用显微计算机断层扫描技术(micro computed tomography, micro-CT)对强骨饮干预的去卵巢骨质疏松大鼠的骨显微结构进行观察,并与碳酸钙 D3 和阿法骨化醇联合用药进行对比,现报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 SD 大鼠 36 只,10 周龄,雌性,体重 (273 ± 16) g,由浙江中医药大学动物实验中心提供,实验动物合格证号:SCXK(浙)2014-0001。实验动物均饲养于光照/黑暗每 12 h 循环 1 次的环境中,温度维持在 21℃左右,自由活动与进食。

1.2 实验药物 强骨饮浓缩液(药物组成:黄芪 30 g、骨碎补 20 g、鹿角霜 20 g、杜仲 15 g、忍冬藤 25 g、川芎 20 g、鸡血藤 25 g、肉桂 10 g、露蜂房 20 g、川续断 30 g、秦艽 15 g、防风 15 g 等)由浙江省新华医院药剂科提供,每毫升含生药 2.48 g。碳酸钙 D3 咀嚼片(惠氏制药有限公司生产,每片含碳酸钙 1.5 g、维生素 D3 125 单位,国药准字 H10950029)与 1% 西黄耆胶混合配备成浓度为 $15.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混悬液。阿法骨化醇胶囊(昆明贝克诺顿制药有限公司生产,每粒含阿法骨化醇 0.5 μg ,国药准字 H20010320)溶解在体积分数为 100% 的乙醇中,质量分数为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,给药前用棉子油稀释为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。药物均避光,4℃冰箱保存。

1.3 实验仪器 micro-CT,型号 SKYSCAN1176,德国 Bruker 公司生产,扫描参数:电压 65 kV,电流 385 μA ,分辨率 18 μm ,显示视野 200 μm ,曝光时间 270 ms。

2 方法

2.1 分组及造模 适应性喂养 2 周后,将 36 只大鼠标号,采用随机数字表随机分为假手术组、强骨饮组和模型组,每组 12 只。3% 戊巴比妥钠注射液 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉,假手术组只切除卵巢周围脂肪而不切除卵巢,其他两组均切除双侧卵巢。

2.2 药物干预 造模后 3 个月,假手术组以生理盐水 $0.041 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 灌胃;强骨饮组以强骨饮浓缩液 $0.041 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 灌胃;模型组以碳酸钙 D3 混悬液 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 、阿法骨化醇溶液 $0.037 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 灌胃;每日 1 次,连续干预 2 个月。药物剂量计算方法均采用黄继汉等^[5]制定的动物剂量换算公式。

2.3 骨显微结构观察 药物干预结束后,将大鼠左侧股骨固定于 micro-CT 专用扫描垫上,扫描股骨头至股骨中段,层厚 18 μm 。扫描旋转 180°,每旋转 0.5° 拍摄 2 张图像。图像经 NRecon 软件进行三维重建后,经 CTAn 软件分析,获取骨表面积(bone surface, BS)、骨体积(bone volume, BV)、骨表面积和体积比值(bone surface/bone volume, BS/BV)、骨体积分数(bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th)、骨小梁数量(trabecular number, Tb. N)及骨小梁分离度(trabecular separation, Tb. Sp)等参数。

2.4 数据统计分析 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据统计分析。3 组大鼠间 BS、BV、BS/BV、BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Tb. Sp 的总体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

药物干预 2 个月后,假手术组骨组织内骨小梁结构排列紧密、有序,骨小梁分离度低;强骨饮组和模型组骨小梁数量明显减少,排列稀疏或出现断裂,形态扭曲(图 1)。3 组间 BS、BV、BS/BV、BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Tb. Sp 比较,差异均有统计学意义;强骨饮组和模型组 BS、BV、BS/BV、BV/TV、Tb. Th、Tb. N 均小于

假手术组 ($P = 0.000, P = 0.018, P = 0.000, P = 0.045, P = 0.004, P = 0.037; P = 0.000, P = 0.008, P = 0.000, P = 0.031, P = 0.004, P = 0.000$), Tb. Sp 均大于假手术组 ($P = 0.000; P = 0.000$); 强骨饮组

BS、BV、BS/BV、Tb. Th 大于模型组 ($P = 0.009, P = 0.007, P = 0.045, P = 0.000$), Tb. Sp 小于模型组 ($P = 0.000$), 2 组 BV/TV 和 Tb. N 的组间差异均无统计学意义 ($P = 0.104, P = 0.869$)。见表 1。

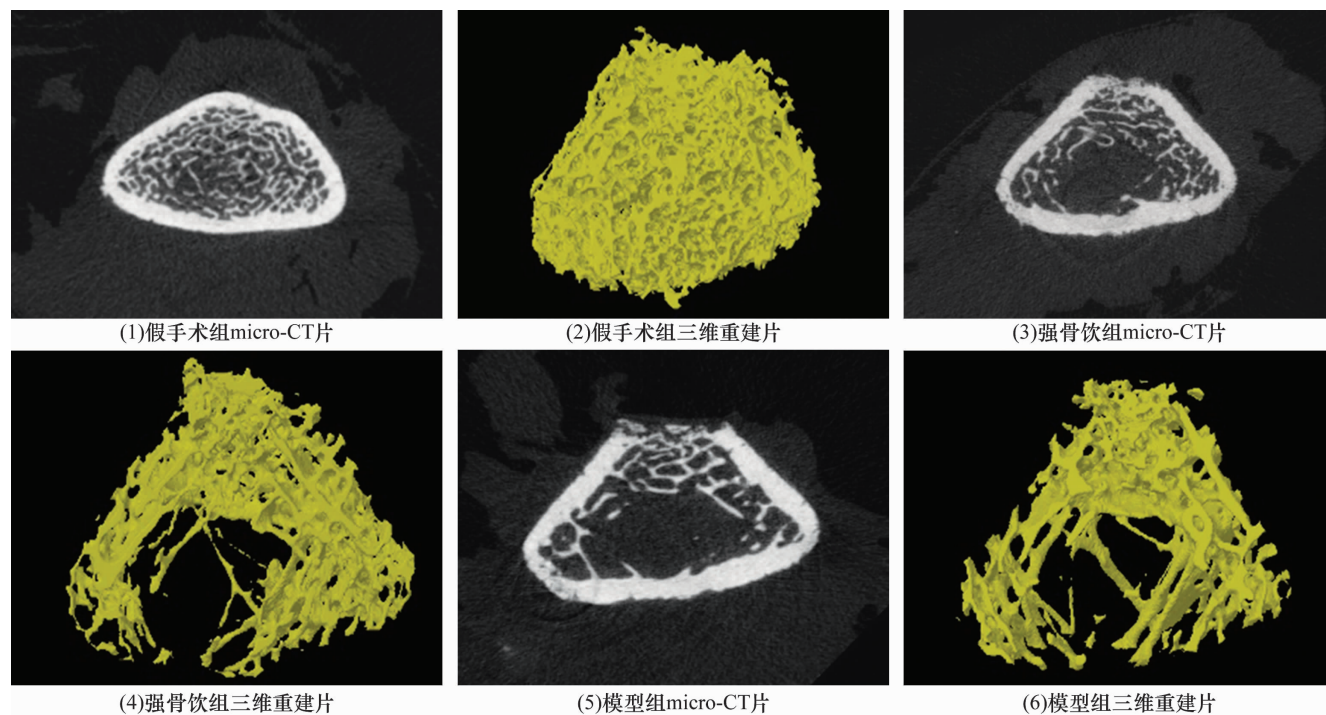


图 1 3 组大鼠股骨 micro-CT 片及三维重建图片

表 1 3 组大鼠股骨显微结构参数 $\bar{x} \pm s$

| 组别 | n | BS (mm ²) | BV (mm ³) | BS/BV (mm ⁻¹) | BV/TV (%) | Tb. Th (μm) | Tb. N (mm ⁻¹) | Tb. Sp (μm) |
|------|----|-----------------------|-----------------------|---------------------------|----------------|---------------|---------------------------|---------------|
| 假手术组 | 12 | 198.366 ± 32.819 | 28.032 ± 1.462 | 9.153 ± 2.146 | 81.244 ± 6.863 | 0.109 ± 0.016 | 3.591 ± 0.227 | 0.193 ± 0.046 |
| 强骨饮组 | 12 | 142.914 ± 18.173 | 24.251 ± 2.601 | 5.305 ± 0.983 | 77.812 ± 5.015 | 0.093 ± 0.007 | 2.694 ± 0.198 | 1.212 ± 0.359 |
| 模型组 | 12 | 120.931 ± 11.801 | 22.096 ± 1.783 | 3.804 ± 0.655 | 69.827 ± 3.541 | 0.084 ± 0.006 | 1.839 ± 0.201 | 1.922 ± 0.238 |
| F 值 | | 63.243 | 10.290 | 43.774 | 10.685 | 10.489 | 140.827 | 382.812 |
| P 值 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.044 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

4 讨论

骨质疏松症是一种以骨量减少和骨显微结构改变为特征的骨骼疾病^[6]。绝经后妇女由于卵巢功能衰退,内源性雌激素分泌减少,而出现不可逆的骨丢失,致骨力学性能下降^[7]。在骨质疏松症的防治中,只强调骨密度在诊断及疗效评价中的作用是片面的。骨显微结构、有机基质、矿物成分、微小损伤及修复状态等称为骨质量,骨质量影响骨强度,并与骨折的发生息息相关^[8]。骨显微结构的观察结果已成为骨质疏松疗效评价中最重要的部分^[9]。

Micro-CT 技术不仅可以在活体上研究骨显微结构,还能进行骨骼图像的三维重建、定量分析骨的各项参数,被广泛应用于骨质疏松与骨关节炎的药物开发及临床前研究^[10]。绝经后骨质疏松症大鼠模型造

模技术成熟,是骨质疏松症研究常用的动物模型^[11]。强骨饮具有益气补肾、温经通络、活血止痛的功效,可缓解骨疼痛、增加骨密度、改善骨代谢,用于骨质疏松症的治疗可取得良好的疗效^[12-16]。钙和维生素 D 是临床治疗骨质疏松症的基础用药。阿法骨化醇是最早用于骨质疏松防治的药物,其药理作用为减少甲状旁腺细胞的增殖,抑制甲状旁腺激素的分泌,增加小肠对钙的吸收,提高血钙水平,减少骨钙的流失。本研究采用 Micro-CT 扫描,观察强骨饮对去卵巢骨质疏松大鼠骨显微结构的影响,并与碳酸钙 D3 和阿法骨化醇联合用药进行对比,强骨饮组 BS、BV、BS/BV、Tb. Th 大于模型组, Tb. Sp 小于模型组,说明强骨饮更有利于促进去卵巢骨质疏松大鼠骨量的增加,骨小梁的连接较模型组更为紧密,更有利于改善骨质量。

本研究表明,与碳酸钙 D3 和阿法骨化醇联用相比,强骨饮更有利于改善去卵巢骨质疏松大鼠的骨显微结构,具有更好的抗骨质疏松作用。

5 参考文献

- [1] Wetmore JB, Benet LZ, Kleinstuck D, et al. Effects of short-term alendronate on bone mineral density in haemodialysis patients[J]. Nephrology (Carlton), 2005, 10(4): 393 - 399.
- [2] 赵稜,汪煌,魏杰,等. 自拟强骨饮对绝经后骨质疏松患者血清雌激素水平及骨密度影响的临床观察[J]. 浙江中医药大学学报, 2011, 35(4): 529 - 531.
- [3] 何伟涛,毛应德龙,孙金谔,等. 强骨饮对骨吸收参数 TRACP5b 及 Crosslaps 的影响[J]. 中医正骨, 2009, 21(12): 1 - 3.
- [4] 史晓林. 自拟强骨饮治疗骨质疏松症的 32 例临床报告[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2006, 14(2): 57 - 58.
- [5] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069 - 1072.
- [6] Emkey GR, Epstein S. Secondary osteoporosis: pathophysiology & diagnosis[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2014, 28(6): 911 - 935.
- [7] 秦健,杨乃龙. 绝经后妇女血清基质金属蛋白酶-9 和基质金属蛋白酶抑制因子-1 与骨密度的关系[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(4): 245 - 248.
- [8] 黄柏辉. 骨强度与骨质疏松性脊柱骨折[J]. 临床和实验

医学杂志, 2007, 6(2): 143 - 144.

- [9] Lochmüller EM, Matsuura M, Bauer J, et al. Site-specific deterioration of trabecular bone architecture in men and women with advancing age[J]. J Bone Miner Res, 2008, 23(12): 1964 - 1973.
- [10] 王维刚,刘震泽,李俊,等. 显微 CT 在骨微结构研究中的应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(1): 11 - 17.
- [11] Ikeda S, Tsurukami H, Ito M, et al. Effect of trabecular bone contour on ultimate strength of lumbar vertebra after bilateral ovariectomy in rats[J]. Bone, 2001, 28(6): 625 - 633.
- [12] 史晓林,茅月娟,刘康,等. 强骨饮与密盖息对去势大鼠股骨颈骨形态计量学影响的对比研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2008, 25(6): 490 - 492.
- [13] 史晓林,朱彦昭,宁玉梅,等. 强骨饮对骨质疏松患者抗酒石酸性磷酸酶-5b 影响的研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2008, 16(1): 25 - 27.
- [14] 刘国泰,王建辉,周莉,等. 强骨饮治疗绝经后骨质疏松症的临床研究[J]. 中国药物警戒, 2014, 11(11): 652 - 656.
- [15] 徐伟锋,叶健,吴连国. 强骨饮对骨质疏松性股骨颈骨折患者全髋关节置换术后血清骨代谢生化指标和骨密度的影响[J]. 中医正骨, 2015, 27(2): 12 - 16.
- [16] 吴连国,刘康,黄俊俊,等. 强骨饮对股骨颈骨折患者人工股骨头置换术后假体周围骨密度的影响[J]. 中医正骨, 2014, 26(4): 15 - 18.

(2016-04-22 收稿 2016-05-17 修回)

· 简 讯 ·

《中医正骨》广告业务范围

■ 医疗、科研、教学单位及药械生产营销企业介绍

■ 用于骨伤科医疗、科研、教学的器械设备介绍

■ 用于骨伤科医疗、科研、教学的中西药物及中间体介绍

■ 各种形式的骨伤科讯息,如书刊征订、招生启事、会议通知等

《中医正骨》2017 年度广告收费标准

| 刊登位置 | 印刷规格 | 版面 | 每期收费标准(元) | 半年收费标准(元) | 全年收费标准(元) |
|------|---------------|-------|-----------|-----------|-----------|
| 封二 | 大 16 开彩色铜版纸印刷 | 全版 | 9 000 | 54 000 | 75 600 |
| 封三 | 大 16 开彩色铜版纸印刷 | 全版 | 8 000 | 48 000 | 67 200 |
| 封底 | 大 16 开彩色铜版纸印刷 | 全版 | 10 000 | 60 000 | 84 000 |
| 前插页 | 大 16 开彩色铜版纸印刷 | 全版 | 7 000 | 42 000 | 58 800 |
| 后插页 | 大 16 开彩色铜版纸印刷 | 全版 | 6 000 | 36 000 | 50 400 |
| 内文图文 | 大 16 开黑白铜版纸印刷 | 全版 | 3 000 | 18 000 | 25 200 |
| | 大 16 开黑白铜版纸印刷 | 1/2 版 | 1 800 | 10 800 | 15 120 |
| 内文文字 | 大 16 开黑白铜版纸印刷 | 全版 | 3 000 | 18 000 | 25 200 |
| | 大 16 开黑白铜版纸印刷 | 1/2 版 | 1 800 | 10 800 | 15 120 |