

JGYS 对大鼠去卵巢高转换型骨质疏松症的影响

姚荣成¹⁾, 谢宇²⁾, 张悦²⁾, 王紫微²⁾, 罗文羲²⁾, 付婷²⁾, 杨仁华²⁾, 沈志强²⁾, 陈鹏²⁾
(1) 曲靖市第一人民医院药学部, 云南 曲靖 655000; 2) 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650500)

[摘要] **目的** 用现代药理学技术研究 3 个暴露剂量的受试品 JGYS 对骨重、骨密度、骨钙及骨代谢的影响, 评价 JGYS 受试品对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗作用及其剂量-效应关系. **方法** (1) 摘除 6 月龄雌性大鼠双侧卵巢, 复制高转换型骨质疏松症模型. 假手术和模型动物进行以下分组, 10 只/组, 即 (1) 假手术组 (未摘除卵巢); (2) 去卵巢模型组; (3) 去卵巢模型动物 +300 mg/kg 低剂量 JGYS 组; (4) 去卵巢模型动物 +600 mg/kg 中剂量 JGYS 组; (5) 去卵巢模型动物 +1 200 mg/kg 高剂量 JGYS 组; (6) 去卵巢模型动物 +500 mg/kg 仙灵骨葆胶囊阳性药物对照组; (7) 去卵巢模型动物 +0.03 mg/kg 己烯雌酚阳性对照组. 受试品 (JGYS 药料)、阳性对照品 (仙灵骨葆胶囊药料和粉碎的己烯雌酚片) 均悬浮于 0.5% 羧甲基纤维素钠中. 假手术组和去卵巢模型组动物按 1 mL/100 g 体重灌胃 0.5% 羧甲基纤维素钠, 1 次/d, 连续 90 d. (3) ~ (5) 组灌胃给予受试品药液, 灌胃体积均为 1 mL/100 g 体重、1 次/d、连续 90 d. 阳性对照品均以 1 mL/100 g 体重灌胃给药, 1 次/d, 连续 90 d. 末次给药后取血制备血清, 检测血清碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)、血清钙和血清磷水平, 牺牲动物后检测子宫指数; 双能 X 线检测股骨和腰椎的骨密度和骨矿含量; 原子吸收方法测定股骨和椎骨的骨钙含量. **结果** (1) 对子宫指数的影响: 与模型组比较, 1 200 mg/kg JGYS 可明显降低大鼠的体重, 升高其子宫指数, 600 mg/kg JGYS 降低体重, 增加子宫指数, 300 mg/kg JGYS 对大鼠的体重和子宫指数均无明显影响. 600 mg/kg JGYS 对子宫指数的影响与仙灵骨葆胶囊相当, 但明显弱于己烯雌酚片. (2) 对骨代谢指标的影响: 与模型组比较, 600 和 1 200 mg/kg 的 JGYS 明显降低 ALP 和 TRAP 的活性, 300 mg/kg JGYS 对 ALP 和 TRAP 活性均无明显影响. 600 mg/kg JGYS 对 ALP 和 TRAP 的作用与仙灵骨葆胶囊及己烯雌酚相当. 与去势模型组比较, 3 种剂量的 JGYS 对血钙、血磷水平均无明显影响. (3) 对骨量的影响: 对股骨骨密度和骨矿含量的影响: 与模型组比较, 600、1 200 mg/kg 的 JGYS 明显增加股骨的骨密度和骨矿; 300 mg/kg 的 JGYS 对股骨的骨密度和骨矿均无明显影响. 600 mg/kg JGYS 增加股骨骨密度及骨矿的作用与 500 mg/kg 仙灵骨葆胶囊及 0.03 mg/kg 己烯雌酚相当. 对椎骨骨密度和骨矿含量的影响: 3 种剂量的 JGYS 明显增加椎骨的骨密度和骨矿含量. 300 ~ 1 200 mg/kg 的 JGYS 增加椎骨的骨密度和骨矿含量的作用与 500 mg/kg 的仙灵骨葆胶囊相当; 1 200 mg/kg 的 JGYS 增加椎骨的骨密度作用强于仙灵骨葆胶囊. 对骨湿重、干重、灰重和骨钙含量的影响: 与模型组比较, 600 和 1 200 mg/kg JGYS 均明显增加股骨和椎骨的骨钙含量, 并提高湿重、干重和灰重; 300 mg/kg JGYS 对股骨的上述指标无明显影响, 但增加椎骨的骨钙和骨重. 600 mg/kg JGYS 的作用与 500 mg/kg 仙灵骨葆胶囊相当, 但弱于 0.03 mg/kg 的己烯雌酚. **结论** 在高转换型骨质疏松症模型中, JGYS 具有调节骨代谢、增加骨量和骨密度作用.

[关键词] JGYS; 高转换型骨质疏松症; 骨密度; 骨钙; 骨代谢

[中图分类号] R969.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2015) 01 - 0004 - 08

Effect of JGYS on Ovariectomy-induced Rat High-turnover Osteoporosis

YAO Rong - cheng¹⁾, XIE Yu²⁾, ZHANG Yue²⁾, WANG Zi - wei²⁾, LUO Wen - xi²⁾, FU Ting²⁾, YANG Ren - hua²⁾, SHEN Zhi - qiang²⁾, CHEN Peng²⁾

(1) Dept. of Pharmacy, The First People's Hospital of Qujing City, Qujing Yunnan 655000; 2)

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30660212, 81160401, 81260493); 云南省社会发展计划重点项目 (2008CC009); 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金重点项目 (2013FB103)

[作者简介] 姚荣成 (1965 ~), 男, 云南曲靖市人, 医学学士, 副主任药师, 主要从事医院药学工作.

[通讯作者] 沈志强. E-mail:704896604@qq.com; 陈鹏. E-mail:ynkmcp@gmail.com

Pharmaceutical College & Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products of Yunnan Province, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of JGYS on bone weight, bone mineral density, and bone calcium, and to evaluate the therapeutic effects on ovariectomy (OVX)-induced rat osteoporosis and its dose-effect relationship. **Methods** Female Sprague-dawley (SD) rats were randomly divided into an ovariectomized (OVX) group and a sham operation group. The rats in OVX group were ovariectomized. However, for the rats in sham group, only a part of fat near both ovaries were removed under the same anesthesia and surgical approach. Bone mineral density, mechanical properties, and serum biochemical parameters were examined 90 d after OVX to characterize the experimental animal model. After osteoporotic rat model establishment, rats in OVX group were divided into model group, diethylstilbestrol group, 300 mg/kg, 600 mg/kg, 1 200 mg/kg JGYS groups, and 500 mg/kg Xianlingubao capsule, ten rats in each group. All the above drugs were administered orally for 90 d. Bone mineral density and serum biochemical parameters were examined respectively by dual-energy X-ray absorptiometry analysis and enzyme-linked immunoassay. **Results** (1) Effect on the uterus index: compared with model group, 1200 mg/kg JGYS could obviously reduce the weight of rats, and increase the uterus index; 600 mg/kg JGYS reduced weight and increased the uterus index; 300 mg/kg JGYS had no significant effect on rat weight and the uterus index; the effect on the uterus index of 600 mg/kg JGYS was similar to Xianlingubao capsule, but significantly weaker than diethylstilbestrol. (2) Effect on bone metabolism index: ① the effect on serum ALP, TRAP: compared with the model group, 600 and 1200 mg/kg JGYS could significantly decrease the activity of ALP and TRAP, 300 mg/kg JGYS had no obvious effect on the activity of ALP and TRAP. The function of 600 mg/kg JGYS was similar to Xianlingubao capsule and diethylstilbestrol. ② the effect on the blood calcium and blood phosphorus: compared with OVX group, three doses of JGYS showed no significant effect either on blood calcium or on blood phosphorus levels. (3) Effect on bone mass: ① the effect on femoral bone mineral density and bone mineral content: compared with the model group, 600-1200 mg/kg JGYS groups could significantly increase femoral bone mineral density and bone mineral content; 300 mg/kg JGYS showed no significant effect. The effect of increasing femoral bone mineral density and bone mineral content for 600 mg/kg JGYS was same as 500 mg/kg Xianlingubao capsule and 0.03 mg/kg diethylstilbestrol. ② the effect of vertebral bone mineral density and bone mineral content: three doses of Yishenjiangu tablet obviously increased vertebral bone mineral density and bone mineral content. The effect on increasing the vertebral bone mineral density and bone mineral content was similar to 500 mg/kg Xianlingubao capsule; the 1200 mg/kg JGYS tablet's function for increasing vertebral bone mineral density was better than Xianlingubao capsule. ③ the effect on wet, dry, and ash weight of bone and bone calcium content: compared with the model group, 600 and 1200 mg/kg JGYS significantly increased femoral and vertebral bone calcium content, and increased the content of wet, dry weight and ash weight; 300 mg/kg JGYS had no significant effect on the former index, but increase the calcium and bone of vertebral bone. The function of 600 mg/kg JGYS was similar to 500 mg/kg Xianlingubao capsule, but weaker than 0.03 mg/kg diethylstilbestrol. **Conclusion** JGYS can modulate bone metabolism and increase bone mass, and shows a therapeutic effect on OVX-induced rat osteoporosis in a dose-effect manner.

[Key words] JGYS; High-turnover osteoporosis; Bone mineral density; Bone calcium; Bone metabolism

骨质疏松 (osteoporosis, OP) 是一种全身性代谢性骨骼疾病, 以骨量减少、骨质微观结构退化为特征的, 致使骨脆性增加且易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病^[1], 骨质疏松症以白人尤其是北欧人种多见, 其次为亚洲人, 而黑人少见, 骨密度为诊断骨质疏松症的重要指标, 骨密度值主要决定于遗传因素, 其次受环境因素的影响, 有报道青年双卵

孪生子之间的骨密度差异是单卵孪生子之间差异的 4 倍;而在成年双卵孪生子之间骨密度差异是单卵孪生子的 19 倍^[2]。目前, 治疗骨质疏松的药物主要分为: (1) 抑制破骨细胞活性的药物, 主要有雌激素、降钙素、双膦酸盐、选择性雌激素受体调节剂等; (2) 促进成骨细胞生成的药物, 如氟化物、甲状旁腺激素、他汀类药物等; (3) 促进骨化的

药物, 主要有钙剂和维生素 D 及其衍生物等; (4) 其他, 维生素 K 等. 但在疗效和安全性方面尚存在诸多不足^[3-9].

傣药作为我国四大民族医药之一, 据文字记载已有 2 500 a 历史. 1998 年, 傣族名医李明泰博士在整理、编辑散落在民间的《贝叶经》中, 意外发现了一个用于续筋接骨的重要配方, 并写道: “千年健, 俗称接腰草, 主产于云南勐腊、景洪和广西, 具有祛风湿、强筋骨、止痛消肿之功效. 以千年健为君药, 配伍红花、丹参、三七、杜仲等名贵药材, 即可药到病除.”

JGYS 中药复方制剂通过补益肝肾, 综合有效地调理肝肾功能, 肾主骨, 肾精充足, 髓化生有源而旺盛, 骨得养则骨髓强劲, 从而达到强筋健骨之功效, 治疗因气虚血淤引起的腰腿痛, 麻木等症, 并增强骨组织的免疫能力和延缓骨骼衰老退行性改变, 加快骨组织的修复, 促进骨折愈合. 临床上主要用于骨伤科腰腿痛等症的治疗.

基于上述民族民间用药史和临床应用, 本试验复制高转换型骨质疏松症动物模型, 用现代药理学技术评价三个暴露剂量的受试品 JGYS 对骨重、骨密度、骨钙和骨代谢指标的影响, 研究 JGYS 对实验性骨质疏松症的治疗作用及其剂量-效应关系, 为增加其临床适应症提供科学的药理学实验与理论依据, 有利于促进云南少数民族药物的进一步运用和发展.

1 材料与疗法

1.1 实验动物

Sprague-dawley (SD) 大鼠 70 只, 体重 (250 ± 11.25) g, (SPF 级, 雌性, 来源于昆明医科大学实验动物中心, 苦味酸标记).

1.2 药物

JGYS (薄膜衣片) 为天然药物复方制剂, 主要由千年健、红花、杜仲、淫羊藿等组成. 仙灵骨葆胶囊 (贵州同济堂制药有限公司, 批号 20110709)、己烯雌酚片 (合肥久联制药有限公司, 批号 20110419).

1.3 主要试剂

血清钙、血清磷检测试剂盒 (北京中生北控生物科技股份有限公司), 批号: 20110101; 血清碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 检测试剂盒 (上海荣盛生物技术有限公司), 批号: 20110201; 抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 检测试剂盒 (南京建成

生物工程研究所), 批号: 20111129.

1.4 主要仪器

LIBROR AEG-220 型精密电子秤 (日本岛津); Centra[®] MP4R 型离心机 (IEC 公司); TMS-1024 型 SAPPHIKE 240 全自动生化分析仪 (Tokyo Boeki Medical System LTD); UV-2601 型紫外分光光度计 (北京北分瑞利分析仪器公司); AA-670 型原子吸收分光光度计 (日本岛津); M-525 SII 型马孚炉 (美国 NEY 公司); BS210S 型万分之一天平 (德国 Sartoris); 双能 X 线骨密度测量仪 (EXPERT-XL 型), 美国 Lunar 公司生产.

1.5 方法

1.5.1 摘除 SD 大鼠双侧卵巢, 复制高转换型骨质疏松模型 6 月龄雌性大鼠, 适应性饲养 2 周后, 随机分为 2 组, 即模型组与假手术组 (Sham 组). 按去卵巢 (ovariectomy, OVX) 骨质疏松动物模型要求进行手术, 略有改进, 即 2% 戊巴比妥钠溶液按 40 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 俯卧位固定, 在背部中 1/3 处剪毛, 自腰椎背部中线向下作纵行切口, 长 2~3 cm, 沿肩脚线分别于两侧肋下剪开腰肌, 可见脂肪组织, 其包被下深红色颗粒状组织即卵巢, 下端与其相连的子宫角, 行手术结扎并切断子宫角, 完整切除双侧卵巢, 切口缝合, 完成手术造模. 假手术组大鼠行假手术, 即采用同样的麻醉和手术入路, 找到卵巢后, 切除卵巢附近的部分脂肪后即关闭. 术后所有大鼠按 16 000 U/100 g 肌肉注射青霉素, 1 次/d, 连续 3 d, 防止术后感染. 3 个月后检测骨密度、骨生物力学和骨形态计量学判断模型成功与否, 造模成功后, 再行随机分组. (1) 动物分组: 雌性大鼠随机分成 7 组, 10 只/组, 即: ①假手术组 (未摘除卵巢); ②去卵巢模型组; ③模型动物 + 300 mg/kg JGYS 组; ④模型动物 + 600 mg/kg JGYS 组; ⑤模型动物 + 1 200 mg/kg JGYS 组; ⑥模型动物 + 500 mg/kg 仙灵骨葆胶囊阳性药物对照组; ⑦模型动物 + 0.03 mg/kg 己烯雌酚阳性药物对照组. (2) 给药途径与方法 受试品 (JGYS 药料) 混悬于 0.5% 羧甲基纤维素钠中, 现配现用. 阳性对照品 (仙灵骨葆胶囊药料和碾碎的己烯雌酚片粉末) 悬浮于 0.5% 羧甲基纤维素钠中. 假手术组和去卵巢模型组动物按 1 mL/100 g 体重灌胃 0.5% 羧甲基纤维素钠, 1 次/d, 连续 90 d. 受试品和阳性对照品药液均以 1 mL/100 g 体重灌胃给药, 1 次/d, 连续 90 d. 每周称体重 1 次, 并根据体重调整灌胃量. (3) 取材: 动物于牺牲前禁食 12 h, 末次给药后 2 h, 采用麻醉后腹主动脉取血后, 继续放血牺牲动物. 摘取子

宫、两侧股骨（完整股骨近心端包括股骨头，远心端到膝关节）和第 2、3 腰椎（L₂₋₃）。剔除肌肉的左侧股骨和第 2 腰椎（L₂）将其用浸有 PBS 缓冲液的纱布包裹后，4℃低温保存，依次检测骨密度与骨矿、骨生物力学和骨钙水平。右侧股骨和第 3 腰椎（L₃）置 10% 的中性福尔马林溶液中固定，以备骨组织病理学与形态计量学的检测。

1.5.2 抗高转换型骨质疏松症作用检测指标 (1) 体重和子宫指数 实验结束时再称量各组大鼠体重，动物牺牲后摘取各组大鼠子宫，用滤纸吸干表面水份，随即电子分析天平称重。按下式计算子宫指数：

$$\text{子宫指数} = \frac{\text{子宫重 (g)} \times 1000}{\text{体重 (g)}}$$

(2) 血清钙测定：采用邻甲酚肽络合酮比色法。取邻甲酚肽络合剂 2.5 mL 和二乙胺溶液 2.5 mL 加入试管中；在空白管中加入去离子水 0.05 mL，在标准管中加入 2.5 mmol/L Ca²⁺ 标准 0.05 mL，在测定管中加入血清 0.05 mL，分别均匀。置 37℃保温 10 min，取出待冷却至室温，用 575 nm 波长，以空白调零，读取各管吸光度。

$$\text{血清总Ca}^{2+}(\text{mmol/L}) = \frac{\text{测定管吸光度}}{\text{标准管吸光度}} \times 2.5 \text{ mmol/L}$$

(3) 血清磷测定：采用还原钼蓝法。取显色液 4.0 mL 加入试管中，空白管加入去离子水 0.1

$$\text{TRAP 活力 (U/L)} = \frac{\text{测定管吸光度} - \text{对照管吸光度}}{\text{呈色物微摩尔消光系数}} \times \frac{1}{\text{比色光径} \times \text{反应时间}} \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{取样量}}$$

(6) 股骨和腰椎骨矿物质密度 (bone mineral density, BMD) 及骨矿物质含量 (bone mineral content, BMC) 检测 用双能 X 射线骨密度测量仪分别测量离体的大鼠左侧股骨和第 2 腰椎 (L₂) 的 BMD 和 BMC。利用小动物分析软件进行处理，结果分别以 g/cm² 和 g 表示。

(7) 股骨和腰椎骨钙含量测定：左股骨和第 2 腰椎称湿重并于检测骨密度后置马孚炉 200℃烘烤 5 h，冷却后再次称重，为干重，继之于 750℃烘烤 5 h，冷却后称灰重，称灰重后，用原子吸收分光光度法测骨钙含量。

测定方法：(1) 标准液配制：分析天平精确称取标准 CaCO₃，分别配制成 0.00 mmol/L，0.20 mmol/L，0.40 mmol/L，0.60 mmol/L，0.80 mmol/L，1.00 mmol/L 的 Ca²⁺ 标准液（含 SrNO₃ 21%），上机制作标准曲线（标准曲线 R = 0.9999）。(2) 样品钙含量测定：分析天平精确称取 L₂ 腰椎及左股骨（均已经过 750℃灰化）0.04 g，溶于 5 mL 稀盐酸中（V/V = 42%），振荡至完全溶解。取 20 μL 加

mL，标准管中加入 P³⁺ 标准液 0.1 mL，测定管中加入血清 0.1 mL。混匀后置 37℃水浴 10 min，于 650 nm 波长处，以空白管调零，读取各管吸光度值。

$$\text{血清磷 (mmol/L)} = \frac{\text{测定管吸光度}}{\text{标准管吸光度}} \times 1.29 \text{ mmol/L}$$

(4) 血清 ALP 活性测定 采用磷酸苯二钠法。取缓冲液 0.5 mL 加入试管中；空白管中加入双蒸水 0.05 mL，标准管中加入 0.1 mg/mL 酚标准应用液 0.05 mL，测定管中加入血清 0.05 mL，再各加基质液 0.5 mL，充分混匀，37℃水浴 15 min，加显色剂 1.5 mL，立即混匀。空白管调零，520 nm 处，测各管吸光度。

$$\text{ALP (金氏单位/L)} = \frac{\text{测定管吸光度}}{\text{标准管吸光度}} \times 0.005 \times \frac{100}{0.05}$$

(5) 血清 TRAP 活力测定：采用比色法，按说明书操作。取血清 0.05 mL 加入测定管中，再取石榴石 GBA 底液 0.3 mL 和亚硝酸钠溶液 0.5 mL 加入试管中，混匀，37℃准确反应 15 min 后；试管中加入萘酚 AS-BI 磷酸溶液 0.5 mL，再次混匀，37℃准确反应 15 min 后；取醋酸溶液 1.0 mL 和酒石酸盐溶液 0.1 mL 加入试管中，取血清 0.05 mL 加入对照管中，混匀，室温静置 5 min，530 nm，1 cm 光径，双蒸水调零测各管吸光度。

入 4 980 μL（含 SrNO₃ 21%）的三蒸水中，稀释 250 倍后上机测定。骨钙含量用下列公式计算：

$$\text{骨钙(mg/g骨灰重)} = \frac{\text{测定值} \times 40 \times 5 \times 250/1000}{\text{样品骨灰重}}$$

1.6 统计学处理

用 IBM SPSS 20 版统计软件处理所得数据。组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，LSD 方法统计，结果均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对体重和子宫指数的影响

与假手术组比较，去卵巢模型组动物的体重明显增加，而子宫指数则显著降低，差异有统计学意义 (P < 0.01)；与模型组比较，1 200 mg/kg JGYS 可明显降低大鼠的体重，升高其子宫指数 (P < 0.01)，600 mg/kg JGYS 降低体重、增加子宫指数 (P < 0.05)，300 mg/kg JGYS 对体重和子宫指数均无明显影响。500 mg/kg 的仙灵骨葆胶囊和

0.03 mg/kg 的己烯雌酚均显著降低体重, 同时增加其子宫指数 ($P < 0.01$)。600 mg/kg JGYS 对子宫指数的影响与仙灵骨葆胶囊相当 ($P > 0.05$), 但明显弱于己烯雌酚片 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 对血清钙、血磷的影响

血清 Ca^{2+} 含量检测结果显示: 与假手术组比较, 去势模型组的血钙无明显变化 ($P > 0.05$)。与去势模型组比较, 3 种剂量的 JGYS、仙灵骨葆胶囊及己烯雌酚对 Ca^{2+} 水平均无明显影响 ($P > 0.05$), 见表 2。血清磷含量检测结果显示: 大鼠去卵巢后血磷含量虽有升高趋势, 但无统计学意义 ($P > 0.05$), 与假手术组比较。与模型组比较, 3 种剂量的 JGYS、仙灵骨葆胶囊及己烯雌酚虽有降低血磷趋势, 亦无统计学差异 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 对血清 ALP 和 TRAP 的影响

与假手术组比较, 去势模型组的 ALP 和 TRAP 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 600 和 1 200 mg/kg 的 JGYS 明显降低 ALP 和 TRAP 的水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 300 mg/kg JGYS 对 ALP 和 TRAP 水平均无明显影响 ($P > 0.05$); 仙灵骨葆胶囊和己烯雌酚均明显降低 ALP 和 TRAP 水平 ($P < 0.05$)。600 mg/kg JGYS 对 ALP 和 TRAP 的作用与仙灵骨葆胶囊及己烯雌酚相当 ($P > 0.05$), 见表 3。

2.4 对骨矿物质密度 (BMD) 及骨矿物质含量 (BMC) 的影响

(1) 对股骨骨密度和骨矿含量的影响: 与假手术组比较, 模型组股骨的骨密度和骨矿水平均显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 600、1 200 mg/kg 的 JGYS、仙灵骨葆胶囊和己烯雌酚均明显增加股骨的骨密度和骨矿 ($P < 0.01$); 300 mg/kg 的 JGYS 对股骨的骨密度和骨矿均无明显影响。600 mg/kg JGYS 增加股骨骨密度及骨矿的作用与 500 mg/kg 仙灵骨葆胶囊及 0.03 mg/kg 己烯雌酚相

当 ($P > 0.05$), 见表 4。(2) 对 L_2 骨密度和骨矿含量的影响: 与假手术组比较, 模型组 L_2 的骨密度和骨矿含量均显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 三种剂量的 JGYS、500 mg/kg 仙灵骨葆胶囊和 0.03 mg/kg 的己烯雌酚均明显增加 L_2 的骨密度和骨矿含量 ($P < 0.01$)。300 ~ 1 200 mg/kg 的 JGYS 增加 L_2 的骨密度和骨矿含量的作用与 500 mg/kg 的仙灵骨葆胶囊相当 ($P > 0.05$); 1 200 mg/kg 的 JGYS 增加 L_2 的骨密度作用强于仙灵骨葆胶囊 ($P < 0.05$, 与仙灵骨葆胶囊组比较, 见表 4。

2.5 对骨湿重、干重、灰重和骨钙含量的影响

对股骨: 与假手术组比较, 去卵巢模型组股骨的骨钙含量、湿重、干重及灰重均显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 600 和 1 200 mg/kg JGYS、500 mg/kg 仙灵骨葆胶囊及 0.03 mg/kg 己烯雌酚均明显增加股骨的骨钙含量, 并提高湿重、干重和灰重; 300 mg/kg JGYS 对上述指标无明显影响。600 mg/kg JGYS 的作用与 500 mg/kg 仙灵骨葆胶囊相当 (见表 5)。

3 讨论

骨质疏松症是一种常见且易被忽视的代谢性疾病, 具有发病率高、危害性大的特点, WHO 将其列为三大老年病之一。疼痛是骨质疏松症患者最明显, 最直接的症状, 也是骨质疏松症患者生存质量下降以及就诊的最主要的原因之一, 其与骨折发生率成正相关。骨质疏松症疼痛发生的原因主要是骨转换过快, 骨吸收增加。在骨吸收过程中, 骨小梁破坏、消失以及骨膜下皮质骨破坏引发全身骨痛; 临床以腰背疼痛为多见^[7]。据调查有 20% 以上的妇女因骨盆骨折, 在短期内死于血栓栓塞、肺部感染、褥疮等相关并发症。因为贫乏的处理记录和研究只是针对再骨折的预防, 而治疗骨质疏松性骨折

表 1 JGYS 对去卵巢骨质疏松症大鼠体重及子宫指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of JGYS on body weight and index of uterus in ovariectomy-induced osteoporotic rats ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	剂量 (mg/kg)	体重 (g)	子宫指数
假手术组	10	-	364.30 ± 15.46	3.17 ± 0.67
去卵巢模型组	10	-	410.20 ± 29.13**	1.73 ± 0.75**
JGYS 组	10	300	401.30 ± 25.83	1.97 ± 0.88
	10	600	379.60 ± 21.07 [△]	2.72 ± 0.64 [△]
	10	1 200	378.30 ± 27.19 ^{△△}	2.88 ± 0.75 ^{△△}
仙灵骨葆胶囊组	10	500	374.40 ± 21.86 ^{△△}	2.79 ± 1.13 ^{△△}
己烯雌酚片组	10	0.03	377.60 ± 35.27 ^{△△}	3.13 ± 1.15 ^{△△}

与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与去卵巢模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ 。

表 2 JGYS 去卵巢骨质疏松症大鼠血清钙、磷含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 2 Effect of JGYS on contents of serum calcium and phosphorus in ovariectomy-induced osteoporotic rats ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	剂 量 (mg/kg)	Ca ²⁺ (mmol/L)	P ³⁺ (mmol/L)
假手术组	10	-	2.74 ± 0.11	1.97 ± 0.30
去卵巢模型组	10	-	2.71 ± 0.11	2.36 ± 0.88
JGYS 组	10	300	2.68 ± 0.07	2.05 ± 0.49
	10	600	2.70 ± 0.13	2.10 ± 0.64
	10	1 200	2.79 ± 0.09	2.11 ± 0.42
仙灵骨葆胶囊组	10	500	2.72 ± 0.13	2.05 ± 0.31
己烯雌酚片组	10	0.03	2.74 ± 0.10	2.09 ± 0.38

表 3 JGYS 去卵巢骨质疏松症大鼠血清 ALP 和 TRAP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 3 Effect of JGYS on levels of ALP And TRAP in ovariectomy-induced osteoporotic rats ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	剂 量 (mg/kg)	ALP (U/L)	TRAP (U/L)
假手术组	10	-	96.70 ± 37.48	11.43 ± 1.96
去卵巢模型组	10	-	189.50 ± 57.67**	20.95 ± 6.97**
JGYS 组	10	300	178.50 ± 38.58	19.45 ± 8.03
	10	600	141.00 ± 32.53 [△]	14.80 ± 5.21 [△]
	10	1 200	138.80 ± 46.64 [△]	12.20 ± 4.98 ^{△△}
仙灵骨葆胶囊组	10	500	135.90 ± 33.39 [△]	13.19 ± 7.31 [△]
己烯雌酚片组	10	0.03	106.60 ± 41.90 ^{△△}	12.89 ± 6.54 [△]

与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与去卵巢模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$.

表 4 JGYS 对去卵巢骨质疏松症大鼠股骨和 L2 骨矿物质密度 (BMD) 及骨矿物质含量 (BMC) 的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 4 Effect of JGYS on contents of BMD And BMC in ovariectomy-induced osteoporotic rats ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	剂 量 (mg/kg)	股 骨		L ₂	
			BMD (g/cm ²)	BMC(g)	BMD (g/cm ²)	BMC(g)
假手术组	10	-	0.20 ± 0.01	0.49 ± 0.06	0.18 ± 0.01	0.15 ± 0.04
去卵巢模型组	10	-	0.16 ± 0.01**	0.35 ± 0.06**	0.11 ± 0.01**	0.06 ± 0.01**
JGYS 组	10	300	0.17 ± 0.07	0.38 ± 0.02	0.12 ± 0.01**	0.08 ± 0.02 [△]
	10	600	0.18 ± 0.02 ^{△△}	0.45 ± 0.07 ^{△△}	0.15 ± 0.02 ^{△△}	0.11 ± 0.03 ^{△△}
	10	1 200	0.19 ± 0.01 ^{△△}	0.46 ± 0.07 ^{△△}	0.17 ± 0.02 ^{△△▲}	0.12 ± 0.04 ^{△△}
仙灵骨葆胶囊组	10	500	0.18 ± 0.02 ^{△△}	0.46 ± 0.07 ^{△△}	0.15 ± 0.01 ^{△△}	0.10 ± 0.03 ^{△△}
己烯雌酚片组	10	0.03	0.18 ± 0.02 ^{△△}	0.47 ± 0.07 ^{△△}	0.16 ± 0.02 ^{△△}	0.13 ± 0.04 ^{△△}

与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.01$, ^{△△} $P < 0.01$; 与仙灵骨葆胶囊组比较, [▲] $P < 0.05$.

表 5 JGYS 对去卵巢骨质疏松症大鼠股骨骨钙和重量的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 5 Effect of JGYS on femur bone weight and bone calcium contents in ovariectomy-induced osteoporotic rats ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	剂 量 (mg/kg)	骨 钙 (mg/g)	股骨重 (g)		
				湿重	干重	灰重
假手术组	10	-	627.8 ± 36.7	0.95 ± 0.10	0.70 ± 0.08	0.49 ± 0.07
去卵巢模型组	10	-	465.5 ± 39.9**	0.68 ± 0.08**	0.44 ± 0.08**	0.30 ± 0.07**
JGYS 组	10	300	488.1 ± 30.0	0.69 ± 0.06	0.48 ± 0.05	0.33 ± 0.05
	10	600	526.5 ± 39.5 ^{△△}	0.78 ± 0.06 [△]	0.54 ± 0.06 ^{△△}	0.37 ± 0.07 [△]
	10	1 200	536.0 ± 30.3 ^{△△}	0.82 ± 0.05 ^{△△}	0.57 ± 0.06 ^{△△}	0.42 ± 0.05 ^{△△}
仙灵骨葆胶囊组	10	500	531.3 ± 40.0 ^{△△}	0.78 ± 0.06 [△]	0.56 ± 0.08 ^{△△}	0.38 ± 0.04 [△]
己烯雌酚片组	10	0.03	540.2 ± 35.4 ^{△△}	0.84 ± 0.05 ^{△△}	0.56 ± 0.07 ^{△△}	0.42 ± 0.09 ^{△△}

与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$.

表 6 JGYS 对去卵巢骨质疏松症大鼠椎骨骨钙和重量的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 6 Effect of JGYS on on vertebra bone weight and bone calcium contents in variectomy -induced osteoporotic rats ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	剂量 (mg/kg)	骨钙 (%)	椎骨重 (g)		
				湿重	干重	灰重
假手术组	10	-	421.0 ± 29.1	0.72 ± 0.08	0.42 ± 0.08	0.19 ± 0.04
去卵巢模型组	10	-	307.9 ± 21.1**	0.51 ± 0.07**	0.25 ± 0.05**	0.11 ± 0.03**
JGYS 组	10	300	329.1 ± 21.9 [△]	0.57 ± 0.05 [△]	0.29 ± 0.04 [△]	0.13 ± 0.02
	10	600	341.8 ± 28.1 ^{△△}	0.60 ± 0.05 ^{△△}	0.32 ± 0.05 ^{△△}	0.14 ± 0.02 [△]
	10	1 200	348.2 ± 24.3 ^{△△}	0.64 ± 0.05 ^{△△}	0.35 ± 0.06 ^{△△}	0.15 ± 0.02 ^{△△}
仙灵骨葆胶囊组	10	500	345.8 ± 30.3 ^{△△}	0.60 ± 0.03 ^{△△}	0.33 ± 0.06 ^{△△}	0.14 ± 0.03 [△]
己烯雌酚片组	10	0.03	350.6 ± 30.3 ^{△△}	0.64 ± 0.06 ^{△△}	0.36 ± 0.05 ^{△△}	0.16 ± 0.03 ^{△△}

与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

已经失去治疗最佳的时机, 给个人、家庭和社会造成沉重的负担。

中医将骨质疏松归为“骨痿”、“骨痹”、“骨枯”等范畴, 并且基于“肾主骨”的理论, 中医普遍采用补肾的方法来治疗骨质疏松症。现代医学研究证实, 肾虚患者的下丘脑-垂体-性腺轴功能减退, 致骨形成与骨吸收平衡破坏, 骨组织显微结构受损而导致骨质疏松症。

目前关于 OP 动物模型建立的方法主要有双侧卵巢摘除法(去势法)、维甲酸法、糖皮质激素诱导法、营养法、人工法等。其中双侧卵巢摘除法最常用, 现代医学认为, 由于绝经后因雌激素缺乏造成中老年妇女骨质疏松已成共识, 在实验研究方面, OVX 大鼠和绝经后骨质疏松症所出现的骨丢失情况有许多共同之处, 得到美国 FDA 的认可。本研究应用切除大鼠双侧卵巢复制人类绝经后骨质疏松症模型, 其机理是由于去卵巢大鼠体内雌激素水平降低, 骨代谢呈负平衡状态, 骨吸收相对增强, 骨量逐渐丢失, 形成高转换型骨质疏松。

本实验结果显示, 去势模型组大鼠体重上升, 明显高于模型组, 600 和 1 200 mg/kg JGYS 明显降低体重, 增加子宫指数。由于 OVX 大鼠体内雌激素水平降低, 骨代谢呈负平衡状态, 骨吸收相对增强, 骨量逐渐丢失, 形成 OP, 而 OVX 动物的体重快速增长现象为机体抵抗去卵巢对骨骼影响的一种自我保护性反应, 可以部分抑制 OVX 大鼠的骨丢失, 但不能完全阻止其发展。

本实验模型组动物血清钙、磷均无明显变化, 而且 3 种剂量的 JGYS 对血钙、血磷水平均无明显影响。

ALP 主要来源于骨组织与肝脏, 当肝功能正常时, 总 ALP 水平可代表骨代谢的变化(主要是成骨作用)。骨 ALP 来自成骨细胞, 其活性大小直

接反映成骨细胞的活性。成骨活跃时, 成骨细胞分泌大量 ALP, 一部分参与骨的钙化, 即在骨钙化区水解磷脂, 释放的磷酸根与钙以沉淀的方式沉积在胶原骨架上, 发生骨矿化作用; 另一部分释放入血, 使血中酶活性增强, 因此 ALP 是评价机体的成骨活性和骨组织钙化能力相对特异性的指标^[8]。抗酒石酸性磷酸酶 (TRAP) 是一种化学作用同 ALP 类似的酶, 只是在酸性环境下发挥作用。它主要存在于骨、前列腺、红细胞、血小板和脾脏中。排除了其他系统疾病后, 血清中 TRAP 的变化则主要反映骨的代谢情况, 尤其是骨的吸收作用。骨性 TRAP 由破骨细胞释放, 在骨吸收时对骨质的溶解起重要作用。当骨吸收活跃时, 反映在血中酶活性明显上升, 是反映骨吸收的特征性指标^[9]。因此, 血中 ALP 和 TRAP 水平可分别反映成骨细胞及破骨细胞的功能。本实验中去卵巢大鼠由于雌激素减少或缺乏使其对破骨细胞的抑制作用解除, 骨吸收显著增加, 随之骨形成也增加, 使得 ALP 活性增加, 表明去势大鼠成骨细胞活跃, 骨转换增强, 是对破骨作用过强的一种代偿性反应。TRAP 活力也明显升高, 提示骨偶联过程失衡, 破骨细胞性骨吸收作用超过了成骨细胞性骨形成作用, 导致净骨量减少, 产生高转换型骨质疏松。女性绝经后骨质疏松症是由于骨更新率增加所致, 即骨吸收与骨形成作用同时增强, 但由于骨吸收相对大于骨形成, 骨量不能维持平衡而逐渐丢失, 表现于骨组织上即为骨量持续减少^[10]。与模型组比较, 600 和 1 200 mg/kg 的 JGYS 明显降低 ALP 和 TRAP 的活性, 300 mg/kg JGYS 对 ALP 和 TRAP 活性均无明显影响。600 mg/kg JGYS 对 ALP 和 TRAP 的作用与仙灵骨葆胶囊及己烯雌酚相当。本试验结果提示 JGYS 具有剂量依赖性调节骨代谢作用。

模型组大鼠股骨和椎骨湿重、干重和灰重均下

降、骨钙含量明显减少。600和1 200 mg/kg JGYS均明显增加股骨和椎骨的骨钙含量,并提高湿重、干重和灰重;300 mg/kg JGYS对股骨的上述指标无明显影响,但增加椎骨的骨钙和骨重,提示JGYS有增加骨量的作用。600 mg/kg JGYS的作用与500 mg/kg仙灵骨葆胶囊相当,但弱于0.03 mg/kg的己烯雌酚。

骨形态学、骨密度更能反映早期的骨的变化,这种变化发展下去可能会影响骨的力学性能^[1]。由于OVX后骨量丢失主要发生在以骨小梁为主的松质骨,松质骨处于高转换状态,骨吸收大于骨形成导致骨丢失,而皮质骨代谢却不同,松质骨骨量的减少造成皮质骨受力明显增加,加之体重的增加,皮质骨发生适应性变化,骨内膜吸收增加,骨髓腔面积增大,骨外膜成骨增加,早期皮质骨骨量不减少,甚至增加,所以总的骨量增加,但又由于松质骨比皮质骨的表面积大得多,所以骨密度可以准确地反映单位面积的骨骼变化(主要松质骨),而骨矿只能反映大鼠整体的骨量变化。本实验模型组大鼠椎骨和股骨的骨密度及骨矿含量明显降低。与模型组比较,600、1 200 mg/kg的JGYS明显增加股骨的骨密度和骨矿,且600 mg/kg JGYS增加股骨骨密度及骨矿的作用与500 mg/kg仙灵骨葆胶囊及0.03 mg/kg己烯雌酚相当。三种剂量的JGYS明显增加椎骨的骨密度和骨矿含量,且300 mg/kg的JGYS增加椎骨的骨密度和骨矿含量的作用与仙灵骨葆胶囊相当。综合以上结果,提示JGYS可能通过调节成骨与破骨的平衡、提高骨钙含量和增加骨矿水平来发挥增加股骨和椎骨骨密度的作用。

雌激素对OVX大鼠骨质疏松模型有十分肯定的防治作用。研究表明己烯雌酚对去卵巢大鼠和去势雄鼠均具有抗骨质疏松作用^[12,13]。仙灵骨葆胶囊为纯中药制剂,金慰芳等^[14]研究表明仙灵骨葆胶囊具有明显治疗大鼠实验性骨质疏松症效果。现代中医药研究已经从淫羊藿、补骨脂等中草药中提取出异黄酮类物质,具有类雌激素样作用,可促进成骨细胞增殖及增强其活性并抑制破骨细胞,调节IL-6等细胞因子,从而促进骨形成,抑制骨吸收^[13,15,16]。临床研究也提示其具有明确的抑制骨吸收、增加骨量、提高骨密度和降低骨折率并缓解骨痛作用。本研究采用仙灵骨葆胶囊、己烯雌酚阳性对照药,实验结果与上述文献报道基本符合。

综上所述,在高转换型骨质疏松症模型中,JGYS具有调节骨代谢、增加骨量和提高骨密度作用,提示JGYS对实验性骨质疏松症有较好的治疗作用并呈剂量-效应关系。

[参考文献]

- [1] CHRISTIANSEN C. Osteoporosis: diagnosis and management today and tomorrow [J]. *Bone*, 1995, 17(5): 513S - 516S.
- [2] 秦岭. 骨科研究互联网相关网页介绍 [J]. *医用生物力学*, 2003, 18 (2): 125 - 128.
- [3] BINKLEY N, KRUEGER D. Combination therapy for osteoporosis: considerations and controversy [J]. *Curr Osteoporosis Rep*, 2005, 3 (4): 150 - 154.
- [4] ODVINA C V, ZERWEKH J E, RAO D S, et al. Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90 (3): 1 897 - 1 899.
- [5] MACLEAN C, NEWBERRY S, MAGLIONE M, et al. Systematic review: comparative effectiveness of treatments to prevent fractures in men and women with low bone density or osteoporosis [J]. *Ann Intern Med*, 2008, 148(3): 197 - 213.
- [6] FINKELSTEIN J S, HAYES A, HUNZELMAN J L, et al. The effects of parathyroid hormone, alendronate, or both in men with osteoporosis [J]. *N Engl J Med*, 2003, 349 (13): 1 216 - 1 226.
- [7] 钟华载. 针刺对骨质疏松症患者疼痛影响的临床观察 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.
- [8] DAHL S G, ALLAIN P, MARIE P J, et al. Incorporation and distribution of strontium in bone [J]. *Bone*, 2001, 28 (4): 446 - 453.
- [9] MATTHEW J S, MICHAEL D B, BRIAN A. Morphological and mechanical properties of caudal vertebrae in the SAMP6 mouse model of senile osteoporosis [J]. *Bone*, 2004, 35 (7): 425 - 431.
- [10] FROST H M. The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporosis and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents [J]. *Bone Miner*, 1987, 2 (2): 73 - 85.
- [11] DAHL S G, ALLAIN P, MARIE P J, et al. Incorporation and distribution of strontium in bone [J]. *Bone*, 2001, 28 (4): 446 - 453.
- [12] MATTHEW J S, MICHAEL D B, BRIAN A. Morphological and mechanical properties of caudal vertebrae in the SAMP6 mouse model of senile osteoporosis [J]. *Bone*, 2004, 35 (8): 425 - 431.
- [13] 邹丽宜, 吴铁. 糖皮质激素与骨质疏松 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2003, 9 (2): 177 - 180.
- [14] 金慰芳, 高建军, 王洪复. 骨质疏松大鼠模型药效研究中阳性对照药物的应用 [J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2008, 1(2): 144 - 148.
- [15] 李恩, 薛延, 王洪复, 等. 骨质疏松鉴别诊断与治疗 [M]. 北京: 北京人民出版社, 2005: 95.
- [16] 朱静, 周彬, 刘建. 糖皮质激素诱发的骨质疏松症 [J]. *四川医学*, 2002, 6 (23): 648 - 649.

(2014 - 11 - 05 收稿)