

复方葛根片对维甲酸诱导骨质疏松模型大鼠的治疗作用

路其康^{1*}, 顾正位¹, 毕云生², 张淑瑜², 杨文超¹, 于燕莉^{2#}(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 济南军区总医院药剂科, 济南 250031)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4804-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.17

摘要 目的: 研究复方葛根片对维甲酸致大鼠骨质疏松的影响。方法: 采用ig维甲酸溶液15 d的方法建立骨质疏松模型; 设立正常组。将造模成功后的大鼠随机分为模型对照组、仙灵骨葆胶囊[0.32 g/(kg·d)]阳性对照组及复方葛根片低、高剂量[0.24、0.4 g/(kg·d)]组($n=8$), ig 6周。取血清样本测定血清钙(s-Ca)、血清磷(s-P)、碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(BGP)的水平, 采用骨密度仪测定骨密度(BMD)、骨矿物质含量(BMC)、骨影面积(BIA)和肌肉含量(MC), 并观察骨密度扫描结果。结果: 与正常组比较, 模型对照组大鼠s-Ca、BMD、BMC、MC水平降低, BGP水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型对照组比较, 复方葛根片组各相关指标及骨密度扫描结果均有改善, 其中高剂量组s-Ca、s-P、ALP、BMD、MC水平升高, BGP水平降低, 低剂量组BMD、MC水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论: 复方葛根片可以改善维甲酸致大鼠骨质疏松。

关键词 复方葛根片; 维甲酸; 骨质疏松模型; 大鼠; 骨密度

Effect of Compound Pueraria Tablets on Osteoporosis Model Rats Induced by Retinoic Acid

LU Qi-kang¹, GU Zheng-wei¹, BI Yun-sheng², ZHANG Shu-yu², YANG Wen-chao¹, YU Yan-li²(1. School of Pharmacy, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China; 2. Dept. of Pharmacy, General Hospital of Jinan Military Command, Jinan 250031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effect of Compound pueraria tablets on osteoporosis model rats induced by retinoic acid. METHODS: The osteoporosis model was induced by intragastric administration of retinoic acid solution for 15 days; normal group was established. After modeling, the rats were randomly divided into model control group, Xianling gubao capsule [0.32 g/(kg·d)] positive control group, Compound pueraria tablets low-dose and high-dose [0.24, 0.4 g/(kg·d)] groups ($n=8$). After 6 weeks of ig, the serum sample was collected to determine the levels of serum calcium (s-Ca), serum phosphorus (s-P), ALP and bone gla protein (BGP); bone density instrument was used to detect the contents of bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC), bone image area (BIA) and muscle content (MC); the results of compact bone substance scanning were observed. RESULTS: Compared with normal group, the levels of s-Ca, BMD, BMC and MC in rats were decreased in model control group, while the level of BGP was increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model control group, related index and compact bone substance scanning of Compound pueraria tablets groups were all improved; the levels of s-Ca, s-P, ALP, BMD and MC were increased in Compound pueraria tablets high-dose group, while the level of BGP was decreased; the levels of BMD and MC were increased significantly in Compound pueraria tablets low-dose group ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: Compound pueraria tablets can improve the osteoporosis induced by retinoic acid in rats.

KEYWORDS Compound pueraria tablets; Retinoic acid; Osteoporosis model; Rat; Bone density

骨质疏松(Osteoporosis)是一种很常见的多因素老年性疾病, 尤其常见于绝经后女性, 其特征是骨量下降和骨的微细结构破坏, 表现为骨的脆度增加, 从而增加了骨折的危险性。临床上治疗该症时多采用激素代替疗法(如雌二醇)、选择性雌激素受体调节剂、二磷酸盐类(如利塞膦酸)、降钙素和维生素D等, 但治疗效果有限^[1], 且长时间大量应用雌激素可使乳腺癌和子宫内膜癌等生殖系统癌症的发病率显著升高, 过高的血钙也会导致钙在心脑血管的沉积而诱发心脑血管疾病。

复方葛根片系济南军区总医院制剂, 处方被《中国人民解放军医疗机构制剂规范》(2002年增补版)收录, 由葛根、丹参、茵陈和延胡索组成, 具有活血化瘀、和氣止痛、生津养心

之功效^[2], 临床上主要用于冠心病、心绞痛、心肌梗死等疾病的治疗。其中葛根升阳止泻、通经活络, 能增加未成熟小鼠子宫的质量, 具有与雌二醇相同的抗骨质疏松效果^[3]。丹参活血祛瘀、通经止痛, 能减轻局部淤血、改善局部循环; 其中的丹参酮能减缓雌激素水平降低、抑制骨转换, 进而可防治骨质疏松^[4]。复方葛根片主要含有的葛根素、大豆苷、大豆苷元等异黄酮类, 丹参酮II A、丹酚酸类成分, 绿原酸、延胡索乙素等生物碱类成分均具有较强的药理活性。因此, 笔者在本文中探讨复方葛根片对骨质疏松症模型大鼠的治疗作用及其机制, 为进一步拓展其临床治疗范围, 同时也为该医院制剂申报国家新药提供研究资料。

1 材料

1.1 仪器

AU 5800型全自动生化分析仪、DXC800型全自动生化分析仪(美国Beckman Coulter公司); Cobas e601型全自动电化

* 硕士研究生。研究方向: 中药学。E-mail: 15953181250@163.com

通信作者: 主任药师, 硕士生导师, 硕士。研究方向: 中药质量控制与药理学。电话: 0531-51666293。E-mail: yuyanli323@sohu.com

学发光分析仪(瑞士Roche公司);IMMULITE2000型全自动化学发光免疫分析仪(德国Siemens公司);XR-600型双能X线骨密度仪(美国Norland公司);TGL-16G-A型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

维甲酸原料药(上海海曲化工有限公司,批号:03-003-1410001,纯度:≥98%);复方葛根片(济南军区总医院药剂科制剂室,批号:20140504,规格:每片0.4g,按生药量计每片0.3g,成人用量:每次2片,tid);仙灵骨葆胶囊(贵州同济堂制药有限公司,批号:1312010,规格:每粒0.5g);水合氯醛溶液(济南军区总医院药剂科制剂室,批号:20141221,规格:30ml:3g);骨钙素(BGP)放射免疫试剂盒(上海瑞齐生物科技有限公司,批号:201407);血清碱性磷酸酶(ALP)、血清磷(s-P)、血清钙(s-Ca)试剂盒等(上海柯丰生物科技有限公司)。

1.3 动物

健康Wistar大鼠56只,♀♂各半,体质量(200±20)g,山东大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(鲁)2013-0009。大鼠饲养于济南军区总医院实验动物中心,由获得资格认可的人员饲养。

2 方法

2.1 动物分组与给药

大鼠适应性喂养1周后,随机取16只作为正常组,其余纳入维甲酸组。维甲酸组ig维甲酸溶液(配制成1.5g/100ml的溶液,给药量为1ml/100g),正常组给予等量的生理盐水,qd。15d后,从维甲酸组随机选取8只,与正常组8只比较检测造模是否成功;然后将维甲酸组的其余大鼠随机均分为模型对照组、阳性对照组与复方葛根片低、高剂量组。阳性对照组ig仙灵骨葆胶囊[给予生药量为0.32g/(kg·d),用水配制成3.2g/100ml的溶液],复方葛根片低、高剂量组分别给予复方葛根片[给予生药量为0.24、0.4g/(kg·d),用水分别配制成2.4g/100ml、4g/100ml的溶液]。其中给予生药量(g)=成人用药量(g)/成人体质量(kg)×大鼠体质量(g)×R,成人体质量按60kg计,R为剂量倍数,阳性对照组与复方葛根片低、高剂量组的R值分别按6、8、10计。剩余的8只正常组大鼠、模型对照组大鼠均给予等量的生理盐水,qd。各组大鼠ig6周,每周称体质量1次,按体质量调节给药量。

2.2 检测指标

2.2.1 造模指标检测 造模15d后,于末次给药后12h(禁食不禁水),对正常组和维甲酸组的各8只共16只大鼠,用水合氯醛溶液(0.2ml/g)腹腔注射麻醉,分离出大鼠的四肢股骨和腰椎骨,取右后肢股骨置于骨密度仪扫描台上进行分析检测,测定骨密度(BMD)、骨矿物质含量(BMC)、骨影面积(BIA)和肌肉含量(MC),按文献[5]方法计算T评分(T值低于-2.5表明为骨质危险度增加)。

2.2.2 给药后的指标检测 各组大鼠于末次给药后12h(禁食不禁水),用水合氯醛溶液(0.2ml/g)腹腔注射麻醉,将麻醉后大鼠直接放在骨密度仪下进行扫描分析;腹腔动脉取血(注入加分离胶的真空管),离心出血清,置于-20℃冰箱保存,按照试剂盒说明书要求测定血清学各指标即s-Ca、s-P、ALP和BGP(取血量为3ml)。截取大鼠四肢,只剥去皮毛,留下肌肉组织,取样本置于骨密度测量仪的扫描台上进行分析检测,测定骨影像学指标BMD、BMC、BIA和MC,并采用双能X线骨密度仪扫描大鼠后肢股骨骨密度图(采用高能准直器,矩阵:256×

1024,放大倍数:1.0倍,速度:12cm/min显像)。

2.3 统计学方法

所有数据均采用SPSS软件计算,以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和t检验,判断其差异是否有统计学意义(置信区间为95%, $P < 0.05$)。

3 结果

3.1 造模指标检测

以维甲酸连续灌胃15d后,维甲酸组BMD水平呈下降趋势($P < 0.05$),MC显著降低($P < 0.01$),与正常组比较差异有统计学意义;另外,BMC、BIA也均有降低,且T评分低于-2.5。在饲养过程中还发现大鼠表现出不同程度的毛色发黄、身体无力、活动减少、拱背竖毛等现象,这表明维甲酸诱导大鼠骨质疏松模型已成功。正常组与维甲酸组各指标测定结果详见表1。

表1 两组大鼠BMD、BMC、BIA、MC测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)
Tab 1 BMD, BMC, BIA and MC of rats in 2 groups ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	BMD, g/cm ²	BMC, g	BIA, cm ²	MC, g	T评分
正常组	0.215 1±0.013	2.416±0.76	11.23±0.97	264.1±23	
维甲酸组	0.190 9±0.017*	2.044±0.64	10.71±0.74	107.2±16**	-2.71

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.2 给药后各指标检测

3.2.1 血清学指标 与正常组比较,模型对照组s-Ca含量降低($P < 0.05$),BGP水平显著升高($P < 0.01$),表明维甲酸诱导的骨质疏松模型并未恢复。与模型对照组比较,阳性对照组血清中s-Ca、s-P含量及ALP水平都有所增加,复方葛根片低、高剂量组s-Ca、s-P含量增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),特别是高剂量组;且高剂量组ALP显著升高($P < 0.01$)、BGP降低($P < 0.05$),且优于阳性对照组,表明复方葛根片能有效改善模型大鼠骨质疏松。各指标检测结果详见表2。

表2 各组大鼠血清学指标检测结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Serology index of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	s-Ca, mmol/L	s-P, mmol/L	ALP, U/L	BGP, ng/ml
正常组	2.61±0.54	2.37±0.11	71.33±4.93	14.48±0.17
模型对照组	2.14±0.32*	1.98±0.12	58.83±3.13	30.57±1.04**
阳性对照组	2.39±0.15	2.46±0.70	110.75±3.59	17.17±0.78
复方葛根片低剂量组	2.24±0.42	2.55±0.79	75.83±5.71	21.38±0.63
复方葛根片高剂量组	2.50±0.39 [#]	3.01±0.37 ^{##}	122.33±5.32 ^{###}	15.51±0.42 [#]

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

3.2.2 骨影像学指标 与正常组比较,模型对照组的BMC、BMD水平下降($P < 0.05$)。与模型对照组比较,阳性对照组和复方葛根片组的BMC、BMD都有所增加,其中复方葛根片高剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$),表明复方葛根片可以提高BMC含量、增加BMD,从而改善骨质疏松。

与6周前比较,模型对照组的MC有所增加,但依然比正常组水平低($P < 0.05$)。与模型对照组比较,阳性对照组与复方葛根片高剂量组的MC显著增加($P < 0.01$),其中复方葛根片高剂量组的增加更明显。各指标检测结果见表3,骨密度扫描图见图1。

表3 各组大鼠骨影像学指标检测结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 3 Bone imaging index of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	BMD,g/cm ²	BMC,g	BIA,cm ²	MC,g	T评分
正常组	0.214 9±0.027	2.374±0.74	11.05±1.67	262.9±16	
模型对照组	0.190 2±0.043*	2.078±0.38*	10.92±1.75	198.2±24*	-2.64
阳性对照组	0.198 2±0.012	2.106±0.33	10.62±1.14	276.1±33 ^{##}	-1.21
复方葛根片低剂量组	0.196 6±0.019 [#]	2.102±0.24	10.69±0.93	241.2±18 [#]	-1.53
复方葛根片高剂量组	0.201 5±0.023 [#]	2.105±0.36	10.45±1.91	297.1±27 ^{##}	-0.93

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型对照组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

Note: vs. normal group, * $P<0.05$; vs. model control group, [#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

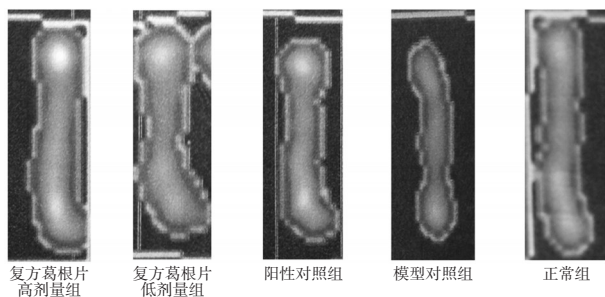


图1 各组大鼠骨密质扫描图

Fig 1 Compact bone substance scanning of rats in each group

由图1可见,与正常组比较,模型对照组骨干的骨密质地疏松,骨髓腔暗淡,骨松质内红骨髓减少;与模型对照组比较,阳性对照组、复方葛根片高低剂量组的骨密质改善明显,尤其是高剂量组的骨密质地坚硬致密,骨松质内红骨髓增加。

4 讨论

研究发现,维甲酸存在诱导骨质疏松的副作用,能在短时间内致大鼠股骨平均骨小梁宽度、骨小梁面积百分比减少,雌激素2水平下降,使得雌激素的分泌减少,刺激破骨细胞的活性增强^[6]。推测其可能通过激活破骨细胞促进骨吸收,使骨处于骨形成小于骨吸收的负动态平衡来诱导形成骨质疏松^[7]。故可采用维甲酸诱导大鼠骨质疏松,其所诱发的病症表现与人类的发病特点、骨形态学表现及骨反应相似,且诱导操作简单、造模周期短、便于给药观察^[7]。如朱虎虎等^[8]用维甲酸灌胃大鼠28 d后,发现其BMD、BMC、骨小梁面积百分比和平均骨小梁宽度明显减少,s-Ca、s-P含量均降低,提示骨质疏松模型复制成功。本实验采用连续ig给予大鼠维甲酸15 d的方式建模,经骨密度仪检测,也证实大鼠的BMD、MC水平皆明显下降($P<0.01$),证实骨质疏松模型造模成功。

ALP主要反映成骨细胞活性和骨形成水平,并且二者水平呈正相关,故本实验中模型对照组与正常组比较,ALP并无显著性差异;而复方葛根片组的ALP有所增加,其中高剂量组显著增加($P<0.01$),这说明复方葛根片能促进骨形成。血清中BGP是由成骨细胞分泌的一种活性多肽,在调节骨代谢中起重要作用,其水平高低可反映成骨细胞活性。本文研究发现,模型对照组比正常组BGP的含量明显增加($P<0.01$),连续给药6周后复方葛根片组BGP的含量明显减少($P<0.05$),且接近于正常组BGP水平,表明复方葛根片能有效改善BGP水平,进而增强成骨细胞活性、加快骨质合成、改善骨质疏松。

BMC和骨基质是组成骨的两大部分。本文中,模型对照

组的s-Ca、s-P的含量明显比正常组的含量低;灌胃给药6周后,与模型对照组比较,复方葛根片低、高剂量组的s-Ca、s-P含量都呈增加趋势,其中复方葛根片高剂量组可显著增加s-P的含量,BMC也有所增加。虽然没有显著的统计学意义,但是通过表1与表3比较,相同时间内,给予复方葛根片比自身恢复Ca、P含量的效果更明显。这说明复方葛根片能有效调节s-Ca、s-P的含量,改善骨矿物质,促进骨代谢。BMD是骨质量的一个重要标志,其可反映骨质疏松程度,是预测骨折危险性的重要依据。本实验中,灌胃给药6周后,复方葛根片低、高剂量组比模型对照组的BMD含量均更高,且接近于正常组水平,表明复方葛根片可以有效提高骨质疏松大鼠的BMD水平,改善骨质疏松。肌肉组织附着在骨骼外面,主要对骨骼发挥保护作用。本文研究发现,同一实验条件下,模型对照组大鼠的MC比正常组明显减少;而给予受试药后,复方葛根片比模型对照组的MC均更高,说明复方葛根片还可以通过改善物质的吸收、增加MC、增强体魄从而保护骨骼。这些都表明复方葛根片能够有效改善维甲酸诱导的模型大鼠的骨质疏松。

仙灵骨葆胶囊具有滋补肝肾、活血通络、强筋壮骨的治疗作用,其处方中含有的补骨脂、淫羊藿含有黄酮类成分,具有植物雌激素样作用,可增加血清BGP、生长激素、血清ALP、s-P;促进骨小梁成熟、成骨细胞增加及髓腔内细胞丰富,促进软骨细胞成熟^[9]。其单独用药能够降低骨转换和抑制骨吸收,与本文研究的复方葛根片作用相似;与其他化学药联合用药更能有效抑制破骨细胞活性、降低骨转换速度,为临床常用药^[10-11],故本实验选其为阳性对照药。

参考文献

- [1] 渠海波,张朝,吴刚.骨质疏松的研究进展[J].包头医学院学报,2013,29(3):119.
- [2] 总后勤部卫生部.中国人民解放军医疗机构制剂规范:增补本[S].2002年版.北京:人民军医出版社,2007:21.
- [3] 王新祥,张允岭,吴坚,等.葛根对骨质疏松模型小鼠骨密度和骨组织构造的作用[J].中国骨质疏松杂志,2008,14(5):349.
- [4] 周延萌,刘玉波,高允生.丹参酮对维甲酸致小鼠骨质疏松的防治作用[J].中国中药杂志,2010,35(21):2923.
- [5] 虞进波,章振林,张浩,等.女性骨面积大小与骨密度的关系[J].上海医学,2008,31(4):234.
- [6] 许鹏,郭雄,张银刚,等.维甲酸诱导骨质疏松模型大鼠的效果及机理[J].四川大学学报:医学版,2005,36(2):229.
- [7] 卢锦东,谢平金.骨质疏松大鼠造模法研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2015,17(9):248.
- [8] 朱虎虎,孙伟,孙建新,等.维甲酸诱导雌性大鼠骨质疏松模型建立的效果观察[J].当代医学,2013,19(14):24.
- [9] 崔省珍,呼亚玲.仙灵骨葆胶囊对去卵巢大鼠骨代谢生化指标的影响[J].临床医药实践杂志,2007,16(4):260.
- [10] 董艳,陆英,华丽霞.鲑降钙素联合仙灵骨葆治疗绝经后妇女骨质疏松症所致骨痛疗效观察[J].中国药房,2010,21(2):154.
- [11] 陈涛平,郭召,焦建宝,等.仙灵骨葆胶囊联合西药治疗骨质疏松症临床疗效观察[J].四川中医,2015,33(1):171.

(收稿日期:2015-06-24 修回日期:2015-09-05)

(编辑:刘 萍)