

壮骨伸筋胶囊对维甲酸致小鼠骨质疏松的改善作用[△]

郭庆*,孙晓丽,李丽娟,郝江叶,段重高,周亚伟[#](北大世佳研究中心,北京 102206)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)16-2187-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.16.08

摘要 目的:考察壮骨伸筋胶囊对维甲酸致小鼠骨质疏松的改善作用。方法:将84只小鼠随机分为正常对照组、模型对照组、阳性对照组[骨质疏松颗粒,5g(生药)/kg]和壮骨伸筋胶囊高、中、低剂量组[7.80、3.90、1.95g(生药)/kg]。除正常对照组外,其余各组小鼠均ig维甲酸(90mg/kg)复制骨质疏松模型;造模7d后,给药组小鼠ig相应药物,正常对照组和模型对照组小鼠ig生理盐水,每天1次,连续14d。检测血清中碱性磷酸酶(ALP)活性及血清和股骨中钙、磷含量,检测小鼠体质量和股骨的干质量、骨长度和骨横径,并计算脏器(脾脏、睾丸、卵巢、子宫)系数。结果:与正常对照组比较,模型对照组小鼠血清中ALP活性升高,股骨中钙、磷含量以及小鼠体质量、股骨长度和股骨横径明显减少,脾脏系数升高,睾丸系数和子宫系数降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型对照组比较,壮骨伸筋胶囊各剂量组小鼠股骨中钙、磷含量增加,脾脏系数降低;高、中剂量组小鼠血清中ALP活性降低,小鼠体质量、股骨长度增加,睾丸系数和子宫系数升高;高剂量组小鼠股骨横径增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:壮骨伸筋胶囊对维甲酸致小鼠骨质疏松有一定的改善作用。

关键词 壮骨伸筋胶囊;维甲酸;骨质疏松;改善;小鼠

Improvement Effects of Zhuanggushenjin Capsules on Osteoporosis Induced by Retinoic Acid in Mice

GUO Qing, SUN Xiaoli, LI Lijuan, HAO Jiangye, DUAN Chonggao, ZHOU Yawei (Beijing University Bescholor Research Center, Beijing 102206, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the improvement effects of Zhuanggushenjin capsules on osteoporosis induced by retinoic acid in mice. **METHODS:** 84 mice were randomly divided into normal control group, model control group, positive control group [Gushukang granules, 5 g (crude drug)/kg] and Zhuanggushenjin capsules high-dose, medium-dose and low-dose groups [7.80, 3.90, 1.95 g (crude drug)/kg]. Except for normal control group, those groups were given retinoic acid (90 mg/kg) to induce osteoporosis model. 7 days after modeling, all drug groups were given relevant medicine intragastrically, normal control group and model control group given normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 14 days. ALP activity and the contents of calcium and phosphorus in serum and thigh-bone were determined. The body weight, the dry weight, length and diameter of thigh-bone were determined, and organ coefficients (spleen, testicle, ovarium and uterus) were calculated. **RESULTS:** Compared with normal control group, the activity of ALP in serum of mice increased in model control group, while the contents of calcium and phosphorus, body weight, length and diameter of thigh-bone decreased significantly; spleen coefficients increased, while testicle and uterus coefficients decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model control group, the contents of calcium and phosphorus increased in Zhuanggushenjin capsules groups, while spleen coefficient decreased; the activity of ALP in serum of mice decreased in high-dose and medium-dose groups, while body weight, the length of thigh-bone, testicle and uterus coefficients increased; diameter of thigh-bone increased in high-dose group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS:** Zhuanggushenjin capsules can improve retinoic acid-induced osteoporosis in mice to certain extent.

KEYWORDS Zhuanggushenjin capsules; Retinoic acid; Osteoporosis; Improvement; Mice

随着人口老龄化,骨质疏松发病率呈逐年上升趋势,目前已跃居世界常见病发病率的第7位^[1],其严重性已受到严密关注。特别是中老年女性由于卵巢功能下降导致体内雌激素水平骤降,由此引发骨代谢平衡紊乱,骨吸收大于骨形成^[2-3],出现以骨量减少、骨组织纤维结构退化和骨折频度增加为特征的骨质疏松症。中医药着重调动内因,整体调节,在防治此病方面具有较大的优势^[4]。

壮骨伸筋胶囊是长春中医药大学附属医院骨科主任、全国著名骨科专家刘柏龄教授多年的临床经验方,由淫羊藿、熟地黄、鹿衔草、骨碎补等15味中药组成,是治疗骨质增生、颈椎

病、腰椎病、风湿骨痛、四肢麻木、颈肩痛、臂痛、手麻痛的最新中成药^[5]。壮骨伸筋胶囊经原卫生部药品审评中心的严格审查,已于1995年10月被原卫生部批准为中药新药。

维甲酸在临床上有致骨质疏松的副作用,常用于复制骨质疏松动物模型,因此也被用于骨质疏松治疗药物的研究^[6-7]。本文采用维甲酸致小鼠骨质疏松模型,对壮骨伸筋胶囊的抗骨质疏松作用进行药效学研究,以评价其药用价值,为其临床应用提供基础实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Microlab300半自动生化仪(荷兰威图公司);AE100分析天平(瑞士梅特勒托利多仪器有限公司);TDL-5-A离心机(上海安亭科学仪器有限公司);ICAP-9000电感耦合等离子体发射光谱仪(美国Jarrell-Ash公司);SRJX-3-9电阻炉(沈阳通用

[△]基金项目:吉林省科技发展计划项目(No.20130302025YY)

*实验员,硕士。研究方向:药理与毒理。E-mail: gqlucky@163.com

[#]通信作者:教授,博士。研究方向:中药新药研究。电话:010-62538007。E-mail: ywzhou@pku.edu.cn

电炉制造有限公司);UV-2550分光光度计(日本 Shimadzu 公司)。

1.2 药品与试剂

壮骨伸筋胶囊(通化金马药业集团股份有限公司,批号:20120922,规格:0.3 g/粒);维甲酸片(山东良福制药有限公司,批号:131002,规格:10 mg/片);骨疏康颗粒(辽宁康辰制药有限公司,批号:13110310,规格:10 g/袋);碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(批号:130363)、钙试剂盒(批号:130561)、磷试剂盒(批号:130531)均购自中生北控生物科技股份有限公司。

1.3 动物

昆明小鼠84只,♀♂各半,体质量30~32 g,由解放军军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号:SCXK(军)2012-0004。

2 方法

2.1 阳性对照药的选择

骨疏康颗粒是根据中医“肾主骨生髓”的理论,遵循老年人全血变化规律研制而成的纯天然中药制剂,其主要成分为淫羊藿、熟地黄、黄芪、丹参等,以补肾壮骨、益精填髓为主,兼以活血化淤、益气补血,在双补肾之阴阳的同时健脾;而淫羊藿、熟地黄中含有多种维生素,调理绝经后妇女内分泌、免疫功能,使失衡的骨代谢向正态平衡方向逆转,共奏壮骨之功效^[8]。因此,本实验使用骨疏康颗粒作为阳性对照药。

2.2 给药剂量的设置

根据前期药效学实验,壮骨伸筋胶囊对小鼠的有效剂量为1.40 g/kg,相当于3.90 g(生药)/kg。因此笔者在本实验中选择3.90 g(生药)/kg为中剂量,7.80 g(生药)/kg为高剂量,1.95 g(生药)/kg为低剂量。

2.3 分组、造模与给药

将84只昆明小鼠随机分为6组,每组14只,♀♂各半,分别为正常对照组、模型对照组、阳性对照组[骨疏康颗粒,5 g(生药)/kg]和壮骨伸筋胶囊高、中、低剂量组[7.80、3.90、1.95 g(生药)/kg]。除正常对照组外,其余各组小鼠每天ig维甲酸(90 mg/kg)1次,连续14 d,复制骨质疏松模型。在ig维甲酸7 d后(即实验第8天),各给药组小鼠开始每天ig相应药液1次,正常对照组和模型对照组小鼠ig等体积生理盐水,连续14 d(造模和给药总共耗时21 d)。实验期间每周称定小鼠体质量1次,以调整给药剂量。

2.4 指标检测

2.4.1 血清中ALP活性和钙、磷含量 末次给药后,各组小鼠禁食不禁水18 h,次日摘眼球取血,离心(1 000×g,20 min),取血清,按照相应试剂盒说明书操作,采用半自动生化仪检测血清中ALP活性和钙、磷含量。

2.4.2 骨中钙、磷含量以及股骨干质量、股骨长度、股骨横径 待“2.4.1”项下取血完成后,处死并解剖小鼠,完整分离双侧股骨,除净附着的软组织,经80℃烘干48 h,进行如下测定:(1)股骨中钙、磷含量。天平精密称取股骨骨样,放入聚四氟乙酸溶液中,加2 ml硝酸,将溶液置于150℃烤箱中5 h,取出用去离子水定容至100 ml,用电感耦合等离子体发射光谱仪测定骨中钙、磷含量。(2)股骨干质量。将小鼠右侧股骨置于电阻炉中,恒定温度为80℃,持续6 h,用电子天平称定灰分质量。(3)股骨长度及股骨横径。用游标卡尺对股骨长度及横径进行测量。

2.4.3 脏器系数 摘取小鼠脾脏、睾丸、卵巢、子宫等脏器,称

定各脏器湿质量,计算脏器系数(脏器系数=脏器湿质量/体质量×100%)。

2.5 统计学方法

使用SPSS 19.0进行数据分析。实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠血清中ALP活性和钙、磷含量的测定结果

与正常对照组比较,模型对照组小鼠血清中ALP活性明显升高($P < 0.01$),血清中钙、磷含量差异无统计学意义($P > 0.05$);与模型对照组比较,阳性对照组和壮骨伸筋胶囊高、中剂量组小鼠血清中ALP活性明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),血清中钙、磷含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组小鼠血清中ALP活性和钙、磷含量的测定结果见表1。

表1 各组小鼠血清中ALP活性和钙、磷含量的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 14$)

Tab 1 ALP activity and contents of calcium and phosphorus in serum of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	剂量,g(生药)/kg	ALP,U/L	钙,mmol/L	磷,mmol/L
正常对照组		123.13±46.92	2.60±0.09	1.81±0.22
模型对照组		174.13±33.58*	2.60±0.06	1.89±0.22
阳性对照组	5	138.56±37.58*	2.64±0.09	2.04±0.43
壮骨伸筋胶囊高剂量组	7.8	132.31±38.01**	2.53±0.13	2.07±0.24
壮骨伸筋胶囊中剂量组	3.9	139.78±36.83*	2.54±0.09	2.17±0.59
壮骨伸筋胶囊低剂量组	1.95	175.59±54.49	2.56±0.12	1.90±0.25

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

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

3.2 各组小鼠股骨中钙、骨含量的测定结果

与正常对照组比较,模型对照组小鼠股骨中钙、磷含量明显减少($P < 0.01$);与模型对照组比较,阳性对照组和壮骨伸筋胶囊各剂量组小鼠股骨中钙、磷含量明显增加($P < 0.01$)。各组小鼠股骨中钙、磷含量测定结果见表2。

表2 各组小鼠股骨中钙、磷含量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 14$)

Tab 2 Contents of calcium and phosphorus of thigh-bone of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	剂量,g(生药)/kg	钙,mg/g	磷,mg/g
正常对照组		390.12±0.42	220.20±0.34
模型对照组		313.21±2.20*	170.95±0.45*
阳性对照组	5	350.09±0.21*	197.93±0.48*
壮骨伸筋胶囊高剂量组	7.8	341.17±4.54*	187.25±1.13*
壮骨伸筋胶囊中剂量组	3.9	336.19±4.53*	182.13±0.35*
壮骨伸筋胶囊低剂量组	1.95	319.79±1.29*	173.17±1.90*

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型对照组比较,* $P < 0.01$

Note:vs. normal control group,* $P < 0.01$;vs. model control group,* $P < 0.01$

3.3 各组小鼠体质量和股骨干质量、长度及横径的测定结果

与正常对照组比较,模型对照组小鼠体质量、股骨长度和股骨横径明显减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型对照组比较,阳性对照组和壮骨伸筋胶囊高、中剂量组小鼠体质量、股骨长度明显增加,且壮骨伸筋胶囊高剂量组小鼠股骨横径明显增加($P < 0.05$);各组小鼠股骨干质量差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组小鼠体质量和股骨干质量、长度和横径的测定结

果见表3。

表3 各组小鼠体质量和股骨干质量、长度及横径的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=14$)

Tab 3 Body weight, dry weight, length and diameters of thigh-bone of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=14$)

组别	剂量,g(生药)/kg	体质量,g	股骨干质量,g	股骨长度,mm	股骨横径,cm
正常对照组		38.10±3.70	0.06±0.01	16.02±0.96	0.22±0.02
模型对照组		33.40±3.00**	0.06±0.01	15.13±1.27*	0.20±0.02**
阳性对照组	5	35.30±1.40 [#]	0.06±0.01	15.97±1.40	0.22±0.02
壮骨伸筋胶囊高剂量组	7.8	35.60±1.80 [#]	0.06±0.01	16.12±0.70 [#]	0.23±0.01 [#]
壮骨伸筋胶囊中剂量组	3.9	36.50±2.70 [#]	0.06±0.01	16.10±0.72 [#]	0.22±0.02
壮骨伸筋胶囊低剂量组	1.95	33.20±1.70	0.05±0.01	15.73±1.25	0.21±0.01

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

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

3.4 各组小鼠脏器系数的测定结果

与正常对照组比较,模型对照组小鼠的脾脏系数明显升高,睾丸系数和子宫系数明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),卵巢系数差异无统计学意义($P>0.05$);与模型对照组比较,阳性对照组和壮骨伸筋胶囊各剂量组小鼠的脾脏系数均明显降低,壮骨伸筋胶囊高、中剂量组小鼠的睾丸系数、子宫系数明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);各组小鼠卵巢系数差异无统计学意义($P>0.05$)。各组小鼠脏器系数的测定结果见表4。

表4 各组小鼠脏器系数的测定结果 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab 4 Organ coefficients of mice in each group ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	剂量,g(生药)/kg	脾脏系数 (n=14)	睾丸系数 (n=7)	卵巢系数 (n=7)	子宫系数 (n=7)
正常对照组		0.45±0.14	0.58±0.11	0.1±0.03	0.07±0.02
模型对照组		1.02±0.49**	0.40±0.12*	0.1±0.03	0.06±0.02*
阳性对照组	5	0.66±0.21 ^{##}	0.47±0.08	0.11±0.04	0.13±0.02 ^{##}
壮骨伸筋胶囊高剂量组	7.8	0.46±0.11 ^{##}	0.60±0.07 ^{##}	0.10±0.05	0.11±0.06 [#]
壮骨伸筋胶囊中剂量组	3.9	0.55±0.13 ^{##}	0.60±0.09 ^{##}	0.10±0.03	0.11±0.03 [#]
壮骨伸筋胶囊低剂量组	1.95	0.53±0.13 ^{##}	0.50±0.07	0.09±0.26	0.09±0.05

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

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

4 讨论

骨质疏松症是一种骨代谢性疾病,表现为骨量减少、骨小梁变细、骨脆性增加、骨折危险性增高。现代医学认为,骨质疏松是在生理老化基础上由遗传及环境等多种因素共同作用的结果,骨质疏松产生的主要原因是雌激素缺乏和钙摄入不足,以致骨吸收大于骨形成。中医学认为骨质疏松属于中医“骨痿”“骨痹”的范畴,其发生首先当责之于肾虚精亏,多采用补肾填精壮骨之法治疗^[9]。

雌激素主要通过直接作用于成骨细胞和破骨细胞,调节成骨细胞分泌的局部细胞因子,加强降钙素的分泌,调节骨代谢,促进骨形成,抑制骨吸收^[10]。ALP是成骨细胞分化的特异性指标之一,ALP的活性变化可反映骨细胞增殖的程度^[11]。在本实验中,模型对照组小鼠子宫系数明显降低,卵巢系数没有明显的变化,但ALP的活性却明显升高,这些指标在骨代谢过程中起到关键作用。给药后,各给药组小鼠血清中ALP活性

不同程度地降低;卵巢系数不同程度地升高,这说明壮骨伸筋胶囊能够降低维甲酸所致的骨质疏松小鼠过高的骨转换。且骨疏康颗粒和壮骨伸筋胶囊能够明显减轻骨质疏松所致的小鼠体质量下降。

小鼠股骨中钙、磷含量的检测结果显示,模型对照组小鼠股骨中钙含量较正常对照组明显减少,这说明维甲酸能够明显降低股骨中钙的含量,使得大量钙流失,从而导致骨质疏松的形成。给予壮骨伸筋胶囊后,各剂量组小鼠股骨内钙含量不同程度地增加,这说明壮骨伸筋胶囊能够有效地抑制骨钙流失,对于骨质疏松具有明显的改善作用。

与正常对照组比较,模型对照组小鼠体质量、股骨长度、股骨横径均明显降低,这说明模型对照组小鼠骨生长受到明显抑制。给予壮骨伸筋胶囊后,各剂量组小鼠体质量、骨长度和横径明显增加,这说明壮骨伸筋胶囊能够改善维甲酸所致的骨增长速度缓慢,使骨生长趋于正常,从而起到治疗骨质疏松的作用。

综上所述,壮骨伸筋胶囊ig给药后对维甲酸致小鼠实验性骨质疏松有明显的改善作用,但其具体作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 李彤.老年骨质疏松的护理[J].中国疗养医学,2013,8(22):728.
- [2] 孙炜,赵效国.钼蓝比色法测定骨质疏松模型大鼠的骨磷含量[J].疾病监测与控制杂志,2010,4(3):132.
- [3] 许鹏,郭雄.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.
- [4] 杨迺嘉,霍昕.健骨灵胶囊对维甲酸所致骨质疏松大鼠骨形态与骨代谢的影响[J].中国新药杂志,2008,17(14):1229.
- [5] 许碧莲,崔焯,陈文双,等.丹参骨宝对维甲酸模型大鼠股骨生物力学及骨密度的影响[J].生物医学工程学杂志,2010,27(2):307.
- [6] 冼华,曹文富.补骨防疏煎剂对骨质疏松症大鼠血清骨钙素的影响[J].中国药房,2011,22(19):1751.
- [7] 张贵林,刘思源,任光友,等.骨松宝胶囊对维甲酸骨质疏松大鼠骨形态学和生化指标的影响[J].中药新药与临床药理,2004,15(4):250.
- [8] 马泉,刘瑞荣,杨印智.骨疏康治疗绝经后骨质疏松症86例[J].陕西中医,2004,25(12):1096.
- [9] 刘文波,胡志俊,刘洪举.骨质疏松症中医研究进展[J].贵州医药,2010,34(1):85.
- [10] 曲强,万新海,陈翠珠,等.雌激素通过调节骨髓来源的成骨细胞所产生的细胞因子抑制破骨细胞功能[J].中国骨质疏松杂志,2002,8(1):8.
- [11] 王敏.罗格列酮对体外培养小鼠前成骨细胞系MC3T3-E1生长与分化的影响研究[J].中国药房,2011,22(37):3486.

(收稿日期:2015-09-11 修回日期:2016-01-12)

(编辑:林 静)