

杜仲壮骨丸对维甲酸致小鼠骨质疏松的改善作用^Δ

刘明^{1*}, 宣振华², 张永萍^{2#}, 刘毅², 刘莉³, 王海洋³ (1. 贵阳中医学院基础医学院, 贵阳 550025; 2. 贵阳中医学院药学院, 贵阳 550025; 3. 贵阳德昌祥药业股份有限公司, 贵阳 550002)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)01-0035-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.01.09

摘要 目的: 考察杜仲壮骨丸(DZ)对小鼠骨质疏松的改善作用。方法: 将72只KM小鼠随机分为空白对照组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、阳性对照组(仙灵骨葆胶囊, 0.50 g/kg)和DZ高、中、低剂量组(1.90、0.95、0.48 g/kg, 记为DZ-H、DZ-M、DZ-L组), 每组12只。除空白对照组外, 其余各组小鼠均ig维甲酸复制骨质疏松模型, 并同时ig相应药物, 每天1次, 连续14 d。末次给药后, 测定小鼠体质量; 摘眼球取血测定血清钙、血清磷含量; 取肝、脾、胸腺测定脏器指数; 取左侧股骨测定骨湿质量、干质量、长度和直径; 取右侧股骨测定骨小梁面积百分比、骨小梁宽度及数目。结果: 与空白对照组比较, 模型组小鼠体质量降低; 血清钙、血清磷含量增加; 肝指数、脾指数升高, 胸腺指数降低; 股骨湿、干质量及直径减少; 骨小梁面积百分比降低, 骨小梁宽度及数目减少, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组小鼠血清钙含量减少, 阳性对照组和DZ-M、DZ-L组小鼠血清磷含量减少; 阳性对照组和DZ-M、DZ-L组小鼠胸腺指数升高, 阳性对照组小鼠肝脏指数降低; 阳性对照组小鼠的股骨湿质量及DZ-M组小鼠股骨干、湿质量和直径均增加; 阳性对照组和DZ-H、DZ-M组小鼠股骨骨小梁百分比升高, 骨小梁宽度及骨小梁数目均增加, 且DZ-L组小鼠骨小梁数目增加, 以上差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: DZ对维甲酸致小鼠骨质疏松具有一定的改善作用。

关键词 杜仲壮骨丸; 维甲酸; 骨质疏松模型; 小鼠; 股骨计量学指标

Improvement Effect of Duzhong Zhuanggu Pills on Retinoic Acid-induced Osteoporosis in Mice

LIU Ming¹, XUAN Zhenhua², ZHANG Yongping², LIU Yi², LIU Li³, WANG Haiyang³ (1. School of Basic Medicine, Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 2. School of Pharmacy, Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 3. Guiyang Dechangxiang Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate improvement effect of Duzhong zhuanggu (DZ) pills on retinoic acid-induced osteoporosis in mice. METHODS: 72 KM mice were randomized into blank control group (normal saline), model group (normal saline), positive control group (Xianling gubao capsule, 0.50 g/kg), DZ pills high-dose, medium-dose and low-dose groups (1.90, 0.95,

- 报(医学版), 2011, 31(7): 895-899.
- [8] Tolomeo T, Rico De Souza A, Roter E, *et al.* T cells demonstrate a Th1-biased response to native beta2-glycoprotein I in a murine model of anti-phospholipid antibody induction[J]. *Autoimmunity*, 2009, 42(4): 292-295.
- [9] 李莎莎, 张义军, 李洪利, 等. 非小细胞癌中MTAP蛋白及基因表达水平的检测[J]. *中国肿瘤杂志*, 2011, 14(2): 151-155.
- [10] 梅珊珊, 屈艳霞, 张广兰, 等. URSA患者蜕膜调节性T细胞Toll受体表达变化的临床意义[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2014, 35(4): 559-564.
- [11] 杜久伟, 朱瑞, 王飞, 等. 原因不明反复自然流产患者外周血TLR2、TLR4表达及CD4⁺CD25⁺Treg细胞的变化[J]. *临床检验杂志*, 2013, 31(5): 360-362.
- [12] Mulla MJ, Salmon JE, Chamley LW, *et al.* A role for uric acid and the Nalp3 inflammasome in antiphospholipid antibody-induced IL-1 β production by human first trimester trophoblast[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65237.
- [13] Oku K, Amengual O, Atsumi T. Pathophysiology of thrombosis and pregnancy morbidity in the antiphospholipid syndrome[J]. *Eur J Clin Invest*, 2012, 42(10): 1126-1135.
- [14] 宋钰, 王海燕. 复发性流产合并抗磷脂抗体综合征诊疗进展[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2016, 24(5): 9-13.
- [15] 林芸竹, 申向黎, 黄亮, 等. 妊娠早期保胎药的新剂型研发进展[J]. *中国药房*, 2008, 19(1): 63-65.

(收稿日期: 2016-08-18 修回日期: 2016-10-29)

(编辑: 林静)

^Δ 基金项目: 贵州省科技计划子课题(No. 黔科合重大专项字[2012]6009号)

* 副教授, 博士。研究方向: 中药、民族药防治心脑血管疾病药理。电话: 0851-88308013。E-mail: 393617518@qq.com

通信作者: 教授。研究方向: 中药新制剂。E-mail: 642055255@qq.com

0.48 g/kg, DZ-H, DZ-M, DZ-L groups), with 12 mice in each group. Except for blank control group, other groups were given retinoic acid intragastrically to induce osteoporosis model, and given relevant medicine intragastrically once a day, for 14 days. After last administration, body weight of mice was determined; the blood sample was collected from eyeball to determine the contents of serum calcium and phosphorus; liver, spleen and thymus gland were collected to determine organ index; left femur was collected to determine bone wet weight, bone dry weight, length and diameter; right femur was collected to determine the area percentage, width and number of bone trabecula. RESULTS: Compared with blank control group, the body weight of mice in model group were decreased; the contents of serum calcium and phosphorus were increased; liver indexes and spleen indexes were increased, while thymus indexes were decreased; bone wet weight, bone dry weight, length and diameter were decreased; area percentage, width and number of trabecular were decreased, with statistical significance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with model group, the contents of serum calcium were decreased in treatment groups, and the contents of serum phosphorus were decreased in positive control group, DZ-M and DZ-L groups. Thymus indexes were increased in positive control group, DZ-M and DZ-L groups, while liver indexes were decreased in positive control group; femur wet weight of positive control group as well as femur dry and wet weight, diameters of DZ-M were all increased. The percentage, width and number of bone trabecula were increased in positive control group, DZ-H and DZ-M group, and the number of bone trabecula was increased in DZ-L group, with statistical significance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: DZ pills have improvement effect on osteoporosis induced by retinoic acid in mice.

KEYWORDS Duzhong zhuanggu pills; Retinoic acid; Osteoporosis model; Mice; Metrology index of femur

维甲酸(Retinoic acid)是一种免疫抑制剂,由于其具有抑制骨合成的作用,近年来常被用来建立动物骨质疏松模型^[1]。杜仲壮骨丸(DZ)是贵阳德昌祥药业有限公司独家专利品种(国药准字号为Z52020210),临床主要用于治疗风湿痹痛、筋骨无力等症。本品临床应用多年,具有坚实的临床基础,但由于处方中含有豹骨和寻骨风2味药材,其中豹骨属于濒危保护动物药材,寻骨风由于含有马兜铃酸,长期大量应用可引起一定程度的肾损害。因此,本课题组在对这2味药材进行减去或替代(即去掉豹骨,另用肿节风代替寻骨风,然后按照原制备工艺制备)研究的基础上,采用维甲酸致小鼠骨质疏松,观察改进后的DZ对小鼠骨质疏松的改善作用,以扩大其临床适应证。

1 材料

1.1 仪器

752紫外光栅分光光度计(上海第三分析仪器厂); TGL-12GB-C台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂); BX51T-PHD-J11系统相差显微镜(日本奥林巴斯公司); 多功能真彩色细胞图像分析管理系统(美国Media Cybernetics公司)。

1.2 药品与试剂

DZ(贵阳德昌祥药业有限公司,批号:20130906,规格:0.19 g/丸);仙灵骨葆胶囊(贵州同济堂制药有限公司,批号:20130217,规格:每粒0.5 g);维甲酸原料药(全反式,重庆华邦制药股份有限公司,批号:20130425);血清钙、磷试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20140327,20140329)。

1.3 动物

SPF级KM小鼠72只,♀♂各半,体质量24~28 g,由贵阳医学院实验动物中心提供[动物合格证号:SCXK

(黔)2012-001]。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将72只KM小鼠随机分成6组,分别为空白对照组、模型组、阳性对照组(仙灵骨葆胶囊,0.50 g/kg,相当于人临床用量的10倍剂量)和杜仲壮骨丸高、中、低剂量组(1.90、0.95、0.48 g/kg,分别相当于人临床用量的20、10、5倍剂量,分别记为DZ-H、DZ-M、DZ-L组),每组12只。除空白对照组外,其余各组小鼠每天上午按105 mg/kg剂量ig维甲酸相应溶液1次,连续14 d,复制骨质疏松模型^[2]。造模同时,各给药组小鼠每天下午ig相应药物,给药体积均为0.2 mL/10 g(均以生理盐水为溶剂),每天1次,连续14 d;空白对照组和模型组小鼠ig等体积生理盐水。实验过程中每周称小鼠体质量1次。

2.2 标本采集及指标检测

参考文献[3-6]中方法进行标本采集与指标检测。

2.2.1 血清钙、血清磷含量及重要脏器指数 于实验第15天摘眼球取血,以1 000×g离心15 min,分离血清,按照试剂盒说明书操作,检测血清钙、血清磷含量。取血完成后处死小鼠,取肝、脾、胸腺,称质量,计算脏器指数:脏器指数(mg/g)=脏器质量(mg)/体质量(g)。

2.2.2 骨小梁面积百分比、骨小梁宽度及数目 取右侧股骨,中性福尔马林浸泡,常规脱钙,切片,苏木精-伊红(HE)染色后,通过多功能真彩色细胞图像分析管理系统对骨小梁面积百分比、骨小梁宽度及骨小梁数目进行分析。

2.2.3 股骨计量学指标 取左侧股骨,除净附着的软组织,测定股骨计量学指标。(1)股骨湿质量:用电子天平称量,得股骨湿质量(mg);(2)股骨长度:用游标卡尺进行测量,得股骨长度(mm);(3)股骨直径:分别于股骨的

近端1/3点、中点、远端1/3点,用游标卡尺量取最大外径及最小外径,取6个值的平均值,得股骨直径(mm);(4)股骨干质量:将股骨在80℃条件下烘干至恒质量,得股骨干质量(mg)。

2.3 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行数据分析。实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,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 DZ对骨质疏松模型小鼠血清钙、血清磷含量的影响

与空白对照组比较,模型组小鼠血清钙、血清磷含量增加($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组小鼠血清钙、血清磷含量均不同程度地降低,除DZ-H组小鼠血清磷含量降低不显著外,其余各组差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见表1。

表1 各组小鼠血清钙、血清磷含量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 The serum calcium and serum phosphorus content of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,g/kg	血清钙,mmol/L	血清磷,mmol/L
空白对照组		1.964 ± 0.305	2.778 ± 0.756
模型组		2.439 ± 0.674*	3.663 ± 0.895*
阳性对照组	0.50	1.994 ± 0.254 [#]	2.778 ± 0.399 ^{##}
DZ-H组	1.90	1.984 ± 0.368 [#]	3.173 ± 0.771
DZ-M组	0.95	1.998 ± 0.182 [#]	3.034 ± 0.707 [#]
DZ-L组	0.48	2.031 ± 0.125 [#]	2.977 ± 0.562 [#]

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

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

3.2 DZ对骨质疏松模型小鼠体质量及重要脏器指数的影响

与空白对照组比较,模型组小鼠体质量、胸腺指数降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),肝指数和脾指数升高($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组和DZ-M、DZ-L组小鼠胸腺指数升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),阳性对照组小鼠肝指数降低($P < 0.05$),结果见表2。

3.3 DZ对骨质疏松模型小鼠股骨骨小梁的影响

与空白对照组比较,模型组小鼠股骨骨小梁面积百分比降低($P < 0.01$),骨小梁宽度和数目减少($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组上述指标均得到不同程度改善,除DZ-L组小鼠股骨骨小梁面积百分比和骨小梁宽度变化不显著外,其余各组上述指标差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见图1、表3。

3.4 DZ对骨质疏松模型小鼠股骨计量学指标的影响

表2 各组小鼠体质量及胸、肝、脾指数测定结果($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Tab 2 The weight and thymus, liver and spleen indexes of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量,g/kg	体质量,g	胸腺指数,mg/g	肝指数,mg/g	脾指数,mg/g
空白对照组		33.3 ± 2.9	3.8 ± 0.7	43.5 ± 4.0	3.2 ± 0.5
模型组		29.9 ± 3.9*	2.9 ± 0.5**	47.8 ± 4.3*	3.9 ± 0.9*
阳性对照组	0.50	29.8 ± 3.7	3.4 ± 0.6 [#]	43.9 ± 6.1 [#]	3.4 ± 0.7
DZ-H组	1.90	28.9 ± 3.3	3.1 ± 0.6	44.9 ± 5.6	3.5 ± 0.9
DZ-M组	0.95	28.7 ± 3.8	3.5 ± 1.0 [#]	46.6 ± 4.6	3.7 ± 0.8
DZ-L组	0.48	30.2 ± 4.1	3.3 ± 0.6 [#]	48.6 ± 5.5	3.9 ± 0.8

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$

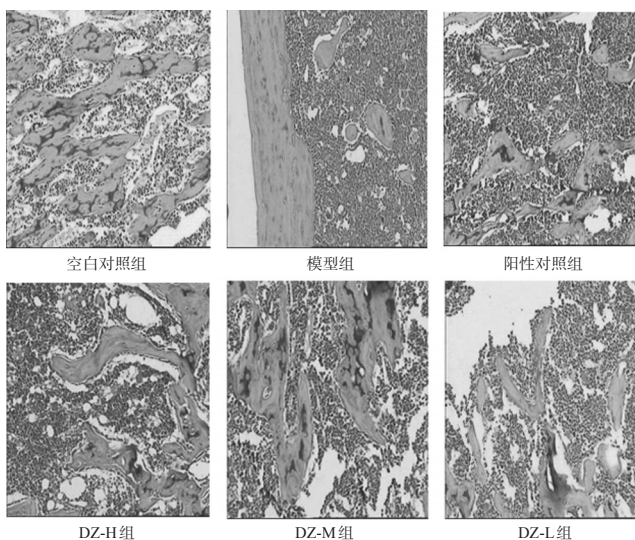


图1 各组小鼠股骨病理切片图(HE染色,×100)

Fig 1 Pathological sections of femour of mice in each group(HE staining,×100)

表3 各组小鼠股骨骨小梁面积百分比、骨小梁宽度及数目测定结果($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 3 The area percentage, width and number of bone trabecula of femur of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量,g/kg	骨小梁面积百分比,%	骨小梁宽度,μm	骨小梁数目,个/mm
空白对照组		31.8 ± 8.1	41.7 ± 9.9	8.8 ± 1.8
模型组		5.1 ± 1.4**	10.3 ± 2.8**	2.3 ± 0.7**
阳性对照组	0.50	17.9 ± 7.1 ^{##}	25.2 ± 7.7 ^{##}	5.3 ± 1.2 ^{##}
DZ-H组	1.90	20.7 ± 9.8 ^{##}	28.7 ± 16.8 ^{##}	6.1 ± 1.6 ^{##}
DZ-M组	0.95	15.8 ± 6.1 ^{##}	14.9 ± 4.8 [#]	5.4 ± 1.7 ^{##}
DZ-L组	0.48	5.1 ± 1.7	12.8 ± 8.2	3.3 ± 0.9 [#]

注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

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

与空白对照组比较,模型组小鼠股骨湿质量、干质量降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),股骨直径减少($P < 0.05$),

股骨长度无显著变化($P>0.05$);与模型组比较,阳性对照组和DZ-M组小鼠股骨湿质量增加($P<0.05$),DZ-M组小鼠股骨干质量和股骨直径增加($P<0.05$)。结果见表4。

表4 各组小鼠股骨计量学指标测定结果($\bar{x}\pm s, n=12$)
Tab 4 The metrology index of femur in mice in each group($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量,g/kg	股骨湿质量,mg	股骨干质量,mg	股骨长度,mm	股骨直径,mm
空白对照组		56.0±5.9	36.2±6.5	13.3±0.5	1.77±0.09
模型组		48.5±6.4**	30.8±4.6*	13.1±0.4	1.66±0.13*
阳性对照组	0.50	54.0±8.0 [#]	33.5±6.0	13.3±0.6	1.74±0.13
DZ-H组	1.90	50.5±5.5	33.2±6.6	13.3±0.8	1.72±0.09
DZ-M组	0.95	54.2±7.7 [#]	35.1±6.1 [#]	13.2±0.5	1.74±0.09 [#]
DZ-L组	0.48	49.8±5.5	32.3±5.4	13.4±0.6	1.66±0.13

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

Note:vs. blank control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$;vs. model group,[#] $P<0.05$

4 讨论

骨质疏松是一种骨代谢性疾病,表现为骨密度降低,骨矿元素含量减少,骨小梁变细、数目变少,骨脆性增加,骨折危险性加大等。现代医学认为,骨质疏松是机体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量不足,以致骨吸收大于骨形成^[7]。中医学认为,骨质疏松属于中医“骨痿”“骨痹”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^[8-9]。在进行维甲酸致骨质疏松动物研究时,多选择钙剂、维生素D等作为阳性对照药物,但也有研究者选择中成药(如仙灵骨葆胶囊)^[10],且仙灵骨葆胶囊已成为临床上治疗骨质疏松的重要中成药。

小鼠按105 mg/kg剂量连续给予维甲酸14 d后,与空白对照组比较,模型组小鼠体质量、胸腺指数显著降低,这提示维甲酸对小鼠有一定的免疫抑制作用;股骨干、湿质量均显著减轻,股骨直径显著减少,这提示维甲酸对于小鼠骨生长具有明显抑制作用;血清钙、血清磷含量升高,这提示维甲酸可诱导骨代谢活跃、骨转换率升高;股骨病理检测发现模型组小鼠股骨骨小梁稀疏、变细、断裂、排列紊乱,骨小梁面积百分比、宽度、数目均减少,这进一步表明其可抑制骨形成,最终导致骨质疏松。给予DZ后,小鼠体质量虽未见明显恢复,但重要脏器指数却得到不同程度改善,股骨干、湿质量及股骨直径均增加,血清钙、磷含量显著降低,骨小梁面积百分比、宽度、数目均增加,这提示DZ能够有效地增强免疫,

促进骨生长趋于正常,抑制血钙、血磷流失,促进骨钙、骨磷吸收,对于骨质疏松具有明显的改善作用。

本研究结果发现DZ-H组小鼠的指标变化不如中、低剂量组,其原因可能是高剂量组给药剂量较大,药物吸收不完全,或者是因剂量较大,药物成分间相互影响所致。在实验中,因每组均有个别血清样本出现溶血或血量过少的情况,故每组均随机选择10个血液样本进行血清钙、磷的测定;病理检测则每组随机选择8个样本进行检测。

综上所述,DZ 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] 孙丽萍,孙承琳,张丽,等.骨质疏松动物模型的探讨[J].中国骨质疏松杂志,1997,3(3):24-27.
- [2] 周延萌,宋立群,马晓茜,等.红车轴草异黄酮对维甲酸致小鼠骨质疏松的预防作用[J].中国药理学通报,2010,26(12):1658-1661.
- [3] 程建军,刘丽,江连洲,等.大豆分离蛋白冰淇淋对维甲酸致小鼠骨质疏松的防治作用[J].大豆科技,2013,5(4):38-43.
- [4] 陈方,吴铁,崔燎,等.卡托普利抗小鼠维甲酸性骨质疏松的作用探讨[J].中国药理学通报,2002,18(5):572-575.
- [5] 路其康,顾正位,毕云生,等.复方葛根片对维甲酸诱导骨质疏松模型大鼠的治疗作用[J].中国药房,2015,26(34):4803-4806.
- [6] 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):2923-2926.
- [7] 盛彤,谢培风,王新祥,等.骨质疏松症中医脾虚病机认识的现代医学基础[J].中国骨质疏松杂志,2013,19(5):509-513.
- [8] 郭庆,孙晓丽,李丽娟,等.壮骨伸筋胶囊对维甲酸致小鼠骨质疏松的改善作用[J].中国药房,2016,27(16):2187-2191.
- [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):85-86.
- [10] 陆奇志,周甘平,赵应学.复方杜牡健骨颗粒对维甲酸致大鼠骨质疏松防治作用的实验研究[J].中医药导报,2013,19(7):83-85.

(收稿日期:2016-07-04 修回日期:2016-10-16)

(编辑:林 静)