

醋龟甲不同剂型对血虚或骨质疏松小鼠的防治作用比较

王新雨^{1,2*}, 谭晓梅^{1#}, 张文新¹, 胡元立¹(1.南方医科大学中医药学院, 广州 510515; 2.广东岭南职业技术学院医药健康学院, 广州 510663)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2661-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.20

摘要 目的:比较醋龟甲的水煎剂和散剂对血虚小鼠或骨质疏松小鼠的防治作用。方法:将小鼠随机分为正常组(1%羧甲基纤维素钠溶液)、模型组(1%羧甲基纤维素钠溶液)、阳性组(复方阿胶浆20 mL/kg或骨松宝胶囊1.98 g/kg)以及醋龟甲水煎剂和散剂的低、中、高剂量组(剂量均为1.95、3.90、7.80 g/kg),每组10只。在小鼠血虚模型实验中,除正常组外,其余各组小鼠ip环磷酰胺0.1 g/kg造模;并从实验第1天起ig给药(阳性药物为复方阿胶浆),每天1次,连续8 d;给药结束后,测定小鼠外周血中白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HG)、血细胞比容(HCT)、血小板(PLT)水平及股骨中骨髓有核细胞(BMNC)数。在小鼠骨质疏松模型实验中,除正常组外,其余各组小鼠ig维甲酸0.105 g/kg造模;并从实验第1天ig相应药物(阳性药物为骨松宝胶囊),每天1次,连续30 d;给药结束后,测定小鼠血清中碱性磷酸酶(ALP)水平、脏器(胸腺、肝、脾、卵巢)系数和股骨的干质量、去脂干质量、灰质量以及股骨中钙、磷含量。结果:在小鼠血虚模型实验中,与正常组比较,模型组小鼠外周血中WBC、RBC、HG、HCT、PLT水平及股骨中BMNC数均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,醋龟甲水煎剂低剂量组小鼠外周血中HCT、PLT、BMNC水平和中剂量组中RBC、HG水平以及高剂量组中HCT水平均显著升高($P<0.05$),醋龟甲散剂低、高剂量组小鼠外周血中WBC水平以及中剂量组HG水平显著升高($P<0.05$)。在小鼠骨质疏松模型实验中,与正常组比较,模型组小鼠血清中ALP水平和股骨的干质量、去脂干质量、灰质量、灰质量/去脂干质量以及股骨中钙、磷含量均显著降低($P<0.01$),各脏器系数无统计学差异($P>0.05$);与模型组比较,醋龟甲水煎剂高剂量组小鼠血清中ALP水平和股骨的干质量、磷含量均显著升高($P<0.05$),醋龟甲散剂中、高剂量组以及中剂量组小鼠股骨的灰质量、灰质量/去脂干质量和钙、磷含量均显著升高($P<0.05$)。结论:醋龟甲水煎剂对血虚小鼠的防治作用较好;醋龟甲散剂对骨质疏松小鼠的防治作用较好。

关键词 醋龟甲;水煎剂;散剂;骨质疏松;血虚;小鼠

2007,6(11):114-115.

[6] 沈时鹏,冯浩.头孢地尼的抗菌活性和药动学研究[J].中国实用医药,2009,4(15):30-31.

[7] Li J, Wang L, Chen Z, et al. Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of cefdinir in beagle dog plasma integrated with an automatic on-line solid-phase extraction following protein precipitation in the 96-well plate format[J]. *J Chrom B*, 2012, 895/896: 83-88.

[8] Kapnissi-Christodoulou CP, Zhu X, Warner I. Analytical separations in open-tubular capillary electrochromatography[J]. *Electrophoresis*, 2003, 24(22/23):3917-3934.

[9] Eeltink S, Rozing GP, Kok WT. Recent applications in capillary electrochromatography[J]. *Electrophoresis*, 2003, 24(22/23):3935-3961.

[10] 汪难喜,翟学佳,朱超然,等.头孢地尼在健康人体中生理药动学模型的建立与应用[J].中国药房,2016,27(35):4920-4923.

[11] 钱妍,赵春景,喻娅婷. HPLC测定头孢地尼胶囊的含量[J].华西药理学杂志,2005,20(3):253-255.

[12] Sader H, Jones R. Cefdinir: an oral cephalosporin for the treatment of respiratory tract infections and skin and skin structure infections[J]. *Expert Rev Antiinfect Ther*, 2007, 5(1):29-43.

[13] 张伟,秦玉花,赵红卫,等.头孢地尼口腔崩解片生物等效性研究[J].实用诊断与治疗杂志,2008,22(6):404-406.

[14] 王锋,李相鸿,孙华.国产头孢地尼分散片生物等效性研究[J].今日药学,2010,20(5):22-24.

[15] Chen Z, Zhang J, Yu J, et al. Selective method for the determination of cefdinir in human plasma using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, 834(1/2):163-169.

[16] 林建阳,姜明燕,阚周密,等.头孢地尼分散片在健康人体内的药动学及生物等效性[J].中国抗生素杂志,2012,37(9):706-710.

* 博士研究生。研究方向:中药制剂。电话:020-62789112。
E-mail:379319742@qq.com

通信作者:研究员,博士生导师。研究方向:中药新制剂。电话:020-61648265。E-mail:txm@fimmu.com

(收稿日期:2017-01-03 修回日期:2017-05-03)
(编辑:刘明伟)

Comparison of the Preventive and Therapeutic Effect of Different Dosage Forms of Vinegar Testudinis Carapax on Mice with Hemopenia or Osteoporosis

WANG Xinyu^{1,2}, TAN Xiaomei¹, ZHANG Wenxin¹, HU Yuanli¹ (1.School of TCM, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2.School of Medicine and Health, Lingnan Institute of Technology, Guangzhou 510663, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To compare the preventive and therapeutic effect of Vinegar testudinis carapax (VTC) water decoction and powder on mice with hemopenia or osteoporosis. **METHODS:** Mice were randomly divided into normal group (1% CMC-Na), model group (1% CMC-Na), positive group (Compound e-jiao slurry 20 mL/kg or Gusongbao capsule 1.98 g/kg), VTC water decoction and powder low-dose, medium-dose, high-dose groups (1.95, 3.90, 7.80 g/kg), 10 in each group. In hemopenia mice model experiment, except for the normal group, mice in other groups were intraperitoneally injected cyclophosphamide 0.1 g/kg for modeling, and intragastrically given medicines from the first day (positive drug was Compound e-jiao slurry), once a day, for 8 d. After administration, peripheral blood levels of white blood cells (WBC), red blood cells (RBC), hemoglobin (HG), hematocrit (HCT), platelet (PLT) and bone marrow nucleated cells (BMNC) numbers in femur of mice were determined. In osteoporosis mice model experiment, except for the normal group, mice in other groups were intragastrically given retinoic acid 0.105 g/kg for modeling, and intragastrically given relevant medicines from the first day (positive drug was Gusongbao capsule), once a day, for 30 d. After administration, alkaline phosphatase (ALP) level, organ (thymus, liver, spleen, ovary) coefficients, dry masses and degreasing, ash quality of the femur, and contents of femur calcium and phosphorus in serum of mice were detected. **RESULTS:** In hemopenia mice model experiment, compared with normal group, WBC, RBC, HG, HCT, PLT levels in peripheral blood and BMNC numbers in femur of mice in model group were decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, HCT, PLT, BMNC levels in peripheral blood of mice in VTC water decoction low-dose group, and RBC, HG levels in medium-dose group and HCT level in high-dose group were significantly increased ($P < 0.05$). And WBC level in peripheral blood of mice in powder low-dose, high-dose groups and HG level in medium-dose group were significantly increased ($P < 0.05$). In osteoporosis mice model experiment, compared with normal group, ALP level in serum of mice in model group, dry mass and degreasing, ash mass, ash mass/dry mass of degreasing of the femur, and the contents of femur calcium and phosphorus were significantly decreased ($P < 0.01$), there was no significant difference in each organ coefficient ($P > 0.05$). Compared with model group, ALP level in serum and dry mass, phosphorus content of femur of mice in VTC water decoction high-dose group were significantly increased ($P < 0.05$); ALP level in serum and dry mass, phosphorus content of femur of mice in VTC, powder medium-dose, high-dose group, the ash mass, ash mass/dry mass of degreasing, contents of femur calcium and phosphorus in VTC powder medium-dose group were significantly increased ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** VTC water decoction shows better preventive and therapeutic effect on hemopenia mice; while VTC powder shows better preventive and therapeutic effect on osteoporosis mice.

KEYWORDS Vinegar testudinis carapax; Water decoction; Powder; Osteoporosis; Hemopenia; Mice

醋龟甲为龟科动物乌龟[*Chinemys reevesii*(Gray)]背甲及腹甲醋制品。其作为药用首载于汉代的《神农本草经》^[1],被列为上品,以后本草多有记载,其使用方式也不尽相同。在古代,龟甲用法为先煎、研末、入丸散等,如《温氏经验良方·解烦煎》治小儿解烦:“龟板五钱……水煎”;《圣济总录·龟甲散》治心矢志善忘:“龟甲(炙)……捣为细散等”^[2]。现代临床在用龟甲治疗骨痹、鸡胸、血虚等病症时,既有用水煎剂的,也有用散剂的^[3-4]。《中国药典》用法为先煎,而在其收载的用于治疗骨质疏松、血虚等相关疾病的成方制剂中既有以水煎剂入药的(如龙牡壮骨颗粒),也有以散剂入药的(如三宝胶囊),但不同剂型对治疗骨质疏松和血虚的药效是否有差异未见报道。鉴于此,本研究主要参照2015版《中国药典》(一部)醋龟甲的用法用量及治疗病症,研究醋龟甲水煎剂和散剂对血虚或骨质疏松小鼠防治作用的差异,为其临床合理使用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

YZ-Hemavet 950 动物血液分析仪(英国Drew Scientific公司);Agilent LC 1100 系列高效液相色谱仪(美国Agilent公司);Alltech2000 蒸发光散射检测器(美国Alltech公司);HC-3018 高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

1.2 药材、对照品、试剂

醋龟甲(亳州市亳广中药饮片有限公司,批号:140810)经南方医科大学中药鉴定教研室刘传明教授鉴定为真品;维甲酸原料药(北京贝丽莱斯生物化学有限公司,批号:120701);骨松宝胶囊(贵州富华药业有限责任公司,批号:20140712,规格:0.5 g/粒);注射用环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:14031521,规格:200 mg/瓶);复方阿胶浆(山东东阿阿胶股份有限公司,批号:140847,规格:20 mL/支);碱性磷酸酶(ALP)酶联

免疫吸附(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20140907);乙腈为色谱纯,甲醇、氯仿、石油醚和冰醋酸等均为分析纯。

1.3 动物

KM小鼠180只,SPF级,♀♂各半,体质量18~22 g,由南方医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(粤)2011-0015。小鼠适应性饲养3 d后进行实验。

2 方法

2.1 实验用药液制备

(1)醋龟甲水煎剂药液:取醋龟甲饮片200 g,加约6倍量水,浸泡60 min,煎煮保持微沸45 min,过150目滤布,收集滤液;滤渣再加约4倍量水,保持微沸30 min,过150目滤布;合并2次滤液,干燥,得干膏。取干膏加入1%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液适量,制备成每1 mL含生药0.04、0.08、0.12 g/mL的低、中、高质量浓度的药液。(2)醋龟甲散剂药液:取100目醋龟甲散剂,加入1% CMC-Na溶液适量,制备成每1 mL含生药0.04、0.08、0.12 g/mL的低、中、高质量浓度的药液。(3)复方阿胶浆药液:取复方阿胶浆,加入1.5倍体积1% CMC-Na溶液,即得。(4)骨松宝胶囊药液:取骨松宝胶囊内容物,加入1% CMC-Na溶液适量,配制成质量浓度为0.039 6 g/mL的溶液,即得。

2.2 醋龟甲不同剂型对环磷酰胺致小鼠血虚的影响

2.2.1 分组 取90只小鼠随机分为正常组、模型组、阳性组(复方阿胶浆,20 mL/kg)^[5]以及醋龟甲水煎剂和散剂的低、中、高剂量组(给药剂量均为1.95、3.90、7.80 g/kg,根据2015年版《中国药典》(一部)中剂量进行换算^[6],分别相当于人临床用量的1.5、3、6倍),共9组,每组10只。

2.2.2 造模 除正常组小鼠ip等体积的生理盐水外,其余各组小鼠在给药的第3、4天ip环磷酰胺0.1 g/kg造成血虚模型。

2.2.3 给药 从实验第1天起,正常组和模型组小鼠ig等体积1% CMC-Na溶液,其余各给药组小鼠ig“2.1”项下相应药液,每天1次,连续8 d。

2.2.4 指标观察 末次给药后1 h,小鼠摘眼球取血,采用动物血液分析仪检测外周血中白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HG)、血细胞比容(HCT)和血小板(PLT)水平。然后将小鼠颈椎脱臼处死,取右侧完整股骨,除净软组织,用甲醇-冰醋酸(3:1)5 mL冲出全部骨髓,过4号针头使成单细胞悬液,显微镜下对骨髓有核细胞(BMNC)计数。

2.3 醋龟甲不同剂型对维甲酸致小鼠骨质疏松的影响

2.3.1 分组 取90只小鼠随机分为正常组、模型组、阳性组(骨松宝胶囊,1.98 g/kg)^[7]以及醋龟甲水煎剂和散剂的低、中、高剂量组(给药剂量均为1.95、3.90、7.80

g/kg),共9组,每组10只。

2.3.2 造模 除正常组小鼠ig等体积的生理盐水外,其余各组小鼠ig维甲酸0.105 g/kg,每天1次,连续15 d,复制骨质疏松模型。

2.3.3 给药 从实验第1天起,正常组和模型组小鼠ig等体积1% CMC-Na溶液,其余各给药组小鼠ig“2.1”项下相应药液,每天1次,连续30 d。

2.3.4 指标观察 末次给药后1 h,摘眼球取血,置于1.5 mL的EP管中,1 000×g离心10 min,取上层血清,按试剂盒说明书测定血清中ALP水平。然后将小鼠处死,取小鼠胸腺、肝、脾、卵巢(♀),称质量并计算脏器系数:脏器系数(%)=脏器质量/体质量×100%。取左侧股骨,用石油醚洗净股骨上液体,精密称质量(湿质量),置于105℃烘箱中干燥6 h,精密称质量,得股骨干质量;将股骨置于具塞试管中,加氯仿-甲醇(3:1)10 mL浸泡过夜,倒掉溶剂,再加氯仿-甲醇(3:1)溶剂10 mL,将试管置于40℃恒温水浴中,4 h后重复1次,挥干溶剂,置于105℃烘箱中烘40 min,精密称质量,得股骨去脂干质量;将处理好的样品置于20 mL恒重坩埚中,于高温炉中800℃灰化6 h,于干燥器中放至室温,精密称质量,即得股骨灰质量。取灰化后的样品15 mg,精密称定,加1 mol/L盐酸5 mL溶解,加水定容至100 mL,0.45 μm滤膜滤过,采用高效液相色谱-蒸发光散射法,测定股骨中钙、磷含量^[8]。

2.4 统计学方法

采用SPSS 20.0统计软件对所得数据进行分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。结果比较运用单因素方差分析,方差齐时行LSD检验,方差不齐时行Dunnett's T_3 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 环磷酰胺致血虚小鼠的实验结果

3.1.1 外周血常规测定结果 与正常组比较,模型组小鼠外周血中WBC、RBC、HG、HCT、PLT水平均显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,醋龟甲散剂低、高剂量组小鼠外周血中WBC水平显著升高($P < 0.05$),且组间无统计学差异($P > 0.05$);阳性组和醋龟甲水煎剂中剂量组小鼠外周血中RBC水平显著升高($P < 0.05$);阳性组、醋龟甲水煎剂中剂量组和散剂低剂量组小鼠外周血中HG水平均显著升高($P < 0.05$),且组间无统计学差异($P > 0.05$);醋龟甲水煎剂低、高剂量组小鼠外周血中HCT水平显著升高($P < 0.05$),且组间无统计学差异($P > 0.05$);醋龟甲水煎剂低剂量组小鼠外周血中PLT水平显著升高($P < 0.05$),结果详见表1。

3.1.2 BMNC数的测定结果 与正常组比较,模型组小鼠BMNC数显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性

组和醋龟甲水煎剂低剂量组小鼠 BMNC 数显著升高 ($P<0.05$); 醋龟甲散剂各剂量组小鼠 BMNC 数均无统计学差异 ($P>0.05$), 结果详见表 1。

表 1 各组小鼠外周血常规及 BMNC 数测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 1 Results of peripheral blood routine and BMNC numbers of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

| 组别 | 外周血常规指标 | | | | | BMNC, $\times 10^6$ /根 |
|------------|---------------------------|------------------------------|----------------|----------------|---------------------------|------------------------|
| | WBC, $\times 10^9 L^{-1}$ | RBC, $\times 10^{12} L^{-1}$ | HG, g/dL | HCT, % | PLT, $\times 10^9 L^{-1}$ | |
| 正常组 | 7.22 ± 1.52 | 9.50 ± 0.22 | 16.78 ± 0.51 | 54.88 ± 3.61 | 941.60 ± 143.12 | 4.30 ± 0.69 |
| 模型组 | 3.12 ± 1.06** | 8.49 ± 0.22** | 12.08 ± 1.64** | 46.16 ± 4.12** | 552.00 ± 159.12** | 3.02 ± 0.85** |
| 阳性组 | 3.66 ± 2.00 | 9.16 ± 0.37* | 14.26 ± 1.21* | 49.25 ± 5.70 | 547.60 ± 202.09 | 3.79 ± 0.41* |
| 醋龟甲水煎剂低剂量组 | 3.34 ± 2.32 | 8.60 ± 0.23 | 13.41 ± 2.09 | 50.85 ± 2.06* | 868.50 ± 200.19* | 4.25 ± 1.34* |
| 醋龟甲水煎剂中剂量组 | 4.10 ± 1.95 | 9.25 ± 0.37* | 14.00 ± 2.54* | 47.85 ± 7.03 | 553.37 ± 292.02 | 3.03 ± 0.60 |
| 醋龟甲水煎剂高剂量组 | 4.22 ± 1.67 | 8.75 ± 0.17 | 13.62 ± 2.29 | 50.87 ± 3.92* | 558.60 ± 206.08 | 2.98 ± 0.48 |
| 醋龟甲散剂低剂量组 | 4.72 ± 1.42* | 8.74 ± 0.34 | 13.94 ± 2.43* | 47.62 ± 5.74 | 689.60 ± 231.52 | 3.35 ± 0.70 |
| 醋龟甲散剂中剂量组 | 3.18 ± 1.47 | 8.86 ± 0.38 | 13.41 ± 1.59 | 46.16 ± 5.88 | 710.12 ± 175.04 | 3.47 ± 0.72 |
| 醋龟甲散剂高剂量组 | 4.68 ± 1.71* | 8.87 ± 0.32 | 13.40 ± 2.11 | 48.13 ± 3.67 | 623.30 ± 151.37 | 3.49 ± 0.53 |

注: 与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$

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

3.2 维甲酸致骨质疏松小鼠的实验结果

3.2.1 血清中 ALP 水平的测定结果 与正常组比较, 模型组小鼠血清中 ALP 水平显著降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 阳性组、醋龟甲水煎剂高剂量组和醋龟甲散剂中、高剂量组小鼠血清中 ALP 水平均显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 且组间均无统计学差异 ($P>0.05$), 结果详见表 2。

表 2 各组小鼠血清中 ALP 水平及脏器系数测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Results of ALP level in serum and organ coefficients of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | ALP, U/L | 胸腺系数(n=10) | 脾系数(n=10) | 脾系数(n=10) | 卵巢系数(n=5) |
|------------|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| 正常组 | 5.208 0 ± 0.712 4 | 0.320 5 ± 0.005 6 | 3.955 2 ± 0.106 8 | 0.363 4 ± 0.013 8 | 0.092 9 ± 0.006 4 |
| 模型组 | 2.974 0 ± 1.236 3** | 0.303 5 ± 0.030 3 | 3.421 5 ± 0.129 9* | 0.360 9 ± 0.023 5 | 0.070 4 ± 0.007 0* |
| 阳性组 | 4.184 0 ± 0.577 2* | 0.241 0 ± 0.021 4 | 3.365 2 ± 0.089 6 | 0.307 8 ± 0.016 9 | 0.065 8 ± 0.004 3 |
| 醋龟甲水煎剂低剂量组 | 3.430 0 ± 1.207 3 | 0.277 7 ± 0.034 4 | 3.616 8 ± 0.106 3 | 0.378 4 ± 0.026 8 | 0.066 3 ± 0.006 3 |
| 醋龟甲水煎剂中剂量组 | 3.951 0 ± 1.175 3 | 0.311 4 ± 0.015 8 | 3.565 9 ± 0.081 1 | 0.378 4 ± 0.021 4 | 0.064 3 ± 0.007 6 |
| 醋龟甲水煎剂高剂量组 | 4.363 3 ± 1.160 4** | 0.260 9 ± 0.016 7 | 3.278 4 ± 0.119 8 | 0.353 6 ± 0.018 7 | 0.058 7 ± 0.007 1 |
| 醋龟甲散剂低剂量组 | 3.445 0 ± 1.191 8 | 0.281 1 ± 0.027 3 | 3.920 4 ± 0.166 5 | 0.407 7 ± 0.029 7 | 0.079 1 ± 0.005 3 |
| 醋龟甲散剂中剂量组 | 4.228 9 ± 1.487 2* | 0.312 9 ± 0.026 3 | 3.398 9 ± 0.065 2 | 0.373 3 ± 0.031 2 | 0.058 9 ± 0.004 9 |
| 醋龟甲散剂高剂量组 | 4.417 0 ± 0.902 5** | 0.304 3 ± 0.019 2 | 3.854 0 ± 0.184 9 | 0.376 0 ± 0.026 2 | 0.064 5 ± 0.004 5 |

注: 与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

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

3.2.2 小鼠脏器系数的测定结果 与正常组比较, 模型组小鼠肝系数、卵巢系数显著降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, 各给药组小鼠的胸腺系数、脾系数、脾系数、卵巢系数均无统计学差异 ($P>0.05$), 结果详见表 2。

3.2.3 小鼠股骨质量的测定结果 与正常组比较, 模型

组小鼠股骨的干质量、去脂干质量、灰质量和灰质量/去脂干质量均显著降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 醋龟甲散剂中剂量组小鼠股骨的干质量、灰质量显著降低 ($P<0.05$); 醋龟甲水煎剂高剂量组和散剂中剂量组小鼠灰质量/去脂干质量显著降低 ($P<0.05$), 但两组间无统计学差异 ($P>0.05$), 结果详见表 3。

表 3 各组小鼠股骨质量测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 3 Results of mass of the femur of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

| 组别 | 干质量, g | 去脂干质量, g | 灰质量, g | 灰质量/去脂干质量, g/g |
|------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 正常组 | 0.055 6 ± 0.006 8 | 0.054 0 ± 0.006 5 | 0.033 6 ± 0.004 0 | 0.622 3 ± 0.013 9 |
| 模型组 | 0.046 4 ± 0.003 3** | 0.045 1 ± 0.004 0** | 0.026 6 ± 0.002 6** | 0.590 5 ± 0.023 1** |
| 阳性组 | 0.047 9 ± 0.003 7 | 0.047 1 ± 0.003 7 | 0.028 3 ± 0.002 4 | 0.600 2 ± 0.016 6 |
| 醋龟甲水煎剂低剂量组 | 0.050 9 ± 0.008 9 | 0.049 5 ± 0.009 0 | 0.029 7 ± 0.005 5 | 0.600 2 ± 0.024 6 |
| 醋龟甲水煎剂中剂量组 | 0.047 3 ± 0.006 7 | 0.046 4 ± 0.006 5 | 0.028 2 ± 0.004 0 | 0.608 4 ± 0.008 9 |
| 醋龟甲水煎剂高剂量组 | 0.046 7 ± 0.004 9 | 0.045 5 ± 0.004 8 | 0.027 7 ± 0.002 9 | 0.609 4 ± 0.025 5* |
| 醋龟甲散剂低剂量组 | 0.047 4 ± 0.005 6 | 0.046 2 ± 0.005 3 | 0.027 4 ± 0.003 0 | 0.593 7 ± 0.031 8 |
| 醋龟甲散剂中剂量组 | 0.051 8 ± 0.002 6* | 0.050 2 ± 0.003 1 | 0.030 9 ± 0.002 6* | 0.615 6 ± 0.018 6* |
| 醋龟甲散剂高剂量组 | 0.044 9 ± 0.005 9 | 0.043 6 ± 0.005 8 | 0.026 5 ± 0.004 0 | 0.606 3 ± 0.021 6 |

注: 与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$

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

3.2.4 小鼠股骨中钙、磷含量的测定结果 与正常组比较, 模型组小鼠股骨中钙、磷含量显著降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 阳性组、醋龟甲水煎剂高剂量组和散剂中剂量组小鼠股骨中磷含量均显著升高 ($P<0.05$), 且组间无统计学差异 ($P>0.05$); 醋龟甲散剂中剂量组小鼠股骨中钙含量显著升高 ($P<0.05$), 结果详见表 5。

表 4 各组小鼠股骨中钙、磷含量测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

| 组别 | 磷/去脂干质量, g/g | 钙/去脂干质量, g/g |
|------------|---------------------|---------------------|
| 正常组 | 0.053 8 ± 0.002 0 | 0.294 7 ± 0.011 1 |
| 模型组 | 0.050 2 ± 0.002 5** | 0.272 0 ± 0.015 6** |
| 阳性组 | 0.053 1 ± 0.003 2* | 0.283 6 ± 0.013 2 |
| 醋龟甲水煎剂低剂量组 | 0.052 4 ± 0.003 6 | 0.276 6 ± 0.010 9 |
| 醋龟甲水煎剂中剂量组 | 0.050 9 ± 0.003 5 | 0.277 2 ± 0.010 3 |
| 醋龟甲水煎剂高剂量组 | 0.053 7 ± 0.002 7* | 0.281 3 ± 0.007 6 |
| 醋龟甲散剂低剂量组 | 0.051 2 ± 0.003 3 | 0.281 4 ± 0.015 4 |
| 醋龟甲散剂中剂量组 | 0.053 8 ± 0.002 0* | 0.290 9 ± 0.009 4* |
| 醋龟甲散剂高剂量组 | 0.051 5 ± 0.003 0 | 0.280 3 ± 0.016 2 |

注: 与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$

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

4 讨论

环磷酸胺具有细胞毒性, 能抑制细胞分裂, 致骨髓造血功能损坏, 引发多系血细胞数量减少, 从而造成血虚^[9]。血虚证是中医临床常见病证之一, 主要病理表现为外周血中 WBC 减少和 HCT 水平降低、骨髓造血干细胞受到抑制等^[10]。复方阿胶浆临床上用于治疗气血两虚及贫血已有多年经验, 疗效较好。现代研究表明, 阿胶对缺血性动物的 RBC、HG 及 HCT 有显著的升高作用, 并对骨髓细胞的功能有显著的改善作用, 故在小鼠

血虚模型中以复方阿胶浆为阳性对照药物^[11]。维甲酸引起骨质疏松症的主要表现是骨的有机质和无机质减少^[12]。骨松宝胶囊临床上用于骨痿(骨质疏松症)引起的骨折、骨痛及预防更年期骨质疏松症。临床研究表明,骨松宝胶囊能有效改善患者骨质疏松的症状、提高骨密度,疗效确切可靠^[13],故在鼠骨质疏松模型中以其为阳性对照药物。

在小鼠血虚实验中,与模型组比较,醋龟甲水煎剂低剂量组小鼠外周血中PLT、HCT水平以骰骨中BMNC数,中剂量组小鼠外周血中RBC、HG水平和高剂量组HCT水平均显著升高($P < 0.05$);而散剂仅低剂量组小鼠外周血中RBC、HG水平及高剂量组小鼠外周血中RBC水平显著降低($P < 0.05$),因此水煎剂组效果较好。研究报道,酪氨酸、甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和丙氨酸这5种氨基酸组成了刺激小鼠BMNC细胞增殖的活性成分的物质基础^[14]。龟甲中亦有此5种氨基酸,且含量较高^[15],醋龟甲水煎剂采用煎煮法提取制备,有利于其氨基酸、脂肪酸等有效物质的溶出。

在小鼠骨质疏松实验中,与模型组比较,醋龟甲水煎剂仅高剂量组小鼠骰骨的灰质量/去脂干质量、磷含量有显著改善($P < 0.05$);而散剂中剂量组小鼠骰骨的干质量、灰质量、灰质量/去脂干质量以及钙、磷含量均有显著改善($P < 0.05$),因此散剂作用较好。骨中无机质主要是钙和磷共同形成骨的磷灰石结晶,占骨盐成分的84%,所以钙、磷是骨矿物质的主要成分。骨骼有机质中有70%~86%是骨胶原,其能促进钙、磷等无机质在骨上的沉积,因而能起到修复骨折的作用。在前期的研究中发现,醋龟甲中钙含量为30%左右,磷含量为6%左右^[16],多以羟基磷酸钙、碳酸钙等形式存在,难溶于水,但进入体后在胃酸的作用下成为可溶性钙和磷。因此,醋龟甲散剂治疗骨质疏松的有效物质基础可能以钙和磷为主。而醋龟甲水煎剂中钙、磷含量虽相对散剂少很多,但醋龟甲亦含有骨胶原^[17],煎煮有利于骨胶原的溶出,易被吸收利用。因此,醋龟甲水煎剂治疗骨质疏松的物质基础可能以骨胶原为主。

在血虚模型中,低剂量醋龟甲水煎剂对血虚小鼠BMNC数有显著影响,而低、中、高剂量醋龟甲散剂对血虚小鼠BMNC数均无显著影响。而在骨质疏松模型中,与模型组比较,散剂高剂量组小鼠多数指标无显著改善,考虑因醋龟甲中含碳酸钙,大剂量碳酸钙可中和胃酸并减少胃蛋白酶活性^[18],是否因此而影响了药效,尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 顾观光,杨鹏举.神农本草经[M].3版.北京:学苑出版社,1998:106-107.
- [2] 王新雨,谭晓梅,袁丽霞,等.动物药临床应用述评[J].中医杂志,2011,52(18):1609-1612.
- [3] 蔡家振,瞿曙琨.海龟壮骨散治疗老年骨质疏松症30例临床分析[J].亚太传统医药,2014,10(24):107-108.
- [4] 张维,尹宏兵.鹿茸、三七等中药联合治疗骨质疏松症的临床疗效分析[J].中国医药指南,2016,14(30):164-165.
- [5] 陈红霞,贾晓斌,陈彦,等.当归补血微丸对环磷酰胺所致小鼠贫血的影响[J].中国医院药学杂志,2007,27(5):588-590.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:180.
- [7] 肖润梅,陈勇.药材醇提物对骨质疏松小鼠生化指标影响的比较[J].上海师范大学学报(自然科学版),2007,36(3):85-88.
- [8] 王新雨,汤庆发,谭晓梅. HPLC-ELSD法同时测定小鼠股骨中钙和磷[J].中药药理与临床,2014,30(6):187-189.
- [9] 王碧英,陈玉春.四物汤补血调血作用机理的研究[J].深圳中西医结合杂志,2000,10(5):198-200.
- [10] 苏晓妹,魏东,张涛,等.阿胶对血虚证动物模型的作用[J].中国药师,2006,9(7):597-599.
- [11] 曾繁强,徐永莉,江思华,等.红毛鸡干燥体醇提物对血虚模型小鼠的补血作用研究[J].中国药房,2016,27(31):4373-4375.
- [12] 陈方,吴铁,崔燎.维甲酸致小鼠骨质疏松模型的量效关系及骨药理作用探讨[J].中国药理学通报,2002,18(6):681-684.
- [13] 徐爱生.骨松宝胶囊治疗骨质疏松症的疗效分析[J].亚太传统医药,2010,6(2):51-52.
- [14] 刘建华.泰和乌骨鸡活性肽抗氧化与降血压及其补血作用研究[D].南昌:南昌大学,2011.
- [15] 范亚刚,王建云.13种龟甲的无机元素和氨基酸含量比较[J].广东微量元素科学,1997,4(10):48-52.
- [16] Tang QF, Wang XY, Chen FL, et al. Simultaneous determination of phosphate anion and calcium cation in *Plastrum testudinis* by HPLC-ELSD[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 77(2):29-31.
- [17] 王新雨,谭晓梅,陈飞龙,等. HPLC-ELSD法测定醋龟甲中羟脯氨酸[J].中草药,2011,42(7):1338-1340.
- [18] 蒋丽蓉,朱玮琪.碳酸钙治疗儿童胃酸过多性疾病的疗效与安全性[J].临床儿科杂志,2006,24(9):717-718.

(收稿日期:2016-11-29 修回日期:2017-03-01)

(编辑:林 静)