

骨新康对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗作用

冯汉林¹, 赵文娟², 殷明², 严启新¹, 王泽剑^{2*}

1. 深圳市海王生物工程股份有限公司, 广东 深圳 518057

2. 上海交通大学 药学院, 上海 2000240

摘要: **目的** 观察骨新康对卵巢切除致大鼠骨质疏松症的治疗作用。**方法** 选用 SD 雌性大鼠, 随机分为 7 组, 每组 12 只, 一组切去腹腔中少量脂肪作为假手术组, 其余各组大鼠切除双侧卵巢, 3 个月后各组干预给药, 8 周后测定各组股骨骨密度、骨生物力学指标、骨显微结构, 以及大鼠血清生化指标。**结果** 骨新康具有增加骨密度、改善骨生物力学指标以及具有性激素和促性腺激素样作用。**结论** 该药物具有抗大鼠骨质疏松症的作用。

关键词: 骨新康; 骨质疏松; 卵巢切除

中图分类号: R681

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2012)01-0014-04

Therapeutic effects of Guxinkang on osteoporosis in ovariectomized female rats

FENG Han-lin¹, ZHAO Wen-juan², YIN Ming², YAN Qi-xin¹, WANG Ze-jian²

1. Shenzhen Neptunus Bioengineering Holdings Co., Ltd., Shenzhen 518057, China

2. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Guxinkang on osteoporosis in rats after ovariectomy (OVX). **Methods** SD female rats were randomly divided into seven groups with 12 in each group. The control group by cutting adipose tissue was Sham group, while the rats in other groups received bilateral OVX. After three months of surgery, Guxinkang was given to the rats for extra two months. The levels of bone density, bone biomechanics, blood calcium, blood phosphate, and bone microstructure were observed in each group. **Results** Compared with the model group, Guxinkang could significantly increase the bone density, bone biomechanics, blood calcium, and the microstructure of bone trabecular width with hormone and gonadotropin-like action. **Conclusion** Guxinkang has a distinct preventive and effect on osteoporosis of rats.

Key words: Guxinkang; osteoporosis; ovariectomy (OVX)

绝经后骨质疏松是以骨量减少、骨显微结构退化为特点的一种全身代谢性骨骼疾病, 主要病因为体内雌激素水平的下降。临床上射干通常用于治疗上呼吸道感染, 以往报道显示从射干中提取的鸢尾苷、鸢尾黄素具有雌激素样作用, 与子宫、乳房等器官亲和力低^[1-2]。骨新康胶囊为深圳市海王生物工程股份有限公司开发的中药五类新药, 其主要成分为射干总黄酮, 该提取物对骨质疏松的作用未见文献报道。本实验按中药新药五类的药理学要求, 对其进行深入的抗骨质疏松的研究, 重点研究对去卵巢大鼠的骨质疏松治疗作用及作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

SD 大鼠 (中国科学院上海实验动物中心, 清

洁级, 体质量 200 g, 雌性, 合格证号为中科动管第 004 号; 许可证号 SCXK (沪) 2002-0010)。室温调节在 (24±2) °C, 自由摄食与饮水。

1.2 药品与仪器

骨新康原料 (即射干总黄酮提取物, 深圳海王药业有限公司制备, 批号 20040305, 质量分数 63.91%), 强骨胶囊 (北京岐黄制药有限公司, 0.25 g/粒, 批号 031002), 尼尔雌醇片 (上海华联制药有限公司生产, 2 mg/片, 批号 040301), 放射免疫检测试剂盒 (北京邦定泰克生物技术有限公司, 批号 20041201), 比色用试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 20041122)。SN-682 放射免疫 γ 计数器 (中国科学院上海原子核研究所日环仪器厂), XR-26 双能 X 线骨密度测量仪 (美国 Norland 公

收稿日期: 2011-10-27

作者简介: 冯汉林, 研发总监, 高级工程师。E-mail: fenghl@neptunus.com

*通讯作者 王泽剑 Tel: (021)34206836 E-mail: wangzejian@sjtu.edu.cn

司), QTS—25 骨生物力学流变仪 (德国 Stevens 公司); Elx—800 酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司), 2505 SuperCut 硬组织切片机 (USA)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

雌性 SD 大鼠 72 只, ip 给予 3%戊巴比妥钠 45 mg/kg 麻醉后, 行双侧卵巢切除术 (OVX), 手术后经病理学证实为大鼠卵巢组织, 且包膜完整。假手术组 (12 只) 切开皮肤、肌肉和腹膜后, 仅切除小块脂肪组织, 但不摘除卵巢。术后普通饲料饲养 3 个月。于卵巢切除 3 个月后, 将卵巢切除大鼠随机分为 6 组, 每组 12 只, 分别为模型组、骨新康低、中、高剂量组 (分别为 50、100、200 mg/kg)、强骨胶囊组 (90 mg/kg) 和尼尔雌醇组 (1 mg/kg)。药物均采用 0.5%羧甲基纤维素钠配制成悬浊液, 按分组给大鼠 ig 给药, 模型组和假手术组 ig 等体积的 0.5%羧甲基纤维素钠溶液^[3], 尼尔雌醇组一周给药一次, 其余各组一天给药一次, 共 2 个月, 每周测体质量, 以便调节药量, 5 个月后结束实验。

2.2 测定指标

2.2.1 骨密度及生物力学指标 用乌拉坦麻醉大鼠后取血液及骨标本供测试, 测定右侧股骨密度; 左侧股骨去除附着软组织及近侧端关节软骨, 进行三点弯曲法和压缩法测定骨骼的最大能量吸收、最大应力、弹性应力、刚性系数和弹性应变。

2.2.2 血清生化指标及激素水平^[4-5] 比色法测定钙 (Ca)、磷 (Pi)、碱性磷酸酶 (AKP); 放免法测定雌二醇 (E₂)、黄体生成素 (LH)、促卵泡激素 (FSH)、骨钙素 (BGP)。

2.2.3 组织病理学指标^[6] 取下胫骨上段, 锯开骨髓腔后放入 10%福尔马林溶液固定, 24 h 后用 75%乙醇固定, 然后梯度脱水, 甲基丙烯酸甲酯包埋。沿矢状面作 5 μm 厚的不脱钙切片, 将切片 (不脱塑) 浸于 0.2%甲酸 45 s, 然后浸于 20%甲醇 60 min, 蒸馏水冲净, 用 1%甲苯胺蓝 (含 0.5%四硼酸) 染色 3 min, 封片。采用全自动图像分析系统 (DIAS, KSS Image Magna UT, USA) 分析, 测量范围为右侧胫骨近端矢状面骨髓线下 1 和 4 mm 之间的松质骨。测定骨小梁面积、数量和厚度^[7]。

2.3 统计学方法

试验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用单因素随机方差检验, 并用 Dunnett 法比较各组间测定指标差异的显著性。

3 结果

3.1 骨新康对大鼠股骨密度的影响

与假手术组相比, 模型组骨密度显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 骨新康剂量依赖性的升高骨质疏松大鼠股骨密度, 其中高剂量骨新康组与尼尔雌醇组效果最好, 具有显著差异 ($P < 0.05$), 强骨胶囊组与假手术组相比无显著差异, 见表 1。

表 1 骨新康对去卵巢致骨质疏松大鼠骨密度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 1 Effect of Guxinkang on bone density of rats with osteoporosis after OVX ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	骨密度/(g·cm ⁻²)
假手术	—	0.28±0.02
模型	—	0.24±0.02 [*]
强骨胶囊	90	0.26±0.01
尼尔雌醇	1	0.27±0.02 [#]
骨新康	50	0.26±0.01
	100	0.26±0.02
	200	0.27±0.02 [#]

与假手术组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

3.2 骨新康对大鼠股骨生物力学的影响^[8]

与假手术组相比, 模型组最大能量吸收、最大应力、弹性应力、刚性系数均显著下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 骨新康组剂量依赖性升高骨质疏松大鼠股骨最大能量吸收、最大应力、弹性应力, 高剂量组效果较好 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 强骨胶囊可显著提高骨质疏松大鼠股骨的最大应力、最大能量吸收和弹性应力 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 尼尔雌醇组显著提高大鼠股骨最大应力 ($P < 0.05$); 各用药组对大鼠骨刚性系数改变不显著, 见表 2。

3.3 骨新康对大鼠血清激素水平及生化指标的影响

与假手术组相比, 模型组 E₂、FSH、LH 和 BGP 水平显著降低 ($P < 0.05$), 血清 Pi 水平显著增高, 血 Ca 水平显著下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 骨新康各组能剂量依赖性地升高骨质疏松大鼠的血 Ca 水平; 提高 E₂、FSH、LH、BGP 和血清 AKP 等的水平, 降低血 Pi 水平, 高剂量组效果较好 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 尼尔雌醇组显著提高大鼠 FSH 水平, 对血清 AKP 等无显著影响, 提示尼尔雌醇组主要是通过抑制破骨细胞的功能发挥抗骨质疏松的作用, 强骨胶囊和骨新康作用机制相似。各组大鼠血清激素水平及生化指标的变化见表 3、4。

表2 骨新康对去卵巢大鼠骨生物力学指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effect of Guxinkang on bone biomechanics of rats with osteoporosis after OVX ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	例数	最大能量吸收/(N·mm ²)	最大应力/(N·mm ⁻²)	弹性应力/(N·mm ⁻²)	刚性系数/(N·mm ⁻²)
假手术	—	12	38.7±6.1	299.5±23.4	212.3±7.2	0.05±0.01
模型	—	12	25.4±4.2*	254.2±20.3*	196.4±4.5*	0.04±0.01*
强骨胶囊	90	11	31.3±3.9 [#]	296.2±16.7 [#]	207.2±8.5 [#]	0.04±0.01
尼尔雌醇	1	12	30.3±6.1	278.8±7.5 [#]	200.9±16.5	0.04±0.01
骨新康	50	12	28.5±4.8	278.6±23.7	200.0±11.8	0.04±0.01
	100	12	35.2±9.8	289.4±12.1 [#]	201.3±11.6	0.04±0.01
	200	12	38.2±3.6 [#]	299.0±12.8 [#]	211.9±8.2 [#]	0.04±0.01

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ * $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group表3 骨新康对去卵巢大鼠血清激素水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effect of Guxinkang on serum hormone levels of rats with osteoporosis after OVX ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	例数	E ₂ /(ng·L ⁻¹)	FSH/(IU·L ⁻¹)	LH/(IU·L ⁻¹)	BGP/(μg·L ⁻¹)
假手术	—	12	17.6±2.7	1.2±0.1	8.7±2.3	0.19±0.01
模型	—	12	9.3±1.3**	0.4±0.2**	1.6±1.3**	0.16±0.01*
强骨胶囊	90	11	13.6±5.8	1.1±0.3 [#]	3.2±2.0*	0.22±0.01*
尼尔雌醇	1	12	10.2±3.9*	1.1±0.3 [#]	2.2±1.4*	0.19±0.01
骨新康	50	12	10.4±3.8*	0.5±0.5*	1.6±0.6*	0.28±0.12
	100	12	12.5±5.9	0.5±0.3*	1.9±1.8*	0.32±0.13 [#]
	200	12	16.0±4.0 [#]	1.1±0.4 [#]	4.6±2.3 [#]	0.33±0.07 ^{##}

与假手术组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group表4 骨新康对去卵巢大鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 4 Effect of Guxinkang on serum biochemical indexes of rats with osteoporosis after OVX ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	例数	Ca/(mmol·L ⁻¹)	Pi/(mmol·L ⁻¹)	AKP/(U·10 ⁻² ·mL ⁻¹)
假手术	—	12	2.5±0.5	66±18	1.39±0.35
模型	—	12	1.0±0.4*	430±97**	1.62±0.64
强骨胶囊	90	11	1.9±0.7 [#]	108±12 ^{###}	2.50±0.68*
尼尔雌醇	1	12	1.4±0.9	401±92	2.03±0.92
骨新康	50	12	1.2±0.3	171±24**	1.99±0.84
	100	12	1.5±0.7	110±17**	2.24±1.16
	200	12	2.2±0.8 [#]	71±53 ^{###}	2.58±0.72*

与假手术组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

3.4 骨新康对大鼠胫骨形态计量学指标的影响

与假手术组相比,模型组骨小梁面积、数目均显著降低(骨量丢失50%以上, $P<0.01$)。与模型组比较,尼尔雌醇、强骨胶囊和骨新康组骨小梁面积、骨小梁数目均无变化,然而中、高剂量骨新康组可维持骨小梁厚度在假手术组水平,与强骨胶囊组、尼尔雌醇组比较,骨小梁厚度增加($P<0.05$),见表5。

4 讨论

骨质量的评价包括骨密度、骨生物力学及骨的显微结构三方面。骨密度是反映骨质疏松程度,预测骨折危险性的重要依据。本研究测定的骨密度参数及其他指标,经统计学分析具有显著差异,说明建立的骨质疏松症模型成立。在大鼠切除卵巢致骨质疏松模型上,骨新康在多个指标上表现出较好的对抗骨质疏松症的作用(与阳性对照药尼尔雌醇、

表5 骨新康对去卵巢大鼠骨形态学指标影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 5 Effect of Guxinkang on indexes of bone morphology of rats with osteoporosis after OVX ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	例数	骨小梁面积/%	骨小梁厚度/ μ m	骨小梁数目/(个·mm ⁻¹)
假手术	—	12	18.1 $\pm$ 9.30	60.1 $\pm$ 9.2	2.86 $\pm$ 1.63
模型	—	12	7.76 $\pm$ 4.07**	54.5 $\pm$ 5.5*	1.35 $\pm$ 0.82**
强骨胶囊	90	11	6.77 $\pm$ 1.87	54.3 $\pm$ 7.6	1.25 $\pm$ 0.30
尼尔雌醇	1	12	6.41 $\pm$ 3.10	50.6 $\pm$ 8.8	1.29 $\pm$ 0.77
骨新康	50	12	9.04 $\pm$ 3.66	51.7 $\pm$ 9.2	1.80 $\pm$ 0.84
	100	12	7.63 $\pm$ 3.52	62.5 $\pm$ 7.7 [#]	1.24 $\pm$ 0.52
	200	12	7.55 $\pm$ 2.83	62.7 $\pm$ 7.5 [#]	1.20 $\pm$ 0.45

与假手术组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group

强骨胶囊药效学作用相平行),并显示出一定的量效关系。这些结果提示骨新康具备作为防治骨质疏松药物的潜力。

骨新康各剂量组、尼尔雌醇组和强骨胶囊组与模型组比较均表现出明显升高去卵巢致实验性骨质疏松大鼠股骨密度的作用,提示骨新康能提高单位骨组织体积的骨量。

骨生物力学反映骨质质量的指标主要有骨骼的强度、弹性、刚性等,是评价骨质量的可靠方法^[8]。与模型组相比,骨新康各剂量组及尼尔雌醇组和强骨胶囊组均能明显改善去卵巢致实验性骨质疏松大鼠上述各项骨生物力学指标,提示骨新康能增加骨组织的承载力,提高骨骼抵抗外力冲击的能力,并对骨的几何形状和内在特性有一定的改善作用。

与模型组相比,骨新康、尼尔雌醇和强骨胶囊均能显著升高卵巢切除致实验性骨质疏松大鼠的血钙水平($P<0.05$)。骨新康升高血钙水平的同时也升高了骨密度,说明促进了骨对钙的吸收,有利于骨矿盐的形成。

与模型组相比,骨新康高剂量、尼尔雌醇和强骨胶囊能显著升高卵巢切除致实验性骨质疏松大鼠的血清E₂、LH、FSH水平($P<0.05$, 0.01),提示骨新康可能有性激素样和/或促性腺激素样作用。

射干总黄酮主要含射干苷(鸢尾苷 tectoridin)、鸢尾苷元(tectorigenin)、野鸢尾苷(iridin)、染料木素(genistein)等,实验表明所含各成分对骨质疏松症都有一定作用^[9]。Morito等^[10]通过异黄酮类成分的基因表达进行了研究,结果表明,鸢尾苷元、美皂异黄酮、5-甲氧基-染料木素、刺芒柄花素可以与人类雌激素素(hER)- β 受体较好结合,鸢尾苷元、5-甲氧基-染料木素、刺芒柄花素也可以和植物

雌激素 hER- α 受体结合,鸢尾苷元可以诱导 hER- α 、 β 受体基因转录,与成骨细胞内的雌激素受体结合后加强成骨细胞的活性,促进骨基质的产生、分泌和骨矿化的过程,可预防骨质疏松的发生。本实验首次系统地对射干总黄酮进行研究,结果表明其具有潜在的抗骨质疏松作用。

参考文献

- [1] 钟 鸣, 关旭俊, 黄炳生, 等. 中药射干的现代研究进展 [J]. 中药材, 2001, 12(24): 904-907.
- [2] 李国信, 王光函, 姜 鸿, 等. 射干提取物在大鼠体内的药动学研究[J]. 中草药, 2010, 41(12): 2052-2053.
- [3] 谢雁鸣, 赵晋宁, 张文君, 等. 强骨胶囊抗维甲酸所致大鼠骨质疏松症的实验研究 [J]. 中药新药与临床药理, 1998, 9(4): 217-220.
- [4] 倪天庆. 仙珠胶囊对去卵巢大鼠骨密度和血生化指标的影响[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(1): 54-57.
- [5] 岳 南, 只德广, 赵益贵, 等. 骨康宁冲剂治疗骨质疏松的药效学研究[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(4): 227-231.
- [6] 岳 南, 李 勇, 只德广, 等. 骨康宁抗骨质疏松药理研究[J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 51-57.
- [7] 谢 华, 吴 铁, 李青南, 等. 维生素 E 对去卵巢大鼠骨组织计量学的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2001, 7(21): 304-306.
- [8] 于 琼, 吴 铁, 崔 燎. 双丹口服液对环磷酰胺大鼠股骨生物力学和生化指标的影响 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(9): 2133-2135.
- [9] 袁崇均, 王 筋, 陈 帅, 等. 川射干化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(3): 444-446.
- [10] Morito K, Aomori T, Hirose T, et al, Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (II) [J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25(1): 48-52.