

健骨丸对去势大鼠骨质疏松性骨折愈合的影响

刘 炜, 罗会盛*, 邹恺平, 王 娜, 刘 顺, 施 敏

南京中医药大学附属医院 江苏省中医院, 江苏 南京 210029

摘 要: **目的** 观察健骨丸对去势大鼠骨质疏松性骨折愈合的影响。**方法** 建立去势大鼠右胫骨骨折模型, 随机分为对照组、模型组、仙灵骨葆胶囊 (300 mg/kg) 组和健骨丸低、中、高剂量 (150、300、450 mg/kg) 组, 给药 15、30 d 后, 检测各组大鼠血清中雌二醇 (estradiol, E₂)、降钙素 (calcitonin, CT)、骨钙素 (bone gla protein, BGP)、血钙、血磷水平和碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 活性; 采用 X-射线扫描各组大鼠右胫骨骨折处并测定骨密度; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色检测各组大鼠右胫骨骨折处病理变化。**结果** 健骨丸可以提高去势大鼠血清中 E₂、CT、BGP、血钙、血磷水平和 AKP 活性; 健骨丸可以促进断端骨痂生成, 提高骨密度, 促进骨折断端愈合。**结论** 健骨丸能够上调骨细胞活性, 促进去势后大鼠骨折愈合以及骨形成。

关键词: 健骨丸; 去势大鼠; 绝经后骨质疏松症; 骨质疏松性骨折; 骨折愈合; 骨形成

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)18-5615-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.18.016

Effect of Jiangu Pill on osteoporotic fracture healing in ovariectomized rats

LIU Wei, LUO Hui-sheng, ZOU Kai-ping, WANG Na, LIU Shun, SHI Min

Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of Jiangu Pill (健骨丸) on osteoporotic fracture healing in ovariectomized rats. **Methods** The right tibia fracture model of ovariectomized rats was established and randomly divided into control group, model group, Xianling Gubao Capsule (300 mg/kg) group, low-, medium- and high-dose Jiangu Pill (150, 300, 450 mg/kg) groups. Fifteen and 30 d after administration, estradiol (E₂), calcitonin (CT), bone gla protein (BGP), blood calcium, blood phosphorus levels and alkaline phosphatase (AKP) activity in serum of rats in each group were detected; X-ray was used to scan the fractures of right tibia of rats in each group and bone mineral density was measured; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the pathological changes in right tibial fractures. **Results** Jiangu Pill increased E₂, CT, BGP, blood calcium, blood phosphorus levels and AKP activity in serum of ovariectomized rats; Jiangu Pill promoted the formation of broken end callus, increased bone density, and promoted the healing of fractured ends. **Conclusion** Jiangu pill can up-regulate the activity of bone cells, promote fracture healing and bone formation in ovariectomized rats.

Key words: Jiangu Pill; ovariectomized rats; postmenopausal osteoporosis; osteoporotic fracture; fracture healing; bone formation

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 是一种与绝经有关的全身代谢性骨病, 以骨量减少、骨组织显微结构破坏继而骨脆性增高和易发生骨折为特征^[1-2]。我国是 PMOP 高发地区, 女性绝经后 10 年内骨流失速度较快, 60 岁以上患有 PMOP 的女性中, 30%~50% 将经历 PMOP 相关骨折, 且这种趋势逐年增高^[3]。目前临床

上常用雌激素类、促进骨形成、抑制骨吸收等药物治疗 PMOP 相关骨折^[4]。中医理论认为肾生骨髓^[5]。健骨丸为江苏省中医院院内制剂, 其处方基本组成为鹿角、熟地黄、狗脊、黄柏、阿胶、三七、茯苓和六神曲, 具有补肾健脾、填精益髓、活络定痛的功效, 临床已使用近 20 年, 其疗效确切, 常用于治疗绝经期骨质疏松症、男性骨质疏松症等原发性骨

收稿日期: 2021-02-20

基金项目: 江苏省中医院制剂工艺改进和质量标准提升项目 (制剂部发展基金) (Y2020CX75)

作者简介: 刘 炜, 硕士, 主管药师, 研究方向为中药药剂学、中药药理学等。E-mail: 269560856@qq.com

*通信作者: 罗会盛, 本科, 副主任中药师, 国家中药特色技术传承人才, 研究方向为中药学、中药药剂学等。E-mail: 396968655@qq.com

骨质疏松症。本研究通过建立大鼠绝经模型,研究健骨丸对去势大鼠骨质疏松相关指标及骨折愈合的影响^[6-7],以期探讨健骨丸对 PMOP 所致骨折的治疗作用。

1 材料

1.1 动物

清洁级雌性 SD 大鼠,12 周龄,体质量 200~220 g,由浙江省实验动物中心提供,动物合格证号 SYXK 2017-0069。动物饲养于 SPF 级饲养室,12 h 昼夜交替,温度(21±2)℃,湿度(50±10)%,自由进食饮水。动物实验经江苏省中医院伦理委员会批准(批准号 2020DW-34-01)。

1.2 药品与试剂

健骨丸(质量标准 JSZBZ20090801Z,批号 1912010)由江苏省中医院制剂部提供,主要含盐酸小檗碱和三七皂苷;仙灵骨葆胶囊(批号 191022103)购自贵州同济堂制药有限公司;钙测定试剂盒(批号 20190111)、血清无机磷测定试剂盒(批号 20190111)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)测定试剂盒(批号 20190106)购自南京建成生物工程研究所;人血清雌二醇(estradiol, E₂)放免试剂盒、血清骨钙素(bone gla protein, BGP)放免试剂盒和降钙素(calcitonin, CT)放免试剂盒购自北京华英生物技术研究所;其他试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器

Power wave x340 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);Discover W 型双能 X 线骨密度测量仪(美国 Hologic 公司);Eclipse E100 型光学显微镜(日本尼康公司);5424R 型台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

SD 大鼠随机分为对照组、模型组、仙灵骨葆胶囊(300 mg/kg,相当于临床等效剂量)组和健骨丸低、中、高剂量(150、300、450 mg/kg,分别相当于临床最大剂量的 0.5、1.0、1.5 倍)组,各组再分为给药 15 d 以及 30 d 2 组。除对照组外,其余各组进行双侧卵巢切除手术,3 个月后右后腿胫骨机械性骨折,建立去势骨质疏松性骨折模型^[7]。骨折手术当天,各给药组 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 等体积 0.9%氯化钠溶液,1 次/d,连续 15、30 d。

2.2 健骨丸对去势骨质疏松性骨折大鼠血清中 E₂、CT、BGP、血钙、血磷水平和 AKP 活性的影响

分别于给药 15、30 d,大鼠乙醚麻醉后颈总动

脉采血致死,全血于室温放置,分层后 4000 r/min 离心 10 min,取上层血清,按试剂盒说明书检测血清中 E₂、CT、BGP、血钙、血磷水平和 AKP 活性。

2.3 健骨丸对去势骨质疏松性骨折大鼠胫骨影像学及骨密度的影响

分别于给药 15、30 d,采用双能 X 线骨密度测量仪对各组大鼠右胫骨进行 X-射线扫描,并测定骨密度。

2.4 健骨丸对去势骨质疏松性骨折大鼠骨折处病理变化的影响

取给药 30 d 大鼠骨折处及其周围组织,于 10% 福尔马林中固定,脱钙后常规石蜡包埋、切片,进行苏木素-伊红(HE)染色,于显微镜下拍照并观察骨折周围修复情况。

2.5 统计方法

使用 Graphpad Prism 7 软件进行数据统计,组间差异使用 One way ANOVA 法进行分析。

3 结果

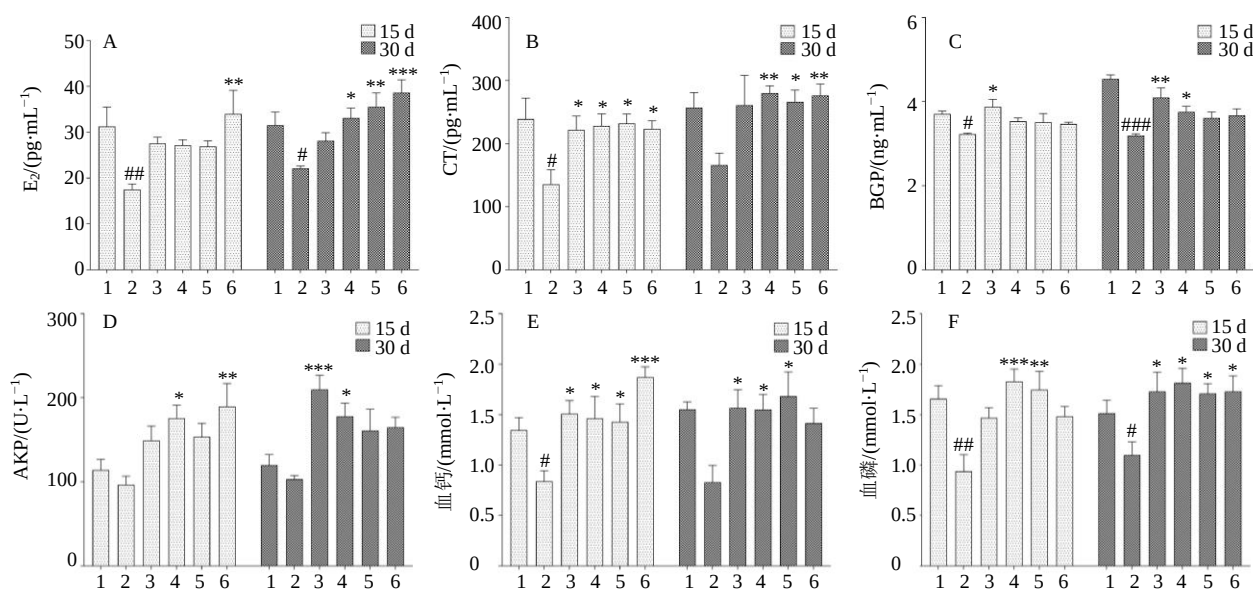
3.1 健骨丸对去势骨质疏松性骨折大鼠血清中 E₂、CT、BGP、血钙、血磷水平和 AKP 活性的影响

E₂ 是由卵巢内的卵泡细胞分泌的一种甾体雌激素,雌激素降低是导致 PMOP 最主要的原因^[8-9]。如图 1-A 所示,与模型组比较,给药 15 d,健骨丸高剂量组血清 E₂ 水平显著升高($P<0.01$);给药 30 d,健骨丸各剂量组血清 E₂ 水平均显著升高($P<0.05$ 、0.01、0.001)。

CT 是一种钙调节激素,能够通过抑制破骨细胞的增殖并降低破骨细胞的活性,从而降低骨吸收和骨丢失^[10]。如图 1-B 所示,与模型组比较,给药 15 d,各给药组血清 CT 水平均显著升高($P<0.05$);给药 30 d,健骨丸各剂量组血清 CT 水平显著升高($P<0.05$ 、0.01)。

BGP 主要由成骨细胞、骨细胞、骨肉瘤细胞等骨形成性细胞产生,血中 BGP 水平可特异性反映成骨细胞的活性^[11]。如图 1-C 所示,与模型组比较,给药 15 d,仙灵骨葆胶囊组血清 BGP 水平显著升高($P<0.05$);给药 30 d,仙灵骨葆胶囊组和健骨丸低剂量组血清 BGP 水平显著升高($P<0.05$ 、0.01)。

AKP 是骨细胞功能分化的指标,其活性可作为成骨细胞分化的特异性标志。临床常用 AKP 活性评价成骨细胞分泌功能^[12]。如图 1-D 所示,与模型组比较,给药 15 d,健骨丸低、高剂量组血清 AKP 活性显著升高($P<0.05$ 、0.01);给药 30 d,仙灵



1-对照组 2-模型组 3-仙灵骨葆胶囊组 4-健骨丸低剂量组 5-健骨丸中剂量组 6-健骨丸高剂量组 与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 图 3、5 同

1-control group 2-model group 3-Xianling Gubao Capsule group 4-low-dose Jiangu Pill group 5-medium-dose Jiangu Pill group 6-high-dose Jiangu Pill group # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as figs. 3, 5

图 1 健骨丸对去势骨质疏松性骨折大鼠血清中 E_2 (A)、CT (B)、BGP (C) 水平、AKP (D) 活性、血钙 (E) 和血磷 (F) 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Effect of Jiangu Pill on E_2 (A), CT (B), BGP (C) levels, AKP (D) activity, blood calcium (E) and blood phosphorus (F) levels in serum of ovariectomized osteoporotic fracture rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

骨葆胶囊组和健骨丸低剂量组血清 AKP 活性显著升高 ($P < 0.05$ 、0.001)。

在骨折愈合过程中, 局部环境的微量元素代谢活跃, 其中钙和磷的沉积是一个关键步骤, 两者处于动态平衡的状态^[13]。如图 1-E、F 所示, 与模型组比较, 给药 15 d, 仙灵骨葆胶囊组和健骨丸各剂量组血钙水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.001), 健骨丸低、中剂量组血磷水平均显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001); 给药 30 d, 仙灵骨葆胶囊组和健骨丸低、中剂量组

血钙水平均显著升高 ($P < 0.05$), 各给药组血磷水平均显著升高 ($P < 0.05$)。

3.2 健骨丸对去势骨质疏松性骨折大鼠胫骨影像学及骨密度的影响

骨质疏松性骨折的愈合过程通常包括纤维、软骨及骨性骨痂的形成。骨痂的形成对骨折愈合至关重要, 反映了骨组织再生修复的自然规律, 也是临床判断骨折愈合程度的重要依据^[14-15]。如图 2 所示, 给药 15 d, 各给药组断面有骨痂生成; 给药 30 d 后,

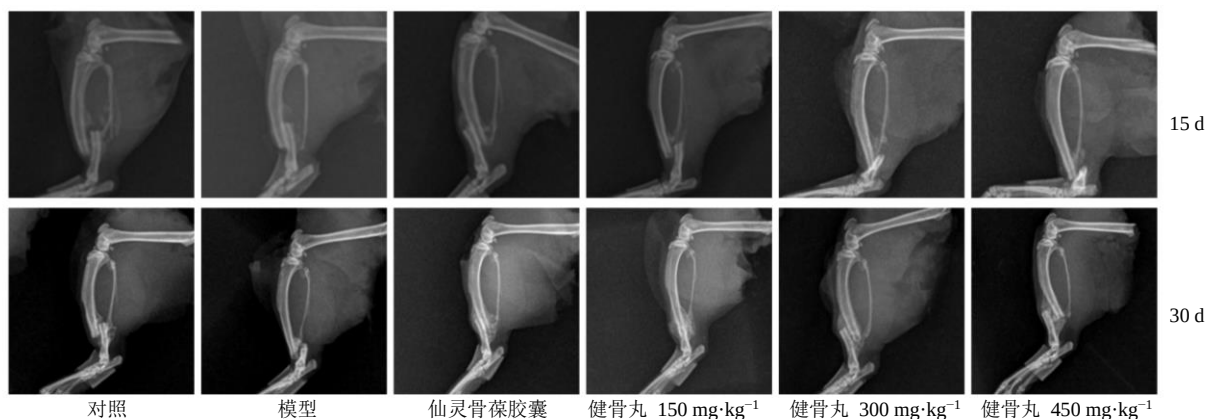


图 2 健骨丸对去势骨质疏松性骨折大鼠胫骨影像学的影响

Fig. 2 Effect of Jiangu Pill on tibia imaging in ovariectomized osteoporotic fracture rats

各给药组断面有大量骨痂形成, 其中健骨丸中、高剂量组生成骨痂量多于模型组。健骨丸各剂量组骨折愈合情况较模型组有明显改善。

骨密度即骨骼矿物质密度, 反映骨骼强度, 也是诊断骨质疏松症、骨质疏松性骨折以及骨折愈合程度的重要指标^[16-17]。如图 3 所示, 给药 15、30 d, 与模型组比较, 各给药组骨密度均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

3.3 健骨丸对去势骨质疏松性骨折大鼠骨折处病理变化的影响

如图 4 所示, 与模型组相比, 健骨丸各剂量组断端骨痂中骨性骨痂的成分增多, 骨小梁的粗细及骨髓腔的大小与对照组相似。

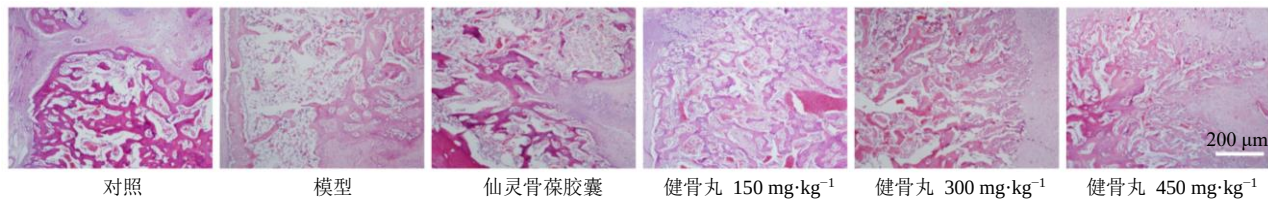


图 4 健骨丸对去势骨质疏松骨折大鼠骨折处病理变化的影响 (HE, ×40)

Fig. 4 Effect of Jiangu Pill on pathological changes of fractures in ovariectomized osteoporotic fracture rats (HE, ×40)

4 讨论

在中医理论中, 女性绝经主要是因肾气渐衰、冲任不足、天癸将竭、精气亏虚、阴阳失衡所致。中医理论认为肾与骨有着极其密切的联系, 《素问·阴阳应象大论》曰: “肾生骨髓”, 即肾中精气充足, 骨髓得以滋养, 骨则强壮^[18-19]。

健骨丸为江苏省中医院临床验方制成的院内制剂, 其处方基本组成为鹿角、熟地黄、狗脊、黄柏、阿胶、三七、茯苓和六神曲。方中鹿角、狗脊共为君药, 鹿角性温, 归肝、肾经, 有温肾阳、强筋骨之效; 狗脊性甘、寒, 归肝、肾经, 有补肝肾、强腰脊之功效; 熟地黄、阿胶共为臣药, 熟地黄性微温, 归肝、肾经, 有填精益髓之效, 为补肾阴之要药; 阿胶性平, 归肺、肝、肾经, 有补血、滋阴、止血之功效; 佐以黄柏苦寒坚肾, 三七散瘀止痛, 茯苓、六神曲健脾宁心, 诸药合用, 共奏补肾健脾、填精益髓、活络定痛之功, 在临床上对绝经期骨质疏松症有确切疗效。

本研究以仙灵葆胶囊为阳性对照药物, 通过建立去势大鼠模型, 探讨健骨丸对去势大鼠骨质疏松性骨折愈合的影响。结果显示, 健骨丸能够增加去势骨质疏松模型大鼠血清 E_2 水平。雌激素降低是导致 PMOP 的重要原因之一, E_2 是活性最强的雌激

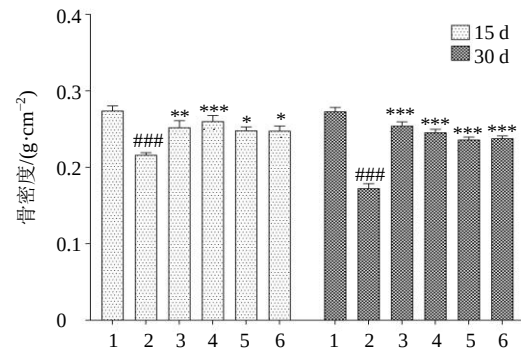


图 3 健骨丸对去势骨质疏松骨折大鼠骨密度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 3 Effect of Jiangu Pill on bone density in ovariectomized osteoporotic fracture rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

素, E_2 水平的降低会抑制成骨细胞活性并增强破骨细胞活性, 导致骨密度降低, 骨量丢失增多。健骨丸通过升高 E_2 水平, 增加骨密度, 促进成骨细胞增殖, 抑制骨吸收, 保护骨组织, 防止骨丢失。在骨折愈合过程中检测 AKP 具有重要意义, AKP 的含量变化可反映骨折区细胞增殖的程度以及骨折愈合演进的状况。血中 40%~50% AKP 来源于骨, AKP 的活性可反映骨细胞尤其是新形成的成骨细胞的活性及状态。本研究结果显示, 健骨丸可提高血中 AKP 活性, 提示健骨丸可以提高成骨细胞活跃度, 促进骨形成增加。血中 CT、BGP 水平也是反映成骨细胞活性的特异性指标, 本研究结果显示, 健骨丸可以提高血清 CT、BGP 水平, 促进骨形成; 此外, 健骨丸能够增加血钙、血磷水平, 促进骨基质的钙化, 形成骨质^[6,20-22]。

结合 X-射线扫描、骨密度及病理组织学结果可知, 健骨丸可以通过提高骨折端骨密度来增加骨骼强度, 从而促进骨折愈合; 同时, 骨折断端已由增生的纤维结缔组织、软骨、松质骨形成的骨痂连接。与对照组比较, 模型组大鼠骨痂内松质骨髓腔较大, 表现为明显的骨质疏松现象; 各给药组骨髓腔形态基本正常, 由去势诱导的骨质疏松症状明显缓解; 健骨丸各剂量组骨小梁表面可见活跃增生的成

骨细胞,小梁之间已有骨髓腔形成,部分增生的结缔组织内尚可见丰富的毛细血管,骨痂内软骨数量不等。健骨丸可使机械损伤的骨折断端骨痂明显增多,成骨细胞增生活跃,骨折愈合良好^[8,23]。健骨丸各剂量组未体现明显的剂量相关性,这可能是受多组分的药物代谢影响。本研究结果提示,健骨丸对于其他适应症的临床指导用量(成人10~15 g/d)也可作为修复绝经引起的骨质疏松性骨折的临床使用剂量。

本研究通过测定去势大鼠血清中E₂、CT、BGP、AKP、血钙、血磷等生化指标,结合X-射线扫描、骨密度检测以及病理组织学方法,表明健骨丸具有促进绝经引起的骨质疏松性骨折的骨形成以及骨折愈合的功效。课题组后续将深入探究其可能的作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 叶丹. 骨质疏松药物治疗的研究进展 [J]. 牡丹江医学院学报, 2021, 42(1): 148-151.
- [2] Black D M, Rosen C J. Postmenopausal osteoporosis [J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(3): 254-262.
- [3] 胡广, 关智宇, 张开伟. 三七总皂苷干预去势骨质疏松性骨折模型大鼠的作用机制 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(2): 172-177.
- [4] 李春君, 于德民, 于倩. 骨质疏松治疗的研究进展 [J]. 药品评价, 2013, 10(5): 35-39.
- [5] 李章青. 补肾化痰方对去势骨质疏松大鼠脂/骨代谢影响的实验研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2020.
- [6] 笪巍伟, 唐德志, 金镇雄, 等. 强骨胶囊对去势后小鼠骨质疏松性骨折愈合的影响 [J]. 中成药, 2020, 42(4): 1044-1047.
- [7] Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, et al. Ovariectomized rat model of osteoporosis: A practical guide [J]. *Excli J*, 2020, 19: 89-107.
- [8] 曲雷鸣, 龚伟. 鹿茸干预去卵巢骨质疏松症模型大鼠的实验评价 [J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(1): 52-55.
- [9] Chen X T, Zhu X J, Hu Y, et al. EDTA-modified 17 β -estradiol-laden upconversion nanocomposite for bone-targeted hormone replacement therapy for osteoporosis [J]. *Theranostics*, 2020, 10(7): 3281-3292.
- [10] 朱庆华, 陶周善, 谢加兵, 等. 甲状旁腺激素 1-34 和雷奈酸锶联合使用对去势大鼠骨质疏松症影响的研究 [J]. 大连医科大学学报, 2017, 39(1): 8-12.
- [11] 颜海彬, 张炳云. 联合使用甲状旁腺激素和辛伐他汀对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗有叠加效应 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(3): 300-303.
- [12] 赖蔚文. 阿仑磷酸钠对大鼠成骨细胞的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2020.
- [13] 穆树林, 张柳, 李震, 等. 仙灵骨葆对卵巢切除大鼠股骨骨折愈合影响的实验研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2009, 23(6): 690-693.
- [14] 余昶, 董启榕, 周晓中. 大鼠股骨开放截骨模型与闭合骨折模型制作的比较 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(46): 9071-9075.
- [15] 刘雄飞, 魏骏, 玄鲁燕. 双能 X 线骨密度仪椎体骨密度测定对骨质疏松症的诊断价值观察 [J]. 当代医学, 2016, 22(30): 43-44.
- [16] 褚亚明, 姜保国, 张殿英, 等. 骨量、微结构及受力方向对去卵巢大鼠骨生物力学的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2007, 13(9): 651-654.
- [17] 廖文胜, 戴冠戎, 汤亭亭, 等. 老年骨折患者骨转换生化指标的初步分析 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8(4): 324-325.
- [18] 卞俊, 陈海飞, 宣伟东, 等. 愈骨疗伤胶囊对骨折愈合及其相关血液生化指标的影响 [J]. 解放军药学报, 2008, 24(3): 215-217.
- [19] 谢艳, 朱太咏, 毕军花, 等. 益气生骨颗粒对大鼠骨折愈合骨痂中无机质及钙含量的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(19): 3781-3783.
- [20] 罗祖军, 王强, 林棋荣. 六味地黄丸对下颌骨骨折术后愈合的生化指标影响及意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 600-601.
- [21] 王晶, 赵津璋, 刘国良, 等. 辛伐他汀对去卵巢小鼠骨保护作用的实验研究 [J]. 中国医学装备, 2019, 16(1): 135-138.
- [22] 鲍根强, 肖春来, 张国辉, 等. 葛根素对去卵巢大鼠骨质疏松性骨折骨痂血管形成的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(5): 655-658.
- [23] 刘明, 刘杨, 张永萍, 等. 新仙灵骨葆胶囊对大鼠骨折愈合的影响研究 [J]. 中国药房, 2018, 29(9): 1201-1204.

[责任编辑 李亚楠]