

实验研究 ·

骨疏康对卵巢切除大鼠骨质量及基因表达的影响*

薛延¹ 包方¹ 李东¹ 刚丕寰² 蒋淑媛² 黄公怡³

(1. 北京创伤骨科研究所骨与关节病研究中心,北京 100035; 2. 辽宁中医研究院,辽宁 沈阳;
3. 北京医院,北京)

【摘要】 目的 为进一步探讨骨疏康防治骨质疏松的作用机理。方法 将 27 只 3 月龄 Wistar 雌性大鼠随机分为三组:假手术组(Sham)、卵巢切除组(OVX)、骨疏康组(GSK)。给药后 12 周同时处死。取大鼠血、尿检测骨代谢生化指标,取股骨或腰椎测量骨密度、骨形态计量学参数、骨生物力学参数,取股骨和胫骨,测定骨粘连蛋白(ON)mRNA 表达。结果 与 OVX 组相比,GSK 组股骨及 L₄ 骨密度明显增高,生物力学参数也有增加。GSK 有抑制骨吸收作用。结论 GSK 增加骨量和骨强度的作用。

【关键词】 去卵巢 生物力学 骨形态计量学 中草药 骨质疏松

Effect of Gushukang on bone quality and gene expression of osteonectin in ovariectomized rats. XUE Yan, BAO Fang, LI Dong, et al. Bone & Joint Diseases Center Beijing Institute of Traumatology & Orthopaedics (Beijing 100035).

【Abstract】 Objective To investigate the mechanisms of prevention and treatment of Gushukang on osteoporosis. **Methods** Ovariectomized(OVX) female Wistar rats(3 months old) were divided into three groups randomly: sham group, OVX group and GSK group. Biochemical markers, bone mineral density(BMD), bone histomorphometry, bone biomechanical properties and the expression of osteonectin(ON) mRNA of femur and tibia were measured at the end of the experiment. **Results** Compared with OVX rats, GSK significantly increased BMD of femur and L₄, also increased the mechanical properties of OVX rats. GSK inhibited bone resorption. **Conclusion** GSK increased bone mass and bone strength.

【Key Words】 Ovariectomized Biomechanics Bone histomorphometry Chinese herbal drugs Osteoporosis

骨疏康为纯中药制剂,是我国第一个获准治疗骨质疏松症的中药[(95)卫药准字 Z-08 号]。在临床研究中,骨疏康对骨质疏松症患者腰背痛治疗效果非常显著,总有效率为 92.3%,显效率达 76.3%^[1]其防治原理主要是根据中医“肾主骨”的理论,以补肾为主,结合活血化瘀^[2]。本实验旨在运用现代科学方法,如:生化、骨形态计量学、骨密度测量及骨生物力学等进一步深入探讨骨疏康防治骨质疏松的作用机理,为其临床应用提供理论基础。

1 材料与方

1.1 动物分组与模型制备 3 月龄雌性 Wistar 大鼠,体重 231.6 ± 16.0g, (二级动物,医科院动物中心动物合格证书号:医动字第 01-3008 号)。自然光

照,自由饮水、取食。饲料含钙 0.32%,磷 0.17%。饲养于北京市药检所动物室(环境设施合格证号:医动字第 01-2074)。

将 27 只大鼠分为 3 组,每组 9 只:(1)假手术组(sham):打开腹腔,找出卵巢但不切除;(2)卵巢切除组(OVX):腹部双侧切除卵巢;(3)骨疏康组(GSK):OVX 大鼠,以骨疏康一代冲剂(2.5g 生药/kg 体重/天)灌胃 12 周。

1.2 样品收集 在处死大鼠前 12 天及前 1 天以 0.1ml/100g 体重的剂量腹腔注射 0.5% 荧光素水溶液。处死前 1 天用代谢笼收集 24h 尿液。处死前眼眶取血,收集血清 - 20 保存。剥取下肢骨,液氮保存,取腰椎, L₂₋₃ 福尔马林液固定, L₄₋₆ 浸于生理盐

* 本文为国家科委九五攻关资助课题(项目编号:96-906-05-04)

水中, - 20 保存。取子宫、胸腺、脾称重。

1.3 测定血尿各项生化指标 (1) 血清碱性磷酸酶 (ALP), 以磷酸苯二钠为底物, 高铁氯化钾显色, 510nm 比色; (2) 血清及尿钙、磷、肌酐 (Cr), 用北京中生生物技术公司试剂盒测定; (3) 血清骨钙素 (BGP), 用丹麦 Osteometer A/S 公司酶标试剂盒测定; (4) 血清雌二醇 (E₂), 用比利时 Biosource 公司酶标试剂盒测定。 (5) 血清抗酒石酸盐酸性磷酸酶 (TRAP), 用北京化工厂试剂盒。

1.4 骨密度测定 用浮力法分别测股骨与腰椎 (L₄) 体积, 然后 105 烤干至恒重, 称重。干重与体积之比即骨矿密度。

1.5 骨生物力学 参照崔伟等^[3]方法, 用左股骨在流变仪 (英国 Stevens 公司) 上做三点弯曲实验测算生物力学参数, 加载速度 6mm/min, 跨距 22mm。

1.6 骨形态计量学测定 用第 2 - 3 腰椎制备不脱钙切片, 5μm 切片用 1% 甲苯胺蓝染色, 10μm 切片不染色作荧光观察, 在德国 Option- RS 多功能显微镜下计数, 用 Morphonet-10 半自动图象分析仪计算形态计量学参数 (参照郑丰裕等^[4]方法)。

1.7 骨粘连蛋白 (ON) 基因表达水平测定 参照 Chomczynsk 等^[5]方法, 将右股骨和胫骨在液氮中研磨成粉末状提取总 RNA。取 20μgRNA 倍比稀释 3 次, 热变性后点于硝酸纤维素膜上。以 a - ³²p - dCTP 标记的 1.9 Kb Onc DNA 片段 (承 Yong MF 教授赠送) 为探针进行杂交。方法见“分子克隆实验指南”^[6], 杂交温度 42 。

1.8 统计处理 各组数据用均值 ± 标准误 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) 表示, t 检验比较两组差异: P < 0.05 差异显著, P < 0.01 差异极显著。

2 结果

2.1 血清与尿生化指标 OVX 组血清 E₂ 浓度较 Sham 组显著降低 (P < 0.01), 血 Ca、P、BGP、ALP 和尿 Hop/Cr、Ca/Cr 等指标与 Sham 组无显著差异; GSK 组血 Ca、ALP 显著高于 OVX 组、Sham 组 (P < 0.01), 血清 TRAP 和尿 Hop/Cr 明显低于 OVX 组、Sham 组 (P < 0.05), 血清 E₂ 水平显著低于 OVX 组和 Sham 组, 血清 BGP 水平显著高于 Sham 组 (P < 0.05) (见表 1)。

表 1 血清及尿生化指标 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

组别	血 清				尿			
	Ca (mM)	P (mM)	E ₂ (pg/ml)	BGP (ng/ml)	ALP (u/l)	TRAP (u/l)	Hop/Cr (mg/g)	Ca/Cr (mg/g)
Sham	2.12 ± 0.08	1.46 ± 0.13	94.4 ± 4.7	12.8 ± 1.4	2.37 ± 0.19	13.4 ± 1.54	20.6 ± 2.46	0.08 ± 0.02
OVX	2.20 ± 0.12	1.47 ± 0.29	87.6 ± 5.6 ^b	14.1 ± 0.6	2.42 ± 0.30	15.0 ± 1.57	16.5 ± 1.41	0.10 ± 0.02
GSK	2.57 ± 0.16 ^{bd}	1.51 ± 0.14	80.0 ± 3.9 ^{bd}	15.0 ± 1.2 ^a	4.52 ± 0.38 ^{bd}	8.2 ± 1.30 ^{ac}	14.8 ± 0.53 ^{bc}	0.11 ± 0.01
LG	2.84 ± 0.14 ^{bd}	1.54 ± 0.11	89.3 ± 4.96	11.8 ± 1.01 ^d	3.90 ± 0.27 ^{bd}	9.4 ± 0.58 ^{bd}	19.6 ± 1.40 ^d	0.12 ± 0.04

注: 与 Sham 组比较: a P < 0.05, b P < 0.01; 与 OVX 组比较: c P < 0.05, d P < 0.01。

2.2 股骨与第四腰椎骨密度 OVX 组股骨与第四腰椎 (L₄) 骨密度显著低于 Sham 组 (P < 0.01); GSK 组股骨与腰椎骨密度显著高于 OVX 组, GSK 组腰椎骨密度显著低于 Sham 组 (P < 0.01) (见表 2)。

表 2 股骨与第四腰椎骨密度值 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

组别	股骨干重 (g)	股骨骨密度 (g/cm ³)	L ₄ 干重 (g)	L ₄ 骨密度 (g/cm ³)
Sham	0.55 ± 0.04	1.72 ± 0.04	0.122 ± 0.003	1.95 ± 0.05
OVX	0.46 ± 0.10 ^a	1.57 ± 0.13 ^a	0.115 ± 0.002 ^b	1.67 ± 0.02 ^b
GSK	0.51 ± 0.04	1.70 ± 0.01 ^c	0.119 ± 0.003 ^c	1.85 ± 0.05 ^{bd}

注: 与 Sham 组比较: a P < 0.05, b P < 0.01; 与 OVX 组比较: c P < 0.05, d P < 0.01。

2.3 骨生物力学参数 OVX 组股骨各项生物力学

参数均低于 Sham 组, 其中最大载荷、最大挠度、最大应力值显著低于 Sham 组 (P < 0.05 或 < 0.01); GSK 组最大应变值显著高于 OVX 组 (P < 0.01), 最大载荷与最大应力值与 OVX 组相似而显著低于 Sham 组 (P < 0.01) (见表 3)。

表 3 股骨生物力学参数 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

组别	最大载荷 (N)	最大挠度 (mm)	最大应力 (MPa)	最大应变	变形位能 (N·mm)
Sham	116 ± 4.2	0.63 ± 0.10	275 ± 10.8	0.018 ± 0.001	16.1 ± 0.56
OVX	99 ± 3.9 ^b	0.54 ± 0.05 ^a	245 ± 15.2 ^b	0.017 ± 0.001	15.5 ± 1.30
GSK	99 ± 3.6 ^b	0.58 ± 0.04	250 ± 9.2 ^b	0.019 ± 0.011 ^d	16.9 ± 1.22

注: 与 Sham 组比较: a P < 0.05, b P < 0.01; 与 OVX 组比较: c P < 0.05, d P < 0.01。

2.4 腰椎形态计量学指标 OVX 组骨小梁相对体积 (TBV) 与骨小梁相对宽度 (MTT) 明显低于 Sham 组 ($P < 0.05$), 骨小梁吸收表面 (RS) 与骨小梁形成表面 (FS) 显著高于 Sham 组 ($P < 0.05$); GSK 组 TBV 值显著高于 OVX 组 ($P < 0.01$), RS 明显低于 OVX 组 ($P < 0.01$), FS 与 OVX 组相似明显高于 Sham 组 ($P < 0.01$) (见表 4)。

表 4 第三腰椎骨形态计量学参数 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

组别	骨小梁相对体积 TBV (%)	骨小梁相对宽度 MTT (μm)	吸收表面 RS (%)	形成表面 FS (%)	矿化速率 MAR (μm/day)
Sham	37.6 ± 2.3	39.2 ± 2.6	5.0 ± 1.4	6.6 ± 1.5	2.4 ± 0.2
OVX	26.5 ± 1.0 ^b	38.4 ± 2.2	8.8 ± 0.4 ^b	11.5 ± 0.5 ^b	2.8 ± 0.2 ^b
GSK	32.3 ± 5.2 ^{ad}	40.8 ± 10.2	6.2 ± 0.2 ^d	12.0 ± 4.3 ^b	2.3 ± 0.1 ^d

注:与 Sham 组比较:a $P < 0.05$, b $P < 0.01$;
与 OVX 组比较:c $P < 0.05$, d $P < 0.01$ 。

2.5 骨粘连蛋白 (ON) mRNA 表达水平 以 ON cDNA 为探针,对大鼠股骨、胫骨总 RNA 作斑点杂交,结果表明与 Sham 组相比,OVX 组 ON mRNA 表达略有降低,GSK 组无明显变化。

此外 OVX 组子宫重量 0.155 ± 0.02g 明显低于 Sham 组 (0.819 ± 0.13g) ($P < 0.001$)。而 GSK 组子宫重量 0.187 ± 0.02g 明显高于 OVX 组 ($P < 0.01$)。

3 讨论

去卵巢大鼠模型是目前公认的妇女绝经后骨质疏松症动物模型。去卵巢大鼠所发生的骨丢失情况与绝经后骨质疏松引起的骨丢失有许多共同之处^[7]。因此可用该模型对骨质疏松治疗和预防药物的药效学进行初步评价。

从骨代谢生化指标测试结果可见,与 Sham 组相比,OVX 大鼠模型组血清雌二醇浓度和子宫角重量显著下降,证明去势手术成功;骨形成 (血 BGP、ALP) 与骨吸收 (TRAP、尿 Ca/Cr) 生化指标均略升高,说明该模型骨转换率有增高趋势,与绝经后妇女骨代谢情况相似。GSK 组骨形成指标值明显高于 OVX 组或 Sham 组,而骨吸收指标值明显下降或降低,说明骨疏康可促进骨形成抑制骨吸收。

骨密度是评价骨质疏松疗效的关键指标。本实验结果表明 OVX 组大鼠股骨与腰椎骨密度明显低于 Sham 组,说明动物模型基本成功。与 OVX 组相比,GSK 组骨密度均显著增高,但 GSK 组腰椎骨密度仍显著低于 Sham 组,说明骨疏康可减缓大鼠卵巢切除引起的骨丢失。

骨的生物力学性能是评价骨质量不可缺少的指标。从本实验股骨三点弯曲实验获得的参数可以看出,OVX 组大鼠各项生物力学参数值均低于 Sham 组,说明大鼠卵巢切除后骨生物力学性能下降,骨折危险性增加。与 OVX 组相比,GSK 组各项力学参数值均有一定程度的改善。

骨形态计量学是评价骨转换与骨结构的有效手段。OVX 组大鼠 TBV 与 MTT 值的显著降低说明卵巢切除引起骨丢失增加;RS、FS 及 MAR 值的升高表明卵巢切除后大鼠骨吸收与骨形成均加快,与上述生化指标的测试结果基本一致,说明卵巢切除大鼠为高转换型骨代谢。与 OVX 组相比,GSK 组 TBV 值显著升高,说明 GSK 有促进骨量恢复作用。并且 GSK 组的 RS 值明显低于 OVX 组,而 FS 与 OVX 组相近,说明骨疏康抑制骨吸收的作用明显。

骨粘连蛋白 (ON) 是骨基质中主要的非胶原蛋白之一,其生理作用尚不十分清楚。通常认为 ON 参与矿化起始,ON 对 I 型胶原和羟磷灰石 (HA) 具有强亲和力,ON 可促进 HA 与 Ca^{2+} 结合。免疫组化检测发现,ON 在矿化和骨再建的组织中表达水平较高,提示它可能参与骨再建作用的调节^[8,9]。本研究结果显示,去势后大鼠股骨中 ON - mRNA 表达有所下降,而骨疏康冲剂无明显恢复其表达的作用,说明可能 ON 并非参与骨疏康改善骨量的作用。

参考文献

- [1] 蒋淑媛,尚亚平,吴林生,等.骨疏康颗粒治疗骨质疏松症的临床观察(附 300 例分析).中国骨质疏松杂志,1995,1(2):167.
- [2] 李东安,贾冬,李绍华,等.骨疏康冲剂的药理学实验研究.中国骨质疏松杂志,1996,2(3):55.
- [3] 崔伟,刘成林,史之祯,等.卵巢切除大鼠血清甲状腺素、降钙素变化与骨质量降低.中国骨质疏松杂志,1996,2(2):22.
- [4] 郑丰裕,党耕町.单纯或联合应用雌激素、钙、氟化钠防止去势后雌性大鼠骨丢失的实验研究.中华骨科杂志,1995,15(5):266.
- [5] Chomczynsk P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analyt Biochem, 1987, 162(8):156.
- [6] 萨姆布鲁克·丁,弗里奇·EF,曼尼柯斯·T 著.金冬雁,黎孟枫译,侯云德校.分子克隆实验指南.北京:科学出版社,1992.372 - 374.
- [7] Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone. Bone and Mineral, 1991, 15(3):175.
- [8] Pacific M, Oshima D, Fisher LW, et al. Changes in osteonectin distribution and levels are associated with mineralization of chicken tibial growth cartilage. Calcif Tissue Int, 1990, 47(1):51.
- [9] Ibaraki K, Termine JD, Whitson SW et al. Bone matrix mRNA expression in differentiating fetal bovine osteoblasts. J Bone Miner Res, 1992, 7(7):743.

(收稿:1999-04-01 修回:1999-08-07 编辑:房世源)