

• 基础研究 •

骨宝液在去卵巢大鼠骨质疏松症中抑制骨转换作用的实验研究

张兆华, 陈志维, 陈逊文, 罗汉文

(广州中医药大学附属佛山市中医院骨科, 广东 佛山 528000)

摘要 目的: 探讨骨宝液对去卵巢大鼠骨质疏松症中抑制骨转换作用。方法: 60 只大鼠去卵巢诱导骨质疏松症, 随机分为正常对照组、模型组、尼尔雌醇组、骨宝液低、中、高剂量组。正常对照组、模型组以 0.9% 生理盐水每天 10 ml/kg, 尼尔雌醇组以尼尔雌醇每 2 周 1 mg/kg, 其他三组每天分别以骨宝液 5、10、15 ml/kg 的剂量灌胃给药 3 个月后, 以比色法测定其血清钙(sCa)、骨碱性磷酸酶($brAKP$)和血清抗酒石酸性磷酸酶($sTRAP$)的活性, 竞争放射免疫法测定血清中骨钙素($sBGP$)的含量; 双能 X 线骨密度仪(DEXA)测定股骨及腰椎的骨密度; 三点弯曲试验法测定骨生物力学; 扫描电镜进行骨小梁形态计量学分析。结果: 骨宝液组与其他组比较, $sTRAP$ 水平降低, 腰椎骨密度增加, 股骨抗弯抗拉能力改善, 骨小梁形态改善, 骨小梁平均宽度(MTT)与骨小梁面积百分比(TS%)显著增加。结论: 骨宝液对去卵巢大鼠骨质疏松症具有防治作用, 其机制可能与抑制骨转换有关。

关键词 卵巢切除术; 骨质疏松; 中药

The experimental study of the effects of Gubaoye (骨宝液) on osteoporosis in ovariectomized rats by inhibiting the bone turnover ZHANG Zhaohua, CHEN Zhwei, CHEN Xurwen, LUO Hanwen. Department of Orthopaedic Surgery, Foshan Hospital of TCM, Foshan Guangdong, 528000, China

Abstract Objective: To explore the effects of Gubaoye on osteoporosis in ovariectomized rats by inhibiting the bone turnover. **Methods:** Sixty rats were induced to osteoporosis by ovariectomy, and randomly divided into six groups (ten rats in each group): A control group, a model group, a Nlestriol group, a low dose Gubaoye group, a middle Gubaoye group and a high dose Gubaoye group. The control and model groups were fed with 0.9% saline 10 ml/kg once a day. The Nlestriol group was fed with 1 mg/kg. The other three groups were fed with Gubaoye at the dose of 5, 10, 15 ml/kg once a day respectively. After feeding for 3 months, the concentration of calcium (sCa), tartrate resistant acid phosphatase in serum ($sTRAP$) and alkaline phosphatase in bone ($brAKP$) were measured by colorimetric method. The concentration of osteocalcin in serum ($sBGP$) was measured by competitive radio immunologic method. Bone mineral density (BMD) of femur and lumbar of rats was determined by Dual Energy X ray Absorptiometry (DEXA). Biomechanical characteristics of femur were measured by three point bending test. Histomorphometry of bone trabecula was analysed by scanning electron microscope. **Results:** As compared with the other groups, In the ubaoye groups, the level of $sTRAP$ was decreased; The bone density of lumbar vertebra was increased; The resistance of bending and compression of fumr of rats was enhanced; The form of bone trabecula was impoved and MTT and trabeculae square percentage (TS%) were obviously increased, as compared with other groups. **Conclusion:** Gubaoye has anti osteoporotic effects on ovariectomized rats by inhibiting the bone turnover.

Key words Ovariectomy; Osteoporosis; Chinese herbal

骨宝液(Gubaoye)是根据我院全国名老中医陈渭良教授治疗骨质疏松症经验方研制而成, 主要由仙茅、淫羊藿、山萸肉、熟地黄等组成的复方, 具有补

益肝肾、强壮筋骨的作用, 临床广泛应用于治疗骨质疏松症, 疗效满意。本文主要研究了骨宝液对去卵巢骨质疏松大鼠的血清生化学指标、骨密度(bone mineral density, BMD)、骨生物力学以及骨形态计量学的影响, 为其成为防治骨质疏松的药物提供实验

依据。

1 材料与方法

1.1 药材及试剂 骨宝液由佛山中医院制药厂生产并提供(批号:粤药制字 Z03140213); 尼尔雌醇(Nilestriol; 商品名: 维尼安; 批号 990108; 上海华联制药有限公司); 2% 戊巴比妥钠(广东化学试剂公司); 骨钙素放免试剂盒(BGP, 批号 200305, 中国原子能科学研究院); 碱性磷酸酶、钙及抗酒石酸酸性磷酸酶试剂盒均为广东华达生物技术有限公司产品。

1.2 动物分组及给药 6 个月龄清洁级 Wistar 雌性大鼠 60 只, 体质量 300~ 325 g, 由广东省实验动物中心提供。按随机数字表方法^[1]将 60 只大鼠随机分为 6 组, 即正常对照组、模型组、尼尔雌醇组、骨宝液低剂量组(L-GBY)、中剂量组(M-GBY)、高剂量组(H-GBY), 每组 10 只。将大鼠以 2% 戊巴比妥钠(剂量为 40 ml/kg)腹腔注射麻醉后, 俯位固定, 在背部脊柱两侧切口, 于无菌条件下摘除双侧卵巢作为骨质疏松症模型大鼠, 对照组双侧切除一小块脂肪^[2]。术后 1 周各组大鼠分别予以灌胃给药, 分别给予以下药物: 对照组、模型组给予 0.9% 生理盐水 10 ml·kg⁻¹·d⁻¹; 尼尔雌醇组予尼尔雌醇每 2 周 1 mg/kg; 受试药骨宝液 L-GBY 组、M-GBY 组、H-GBY 组分别是 5、10、15 ml·kg⁻¹·d⁻¹, 连续 3 个月。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 骨密度测定 于实验结束前 2 d 在乙醚麻醉条件下, 测定腰椎和股骨的骨密度。

1.3.2 血清生化指标测定 大鼠股动脉采血, 酶促反应比色法测定骨碱性磷酸酶(b AKP)及抗酒石酸酸性磷酸酶(s TRAP)含量, 竞争放射免疫法测定血

清中骨钙素(s BGP)的含量, 甲基百里香酚兰比色法测定血清钙(s Ca)含量。具体操作按试剂盒说明进行。

1.3.3 骨生物力学指标测定 大鼠处死后迅速剥离右侧股骨, 置于 2 000 mol/L 弹簧压力试验机上进行三点弯曲试验, 通过微机-传感器系统取股骨所承载的力及挠度, 采用 Grapge 软件进行数据处理, 可得到最大力(Pb)、最大力下挠度(δb)、抗弯截面系数(Wx)和极限强度(σb)等指标。

1.3.4 骨形态学测量 将断骨头端置于 4% 戊二醛中固定, 用牙科金刚石锯(砂轮)将腰椎矢面锯开, 取其中一块, 清洗、10% 次氯酸钠溶液浸泡 6 h、超声清洗 15 min、乙醇梯度脱水、乙醚浸泡、然后在空气中自然干燥、离子溅射镀膜。在扫描电镜下观察摘除卵巢对大鼠股骨头部形态学的影响及药物对骨质疏松大鼠股骨头部形态学的改善作用, 加速电压为 20 kV。用 SEM 拍摄的照片结合 CMIAS98A 型图像分析仪(北京航空航天大学制作)进行骨小梁表面百分比测量。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理。运用单因素方差分析法(One way ANOVA)并分别固定 Control 和 Model 组运用 Dunnett 法作组间比较。

2 结果

2.1 对血清学指标的影响 同对照组比较, 模型组的 s BGP、b AKP 和 s Ca 均显著升高。同模型组比较, 尼尔雌醇组的 b AKP、s BGP、s Ca、和 s TRAP 均明显降低, 中、高剂量骨宝液组的 s TRAP 显著下降(见表 1)。

表 1 骨宝液对去卵巢大鼠 s BGP、b AKP 和 s Ca 的影响(n= 10, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of Gubaoye on s BGP, b AKP and s Ca in ovariectomized rats(n= 10, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Dose(m l/kg)	s BGP(ng/ml)	b AKP(U)	s TRAP(U/L)	s Ca(mmol/L)
Control	—	1.067±0.465* *	21.87±8.71* *	15.63±5.12	2.41±0.18* *
Model	—	1.805±0.338	38.97±14.42	18.35±3.00	3.09±0.39
Nilestriol	1	1.159±0.208* *	22.37±6.93* *	10.79±3.59* *	2.52±0.41*
L-GBY	5	1.587±0.389	28.95±8.39	16.98±9.76	2.78±0.69
M-GBY	10	1.341±0.623	35.98±9.69	12.91±7.81*	3.42±0.58
H-GBY	15	1.379±0.597	33.08±10.95	11.09±4.05* *	2.87±0.36

注: 与模型组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01

Note: Compared with model group, * P < 0.05, ** P < 0.01

2.2 对骨密度和骨形态计量学的影响 DEXA 测试分析结果表明, 模型组大鼠股骨密度明显降低, 腰椎骨密度也有下降趋势, 连续给药 3 个月, 骨宝液各剂量组股骨密度显著升高, 腰椎骨密度也有升高趋势, 骨形态

计量学指标表明与对照组相比, 模型组大鼠股骨骨小梁面积百分比(TS%)和骨小梁平均宽度(MTT)明显降低, 骨宝液各剂量组骨小梁面积百分比和骨小梁平均宽度较模型组大鼠明显提高(见表 2)。

表 2 骨宝液对去卵巢大鼠 BMD、TS 和 MTT 的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of Gubaoye on BMD, TS and MTT in ovariectomized rats($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Groups	Dose(m l/kg)	Lumbar(g/cm ³)	Femur(g/cm ³)	TS(%)	MTT(μ m)
Control	—	0.297±0.031	0.398±0.051 ^{**}	0.920 6±0.040 2 ^{**}	135.00±23.89 ^{**}
Model	—	0.269±0.016	0.314±0.031	0.798 7±0.040 6	56.76±18.98
Nilestriol	1	0.268±0.014	0.349±0.031 [*]	0.912 7±0.036 1 ^{**}	144.89±21.67 ^{**}
L-GBY	5	0.276±0.029	0.358±0.045 [*]	0.883 1±0.047 8 ^{**}	98.67±13.90 ^{**}
M-GBY	10	0.287±0.025	0.351±0.024 [*]	0.924 7±0.030 7 ^{**}	128.80±26.62 ^{**}
HGBY	15	0.283±0.041	0.365±0.031 [*]	0.950 4±0.018 6 ^{**}	139.33±28.52

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: Compared with model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

扫描电镜观察结果发现模型组大鼠腰椎松质骨骨小梁结构与正常组有明显差异,模型组大鼠腰椎骨小梁拱桥结构不规则,小梁间的空隙明显加大,骨小梁中段变细、有裂痕,骨表面破损、不平滑等。骨宝液各组均有不同程度的改善。

2.3 对生物力学指标的影响 三点弯曲试验结果

表明,模型组大鼠极限强度 σ_b 明显降低,骨宝液高、中两个剂量组显著大于模型组;骨宝液高剂量组抗弯截面系数 W_x 显著降低。尼尔雌醇组由于大鼠体重过小,最大力和最大力下挠度都偏小,但极限强度仍明显增大(见表 3)。

表 3 骨宝液对去卵巢大鼠生物力学指标的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effect of Gubaoye on biomechanics in ovariectomized rats($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Groups	Dose(m l/kg)	Pb(N)	δb (mm)	W_x (mm ³)	σ_b (MPa)
Control	—	112±13.7	0.71±0.28	3.71±0.76	156.09±20.46 [*]
Model	—	109±5.1	0.53±0.27	4.03±0.43	124.09±12.75
Nilestriol	1	98±9.5 [*]	0.55±0.18	3.08±0.33 [*]	147.61±13.97 [*]
L-GBY	5	106±20.4	0.59±0.16	3.91±0.38	142.40±25.78
M-GBY	10	121±17.8	0.64±0.31	3.59±0.45	161.01±19.01 ^{**}
HGBY	15	108±19.9	0.69±0.32	3.34±0.50 ^{**}	164.00±25.03 ^{**}

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: Compared with model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

本研究通过多指标的综合观察,证实大鼠去卵巢后,骨形成指标(s BGP、 t AKP)及骨吸收均升高,但骨吸收大于骨形成,最后出现高转换型骨质疏松,与绝经后妇女骨代谢情况相似,证明这一实验结果与以往文献报道相一致^[3],表明本实验所造绝经后骨质疏松动物模型是成功的。

本研究发现:连续给药 3 个月,中、高剂量骨宝液组 s TRAP 显著降低, s BGP 和 t AKP 有下降趋势但不显著。因而说明骨宝液可能主要是通过抑制破骨细胞的活性来发挥作用的。

在去势大鼠观察骨质疏松模型形成时,最敏感的部位应是腰椎节段,所以在我们的实验中,选取腰椎结果反映骨量变化,本研究发现,模型组大鼠腰椎骨密度明显降低。连续给药 3 个月,骨宝液各组腰椎骨密度均有显著升高,腰椎和股骨的骨密度均有所增加,说明骨宝液能显著防止去势大鼠骨质的丢失,

和 SPA 测量所报道的一致^[4-6]。

骨生物力学性能是评价骨质量不可缺少的指标。本实验采用的三点弯曲试验有结构指标和材料力学指标,结构指标主要指最大力、最大力下挠度与抗弯截面系数,其变化主要受骨尺寸大小和几何形态的影响。材料力学指标主要指极限强度,反映骨的内在质量,不受骨尺寸大小的影响^[7]。本研究表明,模型组大鼠极限强度显著降低,而高、中剂量骨宝液组的极限强度均明显提高,说明骨的抗弯、抗冲击和抗疲劳能力较模型组均有改善。骨形态计量学是评价骨转换与骨结构的有效手段,具有直观、形象的优点,能对松质骨进行客观的定量分析。本研究发现,模型组大鼠骨小梁拱桥结构趋于狭长卵圆形和狭长梭形,由于骨小梁的吸收、变细,使小梁间空洞面积增大,骨小梁面积百分比显著下降,骨小梁平均直径显著降低,骨表面粗糙不平。给药 3 个月后,骨宝液各剂量组均可明显改善骨小梁结构,使之趋

于正常的卵圆形和梭形,骨表面较平整、光滑,骨小梁面积百分比和骨小梁平均直径明显提高,说明骨宝液能明显改善去势大鼠的骨丢失。

通过上述实验研究表明骨宝液能明显干预卵巢切除诱发骨质疏松大鼠模型的骨转换过程,能发挥治疗骨质疏松症的作用,且其在 β -AKP、 β -BGP、 β -Ca 和 β -TRAP 和腰椎等部位的骨密度值和生物力学指标方面有显著差异并有统计学意义 ($P < 0.01$),因而证明骨宝液治疗骨质疏松疗效确切。其机制可能是主要通过抑制反映破骨细胞,提高成骨细胞的活性以及增加骨基质、骨矿物质在骨的沉着,从而起到抑制骨质疏松的形成及治疗骨质疏松症的目的。

参考文献

- 1 方积乾,徐勇勇,余松林,等.医学统计学与电脑实验.上海:上海科学技术出版社,1997.446.
- 2 邹移海,黄韧,连至诚,等.中医实验动物学.广州:广州暨南大学出版社,1999.128.
- 3 刘忠厚.骨质疏松症.北京:化学工业出版社,1992.116-629.
- 4 熊学华,刘庆思,余克强.中药骨康对去势大鼠血清钙素及离体骨密度的影响.中国中医骨伤科杂志,2002,10(4):14-16.
- 5 张俊忠,蔡余力.补肾益气活血法治疗绝经后骨质疏松症的实验研究.中国骨伤,2002,15(4):217-219.
- 6 陈列,赵和平,谢兴文,等.中药增骨丸对去卵巢所致骨质疏松大鼠血、尿生化及骨形态的影响.中医正骨,2002,14(3):6-7.
- 7 陈孟诗,赖胜祥,李良,等.大鼠的骨生物力学指标选取及测试.生物医学工程学杂志,2001,18(4):547.

(收稿日期:2005-04-25 本文编辑:李为农)

• 短篇报道 •

套筒鹅头钉钢板临床应用

郭建君,韩兴军

(高唐县中医医院骨科,山东 高唐 252800)

自 2000 年以来采用套筒鹅头钉钢板治疗髌部骨折 32 例,取得良好疗效,报告如下。

1 临床资料

本组 32 例,男 18 例,女 14 例;年龄 28~82 岁,平均 51 岁。受伤原因:交通伤 18 例,坠落伤 8 例,滑倒摔伤 6 例。粗隆间骨折 22 例,其中内翻型 15 例,外翻型 7 例;粗隆下骨折 10 例。其中 18 例合并高血压、冠心病、糖尿病。受伤至就诊时间为 30 min~5 d,入院后先行胫骨结节骨牵引,并治疗合并症,牵引 2~7 d 后手术。

2 手术方法

手术前需行骨牵引,使患健肢等长,术中助手始终维持牵引。采用硬膜外麻醉,取仰卧位,伤侧臀部垫高 5~10 cm,下肢内旋 15°,采用髌外侧切口。粉碎性骨折应用钢丝先行捆扎固定骨折块。复位满意后,粗隆间骨折用 2~4 枚克氏针在粗隆顶部或粗隆的前后部分别穿入暂时固定,维持骨折远近端的对位。粗隆下骨折用 2~4 枚克氏针固定不牢时用持骨钳把持固定,或暂用普通钢板加三爪固定器固定骨折后进行穿入导针。在大粗隆顶点下 2~3 cm 处,略偏前放置 135° 角度尺定位器打入导针。导针打入深度,要比术前 X 线测量长度略长,导针打好后,距导针上下左右各 3 mm 平行于导针分别打入 4 枚 ϕ 1.5 mm 克氏针,长度与导针相近,用来探查四周是否在骨皮质内。确定导针在皮质内时,摄 X 线片,据 X 线片确定滑动螺钉长度,应宁短勿长。定好组合绞刀长度钻孔拧入自攻拉力螺钉,套入鹅头钉钢板之套筒,钢板长度应选用在骨折平面以下有 5~6 孔(或为骨干直径长度的 2 倍以上)。拧入螺钉及螺母,钢板固定好后冲洗切口,放置引流管。

术后穿“丁”字鞋 1 周,保持下肢中立位。2 d 后床上进行屈膝屈髌活动,6 周扶拐下地,结合 X 线片愈合情况,约 2~4 个月下地行走。

3 结果

本组 32 例均获随访,随访时间 3 个月~1 年。根据骨折治疗结果评定标准:优 20 例,骨折愈合良好,无髌内翻或外旋畸形,行走无痛,下蹲达到或接近正常范围,功能恢复到骨折前状态;良 9 例,骨折愈合良好,髌关节有轻度内翻,患肢缩短在 2 cm 以内,行走无痛,需或无需支撑,功能恢复接近正常;可 3 例,骨折愈合较差,有髌内翻或外旋畸形,髌关节疼痛,功能明显受限,不能负重或行走。髌内翻、髌外旋畸形各 1 例,伤肢短缩畸形 1 例,髌关节疼痛 2 例,膝关节疼痛 3 例。

4 讨论

套筒鹅头钉钢板不分左右,没有前倾角,因此要想保证钢板接触面与股外侧良好吻合,就必须使导针与股骨长轴在同一平面上,这样就因为前倾角的存在,而使导针在颈内行走方向是前下至上,而非与股骨颈长轴平行在中央走行,所以导针进针点应稍偏前,方能保证使钉道在颈中按上述方向走行,要想保持其有效接触,使固定更加稳定,就应将钢板放于股骨近端偏前。笔者建议,今后鹅头钉制作应附加前倾角,并分出左右,这样更符合生物力学方向,更便于操作。滑动螺母,对骨折部位能起到一定的加压作用。在粗隆间骨折粉碎不严重时,可将螺钉拧进深入粗隆部骨面 0.5 cm,上钢板后再加压拧紧螺母,起到加压固定作用,若粉碎较重者,不应过于加压,避免造成骨折移位。

(收稿日期:2004-07-14 本文编辑:王玉蔓)