

· 基础研究 ·

骨康对去卵巢大鼠骨源性碱性磷酸酶和胰岛素样生长因子的影响

陈一凡¹, 黄宏兴², 李颖²

(1.广州医学院第二附属医院中医骨伤科, 广东 广州 510260; 2.广州中医药大学附属骨伤科医院)

【摘要】 目的:探讨骨康对去卵巢大鼠血清中骨碱性磷酸酶(BALP)和胰岛素样生长因子-1(IGF-1)的影响,及其治疗骨质疏松症的作用机制。方法:6月龄雌性SD大鼠68只按简单随机方法分为空白组和手术组,分别为22只和46只。空白组行假手术,手术组行卵巢切除术。术后3个月从两组随机各选出10只大鼠行骨密度检查,以确定造模成功。在确定造模成功后,将手术组中剩下的36只大鼠再随机分为3组,每组12只,分别为手术模型组、雌激素组、中药组。空白组中剩下的12只大鼠为空白对照组。对各组进行灌胃给药治疗,灌胃给药容积为10ml/kg,空白对照组、手术模型组灌服蒸馏水;中药组灌服相应的药物,雌激素组给予尼尔雌醇灌胃。治疗3个月采取动物血清进行实验指标检测,测定动物血清中E₂、IGF-1、BALP含量。结果:雌激素组、中药组血清E₂、BALP水平高于手术模型组,其差异有统计学意义(P<0.05),而雌激素组与中药组血清E₂水平相比较差异无统计学意义(P>0.05)。中药组血清IGF-1水平高于手术模型组及空白对照组,差异有统计学意义(P<0.05)。结论:中药骨康能提高去卵巢大鼠血清中雌二醇、胰岛素样生长因子、骨源性碱性磷酸酶水平,间接促进成骨细胞增殖,抑制破骨细胞骨吸收,促进成骨细胞的骨形成功能。

【关键词】 骨康; 骨碱性磷酸酶; 胰岛素样生长因子1; 骨质疏松; 去卵巢大鼠

Effects of Gukang (骨康) on bone-source alkaline phosphatase (BALP) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in serum of spaying rats CHEN Yi-fan*, HUANG Hong-xing, LI Ying. *Department of TCM Orthopaedics, the 2nd Hospital Affiliated to Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, Guangdong, China

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of Gukang on bone-source alkaline phosphatase (BALP) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in serum of spaying rats and the mechanism of curative effect of Gukang on osteoporosis. **Methods:** Sixty-eight 6-month-old SD rats were chosen and randomly divided into blank control group (22 rats with sham operation) and operation group (46 rats with spaying operation). Three months after operation, 10 rats were randomly chosen from each group and tested with bone mineral density in order to determine models of osteoporosis made. After modeling, operation group was divided into 3 sub-groups: operation model group, estrogen group and Gukang group, 12 rats in each group. Twelve rats remained in blank control group. Every group were treated through intragastric administration therapy (volum 10 ml/kg). Blank

通讯作者:陈一凡 Tel:020-34152476 E-mail:fanyia@yahoo.com.cn

伸的作用,只有肩胛下肌才能使肩关节继续后伸使前臂离开背部。有时肩部疼痛影响此试验的敏感性,可于肩前疼痛点局部封闭,疼痛消失后可提高试验的阳性率。压腹试验的原理是肩胛下肌断裂后对腹部施压时,由于失去肩胛下肌内旋内收的力量并伴有疼痛,只能靠肱三头肌长头的力量后伸肩关节使肘关节置于躯干后方后才能给腹部以压力。

4.2 关于治疗 肩胛下肌腱断裂,目前多主张手术治疗^[2-5],手术的方式一般采用肌腱止点的重建。未发明使用线锚之前肌腱止点重建较繁琐,而且不牢固,容易失败。我们使用较先进的线锚重建法,使肩胛下肌腱的断端牢固固定在肱骨小结节附近。该方法的主要并发症是线锚松动,为防止此并发症,要注意骨孔的直径应小于线锚的直径。本组使用线锚行肩胛下肌腱止点重建,均未发现线锚松动,经长期随访,取得较好

的临床效果,我们认为该方法值得提倡。

参考文献

- [1] 郑宪友,史其林,孙贵新,等. Neer 法联合 Mclaughlin 法治疗肩袖断裂伤. 中华创伤骨科杂志, 2005, 7: 278-280.
- [2] 吴凡,杜全印,麻肇东. 18 例肩胛下肌劳损的治疗. 创伤外科杂志, 2001, 3(增刊): 64.
- [3] Cummins CA, Murrell GA. Mode of failure for rotator cuff repair with suture anchors identified at revision surgery. J Shoulder Elbow Surg, 2003, 12(2): 128-133.
- [4] Gerber C, Hersche O, Farron A. Isolated rupture of the subscapularis tendon. J Bone Joint Surg (Am), 1996, 78: 1015-1023.
- [5] Deutsch A, Altchek DW, Veltri DM, et al. Traumatic tears of the subscapularis tendon. Am J Sports Med, 1997, 25: 13-22.

(收稿日期:2008-08-19 本文编辑:连智华)

control group and operation model group were irrigated with distilled water,estrogen group with estrogen and *Gukang* group with *Gukang*. Three months after treatment,serum of all groups were collected and tested for E₂,BALP and IGF-1 with ELISA.

Results:The concentration of serum E₂,BALP in estrogen group and *Gukang* group were higher than operation model group, there were significant difference ($P<0.05$),but no significant difference in serum E₂ between estrogen group and *Gukang* group ($P>0.05$). The concentration of serum IGF-1 in *Gukang* group was higher than operation model group and blank control group, there were significant difference ($P<0.05$). **Conclusion:** *Gukang* can increase the level of E₂,BALP and IGF-1 in serum of spaying rats. Thus,it can indirectly promote reproduction of osteoblasts,inhibit activity of osteoclasts and promote bone formation.

Key words *Gukang*(骨康); Bone-source alkaline phosphatases(BALP); Insulin-like growth factor 1(IGF-1); Osteoporosis; Spaying rats

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(2): 119-121 www.zggszz.com

绝经后骨质疏松症(postmenopausalosteoporosis, PMOP)是严重危害中老年妇女的难治性疾病,病因至今尚未完全阐明。骨在整个生命过程中都具有新陈代谢的活性,骨代谢过程中,新骨不断形成,旧骨不断被沉积到骨上,同时又不断地从骨中释放到血循环中,通过测定血、尿等骨生化标志物可直接了解骨的生理和病理代谢变化。本实验研究中药骨康对去卵巢大鼠血清中骨碱性磷酸酶(BALP)和胰岛素样生长因子(IGF-1)影响,以期从骨形成生化标志物 BALP 和影响骨形成和骨吸收局部调节因子 IGF-1 的角度来探讨中药骨康防治骨质疏松症的作用机制。

1 材料与方

1.1 实验对象 清洁级健康雌性 SD 大鼠 68 只,6 月龄,体重 260~290 g(由广州中医药大学实验动物中心提供。合格证号:0017012)。所有 SD 大鼠均饲养在恒温、恒湿的清洁环境中,环境温度为(25±1)℃,湿度为 70%,每天 12 h 光照,12 h 黑暗,任意进食饲养者提供的大鼠标准饲料和自来水。

1.2 造模方法 用 10%水合氯醛溶液按 0.33 ml/100 g 腹腔注射,5 min 后,SD 大鼠完全麻醉,采用背侧入路双侧卵巢摘除手术造模。SD 大鼠俯卧位,肋弓下 L₃ 处,去毛,消毒,切口,切口一般为 1 cm,钝性分离至肌肉层,腰椎左侧 0.5 cm 钝性分离肌肉,小心剪开腹膜,组织镊深入伤口,小心提起腹腔脂肪,轻手翻开脂肪,找到梅花状的卵巢,1 号无菌丝线结扎,眼科剪从输卵管剪断分离卵巢,压迫止血后,将脂肪小心放入腹腔,分层缝合肌肉筋膜。同样的方法,切除右侧卵巢,伤口内滴入少量的青霉素水溶液,缝合皮肤,消毒伤口。假手术方法:手术径路同手术组,将卵巢从腹腔提出而不切除,仅切除周围少量脂肪组织后立即关闭伤口,伤口内滴入少量的青霉素水溶液,缝合皮肤,消毒伤口。术后分笼饲养。

1.3 分组方法 将 68 只大鼠按采用 Excel “随机数发生器”进行随机分组,分为空白组和手术组。具体分组方法:首先产生 1~68 个编号,再给 1~68 个编号分配各自的随机概率数,然后将编号所对应的随机概率数进行排序,最后按排列后的随机概率数分组。结果分为空白组 22 只和手术组 46 只。空白组行假手术,手术组行卵巢切除术。术后 3 个月从两组随机各选出 10 只大鼠行骨密度检查,以确定造模是否成功。在确定造模成功后,将手术组中剩下的 36 只大鼠根据上述方法分为 3 组,每组 12 只,分别为手术模型组、雌激素组、中药组,空白组中剩下的 12 只大鼠为空白对照组,共 4 组。

1.4 药物制备 中药骨康,含生药量 1.43 g/ml (由补骨脂、淫羊藿、肉苁蓉、黄芪、丹参等组成)由广州中医药大学附属骨伤科医院制剂室提供,方中各药物的产地、用药部位及炮制方法均有严格控制。尼尔雌醇由上海华联药厂提供(生产批号 060501)。

1.5 治疗方法 术后 3 个月分别从空白组和手术组随机选 10 只大鼠,采用 DEXA(HOLOGIC 公司,QDR-4000 型)进行全身骨密度测定,确定绝经后骨质疏松症动物模型成功后,开始对各组进行灌胃给药治疗,灌胃给药容积 10 ml/kg,空白对照组、手术模型组灌服蒸馏水;中药组灌服相应的药物,药物以蒸馏水定容至所需浓度,即 10 ml/kg 灌服给药,每日 1 次;尼尔雌醇组给予尼尔雌醇 1 mg/kg 灌胃,使用前配成混悬液(浓度为 0.167 mg/ml),1 次/周,其余时间予蒸馏水 10 ml/kg 灌胃。治疗时间 3 个月。在实验过程中,手术组中 2 只大鼠因伤口感染死亡,雌激素组和中药组各有 1 只大鼠因灌药误入肺部而死亡。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 骨密度测定 采用双能 X 线骨密度测量仪(美国 HOLOGIC 公司,QDR-4000 型,变异系数 CV<0.1%)测定大鼠的全身、腰椎、髌部、股骨和胫骨骨密度,测定均在 10%水合氯醛溶液(0.33 ml/100 g)腹腔麻醉下进行。

1.6.2 骨生化指标测定 雌二醇、骨源性碱性磷酸酶、胰岛素样生长因子采用放免法测定,试剂由广州博理生物科技有限公司提供,测定仪器为 SN-695 型智能放射免疫测量仪(上海核辐射光电器有限公司)。上述指标数据由广州中医药大学第三附属医院骨质疏松实验室负责检测。

1.7 统计分析方法 计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 11.5 软件进行成组设计定量资料 *t* 检验和方差分析,多个样本均数两两比较用 SNK-*q* 检验,方差不齐的采用秩和检验。

2 结果

2.1 造模结果 见表 1。手术组的全身和腰部骨密度与空白组比较(成组设计定量资料 *t* 检验),差异有统计学意义($P<0.05$),造模成功。

2.2 各组大鼠血清中 E₂,BALP,IGF-1 的含量 见表 2。统计方法采用成组设计定量资料 *t* 检验和单因素 3 水平方差分析,多个样本均数两两比较(多因素非平衡组合试验下的定量资料,其全面组合应该有 6 个,但是正常组加中药和正常组加雌激素,对于本实验没有必要进行,所以中药组、雌激素组和

表 1 造模后 3 个月手术组与空白组骨密度比较($\bar{x}\pm s, g/cm^2$)

Tab.1 Comparison of bone mineral density (BMD) between operation modle group and blank contol group at 3 months afer modeling ($\bar{x}\pm s, g/cm^2$)

分组	鼠数	全身骨密度	腰部骨密度	左髌部骨密度	右髌部骨密度
空白组	10	0.136±0.013	0.210±0.021	0.194±0.036	0.203±0.026
手术组	10	0.119±0.016*	0.182±0.041**	0.178±0.049***	0.184±0.046****

注:与空白组比较,* $P=0.022<0.05$,** $P=0.035<0.05$,*** $P=0.179>0.05$,**** $P=0.095>0.05$

Note: As compared with blank control group, * $P=0.022<0.05$, ** $P=0.035<0.05$, *** $P=0.179>0.05$, **** $P=0.095>0.05$

手术模型组采用单因素 3 水平方差分析,组间比较采用多个样本均数两两比较;手术模型组和空白对照组采用成组设计定量资料 t 检验)。

表 2 各组大鼠血清中 E_2 、BALP、IGF-1 的含量($\bar{x}\pm s, ng/L$)

Tab.2 Comparison of the content of insulin-like growth factor-1 (IGF-1), bone-source alkaline phosphatase (BALP) and estrogen (E_2) among four groups ($\bar{x}\pm s, ng/L$)

分组	鼠数	E_2 (ng/L)	BALP	IGF-1
中药组	11	80.50±20.93	14.54±3.14	11.53±4.86
雌激素组	11	83.23±16.75	15.79±3.19	4.54±1.31
手术模型组	10	58.06±14.76	11.87±1.17	6.78±1.92
空白对照组	12	75.07±23.66	14.69±3.49	7.72±4.33

注: E_2 ,中药组与手术模型组比较, $P=0.007<0.05$;与雌激素组比较, $P=0.721>0.05$;手术模型组与空白对照组比较, $P=0.049<0.05$ 。BALP,中药组与手术模型组比较, $P=0.032<0.05$;与雌激素组比较, $P=0.288>0.05$;手术模型组与空白对照组比较, $P=0.024<0.05$ 。IGF-1,中药组与手术模型组比较, $P=0.002<0.05$;与雌激素组比较, $P=0.000<0.05$;手术模型组与空白对照组比较, $P=0.535>0.05$

Note: E_2 , Gukang group vs operation model group, $P=0.007<0.05$; Gukang group vs estrogen group, $P=0.721>0.05$; Operation model group vs blank control group, $P=0.049<0.05$. BALP, Gukang group vs operation model group, $P=0.032<0.05$; Gukang group vs estrogen group, $P=0.288>0.05$; Operation model group vs blank control group, $P=0.024<0.05$. IGF-1, Gukang group vs operation model group, $P=0.002<0.05$; Gukang group vs estrogen group, $P=0.000<0.05$; Operation model group vs blank control group, $P=0.535>0.05$

表 2 结果显示雌激素组、中药组血清 E_2 水平高于手术模型组,差异有统计学意义($P<0.05$),而雌激素组与中药组血清 E_2 水平相比较差异无统计学意义($P>0.05$)。雌激素组、中药组血清 BALP 水平高于手术模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)。中药组血清 IGF-1 水平高于手术模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

绝经期妇女 E_2 水平明显下降,是绝经后骨质疏松发生的主要原因。中药骨康是由淫羊藿、补骨脂、黄芪、当归、丹参等组成的纯中药制剂,具有补肾壮骨、益气健脾、活血通络之功效,经临床观察和动物实验证实其具有抑制骨吸收和促进骨形成的双重作用,是防治绝经后骨质疏松症的理想药物^[1]。

BALP 是成骨细胞的一种细胞外酶, BALP 在机体成骨过程中,能解除其对骨矿形成的抑制作用,有利于成骨。吴符火等^[2]观察阳钙宝对实验性骨质疏松模型大鼠的防治作用,证

实阳钙宝能增加去卵巢性骨质疏松模型大鼠股骨密度厚度和松质部骨小梁的宽度,升高血清碱性磷酸酶活性,对股骨骨质和骨小梁有保护作用。郭宝荣等^[3]采用肾壮骨合剂治疗老年糖尿病合并骨质疏松症,骨密度较治疗前有明显增加,BGP、BALP 及 Ca/Cr 均较治疗前有改善。

IGF-1 可加强骨吸收细胞的募集,为骨重建的主要调节剂以维持骨量,IGF-1 对骨膜细胞和非骨膜细胞的复制均有影响,提示 IGF-1 对成骨细胞有特殊作用。血清中的 IGF-1 水平随年龄增长明显下降,女性绝经后血清 IGF-1 水平明显低于绝经前。苏钟毅等^[4]通过对胰岛素样生长因子-1 在骨质疏松大鼠骨折端的局部应用,为进一步临床应用提供理论基础和使用依据。姜学明等^[5]观察补肾健脾活血方对实验性骨质疏松大鼠血清胰岛素生长因子的治疗,它能明显增加血清 IGF-1 含量,其作用强于单纯补肾中药和西药,且与剂量呈正相关。

实验研究表明,骨康能够提高去卵巢大鼠血清中雌二醇、BALP、IGF-1 水平,对成骨细胞增殖分化具有直接促进作用,使成骨活动增强,促进骨形成,增加骨量,有利于成骨。骨康治疗原发性骨质疏松症的作用机制可能是通过抑制破骨细胞的骨吸收并促进成骨细胞的骨形成,从而恢复骨吸收与骨形成的偶联机制来实现的。从实验数据可以看出骨康组 IGF-1 水平明显高于其他 3 组,例外雌激素组 IGF-1 水平明显偏低,不但远低于中药组,而且更低于手术模型组和空白组,出现这种情况,可能与雌激素双向调节 IGF-1 水平有关。黄遂柱等^[6]在研究成年雌性 SD 大鼠于卵巢切除后及再补充雌激素后血清皮质醇和类胰岛素生长因子的变化时,发现补充雌激素对大鼠血清皮质醇和 IGF-1 有影响,IGF-1 水平不升反而降低。

参考文献

- [1] 刘海金,陈超.刘庆思教授治疗骨质疏松症经验介绍.新中医,2007,39(5):14.
- [2] 吴符火,张苏娜,郑英珠.阳钙宝对实验性骨质疏松大鼠股骨和血清碱性磷酸酶及钙磷的影响.中医药学刊,2006,24(5):901-902.
- [3] 郭宝荣,杨文军,张珊珊,等.益肾壮骨合剂治疗老年糖尿病合并骨质疏松症临床研究.山东中医杂志,2006,25(3):157-158.
- [4] 苏钟毅,尹芸生,李栋,等.胰岛素样生长因子-1 促骨质疏松骨折愈合的实验研究.中国药物与临床,2007,7(3):182-185.
- [5] 姜学明,凌泽喜.补肾健脾活血方对卵巢大鼠血清 IGF-1 的影响.湖北中医杂志,2005,27(11):5-6.
- [6] 黄遂柱,上官峰,赵永强.补充雌激素对卵巢切除大鼠血清皮质醇和 IGF-1 的影响.中国骨质疏松杂志,2004,10(4):443-444.

(收稿日期:2008-09-11 本文编辑:连智华)