

· 基础研究 ·

葛根素和白藜芦醇对青年大鼠峰值骨量的影响研究

蒺蒺荣¹, 杨芳芳¹, 高玉海¹, 马慧萍², 陈克明¹

(1. 兰州军区兰州总医院骨科研究所 甘肃 兰州 730050; 2. 兰州军区兰州总医院高原环境伤害防治重点实验室, 甘肃 兰州 730050)

【摘要】 目的: 比较葛根素、白藜芦醇单体与二者的复合药物对大鼠峰值骨量的影响。方法: 选取雌性 SPF 级 Wistar 大鼠 40 只, 体重 109.45~119.44 g, 平均 115.87 g, 大鼠适应 3 d 后采用随机数字表法将其分为 4 组, 每组 10 只, 分别为空白对照组(CON 组, 每日灌胃等体积的蒸馏水), 葛根素组(PR 组, 每日灌胃 15.4 mg/kg 葛根素), 白藜芦醇组(RES 组, 每日灌胃 8.4 mg/kg 白藜芦醇), 复合药物组(P+R 组, 每日灌胃 8.4 mg/kg 白藜芦醇+15.4 mg/kg 葛根素复合药)。每 7 d 监测 1 次大鼠体重, 每月检测 1 次大鼠全身骨密度。3 个月后处死全部大鼠。采用双能 X 线骨密度仪检测股骨和椎骨离体骨密度; 采用万能材料试验机分析骨生物力学; 采用 VG 染色分析骨形态计量学; 采用 ELISA 试剂盒检测血清骨代谢指标及用 Micro-CT 扫描仪扫描股骨微结构。**结果:** 各组大鼠在实验期间的体重变化无统计学意义; 骨密度结果显示: 与 CON 组比较, 其余 3 组股骨和椎骨骨密度均显著升高, 且 R+P 组显著高于 PR 组和 RES 组。股骨三点弯曲和椎骨压缩试验结果显示: 与 CON 组相比, 其余 3 组股骨和椎骨最大载荷值均显著升高, 且 P+R 组高于 PR 组和 RES 组, 而各组间弹性模量值无统计学意义; 股骨 VG 染色结果显示: 与 CON 组相比, 其余 3 组骨小梁数目显著增加, 分离度明显减低, 且 R+P 组明显优于 PR 组和 RES 组, 而各组间骨小梁厚度无显著变化。Micro-CT 扫描重建图结果显示: 与 CON 组相比, 其余 3 组股骨骨小梁结构紧密, 数目较多, 分离度小, 连续性好, 且 R+P 组显著优于 RES 和 PR 组; Micro-CT 扫描指标结果显示: 与 CON 组相比, 其余 3 组股骨骨小梁数目(trabecular number, Tb.N)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)显著增加, 骨小梁分离度(trabecular spacing, Tb.Sp)显著降低, 且差异具有统计学意义($P < 0.05$), 且 R+P 组显著优于 RES 和 PR 组。血清生化指标结果显示: 与 CON 组相比, 其余 3 组血清中骨钙素(osteocalcin, OC)水平均升高, 抗酒石酸酸性磷酸酶 5b(TRACP 5b)含量均下降, 差异具有显著性, 且 P+R 组显著高于 PR 组、RES 组, 而 TRACP 5b 含量无显著变化。**结论:** 葛根素与白藜芦醇单体按 1:1 比例组合而成的复合药在提高青年大鼠峰值骨密度和骨质量, 增强骨生物力学性能, 促进成骨细胞的矿化成熟, 抑制破骨细胞骨吸收方面的药效显著优于葛根素和白藜芦醇单体的作用, 表明中药复方或复合药将作为预防和治疗骨质疏松的新途径。

【关键词】 葛根素; 骨密度; 大鼠; 复方合剂

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2018.07.010

Resveratrol and puerarin on peak bone mass in young rats XI Hui-rong, YANG Fang-fang, Gao Yu-hai, MA Hui-ping, and CHEN Ke-ming*. *Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, Gansu, China

ABSTRACT Objective: To compare effects of resveratrol, puerarin and the compounds on peak bone mass in rats. **Methods:** Forty SPF Wistar rats weighed 109.45 g to 119.44 g with an average of 115.87 g were selected. After 3 days' adaption, rats were divided into control group (the same volume of distilled water per day), puerarin group (15.4 mg/kg puerarin daily), resveratrol group (8.4 mg/kg resveratrol daily), compound drug group (daily dose of 8.4 resveratrol added 15.4 mg/kg of puerarin) and 10 in each group. The body weight of the rats was monitored at every 7 days and body bone density was measured at every month. All rats were sacrificed after 3 months. The bone mineral density of femur and vertebrae was detected by dual energy X-ray absorptiometry; bone biomechanics, VG staining was used to analyze bone histomorphometry; ELISA was used to detect serum bone metabolic index and microstructure of femur were scanned with Micro-CT scanner. **Results:** There were no significant differences in body weight among groups during exoeriment. Bone mineral density results showed BMD of femur and vertebrae in the other three groups were significantly increased, and R+P group was significantly higher than PR group and RES group ($P < 0.05$) by compared with CON group; three-point bending and compression test results showed compared with

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 81471090); 甘肃省自然科学基金(编号: 1506RJZA306)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (No. 81471090)

通讯作者: 陈克明 E-mail: chenkm@lut.cn

Corresponding author: CHEN Ke-ming E-mail: chenkm@lut.cn

CON group, other three groups of femoral and vertebral maximum load values were significantly increased, and P+R group was higher than PR group and RES group, but elastic modulus was not statistically significant. Bone histomorphometry showed that number of trabecular bone in other three groups were significantly increased compared with CON group, separation of trabecular bone were significantly reduced, continuity was improved, and R+P group was significantly better than RES and PR group. The results of Micro-CT scan showed that separation of trabecular bone were significantly reduced, continuity were improved in other three groups, and R+P group was significantly better than RES and PR group. The numbers of trabecular bone (Tb.N), trabecular bone thickness (Tb.Th), volume of trabecular bone (BV/TV) in PR group, RES group and R+P group were significantly higher than CON group, but trabecular bone separation (Tb.Sp) was significantly reduced. Serum levels results showed, level of OC in the other three groups were higher than control group ($P < 0.05$), content of TRACP 5b decreased, and level of OC in P+R group was significantly higher than PR group and RES group, content of TRACP 5b was no significant change. **Conclusion:** Compound of puerarin and resveratrol assigned in a 1:1 ratio could improve bone mineral density and bone mass in young rats, enhance biomechanical properties of bone, promote mineralization and maturation of osteoblasts, inhibit osteoblastic bone resorption, and is better than the role of their respective monomers. The paper showed that traditional Chinese medicine compound medicine will be used as a new way to prevent and treat osteoporosis.

KEYWORDS Puerarin; Bone density; Rats; Drug combinations

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2018, 31(7):635-641 www.zggszz.com

峰值骨量 (peak bone mass, PBM) 是人在生命成熟时期获得的最高骨量, 成熟期过后则逐渐丢失, 任何年龄段的骨量则是成熟期 PBM 和骨丢失之差^[1]。峰值骨量的高低与骨质疏松症的发生有密切关系。研究表明, 峰值骨量越高, 越不容易发生骨质疏松^[2]。因此, 努力提高峰值骨量是骨质疏松防治的重点。中药单体白藜芦醇和葛根素已被证明是预防和治疗骨质疏松的有效药物。据报道, 它们能预防 OVX (ovariectomized) 大鼠所致的骨质疏松症, 提高大鼠峰值骨量, 具有促进骨形成的作用^[3]。尽管如此, 它们提高骨密度、改善峰值骨量、促进骨形成的能力是有限的。因此, 本实验依据贾韦国^[4]提出的寡单体复合药的概念, 以白藜芦醇、葛根素为单体进行复合, 从中药复合药的角度考虑, 比较两单体与复合药对提高大鼠峰值骨量作用和影响, 从而为预防和治疗骨质疏松提供新的途径和方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

白藜芦醇、葛根素 (陕西宝鸡辰光生物科技有限公司, 纯度 $\geq 98\%$); 双能 X 线骨密度仪 (Prodigy, GE 公司, 美国), 万能材料试验机 (AG-IS, 岛津公司, 日本), 硬组织切片 (SP1600, LEICA 公司, 德国), 酶标仪 (Epoch, BioTek 公司, 美国), Micro-CT (ScanSky 1176, Bruke, 瑞典), 骨钙素和抗酒石酸酸性磷酸酶试剂盒 (IDS 公司, 丹麦)。

1.2 实验动物与分组

1 月龄雌性 SPF 级 Wistar 大鼠 40 只, 体重 109.45~119.44 g, 平均 115.87 g, 购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心 [实验动物合格证号: SCXK (甘) 2014-0006-152]。适应性饲养一周后采用随机数表法分组法分为 4 组, 先将 40 只

大鼠从 1 编号到 40, 然后通过随机数字表抽取 40 个数, 按大小排序, 依次每 10 个数对应的大鼠为一组, 每组 10 只。灌胃剂量参考公认的治疗骨质疏松症药物金雀异黄酮 (genuine flavonoids, GEN) 剂量 10 mg/kg^[5], 换算成同样摩尔浓度的葛根素 (puerarin, PR)、白藜芦醇 (resveratrol, RES)、复合药物组 (puerarin+resveratrol, P+R), 灌胃剂量分别为白藜芦醇组 (RES, 8.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 葛根素组 (PR, 15.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 复合药物组 [R+P, (8.4+15.4) mg·kg⁻¹·d⁻¹], 空白对照组 (CON, 等体积的蒸馏水)。

1.3 检测项目与方法

1.3.1 骨密度检测 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后, 用双能 X 线骨密度仪检测全身骨密度, 当发现组间有显著性差异后即处死所有动物, 分离出椎骨和右侧股骨, 分别置检查床上检测其骨密度值。

1.3.2 股骨三点弯曲试验和椎骨压缩试验 检测取右侧股骨置于 AG-IS 型万能试验机上进行三点弯曲测试, 跨距 14 mm, 加载速度 10 mm/min, 计算机记录载荷变形曲线及检测指标: 最大载荷、弹性模量。截取大鼠 L₄ 用于压缩试验, 将椎体两面的椎间盘及软组织切除, 用砂纸将椎骨打磨成上下两个面平行的圆柱体, 放置于不锈钢平台上, 逐渐加载压力, 加载速度为 2 mm/min, 记录载荷变形曲线及检测指标: 最大载荷、弹性模量。

1.3.3 胫骨 VG 染色分析 采用不脱钙骨组织切片法进行骨形态计量学分析。新鲜分离的左侧胫骨用 4% 多聚甲醛固定后, 梯度浓度乙醇脱水, 过渡至二甲苯中, 浸入用甲基丙烯酸甲酯、邻苯二甲酸二丁酯和过氧化苯甲酰按不同比例配置的 1、2、3 号液中各 7 d, 最后用 4 号液包埋。将包埋好的骨组织用 LEICA SP 1 600 锯式切片 (切片厚度约 50 μm) 的骨片,

用 502 胶水将骨片封固于载玻片上,用 1 200~2 000 目砂纸打磨至显微镜下可见的厚度, 然后进行 Van Gilson 染色(VG 染色),镜下观察骨小梁形态变化。

1.3.4 股骨 Micro-CT 扫描 从每组新鲜剥离的左侧股骨中随机取 6 根进行 Micro-CT 扫描。对同一样品扫描获得 500 张不同截面的 1 024×1 024 像素图片, 分别以骨骺线下 100~200 层和 300~400 层分析松质骨和皮质骨感兴趣区(ROI),用 Dataviewer 软件进行数据重建,用 CTAn 软件进行参数定量分析,包括体积骨密度(vBMD)、骨小梁数目(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁分离度(Tb.Sp)和骨体积百分比(BV/TV)等,并制作 3D 模型,最后用 Mimics 17.0 软件对 3D 模型进行图像处理。

1.3.5 血清 OC 和 TRACP 5b 含量检测 大鼠麻醉后自腹主动脉抽取血样,静置 10 min,5 000 r/min 离心 10 min,取上层血清冻存于-80 ℃。骨形成指标检测骨钙素(osteocalcin,OC),骨吸收指标检测抗酒石

酸性磷酸酶 5b(TRACP 5b),按说明书制作各自标准曲线,从标准曲线计算出样品中 OC 和 TRACP 5b 的含量,单位分别为 ng/ml 和 U/L。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,定量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组数据比较前先进行方差齐性检验,组间差异比较采用单因素方差分析(One-Way,ANOVA),以 Student-Newman-Keuls 检验进行组间的两两比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验大鼠体重变化结果

各组大鼠随时间增长体重均增加,但各组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.2 大鼠全身骨密度及股骨、椎骨离体骨密度变化结果

与 CON 组比较,第 1 个月末,各实验组大鼠的

表 1 各组大鼠治疗后体重变化结果($\bar{x}\pm s, g$)

Tab.1 Changes of body weight of rats among groups($\bar{x}\pm s, g$)

组别	鼠数(只)	4 周	8 周	12 周
CON 组	10	146.78±16.72	198.00±12.21	212.67±16.93
PR 组	10	152.11±8.68 ^{a1}	199.78±9.82 ^{a2}	214.22±7.46 ^{a3}
RES 组	10	150.56±9.37 ^{b1}	200.33±6.37 ^{b2}	199.56±6.37 ^{b3}
R+P 组	10	150.89±13.1 ^{le1le1}	199.37±13.34 ^{le2le2}	202.25±10.66 ^{le3le3}
F 值	-	0.311	1.147	3.840
P 值	-	0.818	0.345	0.019

注:与对照组比较,^{a1} $q=0.895$,^{a2} $q=0.359$,^{a3} $q=0.265$,^{b1} $q=0.624$,^{b2} $q=0.535$,^{b3} $q=2.292$,^{c1} $q=0.612$,^{c2} $q=0.24$,^{c3} $q=1.647$, $P<0.05$;与 PR 组比较,^{d1} $q=0.836$,^{d2} $q=0.078$,^{d3} $q=2.909$, $P<0.05$;与 RES 组比较,^{e1} $q=0.065$,^{e2} $q=0.149$,^{e3} $q=0.685$, $P<0.05$

Note:Compared with control group,^{a1} $q=0.895$,^{a2} $q=0.359$,^{a3} $q=0.265$,^{b1} $q=0.624$,^{b2} $q=0.535$,^{b3} $q=2.292$,^{c1} $q=0.612$,^{c2} $q=0.24$,^{c3} $q=1.647$, $P<0.05$;compared with puerarin group,^{d1} $q=0.836$,^{d2} $q=0.078$,^{d3} $q=2.909$, $P<0.05$;compared with resveratrol group,^{e1} $q=0.065$,^{e2} $q=0.149$,^{e3} $q=0.685$, $P<0.05$

表 2 不同时间点各组大鼠全身骨密度检测结果($\bar{x}\pm s, g/cm^2$)

Tab.2 Results of BMD of whole body of rats at different time points among 4 groups($\bar{x}\pm s, g/cm^2$)

组别	鼠数(只)	第 1 个月	第 2 个月	第 3 个月
CON 组	10	0.135 0±0.008 4	0.142 0±0.005 6	0.147 0±0.006 3
PR 组	10	0.136 0±0.003 9 ^{a1}	0.150 0±0.004 2 ^{a2}	0.156 0±0.004 9 ^{a3}
RES 组	10	0.134 0±0.009 3 ^{b1}	0.149 0±0.010 0 ^{b2}	0.156 0±0.007 9 ^{b3}
R+P 组	10	0.134 0±0.005 0 ^{le1le1}	0.151 0±0.006 4 ^{le2le2}	0.164 0±0.006 9 ^{le3le3}
F 值	-	0.516	2.193	4.893
P 值	-	0.675	0.108	0.010

注:与对照组比较,^{a1} $q=0.341$, $P<0.05$;^{a2} $q=3.614$, $P<0.05$;^{a3} $q=3.566$, $P<0.05$;^{b1} $q=0.252$, $P<0.05$;^{b2} $q=1.931$, $P<0.05$;^{b3} $q=2.817$, $P<0.05$;^{c1} $q=0.323$, $P<0.05$;^{c2} $q=3.347$, $P<0.05$;^{c3} $q=5.754$, $P<0.05$;与 PR 组比较,^{d1} $q=0.997$, $P<0.05$;^{d2} $q=0.413$, $P<0.05$;^{d3} $q=2.989$, $P<0.05$;与 RES 组比较,^{e1} $q=0.00$, $P<0.05$;^{e2} $q=0.533$, $P<0.05$;^{e3} $q=2.412$, $P<0.05$

Note:Compared with control group,^{a1} $q=0.341$, $P<0.05$;^{a2} $q=3.614$, $P<0.05$;^{a3} $q=3.566$, $P<0.05$;^{b1} $q=0.252$, $P<0.05$;^{b2} $q=1.931$, $P<0.05$;^{b3} $q=2.817$, $P<0.05$;^{c1} $q=0.323$, $P<0.05$;^{c2} $q=3.347$, $P<0.05$;^{c3} $q=5.754$, $P<0.05$;compared with puerarin group,^{d1} $q=0.997$, $P<0.05$;^{d2} $q=0.413$, $P<0.05$;^{d3} $q=2.989$, $P<0.05$;compared with resveratrol group,^{e1} $q=0.00$, $P<0.05$;^{e2} $q=0.533$, $P<0.05$;^{e3} $q=2.412$, $P<0.05$

全身骨密度无显著性差异;第 2 个月末,与 CON 组比较,其余 3 组全身骨密度均升高;第 3 个月末,与 CON 组相比,R+P 组全身骨密度极显著升高,且高于 PR 组和 RES 组(表 2)。股骨、椎骨离体骨密度与全身骨密度具有相同趋势(表 3),与 CON 组比较,PR 组、RES 组股骨和椎骨骨密度均显著升高,R+P 组极显著升高,且高于 PR 组和 RES 组;与 PR 组、RES 组比较,P+R 组椎骨骨密度均显著升高,且差异具有显著性,而股骨骨密度无明显变化。

表 3 各组大鼠股骨和椎骨离体骨密度检测结果($\bar{x}\pm s$, g/cm²)
Tab.3 Results of BMD of femur and vertebra of rats among 4 groups($\bar{x}\pm s$, g/cm²)

组别	鼠数(只)	股骨	椎骨
CON 组	10	0.118 0±0.002 8	0.128 0±0.003 3
PR 组	10	0.125 0±0.002 0 ^{al}	0.138 0±0.002 1 ^{a2}
RES 组	10	0.125 0±0.001 3 ^{bl}	0.140 0±0.002 7 ^{b2}
R+P 组	10	0.134 0±0.002 5 ^{cdlel}	0.149 0±0.001 8 ^{cdle2}
F 值	-	4.225	8.360
P 值	-	0.016	0.001

注:与对照组比较,^{al} $q=6.433, P<0.05$; ^{a2} $q=8.085, P<0.05$; ^{bl} $q=7.171, P<0.05$; ^{b2} $q=8.9, P<0.05$; ^{cl} $q=13.479, P<0.05$; ^{c2} $q=17.667, P<0.05$; 与 PR 组比较,^{dl} $q=8.89, P<0.05$; ^{d2} $q=12.577, P<0.05$; 与 RES 组比较,^{el} $q=10.1, P<0.05$; ^{e2} $q=8.771, P<0.05$

Note:Compared with control group, ^{al} $q=6.433, P<0.05$; ^{a2} $q=8.085, P<0.05$; ^{bl} $q=7.171, P<0.05$; ^{b2} $q=8.9, P<0.05$; ^{cl} $q=13.479, P<0.05$; ^{c2} $q=17.667, P<0.05$; compared with puerarin group, ^{dl} $q=8.89, P<0.05$; ^{d2} $q=12.577, P<0.05$; compared with resveratrol group, ^{el} $q=10.1, P<0.05$; ^{e2} $q=8.771, P<0.05$

表 4 各组大鼠股骨三点弯曲试验结果($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 Results of three-point bending experiment of drugs in femur among 4 groups($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数(只)	最大载荷(N)	弹性模量(Mpa)
CON 组	10	70.92±13.25	8 866.25±2 267.88
PR 组	10	129.56±14.40 ^{al}	10 272.38±1 140.99 ^{a2}
RES 组	10	129.10±16.54 ^{bl}	11 364.75±591.16 ^{b2}
R+P 组	10	141.08±13.41 ^{cdlel}	10 862.80±1 479.55 ^{cdle2}
F 值	-	19.89	0.912
P 值	-	0.000	0.453

注:与对照组比较,^{al} $q=9.476, P<0.05$; ^{a2} $q=1.751, P<0.05$; ^{bl} $q=8.681, P<0.05$; ^{b2} $q=3.371, P<0.05$; ^{cl} $q=11.769, P<0.05$; ^{c2} $q=2.332, P<0.05$; 与 PR 组比较,^{dl} $q=0.171, P<0.05$; ^{d2} $q=0.999, P<0.05$; 与 RES 组比较,^{el} $q=0.187, P<0.05$; ^{e2} $q=0.996, P<0.05$

Note:Compared with control group, ^{al} $q=9.476, P<0.05$; ^{a2} $q=1.751, P<0.05$; ^{bl} $q=8.681, P<0.05$; ^{b2} $q=3.371, P<0.05$; ^{cl} $q=11.769, P<0.05$; ^{c2} $q=2.332, P<0.05$; compared with puerarin group, ^{dl} $q=0.171, P<0.05$; ^{d2} $q=0.999, P<0.05$; compared with resveratrol group, ^{el} $q=0.187, P<0.05$; ^{e2} $q=0.996, P<0.05$

2.3 股骨三点弯曲试验和椎骨压缩试验结果

由股骨三点弯曲试验可知,与 CON 组相比,其余 3 组大鼠股骨最大载荷极显著升高,且 P+R 组显著高于 PR 组、RES 组,而各组间弹性模量值无统计学意义(表 4);由椎骨压缩试验可知,与 CON 组相比,PR 组、RES 组大鼠椎骨最大载荷值显著升高,P+R 组极显著升高,且差异有统计学意义;各实验组椎骨的弹性模量值无显著性变化(表 5)。

表 5 各组大鼠椎骨压缩试验结果($\bar{x}\pm s$)

Tab.5 Compression experiment of drugs in vertebrae among 4 groups($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数(只)	最大载荷(N)	弹性模量(Mpa)
CON 组	10	238.01±54.77	327.25±26.78
PR 组	10	293.50±31.30 ^{al}	440.87±82.02 ^{a2}
RES 组	10	309.46±43.38 ^{bl}	409.37±84.28 ^{b2}
R+P 组	10	339.80±49.57 ^{cdlel}	389.40±58.86 ^{cdle2}
F 值	-	4.648	0.647
P 值	-	0.011	0.592

注:与对照组比较,^{al} $q=2.782, P<0.05$; ^{a2} $q=4.164, P<0.05$; ^{bl} $q=3.234, P<0.05$; ^{b2} $q=2.937, P<0.05$; ^{cl} $q=4.357, P<0.05$; ^{c2} $q=3.039, P<0.05$; 与 PR 组比较,^{dl} $q=2.497, P<0.05$; ^{d2} $q=1.612, P<0.05$; 与 RES 组比较,^{el} $q=1.457, P<0.05$; ^{e2} $q=0.614, P<0.05$

Note:Compared with control group, ^{al} $q=2.782, P<0.05$; ^{a2} $q=4.164, P<0.05$; ^{bl} $q=3.234, P<0.05$; ^{b2} $q=2.937, P<0.05$; ^{cl} $q=4.357, P<0.05$; ^{c2} $q=3.039, P<0.05$; compared with puerarin group, ^{dl} $q=2.497, P<0.05$; ^{d2} $q=1.612, P<0.05$; compared with resveratrol group, ^{el} $q=1.457, P<0.05$; ^{e2} $q=0.614, P<0.05$

2.4 大鼠胫骨 VG 染色分析结果

如图 1 所示,与 CON 组相比,PR 组、RES 组和 R+P 组的骨小梁数目显著增加,骨小梁分离度明显减低,连续性变好,且 R+P 组明显优于 RES 组和 PR 组。

2.5 股骨 Micro-CT 扫描结果

图 2 为股骨 Micro-CT 扫描结果的 3D 重建效果图,由松质骨扫描图可见,与 CON 相比,PR 组、RES 组和 R+P 组大鼠股骨的骨小梁结构紧密,数目较多,分离度小,连续性好;且 R+P 组显著优于 RES 和 PR 组。股骨 Micro-CT 扫描指标变化结果显示,与 CON 组相比,PR 组、RES 组和 R+P 组的 vBMD、骨小梁数目(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)显著增加,且差异有统计学意义;骨小梁分离度(Tb.Sp)显著降低,且差异有统计学意义(表 6);以上结果与图 1 所示胫骨不脱钙切片 VG 染色结果相一致。

2.5 大鼠血清中 OC 和 TRACP 5b 含量检测结果

如表 7 所示,与 CON 组相比,PR 组、RES 组和 R+P 组血清中 OC 含量均增加,TRACP 5b 含量均降

表 6 各组大鼠血清中 OC 和 TRACP 5b 变化结果 ($\bar{x}\pm s$)
Tab.6 Changes of serum OC and TRACP 5b in rats among 4 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数(只)	OC(ng/ml)	TRACP 5b(U/L)
CON 组	10	370.07±28.46	3.35±0.53
PR 组	10	495.43±52.31 ^{a1}	1.96±0.17 ^{a2}
RES 组	10	478.52±20.27 ^{b1}	1.89±0.41 ^{b2}
R+P 组	10	629.21±43.64 ^{c1d1e1}	1.89±0.44 ^{c2d2}
F 值	-	9.632	3.142
P 值	-	0.004	0.048

注:与对照组比较,^{a1} $q=5.441, P<0.05$;^{a2} $q=6.859, P<0.05$;^{a3} $q=7.467, P<0.05$;^{a4} $q=5.496, P<0.05$;^{b1} $q=4.518, P<0.05$;^{b2} $q=6.573, P<0.05$;^{b3} $q=8.679, P<0.05$;^{b4} $q=4.837, P<0.05$;^{c1} $q=10.588, P<0.05$;^{c2} $q=11.268, P<0.05$;^{c3} $q=11.529, P<0.05$;^{c4} $q=2.649, P<0.05$ 。与 PR 组比较,^{d1} $q=10.685, P<0.05$;^{d2} $q=5.196, P<0.05$;^{d3} $q=0.66, P<0.05$;^{d4} $q=4.781, P<0.05$ 。与 RES 组比较,^{e1} $q=14.819, P<0.05$;^{e2} $q=7.473, P<0.05$;^{e3} $q=2.867, P<0.05$;^{e4} $q=1.214, P<0.05$

Note:Compared with control group, ^{a1} $q=5.441, P<0.05$;^{a2} $q=6.859, P<0.05$;^{a3} $q=7.467, P<0.05$;^{a4} $q=5.496, P<0.05$;^{b1} $q=4.518, P<0.05$;^{b2} $q=6.573, P<0.05$;^{b3} $q=8.679, P<0.05$;^{b4} $q=4.837, P<0.05$;^{c1} $q=10.588, P<0.05$;^{c2} $q=11.268, P<0.05$;^{c3} $q=11.529, P<0.05$;^{c4} $q=2.649, P<0.05$ 。compared with puerarin group, ^{d1} $q=10.685, P<0.05$;^{d2} $q=5.196, P<0.05$;^{d3} $q=0.66, P<0.05$;^{d4} $q=4.781, P<0.05$ 。compared with resveratrol group, ^{e1} $q=14.819, P<0.05$;^{e2} $q=7.473, P<0.05$;^{e3} $q=2.867, P<0.05$;^{e4} $q=1.214, P<0.05$

低。与 PR 组、RES 组相比,P+R 组 OC 含量显著升高,TRACP 5b 含量显著降低。

3 讨论

随着中药现代化的发展,中药复方越来越受到人们的关注。朱心红等^[6]于 2004 年就提出中药成分组合效应假说,即“中药复方的药效物质基础是其中所含有效成分的最佳比例组合”。治疗疾病的物质基础是中药复方中所有药物有效成分的组合,而复方中每一种药物都包含着针对某一疾病的主要有效成分,这些主要有效成分被称为功能组分。目前,功能

组分结合的研究还相对较少。本文选用葛根素和白藜芦醇单体,研究其功能组分结合后的药效,原因如下:(1)葛根具有活血化瘀、改善微循环、扩张冠状动脉等作用,其制剂葛根素注射剂临床用于治疗心脑血管疾病及视网膜血管病、眼底病及突发性耳聋等^[7]。(2)白藜芦醇具有调节血脂、抗血小板聚集、抗氧化、抗肿瘤等多种重要生物活性。因此,笔者考虑将这两种与骨形成有关的中药单体进行复合,按 1:1 的比例混合配成溶液,对大鼠进行灌胃,考察复合药物对提高青年大鼠峰值骨量的作用。

3.1 中药复方对大鼠骨密度的影响

骨密度是检测骨质量的重要指标,通过检测骨密度,可以判定骨折发生的可能性。本实验结果显示葛根素、白藜芦醇单体均可提高青年大鼠全身骨密度及离体骨密度,而将葛根素和白藜芦醇按一定比例复合,复合药物组全身及离体骨密度分别显著高于葛根素和白藜芦醇组。这表明将某些中药单体按一定比例组合,其药效优于其中任意一种单体。

3.2 中药复方对股骨三点弯曲和椎骨压缩试验的影响

骨生物力学是研究骨组织在外界作用下的力学特性和骨在受力后的生物学效应,是对骨质量进行评定的一种可靠方法。骨生物力学的评价指标通常为最大载荷、弹性模量等。实验结果显示,口服葛根素、白藜芦醇均可显著提高青年大鼠股骨和椎骨的最大载荷值,而对弹性模量无显著变化。将葛根素、白藜芦醇两种单体进行复合后,复合药物组股骨和椎骨最大载荷值分别高于各自单体组值的。这表明复合药在提高骨力学性能方面的作用也显著优于单体,进一步证明将几种单体进行复合后,其复合药物的药效明显会增加。

3.3 中药复方对骨形态计量学的影响

骨形态计量学是评价骨组织微结构的重要指

表 7 各组大鼠股骨 Micro-CT 扫描松质骨量化指标分析 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Tab.7 Parameters of cancellous bone of femurs by Micro-CT scanning among 4 groups ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	vBMD (g/cm ³)	Th.N(1/μm)	Tb.Th(μm)	Tb.Sp(μm)
CON 组	1.155 0±0.244 1	0.022±0.004	7.07±0.37	49.18±7.58
PR 组	1.736 0±0.094 8 ^{a1}	0.036±0.003 ^{a2}	10.47±1.05 ^{a3}	29.80±4.14 ^{a4}
RES 组	1.626 0±0.075 1 ^{b1}	0.034±0.002 ^{b2}	9.70±0.64 ^{b3}	23.09±2.99 ^{b4}
R+P 组	2.255 0±0.071 9 ^{c1d1e1}	0.045±0.003 ^{c2d2}	10.81±0.70 ^{c3d3}	21.55±0.85 ^{c4d4}
F 值	7.686	15.85	3.94	8.25
P 值	0.026	0.003	0.087	0.022

注:与对照组比较,^{a1} $q=6.657, P<0.05$;^{a2} $q=7.897, P<0.05$;^{a3} $q=9.815, P<0.05$;^{a4} $q=6.89, P<0.05$;^{b1} $q=15.729, P<0.05$;^{b2} $q=6.702, P<0.05$ 。与 PR 组比较,^{c1} $q=6.21, P<0.05$;^{c2} $q=0.469, P<0.05$ 。与 RES 组比较,^{d1} $q=9.903, P<0.05$;^{d2} $q=0.00, P<0.05$

Note:Compared with control group, ^{a1} $q=6.657, P<0.05$;^{a2} $q=7.897, P<0.05$;^{a3} $q=9.815, P<0.05$;^{a4} $q=6.89, P<0.05$;^{b1} $q=15.729, P<0.05$;^{b2} $q=6.702, P<0.05$ 。compared with puerarin group, ^{c1} $q=6.21, P<0.05$;^{c2} $q=0.469, P<0.05$ 。compared with resveratrol group, ^{d1} $q=9.903, P<0.05$;^{d2} $q=0.00, P<0.05$



图 1 大鼠胫骨近端不脱钙切片 VG 染色(×4) 1a. CON 组骨小梁网状结构稀疏,分离度大 1b. PR 组骨小梁网状结构较稀疏,分离度较大 1c. RES 组骨小梁网状结构较稀疏,分离度较大 1d. P+R 组骨小梁网状结构致密,分离度小

Fig.1 VG staining of undecalcified sections of tibial epiphysis (×4) 1a. CON group showed trabecular structure was scattered, degree of separation was large 1b. PR group showed trabecular structure was few and scattered, degree of separation was large 1c. RES group showed trabecular structure was few and scattered, degree of separation was large 1d. P+R group showed trabecular net structure was relatively dense, degree of separation was small

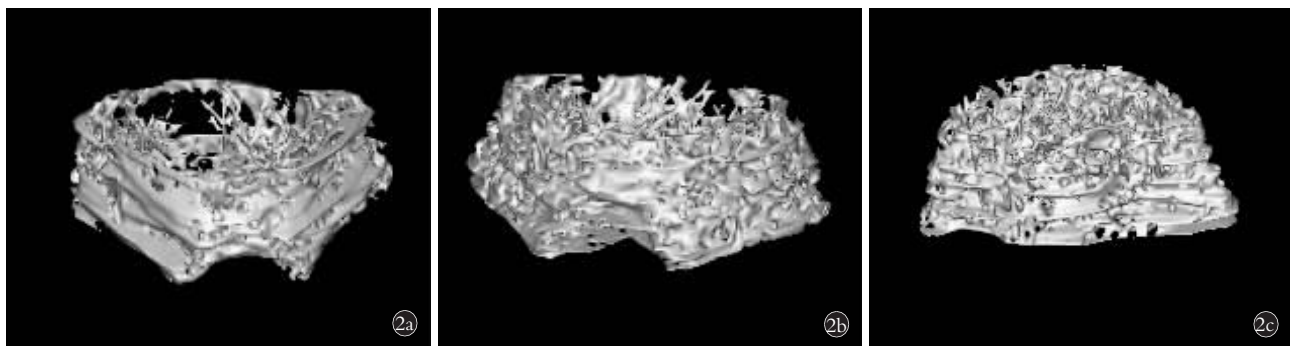
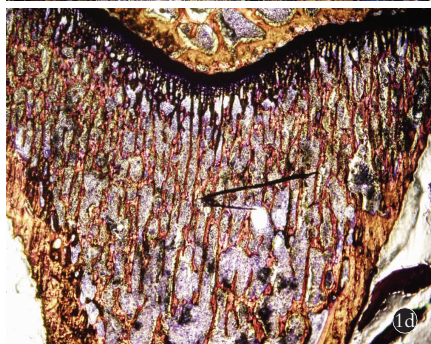
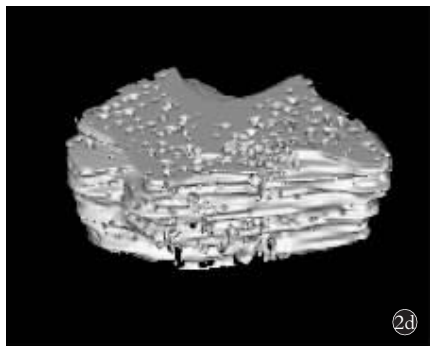


图 2 大鼠股骨松质骨 Micro-CT 扫描 3D 重建图 2a. CON 组骨小梁稀疏 2b. PR 组骨小梁较致密 2c. RES 组骨小梁较致密 2d. P+R 组骨小梁致密

Fig.2 Reconstructive 3D of cancellous bone of femurs in rats 2a. CON group showed trabecular was few and scattered 2b. PR group showed trabecular was light dense 2c. RES group showed less dense of bone trabecular 2d. P+R group showed compact structure of bone trabecular



标,反映机体组织形态学方面的变化情况。它可以通过 Tb.N、Tb.Th、Tb.Sp 等参数鉴定骨量。本实验通过胫骨 VG 染色和股骨 Micro-CT 扫描对骨形态计量学进行研究, VG 染色是对胫骨骨骺线以下的骨小梁部分进行染色,从骨小梁的网状致密结构及连续性判断药物的作用效果,是从二维空间角度对骨微结构进行评价。而 Micro-CT 扫描技术是对样本进行 360°不同角度扫描,然后通过计算机软件对每个角度扫描的图像进行重构,得到样本内部精细结构的

变化情况^[8],是从三维空间的角度对骨微结构的评价。本实验从 VG 染色图和 Micro-CT 扫描三维重建图中骨小梁的数目、疏稀程度和连续性可直观看出,复合药较单体药物更显著提高了骨小梁网状结构的交联度,从而使大鼠骨质紧密,明显改善骨组织微结构。Micro-CT 扫描量化指标也显示:葛根素、白藜芦醇均能显著提高股骨和胫骨的骨小梁数目、骨小梁厚度及骨体积百分比,降低骨小梁分离度,同时复合药物组股骨和胫骨的骨小梁数目、厚度显著高于葛

根素和白藜芦醇组, 而骨小梁分离度显著低于各自单体的值; 此结果与骨密度和生物力学结果一致。

3.4 中药复方对血清中 OC 和 TRACP 5b 的影响

血清生化指标可反映骨代谢的本质, 能客观评价骨转换率^[9]。本实验选取了目前骨代谢研究中比较经典的骨转换因子 OC (骨形成相关因子) 和 TRACP 5b (骨吸收相关因子)。结果显示, 白藜芦醇、葛根素均可提高大鼠血清中 OC 含量, 降低 TRACP 5b 含量; 将白藜芦醇、葛根素两单体按 1:1 比例复合, 复合药物组血清中 OC 含量显著高于葛根素、白藜芦醇组, TRACP 5b 含量显著低于葛根素、白藜芦醇组。以上结果表明中药单体及复合药提高大鼠峰值骨量是通过促进血清中骨形成相关因子 OC 含量, 抑制骨吸收相关因子 TRACP 5b 含量而发挥作用的, 且将某几种单体进行复合后, 其复合药物的药效会显著高于各自单体的药效。

上述结果表明, 葛根素、白藜芦醇单体在各自浓度下的药效均低于葛根素和白藜芦醇复合后的药效, 可能机制是两种或两种以上中药单体组合起来的活性基团更多, 作用靶点也更为丰富, 从而使其复合药物具有较单体化合物更强的药效。因此, 本文的创新之处在于将某几种单体进行组合, 研究其复合物的药效, 这种组合使药物治疗作用更加集中, 疗效更加显著。

综上所述, 中药有效成分的结合的确具有实际意义, 它通过潜在的成分-靶点相互作用来降低各种疾病, 在降低不良反应的同时增加治疗效果。然而由于中药成分多, 作用机制复杂, 从而造成复合中药作用机制不明确。目前, 利用中药复方或复合药物预防和治疗骨质疏松症的途径仍然存在以下几个问题: 一是中药复方或复合药的成分复杂, 作用机制尚不明确。二是各类中药的配伍变化情况未知, 两种或两种以上的中药有效成分复合在一起, 有时会出现有效成分之间发生化学反应, 甚至出现不良作用, 会减低药效、危害人体健康。三是实验研究的检测指标少, 多数集中于骨静力学、动力学参数和抗弯力等^[16], 对于能反映骨代谢和机体平衡的分子生物水平的研究较少, 故缺乏一定的说服力。因此, 有关中药复方或复合药物治疗骨质疏松症的作用机制是今后需要进一步探讨和分析的重点。

参考文献

[1] Gautam AK, Bhargavan B, Tyagi AM, et al. Differential effects of

formononetin and cladrin on osteoblast function, peak bone mass achievement and bioavailability in rats[J]. J Nutr Biochem, 2011, 22(4):318-327.

[2] Gordon CM, Zemel BS, Wren TA, et al. The determinants of peak bone mass[J]. J Pediatr, 2017, 180:261-269.

[3] 马小妮, 葛宝丰, 陈克明, 等. 淫羊藿苷调节成骨细胞骨形成和被骨细胞骨吸收的机制[J]. 中国医学科学院学报, 2013, 35(4):432-438.

MA XN, GE BF, CHEN KM, et al. Effects of icariin on bone formation and bone resorption of osteoblasts in osteoblasts[J]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2013, 35(4):432-438. Chinese.

[4] 贾韦国. 吸收与代谢后寡单体复合药物——中药现代化的新尝试[J]. 结合医学学报, 2006, 4(5):441-446.

JIA WG. Absorb and metabolize oligomeric complex drugs—A new attempt for modern medicine[J]. Jie He Yi Xue Xue Bao, 2006, 4(5):441-446. Chinese.

[5] Elmarakby AA, Ibrahim AS, Faulkner J, et al. Tyrosine kinase inhibitor, genistein, reduces renal inflammation and injury in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Vascul Pharmacol, 2011, 55(5-6):149-156.

[6] 朱心红, 沈群, 高天明. 中药成分组合效应假说及实验研究[J]. 中草药, 2004, 35(2):122-124.

ZHU XH, SHEN Q, GAO TM. Hypothesis and experimental study on compositional effect of traditional chinese medicine[J]. Zhong Cao Yao, 2004, 35(2):122-124. Chinese.

[7] 徐兆景. 葛根素药理作用机制探讨及临床应用[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(8):256-257.

XU ZJ. Pharmacological mechanism of puerarin and its clinical application[J]. Zhongguo Xian Dai Yao Wu Ying Yong, 2016, 10(8):256-257. Chinese.

[8] 朱太咏, 杜天信, 张国梁, 等. 补肾中药复方改善骨质疏松模型大鼠皮质骨生物力学性能的实验[J]. 中国临床康复, 2005, 9(11):223-225.

ZHU TY, DU TX, ZHANG GL, et al. Experimental study on improving the biomechanical properties of cortical bone in rat model of osteoporosis by tonifying kidney and herbal compound[J]. Zhongguo Lin Chuang Kang Fu, 2005, 9(11):223-225. Chinese.

[9] Chen J, Chen P, Qi H, et al. Puerarin affects bone biomarkers in the serum of rats with intrauterine growth restriction[J]. J Tradit Chin Med, 2016, 36(2):211-216.

[10] 王剑, 郑洪新, 刘研, 等. 补肾益髓中药复方对糖皮质激素性骨质疏松症大鼠肾组织 Msx2 mRNA 及蛋白表达的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 27(3):25-28.

WANG J, ZHENG HX, LIU Y, et al. Effect of bushen yisui compound prescription on expression of Msx2 mRNA and protein in renal tissue of rats with glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. Liao Ning Zhong Yi Yao Da Xue Xue Bao, 2012, 27(3):25-28. Chinese.

(收稿日期:2018-03-19 本文编辑:李宜)