

通络生骨胶囊对大鼠应力缺失性骨质疏松的防治作用

刘少军^{1*}, 陈小俊¹, 冯丽敏², 赵瑞芝²

(1. 广州中医药大学第一附属医院骨三科, 广州 510405; 2. 广东省中医药科学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:探讨通络生骨胶囊对大鼠应力缺失性骨质疏松模型的改善作用。方法:40 只大鼠随机分为正常对照组, 模型对照组, 通络生骨胶囊低(0.6 g·kg⁻¹)、高剂量(1.2 g·kg⁻¹)组, 除正常对照组外, 利用鼠尾悬吊模型制备大鼠应力缺失性骨质疏松模型, 药物组在造模同时给与通络生骨胶囊。造模 21 d, 采血, 测定血清中碱性磷酸酶、酸性磷酸酶, 钙含量; 处死动物, 取其胫骨及股骨, 切片, 观察骨形态变化。结果:空白对照组, 模型对照组, 通络生骨胶囊低、高剂量组碱性磷酸酶含量分别为:430.6, 355.4, 485.6, 417.3 U·L⁻¹; 酸性磷酸酶含量分别为 13.63, 8.96, 7.02, 8.60 U·L⁻¹, 血钙含量分别为 1.357, 1.142, 1.186, 1.149 mmol·L⁻¹; 血清总钙含量分别为 2.455, 2.162, 2.362, 2.286 mmol·L⁻¹; 骨小梁面积分别为 0.0049, 0.0033, 0.0035 mm², 成骨细胞个数分别为 11.8, 7, 12.5, 9.2 个; 骨小梁个数分别为 6.1, 4.2, 4.6, 5.3 个。与正常对照组比较, 模型组碱性磷酸酶含量, 血清离子钙, 血清总钙浓度均显著下降, 模型组骨小梁面积百分比、成骨细胞个数、骨小梁厚度及骨小梁个数均显著降低, 骨小梁间距显著升高; 与模型组比较, 通络生骨胶囊低、高剂量组显著升高血清碱性磷酸酶含量, 骨小梁面积, 成骨细胞个数以及骨小梁个数, 增加了骨小梁厚度, 高剂量组作用更为显著。结论:通络生骨胶囊可用于应力缺失性骨质疏松防治。

[关键词] 通络生骨胶囊; 应力; 骨质疏松

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0170-04

Effect of Tongluo Shenggu Capsules on Osteoporosis Induced by Stress Absence

LIU Shao-jun^{1*}, CHEN Xiao-jun¹, FENG Li-min², ZHAO Rui-zhi²

(1. Bone laboratory of First Affiliated Clinical College, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Guangdong Provincial Academy of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Tongluo Shenggu Capsules on the osteoporosis induced by stress absence. Method: Fourty male SD rats were randomly divided into four groups: normal control, model control, high and low dose drug groups. Besides the normal control group, all animals in other three group were subjected to tail suspension test for 21 days, the animals in drug groups were administered Tongluo Shenggu Capsule. The bone metabolism markers and biomechanical parameters were determined. Result: Compared with the normal control group, the alkaline phosphatase (ALP) and the concentration of calcium in serum of model group was decreased significantly, the area and thickness of bone trabecula, the amount of osteoblast were decreased obviously, compared to the model control, Tongluo Shenggu capsules could increase ALP, the area and thickness of bone trabecula and the osteoblast amount. Conclusion: Tongluo Shenggu Capsules could enhance the growth of bone and could be used to treat osteoporotic induced by stress absence.

[Key words] stress absence; osteoporotic; Tongluo Shenggu Capsules

[收稿日期] 20101008(005)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2007B031407010)

[通讯作者] * 刘少军, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为骨病治疗, 电话: 020-36591211, E-mail: liushaojun@163.net

应力刺激降低是引起宇航员、老年人及长期卧床患者的骨质疏松的发生的原因^[1-2]。目前的应对措施主要是加强运动锻炼,服用骨吸收抑制剂以及骨形成促进剂如双磷酸盐,激素替代疗法等,运动锻炼需要控制强度,适应面较窄,而西药治疗则毒副作用较大。预防疾病发生一般较疾病发生后治疗容易,因此寻找预防应力缺失性骨质疏松发生的药物非常迫切。

通络生骨胶囊为木豆叶提取物制备的抗股骨头坏死的新药,具有促进骨形成的作用,推测可用于治疗骨质疏松,因此,本文采用鼠尾悬吊法制备大鼠应力缺失性骨质疏松模型,探讨通络生骨胶囊对于此类骨质疏松的治疗作用。

1 材料

1.1 药物 通络生骨胶囊,浙江海正药业有限公司,批号 080201。

1.2 动物 SPF 级 SD 大鼠 40 只,4 周龄,雄性,体重 80 ~ 100 g,购自广东省实验动物中心 (GLP 实验室),合格证号 0060713,SPF 饲养环境。

1.3 试剂 ECHO 全自动血液生化分析仪配套试剂,上海复旦张江生物医药股份有限公司生产,批号 ALP:090602;抗酒石酸酸性磷酸酶测试盒,南京建成科技有限公司生产,批号 20100417;电解质分析仪配套试剂。江苏奥迪康医学科技有限公司生产, A 校准液批号 091215-14, B 斜标液批号 091201-17R, 反应液批号 100301-12;6.3 质控物来源:ECHO 配套质控物 (正常值质控),批号 395UE。

1.4 仪器 ECHO 全自动血液生化分析仪:意大利 LOGOTECH;AC9000 电解质分析仪:江苏奥迪康医学科技有限公司;UV2800 紫外分光光度计:上海尤尼柯仪器有限公司;HWS-28 电热恒温水浴箱:上海一恒科技有限公司。MSUOT 数码成像系统;全自动轮转切片机:徕卡仪器有限公司;漂烘片机:常州市雅博设备有限公司;石蜡包埋机:徕卡仪器有限公司。

2 方法

2.1 动物模型制作 SD 大鼠 40 只,雄性,随机分为 4 组,除正常对照组外,参照文献方法制备应力缺失性骨质疏松模型^[3]。简述如下:先用肥皂水清洗尾部表面,并用电吹风机吹干。再依次向尾部表面喷涂安息香酊和松香酊,并吹干,以防止粘贴物对皮肤的激惹作用。涂松香酊可使尾部的皮肤表面变涩,使胶布粘贴的更牢。然后,自一侧尾根部起,按纵向走

行,将一长约 20 cm、与尾部等宽的医用胶布条,粘贴于尾部表面至距尾尖部 3 ~ 5 cm 处,再将胶布条绕过一直径为 5 mm 左右的胶管粘贴于对侧的尾部皮肤上。另外两侧皮肤则不粘贴胶布以作为下次更换胶布时的粘贴部位。接着,在此段尾部的表面,再依次间断地轻绕 2 ~ 3 圈 0.8 cm 宽的胶布条和连续缠绕一层 1.5 cm 宽的纱布条以对纵行胶布条加强固定。用一绞丁环将有纵行胶布条绕过的胶管与悬吊杆上可沿水平吊梁滑动的滑轮相连。绞丁环可使悬吊大鼠作 360° 的平面旋转活动。调节水平吊梁高度,使大鼠的后爪在伸直时刚好不能触及笼的下层,从而使动物始终保持里头低位 (约 - 30 度)。大鼠借前肢在笼内自由活动。胶布粘贴部位的更换每 7 d 左右,即须更换粘贴部位 1 次。药物高低剂量组在造模次日开始灌胃给药,给药剂量均为 10 mL · kg⁻¹,浓度分别为 120, 60 g · L⁻¹,直至实验结束。

2.2 血清取材及测定 造模 21 d,即药物组给药 20 d,麻醉后心脏采血,分离血清,按照全国临床检验操作规程 (3 版),测定其中碱性磷酸酶含量 (ALP),酸性磷酸酶含量 (StrACP),血清 Ca²⁺ 浓度。其中 ALP 测定采用全自动生化仪速率法,StrACP 采用抗酒石酸酸性磷酸酶手工法测定, Ca²⁺ 测定采用电解质分析仪进行测定。

2.3 骨取材及测定 处死麻醉大鼠,取其股骨及胫骨,剥离肌肉及附着组织,以 10% 甲醛固定,将胫骨、股骨骨松质部分制成病理切片,经 HE 染色后用荧光显微镜、MSUOT 数码成像系统拍摄图片及 MIAS300 型图像分析仪测量距断线下 1 mm 处至远端 4 mm 范围内的骨组织测定骨小梁面积百分比、成骨细胞指数、破骨细胞指数、骨小梁厚度、骨小梁间距、骨小梁数目。

2.4 数据处理 采用 SPSS11.0 数据处理软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,双侧 *t* 检验, *P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 血清碱性磷酸酶,酸性磷酸酶及钙离子测定 由表 1 可见,与正常对照组比较,模型组碱性磷酸酶含量,抗酒石酸酸性磷酸酶含量,血清钙离子浓度以及总钙浓度均显著降低 (*P* < 0.05),提示应力缺失导致骨代谢发生改变;与模型组比较,药物低、高剂量组显著升高了碱性磷酸酶的含量,有升高血清钙离子浓度的趋势。

表 1 通络生骨胶囊对应力缺失骨质疏松模型对血清骨形成生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药剂量 /g·kg ⁻¹	碱性磷酸酯酶 /U·L ⁻¹	酸性磷酸酯酶 /U·L ⁻¹	血清离子钙浓度 /mmol·L ⁻¹	血清总钙浓度 /mmol·L ⁻¹
正常对照	—	430.6 ± 81.4 ¹⁾	13.63 ± 3.64 ¹⁾	1.357 ± 0.128 ¹⁾	2.455 ± 0.157 ¹⁾
模型	—	355.4 ± 76.9	8.96 ± 3.05	1.142 ± 0.195	2.162 ± 0.330
通络生骨	0.6	485.6 ± 126.0 ¹⁾	7.02 ± 2.08 ¹⁾	1.186 ± 0.076 ¹⁾	2.362 ± 0.194
	1.2	417.3 ± 104.7 ¹⁾	8.60 ± 3.24 ¹⁾	1.149 ± 0.206 ¹⁾	2.286 ± 0.366

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 2 ~ 3 同)。

3.2 骨形态学观察 结果见表 2 ~ 3。与正常对照组比较,模型对照组骨小梁面积百分比、成骨细胞个数、骨小梁厚度及骨小梁个数均显著降低,破骨细胞

指数、骨小梁间距等均显著升高,充分说明应力缺失严重影响股骨及胫骨的形成,说明本次实验造模成功。

表 2 通络生骨胶囊造模同时给药对应力缺失骨质疏松模型大鼠股骨骨形态影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	骨小梁 面积/%	骨小梁面积 /mm ²	成骨细胞 数/个	破骨细胞 数/个	成骨细胞 指数	破骨细胞 指数	骨小梁厚度 /μm	骨小梁间距 /μm	骨小梁数 /个
正常对照	—	27.2 ± 4.6 ¹⁾	0.004 9 ± 0.001 4 ¹⁾	11.8 ± 2.0 ¹⁾	1.5 ± 1.5	2 394 ± 874	308.2 ± 535.8 ¹⁾	78.3 ± 7.6 ¹⁾	96.66 ± 21.73 ¹⁾	6.1 ± 0.8 ¹⁾
模型对照	—	12.9 ± 6.2	0.003 3 ± 0.000 9	7.0 ± 2.8	2.1 ± 0.7	2 229 ± 701	678.6 ± 268.7	62.4 ± 11.7	170.22 ± 20.20	4.2 ± 0.5
通络生骨	0.6	20.3 ± 3.6 ¹⁾	0.003 5 ± 0.001 0 ¹⁾	12.5 ± 1.4 ¹⁾	1.6 ± 1.0	3 634 ± 659 ¹⁾	491.3 ± 344.8	70.6 ± 5.5	130.07 ± 12.38 ¹⁾	4.6 ± 0.9 ¹⁾
	1.2	18.3 ± 10.1 ¹⁾	0.004 1 ± 0.000 5	9.2 ± 2.4 ¹⁾	3.6 ± 0.5 ¹⁾	2 423 ± 468	948.0 ± 116.8 ¹⁾	57.4 ± 7.0	156.23 ± 19.47 ¹⁾	5.3 ± 1.0 ¹⁾

表 3 通络生骨胶囊造模同时给药对应力缺失骨质疏松模型对大鼠胫骨骨形态影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	骨小梁 面积/%	骨小梁面积 /mm ²	成骨细胞 数/个	破骨细胞 数/个	成骨细胞 指数	破骨细胞 指数	骨小梁厚度 /μm	骨小梁间距 /μm	骨小梁数 /个
正常对照	—	32.6 ± 5.50 ¹⁾	0.005 1 ± 0.001 4 ¹⁾	11.9 ± 3.6 ¹⁾	1.5 ± 1.8	2 458 ± 491	294 ± 369 ¹⁾	58.7 ± 7.9 ¹⁾	103.8 ± 27.8 ¹⁾	7.1 ± 1.3 ¹⁾
模型对照	—	18.8 ± 7.27	0.002 6 ± 0.001 0	5.6 ± 3.2	1.4 ± 0.5	2 271 ± 1 147	559 ± 137	47.9 ± 11.3	177.2 ± 32.4	3.9 ± 1.4
通络生骨	0.6	19.57 ± 2.86 ¹⁾	0.003 6 ± 0.000 6 ¹⁾	12.4 ± 1.3 ¹⁾	1.3 ± 0.7	3 609 ± 688 ¹⁾	372 ± 245	52.7 ± 8.3	125.8 ± 39.6 ¹⁾	6.2 ± 1.3 ¹⁾
	1.2	11.7 ± 9.19 ¹⁾	0.004 0 ± 0.001 6 ¹⁾	8.7 ± 1.6 ¹⁾	3.7 ± 0.7 ¹⁾	2 192 ± 516	917 ± 102	54.2 ± 6.3	167.2 ± 25.9 ¹⁾	4.7 ± 1.1 ¹⁾

与模型组比较,无论是股骨还是胫骨,药物低剂量组均显著升高了成骨细胞个数以及骨小梁个数,升高股骨骨小梁面积百分比和胫骨的骨小梁面积,药物高剂量组则不仅提高了骨小梁面积百分比,成骨细胞个数以及成骨细胞指数还显著增加了骨小梁厚度及其个数,显著减少了骨小梁间距。药物高剂量组在成骨细胞个数,破骨细胞个数,破骨细胞指数、骨小梁厚度等与正常对照组相比无显著性差异,提示通脉成骨胶囊对于应力缺失导致的股骨及胫骨的骨质疏松具有良好的治疗作用。

4 讨论

鼠尾悬吊可造成大鼠后肢难以用力而减少了其运动,是研究废用性骨质疏松的常见模型,一般造模时间为 4 周,本实验在造模 3 周中发现有约 15% 大鼠出现尾坏死的情况,因此缩短造模时间为 3 周,骨形态显微结果证实 3 周已达到造模效果。鼠尾坏

死是由于大鼠可绕悬挂钩旋转运动,可能由于绞钉环不够平滑(本实验采用铁丝自行制作,绞钉环比较粗糙),旋转受阻,导致鼠尾扭曲缺血造成。提示进行鼠尾悬吊模型时要充分考虑绞钉环的可旋转性。

碱性磷酸酶是骨形成指标,在成骨细胞中表达。本实验中造模后碱性磷酸酶显著下降,与佟海英等的结果一致^[4],与成骨细胞个数及指数显著下降,骨小梁厚度降低,间距加大的骨形态变化相呼应;药物高、低剂量组均显著升高碱性磷酸酶含量,而在骨形态的研究中则提高了成骨细胞个数及指数,增加了骨小梁厚度,减少了骨小梁间距的结果一致,提示通络生骨胶囊通过改善骨代谢而促进成骨。

酸性磷酸酶是骨吸收指标,在破骨细胞中表达,本文结果提示模型组酸性磷酸酶降低,与佟海英等的结果不同,与破骨细胞个数及指数似乎也不相关,其原因有待进一步探讨。

芒果苷单钠盐的抑菌作用研究

袁叶飞^{1,2*}, 邓家刚², 胡祥宇¹, 欧贤红³

(1. 泸州医学院, 四川 泸州 646000; 2. 广西中医学院, 南宁 530001;
3. 桂林医学院, 广西 桂林 541004)

〔摘要〕 目的:观察芒果苷单钠盐的抑菌作用。方法:以咽喉及上呼吸道常见致病菌肺炎双球菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌和流感嗜血杆菌为受试菌,分别通过体外抑菌和体内抑菌实验来观察芒果苷单钠盐的抑菌作用。结果:体外研究显示芒果苷单钠盐对肺炎双球菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌和流感嗜血杆菌均表现出一定的抑制作用。其最小抑菌质量浓度分别为 10.0,5.0,10.0,2.5 g·L⁻¹。体内研究显示芒果苷单钠盐可显著提升菌液感染小鼠的存活率。结论:芒果苷单钠盐具有明显的抑菌作用。

〔关键词〕 芒果苷单钠盐;抑菌作用;肺炎双球菌;肺炎克雷伯菌;金黄色葡萄球菌;流感嗜血杆菌

〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2011)06-0173-03

Bacteriostatic Action of Mangoferin Monosodium Salt

YUAN Ye-fei^{1,2*}, DENG Jia-gang², HU Xiang-yu¹, OU Xian-hong³

(1. Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China;
2. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;
3. Guilin Medical College, Guilin 541004, China)

〔收稿日期〕 20101006(001)
〔基金项目〕 广西应用基础研究专项(0731054);广西青年基金资助项目(0640052);广西教育厅资助项目(200507049)
〔通讯作者〕 *袁叶飞,副教授,博士学位,主要从事中草药化学成分及药效筛选研究工作,Tel:13158621302

通络生骨胶囊为木豆叶提取物,为治疗股骨头坏死的中药新药,长期服用未见明显毒副作用。文献报道其具有改善病变部位血液运输,促进骨髓基质干细胞向成骨细胞分化,抑制其向脂肪细胞的分化,促进骨钙素、降钙素合成,同时改善骨密度^[3,4]等多种有利骨形成的作用,以往研究多关注其在骨坏死机制上的药效及机制探讨,对于应力缺失性骨质疏松尚未涉及。本研究结果提示预防给与通络生骨胶囊,可减少应力缺失造成的骨质疏松,提示该药物可用于航天以及长期卧床患者骨质疏松的预防。

〔参考文献〕

〔1〕 孙联文,庄逢源. 微重力导致骨质疏松的研究进展[J]. 中华航空航天医学杂志,2004,15(1):54.

〔2〕 孙客. 废用性骨质疏松症临床研究现状[J]. 中国康复医学杂志,2001,16(2):125.

〔3〕 陈杰,马进,丁兆平,等. 一种模拟长期失重影响的大鼠尾部悬吊模型[J]. 空间科学学报,1993,13(2):159.

〔4〕 佟海英,胡素敏,周鹏,等. 中药复方对模拟失重大鼠骨代谢的影响[J]. 中国中药杂志,2008,33(7):79.

〔5〕 刘少军,邓彦,王海彬,通络生骨胶囊对骨髓基质干细胞成骨和成脂肪分化的影响[J]. 四川中医,2008,26(3):22.

〔6〕 杨俊兴,方斌,徐传毅,等. 通络生骨胶囊对激素性股骨头坏死大鼠骨钙素,降钙素与骨密度的影响[J]. 广州中医药大学学报,2007,24(1):41.

〔责任编辑〕 聂淑琴