

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.07.019

龟甲对糖皮质激素性骨质疏松大鼠腰椎和胫骨骨密度、骨强度的影响

张志达¹, 任辉², 沈耿杨¹, 梁德², 杨志东², 黄锦菁¹, 招文华¹, 余佩沅¹, 尚奇¹, 江晓兵^{2*}

(1. 广州中医药大学, 广东省广州市机场路 12 号, 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院)

摘要 目的 观察龟甲对糖皮质激素性骨质疏松大鼠腰椎、胫骨骨密度和骨强度的作用差异。方法 48 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、西药组和龟甲组, 每组 12 只。模型组、西药组和龟甲组皮下注射地塞米松制造骨质疏松模型。造模后西药组用阿仑膦酸钠 63 mg/kg 灌胃, 每 7 天 1 次; 龟甲组用龟甲 30 mg/(kg·d) 灌胃, 每天 1 次; 空白组和模型组用 0.9% 氯化钠溶液 2 ml 灌胃, 每天 1 次。各组均给药 3 个月。分别于给药前及给药 2 个月、3 个月检测各组大鼠腰椎、胫骨骨密度和骨强度, 计算给药 3 个月时西药组与龟甲组骨密度及骨强度改善率。结果 龟甲组给药 2、3 个月腰椎、胫骨骨密度, 胫骨骨强度均升高, 给药 3 个月腰椎骨强度亦升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。给药 3 个月时, 西药组、龟甲组腰椎骨密度、骨强度及胫骨骨密度、骨强度均高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 龟甲组腰椎骨密度低于西药组 ($P < 0.05$), 而腰椎骨强度及胫骨骨密度、骨强度与西药组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。给药 3 个月后, 龟甲组腰椎骨密度改善率为 8.08%, 胫骨骨密度改善率为 8.30%, 腰椎骨强度改善率为 44.67%, 胫骨骨强度改善率为 30.58%。结论 龟甲对糖皮质激素性骨质疏松大鼠腰椎、胫骨骨密度和骨强度均有改善作用, 且对腰椎骨强度改善作用优于胫骨, 对二者骨密度改善作用相当。

关键词 糖皮质激素性骨质疏松; 龟甲; 骨密度; 骨强度

糖皮质激素性骨质疏松 (glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 是长期摄入糖皮质激素 (GC) 后骨骼系统的并发症, 是最常见的继发性骨质疏松^[1], 具有发病率高、病情重、危害大的特点。骨折是骨质疏松最严重的并发症, 长期服用 GC 的成人中有 30% ~ 50% 发生骨折^[2]。据报道, 髌部骨折患者 1 年内的死亡率达 8.4% ~ 36.0%, 再发髌部骨折的风险增加 5 倍; 而椎体骨折后再发椎体骨折的风险增至 5 倍, 其他部位骨折风险增至 2 ~ 3 倍^[3]。研究发现, 中医药可有效治疗 GIOP, 可缓解疼痛, 改善功能, 提高生活质量, 且不良反应少^[4-6]。我们前期研究证实, 龟甲可增加 GIOP 大鼠腰椎骨密度和骨生物力学, 改善骨微细结构^[7]。由于 GC 骨损害作用存在部位差异, 不同部位骨可能对药物治疗的作用强弱存在差异^[8]。因此, 本

研究对比了补肾中药龟甲干预 GIOP 大鼠不同时间对中轴骨 (腰椎)、外周骨 (胫骨) 骨密度及骨强度的作用差异, 为中医临床辨“部位”选药或更好地配合其他药物使用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级 3 月龄 SD 雌性大鼠 48 只, 体重 (230 ± 20) g, 实验动物许可证号: 44005800004140, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 饲养于广州中医药大学第一附属医院 SPF 级实验动物中心。

1.2 药物

龟甲 1500 g, 由广州中医药大学第一附属医院提供 (批号 170601), 研磨成粉, 置于 Soxhlet 提取器, 用乙酸乙酯溶剂和水逐步萃取后获得龟甲有效成分, 装于无菌瓶置于 4℃ 冰箱保存备用。

1.3 主要试剂和仪器

阿仑膦酸钠 (国药准字 J20130085, 规格: 70 mg/片), 杭州默沙东公司; 4% 多聚甲醛 (货号 158127), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 3% 戊巴比妥

基金项目: 国家自然科学基金 (81774338, 81503591); 广东省自然科学基金 (2016A030313645, 2014A030310082); 广东省省级科技计划 (2014A020221021); 广州中医药大学第一临床医学院优秀博士学位论文培育项目 (YB201602)

* 通讯作者: spinedrjxb@sina.com, (020) 36591604

钠溶液 (货号 F20150922), 中国医药 (集团) 上海化学试剂公司; 乙酸乙酯溶剂 (批号 20170518), 广州化学试剂厂。Soxhlet 提取器, 德国 ISOLAB 公司; Discovery QDR 系列双能 X 线骨密度仪, 美国 Hologic 公司; Electropuls E1000 万能材料试验机, 美国 Instron 公司。小动物梯级标准分析软件 Discovery A 13.3.0.1 : 3, 美国 Hologic 公司。

1.4 动物分组、造模及给药

48 只大鼠根据体重排序分 12 个区间, 采用 Excel 2010 产生 48 个随机数逐个对应体重, 对应各个区间的随机数按大小顺序分别标序 (1、2、3、4), 所有相同标序号的为一组, 分为空白组、模型组、西药组及龟甲组, 每组 12 只。模型组、西药组及龟甲组参照文献 [6] 的方法建立 GIOP 模型, 皮下注射地塞米松 0.6 mg/kg, 空白组皮下注射等体积 0.9% 氯化钠溶液, 均每 3 天 1 次, 连续 3 个月。造模后, 西药组用阿仑膦酸钠 63 mg/kg 灌胃, 每 7 天 1 次; 龟甲组用龟甲 30 mg/(kg·d) 灌胃 2 ml, 每天 1 次; 空白组和模型组用 0.9% 氯化钠溶液 2 ml 灌胃, 每天 1 次。各组均给药 3 个月。

1.5 观察指标及方法

标本采集时间点为给药前、给药 2 个月、给药 3 个月, 每组取 4 只大鼠, 用 3% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔麻醉, 腹主动脉放血处死, 采取骨标本, 分离出腰椎 (L1-L3) 和右胫骨, 剔除软组织, 用 4% 多聚甲醛保存于 4℃ 冰箱, 备用。

1.5.1 骨密度 分别将大鼠离体 L1-L3 和胫骨平铺于双能 X 线骨密度仪平台上, 对每组大鼠腰椎 L1-L3 和胫骨逐个扫描, 设定 L1-L3 和全胫骨为感兴趣区域, 应用小动物梯级标准分析软件进

行逐个分析测算, 获取 L1-L3 和胫骨的骨密度值。计算给药 3 个月时西药组与龟甲组的骨密度改善率, 骨密度改善率 (%) = (干预组平均骨密度 - 模型组平均骨密度) / 模型组平均骨密度 × 100% [7]。

1.5.2 骨强度 骨密度检测后游离 L1 椎体, 去除附件及上下终板 (确保椎体上下两面平行, 高约 5 mm), 置于万能材料试验机上, 以 1 mm/min 速度进行压缩实验检测骨强度。取胫骨置于万能材料试验机支座上, 跨距为 25 mm, 加载速度为 1 mm/min, 获取最大载荷值, 即骨强度。计算给药 3 个月时西药组与龟甲组骨强度改善率, 骨强度改善率 (%) = (干预组平均骨强度 - 模型组平均骨强度) / 模型组平均骨强度 × 100% [8]。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析, 实验数据均为计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间比较应用单因素方差分析, 组间两两比较应用 LSD 分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

空白组给药 2 个月前, 西药组给药 2 个月前、龟甲组给药 3 个月前各有 1 只大鼠因灌胃死亡, 西药组给药 3 个月前有 1 只大鼠前肢出现肿物, 未纳入统计。

2.1 各组大鼠不同时间腰椎、胫骨骨密度及骨强度比较

表 1 示, 与本组给药前比较, 模型组给药 2 个月腰椎、胫骨骨密度及给药 3 个月胫骨骨密度均升高, 西药组给药 2、3 个月腰椎、胫骨骨密度和骨强度均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 龟甲组给药 2、3 个月腰椎、胫骨骨密度, 胫骨骨强度均升高,

表 1 各组大鼠不同时间腰椎、胫骨骨密度及骨强度比较

组别	时间	鼠数	骨密度 (g/cm^2)		骨强度 (N)	
			腰椎	胫骨	腰椎	胫骨
空白组	给药前	4	0.270 ± 0.008	0.280 ± 0.007	195.46 ± 24.28	79.43 ± 8.78
	给药 2 个月	3	0.306 ± 0.012 **	0.292 ± 0.007	204.19 ± 8.03	81.55 ± 6.95
	给药 3 个月	4	0.280 ± 0.007 Δ	0.300 ± 0.012 *	198.31 ± 10.18	77.81 ± 5.38
模型组	给药前	4	0.238 ± 0.004 $\Delta\Delta$	0.252 ± 0.010 $\Delta\Delta$	128.31 ± 19.84 $\Delta\Delta$	53.57 ± 8.47 $\Delta\Delta$
	给药 2 个月	4	0.268 ± 0.002 ** $\Delta\Delta$	0.261 ± 0.006 ** $\Delta\Delta$	128.33 ± 15.18 $\Delta\Delta$	55.58 ± 7.03 Δ
	给药 3 个月	4	0.252 ± 0.010 $\Delta\Delta$	0.269 ± 0.006 ** $\Delta\Delta$	118.29 ± 18.21 $\Delta\Delta$	53.68 ± 8.32 $\Delta\Delta$
西药组	给药前	4	0.239 ± 0.007 $\Delta\Delta$	0.251 ± 0.010 $\Delta\Delta$	136.91 ± 8.39 $\Delta\Delta$	53.31 ± 4.14 $\Delta\Delta$
	给药 2 个月	3	0.305 ± 0.006 * $\Delta\Delta$	0.294 ± 0.005 * $\Delta\Delta$	197.88 ± 4.65 * $\Delta\Delta$	81.09 ± 11.52 * $\Delta\Delta$
	给药 3 个月	3	0.294 ± 0.012 * $\Delta\Delta$	0.302 ± 0.004 * $\Delta\Delta$	205.67 ± 19.11 * $\Delta\Delta$	74.49 ± 5.67 * $\Delta\Delta$
龟甲组	给药前	4	0.237 ± 0.012 $\Delta\Delta$	0.249 ± 0.009 $\Delta\Delta$	135.57 ± 12.04 $\Delta\Delta$	52.49 ± 5.46 $\Delta\Delta$
	给药 2 个月	4	0.286 ± 0.009 * Δ	0.278 ± 0.013 *	160.81 ± 13.87 $\Delta\Delta$ Δ	69.77 ± 6.51 *
	给药 3 个月	3	0.272 ± 0.006 * $\Delta\Delta$	0.291 ± 0.012 * Δ	181.56 ± 7.99 * $\Delta\Delta$	70.09 ± 4.46 * Δ

注: 与本组给药前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与本组给药 2 个月比较, $\Delta P < 0.05$; 与空白组同时间比较, $\Delta\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组同时间比较, $\#P < 0.05$, $\#\#\Delta P < 0.01$; 与西药组同时间比较, $\&P < 0.05$, $\&\&P < 0.01$

给药 3 个月腰椎骨强度亦升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与本组给药 2 个月比较, 给药 3 个月模型组腰椎骨密度下降 ($P < 0.05$)。给药前模型组、西药组和龟甲组腰椎、胫骨骨密度、骨强度均低于空白组 ($P < 0.01$), 西药组、龟甲组腰椎、胫骨骨密度、骨强度与模型组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。给药 2 个月时, 模型组腰椎、胫骨骨密度、骨强度低于空白组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 西药组腰椎骨密度、骨强度及胫骨骨密度、骨强度均高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 龟甲组腰椎骨强度高于模型组、低于西药组 ($P < 0.05$), 腰椎骨密度及胫骨骨密度、骨强度与模型组、西药组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。给药 3 个月时, 模型组腰椎、胫骨骨密度、骨强度均低于空白组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 西药组、龟甲组腰椎骨密度、骨强度及胫骨骨密度、骨强度均高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 龟甲组腰椎骨密度低于西药组 ($P < 0.05$), 而腰椎骨强度及胫骨骨密度、骨强度与西药组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 西药组和龟甲组骨密度及骨强度改善率比较

表 2 示, 龟甲组腰椎与胫骨骨密度改善率相近, 腰椎骨强度改善率大于胫骨, 说明龟甲可能对 GIOP 中轴骨 (腰椎) 的骨质疏松治疗效果好于外周骨 (胫骨)。西药组对腰椎、胫骨的骨密度、骨强度改善率均高于龟板组。

表 2 给药 3 个月西药组和龟甲组大鼠腰椎、胫骨骨密度及骨强度改善率比较 (%)

组别	鼠数	腰椎		胫骨	
		骨密度改善率	骨强度改善率	骨密度改善率	骨强度改善率
西药组	3	16.82	63.89	12.27	38.77
龟甲组	3	8.08	44.67	8.30	30.58

3 讨论

骨质疏松症属于中医学“骨痿”范畴。《素问·痿论》载“肾主身之骨髓, ……骨枯而髓减, 发为骨痿”, 指出肾虚是骨痿的主要病机。现代中医学认为, 糖皮质激素为阳刚燥热之品, 久用易致体内阴液耗损, 无以滋阳, 阳虚阴亏, 进而影响生骨化髓, 发为 GIOP^[1]。本研究选取了补肾中药龟甲治疗 GIOP, 结果显示龟甲可有效提升大鼠中轴骨 (腰椎) 和外周骨 (胫骨) 的骨密度和骨强度, 与既往研究^[1]结果一致。

骨密度决定了 70% 的骨强度, 是目前临床诊

断骨质疏松的金标准, 也是预测骨折风险的关键指标之一^[2]。本研究中连续皮下注射地塞米松 3 个月可明显降低腰椎和胫骨的骨密度及骨强度, 龟甲干预 2 个月即可显著增加腰椎骨强度, 至给药 3 个月时, 腰椎骨密度及骨强度均获得明显提升; 另外, 给药 3 个月时胫骨骨密度和骨强度均明显高于模型组。阿仑膦酸钠为治疗 GIOP 的标准药物^[3], 给药 2 个月即可有效增加 GIOP 大鼠腰椎、胫骨的骨密度和骨强度, 但与龟甲组比较除腰椎骨强度外差异均无统计学意义, 提示龟甲在增加腰椎骨密度及胫骨骨密度、骨强度方面的作用与它接近; 给药 3 个月阿仑膦酸钠同样可显著增加腰椎和胫骨的骨密度、骨强度, 此时龟甲组只有腰椎骨密度明显低于该组, 提示龟甲在增加腰椎骨强度及胫骨骨密度、骨强度方面的作用与它接近。通过对比给药 3 个月时腰椎和胫骨骨密度及骨强度改善率, 发现龟甲能更好地改善腰椎骨质疏松, 且对腰椎骨强度改善作用大于胫骨骨强度, 对二者骨密度改善作用相当。龟甲对 GIOP 大鼠腰椎骨质疏松的改善早于胫骨, 表明 GIOP 腰椎对龟甲敏感性优于胫骨, 亦即龟甲对腰椎骨和胫骨存在作用倾向性, 这种“归部位”特性与中药的“归经”类同。

综上所述, 龟甲对 GIOP 大鼠腰椎、胫骨骨密度和骨强度均有改善作用, 能改善腰椎骨质疏松, 且对腰椎骨强度改善作用优于胫骨骨强度, 对二者骨密度改善作用相当。

参考文献

- [1] KENANIDIS E, POTOUPNIS ME, KAKOULIDIS P, et al. Management of glucocorticoid-induced osteoporosis: clinical data in relation to disease demographics, bone mineral density and fracture risk [J]. Expert Opin Drug Saf, 2015, 14(7): 1035-1053.
- [2] CANALIS E, MAZZIOTTI G, GIUSTINA A, et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy [J]. Osteoporos Int, 2007, 18(10): 1319-1328.
- [3] 中华医学会骨科学分会骨质疏松学组. 骨质疏松性骨折患者抗骨质疏松治疗与管理专家共识 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2015, 8(3): 189-195.
- [4] 杨燕, 年宏蕾, 刘仁慧, 等. 淫羊藿-女贞子配伍对糖皮质激素性骨质疏松大鼠 TGF- β_1 /Smads 通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(9): 99-104.
- [5] 孙平, 王金枝, 刘丰, 等. 中药复方护骨胶囊治疗糖皮质激素性骨质疏松症 [J]. 实用医学杂志, 2016, 32(24): 4122-4124.
- [6] 徐进, 丁任, 石晓兵, 等. 中药复骨方对糖皮质激素致骨质疏松骨折大鼠骨代谢及骨密度的影响 [J]. 中国老年

- 学杂志, 2016, 36(1): 21-23.
- [7] 任辉, 张志达, 梁德, 等. 龟板改善激素性骨质疏松大鼠骨量、骨微细结构、骨生物力学和骨代谢的机制探讨[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1858-1862.
- [8] DEVOGELAER JP, ADLER RA, RECKNOR C, et al. Baseline glucocorticoid dose and bone mineral density response with teriparatide or alendronate therapy in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. J Rheumatol, 2010, 37(1): 141-148.
- [9] REN H, LIANG D, JIANG X, et al. Variance of spinal osteoporosis induced by dexamethasone and methylprednisolone and its associated mechanism [J]. Steroids, 2015, 102: 65-75. doi: 10.1016/j.steroids.2015.07.006.
- [10] 鲁欢, 涂海涛, 罗月中. 补肾健骨法预防肾病综合征患者激素性骨质疏松症的作用研究[J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(1): 5-8.
- [11] LIANG D, REN H, QIU T, et al. Extracts from plastrum testudinis reverse glucocorticoid-induced spinal osteoporosis of rats via targeting osteoblastic and osteoclastic markers [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 82: 151-160. doi: 10.1016/j.biopha.2016.04.068.
- [12] 中国老年学学会骨质疏松委员会, “手册”编写专家组. 中国人群骨质疏松诊疗手册(2007 年版) [J]. 中国骨质疏松杂志, 2007(S1): 1-67.
- [13] SAAG KG, SHANE E, BOONEN S, et al. Teriparatide or alendronate in glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. N Engl J Med, 2007, 357(20): 2028-2039.

Effect of Tortoiseshell on Bone Mineral Density and Bone Strength of Lumbar Vertebrae and Tibia in Glucocorticoid-induced Osteoporosis Rats

ZHANG Zhida¹, REN Hui², SHEN Gengyang¹, LIANG De², YANG Zhidong², HUANG Jinjing¹, ZHAO Wenhua¹, YU Peiyuan¹, SHANG Qi¹, JIANG Xiaobing²

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510405; 2. First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the effect of tortoiseshell on the bone mineral density (BMD) and bone strength of lumbar vertebrae and tibia in glucocorticoid-induced osteoporosis rats. **Methods** Forty-eight SD rats were randomized into blank group, model group, western medicine group and tortoiseshell group, 12 rats in each group. Dexamethasone was injected subcutaneously to make the osteoporosis model in the model group, western medicine group, and tortoiseshell group. After modeling, the western medicine group was treated with alendronate sodium 63 mg/kg orally once every 7 days; the tortoiseshell group was treated with tortoiseshell 30 mg/(kg · d) by gavage once a day; the blank group and the model group were treated with 0.9% chlorine sodium solution 2 ml by gavage once a day. All groups were administered for 3 months. The BMD and bone strength of lumbar vertebrae and tibias were measured before treatment, 2 months and 3 months after administration. The BMD and bone strength improvement rate of western medicine group and tortoiseshell group were calculated 3 months after administration. **Results** In the tortoiseshell group, the BMD of lumbar vertebrae and tibia increased 2 and 3 months after administration, so did the strength of tibia; the intensity of lumbar vertebrae also increased 3 months after administration ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Three months after administration, the BMD and bone strength of lumbar vertebrae and tibia in the western medicine group and the tortoiseshell group were all higher than those in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The BMD of lumbar vertebrae was lower in the tortoiseshell group than in the western medicine group ($P < 0.05$), but there was no significant difference in the lumbar vertebrae bone strength and tibia BMD and bone strength ($P > 0.05$). After 3 months of administration, in the tortoiseshell group, the BMD improvement rate of lumbar vertebrae was 8.08%, of tibia 8.30%, the strength improvement rate of the lumbar vertebrae was 44.67%, of tibia 30.58%. **Conclusion** The tortoiseshell could improve the BMD and bone strength of lumbar vertebrae and tibia in glucocorticoid-induced osteoporosis rats, and has a better effect on the improvement of bone strength of lumbar vertebrae than of tibia, and has an equal effect on the improvement of BMD.

Keywords glucocorticoid osteoporosis; tortoiseshell; bone mineral density; bone strength

(收稿日期: 2017-09-04; 修回日期: 2018-01-12)

编辑: 王利芬