

[药 理]

黄芪散对糖皮质激素性骨质疏松大鼠股骨和胫骨的影响

王芳¹, 陈珺², 曾煦欣³, 张家豪¹, 梁丹丹¹, 李卫民^{4*}

(1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广东 广州 510006; 3. 佛山科学技术学院口腔医学院, 广东 佛山 528000; 4. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 探讨黄芪散(葛根、黄芪、桑白皮)对糖皮质激素骨质疏松大鼠股骨和胫骨的影响。方法 采用1月龄Sprague Dawley (SD)大鼠30只,随机均分3组:正常组(生理盐水)、模型组(醋酸泼尼松)、黄芪散组(剂量选择临床成人剂量)。实验维持120 d。动物处死前进行钙黄绿素双荧光标记。测定血清骨吸收和骨形成指标,采用骨生物力学方法测量股骨结构力学和材料力学参数,采用骨组织形态计量学方法测量胫骨上段松质骨和中段皮质骨的静态、动态参数。结果 黄芪散组不能明显改善糖皮质激素对血液和骨生物力学造成的影响,但可明显增加糖皮质激素模型大鼠胫骨上段的骨小梁面积和骨小梁数目、胫骨上段荧光标记周长百分数、胫骨中段骨内膜骨矿化沉积率。结论 黄芪散可明显提高糖皮质激素性骨质疏松大鼠胫骨松质骨骨量,增强骨小梁结构。

关键词: 糖皮质激素性骨质疏松; 黄芪散; 骨生物力学; 骨组织形态计量学; 股骨; 胫骨

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)06-1109-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.06.001

Effects of Huangqi Powder on femur and tibia in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis

WANG Fang¹, CHEN Jun², ZENG Xu-xin³, ZHANG Jia-hao¹, LIANG Dan-dan¹, LI Wei-min^{4*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. School of Life Science and Biopharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3. School of Stomatology, Foshan University, Foshan 528000, China; 4. School of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the influence of Huangqi Powder (*Puerariae lobatae Radix*, *Astragali Radix*, *Mori Cortex*) on femur and tibia in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis (GIOP). **METHODS** Thirty one-month-old male SD rats were divided into three groups by randomized block design, which were control group (normal saline), prednisone group (3.5 mg/kg prednisone acetate), Huangqi Powder group (clinical adult dosage). Experimental test was maintained for one hundred and twenty days. Double fluorochrome labeling with calcein was performed before necropsy; bone resorption and bone formation index were determined by using blood serum; the femur structural and material mechanics were analyzed by using bone biomechanics method. The cancellous bone of proximal tibial and the cortical bone of tibial shaft static parameter and dynamic parameter were analyzed by bone histomorphometry method. **RESULTS** Huangqi Powder had no obvious improving effects on bone biomechanics and bone static parameter, but could increase the area, width and number of the proximal tibia bone trabecular. Mark perimeter percentage and mineralization rate of deposition could be increased. **CONCLUSION**

Huangqi Powder can significantly increase proximal tibia cancellous bone mass and enhance bone trabecula structure of glucocorticoid-induced osteoporosis rats.

收稿日期: 2016-11-17

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(81473439); 2017年广东省普通高校青年创新人才项目(2017)

作者简介: 王芳(1982—),女,博士,讲师,从事中药新药开发与研究。Tel:(020)39352169, E-mail:fangzisunmy@126.com

*通信作者: 李卫民(1954—),男,博士,教授,从事中药新药开发与研究。Tel:(020)39358290, E-mail:liweimin@gzucm.edu.cn

KEY WORDS: glucocorticoid-induced osteoporosis; Huangqi Powder (HQP); bone biomechanics; bone histomorphometry; femur; tibia

糖皮质激素骨质疏松 (glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 是最常见的继发性骨质疏松症, 是一种以骨形成能力降低为主要特征的继发性骨质疏松症。应用外源性糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 后一年其发病率为 0.6% ~ 6%, 且易引起病理性骨折, 致残率极高^[1]。糖皮质激素作为胰岛素的反调激素, 其水平及活性的升高与 2 型糖尿病的发生发展密切相关。中医理论认为外源性 GC 属于大热物质, 可耗阴伤津, 致阴虚, 所以常用于阴虚证动物模型的建立。内源性和外源性的 GC 活性的升高, 都会导致阴虚, 进而发展为消渴症^[2]。

黄芪散来自《圣济总录》, 是医治消渴病的经典方。全方由葛根、黄芪、桑白皮 3 味药按质量比 2:1:1 的比例组成。课题组前期研究证实其对糖尿病骨质疏松有明显影响。本次实验采用 GC 诱导骨质疏松的模型来观察黄芪散对模型动物骨骼的影响, 以期为进一步探讨黄芪散对体内糖脂代谢与骨骼代谢的协同调节作用奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 SPF 级健康 SD 大鼠, 雄性, 体重 200 ~ 220 g, 由广东省医学实验动物中心提供, 动物生产许可证号 SCXK (粤) 2013-0002。共 30 只。大鼠饲养于 SPF 级动物室, 喂饲全价颗粒饲料。饲养条件: 每 12 h 明暗循环, 温度 21 ~ 23 °C, 湿度为 50% ~ 80%。

1.2 药品与试剂 黄芪、葛根、桑白皮药材均购自广州中医药大学大药房有限公司 (批号 150113); 黄芪散浸膏由广州中医药大学科技园制备, 每 1 g 相当于生药 1.71 g, 密度 1.22 (50 °C)。醋酸泼尼松粉末 (大连美仑生物技术有限公司, 批号 D0719A, 规格 1 mL: 2 mg); 荧光标记物 Calcein (成都市科龙化工试剂厂, 批号 20131025); 甲基丙烯酸甲酯 (成都市科龙化工试剂厂, 批号 2014082501); 邻苯二甲酸二丁酯 (成都市科龙化工试剂厂, 批号 20130225); 过氧化苯甲酰 (天津市福晨化学试剂厂, 批号 20140419); Orange G (Sigma, USA, 1001508585); Hematoxylin (Sigma, USA, 101379249); Acid Fuchsin (Sigma, USA, 1001400602); Light Green SF Yellowish (Sigma, USA, 1001790137); Ponceaus (Sigma, USA, 101114261); BGP (武汉华美生物工程有限

公司, 批号 M21016574); PINP (武汉华美生物工程有限公司, 批号 M21016575); CTX-1 检测试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司, 批号 M14016577)。

1.3 仪器 硬组织切片机 RM2255 (德国 Leica); 骨组织形态计量学测量系统 (美国 BIOQUANT OSTEO 公司); 生物力学试验机 S1083 (德国 Lloyd Instruments 公司); 电子游标卡尺 0 ~ 150 mm (上海恒量量具有限公司); YM-III 型石膏打磨机 (上海雷磁仪器厂新泾分厂)。

2 动物分组和实验处理

2.1 糖皮质激素骨质疏松动物模型的建立及给药

取 1 月龄 SD 大鼠 30 只, 适应 1 周后, 随机均分为 3 组: 正常组 (基础饲料)、GC 模型组、黄芪散组。除正常组外, 其余各组开始灌胃醋酸泼尼松 3.5 mg/kg^[3], 1 d 1 次, 同时 1 h 后开始灌胃给药 (动物给药分组, 高、中、低剂量前期基础已考察, 见文献 [4], 故选择最佳的原方配比组, 黄芪散给药剂量为 10 mL/kg, 精密称取 2.96 g 混悬于 10 mL 质量浓度为 5 g/L 的阿拉伯树胶中; 以成人临床剂量折算), 连续 120 d。

2.2 动物处死操作 所有动物处死前第 14、13 天和第 4、3 天分别皮下注射钙黄绿素 5 mg/kg, 进行双荧光标记。实验结束前一天禁食。次日给予大鼠质量浓度为 20 g/L 的戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉。进行腹主动脉放血处死, 所获血标本静置 2 h 后 3 000 r/min 离心 30 min 得到血清, 分装并置于 -20 °C 冰箱备用。分离左侧胫骨上段松质骨 (proximal tibia metaphyses, PTM) 及中段皮质骨 (tibial cortex, TX), 备做不脱钙骨切片, 待行骨形态计量学分析。分离左侧股骨, 剔除附着之肌肉、筋膜 (保留骨膜), 生理盐水冲洗, 以生理盐水浸润的医用纱布包裹, 锡纸包于其外, 做好组别标记, -20 °C 冰箱冻存, 待行骨生物力学分析。

2.3 血清生化指标检测 选取骨形成血液指标骨钙素 (bone gamma-carboxy-glutamic acid containing proteins, BGP)、I 型原胶原 N-端肽 (procollagen type I N-terminal propeptide, PINP) 与骨吸收血液指标 I 型胶原交联 C-末端肽 (C-terminal telopeptides of type I collagen, CTX-1) 进行检测, 按试剂盒方法进行。

2.4 骨生物力学的测定 行股骨三点弯曲实验：取冻于-20℃的左侧股骨样品，实验时以37℃生理盐水解冻，在生物力学试验仪上进行操作。参照文献[4]，测定结构力学和材料力学指标。

2.5 骨组织形态计量学的测定 胫骨上段松质骨用低速锯沿胫骨上段冠状面切下暴露骨髓腔，进行固定、脱水、包埋，按文献[3]制成5μm和8μm切片，5μm切片采用Masson-Goldner Trichrome染色法，染色后，骨质为绿色，骨髓为红色，行静态参数测定；8μm厚片不染色，直接封片，行动态参数测定。胫骨中段皮质骨，同法用低速锯沿水平面暴露骨髓腔，留取胫腓结合部位。进行固定、脱水、包埋，按文献[3]制成45μm左右的骨片，不染色，直接封片测量动静态参数。

2.6 统计学处理 所有数据用SPSS 13.0软件进行统计学分析，结果用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，运用多个样本均数间的多重比较，LSD-t法与S-N-K-t检验2组间的变量差异， $P < 0.05$ 认为有显著差异， $P < 0.01$ 认为有极显著差异。

3 结果

3.1 对糖皮质激素造模各组血液相关指标测定 结果见表1，其中BGP、PINP为骨形成指标，CTX-1为骨吸收指标。较正常组，GC模型组大鼠BGP、CTX-1指标都呈下降趋势，但以BGP下降更明显，下降幅度达25%，有统计学差异($P < 0.01$)，CTX-1值下降但不显著。较GC模型组，黄芪散组BGP、PINP指标下降，其中BGP显著下

降($P < 0.01$)，CTX-1指标上升，但无统计学差异($P > 0.05$)。结果说明药物在血液指标上不能改善糖皮质激素造成的影响。

表1 黄芪散对糖皮质激素骨质疏松大鼠骨相关血液指标的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab.1 Effects of HQP on glucocorticoid-induced osteoporosis blood index related to bone ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	BGP/ (pg·mL ⁻¹)	PINP/ (pg·mL ⁻¹)	CTX-1/ (pg·mL ⁻¹)
正常组	2 472.28 ± 128.47	97.07 ± 3.71	54.07 ± 19.23
GC模型组	1 871.30 ± 338.90**	97.29 ± 2.20	40.03 ± 5.12
黄芪散组	1 482.43 ± 529.86*** Δ	95.13 ± 3.33	53.59 ± 16.60

注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与GC模型组比较， $\Delta P < 0.01$

3.2 对模型大鼠股骨骨生物力学的影响 结果见表2。前3个参数(最大载荷、骨结构硬度、骨结构韧性)反映骨结构的硬度及韧性，后3个参数(最大能量吸收、弹性模量、刚度系数)反映骨材料所给予骨的硬度及韧性。骨全长是反映造模对于骨成长的影响。较正常组，造模组及给药组的差异都未有统计学意义($P > 0.05$)，造模组在最大载荷、骨结构硬度、弹性模量、刚度系数上略有上升，在骨结构韧性、最大能量吸收、骨全长上略有降低，差异不大，无法看出模型在骨生物力学上的影响趋势。较模型组，给药组除弹性模量外所有参数都有降低趋势，提示黄芪散在骨生物力学上可能没有起到改善作用。

表2 黄芪散对糖皮质激素造模大鼠各组骨生物力学的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab.2 Effects of HQP on bone biochemistry of glucocorticoid molding rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	最大载荷/N	骨结构硬度/ GPa	骨结构韧性/ (N·mm)	最大能量吸收/ (N·mm)	弹性模量/ GPa	刚度系数/ (N·mm ²)	骨全长/ mm
正常组	159.68 ± 6.65	218.23 ± 11.22	148.86 ± 19.92	5.60 ± 0.83	2 238.73 ± 132.19	36 365.66 ± 1 868.15	43.18 ± 1.12
GC模型组	162.42 ± 13.92	223.30 ± 16.77	126.26 ± 25.85	4.96 ± 0.87	2 437.78 ± 197.75	37 216.72 ± 2 795.68	42.37 ± 0.25
黄芪散组	158.22 ± 14.68	219.28 ± 10.24	105.62 ± 33.09	4.20 ± 1.41	2 462.50 ± 536.41	36 047.67 ± 1 706.26	41.58 ± 0.43

3.3 对模型大鼠胫骨骨组织形态计量学的影响

3.3.1 对模型大鼠胫骨上段松质骨静态参数的影响 如表3、图1所示。与正常组相比，GC模型组大鼠胫骨上段的骨小梁数目和面积明显减少，结构断裂、稀疏，出现部分无骨小梁的骨髓区域。从静态参数可见，GC模型组骨小梁面积百分数Tb.Ar% ($P < 0.01$)、骨小梁宽度Tb.Th都显著减少($P < 0.05, P < 0.01$)，骨小梁数目Tb.N减少，骨小梁分离度Tb.Sp显著增加($P < 0.05$)，

Tb.Ar%是反映骨量变化的重要指标，Tb.Th、Tb.N和Tb.Sp等则是反映骨小梁显微镜下结构的综合指标，以上变化显示了GC大鼠胫骨上段松质骨结构发生明显变化，呈现典型骨质疏松状态。与GC模型组比较，黄芪散组胫骨上段的Tb.Ar%、Tb.Th、Tb.N均增加，其中Tb.Ar%与Tb.N均显著增加($P < 0.01$)，其值接近正常组水平。提示黄芪散可预防糖皮质激素大鼠胫骨上段松质骨的骨丢失。

表3 黄芪散对糖皮质激素造模各组大鼠胫骨上段松质骨静态学参数的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.3 Effects of HQP on static histomorphometric parameters of PTM in glucocorticoid osteoporosis rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	Tb. Ar /%	Tb. Th / μm	Tb. N / (个· mm^{-1})	Tb. Sp/ μm
正常组	30.61 \pm 7.52	49.24 \pm 12.30	6.23 \pm 0.24	111.31 \pm 11.36
GC模型组	17.30 \pm 2.90**	33.03 \pm 8.14*	5.41 \pm 1.18*	159.00 \pm 38.36*
黄芪散组	30.00 \pm 8.22 $\Delta\Delta$	41.55 \pm 10.39	7.18 \pm 0.58 $\Delta\Delta$ **	98.18 \pm 16.40 $\Delta\Delta$

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与GC模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

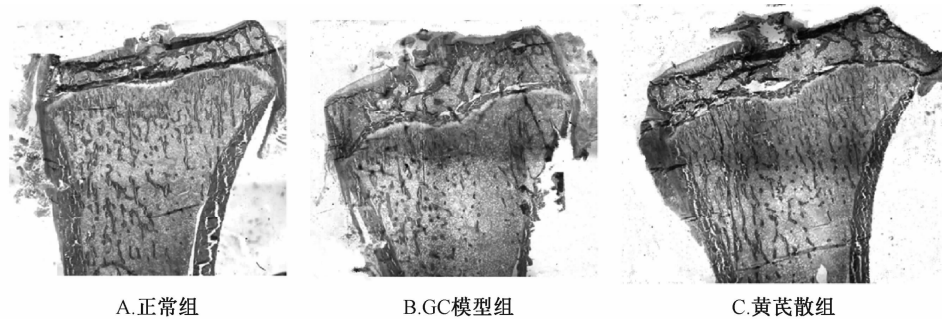


图1 糖皮质激素造模各组大鼠胫骨上段5 μm 切片 Masson-Goldner Trichrome 染色 ($\times 20$)

Fig.1 5 μm section of proximal tibial in glucocorticoid rats with Masson-Goldner Trichrome dyeing ($\times 20$)

3.3.2 对模型大鼠胫骨上段松质骨动态参数的影响 如表4、图2所示。与正常组相比, GC模型组大鼠胫骨上段松质骨荧光标记周长百分数% L. Pm、矿化沉积率 MAR、骨表面新骨形成率 BFR/BS、骨转换率 BFR/BV、新骨年形成率 BFR/TV 均降低, 其中% L. Pm, BFR/BS, BFR/TV 均显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。说明 GC 组大鼠成骨细胞活性降低, 骨形成降低, 与正常组大鼠相

比, GC 组大鼠胫骨上段松质骨代谢过程减弱, 骨形成减少, 出现骨低转换改变, 结果表现骨质丢失。黄芪散组% L. Pm、BFR/BS、BFR/BV、BFR/TV 都较 GC 模型组相应增加, 其中% L. Pm、BFR/TV 都呈显著增加 ($P < 0.05$), 并与正常组值接近。说明黄芪散可促进胫骨新骨形成, 明显阻止胫骨上段的骨量丢失。

表4 糖皮质激素造模各组大鼠胫骨上段松质骨动态学参数测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.4 Effects of HQP on proximal tibial dynamic histomorphometric parameters of glucocorticoid osteoporosis rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	% L. Pm/%	MAR/ ($\mu\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$)	BFR·BS $^{-1}$ / ($\mu\text{m} \cdot \text{d}^{-1} \cdot 100$)	BFR·BV $^{-1}$ / (%·year $^{-1}$)	BFR·TV $^{-1}$ / (%·year $^{-1}$)
正常组	9.009 \pm 2.538	0.202 \pm 0.027	1.833 \pm 0.609	0.028 \pm 0.011	0.0083 \pm 0.0025
GC模型组	5.115 \pm 2.024*	0.178 \pm 0.067	0.918 \pm 0.491*	0.019 \pm 0.008	0.0035 \pm 0.0019**
黄芪散组	8.358 \pm 2.496 Δ	0.162 \pm 0.008**	1.361 \pm 0.438	0.024 \pm 0.007	0.0070 \pm 0.0019 Δ

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与GC模型组比较, $\Delta P < 0.05$

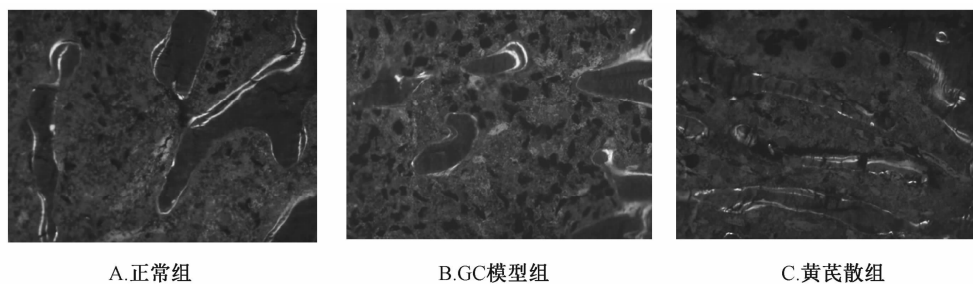


图2 糖皮质激素造模各组大鼠胫骨上段8 μm 切片荧光标记 ($\times 100$)

Fig.2 Fluorescence labeling of 8 μm section of proximal tibial in glucocorticoid rats ($\times 100$)

3.3.3 对模型大鼠胫骨中段皮质骨静态参数的影响 如表5、图3所示。与正常组相比, GC模型

组皮质骨面积 Ct. Ar 减少、皮质骨厚度 Ct. Wi 减少, 骨髓腔面积百分率% Ma. Ar 则增加, 图3中可

见, GC 模型组较正常组骨髓腔面积增大, 皮质骨面积减少。与 GC 模型组相比, 黄芪散组 Ct. Ar、% Ma. Ar 值减少, 皮质骨面积百分率 % Ct. Ar、Ct.

Wi 值增加, 提示黄芪散对 GC 大鼠胫骨中段皮质骨面积不能起到改善作用, 但对皮质骨髓腔面积与皮质骨厚度有改善的趋势。

表 5 黄芪散对各组大鼠胫骨中段皮质骨静态参数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 5 Effects of HQP on tibial shaft static histomorphometric parameters of glucocorticoid osteoporosis rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	Ct. Ar/mm ²	% Ct. Ar/%	% Ma. Ar/%	Ct. Wi/mm
正常组	6 878 477. 78 ± 597 482. 98	84. 35 ± 2. 21	15. 65 ± 2. 21	942. 43 ± 75. 47
GC 模型组	6 388 393. 04 ± 255 554. 22	83. 71 ± 2. 58	16. 29 ± 2. 58	888. 61 ± 21. 74 *
黄芪散组	6 220 546. 31 ± 605 963. 81 *	84. 16 ± 1. 30	15. 84 ± 1. 30	892. 14 ± 51. 58

注: 与正常组比较, *P < 0.05

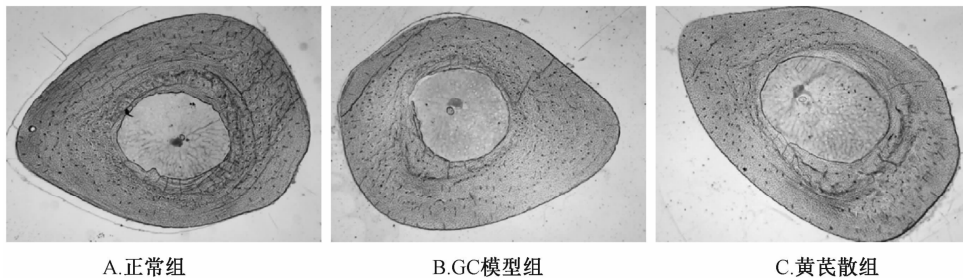


图 3 糖皮质激素造模各组大鼠胫骨中段 45 μm 切片 (×20)

Fig. 3 45 μm section of tibial shaft in glucocorticoid rats (×20)

3.3.4 对模型大鼠胫骨中段皮质骨动态参数的影响 如表 6 所示。与正常组相比, GC 模型组骨外膜荧光标记周长百分数 % P-L. Pm 明显降低 (P < 0.05); 与 GC 模型组相比, 黄芪散组 % P-L. Pm 和骨内膜骨矿化沉积率 E-MAR 明显增加 (P < 0.05, P < 0.01)。各组骨外膜骨矿化沉积率 P-MAR、骨

外膜骨形成率 P-BFR/BS、骨内膜荧光标记周长百分数 % E-L. Pm 和骨内膜骨形成率 E-BFR/BS 均无显著性差异 (P > 0.05)。骨矿化沉积率反应骨矿化的速度, 代表成骨细胞活性。提示黄芪散对皮质骨的作用与促进内膜骨矿化沉积率, 促进成骨细胞活性有关。

表 6 黄芪散对各组大鼠胫骨中段皮质骨动态参数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 6 Effects of HQP on tibial shaft dynamic histomorphometric parameters of glucocorticoid osteoporosis rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	% P-L. Pm /%	P-MAR/(μm·d ⁻¹)	P-BFR·BS ⁻¹ (μm·d ⁻¹ ·100)	% E-L. Pm/%	E-MAR/(μm·d ⁻¹)	E-BFR·BS ⁻¹ / (μm·d ⁻¹ ·100)
正常组	70. 21 ± 7. 43	13. 83 ± 5. 90	0. 086 8 ± 0. 048 9	13. 34 ± 2. 13	0. 304 ± 0. 337	0. 000 91 ± 0. 001 05
GC 模型组	54. 07 ± 21. 21 *	8. 34 ± 5. 49	0. 038 0 ± 0. 035 5	12. 96 ± 6. 46	0. 277 ± 0. 831	0. 000 83 ± 0. 000 25
黄芪散组	57. 22 ± 18. 50 *	11. 04 ± 9. 17	0. 051 6 ± 0. 048 5	9. 21 ± 3. 63	1. 213 ± 0. 631 ^{△△}	0. 003 54 ± 0. 005 25

注: 与正常组比较, *P < 0.05, **P < 0.01; 与 GC 模型组比较, △△P < 0.01

4 讨论

骨钙素为成骨细胞特异合成和分泌的一种非胶原蛋白, 其水平高低可直接反映成骨细胞的活性, 为测量骨形成或骨转换的一项特异而敏感的生化指标^[5]。但血循环中的 BGP 半衰期很短, 迅速被肾脏清除。因此有关骨质疏松症患者血中 BGP 水平各家报道不同^[6]。本研究发现 GC 可致模型组 BGP 水平下降, 可能 GC 本身促进脂肪分解^[7]。黄芪散组 BGP 水平更低, 表明黄芪散未能在血液水平上改善 GC 造成的影响。PINP 是成骨细胞合成并释放出前胶原纤维的细胞外分解产物, 其在血循环中

的含有量主要反映 I 型胶原的合成速率及骨转换情况, 升高提示 I 型胶原合成速率加快, 骨转换活跃。研究表明血清 PINP 水平与骨形成的组织计量学参数和钙动力学研究结果呈显著正相关^[8-9]。本研究中 PINP 值各组之间未构成显著性差异, 黄芪散在 PINP 指标上未有改善。CTX-1 存在于成熟的骨胶原中, 当破骨细胞活性增强时骨胶原溶解释放 I 型胶原蛋白, 其碎片释放进入血液中。CTX-1 是目前国际公认的代表骨吸收的生化指标^[10]。本研究发现, GC 会导致 CTX-1 水平下降, 给药组可恢复其接近正常水平。

骨组织形态计量学是目前应用骨质疏松动物实验和临床研究中的重要科研手段,其测定的动态结果是骨密度仪和 Micro-CT 测定无法比拟的^[11]。本次实验结果在血液指标与骨生物力学参数上都未能体现出造模及药物对其显著的影响。但不代表 GC 没有造成对骨的破坏,要结合骨形态计量学微观结构变化来综合分析,骨组织形态计量学参数的变化较骨质量和功能的变化之前出现。而实验表明在骨组织形态计量学上模型及药物对其影响显著。

目前主要认为糖皮质激素性骨质疏松以骨形成缺陷为主^[12],本实验的骨形态计量学也证实了这一点。给药组骨表面新骨形成率 BFR/BS,新骨年形成率 BFR/TV 都较模型组增加。本次实验模型对松质骨的影响超过对皮质骨的影响,可能因为皮质骨结构致密,与松质骨相比,血管和软组织较少,主要起机械支持和抗张力作用。一般认为,皮质骨的丢失在动物造模短期内不明显^[13]。

本实验采用大鼠造模,就是介于考虑到方便骨组织形态学的观察,小鼠个体差异大,在前人实验中,小鼠胫骨上段松质骨个体差异大,骨小梁面积百分数(% Tb. Ar)可以从 0.08 到 0.25 不等^[14]。所以,采用大鼠进行造模。前人研究^[15]注射用地塞米松(1 mg/kg)的肌肉或静脉注射诱导产生骨质疏松大鼠模型,其骨的面积百分率的减少不明显,但骨形成与骨生物力学性能降低,造模以骨的质量降低为主,不是骨量降低。而口服的泼尼松灌胃给药,不仅可降低骨量(骨小梁的多少与面积),也降低骨质量(骨强度)。故本实验采用口服醋酸泼尼松的方法造模。本次实验中,模型组骨生物力学没有严重受损,只是骨量减少明显。

致谢 本实验在广东药科大学广东省生物技术候选药物研究重点实验室完成,参与人员为王芳、曾煦欣、陈珺、张家豪、梁丹丹、刘洋、高颖。对以上各位表示感谢!还特别感谢此实验室的李青南教授给予的技术指导。

参考文献:

- [1] Frenkel B, White W, Tuckermann J. Glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 872: 179-215.
- [2] 王 登,周 珺,李茂星,等.基于糖皮质激素调节的中药治疗 2 型糖尿病研究进展[J]. *中药材*, 2015, 38(2): 405-409.
- [3] Elshal M F, Almalki A L, Hussein H K, et al. Synergistic antiosteoporotic effect of *Lepidium sativum* and alendronate in glucocorticoid-induced osteoporosis in Wistar rats[J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2013, 10(5): 267-273.
- [4] 陈艳芬,王春怡,李卫民,等.古方黄芪散降糖作用的实验研究[J]. *广东药学院学报*, 2010, 26(1): 73-76.
- [5] Wolf G. Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence[J]. *Nutr Rev*, 1996, 54(10): 332-333.
- [6] Ross P D, Knowlton W. Rapid bone loss is associated with increased levels of biochemical markers[J]. *J Bone Miner Res*, 1998, 13(2): 297-302.
- [7] 徐 冲,徐国恒.糖皮质激素与脂肪代谢和胰岛素抵抗[J]. *生理科学进展*, 2009, 40(1): 19-23.
- [8] 刘 洁,李 伟,董明纲.新一代骨转换标志物研究现状[J]. *中国临床医学*, 2006, 2(1): 102-104.
- [9] Krege J H, Lane N E, Harris J M, et al. PINP as a biological response marker during teriparatide treatment for osteoporosis[J]. *Osteoporos Int*, 2014, 25: 2159-2171.
- [10] 魏雅楠,苗懿德,刘忠厚,等.骨代谢生化标志物的临床进展—不同国家和地区绝经前后女性骨代谢标志物参考值回顾分析[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2007, 13(7): 455-468.
- [11] 陈 珺,张 豪,杨国柱,等.骨形态计量学目前应用专家共识[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(9): 1031-1054.
- [12] Gutierrez-Polo R. Glucocorticoid induced osteoporosis[J]. *An Sist Sanit Navar*, 2003, 26(Suppl 3): 63-80.
- [13] 范慧洁,戴如春,盛志峰,等.去卵巢大鼠不同时期皮质骨与松质骨变化的显微 CT 观察[J]. *中华老年医学杂志*, 2008, 27(1): 57-61.
- [14] 邹丽宜,吴 铁,崔 燎.丹参抑制泼尼松大鼠骨质丢失[J]. *中成药*, 2006, 28(4): 17-21.
- [15] 崔 燎.骨质疏松药理学动物实验与图谱[M].北京:科学出版社,2011: 38-47.