

光谱仪测试其他样本。若 $\geq 3$ 通道异常,建议整机的测试结果舍弃,停机维修。如有2通道异常,可停机半小时后再启动红外光谱仪,再次对每一通道进行空白单次测试, $\leq 1$ 通道异常,继续进行 $^{13}\text{C}$ -UBT;如仅原2通道异常,则将异常的通道封闭停用,其他通道继续使用。

实践证明,对 $^{13}\text{C}$ 红外光谱仪进行每个月1次使用空白样本重复性测试、每季度1次标准品重复性测试和随机空白样本测试作为 $^{13}\text{C}$ -UBT的常规质控方法,可以确保 $^{13}\text{C}$ -UBT结果的准确、可信。

#### 参考文献

- 1 Graham DY, Klein PD, Evans DJ, et al. Campylobacter pylori detected noninvasively by the  $^{13}\text{C}$ -urea breath test[J]. Lancet, 1987, 23(6):1174-1177
- 2 王青霞,安会波.  $^{13}\text{C}$ -尿素呼气试验检测幽门螺杆菌的研究进展[J]. 河北医药, 2009, 31(9):1105-1107

- 3 Carlos R, Filho SA. Síntese e controle de qualidade da ureia enriquecida em  $^{13}\text{C}$  para diagnóstico da Helicobacter pylori (HP) Synthesis and quality control of  $^{13}\text{C}$ -enriched urea for Helicobacter pylori(HP) diagnosis[J]. Química Nova, 2013, 36(1):107-113
- 4 陈静,邵明义,魏明,等. 重复测量设计的方法在慢性疾病疗效评价中的应用探讨[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(3):442-443
- 5 张丽颖,李振华,李保双,等.  $^{13}\text{C}$ -尿素呼气试验定量值与胃黏膜病变程度的相关性[J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21(2):177-181
- 6 张晏,李婉玲.  $^{13}\text{C}$ -呼气试验阳性患者消化道隔离意识调查[J]. 中国老年保健医学杂志, 2014, 12(5):95-96
- 7 邱岩,高炳霞,齐颖,等. 门诊患者 $^{13}\text{C}$ -呼气试验检测幽门螺杆菌的调查分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(24):5960-5962
- 8 杨运波. HP酶联免疫检测法和 $^{13}\text{C}$ -UBT法与临床疗效的关系[J]. 辽东学院学报:自然科学版, 2012, 24(2):119-121

(收稿日期:2015-04-15)

(修回日期:2015-05-19)

## 仙灵骨葆对去卵巢骨质疏松大鼠模型骨微结构的影响

贺 莉 李 刚

**摘 要** **目的** 观察仙灵骨葆对去卵巢骨质疏松大鼠模型骨微结构损伤的改善作用,并探讨其可能机制。**方法** 30只雌性SD大鼠随机分为3组,正常组:卵巢假切+安慰剂,模型组:卵巢切除+安慰剂,治疗组:卵巢切除+仙灵骨葆。治疗组每天仙灵骨葆悬浊液灌胃,正常组和模型组按照相同剂量给予生理盐水灌胃,干预12周。实验结束后采集血清标本和骨骼标本做生化检测和骨微结构形态学分析。**结果** 去卵巢大鼠雌二醇水平显著降低,血钙水平降低,碱性磷酸酶和骨钙素升高( $P<0.05$ ),仙灵骨葆能够改善上述现象;仙灵骨葆能够显著改善OVX大鼠松质骨丢失,显著增加BMD、Tb.Th、Tb.N、Tb.Sp和BV( $P<0.05$ );治疗组皮质骨与正常组相比,Cr.Th、BV和BV/TV显著降低,PO则显著升高( $P<0.05$ ),但较模型组有所改善。**结论** 仙灵骨葆具有延缓去卵巢大鼠发生骨密度下降、骨量减少及骨微结构破坏的作用,其机制可能与调控成骨细胞和破骨细胞活性及功能相关。

**关键词** 骨质疏松症 卵巢切除术 骨微结构 仙灵骨葆

**中图分类号** R3

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.12.045

**Effect of Xianlinggubao on Bone Microstructure of OVX Rats.** He Li, Li Gang. Xi'an Traditional Chinese Medicine Hospital Orthopedic Department, Shaanxi 710001, China

**Abstract Objective** To observe the effect of Xianlinggubao on bone microstructure damage of ovary osteoporosis rat model, and discuss the possible mechanism. **Methods** Thirty female SD rats were randomly divided into 3 groups: normal group (sham plus placebo), model group (OVX plus placebo), treatment group (OVX plus Xianlinggubao). Treatment group was gavaged with Xianlinggubao suspension every day for 12 weeks, in accordance, normal group and model group were given same dose saline. In the end of experiment, serum samples and bone specimen were collected for biochemical detection and bone microstructure morphology analysis. **Results** The blood estradiol and calcium levels of OVX rats were significantly reduced, ALP and osteocalcin significantly increased ( $P<0.05$ ), but xianlinggubao was able to improve the above symptoms. Xianlinggubao could improve the cancellous bone loss of OVX rats, significantly

作者单位:710001 西安市中医医院骨伤科(贺莉);471002 洛阳正骨医院(李刚)

通讯作者:李刚,电子邮箱:773887489@qq.com

increased BMD, Tb. Th, Tb. N, Tb. Sp and BV ( $P < 0.05$ ). Compared with normal group, the cortical bone of treatment group, the index of Cr, Th, BV and BV/TV were significantly reduced, PO was significantly increased ( $P < 0.05$ ), but improved to model group.

**Conclusion** Xianlinggubao could delay the bone mass lose and bone microstructure damage of OVX rats. The mechanism may be related to regulation of osteoblast and osteoclast activity and function.

**Key words** Osteoporosis; OVX; Bone microstructure; Xianlinggubao

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是中老年人群常见疾病,它是一种骨量低下,骨微结构损坏,导致骨脆性增加,易发生骨折为特征的全身性疾病<sup>[1]</sup>。随着人口分布老龄化趋势的不断严重,骨质疏松症在全球范围内已成为一项重大的健康问题。目前尚无有效的方法再生已经丢失骨小梁,因此,对于绝经后妇女人群而言,有效的延缓骨量下降速度,对预防骨质疏松症和骨质疏松性骨折的发生意义重大。

仙灵骨葆胶囊是一种通过中国国家食品药品监督管理局 (CFDA) 标准认证的非处方 (OTC) 传统中药,被用于治疗骨质疏松、骨关节炎、无菌性骨坏死及骨折<sup>[2]</sup>。大量的动物实验证实,仙灵骨葆能够增加去卵巢 (OVX) 大鼠 BMD、骨强度,预防老年大鼠发生股骨骨折和髋关节损伤<sup>[3-5]</sup>。但是目前大部分研究都是在 OVX 大鼠发生骨质疏松症后进行干预,为了观察仙灵骨葆胶囊对绝经后骨量丢失和骨微结构损坏的作用,笔者用仙灵骨葆胶囊对 OVX 手术后 1 周的大鼠进行干预,观察其对绝经后大鼠骨微结构损坏的预防作用。

## 材料与方法

1. 实验动物:SPF 级雌性 11 周龄大鼠 30 只,体重  $240 \pm 20$ g,实验动物由上海西普尔-必凯实验动物公司提供,实验动物许可证号:SCXK(沪)2006-0010;动物使用许可证号:SXK(沪)2006-0010。整个实验中,所有大鼠自由进食和饮水,动物饲养环境温度  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,相对湿度 50%~70%,12h 昼夜循环周期。

2. 药物和仪器:仙灵骨葆胶囊(粉剂,成分为淫羊藿 70%、续断 10%、丹参 5%、补骨脂 5%、地黄 5%、知母 5%)购自贵州同济堂制药有限公司,用时配成悬浊液。安慰剂为生理盐水(上海君瑞生物技术有限公司)。骨钙素放免试剂盒(德国罗氏),SkyScan1176 micro-CT(比利时布鲁克公司),AU2800 全自动生化分析仪(Olympus),酶标分析仪(Bio-Rad 公司)。

3. 方法:(1)骨质疏松动物模型的构建:所有雌性 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为 3 组,每组 10 只:正常组(Sham+生理盐水),或称为卵巢假切组,模型组(OVX+生理盐水)和治疗组(OVX+仙灵骨葆)。正常组,常规手术,但仅切除卵巢周围脂肪组织(卵巢大小),其余两组切除双

侧卵巢。具体手术方式:按照空腹体重 10% 水合氯醛 0.3ml/100g 腹腔注射麻醉,备皮消毒后,从背侧入路实施手术。选择后方髂骨嵴上 2cm,脊柱旁开 1cm 处做纵行切口,长约 1cm,逐层分离皮下组织、肌肉及筋膜进入腹腔,暴露腹腔卵巢予以结扎和切除后,逐层关闭伤口。术后给予抗生素治疗 3 天,用以预防感染。(2)实验干预:术后恢复 1 周开始干预,仙灵骨葆按照 500mg/(kg·d) 剂量作为干预措施。用生理盐水将粉剂配成 50mg/ml 的混悬液,按照 1ml/(100g·d) 的剂量灌胃,模型组和正常组 1ml/(100g·d) 生理盐水灌胃。干预 12 周,每周称量 1 次空腹体重,校正药物和安慰剂用量。(3)指标检测:干预 12 周后,处死所有大鼠,经下腔静脉采血,4℃ 离心分离血清用于检测血钙、磷、碱性磷酸酶、骨钙素及雌激素水平。完整分离右侧整段股骨,剔除肌肉组织,10% 甲醛固定液固定 24h,转 75% 乙醇过夜,用于 micro-CT 检测。重构图像数据后使用 CT Analyser 做骨微结构分析,主要评价指标包括骨密度(BMD)和骨微结构参数[骨小梁和皮质骨体积及体积分数(BV, BV/TV)、厚度(Tb/Cor. Th)、骨小梁间距(Tb. Sp)及皮质骨的孔隙率(PO%)]。

4. 统计学方法:使用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,所有计量数据资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。在满足总体方差齐性、样本独立及正态分布的前提下,按照 one-way ANOVA 的方法对总体均数进行统计分析,按照 SNK 法进行两两间的均数比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 一般情况:造模过程中,正常组 1 只大鼠因为麻药注入下腔静脉而死亡,治疗组 1 只大鼠灌胃过程中由于误吸感染肺炎死亡,其余动物状态良好,卵巢切除大鼠体重增长速度快于正常大鼠,腹内和腹壁脂肪堆积明显。实验结束时,各组动物总数为正常组 9 只,模型组 10 只,治疗组 9 只。

2. 干预后各组大鼠血钙、磷、碱性磷酸酶、骨钙素及雌二醇情况:与正常组相比,模型组血钙、雌二醇水平明显降低( $P < 0.05$ ),反之,碱性磷酸酶和骨钙素水平明显升高( $P < 0.05$ )。仙灵骨葆治疗 3 个月后,与模型组相比,血钙水平显著升高( $P < 0.05$ ),而骨钙素水平显著下降( $P < 0.05$ ),雌二醇水平虽然有升高的趋势,但差异没有统计学意义,3 组血磷水平之间差异无统计学意义。结果详见表 1。

表 1 干预结束后 3 组血清 Ca、P、ALP、OC 和 E<sub>2</sub> 结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | n(只) | Ca(mmol/L)    | P(mmol/L)   | ALP(U/L)       | OC(ng/ml)      | E <sub>2</sub> (mmol/L) |
|-----|------|---------------|-------------|----------------|----------------|-------------------------|
| 正常组 | 9    | 2.56 ± 0.05   | 1.91 ± 0.21 | 38.5 ± 6.1     | 21.02 ± 2.98   | 26.1 ± 8.1              |
| 模型组 | 10   | 2.14 ± 0.04 * | 2.14 ± 0.32 | 92.8 ± 32.7 ** | 34.56 ± 4.68 * | 9.2 ± 2.5 **            |
| 治疗组 | 9    | 2.58 ± 0.07 # | 2.06 ± 0.20 | 95.1 ± 31.2 ** | 22.25 ± 3.12 # | 11.6 ± 2.3 **           |

与正常组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组相比, #  $P < 0.05$

3. 仙灵骨葆对松质骨 BMD 和骨微结构的影响:3 个月后,与正常组相比,模型组大鼠松质骨骨量丢失显著,表现为 BMD、Tb. Th、Tb. N、Tb. Sp 显著降低( $P < 0.01$ ),BV 和 BV/TV 同样显著下降( $P < 0.05$ ),治疗组骨量也有丢失,同样表现为 BMD、Tb. Th、Tb. N、

Tb. Sp、BV 和 BV/TV 显著降低( $P < 0.05$ )。但治疗组上述指标下降没有模型组那么明显,表现为 BMD、Tb. Th、Tb. N、Tb. Sp 和 BV 明显高于模型组( $P < 0.05$ )。结果详见表 2。

表 2 干预结束后各组松质骨 BMD 及骨微结构指标结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | BMD(g/cm <sup>3</sup> ) | BV(mm <sup>3</sup> ) | BV/TV(%)           | Tb. Th(mm)        | Tb. N(1/mm)       | Tb. Sp(mm)       |
|-----|-------------------------|----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| 正常组 | 0.231 ± 0.012           | 5.798 ± 0.105        | 51.117 ± 10.314    | 0.140 ± 0.021     | 3.585 ± 0.017     | 0.178 ± 0.011    |
| 模型组 | 0.128 ± 0.014 **        | 3.431 ± 0.264 *      | 28.521 ± 8.592 *   | 0.110 ± 0.037 **  | 1.478 ± 0.042 **  | 0.594 ± 0.029 ** |
| 治疗组 | 0.173 ± 0.019 * #       | 3.798 ± 0.349 * #    | 35.314 ± 9.780 * # | 0.122 ± 0.041 * # | 2.041 ± 0.063 * # | 0.507 ± 0.013 ** |

与正常组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组相比, #  $P < 0.05$

4. 仙灵骨葆对皮质骨 BMD 和骨微结构的影响:干预措施对皮质骨影响的整体趋势与松质骨相似,但各指标变化程度不及松质骨明显。与正常组相比,模型组大鼠皮质骨骨量丢失显著,表现为 BMD 和 Cr. Th 显著降低,而 PO 则显著升高( $P < 0.05$ ),BV 和

BV/TV 同样显著下降( $P < 0.01$ ),治疗组骨量也有丢失,同样表现为 Cr. Th、BV 和 BV/TV 显著降低,PO 明显升高( $P < 0.05$ )。与模型组相比,虽然各指标差异并无统计学意义,但治疗措施能够使上述指标有不同程度的改善。结果详见表 3。

表 3 干预结束后各组皮质骨 BMD 及骨微结构指标结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | BMD(g/cm <sup>3</sup> ) | BV(mm <sup>3</sup> ) | BV/TV(%)          | Cr. Th(mm)      | PO(%)            |
|-----|-------------------------|----------------------|-------------------|-----------------|------------------|
| 正常组 | 0.869 ± 0.015           | 6.774 ± 0.036        | 66.729 ± 8.764    | 0.550 ± 0.025   | 21.836 ± 3.653   |
| 模型组 | 0.622 ± 0.023 *         | 3.453 ± 0.065 **     | 32.767 ± 7.653 ** | 0.427 ± 0.031 * | 36.748 ± 8.736 * |
| 治疗组 | 0.707 ± 0.008           | 4.941 ± 0.141 *      | 37.448 ± 6.050 *  | 0.492 ± 0.034 * | 31.051 ± 6.780 * |

与正常组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

5. 仙灵骨葆对 OVX 大鼠骨微结构形态的影响:重构后的图片结果显示:A 部分比较 3 组皮质骨的三维结构变化情况,与 SHAM + NS 组相比,OVX + NS 组和 OVX + XLGB 组皮质骨厚度下降,B 部分两个 OVX 组骨小梁数目减少、间隙变大、结构由原来的板状结构向杆状转变。仙灵骨葆治疗后 OVX + XLGB 组较 OVX + NS 组上述状态有所改善。结果详见图 1。

讨 论

随着骨质疏松患病人群的不断增多,对骨质疏松症治疗药物的研究也在不断深入和完善,虽然药物品种在不断增多,但是仍不能满足临床需求。对于西药而言,往往对药物作用机制和主要有效成分研究得较为透彻,而对于传统中药而言,其有效成分和作用机

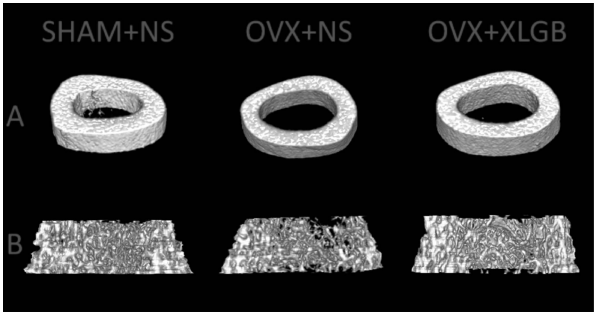


图 1 干预后 3 组大鼠股骨皮质和松质骨三维图  
A. 股骨中段皮质骨三维图;B. 股骨远端松质骨三维图

制还有待于大量的基础和临床研究进行探索和证实。因此,本研究以 OVX 大鼠骨微结构变化作为切入点,探索传统中药仙灵骨葆胶囊对绝经后骨质疏松症的

防治作用。

我国传统医学将骨质疏松症划分到“骨萎”的范畴,认为是由肾虚继而引发骨吸收大于骨生成,最终出现骨质疏松症侯群<sup>[6]</sup>。仙灵骨葆胶囊是中国少数民族苗族“苗医”传统秘方修订后制成的中成药,主要通过肾脏系统发挥营养骨骼的作用<sup>[7]</sup>。仙灵骨葆胶囊主药是黔岭藿,黔岭藿是淫羊藿的一种,淫羊藿主产于贵州、陕西、湖北省等地,属补肾阳、强筋骨、祛风湿药物。其次还包括骨碎补,它具有补肾阳作用的同时还可以接骨。通过这两味中药的共同作用,以达到补肾阳强筋骨的作用。仙灵骨葆胶囊对治疗绝经后骨质疏松症的有效性和安全性在一项国际临床研究中也获得证实<sup>[2]</sup>。国内也有大量研究报道了仙灵骨葆胶囊在预防和治疗骨质疏松症及其他代谢性骨病中的重要作用<sup>[8~10]</sup>。

笔者通过 micro-CT 对仙灵骨葆胶囊干预 3 个月大鼠的股骨进行扫描、重构和分析,该技术对标本没有任何损伤,并能准确测量 BMD、皮质骨和松质骨骨微结构变化和制作三维图形等。模型组大鼠卵巢切除 3 个月后 BMD 显著下降、松质骨和皮质骨微结构损坏明显,证明大鼠骨质疏松模型成功建立。与正常组相比,虽然仙灵骨葆胶囊治疗组也出现 BMD 下降及骨微结构损坏,但其程度没有模型组那么明显,证明仙灵骨葆胶囊能够有效防治卵巢切除大鼠骨量丢失,从三维图可以更加直观的展示仙灵骨葆胶囊对松质骨和皮质骨骨微结构损坏的保护作用。三维图表现为仙灵骨葆能够显著改善 OVX 大鼠松质骨丢失,显著增加 BMD、Tb. Th、Tb. N、Tb. Sp、BV;实验组皮质骨与正常组相比,Cr. Th、BV 和 BV/TV 显著降低,PO 则显著升高,但较模型组有所改善。骨密度升高和骨微结构的完整性是增加骨强度,提高骨骼对外力<sup>[11]</sup>。因此,BMD 升高能够改善骨质疏松症及其相关并发症,如骨质疏松性骨折。

仙灵骨葆胶囊防治骨质疏松的作用机制已有研究报道,有研究指出其主要有效成分淫羊藿有效成分淫羊藿甙可以上调 OPG 的基因表达,从而发挥增加骨合成代谢,使骨量和骨密度上升<sup>[12]</sup>。体外实验同样证实淫羊藿能够增加成骨细胞数量和活性,同时对破骨细胞的骨吸收功能发挥抑制作用<sup>[13,14]</sup>。淫羊藿单体对体外培养的破骨细胞进行干预,结果发现其具有抑制破骨细胞增殖和形成骨陷窝的能力<sup>[15]</sup>。钙是构成骨矿物质的重要成分,同时也是决定 BMD 高低的重要因素,既往研究发现,卵巢切除大鼠经仙灵骨

葆干预 3 个月可以明显提高骨钙含量,但其机制尚不清楚,可能与上述淫羊藿对成骨和破骨细胞的调控作用相关。

综上所述,仙灵骨葆胶囊可能是通过调控成骨细胞和破骨细胞的功能,预防绝经后发生 BMD 下降和骨微结构损坏,从而对骨质疏松症起到防治的作用。本实验也证实仙灵骨葆具有升高去卵巢骨质疏松模型大鼠的骨量,延缓骨微结构损坏进程,从而达到防治骨质疏松症的作用。

## 参考文献

- 1 Lock CA, Lecouturier J, Mason JM, *et al.* Lifestyle interventions to prevent osteoporotic fractures: a systematic review [J]. *Osteoporos Int*, 2006, 17(1): 20-28
- 2 Zhu HM, Qin L, Garnero P, *et al.* The first multicenter and randomized clinical trial of herbal Fufang for treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. *Osteoporos Int*, 2012, 23(4): 1317-1327
- 3 Li Y, Lu SS, Tang GY, *et al.* Effect of Morinda officinalis capsule on osteoporosis in ovariectomized rats [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2014, 12(3): 204-212
- 4 Tao L, Shen XC, Yang RH, *et al.* Effect and mechanism of Jiangu Guben capsules on postmenopausal osteoporosis of ovariectomized rats [J]. *Chin Hosp Pharm J*, 2009, 29(4): 1431-1434
- 5 Qin L, Zhang G, Hung WY, *et al.* Phytoestrogen-rich herb formula "XLGB" prevents OVX-induced deterioration of musculoskeletal tissues at the hip in old rats [J]. *J Bone Miner Metab*, 2005, 23(Suppl): 55-61
- 6 宋献文,石印玉,沈培芝,等. 补肾中药对实验性骨质疏松的疗效观察及其机制探讨 [J]. *中国中医骨伤科*, 1996, 4(3): 5-8
- 7 Gui L, Shen H. Application of Xianlinggubao in bone and arthritis disease [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*, 2007, 26(2): 619-622
- 8 邢磊,焦颖华,耿丽华,等. 仙灵骨葆对去势大鼠骨量和生物力学性能的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(3): 535-537
- 9 李震,张柳,穆树林,等. 仙灵骨葆预防卵巢切除大鼠的腰椎间盘退变 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 8(15): 2722-2726
- 10 王劲松,胡锡琴,嵯君,等. 仙灵骨葆对卵巢大鼠骨密度和骨代谢的影响 [J]. *陕西中医学院学报*, 2010, 5(3): 64-65
- 11 王培霞,王芳,高利红,等. 仙灵骨葆对卵巢切除小鼠骨质疏松症的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2013, 19(5): 441-445, 449
- 12 张秀珍,杨黎娟. 淫羊藿甙对大鼠成骨细胞护骨素, RANKL 表达的影响 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2006, 22(3): 222-225
- 13 高毅. 淫羊藿苷对成骨细胞增殖分化的影响及机制探讨 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013
- 14 李盛林,高华,章魁华,等. 淫羊藿对小鼠成骨细胞增殖、功能及凋亡的影响 [J]. *北京大学学报:医学版*, 2008, 40(1): 43-46
- 15 陈坤,于世风,史凤芹,等. 黔岭藿对体外培养的破骨细胞作用的研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 1996, 2(3): 59-61, 94

(收稿日期:2015-04-10)

(修回日期:2015-05-04)