

龙牡壮骨颗粒对糖皮质激素所致大鼠骨质疏松症作用研究

胡振波¹ 赵刚¹ 刘惟莞² 夏纯¹ 丁虹² 黄志军¹

(1 健民药业集团药物研究院, 武汉, 430052; 2 武汉大学药学院, 武汉, 430071)

摘要 目的:探讨龙牡壮骨颗粒对糖皮质激素所致骨质疏松症大鼠的治疗效果。方法:采用低钙饲料饲养加肌注氢化泼尼松的方法制备大鼠骨质疏松症模型。造模成功后,复方组、中药成分组、化药成分组、模型组大鼠分别灌胃龙牡壮骨颗粒复方、龙牡壮骨颗粒中药成分、龙牡壮骨颗粒化药成分及蒸馏水,正常对照组大鼠给予正常饲料饲养,不予造模。给药35 d后测定相关指标。结果:复方组大鼠体重、胸腺指数、血钙、血磷、股骨干重、骨钙、干骺端皮质外径、骨密度、骨干髓质密度、皮质密度、骨密度等指标明显优于模型组,尿钙含量则显著低于模型组。结论:龙牡壮骨颗粒对糖皮质激素所致骨质疏松症大鼠有良好治疗效果。

关键词 龙牡壮骨颗粒;大鼠;骨质疏松症;糖皮质激素

Study on Effects of Longmu Zhuanggu Granule in Treating Glucocorticoid-resulted Rat Osteoporosis

Hu Zhenbo¹, Zhao Gang¹, Liu Weiwan², Xia Chun¹, Ding Hong², Huang Zhijun¹

(1 Academy of Pharmaceutical Research, Jianmin Pharmaceutical Group Co., LTD, Wuhan 430052, China;

2 School of Pharmacy, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of Longmu Zhuanggu Granule on glucocorticoid-induced osteoporosis rats. **Methods:** Rat osteoporosis models were prepared with low calcium feed and muscle injection with hydride prednisone. Compound group, Chinese medicine group, chemical medicine group, and model group of rats were given Longmu Zhuanggu Granule, its Chinese medicine, its chemical medicine, and distilled water respectively by intragastric administration. Normal control rats were feed with normal fodder. Related indicators were detected after 35 days of administration. **Results:** Indicators of the compound group of rats, such as body weight, thymus index, calcium and phosphorus in blood, femoral weight, bone calcium, femoral epiphysis end diameter of the cortex, bone mineral density, the density of backbone medulla, cortical density, bone mineral density, etc, were significantly superior to the model group. Urinary calcium of the compound group of rats was significantly lower than that of the model group. **Conclusion:** Longmu Zhuanggu Granule possesses a well therapeutic effect on glucocorticoid-induced osteoporosis.

Key Words Longmu Zhuanggu Granule; Rat; Osteoporosis; Glucocorticoid

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.12.052

龙牡壮骨颗粒是健民药业集团股份有限公司独家品种,已上市30余年,主要用于治疗和预防小儿佝偻病、软骨病;对小儿多汗、夜惊、食欲不振、消化不良、发育迟缓等症以及反复呼吸道感染也有治疗作用^[1-2]。前期已有大量研究数据验证了该品种对小儿佝偻病的疗效^[3-4],但对骨质疏松症的治疗作用尚无实验数据,仅有一些临床观察报道^[5-6]。为了考察龙牡壮骨颗粒对骨质疏松症的作用情况,本研究采用低钙饲料饲养加糖皮质激素氢化泼尼松肌注的方式制作大鼠骨质疏松症模型^[7-8],并考察龙牡壮骨颗粒对骨质疏松症大鼠各项指标的影响情况,以期探讨该产品治疗骨质疏松症的

疗效。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 龙牡壮骨颗粒、龙牡壮骨颗粒中药组分、龙牡壮骨颗粒化药组分均由健民药业集团股份有限公司提供(批号:010825)。氢化泼尼松,上海第九制药厂生产(批号:010501)。各项生化指标试剂盒均为上海申能-德赛诊断技术有限公司产品,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器 AEROSSET 型全自动生化分析仪(美国雅培公司);LGS-4-1 型马福炉(上海第三实验电炉厂);TAS9862 型乙炔火焰原子吸收光谱仪(北京普析通用仪器有限公司);HPIAS-2000 型图像分析系

基金项目:武汉市高新技术成果转化及产业化计划(201260513159)——中药儿科系列化新产品的产业化开发

作者简介:胡振波(1971.01—),男,硕士,高级工程师,研究方向:中药药理学研究

通信作者:黄志军(1972.09—),男,博士,副教授,研究方向:药理学研究,Tel:(027)84520229,E-mail:542354589@qq.com

统(千屏影像工程公司);UV-120 型紫外分光光度计(日本岛津)。

1.3 实验动物 SD 雄性成年清洁级大鼠,体重(242±27)g,由湖北省卫生防疫站提供,于实验前饲养 5 d,以适应本实验动物室环境。

1.4 方法 60 只大鼠随机分为五组,每组 12 只,分别为正常对照组、模型组、复方组、中药成分组、化药成分组。其中,正常对照组给予正常饲料(含钙 0.46%)饲养,饮自来水。其他四组均采用低钙饲料(含钙 0.16%)饲养、饮用蒸馏水,并肌注氢化泼尼松 4.5 mg/kg,每周肌注 2 次,制作骨质疏松模型。在造模的基础上,复方组灌胃给予龙牡壮骨颗粒,(2.7 g 生药+3.3 μg 维生素 D₂+10 mg 葡萄糖酸钙+2.5 mg 乳酸钙)/kg,1 次/d;中药成分组给予龙牡壮骨颗粒中药成分(2.7 g 生药/kg),1 次/d;化药成分组给予(3.3 μg 维生素 D₂+10 mg 葡萄糖酸钙+2.5 mg 乳酸钙)/kg,1 次/d;正常对照组和模型组则给予 10 mL/kg 蒸馏水灌胃。给药 35 d 后测定如下指标:

体重:观察实验前和实验结束时体重变化。

胸腺、脾、肾指数:取胸腺、脾脏、肾脏称重,根据公式计算脏器指数:脏器指数=脏器重量/体重(mg/g)。

尿钙:实验结束时,收集每只大鼠 24 h 尿液,用邻甲酚肽络合酮比色法按照试剂盒说明书方法测定尿钙排泄量^[9]。

血清钙、磷:实验结束时,以 3% 戊巴比妥 30 mg/kg 腹腔注射麻醉动物,颈动脉取血,3 000 r/min 分离血清,测定血清钙含量;以磷钼酸法按照试剂盒说明书方法测定血清磷含量^[10];以放射免疫法测定血清骨钙素含量^[11]。

股骨 X 线片采用 HPIAS-2000 型图像分析系统进行分析,得出骨密度相关参数。

1.5 统计学方法 所有数据均采用均数±标准差表示,经方差分析进行统计学处理,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对骨质疏松症大鼠体重的影响 结果如表 1 所示,由于皮质激素的负氮平衡作用可致体重不增或下降,模型组大鼠体重增加明显要低于正常对照组大鼠,但相对于模型组,复方组及中药成分组大鼠体重增长明显(P<0.05),化药成分组与模型组差异则无统计学意义。

表 1 龙牡壮骨颗粒及其中药、化药组分对大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	实验前体重(g)	实验后体重(g)
正常对照组(n=9)	240±30	271±28
模型组(n=8)	243±27	237±13**
复方组(n=9)	240±23	263±28 $\Delta\Delta$
中药成分组(n=8)	245±24	249±18 Δ
化药成分组(n=7)	239±37	239±21

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

2.2 对骨质疏松症大鼠脏器指数的影响 各组动物脏器指数结果见表 2。糖皮质激素可明显降低大鼠脾脏、胸腺和骨指数(与正常对照组比较,P<0.01),对肾脏则无明显改变(P>0.05)。复方组及其中药成分组能逆转糖皮质激素所致大鼠的胸腺萎缩,对脾脏及骨指数有一定的改善作用,但与模型组比较差异无统计学意义,化药成分组与模型组则无统计学意义。

2.3 对骨质疏松症大鼠血清钙、磷及尿钙的影响 结果如表 3 所示。与正常对照组比较,模型组大鼠血钙及血磷含量明显降低,尿钙含量明显升高。复方组及中药成分组、化药成分组均能使糖皮质激素所致骨质疏松症大鼠血清钙、磷含量显著升高,尿钙显著降低,表明可明显减少钙的丢失,有利于新骨的形成。

2.4 对骨质疏松症大鼠股骨的影响 糖皮质激素能使大鼠骨干重及骨钙含量明显下降(见表 4,模型组与正常对照组比较,P<0.01),复方组及中药成分组、化药成分组均能使骨质疏松症大鼠骨干重及骨钙含量显著升高(与模型组比较,P<0.01)。

表 2 龙牡壮骨颗粒及其中药、化药组分对大鼠脾、胸腺、肾及骨指数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	脾指数(mg/g)	胸腺指数(mg/g)	肾指数(mg/g)	骨指数(mg/g)
正常对照组(n=9)	5.04±0.01	0.78±0.10	5.5±0.70	0.27±0.03
模型组(n=8)	4.60±0.70**	0.56±0.09**	5.9±0.50	0.22±0.03**
复方组(n=9)	5.40±1.20	0.80±0.27 $\Delta\Delta$	5.6±1.20	0.25±0.04
中药成分组(n=8)	6.70±0.90	1.00±0.30 $\Delta\Delta$	6.1±1.00	0.24±0.03
化药成分组(n=7)	5.50±1.60	0.61±0.24	6.0±0.40	0.23±0.02

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

表3 龙牡壮骨颗粒及其中药、化药组分对骨质疏松症大鼠血清钙、磷及尿钙含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	血钙(mM)	血磷(mM)	尿钙($\mu\text{mol}/24\text{ h}$)
正常对照组($n=9$)	2.16 $\pm$ 0.10	2.10 $\pm$ 0.30	2.20 $\pm$ 0.60
模型组($n=8$)	1.70 $\pm$ 0.50 **	1.73 $\pm$ 0.17 **	4.30 $\pm$ 0.70 **
复方组($n=9$)	2.25 $\pm$ 0.09 $\Delta\Delta$	2.19 $\pm$ 0.16 $\Delta\Delta$	2.20 $\pm$ 0.80 $\Delta\Delta$
中药成分组($n=8$)	2.18 $\pm$ 0.23 $\Delta\Delta$	2.10 $\pm$ 0.22 $\Delta\Delta$	2.70 $\pm$ 0.70 $\Delta\Delta$
化药成分组($n=7$)	2.00 $\pm$ 0.40 Δ	2.07 $\pm$ 0.12 $\Delta\Delta$	3.30 $\pm$ 0.50 $\Delta\Delta$

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

表4 龙牡壮骨颗粒及其中药、化药组分对骨质疏松症大鼠股骨的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	干重(g)	灰重(g)	骨钙(mg/g)
正常对照组($n=9$)	0.51 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.03	399 $\pm$ 5
模型组($n=8$)	0.38 $\pm$ 0.04 **	0.22 $\pm$ 0.03	379 $\pm$ 5 **
复方组($n=9$)	0.55 $\pm$ 0.04 $\Delta\Delta$	0.25 $\pm$ 0.03	407 $\pm$ 5 $\Delta\Delta$
中药成分组($n=8$)	0.56 $\pm$ 0.06 $\Delta\Delta$	0.24 $\pm$ 0.03	402 $\pm$ 8 $\Delta\Delta$
化药成分组($n=7$)	0.51 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta$	0.23 $\pm$ 0.02	400 $\pm$ 7 $\Delta\Delta$

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

2.5 骨质疏松症大鼠股骨 X 线片图像分析 结果如表 5 所示。无论干骺端还是骨干糖皮质激素均导致骨密度降低,模型组与正常对照组差异均有统计学意义($P < 0.01$)。复方组及中药成分组、化药成分组均可使干骺端的骨密度、皮质外径,骨干平均骨密度、平均皮质密度、平均髓质密度有显著性改善。

3 讨论

龙牡壮骨颗粒由 13 味中药及维生素 D₂、葡萄糖酸钙、乳酸钙等组成,方中黄芪健脾补气、升阳固表止汗,党参、白术(炒)、山药、茯苓、大枣益气健脾、补血益气,鸡内金(炒)消食健脾,龙骨、牡蛎(煅)镇惊安神、敛汗固精,五味子(醋制)敛肺滋肾,生津收汗,龟甲(醋制)滋阴潜阳,益肾强骨,辅以麦冬、甘草,以养胃阴,调和脾胃。全方合用,脾肾双补,共奏健脾益气,补肾益精,填精益髓,培元固本之功,此外,该品还含有维生素 D₂ 及葡萄糖酸钙、乳酸钙等成分,适合于骨质疏松症的治疗^[1]。

研究结果显示,龙牡壮骨颗粒可显著增加糖皮质激素所致骨质疏松症大鼠的体重、胸腺指数、血钙、血磷、股骨干重、骨钙及干骺端的骨密度、皮质外径,骨干骨密度、皮质密度、髓质密度等,并显著降低

尿钙含量,由此,该品可显著增加钙的利用率,促进新骨的形成与骨生长。此外,龙牡壮骨颗粒中药成分组也有类似作用,提示该产品中药成分可独立治疗骨质疏松症。

龙牡壮骨颗粒化药成分组对骨质疏松症大鼠的体重及脾、胸腺、肾及骨等脏器指数均无影响,因此,仅通过灌胃给予维生素 D₂ + 葡萄糖酸钙 + 乳酸钙对于骨质疏松症的治疗效果不明显,尤其是对体重及脏器指数几无疗效,但对于增加血钙、血磷含量,降低尿钙含量,增加股骨干重与骨钙含量以及增加骨密度等方面有一定效果。然而,龙牡壮骨颗粒相对于化药成分组在动物整体机能的改善方面表现出了明显的优势,尤其是体重的增加及免疫力的提升等方面,显示出了更为全面的疗效。

参考文献

[1]郭小娟,王玲,赵刚,等. 龙牡壮骨颗粒强筋壮骨作用综述[J]. 世界中医药,2017,12(7):1551-1553.

[2]郭小娟,王玲,赵刚,等. 龙牡壮骨颗粒健脾和胃作用综述[J]. 世界中医药,2017,12(10):2531-2534.

[3]刘秀兰,向明,李亚洲,等. 龙牡壮骨颗粒治疗大鼠佝偻病药效学及其机制[J]. 中国医院药学杂志,2014,34(22):1893-1897.

[4]张雪荣,陈格格,陈庆梅,等. 龙牡壮骨颗粒治疗维生素 D 缺乏性佝偻病的临床研究[J]. 世界中医药,2016,11(8):1454-1456.

[5]戴亦晖,陈瑶. 龙牡壮骨颗粒治疗原发性骨质疏松症的临床观察[J]. 中国疗养医学,2012,21(2):152-153.

[6]戴亦晖,黄健,郭尧. 龙牡壮骨颗粒治疗原发性骨质疏松症 158 例[J]. 沈阳部队医药,2012,25(5):386-387.

[7]梁德,唐晶晶,江晓兵,等. 泼尼松灌胃与肌内注射对大鼠骨密度、骨生物力学性能及骨代谢的影响[J]. 中国实验动物学报,2014,22(6):85-88.

[8]邹丽宜,吴铁,崔焱,等. 泼尼松致大鼠骨质疏松症的作用机制研究[J]. 中国药理学通报,2007,23(10):1388-1392.

[9]邱翠婷,郑海军,李寰,等. 维生素 K2 抑制钙磷诱导血管平滑肌细胞钙化的作用研究[J]. 中国实用医刊,2016,43(18):16-18.

[10]窦露,朱成宾,高应东. 甘油三酯对血清无机磷浓度测定的干扰分析[J]. 生物医学工程与临床,2016,20(1):93-96.

[11]陈志勇,应晟. 血清骨钙素、胰岛素样生长因子-1 和胰岛素生长因子结合蛋白检测在儿童性早熟早期诊断中的意义[J]. 现代实用医学,2017,29(5):605-607.

(2017-11-10 收稿 责任编辑:徐颖)

表5 龙牡壮骨颗粒及其中药、化药组分对骨质疏松症大鼠股骨密度参数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	股骨远端干骺端			骨干		
	皮质外径(mm)	骨密度(g/cm ²)	皮质厚度指数	髓质密度(g/cm ²)	皮质密度(g/cm ²)	骨密度(g/cm ²)
正常对照组($n=7$)	19.0 $\pm$ 3.0	0.48 $\pm$ 0.07	0.33 $\pm$ 0.05	0.39 $\pm$ 0.03	0.56 $\pm$ 0.04	0.53 $\pm$ 0.09
模型组($n=7$)	15.6 $\pm$ 2.5 **	0.21 $\pm$ 0.02 **	0.29 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.05 **	0.31 $\pm$ 0.05 **	0.26 $\pm$ 0.05 **
复方组($n=7$)	19.0 $\pm$ 4.0 $\Delta\Delta$	0.34 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta$	0.31 $\pm$ 0.03	0.30 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$	0.41 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta$	0.35 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta$
中药成分组($n=7$)	20.0 $\pm$ 5.0 $\Delta\Delta$	0.31 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$	0.31 $\pm$ 0.07	0.26 $\pm$ 0.04 Δ	0.33 $\pm$ 0.03	0.27 $\pm$ 0.03
化药成分组($n=7$)	18.1 $\pm$ 1.5 Δ	0.30 $\pm$ 0.02 $\Delta\Delta$	0.30 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$	0.41 $\pm$ 0.06 $\Delta\Delta$	0.34 $\pm$ 0.06 Δ

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