

淫羊藿黄酮对去势大鼠骨生物力学性能的影响^{*}

陈 鹏¹, 刘文和², 颜林淋¹, 陈家玉^{3**}, 胡伟文¹, 曹锡文¹, 李 杨¹

(1. 湘南学院附属医院 郴州 423000; 2. 暨南大学医学院附属清远医院 清远 511518;

3. 湘南学院 郴州 423000)

摘 要:目的:探讨淫羊藿黄酮对去势大鼠骨生物力学性能的影响。方法:选用2月龄雌性SD大鼠60只,随机分为6组,每组10只。A组:空白对照组,常规方法饲养,进行假手术处理;B组:去势组,不给予淫羊藿黄酮干预;C组:去势+钙剂,每日灌服高效钙($75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)+维生素D₃ $21\text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}$;D组:去势+低剂量,每日灌服淫羊藿黄酮($75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$);E组:去势+中剂量,每日灌服淫羊藿黄酮($150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$);F组:去势+高剂量,每日灌服淫羊藿黄酮($300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。实验第4月末处死大鼠,取出大鼠双侧胫骨、双侧股骨、双侧肱骨和全部腰椎。实验动物干预完毕后测定:①第四腰椎体力学性能指标中弹性模量、最大载荷、最大应力、变形位能、结构刚度;②股骨结构力学性能指标中最大载荷、破坏载荷、变形位能、结构刚度;③股骨材料力学性能指标中弹性模量、最大应力、最大应变、破坏应力、破坏应变。结果:与B组比较,A、D、E、F组第四腰椎体力学性能指标中弹性模量、最大载荷、最大应力、变形位能、结构刚度,股骨结构力学性能指标中最大载荷、破坏载荷、变形位能、结构刚度,股骨材料力学性能指标中弹性模量、最大应力、最大应变、破坏应力明显升高($P<0.05$);C组有升高趋势;A、C、D、E、F组之间比较差异没有统计学意义;D、E、F组随淫羊藿黄酮剂量的增加而增加,但其相互之间差异没有统计学意义;股骨材料力学性能指标中破坏应变A、C、D、E、F组之间相互比较差异没有统计学意义,表明去势造成了大鼠椎骨力学性能、股骨结构力学性能和股骨材料力学性能的降低,应用淫羊藿黄酮可改善第四腰椎体力学性能、股骨结构力学性能和股骨材料力学性能。结论:淫羊藿黄酮可有效防治去势大鼠骨生物力学性能的降低,使其维持在较高水平。

关键词:淫羊藿黄酮 去势大鼠 生物力学 SD大鼠

doi: 10.11842/wst.2014.08.023

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

原发性骨质疏松(Osteoporosis, OP)是一种常见的衰老性疾病,随着社会人口的老年化,其发病率越来越高,已经跃居全球常见病和多发病的第7位,严重危害老年人的身心健康。OP方面的研究主要集中在去势动物实验研究,对淫羊藿的药理作用研究主要集中在补肾壮阳,治疗肾阳虚证等方面。本研究将这几个方面结合起来探讨淫羊藿黄酮对去势诱导骨丢失和OP的防治研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验选用2月龄雌性SD大鼠60只,体质量 $175.28\sim 212.64\text{ g}$,平均 $(201.51\pm 15.32)\text{ g}$,组间体质量差异无统计学意义,为一级实验动物,购自上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2003-0003。鼠料购自中南大学湘雅医学院实验动物部。实验动物购得后,在动物室内适应1周。按体质量的10%饲喂各组饲料,饮水量不限,每周称

收稿日期:2013-11-26

修回日期:2014-08-15

* 湖南省科技厅立项资助项目(2012TP4021-4) 探讨骨质疏松与老年人髋部骨折的关系,负责人:陈鹏,郴州市科技局立项资助项目(2012CT116):探讨骨质疏松与老年人髋部骨折的关系,负责人:陈鹏。

** 通讯作者:陈家玉,教授,主任医师,硕士生导师,主要研究方向:老年性骨病,颅脑肿瘤。

重 1 次,观察大鼠的生长情况和进食量。随机平均分成 6 组,每组 10 只。所有动物在同一条件下(室温 18℃-25℃)采用普通鼠料定量饲养,自由摄食、饮水。基础饲料为按美国 AOAC 标准配制的低钙合成饲料。

1.2 药物、仪器与试剂

淫羊藿药用的主要有效成分:淫羊藿总黄酮,含量为 62.5%^[1];高效钙粉,每克钙粉含钙 400 mg,配制成一定浓度的药物混悬液,置于 4℃冰箱中避光保存备用;维生素 D₃;大鼠灌胃器;扇形束双能 X 线吸收法骨密度测量仪(Dual Energy X-Ray Absorptiometry, DEXA)。

1.3 分组

选用 2 月龄雌性 SD 大鼠 60 只,随机分为 6 组,每组 10 只。A 组:空白对照组,常规方法饲养,进行假手术处理;B 组:去势组,不给予淫羊藿黄酮干预;C 组:去势+钙剂,每日灌服高效钙(75 mg·kg⁻¹)+维生素 D₃ 21 IU·kg⁻¹;D 组:去势+低剂量,每日灌服淫羊藿黄酮(75 mg·kg⁻¹);E 组:去势+中剂量,每日灌服淫羊藿黄酮(150 mg·kg⁻¹);F 组:去势+高剂量,每日灌服淫羊藿黄酮(300 mg·kg⁻¹)。实验第 4 月末处死大鼠,取出大鼠双侧胫骨、双侧股骨、双侧肱骨和全部腰椎,测定双侧股骨、双侧胫骨、双侧肱骨和全部腰椎骨密度^[2]。

1.4 实验方法

实验进行 4 个月后用 3%戊巴比妥麻醉处死,开胸、心脏抽血(用作检测血生化指标)。①取 L4 椎体,去除周围软组织,去除横突、棘突等椎体后部组织,只保留前部椎体部分,使之成为高 5 mm 椎体上下表面平行的近似三角形柱体。用游标卡尺测量三角形截面的底边和高,计算椎体的横截面积。椎体处理完毕后在试验机上进行压缩实验。机器型号为岛津 AGS10KNG 电子万能试验机,加载速度 1 mm·min⁻¹。②取同侧股骨,小心去除骨骼表面附着的肌肉、韧带及骨膜,避免损伤骨质。用自凝牙托水和自凝牙托粉包埋股骨两端,形成平整支撑面。用游标卡尺测量股骨中段加压点直径,计算截面面积。股骨处理完毕后在上述试验机上行三点弯曲实验,支点跨距 20 mm,加载速度 15 mm·min⁻¹,探头接触标本后继续运行 2.5 mm。

1.5 测量指标

测量指标包括:弹性模量,最大载荷,最大变

形,最大应力,最大应变,破坏载荷,破坏应力,变形位能,结构刚度。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 12.5 软件进行统计分析,两组样本均数间比较采用 *t* 检验,多组样本间比较采用成组设计多个均数比较的方差分析,所有数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,当 $P < 0.05$ 时,继续做多个实验组与对照组间的两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 淫羊藿黄酮干预对去势大鼠椎骨力学性能的影响

各组测量数据可知,与 B 组比较,A、D、E、F 组 L₄ 椎骨力学性能指标中弹性模量(MPa)、最大载荷(N)、最大应力(N·mm⁻²)、变形位能(N·mm⁻¹)、结构刚度(N·mm⁻¹)明显升高($P < 0.05$);C 组有升高趋势;A、C、D、E、F 组之间相互比较差异没有统计学意义;D、E、F 组随淫羊藿黄酮剂量的增加而增加。见表 1。

2.2 淫羊藿黄酮干预对去势大鼠股骨结构力学参数和材料力学性能的影响

大鼠股骨三点弯曲实验测得的结构力学参数和材料力学参数的数据统计结果见表 2 和表 3。与 B 组比较,A、D、E、F 组股骨结构力学性能指标中最大载荷(N)、破坏载荷(N)、变形位能(N·mm⁻¹)、结构刚度(N·mm⁻¹)和股骨材料力学性能指标中弹性模量(MPa)、最大应力(N·mm⁻²)、破坏应力(N·mm⁻²)明显升高($P < 0.05$);C 组有升高趋势;A、C、D、E、F 组之间比较其差异没有统计学意义;D、E、F 组随淫羊藿黄酮剂量的增加而增加,但其之间差异没有统计学意义;股骨材料力学性能指标中的破坏应变(%)A、C、D、E、F 组之间比较差异没有统计学意义。

3 讨论

骨骼在一生中都处在不停的代谢活动中,破骨细胞吸收旧骨,成骨细胞再形成新骨,正常状态下骨形成与骨吸收相互偶联达到动态平衡,去势使其失去偶联,骨形成减少或/和骨吸收增加,导致骨丢失而发生 OP^[1]。而从生物力学角度看,骨组织是由无机盐和有机质组成的两向性复合材料^[2]。无机成

分提供骨的强度、牢固性,而有机成分使骨具有一定的韧性。骨在受到外力时其内部结构和外部形态都将随之改变,这种改变直接反应在骨的结构力学和材料力学性能的变化上。骨质疏松后,骨的结构和材料力学性能参数均有不同程度的下降,骨抵抗外力的能力降低,骨脆性增加,轻微外力即可能引起骨折。而一种药物对骨质疏松的治疗效果如何,也可以通过用药前后骨的力学性能变化的情况,最

表 1 淫羊藿黄酮干预对去势大鼠椎骨力学性能的影响(LV₄)($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	弹性模量/MPa	最大载荷/N	最大应力/N·mm ⁻²	变形位能/N·mm ⁻¹	结构刚度/N·mm ⁻¹
A 组	1 402.2±238.7	255.1±38.6	43.5±5.9	240.1±91.8	1340.7±274.6
B 组	933.2±265.2 [△]	172.9±15.9 [△]	37.8±2.8 [△]	200.2±25.9 [△]	1005.3±247.1 [△]
C 组	1 116.1±281.9	213.6±43.5	38.3±3.7	215.9±52.8	1103.3±238.4
D 组	1 125.2±233.7 [*]	225.1±33.1 [*]	39.5±5.1 [*]	222.1±81.8 [*]	1205.7±244.6 [*]
E 组	1 236.2±235.7 [*]	238.1±35.3 [*]	40.9±5.5 [*]	225.1±84.8 [*]	1233.7±264.5 [*]
F 组	1 315.2±238.7 [*]	245.8±38.6 [*]	41.8±5.8 [*]	230.5±91.5 [*]	1255.7±274.6 [*]

注 :与 A 组比较 ,[△] $P<0.05$;与 B 组比较 ,^{*} $P<0.05$ 。

表 2 淫羊藿黄酮干预对去势大鼠股骨结构力学参数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	最大载荷/N	破坏载荷/N	变形位能/N·mm ⁻¹	结构刚度/N·mm ⁻¹
A 组	145.6±18.5	140.6±20.4	85.3±12.3	264.0±64.4
B 组	99.5±8.6 [△]	83.3±19.6 [△]	61.8±11.4 [△]	198.6±42.3 [△]
C 组	110.8±23.5	98.6±13.7	80.8±10.2	221.4±41.6
D 组	114.4±17.3 [*]	115.4±13.4 [*]	81.6±15.6 [*]	238.2±54.7 [*]
E 组	124.3±15.6 [*]	123.1±11.3 [*]	82.4±14.5 [*]	248.2±46.2 [*]
F 组	134.4±16.4 [*]	130.1±12.3 [*]	83.5±13.4 [*]	258.2±35.5 [*]

注 :与 A 组比较 ,[△] $P<0.05$;与 B 组比较 ,^{*} $P<0.05$ 。

表 3 淫羊藿黄酮干预对去势大鼠股骨材料力学性能的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	弹性模量/MPa	最大应力/N·mm ⁻²	最大固有应变/%	破坏应力/N·mm ⁻²	破坏应变/%
A 组	8 569.5±1580.3	180.2±12.5	4.1±0.6	160.5±11.9	3.2±1.1
B 组	6 065.4±1146.4 [△]	153.4±14.6 [△]	3.1±0.3 [△]	125.4±12.2 [△]	4.6±1.3
C 组	6 535.3±1312.2	163.7±13.5	3.3±0.5	133.9±13.4	3.5±1.2
D 组	6 835.7±1412.4 [*]	167.4±14.5 [*]	3.4±0.4 [*]	143.6±12.3 [*]	3.6±1.4
E 组	7 569.4±1380.8 [*]	170.6±11.3 [*]	3.5±0.3 [*]	147.6±14.6 [*]	3.7±1.5
F 组	7 989.6±1180.5 [*]	171.2±12.5 [*]	3.6±0.5 [*]	151.6±13.4 [*]	3.8±1.3

注 :与 A 组比较 ,[△] $P<0.05$;与 B 组比较 ,^{*} $P<0.05$ 。

直观的表现出来,即力学性能参数是反映和评价骨质量的最直接的指标^[1,3]。表现骨结构力学特性的指标有骨所能承受的载荷、挠度、骨断裂时的载荷、变形以及引起骨结构断裂所需的能量,即变形位能等,它们反映了整体骨抵抗骨折的能力。描述骨材料力学特性的指标有应力、应变、弹性模量等。骨的材料力学性能不受骨形状大小的影响,反映骨自身的强度和韧性,与骨中矿物质含量、骨密度有关。

骨可分为皮质骨和松质骨。两种骨的材料成分及板层形式相同,两者的差别仅在于疏松的程度不同。但从生物力学角度看,不同性质的骨结构表现出不同的结构性能。在OP时,松质骨骨量的减少和其力学构筑的改变,以及皮质骨厚度的变化,都将降低骨的强度和刚度。多项研究^[4,5]发现OP大鼠骨骼的各项力学性能指标显著降低。本实验结果显示,去势大鼠(B组)L₄椎体和股骨干的最大载荷、最大应力、变形位能和结构刚度等大部分指标明显下降。

腰椎椎体主要由松质骨构成。由于骨的各向异性特点,骨小梁结构在纵向和横向上结构不同,骨强度在不同方向上也有很大差别^[6,7]。本实验采用纵向加压,意在研究椎体纵向的力学性能。本组结果显示淫羊藿黄酮干预组去势大鼠腰椎最大载荷和最大应力明显提高。椎体的最大载荷是椎体所能承受的最大挤压力,最大应力也叫极限强度,是材料抵抗破坏的能力。这两个参数的提高,表示去势大鼠在服淫羊藿黄酮后,其抗挤压和抵抗破坏的能力加强了。

股骨干由皮质骨组成,去势大鼠皮质骨的变化,主要是骨髓骨外膜的骨形成减少和骨内膜面的骨吸收增加,从而出现皮质骨变薄,骨髓腔增大^[8,9]。

本实验淫羊藿黄酮干预组与B组比较的统计结果支持以上观点。更主要的是,本实验的结果显示,淫羊藿黄酮干预对去势大鼠股骨干力学性能的影响,主要表现在结构力学性能的提高,而在材料力学方面,虽然淫羊藿黄酮干预组与B组比较,弹性模量、极限强度、破坏应力等指标都有提高的趋势。在反映股骨干结构力学性能的参数中,淫羊藿黄酮干预组的最大载荷和变形位能与B组比较有明显提高,表明大鼠灌服淫羊藿黄酮后,其股骨干能承受的弯曲力增大了,破坏前需要吸收更多的能量。本组结果说明淫羊藿黄酮可有效防治去势大鼠腰椎、股骨干的抗骨折能力的降低。

参考文献

- 1 赵宝林,马洪顺,赵光涛.骨质疏松对骨生物力学性能影响实验研究.中国老年学杂志,2003,24(6):372-373.
- 2 贾晓斌,兰雪莲,陈彦,等.淫羊藿黄酮类成分抗骨质疏松作用及其机制研究进展.中国药房,2010,21(3):269-270.
- 3 赵文昌,宋丽军,温凯航,等.淫羊藿抗骨质疏松症的研究进展.中国医药导报,2012,9(25):20-22.
- 4 孔焕宇,陈燕平,淑芹,等.去卵巢大鼠骨质疏松检测指标的实验分析.中国骨伤,2004,17(4):204-206.
- 5 崔燎,陈槐卿,许碧连,等.去卵巢大鼠椎骨组织形态计量学、生物力学特点及相关性研究.生物医学工程学杂志,2004,21(2):178-183.
- 6 韩利华,王全平,李靖,等.卵巢切除大鼠皮质骨骨密度与生物力学特性分析.中国临床康复,2003,7(18):2532-2533.
- 7 杨川,戴如春,廖二元,等.去势大鼠骨密度与生物力学间关系的改变.中华物理医学与康复杂志,2001,23(4):207-210.
- 8 叶纯,苏进,王凡.淫羊藿水提液对去势大鼠松质骨的影响.中国临床解剖学杂志,2008,26(1):87-90.
- 9 韩利华,王奎平,刘建,等.卵巢切除大鼠皮质骨骨密度与生物力学特性.第四军医大学学报,2001,23(11):1023-1025.

Pharmacological Effect of EPF on Biomechanical Properties among Ovariectomized Rats

Chen Peng¹, Liu Wenhe², Yan Linlin¹, Chen Jiayu³, Hu Weiwen¹, Cao Xiwen¹, Li Yang¹

(1. Affiliated Hospital of Xiangnan University, Chengzhou 423000, China;

2. Medical College of Jinan University, Affiliated Qingyuan People's Hospital, Qingyuan 511518, China;

3. Xiangnan University, Chengzhou 423000, China)

Abstract: This study was aimed to explore pharmacological effects of epimedium pubescen flavonoid (EPF) on biomechanical properties among ovariectomized rats. Sixty female Sprague-Dawley (SD) rats (aged 2-month-old) were randomly divided into six groups ($n = 10$), which were the sham control group (Group A), the model group (Group

B), the standard group (Group C), the treated 1 group (Group D), the treated 2 group (Group E), and the treated 3 group (Group F). Except the sham control group (Group A), rats in other groups had been ovariectomized. All rats were given the same feedstuff. Meanwhile, Group C was given calcium $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ combined with VitD_3 $21 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$ by gastrogavage every day for 4 months; Group D was given EPF $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; Group E was given EPF $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; Group F was given EPF $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. At the end of the 4th month, all rats were sacrificed. Bones, which included tibia, femur and humerus of both sides and all lumbar vertebra bodies, had been taken out. Measurement was made on the elastic modulus, maximum loading capability, maximum stress, potential energy of deformation, and structural rigidity of biomechanical properties of the fourth lumbar vertebra body (LV_4); the maximum loading capability, bone break load, potential energy of deformation, structural rigidity of the structural dynamics properties of the femur compact bone; the elastic modulus, maximum stress, maximum inherent strain, bone break stress, and bone break strain of the mechanical properties of a material of the femur compact bone in the experimental rats. The results showed that compared with Group B, the elastic modulus, maximum loading capability, maximum stress, potential energy of deformation, and structural rigidity of LV_4 ; the maximum loading capability, bone break load, potential energy of deformation, structural rigidity of the structural dynamics properties of the femur compact bone; the elastic modulus, maximum stress, maximum inherent strain, and bone break strain of the mechanical properties of a material of the femur compact bone were obviously increased in Group A, D, E and F ($P < 0.05$). Group C had increasing tendency. There were no statistical differences among Group A, C, D, E and F. Group D, E, and F had increased with EPF dose-dependently. However, there were no statistical differences among them. There were no statistical differences on bone break strain of the mechanical properties of a material of the femur compact bone among Group A, C, D, E, and F. It showed that ovariectomization reduced the biomechanical properties of vertebra bodies, structural dynamics properties of the femur compact bone, and the mechanical properties of a material of the femur compact bone. The application of EPF can effectively prevent and treat the decreasing of biomechanical properties of ovariectomized rats, so as to keep them in a relatively higher level.

Keywords: Epimedium pubescens flavonoid, ovariectomized rats, biomechanical properties, Sprague-Dawley rats

(责任编辑 张丰丰 张志华 责任译审 王 晶)