

本文引用:刘菊,梅群超,谢先龙,等.温阳补肾方对去卵巢大鼠骨密度及骨标志物的影响[J].新乡医学院学报,2014,31(6):426-428.

【基础研究】

温阳补肾方对去卵巢大鼠骨密度及骨标志物的影响

刘菊,梅群超,谢先龙,张瑶,陈辉

(华中科技大学同济医学院附属中西医结合医院老年病科,湖北 武汉 430022)

摘要: **目的** 探讨温阳补肾方对去卵巢大鼠骨密度及骨标志物的影响。**方法** 取3月龄健康雌性SD大鼠40只,随机分为正常组、对照组、模型组和治疗组,每组10只。正常组大鼠行假手术,其余3组大鼠行双侧卵巢摘除术,术后30d开始治疗,治疗组大鼠灌胃给予温阳补肾方,对照组大鼠给予戊酸雌二醇,治疗组及对照组大鼠各自按1 mL · 100 g⁻¹体质量灌胃;正常组和模型组大鼠每日按体质量给予同等剂量的生理盐水。于给药治疗12周后测定血清中骨原交联水平及I型胶原N端前肽(PINP)、碱性磷酸酶(AKP)、钙和磷的水平;骨密度测量仪测骨密度。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠PINP水平明显升高,骨原交联水平下降,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组大鼠骨原交联水平升高,PINP水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与对照组比较,模型组大鼠血清AKP水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,治疗组大鼠血清AKP水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组和正常组比较,模型组大鼠骨密度明显下降($P < 0.05$);与模型组比较,治疗组大鼠骨密度明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 温阳补肾方能提高血清中AKP的水平,增加骨密度,抑制骨吸收,促进骨形成,具有防治骨质疏松症的作用。

关键词: 温阳补肾方;骨质疏松;去卵巢大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2014)06-0426-03

Effects of *Wenyangbushen* prescription on the bone mineral density and marker of bone in ovariectomized rats

LIU Ju, MEI Qun-chao, XIE Xian-long, ZHANG Yao, CHEN Hui

(Department of Geriatrics, the Integrative Medicine Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of *Wenyangbushen* prescription on the bone mineral density (BMD) and marker of bone in ovariectomized rats. **Methods** Forty three months old health female SD rats were selected and randomly divided into normal group, control group, model group and treatment group, with 10 rats in each group. The normal group was only shamly operated and the other three groups were ovariectomized. The rats were treated at 30 days after operation. The treatment group was given *Wenyangbushen* prescription (1 mL · 100 g⁻¹); the control group was given estradiol valerate (1 mL · 100 g⁻¹); the normal group and model group were given isodose physiological saline according to the body weight per day. The levels of BMD, bone original crosslinking, procollagen type I N-terminal propeptide (PINP), alkaline phosphatase (AKP), calcium and phosphorus were determined at 12 weeks after treatment. **Results** Compared with normal group, the levels of PINP and bone original crosslinking in model group decreased ($P < 0.01$); compared with model group, the levels of bone original crosslinking increased and the levels of PINP decreased in treatment group ($P < 0.01$). The serum AKP in model group were significantly lower than those in control group and treatment group ($P < 0.05$). Compared with control group and normal group, the BMD in model group decreased ($P < 0.05$); compared with model group, the BMD in treatment group increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The *Wenyangbushen* prescription can increase the level of AKP and BMD in ovariectomized rats; repress bone resorption and promote bone formation, thus it can be used to treat osteoporosis.

Key words: *Wenyangbushen* prescription; osteoporosis; ovariectomized rat

DOI: 10.7683/xyxyxb.2014.06.006

收稿日期: 2014-02-21

基金项目: 武汉市卫生局临床医学科研项目(编号: WZ12B06)

作者简介: 刘菊(1973-),女,湖北随州人,硕士,主治医师,研究方向: 老年内分泌疾病。

通信作者: 陈辉(1961-),男,湖北武汉人,学士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向: 老年病。

骨质疏松症是以骨量减少、骨微观结构退化为特征,致使骨的脆性增加并易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病^[1],是绝经后妇女的常见病。骨质疏松症及其严重后果骨折已成为威胁中老年人健康的主要问题,随着我国人口老龄化的加剧,骨质疏松症

防治所面临的问题越来越严峻^[2]。我国现代医学研究发现,妇女绝经后由于卵巢功能衰退,雌激素水平急剧下降,体内骨代谢失去平衡,骨吸收活动加速,骨无机盐丢失增加,而成骨细胞功能则代偿性增强,呈现高转换型骨代谢,骨吸收大于骨形成,全身骨量逐渐减少,骨骼脆性增加,最终导致骨质疏松症发生。西医治疗骨质疏松仍未取得令人满意的效果,近年来从天然药物中寻找更安全有效的抗骨质疏松中药制剂已成为研究热点^[3],为此本实验通过去卵巢手术,建立大鼠绝经后骨质疏松动物模型,研究温阳补肾方对去卵巢骨质疏松大鼠体内雌激素和骨代谢生物化学指标的影响,以探索一条防治骨质疏松的有效途径并初步探讨其作用机制。

1 材料与方

1.1 实验动物 健康纯种无特定病原(specific pathogen-free, SPF)级3月龄SD雌性大鼠40只,体质量为(200 ± 15)g,由湖北省实验动物研究中心提供,动物合格证编号:4200060000069。饲养在SPF屏障笼内,每笼4只,自由饮水,室内保持20~25℃,湿度为60%,饮水为蒸馏水,饲料经过辐照灭活处理,饮水和饲料均可由大鼠自行摄取。40只大鼠随机分为正常组、对照组、模型组和治疗组,每组10只。

1.2 实验药物 温阳补肾方由淫羊藿、盐杜仲、附子、当归、肉桂、盐补骨脂、巴戟肉、肉苁蓉、菟丝子、甘草、丹参、牛膝组成,生药由武汉市中西医结合医院门诊中药房提供,并由武汉市中西医结合医院中心实验室(国家3级实验室)制作成药液(煎剂),按成人与动物服用剂量换算,使每1mL药液含1g原药材,每2周配制1次,4℃冰箱保存。戊酸雌二醇片(DELPHARM Lille SAS法国杜芬药厂,批号:253A)配制成0.02g·L⁻¹水溶液。以上药液配制后冷藏备用。

1.3 实验仪器和试剂 采用酶联免疫吸附测定法测定骨原交联、I型胶原N端前肽(procollagen type I N-terminal propeptide, PINP),全自动生物化学分析仪测定血液生物化学指标。

1.4 实验方法 正常组大鼠行假手术,其余3组大鼠行双侧卵巢摘除术。将各组大鼠用质量分数

10%水合氯醛按3mL·kg⁻¹腹腔注射麻醉,腹位固定。消毒后,取最末肋骨下、距脊柱外侧约2cm交叉处剪开一长约2.0cm的切口,钝性分离(经筋膜、肌层)逐层进入腹腔,可见乳白色脂肪组织,轻轻将之提出腹腔,即可见被之包裹的粉红色“桑葚样”卵巢,除正常组行假手术仅切除卵巢附近的一小块脂肪组织外,其他3组结扎及剪断双侧卵巢组织,检查无渗血,将脂肪组织和子宫角送回腹腔内,同法摘除另一侧卵巢,分2层间断缝合关闭腹腔并缝合皮肤,络合碘切口消毒。待麻醉苏醒后常规饲养,自由饮水摄食30d,并注意观察大鼠食欲、精神状态等,每周测1次体质量。30d后治疗组大鼠灌胃给予温阳补肾方,对照组大鼠给予戊酸雌二醇片灌胃,给药剂量为1mL·100g⁻¹体质量,正常组和模型组大鼠每日按体质量给予同等剂量的生理盐水。给药12周后,测体质量,将各组大鼠用质量分数10%水合氯醛按3mL·kg⁻¹腹腔注射麻醉,四肢展开平置于双能X线吸收测量仪平台上,通过计算机enCore2007小动物软件系统测定全身骨矿物质密度(bone mineral density, BMD)。由华中科技大学附属协和医院核医学科检测。测定大鼠BMD后腹主动脉采血,检测血清骨原交联、PINP水平、血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)、钙(Ca)、磷(P)含量。由武汉市第一医院检验中心检测。

1.5 统计学处理 应用SPSS 13.0统计软件进行数据处理,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 温阳补肾方对大鼠血清骨原交联、AKP、Ca、P水平的影响 结果见表1。与正常组比较,模型组和治疗组大鼠PINP水平明显升高;模型组骨原交联水平下降,治疗组骨原交联水平升高差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组大鼠比较,治疗组大鼠骨原交联水平升高, PINP水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$);对照组和治疗组大鼠血清AKP水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗组的PINP、骨原交联及AKP水平与对照组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。4组大鼠血清Ca、P水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 温阳补肾方对大鼠骨原交联、PINP、AKP、Ca、P的影响

Tab.1 Effect of Wenyangbushen prescription on the bone original crosslinking, PINP, AKP, Ca and P in ovariectomized rats

组别	n	PINP/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	骨原交联/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	AKP/(IU·L ⁻¹)	Ca/(mmol·L ⁻¹)	P/(mmol·L ⁻¹)
正常组	10	5.273 ± 0.604	0.692 ± 0.043	95.25 ± 13.76	2.61 ± 0.10	1.34 ± 0.25
对照组	10	5.303 ± 0.547	0.685 ± 0.051	104.37 ± 35.95 ^b	2.48 ± 0.15	0.96 ± 0.23
模型组	10	5.984 ± 0.647 ^a	0.518 ± 0.046 ^a	78.35 ± 24.49	2.06 ± 0.08	1.23 ± 0.32
治疗组	10	5.288 ± 0.399 ^{ab}	0.707 ± 0.069 ^{ab}	123.25 ± 39.17 ^b	2.59 ± 0.11	1.08 ± 0.25

注:与正常组比较^a $P < 0.01$;与模型组比较^b $P < 0.01$ 。

2.2 温阳补肾方对大鼠 BMD 的影响 结果见表 2。与模型组比较,治疗组、对照组和正常组大鼠 BMD 明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗组与对照组大鼠 BMD 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 4 组大鼠 BMD 水平变化

Tab.2 Changes of BMD of rats in four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	全身 BMD/ ($g \cdot cm^{-2}$)	腰椎 BMD/ ($g \cdot cm^{-2}$)	右股骨 BMD/ ($g \cdot cm^{-2}$)
正常组	10	0.157 ± 0.001 ^a	0.238 ± 0.012 ^a	0.184 ± 0.001 ^a
对照组	10	0.154 ± 0.002 ^a	0.229 ± 0.001 ^a	0.176 ± 0.001 ^a
模型组	10	0.144 ± 0.003	0.199 ± 0.002	0.159 ± 0.001
治疗组	10	0.165 ± 0.006 ^a	0.247 ± 0.011 ^a	0.181 ± 0.009 ^a

注:与模型组比较^a $P < 0.05$ 。

3 讨论

中医学无骨质疏松症这一病名,但根据其肢体软弱无力、身高缩短、脊柱畸形(驼背或脊柱侧凸)等临床表现来判定,多将其归属为“骨痿”范畴。根据肾藏精,主骨生髓的理论,对骨质疏松的治疗主要以补肾中药为主,而在补肾药中又以补益药中的补阳药物为最多^[4]。本研究温阳补肾方中淫羊藿、杜仲、补骨脂补肾助阳益精,坚骨强筋;杜仲,性甘、温,归肝、肾经,具有补肝肾、强筋骨之功效。巴戟天、肉苁蓉、牛膝、丹参、当归活血补肝,填精益髓,甘草益气调和诸药,共奏温阳补肾活血、强筋壮骨之功。

现代医药研究发现淫羊藿、补骨脂等补肾中药中含有异黄酮类物质,具有类雌激素样作用,可促进成骨细胞增殖及增强其活性并抑制破骨细胞,调节白细胞介素-6 等细胞因子,从而促进骨形成,抑制骨吸收^[5-7]。有研究发现,淫羊藿苷可强烈促进骨髓基质细胞(bone marrow derived stroma cell, BMSCs)的成骨性分化^[8-9],表现在可显著提高 AKP 的活性,促进骨钙素的表达和钙盐沉积,促进骨组织的修复,抑制骨量丢失,提高股骨质量和基质表面密度,拮抗骨质疏松。

血清 AKP 被认为是成骨细胞分化的早期标志物,是反映成骨细胞活性的重要指标。其主要由成骨细胞产生,含量丰富,参与骨代谢的调节,其活性的强弱间接反映了成骨细胞的活动情况^[10]。本研究治疗组大鼠血清 AKP 水平明显升高,提示骨转换及骨形成增加。4 组大鼠血清 Ca、P 水平变化差异无统计学意义,可能与 Ca、P 代谢受多种因素影响有关。

I 型胶原由成骨细胞以原胶原的形式分泌,在基质中被迅速裂解,脱下 N 末端肽与 C 末端肽成为成熟 I 型胶原。骨胶原的过度降解或合成减少均可引起骨弹性和韧性降低,骨盐失去依附,溶解增多,极易导致骨质疏松。本研究中与正常组比较,模型组大鼠 PINP 水平明显升高,骨原交联水平下降;与模型组比较,治疗组能提高骨原交联水平,降低

PINP 水平;与对照组比较,血清骨原交联、PINP 水平差异无统计学意义。

大量研究证实,卵巢摘除可造成骨吸收大于骨形成的高转换型骨质疏松模型,其与人类绝经后骨质疏松症相似^[11]。本实验结果显示,与未摘除卵巢的正常组比较,模型组大鼠 BMD 降低,说明摘除卵巢建立骨质疏松动物模型成功。与模型组比较,治疗组及对照组大鼠 BMD 水平显著提高,说明温阳补肾方及雌激素具有显著提高大鼠 BMD 的作用。治疗组与对照组大鼠 BMD 比较差异无统计学意义,说明温阳补肾方具有雌激素的作用特点,即可表现为雌激素样作用,进而治疗骨质疏松症。

BMD 是目前用于骨质疏松症诊断及骨折危险度评价最重要、最客观的检测指标,BMD 变化是判定骨质疏松骨丢失率及药物疗效的重要客观依据。本实验结果显示,模型组大鼠股骨的 BMD 较正常组明显降低,提示去卵巢能明显引起大鼠骨质疏松症的发生;而治疗组大鼠 BMD 明显高于模型组,作用与雌激素组接近,提示温阳补肾方丸能够对抗去卵巢引起的雌性大鼠的骨丢失,增加 BMD。

本研究证明去势大鼠的 BMD 均有不同程度的升高,与模型组比较差异有统计学意义,说明温阳补肾方有一定的补肾壮骨功能,抑制骨吸收,促进骨形成,能够延缓骨质疏松的发展,作为中医药治疗的一种新方法有广泛的应用价值。

参考文献:

- [1] 李恩,薛延,王洪复,等. 骨质疏松鉴别诊断与治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社,2005:56.
- [2] 贺莉,马玲. 健康教育对社区中老年人骨质疏松干预效果的 Meta 分析[J]. 新乡医学院学报,2012,29(8):632-636.
- [3] Maraldo M,McMurdur M T F, Vestergaard P, et al. Evidence of effect of antiresorptive medicine in the elderly and old[J]. *Eur Ger Med*, 2010,1(5):279-292.
- [4] 张喜德,刑玉瑞,田丙坤. 骨质疏松症常用中药及其选配规律探析[J]. 陕西中医学院学报,1999,22(3):43-44.
- [5] 王婷,张大威,张金超,等. 淫羊藿黄酮的分离鉴定及其对前破骨细胞增殖的影响[J]. 中草药,2006,37(10):1458-1462.
- [6] 谢雁鸣,许勇钢,赵晋宁,等. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨密度和细胞因子 IL26, IL24, TNF2 α 水平的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2004,10(1):34-37.
- [7] 寿清耀,杨荣平,王宾豪,等. 补骨脂雌激素样作用有效成分研究[J]. 中药新药与临床药理,2007,18(6):425-327.
- [8] Chen K M, Ge B F, Ma H P, et al. Icaritin, a flavonoid from the herb epidium enhances the osteogenic differentiation of rat primary bone marrow stromal cells[J]. *Pharmazie*, 2005,60(12):939-942.
- [9] 周乐,崔燎,吴铁. 淫羊藿对肾虚雌性大鼠肾脏和股骨 BMP27 表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2008,14(2):90-93.
- [10] 张军芳,蒋飞霞,徐尚婷. 骨代谢生化标志物与骨质疏松症研究进展[J]. 中国热带医学杂志,2009,9(3):568-570.
- [11] 尚庆,刘宗超,鲁晓波. 骨质疏松的动物模型特点的综述[J]. 中国实用医药杂志,2008,3(13):193-195.

(本文编辑:孟月 英文编辑:孟月)