

补肾、健脾和活血化瘀方药对去卵巢大鼠骨质疏松的比较性研究

李芳芳 李 恩 佟晓旭 陈永春 康文华



摘要 采用去卵巢大鼠模型,在确定单一因素的条件下比较性研究三种治则对骨代谢的影响。40只4月龄SD♀大鼠,随机分为5组,每组8只。I组:假手术组(sham),II组:切除卵巢组(OVX),III组:切除卵巢加补肾方剂组(OVX+TKR),IV组:切除卵巢加健脾方剂组(OVX+ISR),V组:切除卵巢加活血化瘀中药组(OVX+PBCR)。术后第7天起,II~V组灌胃中药,I~I组灌胃蒸馏水。术后97天处死动物。行血清、尿生化检测、胫骨骨组织形态计量学检测和股骨骨密度检测。结果:OVX与sham组相比,胫骨TBV%明显下降($P<0.01$),股骨的股骨头、粗隆间、踝间窝上骨密度明显下降($P<0.05\sim0.01$)。OVX+TKR组与OVX组相比,胫骨TBV%明显上升($P<0.01$),股骨各部位骨密度均明显升高($P<0.05\sim0.01$),健脾方剂组基本无延缓去势引起的骨量丢失作用。活血化瘀中药有延缓去势引起的大鼠骨量丢失作用。结果提示:三方相比,补肾方剂有显著性对抗去势引起的大鼠骨量丢失作用。

关键词 骨质疏松 补肾 健脾 活血化瘀

Comparative study of antiosteoporosis of tonifying kidney recipe, invigorating spleen recipe and promoting blood circulation recipe on ovariectomized rat

Li Fangfang, Li En, Tong Xiaoxu, Chen Yongchun, Kang Wenhua
Hebei Medical University, Shijiazhuang 250017, China

Abstract Using ovariectomized rat (OVX), on the condition of single definite factor, the effects of tonifying kidney recipe (TKR), invigorating spleen recipe (ISR) and promoting blood circulation recipe (PBCR) on bone were studied. Forty female SD rats of four month weighed $230\pm25\text{g}$ were divided into 5 groups, eight rats a group, group I: false operation (sham), group II: ovary resection (OVX), group III: ovary resection plus TKR (OVX+TKR), group IV: ovary resection plus ISR (OVX+ISR), group V: ovary resection plus PBCR (OVX+PBCR). Seven days after operation, group II was given TKR 11.25g/Kg/d, group IV was given ISR 3.23g/Kg/d, group V was given 2.16g/Kg/d, group I and I were given only water, five times a week, successively in three months. Ninety seven days after operation, all animals were killed, then following tests were made: biochemical examine of serum and urine, morphologic metrology of tibia, and BMD of femur. Results: compared with group I, TBV% of tibia remarkably lowered ($P<0.01$), TFS% and TRS% remarkably increased ($P<0.05\sim0.01$), BMD in neck

作者单位:250017 石家庄河北医科大学

作者简介:李芳芳,女,39岁,现任河北医科大学生生化教研室并中西医结合基础理论研究室副教授。北京中医学院中药系专业毕业并获学士学位,河北医学院药理学研究生并获硕士学位,河北医科大学中西医结合基础理论博士研究生并获博士学位,博士论文获第三届中国新医药博士论坛优秀论文奖,现从事中医药治疗骨质疏松症的作用机理和有效成分的研究。

of femur, intertrochanter, above the intercondylar fossa remarkably lowered ($P < 0.05 - 0.01$) in group I. By all such, OVX rat successfully established a model of osteoporosis, and this model was a highly transform one. Compared with group I, in group II TBV% of tibia remarkably rose ($P < 0.01$), TFS% and TRS% remarkably lowered ($P < 0.01$), BMD in head of femur, neck of femur, intertrochanter, middle segment of femur, above intercondylar fossa of femur remarkably rose ($P < 0.05 - 0.01$), such demonstrated that TKR could remarkably postpone the loses of rat bone mass caused by ovary resection. Compared with group I, in group IV TBV% and TRS% of tibia did not have obvious changes ($P > 0.05$), TRS% obviously decreased ($P < 0.01$), BMD in every part of femur did not have distinct discrepancy ($P > 0.05$), showed that ISR did not have the effect of resisting the loses of bone quantity in rat caused by ovary resection. Compared with group II, in group V TBV% of the tibia remarkably rose ($P < 0.05$), TFS% and TRS% remarkably lowered ($P < 0.05 - 0.01$), BMD of the neck of femur remarkably rose ($P < 0.05$), showed that PBCR had the effects of resisting the loses of bone quantity in rat caused by ovary resection, but the effects were lower than that of the TKR. The results demonstrated that TKR could resist the lose of bone quantity in rat caused by ovary resection, PBCR, also had such effect, but its was lower than that of TKR.

Key words Osteoporosis Tonifying Kidney recipe Invigorating Spleen recipe Promoting blood circulation recipe

在中医理论中,肾和骨的关系非常密切,《素问·六节脏象篇》记载:“肾者……其充在骨”。临床上用补肾法治疗绝经后骨质疏松症取得了良好的效果^[1,2]。另外,中医认为脾主运化,脾失运化则后天之精不足,此为骨质疏松的病机之一。中医临床将骨质疏松归入骨痹,认为骨质疏松症的骨痠骨痛临床表现,痰瘀阻脉为病机。根据中医理论,运用补肾、健脾、活血化瘀治则应对骨质疏松症有一定的预防和治疗作用,但在动物模型上,缺乏三种治则的比较性研究,而这种比较性研究对进一步证实中医理论及对指导临床实践都具有重要意义。本研究以西医的研究思路,除去中医“证”的因素,采用去卵巢大鼠模型,在确定单一因素条件下比较性研究补肾、健脾和活血化瘀中药对去势大鼠骨代谢的影响。

1 材料与方法

补肾方剂(附方:熟地、仙灵脾、肉苁蓉、枸杞、菟丝子等11味中药按比例组成)终浓度2.2g生药/ml;健脾方剂(附方:党参、白术、茯苓、炙甘草等量组成),终浓度1.1g生药/ml;活血化瘀中药(附方:当归、川芎按比例组成),

终浓度0.83g生药/ml。上述各中药均购自河北省药材公司,经生药教研室鉴定。药液的制备均按常规方法,以15~20倍蒸馏水浸泡煎煮两次,2小时/次。合并水提液,离心弃去沉淀,上清液浓缩而成。

40只4月龄SD雌性大鼠,体重 230 ± 25 g,由河北省实验动物中心提供。1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,经背切除双侧卵巢。随机分为5组,每组8只。I组为假手术组(sham),II组为切除卵巢组(OVX),III组为切除卵巢加补肾方剂组(OVX+TKR),IV组为切除卵巢加健脾方剂组(OVX+ISR),V组为切除卵巢加活血化瘀中药组(OVX+PBCR),III~V组术后第7天起灌胃中药,所用剂量均按人日服剂量、按大鼠体表面积换算的等效剂量。TKR 11.25g/kg/日,ISR 3.2g/kg/日,PBCR 2.16g/kg/日,一周5次,连续90天。I、II组灌胃等量蒸馏水。5组动物均于术后97天处死。实验结束前一天禁食并分别收集24小时尿。以股动脉放血处死。留血清、双侧股骨、胫骨备用。

血清Ca测定采用EDTA-Na微量滴定法,血清碱性磷酸酶(AKP)测定用氨基萘替比林测酚法,血清骨钙素(BGP)、C端甲状旁腺素

(C-PTH)、降钙素(CT)采用放射免疫分析法(解放军总医院产测定盒)测定,尿羟脯氨酸(HOP)测定采用改良氯胺T氧化比色法。

取右胫骨近端1/3,去除附着的软组织后固定于70%乙醇,再经Villanueva染液浸染72小时,逐级脱水脱脂后以甲基丙烯酸羟乙基酯包埋,用Jung 1140切片机制备5 μ M纵向不脱钙骨切片。甲苯胺兰复染,用目镜内装有A100单方格网格尺和直线测微尺的OLYMPUSCHA显微镜在400倍视野下进行形态计量,测定区域限定在距骺板下缘1mm以外的干骺端,测定面积为16mm²,测定参数为(1)骨小梁体积百分比(TBV%);骨小梁体积占被测骨髓腔总体积的百分比,是骨量水平的主要标志,(2)骨小梁形成表面百分比(TFS%);有成骨细胞被覆的类骨质表面占骨小梁表面的百分比,表示骨形成参数,(3)骨小梁吸收表面百分比(TRS%);不规则凹凸不平骨小梁表面占骨小梁表面的百分比,代表骨吸收参数^[3]。

双侧股骨仔细剔除软组织,用钼靶软线X

线机拍摄前后位X线片,条件为27KV、10mAs,靶片距40cm,投照时放置14级标准铝梯(每级差0.5mm),用显微光密度仪测X线片上股骨不同部位光密度值,折算成骨灰阶值,以灰阶值表示骨密度变化,灰阶值越高骨密度值越高^[4]。

统计学处理采用组间均值比较的t检验。

2 结果

实验结束时,除健脾方剂组体重与假术组相同外,去势组及补肾组和活血化瘀组体重均显著高于假术组($P<0.01$),Ⅱ~Ⅴ组的子宫指数明显低于假术组($P<0.01$)见表1。

与假术组相比,Ⅰ~Ⅳ血Ca明显降低($P<0.05\sim0.01$),但与去势组相比,Ⅲ~Ⅳ组血Ca又明显上升($P<0.05$),与假术组相比,Ⅰ~Ⅳ组AKP、HOP、BGP均明显上升($P<0.05$),且各组之间无差别,见表2。

与假术组相比,Ⅰ~Ⅳ组C-PTH和CT均明显升高($P<0.05$),且各组之间无差别,见表3。

表1 各组大鼠体重、器官指数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	体重(g)		子宫指数
		实验前	实验后	(mg·g ⁻¹)
I (sham)	7	228.4 $\pm$ 11.9	273.0 $\pm$ 13.9	1.45 $\pm$ 0.15
Ⅰ (OVX)	8	226.7 $\pm$ 11.4	337.8 $\pm$ 30.5***	0.25 $\pm$ 0.04***
Ⅱ (OVX+TKR)	7	225.3 $\pm$ 14.2	342.0 $\pm$ 13.9***	0.23 $\pm$ 0.05***
Ⅳ (OVX+ISR)	7	222.6 $\pm$ 13.8	280.5 $\pm$ 18.5 $\Delta\Delta$	0.25 $\pm$ 0.03***
Ⅴ (OVX+PBCR)	7	215.9 $\pm$ 10.8	310.8 $\pm$ 30.3***	0.26 $\pm$ 0.05***

注:与sham组比较*** $P<0.01$,与OVX组比较, $\Delta\Delta P<0.05$

表2 各组大鼠血清、尿生化指标比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	Ca (mg·dl ⁻¹)	AKP (u·L ⁻¹)	BGP (ng·ml ⁻¹)	HOP (mg·24h ⁻¹)
I (sham)	7	12.3 $\pm$ 0.8	246.3 $\pm$ 98.2	2.13 $\pm$ 0.42	0.14 $\pm$ 0.04
Ⅰ (OVX)	7	10.2 $\pm$ 0.6***	419.9 $\pm$ 103.3**	4.44 $\pm$ 0.94**	0.23 $\pm$ 0.08**
Ⅱ (OVX+TKR)	7	11.4 $\pm$ 0.4*** $\Delta\Delta\Delta$	435.4 $\pm$ 107.4** Δ	4.42 $\pm$ 0.65** Δ	0.27 $\pm$ 0.08** Δ
Ⅳ (OVX+ISR)	7	11.7 $\pm$ 0.7*** $\Delta\Delta\Delta$	468.86 $\pm$ 89.78** Δ	4.73 $\pm$ 0.72** Δ	0.22 $\pm$ 0.07** Δ
Ⅴ (OVX+PBCR)	7	11.3 $\pm$ 0.6*** $\Delta\Delta\Delta$	509.65 $\pm$ 120.06** Δ	4.40 $\pm$ 0.49** Δ	0.21 $\pm$ 0.07** Δ

注:与sham组比较** $P<0.05$,*** $P<0.01$

与OVX组比较 $\Delta P>0.05$, $\Delta\Delta P>0.05$, $\Delta\Delta\Delta P>0.01$

表3 各组大鼠PTH、CT值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	C-PTH (ng · ml ⁻¹)	CT (pg · ml ⁻¹)
I (sham)	7	116.7 ± 22.0	552.9 ± 23.5
II (OVX)	8	117.8 ± 39.0**	691.7 ± 31.0**
III (OVX+TKR)	7	162.6 ± 30.4***Δ	666.4 ± 26.7***Δ
IV (OVX+ISR)	7	185.8 ± 28.3***Δ	646.9 ± 34.4***Δ
V (OVX+PBCR)	7	211.1 ± 33.9***Δ	610.5 ± 32.5***Δ

注:与 sham 组比较 ** $P < 0.05$ 与 OVX 组比较 Δ $P > 0.05$

与假术组相比,去势组 TBV%明显下降, TFS%和 TRS%有显著上升 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。补肾组与去势组相比, TBV%明显上升, TFS%和 TRS%均明显下降 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。健脾组与去势组相比, TBV%和 TFS%

变化不显著 ($P < 0.05$), TRS%明显下降 ($P < 0.01$)。活血化瘀组与去势组相比, TBV%明显升高, TFS%和 TRS%均明显下降 ($P < 0.05 \sim 0.01$), 见表4。

表4 各组大鼠胫骨骨组织形态计量学比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TBV%	TFS%	TRS%
I (sham)	7	16.52 ± 3.05	3.96 ± 2.10	2.14 ± 0.57
II (OVX)	8	6.33 ± 2.00***	14.34 ± 2.44***	4.39 ± 0.74**
III (OVX+TKP)	7	13.14 ± 2.93***ΔΔΔ	7.48 ± 4.01***ΔΔΔ	1.96 ± 0.35***ΔΔΔ
IV (OVX+ISR)	7	6.47 ± 2.86***○○○	15.67 ± 2.56***○○○	3.20 ± 0.36***ΔΔΔ○○○
V (OVX+PBCR)	7	10.90 ± 4.69***ΔΔ	11.25 ± 3.25***ΔΔ	3.06 ± 0.51***ΔΔΔ○○○

注:与 sham 组比较 ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ 与 OVX 组比较 ΔΔ $P < 0.05$, ΔΔΔ $P < 0.01$ 与 OVX+TKR 组比较 ○○ $P < 0.05$, ○○○ $P < 0.01$

与假术组相比,去势组股骨头、粗隆间、踝间窝上骨密度明显下降 ($P < 0.05 - 0.01$), 而在股骨颈和股骨中段处无显著性差异 ($P < 0.05$)。补肾组与去势组相比,股骨各测量部位

骨密度均升高 ($P < 0.01$)。健脾组与去势组相比,股骨各部位骨密度无显著差异 ($P < 0.05$)。活血化瘀组与去势组相比,股骨颈骨密度显著升高 ($P < 0.05$)。见表5。

表5 各组大鼠股骨骨密度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	股骨头	股骨颈	粗隆间	中段	踝间窝上
I (sham)	14	3.26 ± 0.24	2.40 ± 0.43	2.95 ± 0.25	2.45 ± 0.25	2.14 ± 0.12
II (OVX)	16	2.84 ± 0.21***	2.15 ± 0.39*	2.62 ± 0.21**	2.37 ± 0.17*	1.86 ± 0.14**
III (OVX+TKR)	14	3.16 ± 0.26***ΔΔΔ	2.78 ± 0.30***ΔΔΔ	2.87 ± 0.18ΔΔΔ	2.80 ± 0.23***ΔΔΔ	2.10 ± 0.18ΔΔΔ
IV (OVX+ISR)	14	3.00 ± 0.30***Δ	2.41 ± 0.42Δ	2.77 ± 0.29Δ	2.33 ± 0.14Δ	1.99 ± 0.14***Δ
V (OVX+PBCR)	14	2.96 ± 0.28***Δ	2.65 ± 0.62***ΔΔ	2.71 ± 0.22Δ	2.42 ± 0.26Δ	1.93 ± 0.20***Δ

注:与 sham 组比较 * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ 与 OVX 组比较 Δ $P > 0.05$, ΔΔ $P < 0.05$, ΔΔΔ $P < 0.01$

3 讨论

激素的变化在骨质疏松症发生与发展中起重要作用,雌激素水平下降是导致绝经后骨质疏松症的重要发病因素亦为众多的临床资料所证实。大量实验表明去除双侧卵巢大鼠可引起骨代谢的各种变化,包括不同部位骨量的降低、骨组织形态学的改变、骨生物力学性能的下降、骨基质的变化及体内激素的相应变化等^[5-6]。目前去势大鼠已成为实验室研究雌激素缺乏时骨代谢改变及研究药物防治的主要模型。在本实验中,去势鼠股骨骨密度降低主要发生在松质骨较多的部位(股骨头、粗隆间、踝间窝上)表明去势引起的骨丢失,松质骨的丢失快于密度骨。去势鼠的 TFS%和 TRS%均明显升高,表明骨形成和骨吸收均升高,而骨量(TBV%)明显下降,提示去势引起高转换型骨质疏松,生化检测进一步证实这一点,代表骨形成的 AKP、BGP 和代表骨吸收的尿 HOP 均明显升高。去势引起血 Ca 下降,进而调节血 Ca 的重要激素 PTH 和 CT 也发生变化。PTH 和 CT 均升高,在这里 PTH 升高是血 Ca 下降引起的,是主要的变化,而 CT 升高是为了维持激素平衡而代偿性升高。

补肾方剂可提高去势大鼠血 Ca 浓度,可延缓去势大鼠的骨量丢失,TFS%和 TRS%的下降表明骨形成和骨吸收均下降,但与去势鼠相比,仍处于较高的骨转移水平,这也是生化指标中表示骨形成和骨吸收的指标没有下降的原因。股骨各部位骨密度均提高,特别是在股骨颈和股骨中段部位甚至超过假术动物,显示出“壮骨”作用。

健脾方剂可提高去势大鼠血 Ca 浓度,但骨组织形态计量学显示其并不延缓去势大鼠的骨量丢失。股骨骨密度检测表明在股骨颈处骨

密度有增高趋势,但统计学无显著性差异。

活血化瘀中药可提高去势大鼠血 Ca 浓度,延缓去势大鼠的骨量丢失,但实验数据表明其作用弱于补肾方剂。骨密度检测表明其仅使去势大鼠股骨颈处骨密度升高。

通过比较性研究看到补肾中药有较显著的延缓去势后骨量丢失作用。活血化瘀中药有一定的作用而健脾方剂基本无作用。在动物实验中比较中医的治法治则是一种尝试。中医临床的精华是辩证施治,在绝经后骨质疏松症中均可能伴有肾虚、脾虚和血瘀症状,因而这三种治则均可能有效,但通过基础研究提示:临床在治疗骨质疏松症时应以补肾为主。另一方面,在中医理论中补肾法和活血化瘀法是通过不同环节起作用的,既然两种方法均有效,就可以认为缺乏雌激素的骨量丢失是机体多环节紊乱的共同结果,因而治疗上可以从多个位点进行干预。

参考文献

- 1 黄艳红,叶雪倩. 补肾中药片对围绝经期妇女骨质疏松代谢的影响. 中国中西医结合杂志,1993,13:522
- 2 沈霖,杜靖远,杨家玉等. 补肾法防治绝经后妇女骨丢失的研究. 中国中西医结合杂志,1994,14:515
- 3 章明放,张乃鑫,谭郁彬. 运动对雌性大鼠去势后骨质疏松症的作用——骨组织形态计量学观察. 中华骨科杂志,1994,14:365
- 4 王濤,程秀珍,蔡恩鸿等. 实验性氟中毒的骨骼 X 线表现及病理基础. 中华放射学杂志,1992,26:552
- 5 崔伟,刘成林,史之祯等. 卵巢切除大鼠血清甲状旁腺素、降钙素变化与骨质量降低. 中国骨质疏松杂志,1996,2:22
- 6 陶天遵,陶树青,吕嵩等. 维生素 K₃ 对去卵巢大鼠骨质疏松预防作用的实验研究. 中国骨质疏松杂志,1996,2:27
- 7 Mosekilde L, Danielsen CC, Knudsen UB. The effect of aging and ovariectomy on the vertebral bone mass and biomechanical properties of mature rats. Bone 1993;14:1-6
- 8 Peng Z, Tuukkanen J, Zhang H, et al. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. Bone 1994;15(5):523-532