

天灸防治去卵巢大鼠骨质疏松的实验研究

李学武 李晓泓 张露芬 田阳春 张冰 王磊 王昱 杜宇颖 谷世喆 刘忠厚

摘要 在中医“肾主骨”的理论指导下,许多学者应用补肾壮骨法研制出了疗效肯定,副作用小的防治骨质疏松症中药制剂,但均需较长时间的服用,可能会加重胃炎、溃疡等内脏功能障碍的骨质疏松患者的负担。为了寻找新的治疗途径和方法,我们选用了天灸这种中医外治法,并进行了天灸防治骨质疏松大鼠的实验研究。结果表明:天灸可使去卵巢大鼠的血中碱性磷酸酶的含量增加;在服用钙尔奇 D 的同时,应用天灸可使股骨髓腔面积扩大的程度减弱,对皮质面积影响不大,抑制股骨近 1/3 段矿盐的丢失;并在服用钙尔奇 D 的同时,应用天灸还可使血中骨钙素增加,血清抗酒石酸盐酸性磷酸酶含量下降。使腰椎骨密度、载荷和刚度有所增加。结果提示:天灸法可刺激成骨细胞的活性增加骨形成,同时可在一定的程度上抑制骨吸收,减少骨量的丢失,提高骨骼抵抗外力的能力。特别是天灸的治疗途径是经过外部俞穴刺激,内部自身调节而实现的,可以避免大量外源性给药造成胃肠负担过重,以及引起自身的某些功能的抑制,且天灸用的中药膜成本低廉,使用较方便,是值得进一步研究的新方法。

Prevention and treatment of osteoporosis in ovariectomized rats by celestial moxibustion

Li Xuewu, Li Xiaohong, Zhang Lufen et al.

Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100013, China

Abstract Based on the theory of traditional Chinese medicine that “Kidney controls bones”, many scholars, with the aim of tonifying the kidney to strengthen the bones have produced herbal medicines that have a definite effect on osteoporosis. However, all these medicines need to be taken for a long time, and can possibly aggravate a patient's pre-existing conditions such as gastritis and gastric ulcer. In order to provide a new way of treating osteoporosis, we have chosen celestial moxibustion (CM), one of external treatment methods in traditional Chinese medicine, and conducted research on the prevention and treatment in laboratory rats. The results indicate that CM therapy can increase AKP levels, increase BGP, and, combined with VitD+Ca, can reduce TRAP levels, abate the degree of femoral bone marrow cavity expansion, inhibit loss of mineral salts in the proximal 1/3 of the femur, and cause a moderate increase in the load capacity and bone stiffness of lumbar vertebrae. The results indicate that CM treatment can stimulate the activity and production of osteocytes, and has a definite effect on controlling (deossification/bone absorption) and decreasing bone loss and increase skeletal resistance to external forces. Since CM is an external treatment method, working through the stimulation of acupoints on the surface of the body so that the body itself makes an in-

ternal adjustment, we can avoid the use of many exogenous herbs which increase burden on stomach and intestines. In addition, the cost of the herbs (Mo) used in CM is minimal. This method is practical and worth further research.

骨质疏松症是绝经后妇女常见代谢性疾病。其特征是骨量减少, 骨组织的显微结构改变, 骨折的危险性增大。近年来, 在“肾主骨”中医理论指导下, 许多学者应用补肾壮骨法研制出了疗效肯定副作用小的中药制剂, 但均需较长时期的服用, 对于那些胃炎、溃疡等内脏功能障碍的骨质疏松患者可能加重其负担; 此外大量外源性给药还会引起机体内在功能的抑制。为了寻找新的治疗途径和方法, 我们选用了天灸这种特殊的中医外治法。并进行了天灸防治骨质疏松大鼠的实验研究, 取得了初步结果, 现将有关情况小结如下:

1 材料与方法

1.1 动物模型制备及分组: 10月龄 Wistar 种雌性大鼠由中国医学科学院实验动物繁育场提供。体重 280~310g。大鼠随机分成 6 组。第 1 组为正常对照组 (不摘双侧卵巢, 简称正常组)。其余鼠均在乙醚麻醉下由腹腔摘除双侧卵巢。术后再将存活鼠重新随机分 5 组。第 2 组为造模空白组 (简称造模组); 第 3 组为外敷天灸中药膜组 (简称天灸组); 第 4 组为口服钙尔奇 D 组 (简称服药组); 第 5 组为口服钙尔奇 D, 同时外敷天灸中药膜组 (简称天灸+药组)。

1.2 实验用药: (1) 用于天灸的中药膜是在临床经验用方的基础上加减提炼而成。主要由补肾壮骨、活血化瘀, 以及对穴区有较强刺激作用的中药组成 (淫羊藿、刺五加、丹参、蛇床子、辣椒等) 由北京中医药大学中药系制剂室加工制成 200% 的天灸用中药膜。(2) 钙尔奇 D 为苏州立达公司提供, 每片钙尔奇 D 含 600mg 元素钙, 125 国际单位的 VitD₃。

1.3 治疗方法: 所有大鼠均于造模 3 个月后开始治疗 (1) 天灸法: 在大鼠背侧肾俞穴剪净 1.5cm 见方的鼠毛、露出皮肤。每次外敷约

0.5g 的天灸药膜, 24~36 小时后自然干落, 穴区多呈潮红, 或起小泡。每周二次, 连敷 6 个月。

(2) 服药法: 大鼠口服钙尔奇 D 量按人鼠换算法计算, 加在相应组鼠料中喂食。每日 1 次, 连喂 6 个月。正常组、造模组不用治疗。所有鼠均在同等条件二级动物室饲养, 饮用自来水。

1.4 取样: 停止治疗 48 小时后取样。(1) 血标本: 乙醚麻醉后腹主动脉取血, 离心分离血清备用。测 TRAP 的血清样品需立即加入酸性稳定剂 (该剂由北京积水潭医院生化研究室提供)。(2) 骨标本: 取血后的大鼠立即拆取股骨椎骨, 剔尽附着处软组织, 放入超纯水, 冰箱保存 (4℃)。

1.5 分析方法: (1) 血生化分析: 血清钙用磷钼基酚酞络合酮法; 血清磷用钼酸胺法; 血碱性磷酸酶 (AKP) 用酶动力学法; 血清骨钙素 (BGP) 用放射免疫法。放射免疫分析试剂盒由北京中国原子能科学研究院提供; 血清抗酒石酸盐酸性磷酸酶 (TRAP) 用酶动力学法。

(2) 骨标本分析: 股骨: 用 QTS-25 型流变仪 (英国) 测量股骨截面的皮质骨内外径, 分析获得股骨皮质厚度、皮质面积、髓腔面积。取另一根股骨去除两端干骨后部分, 用牙科锯截取近 1/3 端股骨干, 105℃ 烤干至恒重, 放入灰化炉中 600℃ 48 小时灰化, 计算矿盐含量 (g/g)。

椎骨: 骨密度用美国 Lunar DPX 型双能 X 线骨密度仪测量。用 WD-1 型电子万能试验机 (量程 25kg 加载速度 2mm/min) 测骨载荷和刚度。

2 结果

各组大鼠股骨近 1/3 段矿盐含量、股骨髓腔面积, 皮质面积及皮质厚度变化见表 1。各组大鼠血清 Ca、P、TRAP、AKP 的变化见表 2。各组大鼠血清骨钙素变化 ($\bar{x} \pm s$) 见表 3。各组大

鼠腰椎最大载荷、刚度、骨密度变化见表 4。

3 讨论

在女性绝经后,由于体内雌激素水平急剧下降,骨吸收大于骨形成,最终使骨代谢呈现负钙平衡,骨量逐步丧失^[1]。现已证实:去势大鼠

与人类绝经后骨质疏松症有许多相似之处,包括松质骨的丢失大于皮质骨;属高转换型;肠道钙吸收障碍和 VitD 代谢的变化以及对各种治疗药物的反应^[2]。目前常用摘除成熟大鼠双侧卵巢的方法,造成具有类似人类绝经后骨质疏松的模式。从本文造模组正常组的骨矿盐含量,

表 1 各组大鼠股骨近 1/3 段矿盐含量、股骨髓腔面积、皮质面积及皮质厚度变化

组别	例数	股骨 1/3 段矿盐(g/g)	髓腔面积(mm ²)	皮质面积(mm ²)	皮质厚度(mm)
正常组	8	0.636±0.024	3.426±0.197	8.273±1.160	0.991±0.158
造模组	8	0.539±0.080 ^A	4.684±0.763 ^Δ	5.831±1.397 ^{ΔΔ}	0.609±0.137 ^{ΔΔ}
天灸组	8	0.634±0.030 ^{**}	4.023±0.775 [*]	6.014±0.737 ^{ΔΔ}	0.767±0.196
服药组	7	0.634±0.017 ^{**}	4.587±0.456 ^{ΔΔ}	6.324±1.178 ^{ΔΔ}	0.737±0.192
天灸+药组	7	0.649±0.024 ^{**}	4.296±0.876	6.676±1.821 ^{ΔΔ}	0.823±0.137 [*]

注:与造模组比 * $P<0.05$ ** $P<0.01$;与正常组比 $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$;下表同

表 2 各组大鼠血清 Ca、P、TRAP、AKP 变化($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	血清 Ca(mmol/L)	血清磷(mmol/L)	AKP(IU/L)	TRAP(B-L)
正常组	8	2.75±0.132	2.80±0.525	112.44±30.69	2.37±0.657
造模组	7	2.88±0.167	3.12±0.646	126.84±15.56	3.250±0.476
天灸组	8	2.90±0.073	3.73±0.505	172.00±22.78 ^{**ΔΔ}	3.041±0.674
服药组	7	3.06±0.281	3.39±0.309	157.52±27.15 ^{*Δ}	2.516±0.817
天灸+药组	7	2.82±0.186	3.16±0.783	171.50±27.40 ^{**ΔΔ}	1.888±0.401 ^{**}

表 3 各组大鼠血清骨钙素变化($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	血清骨钙素(ng/ml)
正常组	7	9.60±4.27
造模组	7	15.62±5.18 ^A
天灸组	7	23.39±16.80 ^A
服药组	7	22.98±18.90
天灸+药组	7	29.75±14.51 ^{*Δ}

骨皮质厚度骨密度等比较看,均已呈现显著性

差异,说明本文建立的骨质疏松模型成立。

骨质疏松症,属中医的“骨痿”“骨痹”范畴。其发病与肾气的盛衰密切相关,大量研究已证实内服补肾壮骨中药对本病具有肯定的疗效^[3]。本研究所用的天灸属中医外治法,它是通过在大鼠肾俞穴贴敷中药膜造成对穴区较持久的刺激达到振奋肾气,调动机体潜在机能,从本研究的结果分析看,天灸的确具有一定防治去卵巢大鼠骨质疏松的作用,可体现在:

表 4 各组大鼠腰椎最大载荷、刚度、骨密度变化($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	最大载荷(kg)	刚度(kg/mm)	骨密度(g/cm ³)
正常组	7	20.08±3.11	32.380±11.338	0.234±0.08
造模组	7	13.51±4.04 ^{ΔΔ}	17.227±7.487 ^Δ	0.217±0.010 ^Δ
天灸组	7	16.35±2.89	24.354±6.049	0.225±0.005
服药组	7	15.93±5.11	21.74±13.486	0.227±0.007
天灸+药组	7	17.90±1.52 [*]	32.190±12.217 [*]	0.232±0.007 [*]

3.1 可使成骨细胞的活性增加:成骨细胞是骨代谢的主要功能细胞。成骨细胞内含有大量的

碱性磷酸酶,血中碱性磷酸酶 50%来源于骨,从某种程度上血 AKP 的活性可反映成骨细胞

的活跃状态。血清骨钙素也是由成骨细胞合成、分泌的一种维生素 K 依赖性钙结合蛋白,血清骨钙素可反映成骨细胞特别是新形成成骨细胞的活性及状态,因此它是特异性骨更新指标^[6]。实验研究已证明:去势鼠血碱性磷酸酶活性增加^[7]。血清骨钙素的水平也有上升之势^[8]。通常这种活性增加及含量的上升是一种代偿保护作用的体现,它们多是伴随着骨吸收的亢进而发生的。本研究发现天灸组血清 AKP 达到较高水平,天灸+药组的血清骨钙素与模型组比有显著性差异($P<0.05$),说明天灸法可能刺激了成骨细胞的活性。另有研究表明:血清总骨钙素中,有一部分是羟化作用强的结合型 BGP,它可促进钙盐沉积。同时还含有游离型 BGP,它们不能被有效地羟化,因而使钙盐沉积障碍^[9]。由于我们检测的是血清总骨钙素,难以直接说明对钙盐沉积的作用。但是从股骨近 1/3 段矿盐含量、骨皮质厚度,以及腰椎的力学性能的改善状况分析可间接推断:天灸可能促使血中结合型 BGP 含量增加或使游离型 BGP 减少,最终使钙盐沉积增加。

3.2 对破骨细胞的活性有一定抑制作用:血清抗酒石酸盐酸性磷酸酶(TPAP),主要是由破骨细胞释放到血中的。血中 TRAP 的水平基本可反映破骨细胞的活性和骨吸收的状态^[4]。本研究结果显示,在服用钙尔奇 D 的同时,天灸可使血中 TRAP 明显降低, $P<0.01$ 。又骨的内膜面的变化主要表现为骨吸收,在一定程度上表现为髓腔扩大^[2]。天灸法可使髓腔扩大的程度减弱,甚至控制髓腔面积的扩大,与正常组相比无显著性差异($P>0.05$),说明天灸可能在某种程度上抑制了骨吸收。

3.3 可使骨量增加并改善骨的生物力学性能:摘除双侧卵巢大鼠的骨量变化,通常表现为骨皮质变薄,髓腔变大,矿盐含量减少,本研究结果表明:所有天灸各组均可使股骨近 1/3 段矿盐含量增加($P<0.05\sim P<0.01$)。(有资料已证实:股骨近 1/3 段是股骨代谢相对活跃的部分^[10]。)天灸组可使髓腔面积扩大的程度减弱,

在服药同时天灸还可使股骨皮质明显增厚($P<0.05$)。并使腰椎骨密度,载荷和刚度增加。总之使骨抵抗外力作用增加。

3.4 与钙尔奇 D 有正协同作用:钙尔奇 D 是目前公认的疗效较好的补钙制剂,本研究天灸加钙尔奇 D 组比单纯用钙尔奇 D 组效果更优,说明二者联用防治骨质疏松有正协同作用。天灸法本身是否影响了肠道吸收功能或刺激了骨代谢的其它环节还有待进一步证实。

天灸用中药膜内含补肾化痰的中药。现代研究已证实:有些中药可对抗骨质疏松。如:淫羊藿可使去势大鼠的破骨细胞产生抑制,并能增加成骨细胞的衍化和增殖,使骨形成增加,骨吸收减少^[11]。刺五加口服药对减轻模拟失重大鼠骨丢失有明显作用,使骨矿绝对含量丢失减少 29%^[12]。丹参中丹参酮,蛇床子的乙醚提取物均具有激素样作用,可抑制骨吸收,减少骨丢失,维持骨密度^[13,14]。天灸用中药膜含有上述中药成份,它们与另外一些中药混合制成粘附性较强,并且有一定渗透作用的刺激性强的药膜,在穴位的贴敷过程中是否被透皮吸收,是值得深入探讨与证实的。

总之,天灸法可抑制骨吸收,增加骨形成,对骨代谢产生一定的影响,减少骨量的丢失,提高骨骼抵抗外力的作用特别是它的治疗途径是经过外部俞穴刺激,内部自身调节而实现的,可以避免外源性给药造成胃肠负担过重,以及引起机体自身的某些功能的抑制,天灸用中药膜成本低廉,使用较方便,是值得进一步研究新方法。

参 考 文 献

- 1 Erikssen EF. Cancellous bone remodeling in type 1 (postmenopausal) osteoporosis. Quantitative assessment of rates of formation, resorption and bone loss at tissue levels. *J Bone Min Res*, 1990, 5: 311.
- 2 Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, et al. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int*, 1989, 45: 360.
- 3 刘忠厚主编. 骨质疏松研究与防治. 北京: 化学工业出版社, 1994, 10.

导致骨质疏松^[6]。在本文中,表现为大鼠腰椎的骨小梁表面不光滑、粗细不均,骨吸收陷窝增多,骨小梁变细、甚至断裂而留下残端,使骨连接遭到破坏,出现骨小梁之间的间隙加大,骨小梁数量减少等。骨结构的微小变化就可使骨的强度明显下降^[7]。上述的骨三维结构变化必将导致骨松质的整体力学强度明显下降,这可能是造成显微骨折的主要原因。在正常情况下,显微骨折可通过骨的重建过程得以修复,但受糖皮质激素—泼尼松影响的骨骼,其骨形成减少,显微骨折修复能力降低,于是显微骨折积累,轻微外力打击即可引起骨折。因此,临床上,长期使用糖皮质激素的病人常出现骨质疏松症,甚至并发骨折。

芪藿肾宝是一种由黄芪、白术和淫羊藿组成的复方中药,根据《本草纲目》记载,它们均有强筋壮骨之功效。现代研究证明:淫羊藿、黄芪的作用是多方面的^[8]。它们能增强机体免疫功能,对氢化可的松抑制后的网状内皮系统吞噬功能有明显提高。增强机体细胞的生理代谢,对在试管内培养中的鸡胚股骨生长均有明显的促进作用^[9,10]。而且有抗骨质疏松作用^[3~5]。此外,还有类似性激素的作用,使受糖皮质激素影响的动物体内分泌减少的雄性激素得到补充。性激素是骨代谢的强大调节剂,能促进骨的代谢,以对抗糖皮质激素所引起骨的不良改变。三种中药组合,能增强造骨的功效(本室的另一个实验的结果证明,芪藿肾宝能使服用泼尼松的

大鼠的骨小梁数量和骨小量的面积显著性增加及骨小梁的间隙减小,使骨量保持基本正常的水平)。在本文中,芪藿肾宝治疗组的大鼠腰椎的松质骨能保持正常的三维结构,从而实现良好的力学性能。提示:在使用糖皮质激素的同时加用芪藿肾宝,可防止类固醇性的骨质疏松症及骨折的出现。

参考文献

- 1 秦银河,莫华根,蒋克钧,等. 肾移植术后糖皮质激素引起的骨质改变. 中华器官移植杂志,1988,9(2):61.
- 2 Adinoff AD, Hollister JR. Steroid-induced fractures and bone loss in patients with asthma. N Engl J Med, 1983, 309:265.
- 3 谢华,吴铁,黄莲芳,等. 黄芪水提液对大鼠的类固醇性骨质疏松的作用. 中草药,1997,29(1):371.
- 4 李青南,廖进民,吴铁,等. 淫羊藿提取液防治激素所致大鼠骨质疏松的实验研究. 中国药理学杂志,1996,31(8):467.
- 5 李朝阳,吴铁,林柏云,等. 芪藿肾宝与己烯雌酚对去卵巢大鼠骨代谢的影响. 中国骨质疏松杂志,1997,3(1):67.
- 6 Lukert BP, Raisz LG. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. Ann Intern Med, 1990, 112:352.
- 7 Bagi CM, Miller SC, Bowman BM, et al. Differences in overloaded and under-loaded femurs from ovariectomized rats, comparison of bone morphometry with torsional testing. Bone, 1992, 13:35.
- 8 阴康. 现代中药研究与临床应用. 北京:学苑出版社, 1993:592~595.
- 9 高子范,马克昌,杨宗智,等. 黄芪注射液对培养中鸡胚软骨生长的促进作用. 中草药,1988,19(5):18.
- 10 高子范,马克昌,杨宗智,等. 淫羊藿注射液对试管内鸡胚股骨生长的促进作用. 中西医结合杂志,1985,5(3):172.
- 9 崔伟. 卵巢切除大鼠血清三种骨钙素变化与骨丢失. 中国骨质疏松杂志,1997,(3):17.
- 10 崔伟. 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(2):26.
- 11 李青南. 淫羊藿提取液对去卵巢大鼠骨代谢的影响. 中草药,1993,24(12):637.
- 12 刘成林. 高磷摄入和给予刺五加对悬吊大鼠肾脏、肌肉与骨质的影响,见:刘忠厚主编,骨质疏松研究与防治. 北京:化学工业出版社,1994:258.
- 13 李隆敏. 丹参酮防治绝经后骨质疏松症. 中国骨质疏松杂志,1996,2(1):78.
- 14 廖进民. 蛇床子总香豆素对激素致大鼠骨质疏松的骨密度影响. 骨质疏松研究与防治(第二卷),1996:191.

(上接 61 页)

- 4 薛延. 骨质疏松症的生化诊断. 中国骨质疏松杂志, 1995,1(1):58.
- 5 闫景龙. 低负荷对大鼠皮质骨结构和力学性能影响的实验研究. 中国骨质疏松杂志,1996(3):39.
- 6 刘忠厚主编. 骨质疏松症. 北京:化学工业出版社,1992, 173.
- 7 沈霖. 补肾密骨液对实验性骨质疏松症的影响. 中医正骨,1994,6(4):3.
- 8 Delmas PD, Demiaux B, Malaval L, et al. Serum bone Gla protein is not a sensitive marker of bone turnover in Paget's disease of bone. Calcif Tissue Int, 1986, 38:60.