

补肾中药复方延缓老年雄性大鼠股骨皮质骨、松质骨骨量增龄性丢失的实验研究

张戈 史万忠 石印玉 曹月龙 秦红友 张倩 宫斌 莫启忠

摘要 目的 研究补肾中药复方延缓老年大鼠股骨皮质骨、松质骨骨量增龄性丢失的作用。方法 36只24月龄SD雄性大鼠随机分为24月龄本底对照组、30月龄增龄对照组、补肾中药复方低剂量组、补肾中药复方高剂量组,每组各9只。低剂量组、高剂量组均自24月龄给药至30月龄。各组相应处理以后分别测定各组大鼠左侧股骨以松质骨为主的近段、远段以及以皮质骨为主的中段的骨密度。**结果** 补肾中药复方低剂量组大鼠股骨各段骨密度增龄性减少率出现延缓的趋势;高剂量的补肾中药复方则能明显延缓股骨各段骨密度增龄性减少率。**结论** 补肾中药复方具有量效依赖性地延缓大鼠皮质骨、松质骨增龄性骨丢失的作用。

关键词 补肾 增龄 骨密度 皮质骨 松质骨

Effect of a compound 'kidney tonifying' Chinese herbal preparation on femur cortical and trabecular bone loss induced by aging in aged male rats

Zhang Ge, Shi Wanzhong, Shi Yinyu, et al

Institute of Traumatology and Orthopedics, Shanghai Academy of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China.

Abstract Objective To study quantitatively the effect of a compound 'kidney tonifying' Chinese herbal preparation (KTP) on femur cortical and trabecular bone loss induced by aging in aged male rats. **Methods** Thirty-six male Sprague-Dawley rats, 24 months old, were divided at random into four groups: Baseline control group (24 months old), aging control group (30 months old), high dose KTP group, and low dose KTP group, 9 rats each. The rats in high dose and low dose groups were given KTP for six months. Bone mineral density (BMD) in trabecular bone of proximal and distal segments of left femur and cortical bone of middle segment was measured after every group had received appropriate treatment. **Results** The decreases in BMD induced by aging in corresponding femur segment were slightly delayed in low dose KTP group and significantly delayed in high dose KTP group. **Conclusions** KTP can delay cortical and trabecular bone losses induced by aging in aged rat in a dose-effect dependent manner.

Key words Kindney tonifying Aged rats Bone mineral density Cortical bone

以往的实验研究显示按照中医“肾主骨”理论设计的补肾类中药复方能够分别防治由卵巢

本研究系国家自然科学基金资助项目(项目编号:39170876)

作者单位:200032 上海市中医药研究院骨伤科研究所(张戈、史万忠、石印玉、曹月龙);上海中医药大学基础医学院中医基础实验室(秦红友、张倩、宫斌、莫启忠)

切除、糖皮质激素、维甲酸诱导的骨质疏松模型大鼠的骨量丢失^[1-4]，但是补肾类中药复方对于单纯由增龄因素诱导的老年性骨质疏松模型骨量的影响的研究尚不多见。因此，本项课题通过比较24月龄雄性大鼠以及30月龄雄性大鼠的股骨不同部位的骨量变化，旨在定量研究由首乌、苁蓉等数种天然植物组成的补肾中药复方延缓老年大鼠股骨皮质骨、松质骨骨量增龄性丢失的作用，为临床应用中医“肾主骨”理论防治老年性骨质疏松提供实验证据。

1 材料和方法

1.1 实验动物：24月龄 SD 雄性大鼠 36 只，(450±20) g，由上海中医药大学实验动物中心提供(上海市医学实验动物管理委员会实验合格证书号 0017500)。

1.2 动物饲养：各组大鼠分笼饲养；自由摄取标准大鼠饲料(钙 1.01%，磷 0.78%)；自由饮用蒸馏水；室温(18±2)℃。

1.3 实验药物：应用蒸馏水将补肾中药复方胶囊制剂药粉配制成为悬浊液(浓度 0.6 g/ml)，低剂量组按照 10 ml/kg 体重的剂量给药，高剂量组按照 30 ml/kg 体重的剂量给药。

1.4 动物分组与相应处理：36 只 24 月龄 SD 雄性大鼠随机分为 24 月龄本底对照组、30 月龄增龄对照组、补肾中药复方低剂量组、补肾中药复方高剂量组，每组各 9 只。24 月龄本底对照组大鼠适应性正常喂养一周以后，全部处死；30 月龄增龄对照组大鼠自 24 月龄正常喂养至 30 月龄时全部处死；低剂量组、高剂量组大鼠均自 24 月龄正常喂养的同时自由饮用补肾益精中药复方制剂悬浊液，至 30 月龄时全部处死。各组相应处理以后分别测定左侧股骨近段、中段、远段的骨密度。

1.5 实验仪器：SPA-N 型单光子骨密度仪(中国成都测试技术研究院)，放射源为¹²⁵I。

1.6 股骨近、中、远段骨密度及其测定：处死大鼠以后，取出左侧股骨，应用 70% 乙醇固定，剥离软组织；使用 HB 铅笔在剥离软组织的股骨的近、中、远段分别标记三条线(A 线：股骨近端

股骨小转子根部远侧；B 线：股骨远端股骨骺面近侧；C 线：A 线与 B 线之中点)。沿标记的每一条线分别进行骨横越扫描三次，计算三次获得的骨密度的平均值，作为此线代表的股骨某段的骨密度。

1.7 统计学处理：各组测定值以均数±标准差表示，两组均数之间比较采用双侧 *t* 检验法，显著性水准取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 增龄对老年雄性大鼠股骨各段骨密度的影响：详见表 1。由表 1 可知，30 月龄雄性大鼠股骨各段骨密度明显低于 24 月龄雄性大鼠($P<0.05$)。

2.2 补肾中药复方对老年雄性大鼠股骨各段骨密度的影响：详见表 1。由表 1 可知，与 30 月龄空白对照组比较，低剂量组近段、中段、远段骨密度分别增加了 18% ($P>0.05$)、16% ($P>0.05$)、0.5% ($P>0.05$)，高剂量组近段、中段、远段骨密度分别增加了 30% ($P<0.05$)、23% ($P<0.05$)、12% ($P<0.05$)；但是，与 24 月龄空白对照组比较，高剂量组各段骨密度尚未达到 24 月龄的水平($P<0.05$)。

表 1 补肾中药复方对老年雄性大鼠股骨各段骨密度的影响 (g/cm²)

分组	近段骨密度	中段骨密度	远段骨密度
本底对照组 (24月龄)	0.27±0.01	0.31±0.03	0.23±0.02
增龄对照组 (30月龄)	0.19±0.03 ^{△△}	0.22±0.03 ^{△△}	0.18±0.02 ^{△△}
低剂量组	0.22±0.03*	0.25±0.04*	0.18±0.01*
高剂量组	0.25±0.01** ^{△△}	0.27±0.01** ^{△△}	0.20±0.01** ^{△△}

注：与 30 月龄增龄对照组比较 * $P>0.05$ ** $P<0.05$ ，与 24 月龄本底对照组比较 ^{△△} $P<0.05$ ； $n=9$

3 讨论

3.1 老年性骨质疏松模型骨丢失状况的判定
根据老年性骨质疏松症区别于绝经后骨质疏松症的特征^[5]，判定大鼠增龄性骨量丢失模型是否复制成功主要取决于大鼠经过增龄因素的

自然诱导以后发生的皮质骨、松质骨的骨量丢失的严重程度。美国学者 Dike N. Kalu 报道大鼠24月龄以后开始出现增龄性骨量丢失^[6]。但是尚未观察骨中松质骨、皮质骨各自的具体丢失状况。本项研究发现30月龄雄性大鼠股骨以松质骨为主的近段、远段骨密度以及以皮质骨为主的股骨中段骨密度均明显低于24月龄雄性大鼠($P < 0.05$),其中股骨近段骨密度减少了30%($P < 0.05$),中段骨密度减少了29%($P < 0.05$),远段骨密度减少了22%($P < 0.05$),表明雄性大鼠24月龄以后出现的增龄性骨量丢失既包括皮质骨的丢失,也包括松质骨的丢失,这种骨丢失状况与临床老年性骨质疏松基本一致^[8],提示比较典型的大鼠增龄性骨丢失模型复制成功。

3.2 延缓老年性骨质疏松模型骨丢失作用的研究:补肾中药复方从大鼠24月龄开始出现自发性骨丢失的时候给药,到30月龄的时候处死,历时6个月的给药时间,相当于12月龄大鼠骨重建周期的9倍^[7]。如果与30月龄增龄对照组比较,分析低剂量组、高剂量组大鼠股骨各段骨密度,那么实验结果提示低剂量组大鼠股骨各段骨密度出现升高的趋势($P > 0.05$),高剂量组大鼠股骨各段骨密度出现显著升高($P < 0.05$)。如果与24月龄本底对照组比较,分析30月龄增龄对照组、低剂量组、高剂量组大鼠股骨各段骨密度增龄性减少率,那么实验结果亦提示低剂量组大鼠的骨密度增龄性减少率出现延缓的趋势,高剂量组大鼠的骨密度增龄性减少率则出现明显延缓。可见,补肾中药复方具有量效依赖性地延缓大鼠皮质骨、松质骨增龄性骨丢失的作用。

3.3 延缓骨丢失作用机制的推测:国外学者相继报告大鼠由于肾脏 1α 羟化酶活性随着增龄逐步下降^[9-11], $1,25(\text{OH})_2\text{Vit D}_3$ 的合成受到影响,肠钙吸收发生障碍,以致机体调节血清甲状旁腺激素(PTH)水平反馈性上升,在24月龄以后日益明显^[6],导致骨吸收亢进;对于PTH而言,松质骨不如皮质骨敏感,PTH介导骨吸收亢进的部位主要在皮质骨,因为临床甲状旁

腺功能亢进的患者出现的继发性纤维囊性骨炎通常见于皮质骨丰富的长骨^[12]。因此,大鼠24月龄以后出现的以皮质骨为主的股骨中段骨丢失的机制主要与血清PTH的上升密切相关。那么大鼠24月龄以后以松质骨为主的股骨近段、远段出现的骨丢失又主要与何种因素相关呢?从骨重建的功能细胞(成骨细胞、破骨细胞)定位的体现骨代谢、骨转换的骨表面分析,同体积的松质骨的骨表面是同体积的皮质骨的6倍;显然,若骨表面上的功能细胞一旦发生异常,则松质骨的骨重建特征就会灵敏地出现变化。Liang 报告老年大鼠成骨细胞碱性磷酸酶基因以及I型胶原基因在转录水平的表达低下^[13],提示老年大鼠松质骨表面成骨细胞介导的骨形成功能增龄性减弱是造成大鼠24月龄以后松质骨发生骨重建负平衡的重要因素。由此推测,补肾中药复方量效依赖性地延缓大鼠皮质骨、松质骨增龄性骨丢失的作用机制似与降低大鼠血清甲状旁腺激素水平和提高成骨细胞活性有关。目前,国内学者报道补肾类中药复方降低骨质疏松模型血清甲状旁腺激素水平的机制可能与促进模型肠钙结合蛋白CaBp-D9K基因的表达有关^[14]。至于补肾中药复方如何提高老年大鼠成骨细胞活性尚且需要提供细胞生物学证据进行证实。

4 小结

补肾中药复方能够量效依赖性地延缓老年大鼠皮质骨、松质骨增龄性骨丢失;并且这一作用似与补肾中药复方多环节多层次地调节失衡的骨重建,最终达到促进骨形成、抑制骨吸收。

致谢:本项研究的数据分析得到了河南省洛阳正骨研究所生物医学工程研究室主任朱太咏副教授的帮助

参 考 文 献

- 1 沈培芝,陈东煜,张戈,等.补肾中药复方防治地塞米松致雄性大鼠骨质疏松及其生化机制探讨.中国中西医结合杂志,1998,18(5):290-292.
- 2 沈培芝,徐宇,张戈,等.比较密骨胶囊与维生素D₃对糖皮质激素形骨质疏松模型骨量、骨强度影响的研究.中国骨质疏松杂志,1997,3(3):9-11.

- 3 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):67-69.
- 4 王洪复,励杏娣,金慰芳,等. 补肾与富钙中药对维甲酸诱发大鼠骨质疏松防治作用的观察. 老年医学与保健,1997,3(3):6-8.
- 5 刘忠厚,潘子昂,王石麟. 原发性骨质疏松症诊断标准的探讨. 中国骨质疏松杂志,1997,3(1):1-15.
- 6 Kalu DN, Harding RH, Cockerham R, et al. Aging and dietary modulation of rat skeleton and parathyroid hormone. *Endocrinology*, 1984,115(4):1239-1247.
- 7 Akamine T, Jee WSS, Ke HZ, et al. Bone, prostaglandin E₂ prevents bone loss and adds extra bone to immobilized distal femoral metaphysis in female rats. 1992,13:11.
- 8 黄国良. 骨质疏松症的临床表现和检查诊断. 见:曹建中,何玉香,吕维善主编,老年骨内科学. 北京:人民卫生出版社,1996. 157-159.
- 9 Henry KM, Kon SK. The relationship between calcium retention and body stores of calcium in the rat; effect of age and vitamin D. *Br J Nutr*, 1953,7:147.
- 10 Bengel HM, Mathias RS, Perkins JH, et al. Urinary concentrating effect in the aged rat. *Am J Physiol*, 1981,4:22.
- 11 Gregory JG, Barrows CH. The effect of age on renal functions of female rats. *J Gerontol*, 1981,24:321.
- 12 金世鑫,沈志卫,汪娜. 骨质疏松综合征:骨功能学和临床联系. 中国骨质疏松杂志,1997,3(1):36-39.
- 13 Liang CT, Barnes J, Seedorf JG, et al. Impaired bone activity in aged rats: alterations at the cellular and molecular levels. *Bone*, 1992,13:435-441.
- 14 刘和锦,李恩,刘琨,等. 补肾中药对骨质疏松大鼠 CaBp-D9k 基因表达的影响. 中国骨质疏松杂志,1996,2(3):62-64.

(上接第7页)

步减少,这样雌、孕激素减低和 IL-1 升高可能在体内形成恶性循环,加速了骨量丢失。

IL-2 是活化的 T-淋巴细胞产物,有关 IL-2 对骨量影响的研究很少,目前尚无明确的定论。动物实验表明 IL-2 能够刺激骨吸收^[12], Fujita 等^[9]报道低转换的 I 型骨质疏松的发生和 IL-2 活性升高有关。本文对高转换的 I 型骨质疏松研究结果表明,体内血清中 IL-2 的水平不受绝经和绝经年限的影响,含量很稳定,对骨量也没有直接性影响,与 IL-1 大不相同。本文还对 IL-2 和女性激素间的关系进行了相关分析,结果表明 IL-2 与 LH 呈有意义的正相关。人体内 IL-2 和 LH 呈显著的正相关,说明 IL-2 可能通过促进垂体前叶 LH 的释放,在保护、维持卵巢功能中起作用,从而通过雌、孕激素间接影响女性骨量。

参 考 文 献

- 1 Horowitz MC. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science*, 1993, 260:626.
- 2 唐海,罗先正,任素梅,等. 中国人原发性骨质疏松症诊断标准探讨. 中国骨质疏松杂志,1997,3(4):1.
- 3 Alioa JF. Risk factor for postmenopausal osteoporosis. *Am J Med*, 1985, 78:95.
- 4 Johnston CC, Davison AM, Will EJ, et al. Age-related bone loss. *Barzel Osteoporosis I*. New York, Grune & Stratton, 1980. 91.
- 5 Riggs BL. Serum concentration of estrogen, testosterone and gonadotropins in osteoporosis and nonosteoporosis postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 1973, 36:109.
- 6 徐克慧,杨式之,刘宏传,等. 绝经后骨质疏松患者性激素测定病例对照研究. 中国骨质疏松杂志,1995,1(2):136.
- 7 Ebeling PR, Atley LM, Guthrie JR, et al. Bone turnover markers and bone density across the menopausal transition. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81(9):3366.
- 8 Pacifici R, Rifas L, McCracken R, et al. Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin-1 release. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1989, 86(7):2398.
- 9 Fujita T, Matsui T, Nakao Y, et al. Cytokines and osteoporosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1990, 587:371.
- 10 Cantatore FR, Loverro G, Ingrassio AM, et al. Effect of oestrogen replacement on bone metabolism and cytokines in surgical menopause. *Clin Rheumatol*, 1995, 14(2):157.
- 11 Kalra PS, Fuentes M, Sahu A, et al. Endogenous opioid peptides mediate the interleukin-1-induced inhibition of the release of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone and LH. *Endocrinol*, 1990, 127(5):2381.
- 12 Schneider GB, Barak M, Merzbach D, et al. Effects of interleukin-2 on bone resorption and natural immunity in osteoporotic rats. *Lymphokine Cytokine Res*, 1994, 13(6):335.