

补肾益骨方对去卵巢大鼠骨质疏松症治疗作用的研究

黄明炜 何小波 刘雨银 陶连方 张俊 谢辉

中图分类号: R289.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)06-0447-04

摘要:目的 探讨中药补肾益骨方对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗作用。方法 运用切除大鼠卵巢方法建立去卵巢骨质疏松症模型,随机分为空白对照组、模型组、倍美力组、补肾益骨方组。采用双能 X 线骨密度测定法检测各组实验鼠骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC)、放射免疫分析法和 ELISA 法等检测各组实验鼠血清雌二醇(E_2)、骨钙素(BGP)、抗酒石酸酸性磷酸酶 5b(TRACP5b)和以及尿脱氧吡啶啉(Dpd)。结果 补肾益骨方可明显升高 BMD、BMC,提高血清 E_2 及 BGP 水平,降低 TRACP5b 和 Dpd 含量。结论 补肾益骨方通过调节机体相关内分泌功能,抑制骨吸收,降低骨的转换率,减少骨量丢失,增加骨密度,对骨质疏松症有防治作用。

关键词: 补肾益骨方; 骨质疏松症; 骨密度; 骨钙素; 抗酒石酸酸性磷酸酶 5b

doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.06.015

Effects of Bushen Yigu recipe on prevention and treatment of osteoporosis in ovariectomized rats HUANG Mingwei, HE Xiaobo, LIU Yuyin, et al. Department of Geriatrics, People's Hospital of Shiyan Affiliated Yunyang Medical College, Geriatrics Medical College, Shiyan Hubei 442000, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of Bushen Yigu recipe on treatment of osteoporosis in ovariectomized rats. **Methods** The model of osteoporosis was established by ovariectomy in female rats, and then they were divided into four groups: the test group which was given Bushen Yigu Decoction, the conjugated estrogens group, the model control group and the blank control group. Bone mineral density(BMD), Bone mineral content(BMC) and the level of serum estradiol, bone gamma-carboxyglutamic-acid-containing proteins and tartrate-resistant acid phosphatase 5b and deoxypyridinoline were measured in all groups before and after treatment. **Results** The BMD and BMC were higher in the Bushen Yigu Decoction group. And the Bushen Yigu Decoction can also improve the level of estradiol and BGP at the same time lower the level of TRACP5b and deoxypyridinoline. **Conclusion** The Bushen Yigu Decoction is effective for treatment on osteoporosis induced by ovariectomy, and the mechanism maybe include endocrine-regulation, inhibition of bone absorption, lowering the rate of bone turnover, decreasing the loss of bone and enhancing the bone density etc.

Key words: Bushen Yigu decoction; Osteoporosis; BMD; BGP; TRACP5b

骨质疏松症(Osteoporosis, 简称 OP)是以骨量降低和骨组织显微结构破坏为特征,导致骨脆性增加和易于骨折的代谢性骨病^[1]。临床表现腰背痛、身体畸形、骨折等。随着世界人口老龄化,该病发病率高,且合并严重并发症,对个人、家庭、社会构成严重的负担。它已成为一个世界性医学课题。目前西药

主要是骨吸收抑制剂(雌激素、维生素 D、降钙素、双膦酸盐等)和骨形成促进剂(氟化物等)。但它们各自只作用于骨重建的某个环节,且在长期使用过程中无论在观念、价格,还是在方便、安全方面都或多或少地存在需要解决的问题。中药主要补肝脾肾活血化瘀,作为具有“多成分、多靶点、协同促进增效、配伍适中安全”特征的中药(草药)复方已经开始引起人们研发的兴趣^[2]。补肾益骨方是鄖阳医学院附属人民医院专家基于传统医学理论对骨质疏松症病因病机的认识,结合多年临床实践总结的验方,

作者单位: 442000 湖北十堰, 鄖阳医学院附属人民医院老年病科, 十堰市老年医学研究所

通讯作者: 黄明炜, Email: Huangmingwei914@tom.com

疗效肯定,为可改善骨质疏松的有效药物,并已有相关科研报道。本研究采用切除大鼠卵巢建立去卵巢骨质疏松症的模型,观察补肾益骨方对其骨密度、性激素和骨代谢生化指标等的影响以探讨补肾益骨方对骨质疏松症的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用5月龄Wistar雌性大鼠40只,体质量(190 ± 20)g,由湖北省鄖阳医学院实验动物中心提供。

1.2 实验药物

补肾益骨方由淫羊藿、熟地、枸杞、骨碎补、肉苁蓉、补骨脂、杜仲、黄芪、当归、红花10味中药醇提液和水煎液混合而成(全部药材均购自湖北十堰市人民医院中药房)。用中药多功能提取罐回收溶剂,制成粗提液。中药终浓度为3 g/mL生药,加入苯甲酸作防腐剂(终浓度为0.1%)。雌激素为倍美力(系江苏立达制药公司产品,每片0.625 mg),使用时制成混悬液灌胃。

1.3 实验动物造模、分组及给药方法

将大鼠随机分为假手术空白对照组、模型组、倍美力组、补肾益骨方组,每组10只。各组动物经腹腔注射2%苯巴比妥(40 mg/kg)达到麻醉效果后,分别沿腹正中中线剪开皮肤,分离肌肉、筋膜及腹腔脏层,暴露腹腔。除空白组行假手术,切除卵巢附近一小块脂肪组织外,各组结扎及剪断双侧卵巢组织,术后给予青霉素20万U肌肉注射,1次/d,连续3d。分层缝合肌肉、皮肤。术后各组大鼠分笼饲养,在(24 ± 2)℃、通风良好、湿度60%~70%的实验条件下标准鼠饲料喂养,自由摄水。术后两周开始用药。试验过程中每周称1次体重,根据体重调整给药剂量。空白组及模型组蒸馏水灌胃20 mg/kg,每周1次灌胃给药,倍美力组按1 mg/kg体重混悬液灌胃给药,每天1次。根据前期预实验结果,补肾益骨方组按中剂量15.19 g/kg给药,每日1次,连续给药12w,至检查前48h停止。

1.4 观察指标

各组动物均在同样的环境及饮食条件下喂养。每周称重1次,观察各组大鼠体重的变化。各组动物均于用药12w后,先经心脏取血然后处死。处死前将大鼠分置于代谢笼中,收集24h空腹尿液混匀,分装, -70℃保存待测。

1.4.1 血清生化和骨代谢的测定 用药12w后,先经心脏取血,测定血清抗酒石酸酸性磷酸酶5b

(TRACP5b)、血清雌二醇(E_2)、血清骨钙素(BGP)。 E_2 、BGP均采用放免法测定,试剂盒由天津洁瑞医学生物研究有限公司提供;TRACP5b采用ELISA法,试剂盒为芬兰SBA Medipolis Center产品。

1.4.2 尿指标的测定 各组大鼠处死前1天分别置于代谢笼喂养,收集24h尿液,于-20℃冰箱避光保存。尿脱氧吡啶啉(Dpd)采用ELISA法,试剂盒为美国Quidel公司生产;尿肌酐(Cr)采用碱性苦味酸法,试剂盒由北京北化精细化学品有限公司生产。

1.4.3 骨密度(BMD)及骨矿含量(BMC)检测 用药12w后,心脏取血处死动物,完整取出大鼠L₅椎体、右股骨,剔净软组织后,用生理盐水布包裹,将椎体与股骨编号,置于-80℃冰箱保存。测定时将标本放置于美国Hologic QDR-4500W型双能X线骨密度仪的探头下,应用小动物软件进行腰椎和右股骨的扫描,记录骨矿含量及骨密度数据。

1.5 统计学处理

统计采用SPSS 10.0统计软件进行数据处理,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 切除卵巢14w各组大鼠血清 E_2 和骨代谢指标的检测结果

大鼠切除卵巢14w后,模型组血清 E_2 水平显著低于空白对照组($P < 0.01$),血清BGP显著高于空白对照组($P < 0.01$),血清TRACP5b显著高于空白对照组($P < 0.01$),模型组Dpd/Cr显著高于空白对照组($P < 0.05$),说明去卵巢后成骨细胞、破骨细胞功能相对均增强或数量增多,处于高转换状态。倍美力组血清 E_2 水平显著高于模型组($P < 0.01$),但低于空白对照组,差异有显著性($P < 0.05$),倍美力组血清BGP水平显著低于模型组($P < 0.01$),与空白对照组相比差异无显著性($P > 0.05$);倍美力组血清TRACP5b及尿Dpd/Cr较模型组非常显著降低($P < 0.01$),与空白对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。补肾益骨方组血清 E_2 水平较模型组非常显著升高($P < 0.01$),仍低于空白对照组($P < 0.05$);补肾益骨方组血清BGP水平较模型组显著降低($P < 0.01$),与空白对照组相比差异无显著性($P > 0.05$);血清TRACP5b及尿Dpd/Cr较模型组非常显著降低($P < 0.01$),与空白对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。见表1。

表 1 切除卵巢 14 w 各组大鼠血清 E₂、BGP、TRACP5b、尿 Dpd/Cr 检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	E ₂ (pg/mL)	BGP(ng/mL)	TRACP5b(pg/mL)	Dpd/Cr(nmol/nmol)
空白对照组	10	7.81 ± 0.96	1.61 ± 0.45	5.77 ± 0.97	68.55 ± 13.67
模型组	10	2.44 ± 0.32**	2.13 ± 0.32**	7.68 ± 0.72**	88.34 ± 21.38▲*
倍美力组	10	6.97 ± 0.94▲▲*	1.65 ± 0.51▲▲	5.17 ± 0.81▲▲	64.14 ± 13.14▲▲
补肾益骨方组	10	6.94 ± 0.72▲▲*	1.63 ± 0.39▲▲	5.06 ± 0.74▲▲*	58.39 ± 10.26▲▲*

注 :与空白对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较 ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

2.2 切除卵巢 14 w 骨密度及骨矿含量测定结果

与空白对照组比较 ,模型组大鼠腰椎骨密度及骨矿含量、股骨骨密度及骨矿含量明显下降 ,差异具有显著性($P < 0.01$)。与模型组相比 ,补肾益骨方及倍美力组大鼠腰椎、股骨骨密度及骨矿含量显著

性升高($P < 0.01$)。补肾益骨方及倍美力组与空白对照组相比 ,组间统计学无显著性差异($P > 0.05$)。补肾益骨方组骨密度的变化与倍美力组比较 ,差异无显著性($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 切除卵巢 14 w 各组大鼠腰椎、股骨 BMD、BMC 检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	腰椎 BMD(g/cm ²)	腰椎 BMC(g)	右股骨 BMD(g/cm ²)	右股骨 BMC(g)
空白对照组	10	0.281 ± 0.027	0.017 ± 0.002	0.249 ± 0.014	0.386 ± 0.016
模型组	10	0.218 ± 0.016**	0.011 ± 0.001**	0.210 ± 0.012**	0.329 ± 0.019**
倍美力组	10	0.273 ± 0.013▲▲	0.016 ± 0.002▲▲	0.240 ± 0.014▲▲	0.385 ± 0.056▲▲
补肾益骨方组	10	0.283 ± 0.015▲▲	0.016 ± 0.003▲▲	0.249 ± 0.021▲▲	0.411 ± 0.052▲▲

注 :与空白对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较 ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

3 讨论

美国食品与药物管理局(FDA)和世界卫生组织(WHO)推荐的去卵巢大鼠是研究绝经后骨质疏松症的最佳模型^[3]。一般来讲 ,雌性大鼠在 6 ~ 10 月为成年期^[4] ,故本实验选择 5 ~ 6 月龄大鼠进行去卵巢手术 ,手术 14 w 后 ,雌激素及 BMD 显著降低 ,出现骨质疏松提示手术造模成功。

研究表明绝经后骨质疏松症的发病与肾之精气亏虚有十分密切的关系 ,提示补肾保精、早期防治是减少发病的重要环节^[5]。补肾益骨方是郧阳医学院附属人民医院专家基于传统医学理论对骨质疏松症病因病机的认识 ,结合多年临床实践总结的验方 ,该方由淫羊藿、熟地、枸杞、骨碎补、肉苁蓉、补骨脂、杜仲、黄芪、当归、红花及其复方组成。其中补骨脂、骨碎补具有壮骨作用 ,淫羊藿、肉苁蓉、杜仲具有温肾阳 ,熟地、枸杞具有滋肾阴 ,黄芪有补气 ,当归、红花则活血化淤 ,诸药互奏补肾壮骨、益精填髓、活血通络、益气养阴、调整阴阳之功效。

雌激素对于维持骨吸收和骨形成的平衡具有极其重要的作用。目前在破骨细胞和成骨细胞中均发现了雌激素受体的存在 ,雌激素可以通过这些受体的直接作用来限制骨转换。当雌激素缺乏时 ,这种限制开始丧失 ,则整个骨转换增强。本研究结果显示 ,切除卵巢大鼠血中雌激素水平显著降低 ,并出现

骨质疏松病理变化 ,提示造模成功。服用补肾益骨方 12 w 后 ,补肾益骨方组血清 E₂ 水平明显上升 ,提示了补肾益骨方具有提高切除卵巢大鼠雌激素水平的作用。推测可能与该药本身具有拟雌激素样作用有关。

尿 Dpd 主要存在于骨和软骨中 ,骨吸收活跃时 ,排量增多 ,因尿中 Dpd 仅来源于成熟的骨 I 型胶原的降解 ,是未经过代谢变化排出的 ,且不受饮食影响 ,具有骨特异性 ,是一种反映骨吸收的理想指标^[6]。血清 TRACP5b 是近年来新发展起来的第二代骨吸收生化标志物 ,是血清中酸性酶 6 种酶的一种 ,主要由破骨细胞分泌 ,具有酶活性^[7] ,本实验采用 ELISA 方法测定的是刚刚进入血循环的具有活性的 TRACP5b 含量 ,它可准确反映骨吸收速率。国外的临床实验也表明 :血清中 TRACP5b 水平是一个较好的抗吸收治疗检测指标^[8]。大鼠切除卵巢 14 w 后 ,TRACP5b 显著升高 ,表明骨吸收速率加快。服药 12 w 后 ,补肾益骨方组和倍美力组可使 TRACP5b 及尿 Dpd 明显下降 ,表明补肾益骨方对去卵巢骨质疏松大鼠过快的骨吸收有明显的抑制作用。服药 12 w 后 ,补肾益骨方组使 TRACP5b 及尿 Dpd 下降较倍美力组明显 ,且与对照组有显著性差异 ,提示补肾益骨方抑制骨吸收作用比单纯补充性激素作用更强。

骨钙素(BGP)又称 γ -羧基谷氨酸蛋白 ,是一种

含维生素 K 依赖的氨基酸 Cla 的非胶原蛋白,主要由成骨细胞产生和分泌,其生理功能是维持骨的正常矿化速度,血清 BGP 可作为评估骨转换率及骨形成的特异指标^[9]。本研究结果表明,服药 12 w 后,补肾益骨方组血清 BGP 水平均显著低于模型组,表明补肾益骨方能降低卵巢切除使雌激素急剧下降所致的高骨转率,防止快速骨量丢失,有效延缓绝经后骨质疏松症的发生及病变进程。

骨密度是骨矿代谢中量化骨量的重要指标,也是评价骨量最有说服力的指标之一。本研究结果表明,大鼠切除卵巢 14 w 后,BMD 显著降低,出现骨质疏松。服用补肾益骨方 12 w 后,BMD 显著升高。表明补肾益骨方可通过抑制破骨细胞的骨吸收,降低卵巢切除后的高骨转换率,防止了骨量的快速丢失,增加骨量而使骨密度增加。

总之,本研究结果表明:中药补肾益骨方能够提高去卵巢大鼠血清雌二醇水平,减少骨吸收,抑制卵巢切除后大鼠的高骨转换率,从而提高骨密度和骨矿含量,对绝经后及老年性骨质疏松症具有确切的防治效果。

【参 考 文 献】

- [1] 陆再英,钟南山.骨质疏松症.内科学.第7版.北京:人民卫生出版社,2008:835.
- [2] 张戈,石印玉,秦岭,等.绝经后髋部骨质疏松性骨折风险的研究进展.中国中医骨伤科杂志,2003,11(1):49-52.
- [3] Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, et al. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. Bone, 1995, 17(4 Suppl): S125-S133.
- [4] 刘忠厚.骨质疏松学.北京:科学出版社,1998:506-507.
- [5] 叶日乔,刘道兵,贾经汉,等.绝经后骨质疏松症患者骨密度及性激素水平与肾虚证的关系.中医正骨,2005,17(2):3-6.
- [6] 王吉耀,廖二元,胡品津.骨质疏松症.内科学.第1版.北京:人民卫生出版社,2002:1013.
- [7] Nakasato YR, Janckila AJ, Halleen JM, et al. Clinical significance of immunoassays for type 5 tartrate-resistant acid phosphatase. Clin Chem, 1999, 445: 2150-2157.
- [8] Hallen JM, Alatalo SL, Ivaska KK, et al. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a useful marker for monitoring alendronate therapy. J Bone Miner Res, 2001, 16(Suppl): S534.
- [9] Kusumi T, Kusumi A. Osteocalcin/bone Gla protein(BGP). Nippon Rinsho, 2004, 62(Suppl 2): S136-S140.

(收稿日期:2009-03-10)