

中医不同治法对骨质疏松症大鼠骨密度及骨骼肌 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶影响的比较研究

杨芳 郑洪新 王剑 朱辉 张国哲

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)01-0056-04

摘要: 目的 观察中医不同治法对糖皮质激素诱导骨质疏松症大鼠骨密度、骨骼肌 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶变化的影响,探讨中医防治骨质疏松症的作用机制。方法 将 120 只雌雄各半的大鼠随机分为正常对照组、模型对照组(模空组)、补肾中药组、健脾中药组、活血化瘀中药组和骨疏康中药组 6 个组。用地塞米松肌注造模。实验结束后,腹主动脉取血处死大鼠,用酶联免疫法测定大鼠骨骼肌 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶,用双能 X 线骨密度仪测定大鼠离体股骨上 1/3 骨密度。结果 ①与正常组比较,模空组大鼠离体股骨上 1/3 骨密度显著降低($P < 0.01$);与模空组比较,各治疗组大鼠股骨上 1/3 骨密度均有不同程度的升高,其中以补肾中药组升高程度最为显著($P < 0.01$),其余各治疗组骨密度较模空组升高程度比较无统计学意义。②与正常组比较,其他各组大鼠骨骼肌的 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶显著降低($P < 0.01$);与模空组比较,各治疗组大鼠骨骼肌的 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶均明显升高($P < 0.01$);补肾组大鼠骨骼肌的 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶升高最为明显,明显高于骨疏康组、活血组、健脾组,差异具有非常显著性($P < 0.01$);活血组大鼠骨骼肌的 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶升高程度最低,与补肾组、健脾组、骨疏康组比较具有统计学差异($P < 0.01$);健脾组和骨疏康组升高程度也比较明显,但二者比较无统计学意义。结论 补肾、健脾方法对骨质疏松症大鼠的骨密度和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶具有一定调节作用。
关键词: 补肾;健脾;骨密度; Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶

Effect of varied traditional Chinese therapies on bone mineral density and Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP enzyme in the skeletal muscle of glucocorticoid-induced osteoporosis in rats YANG Fang, ZHENG Hongxin, WANG Jian, et al. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China
Corresponding author: ZHENG Hongxin, Email: zhenghx2002@126.com

Abstract: Objective To observe the effect of the different treating methods with traditional Chinese medicine (TCM) on bone mineral density (BMD) and Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP enzyme in the skeletal muscle in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis and to discuss the mechanism of TCM on prevention and treatment of osteoporosis. **Methods** One hundred and twenty rats with half of each sex were randomly divided into 6 groups, including normal control group, model control group, reinforcing the kidney herb group, strengthening the spleen herb group, promoting blood circulation to remove stasis herb group, and GUSUKANG herb group. Intramuscular injection of dexamethasone was used to establish the model. At the end of the experiment, the rats were killed by withdrawing blood from the abdominal aorta. Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP enzyme was measured using enzyme-linked immunosorbent assay and BMD of the upper 1/3 of rat femur was detected using dual energy X-ray absorptiometry. **Results** ① Compared to normal control group, BMD of upper 1/3 of the femur in model control group decreased significantly ($P < 0.01$). Compared to model control group, BMD of upper 1/3 of the femur increased in all treatment groups at different degree, with the most significant increase in reinforcing the kidney herb group ($P < 0.01$). The BMD difference between model control group and the other treatment groups had no statistical significance. ② Compared to normal

基金项目: 沈阳市科技局青年科技人才培养项目(1081238-1-01); 辽宁省教育厅研究项目(2009B123)

作者单位: 110847 沈阳, 辽宁中医药大学

通讯作者: 郑洪新, Email: zhenghx2002@126.com

control group, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP enzyme in the skeletal muscle in all other groups decreased significantly ($P < 0.01$). Compared to model control group, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP enzyme in the skeletal muscle of all treatment groups increased significantly ($P < 0.01$). Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP enzyme in the skeletal muscle in reinforcing the kidney herb group increased the most significantly, compared to GUSUKANG group, promoting blood circulation group, and strengthening the spleen group with statistical significance ($P < 0.01$). The increase of Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP enzyme in the skeletal muscle in promoting blood circulation group was the lowest, compared to that in reinforcing the kidney herb group, strengthening the spleen group, and GUSUKANG group ($P < 0.01$). Those increases in strengthening the spleen group and GUSUKANG group were also apparent. However the difference between the two groups was no statistical significance. **Conclusion** The reinforcing the kidney method and the strengthening the spleen method had certain regulative effect on BMD and Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP enzyme in the skeletal muscle in osteoporotic rats.

Key words: Reinforcing Kidney; Strengthening Spleen; Bone Mineral Density; Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP enzyme

骨质疏松 (osteoporosis) 是以骨量减少、骨的微观结构退化为特征的, 致使骨的脆性增加以及易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病^[1]。肌肉作为骨骼最为邻近的组织之一, 可以通过增加肌肉的力量、弹性及身体的协调性和平衡性, 加强骨形成和肌肉对骨骼的支持力量, 进而减少骨质疏松症患者骨折的发生。本实验通过比较观察中医不同治法对糖皮质激素诱导骨质疏松症大鼠骨密度、骨骼肌 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶变化的影响, 探讨中医防治骨质疏松症的作用机制, 为临床治疗骨质疏松症提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物、环境及饲料

SPF 级 Wistar 大鼠 120 只, 雌雄各半, 雌性体重 190 ± 10 g, 雄性体重 240 ± 10 g, 3 月龄。由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 动物合格证号: SCXK(沪) 2008-0016。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂: Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶试剂盒, 由美国 ADL 公司提供, 生产批号为 110371。仪器: 微孔板酶标仪 (型号为 550, 美国伯乐公司); XR-26 型双能 X 线骨密度仪 (美国, NORLAND)

1.3 药物

补肾中药由淫羊藿、活性马鹿茸、牡蛎组成; 健脾中药为补中益气颗粒, 由北京汉典制药有限公司提供, 生产批号为 090101; 活血中药为血府逐瘀胶囊, 由天津宏仁堂药业有限公司提供, 生产批号为 103015; 阳性对照药为骨疏康颗粒, 由辽宁康辰药业有限公司提供, 生产批号为 080729。

1.4 分组

按同性别大鼠体重分层, 随机数字表分为 6 组, 雌雄分笼饲养, 每笼 10 只, 每组 20 只。即正常对照

组、模型对照组、补肾中药组、健脾中药组、活血化瘀中药组和阳性中药对照组 (骨疏康中药组)。

1.5 造模及给药

造模用地塞米松肌注, 剂量为 2.5 mg/kg 体重, 左后肢臀部肌肉注射, 每周 2 次, 连续 9 周。正常对照组大鼠常规喂养。大鼠适应饲养 1 周后开始造模、给药、灌胃, 每日 1 次。模型对照组给予等体积生理盐水, $1 \text{ ml}/100 \text{ g}$; 补肾中药组、健脾中药组、活血化瘀中药组、阳性对照组用药量按人体公斤体重 (g/kg) 的 6.3 倍计算, (成人体重按 60 kg 计算), 容积为 $1 \text{ ml}/100 \text{ g}$ 体重, 补肾组给药量为鹿茸 $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 牡蛎 $0.263 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 淫羊藿 $0.0756 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 健脾组给药量为 $0.945 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 活血组给药量为 $0.504 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 阳性对照组给药量为 $2.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。实验期间, 各组大鼠每周称重一次, 并根据体重变化调整给药剂量。

1.6 标本采集及检测

实验大鼠在最后一次灌胃后, 禁食 24 h, 经 10% 水合氯醛注射麻醉 ($0.3 \text{ ml}/100 \text{ g}$ 体重), 麻醉后用碘伏消毒手术部位, 剪开腹腔后, 立即取出大鼠右后肢腓肠肌的白肌部分和右后肢的全股骨。标本处理过程: ①将肌组织放入约 5 倍于组织体积的量的 MSH 缓冲液中清洗, 擦干、称重后, 用剪刀剪碎置入匀浆瓶中; 将 5 ml/g 组织加入匀浆液中, 并加入蛋白酶抑制剂 $5 \mu\text{L}/\text{mg}$ (按比例增减加入量); 以 500 r/min 匀浆充分; 将匀浆后的组织放入离心管中离心, $2000 \times g$, 10 min ; 除去脂肪层和上清, 离心 $5000 \times g$, 15 min ; 除上清, 提取线粒体放入 1 ml EP 管中。具体检测步骤按试剂盒说明书进行。②将大鼠全股骨用生理盐水冲洗后, 用生理盐水浸渍的医用纱布包裹, 再用预先准备的锡纸包裹。应用双能 X 线骨密度仪对大鼠离体股骨上 $1/3$ 骨密度进行检测。

测。应用仪器附带的“The Small Subject Scout Scan”小动物软件进行数据分析。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件处理所得数据,选用 ONE-Way ANOVA 进行统计析,数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

大鼠右后肢离体股骨上 1/3 骨密度检测结果显示:与正常组比较,模空组大鼠离体股骨上 1/3 骨密度显著降低 ($P < 0.01$);与模空组比较,各治疗组大鼠股骨上 1/3 骨密度均有不同程度的升高,其中以补肾中药组升高程度最为显著 ($P < 0.01$),其余各治疗组骨密度较模空组升高程度比较无统计学意义。

表 1 各组大鼠离体股骨上 1/3 骨密度比较的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数	股骨上 1/3 骨密度 (g/cm^2)
正常组	20	0.119 ± 0.011
模空组	20	$0.109 \pm 0.007^*$
骨疏康组	18	$0.111 \pm 0.006^*$
活血组	20	$0.112 \pm 0.007^*$
健脾组	20	$0.112 \pm 0.005^*$
补肾组	18	$0.116 \pm 0.007^{\Delta}$

注:与正常组比较, $^*P < 0.01$;与模空组比较, $^{\Delta}P < 0.01$

大鼠骨骼肌 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶检测结果显示:与正常组比较,其他各组大鼠骨骼肌的 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶显著降低 ($P < 0.01$);与模空组比较,各治疗组大鼠骨骼肌的 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶均明显升高 ($P < 0.01$);补肾组大鼠骨骼肌的 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶升高最为明显,明显高于骨疏康组、活血组、健脾组,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);活血组大鼠骨骼肌的 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶升高程度最低,与补肾组、健脾组、骨疏康组比较具有统计学差异 ($P < 0.01$);健脾组和骨疏康组升高程度也比较明显,但二者比较无统计学意义。

表 2 各组大鼠骨骼肌 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数	Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶浓度 (mg/L)
正常组	11	21.21744 ± 0.8406
模空组	12	$3.099415 \pm 0.3685^*$
骨疏康组	12	$10.48246 \pm 0.4676^{\Delta*}$
活血组	12	$7.285575 \pm 0.7869^{\Delta**}$
健脾组	12	$10.62378 \pm 0.7665^{\Delta*}$
补肾组	12	$14.0448 \pm 0.3561^{\Delta}$

注:与正常组比较, $^*P < 0.01$;与模空组比较, $^{\Delta}P < 0.01$;与补肾组比较, $^{\Delta}P < 0.01$;与健脾组比较, $^*P < 0.01$;与骨疏康组比较, $^*P < 0.01$

3 讨论

3.1 中医对骨质疏松症的认识

根据骨质疏松症的症状、病因病机,本病属于中医学“骨痹”、“骨痿”、“肾虚腰痛”等范畴。“骨痿”与肾关系密切,因肾精乏源,骨骼失养,骨骼脆弱无力可致骨质疏松症,因而该病多发于老年人。可以看出,肾虚是骨质疏松症的根本病机。脾为后天之本,肾精依赖脾精的滋养才源源不断得以补充。若脾失健运,水谷精微不足,必使肾精乏源或肾精亏虚,骨骼失养,则骨骼脆弱无力而致骨质疏松症的发生,所以脾虚也是本病的重要病机。若肌肉瘦弱痿软无力,从而导致肌肉与骨的协调性下降而发为骨痿,即中医所说的“骨不濡则肉不能著也,骨肉不相亲则肉软却”、“骨枯而髓减”。

3.2 骨骼与肌肉的协调性对骨质疏松症的影响

现代医学认为,骨骼作为一种器官,有自身的代谢。骨质通过不断重复的骨破坏和骨形成来维持人体平衡,这一过程由破骨细胞和成骨细胞共同调节,破骨细胞不断吸收局部旧骨质,而成骨细胞不断形成新骨质。骨质疏松正是这一调节失衡的结果,肌肉作为骨骼最为邻近的组织之一,是骨与骨连接的纽带,与骨的生长和发育密切相关。肌肉可以影响骨代谢,通过收缩产生应力而促进成骨。现代医学认为骨质疏松症的形成与内分泌紊乱钙吸收不良和肌肉痿弱不用有关。Kritz-Silverstein D 等^[2]在研究中发现,老年人随着年龄增长,骨质的丢失与肌肉强度的降低趋势是相同的,适当增加肌力训练能促进骨骼的形成,增加骨骼的强度,能够抵抗由于年龄增长导致的骨质丢失。Valdimarsson 等^[3]认为肌肉与 BMD 和 BMC 具有最密切的关系,两者不仅是单变量相而且呈线性相关。

3.3 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶对骨骼肌收缩的影响

Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶是反映细胞的能量代谢和建立跨膜的离子梯度、维持细胞膜电位与细胞内外离子平衡的一种重要的蛋白酶,在生理条件下又称依赖 ATP 的膜结合蛋白酶。它对心肌及其它肌肉的收缩、神经细胞动作电位的传导、细胞的分泌及繁殖均有重要影响,它可以水解 ATP,使细胞内 Ca^{2+} 泵到细胞外,以维持细胞内较低的 Ca^{2+} 浓度,这是维持细胞稳态的重要机制之一,也是细胞功能得以正常发挥的基础^[4]。肌浆网膜上 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶,当肌浆中的 Ca^{2+} 浓度升高时,钙泵被激活,通过分解 ATP 获得能量,将 Ca^{2+} 逆浓度梯度转运回肌浆网

中。肌浆中 Ca^{2+} 浓度随之降低, Ca^{2+} 从肌钙蛋白上解离下来, 引起肌纤维的舒张。

本实验通过比较不同治法对糖皮质激素诱导骨质疏松症大鼠骨密度的影响, 发现补肾组可以明显提高骨质疏松症大鼠的骨密度, 与模空组比较有显著性差异, 而与正常组比较无显著性差异。这一结果印证了中医基础理论的科学性, 即肾虚是骨质疏松症的根本病机, 补肾方法是治疗肾虚骨质疏松症的根本方法。通过比较不同治法对糖皮质激素诱导骨质疏松症大鼠 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶浓度的影响, 发现补肾组和健脾组均可以明显提高骨质疏松症大鼠 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶的浓度, 提示健脾方法可以通过提高骨质疏松症大鼠骨骼肌的 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 的浓度, 提高肌肉组织的能量代谢, 促进肌肉的收缩能力, 以有效的保护骨组织, 提高肌肉与骨骼的协调性, 已达到防治骨质疏松症的目的。正如中医基础理论所提到, 肾藏精, 为先天之本; 脾主肌肉, 为后天之本。脾主运化功能旺盛, 才能化生精气血津液, 使

四肢肌肉强健, 骨骼肌肉坚固有力, 即所谓“后天养先天”。

通过本实验的结果, 建议在今后运用中医中药治疗骨质疏松症患者时, 在用补肾方法治疗的同时, 适当辅以健脾的方法, 实现健脾实肌肉、补肾壮骨骼的脾肾同治的治疗目的, 以期更加有效的防治骨质疏松症。

【参考文献】

- [1] 刘忠厚. 骨矿与临床. 北京: 中国科学技术出版社, 2006.
- [2] Kritiz, SD, Barrett CE. Grip strength and bone mineral density in oldet women. J Bone Miner Res, 1994, 9(1): 45.
- [3] Valdimarsson O, Kristinsson JO, Stefansson SO, et al. Lean mass and physical activity as predictors of bone mineral density in 16-20 years old women. J Intern Med, 1999, 245(5): 489-496.
- [4] 周智兴, 傅颖媛, 黄苓苔对白色念珠菌细胞周期和钙镁 ATP 酶活力的影响. 山东医药, 2007, 47(33): 34.

(收稿日期: 2010-09-16)

(上接第 50 页)

- [6] Dargent-Molina P, Poitiers F, Breart G. In elderly women weight is the best predictor of a very low bone mineral density. Osteoporos Int, 2000, 11(10): 881-888.
- [7] Taylor BC, Schreiner PJ, Stone KL. Long-term prediction of incident hip fracture risk in elderly white women. J Am Geriatr Soc, 2004, 52(9): 1479-1486.
- [8] Dick IM, Devine A, Beilby J, et al. Effects of endogenous estrogen on renal calcium and phosphate handling in elderly women. Am J Physiol-Endocrinol Metab, 2005, 288(2): E430-5.
- [9] Rosen CJ, Ackert-Bicknell C, Beamer WC, et al. Allelic differences in a quantitative trait locus affecting insulin-like growth factor-I impact skeletal acquisition and body composition. Pediatr Nephrol, 2005, 20(3): 255-60.
- [10] 李兰, 周侧, 邵晋康. 体重质量指数与 557 例绝经后妇女骨密度变化的关系研究. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(4): 493-494.
- [11] Wang MC, Bachrach LK, VanLoan M, et al. The relative contributions of lean tissue mass and fat mass to bone density in young women. Bone, 2005, 37(4): 474-481.
- [12] Barrea G, Bunout D, Gattas V, et al. A high body mass index protects against femoral neck osteoporosis in healthy elderly subjects. Nutrition, 2004, 20(9): 769-771.
- [13] 刘石平, 伍贤平, 廖二元, 等. 成年女性体表面积与不同骨骼部位骨密度关系及其患骨质疏松的风险. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11(3): 306-310.

(收稿日期: 2010-09-11)

ATP酶影响的比较研究

作者: [杨芳](#), [郑洪新](#), [王剑](#), [朱辉](#), [张国哲](#)
作者单位: [辽宁中医药大学, 沈阳, 110847](#)
刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名: [CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS](#)
年, 卷(期): 2011, 17(1)

参考文献(8条)

1. [周智兴, 傅颖媛](#) [黄芩苷对白色念珠菌细胞周期和钙镁ATP酶活力的影响](#) [期刊论文] - [山东医药](#) 2007(33)
2. [刘忠厚](#) [骨矿与临床](#) 2006
3. [Valdimarsson O; Kristinsson JO; Stefansson SO](#) [Lean mass and physical activity as predictors of bone mineral density in 16-20 years old women](#) [外文期刊] 1999(05)
4. [Kritz SD; Barrett CE](#) [Grip strength and bone mineral density in older women](#) 1994(1)
5. [Kritz SD; Barrett CE](#) [Grip strength and bone mineral density in older women](#) [外文期刊] 1994(01)
6. [Valdimarsson O; Kristinsson JO; Stefansson SO](#) [Lean mass and physical activity as predictors of bone mineral density in 16-20 years old women](#) 1999(5)
7. [刘忠厚](#) [骨矿与临床](#) 2006
8. [周智兴, 傅颖媛](#) [黄芩苷对白色念珠菌细胞周期和钙镁ATP酶活力的影响](#) 2007(33)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201101015.aspx