

金匱肾气丸联合葡萄糖酸钙对去势大鼠骨质疏松的影响

王建伟 马勇 周玲玲 尹恒 周信 张亚峰 徐兵 王庆

中图分类号: R275.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)01-0060-04

摘要: 目的 观察金匱肾气丸联合葡萄糖酸钙对去势大鼠骨质疏松的影响,探究其防治骨质疏松的机制。方法 将 75 只雌性大鼠随机分成空白对照组,模型组,葡萄糖酸钙组,金匱肾气丸组,金匱肾气丸及葡萄糖酸钙联合用药组共 5 组,采用卵巢切除的方法制成骨质疏松动物模型,灌胃给药 3 个月后进行血钙,磷,骨钙含量的测定和组织病理学的观察。结果 模型组与空白对照组相比,去势大鼠血清钙磷含量无明显变化,钙片组、金匱肾气丸组及联合组血钙,磷含量相比空白组也无明显差异;去势大鼠骨钙含量较正常大鼠明显降低,钙片组,金匱肾气丸,以及联合组去势大鼠骨钙含量较模型组明显改善,以联合组改善最明显($P < 0.01$)。组织病理学观察见:经钙片和金匱肾气丸治疗后骨皮质可见蚕食样改变区域变小,骨小梁较细,排列较为一致。联合用药组骨皮质厚度基本正常,骨小梁略变细,排列较整齐,骨小梁厚度基本正常。结论 金匱肾气丸联合葡萄糖酸钙可以减少去势大鼠骨质疏松大鼠骨矿物质的丢失,对骨质疏松具有较好的防治作用。

关键词: 金匱肾气丸; 葡萄糖酸钙; 骨质疏松; 骨钙; 病理学

Effect of combined use of Jingui shenqi wan and calcium gluconate on ovariectomy-induced osteoporosis in rats WANG Jianwei, MA Yong, ZHOU Lingling, et al. Orthopedic Center, Wuxi Chinese Medical Hospital, Wuxi 214001, China

Corresponding author: MA Yong, Email: zhongyi-my@263.net

Abstract: **Objective** To investigate the effect of combined use of Jingui shenqi wan and calcium gluconate on ovariectomy-induced osteoporosis in rats, and to explore the mechanism of prevention and treatment of osteoporosis. **Methods** Seventy five female rats were randomly divided into control group, model group, calcium gluconate group, Jingui shenqi wan group, and Jingui shenqi wan plus calcium gluconate group. Ovariectomy was performed to induce osteoporosis animal model. Drugs were intragastrically administered for 3 months. Serum calcium, phosphorus, bone calcium content, and histopathological were detected and observed. **Results** Serum calcium and phosphorus in ovariectomized rats had no significant change compared to control group. Serum calcium and phosphorus in calcium gluconate group, Jingui shenqi wan group, and Jingui shenqi wan plus calcium gluconate group had no significant change compared to control group, either. Bone calcium content in ovariectomized rats significantly decreased compared to control rats. Bone calcium content in calcium group, Jingui shenqi wan, and combination group was significantly improved compared to control group, and the combination group improved significantly ($P < 0.01$). Histopathological observation showed that in the cortical bone the encroached changes area was smaller, and the bone trabecula were thinner and arranged consistently in calcium group and Jingui shenqi wan group. In Jingui shenqi wan plus calcium gluconate group, the thickness of cortical bone was normal, and the bone trabecula were slightly thinner and arranged more regularly. **Conclusion** Jingui shenqi wan plus calcium gluconate treatment reduced the loss of bone minerals in ovariectomy-induced osteoporosis in rats, thus had beneficial effect on prevention and treatment of osteoporosis.

作者单位: 214001 江苏 无锡, 无锡市中医院骨科中心(王建伟、尹恒、张亚峰、徐兵、王庆); 南京中医药大学骨伤科研究所(马勇、周玲玲、周信)

通讯作者: 马勇, Email: zhongyi-my@263.net

Key words: Jingui shenqi wan; Calcium gluconate; Osteoporosis; Bone calcium; Pathology

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种骨科常见病和多发病。本课题通过观察去势大鼠骨质疏松模型在治疗前后血钙、磷、骨钙含量及组织病理学的变化,研究金匱肾气丸联合葡萄糖酸钙对骨质疏松的作用,并初步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物

Wistar 雌性清洁大鼠 75 只,4.5 月龄,体重 210 ~ 250g。由南京中医药大学动物中心提供,合格证号:SYXK(苏)2002-0053。

1.2 药品与试剂

金匱肾气丸:河南省宛西制药股份有限公司,批号 071002;葡萄糖酸钙:上海黄海制药有限责任公司,批号 090403;钙离子检测试剂盒,磷离子检测试剂盒,碱性磷酸酶检测试剂盒均为南京建成生物工程有限公司产品。

1.3 仪器

日立 7060 型全自动生化分析仪;放射免疫分析及试剂:美国罗氏公司。

2 方法

2.1 骨质疏松动物模型建立及检测

取 Wistar 雌性清洁大鼠行卵巢切除手术,2%戊巴比妥钠 40 mg/kg 体重腹腔注射麻醉,从背部腰椎两侧行 1 cm 纵向切口,逐层剪开,找出完整双侧卵巢,结扎,切除,止血,逐层缝合,另设假手术组麻醉、消毒及手术方式同实验组,提拉卵巢但不切除,仅切除卵巢周围少许脂肪组织^[1]。术后大鼠分笼饲养 3 d,每只动物腹腔注射青霉素 40 万单位,每日 1 次,连续 3 d。其中 8 只实验动物于造模后死亡,考虑与实验过程中无菌操作不够规范有关,其余实验动物均存活,上述 8 只死亡动物,随后即补充,造模后存活。

2.2 动物分组及给药

将卵巢切除大鼠随机分成 4 组,分别设为模型组,金匱肾气丸组 (JK),葡萄糖酸钙组 (Ca),金匱肾气丸及葡萄糖酸钙联合应用组 (JK + Ca)。假手术组作为生理盐水对照组,共为五组,每组 15 只。连续灌胃给药 3 个月^[2]。于末次给药后次日,各组大鼠眶后静脉取血;取右股骨上段,分别以 10% 甲醛固定;取左侧股骨,进行骨钙含量测定。

2.3 血钙、磷含量测定

各组大鼠眶后静脉取血,离心收获血清,以日立 7060 型全自动生化分析仪测定血钙、磷含量。

2.4 骨钙含量测定

左股骨剔除肌肉后,生理盐水冲去骨髓,在环流空气高热箱 120℃ 烘干 1 h,应用固体物理密度仪自动测量体积 (cm³),随后以三氯甲烷和甲醇 (2:1) 混合脱脂 72 h,120℃ 烘干 6 h 后接着置马福炉 600℃ 灰化 6 h,从股骨的骨灰中取出 30 mg ~ 40 mg 左右,精密称定,用盐酸溶解后采用原子吸收分光光度法测定。

2.5 组织病理学观察

股骨标本中每组各取 5 个,置于 10% 甲醛中固定 12h 后,经序列酒精脱水、EDTA 脱钙、石蜡包埋、沿股骨纵轴切片,每一个标本都在不同层面做三张切片,行 HE 染色。光学显微镜下观察,并将各组标本的骨小梁结构与破骨细胞活性等病理组织学改变^[3]。

2.6 统计学处理

实验数据用 SPSS12.0 软件进行统计学处理分析,测量值用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间资料采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 作为显著性差异的标准。

3 实验结果

3.1 金匱肾气丸联合葡萄糖酸钙对去势大鼠血清钙、磷含量的影响

结果见表 1。模型组大鼠血钙、磷含量较正常对照组未见明显变化,钙片组,金匱肾气丸组以及联合组血钙、磷含量较模型组和正常对照组也无显著性差异。

表 1 金匱肾气丸联合葡萄糖酸钙对去势大鼠血清钙、磷含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 (g/kg)	Ca (mmol/l)	P (mmol/l)
空白组	—	2.872 ± 0.091	2.216 ± 0.228
模型组	—	2.702 ± 0.324	2.24 ± 0.354
钙片组	0.034	2.918 ± 0.079	2.084 ± 0.200
金匱丸组	0.75	2.756 ± 0.174	2.158 ± 0.182
联合组	0.034 + 0.75	2.792 ± 0.132	2.42 ± 0.436

3.2 金匱肾气丸联合葡萄糖酸钙对去势大鼠血清骨钙含量的影响

结果见表 2。模型组大鼠骨钙含量较对照组有明显降低,钙片组和金匱丸组较模型组明显升高 ($P < 0.05$);联合组大鼠骨钙含量较模型组升高更明

显($P < 0.01$)。

3.3 金匱肾气丸联合葡萄糖酸钙对去势大鼠股骨病理组织学改变的影响

病理组织学结果显示:正常对照组的胫骨骨松质结构清楚,骨小梁结构均匀,整齐排列,骨小梁厚度正常、骨皮质致密,边缘整齐(见图 1A);去卵巢模型组大鼠胫骨病理切片显示骨小梁稀疏、断裂、排列紊乱;并可见游离末端,骨皮质疏松,表面破骨细胞活跃,局部呈蚕食样及葱皮样改变,骨髓腔扩大(见图 1B、C);经钙片和金匱肾气丸治疗后骨皮质可见蚕食样改变区域变小,偶见破骨细胞,骨小梁较细,排列较为一致,未见明显异常(见图 1D、E);联

合用药组骨皮质厚度基本正常,未见蚕食样及葱皮样改变,未见破骨细胞,骨松质结构清楚,骨小梁略变细,排列较整齐,骨小梁厚度基本正常(见图 1F)。

表 2 金匱肾气丸联合葡萄糖酸钙对去势大鼠血清骨钙含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量(g/kg)	骨钙(%)
对照组	—	10.986 ± 1.704
模型组	—	6.7368 ± 1.536**
钙片组	0.034	9.1512 ± 1.317 ^Δ
金匱丸组	0.75	9.2808 ± 1.411 ^Δ
联合组	0.034 + 0.75	10.3212 ± 1.444 ^{ΔΔ}

注:与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较: ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

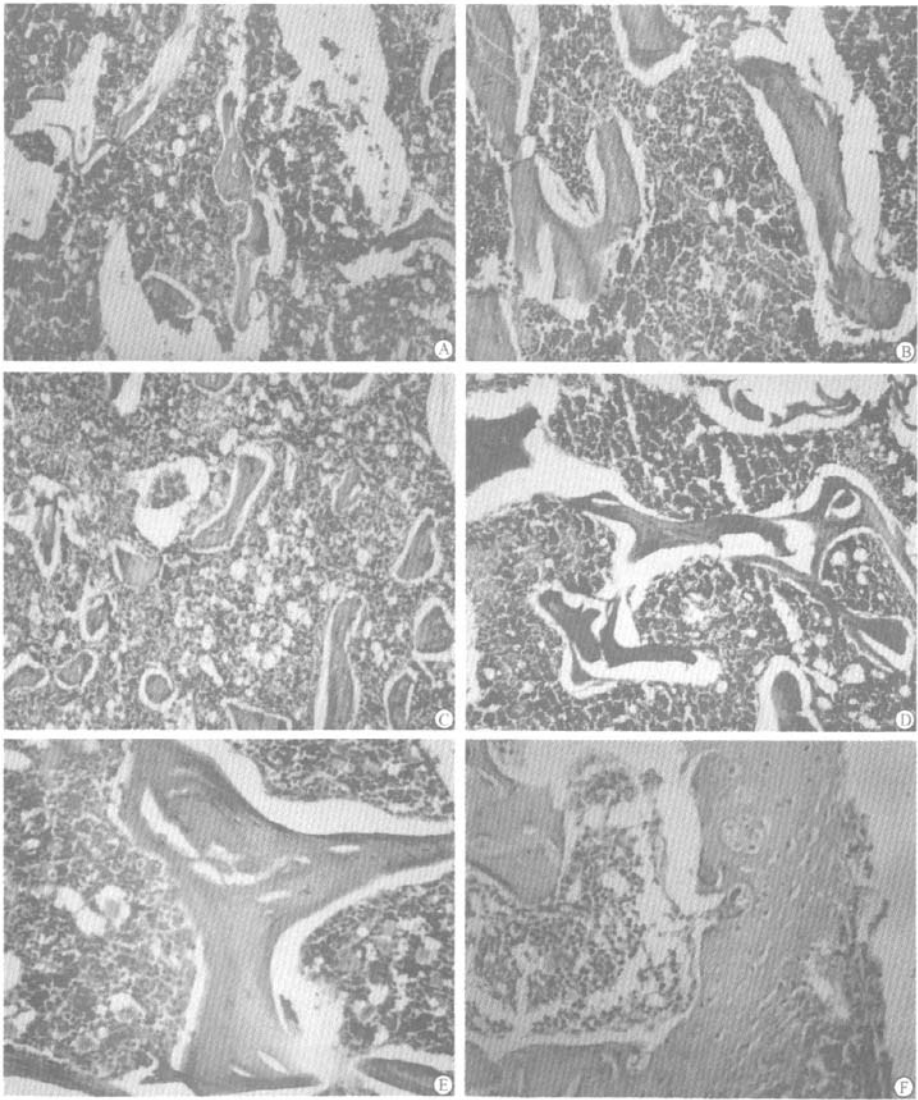


图 1 实验各组去势大鼠股骨病理组织学改变(10 ×)

注:A 正常对照组;B 模型组;C 模型组;D 金匱肾气丸组;E 葡萄糖酸钙组;F 联合组

4 讨论

中医认为“肾主骨”,如《素问·痿论》:“肾主身之骨髓”;《素问·解精微论》:“髓者,骨之充也”;《素问·六节脏象论》:“肾者,主蛰,封藏之本,精之处也……其充在骨。”肾精充足,则骨髓生化有源,骨骼得到髓的充分滋养则坚固有力;若肾精虚少,则骨髓化生乏源,骨骼得不到髓的滋养,便会出现骨脆弱无力、疼痛等症,从而导致骨质疏松的发生。所以,补肾是中医治疗骨质疏松症的主要治法之一。近年来的研究表明,骨髓中 RANKL/OPG 的变化是雌激素缺乏导致骨吸收的主要途径之一^[4,5],补肾中药能够在一定程度上抑制去卵巢大鼠骨髓细胞过度表达 TNF- α 和 RANKL,同时增加护骨素(OPG)的表达^[6],并且能够明显降低骨质疏松模型大鼠下丘脑组织中的骨形成蛋白(BMP-4) mRNA 和蛋白表达水平,明显增强信号转导分子 Smad6 mRNA 和蛋白表达水平^[7],达到防治骨质疏松的作用。

金匱肾气丸是经典的补肾方剂,由于地黄、山药、山茱萸、泽泻、茯苓、牡丹皮、桂枝、制附子组成。本方以方名取义,以肾为水火之脏,有调和阴阳之功,阳动则气化,阴静则精生,阴阳协调以化生肾气^[8]。方中附子、干地黄一阴一阳,桂枝、丹皮一气一血,附子、丹皮一热一寒,山茱萸、泽泻一补一泻,茯苓一固一利,方中以地黄滋补肾阴,山茱萸补益肝阴,山药补益脾阴,以泽泻泻肾浊而不伤肾气,丹皮主阴清肝,合泽泻可降虚火,茯苓健脾而渗湿,利水而不伤正。诸药协同,可调整肾肝脾三脏功能,有开有阖,寓泻于补,使补而不膩,泻邪而不伤正^[9]。有研究说明,金匱肾气丸等补肾中药尤其是平补和补阳中药,能够上调维生素 D 受体(VDR)蛋白表达,促进骨形成,具有预防骨质疏松疾病的功能^[10]。钙制剂为治疗骨质疏松的基础治疗用药,是骨质疏松症治疗中应用最广泛的药物。但单纯补钙对骨量无影响,并不能降低骨折的发生率,目前大多数学者主张将钙剂作为辅助治疗用药与其他治疗药物联合使用。因此,本研究将金匱肾气丸与葡萄糖酸钙联用,观察其对卵巢去势大鼠骨质疏松的防治作用及机制。

在本实验中,通过病理组织学检查发现:模型组可见骨小梁稀疏、断裂、排列紊乱,并可见游离末端,骨皮质疏松,表面破骨细胞活跃,局部呈蚕食样及葱皮样改变,骨髓腔扩大。经钙片和金匱肾气丸治疗后骨皮质可见蚕食样改变区域变小,偶见破骨细胞,骨小梁较细,排列较为一致,未见明显异常。联合用

药组骨皮质厚度基本正常,未见蚕食样及葱皮样改变,未见破骨细胞,骨松质结构清楚,骨小梁略变细,排列较整齐,骨小梁厚度基本正常。说明金匱肾气丸联合葡萄糖酸钙能够明显改善去势大鼠骨组织结构的病理变化,对骨质疏松具有更好的防治效果。

实验结果显示,各组大鼠的血钙、磷含量无显著差异,这可能是由于去卵巢后动物雌激素水平下降,骨吸收过程加强,但同时破骨细胞活性的增强能促使成骨细胞反应性地加强其功能活性,通过分泌更多的促进成骨作用的细胞因子,加快骨组织的矿化速度,从而建立破骨与成骨的新平衡。另外,去势大鼠骨钙含量与正常对照组相比明显降低,钙片组、金匱肾气丸组、金匱肾气丸联合钙片组去势大鼠骨钙的含量较模型组明显升高,尤其以联合用药组升高更明显,说明金匱肾气丸联合葡萄糖酸钙可减少骨矿物质的丢失。因此,金匱肾气丸联合葡萄糖酸钙能够改善机体钙磷代谢的失衡,减少骨矿物质的丢失,既促进了骨的形成,又抑制了骨的破坏吸收,恢复其原有的动态平衡,明显改善骨显微结构病理变化,从而起到防治骨质疏松的作用。但是,由于时间及经费的问题,本实验仅仅检测了血钙、磷、骨钙含量和组织病理学的变化,探讨了金匱肾气丸联合葡萄糖酸钙防治骨质疏松的部分机制,并不能完全阐明其防治骨质疏松的机制,有待于深入研究。

【参考文献】

- [1] 林燕萍,周瑞祥,郭世明,等. 健骨颗粒对去卵巢骨质疏松模型大鼠骨质量的影响. 中国中西医结合杂志,2004,24(5): 431-434.
- [2] 镐英杰,唐煜,高坤,等. 反映骨质疏松大鼠骨代谢变化生化指标的应用. 中国临床康复,2005,9(31): 172-174.
- [3] Wronski TJ, Schenck PA, Cintron M, et al. Effect of bodyweight on osteopenia in ovariectomized rats. Calcif tissue Int, 1987, 40: 155-159.
- [4] Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, et al. Role of rank ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. J Clin Invest, 2003, 111: 1120-1122.
- [5] Wang FS, Wang CJ, Chen YJ, et al. Nitric oxide donor increases osteoprotegerin production and osteoclastogenesis inhibitory activity in bone marrow stromal cells from ovariectomized rats. Endocrinology, 2004, 145: 2148-2156.
- [6] 曾天舒,陈璐璐,潘世秀,等. 补肾法对去卵巢大鼠骨髓细胞 OPG、RANKL 和 TNF- α 基因表达的影响. 中国骨质疏松杂志, 2006, 12(4): 323-326.
- [7] 金珉廷,郑洪新,朱辉. 补肾中药对骨质疏松症大鼠下丘脑 BMP-4、Smad6 mRNA 及蛋白表达的影响. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(8): 556-560.
- [8] 陈卫国. 金匱肾气丸的配伍特点及其临床指导意义. 中医杂志, 2009, 50(4): 378-379.
- [9] 刘贺亮,陈长生,王文勇,等. 金匱肾气丸对大鼠肾阳虚症的干预研究. 第四军医大学学报, 2009, 30(20): 2140-2142.
- [10] 魏义勇,石印玉,冯伟,等. 补肾中药对增龄成骨细胞 VDR 蛋白表达的影响. 中国骨质疏松杂志, 2006, 12(2): 177-180.

(收稿日期: 2010-07-15)

作者: 王建伟, 马勇, 周玲玲, 尹恒, 周信, 张亚峰, 徐兵, 王庆
作者单位: 王建伟, 尹恒, 张亚峰, 徐兵, 王庆(无锡市中医院骨科中心, 江苏, 214001), 马勇, 周玲玲, 周信(南京中医药大学骨伤科研究所)
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(20条)

1. 林燕萍, 周瑞祥, 郭世明 健骨颗粒对去卵巢骨质疏松模型大鼠骨质量的影响[期刊论文]-中国中西医结合杂志 2004(05)
2. 林燕萍, 周瑞祥, 郭世明, 黄美雅, 张安桢 健骨颗粒对去卵巢骨质疏松模型大鼠骨质量的影响 2004(5)
3. 魏义勇, 石印玉, 冯伟 补肾中药对增龄成骨细胞VDR蛋白表达的影响[期刊论文]-中国骨质疏松杂志 2006(02)
4. 镐英杰, 唐煜, 高坤, 裴福兴 反映骨质疏松大鼠骨代谢变化生化指标的应用 2005(31)
5. 刘贺亮, 陈长生, 王文勇 金匮肾气丸对大鼠肾阳虚症的干预研究[期刊论文]-第四军医大学学报 2009(20)
6. Wronski TJ, Schenck PA, Cintron M Effect of bodyweight on osteopenia in ovariectomized rats 1987
7. 陈卫国 金匮肾气丸的配伍特点及其临床指导意义[期刊论文]-中医杂志 2009(04)
8. Eghbali-Fatourechi G, Khosla S, Sanyal A Role of rank ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women 2003
9. 金珉廷, 郑洪新, 朱辉 补肾中药对骨质疏松症大鼠下丘脑BMP-4、Smad6 mRNA及蛋白表达的影响[期刊论文]-中国骨质疏松杂志 2008(08)
10. Wang FS, Wang CJ, Chen YJ Nitric oxide donor increases osteoprotegerin production and osteoclastogenesis inhibitory activity in bone marrow stromal cells from ovariectomized rats 2004
11. 曾天舒, 陈璐璐, 潘世秀 补肾法对去卵巢大鼠骨髓细胞OPG、RANKL和TNF- α 基因表达的影响[期刊论文]-中国骨质疏松杂志 2006(04)
12. 曾天舒, 陈璐璐, 潘世秀, 夏文芳 补肾法对去卵巢大鼠骨髓细胞OPG、RANKL和TNF- α 基因表达的影响 2006(4)
13. Wang FS, Wang CJ, Chen YJ Nitric oxide donor increases osteoprotegerin production and osteoclastogenesis inhibitory activity in bone marrow stromal cells from ovariectomized rats 2004
14. 金珉廷, 郑洪新, 朱辉 补肾中药对骨质疏松症大鼠下丘脑BMP-4、Smad6 mRNA及蛋白表达的影响 2008(8)
15. Eghbali-Fatourechi G, Khosla S, Sanyal A Role of rank ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women 2003
16. 陈卫国 金匮肾气丸的配伍特点及其临床指导意义 2009(4)
17. Wronski TJ, Schenck PA, Cintron M Effect of bodyweight on osteopenia in ovariectomized rats[外文期刊] 1987
18. 刘贺亮, 陈长生, 王文勇 金匮肾气丸对大鼠肾阳虚症的干预研究 2009(20)
19. 镐英杰, 唐煜, 高坤 反映骨质疏松大鼠骨代谢变化生化指标的应用[期刊论文]-中国临床康复杂志 2005(31)
20. 魏义勇, 石印玉, 冯伟, 詹红生 补肾中药对增龄成骨细胞VDR蛋白表达的影响 2006(2)