

# 补肾健脾中药复方对去势大鼠骨骼肌线粒体通透转孔调控的研究

李颖 吴伙燕 黄宏兴 白波

中图分类号: R683 R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)12-1131-04

**摘要:** **目的** 探讨补肾健脾中药复方干预去势大鼠骨骼肌线粒体通透转孔的影响。**方法** 48 只 6 月龄的雌性 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、中药组、西药组。治疗 12 周后收集左侧股骨、股直肌分别行骨矿含量、骨密度测量,同时进行骨骼肌线粒体通透转孔的检测。**结果** 最后纳入研究的动物 40 只。模型组的骨密度值和骨矿含量均低于空白组,其差异有统计学意义( $P < 0.05$ );中药组和西药组的骨密度值均高于模型组,其差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。在骨骼肌线粒体通透转孔方面,空白组的 OD 比值均相应高于模型组的 OD 比值,其差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。经过药物干预后,观察组的 OD 比值与对照组的 OD 比值均相应低于同一时间点的模型组 OD 比值,其差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 补肾健脾中药复方对去势大鼠有明显的治疗作用,能明显提高骨密度;而且能在一定程度抑制骨骼肌细胞的凋亡。

**关键词:** 去势大鼠; 中药复方; 线粒体通透转孔; 骨骼肌

## Study of Chinese herbal compound for tonifying the kidney and invigorating the spleen on the modulation of skeletal muscle mitochondrial permeability and transition pore in ovariectomized rats

LI Ying, WU Huoyan, HUANG Hongxing, et al. Department of Orthopedics, Guangdong Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Foshan 528200, China

Corresponding author: LI Ying, Email:leewinly@163.com

**Abstract: Objective** To study the effect of the Chinese herbal compound for tonifying the kidney and invigorating the spleen on skeletal muscle mitochondrial permeability transition pore (MPTP) in ovariectomized rats. **Methods** Forty-eight 6-month-old female SD rats were randomly divided into 4 groups: control group, model group, traditional Chinese herb group, and western medicine group. After a 12-week treatment, the left femur and the left rectus femoris were collected. Bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were measured using dual energy X-ray absorptiometry. MPTP was detected with colorimetry. **Results** Forty rats were involved in the result analysis eventually. BMD and BMC in model group were lower than those in control group, and the difference was significant ( $P < 0.05$ ). BMD of both traditional herb group and western medicine group was higher than that in model group, and the difference was significant ( $P < 0.05$ ). As to MPTP, the OD ratio in control group was higher than that in model group, and the difference was significant ( $P < 0.05$ ). After the drug intervention, the OD ratio in control group, traditional Chinese herb group, and western medicine group was lower than that in model group at the same time point, and the difference was significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The Chinese herbal compound for tonifying the kidney and invigorating the spleen has an obvious treatment effect on ovariectomized rats. It can improve BMD significantly and inhibit the apoptosis of skeletal muscle cells to some extent.

基金项目: 国家自然科学基金(81001532)中国博士后基金(20100480737);广东省科技计划项目(2010B030700076);广州市中医药科技项目(201122231001)

作者单位: 528200 佛山市,广东省中西医结合医院骨科(李颖、吴伙燕);广州中医药大学附属骨伤科医院骨科(黄宏兴);广州医学院第一附属医院骨科(白波)

通讯作者: 李颖, email:leewinly@163.com

万方数据

**Key words:** Ovariectomized rats; Chinese herbal compound; Mitochondrial permeability transition pore; Skeletal muscle

现在对骨质疏松的研究较多,多是集中于骨“质”、骨“量”和改善症状方面。而肌肉改变与骨质疏松的关系的研究较少,现代研究认为老年人骨骼肌肉系统的退行性改变会造成骨量减少,进而引起运动能力下降、步行缓慢、骨脆性增大、易骨折,最终导致老年人生活质量的下降。进一步的研究证实<sup>[1-2]</sup>肌肉的衰退与细胞凋亡有密切相关,而线粒体通透转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)在细胞凋亡中扮演重要角色,并且在植物和动物细胞的死亡过程中均起重要作用。本研究通过对线粒体通透转换孔的观察,探讨补肾健脾中药复方对去势大鼠骨骼肌调控的情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

选用6月龄健康雌性未孕SD大鼠48只,体重为 $309.17 \pm 26.31$ g,购自广东省医学实验动物中心(合格证明编号:0069773)。所有SD大鼠均喂养在恒温、恒湿的清洁环境中,环境温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,湿度为70%,每天12h光照/黑暗,任意进食饲养者提供的大鼠标准饲料和自来水。将48只大鼠随机分为对照组、模型组、中药组和西药组,各12只。

### 1.2 药物

补肾健脾中药复方由淫羊藿、补骨脂、丹参、黄芪等10味中药组成,该方的提取药物所含生药量为1.43kg/L,由广州中医药大学附属骨伤科医院制剂室提供。戊酸雌二醇片,由拜耳医药保健有限公司广州分公司提供(国药准字J20080036,批号:177A12)。

### 1.3 造模

模型组、观察组、对照组大鼠用10%水合氯醛溶液按 $0.33\text{ml}/100\text{g}$ 腹腔注射,5min后,SD大鼠完全麻醉,采用背侧入路双侧卵巢摘除手术造模。大鼠俯卧位,肋弓下第3腰椎处,去毛,消毒,切口,切口一般为1cm,钝性分离致肌肉层,腰椎左侧0.5cm钝性分离肌肉,小心剪开腹膜,组织镊深入伤口,小心提起腹腔脂肪,轻手翻开脂肪,找到梅花状的卵巢,1号无菌丝线结扎,眼科剪从输卵管剪断分离卵巢,压迫止血后,将脂肪小心放入腹腔,分层缝合肌肉筋膜;同样的方法,切除右侧卵巢,伤口内滴入少量青霉素水溶液,缝合皮肤,消毒伤口。空白组用同

样办法找到卵巢后,将卵巢从腹腔提出而不切除,仅切除周围少量脂肪组织,伤口内滴入少量青霉素水溶液,缝合皮肤,消毒伤口。术后分笼饲养。

### 1.4 治疗方法

造模2周后,中药组和西药组根据人与动物及各类动物间药物剂量换算方法计算,灌胃的药量分别为 $2.979\text{g}/\text{kg}$ , $0.104\text{mg}/\text{kg}$ ,每日灌胃1次。对照组、模型组灌服 $10\text{ml}/\text{kg}$ 蒸馏水。干预12周后,人道主义处死各组大鼠,取出左侧大腿股直肌组织,立即放入液氮罐,同时完整分离出左侧股骨,放入 $4^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

### 1.5 指标检测

#### 1.5.1 离体骨密度和骨矿含量测量

应用双能X线骨密度仪小动物专用扫描和分析软件(美国HOLOGIC公司生产,型号:Discovery A,变异系数CV值: $\text{BMD} = 0.816\%$ 、 $\text{BMC} = 1.117\%$ 、 $\text{AREA} = 0.505\%$ ),对各组大鼠左侧股骨进行离体BMC和BMD测量。

#### 1.5.2 骨骼肌线粒体通透转换孔的检测

采用比色法测定骨骼肌线粒体通透转换孔的变化,其结果根据加入诱导液后任意时间的读数低于加入前的读数表示MPTP开放。即 $\text{A440}/\text{InitialA440}$ 小于1,根据MPTP开放曲线,趋势分析MPTP的开放活性,若吸光比值降低表明诱导MPTP活性增强。该试剂盒由上海杰美基因医药科技有限公司提供。

### 1.6 统计学方法

用SPSS 16.0软件包分析,实验设计为多因素非平衡的组合类型,将组别拆分成2个组合进行比较,即模型组与对照组进行比较,模型组与中药组、西药组进行比较,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,分别采用单因素方差分析及t检验。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠一般情况变化

各组大鼠造模1周内均出现不同程度的饮食量减少,活动减少,蜷腰弓背,毛发凌乱欠光泽;1周后各组大鼠逐渐恢复,活动逐渐灵活,饮食饮水正常。

实验过程中,空白组死亡1只,因麻醉过量致死;模型组死亡2只,中药组死亡3只,西药组死亡2只,死亡原因均为灌胃不当误入肺部或肠胃胀气致

死。最后纳入统计分析的各组大鼠的数量为:空白组 11 只、模型组 10 只、中药组 9 只、西药组 10 只。

### 2.2 各组大鼠离体股骨骨密度和骨矿含量

治疗 12 周后,模型组的骨密度值低于对照组,其差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );说明骨质疏松症模型造模成功。中药组和西药组的骨密度值均高于模型组,其差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );中药组与西药组的骨密度值和骨矿含量接近,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见表 1。

### 2.3 骨骼肌线粒体通透转换孔在各个时间段的 OD 比值变化

根据设定时间点实际吸光值/0 分钟吸光值——吸光值比值降低,表明线粒体通透转换孔的

表 1 各组股骨全段骨矿含量和骨密度值 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	BMC(g)	BMD(g/m <sup>2</sup> )
空白组	11	0.6763 ± 0.0741 *	0.3302 ± 0.0161 *
模型组	10	0.4870 ± 0.0395	0.2638 ± 0.0173
中药组	9	0.5167 ± 0.0487	0.2767 ± 0.0115 *
西药组	10	0.5050 ± 0.0272	0.2767 ± 0.0090 *

\*  $P < 0.05$ ,与模型组比较

活性增强的原理。在各个时间点与加诱导剂前的时间点比较中,空白组的 OD 比值均相应高于模型组的 OD 比值,其差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。经过药物干预后,观察组的 OD 比值与对照组的 OD 比值均相应低于同一时间点的模型组 OD 比值,其差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2 和表 3。

表 2 骨骼肌线粒体通透转换孔在各个时间段的 OD 比值 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	0 min/诱导前	3 min/诱导前	6 min/诱导前	9 min/诱导前
空白组	11	1.029 ± 0.073	1.051 ± 0.124 *	1.039 ± 0.119 *	1.043 ± 0.131 *
模型组	10	0.973 ± 0.028	0.950 ± 0.039	0.942 ± 0.046	0.940 ± 0.041
中药组	9	1.025 ± 0.107	1.034 ± 0.124 *	1.008 ± 0.068 *	1.011 ± 0.076 *
西药组	10	1.001 ± 0.029	1.025 ± 0.054 *	1.02 ± 0.051 *	1.013 ± 0.061 *

\* 与模型组比较,  $P < 0.05$

表 3 骨骼肌线粒体通透转换孔在各个时间段的 OD 比值 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	15 min/诱导前	20 min/诱导前	30min/诱导前
空白组	11	1.050 ± 0.122 *	1.045 ± 0.125 *	1.040 ± 0.131 *
模型组	10	0.947 ± 0.040	0.927 ± 0.061	0.936 ± 0.078
中药组	9	1.018 ± 0.061 *	1.033 ± 0.089 *	1.018 ± 0.077 *
西药组	10	1.032 ± 0.051 *	1.043 ± 0.081 *	1.028 ± 0.060 *

\*  $P < 0.05$ ,与模型组比较

## 3 讨论

老年人骨骼肌肉系统的退行性改变会造成骨量减少,主要是因为老年人的肌力呈衰退状态,骨强度大于肌力,骨骼处于相对废用状态,骨以废用性再建为主,骨转换加快,骨吸收大于骨形成,骨量减少,从而引起骨质疏松。Kritz-Silverstein 等<sup>[3]</sup>发现随着年龄增长,骨质的丢失与肌肉强度的降低相平行。肌力训练能促进骨的形成,增加骨的强度,可以对抗由于年龄增长导致的骨质丢失。而肌力下降则主要与肌量减少所致,也与脂肪增加或 BMD 下降有关,但两者并非是简单的线性关系。Brown 等<sup>[4]</sup>发现 60 ~ 79 岁的男性经 6 个月肌力训练后腰椎骨密度均有增高。肌肉组织质量与骨密度有密切相关<sup>[5-6]</sup>,并证实肌肉协调性紊乱或平衡性障碍导致的摔倒是骨质疏松骨折的主要诱因。

现代医学认为,肌肉衰退的主要原因是细胞的

凋亡。细胞内有三条凋亡途径,即外源性途径、内源性途径和内质网途径,这三条凋亡途径都是通过活化半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 (Cysteine - aspartate specific protease, Caspase),最终集中到线粒体来执行凋亡过程<sup>[7-8]</sup>。线粒体外膜通透性增加是细胞死亡的关键步骤。因此,MPTP 的开放意味着外膜通透性的增加,其开放的结果是线粒体跨膜电位的下降和线粒体呼吸抑制。此时,由于线粒体内膜的通透性增加,质子梯度消失,ATP 生成减少,线粒体肿胀,线粒体去极化导致线粒体跨膜电位下降,随着内膜的去极化,进而细胞色素 c、procaspase - 2、-3、-9 被释放。细胞色素 c 和细胞质中的 Apaf - 1 结合成凋亡小体,激活 Caspases,启动凋亡反应。对于凋亡模式,可以分为三个过程<sup>[9]</sup>,信号传递级联和损伤通路激活的前线粒体阶段(发动阶段);MPT 阶段(决定/影响因子阶段);线粒体释放出的凋亡相关因子激活蛋白酶和核酶的后线粒体阶段(降解阶段)。Costantini 等<sup>[10]</sup>认为,MPTP 开放可以在接受死亡信号以后在同一细胞内形成正反馈,这意味着 MPTP 开放一旦发生就可不再依赖原来的刺激信号,因此细胞将不可逆地走向死亡。在我们的一项前期研究中<sup>[11]</sup>,发现骨质疏松症骨骼肌 MPTP 的通透性高于非骨质疏松症,基于这一点,我们认为通过观察 MPTP 的开放结果来观

察药物对细胞的调控情况。

中医认为肌肉的衰退主要是脾虚,认为脾的运化功能是否正常,必然影响肌肉的功能。若脾气健旺,输送营养充足,则肌肉丰满,四肢轻劲,灵活有力。反之,若脾失健运,营养缺乏,则可导致四肢倦怠无力,甚至肌肉萎软。这种生理功能与线粒体的功能特点有很多共通之处,其氧化磷酸化产能过程与脾主运化功能相吻合。而骨质疏松症的病机主要与肾虚、脾虚和血瘀有关。因此防治骨质疏松症的原则为补肾壮骨、健脾益气、活血通络。本研究据此原则组方,研制出防治骨质疏松症的补肾健脾中药复方,该方由补骨脂、淫羊藿、肉苁蓉、熟地、白芍、黄芪、菟丝子、丹参、当归、大枣等十味中药组成,以补骨脂补肾助阳壮骨为君药,辅之肉苁蓉、淫羊藿、菟丝子加强其补肾壮阳之功为臣药,同时配以黄芪补中益气;丹参、当归活血通络;熟地、白芍滋阴益精,此乃“善补阳者,必于阴中求阳”和“壮水之源,以制阳光”之意,此五味药既培补后天生化之源以充肾精,又达到补中寓通,补而不滞的目的,共为佐药。再以大枣调中和胃为使药。另外,方中黄芪、当归合用补气生血,可助菟丝子、熟地、白芍补精血之力,大枣可助黄芪健脾益气之功。故本方具有补肾壮骨、健脾益气、活血通络的作用。在前期的研究中发现该方对去势大鼠具有明显的治疗作用,其机制可能是在一定程度地提高了体内的雌激素水平<sup>[12-13]</sup>。我们早前的研究发现<sup>[14]</sup>,采用补肾健脾中药和雌激素分别干预去势大鼠,检测两个时间段的骨骼肌MPTP变化,发现两种药物组的值高于模型组,但只有雌激素组与模型组有统计学意义。在本研究中,我们设计了7个时间段,模型组的OD比值均低于模型组,其差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示模型组骨骼肌线粒体通透转换孔的活性增强;经过药物干预后,中药组与西药组除在0 min外的时间点均相应高于模型组,其差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示中药复方与戊酸雌二醇均能抑制骨骼肌线粒体通透转换孔的活性,两者作用相当。因此,本研究进一步提示了骨质疏松症骨骼肌MPTP的通透性高于非骨质疏松症,补肾健脾中药复方能一定程度抑制骨骼肌细胞的凋亡。

## 【参 考 文 献】

- [ 1 ] Andrianjafinony T, Dupré-Aucouturier S, Letexier D, et al. Oxidative stress, apoptosis, and proteolysis in skeletal muscle repair after unloading. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 299 ( 2 ):C307-315.
- [ 2 ] Godbole A, Varghese J, Sarin A, et al. VDAC is a conserved element of death pathways in plant and animal systems. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1642 ( 1-2 ): 87-96.
- [ 3 ] Kritz-Silverstein D, Barrett-Connor E. Grip strength and bone mineral density in older women. *J Bone Miner Res*, 1994, 9 ( 1 ):45-51.
- [ 4 ] Brown AB, McCartney N, Sale DG. Positive adaptations to weight-lifting training in the elderly. *J Appl Physiol*, 1990, 69 ( 5 ):1725-1733.
- [ 5 ] Douch T, Kuwahata R, Matsuo T, et al. Relative contribution of lean and fat mass component to bone mineral density in males. *J Bone Miner Metab*, 2003, 21 ( 1 ): 17- 21.
- [ 6 ] Bayramoğlu M, Sözüy S, Karataş M. Relationships between muscle strength and bone mineral density of three body regions in sedentary postmenopausal women. *Rheumatol Int*, 2005, 25 ( 7 ):513-517.
- [ 7 ] Fossati S, Cam J, Meyerson J, et al. Differential activation of mitochondrial apoptotic pathways by vasculotropic amyloid-beta variants in cells composing the cerebral vessel walls. *FASEB J*, 2010, 24( 1 ):229-241.
- [ 8 ] MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep*, 2004, 5( 7 ):674-678.
- [ 9 ] Loeffler M, Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*, 2000, 256 ( 1 ): 19-26.
- [ 10 ] Costantini P, Jacotot E, Decaudin D, et al. Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92( 13 ): 1042-1053.
- [ 11 ] 李颖,白波,吴伏燕,等. 骨骼肌线粒体通透转换孔在骨质疏松症中的变化. *中华实验外科杂志*, 2011, 28( 7 ):1071-1073.
- [ 12 ] 庄洪,李颖,黄宏兴,等. 中药骨康对去势大鼠的骨密度和 IL-1、IL-6 的影响. *中国老年学杂志*, 2008, 28( 12 ):1074-1076.
- [ 13 ] 李颖,黄宏兴,庄洪,等. 中药骨康对去势大鼠骨质疏松作用机制的实验研究. *中华中医药杂志*, 2009, 24( 2 ):160-163.
- [ 14 ] 李颖,白波,黄宏兴,等. 补肾健脾方对骨质疏松骨骼肌线粒体氧化应激的影响. *中华中医药杂志*, 2011, 26( 8 ):1746-1749.

( 收稿日期:2012-04-27 )

# 补肾健脾中药复方对去势大鼠骨骼肌线粒体通透转孔调控的研究

作者: 李颖, 吴伙燕, 黄宏兴, 白波  
作者单位: 李颖, 吴伙燕(广东省中西医结合医院骨科, 佛山市, 528200), 黄宏兴(广州中医药大学附属骨伤科医院骨科), 白波(广州医学院第一附属医院骨科)  
刊名: 中国骨质疏松杂志   
英文刊名: CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS  
年, 卷(期): 2012, 18(12)

## 参考文献(14条)

1. [Andrianjafiniony T;Dupré-Aucouturier S;Letexier D Oxidative stress, apoptosis, and proteolysis in skeletal muscle repair after unloading](#) 2010(02)
2. [Godbole A;Varghese J Sarin AVDAC is a conserved element of death pathways in plant and animal systems](#) 2003(1-2)
3. [Kritz-Silverstein D;Barrett-Connor E Grip strength and bone mineral density in older women](#) 1994(01)
4. [Brown AB;McCartney N;Sale DG Positive adaptations to weight-lifting training in the elderly](#) 1990(05)
5. [Douch T;Kawahata R;Matsuo T Relative contribution of lean and fat mass component to bone mineral density in males](#) 2003(01)
6. [Bayramoglu M;Szay S;Karata M Relationships between muscle strength and bone mineral density of three body regions in sedentary postmenopausal women](#) 2005(07)
7. [Fossati S;Cam J;Meyerson J Differential activation of mitochondrial apoptotic pathways by vasculotropic amyloid-beta variants in cells composing the cerebral vessel walls](#) 2010(01)
8. [MacFarlane M;Williams AC Apoptosis and disease:a life or death decision](#)[外文期刊] 2004(07)
9. [Loeffler M;Kroemer G The mitochondrion in cell death control:certainities and incognita](#)[外文期刊] 2000(01)
10. [Costantini P;Jacotot E;Decaudin D Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy](#)[外文期刊] 2000(13)
11. 李颖;白波;吴伙燕 骨骼肌线粒体通透转换孔在骨质疏松症中的变化[期刊论文]-中华实验外科杂志 2011(07)
12. 庄洪;李颖;黄宏兴 中药骨康对去势大鼠的骨密度和IL-1、IL-6的影响[期刊论文]-中国老年学杂志 2008(12)
13. 李颖;黄宏兴;庄洪 中药骨康对去势大鼠骨质疏松作用机制的实验研究[期刊论文]-中华中医药杂志 2009(02)
14. 李颖;白波;黄宏兴 补肾健脾方对骨质疏松骨骼肌线粒体氧化应激的影响[期刊论文]-中华中医药杂志 2011(08)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zggzsszz201212016.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201212016.aspx)