

补肾健脾中药方对去卵巢大鼠血清 SOD 和 MDA 的影响

黄宏兴^{1*} 李颖² 黄红³ 李泽钿⁴ 赖圆⁴ 罗明⁴

1. 广州中医药大学附属骨伤科医院, 广州 510240

2. 广东省中西医结合医院, 广东佛山 528200

3. 广州中医药大学护理学院, 广州 510405

4. 广州中医药大学 广州

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 01-0001-04

摘要: **目的** 探讨补肾健脾中药方对去卵巢大鼠血清 SOD 和 MDA 的影响。**方法** 48 只 6 月龄的雌性 SD 大鼠随机分为正常空白组、模型组、中药组、西药组。治疗 12 周后, 收集左侧股骨、血清分别行 BMD 测量和 SOD、MDA 检测。**结果** 最后纳入研究动物 40 只。股骨 BMD 值, 模型组低于正常空白组 ($P < 0.01$); 观察组、对照组分别与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 SOD 方面, 观察组、对照组的 SOD 值均比模型组高, 三者比较, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 MDA 方面, 观察组、对照组的 MDA 值均比模型组低, 三者比较, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 补肾健脾中药方具有提高去卵巢大鼠 BMD 的作用; 能够提高血清中 SOD 的含量, 同时减低 MDA 含量, 在一定的程度上清理自由基, 达到防治骨质疏松症的目的。

关键词: 去卵巢大鼠; 中药复方; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

Effect of the Chinese herbal compound for tonifying the kidney and strengthening the spleen on serum SOD and MDA in ovariectomized rats

HUANG Hongxing¹, LI Ying², HUANG Hong³, LI ZHETIAN⁴, LAI Yuanyuan⁴, LUO Ming⁴

1. The Affiliated Orthopedic Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510240, China

2. Guangdong Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Foshan 528200, China

3. College of Nursing of G Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

4. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

Corresponding author: HUANG Hongxing, Email: gzhhx@126.com

Abstract: Objective To investigate the effect of the tonifying the kidney and strengthening the spleen prescription on serum super oxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in ovariectomized rats. **Methods** Forty-eight 6-month female SD rats were randomly divided into 4 groups ($n = 12$): normal group, ovariectomized group, control group, and observation group. After 12-week treatment, bone mineral density (BMD) of the left femur was detected, and the serum levels of SOD and MDA were also detected. **Results** Forty rats were included in the study finally. BMD of the femur in normal group was higher than that in ovariectomized group ($P < 0.01$). Significant difference of BMD of the femur in observation group and control group was observed compared with that in ovariectomized group ($P < 0.05$), respectively. The serum level of SOD in both observation group and control group was higher than that in ovariectomized group, and significant difference was observed among 3 groups ($P < 0.05$). On the contrary, the serum level of MDA in both observation group and control group was lower than that in ovariectomized group, and significant difference was also observed among 3 groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The tonifying the kidney and strengthening the spleen prescription can improve BMD in ovariectomized rats, improve the serum level of SOD, and reduce the serum level of MDA, which can clear up free radicals to some extent, achieving the purpose of preventing and treating osteoporosis.

Key words: Ovariectomized rats; Chinese herbal compound; Super oxide dismutase; Malondialdehyde

目前认为骨质疏松症与增龄、激素调控、营养状态、物理因素、免疫机能及遗传基因等有关, 雌激素

水平降低是绝经后骨质疏松发病的主要原因。然而骨质疏松症的病因相当复杂,各因素之间又互相联系、互相制约,其发病机理仍有待深入研究。随着自由基医学和自由基生物学的发展,活性氧自由基致脂质过氧化损伤作为一个新的致病因素受到国内外广大生物学和医学工作者的极大关注。本研究采用补肾健脾中药方干预去卵巢大鼠,检测线粒体中超氧化物歧化酶(Super oxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)活性情况,以明确线粒体氧化损伤与细胞凋亡的关系及抗氧化的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用6月龄健康雌性未孕 Sprague Dawley (SD) 大鼠48只, SPF级(Specific pathogen free, SPF), 体重约 309.17 ± 26.31 g, 购自广东省医学实验动物中心, 实验动物质量合格证明编号:0069773。大鼠随机分为正常空白组、模型组、观察组(中药骨康方组)、对照组(西药戊酸雌二醇组), 每组12只。

1.2 实验条件

所有SD大鼠均饲养在恒温、恒湿的清洁环境中, 环境温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 湿度为70%, 自由活动, 光照12 h, 黑暗12 h。供给标准固体饲料(由广州中医药大学实验动物中心提供), 自由摄食水, 每周称体重1次。实验过程中, 对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[3]。

1.3 实验药品

观察组为补肾健脾中药方的药物组成为: 补骨脂、制淫羊藿、肉苁蓉、熟地、白芍、黄芪、菟丝子、丹参、当归、大枣等。该方的提取物, 含生药量1.43 g/ml, 由广州中医药大学附属骨伤科医院制剂室提供。对照组为戊酸雌二醇片, 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)。用药量以成人的用量推算动物用量, 根据人与动物及各类动物间药物剂量换算方法计算, 具体如下: 计算公式: 大鼠的剂量(mg/kg) = W × 成人的剂量(mg/kg), W: 折算系数为6.25。补肾健脾中药方: 成人按60 kg计算, 每天口服28.6 g。大鼠用量 = $6.25 \times 28.6 / (60 \text{ g} \cdot \text{kg})^{-1} = 2.979 \text{ g/kg}$ 。戊酸雌二醇: 成人按60 kg计算, 每天口服1 mg。大鼠用量 = $6.25 \times 1 / (60 \text{ mg} \cdot \text{kg})^{-1} = 0.104 \text{ mg/kg}$ 。所用药物以蒸馏水定容至所需浓度, 每日灌胃一次。

1.4 造模方法

模型组、观察组、对照组大鼠用10%水合氯醛溶液按0.33 ml/100 g腹腔注射5 min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1 cm, 钝性分离致肌肉层, 腰椎左侧0.5 cm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, 找到桑椹状的卵巢, 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。正常空白组用同样方法找到卵巢后, 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。

1.5 取材方法

给药12周, 最后一次灌胃后2 h, 将大鼠在乙醚麻醉罐内麻醉完成后, 将采血针顺着眼球内侧顺势刺入, 把眼球动脉扎破, 顺着采血针流出血液, 每只SD大鼠采血约5 ml, 贴标签, 离心获取血清, 灭活, 抽滤除菌, 置-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.6 指标检测

1.6.1 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: BMD = 0.816%、BMC = 1.117%、AREA = 0.505%), 对各组大鼠左侧股骨进行离体BMC和BMD测量。

1.6.2 大鼠血清SOD和MDA含量的检测: 采用比色法测定血清中SOD和MDA含量, 试剂盒由凯基生物科技有限公司提供。

1.7 统计学分析方法

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, 将组别拆分成两个组合进行比较, 即模型组与正常空白组进行比较, 模型组与观察组、对照组进行比较, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 先进行正态性分析, 符合要求后各组间差异分别采用方差分析。

2 结果

2.1 动物数量分析

实验过程中, 正常空白组死亡1只, 因麻醉过量致死; 模型组死亡2只, 观察组死亡3只, 对照组死亡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数为: 正常空白组11只、模型组10只、观察组9只、对照组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。

表 1 各组股骨全段骨矿含量和骨密度值($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Bone mineral content and BMD of the entire femur in each group ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | BMD(g/m^2) |
|-------|----|------------------------------|
| 正常空白组 | 11 | 0.3302 \pm 0.0161 * |
| 模型组 | 10 | 0.2638 \pm 0.0173 |
| 中药组 | 9 | 0.2767 \pm 0.0115 * |
| 西药组 | 10 | 0.2767 \pm 0.0090 * |

注:与模型组比较,* $P < 0.05$

2.3 大鼠血清中 SOD 和 MDA 活性变化

在各组大鼠血清 SOD 变化比较方面,正常空白组的 SOD 值比模型组高,两组比较,有统计学意义($P < 0.05$);而观察组、对照组的 SOD 值均比模型组高,三者比较,有统计学意义($P < 0.05$)。在 MDA 方面,正常空白组的 MDA 值比模型组低,两组比较,有统计学意义($P < 0.05$);而观察组、对照组的 MDA 值均比模型组低,三者比较,有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠血清中 SOD 和 MDA 活性的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the activity of SOD and MDA in rat serum between each group ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | SOD(U/ml) | MDA(nmol/ml) |
|-------|----|----------------------|-------------------|
| 正常空白组 | 11 | 136.35 \pm 8.12 * | 8.02 \pm 3.40 * |
| 模型组 | 10 | 114.84 \pm 15.49 | 11.46 \pm 3.31 |
| 观察组 | 9 | 130.64 \pm 11.71 * | 9.18 \pm 1.72 * |
| 对照组 | 10 | 128.79 \pm 16.53 * | 8.08 \pm 1.63 * |

注:与模型组比较,* $P < 0.05$

3 讨论

中医学在抗老防衰延年益寿方面积累了丰富的经验。根据“肾主骨”、“脾主肌”,脾肾理论,认为在生理上先天肾与后天脾相互资生,相互促进,维持人体的正常生理活动;病理上若脾肾互济失调,两者互相影响,互为因果,导致一系列疾病;治疗上治脾不忘补肾,补肾亦应注意健脾,或脾肾并重,脾肾同治,再佐以他法。骨质疏松症属于中医“骨痿”范畴,其病因主要与脾虚、肾虚有关。基于“肾主骨”、“脾主肌”和脾肾相关的理论,在治疗骨质疏松症时既要

补肾,亦应健脾。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方,该方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“壮水之主,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。前期的研究已经证实补肾健脾中药在骨质疏松症防治中的疗效确切^[1-2],在本研究中,通过对去卵巢大鼠的股骨 BMD 和 BMC 的检测,发现观察组、对照组均可提高左股骨全段的 BMD 值,差异有统计学意义($P < 0.05$),进一步说明该方具有上述的功用外,还具有类雌激素的作用。但其作用机制和作用靶点仍未明确。

SOD 是一种新型酶制剂,它在保护生物细胞免受超氧自由基和由其形成的活性氧类的毒害方面起着重要作用,迄今为止的研究表明^[3],SOD 广泛存在于多种生物体内,已从细菌、真菌、原生动物、藻类、昆虫、鱼类、植物和哺乳动物等生物体内分离得到了 SOD。SOD 通过催化超氧阴离子自由基(O_2^-)发生歧化反应,减轻或消除超氧阴离子自由基(O_2^-)对机体的损害,自由基的积累将使细胞膜的脂质发生过氧化作用而引起膜裂变,导致细胞损伤甚至细胞死亡。Estévez 等^[4]使用对 pH 敏感的脂质体来运导 SOD 进入运动神经元。进入胞内的 SOD 可以阻止由 NO 引起的神经元细胞凋亡,而空的脂质体、包裹了失活的 SOD 的脂质体或是未能运导入胞内的 SOD 则不能阻止。在 Chabot 等^[5]实验中,发现 SOD 可以阻断三氧化二砷诱导的细胞凋亡,可能是由于砷制剂可以抑制富含巯基的 SOD 活性,致使清除超氧化物能力下降,导致细胞凋亡。在本研究中,模型组中 SOD 的含量最低,提示该组产生了大量的自由基,但通过药物干预后,观察组和对照组 SOD 的含量提高,说明补肾健脾中药方和戊酸雌二醇均能提高大鼠血清 SOD 的含量,可以在一定的程度上提高清除自由基能力。

MDA 是多不饱和脂肪酸过氧化物的降解产物,与脂蛋白交联有毒性作用。在生物体内,自由基作用于脂质发生过氧化反应,氧化终产物为 MDA,会引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,且具有细胞毒性。MDA 的生成量不仅反映氧自由基生成与否还反映脂质过氧化程度,因而测定 MDA 含量可推测脂质过氧化程度。陈琳等^[6]发现实施运动

处方后安静状态和实施最后1次运动处方后血清MDA含量均比其对照值显著下降,说明各种有氧运动锻炼均可降低机体在不同功能状态下的自由基代谢水平,有利于减少自由基对机体的危害。Wyse等^[7]综合实验研究的结果表明有规律的有氧运动训练会增加机体内非酶抗氧化剂含量及抗氧化酶的活性,提高机体防御自由基损害的能力,所以有训练者在完成相同负荷后,血浆和组织中自由基的含量及脂质过氧化水平较没有训练者低。在本研究中,模型组中的MDA含量最多,均高于其他组,说明该组有大量的脂质过氧化反应的产物和氧自由基产生,随着药物的干预,观察组和对照组血清中的MDA含量降低,说明骨康方和戊酸雌二醇均能降低大鼠血清MDA的含量,可以在一定的程度上清理自由基。

综上所述,补肾健脾中药康方具有提高去卵巢大鼠BMD的作用;能够提高血清中SOD的含量,同时减低MDA含量,在一定的程度上清理自由基,达到防治骨质疏松症的目的。

【参 考 文 献】

[1] 黄红,黄宏兴,李颖,等. 补肾健脾活血方对骨质疏松骨骼肌线粒体通透转换孔调控的影响. 新中医,2010,42(6):113-115.
HUANG Hong, HUANG Hong-xing, LI Ying, et al. Effects of the prescription for invigorate the kidney and strengthen spleen and promoting blood on the mitochondrial permeability transition pore of skeletal muscle in osteoporosis. Journal of New Chinese Medicine, 2010,42(6):113-115. (in Chinese)

[2] 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.
LI Ying, BAI Bo, HUANG Hong-xing, et al. Effects of the prescription for invigorate the kidney and strengthen spleen on the oxidative stress of skeletal muscle mitochondrion in osteoporosis. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2011, 26(8):1746-1749. (in Chinese)

[3] 杜秀敏,殷文璇,张慧. 超氧化物歧化酶研究进展. 中国生物工程杂志,2002,23(1):77-79.
DU Xiu-min, YIN Wen-xuan, ZHANG Hui. The progress of super oxide dismutase. Journal of China Biotechnology, 2002, 23(1):77-79. (in Chinese)

[4] Estévez AG, Crow JP, Sampson JB, et al. Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. Science, 1999, 286(5449):2498-2500.

[5] Chabot G, Alos N, Brousseau Y, et al. Osteoporosis and fractures in children with Duchenne's muscular dystrophy treated with glucocorticoids: a longitudinal study. J Bone Miner Res, 2002, 17:F419.

[6] 陈琳,赵冰. 不同运动处方对老年人丙二醛、超氧化物歧化酶、还原性谷胱甘肽和谷胱甘肽过氧化物酶的影响[J]. 新乡医学院学报,2007,24(3):238-239.
CHEN Lin, ZHAO Bing. Influences of different exercise prescriptions on malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathione and glutathione-PX of the elderly people. Journal of Xinxiang Medical College, 2007, 24(3):238-239. (in Chinese)

[7] Wyse C, Cathcart A, Sutherland R, et al. Effect of mammaldynamic exercise on exhaled ethane and carbonmonoxide levels inhuman, equine, and can ine athletes. Comp Biochem Physiol Amol Integr Physiol, 2005,141(2):239-246.

(收稿日期:2013-05-23)

补肾健脾中药方对去卵巢大鼠血清 SOD 和 MDA 的影响

作者: [黄宏兴](#), [李颖](#), [黄红](#), [李泽钿](#), [赖圆圆](#), [罗明](#), [HUANG Hongxing](#), [LI Ying](#),
[HUANG Hong](#), [LI Zhetian](#), [LAI Yuanyuan](#), [LUO Ming](#)

作者单位: [黄宏兴](#), [HUANG Hongxing](#)(广州中医药大学附属骨伤科医院, 广州, 510240), [李颖](#), [LI Ying](#)(广东省中西医结合医院, 广东佛山, 528200), [黄红](#), [HUANG Hong](#)(广州中医药大学护理学院, 广州, 510405), [李泽钿](#), [赖圆圆](#), [罗明](#), [LI Zhetian](#), [LAI Yuanyuan](#), [LUO Ming](#)(广州中医药大学 广州)

刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 

英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年, 卷(期): 2014(1)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201401001.aspx