

中医不同治法对骨质疏松症小鼠骨密度、碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶影响的实验研究

蒋宁¹ 杨芳^{1*} 孙鑫¹ 郑洪新¹ 林庶如¹ 王拥军²

1. 辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110847
2. 上海中医药大学脊柱病研究所上海中医药大学龙华医院, 上海 200032

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 07-0789-03

摘要: **目的** 观察中医不同治法对骨质疏松症小鼠骨密度(BMD)、碱性磷酸酶(ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)变化的影响,探讨中医防治骨质疏松症的机制。**方法** 除正常组外,将骨保护素(OPG)基因敲除小鼠随机分为模型组、补肾组、健脾组、活血组和福善美组。检测各组小鼠BMD及血清ALP、TRAP含量。**结果** 1. 与正常组比较,模型组小鼠BMD显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,补肾组与健脾组BMD显著升高($P < 0.05$)。2. 与正常组比较,模型组小鼠血清ALP含量显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,补肾组、健脾组和福善美组小鼠血清ALP含量显著降低($P < 0.05$)。3. 与正常组比较,模型组小鼠血清TRAP含量显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,补肾组与健脾组小鼠血清TRAP含量显著降低($P < 0.05$)。**结论** 补肾和健脾方法能显著提高骨质疏松小鼠的骨量,明显抑制成破骨活性,使小鼠脱离高骨转换状态,起到治疗骨质疏松症的作用。

关键词: 骨质疏松;骨保护素;骨密度;碱性磷酸酶;抗酒石酸酸性磷酸酶

Experimental study on the effect of different therapies of TCM on bone mineral density, alkaline phosphatase, and tartrate resistant acid phosphatase in osteoporotic mice

JIANG Ning¹, YANG Fang¹, SUN Xin¹, ZHENG Hongxin¹, LIN Shuru¹, WANG Yongjun²

1. Basic Medical College, Liaoning University of Chinese Medicine, Shenyang 110847, China
2. Institute of Spinal Disease, Shanghai University of Chinese Medicine, Longhua Hospital of Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Corresponding author: YANG Fang, Email: yangfang163@sina.com

Abstract: **Objective** To observe the effect of different traditional Chinese medicine on BMD, ALP, and TRAP in osteoporotic mice, and to explore the mechanism of TCM in the treatment of osteoporosis. **Methods** Except the WT group, OPG knockout mice were randomly divided into model group, tonifying kidney group, invigorating spleen group, promoting blood flow group, and Fosamax group. BMD and the content of ALP and TRAP in the serum of the mice in different groups were detected. **Results** 1) BMD in the model group was significantly lower than that in the WT group ($P < 0.05$). BMD in the tonifying kidney group or the invigorating spleen group was significantly higher than that in the model group ($P < 0.05$). 2) The serum content of ALP in the model group was significantly higher than that in the WT group ($P < 0.05$). The serum content of ALP in the tonifying kidney group, the invigorating spleen group, or the Fosamax group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). 3) The serum content of TRAP in the model group was significantly higher than that in the WT group ($P < 0.05$). The serum content of TRAP in the tonifying kidney group or the invigorating spleen group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** The tonifying kidney and invigorating spleen treatment can treat osteoporosis by significantly improving bone mass, inhibiting osteoblast and osteoclast activities, and preventing from high bone turnover status in osteoporotic mice.

Key words: Osteoporosis; Osteoprotegerin; BMD; ALP; TRAP

基金项目: 辽宁省教育厅高校杰出青年学者成长计划 (LJQ2012084)

* 通讯作者: 杨芳, Email: yangfang163@sina.com

骨质疏松是一种以低骨量和骨组织微结构破坏为特征,导致骨质脆性增加和易于骨折的全身性骨代谢性疾病。本病与退行性改变有关,各类因素促

进破骨细胞介导的骨吸收,抑制成骨细胞介导的骨形成,使骨吸收作用大于骨形成,导致骨密度(BMD)的降低。碱性磷酸酶(ALP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)分别是成骨细胞和破骨细胞的特征酶,二者的表达和分泌与成骨细胞、破骨细胞的功能密切相关。

本文旨在通过观察补肾、健脾、活血治法对骨保护素(OPG)基因敲除致骨质疏松症小鼠 BMD、ALP 及 TRAP 变化的影响,探讨中医防治骨质疏松症的机制,为应用中医理论防治骨质疏松症提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级正常小鼠(C57BC)10 只、OPG 基因敲除小鼠(C57BL/6J)50 只,8 周龄,体重 18-20 g,由上海南方模式生物中心提供,合格证号:SCXK(沪)2012-0015。

1.2 药品与试剂

补肾中药由淫羊藿、活性马鹿茸、牡蛎制得;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:090101;活血中药为身痛逐瘀汤,由辽宁中医药大学附属医院制药厂提供;对照药为福善美,由杭州默沙东制药有限公司提供,生产批号:J20080073。碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶 ELISA 试剂盒,由美国 R&D 公司提供。

1.3 仪器

多功能酶标仪(型号 Infinite M200,瑞士 TECAN 公司);双能 X 线骨密度仪(型号 Lunar Prodigy,美国 GE 公司)。

1.4 分组

正常小鼠(C57BC)10 只作为正常组,OPG 基因敲除小鼠按随机数字表法平均分为 5 组,每组 10 只,分别为模型对照组(模型组)、补肾中药组(补肾组)、健脾中药组(健脾组)、活血化瘀中药组(活血组)和对照药组(福善美组)。

1.5 给药

正常组、模型组灌胃生理盐水,补肾组、健脾组、活血组、福善美组用量按成人与小鼠的体重折算系数 9.01 折算(成人体重按 60kg 计算),容积为 10 ml/kg 体重,补肾组给药量为淫羊藿 2.432 mg·kg⁻¹ d⁻¹、马鹿茸 6.4 mg·kg⁻¹ d⁻¹、牡蛎 5.12 mg·kg⁻¹ d⁻¹;健脾组给药量为 18.02 mg·kg⁻¹ d⁻¹;活血组给药量为 0.1802 ml·kg⁻¹ d⁻¹;福善美给药量为 1.5015

mg·kg⁻¹ d⁻¹。给药周期为 8 周,实验期间,各组小鼠每周称重 1 次,并根据体重变化调整给药剂量。

1.6 标本采集及检测

最后一次灌胃后,小鼠禁食 24 小时,10% 水合氯醛注射麻醉(3 ml/kg)。用双能 X 线骨密度仪测定全身 BMD。开腹,腹主动脉取血,3 000 r/min 离心 15 min,取血清。ELISA 法测定 ALP 及 TRAP 含量。

1.7 统计学分析

采用 Spss19.0 软件处理所得数据,选用 ONE-Way ANOVA 进行统计分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。当 $P < 0.05$ 时认为作比较的两组数据在统计学上具有差异。

2 结果

2.1 小鼠 BMD 检测结果

与正常组比较,模型组小鼠 BMD 显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,补肾组与健脾组 BMD 显著升高($P < 0.05$)。

2.2 小鼠血清 ALP 含量检测结果

与正常组比较,模型组小鼠血清 ALP 含量显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,补肾组、健脾组和福善美组小鼠血清 ALP 含量显著降低($P < 0.05$),见表 1。

2.3 小鼠血清 TRAP 含量检测结果

与正常组比较,模型组小鼠血清 TRAP 含量显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,健脾组和补肾组小鼠血清 TRAP 含量显著降低($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组小鼠 BMD 及血清 ALP、TRAP 含量($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 BMD and the serum content of ALP and TRAP in mice of each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	BMD(g/cm ²)	ALP (U/L)	TRAP (μg/ml)
正常组	0.036 ± 0.01	3.63 ± 0.42	15.38 ± 0.85
模型组	0.029 ± 0.01	5.16 ± 0.15	17.14 ± 1.38
补肾组	0.038 ± 0.01*	3.49 ± 0.16*	11.42 ± 0.41*
健脾组	0.034 ± 0.01*	3.99 ± 0.54*	12.19 ± 0.63*
活血组	0.029 ± 0.02	5.04 ± 0.09	16.77 ± 1.12
福善美组	0.028 ± 0.02	4.07 ± 0.32*	16.39 ± 0.52

*:与模型组比较; $P < 0.05$

3 讨论

骨质疏松症以骨量减少,骨密度降低,骨强度减弱为特征,中医学将骨质疏松症归于“骨痹”、“骨痿”或“骨枯”的范畴。中医有“肾主骨”的概念,肾为先天之本,骨的生长发育强劲衰弱与肾精盛衰密

切相关。肾中精气充足,则骨髓生化有源,骨得髓养而强健有力,《素问·四时刺逆从论篇》曰:“肾主身之骨髓”,“肾藏精,主骨生髓,其充在骨”;肾中精气亏虚,则骨髓生化乏源,骨骼失养而痿弱无力,《素问·痿论篇》中“骨枯髓减,发为骨痿”的论述可以看作是原发性骨质疏松症的发病机理。从中医对原发性骨质疏松症的认识中,可以看出肾虚是骨质疏松症的根本病机。脾为后天之本,生化之源,主百骸,化生气、血、精、液以荣润骨骼。若脾气虚弱,中阳不振,精微不布,则肾精乏源,进而使骨髓失养而致骨痿。《素问·根结篇》云:“痿疾者取之阳明”,强调痿疾从脾胃而治。脾虚可通过导致肾虚进而引起骨质疏松症的发生,所以脾虚也是其重要病机。

骨量的多少取决于同一骨重建单位中骨形成与骨吸收的平衡。骨质疏松症在破骨作用强于成骨作用时出现,可分为由破骨细胞介导的高转换型和由成骨细胞介导的低转换型。骨代谢的生化标志物可反映整体骨转换的情况。ALP 是成骨细胞的一种胞外酶,ALP 的主要功能是在成骨过程中水解磷脂,释放的磷酸根与钙以沉淀的方式沉积在胶原骨架上,发生骨矿化作用,同时水解焦磷酸盐,解除其对骨盐形成的抑制作用,有利于骨的形成。ALP 半衰期长,稳定性好,是具有代表性的有效反映骨形成的代谢指标^[1]。TRAP 有抵抗酒石酸抑制的作用,主要来源于破骨细胞。骨吸收时,TRAP 和其他同工酶一起参与骨基质中固体钙磷矿化底物的降解。TRAP 标志着破骨细胞的活性,并在一定程度上反映了骨吸收状况。在骨吸收指标中,TRAP 特异性最高,不易受昼夜变化、肝肾疾病等影响^[2]。

OPG 是一种分泌型糖蛋白,具有抑制破骨细胞分化的作用并能减弱其骨吸收能力,属于肿瘤坏死因子受体超家族^[3]。OPG 基因被敲除后,小鼠体内不能合成分泌 OPG,造成骨骼系统中成骨破骨作用处于严重的失衡状态。当 OPG 的合成与分泌被抑制后,破骨细胞分化增多,骨吸收能力增强^[4]。同时,由于破骨活性的增强,成骨活性也继发性增强,ALP 浓度明显升高,但是成骨细胞和其他组织脏器

不能分泌 OPG 来抑制破骨细胞谱系细胞分化、生存、融合和活化,所以继发性成骨活性增强不能与过度骨吸收保持平衡,最终导致骨量明显丢失,发生高转换型骨质疏松。OPG 基因敲除小鼠具有全身骨质疏松发生情况稳定、动物本身未受外界因素干预等优点,是一种良好的原发性高转换型骨质疏松动物模型^[5]。

本研究观察了中医不同治法对骨质疏松小鼠的作用。结果显示,与正常组相比模型组小鼠 BMD 显著降低,ALP 及 TRAP 含量均显著增高,说明模型组小鼠骨量严重丢失并且骨形成与骨吸收均显著增强,提示其发生了高转换型骨质疏松。补肾组和健脾组小鼠 BMD 显著升高,ALP 及 TRAP 含量均显著降低,说明补肾和健脾方法能显著提高骨质疏松小鼠的骨量,明显抑制成破骨活性,使小鼠脱离高骨转换状态,起到治疗骨质疏松症的作用。本实验结果为应用“肾主骨”、“先天生后天、后天养先天”等中医基础理论防治骨质疏松症提供了科学依据。

【参 考 文 献】

- [1] Guan YT, Cai LL, Ding HX, et al. Clinical study on combination of multiple regimens in treatment of osteoporosis in perimenopause and postmenopausal women. *Zhonghua fu Chan ke za zhi*, 2010, 45(8):571-574.
- [2] Shidara K, Inaba M. Bone metabolic marker for osteoporosis. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 2009, 67(5):927-931.
- [3] Simonet WS, Lacey DL, Cunstun CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89(2):309-319.
- [4] Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998, 93(2):165-176.
- [5] 李晓峰, 席智杰, 梁倩倩, 等. 骨质疏松与椎间盘退变相关性的研究进展. *中国骨质疏松杂志*, 2011, 17(7):643-646. Xiaofeng, Xi Zhijie, LIANG Qianqian, et al. Investigation of the relationship between osteoporosis and intervertebral disc degeneration. *Chin J Osteoporos*, 2011, 17(7):643-646. (in Chinese)

(收稿日期:2014-05-16)