

· 论 著 ·

中医不同治法对骨质疏松症大鼠抗酒石酸酸性磷酸酶含量影响的比较研究

杨芳* 朱辉 郑洪新 王剑 林庶茹
辽宁中医药大学, 沈阳 110847

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 04-0393-03

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抗酒石酸酸性磷酸酶含量的影响,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、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,用酶联免疫法检测各组大鼠血清抗酒石酸酸性磷酸酶的含量。结果 与正常组比较,模型组大鼠血清 TRACP 含量升高极为显著 ($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组大鼠血清 TRACP 含量均明显降低,其中以补肾组和骨疏康组降低最为明显,与其他各组比较具有极显著差异 ($P < 0.01$)。结论 补肾方法通过降低抗酒石酸酸性磷酸酶含量对骨质疏松症具有一定的防治作用。

关键词: 骨质疏松症;抗酒石酸酸性磷酸酶;补肾方法;中医

The effect of different TCM treatments on TRACP level in osteoporotic rats

YANG Fang*, ZHU Hui, ZHENG Hongxin, WANG Jian, LIN Shuru

Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

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

Abstract: Objective To observe the effect of different treatment of traditional Chinese medicine (TCM) on serum tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) level, and to explore the mechanism of TCM on prevention and treatment of osteoporosis.

Methods One hundred and twenty rats (male/female = 1:1) were randomly divided into 6 groups, including the blank group, the model group, the kidney-tonifying group, the spleen-invigorating group, the blood circulation-activating group, and the Gushukang group. The model was induced by muscular injection of dexamethasone. At the end of the experiment, the rats were sacrificed and the serum was collected. TRAP level was examined using ELISA method. **Results** Compared to the blank group, TRACP level in the model group increased significantly ($P < 0.01$). After treatments, all the groups treated with TCM showed a decreased level of TRACP comparing to that in the model group, especially in the kidney-tonifying group and the Gushukang group ($P < 0.01$).

Conclusion Kidney-tonifying therapy may prevent osteoporosis by decreasing TRACP.

Key words: Osteoporosis; Tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP); Kidney-tonifying therapy; Chinese medicine

骨质疏松 (osteoporosis, OP) 是以骨量减少、骨微观结构退化为特征,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。糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 是引起骨质疏松症的最常见的药物,长期接受 GC 治疗者都有发生骨质疏松的危险,而这种由 GC 治疗所导致的骨质疏松症即成为糖皮质激素性骨质疏松症 (glucocorticoid induced

osteoporosis, GIO)。本实验研究以中医学整体观念为指导思想,采用分子生物学的技术,观察补肾、健脾、活血化瘀方法对糖皮质激素性骨质疏松症大鼠的抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRACP) 含量的影响。

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

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (81001485); 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

号:SCXK(沪) 2008-0016。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂:抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP) ELISA 试剂盒:美国 ADL 公司,生产批号为 110371。

1.2.2 仪器:多功能电泳仪(北京六一仪器厂), Heidolph DIAX90 型匀浆机(德国 Heidolph 公司), 日立 7600-020 全自动生化分析仪(日本)。

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;阳性对照药为骨质疏松颗粒,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,每个性别每组 12 只,雌雄分笼饲养,每组分为 A、B 两笼,每笼 6 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(骨质疏松中药组)。

1.5 造模及给药

1.5.1 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。

1.5.2 给药:适应饲养 1 周后开始造模、给药、灌胃,每日 1 次。A、B 组给生理盐水 2 ml;C 组、D 组、E 组、F 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 公斤计算),容积为 1 ml/100 g 体重,补肾组给药量为鹿茸 0.8 g/(kg·d),牡蛎 0.263 g/(kg·d),淫羊藿 0.0756 g/(kg·d);健脾组给药量为 0.945 g/(kg·d);活血组给药量为 0.504 g/(kg·d);阳性对照组给药量为 2.1 g/(kg·d)。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 实验取材

实验大鼠在最后一次灌胃后,禁食 24 小时,处死后立即取材。大鼠经 10% 水合氯醛注射(0.3 ml/100 g 体重)腹腔注射,麻醉后将大鼠仰卧固定在手术架上,用碘伏消毒手术部位,用手术剪剪开腹腔后,用一次性注射器腹主动脉取血 5~8 ml/只。室温静置 4 小时,用离心机 3 000 rpm/min,离心 30 min,取血清,分装,做好标记后于 -70℃ 冰箱保存,待骨代谢生化指标检测。

1.7 检测方法

采用酶联免疫(ELISA)方法,具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.8 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,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有显著统计学意义。

2 结果

大鼠血清 TRACP 含量检测结果显示:与正常组比较,模型组大鼠血清 TRACP 含量升高极为显著($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组大鼠血清 TRACP 含量均明显降低,其中以补肾组和骨质疏松组降低最为明显,与其他各组比较具有极显著差异($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠血清 TRACP 含量的比较

Table 1 Comparison of serum TRACP levels among rats of each group

组别	例数	血清 TRACP 含量(μg/ml)
正常组	12	4.86 ± 0.30
模型组	12	9.96 ± 1.15 **
补肾组	12	5.76 ± 0.85 ▲▲
健脾组	12	6.78 ± 0.96 **▲▲
活血组	12	8.34 ± 1.06 **▲
骨质疏松组	12	5.37 ± 1.14 ▲▲

注:与正常组比较;* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较:▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$

3 讨论

3.1 中医学对骨质疏松症的病机认识

中医学认为,肾与骨关系密切。肾藏精,主生长发育和生殖繁衍,肾中精气的盛衰决定了人体的生、长、壮、老、死的过程,肾中精气充盛与否反映于外的标志为牙齿、骨骼和头发。肾在体合骨指骨的生长发育,有赖于骨髓的充盈及其所提供的营养,肾精充足,骨髓生化有源,骨骼得到髓的滋养,才能坚固有力。若肾精不足,骨髓生化乏源,骨骼失去营养,而骨质脆弱无力。清代医家唐容川在《医经精义》中说到:“肾藏精,精生髓,髓生骨,故骨者,肾之所合也;髓者,肾精所生,精足则髓足;髓在骨内,髓足者则骨强”。

人处于青壮年时期,肾中精气充盛,骨髓化源充足,骨骼得以滋养而骨质坚硬致密;到了中老年时期,肾中精气开始逐渐亏虚,骨髓化源不足,骨骼失去滋养而骨质脆弱疏松,不能发挥正常的生理功能,

因而容易出现骨质脆弱、腰膝酸软、易于骨折等状况,因此中老年人群易发原发性骨质疏松症。女性至七七后,任脉虚、太冲脉衰少、天癸竭,肾精不足而不能维持骨骼的正常功能,因此绝经后的女性也易发骨质疏松症。因此,肾虚是骨质疏松症发病的根本原因,补肾壮骨法是临床治疗该病的根本方法。

3.2 抗酒石酸酸性磷酸酶与骨质疏松症

破骨细胞是重要的骨吸收细胞,在骨骼的重塑中发挥着重要作用。破骨细胞一般含有 4~20 个核,由多个单核细胞融合而成。胞浆泡沫状含有多量空泡,内含有大量的溶酶体酶,如蛋白酶、乳酸和柠檬酸等,对骨吸收起到了重要作用^[1]。TRACP 是了解骨吸收和破骨细胞活性的良好标志物^[2]。TRACP 的过度表达可表现为骨质疏松。当骨吸收增强时,破骨细胞粘附在骨表面,分泌的酸和蛋白酶在骨基质和破骨细胞之间形成一个空隙,磷酸酐酶和 H^+ -ATP 酶质子泵形成了一个酸性环境,位于破骨细胞微粒体 TRACP,可通过破骨细胞波状缘分泌进入此空隙,与其他酶一起参与降解骨基质中固体钙磷矿物。

人体的整个生命过程中,骨骼通过破骨细胞去除衰老的部分,由成骨细胞形成的新骨替代,进而形成骨骼的再造循环,整个骨骼表面约有 10%~15% 的部分不停进行着骨骼的再造过程。骨吸收率增加的结果是骨质疏松,病人从骨质脆弱发展到骨质疏

松需要 10 年以上的时间^[3]。

本实验结果显示,模型组大鼠血清 TRACP 含量升高最为显著,与正常组比较有明显差异,提示骨质疏松症大鼠骨吸收明显增强;与正常组相比,各中药治疗组均能降低骨质疏松症大鼠血清 TRACP 含量,其中补肾组、骨疏康组最为明显,提示补肾中药具有抑制地塞米松引起的大鼠骨吸收增强的作用,这也体现了中医学理论“肾主骨生髓”的实质。根据中医学未病先防、既病防变的思想,通过应用补肾中药可防治骨质疏松症。

【参 考 文 献】

(上接第 392 页)

- [8] 王建华,郭敏,郑丽,等. 补骨脂素干预大鼠成骨细胞骨保护素/核因子 κB 受体激活因子配体 mRNA 的表达. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(37): 6927-6930.

Wang JH, Guo M, Zheng L, et al. Psoralen intervention rats into bone cells and bone protection element/nuclear factor kappa B receptor activation factor ligand mRNA expression. China tissue engineering research and clinical rehabilitation, 2010, 14(37): 6927-6930. (in Chinese)

- [9] Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, et al. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2015, 29(5): 557-568.

- [10] Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, et al. Estrogen receptors alpha (ERa) and beta (ERb): Subtype-selective ligands and clinical potential. Steroids, 2014, 90: 13-29.

- [1] 刘忠厚. 骨矿与临床. 北京: 中国科学技术出版社, 2006: 66-96.

Liu ZH. Bone mineral and clinical. Beijing: China Science and Technology Press, 2006: 66-96. (in Chinese)

- [2] Huang JS, Tu ST, Yang TS, et al. Teriparatide vs calcitonin in the treatment of Asian postmenopausal women with established osteoporosis. Osteoporos Int, 2006, 17(3): 373-378.

- [3] 史晓林, 朱彦昭, 宁玉梅, 等. 强骨饮对骨质疏松患者抗酒石酸酸性磷酸酶-5b 影响的研究. 中国中医骨伤科杂志, 2008; 16(1): 25-27.

Shi XL, Zhu YZ, Ning YM, et al. Study on the effect of strong bone drink on the anti acid phosphatase-5b in osteoporosis patients. Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopedics, 2008, 16(1): 25-27. (in Chinese)

(收稿日期: 2015-08-04)

- [11] DeSelm CJ, Takahata Y, WalTen J, et al. IL-17 mediates estrogen-deficient osteoporosis in an Act1-dependent manner. Cell Biochem, 2012, 113(9): 2895-2902.

- [12] Roggia C, Gao Y, Cenci S, et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(24): 13960-13965.

- [13] 孙铁铮, 吴荣福, 陶天遵. 雌激素、细胞因子与绝经后骨质疏松症. 中国骨质疏松杂志, 1998, 4(4): 87-90.

Sun TZ, Wu RF, Tao TZ. Estrogen and cytokines and postmenopausal osteoporosis. Chinese Journal of osteoporosis, 1998, 4(4): 87-90. (in Chinese)

(收稿日期: 2015-07-11)