

中医不同治法对绝经后骨质疏松症大鼠骨骼、骨骼肌甲状旁腺激素相关蛋白(PTHrP)含量影响的比较研究

金成日¹ 姜奥² 杨芳^{3*}

1. 辽宁中医药大学附属第四医院, 辽宁 沈阳 110100
2. 沈阳市第五人民医院, 辽宁 沈阳 110023
3. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847

中图分类号: R332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 01-0093-04

摘要: 目的 观察补肾、健脾、活血法对骨质疏松症大鼠骨骼、骨骼肌甲状旁腺激素相关蛋白(PTHrP)含量变化的影响。方法 将SD雌性大鼠分为正常组、模型组、补肾组、健脾组、活血组。采用酶联免疫法测定小鼠骨骼、骨骼肌PTHrP含量变化。结果 (1)与正常组比较,模型组大鼠骨骼的PTHrP含量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,补肾组、健脾组、活血组骨骼的PTHrP含量明显升高($P < 0.01$),其中补肾组升高程度比较明显。(2)与正常组比较,模型组大鼠骨骼肌的PTHrP含量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,补肾组、健脾组、活血组骨骼肌的PTHrP含量明显升高($P < 0.01$),其中健脾组升高程度比较明显。**结论** (1)骨质疏松症的形成,可能与骨骼、骨骼肌协调性下降有关。(2)补肾、健脾方法通过提高骨质疏松症大鼠的骨骼、骨骼肌PTHrP含量,对骨质疏松症具有一定的防治作用。

关键词: 中医中药;骨质疏松;甲状旁腺激素相关蛋白;补肾;健脾;大鼠

The effects of different TCM therapeutic regimen on the protein expression of PTHrP in bone and skeletal muscle tissues in post-menopausal osteoporotic rats

JIN Chengri¹, JIANG Ao², YANG Fang^{3*}

1. The Fourth Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110100
2. The Fifth People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110023
3. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

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

Abstract; Objective To evaluate the effects of CTM regimen including tonifying the kidney, invigorating the spleen and promoting blood circulation on the protein expression of of PTHrP in bone and skeletal muscle tissues of rats with osteoporosis.

Methods Rats were randomly divided into normal control group, model control group, tonifying kidney group, invigorating the spleen group and promoting blood circulation group. All the indexes were determined by ELISA method. **Results** (1) Compared with the normal group, the content of PTHrP enzyme in bone tissues of the model control group decreased ($P < 0.01$); compared with the model control group, the content of PTHrP enzyme in bone tissues of the tonifying kidney group, invigorating the spleen group and promoting blood circulation group increased. (2) Compared with the normal control group, the content of PTHrP enzyme in skeletal muscle tissues of the model control group decreased ($P < 0.01$); compared with the model control group, the content of PTHrP enzyme in skeletal muscle tissues of tonifying kidney group, invigorating the spleen group and promoting blood circulation group increased. **Conclusion** (1) Osteoporosis maybe related to the harmony of bone and skeletal muscle. (2) The methods of tonifying kidney and invigorating the spleen have certain preventive effects on osteoporosis by regulating the protein expression of PTHrP in bone and skeletal muscle tissues.

Key words: Chinese Traditional Medicine; Osteoporosis; PTHrP; Tonifying kidney; Invigorating the spleen; Rats

基金项目: 沈阳市科技局项目(F10-149-9-36)

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

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是以骨量减少、骨的微观结构退化为特征的,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。随着老龄

化社会的到来,骨质疏松症将会越来越引起人们的重视。中医药在防治骨质疏松症方面具有副作用小、费用低、远期疗效较佳的优势,通过改善全身情况以提高患者的生活质量。临床上常用的中医治疗骨质疏松症的方法有补肾方法、健脾方法、活血化瘀方法等。

本研究采用分子生物学实验方法,通过研究骨质疏松症大鼠的骨骼、骨骼肌甲状旁腺激素相关肽(parathyroid hormone-related peptide, PTHrP)含量变化,观察补肾方法、健脾方法、活血化瘀方法对骨质疏松症的防治效果和作用机制的异同。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

实验选用清洁级 Wistar 雌性大鼠 60 只,体重(200 ± 50)g,4~5 月龄,未曾交配,实验动物由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物质量合格证明号:1100170659。

先将术前大鼠按照随机分组的方法分为正常组(8 只)、手术组。摘除大鼠双侧卵巢的方法复制绝经后骨质疏松症模型。术后 7d 将手术组存活的大鼠随机分为 4 组(每组 8 只),即:模型组、补肾方法组(简称补肾组)、健脾方法组(简称健脾组)、活血方法组(简称活血组)。

1.2 药品

补肾组用药左归丸,制备方法:按大鼠每千克体重一日药量计算,熟地 2.52 g,山药 1.26 g,枸杞子 1.26 g,山茱萸 1.26 g,川牛膝 1.26 g,菟丝子 1.26 g,鹿角胶(河南老君堂制药有限公司)1.26 g,龟板胶(河南老君堂制药有限公司,国药准字 241020792)1.26 g,打碎、烊化,混合上述颗粒剂,加 20 mL 水。健脾组用药补中益气颗粒(北京汉典制药有限公司)。活血组用药身痛逐瘀汤(辽宁中医药大学附属医院)。

1.3 主要试剂

PTHrP 试剂盒(AMEKO 公司)内含:96 微孔板、一抗液、样品稀释液、酶标抗体液、底物稀释液、洗涤液。

1.4 主要仪器设备

多功能酶标仪(型号:Infinite M200)、低温高速离心机(型号:MR1822)。

1.5 实验方法

1.5.1 造模:用 10% 的水合氯醛将实验大鼠肌肉注射麻醉,麻醉后的大鼠采用俯卧位姿势固定于手

术台上,从腰背部脊柱两侧做纵行切口切开皮肤及肌肉,摘除两侧卵巢组织后逐层缝合,关闭创口。正常组不手术。

1.5.2 给药:术后 7 d 开始给药,每日上午灌胃 1 次,连续灌胃 12 w。上述补肾组、健脾组和活血组的大鼠每日用量按成人用药量的 6.3 倍计算。正常组和模型组以等量 0.9% 的氯化钠溶液灌胃。灌胃期间,每周一对大鼠称重一次,按照体重调整给药剂量。

1.5.3 取材:实验大鼠在第 12 周灌胃后,禁食 24 h 后取材。实验大鼠用 10% 的水合氯醛肌肉注射麻醉后取材。无菌条件下,取大鼠右后肢股骨,剔除附着的肌肉筋膜,保留骨膜,生理盐水冲洗后,用生理盐水浸润后的医用纱布包裹,再用预先准备的锡纸包裹后置 -70℃ 冰箱冻存,待骨密度测定。取大鼠右后肢腓肠肌的白肌部分和左右后肢的全股骨,并放入高压灭菌的 EP 管内,做好标记,放入 -70℃ 冰箱保存备用。

1.6 检测指标及方法

应用 XR-26 型双能 X 线骨密度仪(美国 NORLAND 公司),及其所附带的“The Small Subject Scout Scan”软件,测定大鼠离体股骨上 1/3 的骨密度(g/cm^2)。

采用 ELISA 法检测大鼠骨骼、骨骼肌 PTHrP 含量,用酶联仪在 450 nm 波长依序测量各孔的吸收度(OD 值),绘制标准曲线,计算样品的实际浓度。

1.7 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件处理所得数据,选用 ONE-Way ANOVA 进行统计析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 检测各组大鼠左后肢股骨骨密度结果

与正常组比较,模型组大鼠离体股骨上 1/3 骨密度极显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组大鼠股骨上 1/3 骨密度均有不同程度的升高($P < 0.01$),其中以补肾中药组升高最为显著。见表 1。

2.2 检测各组大鼠骨组织 PTHrP 含量结果

与正常组比较,模型组大鼠骨骼的 PTHrP 含量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,补肾组、健脾组、活血组骨骼的 PTHrP 含量明显升高($P < 0.01$),其中补肾组升高程度比较明显。见表 2。

表1 各组大鼠离体股骨上1/3骨密度值比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of bone mineral density at the 1/3 region of the isolated femur of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	骨密度(g/cm ²)
正常组	8	0.177 ± 0.007
模型组	8	0.132 ± 0.018 *
补肾组	8	0.165 ± 0.006 * ▲
健脾组	8	0.153 ± 0.003 * ▲
活血组	8	0.157 ± 0.005 * ▲

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

表2 各组大鼠骨组织PTHrP含量($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of bone tissue PTHrP content of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	骨组织 PTHrP 含量(mg/L)
正常组	8	8.93 ± 0.25
模型组	8	4.38 ± 0.49 *
补肾组	8	6.60 ± 0.60 * ▲
健脾组	8	6.48 ± 0.61 * ▲
活血组	8	6.08 ± 0.25 * ▲

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

2.3 检测各组大鼠骨骼肌PTHrP含量结果

与正常组比较,模型组大鼠骨骼肌的PTHrP含量显著降低(P < 0.01);与模型组比较,补肾组、健脾组、活血组骨骼肌的PTHrP含量明显升高(P < 0.01),其中健脾组升高程度比较明显。见表3。

表3 各组大鼠骨骼肌PTHrP含量($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of skeletal muscle PTHrP content of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	骨骼肌 PTHrP 含量(mg/L)
正常组	8	8.72 ± 0.24
模型组	8	4.58 ± 0.41 *
补肾组	8	6.77 ± 0.35 * ▲
健脾组	8	7.10 ± 0.25 * ▲
活血组	8	6.72 ± 0.34 * ▲

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

3 讨论

3.1 中医学对骨质疏松症发病的认识

根据骨质疏松症的腰脊疼痛、胫膝酸软、易骨折、足跟疼痛等临床表现,中医学将其归属于“骨痿”、“骨痹”的范畴。在《黄帝内经》中,首载“骨痿”之病名,《素问·痿论》中提到:“肾主身之骨髓……肾气热、则腰脊不举,骨枯而髓减,发为骨痿。”“肾者水脏也,今水不胜火,则骨枯而髓虚,故足不任身,发为骨痿。”可以看出肾虚是骨质疏松症的病理机制的关键,从肾论治骨质疏松症是中医治疗本病的基本原则。

中医学认为“脾肾相关”,而骨骼与肌肉关系密切,肾藏精主骨,脾主四肢肌肉。若脾胃亏虚,水谷精微化生不足,肌肉得不到水谷精微的充养,而肾失所藏,后天之精又不得滋养,肾精不足,筋骨失养,则骨骼与肌肉协调性下降而骨痿不用。《黄帝内经》中的《灵枢·经脉》篇就提到:“足少阴气绝,则骨枯。少阴者,冬脉也,伏行而濡骨髓者也,故骨不濡,则肉不能着也;骨肉不相亲,则肉软却;肉软却,故齿长而垢,发无泽;发无泽者,骨先死。”可以看出肌肉痿软无力,影响骨骼的生长发育,可导致骨枯髓减而发病为“骨痿”。

清代医家王清任在《医林改错》中提到:“元气既虚,必不能布于血管,血管无气,必停留而瘀”。说明老年人肾精不足,血液运行不畅,容易形成病理产物之瘀血,疼痛是瘀血致病的典型症状之一,骨质疏松症患者最常见的症状便是疼痛,因此血瘀也被认为是本病发生的常见因素之一。

3.2 PTHrP含量的变化对骨质疏松症的影响

PTHrP可表达于皮肤、骨髓、脑、心血管、甲状腺、甲状旁腺和骨等多种组织,通过自分泌、旁分泌等方式发挥不同的生理作用。PTHrP的结构比较复杂,可以由激素原转化酶家族加工为3个功能片断,即氨基酸末端PTHrP(1-36)、中间片断的PTHrP(38-94)、以及羧基端的PTHrP(107-139)^[1]。目前PTHrP在骨细胞代谢、恶性肿瘤及心血管疾病中的作用研究相对较多。

PTHrP可保持软骨细胞增殖和延迟软骨细胞分化和程序性死亡,促进髌突生长发育。Ihh通过促进PTHrP的表达,同时PTHrP也可通过自分泌或旁分泌细胞内因子激活其受体保持细胞增殖,降低有增殖潜能的软骨细胞向肥大的软骨细胞转化,因而抑制软骨细胞的终末分化。当PTHrP不足以刺激软骨细胞增殖时,软骨细胞开始分泌Ihh,从而反馈性上调PTHrP的表达水平,该反馈环路协调软骨细胞的增殖和成熟^[2-4]。有研究表明PTHrP(1-36)是PTHrP的保守分泌形式,可以促进肾脏钙的重吸收和延缓骨质疏松的发生^[5]。相关体内外实验研究表明,PTH/PTHrP的短暂作用会使成骨细胞的Runx2无论在蛋白水平还是mRNA水平都升高,而Runx2是一个重要的促进间叶细胞向成骨细胞家族转化的转录因子^[6-8]。也有相关研究表明,PTH在骨合成代谢中主要起凋亡抑制作用,每天给予成年小鼠一定剂量PTH,之后观察到股骨的干骺端成骨细胞凋亡进程下降。上述内容可以看出,PTHrP对

成骨细胞的分化和抑制成骨细胞的凋亡具有一定的作用^[9-10]。

3.3 中医不同治法对骨质疏松症治疗效果的比较研究

通过对各组大鼠骨密度的检测结果分析,与正常组比较,模型组大鼠离体股骨上 1/3 骨密度极显著降低,说明去卵巢法建立骨质疏松症动物模型成功。本实验中补肾方法组用药左归丸,出自《景岳全书》,具有滋阴补肾,填精益髓的功效。健脾方法组用药补中益气颗粒,出自《脾胃论》,具有补中益气,升阳举陷的功效。活血方法组用药身痛逐瘀汤,出自《医林改错》,具有活血祛瘀,祛风除湿,通痹止痛的功效。检测各组大鼠骨组织、骨骼肌中 PTHrP 含量,与模型组相比,中医不同方法治疗组大鼠的骨组织、骨骼肌中 PTHrP 含量均有不同程度的升高,其中补肾组大鼠骨组织 PTHrP 含量升高趋势最为明显,其次为健脾组;健脾组大鼠骨骼肌 PTHrP 含量升高趋势最为明显,其次为补肾组。说明补肾方法可以通过提高骨组织的 PTHrP 含量,减缓成骨细胞的凋亡过程,延缓骨质疏松症的进一步发展;健脾方法提高骨骼肌的 PTHrP 含量,可以提高肌肉的收缩和舒张能力,进一步改善肌肉与骨骼的营养状态,增加骨骼的物质代谢,从而增加骨质的弹性及韧性,防止骨质疏松的发生。

上述实验结果印证了中医学中“肾藏精主骨”、“脾主运化主四肢肌肉”、“脾肾相关”的理论,同时也可以看出补肾填精方法是中医药防治骨质疏松症的根本方法,健脾方法从一定方面也能有效防治骨质疏松症,是防治骨质疏松症的另一重要方法。

【参 考 文 献】

- [1] 张树威,金伟,祝少博,等. 甲状旁腺素相关蛋白亚基因对骨髓干细胞的调控. 中国组织工程研究, 2013, 17(10): 1816-1820.
Zhang SW, Jin W, Zhu SB, et al. Parathyroid hormone-related

protein sub-gene regulates precartilagenous stemcells. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2013, 17(10): 1816-1820. (in Chinese)

- [2] Rabie AB, Tang GH, Xiong H, et al. PTHrP regulates chondrocyte maturation in condylar cartilage. J Dent Res, 2003, 82(8): 627-631.
- [3] Vortkamp A. The Indian hedgehog—PTHrP system in bone development. Ernst Schering Res Found Work-shop, 2000, 29(29): 191-209.
- [4] 张杰,戴娟,王美青,等. 印第安刺猬蛋白信号通路及颞下颌关节改建间的关系. 国际口腔医学杂志, 2013, 40(1): 47-50.
Zhang J, Dai J, Wang MQ, et al. Indian hedgehog signaling pathway and remodeling of temporomandibular joint. International Journal of Stomatology, 2013, 40(1): 47-50. (in Chinese)
- [5] Antonio Casado-Díaz, Raquel Santiago-Mora, José Manuel Quesada. The N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein affect differently the osteogenic and adipogenic potential of human mesenchymal stem cells. Exp Mol Med, 2010, 42(2): 87-98.
- [6] de Castro LF, Lozano D, Portal-Nunez S, et al. Comparison of the skeletal effects induced by daily administration of PTHrP (1-36) and PTHrP (107-139) to ovariectomized mice. J Cell Physiol, 2012, 227(4): 1752-1760.
- [7] Lozano D, de Castro LF, Dapia S, et al. Role of parathyroid hormone-related protein in the decreased osteoblast function in diabetes-related osteopenia. Endocrinology, 2009, 150(5): 2027-2035.
- [8] de Castro LF, Lozano D, Dapia S, et al. Role of the N- and C-terminal fragments of parathyroid-hormone-related protein as putative therapies to improve bone regeneration under high glucocorticoid treatment. Tissue Eng Part A, 2010, 16(4): 1157-1168.
- [9] Bellido T, Ali AA, Plotkin LI, et al. Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts. A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. J Biol Chem, 2003, 278(50): 50259-50272.
- [10] Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. Bone, 2007, 40(6): 1434-1446.

(收稿日期: 2016-07-06; 修回日期: 2016-07-12)

(上接第 73 页)

- [11] 张波,杨传东,史耀勋,等. 骨质疏松症(肾虚血瘀证)与骨吸收标志物的相关性研究. 中国医药指南, 2013, 11(7): 279-280.
Zhang B, Yang CD, Shi YX, et al. Study on the correlation between osteoporosis (kidney deficiency and blood stasis syndrome) and bone resorption markers. Guide of China Medicine, 2013, 11(7): 279-280. (in Chinese)
- [12] 崔尊建. 从雌激素水平探讨围绝经期女性骨代谢与“血瘀”相

关性的研究. 福州: 福建中医药大学, 2013.

Cui ZJ. The Research of correlation of bone metabolism and blood stasis of perimenopausal women from the estrogen levels to explore. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2013. (in Chinese)

(收稿日期: 2016-06-29; 修回日期: 2016-08-27)