

· 论 著 ·

补肾药膳方影响卵巢去势骨质疏松模型大鼠骨形成机制探讨

张洁¹ 林静² 陈燕^{2*}

1. 湖南中医药大学护理学院, 湖南 长沙 410208

2. 湖南省中医药研究院附属医院, 湖南 长沙 410006

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 03-0353-04

摘要: **目的** 观察骨形成代谢指标 BGP 的变化, 探讨补肾药膳影响卵巢去势骨质疏松模型大鼠骨形成的机制。 **方法** 将 60 只 SPF 级雌性 SD 大鼠随机分为 6 组, 各组 10 只, 正常组、假手术组、模型空白组等选用一般饲料饲养, 高剂量药膳组、低剂量药膳组、骨疏康颗粒组等造模 1 周后进行灌胃。3 个月后取大鼠血清标本以 ELISA 法检测血清 BGP 水平。 **结果** 低剂量组与高剂量组与模空组之间差异无统计学意义, 但血清 BGP 具有下降的趋势, 骨疏康组血清 BGP 水平高于模空组 ($P < 0.05$)。 **结论** 补肾药膳对卵巢去势绝经后骨质疏松大鼠模型的骨形成代谢指标有一定的改善作用, 在改善血清 BGP 方面弱于 BALP、PINP 等指标, 补肾药膳方影响 PMOP 症机制值得进一步探讨。

关键词: 补肾药膳方; 绝经后骨质疏松; 骨形成

Effect of reinforcing kidney medicinal diet on bone formation in ovariectomized osteoporotic rats

ZHANG Jie¹, LIN Jing², CHEN Yan^{2*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

2. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China

* Corresponding author; CHEN Yan, Email: 969639737@qq.com

Abstract: **Objective** To observe the changes of bone formation metabolic index BGP and to explore the mechanism of the effect of kidney-tonifying herbal diet on bone formation in ovariectomized osteoporotic rats. **Methods** Sixty SPF female SD rats were randomly divided into 6 groups, with 10 in each group. Rats in normal group, sham-operated group, and model blank group were fed with general diet. Rats in high-dose diet group, low-dose diet group, and Gushukang granule group were fed after 1 week of modeling. Three months later, serum samples of the rats were taken to detect the concentration of BGP using ELISA. **Results** There was no significant difference between low-dose group and high-dose group, but there was a decrease trend in serum BGP. The serum BGP concentration in Gushukang group was higher than that in model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Kidney-tonifying herbal diet improves the bone formation and metabolism of ovariectomized postmenopausal osteoporotic rats. The change of serum BGP is weaker than that of BALP and PINP. The mechanism of kidney-tonifying herbal diet prescription affecting PMOP is worth further exploring.

Key words: reinforcing kidney medicinal diet; postmenopausal osteoporosis; bone formation

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 其特征是骨量减少, 骨组织结构破坏。随着社会老龄化进程的加速, 以老年人和绝经后妇女多见的骨质疏松症患者逐渐增加, 资

料^[1]显示, 我国骨质疏松患病率在 50 岁以上女性人群中约为 40.1%, 超过 20% 的女性在围绝经期即会出现骨量减少。骨质疏松所导致的骨折明显加重了家庭与社会负担, 增加中老年的病残率及病死率^[2]。骨质疏松发生后难以逆转, 加强预防则能更有效地降低骨折的发生率。随着中医理论的发展, 有学者根据“肾主骨”理论进行实验研究, 认为导致 PMOP 症的重要原因是天癸竭、肾气衰、髓化生无

基金项目: 2018 年湖南省研究生科研创新项目, 补肾膳食对绝经后骨质疏松症相关症状及血清指标影响的回顾性调研 (52)

* 通信作者: 陈燕, Email: 969639737@qq.com

源^[3]。基于中医药食同源理论,中医药膳成为防控老年人常见病的应用热点,其中包括 PMOP。已有研究表明,用羊肉、狗肉、羊肾、猪骨等食材辅以中药可有效预防老年骨质疏松症^[4]。2013 年《国务院关于促进健康服务业发展的若干意见》文件指出,要“加强药食同用中药材的种植及产品研发与应用,推广科学规范的中医保健知识及产品”。2016 年中华中医药学会发布《健康管理服务规范》、《药食同源药膳标准通则》两项团体标准,为药膳食疗有效与安全应用提供依据。开展药膳防控 PMOP 研究,为中医食疗养生与饮食预防疾病提供理论支持,为进一步开发药膳产品提供研究基础,对促进老年健康产业的发展具有重要作用。本文基于“肾主骨”、“药食同源”等理论,结合前期课题组研究的自拟补肾药膳方对常见骨形成代谢代表性指标骨碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase, BALP)、I 型原胶原 N-端前肽(propeptide of type I Procollagen, PINP)等的影响,补充常见代谢代表性指标骨钙素(bone gla protein, BGP)水平的变化,综合分析自拟补肾药膳方影响卵巢去势骨质疏松模型大鼠骨形成机制,旨在为探索补肾药膳方对 PMOP 模型大鼠骨形成的作用机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:60 只 SPF 级雌性 SD 大鼠,初始体重 200~220 g, 喂养环境温度(25±1)℃, 湿度 70%, 进食大鼠标准饲料和净化水。入选标准:SPF 级 4~5 月龄雌性大鼠;未曾交配;体重 200 g~220 g。排除标准:适应性饲养一周后体重>300 g 或<200 g 大鼠;出现毛发粗糙、无光泽等不健康表现。脱落标准:实验过程中各种原因导致的大鼠死亡。

1.1.2 实验药物:采用文献法及德尔菲专家咨询法对防治 PMOP 的补肾药膳方进行筛选^[1], 确定补肾药膳方由狗肉 200 g(君药), 羊肾 150 g(臣药), 山药 30 g(佐使药), 枸杞 30 g(佐使药)组成。上述食材清洗后加水 2 000 mL 武火煮沸后文火煲煮 1 h, 取汤汁。分高剂量(第一次汤汁)和低剂量(2 000 mL 水稀释第一次汤汁), 冷藏备用。

1.2 实验方法

1.2.1 动物造模及分组:对 60 只大鼠进行编号, 称重后随即分出正常组、假手术组。将剩余 40 只大鼠去卵巢, 以建立绝经后骨质疏松大鼠模型, 再根据随机数字表进行分组。共 6 组, 每组 10 只, 分别为正

常组、假手术组、模型空白组、高剂量药膳组(简称高剂量组)、低剂量药膳组(简称低剂量组)、骨疏康颗粒组(简称骨疏康组)。

1.2.2 动物给药方法及标本采集:正常组、假手术组以及模型空白组大鼠选用一般饲料饲养, 高剂量组、低剂量组与骨疏康组大鼠分别采用高剂量药膳、低剂量药膳、骨疏康进行灌胃, 剂量根据人体给药剂量的 6.0 倍计算。连续给药 12 周, 从腹主动脉取血低温分离血清, 存于-80℃冰箱。

1.3 指标监测

实验采用 Elisa 法检测血清, 按 Elisa 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司提供, E-EL-R0113c)说明书进行检测血清 BGP、BALP 水平。

1.4 统计学处理

将收集到的数据进行一对一数据录入, 应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 实验结果计量资料符合正态分布采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差分析进行结果统计。

2 结果

通过单因素方差分析, 6 组大鼠的血清 BGP 水平差异有统计学意义。模型空白组、高剂量组、低剂量组、骨疏康组血清 BGP 水平显著高于正常组($P<0.01$), 认为卵巢去势骨质疏松大鼠造模成功。假手术组血清 BGP 水平与正常组比较差异无统计学意义($P>0.05$), 认为 PMOP 症造模成功可排除手术的影响。模型空白组、高剂量组、低剂量组、骨疏康组血清 BGP 水平均显著高于假手术组($P<0.05$), 差异具有统计学意义, 认为摘除卵巢是影响骨质疏松大鼠骨代谢指标变化的因素。低剂量组与高剂量组与模空组之间差异无统计学意义, 但血清 BGP 具有下降的趋势, 骨疏康组血清 BGP 水平高于模空组($P<0.05$), 见表 1。

表 1 各组大鼠血清中 BGP 水平(ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 The concentrations of BGP in rats of each group (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

项目	BGP	F 值	P 值
正常组(n=10)	87.69±5.87		
假手术组(n=10)	85.40±5.00 ^a		
模空组(n=8)	108.85±1.61 ^b	55.946	<0.001
高剂量组(n=9)	105.41±3.14 ^b		
低剂量组(n=10)	105.47±2.69 ^b		
骨疏康组(n=10)	103.69±4.70 ^{b, c}		

注:与正常组比较,^a $P>0.05$;与假手术组比较,^b $P<0.05$;与模空组比较,^c $P<0.05$ 。

3 讨论

3.1 补肾药膳与绝经后骨质疏松

中医理论认为 PMOP 症归属于“骨痿”、“骨痹”,《医经精义·中卷》云:“肾藏精,精生髓,髓养骨”,PMOP 症多见肾虚型,肾精渐衰、骨髓生化无源、骨髓空虚,则可导致骨质疏松症的发生。老年人骨质偏脆,容易发生骨折等一系列临床症状,以肾虚为其内因,提示肾与骨质疏松症有着极其密切的关系。此外,瘀血阻滞、脾胃虚弱、肝血不足也是 PMOP 症发生的重要方面^[5-7]。PMOP 症属于高转换型骨质疏松症,骨形成与骨吸收均活跃,两者之间发生失衡。目前,大量临床试验证实基于补肾理念的中医药在防治 PMOP 症上取得了显著疗效^[8-10]。WHO 曾于 1989 年提出,饮食调节为防控 PMOP 症的三大原则之一。中医药食同源、同功、同理等理论认为食物同药物一样具有寒热温凉、辛甘酸苦咸、升降浮沉等作用,适用于预防和补益^[11-12]。对于已发生的 PMOP 症,中药为补肾疗法,其中补肾药膳对防治 PMOP 症也逐渐有所报道,壮阳狗肉汤、枸杞羊肾粥等药膳在改善腰膝酸软、益精补气等方面具有显著疗效^[13-14]。

3.2 补肾药膳方对绝经后骨质疏松骨形成代谢指标的影响

3.3.1 前期研究基础

本研究自拟的补肾药膳相互补充,温肾壮阳、补中益气、益肾涩精、补脾养胃、养肝滋肾。前期研究中可知补肾药膳方能有效改善 PMOP 症模型大鼠的 CTX-I 的水平以及骨组织形态^[15-16]。据课题组前期研究^[17-18]表明,在骨代谢形成指标 BALP、PINP 等方面,补肾药膳方亦能发挥相应作用。单因素方差分析显示,在 BALP 水平方面,血清 BALP 水平在模型组与假手术组间($P<0.01$),模型组与低剂量组及骨疏康组间($P<0.05$),高剂量组与低剂量组及骨疏康组间差异存在统计学意义($P<0.05$)。在 PINP 血清表达方面,低剂量组、高剂量组、骨疏康组 3 组均显著较模型空白组高。

3.3.2 补肾药膳方对 BGP、BALP、PINP 等骨形成代谢性指标影响

绝经后妇女卵巢功能减退,雌激素水平下降,致使成骨细胞凋亡加速,使骨吸收增多,骨转换率升高^[19]。骨形成标志物可反映骨转换的状态,可用于骨质疏松治疗疗效评价中,其中 BGP、BALP、PINP 等是骨代谢形成代表性指标^[20]。

BGP 由成骨细胞合成,分泌入血,是反映骨形成速率的特异性指标。其主要作用是维持骨的正常矿化,抑制软骨的矿化速率,在高转换率的代谢性骨病中起重要作用,与血清 BALP 水平呈正相关^[21]。本研究中,通过对卵巢去势绝经后骨质疏松模型大鼠进行干预,模型空白组血清 BGP 水平最高,与正常组间差异存在统计学意义,说明绝经后妇女亦存在成骨增强。骨疏康颗粒组与模型空白组之间的血清 BGP 水平差异存在统计学意义,高剂量组、低剂量组血清 BGP 有下降趋势。

BALP 在新骨形成、矿化作用中起一定作用,反映成骨细胞活动。在绝经后骨质疏松症妇女中,研究^[22]发现,血清 BALP 水平处于高水平状态并随着绝经年龄的增加而增加,骨吸收大于骨形成,肾与骨中的 ALP 流失入血,血液中 BALP 水平增多^[23],主要原因是由于骨的代谢加速,低剂量药膳与骨疏康均能有效下降高转换状态下的 BALP 水平,对于抑制绝经后高转换水平具有一定作用。

PINP 反映了新合成的 I 型胶原蛋白的变化^[24],骨形成活跃时,其在血清中的水平升高,成骨增加。由狗肉、羊肾、枸杞、山药组成的补肾药膳方可有效增高卵巢去势骨质疏松模型大鼠的 PINP 水平,在促进成骨增加方面发挥了重要作用^[17]。

3.3.3 补肾药膳方对骨形成代谢性指标影响差异的分析

研究综合发现补肾药膳方中的高剂量药膳、低剂量药膳均可改善 PMOP 症大鼠的血清 PINP 水平。对 BALP 的干预作用低剂量组较模型空白组差异存在统计学意义。但在血清 BGP 方面的干预作用较 BALP、PINP 弱,仅有下降趋势,差异无统计学意义。认为补肾药膳方在影响骨形成方面作用如骨形成速率、新骨形成或矿化、增加成骨量等方面值得进一步深入探讨,以阐述药膳防治 PMOP 症的机理。

随着骨质疏松机理研究的深入,中医药防治 PMOP 症的相关研究在骨代谢水平、骨密度、信号通路等方面均有较大的发展。本研究主要探讨了补肾药膳对骨形成代谢指标的影响,在骨吸收方面及机制方面的研究缺乏相应的指标说明。此外,本研究发现低剂量药膳、高剂量药膳对改善骨代指标方面存在差异,其影响因素值得进一步探讨,对于药膳剂量的精准确定可作为今后的研究方向。

4 小结

在我国人口老龄化面临严峻的挑战,健康中国

战略的实施,大健康观念的树立等背景下,加强中医治未病及健康维护已成共识。中医理论认为 PMOP 症的病因病机有肾精亏虚、瘀血阻滞、脾胃虚弱、肝血不足等方面。其中肾精亏虚与骨质疏松症的发生发展密切相关,是本病根本病机,补肾法是中医治疗 PMOP 的基本大法。以中医治未病作为理论指导,基于“肾主骨”、“药食同源”等中医理论下的补肾药膳能影响去势大鼠的骨形成代谢指标,低剂量药膳效果优于高剂量,接近相当于骨疏康的效果,补充发展了相关中医理论。本研究探讨了补肾药膳在骨形成方面的作用,对 PMOP 机制的深入研究以及补肾药膳方防治 PMOP 症的积极作用具有重要的推广价值和学术意义。

【参 考 文 献】

- [1] 中国老年学学会骨质疏松委员会.中国人骨质疏松症诊断标准专家共识(第三稿·2014版)[J].中国骨质疏松杂志,2014,20(9):1007-1010.
- [2] 张智海,张智若,刘忠厚,等.中国大陆地区以-2.0SD为诊断标准的骨质疏松症发病率回顾性研究[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(1):1-8.
- [3] 张瑶,张维丽,马威,等.补肾健脾汤对去卵巢骨质疏松模型大鼠骨代谢指标的影响[J].中华中医药杂志,2016,31(3):864-867.
- [4] 瞿霞.老年骨质疏松症的中医食疗[J].内蒙古中医药,2013,32(1):140-141.
- [5] 陈相帆,林翔.中医防治绝经后脊柱骨质疏松症近况[J].江西中医药,2017,48(8):75-77.
- [6] 周军挺,丁晓娟,张丽蓉,等.补肾活血中药治疗绝经后骨质疏松症临床研究[J].浙江中西医结合杂志,2017,27(5):398-400.
- [7] 李慧辉,黄建华,鲁光钱,等.益肾复原方治疗肾精亏虚型老年性骨质疏松症疗效评价[J].新中医,2016,48(11):77-79.
- [8] 关媛.左归丸治疗绝经后骨质疏松的临床研究[D].南京中医药大学,2015.
- [9] 展磊,魏秋实.补肾活血药对绝经后骨质疏松妇女血清骨代谢因子的调控作用[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(9):1128-1132.
- [10] 刘莹,刘艳,周晶,等.补肾活血方治疗绝经后骨质疏松疗效观察[J].陕西中医,2017,38(5):612-613.
- [11] 福建省中医药学会.福建中医药膳食学科发展研究报告[J].海峡科学,2013(1):98-107.
- [12] 蔡丽月,林明珠,吴晓玲.骨折患者的中医药膳指导[J].实用医技杂志,2014,21(2):210-210.
- [13] 谢梦洲.中医药膳学[M].北京:中国中医药出版社,2013.
- [14] 聂宏.最受欢迎补肾法中医药膳[J].中医健康养生,2016(11):34-35.
- [15] 林静,张洁,陈燕.补肾药膳方对绝经后骨质疏松症模型大鼠 CTX-I 指标及骨组织形态的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(4):389-392.
- [16] 林静,张洁,梁百慧,等.基于德尔菲法选取防治肾虚型骨质疏松症药膳方的研究[J].中医药导报,2018,24(7):64-67.
- [17] 林静,张基洁,陈燕.补肾药膳对 PMOP 模型大鼠 PINP 指标及骨组织形态的影响[J].中医药导报,2019,25(4):36-39.
- [18] 林静.绝经后妇女服用补肾膳食的观察及自拟补肾药膳方干预去势大鼠 OP 的研究[D].湖南中医药大学,2018.
- [19] Lingling F, Wenhuan XU, Feng L, et al. Estrogen enhances the bone regeneration potential of periodontal ligament stem cells derived from osteoporotic rats and seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide) [J]. Int J Mol Med, 2016, 37(6): 1475-1486
- [20] 孔德策,杨铁毅,邵进.绝经后骨质疏松骨代谢标志物研究进展[J].国际骨科学杂志,2016,37(1):36-41.
- [21] Boyacioglu O, Orenay-Boyacioglu S, Yildirim H, et al. Boron intake, osteocalcin, polymorphism and serum level in postmenopausal osteoporosis[J]. J Trace Elem Med Biol, 2018, 48:52-56.
- [22] Mukaiyama K, Kamimura M, Uchiyama S, et al. Elevation of serum alkaline phosphatase (ALP) level in postmenopausal women is caused by high bone turnover[J]. Aging Clin Exp Res, 2015, 27(4):413-418.
- [23] Zhao D, Wang J, Liu Y, et al. Expressions and clinical significance of serum bone Gla-protein, bone alkaline phosphatase and C-terminal telopeptide of type I collagen in bone metabolism of patients with osteoporosis[J]. Pak J Med Sci, 2015, 31(1):91-94
- [24] 甘卫冬,睦承志,林振原,等.绝经后骨质疏松症患者血清 ICTP、PINP 与血脂相关性的研究[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(9):1191-1194.

(收稿日期:2019-03-23;修回日期:2019-04-21)