补肾固本方对去卵巢大鼠骨质疏松症骨密度、骨矿盐含量及 CT 含量的影响

黄继锋，宋敏*，李泽佳，刘彦宏
（甘肃中医学院，兰州 730000）

［摘要］ **目的**：采用切除双侧卵巢复制骨质疏松症大鼠模型，观察补肾固本方对去势大鼠骨质疏松症骨密度（BMD）、骨矿盐含量及血清降钙素（CT）水平的影响。**方法**：将 105 只 6 月龄雌性 Wistar 大鼠，随机分为空白组、模型组、仙灵骨葆组（500 $mg\cdot kg^{-1}$）、戊酸雌二醇组（90 $\mu g\cdot kg^{-1}$）、补肾固本方高、中、低剂量组（16，8，4 $g\cdot kg^{-1}$）。切除双侧卵巢复制骨质疏松症大鼠模型，造模成功后，给药组 *ig* 给予相应药物，给药 3 个月后取材。双能 X 射线 BMD 测量仪及 X 射线分别测量股骨和腰椎 BMD 及骨矿盐含量，补肾固本方对股骨及腰椎骨生物力学性能的作用，ELISA 法检测 CT。**结果**：与正常组比较，模型组股骨 BMD 值及骨矿物含量有明显下降（$P<0.05$），模型组大鼠股骨及腰椎的弹性模量、最大载荷、屈服强度下降（$P<0.05$），去卵巢组大鼠的血清 CT 水平明显升高（$P<0.01$）；与模型组比较，各治疗组 BMD 及骨矿物有所提高（$P<0.05$，$P<0.01$），补肾固本方高、中、低剂量组及仙灵骨葆组 BMD 显著提高（$P<0.01$），补肾固本方高、中剂量对大鼠腰椎生物力学有一定改善（$P<0.05$），高剂量组对腰椎弹性模量有明显改善（$P<0.01$），补肾固本方高、中、低剂量组 CT 水平较模型组明显改善（$P<0.05$），其中补肾固本方高剂量组大鼠血清 CT 水平均明显高于其余各组，中剂量组对 CT 水平有明显改善（$P<0.01$），高、中剂量组间比较无差别。**结论**：补肾固本方能明显改善去卵巢大鼠 BMD、骨矿物含量、改善去卵巢大鼠血 CT 水平，BMD 及骨矿物含量明显降低；骨的力学性能得到改善或恢复。

［关键词］ 补肾固本方；骨质疏松症；骨密度；骨矿盐；血清降钙素含量
［中图分类号］ R285.5 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903(2015)04-0149-04
［doi］ 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040149

Effect of Bushen Guben Decoction on Bone Mineral Density, Bone Mineral Content and Calcitonin Level in Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis

HUANG Ji-feng, SONG Min*, LI Jia-ze, LIU Yan-hong
(*Gansu College of Traditional Chinese Medicine*, *Lanzhou* 730000, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To observe the effect of Bushen Guben decoction (BGD) on bone mineral density (BMD), bone mineral content and serum calcitonin (CT) level in an ovariectomized rat model of osteoporosis. **Method**: One hundred and five female Wistar rats were randomly divided into the control group, the model group, the Xianlin Gubao group (500 $mg\cdot kg^{-1}$), the estradiol valerate group (90 $\mu g\cdot kg^{-1}$) and high-, medium-, low-dose BGD groups (16, 8, 4 $g\cdot kg^{-1}$). The rats except the control group were subjected to bilateral ovariectomy and killed after 3-month treatment. BMD and bone mineral content in the femur and lumbar vertebra, their biomechanical properties were measured by dual-energy X-ray absorptiometry measurement instrument and X-ray. The serum CT level was detected by ELISA method. **Result**: Compared with the normal group, the BMD and bone mineral content decreased significantly ($P<0.05$), elasticity modulus, maximum loads and yield strength of femur and lumbar vertebra reduced ($P<0.05$), serum CT level declined ($P<0.01$) in the model group. Compared with the model group, the BMD and bone mineral content increased in all treatment groups ($P<0.05$, $P<0.01$), the biomechanical properties had good improvement in Xiaoling Gubao group and high-, medium-dose BGD groups ($P<0.05$, $P<0.01$), serum CT level raised in high-, medium-, low-dose BGD groups

［收稿日期］ 20140717(014)
［基金项目］ 甘肃省财政厅基本科研业务费专项基金项目(BH2010-018)；甘肃省自然科学基金项目(2009-GS03239)
［第一作者］ 黄继锋，硕士，讲师，从事骨质疏松症的发病学和诊断学研究，Tel：13099119040，E-mail：lzhjf301475@163.com
［通讯作者］ * 宋敏，教授，从事骨质疏松症的发病学和诊断学研究，Tel：13008718085，E-mail：sm@gszy.edu.cn

($P<0.05$, $P<0.01$). High-dose BGD had better results in the elasticity modulus of lumbar vertebra and CT level than other groups. **Conclusion**: BGD had good improvement on osteoporosis in ovariectomized rats by affecting BMD and bone mineral content, CT level and biomechanical properties.

[**Key words**] Bushen Guben decoction; osteoporosis; bone mineral density; bone mineral; calcitonin level

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是由于人体骨质骨量低下、骨微结构破坏而引起骨脆性增加而导致全身各部位骨折的一种全身性骨骼系统疾病。统计显示,全球约 2 亿多人患有骨质疏松症,美国约有 2 400万人患有骨质疏松,并且每年约1 000万骨质疏松症患者和 150 万骨质疏松性骨折患者,其直接费用约 140 亿美元,而且还在继续增长[1-2];OP 可分为原发性(primary osteoporosis, POP)和继发性两大类。原发性骨质疏松症分为绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)和老年性骨质疏松症;由于因某些疾病(如内分泌系统,钙吸收障碍等慢性疾病)、营养不良及药物引发的骨质疏松症即为继发性骨质疏松症。伴随我国人口老龄化程度的加快,本病已成为危害人类公共健康最严重的慢性疾病之一。

绝经后骨丢失增加,主要表现为血钙与降钙素水平降低,应用降钙素可减轻这种骨的不断丢失,降钙素短期疗效较好。降钙素能阻止破骨细胞的活性,抑制骨吸收,有强效的镇痛作用。在欧洲和日本,降钙素[3-4]已被广泛运用于老年骨质疏松症患者,尤其是合并骨折的治疗,因为它具有良好的止痛作用;也可用于戊酸雌二醇治疗无效或有雌激素禁忌症的绝经后骨质疏松症的治疗。但长期疗效和预防价值尚未得到研究证实。

本文在查阅相关研究文献资料的基础上,坚持中医学理论对骨质疏松症的认识,以补肾壮骨,活血祛瘀,标本兼治为原则,用药以补肾活血中药为主自拟补肾固本方,通过对建立 POMP 的大鼠模型,分组给药,检测各组大鼠骨密度,骨生物力学性能等骨质疏松症指标,探讨中药补肾固本方治疗骨质疏松症的作用机制与临床疗效,以期为临床治疗本病提供参考。

1 材料

1.1 动物 6 月龄 SPF 级 Wistar 大鼠 105 只,雌性,体重(300 ± 20) g,由甘肃中医学院实验中心提供,合格证号 SCXK(甘)2001-0001-0001335。

1.2 药物及试剂 补肾固本方各药物组成由甘肃中医学院附属医院中药房提供,方药组成:黄芪 30 g,淫羊藿 30 g,当归 10 g,泽兰 10 g,川芎 12 g,骨碎补 10 g,狗脊 10 g,焦杜仲 10 g,川牛膝 10 g,熟地黄 10 g,桑寄生 15 g 等,通过水提取,分别浓缩制成质量浓度为 4,8 $g\cdot mL^{-1}$ 补肾固本方浓缩液;戊酸雌二醇(补佳乐,德国拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号 20080108),仙灵骨葆胶囊(贵州同济堂制药有限公司,批号 20025337),盐酸四环素(南昌江中制药厂),大鼠骨密度(BMD),骨矿盐含量,降钙素(CT)试剂盒(深圳市新产业生物医学工程有限公司,批号 2400373);10% 水合氯醛溶液(中国人民解放军第一医院,批号 20130312),青霉素(华北制药股份有限公司,批号 E081107)。

1.3 仪器 SPL-10KN 型生物力学试验机(日本岛津公司),双能 X 射线骨密度仪(美国 Lunar Dpx 公司)。

2 方法

2.1 动物分组 105 只大鼠适应性喂养10 d后取 15 只为正常组,其余 90 只造模成功后进行分组:模型组、仙灵骨葆组、戊酸雌二醇组、补肾固本方高、中、低剂量组。

2.2 动物造模 90 只大鼠均以 10% 水合氯醛溶液 3 $mL\cdot kg^{-1}$ *ip* 麻醉后,俯卧位固定在手术台上,在背部手术切口处脱毛,用碘伏局部消毒皮肤后,经背部正中切口入路切除双侧卵巢后,逐层关闭,缝合切口,乙醇消毒,术后 3 d 连续臀肌注射青霉素预防感染。

2.3 动物给药 造模成功后第 3 天起开始 *ig*,补肾固本方低剂量组用成人常规剂量按人鼠体型系数换算成等效剂量的 1 倍,中、高剂量组以 2,4 倍计算,分别为 4,8,16 $g\cdot mL^{-1}$,并以每千克中药 10 mL 蒸馏水稀释,制成混悬液于相应组 *ig*;戊酸雌二醇组给予戊酸雌二醇按人鼠等效剂量按每日按 90 $\mu g\cdot kg^{-1}$ *ig*;仙灵骨葆 500 $mg\cdot kg^{-1}$ 给药;正常组和模型组以等剂量生理盐水 *ig*;所有大鼠在处死前 15 d 进行第 1 次荧光标记,盐酸四环素每日 30 $mg\cdot kg^{-1}$, *ip*,连续2 d,处死大鼠前 3 d,进行第 2 次标记,方法同上(各药物剂量均按照人鼠体表面积换算法进行折算)。

2.4 动物取材 给药 3 个月后所有动物统一处死,取出第 1 腰椎、第 2 腰椎及双侧股骨,仔细剔除肌肉和筋膜,分组保存。将截取的大鼠第 1 腰椎椎体,右

侧股骨清除周围软组织后,生理盐水进行冲洗,并用生理盐水纱布包裹,将其放于 60 mL 广口瓶中置于 −20 ℃冰箱保存;将左侧股骨置于有乙醇的 60 mL 广口瓶中在 4 ℃冰箱中保存;同时将所取大鼠股动脉血液离心取血清置于 −20 ℃冰箱保存。

2.5 指标检测

2.5.1 BMD 测定 用双能 X 射线骨密度测量仪测定大鼠股骨及腰椎 BMD。

2.5.2 骨矿盐含量测定 X 射线平片,根据骨的密度、形态和微细结构判断有无皮质性或骨小梁性骨吸收。

2.5.3 股骨及腰椎骨生物力学性能 大鼠股骨及腰椎的弹性模量、最大载荷、屈服强度。

2.5.4 血清生化指标检测 用 ELISA 法检测各实验组 CT,并绘制标准曲线图。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,所有实验计量资料结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析法,组间比较采用 t 检验法分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对去势大鼠股骨 BMD,骨矿盐含量及血清 CT 水平的影响 与正常组比较,模型组股骨 BMD 值及骨矿物含量有明显下降($P<0.05$),与模型组比较,各给药组 BMD 及骨矿物有所提高($P<0.05$, $P<0.01$),补肾固本方高、中、低及仙灵骨葆组 BMD 显著提高($P<0.01$),仙灵骨葆与戊酸雌二醇对骨矿物含量无改变;模型组大鼠的血清 CT 水平较正常组相比明显降低($P<0.01$),补肾固本方高、中、低剂量组 CT 水平较治疗前明显改善($P<0.05$, $P<0.01$),其中补肾固本高剂量组大鼠血清 CT 水平均明显高于其余各组,中剂量组对 CT 水平有明显改善($P<0.01$),差异有统计学意义,高、中剂量组间比较无差别。见表 1。

3.2 对去势大鼠股骨及腰椎骨生物力学性能的影响 模型组和正常组大鼠比较,大鼠股骨及腰椎的弹性模量、最大载荷、屈服强度下降($P<0.05$, $P<0.01$),这说明大鼠切除卵巢后,生物力学性能都有下降。补肾高、中剂量组、仙灵骨葆组和模型股骨组相比,上述生物力学指标都有提高($P<0.05$);与模型组比较,补肾高、中剂量对大鼠腰椎生物力学弹性模量与最大载荷有所增加($P<0.05$),高剂量组对腰椎弹性模量明显增加($P<0.01$)。见表 2,3。

表 1 补肾固本方对去势大鼠 BMD,骨矿盐含量及血清 CT 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

Table 1 Effects of Bushen Guben decoction on BMD of ovariectomized rats, CT bone mineral content and serum level($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

组别	剂量/$g \cdot kg^{-1}$	BMD/$g \cdot cm^{-2}$	骨矿盐/g	CT/$ng \cdot L^{-1}$
正常	–	0.12 ± 0.01	0.37 ± 0.05	2.61 ± 0.99
模型	–	0.11 ± 0.00 1)	0.27 ± 0.05 1)	2.88 ± 1.06 2)
补肾固本方	16	0.13 ± 0.01 4)	0.35 ± 0.06 3)	2.75 ± 1.22 3)
	8	0.13 ± 0.01 4)	0.35 ± 0.84 3)	2.70 ± 1.124 1)
	4	0.12 ± 0.01 3)	0.37 ± 0.05 3)	2.85 ± 1.80 3)
仙灵骨葆	0.5	0.13 ± 0.01 3)	0.33 ± 0.05	2.40 ± 1.12
戊酸雌二醇	9×10^{-5}	0.12 ± 0.01 3)	0.30 ± 0.06	2.61 ± 0.99 3)

注:与正常组比较 1) $P<0.05$, 2) $P<0.01$;与模型组比较 3) $P<0.05$, 4) $P<0.01$(表 2,3 同)。

表 2 补肾固本方对去势大鼠股骨生物力学性能的影响($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

Table 2 Effects of Bushen Guben decoction on biomechanical properties of the femur in ovariectomized rats($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

组别	剂量/$g \cdot kg^{-1}$	弹性模量/$N \cdot mm^{-2}$	最大载荷/N	屈服强度/$N \cdot mm^{-2}$
正常	–	3 121.6 ± 321.20	25.73 ± 7.32	107.34 ± 6.03
模型	–	2 666.3 ± 240.68 1)	7.73 ± 0.34 2)	88.42 ± 11.34 2)
补肾固本方	16	3 106.9 ± 231.90 3)	28.02 ± 7.31 3)	105.25 ± 5.29 3)
	8	2 918.97 ± 218.33 3)	24.63 ± 7.30 3)	105.86 ± 4.40 3)
	4	2 363.6 ± 199.60	7.97 ± 0.50	75.61 ± 14.50
仙灵骨葆	0.5	2 485.82 ± 210.20 3)	8.54 ± 0.37 3)	71.85 ± 23.52
戊酸雌二醇	9×10^{-5}	2 368.67 ± 164.90	10.97 ± 5.60 3)	83.40 ± 21.35

表 3 补肾固本方对去势大鼠腰椎骨生物力学性能的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Table 1 Effects of Bushen Guben decoction on lumbar bone biomechanical properties of ovariectomized rats($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

组别	剂量 /g·kg^{-1}	弹性模量/N·mm^{-2}	最大载荷/N
正常	–	527.30 ± 61.12	36.20 ± 3.29
模型	–	375.34 ± 83.46$^{2)}$	15.41 ± 1.45$^{2)}$
补肾固本方	16	503.10 ± 55.53$^{4)}$	42.19 ± 2.70$^{3)}$
	8	508.78 ± 44.47$^{3)}$	34.42 ± 2.44
	4	404.82 ± 51.05	22.64 ± 2.08
仙灵骨葆	0.5	478.48 ± 26.18$^{1)}$	22.41 ± 2.29
戊酸雌二醇	9 × 10^{-5}	411.46 ± 41.03$^{3)}$	23.43 ± 2.18$^{3)}$

4 讨论

中医药治疗原发性骨质疏松症的作用机制并不是单一的,是经过多途径多靶点的协同增效[5]。本实验以自拟补肾固本方干预原发性骨质疏松症的机制与疗效为研究目标,进一步探索中药在治疗原发性骨质疏松症中的疗效。方中骨碎补、熟地黄、淫羊藿补肾壮骨,填补肾精,使肾精充足而骨髓化生有源;川芎、泽兰、当归、杜仲、牛膝补肝肾,强筋骨,活血通经。桑寄生、狗脊祛风湿强筋骨;黄芪健脾补中,升阳举陷。全方以补气活血补肾立法,气血并调,补而不滞,共收补肾壮骨,益气活血,通络止痛之效。

而处于绝经期的妇女,由于卵巢功能逐渐衰退,体内戊酸雌二醇水平迅速降低,使其对 CT 的敏感性降低,从而使骨代谢呈负平衡,骨吸收大于骨形成,骨量逐步丧失,形成骨质疏松。实验结果表明:与正常组比较,模型组股骨 BMD 值有明显下降,说明去除卵巢后大鼠 BMD 及骨矿盐含量明显下降,差异有统计学意义,说明本实验造模是成功的;和模型组比较,补肾固本方各剂量组及仙灵骨葆组与戊酸雌二醇组的 BMD 及骨矿盐含量均有明显提高,差异有统计学意义,但高剂量组比其余各组对 BMD 的改善效果更明显,差异有统计学意义。说明高剂量补肾固本方对去势大鼠 BMD 及骨矿盐含量的改善有明显作用。其主要机制还是基于中医对本病的认识,本方以补肾虚为治疗根本,兼以活血、健脾、通脉,获得肾精充足,骨髓生化有源,滋养骨骼的作用。

与正常组比较,模型组股骨 BMD 值有明显下降,说明去除卵巢后大鼠 BMD 及骨矿盐含量明显下降,差异有统计学意义;和模型组比较,补肾固本方各剂量组及仙灵骨葆组与戊酸雌二醇组的 BMD 及骨矿盐含量均有明显提高,但高剂量组比其余各组对 BMD 的改善效果更明显。根据补肾固本方对各组大鼠血清 CT 水平影响数据分析结果表明,模型组大鼠的血清 CT 水平较正常组比较明显降低,差异有统计学意义,说明大鼠去卵巢后血清骨代谢物都降低,说明造模成果;模型组大鼠与治疗各组相比较,补肾固本高、中、低剂量组(CT 水平较治疗前明显改善,其中补肾固本高剂量组大鼠血清 CT 水平均明显高于其余各组,中剂量组对 CT 水平有明显改善,高、中剂量组间比较无差别。模型组和正常组大鼠比较,大鼠股骨及腰椎的弹性模量、最大载荷、屈服强度下降。这说明大鼠切除卵巢后,生物力学性能都有下降。补肾高剂量组与中剂量组、仙灵骨葆组和模型组相比,上述生物力学指标都有不同程度的改善,正常组比较无统计学差异。

综上所述,本实验研究表明,合理剂量的中药补肾固本方通过调节去卵巢大鼠血清 CT 水平,达到改善骨质疏松的作用。大鼠在切除卵巢后随着骨质含量的不断减少,骨的力学性能下降;应用补肾固本方进行治疗后,可使其骨的力学性能得到改善或恢复。

[参考文献]

[1] 杨卫红,周建烈. 补充钙和维生素 D 预防骨质疏松性骨折疗效述评[J]. 中国骨质疏松杂志,2008,14(11):797-802.

[2] 赵宇驰,孙常太. 骨质疏松性椎体压缩骨折的诊断[J]. 中国脊柱脊髓杂志,2010,20(3):250-251.

[3] Chesnut C H, Silverman S, Andriano K, et al. A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fractures study[J]. Amer J Med, 2000, 109(4):267-276.

[4] Reginster J Y, Jupsin I, Derosy R, et al. Prevention of postmenopausal bone loss by rectal calcitonin[J]. Calcif Tissue Int, 1995, 56:539-547.

[5] 杜贵友,曹春雨. 中药治疗骨质疏松症实验研究进展[J]. 中国中药杂志,2011,36(4):401-404.

[责任编辑 周冰冰]