

益肾护骨方对废用性骨质疏松的改善作用

高俊¹, 张前德^{2*}, 张曦¹, 胡继红³

(1. 常州市中医医院骨二科, 江苏常州 213003; 2. 南京医科大学第一临床医学院, 南京 210029;
3. 常州市第二人民医院内分泌研究室, 江苏常州 213000)

[摘要] **目的:**观察益肾护骨方对废用性骨质疏松大鼠的血尿生化水平、骨结构及股骨生物力学性能影响,探讨益肾护骨方对废用性骨质疏松的改善作用。**方法:**选取 3 月龄 SD 大鼠 70 只,随机分为正常组、假手术组、模型组、益肾护骨方高、中、低剂量组和阳性药物对照组(强骨胶囊),每组 10 只。模型组、益肾护骨方高、中、低剂量组和阳性药物对照组行右侧坐骨神经切断术,假手术组的手术过程只分离显露坐骨神经后缝合切口。益肾护骨方高、中、低剂量组分别于造模后第 2 天予以益肾护骨方 52, 26, 16.25 g·kg⁻¹,阳性药物对照组造模后第 2 天予以强骨胶囊 0.25 g·kg⁻¹ig,用药 4 周。检测血尿生化、股骨生物力学、胫骨组织形态计量学指标。**结果:**血碱性磷酸酶(ALP)、血清骨钙素(BGP)、血抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)、尿羟脯氨酸(HYP)/肌酐(Cr)、骨小梁节点数、游离末端数及股骨生物力学指标,模型组与假手术组相比显著升高或降低($P < 0.01$);与模型组比较,益肾护骨方高、中、低剂量组血 ALP, BGP, TRACP, 尿 HYP/Cr, 骨小梁节点数、游离末端数及股骨生物力学指标均显著降低或升高($P < 0.01$)。**结论:**益肾护骨方对废用性骨质疏松大鼠有不同程度的成骨作用,可以不同程度延缓或减轻大鼠废用性骨质疏松的发生。

[关键词] 废用性骨质疏松; 动物模型; 骨代谢; 生物力学; 益肾护骨方

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0179-04

[doi] 10.11653/syfy2013230179

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130924.1444.013.html>

[网络出版时间] 2013-09-24 14:44

Effect of Yishen Hugu Decoction on Disused Osteoporosis in Rats

GAO Jun¹, ZHANG Qian-de^{2*}, ZHANG Xi¹, HU Ji-hong³

(1. Department of Orthopaedics, Changzhou Chinese Traditional Medicine Hospital Affiliated to Chinese Traditional Medical University of Nanjing, Changzhou 213003, China;
2. The First Clinical Medical College, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;
3. Department of Endocrinology, Changzhou NO. 2 Hospital, Changzhou 213000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Yishen Hugu decoction on the changes of the blood and urine biochemical levels, the bone structure, bone biomechanical properties in the rat disused osteoporosis. **Method:** Seventy SD rats were randomly divided into 7 groups: normal group, sham operation group, model group, high dose, medium dose and low dose of Yishen Hugu decoction group (52, 26, 16.25 g·kg⁻¹) and positive control group (Drynaria fortunei 0.25 g·kg⁻¹) with 10 rats in each group. The rats in the model group, high, medium, low dose group of Yishen Hugu decoction and positive control group were performed sciatic neurotomy. Normal group was given regular food and water other groups were gavaged Yishen Hugu decoction respectively, and the rats in positive control group were gavaged Drynaria fortunei. The blood and urine

[收稿日期] 20130617(013)

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金(20093237110005);江苏省中医药局科技项目(LZ11207);常州市科技计划项目(CJ20112014)

[第一作者] 高俊, 博士, 主治医师, 从事骨代谢的研究, E-mail: gaojungk@126.com

[通讯作者] *张前德, 教授, 博士生导师, E-mail: 96huji@sina.com

biochemical levels were measured, the femora biomechanical test and the tibia were decalcified and then stained with HE and Masson stain. **Result:** The differences of alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (BGP), tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP), hydroxyproline (HYP) /creatinine (Cr), bone mineral density (BMD) and the numbers of nodes and free ends in model group and sham operation group were significant statically ($P < 0.01$). After administration of Yishen Hugu decoction, those indexes in high, medium, low dose group of Yishen Hugu decoction were obviously higher or lower than that in model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The disused osteoporosis can be prevented effectively by the Yishen Hugu decoction.

[Key words] disused osteoporosis; animal model; bone metabolism; biomechanical; Yishen Hugu decoction

废用性骨质疏松症临床上常常继发于因各种疾病须长期卧床、运动功能受限和骨折等手术后必要的不同程度的制动,神经损伤或病变(中枢神经系统、脊髓或周围神经)所导致的骨关节功能失用及长期全身消耗性疾病等。该疾病已经成为骨创伤疾病、骨关节疾病及骨关节疾病术后康复的重要障碍,甚至有发生骨质疏松性骨折的风险,影响原发疾病的治疗和康复。本研究前期实验证实在废用性骨质疏松形成过程中,骨形成显著降低持续降低,但速度趋缓,观察最佳时间为造模术后 4 周或 6 周^[1]。本研究研究益肾护骨方对废用性骨质疏松动物模型血尿生化水平、骨结构及股骨生物力学性能的影响,为益肾活血中药防治废用性骨质疏松提供新思路。

1 材料

1.1 实验动物 3 月龄 SD 大鼠 70 只,雌雄不限,由江苏大学实验动物中心提供。动物许可证号 SCXK(苏)2009-0002。

1.2 药物

1.2.1 益肾护骨方处方及剂量 由鹿角片 10 g,补骨脂 10 g,骨碎补 10 g,淮牛膝 15 g,熟地黄 15 g,当归 15 g,白芍 15 g,川芎 10 g 组成,由常州市中医医院制剂室水煎浓缩成至每 1 mL 药液中含生药 1 g。

1.2.2 强骨胶囊 强骨胶囊(北京歧黄制药有限公司,每粒胶囊 0.25 g,含骨碎补总黄酮有效成分 0.18 g),使用时加蒸馏水制成 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液。

1.3 试剂及仪器 尿羟脯氨酸(HYP)试剂盒、尿肌酐(Cr)测定试剂、血清骨钙素(BGP)放免试剂盒、血清抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)、Masson 三色染色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司);B41 型光学显微镜(日本 Olympus),万能材料实验机(美国 BOSE3510),医学图像定量分析系统(上海求为生物科技有限公司 MIQAS)。

2 方法

2.1 动物分组 动物实验室适应性喂养 1 周,再按

照体重排序后,按随机数字表分别将大鼠分为 7 组,即 A 组-正常对照组、B 组-假手术组、C 组-模型组、D1 ~ D3 组-益肾护骨方高、中、低剂量组(相当于成人剂量的 20,10,6.25 倍)、E 组-阳性药物强骨胶囊对照组,每组 10 只。C, D1, D2, D3, E 组行右后肢坐骨神经切断术, B 组的手术过程只分离显露坐骨神经后缝合切口。A 组只作参照饲养。

2.2 造模方法 大鼠用 10% 水合氯醛以 $30 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 行腹腔麻醉后,暴露坐骨神经,于近髌处用锐利刀片切除坐骨神经,长约 5 mm,并将神经断端打结处理,逐层缝合切口^[2]。肌注庆大霉素 0.1 mL,以预防感染。

2.3 给药方法 造模后第 2 天分别予以药物干预, ig 给药 4 周,每日 1 次, A、B 组均正常饲料喂养,自由饮水; C 组造模后第 2 天予以药物组同体积的生理盐水 ig; D1, D2, D3 组分别于造模后第 2 天予以益肾护骨方 $52, 26, 16.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig; E 组造模后第 2 天予以强骨胶囊 $0.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig。各组 ig 液体量为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 其浓度及等效剂量按体重折算^[3]。

2.4 检测指标

2.4.1 血、尿生化指标测定 用全自动生化分析仪测定尿 Cr, ALP, 尿 HYP 用对二甲氨基苯甲醛法测定, 血清 BGP 用放射免疫法测定, TRACP 用免疫酶联法。

2.4.2 骨生物力学测试 取股骨标本,生理盐水冲净,自凝树脂将样本两端固定于统一包埋深度。样本固定于实验夹上,进行 3 点弯曲实验。在 BOSE3510 万能材料实验机上,在变形率为 $2 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒定作用下对股骨标本施加载荷,股骨标本中点上方有一个压杆。记录股骨断裂过程中力与位移曲线。

2.4.3 胫骨组织形态计量学检测 取各组右胫骨近侧 1/3 段, 10% 中性甲醛固定 24 ~ 48 h, 10% 中性 EDTA 液 4 ~ 8 °C 脱钙, 冠状对剖, 70%, 80%, 90%

乙醇顺浓度梯度脱水,组织浸蜡,石蜡包埋,5 μm 切片,HE 染色和 Masson 染色,镜下观察股骨远侧干骺端骨组织形态改变。光学显微镜下观察,取 10×10 倍下骨骺线下缘一视野,测节点数和游离末端数^[4-5]。

2.5 统计分析 统计分析采用 SPSS 11.5 软件包,所有数据行正态分布检验,呈正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间相互比较采用 LSD 分析,两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 动物一般情况 实验中无动物意外死亡,观察各时间段内大鼠体重增长基本正常。C, D1, D2, D3, E 组大鼠造模后即出现患肢跛行,至处死仍不能恢复,但均可以 3 个肢体行走及正常觅食。B 组术后 1 周内即可恢复 4 个肢体行走及正常觅食。见表 1。

表 1 益肾护骨方对骨质疏松大鼠血 ALP, BGP, TRACP 及尿 HOP/Cr 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	ALP/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	BGP/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	TRACP/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	HYP/Cr/ $\text{mg} \cdot \text{mmol}^{-1}$
正常对照	-	66.36 \pm 7.71 ¹⁾	4.636 \pm 0.853 ¹⁾	6.31 \pm 1.51 ¹⁾	13.82 \pm 2.78 ¹⁾
假手术	-	68.23 \pm 6.64 ¹⁾	4.089 \pm 0.791 ¹⁾	6.54 \pm 1.30 ¹⁾	14.09 \pm 2.62 ¹⁾
模型	-	113.84 \pm 15.56	1.487 \pm 0.588	14.94 \pm 2.93	23.18 \pm 4.46
益肾护骨方	52	83.24 \pm 7.81 ¹⁾	3.482 \pm 0.532 ¹⁾	10.82 \pm 2.28 ¹⁾	18.51 \pm 3.44 ¹⁾
	26	76.03 \pm 8.24 ¹⁾	3.636 \pm 0.787 ¹⁾	9.54 \pm 1.96 ¹⁾	17.32 \pm 2.50 ¹⁾
	16.25	79.56 \pm 9.12 ¹⁾	3.215 \pm 0.683 ¹⁾	11.12 \pm 2.46 ¹⁾	19.67 \pm 3.17 ¹⁾
强肾胶囊	0.25	84.52 \pm 9.05 ¹⁾	3.278 \pm 0.886 ¹⁾	12.12 \pm 2.68 ¹⁾	19.70 \pm 3.80 ¹⁾

注:与模型组比¹⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.3 对股骨三点弯曲测试结果的影响 C 组股骨最大载荷与 B 组相比显著升高 ($P < 0.01$), 予以益肾护骨方干预后, D1, D2, D3 组最大载荷与 C 组相比显著降低 ($P < 0.01$)。C 组弹性模量与 B 组相比显著升高 ($P < 0.01$), 予以益肾护骨方干预后, D1, D2, D3 组弹性模量与 C 组相比显著降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 益肾护骨方对骨质疏松大鼠股骨三点弯曲测试的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	最大载荷/N	弹性模量/MPa
正常对照	-	132.36 \pm 31.86 ¹⁾	34.71 \pm 4.38 ¹⁾
假手术	-	135.01 \pm 25.90 ¹⁾	35.67 \pm 5.86 ¹⁾
模型	-	85.62 \pm 21.02	20.21 \pm 4.58
益肾护骨方	52	118.93 \pm 22.35 ¹⁾	28.16 \pm 5.73 ¹⁾
	26	117.66 \pm 21.65 ¹⁾	29.64 \pm 6.57 ¹⁾
	16.25	110.19 \pm 20.31 ¹⁾	27.43 \pm 5.82 ¹⁾
强肾胶囊	0.25	107.48 \pm 21.55 ¹⁾	28.70 \pm 6.07 ¹⁾

3.4 对胫骨组织形态学观察及骨小梁形态计量学

3.2 对血 ALP, BGP, TRACP 及尿 HYP/Cr 的影响 见表 3。

3.2.1 对血 BGP 的影响 C 组血 BGP 与 B 组相比显著降低 ($P < 0.01$), 予以益肾护骨方干预后, 与 C 组比较, D1, D2, D3 组血 BGP 显著升高 ($P < 0.01$)。

3.2.2 对血 ALP 的影响 C 组血 ALP 与 B 组相比显著升高 ($P < 0.01$), 予以益肾护骨方干预后, D1, D2, D3 组血 ALP 与 C 组相比显著降低 ($P < 0.01$)。

3.2.3 对血 TRACP 的影响 C 组血 TRACP 与 B 组相比显著升高 ($P < 0.01$), 予以益肾护骨方干预后, 与 C 组比较, D1, D2, D3 组血 TRACP 显著降低 ($P < 0.01$)。

3.2.4 对尿 HYP/Cr 的影响 C 组尿 HYP/Cr 与 B 组相比显著升高 ($P < 0.01$), 予以益肾护骨方干预后, 与 C 组比较, D1, D2, D3 组尿 HOP/Cr 显著降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

的影响

3.4.1 对胫骨组织形态学的影响 A 组与 B 组胫骨近侧干骺段骨皮质较厚, 孔隙较少, 骨小梁排列紧密, 结构正常。而 C 组骨结构紊乱, 骨小梁变细、稀疏, 孔隙增多, 皮质明显较薄, 骨小梁有多处断裂, 骺板下区空旷, 髓腔扩大。D1, D2, D3, E 组胫骨骨小梁结构较 A 组与 B 组也有减少、变细, 骨小梁表面成骨细胞增生减少, 破骨细胞增多。

Masson 染色: 松质骨部分, C 组以蓝色为主, 表明骨基质中矿物成分丧失, 骨基质向矿化骨样组织转化受抑制; D1, D2, D3 组及 E 组则大部呈相互移行的红色区域, 表明该处骨基质矿化良好。

3.4.2 对胫骨组织骨小梁形态计量学的影响 C 组骨小梁节点数与 B 组相比显著减少 ($P < 0.01$), 而游离末端数显著增多 ($P < 0.01$), 予以益肾护骨方干预后, D1, D2, D3 组骨小梁节点数与 C 组相比显著增多 ($P < 0.01$), 而游离末端数显著减少 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 益肾护骨方对骨质疏松大鼠骨小梁
形态计量学的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	节点数/个	游离末端数/个
正常对照	-	13.82 ± 2.78 ¹⁾	18.42 ± 4.06 ¹⁾
假手术	-	14.09 ± 2.62 ¹⁾	18.60 ± 3.50 ¹⁾
模型	-	6.60 ± 1.43	25.50 ± 4.48
益肾护骨方	52	10.60 ± 2.37 ¹⁾	21.30 ± 4.08 ¹⁾
	26	11.55 ± 2.49 ¹⁾	20.10 ± 3.81 ¹⁾
	16.25	10.10 ± 2.23 ¹⁾	21.20 ± 3.82 ¹⁾
强骨胶囊	0.25	9.80 ± 2.57 ¹⁾	20.50 ± 3.69 ¹⁾

4 讨论

废用性骨质疏松症是继发性骨质疏松症之一。“骨质疏松”一般归入中医“骨痿”范畴^[6]。对于骨质疏松症的主要病机,形成了肾虚为本、血瘀为标的普遍认识。所以,治疗骨质疏松历代医家多数均从补肾活血入手^[7]。目前,虽然借助现代科学技术对废用性骨质疏松症病因、病理的分子生物、生物力学等方面有了较深入的进展,但从西药治疗方面来看,目前仍无长足进展。虽然对原发性骨质疏松有很多有效方案可以选择,但缺乏有效的治疗方案治疗废用性骨质疏松^[8-9]。

益肾护骨方是张前德教授在长期临床工作中总结归纳的经验方。益肾护骨方由鹿角片、补骨脂、骨碎补、淮牛膝、熟地黄、当归、白芍、川芎 8 味中药组成。鹿角片为血肉有情之品,温补肾阳,为君,补骨脂、骨碎补补肝肾、强筋骨,为臣,熟地黄补肾阴,阴中求阳,添精益髓,为佐药;淮牛膝,善引诸药下达腰膝,不仅能补肝强筋骨,尚能在滋润之群中轻疏灵动,通调经脉而活血祛瘀,兼有“调血”之职,为使药。当归、白芍、川芎养血活血止痛。总之,益肾护骨方既着重补肾气、温肾阳,兼顾滋补肾阴精,以冀阴中求阳,阴阳互生;另外补益的同时,加用牛膝等通经化痰活络之品,标本兼顾,补而不滞,通而不伤其正。

废用性骨质疏松症是骨代谢失调所致,骨代谢异常,主要表现为骨吸收与骨形成的平衡失调。本研究结果显示,益肾护骨方干预后,与模型组相比,血 ALP, TRACP 及尿 HOP/Cr 较模型组明显降低($P < 0.01$),血 BGP 较模型组明显升高($P < 0.01$),说明益肾护骨方有抑制骨过渡转化,促进成骨细胞活性,抑制成骨细胞破坏的作用。骨的生物力学特性是对骨量、骨质量、骨结构等的综合体现,骨的生物力学特性最能直接反映骨组织的抗骨折能力,而这种抗骨折能力是骨组织所具备的主要功能

的基础。骨的生物力学性能的评定不仅是评价骨质量和强度的主要方法,也是评价骨质疏松症的最佳方法之一。本研究结果显示,益肾护骨方干预后,与模型组相比,股骨最大载荷及弹性模量均较模型组明显升高($P < 0.01$),说明益肾护骨方提高骨组织力学性能,增强股骨抗骨折能力。骨形态学是评价骨吸收及骨形成的有效手段,研究骨小梁的微构筑,即对骨小梁节点数和游离末端数的定量研究,对骨质疏松症的诊断、骨折风险预测和药物疗效评定具有较大的参考价值。本研究结果显示,益肾护骨方干预后,改善了骨小梁微构筑,促进骨基质的矿化,且与模型组相比,骨小梁节点数和游离末端数均有明显的增加($P < 0.01$),说明益肾护骨方能改善骨小梁微构筑,增强骨力学结构。

本实验通过从骨代谢生化指标、骨结构及股骨生物力学性能的角度研究益肾护骨方对废用性骨质疏松大鼠有不同程度的成骨作用,可以不同程度延缓或减轻大鼠废用性骨质疏松的发生。

[参考文献]

[1] 高俊,张前德,胡继红,等.废用性骨质疏松动物模型发生骨质疏松时间段的研究[J].江苏医药,2012,38(10):1145.

[2] 高俊,张前德,胡继红,等.废用性骨质疏松动物模型的建立与评价[J].广东医学,2012,33(18):2728.

[3] 陈奇.中药药理实验方法[M].北京:人民卫生出版社,1994:206.

[4] 陈中献,胡显良,蒋学武.应用于髌端骨连接性参数进行废用性骨质疏松症预防措施的比较[J].广州医药,2003,3(5):11.

[5] 戴寿荣,高润,孔喜良.神经生长因子对失神经支配大鼠骨小梁形态计量的影响[J].中国康复医学杂志,2003,18(8):479.

[6] 高俊,张前德.“肾主骨”理论与破骨细胞骨吸收[J].中医杂志,2012,53(7):547.

[7] 张前德.益肾活血法治疗骨质疏松症的探讨[J].安徽中医临床杂志,2000,12(6):559.

[8] Lau R Y, Guo X. A review on current osteoporosis research; with special focus on disuse bone loss[J]. J Osteoporos, 2011,16(9).

[9] Nabavi N, Khandani A, Camirand A, et al. Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion[J]. Bone, 2011, 49(5):965.

[责任编辑 聂淑琴]