

补肾、健脾和补肾健脾方对尾部悬吊大鼠钙、磷代谢的影响

张林^{1*}, 范颖¹, 陈文娜², 孙宏伟², 马贤德²

(1. 辽宁中医药大学基础医学院方剂学科, 沈阳 110847;

2. 辽宁中医药大学教学实验中心, 沈阳 110847)

[摘要] **目的:**观察补肾、健脾和补肾健脾 3 方对模拟失重大鼠钙、磷代谢的作用,比较其促进骨矿化能力的异同。**方法:**大鼠随机分为正常对照、悬吊、补肾、健脾和补肾健脾共 5 组。后 4 组大鼠头低位 -30 度尾部悬吊连续 21 d 模拟失重,补肾、健脾和补肾健脾组大鼠从实验第 1 天开始依次按 2.4, 3.2, 5.7 g·kg⁻¹·d⁻¹ 给予补肾方、健脾方和补肾健脾方灌胃,其余各组大鼠灌服等容积的生理盐水。实验第 22 天取材,双能 X 射线骨密度仪测左侧胫骨骨密度,全自动生化分析仪检测血和尿中钙磷含量,EDTA 法检测粪钙和饲料钙含量。**结果:**较之正常对照组,悬吊组大鼠左侧胫骨骨密度显著降低 ($P < 0.01$),血钙和血磷含量、钙的表观吸收率明显降低 ($P < 0.01$),尿钙、尿磷、粪钙含量明显增高 ($P < 0.01$);较之悬吊组,补肾健脾组大鼠左侧胫骨骨密度、血钙和血磷含量、摄入钙量、钙的表观吸收率明显升高 ($P < 0.01$),尿钙、尿磷、粪钙含量明显降低 ($P < 0.01$),补肾组和健脾组大鼠左侧胫骨骨密度、血钙升高 ($P < 0.05$),钙的表观吸收率均明显升高 ($P < 0.01$),补肾组大鼠血磷含量明显升高 ($P < 0.01$),尿钙、尿磷含量显著降低 ($P < 0.01$),粪钙含量降低 ($P < 0.05$),健脾组大鼠血磷和摄入钙量增加 ($P < 0.05$),尿钙、尿磷和粪钙含量降低 ($P < 0.05, P < 0.01$);较之补肾健脾组,补肾组和健脾组大鼠左侧胫骨骨密度、血钙含量降低 ($P < 0.05$),补肾组大鼠钙的表观吸收率明显降低 ($P < 0.01$)。**结论:**补肾、健脾和补肾健脾 3 方均能改善模拟失重引起的钙磷代谢异常,健脾方在促进钙吸收和维持血钙处于正常水平方面对补肾方具有协同增效作用。

[关键词] 补肾健脾;模拟失重;尾部悬吊;钙代谢;磷代谢

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0193-04

[doi] 10.11653/syfy2013120193

Effects of Tonifying Kidney and Invigorating Spleen Prescription on the Metabolism of Calcium and Phosphorus in Rat Tail Suspension Model

ZHANG Lin^{1*}, FAN Ying¹, CHEN Wen-na², SUN Hong-wei², MA Xian-de²

(1. Formulaology Discipline, Liaoning University of Chinese Medicine, Shenyang 110847, China;

2. Teaching and Experiment Center, Liaoning University of Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the action of tonifying kidney prescription, invigorating spleen

[收稿日期] 20121224(022)

[基金项目] 国家自然科学基金(81001493);教育部博士点新教师基金(20102133120001);辽宁省教育厅基金(L2011162)

[通讯作者] *张林,副教授,从事方剂配伍规律与效用机制研究, Tel: 13066705263, E-mail: zhanglin770622@hotmail.com

[17] Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A, et al. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. J Clin Invest, 1998, 101(9): 1992.

[18] Inna N L, Alexander G, Peter H K. Caspase; pharmacological manipulation of cell death[J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2665.

[19] 熊露,田少霞,范吉平,等. 脑脉康对脑缺血再灌注损伤后 BDNF、bFGF 蛋白表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(7): 67.

[20] 熊露,田少霞,范吉平,等. 脑脉康对脑缺血再灌注损伤后神经细胞凋亡的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(8): 24.

[责任编辑 聂淑琴]

prescription and tonifying kidney and invigorating spleen prescription on the metabolism of calcium and phosphorus in tail suspension model rats. **Method:** Rats were assigned to five groups randomly: control (C), tail suspended (S), tonifying kidney (TK), invigorating spleen (IS) and tonifying kidney and invigorating spleen (TKIS) groups. Rats in S, TK, IS and TKIS groups were suspended by head down tilt -30° for 21 days. Rats in TK, IS and TKIS groups were orally administrated with three decoctions and other groups with equivalent saline from the first day. Bone mineral density of left tibia was measured respectively using dual energy X ray absorptiometry in rats on day 22. Meanwhile calcium and phosphorus in serum and urine in rats of these five groups were measured by automatic biochemical analyzer. Calcium content in fecal and feed were detected by EDTA. **Result:** Compared with the C group, bone mineral density, serum calcium and phosphorus and apparent absorption rate of calcium are decreased, urine calcium and phosphorus and fecal calcium were increased obviously in S group. Compared with the S group, the bone mineral density, serum calcium and phosphorus, calcium intake and apparent absorption rate of calcium were raised but urine calcium and phosphorus and fecal calcium are reduced in TKIS group. Bone mineral density, serum calcium and phosphorus and apparent absorption rate of calcium were higher in TK and IS groups than the values in S group. Urine calcium and phosphorus and fecal calcium were lower in TK and IS groups than the values in S group. Calcium intake in IS group is increased above S group. Compared with the TKIS group, bone mineral density and serum calcium were decreased in TK and IS groups and apparent absorption rate of calcium was reduced in TK group. **Conclusion:** Three prescriptions including tonifying kidney prescription, invigorating spleen prescription and tonifying kidney and invigorating spleen prescription can improve the abnormal calcium and phosphorus metabolism caused by simulated weightlessness and the invigorating spleen prescription has a synergistic effect on tonifying kidney prescription in promoting calcium absorption and maintaining serum calcium concentration.

[**Key words**] tonifying kidney and invigorating spleen; simulated weightlessness; tail suspension; calcium metabolism; phosphorus metabolism

载人航天飞行实践表明^[1],在太空飞行失重环境中航天员会发生骨质疏松,脊柱、股骨颈和粗隆以及骨盆骨密度每个月丢失 1.0% ~ 1.6%,而且航天飞行导致的骨质疏松会增加以后生活中发生骨折的风险。因此寻求防治失重性骨丢失的有效中药复方是当前航天中医药学领域研究的热点问题。本研究以中医学对骨质疏松症的病机认识为切入点,从钙磷代谢角度比较补肾、健脾和补肾健脾 3 方作用程度的异同,确定较为合适的防治失重性骨丢失的中医治法。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 Wistar 大鼠 40 只,级别 SPF/VAF,体重 (230 ± 10) g,北京维通利华实验动物中心提供。许可证号 SCXK(京)2006-0009。

1.2 药物 方剂补肾方:由鹿茸、淫羊藿等组成,健脾方:由生晒参、生黄芪等组成,补肾健脾方:由生晒参、生黄芪、鹿茸、淫羊藿等组成,全部药材购自北京同仁堂辽宁有限责任公司。补肾方和补肾健脾方中鹿茸打碎,过 100 目筛兑入药液,3 个方中其余药物均采用常规水煎煮法提取,补肾方、健脾方和补肾健

脾方将所得全部药液混合依次浓缩成含生药 0.42, 0.56, 1 g·mL⁻¹ 备用。钙、磷检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所(批号 20100516)。

1.3 仪器 双能 X 射线骨密度分析仪(美国, Lunar),全自动生化分析仪(日本, Hitachi)。

2 方法

2.1 动物分组与处理 大鼠随机分为 5 组:正常组(C)、悬吊组(S)、补肾组(TK)、健脾组(IS)和补肾健脾组(TKIS),每组 8 只。依据人和动物间体表面积折算的等效剂量比值表计算大鼠给药剂量,TK、IS、TKIS 组大鼠从实验第 1 天开始依次按 2.4, 3.2, 5.7 g·kg⁻¹·d⁻¹ 给予补肾方、健脾方和补肾健脾方灌胃。其余各组大鼠灌服等容积的生理盐水。S 组、TK 组、IS 组、TKIS 组大鼠采用头低位 -30° 尾部悬吊法^[2]模拟失重,每天悬吊 24 h,共悬吊 21 d;C 组大鼠不采取任何处理。

实验第 19 天,各组大鼠放入代谢笼单笼饲养,收集 24 h 尿液和粪便,称量 24 h 进食饲料量,尿液经离心,取上清液,待测尿钙磷含量;实验第 22 天,各组大鼠于灌胃后 2 h 水合氯醛麻醉,腹主动脉采

血,离心取上清,待测血钙磷含量,同时取左侧胫骨。

2.2 指标测定

2.2.1 骨密度测定 取各组大鼠左侧胫骨,除净附其上的肌肉和软组织,生理盐水冲洗,用双能 X 射线骨密度分析仪,测定大鼠离体左侧胫骨的骨密度,以单位面积的骨矿物质含量($\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)表示骨密度值。

2.2.2 血和尿中钙磷含量测定 全自动生化分析仪检测血和尿中钙磷含量,具体步骤严格按照试剂盒说明操作。

2.2.3 摄入钙量和粪钙含量测定 将大鼠饲料粉碎,取 0.2 g 加 50 mL 0.2 mol·L⁻¹盐酸和 0.1 g 氯化镧,震荡 2 h,放置过夜,次日摇匀离心,取上清液。再将大鼠粪便 110 °C 烘干,称重,研磨成粉末,取各组大鼠 0.1 g 干粪粉末加 50 mL 0.2 mol·L⁻¹盐酸,震荡 2 h,放置过夜,次日摇匀离心,取上清液。EDTA 法检测饲料和粪样品中钙含量。摄入钙量($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) = 饲料样品钙含量 × 24 h 进食量,粪钙含量($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) = 粪样品中钙含量 × 24 h 排便量。

2.2.4 钙的表观吸收率计算

$$\text{钙的表观吸收率} = (\text{摄入钙量} - \text{粪钙含量}) / \text{摄入钙量} \times 100\%$$

2.3 统计学处理 所得数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 软件处理,单因素方差分析后,行多组间比较,采用 Student-Newman-Keuls 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对模拟失重大鼠左侧胫骨骨密度的影响 与正常组比较,悬吊组大鼠左侧胫骨骨密度明显降低($P < 0.01$);与悬吊组比较,补肾、健脾组大鼠左侧胫骨骨密度升高($P < 0.05$),补肾健脾组大鼠左侧胫骨骨密度明显升高($P < 0.01$);与补肾健脾组比较,补肾、健脾组大鼠左侧胫骨骨密度降低($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 对模拟失重大鼠血中钙、磷含量的影响 与正常组比较,悬吊组大鼠血中钙、磷含量明显降低($P < 0.01$);与悬吊组比较,补肾、健脾组大鼠血中钙含量均升高($P < 0.05$),补肾组大鼠血中磷含量明显升高($P < 0.01$),健脾组大鼠血中磷含量升高($P < 0.05$),补肾健脾组大鼠血中钙、磷含量均明显升高($P < 0.01$);与补肾健脾组比较,补肾、健脾组大鼠血中钙含量降低($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对模拟失重大鼠尿中钙、磷含量的影响 与正常组比较,悬吊组大鼠尿中钙、磷含量均升高($P <$

表 1 补肾、健脾、补肾健脾三方对模拟失重大鼠左侧胫骨骨密度的作用($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	骨密度/ $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$
正常	-	0.098 ± 0.009
悬吊	-	0.079 ± 0.005 ²⁾
补肾	2.4	0.087 ± 0.007 ^{3,5)}
健脾	3.2	0.087 ± 0.006 ^{3,5)}
补肾健脾	5.7	0.095 ± 0.007 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与悬吊组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与补肾健脾组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 4 同)。

表 2 补肾、健脾、补肾健脾三方对模拟失重大鼠血中钙、磷含量的作用($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	血钙	血磷
正常	-	2.46 ± 0.09	2.91 ± 0.26
悬吊	-	2.19 ± 0.13 ²⁾	2.38 ± 0.22 ²⁾
补肾	2.4	2.33 ± 0.09 ^{3,5)}	2.74 ± 0.25 ⁴⁾
健脾	3.2	2.30 ± 0.10 ^{3,5)}	2.70 ± 0.26 ³⁾
补肾健脾	5.7	2.44 ± 0.09 ⁴⁾	2.85 ± 0.29 ⁴⁾

0.05);与悬吊组比较,补肾、补肾健脾组大鼠尿中钙、磷含量均显著降低($P < 0.01$),健脾组大鼠尿中钙含量降低($P < 0.05$),尿中磷含量显著降低($P < 0.01$);与补肾健脾组比较,补肾、健脾组大鼠尿中钙、磷含量无显著性差异。见表 3。

表 3 补肾、健脾、补肾健脾三方对模拟失重大鼠尿钙、尿磷含量的作用($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	尿钙	尿磷
正常	-	0.58 ± 0.07	0.80 ± 0.12
悬吊	-	0.83 ± 0.10 ¹⁾	0.93 ± 0.10 ¹⁾
补肾	2.4	0.69 ± 0.08 ⁴⁾	0.83 ± 0.12 ⁴⁾
健脾	3.2	0.73 ± 0.09 ³⁾	0.85 ± 0.09 ⁴⁾
补肾健脾	5.7	0.62 ± 0.11 ⁴⁾	0.84 ± 0.11 ⁴⁾

3.4 对模拟失重大鼠摄入钙量、粪钙含量和钙的表观吸收率的影响 与正常组比较,悬吊组大鼠摄入钙量和钙的表观吸收率均明显降低($P < 0.01$),粪钙含量明显升高($P < 0.01$);与悬吊组比较,健脾组大鼠摄入钙量增加($P < 0.05$),补肾健脾组大鼠摄入钙量明显增加($P < 0.01$),健脾、补肾健脾组大鼠粪钙含量均明显降低($P < 0.01$),补肾组大鼠粪钙含量降低($P < 0.05$),补肾、健脾、补肾健脾组大鼠钙的表观吸收率均明显升高($P < 0.01$);与补肾健脾组比较,补肾组大鼠钙的表观吸收率明显降低($P < 0.01$)。见表 4。

表 4 补肾、健脾、补肾健脾三方对模拟失重大鼠摄入量、粪钙含量、钙的表观吸收率的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	钙摄入量/ $mg \cdot d^{-1}$	粪钙/ $mg \cdot d^{-1}$	钙的表观吸收率/%
正常	-	168.65 ± 5.52	94.20 ± 5.37	44.14 ± 2.64
悬吊	-	147.28 ± 7.79 ²⁾	104.39 ± 5.33 ²⁾	29.06 ± 2.87 ²⁾
补肾	2.4	154.40 ± 9.04	98.17 ± 5.61 ³⁾	36.37 ± 2.50 ^{4,6)}
健脾	3.2	157.15 ± 8.26 ³⁾	96.38 ± 3.50 ⁴⁾	38.57 ± 2.77 ⁴⁾
补肾健脾	5.7	162.48 ± 10.93 ⁴⁾	95.33 ± 3.73 ⁴⁾	41.20 ± 2.46 ⁴⁾

4 讨论

减轻航天飞行中的骨丢失不仅能确保航天员的健康和安全,而且也会有助于人类顺利完成长期太空探索任务、合理利用太空资源。许多数据已表明^[3],钙和骨代谢受到失重环境的影响,而且这种影响将会一直持续到航天员返回地球 1G 重力环境之后。早在 20 世纪 70 年代末,美国 NASA“空间实验室”已经报道^[4],失重环境会导致负钙平衡的出现,机体对钙的吸收能力降低,而尿钙和粪钙含量明显增加。还有研究证实^[5-6],血清钙浓度在太空飞行 14 d 明显下降,这种降低维持到飞行任务结束的 110 d。在本次研究中发现,尾部悬吊模拟失重导致大鼠胫骨骨密度、血钙和血磷含量、钙摄入量和钙的表观吸收率均明显下降,尿钙、尿磷和粪钙含量显著升高,与以往的研究结果基本一致。

骨的生成可分为两步:一是合成并分泌胶原等骨基质;二是骨盐沉积于基质中,形成坚硬的骨质。中医学认为“肾主骨,生髓,髓养骨”。由此可见肾与骨的生成密切相关,补肾方药有可能可以促进骨基质合成或骨盐沉积。依据脾肾相关理论可知,先天之本肾与后天之本脾互相资生,在一定程度上健脾方药有助于加强肾的生理功能。而且中医学认为骨质疏松症的发病多与脾肾亏虚有关。因此本研究着重比较了补肾、健脾、补肾健脾三方对尾部悬吊模拟失重大鼠钙磷代谢影响的差异。结果表明,3 个方剂均能升高尾部悬吊大鼠左胫骨骨密度,具有防治失重性骨丢失作用,以补肾健脾方效果为优。对于模型组大鼠血钙、血磷的降低,尿钙、尿磷、粪钙的升高,以及钙的表观吸收率的下降,3 个方剂均有抑制作用。对模型组大鼠血钙的恢复,以补肾健脾方为最佳;而在升高模型组大鼠钙的表观吸收率方面,

补肾方不及健脾方和补肾健脾方,究其原因可能与健脾方和补肾健脾方提高了饮食中钙摄入量有关。由本实验结果可推断,中医健脾法在促进钙吸收和维持血钙处于正常水平方面对补肾法具有协同增效作用,以此可解释在补肾、健脾和补肾健脾 3 个方中,缘何补肾健脾方对失重性骨丢失的防治效果最优。

[参考文献]

[1] Iwamoto J, Takeda T, Sato Y. Interventions to prevent bone loss in astronauts during space flight [J]. Keio J Med, 2005, 54 (2): 55.

[2] Morey-Holton E R, Globus R K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects [J]. J Appl Physiol, 2002, 92(4): 1367.

[3] S M Smith, M E Wastney, K O O'Brien, et al. Bone Markers, Calcium metabolism, and calcium kinetics during extended-duration space flight on the Mir Space Station [J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(2): 208.

[4] Johnston R S, Dietlein L F. Biomedical Results of Skylab (NASA SP-377) [M]. Washington DC: US Government Printing Office, 1977: 204

[5] S M Smith, M E Wastney, B V Morukov, et al. Calcium metabolism before, during, and after a 3-mo spaceflight: kinetic and biochemical changes [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 1999, 277(1): R1.

[6] G D Whedon, L Lutwak, P Rambaut, et al. Effect of weightlessness on mineral metabolism, metabolic studies on Skylab orbital space flights [J]. Calcified Tissue International, 1975, 21 (1): 423.

[责任编辑 聂淑琴]