

补肾通络方治疗去势大鼠骨质疏松的研究

闵文¹, 黄桂成^{1*}, 华永庆¹, 马勇¹, 黄正泉¹, 杜斌², 沈计荣²

(1. 南京中医药大学, 南京 210029; 2. 江苏省中医院, 南京 210029)

[摘要] 目的: 观察补肾通络方对骨质疏松大鼠骨代谢和骨密度的干预效应, 并探讨其作用机制。方法: 通过卵巢去势的方法造成大鼠骨质疏松模型, 造模后随机分为 6 组: 假手术组、模型组、仙灵骨葆组、补肾基础组、通络组、补肾通络组。治疗 10 周后, 检测大鼠体重、血清钙(S-Ca)、血清磷(S-P)、血清碱性磷酸酶(S-ALP)及骨密度。结果: 与假手术组比较, 骨质疏松大鼠体重增加, S-Ca 降低, S-P 上升, S-ALP 上升, 骨密度下降, 各组均有显著性差异($P < 0.05$)。与模型组相比, 各治疗组骨质疏松大鼠体重增长受到抑制, 但差异不显著; S-Ca 上升, S-P 下降, 其中补肾通络组有显著差异($P < 0.05$); S-ALP 下降, 各组均有显著性差异($P < 0.01$); 骨密度均上升, 补肾通络组骨密度值高于补肾基础组或通络组, 其中补肾基础组有显著差异($P < 0.05$), 而通络组及补肾通络组有显著差异($P < 0.01$)。结论: 补肾通络中药可以有效降低骨质疏松大鼠的骨代谢异常旺盛水平, 明显提高其骨密度, 补肾中药与通络中药在治疗骨质疏松方面具有良好的协同增效作用。

[关键词] 补肾通络方; 骨质疏松; 骨代谢; 骨密度; 试验研究

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0189-04

Empirical Studies on Treatment Effects of Bushen Tongluo Decoction in Osteoporosis Rats

MIN Wen¹, HUANG Gui-cheng^{1*}, HUA Yong-qin¹, MA Yong¹, HUANG Zheng-quan¹, DU Bin², SHEN Ji-rong²

(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Province Hospital of TCM, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the intervention effects and mechanism of Bushen Tongluo decoction on bone metabolism and density in the osteoporosis rats. **Method:** Rat models of the osteoporosis were established by bilateral ovariectomy. The rats were divided into six groups randomly: the normal group, model group, XinLinGuBao group, Bushen-based decoction group, Tongluo decoction group, Bushen Tongluo decoction group. After ten weeks treatment, the rats weight, the serum calcium, the serum phosphorus, the serum alkaline phosphatase and the bone density. **Result:** The weight of the osteoporosis rats increased, the serum calcium decreased, the serum phosphorus increased, the serum alkaline phosphatase increased and the bone density decreased in model group as compared with the normal group($P < 0.05$). The weight gain of the osteoporosis rats were inhibited in each treat group as compared with model group, but there were no significant difference. The serum calcium increased, the serum phosphorus decreased in each treat group as compared with model group, and there were significant difference in Bushen Tongluo decoction group. The serum alkaline phosphatase decreased obviously in each group as compared with model group($P < 0.01$). The bone density increased in each group as compared with model group, and there were significant difference in Bushen-based decoction group. ($P < 0.05$) and in Tongluo decoction group and Bushen Tongluo decoction group($P < 0.01$). The number of Bushen Tongluo decoction group were higher than the number of Bushen-based decoction group or Tongluo decoction group. **Conclusion:** Bushen Tongluo decoction group can effectively decrease high dysbolism of bone metabolism, increase bone density in the osteoporosis rats. Bushen

[收稿日期] 20100906(012)

[基金项目] 江苏省中医药局课题(2009-2011, LZ09012)

[第一作者] 闵文, 博士, 讲师、主治医师, 研究方向: 中医骨伤科学, E-mail: wenge1977@yahoo.com.cn, Tel: 13905168696

[通讯作者] * 黄桂成, 教授、博士生导师, Tel: 025-85811003, E-mail: hgc@njutcm.edu.cn

decoction and Tongluo decoction have good synergism.

[Key words] Bushen Tongluo decoction; osteoporosis; bone metabolism; bone density; empirical study

补肾通络方是我们治疗骨质疏松症的经验方,在临床上取得了很好的疗效。但目前对于补肾通络法的作用机制研究尚属空白,该法与传统的补肾法之间的疗效差异仍缺乏科学的评判。基于以上考虑,本研究通过血清钙(S-Ca)、血清磷(S-P)、血清碱性磷酸酶(S-ALP)及双能X线检测,评价补肾通络方对去势大鼠骨代谢和骨密度的干预效应,并探讨其作用机制,为补肾通络法临床治疗骨质疏松症提供试验基础和理论依据。

1 材料

1.1 动物 6月龄SD系SPF级健康雌性大鼠92只,体重260~280g,由扬州大学比较医学中心提供,合格证号SCXK(苏)2007-0001。

1.2 受试药物 补肾基础方、通络方、补肾通络方均由江苏省中医院制剂室提供,含生药1.0g·mL⁻¹。补肾基础方:淫羊藿,续断,茯苓等组成。通络方:蜈蚣等组成。补肾通络方:淫羊藿,续断,蜈蚣,茯苓等组成。仙灵骨葆胶囊:贵州同仁堂制药有限公司,生产批号090921。

1.3 试剂与仪器 苦味酸,汕头市西陇化工厂,批号031108;注射用青霉素钠,哈药集团总厂,批号A090303915;水合氯醛,成都市科龙化工试剂厂,批号20081206;氯化钠,南京化学试剂有限公司,批号0909080511;钙试剂盒,批号20100407;磷试剂盒,批号20100407,均由南京建成生物工程研究所提供。双能X线骨密度仪,Lunar Prodigy Advanced,美国GE公司。

2 方法

2.1 动物造模及分组 将以上大鼠随机分为假手术组和手术组,分别为22只和70只。将动物用水合氯醛300mg·kg⁻¹腹腔注射,麻醉生效后沿后正中中线切开皮肤约1.5~2cm,肋弓下脊柱旁开1cm处切开肌肉,打开后腹膜即可见到位于肾脏后下方的脂肪团,将其轻柔提出,找到粉红色的卵巢,分离其周围脂肪,用4号丝线结扎其下方的输卵管血管。将卵巢完整取出,放入固定液固定。取出双侧卵巢后逐层缝合,以600万U/100mL青霉素注射于手术处,每侧1mL。假手术组仅取卵巢旁的部分脂肪即可关闭伤口。术后每天给予青霉素钠盐5万U/只,

连续3d。术后10周从2组分别随机选出10只大鼠处死后均取右侧股骨,去除附着肌肉和结缔组织,采用双能X线骨密度仪进行检测,以验证造模是否成功。造模成功后,假手术组剩下12只,手术组大鼠随机分为5组,模型组、仙灵骨葆组、补肾基础组、通络组、补肾通络组各12只。

2.2 给药方法 补肾基础组、通络组、补肾通络组分别给予水提液含生药分别为0.63,0.54,0.09g·L⁻¹灌胃。仙灵骨葆组按50μg·kg⁻¹大鼠体重灌胃。各组每天以10mL·kg⁻¹,分别给予补肾基础方、通络方、补肾通络方水提液、仙灵骨葆胶囊水溶液及等体积生理盐水灌胃,每日1次,共10周。

2.3 观察指标 动物大体情况的观察:记录造模期间及药物干预期间大鼠的一般情况。给药10周,大鼠颈动脉放血,获取血清,测定骨代谢生化指标:血清钙(S-Ca)、血清磷(S-P)、血清碱性磷酸酶(S-ALP)。处死动物,测定骨密度。

2.3.1 大鼠体重统计 手术前、给药前、给药后逐只称量大鼠体重,统计大鼠体重变化趋势。

2.3.2 血清钙(S-Ca)测定 取5mL试管,依次加入甲基百里香酚蓝(MTB)试剂1mL,碱性溶液2mL,待测血清20μL,混匀,静置5min后,波长610nm,1cm光径,蒸馏水调零,测定吸光度。计算公式:血清中钙含量(mmol·L⁻¹)=(测定管吸光度-空白管吸光度)/(标准管吸光度-空白管吸光度)×标准管浓度(2.5mmol·L⁻¹)。

2.3.3 血清磷(S-P)测定 取5mL试管,依次加入待测血清20μL,尿素溶液1mL,孔雀绿-钼酸液3mL,混匀,室温准确放置15min,640nm比色,1cm光径,蒸馏水调零,测定吸光度。计算公式:磷含量(mmol·L⁻¹)=(测定管吸光度-空白管吸光度)/(标准管吸光度-空白管吸光度)×标准管浓度(1.29mmol·L⁻¹)。

2.3.4 血清碱性磷酸酶(S-ALP)测定 取5mL试管,依次加入待测血清50μL,缓冲液0.5mL,基质液0.5mL,充分混匀并37℃水浴15min后加入显色剂1.5mL,立即混匀,520nm,0.5cm光径比色,空白管调零,测定吸光度。单位定义:100mL血清在37℃与基质作用15min产生1mg酚为1个金氏

单位。计算公式: 碱性磷酸酶(金氏单位/100 mL) = 测定管吸光度/标准管吸光度 × 标准管含酚的量 × 100 mL/0.05 mL 标准管含酚量为 0.005 mg。

2.3.5 骨密度(BMD)测定 大鼠处死后均取右侧股骨, 去除附着肌肉和结缔组织, 使用小动物骨密度测定软件, 采用双能 X 线骨密度仪测定 BMD 值。

2.4 统计学方法 所有试验数据采用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计分析。试验结果皆以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验进行不同组之间的比较分析。

3 结果

3.1 骨质疏松大鼠体重统计 统计结果显示, 进行卵巢切除造模后, 各组去势大鼠体重增长显著超过假手术组, 模型组与假手术组体重相差超过 20 g, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。而经过 10 周给药后去势大鼠体重仍超过假手术组 ($P < 0.01$)。各治疗组体重增长较模型组慢, 但差异不显著。结果见表 1。

表 1 补肾通络方对去卵巢骨质疏松模型大鼠体重影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	体重/g		
	手术前	给药前	给药后
假手术	272.8 ± 26.4	285.3 ± 26.3	294.1 ± 19.1
模型	273.3 ± 23.0	307.4 ± 24.2 ¹⁾	317.8 ± 17.9 ²⁾
仙灵骨葆	273.6 ± 28.3	307.8 ± 29.8	312.9 ± 18.0
补肾基础	273.8 ± 24.8	307.8 ± 23.5	308.1 ± 18.7
通络	273.8 ± 21.9	307.9 ± 22.3	306.4 ± 26.3
补肾通络	273.1 ± 23.4	306.8 ± 24.9	306.2 ± 17.8

注: 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 血清钙(S-Ca)测定结果 统计结果显示, 与假手术组相比, 各组去势大鼠 S-Ca 均降低, 模型组大鼠 S-Ca 显著降低 ($P < 0.01$); 以模型组为对照, 各治疗组大鼠 S-Ca 均上升, 其中补肾通络组与模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$)。结果见图 1。

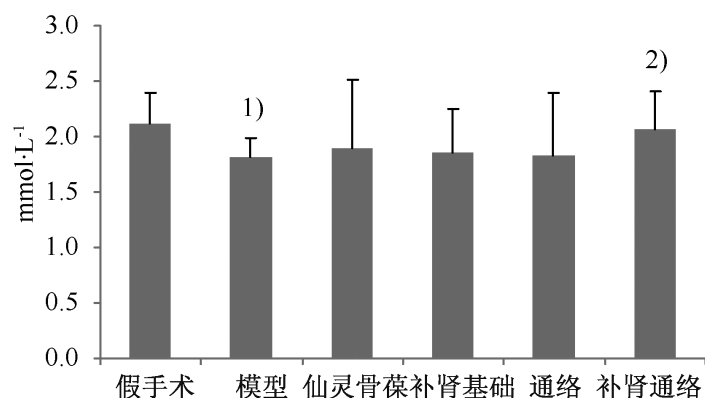


图 1 补肾通络方对去卵巢骨质疏松模型大鼠血钙含量的影响

$\bar{x} \pm s, n = 12$, 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$, 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$

3.3 血清磷(S-P)测定结果 统计结果显示, 去势大鼠 S-P 均上升, 模型组与假手术组比较差异具有

显著性 ($P < 0.05$); 各给药组大鼠 S-P 有下降的趋势, 其中补肾通络组与模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$)。结果见图 2。

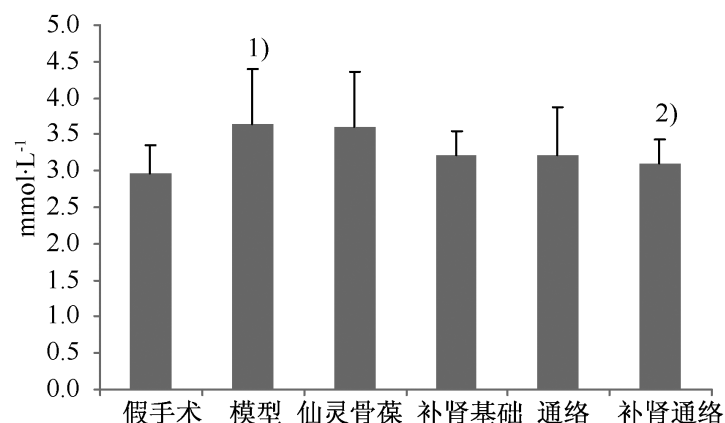


图 2 补肾通络方对去卵巢骨质疏松模型大鼠血磷含量的影响

$\bar{x} \pm s, n = 12$ 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$, 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$

3.4 血清碱性磷酸酶(S-ALP)测定结果 统计结果显示, 模型组与假手术组比较, 大鼠 ALP 明显上升, 差异具有显著性 ($P < 0.05$); 各给药组大鼠 ALP 均明显下降, 差异具有显著性 ($P < 0.01$)。结果见图 3。

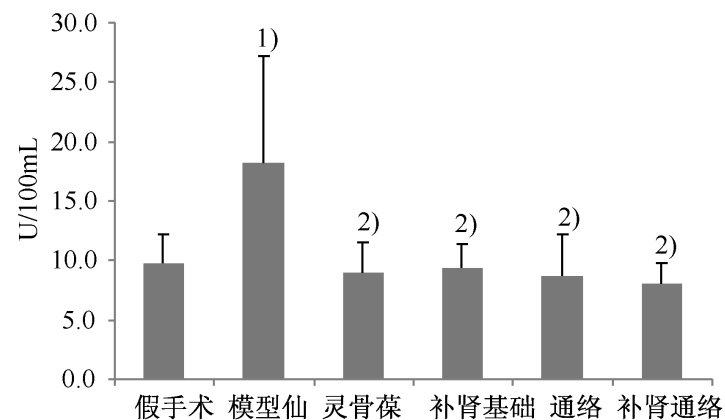


图 3 补肾通络方对去卵巢骨质疏松模型大鼠血清碱性磷酸酶的影响

$\bar{x} \pm s, n = 12$, 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$, 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$

3.5 骨密度测定结果 大鼠股骨骨密度统计结果显示, 卵巢切除后, 模型组骨密度显著下降, 与假手术组比较有显著性差异 ($P < 0.05$), 表明造模成功。各个给药组对大鼠骨密度的下降均有不同程度抑制作用。其中补肾基础组与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$), 而通络组及补肾通络组与模型组比较均具有十分显著差异 ($P < 0.01$), 且补肾通络组骨密度值高于补肾基础组或通络组。见图 4。

4 讨论

中医学中并没有“骨质疏松症”的病名, 一般将其归入“骨痿”、“骨痹”、“骨枯”、“骨极”、“虚劳”或“腰背痛”的范畴。“肾虚则骨枯髓减”等历代医家

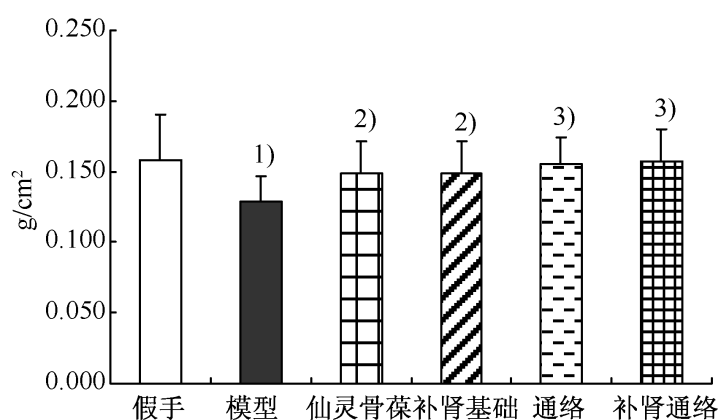


图 4 补肾通络方对去卵巢骨质疏松模型大鼠骨密度的影响

翻±s, n=12, 与假手术组比较¹⁾ P<0.05,
与模型组比较²⁾ P<0.05, ³⁾ P<0.01

的论述,直接指明了肾虚是骨质疏松症发生的根本原因。骨质疏松症患者病程较长,在临床上常表现为迁延难愈的骨痛,初病多在气在经,久病则入血入络,“久痛入络”,发为络病。针对骨质疏松症患者肾虚络阻证的病机特点,我们在治疗上采用了补肾壮骨、活血通络的基本治疗大法。补肾通络方中,淫羊藿、续断等补肾活血中药,对于肾虚络脉空虚、所谓“虚气流滞”者,可达到补络、宣络、营络之目的;蜈蚣等虫类中药活血化瘀,疏通络道,驱邪止痛;茯苓益气健脾,宁心安神。组方中滋肾与活血并举、补气与通络互存,补而不膩邪、通而不伤络,虚实共治,采用虫类药物搜剔络道,共达益肾填精、壮骨生髓、通络止痛之效。

试验结果显示,切除大鼠双侧卵巢 10 周后,去势组同假手术组比较,离体股骨的骨密度降低,证明去势大鼠是较为理想的骨质疏松动物模型,这与相关报道是一致的^[1]。绝经后雌激素减少,骨吸收及骨形成均加速,呈高转换型骨代谢,由于骨吸收的过程较短,成骨过程较长而造成骨量的丢失。采用手术切除双侧卵巢的大鼠,术后骨代谢活跃,骨量出现明显丢失,这些特性较好地模仿了妇女正常绝经时高转换型骨质疏松发生时的骨丢失状态。一般认为血清碱性磷酸酶(S-ALP)的升高有可能是骨吸收亢进伴随着成骨细胞功能活跃的结果,表现高转换型骨质疏松的特征^[2]。

骨质疏松的形成是一个很长的病理过程,有效的骨活性药物临床观察 3~4 年也未必能显示出全部治疗效果,在短时间内根本看不到作用。血清生化指标可反映骨代谢的实际水平^[3],而骨密度仪可测定骨质的细微变化,双能 X 线吸收法是目前国际学术界公认的诊断骨质疏松的金标准^[4]。因此本试

验将血清生化指标和骨密度(BMD)作为评价药物治疗效果的主要标准。

各治疗组同模型组相比较,大鼠 S-Ca 水平上升、S-P 水平下降、S-ALP 活性降低、骨密度明显升高,表明补肾通络中药降低了去势大鼠的骨代谢速率,明显提高了其骨密度。由此可认为补肾通络中药可以有效降低去势大鼠的骨代谢异常旺盛水平,防止骨量丢失,预防骨质疏松的发生。试验还证实,补肾通络组在调节去势大鼠的骨代谢速率和防止骨量丢失方面,优于单纯使用补肾中药与通络中药,这表明,补肾中药与通络中药在治疗骨质疏松方面具有良好的协同增效作用,同时也说明中医辨证施治理论的科学性。

本试验中发现,各组去势大鼠体重显著增长,经过给药后去势大鼠体重仍明显超过假手术组,说明去势可以导致雌鼠肥胖。这可能是由于卵巢切除后,雌激素的分泌量明显减少,对垂体的抑制作用减弱,导致出现继发性下丘脑及垂体功能亢进及精神和植物神经功能紊乱,致使糖脂代谢异常,食欲亢进而饥饿,进食较多引起肥胖。各给药组体重增长较模型组缓慢,但差异不显著。说明以上药物有温和地拮抗去势大鼠体重增长的作用。

血钙的来源有 2 个:通过消化道吸收的钙以及骨骼中的钙。刘庆利等试验发现^[5],中药有避免骨质疏松大鼠血钙丢失的作用。试验中,我们发现各给药组均能不同程度的提高去势大鼠 S-Ca 水平。各给药组是否通过促进消化道的钙吸收来实现去势大鼠 S-Ca 水平的提高,是否通过提高血清中 Ca/P 来实现骨的矿化,以达到纠正骨质疏松的目标,还有待试验进一步证实。

[参考文献]

- [1] 李青南. 骨质疏松试验动物研究-骨组织形态计量学[M]. 成都: 四川大学出版社, 2001: 23.
- [2] 宫琳, 周延民, 李春艳, 等. 快速建立兔骨质疏松症动物模型的方法[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2008, 34(5): 903.
- [3] 高志成, 邓晓东, 王心愉, 等. 复方补骨胶囊对去势大鼠骨密度的影响[J]. 河北医药 2004, 26(1): 16.
- [4] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊治指南(讨论稿)[J]. 实用医学进修杂志, 2006, 34(4): 193.
- [5] 刘庆利, 权铁刚, 唐广志, 等. 中药治疗对去卵巢大鼠骨质疏松动物模型血钙、血磷、碱性磷酸酶与骨密度的影响[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(8): 1517.

[责任编辑 邹晓翠]