

· 实验研究 ·

补肾活血液对去势雌鼠骨质疏松的影响*

张荣华^{1△} 陈可冀² 陆大祥³ 侯 励¹

内容提要 目的:研究补肾活血液对模型大鼠骨质疏松的影响及其机制,为临床中医药治疗骨质疏松提供实验依据。方法:SD 雌性大鼠 50 只,随机分为 5 组:正常组,模型加生理盐水组,雌激素组,中药高、低剂量组。采用切除卵巢诱导的骨质疏松模型,用灌胃法给服补肾活血液,并以尼尔雌醇及生理盐水作为对照。各组动物均在 12 周后处死,测定尿总羟脯氨酸(U-Hyp)、尿肌酐(U-Cr)、骨钙素(BGP)、股骨抗弯强度(FBS),处死前测定全身骨密度(GBMD)。结果:中药组的 GBMD 及 FBS 明显高于模型组($P < 0.05$),但低于正常组($P < 0.05$);BGP 明显高于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$),在高剂量时接近正常组;U-Hyp/Cr 明显低于模型组($P < 0.05$),但仍然高于正常组($P < 0.05$)。结论:补肾活血液对模型鼠骨质疏松有明显的抑制作用,主要影响骨形成环节。

关键词 中药复方 卵巢切除术 骨密度 股骨抗弯强度 骨钙素 尿羟脯氨酸 骨质疏松

Efficacy of Chinese Recipes of Replenishing Kidney and Activating Blood Circulation in Female Rats with Osteoporosis Induced by Ovariectomy Zhang Ronghua, Chen Keji, Lu Daxiang, et al *The First Affiliated Hospital of Medical College, Jinan University, Guangzhou (510630)*

Objective: To investigate the efficacy of Chinese recipe of replenishing Kidney and activating blood circulation (RKABC) in female rats with osteoporosis induced by ovariectomy. **Methods:** Fifty female SD rats at 12 months of age were chosen, and were divided into 5 groups: control, model, model plus nylestriol, RKABC (high dose) and RKABC (low dose). The model of osteoporosis was established by ovariectomy in rats for 12 weeks, and then was given different kinds of liquid and administered approximately for 12 weeks. General bone mineral density (GBMD), femur bending strength (FBS), serum-BGP and urine-Hyp/Cr were measured. **Results:** GBMD, FBS in 3 treatment groups were significantly higher than those in the model group ($P < 0.05$), but lower than those in the normal control group ($P < 0.05$); GBMD, FBS in 2 RKABC groups were slightly higher than those in nylestriol's group ($P > 0.05$). Compared with model group, levels of serum BGP in 2 RKABC groups increased ($P < 0.05$) and in RKABC (H) treatment group increased almost the same as those in the control group ($P > 0.05$). In comparison with model group, levels of U-Hyp/Cr in 3 treatment groups decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) but 2 RKABC treatment groups still significantly higher than those in the normal control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** It indicated that RKABC could control osteoporosis in female rats induced by ovariectomy and seems to promote bone formation.

Key words composite recipe, ovariectomy, bone mineral density, femur bending strength, serum-BGP, urine-Hyp/Cr, osteoporosis

本实验旨在研究在中医“肾主骨”及“不通则痛”理

论的指导下组配的中药复方制剂补肾活血液,防治模型大鼠骨质疏松的效果及其机制,为临床进一步研究中医药防治骨质疏松症提供动物实验依据。

* 广东省中医药管理局资助项目(No. 97248)

1. 暨南大学医学院第一附属医院(广州 510630); 2. 中国中医研究院西苑医院; 3. 暨南大学医学院

△ 现在中国中医研究院西苑医院读博士后(北京 100091)

资料与方法

1 实验动物及骨质疏松模型的复制 实验动物

选用 12 月龄 SD 雌性大鼠 50 只, 体重(380 ± 20)g, 由中山医科大学实验动物中心提供。骨质疏松模型复制参照文献法^[1,2], 2.8% 戊巴比妥腹腔麻醉, 无菌条件下取腰椎两旁切口进入腹腔背侧, 完整摘除双侧卵巢, 止血缝合。

2 药物和试剂 补肾活血液(主要成分为淫羊藿、枸杞子、熟地黄、怀牛膝、当归等)由暨南大学医学院第一附属医院中药制剂室提供, 每毫升含生药 2g。盐酸氯氨酮注射液为上海第一制药厂产品, 批号 95-0206。尼尔雌醇片由上海第十二制药厂生产, 批号 1-1531-96。骨钙素试剂盒由北京长城免疫技术研究所提供, 尿羟脯氨酸标准品由 Sigma 公司提供。尿肌苷试剂盒为上海荣盛生物试剂厂产品。

3 实验分组 50 只大鼠随机分为 5 组, 每组 10 只: 正常动物组(正常组), 模型加生理盐水组(模型组), 模型加雌激素组(西药组), 模型加中药高剂量组(中药高组), 模型加中药低剂量组(中药低组)。正常组处理: 正常 SD 大鼠, 与模型组同时用灌胃法给服生理盐水, 每鼠每次 5ml, 每天 1 次, 12 周为 1 个疗程。模型各组均在手术 12 周后用灌胃法分别给服相应药物, 每天 1 次, 12 周为 1 个疗程; 中药高组: 补肾活血液, 每鼠每次 5ml(含生药 20g); 中药低组: 补肾活血溶液, 每鼠每次 5ml(含生药 10g, 用蒸馏水倍比稀释); 西药组: 尼尔雌醇片, 根据人鼠剂量换算^[3], 每鼠每次 0.01mg, 每周 1 次; 模型组: 生理盐水, 每鼠每次 5ml。

各组大鼠分笼饲养, 自由摄取标准大鼠饲料(钙 1.01%, 磷 0.78%), 自由饮用蒸馏水。各组大鼠均在 3 个月后处死, 处死前 1 天将大鼠分别置入代谢笼中收集 12h 空腹尿液; 处死即刻剖开腹部, 在后腔静脉处抽取静脉血, 分离血清。血清及尿标本均置于 -20°C 冰箱保存, 集中待测。处死大鼠后摘取右侧股骨, 刮净肌肉备用。

4 观察指标及测定方法

4.1 生化指标测定 分别按药盒说明, 用放免分析法测定血清骨钙素(S-BGP)、用分光光度计法测定尿肌苷(U-Cr)、尿总羟脯氨酸(U-Hyp)。

4.2 全身骨密度(GBMD)的测定 处死前, 大鼠腹腔注射 5% 氯氨酮注射液 10mg/100g, 当大鼠呈现稳定的昏睡状态持续 10min 以上时, 置于 DPX-L 型双能 X 线骨密度仪(Lunar Co. USA)的探头下, 应用 GMBD 软件进行全身扫描, 并且自动打印测定结果。

4.3 股骨抗弯强度(FBS)的测定 参照沈培芝等^[4]方法, 取大鼠右侧股骨, 首先用游标卡尺测定股骨中段的宽度并计算截面面积, 然后将股骨放在万能材

料试验机的支架上(跨距 = 25mm), 以 5mm/min 的速度下压股骨中段, 记录最大的压力载荷, 最后计算抗弯强度(单位截面面积上最大的压力载荷)。

5 统计学处理 两组均数之间比较采用 *t* 检验。

结 果

1 各组大鼠 GBMD、FBS 的测定结果比较 见表 1。12 周后, 治疗组的 GBMD 以及 FBS 明显高于模型组($P < 0.05$), 但仍然低于正常组($P < 0.05$)。中药高、低组的 GBMD 以及 FBS 稍高于西药组, 但无统计学意义。

表 1 各组大鼠 GBMD 与 FBS 测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	GBMD(g/cm ²)	FBS(N/mm ²)
中药高	10	$0.410 \pm 0.015^{* \Delta}$	$19.89 \pm 3.05^{* \Delta}$
中药低	10	$0.388 \pm 0.068^{* \Delta}$	$18.44 \pm 2.56^{* \Delta}$
西药	10	$0.384 \pm 0.017^{* \Delta}$	$18.11 \pm 4.33^{* \Delta}$
模型	10	0.343 ± 0.006	15.15 ± 2.25
正常	10	$0.415 \pm 0.004^{**}$	$21.79 \pm 4.43^{**}$

注: 与模型组比较, $^{*} P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$; 与正常组比较, $^{\Delta} P < 0.05$

2 各组大鼠生化指标测定结果比较 见表 2。中药高、低组的 BGP 明显高于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$), 在高剂量时接近正常组; 中药高、低组及西药组尿 U-Hyp/Cr 明显低于模型组($P < 0.05$), 而中药组尿 Hyp/Cr 仍然高于正常组($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠 S-BGP 与 U-Hyp/Cr 测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	S-BGP(g/L)	U-Hyp/Cr
中药高	10	$2.911 \pm 0.651^{**}$	$0.031 \pm 0.002^{* \Delta}$
中药低	10	$2.442 \pm 0.219^{* \Delta}$	$0.033 \pm 0.003^{* \Delta}$
西药	10	$2.216 \pm 0.213^{\Delta}$	$0.029 \pm 0.004^{**}$
模型	10	2.070 ± 0.365	0.039 ± 0.003
正常	10	$3.025 \pm 0.289^{**}$	$0.028 \pm 0.002^{**}$

注: 与模型组比较, $^{*} P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$; 与正常组比较, $^{\Delta} P < 0.05$

讨 论

寻求防治骨质疏松症的有效药物疗法是医学界面临的重大课题^[5]。骨质疏松症在中医并无此病名, 根据其临床特点, 当属中医“骨痿”、“腰痛”范畴。近年来或单纯应用纯中药制剂或中西药合用治疗本症的临床报道, 说明中医中药防治本症有较好的前景^[6,7]; 还有学者选用一些中药复方制剂, 研究其对实验性骨质疏松症骨代谢的影响, 发现中药对于不同诱发因素所致骨质疏松动物模型均有较好的作用^[3,9]。已经证实以补肾为主的方药可以提高糖皮质激素性骨质疏松模型血清中的 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的水平^[10]; 可以增强地塞米松所致的骨质疏松模型鼠体内肠道 CalBP-D9k 基因的表

达^[11]。

我们近年来根据老年人“多虚多瘀”的生理病理特点及“肾主骨”、“肝肾同源”的中医传统理论,在补肾的同时,强调“和血活血”,应用补肾活血方药治疗绝经后骨质疏松症取得满意的临床效果,结合这一经验,设计本实验。

本研究结果提示:中药组的 GBMD 及 FBS 明显高于模型组($P < 0.05$),但仍然低于正常组($P < 0.05$),说明模型复制成功后进行治疗可以部分恢复已经减少的 GBMD 和已经降低的 FBS。中药组的 GBMD 及 FBS 稍高于西药组,但无统计学意义。

BGP 是一种含维生素 K 依赖的氨基酸 Gla 的非胶原蛋白,血清中的 BGP 是在成骨细胞中合成的,因此,S-BGP 数值的高低直接反映成骨细胞的活性,也直接反映骨形成率或骨转换率;本实验发现,中药组的 BGP 明显高于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$),在高剂量时接近正常组,推测补肾活血能刺激骨形成。尿 Hyp/Cr 主要来自骨基质分解,由于其排出量与骨吸收呈显著正相关,可作为反映骨有机质吸收的生化指标;本结果显示,中药组和西药组的 Hyp/Cr 明显低于模型组($P < 0.05$),但仍然高于正常组($P < 0.05$),推测补肾活血有助于抑制破骨细胞的骨吸收活动,且这种作用与中药剂量相关。因此,我们认为补肾活血溶液能使模型鼠的骨重建活动恢复正平衡状态。

本实验以中药复方补肾活血液对抗切除卵巢诱导的 SD 大鼠骨质疏松模型的骨质改变,证实其对模型鼠骨质疏松有明显的抑制作用,主要体现为刺激衍化成骨细胞,作用于骨形成环节。

参 考 文 献

1. Devlin H, Ferguson MW. Compositional changes in rat femur

following ovariectomy. *Acta Anat Basel* 1989;136(1):38—41.

2. Kalu DN, Hardin RR, Cockrham R. Evaluation of the pathogenesis of skeletal changes in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1984;115:507—512.

3. 施新猷. 医学动物实验方法,第 2 版. 北京:人民卫生出版社,1986:448.

4. 沈培芝,陈东煜,张戈,等. 补肾方防治地塞米松致雄性大鼠骨质疏松及其生化机制探讨. *中国中西医结合杂志* 1998;18(5):290—292.

5. Recker RR. Clinical Review 41: current therapy for osteoporosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1993;76(1):14—16.

6. 张荣华,丘和明. 中医中药与退行性骨质疏松症. *现代老年医学杂志* 1996;(4):121—125.

7. 张荣华,丘和明. 中医防治退行性骨质疏松症用药分析. *中医药学报* 1997;(4):30—31.

8. 吴铁,廖进民,李青南,等. 壮骨肾宝防治肾上腺皮质激素所致大鼠骨质疏松症实验研究. *中国中西医结合杂志* 1996;16(2):102—104.

9. 沈霖,杜靖远,杨家玉,等. 补肾密骨液对实验性骨质疏松症的影响. *中医正骨* 1994;6(4):3—6.

10. 刘和娣,李恩,佟晓阳. 补肾方药对地塞米松诱发的骨质疏松大鼠体内雌激素和 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的影响. *中国中西医结合杂志* 1993;13(9):544—545.

11. 刘和娣,李恩,刘鬼. 补肾中药对骨质疏松大鼠 CaBP-D9k 基因及表达的影响. *中国骨质疏松杂志* 1996;2(3):62—64.

(收稿:1999-02-01 修回:1999-07-12)

冀中医学专修学院面向社会招收自费生

本院(原华中医士学校)是由教育部门和卫生部门审批的,历史较长,规模较大。占地 5 万平方米,标本模型及实验仪器设备和生活设施齐全。有正、副教授 200 余名,在校生 1900 名,学校管理严谨,校风良好;使用全国统编教材,教学质量优良,已为全国 26 省市培养了大批医务人才。今年本校招收中西医结合专业、医疗专业、高级护理专业及口腔专业大专 600 名,中专 400 名,学制 3 年(含医院实习,大专 0.5 年,中专 1 年),每年学费、住宿费、实验费大专 2800 元,中专 2550 元;自考成绩及格者颁发大中专毕业证书,国家承认学历(1998 年及格率 98.2%),经卫生部门考核,合格者颁发技术职称证书和行医证,可申请开业和参加人才市场交流,品学兼优可留校或向用人单位推荐,详见学校招生简介可来人来信索取。初、高中应届、往届毕业生持毕业证明、照片 6 张及体检表来人来信报名均可,交报名费 10 元,预交学费 200 元。按报名顺序录取额满为止,每年 9 月 20 日开学(有接待站),未被录取者退还预交费。校址及联系地址:石家庄市栾城段干冀中医学专修学院招生办。联系人:王天,张云芝,宋晓东;邮编:051430;电话:0311—5481046,5481807;来人由石家庄火车站南侧汽车站院内乘 202 路(东线)医学专修学院下车。