

实验研究

补肾方药对去卵巢雌鼠骨质疏松症防治作用的研究

中国中医研究院骨伤科研究所 (北京 100700)

陈训华 危剑安* 陈燕平 丁继华 周重光 张万强 高云 邢美荣

摘要 目的: 为验证益肾填精方药“肾虚骨痛胶囊”防治骨质疏松症的疗效和探讨其治疗机理。方法: 本文以切除卵巢雌性大鼠复制绝经后骨质疏松症模型, 观察该药对去卵巢大鼠抗失骨作用。实验分为模型组、肾虚骨痛胶囊大、小剂量组、骨疏康阳性对照组和正常对照组。术后 1 周开始给药, 持续 120 天。结果: 肾虚骨痛胶囊大剂量组, 与模型组比较, 可以提高模鼠全身及股骨骨密度、股骨灰重、腰椎骨小梁体积、股骨无机元素 Ca、P、Mg、Zn、Cu、Mn 含量, 血清 E₂ 含量用药后有增高之趋势, 但与模型组比较无统计学差异。结论: 肾虚骨痛胶囊可通过体内多方位调节作用达到预防和抑制骨质疏松症的发生和发展, 具有较好的应用前景。

关键词 肾虚骨痛胶囊 去卵巢大鼠 骨质疏松症

Study on the Prevention and Treatment of Osteoporosis in Ovariectomized Rat with Kidney Tonifying Drugs Institute of Orthopaedics and Traumatology, China Academy of Traditional Chinese Medicine (Beijing 100700)

Chen Xunhua, Wei Jianan, Chen Yanping, et al

Aim To test and verify the therapeutic effect of kidney tonifying and essence replenishing drugs. Shen Xu Gu Tong capsule (SXGTC), on prevention and treatment of osteoporosis and explore its therapeutic mechanism. **Methods** Postmenopausal osteoporosis models of 48 female rats were modelled by ovariectomy and divided into 4 groups: model group, large- and small-dose groups of SXGTC, and Gu Shu Kang positive control group, and other 12 rats in intact control group. The administration of drugs were started one week after operation and continued for 120 days. **Results** Comparing with model group, SXGTC in large dose can increase the bone density of the whole body skeleton and femur, the ash weight of femur, the volume of trabeculae in lumbar vertebra, and the contents of inorganic elements, Ca, P, Mg, Zn, Cu and Mn in femur. The content of serum E₂ is included to increase in SXGTC, but no statistical difference as compared with that in model group. **Conclusion** SXGTC can prevent and inhibit the occurrence and development of osteoporosis through internal regulation in many ways. So there is a better prospect for clinical application.

Key words Shen Xu Gu Tong capsule Ovariectomized rat Osteoporosis

“肾主骨”, 肾的盛衰直接关系着骨的坚实与衰老。《辨证录·痿症门》中指出: “肾空干涸; 何能充足于骨中之髓耶?” 骨骼的强弱与肾精之盛衰密切相关, 临床应用益肾填精、强筋

* 中国中医研究院广安门医院

壮骨方药肾虚骨痛胶囊治疗绝经后骨质疏松症的腰膝酸软, 胸背疼痛具有较好的治疗效果, 且可一定程度提高骨密度⁽¹⁾, 为进一步了解该药的治疗作用, 本文应用切除卵巢雌性大鼠观察该药对骨质疏松的抗失骨作用。

材料与方 法

1. 实验用药: 肾虚骨痛胶囊 (简称胶囊), 中国中医研究院广安门医院制剂室提供, 每粒胶囊相当生药 15g; 骨疏康颗粒冲剂〔(95)卫药准字 Z—08 号〕购自辽宁省东港市药厂。

2. 实验动物、造模方法与分组: 3 月龄 SD 清洁级雌性大鼠, 体重 $230 \pm 10\text{g}$, 购自中国药品生物制品检定实验动物养殖中心。动物麻醉后背部切口切除双侧卵巢止血缝合。造模大鼠随机分为 4 组: 胶囊大、小剂量组, 每日灌服胶囊混悬液 2ml/只, 分别相当于生药 12g/只和 6g/只; 阳性对照药组每日灌服骨疏康混悬液 2ml/只 (最大可抽吸灌服浓度); 模型组与正常对照组仅给蒸馏水。各组均于手术后 1 周开始给药, 共 120 天, 全部动物实验室常规喂养。

3. 观察指标与方法: (1) 体重: 每周各组均称体重一次, 比较各组间的体重增长率。(2) 全身骨密度和股骨骨密度: 将麻醉动物置美国 Lunar 公司 DPX 型双能 X 线骨密度仪扫描定位板上, 测定全身骨密度; 实验结束后完整剥离股骨, 剔净软组织, 放于 2cm 厚的米袋上 (以模拟软组织环境), 探头下测定其骨密度。扫描条件: 电压 76KV, 电流 $150\mu\text{A}$, 扫描模式中等。结果判定以面密度 (g/cm^2) 为依据, 重复误差 1%, 精确度 $< 2\%$, 计算机控制。(3) 股骨灰分重量: 一侧股骨置 800 C 恒温电阻炉中持续焚烧 6 小时, 取出后立即用电子天平称其灰重。(4) 腰椎骨骺病理学分析: 动物处死后剥离腰椎, 10% 福尔马林液中固定, 切取第二腰椎于 5% 硝酸中脱钙, 石蜡包埋, 制成 $5\mu\text{m}$ 厚的横切切片, HE 染色, 显微镜下观察骨小梁变化, 骨小梁计数方法参见《骨关节病理学》⁽²⁾。

(5) 股骨无机元素含量: 将一侧股骨用无离子水清洗后 80 C 烤箱内烘干 4 小时, 天平精确称量后将标本置聚四氟乙烯溶样弹中, 加优级纯硝酸 2ml, 溶样弹放于 150 C 烤箱中 4 小时, 去离子水定容后测定。采用美国 Jarrell Ash ICP 9000 型等离子光电计, 仪器条件: 发射功率 1.1KW, 反射功率 $< 5\text{W}$, 观测高度 14mm, 冷却气流量 18L/min。(6) 血清雌二醇 (E_2)、骨钙素 (BGP) 测定: 动物麻醉下打开腹腔, 腹主动脉取血, 常规分离血清, 用于测定。(该指标由积水潭医院骨伤科研究所生化室完成)。

4. 统计学分析: 参数均以 “ $\bar{X} \pm S$ ” 表示, 各组间差异用 t 测验方法。

结 果

1. 体重: 表 1 显示, 各组动物实验前后比较, 体重均有显著增加 ($P < 0.01$); 模型组、各给药组与正常对照比较均具有显著差异 ($P < 0.01$); 而各给药组与模型组间比较无差异。

表 1 实验动物体重增长情况

组别	实验前		实验后		体重增长率 (%)
	动物数	重 (g)	动物数	体重 (g)	
正常对照	12	233.6 ± 15.9	10	296.1 ± 18.7	21.1
模型组	12	234.4 ± 18.5	12	357.2 ± 34.2*	34.3
胶囊大剂量	12	236.0 ± 12.5	10	335.5 ± 25.2*	30.0
胶囊小剂量	12	229.4 ± 11.3	11	345.3 ± 21.2*	33.0
骨疏康对照	12	230.3 ± 14.5	10	359.7 ± 38.6*	34.4

* 与正常对照组比较 $P < 0.01$

2. 全身骨密度、股骨骨密度和股骨灰重: 表 2 显示, 卵巢切除模型组大鼠全身、股骨骨密度及股骨灰量均明显低于正常对照组, 具有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 胶囊大剂量组可明显提高去卵巢大鼠的全身、股骨骨密度以及股骨灰重, 同模型组比较均具有显著差异 ($P < 0.05$); 阳性对照药骨疏康组与模型组比较亦有明显增加股骨灰重的作用 ($P < 0.05$)。

表 2 全身股骨骨密度及股骨灰重

组别	动物数 (n)	全身骨密度 (g/cm ²)	股骨骨密度 (g/cm ²)	股骨灰重 (g)
正常对照	10	0.3641±0.009	0.2704±0.008* *	0.4075±0.011* *
模型组	10	0.3560±0.007	0.2367±0.012	0.3500±0.019
胶囊大剂量	10	0.3654±0.009*	0.2484±0.010*	0.3779±0.028*
胶囊小剂量	10	0.3520±0.007	0.2368±0.012	0.3632±0.032
骨疏康对照	10	0.3537±0.005	0.2436±0.009	0.3711±0.022*

模型组比较 * P < 0.05 * * P < 0.01

3. 腰椎骨小梁体积变化比较: 如表 3 示, 腰椎骨小梁体积模型组较正常对照组显著降低, 而胶囊大剂量组和骨疏康组均具有对抗骨小梁体积改变的作用, 两组骨小梁体积显著提高, 与模型组比较 P < 0.05 和 0.01, 胶囊小剂量组仅有增高之趋势而无明显差异。

镜下所见, 模型组骨小梁明显减少, 变细, 排列不整齐, 与正常对照组比较骨小梁体积变小; 胶囊大剂量组与模型组比较骨小梁数目增多, 增粗, 排列略整, 骨小梁体积明显增大, 但与正常对照组比较骨小梁体积也明显减少; 骨疏康组骨小梁体积则与正常对照无甚差异。

表 3 腰椎骨小梁体积 (10⁻⁴mm³) 变化比较

组别	动物数 (n)	骨小梁体积
正常对照组	10	18.58±3.02*
模型组	12	8.74±1.97
胶囊大剂量组	11	11.92±1.69*
胶囊小剂量组	10	9.96±2.31
骨疏康对照组	12	18.43±2.84*

* 与模型组比较 P < 0.05

4. 股骨无机元素含量比较: 表 4 示, 模型组去卵巢大鼠股骨中 Ca、P、Mg、Zn、Cu、Mn 诸元素含量均较正常对照组非常显著性降低 (P < 0.01), 各给药组 6 种元素含量均较模型组显著增高 (P < 0.01)。

表 4 股骨无机元素含量比较

组别	动物数	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Mg (mg/g)	Zn (μg/g)	Cu (μg/g)	Mn (μg/g)
正常对照组	10	205.62±3.62*	116.78±3.28*	4.07±0.09*	274.9±17.31*	12.73±0.82*	2.48±0.19*
模型组	10	164.63±18.33	81.79±15.83	3.20±0.34	188.80±20.46	1.22±1.81	0.26±0.34
胶囊大剂量组	10	219.79±11.43*	122.64±16.00*	4.24±0.19*	262.50±20.80*	29.93±1.71*	5.06±0.32*
胶囊小剂量组	10	181.00±6.46*	105.01±4.23*	3.63±0.18*	225.70±12.49*	10.18±2.73*	1.69±0.35*
骨疏康对照组	10	195.49±8.49*	102.51±5.74*	3.73±0.17*	222.50±16.01*	14.47±1.97*	2.57±0.16*

* 与模型组比较 P < 0.01

5. 血清雌二醇 (E₂)、骨钙素 (BGP) 测定: 如表 5 示, 模型组血清 E₂ 含量显著低于正常对照组 (P < 0.05), 胶囊大剂量组和骨疏康组统计结果未显出明显差异, 但两组血清 E₂ 含量均具有明显增高之趋势; BGP 各组间均未见明显差异。

表 5 血清 E₂、BGP 测定

组别	E ₂ (pg/ml)	BGP (ng/ml)
正常对照	74.11±31.0*	5.32±1.68
模型组	49.86±8.30	5.05±5.34
胶囊大剂量	64.69±31.30	5.52±1.43
胶囊小剂量	52.62±6.45	9.32±2.47
骨疏康对照	57.92±18.34	6.31±1.43

* 与模型组比较 P < 0.05

讨 论

本研究应用切除卵巢大鼠复制人类绝经后骨质疏松症模型。由于去卵巢大鼠体内雌激素水平降低,骨代谢呈负平衡状态,骨吸收相对增强,骨量逐渐丢失,形成骨质疏松^[3]。

实验中所有去卵巢大鼠体重增长较快,与正常对照组比较具有非常显著差异,用药组对体重的快速增长无抑制作用。有学者认为,去卵巢动物的体重快速增长现象为机体抵抗去卵巢对骨骼影响的一种自我保护性反应,可以部分地抑制去卵巢大鼠的骨丢失,但不能完全阻止其发展^[4]。

胶囊大剂量组和骨疏康组血清 E₂ 含量表现出明显上升趋势,说明该药对骨质疏松的防治与增加血清 E₂ 含量有关。骨钙素(BGP)是由成骨细胞合成,分泌的一种钙结合蛋白,一般认为高转换型骨丢失状态下血清 BGP 水平升高,然而我们的实验发现,去卵巢大鼠血清 BGP 水平在去卵巢 120 天时无明显改变,但其骨密度显著降低。去卵巢 120 天时所测 BGP 无明显改变,是否此时骨转换状态恢复正常或骨细胞合成分泌 BGP 的功能恢复正常水平,有待进一步探讨。

本实验结果表明,去卵巢大鼠的全身、股骨骨密度、股骨灰重、股骨无机元素含量以及骨小梁体积等项指标经大剂量肾虚骨痛胶囊的防治得以显著提高,提示大剂量该药不仅具有抑制骨质丢失作用还能促进丢失的骨量得到一定程度的恢复。

骨密度降低是骨质疏松时骨变化的特征,国内外学者一致认为双能 X 线骨密度仪是测量大鼠骨量的精确、有效的方法,是评估防治药物作用的可靠指标之一^[5,6]。我们的实验应用该仪器测定,其结果是有意义的。国外学者的研究结果认为,骨和毛发中 Zn、Cu、Mn 元素

含量正常受试者与骨质疏松患者间具有显著差异^[7]。本实验结果中,除 Ca、P、Mg 三者间有显著差异外,Zn、Cu、Mn 亦有差异,但在给药组中 6 种元素均较模型组有显著提高,不仅提高微量元素与骨质疏松有密切关系,而且表明实验性骨质疏松症在其病理发展和逆转过程中,这些无机元素的代谢是非常活跃的。骨无机元素含量增高,无疑能够增加骨骼强度,维持骨骼的健康状态。股骨灰重的显著提高,更加支持上述结果。

中医药治疗骨质疏松症的作用机制与西药不同,它是通过对机体全身性的调节,作用于多个环节,纠正机体激素失衡、负钙平衡和调整体内微量元素的平衡等而达到治疗骨质疏松症的效果。肾虚骨痛胶囊,具有益肾填精、生髓壮骨、平衡阴阳、活血止痛之功效,通过体内多方位调节达到预防和抑制骨质疏松症的发生和发展,具有较好的应用前景。

参考文献

1. 危剑安,陈训华,李承军,等. 肾虚骨痛胶囊对绝经期妇女骨密度的影响. 中医杂志 1995; 36(9): 538.
2. 刘子君主编. 骨关节病理学. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 467.
3. Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, et al. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. Calcif Tissue Int 1989; 45: 360.
4. Wronski TJ. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. Calcif Tissuc Int 1987; 40: 155.
5. 王洪复,翁世芳,黄克,大鼠骨密度测定方法及其在骨质疏松模型建立中的应用. 中国骨质疏松杂志 1995; 1(1): 8.
6. Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, et al. The diagnosis of osteoporosis. J Bone Miner Res 1994; 9: 1137.
7. Okano T. Effects of essential trace elements on bone turnover - in relation to the osteoporosis. Nippon Rinsho 1996; 54(1): 148.

本研究为国家中医药管理局科研基金会资助课题(No. 922187)

(收稿: 1997-12-24)

书 讯

由张德桂主任医师主编,黄殿栋教授主审的《骨科外固定学》一书已再版,并增编了骨科外固定研究与进展,欲订购者请与哈尔滨市南岗区凤麓街 9 号北方股骨头坏死研究所张德桂联系。邮编 150006, 邮购书价每本 56 元(含邮费)。