

• 基础研究 •

补肾益骨方对去势大鼠血生化、骨量和骨力学性能的影响

杨林¹, 姚新苗², 黄竞¹, 孙庆荣¹, 吴洪海¹

(1. 扬州大学医学院, 江苏 扬州 225001; 2. 浙江中医学院附属医院)

【摘要】 目的: 观察补肾益骨方对去势大鼠血生化、骨量及其力学性能的影响; 探讨补肾益气方能提高去势大鼠骨密度改善骨生物力学性能的机制。方法: 取 12 周龄 Wistar 雌性大鼠 40 只, 随机分为模型组 (A)、治疗组 (B)、阳性对照组 (C)、正常对照组 (D) 4 组, 每组 10 只。D 组行假手术 (单纯剖腹后关闭), 其余 3 组行完整双侧卵巢摘除术, 术后常规饲养 12 周。A、D 组以蒸馏水 10 ml/kg 灌胃, B 组以 10 ml/kg 补肾益骨方提取液灌胃, C 组以 10 ml/kg α -D₃ 胶丸水溶液灌胃。用药 12 周后, 取血清用电极法测定血清中 Ca、P 含量; 用放射法测定血清中骨钙素 (BGP)、降钙素 (CT) 水平; 以双能 X 线密度测定仪测定骨密度; 通过三点弯曲试验, 记录载荷-变形曲线, 测定骨生物力学指标。结果: 治疗组血清中 BGP、CT 水平及骨矿含量、骨密度明显高于模型组, 并改善了去势大鼠的骨生物力学性能。结论: 补肾益骨方能提高去势大鼠骨密度, 改善骨生物力学性能, 推测激素 BGP、CT 水平变化是其重要的治疗机制之一。

【关键词】 大鼠; 卵巢切除术; 补肾益骨方; 骨密度; 骨生物力学

Effects of *Bushen Yigu* recipe (补肾益骨方) on biochemistry, bone quantity and biodynamics in ovariectomized rats

YANG Lin*, YAO Xin-miao, HUANG Jing, SUN Qing-rong, WU Hong-hai* The Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu, China

ABSTRACT Objective To observe the effects of *Bushen Yigu* recipe on biochemistry, bone quantity and biodynamics in ovariectomized (OVX) rats and to explore its mechanism. **Methods** Forty female Wistar rats were randomly divided into 4 groups: control group (A), treated group (B), positive control group (C) and normal control group (D). The ovaries were excised in the group A, B, C, and the celotomy was done in the group D (no exercise ovaries). Twelve weeks after the operation, group A, D were administered distilled water 10 ml per kilogram every day, group B were administered extract of *Bushen Yigu* recipe 10 ml per kilogram every day, group C were administered water solution of α -D₃ soft gelatin capsule 10 ml per kilogram every day. The rats were killed at 12 weeks after treatment, serum Ca, P level by electrode method, bone gla protein (BGP) and calcitonin (CT) by radioimmunity method, bone mineral content (BMC) by dual energy X-ray absorptimetry (DEXA), were respectively determined. Bone biomechanical properties test were performed using a material testing machine. **Results** Serum Ca, P, BGP, CT and BMC in the group B were obviously higher than group A. The biomechanical parameters in the group B were also improved. **Conclusion** *Bushen Yigu* recipe can increase BMC and obviously improve the bone biomechanical properties for OVX rats. The change of serum hormone may be the main mechanism in treatment of osteoporosis.

Key words Rats; Ovariectomy; *Bushen Yigu* recipe; Bonem ineral content; Bone biomechanics

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(4): 224-226 www.zggssz.com

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是常见的代谢性疾病。绝经后的妇女因卵巢功能减退, 雌激素水平下降, OP 患病风险增加。近年来, 我们根据中医“肾主骨、生髓”的理论, 采用自拟补肾益骨方治疗绝经后 OP 症所引起的腰膝酸软、胸背疼痛, 取得了较好的效果。为进一步了解该药的功效, 我们应用切除卵巢大鼠模型观察该药对骨质疏松的治疗作用。

1 材料与方

1.1 实验药物 ①补肾益骨方提取液: 由浙江省中医院中药

房提供, 主要由山药、熟地、枸杞、骨碎补、补骨脂、续断、仙灵脾、丹参等组成, 含生药 1.0 g/ml。②配制阿法骨化醇 (α -D₃) 胶丸 [以色列梯瓦制药工业有限公司生产, 批号 (95) 卫药准字 J-10 号] 水溶液浓度 0.005 mg/ml。③氯氨酮: 上海第一生化药业有限公司生产, 批号沪卫药准字 (1995) 第 001064 号。

1.2 实验动物 取 12 周龄的雌性 Wistar 大鼠 40 只, 体重约 200 g (由浙江中医学院实验动物中心提供), 用简单随机法分为 A (模型组)、B (治疗组)、C (阳性对照组)、D (正常对照组) 4 组, 分 8 笼以常规饲料喂养, 自由饮水。饲养室保持良好通风, 控制室温在 (21 ± 1) °C, 湿度 63%, 噪音 < 55 分贝, 光照

基金项目: 浙江省中医药管理局科研基金 (No 2002C010)

通讯作者: 杨林 Tel 0514-7978864 E-mail yzlianglin@163.com

与黑暗时间为每 12 h 交替。

1.3 造模方法 腹腔注射氯氨酮 (5 μg/100 g), 麻醉条件下, 打开 A、B、C 组大鼠腹腔去除双侧卵巢, 逐层缝合; D 组大鼠仅予以单纯剖腹后立即关闭。术后 3 d 肌注青霉素 4 × 10⁴ U, 预防感染。

1.4 饲养与给药 造模后将大鼠分 8 笼予以常规饲料喂养 12 周, 第 13 周起开始每日给药, A、D 组以蒸馏水 10 ml/kg 灌胃; B 组以 10 ml/kg 的补肾益骨方提取液灌胃; C 组以 α-D₃ 胶丸水溶液 10 ml/kg 灌胃, 整个灌胃过程持续 12 周。

1.5 观察指标 用电极法, 测定各组大鼠血清中 Ca_p 含量的变化; 采用放射免疫分析法, 测定骨钙素 (BGP)、降钙素 (CT) 水平; 采用美国 HOLOG IC 公司 QDR-2000 型双能 X 线吸收仪测定大鼠右股骨上干骺端骨密度; 采用三点弯曲实验, 将大鼠左股骨置于万能材料实验机上, 最大载荷为 20 kg 两端跨距 L 为 20 mm, 加载速度为 5 mm/min, 检测过程由计算机自动描绘股骨的载荷-变形曲线 (L 为两支点间股骨长度)。

1.6 数据处理 采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计。各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 骨量变化 B、C、D 组的骨矿含量 (BMC)、骨密度 (BMD) 明显高于 A 组 (P < 0.01), B 组与 C 组的疗效相近, 二者差异无显著性统计学意义 (P > 0.05), 见表 1。

表 1 补肾益骨方提取液对去势大鼠右股骨上端骨密度变化的影响 ($\bar{x} \pm s$ n = 10)

Tab 1 The effect of extract of Bushen Yigu recipe on BMC of right femoral upper in OVX rats ($\bar{x} \pm s$ n = 10)

组别	BMC (g)	BMD (g/cm ²)
A	0.0023 ± 0.0019**	0.0066 ± 0.0058**
B	0.0216 ± 0.0048**	0.0513 ± 0.0123**
C	0.0196 ± 0.0077**	0.0533 ± 0.0209**
D	0.0181 ± 0.0052**	0.0494 ± 0.0150**

注: 与 A 组比较, **P < 0.01; 与 B 组比较, **P < 0.01

Note: Compare with group A, **P < 0.01; compare with group B, **P < 0.01

表 2 补肾益骨方提取液对去势大鼠左股骨生物力学变化的影响 ($\bar{x} \pm s$ n = 10)

Tab 2 The effect of extract of Bushen Yigu recipe on biomechanics of left femoral in OVX rats ($\bar{x} \pm s$ n = 10)

组别	最大应力 (MPa)	最大应变 (%)	弹性模量 (Gpa)	韧性系数 (mm/kgf)
A	10.697 ± 2.500**	1.296 ± 0.342**	0.873 ± 0.129*	0.0335 ± 0.0071*
B	15.181 ± 1.311**	1.635 ± 0.107**	0.947 ± 0.061*	0.0399 ± 0.0041*
C	16.795 ± 1.677**	1.773 ± 0.158**	0.948 ± 0.054*	0.0356 ± 0.0052*
D	14.348 ± 1.374**	1.590 ± 0.166**	0.911 ± 0.122	0.038 ± 0.0056

注: 与 A 组比较, *P < 0.05 **P < 0.01; 与 B 组比较, *P < 0.05 **P < 0.01

Note: Compare with group A, *P < 0.05 **P < 0.01; Compare with group B, *P < 0.05, **P < 0.01

表 3 补肾益骨方提取液对去势大鼠血清生化水平的影响 ($\bar{x} \pm s$ n = 10)

Tab 3 The effect of extract of Bushen Yigu recipe on serum biochemistry in OVX rats ($\bar{x} \pm s$ n = 10)

组别	BGP (ng/ml)	CT (pg/ml)	P (mmol/L)	Ca (mmol/L)
A	0.860 ± 0.187*	120.345 ± 34.782*	1.413 ± 0.202	2.538 ± 0.137
B	1.240 ± 0.389*	175.637 ± 56.449*	1.543 ± 0.147	2.494 ± 0.046
C	1.310 ± 0.286*	137.574 ± 48.676	1.575 ± 0.251	2.566 ± 0.095
D	1.600 ± 0.379**	160.769 ± 33.515	1.533 ± 0.216	2.457 ± 0.035

注: 与 A 组比较, *P < 0.05 **P < 0.01; 与 B 组比较, *P < 0.05

Note: Compare with group A, *P < 0.05 **P < 0.01; Compare with group B, *P < 0.05

2.2 骨力学性能变化 B、C、D 组大鼠骨的最大应力、最大应变明显优于 A 组 (P < 0.01), B、C 的弹性模量与 A 组差异有显著性统计学意义 (P < 0.05), B 组的韧性系数高于 A、C 组, 差异有显著性统计学意义 (P < 0.05), 见表 2。

2.3 血清生化水平变化 B 组大鼠血清 BGP、CT 含量明显高于 A 组 (P < 0.05), B 组大鼠血清 BGP 水平与 C、D 组相近 (P > 0.05)。各组血 Ca_p 差异无显著性统计学意义 (P > 0.05), 见表 3。

3 讨论

骨密度反映了骨的数量, 而骨生物力学则反映了骨的性能, 世界卫生组织 (WHO) 对 OP 的定义为: 骨密度比同性别年轻人的平均值低至少 2.5 个标准差时, 则诊断为 OP。Ebbesen 等^[1] 在研究中曾指出, 对于完整的椎体和股骨来说, BMD 对整体骨强度的影响仅占 40% ~ 50%。骨力学性能是骨量、骨结构连续性、骨皮质厚度及骨的材料特性的综合反映^[2], 是反映骨质量的一个重要指标^[3-4], 最大应力是指在单位面积上所能承受的最大力; 弹性模量是在负荷形变线上弹性区内任何一点上的应力/应变比例, 弹性模量越高, 所需产生一定形变的应力就越大, 二者是衡量材料刚度、强度的重要指标。实验结果显示 A 组大鼠股骨干骺端处 BMC 和 BMD 显著低于 D 组 (P < 0.01), 力学性能也有所下降, 说明切除卵巢后的大鼠骨矿含量明显降低, 使骨折的危险性也明显增加。经补肾益骨方治疗后大鼠股骨干骺端的 BMC 和 BMD 显著提高, 骨最大应力、弹性模量也明显高于 A 组, 差异有显著性 (P < 0.05), 提示补肾益骨方能促进去势大鼠骨结构的再建, 改善骨的内部构造, 从而增强了骨的单位面积上受力能力, 提高了 OP 骨组织的机械性能。最大应变是骨断面在外力作用下垂直于骨长轴方向上的位移, 说明材料塑形能力; 韧性系数是指在外力作用下, 骨的位移除以载荷所得系数, 载荷不变时, 韧性系数越大则骨的韧性越好, 本实验 B 组的骨最大应变高于 A 组 (P < 0.01), 结果和 C、D 组相近, 韧性系数高于 A、C 组 (P < 0.05), 表明补肾益骨方提高 OP 骨机械性能, 同时改善了 OP 骨组织的塑形能力。

在骨代谢过程中, BGP是成骨细胞分泌的一种肽类物质, 可促进骨钙盐沉积, 增加骨细胞的矿化速度^[5], 研究认为 BGP基因是成骨细胞分化的标志基因^[6], 其含量变化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。CT是甲状腺 C细胞合成和分泌的一种激素, 主要是通过抑制破骨细胞的骨吸引而产生治疗作用^[7-8], 实验结果发现, B组大鼠血清 BGP、CT含量明显高于 A组 ($P < 0.05$), 其中 BGP水平与 C组相近, 表明补肾益骨方具有明显的刺激骨形成、抑制骨吸引的作用, 其治疗效应和 α -D₃ 相近, 这也和骨密度检测结果相一致。同时 A组大鼠血清 Ca水平较高, 这与去势大鼠骨改建呈高转换状态相符, C组血清 Ca水平较高可能与其药理作用相关, 但各组的 Ca/P含量差异无显著性统计学意义 ($P > 0.05$)。

综上所述, 补肾益骨方能提高去势大鼠骨密度、改善骨生物力学性能, 推测可能是通过改变血清激素 BGP、CT水平来实现的。但这还需要通过成骨细胞体外培养实验等来作进一步探讨, 为开发具有知识产权的中药新药提供细胞学依据, 这不仅具有重要的经济价值, 更具有重大的社会意义。

参考文献

- 1 Ebbesen EN, Thomsen JS, Mosekilde L. Nondestructive determination of iliac crest cancellous bone strength by pQCT. *Bone* 1997, 21(6): 535-540
- 2 曹新生, 张乐宁, 吴兴裕, 等. 间断性头高位 45°对抗措施对模拟失重大鼠股骨生物力学特性的影响. 第四军医大学学报, 2000, 21(6): 655-658
- 3 Watts NB. Bone quality: getting closer to a definition. *J Bone Miner Res* 2002, 17(7): 1148-1150
- 4 Day JS, Ding M, Bednarsz P, et al. Bisphosphonate treatment affects trabecular bone apparent modulus through microarchitecture rather than matrix properties. *J Orthop Res* 2004, 22(6): 465-471.
- 5 Swaninathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta* 2001, 313(1-2): 95-105.
- 6 Egan JJ, Maden C, Kala S, et al. A randomized double-blind study comparing the effects of beclomethasone and fluticasone on bone density over two years. *Eur Respir J* 1999, 13(6): 1267-1275
- 7 Stepan JJ, Zikan V. Calcitonin load test to assess the efficacy of salmon calcitonin. *Clin Chim Acta* 2003, 336(1-2): 49-55
- 8 Silverman SL, Azria M. The analgesic role of calcitonin following osteoporotic fracture. *Osteoporos Int* 2002, 13(1): 858-867

(收稿日期: 2006-06-26 本文编辑: 李为农)

颈痛颗粒有奖征文活动通知

颈痛颗粒是治疗神经根型颈椎病的新药。颈痛颗粒通过活血化瘀、行气止痛功能达到消除神经根周围组织水肿和无菌性炎症, 缓解对神经根的压迫作用; 对神经根型颈椎病引起的颈、肩及上肢疼痛起到了较好的治疗作用。为了进一步总结和交换颈痛颗粒的临床用药经验, 山东福瑞达医药集团公司与《中国骨伤》杂志社联合举办颈痛颗粒的有奖征文活动。现将有奖征文形式通知如下。

1 征文内容: ①颈椎病的发病机制; ②颈痛颗粒治疗神经根型颈椎病起效时间的评价; ③颈痛颗粒治疗神经根型颈椎病的临床疗效及评价; ④颈痛颗粒治疗神经根型颈椎病的安全性研究; ⑤颈痛颗粒治疗神经根型颈椎病的远期疗效; ⑥颈痛颗粒治疗其他型颈椎病的临床疗效及评价; ⑦颈痛颗粒治疗神经根型颈椎病和其他药物的疗效比较及评价; ⑧颈痛颗粒治疗颈椎病的经验交流; ⑨颈痛颗粒在临床应用中的其他有关问题。

2 征文要求: ①征文必须是未公开发表的原创性研究论文、经验交流和综述等; ②观察病例数 100 例以上, 观察期至少 3 个月以上; ③征文格式按《中国骨伤》稿约; ④请注明作者姓名、单位、职称、地址、邮编、联系电话、E-mail 地址。截稿日期: 2007 年 9 月 31 日

3 评奖方法: 所有征文将由《中国骨伤》杂志社组织有关专家对论文进行评审。此次征文活动设一等奖 1 名, 奖品为价值 1500 元的礼品; 二等奖 3 名, 奖品为价值 1000 元的礼品; 三等奖 6 名, 奖品为价值 500 元的礼品。奖励仅限第一作者。优秀论文将推荐发表于相关期刊上: 《中国骨伤》《中国中西医结合杂志》《中国骨与关节损伤杂志》《中国运动医学杂志》《中国康复理论与实践杂志》《中国医药》。

来稿请寄: 北京市东直门内南小街甲 16 号《中国骨伤》杂志社收, 邮编: 100700 并在信封左下角注明“有奖征文”字样。