

• 基础研究 •

中药复方干预 3 周模拟失重大鼠骨丢失的初步研究

周鹏*, 胡素敏, 佟海英, 傅骞, 杨佳, 高学敏, 张建军
(北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

【摘要】 目的: 研究中药复方对 3 周模拟失重大鼠骨骼改变的干预作用, 初步观察模拟失重情况下, 复方对钙剂(牡蛎醋酸水解物)的协同作用。方法: Wistar 大鼠, 雄性, 30 只, 随机分为 3 组, 空白组、模型组、中药组, 每组 10 只。尾吊模拟失重 3 周, 中药复方(含熟地黄、怀牛膝、黄芪、当归、牡蛎醋酸水解物等)水煎剂灌胃。观察中药对模拟失重大鼠血清钙与磷水平、后身骨密度、骨矿盐含量、力学强度的影响。结果: 模拟失重 3 周后, 与空白组比较, 模型组血清钙磷均显著升高($P < 0.01$), 后身骨密度、骨力学强度均显著降低($P < 0.01$); 中药组血钙磷升高程度有减小趋势, 骨密度显著提高($P < 0.01$ 或 0.05), 骨力学强度有较大改善趋势。结论: 3 周尾吊模拟失重可造成大鼠后身骨量显著丢失和强度下降, 中药可较好地改善上述情况。单纯补充钙剂不足以对抗模拟失重所致骨丢失, 复方中熟地黄、怀牛膝、黄芪、当归等可能对钙剂牡蛎起到了协同作用。

【关键词】 失重模拟; 钙; 磷; 骨密度; 中药疗法

Effect of Chinese herb medicine compound on bone loss in rats under 3 weeks simulated weightlessness: preliminary study ZHOU Peng, HU Su-min, TONG Hai-ying, FU Qian, YANG Jia, GAO Xue-min, ZHANG Jian-jun. School of Preclinical Medicine, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Chinese herb medicine compound on bone loss in rats under 3 weeks simulated weightlessness, and to observe the synergistic action of other ingredients in the compound on calcium. **Methods:**

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30500663), 国家基础科学人才培养基金(编号: 20070110)

通讯作者: 胡素敏 Tel: 010-64287006 E-mail: cinndyhu@yahoo.com.cn

*现地址: 天津中医药大学中医学院, 天津 300193

形小于 20°, 椎体压缩小于 50%, 脊柱稳定或相对稳定的单节段新鲜胸腰椎骨折是该手术的适应证^[5]。因此, 大部分患者为胸腰椎压缩性骨折, Denis B、C 及 D 型骨折, 由屈曲暴力引起, 由于中柱完整, 脊柱稳定及相对稳定。2 例爆裂性骨折, 均为 Denis B 型。爆裂性骨折由于存在中柱骨折, 有骨块突入椎管内, 椎体骨皮质以及终板骨折, 骨水泥漏进椎管的风险性增加。对于爆裂性骨折单纯用后凸成形术治疗存在一定的风险, 采用该方法应慎重, 手术时机应控制在伤后 4 周内, 以伤后 1 周内手术最佳, 术后早期应避免负重及行走。

3.3 手术要点及注意事项 除高质量的透视影像设备要求外, 对手术者的操作技术亦有着较高要求, 术者应熟练掌握经皮穿刺定位技术, 熟悉填充材料的性状和使用方法, 手术穿刺置入导针的进针点、方向和深度要准确, 一般在右侧椎弓根影“2 点钟”方位进针, 进针的角度、方向及途径应根据正侧位透视影像及时调整。侧位针尖达椎体前缘, 正位应略超过棘突线。导针穿入椎体不宜过深, 一般到离椎体前缘 3/5 处即可。另外, 由于骨扩张器的扩张过程是一种强行扩张, 扩张后的直径是固定的, 因此应保证骨扩张器在椎体内处于合适

的位置, 避免造成终板骨折引起骨水泥渗漏^[6]。同时, 骨扩张器扩张椎体时应边观察边扩张, 反复透视, 密切观察患者下肢运动感觉情况, 避免手术损伤脊髓神经。

参考文献

- 1 史金辉, 杨惠林, 陈亮. 椎体后凸成形术的现状与发展. 国际骨科学杂志, 2006, 27(2): 91-93.
- 2 周云, 章洪喜, 唐天骊. 椎体成形术治疗胸腰椎骨折的研究进展. 中国骨伤, 2006, 19(2): 760-762.
- 3 Denis F. The three column spine and its significance in the classification of acute thoracolumbar spinal injuries. Spine, 1983, 8: 817-831.
- 4 Lieberman IH, Dudeney S, Reinhardt MK, et al. Initial outcome and efficacy of "kyphoplasty" in the treatment of painful osteoporotic vertebral compression fractures. Spine, 2001, 26: 1631-1638.
- 5 黄洪斌, 范顺武, 鲍丰, 等. 椎体成形术结合体位复位治疗创伤性胸腰椎骨折. 中华骨科杂志, 2008, 28(1): 20-24.
- 6 郑召民, 邝冠明, 李佛保, 等. Sky 骨扩张器系统在经皮椎体后凸成形术中的临床应用. 中国脊柱脊髓杂志, 2005, 15(3): 166-169.

(收稿日期: 2008-05-26 本文编辑: 王玉蔓)

Thirty male Wistar rats were divided into 3 groups; control group, tail-suspend group, tail-suspend and medicine group which took Chinese herb medicine compound (contains Radix Rehmanniae Praeparata, Radix Achyranthis Bidentatae, Radix Astragali, Radix Angelicae Sinensis, Concha Ostreae prepared by acetic acid) by gastric administration. After 3 weeks simulated weightlessness, serum calcium (Ca), phosphorus (P), bone mineral density (BMD) and content (BMC), bone mechanical properties (MEC) were observed. **Results:** At the end of the experiment, serum Ca and P increased significantly ($P < 0.01$), BMD and BMC of posterior body decreased significantly ($P < 0.01$) in tail suspend rats, compared with in the control group. In rats of tail suspended and medicine group, the increase degree of serum Ca and P were smaller, BMD and BMC of posterior body increased significantly ($P < 0.01$ or 0.05), and MEC also tend to increase. **Conclusion:** Bone mass of posterior body lose significantly, with mechanical property significantly decrease in rats after 3 weeks simulated weightlessness. Chinese herb medicine compound is effective to prevent the change of bone. Simple calcium supplement can not prevent simulated weightlessness induced bone loss, therefore other ingredients in the compound may perform synergistic action to calcium (Concha Ostreae prepared by acetic acid).

Key words Weightlessness simulation; Calcium; Phosphorus; Bone density; Treatment with Chinese herbs

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(9): 658-661 www.zggszz.com

失重造成的骨质进行性流失等是飞行中的重要危险因素,目前其机制尚不清楚,亦无较理想的干预措施^[1-2]。本课题通过深入挖掘中医药理论,全面进行辨证分析,以培肾补脾、养骨荣髓、益气和血为大法,探索了较全面针对失重生理紊乱的有效中药复方。由于复方中含有固涩肾精的牡蛎,其主要成分为碳酸钙,文献表明补充钙剂对失重骨质丢失有一定缓解作用^[3],为考察复方其他成分对钙剂牡蛎的协同作用,本次实验以等量牡蛎钙溶液为对照,并基本控制各动物摄食量相等,进一步观察中剂量复方在 3 周模拟失重中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物及饲料 Wistar 大鼠,雄性,30 只,体重(200±10)g,北京维通利华实验动物公司提供,动物合格证号:SCXK(京)200-0003。饲料为大、小鼠生长维持颗粒饲料,北京科澳协力饲料有限公司,许可证号:京饲(配)字第 238 号、京动许字(2000)第 015 号。

1.1.2 受试药物 由熟地黄、怀牛膝、黄芪、当归、牡蛎等按照一定比例组成,全部药材购自安国药材市场,经北京中医药大学临床中药室鉴定。其中牡蛎以醋酸水解,全方按严格中药提取工艺制成等于每毫升含 0.704 g 生药的供试药液(合临床成人用量的 8 倍),含牡蛎钙浓度 8 mg/ml。

1.1.3 空白对照 等量牡蛎醋酸水解物的去离子水溶液,含牡蛎钙 8 mg/ml。

1.1.4 主要试剂与仪器 血清钙试剂盒,磷试剂盒(中生北控生物技术有限公司),台式高速冷冻离心机(长沙平凡仪器公司),A-6 半自动生化仪(松上仪器公司),Lunar-DXA IQ 骨密度仪(Lunar 公司),微机控制电子万能试验机(长春朝阳试验仪器有限公司),烘箱,马弗炉。

1.2 实验方法

1.2.1 造模 采用尾吊法模拟失重时后肢去负荷及体液头向转移效应。大鼠尾部无水乙醇脱脂,吹干,以医用胶布从尾根部沿两侧面纵向粘贴、横向加固,在鼠尾远端将胶布勾挂于悬吊笼横梁上,调整高度使鼠前肢承重,后肢悬空,鼠体与水平面成 30°角。大鼠可 360°活动,自由觅食水。

1.2.2 分组与给药 正常大鼠 30 只,按体重随机分为 3 组,每组 10 只,悬吊笼单笼饲养。全部动物定量饮食,每日每动物

10~20 g 全价饲料,按生长情况调整给食量,基本保证各动物摄食量相等。实验期 4 周。第 1 周为适应期,第 2~4 周为模拟失重期。空白组:不悬吊,大鼠始终自由活动,每日以含牡蛎钙 8 mg/ml 的水溶液 2.5 ml 灌胃,合每日添加牡蛎钙 20 mg。模型组:不悬吊适应 1 周,尾吊 3 周模拟失重。每日以含牡蛎钙 8 mg/ml 的水溶液 2.5 ml 灌胃,合每日添加牡蛎钙 20 mg。中药组:不悬吊适应 1 周,尾吊 3 周模拟失重,每日以每毫升含 0.704 g 生药供试药液 2.5 ml 灌胃给药,其中含牡蛎钙 20 mg。

1.2.3 观察指标及检测方法 血钙、磷:实验结束后以 10% 水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,3 000 r/min 低温分离血清。测血钙含量用邻甲酚酞络合酮法,测血磷含量用钼兰法,严格按试剂盒说明书在 A-6 半自动生化仪上测量血清钙、磷水平。

骨密度:剥取股骨,第 4 腰椎,剔净周围软组织,以双能 X 线骨密度仪作骨横越扫描,检测骨密度和骨矿含量。

骨力学强度:在电子万能试验机上以三点弯曲法测量股骨力学强度,跨距 20 mm,加载速度 0.01 mm/s;压缩法测量腰椎力学强度,预设载荷 600 N,加载速度 0.01 mm/s。记录载荷-位移曲线,读取弹性载荷和最大载荷。

股骨一般情况与主要成分:剥取股骨,测量长度、湿重后,烘干至恒重,称取干重;随后入马弗炉 600 °C 灰化 24 h,称取无机质重量,干重与无机质重的差值为有机质重量。

1.3 统计分析 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SAS 8.2 统计软件作组间单因素方差分析及两均数间多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血钙、磷检测 经过 3 周尾吊模拟失重,模型组血钙、磷水平均较空白组升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。中药组血钙较空白组升高,差异亦有统计学意义($P < 0.05$),但较模型组升高程度为小。中药组血磷较空白组有升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表 1。

2.2 骨密度 模拟失重 3 周,模型组后身骨密度下降,与空白组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),其中股骨下降约 13.5%,腰椎下降约 9.9%。中药组股骨和腰椎骨密度较空白组分别下降 10.3%、3.3%,与空白组比较差异亦有统计学意义($P < 0.01$);中药组股骨和腰椎骨密度均值相对于模型组的缓解幅度为 23.7%、60.6%,与模型组比较差异有统计学意义($P <$

表 1 模拟失重 3 周后血清钙、磷水平($\bar{x}\pm s$)
Tab.1 Serum Ca and P after 3 weeks simulated weightlessness($\bar{x}\pm s$)

组别	weightlessness($\bar{x}\pm s$)	
	血钙(mmol/L)	血磷(mmol/L)
空白组(K)	3.09±0.20 [#]	2.55±0.20 [#]
模型组(M)	3.47±0.43 ^{**}	2.78±0.14 ^{**}
中药组(Z)	3.42±0.14 [*]	2.63±0.18

注:与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$,下同

Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, as compared with group K; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ as compared with group M, Follows the same

0.05),结果见表 2。

2.3 骨力学强度 模拟失重 3 周,模型组大鼠后身骨弹性载荷与最大载荷均下降,与空白组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。中药组股骨和腰椎骨力学强度较模型组均有不同程度的改善,其中股骨弹性载荷与最大载荷恢复较大,尽管与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$),但与空白组的差异亦无统计学意义($P>0.05$);对于腰椎,中药组在力学强度均值上亦显示出一定的改善趋势。结果见表 3。

2.4 股骨成分 3 周模拟失重未造成显著的股骨长度增长异常,但模型组股骨湿重出现下降,与空白组比较差异有统计学意义($P<0.01$),中药有干预这种下降的趋势。从股骨指数上看,组间差异不显著。模拟失重 3 周后,模型组较空白组股骨

干重下降 18.7%,无机质重量减少 21.2%,有机质重量约减少 15.1%,与空白组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。中药组股骨干重、无机质重、有机质重较空白组分别下降 12.4%、13.9%、10.3%,差异有统计学意义($P<0.01$),但较模型组分别改善了 33.7%、34.4%、31.8%,差异有统计学意义($P<0.05$)。模型组由于无机质比例的下降,导致有机质比例升高,该比例变化与空白组比较差异有统计学意义($P<0.01$);中药组亦有这方面表现,但比例变化为小,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 4。

3 讨论

通常认为,失重或模拟失重时承重骨去负荷是导致骨质流失的基本原因。飞行 4 d,跟骨骨质即发现丢失^[4]。“天空实验室”飞行中,人体桡骨、尺骨比飞行前未发生显著骨质改变,而跟骨骨矿含量在不同个体减少了约 4.5%~7.9%^[5]。在 3 个月的飞行中,人体每天丢失约 250 mg 骨钙,在返回地面后的 3 个月以 100 mg/d 的速度缓慢恢复^[6]。目前采用的干预措施^[7-11]主要有机械运动、补充营养元素、药物干预等,然而这些干预作用还远不能对抗失重的影响。人工重力^[12]似乎有希望对抗失重下的生理改变,但其具体实施还存在很多问题。

本课题通过挖掘中医药理论,对失重时骨及全身变化进行了整体分析,失重骨质丢失的病机关键是肾精不固、脾土失督,涉及肾脾,故以培补肾脾、养骨荣髓、益气 and 血为大法,确立了符合中医理论的中药复方。

表 2 模拟失重 3 周后骨密度情况($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Bone mineral density of posterior body after 3 weeks simulated weightlessness($\bar{x}\pm s$)

组别	股骨		第 4 腰椎	
	骨密度(g/cm^2)	骨矿含量(g)	骨密度(g/cm^2)	骨矿含量(g)
空白组(K)	0.156±0.006 ^{##}	0.362±0.038 ^{##}	0.152±0.006 ^{##}	0.096±0.017
模型组(M)	0.135±0.005 ^{**}	0.282±0.026 ^{**}	0.137±0.006 ^{**}	0.088±0.009
中药组(Z)	0.140±0.006 ^{***}	0.312±0.023 ^{***}	0.147±0.008 ^{##}	0.097±0.010

表 3 模拟失重 3 周后骨力学强度($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Bone mechanical properties after 3 weeks simulated weightlessness($\bar{x}\pm s$)

组别	股骨弹性载荷(N)	股骨最大载荷(N)	腰椎弹性载荷(N)	腰椎最大载荷(N)
空白组(K)	40.91±8.37 ^{##}	46.52±7.24 ^{##}	289.58±41.45 ^{##}	347.91±45.67 ^{##}
模型组(M)	29.77±7.04 ^{**}	34.76±6.85 ^{**}	193.13±42.41 ^{**}	259.99±46.57 ^{**}
中药组(Z)	35.53±8.92	39.23±9.27	229.77±55.10 ^{**}	299.06±39.09 [*]

表 4 模拟失重 3 周后股骨一般情况与主要成分($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 General state and major ingredients of femur after 3 weeks simulated weightlessness($\bar{x}\pm s$)

项目	空白组(K)	模型组(M)	中药组(Z)
长度(cm)	3.682±0.092	3.636±0.066	3.687±0.060
湿重(g)	1.039±0.086 ^{##}	0.903±0.047 ^{**}	0.941±0.047 ^{**}
指数($g/100g$)	0.306±0.019	0.319±0.042	0.291±0.016
干重(g)	0.613 67±0.049 70 ^{##}	0.499 20±0.030 56 ^{**}	0.537 55±0.023 83 ^{***}
无机质重(g)	0.357 06±0.030 80 ^{##}	0.281 46±0.017 77 ^{**}	0.307 34±0.014 90 ^{***}
有机质重(g)	0.256 61±0.019 85 ^{##}	0.217 74±0.013 97 ^{**}	0.230 21±0.009 67 ^{***}
无机质比例	0.581 6±0.008 1 ^{##}	0.563 8±0.008 6 ^{**}	0.571 7±0.005 7 ^{***}
有机质比例	0.418 4±0.008 1 ^{##}	0.436 2±0.008 6 ^{**}	0.428 3±0.005 7 ^{***}

实验发现,在等量摄钙的情况下,模型组较空白组血钙、磷均升高,提示骨质溶出释放入血;中药组血钙的升高情况略缓和,血磷升高不显著,提示中药能够缓解骨质的溶出,这与骨密度的情况是一致的。模拟失重 3 周后,模型组后身骨密度较空白组显著下降。而中药组股骨密度下降程度较模型组显著为轻,腰椎骨密度亦高于模型组。此结果显示,对于大鼠这种非直立动物,尾吊模拟失重时股骨所受的影响要大于腰椎;而在中药干预时,腰椎却得到了更大恢复,提示松质骨似乎更容易利用药物,可能与其血运较丰富、代谢较快有关。3 周模拟失重未造成显著的股骨长度增长异常,但与空白组比较,模型鼠股骨的湿重显著下降,中药有干预这种下降的趋势。从股骨指数上看,组间差异不显著,甚至模型组较空白组均值还高些,这种结果提示模拟失重造成的骨的变化与体重的下降是有一定关系的。

骨作为身体的支撑系统,其力学性能尤其重要。本实验结果显示,模拟失重 3 周可造成模型大鼠后身骨力学强度显著下降($P<0.01$),体现在韧性和硬度两方面均受到严重影响。中药组骨力学强度较模型组有不同程度的改善,其中股骨弹性载荷与最大载荷恢复较大,尽管与模型组无显著差异,但与空白组的差异也不显著,这种结果可能与样本量不够大有关;但在腰椎,中药虽然显著改善了骨密度,但对力学强度改善作用不显著。从这里可以得出一点,骨密度的提高与骨力学性能的增强是不同步的,而后者似乎更困难。推测骨矿盐的有序沉积排列需要一定时间,如果实验期延长,中药改善骨力学强度的程度有望加大。与模型鼠骨韧性及硬度显著下降一致的结果是骨有机质和无机质含量的显著减少,其中无机质的减少显得更为突出;中药组在干重、无机质重、有机质重三者的下降程度均较模型组显著改善($P<0.05$)。值得注意的是,伴随模型鼠骨中无机质比例的显著下降,有机质比例相应显著升高,而这种升高却并没有带来弹性载荷即韧性的提高。此现象提示有机质在排列上及与无机质的组合上可能出现了问题,前人实验中也曾发现模拟失重后肢骨 I 型胶原含量增加,但排列紊乱,同时力学性能显著下降^[13]。我们接下来会就此问题进一步研究。

此次实验结果是在各组等量给钙的情况下所得出。本次实验由于条件所限,未设同期非补钙组,这是一个缺憾,以致

不能更好地评价钙剂在其中的作用,以及复方其他药味对钙剂的协同作用。但根据上述结果可以肯定的一点是,单纯补钙质对模拟失重骨丢失的对抗作用是不够的,而复方中的其他药味在调节骨代谢、缓解肌萎缩、改善全身状况方面显然起到了重要作用。

参考文献

- 1 李轶,徐冰心,岳茂兴.航天员因失重致废用性骨质疏松的机制及对策.中国康复医学杂志,2005,20(2):150-152.
- 2 White RJ,Averner M. Humans in space. Nature,2001,409:1115-1118.
- 3 Hatton DC,Yue Q,Dierickx J,et al. Calcium metabolism and cardiovascular function after spaceflight. J Appl Physiol,2002,92:3-12.
- 4 Mack PB,LaChance PA,Vose GP,et al. Bone demineralization of foot and hand of gemini-titan IV, V and VI astronauts during orbital flight. Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med,1967,100(3):503-511.
- 5 Whedon GD,Rambaut PC. Effects of long-duration space flight on calcium metabolism:Review of human studies from Skylab to the present. Acta Astronautica,2006,(58):59-81.
- 6 Smith SM,Wastney ME,Morukov BV,et al. Calcium metabolism before,during,and after a 3-mo spaceflight:kinetic and biochemical changes. Am J Physiol,1999,277(1 Pt 2):R1-R10.
- 7 Iwamoto J,Takeda T,Sato Y. Interventions to prevent bone loss in astronauts during space flight. Keio J Med,2005,54(2):55-59.
- 8 Houtchens BA. Medical-care systems for long-duration space missions. Clin Chem,1993,39(1):13-21.
- 9 Shackelford LC,LeBlanc AD,Driscoll TB,et al. Resistance exercise as a countermeasure to disuse-induced bone loss. J Appl Physiol,2004,97:119-129.
- 10 Lovejoy JC, Smith SR, Zachwieja JJ,et al. Low-dose T(3) improves the bed rest model of simulated weightlessness in men and women. Am J Physiol,1999,277 (2 Pt 1):E370-E379.
- 11 Koesterer TJ,Dodd SL,Powers S. Increased antioxidant capacity does not attenuate muscle atrophy caused by unweighting. J Appl Physiol,2002,93(6):1959-1965.
- 12 Fong K. The next small step. BMJ,2004,329(7480):1441-1444.
- 13 曹新生,吴兴裕,吴燕红,等.模拟失重大鼠后肢骨 ALP/ACP,I 型胶原及生物力学的变化.航天医学与医学工程,2005,18(4):254-258.

(收稿日期:2007-12-17 本文编辑:李为农)

本刊对来稿中照片图处理的有关要求

稿件中的图片要求有良好的清晰度和对比度,最好提供洗印好的照片。X 线图请一律寄照片,不可寄 X 线胶片,图不小于 8 cm×12 cm,肢体照片需包括一端关节。图中需标注的符号(包括箭头)请用另纸标上,不要写在照片上,每幅图的背面应贴上标签,注明图号、作者姓名及图的上下方向。病理照片要求注明染色方法和放大倍数。图片如有引自他刊者,应注明出处。图片均不可粘贴,另纸包好,以免污染或折损。大体标本照片在图内应有尺度标记。如提供电子版的图片,彩色图片应为 RGB 格式,建议作者使用数码相机拍摄照片时,图片分辨率最小为 300 ppi(像素/英寸),线条图最小 1 200 ppi,图像大小 5×7 in(127 mm×178 mm)。图片应按其在正文中出现的顺序命名,采用 JPEG 格式单独存储,请勿插入正文文档中(如 Word 文档)。若刊用人物像,应征得本人的书面同意,或遮盖其能被辨认出系何人的部分。

《中国骨伤》杂志社