

补肾健骨汤对去卵巢大鼠股骨颈骨小梁微血管和骨密度的影响

王 勇, 黄永松, 李冬春, 胡 拥, 王 威
(湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005)

〔摘要〕目的 探讨补肾健骨汤对股骨颈骨小梁微血管及骨密度影响。方法 采用切除大鼠卵巢方法建立骨质疏松症模型, 建模成功后随机分为正常组、假手术组、去势模型组、雷洛昔芬组、补肾健骨汤组, 电镜观察股骨颈骨小梁微血管变化以及骨密度检测股骨颈骨密度。结果 (1) 正常组微血管规则、连续, 骨小梁连续且致密, 厚度均匀; 去势模型组微血管变形变窄, 断裂, 骨小梁稀疏、萎缩, 连续中断; 补肾健骨汤、雷洛昔芬组骨小梁微血管粗细较均匀, 骨小梁出现部分断裂、排列欠规则。(2) 假手术组与正常组骨密度无差异($P>0.05$); 去势模型组骨密度下降明显, 但低于补肾健骨汤组及雷洛昔芬组($P<0.05$)。结论 补肾健骨汤可有效改善股骨颈骨小梁微结构并提高骨密度, 说明其对绝经后骨质疏松症的防治及降低骨折发生起到积极作用。

〔关键词〕绝经后骨质疏松症; 去卵巢大鼠; 骨小梁微血管; 骨密度; 补肾健骨汤; 熟地黄; 淫羊藿; 骨碎补

〔中图分类号〕R274

〔文献标识码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.05.004

Effects of Bushen Jiangu Decoction on Femoral Neck Bone Trabecular Microvascular and its Bone Mineral Density in Ovariectomized Rats

WANG Yong, HUANG Yongsong, LI Dongchun, HU Yong, WANG Wei

(The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China)

〔Abstract〕Objective To investigate the effects of Bushen Jiangu decoction on femoral neck bone trabecular microvascular and its bone mineral density (BMD) in ovariectomized rats. Methods The osteoporosis model rats were built by their ovaries removed, which were assigned to the normal group, sham-operation group, model group, raloxifene group, Bushen Jiangu decoction group. The changes of femoral neck bone trabecular capillaries were observed by electron microscopy and its BMD was determined. Results (1) The microvessel of normal group was regular and continuous, bone trabecula was continuous, compact and with uniformity of thickness. The microvessel of ovariectomized models was narrow deformation, fracture, bone trabecular sparse, atrophy and break of continuous. The bone trabecular microvascular of Bushen Jiangu decoction and raloxifene groups was with uniform thickness, bone trabecular appear some fault, arranging owe rules. (2) There is no difference between control group and sham-operation group ($P>0.05$); the ovariectomized rats's BMD was reduced significantly, but it was lower than that of Bushen Jiangu decoction and raloxifene groups ($P<0.05$). Conclusion Bushen Jiangu decoction can improve the ovariectomized rat's femoral neck bone structure and its bone mineral density. It is proving that Bushen Jiangu decoction can cure postmenopausal osteoporosis and reduce the rate of fracture.

〔Keywords〕postmenopausal osteoporosis; ovariectomized rats; trabecular microvessel; bone mineral density; Bushen Jiangu decoction; Radix Rehmanniae Preparata; Herba Epimedii; Rhizoma Drynariae

随着老龄化社会的到来,影响妇女生活质量的绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMO)的发病率越来越高,由其引起的骨折及并发症日益受到关注。在临床应用中发现,具有补肾益骨功效的

补肾健骨汤能够有效地改善妇女PMO的症状,为进一步明确研究组经验方“补肾健骨汤”作用机制,本文以去卵巢(去势)大鼠建立PMO模型,使用扫描电镜观察去势大鼠股骨颈骨小梁微血管变化,骨密

〔收稿日期〕2015-10-10

〔基金项目〕湖南省中医药管理局项目(2012106)。

〔作者简介〕王 勇,男,主任医师、教授,研究方向:骨与关节、骨病的中医药防治。

度仪检测大鼠股骨颈骨密度来探讨补肾健骨汤对PMO的防治作用。现将方法与结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 4月龄SPF级未交配健康雌性大鼠60只,体质量(200 ± 20)g,湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供[动物许可证号:SCXK(湘)2011-0003,质量合格证4304702577]。动物购进后适应性喂养一周,于SPF级实验室喂养,按清洁级标准、分笼同环境饲养,大鼠摄食为无菌标准饲料和蒸馏水。保持饲养环境的通风,光照,温度 $23\sim 26\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度40%-70%,大鼠笼养,自由摄食、饮水。许可证号:SYXK(湘)2009-0001。

1.1.2 药物 补肾健骨汤:熟地黄20g,淫羊藿15g,骨碎补15g,补骨脂10g,黄芪20g,白术15g,茯苓10g,甘草6g(由湖南中医药大学第二附属医院中药房提供),由中药制剂室统一煎制,并经过恒温水浴制成150mL浓缩药液,药液浓度为 0.74 g/mL 。雷洛昔芬,60mg $\times$ 1片,山东宏富达医药化工有限公司;用法:每次60mg捣碎后放入60mL蒸馏水中制成悬浊液,药液浓度为 1 mg/mL 。

1.1.3 试剂 2%戊巴比妥钠,科昊生物工程有限责任公司生产(生产编号DH0602)。注射用青霉素钠,哈药集团制药总厂,规格:80万单位/瓶,批号:A101002008。

1.1.4 实验设备 扫描电镜(PHILIPSLX30W/TMR)、双能X线吸收骨密度仪(法国MEDILINK公司,型号:OSTEOCORE)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 基于预实验研究,将若干雌性大鼠(>60只)分为正常对照组(12只)、假手术组(12只)、其余雌鼠确认造模成功后随机分去势模型组(12只)、补肾健骨汤组(12只)、雷洛昔芬组(12只)。

1.2.2 动物造模 在SPF实验中心喂养约一周,待雌鼠适应环境后开始实验造模。腹腔麻醉根据每只雌鼠的体质量以2%戊巴比妥钠按 40 mg/kg 标准计算剂量;取俯卧位,备皮、消毒、铺无菌单。取肋骨缘下、后正中线上旁开1.5cm处双背侧约1cm纵切口,进入腹腔后缓慢牵出卵巢,结扎止血后摘除卵巢,依次缝合关闭伤口。其中,假手术组仅在双侧暴

露卵巢后,切除其周围约 1 cm^3 大小脂肪组织,不结扎输卵管,不切除卵巢,余手术操作同上。术后使用青霉素5万U/只肌肉注射3d抗感染;正常组不处理。

1.2.3 动物给药 根据预实验结果,我们仍通过雌鼠去卵巢造模术后4周行骨密度检测验证模型复制成功,然后按每日两次开始灌胃,共持续8周;正常组、假手术组、去势模型组另以蒸馏水灌胃。按照人与动物体表面积换算公式计算给药剂量(大鼠体质量设200g,人体质量设60kg),雷洛昔芬按照 $6.092\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 灌胃,补肾健骨汤组以生药量计算,按照 $11.270\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 灌胃(以上药物需按药液浓度换算后以药液形式灌胃)。

1.2.4 指标观察 骨密度检测:大鼠处死前行骨密度仪器检测骨密度,采用骨密度仪小动物扫描软件精细扫描定位测定一侧股骨颈部的骨密度值;扫描电镜观察:股骨近端头颈部供骨区用骨刀获取约 5 mm^3 大小松质骨标本,后生理盐水反复冲洗,除去骨表面组织级异物后,注意标示出股骨颈横断面为观察面,以2.5%戊二醛固定1d以上,后高频超声清洗30min,酒精脱水,再以醋酸异戊酯保存过夜,检测前以离子溅射仪干燥,喷金,标记编号后在扫描电镜下观察股骨颈骨小梁微血管形态及相关结构,记录后摄片。

1.3 统计学处理

应用SPSS 16.0统计软件包对数据进行统计分析,计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示;以正态性分布检验和方差齐性检验($P>0.05$),再用单因素方差分析进行组间两两比较,用LSD检验,以 $P<0.05$ 差异统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

基于预实验研究,正式实验雌鼠60只,分为5组:正常组、假手术组、去势模型组、补肾健骨汤组、雷洛昔芬组;整个实验过程中无大鼠死亡。

在大鼠饲养过程中,对其活动、饮食及精神状态等进行观察。其中正常组在整个实验过程中,活跃喜动,反应敏捷,毛发顺滑光亮,饮食、睡眠良好;假手术组在术后3d饮食、活动及精神状态逐渐恢复,与正常组无差异;去势模型组、补肾健骨汤组、雷洛昔芬组在造模后1个月内出现活动量减少、毛发干枯、少

动欲睡等情况。在开始治疗灌胃后补肾健骨汤组及雷洛昔芬组的大鼠精神逐渐好转,反应灵敏,毛发逐渐顺滑;去势模型组大鼠精神仍欠佳,少动嗜睡,反应迟钝,毛发干枯无光泽。

2.2 股骨颈骨小梁微血管观察

正常组及假手术组的骨小梁微血管表面完整,粗细均匀,连续性可,骨小梁形态对称,间隙可,骨吸收孔为近圆形;去势模型组股骨颈骨小梁微血管变形变窄,发生断裂萎缩,表面部分结构脱落,甚至可见游离物质,骨小梁稀疏、变细变薄,间隙增宽,连续性中断、残端增多,有大量微骨折形成;补肾健骨汤、雷洛昔芬组与去势模型组相比其骨小梁微血管尚规则,表面少许结构脱落,粗细较均匀,连续性尚可,骨小梁结构基本完整,排列欠规则,表面部分微骨裂。(见图1)。

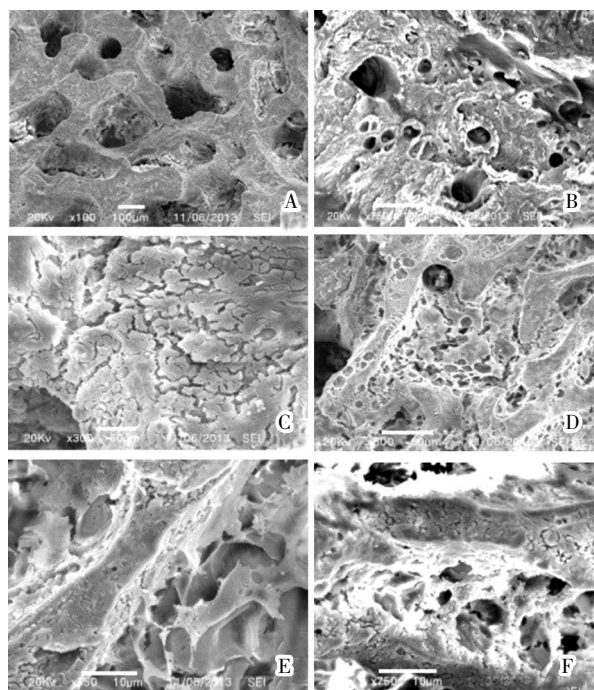


图1 大鼠股骨颈骨小梁表面变化(扫描电镜图)

2.3 股骨颈骨密度测定

假手术组与正常对照组相比,两组骨密度无统计学意义($P>0.05$);去势模型组与正常对照组相比,骨密度减少明显,差异具有统计学意义($P<0.05$),提示造模成功;与去势模型组相比较,补肾健骨汤组、雷洛昔芬组骨密度差异具有统计学意义($P<0.05$);其中雷洛昔芬组骨密度要略高于补肾健骨汤组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠股骨颈骨密度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	骨密度(g/cm^2)
正常对照组	12	0.211 $\pm$ 0.016
假手术组	12	0.209 $\pm$ 0.015
去势模型组	12	0.169 $\pm$ 0.008 Δ
雷洛昔芬组	12	0.207 $\pm$ 0.014 $\bullet$
补肾健骨汤组	12	0.204 $\pm$ 0.011 $\bullet$

注:与正常组比 $\Delta P<0.05$;与去势模型组比 $\bullet P<0.05$ 。

3 讨论

PMO是妇女的一种全身性骨代谢疾病,见于更年期,目前发病率不断上升;目前检测骨质疏松是通过骨密度仪检测。骨质疏松直接表现是骨密度的降低,严重时直接导致骨质疏松性骨折^[1],我国女性一生发生骨质疏松性骨折的危险性(40%)高于乳腺癌、子宫内膜癌和卵巢癌的总和^[2]。发生此类骨折的患者此后一年死亡风险明显增高;长期的慢性疼痛和功能障碍也很常见;对跌倒的畏惧还可导致卧床、孤独,并容易患上老年抑郁症。现代医学认为,女性绝经后,卵巢功能下降,雌激素迅速减少,从而引起骨吸收和骨重建平衡失调,被公认为是PMO发生的重要原因^[3]。雌激素缺乏一方面使破骨细胞过度活跃,骨吸收大于骨形成,影响骨胶原的成熟、转换和骨矿化;另一方面抑制甲状旁腺素(PTH)分泌,使1-25(OH)₂D₃合成减少,造成负钙平衡,骨矿含量减少,导致骨质疏松症。从微观角度看,PMO发生后,骨小梁微血管发生形变、狭窄、萎缩甚至断裂,骨小梁变细、变形、稀疏,小梁间隙增大,壁变薄。HE Shu-zheng^[4]研究表明,绝经后妇女雌激素水平下降,血液流变学呈“高黏稠”状态,造成微循环障碍,导致微血管渗漏和结构破坏。微血管损伤是骨质疏松松质骨超微结构改变的基础,微血管在骨的生成、重建、修复过程中起着至关重要的作用;超微结构改变必将导致骨质的整体力学强度下降,使微骨裂、微骨折增多。目前西药治疗骨质疏松症从减少骨吸收或者促进骨形成着手,而PMO的骨松质吸收迅速,骨代谢转换率高,呈高转换状态,治疗时可考虑使用骨吸收抑制剂^[5]。

中医学无“绝经后骨质疏松症”一词记载,从其临床主要表现以及发病机制来看,可属“骨痿”“骨枯”或“肾虚腰痛”范畴。绝经后妇女由于肾气虚衰,冲任不足,精枯髓少,充养乏源,骨失所养,则骨体枯槁,则发为腰膝酸软、行走不便的骨痿或骨枯。可见

本病的发病关键是“肾虚”,其病机主要与肝肾亏损、脾弱血虚、瘀血阻络有关^[6]。中医药对 PMO 的治疗着重于整体的调节,紧密围绕肾主骨生髓的理论,多用补肾法,或在此基础上加用养肝健脾、补血活血之品治疗^[7]。大量实验证实了一些补肾中药具有与雌激素类似的作用,或被证明含有黄酮类药植物具有抗骨质疏松作用^[8]。黎汉文等^[9]以补肾壮骨方(杜仲、熟地黄、鹿角胶、黄芪、当归、延胡索、牛膝、丹参、补骨脂、茯苓)治疗 30 例 PMO 患者 10 个月后,临床总有效率 96%,明显优于西药对照组(50%),且雌二醇及 BMD 明显增加。

补肾健骨汤治疗 PMO,方中重用熟地黄为君以滋肾填精,大补真阴。淫羊藿、骨碎补、补骨脂补肾壮阳,强筋壮骨,在补阴之中配伍补阳药,取“阳中求阴”之义,均为臣药;黄芪、白术、茯苓益气健脾,补后天生化之源以充肾精,又防补甚滋腻伤及脾胃,俱为佐药;甘草调中。诸药合用共奏补肾益精、强筋壮骨增髓之效。熟地黄作为中药最为常用的补益品种,被各位医家广为选用^[10]。现代的研究证实熟地黄具有抗疲劳、益智之效;同时可改善免疫系统和造血系统,增强人的体质。传统补肾中药淫羊藿,有研究证实淫羊藿具有雌激素样作用,在骨质代谢中能降低可诱导骨质疏松发生的风险^[11]。刘剑钢等人研究表明骨碎补能改善患者的骨密度,加强骨的生物力学性,升高血清中正性骨重建指标,如钙,将有利于骨形成^[12]。现代研究补骨脂可能对破骨细胞存在抑制性,而大鼠骨密度、骨钙含量经过本药的乙酸乙酯萃取物干预后得到增加,并证实该生药提取液能促进成骨细胞形成,达到防治骨质疏松目的。《日华子本草》将黄芪功效描述为“助气,壮筋骨”。研究人员采用体外实验得出了黄芪能抑制破骨细胞的骨吸收效能,降低骨吸收率,并促进骨形成;为黄芪水提物治疗类固醇所致的大鼠骨质疏松获取积极效果提供了可靠的证据^[13]。

本次实验发现大鼠去卵巢后骨密度明显下降,骨小梁微血管变形变窄,发生断裂,骨小梁稀疏萎缩、变细变薄,间隙增宽,连续性中断,结构破坏明显,能较客观地反映 PMO 模型。使用补肾健骨汤可有效提高骨量,骨小梁微血管形态及连续性尚可,少

许游离端,骨小梁结构欠完整,排列基本规则,在改善大鼠股骨颈骨小梁显微结构及降低骨折发生方面起到积极的作用,且与雷洛昔芬效果无明显差异。这一结果为补肾健骨汤防治 PMO 的临床应用奠定了基础。从微观状态或细胞、分子水平对其作用点、途径、机制及其影响因素的阐明,将有助于提高临床应用中药的科学性和准确性^[14],也是时下(补肾)中药治疗骨质疏松取得进展的理想途径。

参考文献:

- [1] 何渝煦,魏庆中,熊启良,等.骨质疏松性骨折与骨密度关系的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2014,20(2):219-224.
- [2] 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[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2011,4(1):2-17.
- [3] Lozop, Krpan D, Krvavica A, et al. Bone Histology in Postmenopausal Osteoporosis -Variations in Cellular Activity [J].Acta Medica Croatica ,2004,58(1):5-11.
- [4] HE shuzheng, XIU zhenhua, HANSENES, et al. Microvascular morphology of bone in arthrosis. Scanning electron microscopy in rabbits [J]. Acta Orthop Scand,1990,61(3):195-200.
- [5] 邱贵兴,裴福兴,胡侦明,等.中国骨质疏松性骨折诊疗指南[J].中华骨与关节外科杂志,2015,8(5):371-375.
- [6] 王小宇,韩丽萍.绝经后骨质疏松症的特点[J].陕西中医学院学报,2008,31(1):15-17.
- [7] 汪 亮,顾刚妹,赵 俊.中药对骨质疏松症的治疗及作用机理研究进展[J].井冈山医学专报,2008,15(1):1-3.
- [8] 苏艳杰,陈亚辉,崔 燎.植物黄酮抗骨质疏松作用研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2014,20(5):562-568.
- [9] 黎汉文,刘 锋,杜嫦燕.补肾壮骨方治疗绝经后骨质疏松症疗效观察[J].内蒙古中医药,2011,(22)11:31-32.
- [10] 罗振华,赵 睿,邓 博,等.金刚健骨片治疗原发性骨质疏松症临床研究[J].湖南中医药大学学报,2014,34(10):39-42.
- [11] Beck MM, Hansen kk, Role of estrogen in avian osteoporosis [J]. Poult Sci,2004,83:200.
- [12] 刘剑刚,谢雁鸣,赵晋宁,等.骨碎补总黄酮胶囊对实验性骨质疏松症和镇痛作用的影响[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(5):31-34.
- [13] 崔 燎,邹丽宜,刘钰瑜,等.丹参水提物和丹参素促进成骨细胞活性和防治泼尼松所致大鼠骨质疏松 [J]. 中国药理学通报,2004,20(3):286.
- [14] 戎 堃,刘 彬,李木子,等.中药防治骨质疏松的研究进展[J].世界中医药,2013,8(12):1 505-1 507.

(本文编辑 李 杰)