

中药杜仲-牛膝配伍对去卵巢大鼠骨质疏松症的 干预实验研究

高卫辉¹, 向艳华², 刘云², 邓桂明¹, 林洁¹, 林王森枝², 贺瑶²

(1.湖南中医药大学第一附属医院妇产科,湖南长沙 410007;2.湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

〔摘要〕目的 探讨杜仲-牛膝配伍组对去卵巢骨质疏松大鼠模型的干预作用。方法 将84只大鼠随机分为正常对照组12只,假手术组12只,剩余60只造模成功后随机分为:模型组、阳性对照组(阿法骨化醇组)、杜仲组、牛膝组、杜仲-牛膝组共5组各12只。给药3个月后,检测各组大鼠的血清E₂、钙离子、磷离子、碱性磷酸酶和骨密度(the bone mineral density, BMD)。结果 与正常对照组相比,模型组大鼠血清中雌二醇(estradiol, E₂)、钙离子、磷离子及BMD值明显降低(P<0.01),血清中碱性磷酸酶含量明显增高(P<0.05)。与模型组相比,牛膝组、杜仲-牛膝组大鼠血清中E₂的含量明显升高(P<0.05);杜仲组、牛膝组、杜仲-牛膝组、阳性对照组大鼠BMD值及血清中钙离子、磷离子均明显升高(P<0.01)。杜仲组、牛膝组、杜仲-牛膝组、阳性对照组大鼠血清中碱性磷酸酶含量均明显降低(P<0.05);杜仲-牛膝组血清碱性磷酸酶明显低于杜仲组、牛膝组(P<0.05)。结论 杜仲-牛膝药对抗骨质疏松作用有增强趋势,其作用可能与提高血清钙离子、磷离子浓度,提高BMD有关。

〔关键词〕 杜仲-牛膝药对;骨质疏松症;雌二醇;骨密度;去卵巢大鼠;杜仲;牛膝

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标识码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.06.011

Influence of TCM Eucommia-Achyranthes Compatibility on Osteoporosis in Ovariectomized Rats

GAO Weihui¹, XIANG Yanhua², LIU Yun², DENG Guiming¹, LIN Jie¹, Lin Wangsenzhi², He Yao²

(1.The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2.Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To investigate the interventional effect of Eucommia-Achyranthes compatibility on osteoporosis in ovariectomized rats. **Methods** Eighty-four rats were randomly divided into normal control group (n=12), sham-operation group (n=12), and the remaining 60 rats after the success of the modeling were randomly divided into model group, positive control group (group afar ossification alcohol), eucommia bark group, achyranthes group, eucommia-achyranthes group, 12 rats in each group. After given medicine for 3 months, the serum estradiol (E₂), calcium ion, phosphate ion, alkaline phosphatase and the bone mineral density (BMD) were detected. **Results** Compared with normal control group, the serum E₂, calcium ion, phosphate ion and bone mineral density of model group were significantly lower than normal control group (P<0.01), and the alkaline phosphatase in serum was more higher (P<0.05). Compared with the model group, the content of E₂ in achyranthes group and eucommia-achyranthes group was increased obviously (P<0.05), the BMD and serum calcium ion, phosphate ion in eucommia bark group, achyranthes group, eucommia-achyranthes group, positive control group were increased obviously (P<0.01), and the alkaline phosphatase in the groups were reduced significantly (P<0.05). The alkaline phosphatase of eucommia-achyranthes group was lower than that in eucommia bark group and achyranthes group (P<0.05). **Conclusion** The compatability of Eucommia-Achyranthes shows increasing trend in anti-osteoporosis, and its effect may be related to increasing

〔收稿日期〕2015-07-10

〔基金项目〕湖南省科学技术厅科技计划项目(2012FJ4287)。

〔作者简介〕高卫辉,女,副教授,硕士研究生导师,主要从事妇产科临床、科研、教学工作。

serum calcium, phosphorus, improving BMD.

[**Keywords**] couplet medicine of *Eucommia-Achyranthes*; osteoporosis; estradio; bone mineral density; ovariectomized rats; eucommia bark; *Achyranthes bidentata*

绝经后骨质疏松症^[1](postmenopausal osteoporosis, PMOP)是由于体内雌激素减少,致成骨作用降低,破骨作用增强,骨矿含量减少的一种退行性病变,一般发生在女性绝经后10年左右,年龄在55~65岁。随着我国经济的飞速发展、生活质量的提高,人类的寿命在延长,社会老龄化程度也在逐步加深,大部分女性三分之一以上的寿命将在绝经后度过,髋部疼痛和股骨颈骨折率的增高^[2-3]以及由此带来的并发症及巨大的医疗费用使PMOP成为全球关注的健康问题。西医认为PMOP是多因素性疾病:雌激素的缺乏、遗传因素、营养状况等,但普遍认为雌激素的缺乏是其主要致病原因^[4]。近年来,应用雌激素治疗PMOP已得到医学界的普遍认同,然而,长期应用雌激素能明显增加乳腺癌和子宫内膜癌的危险^[5],其风险甚至超过受益;因此,针对西药在治疗骨质疏松症方面存在的问题,从中医角度,探索中药在防治PMOP中的用药优势显得尤为重要。

本文采用雌性大鼠摘去卵巢形成骨质疏松模型的造模方法模拟PMOP的病理状态,通过检测雌二醇(estradiol, E₂)、骨密度(the bone mineral density, BMD)等指标,观察杜仲-牛膝作为药对对PMOP的治疗作用,为中药防治PMOP提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

动物选用雌性SD大鼠84只,SPF级,体质量280~320 g,由湖南斯莱克景达实验动物中心提供动物许可证号:SCXK(湘)2011-0003。动物于湖南中医药大学SPF级实验动物中心IVC笼具每组动物分笼喂养,室内保持20℃~25℃,相对湿度12%,自由清洁饮水、进食,采用12h:12h昼夜间断照明,每周换水3次,换垫料2次,水料充足。

1.2 药物

杜仲购自四川省宜宾市中宏药业有限公司,怀牛膝购自河南省焦作市健国怀药有限公司,取成人临床1日所用中药剂量:杜仲10 g,怀牛膝15 g。用煎药罐分别制成相应浓度中药液,4℃冰箱保存备用。阿法骨化醇片:重庆药友制药有限责任公司,规格:0.25 μg/片。

1.3 主要仪器和试剂

2003E1007113全自动生化检测仪(意大利LOGOTECH公司产品);CG-911型γ放射免疫计数器(科大创新股份有限公司中佳公司);钙、磷试剂盒:上海明华体外诊断试剂有限公司;碱性磷酸酶试剂盒:伊利康生物技术有限公司;批号:201203100 E₂放免试剂盒:潍坊三维生物工程集团有限公司。

2 方法

2.1 动物分组

将84只大鼠随机分为正常对照组12只,假手术组12只,剩余60只造模成功后随机分为:模型组、阳性对照组(阿法骨化醇组)、杜仲组、牛膝组、杜仲-牛膝组各12只,共7组。

2.2 PMOP造模与药物干预

采用研究PMOP的病理发展过程的经典模型^[5-6]即通过将雌性大鼠双侧卵巢切除来模拟动物卵巢功能缺陷导致骨质疏松症,将3~10个月的雌性大鼠麻醉后将其卵巢切除,使其雌激素水平降低,从而造成骨吸收大于骨形成,使其骨量丢失^[6]。杜仲组、牛膝组、杜仲-牛膝组大鼠用10%水合氯醛按0.3 mL/100 g的剂量腹腔注射麻醉后摘除两侧卵巢^[7],假手术组只摘除少量脂肪组织。手术后7 d天开始灌胃给药,1次/d,连续给药12周,依据动物与人体表面积表计算动物给药剂量,每周测量动物体质量各1次。正常对照组、假手术组模型组用蒸馏水灌胃,剂量为10 mL/kg。杜仲用1 g/kg,牛膝组用1.5 g/kg,杜仲-牛膝组用1 g/kg杜仲、1.5 g/kg牛膝的混煎剂(相当于60 kg人剂量的6倍)灌胃。阿法骨化醇组用蒸馏水配制成混悬液,以0.05 μg/kg剂量灌胃。

2.3 动物实验指标检测

给药结束后,全部动物禁食不禁水12 h,腹主动脉采血5 mL,收集至10 mL离心管内,室温下静置1 h后离心去血清,标记后于冰箱保存,进行血清及放免指标检测。

2.3.1 BMD测定 剖去双侧侧完整股骨,分离干净上面所附着的肌肉组织,保留骨膜,标记后于冰箱保存,取大鼠左侧股骨按一定水平放置在BMD仪上,对左侧离体股骨近端(即股骨头端,主要为松质

骨)测定 BMD。

2.3.2 血清 E₂ 测定 取大鼠血清样品,用 E₂ 试剂盒,采用放免法测定,按免疫分析试剂盒的操作严格执行。

2.3.3 生化指标检测 抽取各组实验大鼠静脉血,取血清严格按照全自动生化仪进行检测血清钙离子、磷离子、碱性磷酸酶。

2.4 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 21.0 进行分析。所有计量资料均以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,先行正态性分析及方差齐性分析,满足正态性者,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),方差齐时选择 LSD 法,方差不齐时选择 Dunnett T3 法;不满足正态性时采用秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 BMD 的影响

与正常对照组相比,模型组大鼠 BMD 值明显降低($P<0.01$),假手术组大鼠 BMD 值则无显著性变化($P>0.05$),提示摘除双侧卵巢可使大鼠 BMD 值降低;与模型组相比,杜仲组、牛膝组、杜仲-牛膝组、阳性对照组四组大鼠 BMD 值均明显升高($P<0.01$),提示杜仲、牛膝、杜仲-牛膝合用、阳性对照药物对实验大鼠 BMD 值均具有一定的良性调节作用。见表 1。

3.2 对血清 E₂ 的影响

与正常对照组相比,模型组大鼠血清中 E₂ 的含量明显降低($P<0.01$),提示摘除双侧卵巢可使大鼠血清中 E₂ 的含量降低;与模型组相比,牛膝组、杜仲-牛膝组大鼠血清中 E₂ 的含量明显升高($P<0.05$),杜仲组、阳性对照组大鼠血清中 E₂ 的含量差异无统计学意义($P>0.05$),提示牛膝或杜仲-牛膝合用对实验大鼠血清中 E₂ 的含量具有一定的调节作用。见表 1。

3.3 对血清钙离子、磷离子、碱性磷酸酶的影响

与正常对照组相比,模型组大鼠血清中钙离子、磷离子含量明显降低($P<0.01$),碱性磷酸酶含量明显增高($P<0.05$),与模型组相比,杜仲组、牛膝组、杜仲-牛膝组、阳性对照组四组大鼠血清中钙离子、磷离子含量均明显升高($P<0.05$),碱性磷酸酶含量均明显降低($P<0.05$),提示杜仲、牛膝、杜仲-牛膝合用、阳性对照药物对实验大鼠血清中钙离子、磷离子、碱性磷酸酶含量均具有一定的良性调节作用;阳性对照组与杜仲-牛膝组相比,其大鼠血清中钙离子、磷离子含量明显偏高($P<0.05$),提示阳性对照药物对实验大鼠血清中钙离子、磷离子含量的良性调节优于杜仲-牛膝合用;与杜仲-牛膝组相比,杜仲组、牛膝组大鼠血清中碱性磷酸酶含量均明显偏高($P<0.05$),杜仲-牛膝合用对血清中碱性磷酸酶的调节作用优于杜仲、牛膝单独使用。见表 1。

表 1 试验各组对去势大鼠血清 E₂、钙离子、磷离子、碱性磷酸酶和 BMD 的影响

($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	BMD(g/cm ²)	E ₂ (pg/mL)	血钙(mmol/L)	血磷(mmol/L)	血碱性磷酸酶(U/L)
正常对照组	0.280±0.008	23.41±2.05	2.32±0.14	1.79±0.18	28.17±4.09
模型组	0.266±0.006**	9.95±1.12**	2.16±0.13**	1.35±0.20**	49.75±4.56*
假手术组	0.282±0.006	22.90±1.77	2.30±0.18	1.81±0.20	28.08±4.36
杜仲组	0.272±0.006 ^{ΔΔ}	11.22±0.93	2.21±0.12 ^Δ	1.70±0.18 ^Δ	39.50±2.94 [#]
牛膝组	0.274±0.008 ^{ΔΔ}	11.41±1.04 ^Δ	2.21±0.06 ^Δ	1.68±0.13 ^Δ	38.75±5.43 [#]
杜仲-牛膝组	0.277±0.005 ^{ΔΔ}	12.10±1.12 ^Δ	2.23±0.09 ^Δ	1.75±0.12 ^Δ	31.67±4.02 ^Δ
阳性对照组	0.278±0.007 ^{ΔΔ}	10.07±1.41	2.25±0.16 [#]	1.75±0.25 [#]	33.75±5.64 ^Δ
F 值	8.122	219.89	11.11	84.51	33.74

注:与正常对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$,与模型组比较: $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$,与杜仲-牛膝组比较: $\#P<0.05$ 。

4 讨论

在近 30 年的临床工作中发现围绝经期患者主以肾虚为要。对绝经后骨质疏松常以杜仲、牛膝补益肝肾强筋健骨,且疗效明显。中医学认为绝经后骨质疏松的病因病机为肾精亏虚,绝经后肾气衰退,骨髓化生乏源,日久累及元气亏虚,该病根本病因是肾虚,历代医家基本达成了肾虚为本的共识^[9]。

临床上采用中医辨证论治,证型可分为:肝肾亏虚型、脾肾阳虚型、气滞血瘀型,最常见的证型为肝肾亏虚型,中医根据“肾主骨”的理论,故中医在预防和治疗本病是在辩证施治的基础上多选用滋补肝肾、强筋壮骨的要药。

杜仲、怀牛膝均有补肾健骨的作用。如《本草会言》:“腰膝之痛,非杜仲不除…补肝益肾,诚为要药。”《别录》认为“牛膝益精、填骨髓,除腰痛。”牛

膝还有活血通经之特点,《医学衷参西录》曰:“牛膝为补益之品而善引气血下注,故善治肾虚腰痛,或腿痿不能任地。”^[9]现代药理学研究表明:怀牛膝水煎液能显著增加骨质疏松大鼠的骨矿质,增加有机质的含量,提高BMD^[10]。牛膝脱皮甾酮能明显促进原代培养去卵巢大鼠骨髓间充质干细胞的增殖^[11],改善BMD的降低,从而显著改善去卵巢骨质疏松大鼠骨组织的生物力学特性,增加骨小梁骨量,延缓小梁变细、变稀,增加成骨的作用,从而有效地抗骨质疏松^[12]。杜仲具有补肝肾、强筋骨、降血压、安胎等功效。在《神农本草经》中被列为上品,《神农本草经》:“杜仲补中益精气、坚筋骨。久服轻身耐老”。《本草会言》:“腰膝之痛,非杜仲不除…补肝益肾,诚为要药”,被历代医药学家所重视。杜仲在中医药中一直被用作防治骨质疏松症的良药,且具有类雌激素样作用,可提高去势大鼠血清中E₂含量,进而有效地阻止大鼠去势引起的骨丢失,并且未发现副作用^[13]。绝经后骨质疏松属于原发性骨质疏松的I型,都属于退行性的骨质疏松症,绝经后的妇女雌激素水平迅速减少致使骨量丢失加快、骨的微化结构退化,使骨的脆性增加,从而导致全身骨骼疼痛或髌、膝盖、腕关节疼痛^[14-15]。BMD是诊断骨质疏松症的主要定量指标^[16],有研究对肾虚者和非肾虚者进行骨含量测定,发现肾虚患者的尺骨、桡骨的骨含量均显著低于同龄的健康人,肾虚可影响钙、磷代谢,进而使BMD下降,发生骨质疏松症^[17]。如若能及时干预血清钙离子、磷离子浓度,提高BMD,则可缓解患者疼痛,控制病情的发展。大量临床实践和实验研究表明中药在治疗和防治绝经后骨质疏松方面具有确凿疗效且副作用小,能减轻骨痛,提高钙离子、磷离子、BMD,提高患者生活质量^[18-19]。

本研究采用切除雌性大鼠卵巢的方法造成类似绝经后骨质疏松大鼠模型,观察阳性对照组、杜仲组、牛膝组、杜仲-牛膝组对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗作用。结果显示用药各组BMD值、血钙、血磷均有不同程度的升高,且杜仲-牛膝组较杜仲组、牛膝组均明显升高。提示与杜仲、牛膝单味药相比,杜仲-牛膝药对改善去卵巢大鼠的BMD、血钙、血磷作用更明显,且与阿法骨化醇作用相当。用药各组碱性磷酸酶有不同程度的降低,杜仲-牛膝药对改善去卵巢大鼠的血清碱性磷酸酶作用不明显,弱于阿法骨化醇。杜仲-牛膝配伍可有效治疗因雌激素

素下降导致的骨质疏松;疗效优于单纯使用杜仲、牛膝;同时此实验研究也证实了杜仲-牛膝药对的科学合理性,为绝经后骨质疏松的妇女的治疗提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Yohann Bala, Delphine Farlay, Roland D Chapurlat, et al. Modifications of bone material properties in postmenopausal osteoporotic women long-term treated with alendronate [J]. Eur J Endocrinol, 2012,165(10):647-655.
- [2] 林晓生,王海燕,王健,等.疏肝益肾汤治疗绝经后骨质疏松的中长期疗效评价[J].中国骨质疏松杂志,2011,17(12):1 095-1 097.
- [3] Englund U, Nordstrom P, Nilsson J, et al. Physical activity in middleaged women and hip fracture risk: the UFO study[J]. OsteoporosInt, 2011,22(2):499-505.
- [4] Lindsay R. Hormones and bone health in postmenopausal women [J]. Endocrine, 2004,2(3):223-230.
- [5] Schairer C, Lubin J, Troisi R, et al. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk [J]. JAMA,2000,283(4):485-491.
- [6] 宋敏,李晶.大鼠骨质疏松模型的复制方法及意义[J].当代医学,2010,16(15):16-18.
- [7] 文天林,孙天胜,王玲.骨质疏松症的药物治疗[J].人民军医, 2010,53(9):666-668.
- [8] 谢雁鸣,赵晋宁,丁会,等.强骨胶囊抗去势大鼠骨质疏松症的实验研究[J].中国医药科技,2000,7(3):151-152.
- [9] 李沛,潘富伟,陈玉琦.骨质疏松症内服中药使用情况文献分析[J].光明中医,2014,29(9):19-20.
- [10] 高昌琨.怀牛膝对维甲酸所致大鼠骨质疏松防治作用的实验研究[J].基层中药杂志,2001,15(2):9-11.
- [11] 董群伟,陈志峰,孙奋勇.牛膝脱皮甾酮促进去卵巢大鼠间充质干细胞的增殖[J].广东医学,2010,31(1):61-63.
- [12] 董群伟,陈志峰,陈少青.牛膝脱皮甾酮对去卵巢大鼠骨质疏松的治疗作用[J].广东药学院学报,2009,25(5):512-515.
- [13] 潘亚磊,翟远坤.杜仲防治骨质疏松症的研究进展[J].化学与生物工程,2013,30(7):6-8.
- [14] 马俊岭,郭海英,侯钦午.绝经后骨质疏松症的病因病理[J].淮海医药,2010,28(5):3-4.
- [15] 谢雁鸣,宇文亚.原发性骨质疏松症中医临床实践指南(摘录)[J].中华中医药杂志,2012,27(7):1 886-1 890.
- [16] 王洪复.骨质疏松症的诊断[J].国际内分泌代谢杂志,2006,26(4): 285-288.
- [17] 彭丽红,马改霞.骨质疏松症的中医药治疗研究进展[J].西北药学杂志,2013,28(1):98-101.
- [18] 严红梅,张振海.中药治疗骨质疏松症的研究进展 [J]. 中草药, 2014,45(8):1 174-1 178.
- [19] 赵丕文,牛建昭.中药及其活性成分对绝经后骨质疏松症的治疗及其作用机制[J].中国中药杂志,2012,37(12):1 693-1 697.

(本文编辑 杨 瑛)