

·方药研究·

本文引用:林 静,张 洁,陈 燕.补肾药膳方对绝经后骨质疏松症模型大鼠 CTX-I 指标及骨组织形态的影响[J].湖南中医药大学学报, 2018,38(4):389-392.

补肾药膳方对绝经后骨质疏松症模型大鼠 CTX-I 指标及骨组织形态的影响

林 静¹,张 洁¹,陈 燕^{2*}

(1.湖南中医药大学护理学院,湖南 长沙 410208;2.湖南省中医药研究院附属医院,湖南 长沙 410006)

[摘要] **目的** 观察补肾药膳方对绝经后骨质疏松症(PMOP)模型大鼠 I 型胶原 C 端肽(CTX-I)指标及骨组织形态的影响。**方法** SPF 级雌性 SD 大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、补肾药膳方高剂量组、补肾药膳方低剂量组、骨疏康组,每组 10 只。除正常组、假手术组外,其他组大鼠进行双侧卵巢摘除,适应性饲养 15 d 后,分组干预 12 周,ELISA 法检测血清中骨代谢标志物 CTX-I 浓度表达情况,HE 染色镜下观察骨组织形态。**结果** 与正常组和假手术组比较,模型组、补肾药膳方高、低剂量组、骨疏康组大鼠血清 CTX-I 浓度均升高($P<0.05$);与模型组比较,补肾药膳方高剂量组、低剂量组、骨疏康组血清 CTX-I 浓度显著降低($P<0.05$),低剂量组血清 CTX-I 浓度虽低于高剂量组、骨疏康组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。在骨形态上,模型组骨小梁明显变细,出现明显断裂,有扭曲,形态结构差,骨小梁间的间隙增大,骨髓腔扩大融合明显,高剂量组、低剂量组与骨疏康组均能一定程度上改善骨形态。**结论** 补肾药膳方各剂量对 CTX-I 浓度的影响与骨疏康颗粒疗效相当,一定程度能降低骨吸收标志物水平,减少骨吸收,改善骨形态,缓解骨质疏松,但在剂量精确方面仍可待将来研究。

[关键词] 补肾药膳方;绝经后骨质疏松;CTX-I 指标;骨形态

[中图分类号]R285.5;R681 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.04.006

Effect of Reinforcing Kidney Medicinal Diet on CTX-I Index and Bone Morphology in Postmenopausal Osteoporosis Model Rats

LIN Jing¹, ZHANG Jie¹, CHEN Yan^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of reinforcing kidney medicinal diet on CTX-I index and bone morphological changes in postmenopausal osteoporosis (PMOP) model rats. **Methods** SPF female SD rats were randomly divided into normal group, sham operation group, model blank group, high dose group, low dose group and Gushukang group, with 10 rats in each group. Except normal group and sham operation group, other rats were ovariectomized. After 15 days of adaptive feeding, the rats were given intervention treatment for 12 weeks. The expression of CTX-I in serum was detected by ELISA method. Bone morphology was observed by HE staining. **Results** Compared with the normal group and sham-operation group, the concentration of CTX-I in model blank group, high dose group, low dose group, Gushukang group increased significantly ($P<0.05$). Compared with the model blank group, the concentration of CTX-I in high dose group, low dose group and Gushukang group decreased significantly ($P<0.05$). CTX-I in low dose group was lower than the high dose group and Gushukang group, but the difference between them was not significant ($P>0.05$). In the bone morphology, the trabecular bone of the model blank group was significantly thinner, with obvious fracture, twisting, poor shape and structure, increased gap between the trabecular bone and bone marrow cavity. The bone marrow cavity expanded and merged obviously. The high dose group, the low dose group and the Gushukang group could improve bone morphology to some extent. **Conclusion** The effect of reinforcing kidney medical diet on the concentration of CTX-I is comparable with that of Gushukang granules. It could reduce the level of bone resorption markers, reduce bone resorption, improve bone shape and alleviate osteoporosis to a certain extent. The

[收稿日期]2018-03-04

[基金项目]湖南省科技厅课题(2015SK20168);湖南中医药大学 2017 年一方研究生科研创新项目(YF201712)。

[作者简介]林 静,女,在读硕士,研究方向:中医老年护理。

[通讯作者]*陈 燕,女,硕士,主任护师,教授,E-mail:969639737@qq.com。

accuracy of dose should be further studied.

[**Keywords**] reinforcing kidney medicinal diet; postmenopausal osteoporosis; CTX-I index; bone morphology

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是以骨量降低和骨结构退化为特点,危害中老年健康的全身骨代谢疾病^[1]。妇女绝经后,导致骨质疏松的主要原因是天癸渐竭,肾气渐衰,骨髓化生无源,致筋骨不坚,髓枯骨脆^[2]。因此研究抗骨质疏松药物可以从补肾药物着手。WHO明确提出治疗骨质疏松症应从补钙、运动与饮食方面着手,其中饮食疗法是防治骨质疏松的重要方案。随着中医理论的发展,有学者根据“肾主藏精”理论进行实验研究,认为补肾中药对OP各个病理环节有着一定的调节作用,杜仲、牛膝等中药对抗骨质疏松作用有增强趋势^[3-4]。目前有研究认为^[5-6]药膳方能够有效地防治绝经后骨质疏松,操作便利,既可治疗和保健,又可调养身心。为进一步探讨补肾药膳方在防治绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)中的作用,本实验采用经过专家认定的补肾药膳方治疗绝经后骨质疏松模型大鼠,观察其对大鼠血清I型胶原C端肽(CTX-I)浓度及骨组织形态的影响,探讨其对绝经后骨质疏松模型大鼠的干预作用。

1 材料与方

1.1 动物及分组

SPF级雌性SD大鼠60只(4~5月龄,未曾交配,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司),体质量200~220 g,所有SPF级大鼠喂养在恒温恒湿的清洁环境中,环境温度为(25±1)℃,湿度为70%,每天12小时光照/黑暗,进食大鼠标准饲料和净化水。对每只大鼠进行编号,按随机数字表进行分组,共分为6组,每组10只。第一组为正常组,第二组为假手术组,第三组为模型组,第四组为补肾药膳方高剂量药膳组,第五组为补肾药膳方低剂量药膳组,第六组为骨疏康颗粒组,所有动物均适应性饲养1周。

1.2 实验药物

实验组:补肾药膳方食材:狗肉200 g,羊肾150 g,山药30 g,枸杞30 g,由湖南省中医药研究院附属医院提供。将上述食材清水洗净后放入砂锅,食材再加水2 000 mL,武火煮沸后,改用文火煲1 h,取汤汁,食材再加水煎煮1次,合并两次煎煮汤汁,加热浓缩至100 mL备用,为高剂量。

对照组:骨疏康颗粒,辽宁康辰药业有限公司,批准文号:国药准字Z20033255。成分是淫羊藿、熟地黄、骨碎补、黄芪、丹参、木耳、黄瓜籽,20 g/d用于治疗肾虚,气血不足所致的中老年骨质疏松症,

伴有腰脊酸痛,足膝酸软,神疲乏力。

药膳及药物准备均在湖南省中医药研究院附属医院中心实验室完成。

1.3 PMOP模型的建立

所有动物适应性饲养1周后进行造模,除正常组外,模型组、高剂量药膳组、低剂量药膳组、骨疏康组均用10%水合氯醛(0.4 mL/100 g),腹腔注射麻醉大鼠,无菌条件下从下腹部进入腹腔,完整摘除双侧卵巢,切下卵巢送病理科经病理切片证实卵巢正常。假手术组与模型组处理相同,但不切除双侧卵巢,仅切除卵巢周围等体积的脂肪。对进行手术的大鼠仔细止血,逐层缝合,并用青霉素(0.8 mL/250 g)腹腔注射3 d进行抗感染治疗。

1.4 动物灌胃、观察、取材

造模15 d后灌胃12周,正常组和假手术组、模型空白组用一般饲料饲养,药膳组用补肾药膳方灌胃,骨疏康颗粒组用骨疏康灌胃。阳性对照组和实验组用药剂量按人体给药剂量的6.0倍计算^[7]。高剂量组:浓缩补肾药膳方汤汁100 mL,每mL含药膳4.1 g,折算大鼠的给药剂量为41 g/kg·d;低剂量组:在高剂量组的基础上等比递减,每mL含药膳2.05 g,折算大鼠的给药剂量为20.5 g/kg·d;骨疏康颗粒组:骨疏康颗粒成人1 d为20 g,折算大鼠的给药剂量为2 g/kg·d。

实验过程中大鼠出现的死亡情况:模型组灌胃致死2只,高剂量组灌胃致死1只,标本采集前共57只。大鼠在最后一次灌胃后禁食24 h,处死后立即取材。用10%水合氯醛腹腔注射进行麻醉(0.4 mL/100 g),麻醉后用碘伏消毒手术部位,消毒手术剪剪开腹腔,采集标本。

用一次性采血针采集静脉血。暴露腹主动脉沿下腔静脉方向采血,取血量:8 mL/只,血液在不含抗凝剂的试管中低温(4℃)静置4 h后低温离心,3 000 g×30 min,取上层血清,按组别分装,于-80℃超低温冰箱保存,用来检测CTX-I。

1.5 实验方法

采用ELISA法检测大鼠血清I型胶原C端肽(CTX-I)的含量水平。实验前将试剂盒及待测样本放置室温平衡20 min。分别设空白孔、标准孔、待测样品孔,空白孔加样品稀释液100 μL,余孔分别加标准品或待测样品100 μL。37℃孵育90 min弃去液体,甩干,每孔加入生物素化抗体工作液100 μL。37℃温育1 h,弃去孔内液体,甩干并用配制好的

浓缩洗涤液洗板3次,每孔加入酶结合工作液 100 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min,弃去孔内液体,甩干并洗板5次。每孔加底物溶液 90 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育 15 min,当标准孔显示明显梯度时,每孔加终止液 50 μL ,终止反应。用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度(OD值)。以标准品浓度为横坐标,OD值为纵坐标,绘制标准曲线,得出标准方程,根据方程计算每个样本的浓度。病理切片统一采用光镜下采图并分析图像。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,剂量数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,符合正态分布者采用单因素方差分析及多重比较,不符合正态分布者采用秩和检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EIISA 法检测各组大鼠血清 CTX-I 浓度表达

与正常组和假手术组比较,模型组(高、低)剂量组,骨疏康组 CTX-I 浓度均升高($P<0.05$),与模型组比较,补肾药膳方高剂量组、补肾药膳方低剂量组、骨疏康组 CTX-I 浓度均降低($P<0.05$);补肾药膳方高、低剂量组、骨疏康组 CTX-I 浓度比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠血清 CTX-I 浓度表达 ($\bar{x}\pm s$, ng/mL)

| 组别 | CTX-I 浓度 |
|-----------|-------------------------------|
| 正常组 | 16.26 \pm 2.81 |
| 假手术组 | 16.78 \pm 1.41 |
| 模型组 | 25.73 \pm 2.19 $^{\Delta}$ |
| 补肾药膳方高剂量组 | 20.57 \pm 0.89 $^{\Delta*}$ |
| 补肾药膳方低剂量组 | 19.93 \pm 1.01 $^{\Delta*}$ |
| 骨疏康组 | 20.06 \pm 2.37 $^{\Delta*}$ |
| F 值 | 27.15 |
| P 值 | 0.000 |

注:与正常组和假手术组比较, $\Delta P<0.05$;与模型组比较, $*P<0.05$ 。

2.2 大鼠右股骨石蜡切片 HE 染色显微形态

正常组:光镜显示骨小梁排列整齐、规则并连接成网,形态结构完整,骨髓腔大小正常。假手术组:光镜显示骨小梁排列整齐、规则并连接成网,形态结构完整,骨髓腔大小正常,与正常组类似。模型组:骨小梁明显变细,出现明显断裂,有扭曲,形态结构差,骨小梁间的间隙增大,骨髓腔扩大融合明显。高剂量组:与模型组比较,光镜显示骨小梁排列稍微规则,断裂少,部分区域骨小梁间的间隙增大小于模型组,骨髓腔稍有扩大。低剂量组:与模型组比较,光镜显示骨小梁排列规则,断裂很少,形态结构接近正常,骨髓腔大小较正常。骨疏康组:与模型组比较,光镜显示骨小梁排列规则,断裂很少,形态结构接近正常,骨髓腔大小较正常,与低剂量组类似。见图 1。

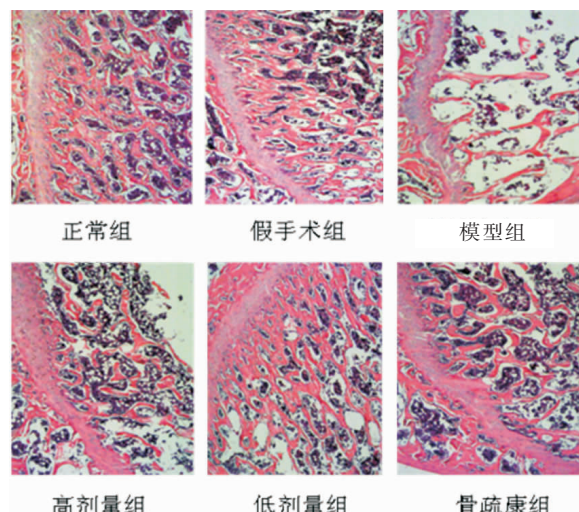


图 1 各组大鼠右股骨显微结构(HE, $\times 400$)

3 讨论

骨质疏松症是现代医学名,在中医古文献中并无“骨质疏松”病名。但骨质疏松所表现的腰背疼痛、头眼昏花、易发生骨折等临床表现及发病机制与中医学中“骨枯而髓减,发为骨痿”论述极为相似,因此通常将此病认为是“骨痿”“骨痹”的范畴^[8]。《黄帝内经》谓骨痿“骨枯而髓减”,谓骨痹“肾脂枯不长”,并未描述二者之间的不同。《金匱要略》中认为骨痹是骨痿的进一步发展。张从正从临床表现说明了两者的不同,认为关节疼痛为主属于骨痹,软弱无力属于骨痿,指出骨痿与骨痹应当区分来论治,提出以其寒热区别病之新旧。这些论述对于进一步认识骨质疏松与骨痿、骨痹间的关系均有一定的参考价值。目前大多数研究者认为绝经后骨质疏松仍旧属于“骨痿”的范畴^[9-10]。

目前 PMOP 公认的发病机制主要是肾虚^[11-12]。中医学认为 PMOP 的发生与肾脏关系密切,肾藏精,为先天之本,主骨生髓,髓以养骨,骨的生发依赖于肾气的滋养。“肾气热,则腰脊不举,骨枯而髓减,发为骨痿”,“……肾病则骨极,牙齿苦痛,手足疼,不能久立,屈伸不利……”,“髓者,肾精所生,精足则髓足,髓在骨内,髓足则骨强……”,以上中医理论均认为肾精气盛衰与骨强劲与否有着根本的联系,若肾虚,骨髓不能濡养骨骼,骨骼软脆无力,出现疼痛,引发骨质疏松。肾主宰着人体的生长发育、生殖与女性的月经潮止,女子二七而潮,七七而绝,说明随着年龄的增长肾精气由盛转衰,骨骼得不到充分的濡养,易造成骨质丢失,引发骨质疏松。因此补肾是防治骨质疏松的基本立足点^[13]。

本研究为保障实验同质性,经咨询专家对食材予以组方:狗肉,羊肾,山药,枸杞。狗肉为主药,狗肉味咸、酸,性温,有温肾壮阳,助气力、补血脉的功效,

且含有丰富的蛋白质,容易吸收;羊肾为臣药,羊肾味甘,性温,补肾气、益精髓;山药和枸杞各为佐使药,山药性味甘、平,补脾养胃,益肾涩精;枸杞性味甘、平,养肝滋肾。以动物类补肾药为主,植物类补肾药为辅,相互补充,增强疗效,全方共奏补肾强骨生髓之效。阳性对照组选取骨质疏松进行灌胃,有骨质疏松颗粒的前期研究表明其能有效治疗 OP,是常用的临床经验用方^[14]。

大鼠的骨变化与人类有较多相似之处,目前公认与临床最接近的绝经后骨质疏松动物模型是去卵巢大鼠模型。去势后的大鼠雌激素缺乏致骨转换率增加,成骨速率小于骨吸收速率,骨代谢平衡被破坏,单位体积内骨组织量减少^[15]。所以本研究对雌性大鼠适应性饲养后切除大鼠双侧卵巢,导致大鼠雌激素水平降低,模拟由于雌激素水平缺乏而引起 PMOP 的临床特征,实质是复制妇女绝经后骨质疏松模型。本研究显示,造模 3 个月后,与正常组和假手术比较,模型组、高剂量组、低剂量组、骨疏康组血清 CTX-I 浓度均升高($P<0.05$);各组实验大鼠股骨在 HE 染色光镜下形态也发生了变化,骨小梁明显变细,出现明显断裂,有扭曲,形态结构差,骨小梁间的间隙增大,骨髓腔扩大融合明显,认为绝经后骨质疏松症大鼠造模成功。

在 PMOP 的诊断、治疗过程中,血清骨代谢指标变化早于 BMD 的改变,有助于早期发现 OP 和风险评估,是其诊断、判断疗效和调整治疗方案有效而简便的方法^[16]。近年,作为骨吸收指标 I 型胶原降解时产生的末端肽及吡啶交联物备受关注,I 型胶原被降解量较少,当骨代谢正常时,血中能检测到的含量极微^[17]。研究表明^[18]I 型胶原 C 端肽(CTX-I)是代表性较强的骨吸收标志物之一,当破骨细胞活性增强时,I 型胶原降解也增高,导致骨转换加快,血中 CTX-I 水平明显升高。本实验研究发现:与模型组比较,高剂量组、低剂量组、骨疏康组血清 CTX-I 浓度显著降低($P<0.05$),补肾药膳方、骨疏康颗粒干预可降低 PMOP 大鼠血清 CTX-I 浓度。其中低剂量组血清 CTX-I 浓度虽低于高剂量组、骨疏康组,但差异不存在统计学意义($P>0.05$),可认为补肾药膳方各剂量之间对 CTX-I 浓度无明显影响,与骨疏康颗粒疗效相当。

4 小结

随着我国进入老龄化社会,OP 患者越来越多,合并骨折等并发症发病率不断增加,已成为老年人尤其是绝经后女性常见的疾病之一,严重影响了其活动能力和生活质量^[19]。女性绝经后,雌激素水平急剧下降,骨重建失衡,加速骨量流失,导致骨质疏松。而 PMOP 发病机制复杂,治疗方法众多,目前应用的西药虽能取得良好的效果,但副作用较多,如胃肠

道不良反应、肝肾毒性等,甚至可产生耐药性,费用也较昂贵^[20],因此寻求更为安全、有效、经济适用的防治方法是临床亟待解决的问题。本实验以中医“肾主藏精”理念为引导,依据“药食同源”观点,用经过专家认定的补肾药膳方干预 PMOP 模型大鼠,观察其大鼠血清 CTX-I 浓度及骨形态的影响,为以后临床上选择科学有效的防治方案提供参考依据,而补肾药膳方的食、药材具有物美价廉、方便易取、易烹调、口感好的优点,值得提倡。

参考文献:

- [1] 薛 延.骨质疏松症防治指南[M].北京:人民卫生出版社,2008:3-13.
- [2] 张 瑶,张维丽,马 威,等.补肾健脾汤对去卵巢骨质疏松模型大鼠骨代谢指标的影响[J].中华中医药杂志,2016,31(3):864-867.
- [3] 邓洋洋,孙 鑫,李 佳,等.去卵巢骨质疏松症模型大鼠股骨、肾、下丘脑 smurf1 信号转导蛋白的活性变化研究[J].中华中医药杂志,2014,29(2):2574-2577.
- [4] 高卫辉,向艳华,刘 云,等.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[J].湖南中医药大学学报,2016,36(6):43-46.
- [5] 许东晨.中医食疗对老年骨质疏松症患者临床症状和骨密度影响研究[J].中医临床研究,2014,6(33):101-102.
- [6] 林 静,梁百慧,方 森,等.食疗对肾虚型骨质疏松症作用的研究进展[J].护理研究,2017,31(13):1561-1563.
- [7] 魏 伟,吴希美.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2010:7.
- [8] 申 浩,魏 戎,谢雁鸣,等.绝经后骨质疏松症骨折危险因素及中医症状相关性研究[J].中国中西医结合杂志,2017,37(1):50-56.
- [9] 鲁尚德.骨质疏松症病因病机研究概况[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(38):44-45,51.
- [10] 秦 臻,任艳玲.从“精不足者补之以味”探讨绝经后骨质疏松症的防治[J].中医杂志,2017,58(12):1021-1023.
- [11] 吴鑫宇,李 冀.骨质疏松症的中医临床方药研究进展[J].中医药学报,2013,41(4):128-130.
- [12] 陈 易,王明三,徐婉梨.绝经后骨质疏松症证型探讨[J].辽宁中医杂志,2017,44(2):273-275.
- [13] 宋 敏,李泽佳,董万涛,等.基于“补肾法”治疗原发性骨质疏松症的研究述评[J].中国骨质疏松杂志,2014,20(8):973-977.
- [14] 郭文清.骨疏颗粒对骨质疏松大鼠骨代谢指标及炎症因子的影响[D].昆明:云南中医学院,2016.
- [15] 梁文娜,李西海,李亚婵,等.基于证素辨证探讨绝经后骨质疏松症中医病理状态辨识[J].中华中医药杂志,2016,31(1):72-74.
- [16] 张萌萌,张艳会,毛未贤,等.1 084 例女性 TRACP、CTX-1、BALP、BGP、钙磷代谢指标与 BMD 相关性[J].中国骨质疏松杂志,2013,19(9):902-906.
- [17] 杨永红,鲁 力,夏凤琼,等.老年血清骨代谢物骨钙素、I 型胶原 C 端肽、骨源性碱性磷酸酶与骨密度的相关性[J].中国老年学杂志,2016,36(20):5112-5113.
- [18] THUDIUM C S, MOSCATELLI I, FLORES C, et al. A Comparison of osteoclast-rich and osteoclast-poor osteopetrosis in adult mice sheds light on the role of the osteoclast in Coupling bone resorption and bone formation [J]. Calcified Tissue International, 2014, 95(1): 83-93.
- [19] 江 婷,方朝晖.中医药治疗骨质疏松症研究现状及进展[J].中医药临床杂志,2014,26(5):543-545.
- [20] 王柄棋,孙雨晴,陈 翔,等.绝经后骨质疏松症药物治疗的现状与思考[J].中国骨质疏松杂志,2017,23(6):818-823.