

补肾方对去卵巢大鼠腰椎骨形态计量学的影响

卢建华¹, 王维佳¹, 陈明涛¹, 华江¹, 万蕾², 何剑星³

(1. 浙江中医药大学附属第一医院, 浙江 杭州 310006; 2. 浙江省上虞市中医院, 浙江 上虞 312000; 3. 中国人民解放军武装警察部队浙江总队杭州医院, 浙江 杭州 310053)

摘要 目的: 研究补肾方(左归丸、右归丸)对去卵巢大鼠腰椎骨形态计量学的影响, 为补肾方治疗骨质疏松症提供有力的实验依据。方法: 将成年 SD 大鼠 50 只, 随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组、左归丸组、右归丸组, 每组 10 只。造模后第 13 周开始给药, 正常对照组、模型组予蒸馏水灌胃, 阳性对照组、左归丸组、右归丸组分别予倍美力水溶液、左归丸煎剂和右归丸煎剂灌胃, 给药 12 周末检测第 2 腰椎骨形态计量学指标。结果: 左归丸、右归丸组与模型组比较, 腰椎形态计量学指标明显改善($P < 0.05$), 与阳性对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 补肾药物左归丸组与右归丸组比较, 差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 补肾方能够抑制骨吸收, 减少骨量的丢失, 对去卵巢大鼠骨质疏松症具有一定的治疗作用。

关键词 骨质疏松症 左归丸 右归丸 去卵巢大鼠 骨组织形态计量学

Effect of BuShenfang on morphometry of lumbar vertebra in Ovariectomized Rats LU Jian-hua*, WANG Wei-jia, CHEN Ming-tao, et al. * The first Hospital affiliated to Zhejiang Traditional Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang China

ABSTRACT Objective: To study the Effect of BuShenfang on morphometry of lumbar vertebra in Ovariectomized Rats, also to provide experimental evidence for treating Osteoporosis. **Methods:** The 50 Ovariectomized SD Rats were randomly divided into normal control group, model group, positive control(OVX) group, Zuoguiwan and Youguiwan group, each group with 10 Rats, after 12 weeks' routine feed, normal control group and model group which were intragastric administration with pure water, positive control group which was intragastric administration with conjugated estrogens water - solution, Zuoguiwan group which was intragastric administration with zuoguiwan decocta, Youguiwan group which was intragastric administration with youguiwan decocta, all the rats were intragastric administration following the schedule 12 weeks, then detect the index of morphometry of Second lumbar vertebra. **Results:** Compared with model group, Bushenfang (including zuoguiwan and youguiwan) can obviously improve index of morphometry of lumbar vertebra ($P < 0.05$). while there was no statistical significance when compared with positive control group. Meantime, the effect of zuoguiwan group is similar to the youguiwan group ($P > 0.05$). **Conclusion:** Bushenfang (including zuoguiwan and youguiwan) can obviously improve index of morphometry of lumbar vertebra, decrease the bone resorption, prevent the loss of bone, strengthen bone Vertebrae, which can prevent and treat osteoporosis. Meantime, the effect of zuoguiwan group is similar to the youguiwan group.

Key words Osteoporosis, zuoguiwan, youguiwan, Ovariectomized Rats, morphometry

骨质疏松症 (Osteoporosis, OP) 是一种以骨量减少和骨组织显微结构退化为特征的, 继而导致脆性增加和骨折危险性增高的系统性骨骼性疾病。中医认为骨质疏松症属“骨痿”范畴, 肾虚是其发生的根本原因^[1], 目前多采用补肾治疗。左归丸和右归丸是张仲景所创的经典补肾方剂, 分别具有滋阴补肾、填精益髓和温补肾阳之功、填精养血之效。本课题旨在研究补肾方对去卵巢大鼠腰椎骨形态计量学指标的影

响, 为补肾法治疗骨质疏松症提供实验依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 雌性 12 周龄 SD 大鼠 50 只, 体质量 (300 ± 20)g, 清洁级, 生产许可证号均为 SCXK(沪)2003-0003, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。

1.2 实验药物 左归丸煎剂、右归丸煎剂: 药物由浙江中医药大学第三附属医院提供, 并由浙江中医药大学药物研究所煎制, 含生药分别为 $1.575 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.665 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。倍美力: 美国惠氏艾尔斯特制药公司艾尔斯特药厂生产, 产品批号 0502090, 水溶液浓度

为 $9.375 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.3 主要仪器 徕卡 SM2500 重型切片机(德国); 奥林巴斯 IX71 型倒置式荧光显微镜(日本)。

2 实验方法

2.1 分组方法 将 50 只 12 周龄的雌性 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组、左归丸组、右归丸组,每组各 10 只。

2.2 造模方法 常规无菌操作,去除模型组、阳性对照组、左归丸组、右归丸组大鼠双侧卵巢;正常对照组大鼠仅予以单纯剖腹后立即关闭。造模后的前 3 d,每天每只给青霉素 4 万 U 肌肉注射,以预防感染。术后大鼠分笼常规饲养 12 周。

2.3 给药方法 大鼠造模后第 13 周起开始给药,正常对照组、模型组每天以蒸馏水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃;阳性对照组每天用浓度为 $9.375 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的倍美力水溶液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃;左归丸组、右归丸组每天分别用 $1.575 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.665 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的左归丸、右归丸煎剂 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃。整个灌胃过程持续 12 周。

2.4 观察指标 大鼠处死前第 14 天和第 4 天分别腹腔注射盐酸四环素($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)进行标记。大鼠处死后,切取并分离第 2 腰椎,保留周围少量肌肉,10% 福尔马林浸泡 2 d,流动水冲洗 4 h,经 75%、80%、95% 至纯酒精脱水分别各 2 d,甲基丙烯酸甲酯进行不脱钙包埋,切片切至 $120 \mu\text{m}$,磨片至 $50 \mu\text{m}$,苦味酸品红染色,荧光显微镜观察, Bioquant 骨形态计量分析软件处理。骨形态计量学指标包括:骨小梁厚度(Tb. Th) (μm);骨小梁体积百分比(BV/TV) (%);矿化沉积率(MAR) ($\mu\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$);单位骨小梁周长骨形成率(BFR/BS) ($\mu\text{m} \cdot \text{d}^{-1} \times 100$)。

2.5 统计方法 采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计。各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 q 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 大鼠腰椎平均骨小梁厚度(Tb. Th) 各组 Tb. Th 比较,差异有统计学意义($F = 18.372, P = 0.001$)。组间两两比较:正常对照组与模型组比较($q = 8.33, P = 0.000$)、阳性对照组与模型组比较($q = 2.83, P = 0.007$)、左归丸组与模型组比较($q = 2.85, P = 0.006$)、右归丸组与模型组比较($q = 4.39, P = 0.006$)、正常对照组与左归丸组比较($q = 5.46, P = 0.000$)、正常

对照组与右归丸组比较($q = 3.94, P = 0.000$),差异均有统计学意义;阳性对照组与左归丸组比较($q = 0.04, P = 0.970$)、阳性对照组与右归丸组比较($q = 1.55, P = 0.970$)、左归丸组与右归丸组比较($q = 1.52, P = 1.000$),差异均无统计学意义(见表 1)。

3.2 骨小梁体积百分比(BV/TV) 各组 BV/TV 比较,差异有统计学意义($F = 11.325, P = 0.001$)。组间两两比较:正常对照组与模型组比较($q = 6.57, P = 0.000$)、阳性对照组与模型组比较($q = 4.11, P = 0.000$)、左归丸组与模型组比较($q = 2.85, P = 0.006$)、右归丸组与模型组比较($q = 2.95, P = 0.005$)、正常对照组与左归丸组比较($q = 3.72, P = 0.001$)、正常对照组与右归丸组比较($q = 3.62, P = 0.001$),差异均有统计学意义;阳性对照组与左归丸组比较($q = 1.25, P = 0.216$)、阳性对照组与右归丸组比较($q = 1.15, P = 0.255$)、左归丸组与右归丸组比较($q = 1.00, P = 0.921$),差异均无统计学意义(见表 1)。

3.3 骨小梁矿化沉积率(MAR) 各组 MAR 比较,差异有统计学意义($F = 9.99, P = 0.001$)。组间两两比较:正常对照组与模型组比较($q = 6.32, P = 0.000$)、阳性对照组与模型组比较($q = 2.28, P = 0.030$)、左归丸组与模型组比较($q = 2.81, P = 0.009$)、右归丸组与模型组比较($q = 2.81, P = 0.009$)、正常对照组与左归丸组比较($q = 3.51, P = 0.001$)、正常对照组与右归丸组比较($q = 3.51, P = 0.001$),差异有统计学意义;阳性对照组与左归丸组比较($q = 0.53, P = 0.615$)、阳性对照组与右归丸组比较($q = 0.53, P = 0.627$)、左归丸组与右归丸组比较($q = 0.00, P = 0.986$),差异无统计学意义(见表 2)。

3.4 单位骨小梁周长骨形成率(BFR/BS) 各组 BFR/BS 比较,差异有统计学意义($F = 15.436, P = 0.001$)。组间两两比较:正常对照组与模型组比较($q = 7.85, P = 0.000$)、阳性对照组与模型组比较($q = 3.87, P = 0.000$)、左归丸组与模型组比较($q = 3.71, P = 0.001$)、右归丸组与模型组比较($q = 3.96, P = 0.000$)、正常对照组与左归丸组比较($q = 4.34, P = 0.000$)、正常对照组与右归丸组比较($q = 4.09, P = 0.000$),差异均有统计学意义;阳性对照组与左归丸组比较($q = 0.16, P = 0.876$)、阳性对照组与右归丸组比较($q = 0.09, P = 0.930$)、左归丸组与右归丸组比较($q = 0.24, P = 0.807$),差异均无统计学意义(见表 2)。

表 1 各组 Tb. Th 和 BV/TV 值比较

组别	n	Tb. Th(μm)	BV/TV(%)
正常对照组	10	73.73 \pm 7.42	38.33 \pm 4.92
模型组	10	53.90 \pm 7.65	27.09 \pm 2.61
阳性对照组	10	60.64 \pm 3.96	34.11 \pm 3.61
左归丸组	10	60.73 \pm 2.53	31.97 \pm 4.45
右归丸组	10	64.34 \pm 6.59	32.14 \pm 3.00

表 2 各组 MAR 和 BFR/BS 值比较

组别	n	MAR ($\mu\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$)	BFR/BS ($\mu\text{m} \cdot \text{d}^{-1} \times 100$)
正常对照组	10	0.72 \pm 0.12	13.24 \pm 2.43
模型组	10	1.08 \pm 0.16	18.71 \pm 0.92
阳性对照组	10	0.95 \pm 0.11	16.08 \pm 1.44
左归丸组	10	0.92 \pm 0.13	16.19 \pm 1.57
右归丸组	10	0.92 \pm 0.12	16.02 \pm 0.92

4 讨 论

骨质疏松症属中医“骨痿”^[2]范畴,中医认为引起骨质疏松症的病因有肾虚、脾虚、血瘀,国内医家根据不同病因,采用了补肾、健脾、活血、化瘀等诸多治法。在这诸多治法之中,又多从肾论治,专行补肾之法,且疗效明显^[3]。左归丸和右归丸为张景岳所创之经典方剂,左归丸具有滋阴补肾的功效。山茱萸养肝滋肾,涩精敛汗;山药补脾益阴,滋肾固精;枸杞子补肾益精,养肝明目;龟鹿二胶,为血肉有情之品,峻补精髓,龟板胶偏于补阴,鹿角胶偏于补阳,在补阴之中配伍补阳药,取“阳中求阴”之义,均为臣药。菟丝子川牛膝益肝肾,强腰膝,健筋骨,俱为佐药。诸药合用,共奏滋阴补肾,填精益髓之效。右归丸为温补肾阳之经典方。方中重用熟地补肾填精,配合山药、萸肉、枸杞子、菟丝子、杜仲补肝肾,益精气,肉桂、附子温肾壮阳,鹿角胶补阳填精,当归温润养血,共奏温补肾阳,填精养血之效。

骨组织形态计量学是近年发展的能定量观察和研究骨组织形态及结构的一门体视学技术^[4],通过骨组织形态学计量分析能较客观地反映出骨重建过程骨量的丢失^[5]。Tb. Th 和 BV/TV 为骨形态计量学的静态参数,反映单位面积内骨小梁的连接状况和骨小梁本身的结构特点,高值表明骨结构越优化,从而骨的抗骨折能力越强。本实验证实,去卵巢造模后,模型组大鼠 Tb. Th、BV/TV 较正常对照组大鼠明显降低,说明模型组大鼠骨量明显减少,骨小梁变薄、变细、宽度减少,间隙增大,骨组织退化。应用左归丸煎剂及右归丸煎剂后,Tb. Th 和 BV/TV 较模型组明显

升高,说明补肾方能够明显升高大鼠骨量,改善骨小梁细小、稀疏和三维结构破坏的状况,骨结构优化,抗骨折能力增强。

MAR 和 BFR/BS 是骨形态计量学的动态参数,是最常用来计算骨重建速率的指标^[6]。实验发现,卵巢切除后模型组大鼠的 MAR 和 BFR/BS 较正常对照组显著增加,提示骨转换活跃,骨重建速率加快,骨吸收大于骨形成^[7-8]。应用左归丸和右归丸煎剂后,BFR/BS 和 MAR 显著低于模型组,提示补肾方抑制骨吸收与骨形成,总体上抑制骨吸收大于骨形成,从而降低骨的高转换率,维持骨量的相对平衡,使骨重建失耦连状态得以纠正。

左归丸与右归丸基于“肾主骨”这一理论,分补肾阴、肾阳,使肾精充实,则骨髓化生有源,骨得其养,坚固有力,从而对骨质疏松症起到一定治疗作用。通过本实验发现,左归丸煎剂与右归丸煎剂能够相同程度地改善去卵巢大鼠腰椎骨形态计量学指标,减少骨量的丢失,改善骨质疏松状况,对去卵巢大鼠骨质疏松起到一定的治疗作用。

5 参 考 文 献

- [1] 於文博,张大方,李丽静,等. 补肾中药防治骨质疏松症的研究[J]. 长春中医药大学学报,2008,24(3):262-263.
- [2] 王玲,哈孝贤,于顺禄,等. 强骨丹对去卵巢大鼠骨组织形态计量学的影响[J]. 山东中医杂志,2007,26(8):560-562.
- [3] 高艳虹,高建军,金慰芳,等. 补肾富钙中药对大鼠卵巢辐射损伤所致骨质疏松形态计量学的影响[J]. 上海交通大学学报,2008,28(5):488-491.
- [4] 李全,王立新,卢坚. 健骨二仙提取液对去卵巢大鼠骨形态计量学的影响[J]. 山东医药,2007,47(13):22-23.
- [5] 熊昌盛,吴峰,何凤春,等. 加味二仙汤颗粒剂防治去势大鼠骨质疏松症的实验研究[J]. 赣南医学院学报,2008,28(2):815-817.
- [6] 于顺禄,白仁晓,郭若霖,等. 骨重建过程“四环素活体标记”骨组织形态计量学指标在骨质疏松中的应用[J]. 中国体视学与图像分析,2003,8(12):119-123.
- [7] 陈小砖,李福安,曹亚飞. 续断对大鼠去卵巢骨质疏松的骨形态计量学研究[J]. 中医正骨,2004,16(5):7-9.
- [8] 张娟,李娟,黄少慧,等. 骨灵片对去卵巢骨质疏松大鼠腰椎形态计量学及生物力学的影响[J]. 中华老年学杂志,2008,28(9):833-835.