

益骨口服液对去势大鼠骨质疏松症 外周血清炎症因子的影响

姚新苗¹, 朱胤晟², 平佃辉², 王艳灵²

(1. 浙江中医药大学附属第三医院, 浙江 杭州 310005;

2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要 目的:观察益骨口服液对去势大鼠骨质疏松症外周血清炎症因子的影响。**方法:**将 80 只 SD 大鼠随机分 4 组, 第 1 组(益骨口服液组)、第 2 组(密盖息组)、第 3 组(益骨口服液 + 密盖息组)、第 4 组(生理盐水对照组), 每组各 20 只; 造模后, 分别予益骨口服液、密盖息、益骨口服液 + 密盖息、生理盐水等不同药物灌胃, 运用 ELISA 技术于治疗后第 10 天、第 30 天、第 60 天、第 90 天四个时点测定血清炎症因子 COX-2、PGE2、cAMP 的含量。**结果:**数据经过重复测量的方差分析, 均存在分组效应($P=0.000$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.000$)和时间效应($P=0.000$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.000$), 第 1 组在不同时间点对血清 COX-2、PGE2、cAMP 含量的比较, 差异有统计学意义($P=0.026$ 、 $P=0.039$ 、 $P=0.031$), 在治疗后第 10 天, 第 1 组与第 4 组两组间, 差异无统计学意义($P=0.075$ 、 $P=0.053$ 、 $P=0.056$), 在治疗后第 30 天, 第 1 组与第 4 组两组间比较, 差异有统计学意义($P=0.035$ 、 $P=0.043$ 、 $P=0.021$), 在第 60、90 天, 两组间比较, 差异有统计学意义($P=0.000$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.000$), 在第 10 天、30 天、60 天、90 天, 第 1 组与第 2、3 组比较均无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**益骨口服液能降低去势大鼠外周血清中 COX-2 和 PGE2, cAMP 的含量, 对去势大鼠骨质疏松疼痛具有一定抑制作用, 在一定程度上, 这是其治疗骨质疏松疼痛的作用机制之一。

关键词 骨质疏松症 补肾活血法 益骨口服液 去势大鼠 炎症因子

Effects of Yigu oral liquid on the peripheral Serum Inflammatory factor in ovariectomized rats YAO Xin-miao*, ZHU Yin-sheng, PING Dian-hui, WANG Yan-ling. * The Third Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To observe the effect of Yigu oral liquid by detecting peripheral serum Inflammatory factor in ovariectomized rats. **Methods:** Eighty Female Wistar rats were randomly divided into 4 groups, group 1 (Yigu oral liquid group), group 2 (calcitonin group), group 3 (Yigu oral liquid group + calcitonin group), group 4 (saline control group). The ovariectomized rats were excised in the groups, rats in the group 1 were administered with Yigu oral liquid; rats in the group 2 were administered with calcitonin; rats in the group 3 were administered with Yigu oral liquid group + calcitonin; rats in the group 4 were administered with saline. The rats were killed after treatment, and the peripheral Serum Inflammatory factors of COX-2, PGE2, cAMP were detected at the 10th day, 30th day, 60th day, 90th day respectively. **Results:** Repeated Measures Analysis of Variance (ANOVA) was used in analyzing the contents of COX-2, PGE2, cAMP in the four groups. The analytic result displayed that there were group effect ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$) and time effect ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$). The contents of the group 1 were compared at four different times; there was statistical difference ($P=0.026$, $P=0.039$, $P=0.031$). At the 10th day after treatment, there was no statistical difference between the group 1 and group 4 ($P=0.075$, $P=0.053$, $P=0.056$), at the 30th day after treatment, there was statistical difference between the group 1 and group 4 ($P=0.035$, $P=0.043$, $P=0.021$), at the 60th day and 90th day after treatment, there was significant statistical difference between the group 1 and group 4 ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$). At the 10th day, 30th day, 60th day, 90th day respectively, there was no statistical difference among group 1, group 2 and group 3 ($P>0.05$). **Conclusion:** Yigu oral liquid can reduce content of COX-2 and PGE2, cAMP in the peripheral serum of the ovariectomized rats, in some degree, the osteoporosis pain could be inhibited, and there may be an important therapeutic mechanism in osteoporosis pain.

Key words: Bushen Yigu recipe; Ovariectomized rats; Inflammatory factor

骨质疏松症的主要病机在于“肾虚”与“血瘀”，

前期我们已研究表明益骨汤促进 OB 的增殖作用, 为探索益骨口服液对骨质疏松症多重效应的研究, 根据中医“不荣则痛”、“不通则痛”的理论结合现代药理

研究思路,为了解该复方的镇痛作用,自 2011 年 7 月至 2011 年 12 月,我们运用 ELISA 技术测定血清疼痛炎症因子 COX-2、PGE2、cAMP 的含量变化,旨在观察益骨口服液对骨质疏松疼痛的效应。

1 材料与方法

1.1 实验药物和实验器材 ①益骨口服液:由浙江省中医院中药房提供,由补骨脂、骨碎补、当归、丹参、怀山药等药物组成,制成浓缩水提液,含生药量 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,用于大鼠灌胃治疗。②氯氨酮:上海第一生化药业有限公司生产,批号沪卫药准字(1995)第 001064 号。③大鼠环磷酸腺苷(cAMP)酶联免疫检测试剂盒:美国 R&D 公司。④大鼠环氧合酶-2(COX-2)酶联免疫检测试剂盒:美国 R&D 公司。⑤大鼠前列腺素 E2(PGE2)酶联免疫检测试剂盒:美国 R&D 公司。⑥微量移液器:京君龙实验仪器北京有限公司。

1.2 实验动物 5 月龄雌性 SD 大鼠 80 只,体重 $(200 \pm 10) \text{ g}$;由浙江中医药大学动物实验中心提供,实验动物合格证号:SCXK(沪)20080016,简单随机方法分为 4 组,第 1 组(益骨口服液组)、第 2 组(密盖息组)、第 3 组(益骨口服液+密盖息组)、第 4 组(生理盐水对照组),每组各 20 只。以常规饲料喂养,自由饮水。饲养室保持良好通风,控制室温在 $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$,湿度 63%,噪音 <55 分贝,光照与黑暗时间为每 12 h 交替。

1.3 去势大鼠动物模型的建立 以氯氨酮按 $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔麻醉后,行双侧卵巢切除手术,术后 3 d 肌肉注射青霉素 $4 \times 10 \text{ U}$,预防感染。饲养 12 周后,完成去卵巢骨质疏松症动物模型。

1.4 饲养与给药 造模后将 SD 大鼠以常规饲料喂养 12 周,第 13 周起开始给药:第 1 组给予灌胃益骨口服液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ (含生药量 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),每天 2

次,作为治疗组;第 2 组予肌肉注射密钙息 $1.04 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ 肌肉注射,每周治疗 2 次,作为骨质疏松疼痛密钙息组;第 3 组给予益骨口服液灌胃 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 加肌注密钙息针(用量用法同上组),作为益骨口服液加密钙息组;第 4 组给予单纯生理盐水灌胃作为骨质疏松疼痛组。于治疗第 10 天、第 30 天、第 60 天、第 90 天 4 个时点,每组各处死 5 只大鼠。

1.5 血清中炎症因子含量检测 采用 ELISA 双抗体夹心法,严格按照说明书操作规程,经过加样、温育、洗涤、加酶、显色、测吸光度,绘制吸光度—标准品浓度的标准曲线,根据样品吸光度值计算 PGE2、cAMP、COX-2 含量。

1.6 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件包分别对数据进行重复测量的方差分析法,多重比较采用最小显著差数法(LSD),结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 血清中 COX-2 含量变化 4 组分别在 5 个不同时间点对血清中 COX-2 含量进行重复测量并行方差分析,结果显示其间存在分组效应($F = 3.153, P = 0.000$)和时间效应($F = 4.025, P = 0.000$);第 1 组不同时间点血清 COX-2 含量比较,差异有统计学意义($P = 0.026$),治疗前各组之间差异无统计学意义($P = 0.067$);治疗后第 10 天,第 1 组与第 4 组两组间比较,差异无统计学意义($P = 0.075$);治疗后在第 30 天,第 1 组与第 4 组相比,差异有统计学意义($P = 0.035$);第 60、90 天两组间比较,差异有统计学意义($P = 0.000$);第 10、30、60、90 天,第 1 组与第 2、3 组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);以上说明益骨口服液能降低去势大鼠血清中 COX-2 的含量(表 1)。

表 1 4 组不同时间点对去势大鼠骨质疏松症血清中 COX-2 含量的影响 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$

| 组别 | 例数 | 用药前 | 10 d | 30 d | 60 d | 90 d |
|-------|----|-----------------|----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| 第 1 组 | 20 | 5.43 ± 0.79 | 5.16 ± 0.62 | $4.289 \pm 0.73^{1)}$ | $3.67 \pm 0.075^{2)}$ | $3.21 \pm 0.55^{2)}$ |
| 第 2 组 | 20 | 5.63 ± 0.74 | 4.68 ± 0.45 | 4.590 ± 0.64 | $4.26 \pm 0.91^{1)}$ | $3.92 \pm 0.86^{2)}$ |
| 第 3 组 | 20 | 5.76 ± 0.64 | $4.15 \pm 0.57^{1)}$ | $3.800 \pm 0.60^{1)}$ | $3.22 \pm 0.67^{2)3)}$ | $2.72 \pm 0.46^{2)3)}$ |
| 第 4 组 | 20 | 5.43 ± 0.83 | $5.60 \pm 0.71^{3)}$ | $5.410 \pm 0.56^{3)}$ | $5.70 \pm 0.63^{3)}$ | $5.74 \pm 0.67^{4)}$ |

注 同一时间点上与第 4 组比较,1) $P < 0.05$,2) $P < 0.01$;同一时间点上与第 2 组比较,3) $P < 0.05$,4) $P < 0.01$

2.2 血清 PGE2 含量变化 4 组分别在 5 个不同时间点对血清 PGE2 含量进行重复测量并行方差分析,结果显示其间存在分组效应($F = 316.31, P = 0.000$)和时间效应($F = 414.45, P = 0.000$);第 1 组在不同

时间点血清 PGE2 含量的比较,差异有统计学意义($P = 0.039$);治疗前各组之间比较,差异无统计学意义($P = 0.082$);治疗后第 10 天,第 1 组与第 4 组两组比较,差异无统计学意义($P = 0.053$);治疗后第 30 天,

第 1 组与第 4 组比较,差异有统计学意义 ($P = 0.043$);第 60、90 天两组间比较,差异有显著性统计学意义 ($P = 0.000, P = 0.000$);第 10、30、60、90 天,第 1 组与第 2、3 组比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);说明益骨口服液能降低去势大鼠血清中 PGE2 的含量(表 2)。

2.3 血清中 cAMP 含量变化 4 组分别在 5 个不同时间点对血清中 cAMP 含量进行重复测量并行方差分析,结果显示其间存在分组效应 ($F = 74.51, P = 0.000$)和时间效应 ($F = 112.15, P = 0.000$);第 1 组

不同时间点血清 PGE2 含量比较,差异有统计学意义 ($P = 0.031$);治疗前各组间比较,差异无统计学意义 ($P = 0.075$);治疗后第 10 天,第 1 组与第 4 组两组比较,差异无统计学意义 ($P = 0.056$);治疗后第 30 天,第 1 组与第 4 组比较,差异有统计学意义 ($P = 0.021$);第 60、90 天两组间比较,差异有显著统计学意义 ($P = 0.000$);第 10、30、60、90 天,第 1 组与第 2、3 组比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);说明益骨口服液能降低去势大鼠血清中 cAMP 的含量(表 3)。

表 2 4 组不同时间点对去势大鼠骨质疏松症血清中 PGE2 含量的影响 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$

| 组别 | 例(只) | 用药前 | 10 天 | 30 天 | 60 天 | 90 天 |
|-------|------|---------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 第 1 组 | 20 | 622.48 ± 6.60 | 590.24 ± 6.89 | 563.04 ± 9.56 ¹⁾ | 510.54 ± 7.80 ²⁾ | 480.54 ± 6.70 ²⁾ |
| 第 2 组 | 20 | 631.42 ± 8.43 | 591.12 ± 13.74 | 570.86 ± 4.15 | 554.12 ± 6.77 ¹⁾ | 514.12 ± 6.7 |
| 第 3 组 | 20 | 629.42 ± 8.43 | 541.32 ± 5.83 ¹⁾ | 494.20 ± 7.09 ²⁾ | 454.06 ± 8.36 ²⁾⁴⁾ | 418.20 ± 8.39 ²⁾⁴⁾ |
| 第 4 组 | 20 | 616.48 ± 7.90 | 613.54 ± 13.86 | 634.36 ± 12.65 ³⁾ | 636.22 ± 14.84 ³⁾ | 624.12 ± 12.54 ⁴⁾ |

注 同一时间点上与第 4 组比较,1) $P < 0.05$,2) $P < 0.01$;同一时间点上与第 2 组比较,3) $P < 0.05$,4) $P < 0.01$

表 3 4 组不同时间点对去势大鼠骨质疏松症血清中 cAMP 含量的影响 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$

| 组别 | 例(只) | 用药前 | 10 d | 30 d | 60 d | 90 d |
|-------|------|---------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 第 1 组 | 20 | 121.36 ± 3.83 | 107.66 ± 5.77 | 95.68 ± 3.84 ¹⁾ | 83.88 ± 2.51 ²⁾ | 69.38 ± 3.81 ²⁾ |
| 第 2 组 | 20 | 123.92 ± 5.94 | 115.06 ± 4.73 | 105.58 ± 3.37 | 98.74 ± 6.02 ¹⁾ | 88.74 ± 6.02 ¹⁾ |
| 第 3 组 | 20 | 125.92 ± 4.64 | 97.60 ± 2.65 ¹⁾ | 88.06 ± 4.11 ¹⁾ | 79.78 ± 2.53 ²⁾ | 65.70 ± 3.25 ²⁾³⁾ |
| 第 4 组 | 20 | 126.26 ± 4.44 | 123.96 ± 5.09 | 121.74 ± 5.03 | 126.94 ± 7.72 ³⁾ | 130.54 ± 6.40 ⁴⁾ |

注 同一时间点上与第 4 组比较,1) $P < 0.05$,2) $P < 0.01$;同一时间点上与第 2 组比较,3) $P < 0.05$,4) $P < 0.01$

3 讨论

疼痛和骨折是骨质疏松症的两大临床表现,本病病变部位主要在腰背四肢及关节,与肾、肝、脾密切相关,累及气血、筋骨,以肝脾肾亏、气血不足为本,以风寒湿痹阻、瘀血阻络为标的骨骼疾病,中医归属为骨痹,骨萎范畴^[1],认为骨质疏松症因气血不通则痛,不荣则痛;而现代医学认为骨质疏松致痛的机制无外乎是伤害性刺激因子、痛相关物质、神经冲动、传导途径和中枢感受等环节,致痛过程中伴随多种免疫活性细胞的活化及细胞因子、炎症介质的共同参与^[2],虽然目前国内外文献对骨质疏松致痛的机理未见统一的报道,但能证实引起炎症因子促进骨质疏松的诱发,疼痛的加剧^[3]。其中 cAMP、COX-2 和 PGE 等相关一些炎症因子在骨质疏松疼痛的形成有重要的调节作用,通过实验表明这些炎症因子的增加,能引起骨显微结构以及骨密度的变化,促进局部骨质疏松的发生和发展^[4]。

PGE2 类物质被认为是具有生物活性的重要炎

症介质,参与疼痛的调制,可通过血管扩张,诱导 T 细胞产生破骨细胞活化因子,激活破骨细胞,引起骨质破坏与吸收,骨小梁变薄变细,形态的改变进而刺激神经导致疼痛^[5];cAMP 被公认为是细胞内重要的第二信使,药物作用于体内产生的生物效应都是通过它介导的。也有研究表明 cAMP 升高可引起感觉神经元过度兴奋和痛觉过敏^[6];COX-2 可作为一种诱导酶,可促进前列腺素的增加,进一步导致疼痛的诱发,实验证实 COX-2 可增加血管通透性,引起组织水肿,降低对神经的刺激阈值而产生对疼痛的敏感增加^[7]。

本研究探讨了益骨口服液对去势大鼠骨质疏松症外周血清炎症因子的影响,已有研究证实药物抗骨质疏松治疗周期至少 3 个月^[8],我们设计本实验进一步研究益骨口服液是否通过 90 d 内血清炎症因子指标也发生变化,因此我们设计 10、30、60、90 d 4 个时间点与治疗前进行比较,所设计每次观察周期比同类实验研究周期长^[9],避免重复测量导致的滞留效应,

最后实验结果显示:4 组通过 5 次不同时间点测量对去势大鼠血清分泌的 COX-2、PGE2、cAMP 含量,数据经重复测量的方差分析,均存在分组效应($P = 0.000$)和时间效应($P = 0.000$),在第 10、30、60、90 天后予益骨口服液组,密盖息组,益骨口服液 + 密盖息组与生理盐水对照组相比,益骨口服液组去势大鼠其血清分泌的 COX-2、PGE2、cAMP 显著降低,说明益骨口服液对去势大鼠骨质疏松疼痛具有一定抑制作用,可通过抑制去势大鼠血清中 COX-2、PGE2、cAMP 的含量,从而减轻疼痛,这是其治疗骨质疏松疼痛的作用机制之一。

目前,关于骨质疏松症中医辨证规律研究不多,今后如何深入研究探寻益骨口服液对原发性骨质疏松症的多重效应与中医辨证规律之间的关系,以往大量实验主要以肾虚为主进行研究,而下一步我们可通过宏观血流量与微观瘀血情况的检测,另辟蹊径,从血瘀证型角度来探讨参与骨质疏松发病机制的因素。

4 参考文献

- [1] 姚太顺. 中药辨证治疗骨质疏松腰背痛的体会[J]. 中医正骨, 2002, 14(11): 24.
- [2] 薛增奇, 陈金春, 黄建华, 等. 慢性肾功能衰竭中晚期骨密度与骨代谢生化指标的相关性[J]. 中医正骨, 2009, 21(2): 7-10.
- [3] McLean RR. Proinflammatory cytokines and osteoporosis[J]. Curr Osteoporos Rep, 2009, 7(4): 134-139.
- [4] De Martinis M, Di Benedetto MC, Mengoli LP, et al. Senile osteoporosis: is it an immune-mediated disease[J]. Inflamm Res, 2006, 55(10): 399-404.
- [5] 杨健松, 胡栢均, 伍中庆, 等. 骨关节炎补肾方对肝肾亏虚型膝骨关节炎关节液中 PGE2、NO 的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2011, 4(19): 26-27.
- [6] Song X, Wang Z, Gan Q, et al. cAMP and cGMP contribute to sensory neuron hyperexcitability and hyperalgesia in rats with dorsal root ganglia compression[J]. J Neurophysiol, 2006, 95(1): 479-492.
- [7] 吴检, 黄键. 环氧合酶-2 及其在炎症痛中表达的调节[J]. 海峡药学, 2010, 9(22): 205-207.
- [8] 杨惠光, 唐天驷, 李忠泽, 等. 鲑鱼降钙素治疗老年骨质疏松症的临床研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(10): 751-753.
- [9] 张新玉. 不同药物对绝经后骨质疏松症短期疗效观察[J]. 新疆医科大学学报, 2011, 34(5): 524-528.

(2012-04-15 收稿 2012-08-02 修回)

· 通 知 ·

全国水针刀三氧消融术尸体解剖研修班及中华筋骨三针法学习班通知

水针刀三氧消融术及筋骨针法是由中国骨伤微创水针刀学术委员会会长、张仲景国医学院教授、广东省中医院主任医师吴汉卿教授在水针刀疗法的基础上,结合三氧治疗仪所研发的新技术,研制发明的多用系列筋骨针具已获国家专利,并创立了十大筋骨针法(已编入骨伤教材),出版了《中华筋骨三针疗法》。该项技术的培训班已举办 180 余期,来自国内包括台湾、香港等地区及国外(马来西亚、新加坡、韩国)的万余名医生学习、掌握了该技术。为满足广大医师要求,现继续举办以下研修、学习班:

水针刀三氧融盘术及尸体解剖研修班:由吴汉卿教授主要传授:水针刀新针法治疗骨伤颈肩腰腿痛病、水针刀三氧融盘术。应用水针刀法结合新鲜尸体详细讲解三针法安全入路法、配合独特松解液及椎间孔扩张术、侧隐窝分离术。新颖的三针法理论、独特的十大针法、结合尸体刀法入路、水针刀挂图,有专科医院手术病人治疗,同时讲解影像诊断,保证每位学员能够独立操作。临床上可治疗腰椎间盘突出症,对颈肩腰腿痛患者具有较好的疗效。

中华筋骨三针法学习班:中华筋骨三针法是吴汉卿教授在水针刀针法九针疗法基础上,根据人体生物力学,提出了人体软组织立体三角平衡学说,创立了平衡三针法。该班传授筋骨三针法原理、三针定位法、十大针法技巧。该法主要治疗:颈椎病、颈 1 横突综合症、颈 7 棘突综合症、肩关节周围炎、肌筋膜炎、腰椎间盘突出症、股骨头坏死症、膝关节骨关节炎、神经痛、类风湿性关节炎、脊柱相关病等。

脊柱九病区药磁线植入技术:传授独特的脊背九大诊疗区,临床应用水针刀分离、磁线留置并配合整脊手法,快速治疗脊柱相关病,如颈源性心脏病、颈性咽炎、面瘫、三叉神经痛、癫痫病、慢性支气管炎、哮喘、胃炎、胃溃疡、结肠炎、生殖疾病等。

其他:参加学习班者将授予国家级中医药 I 类继续教育学分(项目编号:390206006)

开学时间:每月 1 日开课,需提前 2 日报到

报到地址:河南省南阳市仲景路与天山路口(水针刀专科医院)

邮政编码:473000 **联系电话:**0377-63282507, 13721820657

联系人:黄建

网址:www.shuizhendao.com **邮箱:**shuizhendao@163.com