

运动结合中药复方对去势大鼠股骨生物力学影响的研究*

王加谋¹ 刘彤鸥^{2,3}

摘要

目的:探讨运动结合中药复方对去势大鼠骨生物力学改善的作用。

方法:取180日龄SPF级SD雌性大鼠100只,随机分为空白组、模型组、运动组、中药复方组、运动结合中药复方组,每组20只,造模术后常规饲养14天。之后除空白组外,各组分别灌胃治疗,模型组每天给予0.9%氯化钠注射液2ml灌胃;运动组每天给予0.9%氯化钠注射液2ml灌胃,并在高速平板跑台跑步20min,速度为5m/min;中药复方组每天给予中药复方溶液2ml灌胃;运动结合中药复方组每天给予中药复方溶液2ml灌胃,并在高速平板跑台跑步20min,速度为5m/min。干预治疗后12周后将大鼠戊巴比妥腹腔注射麻醉,处死,收集双侧股骨,剔净附着于股骨上的肌肉及结缔组织,分别进行三点弯曲试验、显微结构观察及骨小梁静态参数检测。

结果:与模型组比较,空白组、运动组、中药复方组、运动结合中药复方组在骨密度、股骨载荷、骨小梁静态参数检测指标均有明显差异($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。

结论:运动结合中药复方具有改善去势大鼠骨生物力学指标,保护骨小梁结构的作用。

关键词 运动;中药复方;去势大鼠;骨质疏松;生物力学

中图分类号:R493;R681 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2019)-01-0011-05

Research on the effects of exercise combined with traditional Chinese medicine compound of castration on rat femur biomechanics/WANG Jiamou, LIU Tong'ou//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34(1): 11—15

Abstract

Objective: To explore the rats bone biomechanics improvement action after exercise combined with traditional Chinese medicine compound of castration.

Method: A total of 100 SPF SD female rats, aged 180 days, were randomly divided into blank group, model group, exercise, traditional Chinese medicine compound, sports combined with traditional Chinese medicine compound group, 20 in each group. Followed conventional breeding 14 days after surgery. 2ml 0.9% sodium chloride was filled to stomach daily for model group and exercise group. 2ml traditional Chinese medicine compound solution was filled to the stomach daily for the traditional Chinese medicine compound and sports combined with traditional Chinese medicine compound group. Besides, the rats were forced to running on flat treadmill 20 minutes daily at speed of 5m/min for exercise group and sports combined with traditional Chinese medicine compound group. After 12 weeks treatment, bilateral femur were collected, attached muscle and connective tissue were took out. Then three-point bending test, microstructure observation, and static parameters of bone trabecula test were completed.

Result: BMD, maximal load of femur, and static parameters of bone trabecula test for model group, blank

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.01.004

*基金项目:国家自然科学基金项目(81473465);湖北省自然科学基金项目(2017CFC832)

1 武汉轻工大学医护学院附属武汉脑科医院,武汉,430023; 2 湖北中医药大学附属湖北省中医院; 3 通讯作者
作者简介:王加谋,男,副教授; 收稿日期:2017-09-14

group, exercise group, Chinese medicine compound group, exercise combined with traditional Chinese medicine compound group all have obvious difference from the model group ($P<0.01$ or $P<0.05$).

Conclusion: Exercise combined with traditional Chinese medicine compound is beneficial for treatment of osteoporosis in castrated rats.

Author's address Wuhan Polytechnic University, Affiliated Brain Hospital of Wuhan, Wuhan, 430023

Key word exercise; traditional Chinese medicine compound; castrated rats; osteoporosis; biomechanics

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种以低骨量和骨组织微结构破坏为特征,导致骨质脆性增加和易于骨折的全身性骨代谢性疾病。绝经后妇女是OP发病的重点人群,毋庸置疑,围绝经期卵巢分泌雌激素水平降低是主要原因。根据病因,目前雌激素替代是临床治疗OP的适宜方法,但是长期应用雌激素,其副作用亦会明显,尤其使乳腺癌及子宫内膜癌发病增加,因此它的使用受到了限制。本文从生物力学角度进行动物实验研究,探讨运动及中药复方结合后对骨质疏松的疗效,为运动结合中药复方的应用提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

180日龄SPF级SD雌性大鼠100只,体重大约($187\pm 10\text{g}$),由华中科技大学附属同济医学院实验动物学部提供,许可证号:SCXK(鄂)2016-0007。大鼠在18—22℃室温中适应环境一周,之后随机分为5个组:空白组、模型组、运动组、中药复方组、运动结合中药复方组,每组20只。

1.2 中药复方

淫羊藿、杜仲、红景天、葛根、藏红花、甘草等水煎剂(由湖北省中医院药剂室制备)。依据以下公式: $100\text{ml}(\text{药液})/60\text{kg}(\text{人体重})\times 6.7(\text{换算系数})\times 0.2\text{kg}(\text{大鼠重})\approx 2\text{ml}$,按成人用药量将以上药物合成100ml,生药含量约 $1.32\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,准备好备用。

1.3 主要仪器

OPTON德国双目金相显微镜,型号AX10MRT,超低温冰箱,计算机显微图像分析仪,动物实验高速平板跑台5跑道(四川泰盟),动物骨骼三点弯曲试验机, Motic B5显微摄像系统等。

1.4 动物模型建立和干预方法

造模方法:根据徐淑云主编的《中药实验方法学》进行去势大鼠模型方法造模。操作如下:按照

10ml/kg标准,抽取1%戊巴比妥,腹腔注射麻醉大鼠,后将大鼠仰卧,四肢固定在手术台上,腹部正中备皮、消毒,纵行切开表皮及皮下组织,分离肌肉组织后打开腹膜,进入腹腔。沿着子宫两侧分别向上,分离钳夹后剪去卵巢,结扎近端,查无渗血,分层缝合关闭腹腔,切口消毒,术后常规饲养。造模成功2周后除空白组外,各组大鼠给予以下处理:模型组每天给予0.9%氯化钠注射液2ml灌胃;运动组每天给予0.9%氯化钠注射液2ml灌胃,并在高速平板跑台跑步20min,速度为5m/min;中药复方组每天给予中药复方溶液2ml灌胃;运动结合中药复方组每天给予中药复方溶液2ml灌胃,并在高速平板跑台跑步20min,速度为5m/min。各组均干预治疗12周。

1.5 标本采集与保存

麻醉后处死各组大鼠,下肢消毒,顺着大鼠髋关节的走向迅速剥取左右两侧股骨,剔净附着于股骨上的肌肉及结缔组织,注意保持股骨完整。大鼠左侧股骨纱布包裹标记后置于75%乙醇固定,以备三点弯曲实验检测使用。大鼠右侧股骨石蜡包埋、切片、HE染色。

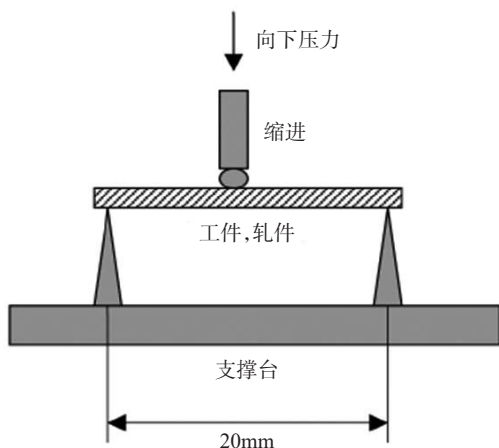
1.6 大鼠股骨生物力学性能分析

三点弯曲力学实验:测试前骨样本在室温下0.9%氯化钠注射液留置4h。MTS 858小型Bionix II型液压伺服试验机测试,1000n传感器、机器装载速度:0.1mm/s,自制股骨20mm的三点弯曲试验模具,并使股骨生理曲线向上,用2mm/min的速度下压股骨中间的一面(图1)。最大弯曲应力 $\sigma = FLH/8J$, F为骨的最大负荷值,随着跨度, LH外径的力的方向, $J = \pi D^4/64$ 轴的惯性,剪切力横向直径D。直到股骨骨折,记录载荷、变形曲线。

1.7 大鼠股骨显微结构观察

大鼠处死后取左下肢股骨上段,打磨3—4mm厚骨髓腔暴露的骨片,染色、脱水、包埋。用低速锯锯成约300 μm 厚的骨片,打磨成100 μm 厚的骨磨片,

图1 三点弯曲示意图*



* 力学性能试验方法(GB/T 14452-1993)

清洗,干燥后封片。置于显微镜下,观察骨皮质外观、厚度及骨小梁分布和排列、骨髓腔大小等,同时拍照。

1.8 骨小梁静态参数检测

采用 OPTON 德国双目金相显微镜,型号 AX10MRT,利用半自动图像分析系统,计算1—3mm 范围内股骨组织形态计量学参数。观察股骨组织切片形态学变化,测量视野下骨片。具体测量参数如下:①骨小梁相对体积(TBV%):骨小梁体积与皮质骨之间松质骨总体积的比率。②骨小梁吸收表面与骨小梁总表面百分比(RST%):骨小梁吸收陷窝面积占骨小梁总面积的比率。③骨小梁类骨质表面与骨小梁总表面百分比(OST%):被覆有成骨细胞的类骨质面积与骨小梁总面积的比率。④骨小梁平均骨壁厚度(MWT):骨小梁的骨重建周期完成后,骨小梁新形成的骨结构单位厚度平均值。

1.9 统计学分析

计量资料采用均数与标准差(正态分布资料)或者中位数与四分位数间距(偏态分布资料)表示。5

组大鼠在生物力学及股骨骨小梁相对体积、吸收表面与总表面、类骨质表面与总表面、平均骨壁厚度的组间比较均采用单因素方差分析(计量资料,正态分布且方差齐)和Kruskal-Wallis秩和检验(计量资料,偏态分布),组间两两比较采用LSD-t检验。所有数据采用SPSS19.0软件运行,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 对去势大鼠骨生物力学的影响

结果可见切除卵巢后模型组大鼠在股骨骨密度、最大载荷、股骨最大应力明显下降,与空白组相比较有显著性差异($P<0.01$)。经过12周的治疗后,可见各干预组股骨最大载荷、股骨最大应力均有改善,与模型组比较有显著性差异($P<0.01$ 或 $P<0.05$),运动结合中药复方组与空白组相比较无显著性意义($P>0.05$)。见表1。

2.2 对去势大鼠股骨显微结构的影响

光镜下观察见空白组骨质形态未见明显异常,骨组织结构正常,骨密度均匀,骨小梁排列整齐、密集;模型组骨皮质菲薄骨小梁数量减少,骨小梁变细、间距增大,骨密度不均匀;运动组、中药复方组骨皮质轻度变薄,骨小梁结构排列尚规则,基本完整,骨小梁数量略有减少,骨密度均匀度良好,但明显好于模型组;运动结合中药复方组骨小梁排列整齐,密集,间距正常,连续性较好,骨密度均匀,纹理清晰,骨形态正常。见图2。

2.3 骨小梁静态参数比较

结果可见切除卵巢后大鼠模型组在股骨骨小梁TBV、RST、OST、MWT均明显改变,与空白组相比较有显著性差异($P<0.01$)。治疗12周后,各干预组指标均有改善,与模型组比较有显著性差异($P<0.01$ 或 $P<0.05$),运动结合中药复方组与空白组相比较无显著性意义($P>0.05$)。见表2。

表1 对各组去势大鼠骨生物力学的影响

($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	骨密度($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	股骨最大载荷(kg)	股骨最大应力(Mpa)
空白组	20	0.123±0.014 ^②	13.169±1.284 ^②	178.32±13.53 ^②
模型组	20	0.107±0.011	7.989±1.208	112.65±17.56
运动组	20	0.118±0.017 ^{①③}	11.179±1.348 ^{①③}	152.78±16.36 ^{①③}
中药复方组	20	0.120±0.016 ^①	11.089±1.246 ^{①③}	154.89±11.58 ^{①③}
运动结合中药复方组	20	0.122±0.015 ^{②④}	12.996±1.565 ^{②④}	173.89±16.11 ^{②④}

注:①与模型组比较 $P<0.05$;②与模型组比较 $P<0.01$;③与运动结合中药复方组比较 $P<0.05$;④与空白组比较 $P>0.05$

表2 各组去势大鼠骨小梁静态参数比较

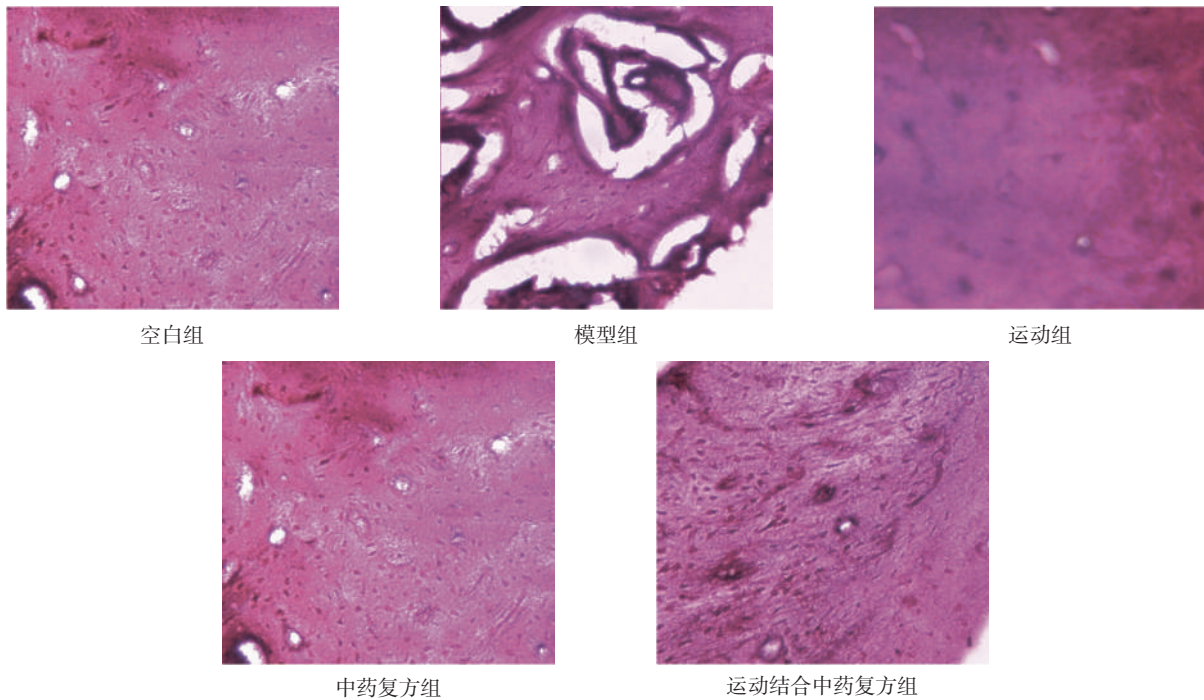
($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	TBV(%)	RST(%)	OST(%)	MWT(μm)
空白组	20	32.32±1.95 ^②	1.41±0.21 ^②	2.06±0.20 ^②	14.98±1.37 ^②
模型组	20	21.37±2.45	1.93±0.36	2.73±0.18	10.67±1.28
运动组	20	24.74±2.24 ^{①③}	1.72±0.27 ^{①③}	2.44±0.16 ^{①③}	12.03±1.31 ^{①③}
中药复方组	20	23.76±1.98 ^{①③}	1.68±0.31 ^{①③}	2.41±0.22 ^{①③}	11.69±1.26 ^{①③}
运动结合中药复方组	20	30.23±1.88 ^{②④}	1.44±0.29 ^{②④}	2.13±0.21 ^{②④}	14.12±1.29 ^{②④}

注:①与模型组比较 $P < 0.05$;②与模型组比较 $P < 0.01$;③与运动结合中药复方组比较 $P < 0.05$;④与空白组比较 $P > 0.05$

图2 各组光镜下股骨显微结构

(HE染色, $\times 40$)



3 讨论

雌激素在骨代谢平衡中起着重要的调节作用^[1],绝经后OP是以雌激素分泌减少,单位体积骨组织减少、骨高频率转换为特征的病变^[2]。OP可造成生存质量不断下降及身体不良健康状态,甚至发生骨折而导致生活不能自理乃至过早死亡^[3-4]。现代医学确认OP是老年全身性退行性改变在骨骼系统的反映^[5-7]。因此对围绝经妇女进行OP预防及治疗,能提高其生存质量,也更有临床意义。

防治OP的方法中,适宜的运动对OP的作用已经被学者所证实^[8-10]。运动后肌肉、韧带柔韧性及力量改善,对骨骼的机械应力增加,增强对成骨细胞活性的刺激,利于骨的生成^[11]。运动对OP的治疗正在普及,黄何平等^[12-13]研究论证骨骼运动刺激功能

适应性反应,即运动刺激骨应变速度增加,骨量增加和结构改善,结果证实骨生物力学及分子生物学性能都有改进^[14-16]。陈玉凤等^[17]研究表明经过高速运动跑台训练,可以提高骨应力最强载荷能力。骨生物力学指标是体现骨骼的物理特性,与患者的骨质量相关,影响患者生活状况,因此测量骨受力后的生物学效应及外力作用下骨组织的力学特性是对评定骨质量的可靠方法^[18]。因此,本研究以三点弯曲试验及骨小梁静态参数测试作为检验结果的主要研究方向,来说明运动结合中药复方能减少骨松质的骨转换及骨量丢失,并改善其三维结构。本实验研究结果也充分表明,运动组及运动结合中药复方组在骨密度、股骨载荷及骨小梁结构及静力学参数变化上都有显著改善。

中医将骨质疏松纳为“骨痿”或“骨痹”范畴。《医经精义》有精辟的论述：“肾藏精，精生髓，髓生骨，故骨者肾之所合也，髓者，肾精所生，精足则髓足，髓在骨内，髓足则骨强。”精辟地阐明了对肾与骨、髓的关系。近年来，中药对OP治疗的研究方兴未艾，中药治疗OP的研究越来越多^[19]。OP患者病程较长，初病多在气在经，久病则入血入络，“久痛入络”，发为络病^[20]。因此，本研究以补肾强骨活血中药作为试验药物进行研究。方中淫羊藿、杜仲益肾健骨为君药，红景天、藏红花温阳活血为臣药，使精血互生而颐养骨髓，葛根为佐药，缓解关节强直屈伸不利，甘草调和诸药^[21]。全方使肾气旺盛，骨髓则生化有源，骨髓滋养润泽骨骼，故骨骼坚韧有力。本研究结果证明中药复方组及运动结合中药复方组与模型组在骨密度及骨小梁结构改善上有显著性差异。

本实验研究将运动结合中药复方在去势大鼠骨密度、股骨最大应力及最大载荷的变化上，证明运动结合中药复方能增加股骨干横断面积最大载荷，改善骨小梁静力学参数。光学显微镜下照片显示运动结合中药复方组成骨细胞数量密集，骨小梁结构致密紧凑，骨密度均匀与模型组相比较改善较明显，因此具有改善去势大鼠骨生物力学指标，保护骨小梁结构的作用，为临床上治疗OP提供了可靠的实验依据。

参考文献

- [1] 韦大文, 尚立芝, 李沛, 等. 补肾方治疗去势雌鼠骨质疏松及其机制的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 125—127.
- [2] 龙梓, 刘丹霞, 廖华卫, 等. 健骨片对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢、骨微结构及骨强度的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(9): 116—121.
- [3] Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial[J]. JAMA, 2002, 288(3): 321—333.
- [4] 国外研究快讯. 保护骨骼健康预防因骨质疏松和低骨密度而增高骨折危险[J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(8): 604.
- [5] 白云静, 申洪波, 张秋枫, 等. 原发性骨质疏松症从肾论治的理论探讨[J]. 中国矫形外科杂志, 2002, 9(6): 619—620.
- [6] Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis[J]. Physical Therapy, 2006, 1: 77—92.
- [7] Elaine MM. Designing exercise programs to lower fracture risk in mature women[J]. Strength and Conditioning Journal, 2006, 1: 24—30.
- [8] 楼华. 老年性骨质疏松及其运动疗法的干预[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 52: 10672—10673.
- [9] 孙建翠, 崔西泉. 有氧健身运动对老年性骨质疏松的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(17): 1326—1328.
- [10] 姜俊良, 梁邱, 杨浩伦, 等. 低频脉冲电磁场治疗绝经后骨质疏松症的临床疗效观察[J]. 中国康复医学, 2017, 32(2): 192—194.
- [11] 邹军, 章岚, 任弘, 等. 运动防治骨质疏松专家共识[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(11): 1291—1302.
- [12] 黄何平. 原发性骨质疏松症及其运动处方[J]. 中国临床康复, 2006, 10(32): 132—134.
- [13] 陈亚琼, 杨海燕, 黄艳红, 等. 补肾中药醇提活性部位预防卵巢摘除小鼠的骨丢失[J]. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8(1): 68—72.
- [14] 林勇凯, 黄宇新. 补肾调肝方治疗高龄骨质疏松症伴抑郁障碍32例疗效观察[J]. 中医杂志, 2014, 55(2): 137—139.
- [15] 刘旦锋, 崔碧玲, 黄银玲, 等. 辅酶Q10对环磷酸腺苷大鼠皮质的影响[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(2): 110—114.
- [16] 陈国仙, 王国荣, 李国山, 等. 低强度复合振动联合阿仑膦酸钠对绝经后骨质疏松患者骨密度的影响研究[J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(2): 182—186.
- [17] 陈玉凤, 熊鹰, 陆一帆, 等. 运动对绝经后骨折女性ALP、BMD、E2的影响[J]. 天津体育学院学报, 2004, 19(1): 94—95.
- [18] 王伯华. 运动康复处方联合补肾活血方对急性期髌部骨折髌关节功能、骨生物力学和骨密度的影响[J]. 中国中医急症, 2016, 25(4): 694—696.
- [19] 宰衷静. 固邦合金乌骨通胶囊治疗骨质疏松性腰背疼痛[J]. 中医正骨, 2009, 21(5): 53—54.
- [20] 闵文, 黄桂成, 华永庆, 等. 补肾通络方治疗去势大鼠骨质疏松的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 189—192.
- [21] 赵冰洁, 宋捷, 章丽, 等. 淫羊藿醇提物对去卵巢大鼠骨质疏松治疗作用及机制研究[J]. 中草药, 2016, 47(11): 1919—1925.