补肾化痰方对去卵巢大鼠血清 TRACP5b 和 β-CTX 的影响 *

胡 娅[1,2] 向 楠[3] 唐 曦[4] 蹇顺华[1] 周亚娜[3]

(1 长江大学医学院 湖北 荆州 430023 ;2 湖北中医药大学 湖北 武汉 43006 ;3 湖北省中医院 湖北 武汉 430061 ;
4 华中科技大学同济医学院附属荆州中心医院 湖北 荆州 434020)

摘要 目的：观察补肾化痰方对去卵巢骨质疏松症大鼠血清脂联素抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (tartarte-resistant acid phosphatase 5b，TRACP5b) 和血清 β- I 型胶原 C- 末端肽 (C-terminal telopeptides of type I collagen，β-CTX) 水平的影响。**方法：**SD 大鼠行双侧卵巢切除术，术后 3 月以中剂量和高剂量补肾化痰方灌胃给药，术后 5 月，双能 X 线骨密度测定仪检测大鼠股骨骨密度，ELISA 法检测大鼠血清 TRACP5b 和 β-CTX 含量。**结果：**补肾化痰方中、高剂量组均能显著提高去卵巢骨质疏松症大鼠的骨密度，降低血清 TRACP5b 和 β-CTX 水平。**结论：**补肾化痰方对去卵巢大鼠骨质疏松症有较好的治疗作用。

关键词：补肾化痰方；骨质疏松症；TRACP5b；β-CTX

中图分类号：Q95-3 R289 R68 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273 (2011)12-2227-03

Influence of Tonifying the Kidney and Eliminating the Phlegm Prescription on Serum TRACP5b and β -CTX in Ovariectomized Rats*

HU Ya[1,2], XIANG Nan[3], TANG Xi[4], JIAN Shun-hua[1], ZHOU Ya-na[3]

(1 Medical School of Yangtze university, Hubei Jingzhou 434000; 2 Hubei University of Chinese Medicine, Hubei Wuhan 430061; 3 Hubei Provincial Hospital of TCM, Hubei Wuhan 430061; 4 Jingzhou hospital, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Jingzhou 434020)

ABSTRACT Objective: To observe the influence of Tonifying the Kidney and Eliminating the Phlegm Prescription on serum TRACP5b andβ -CTX in ovariectomized rats. Methods: Female SD rats were performed the ovariectomy operation. Drug treatment was given to the rats three months after the operation. Two months after being fed with the large dose and the middle dose of Tonifying the Kidney and Eliminating the Phlegm Prescription respectively, the bone mineral density (BMD) of the rats was measured by dual energy X-ray absorptionmetry. The levels of serum TRACP5b and β -CTX were tested with ELISA. Results: Tonifying the Kidney and Eliminating the Phlegm Prescription can decrease the measuring deviation of TRACP5b and β -CTX, but increase the bone density. Conclusion: Tonifying the Kidney and Eliminating the Phlegm Prescription can effectively prevent osteoporosis in female rats induced by ovariectomy.

Key words: Tonifying the Kidney and Eliminating the Phlegm Prescription;Osteoporosis; TRACP5b; β -CTX

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R289 R68 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)12-2227-03

骨质疏松症是以骨量减少、骨组织显微结构退化 (松质骨骨小梁变细、断裂、数量减少，皮质骨多孔、变薄) 为特征，以致骨的脆性增高及骨折危险性增加的一种全身性骨病[1]。骨质疏松症是绝经后妇女和老年人的常见病和多发病。对于骨质疏松症目前还没有根治的方法，西医治疗虽有效，但长期服用不良反应较大，中药在该病治疗中的应用潜力巨大，具有较广泛的市场。传统中医学认为骨质疏松症与肾虚等密切相关[2]。本实验通过观察补肾化痰方对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度 (BMD) 及抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (TRACP5b)、血清 β- I 型胶原 C- 末端肽 (β-CTX) 含量的影响，初步探讨其对骨质疏松症的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药品 中药复方汤剂 补肾化痰方由菟丝子、淫羊藿、补骨脂、全瓜蒌、红曲、山楂组成，生药由湖北中医药大学附属医院门诊部中药房提供，加水煎煮，过滤，并浓缩。利维爱 (南京欧加农制药有限公司，2.5 mg/ 片，批号：LK-4305-10)。

1.1.2 试剂 大鼠抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRACP) 酶联免疫分析试剂盒 (美国 R&D 公司，批号：201007)；大鼠 β-CTX 酶联免疫分析试剂盒 (美国 R&D 公司，批号：201006)。

1.1.3 实验动物 8 月龄雌性 SD 大鼠，清洁级，由华中科技大学同济医学院提供，许可证号 SCXK (鄂) 2004-0007。

1.1.4 仪器 Lunar Prodigy 双能 X 线骨密度测定仪 (美国 GE 公司)；BIO-RAD680 全自动酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 去卵巢大鼠模型的建立和分组 大鼠适应喂养 1 周后，随

* 基金项目：湖北省自然科学基金资助项目 (2007ABA237)

作者简介：胡娅，(1978-)，女，讲师，主要从事中药基础与临床药理方面的研究。

E-mail：huy12@126.com

(收稿日期：2011-02-03 接受日期：2011-02-26)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

机分为对照组、假手术组、西药组、中药中剂量组、中药高剂量组。除对照组外，其他各组大鼠行卵巢切除术。麻醉后，无菌条件下行背部肋下双侧卵巢切除。假手术组术式相同，但不摘除卵巢。术后 3 个月开始灌胃给药。中药中剂量组以中药 9.4g/kg·b·w 灌胃，中药高剂量组以中药 18.8g/kg·b·w 灌胃，西药组予以利维爱 0.23 mg/kg·b·w，对照组、假手术组灌以等体积的生理盐水，每天一次，给药时间为 8 周。期间各组大鼠分笼常规饲养，自由饮水摄食。

1.2.2 骨密度检测 取大鼠左后肢股骨，剔除附着的肌肉筋膜，保留骨膜，生理盐水冲洗后，-70℃保存。测定大鼠离体股骨的骨密度。

1.2.3 血清中 TRACP 和 β-CTX 的测定 心脏抽血离心(3000 r/min，15 min)取血清，-70℃保存。按试剂盒说明书操作，制备两者的标准曲线，检测各组大鼠血清中 TRACP 和 β-CTX 的含量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析，所有数据均以均数± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般观察

大鼠在麻醉三四小时后完全清醒，正常进食。24 h 后切口无红肿，可正常活动，72 h 后切口无感染征象。1 周后切口完全愈合，缝线脱落。

2.2 补肾化痰方对去卵巢大鼠 BMD 及血清 TRACP5b、β-CTX 含量的影响

模型组与假手术组大鼠相比，骨密度明显降低，血清 TRACP5b 及 β-CTX 含量明显升高。利维爱和补肾化痰方都能显著提高去卵巢大鼠的骨密度，降低血清 TRACP5b 及 β-CTX 水平 (P<0.05)。补肾化痰方高剂量组改善骨密度、降低血清 TRACP5b 及 β-CTX 水平的作用强于中剂量组，但差异无统计学意义。详见表 1。

表 1 补肾化痰方对去卵巢大鼠 BMD 及血清 TRACP5b、β-CTX 的影响 ($\bar{x}\pm s$, n = 10)

Table 1 Influence of Tonifying the Kidney and Eliminating the Phlegm Prescription on BMD, Serum TRACP5b and β-CTX in Ovariectomized Rats ($\bar{x}\pm s$, n = 10)

Group	BMD	TRACP (pg/mL)	β-CTX (pg/mL)
Model group	0.162± 0.010	1459.82± 76.94	2038.20± 119.38
Sham-operated group	0.180± 0.008**	1246.48± 101.42**	1890.86± 73.10**
Western medicine group	0.175± 0.010**	1269.76± 45.70**	1976.53± 45.73**
Middle dose group of TCM	0.170± 0.009*	1285.26± 63.84**	1954.67± 45.48*
High dosage group of TCM	0.177± 0.008**	1265.59± 97.88**	1769.29± 67.00**

Note: compared with model group, *P＜0.05，**P＜0.01。

3 讨论

用去卵巢大鼠建立绝经后骨质疏松的动物模型已被广泛采纳 [3,4]。多数学者在大鼠切除卵巢后 4~7 周即观察到骨质疏松。本实验结束时，与假手术组相比，去卵巢组骨密度显著降低，股骨干骺端骨小梁稀疏、断裂，表明大鼠骨质疏松模型建立成功。补肾化痰方能显著增加骨密度，对去卵巢大鼠骨质疏松有较好的治疗作用。

骨骼在人的一生中不断地进行着更新与改造，即在骨表面重复进行骨吸收和骨形成，这个过程称为骨重建过程，主要由成骨细胞和破骨细胞相互作用，共同完成。正常成年人骨吸收和骨形成处于动态平衡状态，一旦平衡被破坏，如骨吸收大于骨形成或骨转换加快，骨吸收量增加，均可导致骨丢失，以致发生骨质疏松症。骨吸收活动是由破骨细胞介导，通过复杂的分子生物学机制完成的[5]。血清中 TRACP 和 β-CTX 是评价破骨细胞活性和骨吸收的良好指标。

TRACP 存在于多种组织中，血液中 TRACP 主要来源于骨吸收过程中破骨细胞的释放。体外实验证明，在骨吸收过程中，破骨细胞活跃，同时大量分泌这种酶，因此检测血清中 TRACP 水平可反映体内破骨细胞活性和骨吸收状态[6]。正常人血清中存在着 TRACP5a 和 TRACP5b，前者无酶活性[7]。国内外临床研究表明，检测血清中具有酶活性的 TRACP5b 的含量，可准确反映骨吸收率[8,9]。TRACP5b 由于其特异性高、结果不受昼夜变化、饮食、肝、肾疾病的影响，已经成为第二代骨吸收的生化标志物，应用于临床，具有早期监测骨质，降低骨折的风险作用。

骨的主要构成包括矿物质 (羟基磷灰石) 和有机质 (Ⅰ型胶原，约占 90%) 两部分[10,11]。在骨组织骨基质的不断重建中，I 型胶原被降解，小片段释放入血，部分出现于尿液中。测定血、尿中这些小片段的含量和变化可评价骨吸收状态，既有助于代谢性骨病的诊断，也能监测和评价抗骨吸收药物的疗效。

I 型胶原 C 末端肽 (C-terminal telopeptides of type I collagen,CTX)，又称为 Crosslaps，是这些小肽片段中的一种[12]。CTX 的检测有几个突出优点：①只来源于成熟胶原纤维，而不来源于新合成胶原；②在体内不被降解，也不被重新利用，能直接反映胶原纤维的降解情况；③胶原饮食对测量结果无影响；④特异性强，灵敏；⑤检测方法简便。该指标是评价人体骨吸收的良好指标[13,14,15,16]。

中医古籍中无骨质疏松症病名，但有与骨质疏松症表现相似的记载。骨质疏松症属于中医“骨痿”、“骨痹”、“腰痛”、“骨枯”、“骨极”的范畴[17]。近年来中医药对骨质疏松的研究日益增多，从动物实验到临床研究，从作用机理到临床疗效观察，从单组分、单味中药到中药复方制剂，研究的广度和深度不断拓展，也越来越显示出中药在治疗骨质疏松症方面显著而独特的疗效。本实验初步探讨临床经验方——补肾化痰方对骨质疏松症

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的治疗作用，该方能显著增加去卵巢骨质疏松大鼠的骨密度，降低其血清 TRACP 和 β-CTX 水平。

参考文献 (References)

[1] 丁桂芝，金之欣.第四届国际骨质疏松症会议简况[J].中医学杂志，1993，73 (8)：507-508
Ding Gui-zhi, Jin Zhi-xin. Brief introduction of the fourth international osteoporosis conference[J]. National Medical Journal of China,1993,73(8):507-508

[2] 黄宏兴，柴生颋，黄红，等. 骨质疏松症中医证型的聚类分析[J].广州中医药大学学报，2007，24 (3)：180-183
Huang Hong-xing, Chai Sheng-ting, Huang Hong.Cluster Analysis of Syndrome Patterns of Osteoporosis in Traditional Chinese Medicine [J].Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2007,24 (3):180-183

[3] 刘石平，廖二元，伍汉文，等. 绝经后骨质疏松大鼠模型的综合评价[J]. 湖南医科大学学报，2001，26(2)：111-114
Liu Shi-ping, Liao Er-yuan, Wu Han-wen, et al. Comprehensive assessment of the ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis [J]. Bulletin of Hunan Medical University, 2001,26 (2): 111-114

[4] Kalu DN.The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss [J]. Bone Miner, 1991, 15(2):175-192

[5] Siegel LC, Fu JC, Uto N. Collagen cross-linking: lysyl oxidase dependent synthesis of pyridinoline in vitro: confirmation that pyridinoline is derived from collagen [J]. Iochem Biophys Res Commun, 1982, 108(4): l546-1550

[6] Halleen JM, Alatalo SL, Janckila AJ, et al. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a specific and sensitive marker of bone resorption[J]. Clin Chem, 2001,47 (3):597-600

[7] Nakasato YR, Janckila AJ, Halleen JM, et al. Clinical significance of immunoassays for type 5 tartrate-resistant acid phosphatase [J]. Clin Chem, 1999, 45(12): 2150-2157

[8] Yamada S, Inaba M, Kurajoh M, et al. Utility of serum tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP5b) as a bone resorption marker in patients with chronic kidney disease: independence from renal dysfunction[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2008, 69 (2): 189-196

[9] 薛延，张海文，杨立红，等.血清骨特异性酸性磷酸酶的临床意义[J].中华内分泌代谢杂志，2003，19 (6)：48-49
Xue Yan, Zhang Hai-wen, Yang Li-hong, et a1. Clinical significance of serum bone-specific acid phosphatase [J]. Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism,2003,19(6):48-49

[10] Oxlund H, Mosekilde L, Ortoft G. Reduced concentration of collagen reducible cross links in human trabecular bone with respect to age and osteoporosis[J]. Bone. 1996,19(5):479-484

[11] Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, et al. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis[J].J Bone Mier Res. 1996,11(3):337-349

[12] Fledelius C,Johnsent A,Cloos P,et al.Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen [J]. J Biol Chem, 1997,272(15):9755-9763

[13] Bonde M,Garnero P,Fledelius C,et al.Measurement of bone degradation products in serum using antibodies reactive with an isomeride form of an 8 amino acid sequence of the C-telopeptide of type I collagen[J]. J Bone Miner Res,1997,12(7):1028-1034

[14] Srivastava AK，MacFarlane G，SrivasIava VP，et a1. A new monoclonal antibody ELISA for detection and characterization of C-telopeptide fragments of type I collagen in urine [J]. Calcif Tissue Int,2001,69(6):327-336

[15] Huber F, Traber L, Roth HJ, et a1. Markers of bone resorption-measurement in serum, plasma or urine? [J]. Clin Lab, 2003,49(5-6):203-207

[16] Zoli A, Lizzlo MM, Capuano A, et a1. Osteoporosis and bone metabolism in postmenopausal women with osteoarthdtis of the hand [J]. Menopause, 2006, 13(3):462-466

[17] 章少华，张咏梅. 中医药治疗骨质疏松症的临床与实验研究进展[J].中日友好医院学报，1997，11 (4)：349-351
Zhang Shao-hua, ZHANG Yong-mei.Clinical and experimental research progress of osteroporosis treated by TCM [J]. Journal of China-Japan Friendship Hospital, 1997,11(4):349-351

（上接第 2250 页）

[14] Waris G, Siddiqui A. Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C[J]. J Biosci, 2003,28:311-321

[15] Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer[J]. J Lab Clin Med,2006,147:58-66

[16] 关剑. 陈孝平, 朱虹，等. 乙型肝炎病毒 X 蛋白上调肝癌多药耐药相关基因表达的研究[J].肝胆外科杂志,2004,12：214-216
Guan Jian, Michael, ZhuHong, etc. Of hepatitis b virus X protein raised more than drug resistance related liver cancer gene expression study [J] ofstet, 2004,12：214-216

[17] Um HR, Lim WC, Chae SY, et al. Raf-1 and protein kinase B regulate cell survival through the activation of NF-kappaB in hepatitis B virus X-expressing cells[J]. Virus Res, 2007,125:1-8

[18] Malaguarnera L, Pilastro MR, Vicari L, et al. Pyrrolidinedithiocarbamate induces apoptosis in human acute myelogenous leukemic cells affecting NF-kappaB activity[J]. Cancer Invest,2005,23:404-412

[19] 游建，王平，陈孝平.乙肝病毒 x 蛋白对肝癌细胞多药耐药的影响[J].中华实验外科杂志,2007,24:1328-1331
YouJian,angPin, Michael. hepatitis b virus X protein on hepatumor cells more medicine resistance effects [J]. The experiment surgical magazine, 2007,24:1328-1331

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net