

# 加味阳和汤对肾阳虚型骨质疏松模型大鼠骨密度及血清微量元素的影响

曹端广<sup>1</sup>, 夏汉庭<sup>1</sup>, 杨文龙<sup>2</sup>, 杨 佛<sup>1</sup>, 刘 璞<sup>1</sup>, 李 威<sup>1</sup>, 王书豪<sup>1</sup>, 杨风云<sup>2</sup>

(1. 江西中医药大学临床医学院, 江西 南昌 330000; 2. 江西中医药大学附属医院, 江西 南昌 330000)

**[摘要]**目的 探究不同浓度的加味阳和汤对维甲酸灌胃、氯化可的松臀部肌肉注射造成的肾阳虚型骨质疏松症(osteoporosis, OP)模型大鼠骨密度(bone mineral density, BMD)及血清微量元素的影响。方法 将48只SD大鼠分为空白对照组, 模型组, 加味阳和汤低、中、高剂量组, 阳性对照组, 除空白对照组外其余均复制肾阳虚型OP模型鼠, 分别给予1%羧甲基纤维素钠、加味阳和汤(5、10、20 g/kg)、戊酸雌二醇(estradiol valerate, E2V)(0.000 2 g/kg)灌胃, 每日1次, 持续灌胃6周。取大鼠股骨及血清, 观察大鼠股骨BMD、血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)水平及微量元素[镁(magnesium, Mg)、锌(zinc, Zn)、铁(ferrum, Fe)]的变化。结果 与模型组比较, 加味阳和汤各剂量组大鼠BMD均有不同程度的上升, 大鼠血清ALP、TRAP活性均显著降低( $P < 0.05$ ), 血清Fe、Zn水平均显著升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 血清Mg水平的变化无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 加味阳和汤对肾阳虚型OP大鼠有明显的治疗作用, 且其作用机制可能与调节血清微量元素水平, 抑制骨的高转换率有关。

**[关键词]**加味阳和汤; 骨质疏松; 维甲酸; 骨密度; 血清微量元素

**[中图分类号]**R681.5<sup>+</sup>5 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2019.03.020

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是以骨微结构破坏, 骨骼强度下降, 骨量丢失为典型特征的一种骨

代谢性疾病。其具有高发病率、高致残率的特点, 危害巨大, 是仅次于心血管疾病的第二大高发疾病<sup>[1-2]</sup>。随着人口的老齡化, OP的发病率也在持续上升。据统计, 目前中国的OP患者约有9 000万人, 到2050年将骤增至2亿多人, 占总人口的13.2%<sup>[3]</sup>。

加味阳和汤是江西中医药大学附属医院骨伤科

**基金项目:**江西省研究生创新专项(YC2018-S268, YC2017-S363); 江西省国医名师传承工作室

**作者简介:**曹端广(1993-), 男, 硕士研究生

**通信作者:**杨风云(1962-), 男, 主任中医师, [fn\\_or@126.com](mailto:fn_or@126.com)

of asthma and cold stimulation. After the model was established, the rats in the high-, middle-, and low-dose Pingchuanning groups were given Pingchuanning by gavage at a dose of 14.6, 7.3, and 3.7 g/kg, respectively, those in the dexamethasone group were given dexamethasone by gavage at a dose of 0.4 mg/kg, and those in the Guilong Kechuanning group were given Guilong Kechuanning by gavage at a dose of 0.4 g/kg. The rats in the normal group and the model group were given normal saline. After lung tissue samples were collected, HE staining was used to observe pathological changes, and quantitative real-time PCR was used to measure the mRNA expression of Bad, forkhead box protein O1 (FKHR), and protein kinase C (PKC). **Results** Compared with the normal group, the model group had marked wall thickening and disorganized bronchial structure in lung tissue, with the presence of inflammatory cell infiltration; compared with the model group, all drug treatment groups had improvements in the pathological changes of lung tissue. There were significant differences in the mRNA expression of Bad, FKHR, and PKC in lung tissue between the normal group and the model group ( $P < 0.05$ ), as well as between the model group and the drug treatment groups ( $P < 0.05$ ). Pingchuanning acted on the mRNA expression of PKC, Bad, and FKHR in a dose-dependent manner, and the high-dose Pingchuanning group had better improvements than the other drug treatment groups. **Conclusion** By regulating the expression of PKC, FKHR, and Bad in the PI3K/Akt signaling pathway, Pingchuanning can reduce airway remodeling, alleviate inflammatory response, and improve the symptoms of asthma in rats with cold-type asthma.

**[Key words]** Asthma; Pingchuanning; Bad; Forkhead box protein O1; Protein kinase C; Airway remodeling

国家级名老中医许鸿照的经验方,由阳和汤加鸡血藤、木瓜、汉防己发展而来。许鸿照在临床诊治 OP 的过程中发现,OP 患者多有肾阳虚的表现,而加味阳和汤具有“补肾、温阳通络”之功,在临床上有针对性地运用于肾阳虚型 OP 患者,取得了较好的临床疗效。

在临床经验总结的基础上,本实验从基础医学的角度出发,通过维甲酸灌胃、氢化可的松臀部肌肉注射复制肾阳虚型 OP 模型大鼠,检测大鼠股骨骨密度(bone mineral density, BMD)及血清微量元素的变化,探究加味阳和汤对肾阳虚型 OP 模型大鼠的治疗作用及其可能机制。

## 1 材料

1.1 实验动物 雌性 SD 大鼠 48 只,3 月龄,体重(180±20)g,购自江西中医药大学实验动物科技中心[动物生产许可证号:SCXK(赣)2018-0003]。

1.2 主要仪器 Hologic QDR-2000 型双光能骨密度仪、Bio-Tek ELx800 型连续波长酶标仪:美国生产;W2-100SP 型旋转蒸发仪:上海申生。

1.3 药物及试剂 维甲酸(存货编号 R817255)、羧甲基纤维素钠(存货编号 C804638):上海麦克林生物科技有限公司;氢化可的松(国药准字 H12020885,每支 2 mL,含氢化可的松 10 mg):天津金耀药业有限公司;戊酸雌二醇(estradiol valerate, E2V;国药准字 J20130009,每片 1 mg):拜耳医药保健有限公司广州分公司;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒:北京四正柏生物科技有限公司;抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)检测试剂盒:武汉华美生物工程有限公司;镁(magnesium, Mg)、铁(ferum, Fe)、锌(zinc, Zn)检测试剂盒:南京建成生物工程研究所。

## 2 方法

2.1 不同浓度加味阳和汤的制备 加味阳和汤[鸡血藤 20 g,熟地黄 15 g,肉桂、鹿角胶(烊化)、麻黄、白芥子、汉防己各 10 g,木瓜、炮姜各 6 g,甘草 3 g]饮片均购于江西中医药大学附属医院中药房,按照比例取饮片浸泡、滤过,由江西中医药大学药学院中药标准化研究实验室制备成煎剂,分别减压浓缩至每毫升含生药 0.5、1、2 g,4 ℃冰箱下保存备用。

2.2 肾阳虚型 OP 模型鼠的制备 维甲酸用 1%羧甲基纤维素钠混悬,按每日 80 mg/kg 灌胃给药,持续 2 周,同时每日臀部肌肉注射氢化可的松,剂量为 2 mg/kg,复制肾阳虚型 OP 大鼠模型。模型复制完成后,取正常及模型组大鼠行 BMD 检测,观察大鼠

是否有神疲、乏力、静卧、小便多等肾阳虚表现。确认模型复制成功后,将 48 只正常大鼠及制备的肾阳虚型 OP 模型鼠分为空白对照组,模型组,加味阳和汤低、中、高剂量组,阳性对照组,共 6 组。各组药物制成溶液后,分别用等容积 1%羧甲基纤维素钠、不同浓度(5、10、20 g/kg)加味阳和汤、E2V(0.000 2 g/kg)灌胃(10 mL/kg),连续 6 周。

2.3 大鼠一般情况观察 观察模型复制过程中及给药过程中大鼠的活动、精神、毛发、体质量、食欲、食量、大小便等的变化。

2.4 骨及血清标本的采集与检测 用乌拉坦将大鼠麻醉后,从腹主动脉取血,室温静置 30 min,6 000 r/min 离心 10 min,分离血清,置于一 20 ℃冰箱保存。应用 ELISA 试剂盒检测血清 ALP、TRAP,采用比色法检测血清 Mg 水平,采用分光光度法检测血清 Fe、Zn 水平。取大鼠右侧股骨,采用美国 Hologic QDR-2000 型双光能骨密度仪检测 BMD 值。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件对所得数据进行分析。连续型变量采用“均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )”进行统计学描述。模型组与正常组比较,采用两个独立样本 *t* 检验(两组数据全呈正态分布时)或 Mann-Whitney *U* 检验(两组数据不全呈正态分布时);除正常对照组之外的其他组均数比较,采用单因素方差分析,均数多重比较采用 LSD 检验(方差齐时)或 Dunnett's *T*<sub>3</sub> 检验(方差不齐时)。采用双侧检验,显著性水准  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

3.1 一般状况 模型复制期间,大鼠拱背、毛色晦暗、食量下降、脾气暴躁、小便多,考虑是维甲酸及氢化可的松的不良反应,大鼠灌胃后死亡 1 只,尸体解剖后考虑灌胃不当,药液灌入气管致死。给药后,不同剂量加味阳和汤组及阳性对照组的大鼠乏力、静卧、小便多等肾阳虚表现得到明显改善,活动增加,毛发渐光泽,食量及体质量均有不同程度的上升。

3.2 各组大鼠股骨 BMD 比较 与空白对照组比较,模型组大鼠股骨 BMD 显著降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,加味阳和汤中、高剂量组和阳性对照组 BMD 显著增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 1。

3.3 各组大鼠血清 ALP、TRAP 水平比较 与空白对照组比较,模型组大鼠血清 ALP 和 TRAP 活性均明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,各给药组大鼠血清 ALP、TRAP 活性均显著降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 1。

3.4 各组大鼠血清 Mg、Fe、Zn 水平比较 与空白

对照组比较,模型组大鼠血清 Mg、Fe、Zn 水平均显著降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,各给药组血清 Fe、Zn 水平均显著升高,差异有

统计学意义( $P<0.05$ ),血清 Mg 水平的差异无统计学意义( $P>0.05$ );且加味阳和汤升高血清 Mg、Fe、Zn 水平呈现剂量依赖性。见表 2。

表 1 各组大鼠股骨 BMD,血清 ALP、TRAP 活性比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别       | n | BMD/(mg/m <sup>3</sup> ) | ALP/(U/L)      | TRAP/(U/mL) |
|----------|---|--------------------------|----------------|-------------|
| 空白对照     | 8 | 282.50±25.41             | 71.50±9.69     | 7.26±1.11   |
| 模型       | 8 | 176.03±51.32*            | 200.40±116.41* | 11.90±2.56* |
| 阳性对照     | 8 | 238.20±48.95#            | 112.62±34.99#  | 6.28±0.92#  |
| 加味阳和汤低剂量 | 8 | 211.28±59.28             | 83.55±20.29#   | 9.02±1.20#  |
| 加味阳和汤中剂量 | 8 | 226.11±29.31#            | 91.88±37.80#   | 8.58±2.13#  |
| 加味阳和汤高剂量 | 8 | 243.25±36.16#            | 93.88±31.96#   | 7.24±1.37#  |

注:与空白对照组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,# $P<0.05$

表 2 各组大鼠血清 Mg、Fe、Zn 水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别       | n | Mg/(mg/m <sup>3</sup> ) | Fe/(mg/m <sup>3</sup> ) | Zn/(mg/m <sup>3</sup> ) |
|----------|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白对照     | 8 | 5.37±0.24               | 131.24±5.24             | 300.25±2.32             |
| 模型       | 8 | 4.37±0.21*              | 110.21±5.21*            | 240.21±5.61*            |
| 阳性对照     | 8 | 4.87±3.42               | 116.24±3.21#            | 280.32±6.51#            |
| 加味阳和汤低剂量 | 8 | 4.55±0.25               | 121.45±2.64#            | 250.21±3.54#            |
| 加味阳和汤中剂量 | 8 | 4.98±3.24               | 124.56±3.21#            | 259.35±2.54#            |
| 加味阳和汤高剂量 | 8 | 5.21±4.21               | 125.86±2.31#            | 267.25±5.61#            |

注:与空白对照组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,# $P<0.05$

#### 4 讨论

OP 是以骨量下降为主要特征的代谢性骨病,发病率高,多集中于 50 岁以上的中老年人,严重影响老年人的生活质量。西医针对 OP 的治疗相当局限,主要以降钙素、双膦酸盐、氟化物等治疗为主,而这些药物都具有一定的不良反应<sup>[4]</sup>。中医称 OP 为“骨痿”。肾主藏精,主骨生髓,肾阳虚是引起 OP 的主要原因,血瘀次之,故中医治疗重补肝肾、温阳通经络。方中君药鹿角胶、熟地黄补髓强骨补肝肾;臣药麻黄、白芥子温阳通络;甘草调和诸药。该方有温补肾阳、散寒通络之功,能通督脉而补阳,主治肾中阳虚、血络瘀阻之骨痿。此外,现代研究表明,鹿角胶有减少骨胶原分解,抑制骨吸收的作用<sup>[5]</sup>。

维甲酸诱导 OP 模型操作简便,时间短,成功率高,在复制 OP 动物模型中被普遍采用。且该模型会出现全身皮毛卷曲、无光泽、懒动、少食的情况,按中医理论,有肾虚表现,可用于复制 OP 肾虚模型。

BMD 是临床诊断 OP 的金标准<sup>[6]</sup>。模型组大鼠股骨 BMD 显著低于空白对照组,有神疲、乏力、静卧、小便多等肾虚表现,说明模型复制成功。各给药组大鼠股骨 BMD 均高于模型组,且与加味阳和汤的浓度呈剂量依赖性,说明各给药组对大鼠 OP 有治疗作用,高剂量加味阳和汤改善大鼠股骨 BMD 效果最明显。

ALP 主要由成骨细胞合成,是骨形成的生化标

志物,反映成骨细胞的活性;TRAP 主要由破骨细胞分泌,是骨吸收的生化标志物,反映破骨细胞的活性<sup>[7-9]</sup>。模型组 ALP、TRAP 显著高于正常对照组,可佐证维甲酸所致骨质疏松为高转换型骨质疏松,骨形成及骨吸收活动加强,但骨吸收速度远高于骨形成,骨量丢失,形成 OP<sup>[10-11]</sup>。各给药组大鼠血清 ALP 均高于空白对照组,说明各给药组均可不同程度地促进骨形成。各给药组大鼠血清 TRAP 活性均降低,说明各给药组的骨吸收被不同程度地抑制。

微量元素在人体中含量极少,但在抗病、防癌等方面作用巨大,与人的健康息息相关,维持人体正常的生理活动<sup>[12-13]</sup>。不同浓度的加味阳和汤对血清 Mg、Fe、Zn 等微量元素均具有上调作用,可引起矿物质的沉积,增加骨密度,抗骨质疏松。

综上所述,不同剂量加味阳和汤组给药后,大鼠乏力、静卧、小便多等肾虚表现得到明显改善,大鼠股骨 BMD 及血清微量元素均有不同程度的上升,说明加味阳和汤对 OP 的防治作用与其补肝肾、温阳通经络的功效密不可分。加味阳和汤能改善维甲酸、氢化可的松所致的肾虚型 OP 模型鼠股骨 BMD,促进骨形成,抑制骨吸收,引起矿物质的沉积,发挥抗骨质疏松的作用。

#### 参考文献:

- [1] ZHANG Z H, LIU Z H, LI N, et al. Expert consensus on the diagnosis of osteoporosis in Chinese Population [J]. Chin J Osteoporos, 2014, 20(9):1007-1010.

- [2] MORALES-TORRES J, GUTIÉRREZ-UREÑA S. Osteoporosis committee of pan-american league of associations for rheumatology. the burden of osteoporosis in latin america[J]. *Osteoporos Int*, 2004, 15(8): 625-632.
- [3] 张智海, 刘忠厚, 石少辉, 等. 中国大陆地区以-2.5 SD为诊断的骨质疏松症发病率文献回顾性研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(1): 1-7, 24.
- [4] ZHAO X L, FENG Y X, PENG Y. Prevention and treatment of osteoporosis with Chinese herbal medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(4): 265-270.
- [5] 王志超, 李志毅. 鹿角胶丸对骨质疏松模型大鼠影响的实验研究[J]. *中医正骨*, 2003(11): 16-17, 66.
- [6] 李娜, 李新民, 孙伟杰, 等. 腰椎定量CT与双能X线骨密度测量对老年患者骨质疏松检出率的比较分析[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2012, 5(2): 83-88.
- [7] 程敏, 刘雪英, 邓雅婷, 等. 墨旱莲对维甲酸所致大鼠骨质疏松症的药效学研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(10): 1318-1323.
- [8] 张建花, 沈焱, 何玉琼, 等. 二仙汤抗骨质疏松有效组分对维甲酸致骨丢失大鼠的影响[J]. *第二军医大学学报*, 2018, 39(2): 165-170.
- [9] 沈晨啸, 章建华, 尹华. 补肾活血颗粒对维甲酸所致大鼠骨质疏松模型的药效学研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(20): 154-158.
- [10] 许鹏, 郭雄, 张银刚, 等. 维甲酸诱导骨质疏松模型大鼠的效果及机理[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2005, 36(2): 229-232.
- [11] 许碧莲, 崔燎, 陈文双, 等. 维甲酸致大鼠骨质疏松模型探讨及丹参骨宝的预防作用[J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(4): 539-543.
- [12] 朱孟勇, 赫长胜, 王彩娇. 巴戟天多糖对骨质疏松大鼠骨密度及血清微量元素的影响[J]. *中草药*, 2010, 41(9): 1513-1515.
- [13] 王新玲, 李桂财, 张华, 等. 乌鲁木齐市维吾尔族青年与老年女性血清微量元素及骨密度的对比[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(33): 5264-5268.

(收稿日期: 2018-11-22; 编辑: 曹健)

## Effect of Jiawei Yanghe Decoction on Bone Mineral Density and Serum Trace Elements in Osteoporosis Rats with Kidney Yang Deficiency

CAO Duan-guang<sup>1</sup>, XIA Han-ting<sup>1</sup>, YANG Wen-long<sup>2</sup>, YANG Fo<sup>1</sup>, LIU Pu<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, WANG Shu-hao<sup>1</sup>, YANG Feng-yun<sup>2</sup>

**[Abstract] Objective** To investigate the effect of different concentrations of Jiawei Yanghe Decoction on bone mineral density (BMD) and serum trace elements in a rat model of osteoporosis (OP) with kidney Yang deficiency induced by intragastric administration of retinoic acid and gluteal intramuscular injection of hydrocortisone. **Methods** A total of 48 Sprague-Dawley rats were divided into blank control group, model group, low-, middle-, and high-dose Jiawei Yanghe Decoction groups, and positive control group. All rats except those in the blank control group were used to establish a model of OP with kidney Yang deficiency. The rats in the model group, low-, middle-, and high-dose Jiawei Yanghe Decoction groups, and positive control group were given 1% sodium carboxymethyl cellulose, Jiawei Yanghe Decoction (5, 10, and 20 g/kg), and estradiol valerate (0.0002 g/kg), respectively, by gavage, once a day for 6 consecutive weeks. The femur and serum were collected to measure BMD of the femur and serum levels of alkaline phosphatase (ALP), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), and the trace elements magnesium (Mg), ferrum (Fe), and zinc (Zn). **Results** Compared with the model group, the low-, middle-, and high-dose Jiawei Yanghe Decoction groups had significant increases in BMD, significant reductions in serum ALP and TRAP, and significant increases in serum Fe and Zn (all  $P < 0.05$ ), while there was no significant difference in serum Mg level between the two groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Jiawei Yanghe Decoction exerts a marked therapeutic effect on OP rats with kidney Yang deficiency, possibly by regulating the serum levels of trace elements and inhibiting the high bone turnover rate.

**[Key words]** Jiawei Yanghe Decoction; Osteoporosis; Retinoic acid; Bone mineral density; Serum trace element