

不同时长麦粒灸干预对去卵巢骨质疏松模型大鼠雌二醇和骨密度及碱性磷酸酶的影响

胡靖¹ 赵晓平*¹ 彭娟娟² 冯照群¹ 范小璇³
陈杰¹ 李崇楠¹ 李陇平¹ 张燕婷¹ 侯文³

(1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000;
3. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000)

摘要:目的 观察不同时长麦粒灸干预对去卵巢大鼠骨质疏松的作用及其初步机制。方法 选取60只3月龄SD健康雌性大鼠,按随机数字表法分为假手术组和手术组,假手术组15只,手术组45只。除假手术组外采用双侧卵巢切除术,复制骨质疏松模型,术后连续10d以阴道图片检测动情周期筛选动物,复制成骨质疏松大鼠模型,从假手术组选取10只大鼠设为对照组,从手术组选取40只大鼠按随机数字表法分为模型组、雌激素组和麦粒灸一个半月组、麦粒灸三月组,每组10只。其中,对照组和模型组不作任何处理,雌激素组皮下注射戊酸雌二醇,麦粒灸组给予麦粒灸干预治疗。连续干预3个月后进行骨密度(BMD)检测,然后从腹主动脉取血,检测血清雌二醇、碱性磷酸酶等指标。结果 空白组、麦粒灸组和雌激素组大鼠腰椎(腰1~腰4)椎体和右侧股骨的BMD较模型组均有提高,但比较均无统计学意义($P > 0.05$);麦粒灸二组较麦粒灸一组比较,骨密度是提高了,其中两者的腰椎骨密度相比, $P < 0.05$,两者有统计学差异;雌激素组的雌二醇和麦粒灸二组与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$),麦粒灸二组的雌二醇和空白组比较有显著差异性($P < 0.01$),麦粒灸二组较麦粒灸一组比较也存在统计学差异($P < 0.05$),空白组碱性磷酸酶较模型组有显著差异性($P < 0.01$),麦粒灸二组较麦粒灸一组有明显降低,但差异无统计学意义。结论 麦粒灸能明显提高去卵巢骨质疏松症模型大鼠腰椎骨密度和血清雌二醇的水平,下调血清碱性磷酸酶的水平,并且早期开始干预的效果明显优于晚期干预。

关键词: 骨质疏松; 麦粒灸; 碱性磷酸酶; 雌二醇; 骨密度

中图分类号: R 711.75 文献标识码: A 文章编号: 2096-1340(2016)06-0117-04

DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2016.06.040

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种以骨量降低和骨组织微结构破坏为特征,导致脆性增加和易于骨折的代谢性骨病^[1]。绝经后骨质疏松(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是因激素分泌紊乱引起的,几乎占骨质疏松症的一半以上^[2]。对于PMOP现代医学认为:绝经后,由于雌激素的下降,骨丢失速度加快,是造成骨质疏松症的主要原因^[3,4]。现代西医学对骨质疏松的治疗虽然药物很多,但基本都具有副作用,麦粒灸作为一项极

具中医特色的治疗手段,已经越来越为人们所接受,有研究已经证明麦粒灸可以改善绝经后骨质疏松的骨质状况,延缓骨质疏松的进度,但未曾有研究做出关于早期干预的报道,已经不同时期的早期干预所产生的不同影响,研究就通过观察不同时期的麦粒灸干预对去卵巢大鼠骨质疏松症模型的雌二醇、骨密度和碱性磷酸酶的影响,探讨麦粒灸作用的可能机制,以及不同时期干预对实验结果造成的不同影响,为麦粒灸早期防治骨质疏

* 通讯作者: 赵晓平(1963-)男,教授,主任医师,研究方向:中西医结合治疗神经外科疾病的临床与实验研究。E-mail: Xianyun0321@163.com

松症的有效而无副作用的治疗方法提供更加科学的理论依据。

1 材料与方

1.1 实验动物及仪器试剂

1.1.1 实验动物 选取60只健康雌性(Sprague-Dawley, SD) SPF级大鼠, 3月龄, 未曾交配, 体重180-220 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物使用许可证为SCXK(京)2014-0001。动物饲养于陕西中医药大学动物中心, 实验期间室温22~27℃, 相对湿度:55%~65%, 12h明暗周期、喂全价颗粒饲料、自由摄食饮水。

1.1.2 药物试剂 戊酸雌二醇片(克龄蒙) 购于DELPHARM Lille S. A. S, 批号:20130006。青霉素 购于山东鲁抗医药股份有限公司, 将黄金艾绒做成麦粒灸5 mg/壮, 大小均匀一致。黄芩油膏。

1.1.3 实验设备 Discovery-A骨密度仪(美国Hologic公司)、高速离心机(德国Eppendorf公司)、MIKRO220/220R低温高速离心机(HETTICH公司)、光学显微镜(南京中医药大学动物中心)、雌二醇(Estradiol, E2)和碱性磷酸酶(Auxin)检测试剂盒购于南京建成悦浩科技有限公司, Rat Estradiol(E2) Elisa测定试剂盒 Lot:201506, Exp:201511, CHA--SS恒温箱(常州国华电器有限公司), SK-1混匀器(常州国华电器有限公司), 华东电子DG5033A A酶标仪(南京华东电子集团医疗装备有限责任公司), Thermo 300 μ l 8道移液器, Thermo Electron(shanghai) Instruments Co., Ltd热电(上海)仪器有限公司, Labsystems Finnpi-pette 200 0 μ l 11单道芬兰移液器(上海雷勃分析仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制作及分组 选取60只3月龄SD健康雌性大鼠, 适应性喂养一周后, 按随机数字表法分为手术组和假手术组, 手术组45只, 假手术组15只, 手术组采用双侧卵巢切除法复制骨质疏松症模型^[5-6]: 10%水合氯醛按0.3 mL/100 g腹腔注射SD大鼠致麻醉, 从脊柱尽肋处切开肌肉和腹膜, 揭开脂肪层, 彻底切除两侧卵巢。假手术组则同样切开腹腔, 揭开脂肪层, 将卵巢移出后复

位, 并不切除卵巢而缝合切口。大鼠术后给予青霉素1.6万单位U/100 g体重, 肌肉注射, 连续3d防止感染。手术切除卵巢第2d起进行阴道涂片检查, 连续观察10d, 根据是否有动情周期判断卵巢切除是否彻底, 有动情周期的大鼠弃之不用。造模成功后, 从假手术组选取10只大鼠设为对照组, 青霉素抗感染处理后, 不作任何干预处理。从手术组选取40只大鼠按随机数字表法分为模型组、雌激素组、麦粒灸一组和麦粒灸二组, 每组10只, 其中麦粒灸一组在手术后一个半月开始干预, 麦粒灸二组在手术后立刻开始为期三个月的干预。

1.2.2 干预方法 麦粒灸组: 人工固定小鼠, 穴位定位参考华兴邦等“大鼠穴位图谱的研制”^[6]的方法实施选穴: ①关元、三阴交(双); ②肾俞、足三里(双)。穴位定位: 关元: 脐下约25 mm处, 三阴交: 后肢内踝尖直上10 mm处, 左右侧各一穴; 肾俞: 第二腰椎下两旁, 左右侧各一穴。足三里(后三里)穴: 膝关节下方, 当腓骨小头内约5 mm处。每日选择其中一组穴位行麦粒灸治疗, 二组穴位交替进行。在穴位处涂敷黄芩油膏, 采用5 mg/壮麦粒大小的灸绒置于所需灸穴位处, 使用线香点燃艾绒, 每壮待大鼠出现所灸部位的收缩动作, 即可移去艾绒。按此重复, 每次5壮。六天为一个疗程。F组连续治疗3个月, D组连续治疗一个半月。麦粒灸意外及处理: 艾灸过程严格按照直接灸的操作避免烫伤。施灸时防止艾绒脱落烧伤大鼠的毛发和皮肤。

1.3 检测指标 治疗3个月后, 将对照组、模型组、雌激素组和中药组大鼠分别进行BMD检测, 然后3%戊巴比妥钠按0.1 mL/100 g腹腔注射SD大鼠致麻醉, 经腹主动脉取血, 血液样本室温静置2h后, 3000 r/min离心30 min取血清, 分装, 置于-20℃冰箱保存集中待测。

1.3.1 骨密度检测 大鼠处死前使用Discovery-ABMD仪及其梯级标准模型和分析软件(美国Hologic公司产)在体扫描, 自动分析得出大鼠全身及腰椎(L1-L5)及股骨(股骨全段)的BMD值, 每个大鼠都按照定好的位置和大小进行检测, 本

次实验以腰椎及右侧股骨骨密度进行比较。

1.3.2 血清雌二醇和碱性磷酸酶检测:血清雌二醇和碱性磷酸酶均采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法^[7]。

1.4 统计学方法 使用SPSS1 1.0版统计分析软件进行统计学处理,所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠腰椎和股骨体BMD的变化 连续治疗3个月后,空白组的总体的BMD为:(0.260 ± 0.011),模型组的总体BMD为(0.236 ± 0.009),两者比较 $P < 0.01$,差异有统计学意义。再次说明我们所造的模型成功。空白组、麦粒灸组和雌激素组大鼠腰椎(腰1~腰4)椎体和右侧股骨的BMD较模型组均由提高,但比较均无统计学意义($P > 0.05$);麦粒灸二组较麦粒灸一组比较,骨密度是提高了,其中两者的腰椎骨密度相比 $P < 0.05$,两者有统计学差异,说明手术后之间干预较手术一个半月后再行干预,效果明显。详见表1。

表1 各组大鼠干预后腰椎体和右侧股骨体BMD的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	腰椎椎体	右侧股骨体
空白组	10	$0.249 \pm 0.014^{**}$	0.283 ± 0.019
模型组	10	0.219 ± 0.006	0.270 ± 0.020
雌激素组	10	0.220 ± 0.013	0.282 ± 0.014
麦粒灸一组	10	0.225 ± 0.012	$0.276 \pm 0.010\#$
麦粒灸二组	10	0.235 ± 0.010	0.279 ± 0.003

注:*表示和B组比较有统计学差异($P < 0.05$),**表示和B组比较有显著性差异($P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠血清中雌二醇和碱性磷酸酶的变化 模型组大鼠血清雌二醇和血清碱性磷酸酶的水平分别为(121.46 ± 7.73) ng/ml和(6.95 ± 1.12) King unit/100mL;各组的雌二醇水平均较模型组有提高,其中雌激素组和麦粒灸二组与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$),甚至两个麦粒灸组的雌二醇较空白组也都较空白组高,其中麦粒灸二组和空白组比较有显著差异性($P < 0.01$),而麦粒灸二组较麦粒灸一组比较也存在统计学差异

($P < 0.05$),再次说明早期干预的效果明显优于晚期干预。各组碱性磷酸酶含量均较模型组有所降低,空白组较模型组有显著差异性($P < 0.01$),麦粒灸二组较麦粒灸一组有明显降低,但差异无统计学意义。详见表2。

表2 各组大鼠血清雌二醇和碱性磷酸酶的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	雌二醇(ng/mL)	碱性磷酸酶(King unit/100 m)
空白组	10	$129.69 \pm 6.45\#\#$	$4.40 \pm 2.27^{**}$
模型组	10	121.46 ± 7.73	6.95 ± 1.12
雌激素组	10	$135.27 \pm 2.47a^{**}$	5.51 ± 0.78
麦粒灸一组	10	$130.73 \pm 7.49\#$	6.29 ± 1.68
麦粒灸二组	10	$141.40 \pm 9.96^{**}$	5.91 ± 2.01

注:*表示和B组比较有统计学差异($P < 0.05$),**表示和B组比较有显著性差异($P < 0.01$)。

#表示与F组比较有统计学差异($P < 0.05$) ##表示与F组比较有显著性差异($P < 0.01$)

3 讨论

中医学并没有骨质疏松症的病名,该病属于中医“骨痿”之范畴,其病机主要有:肾虚为本,脾虚为本,以及脾肾俱虚共为根本三种^[8]。

中国古籍中早有关于麦粒灸记载,如《灵枢·官能》篇中曾有记载“针所不为,灸之所宜。”现代研究表明,电针可以调节去卵巢大鼠的内分泌激素^[5]。有学者还发现,灸法可以提高免疫力,有效地增强机体清除自由基能力,调整内环境,从而延缓衰老过程^[7],在一定程度上可以改善围绝经期症状。徐天舒等^[8]研究结果显示麦粒灸可提高围绝经期模型大鼠血清中E2水平,重建雌激素的部分负反馈作用从而影响围绝经期模型大鼠神经系统的功能状态,从而降低围绝经期综合征的发生。李晓泓等^[9]研究天灸作用时发现天灸可使股骨髓面积扩大的程度减弱,抑制股骨1/3段矿盐的丢失。其进一步研究发现摘除卵巢后马上天灸可有效地减少骨量丢失,对抗骨密度的下降,使骨干增粗、承载外力作用增强。

研究表明,麦粒灸与针灸相比,具有热力深透,患者易于接受、疗效显著的特点;与天灸等其他灸法相比,麦粒灸在操作、灸感、效应等方面也有其明显特点。由于在施灸过程中特有的灼痛与

化脓现象,因此麦粒灸具有现代学者所总结的“温通”的特性,即麦粒灸具畅通、调和经络的优势。灸法一方面使患者出现强烈的穿透性灼痛感,另一方面使局部组织不同程度地损伤产生异体蛋白,从而激活机体的防御机制,而产生持久而多方面调整^[10]。虽然灸法只能在体表操作,难以像针刺那样直达深部,但灸法的温通所产生的激发效应,是针刺法所不具有的,而且灸法非特异性的整体调节效应比针刺法更加明显。总之灸法是一种行之安全、有效、简便易行的方法。我们在本次实验中麦粒灸所选穴位为关元穴、足三里穴、三阴交和肾俞穴,关元位于人身阴阳元气交关之处,具有培元补肾固本之功,足三里对垂体性腺轴的促进作用,有关资料早有报道。研究证实足三里、关元对提高 E2 有特异性作用^[11]。肾俞穴是中医上公认的对于腰膝酸软的患者有明显而确切的疗效,它的主治症与绝经后骨质疏松的临床表现具有高度的一致性。三阴交是治疗遗精、阳痿、遗尿等生殖泌尿系统具有很好的疗效,这些症状也与绝经后骨质疏松症有明确的相关性。

血清碱性磷酸酶是成骨细胞合成和分泌的,是骨形成的一种特异性指标^[12],骨代谢旺盛时期成骨细胞活跃,所以可以见到碱性磷酸酶分泌量增加,并且表现在使血清 ALP 活性上升,因此,血清碱性磷酸酶是骨重建活跃性改变的标志之一,有研究表明,经补肾方治疗后绝经后骨质疏松症后,碱性磷酸酶含量较治疗前降低^[13],与本次实验结果具有一致性。经麦粒灸治疗后,血清碱性磷酸酶含量降低,雌二醇水平和骨密度提高,提示麦粒灸对机体的作用可能也通过血清碱性磷酸酶调节。而且早期干预的效果明显优于手术一段时间之后再行干预,也提供给临床治疗绝经后骨质疏松症的合适的时机,即尽早干预,效果会更好,这与其他学者的研究也具有高度的一致性。证明灸法对于绝经后骨质疏松症有明确的疗效。但是麦粒灸对于机体的作用的具体通路和机制尚不能完

全明确,有待进一步研究发现。

参考文献

- [1]田丙坤,邢玉瑞,乔文彪,等.补肾健脾活血法治疗骨质疏松症机理研究进展[J].陕西中医学院学报,2014,37(6):108-111.
- [2]庄洪,邵敏.绝经后骨质疏松症患者骨密度及骨代谢参数的调查研究[J].中国骨质疏松杂志,2002,8(2):52-54.
- [3]郑昱新,周国林,石关桐,等.绝经后妇女骨密度、体重指数、血脂和雌激素分泌的关系[J].中国骨质疏松杂志,2005,11(1):42-45.
- [4]林燕萍,周瑞祥,冯尔宥,等.健骨颗粒对去卵巢骨质疏松模型鼠钙调节激素的影响[J].中国骨伤,2005,18(1):26-28.
- [5]华兴邦,李辞蓉.大鼠穴位图谱的研制[J].实验动物与动物实验,1991,3(1):1-5.
- [6]程丽娜,杜桂珍,陈伯英.电针调整去卵巢大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴异常功能的生化机制[J].上海针灸杂志,2001,20(6):32-34.
- [7]崔云华,施茵,国兰琴,等.艾灸对老年人衰老症状及外周血单个核细胞细胞周期的影响[J].辽宁中医杂志,2008,35(5):758-760.
- [8]徐天舒,阮建国,戴玮,等.针刺与麦粒灸对围绝经期模型大鼠血清 E₂、FSH、LH 水平的影响[J].南京中医药大学学报,2012,28(6):564-566.
- [9]李学武,李晓泓,张露芬,等.天灸防治去卵巢大鼠骨质疏松的实验研究[J].中国骨质疏松杂志,1998,4(3):61-64.
- [10]王玲玲.麦粒灸临床特点及适宜病症[J].上海针灸杂志,2013,32(11):889-891.
- [11]贾育松.穴位注射治疗绝经后骨质疏松症初探[J].中国骨质疏松杂志,2003,9(2):55-77.
- [12]劳瑞平,孙桂荷,孙艳红.补肾健脾活血法对绝经后骨质疏松症患者骨碱性磷酸酶的影响[J].光明中医,2012,27(10):1983-1984.
- [13]柯青,刘海全,牛维.补肾方药对绝经后骨质疏松症患者骨密度及血钙、血清碱性磷酸酶的影响[J].中国临床康复,2005,31(9):186-189.

(收稿日期:2016-03-22 编辑:文颖娟)