

电针足少阳经穴对去卵巢大鼠骨质疏松的作用

王鸿度¹ 扶世杰¹ 陈 庄² 魏 喆¹ 张丰正¹ 史小玲² 江 洋¹ 江 花^{1*}

(1. 泸州医学院中西医结合学院, 四川省泸州市忠山路 3 段 319 号, 646000; 2. 泸州医学院附属医院)

基金项目: 国家中医药管理局科研专项课题(06-07JP40); 四川省科技厅科研专项课题(2009JY0127)

* 通讯作者: jhflower2586546@sina.com, 13619044639

[摘要] **目的** 验证电针足少阳经穴的抗骨质疏松效应。**方法** 将 40 只 Wistar 雌性大鼠随机分为假手术组、模型组、胆经组、非经穴组, 后 3 组行去卵巢造模手术, 术后 3 个月胆经组、非经穴组按不同取穴方案开始电针, 假手术组、模型组则不行针刺。干预 3 个月后, 分别检测各组大鼠骨密度、骨组织形态学及骨代谢标志物包括骨形成指标及骨吸收指标等。**结果** 模型组和非经穴组骨密度体重校正正值较胆经组、假手术组明显下降($P < 0.05$)。骨组织 HE 切片可见胆经组骨微结构较其他组明显改善。骨形成指标显示胆经组大鼠骨重建的成骨活动较其他组更活跃($P < 0.05$); 骨吸收指标亦提示非经穴组、模型组较其他组破骨活动强烈($P < 0.05$), 而胆经组骨吸收降低, 与假手术组比较无统计学差异($P > 0.05$)。**结论** 电针足少阳经穴具有肯定的全身性抗骨质疏松效应, 可为《黄帝内经》“少阳主骨”关于体表足少阳及其经穴可自身调节骨强度而治疗骨质疏松相关病症的推断提供实验依据。

[关键词] 足少阳经穴; 电针; 抗骨质疏松; 去卵巢大鼠

The Antiosteoporotic Effect of Electroacupuncture at Foot Shaoyang Channel Points in Ovariectomized Rats

WANG Hongdu¹, FU Shijie¹, CHEN Zhuang², WEI Mei¹, ZHANG Fengzheng¹, SHI Xiaoling², JIANG Yang¹, JIANG Hua¹

(1. College of Integrated Chinese and Western Medicine, Luzhou Medical College, Luzhou 646000; 2. Affiliated Hospital of Luzhou Medical College)

ABSTRACT **Objective** To verify the antiosteoporotic effect of electroacupuncture at Foot Shaoyang Channel points. **Methods** Forty Wistar female rats were randomized into sham operation group, model group, gall bladder channel point group, and non-channel point group, and the latter three groups were ovariectomized. Three months after operation, the gall bladder channel point group and non-channel point group were treated with electroacupuncture at the corresponding points according to the planned program for 3 months. Then the samples were collected for studying the changes in bone mineral density (BMD), bone histomorphology, and bone biomarkers including bone formation and resorption indices. **Results** In the model group and non-channel point group, the BMD/body weight adjusted value were significantly lowered than those in the gall bladder channel point group and sham operation group ($P < 0.05$). Bone tissue HE stained observation showed that the bone microstructure in the gall bladder channel point group was more significantly improved than that of other groups. Bone formation markers showed that the osteoblastic activity of remodeling was stronger in the gall bladder channel point group than that of other groups ($P < 0.05$). Bone resorption markers also showed that the osteoclastic activity was stronger in the non-channel point group and model group than that of other groups ($P < 0.05$). But bone resorption in the gall bladder channel point group was lowered, without statistical difference in comparing with the sham operation group ($P > 0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture at Foot Shaoyang Channel points is surely effective in antiosteoporosis, providing an experimental evidence for the theory in *Internal Classic* that Shaoyang dominates bones, from which, the inference is that the Shaoyang channel and its points can regulate the bone intensity, thus, they are used to treat osteoporosis.

Key Words Foot Shaoyang Channel Points; electroacupuncture; antiosteoporosis; ovariectomized rats

除“肾主骨”理论外,《黄帝内经》中还记载有“少阳主骨”之说。经理论模型分析,我们认为该学说可能首次阐明体表足少阳经穴能够自身调控骨强度的生理和病理变化,从而可以改善以骨痛和骨折为主要临床表现的骨质疏松症(osteoporosis, OP)^[1]。迄今为止国内罕有胆(少阳)与骨病高度相关的研究,

但近年国外“胆源性骨病”资料报道较多,即胆病可导致并发 OP^[2-5]。因此,探索并验证足少阳胆及其经穴是否具有骨相对特异性调节作用,特别是抗骨质疏松的效应,是一个很有价值的课题。这将丰富中医骨生理病理认识的内涵,获得足少阳及其经穴特性和用途的新知识,并为今后 OP 临床治疗开拓新的途

径。我们选择标准化去卵巢OP大鼠模型,观察电针足少阳经穴后大鼠骨密度、骨组织形态学及骨代谢标志物等的变化。现将结果报告如下。

1 材料

1.1 动物

12月龄SPF级Wistar雌性大鼠40只,体重(220±10)g,由第三军医大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(渝)2007-0005。实验期间动物喂食正常饲料,自由饮水;每周称重1次。

1.2 主要试剂及仪器

ELISA试剂盒(美国ADL公司);皇龄牌毫针(0.25mm×25mm,泰兴市三里医疗用品厂生产),G6805-I型电针仪(青岛鑫升实业有限公司),QDR-4500A型双能X线骨密度仪(美国Hologi公司),Olympus-BX51显微图像采集系统(Image Pro Plus 6.0,美国Media Cybernetics公司)。

2 方法

2.1 动物分组方法

40只实验大鼠按完全随机化方案分组:将动物编号后,用Microsoft Excel软件随机数发生器产生随机数字表,应用随机数字,将各数一律以4除之,并以余数0、1、2、3分别进入假手术组11只,去势模型对照组(模型组)10只,模型加电针胆经穴组(胆经组)9只,模型加电针非经穴组(非经穴组)10只。

2.2 模型制备及假手术方法

各组大鼠腹腔注射1.5%戊巴比妥钠溶液麻醉,给药剂量为0.3ml/100g体重。俯卧位固定,在背部中部1/3处剪毛,用碘酒、乙醇局部消毒皮肤后自腰椎沿背部正中线下作纵形切口约2~3cm。沿肩胛线分别于左右两肋下剪开腹肌,可见位于两侧肾脏外下方呈粉红色的卵巢及紧密相连的子宫角,去卵巢动物模型在子宫角结扎,切断子宫角,摘除卵巢;假手术组仅摘除卵巢附近相当于卵巢大小的脂肪块。术后连续肌肉注射青霉素3天,5万U/只,1次/天。术后所有动物在同一条件(室温19~24℃,相对湿度40%左右)用普通饲料饲养,自由饮水。

2.3 实验方法

造模术后3个月开始进行分组干预。
胆经组根据《实验针灸学》^[6]选择以下穴位:阳陵泉(距足三里上外侧5mm在腓骨头前下方凹陷处,直刺6mm)、环跳(后肢髋关节后上缘,直刺7mm)、京门(侧腰部,第12肋游离端直刺2mm)、悬钟(后肢外踝尖直上10mm平对三阴交穴)。电针方

法:穴位局部常规消毒,以毫针进针后,行平补平泻手法2min,连接G6805-I型电针仪。波型:疏密波,频率:15Hz,强度:0.2~0.6mA;以所取穴位局部出现节律性震颤为度。刺激时间每次10min,每日1次,10次为1个疗程。疗程之间间隔5天,再行下个疗程。共针刺6个疗程。穴位按左右侧轮换及远近端配合原则选择。

非经穴组选后肢内侧非经穴处,每次选同侧远近两点,左右侧轮换,电针方法及疗程同上。假手术组、模型组则不予干预。

2.4 标本采集

实验结束后,大鼠于处死前1天分别置于代谢笼中,收集24h空腹尿液,置-20℃低温冰箱中备用。处死前用电子台秤称其体重。动物麻醉后开胸从心脏取血5ml,置37℃水浴箱中2h,待血清分离后(3000r/min,10min),取血清置-20℃低温冰箱保存待测。取大鼠双侧股骨,将离体骨仔细剥离掉附着肌肉和结缔组织,右侧股骨送检骨密度(BMD);左侧股骨远端1/3部分送检骨组织形态学观察。

2.5 检测指标及测定方法

BMD检测:标本送华西医科大学附属第四医院。右侧离体股骨置于盛有去离子水的薄壁有机玻璃盒内之水底,使用QDR-4500A型双能X线骨密度仪及所附的小动物测量软件,测量右侧股骨BMD。

骨组织形态学观察:取左侧股骨远端1/3部分,室温置于4%福尔马林溶液中固定。在甲酸中浸泡至完全脱钙后,沿矢状面剖开。经梯度酒精(80%乙醇24h,95%乙醇12h反复2次,100%乙醇1h反复2次)脱水,二甲苯透明浸泡30min,反复2次。组织取出后浸入石蜡中30min,更换石蜡反复浸泡3次,石蜡凝固后取出蜡块。用切片机切片,厚度为5μm。二甲苯脱蜡;高至低浓度酒精脱苯;苏木素,伊红染色;低至高浓度酒精脱水;二甲苯透明;中性树胶封固。Olympus-BX51显微图像采集系统200倍下选取,Image Pro Plus 6.0医学图像分析软件进行计算机图像分析、照相。

骨代谢指标的测定:骨形成标志物:血清骨碱性磷酸酶(BAP)、血清骨钙素(OC)、血清I型前胶原氨基末端肽(PINP);骨吸收生化标志物:尿脱氧吡啶啉(DPD)、血清I型胶原交联氨基末端肽(NTX),均用ELISA法。

2.6 统计学方法

所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,采用

SPSS 11.0 统计软件处理。多组之间进行方差齐性检验、单因素方差分析,再行组间多重比较(LSD法)。如果未满足方差齐性(如BAP、PINP原始数据呈偏态分布,方差分析失效),则使用SPSS软件中秩变换模块进行数据转换,计算RANK分,再行方差检验、组间多重比较(LSD法)。

3 结果

3.1 各组大鼠骨组织HE切片观察

模型组的骨质变薄,骨基质排列紊乱,呈网状,骨细胞数目少,骨基质少,骨小梁外形不规则。胆经组较其他组骨微结构明显改善,普遍骨质较规则、宽阔,分化较成熟,可见骨髓腔结构。

3.2 各组大鼠BMD体重校正值得比较

表1示,模型组和非经穴组BMD体重校正值得(BMD/体重 $\times 100$)较假手术组显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);而模型组和非经穴组比较无统计学意义($P > 0.05$)。胆经组较模型组、非经穴组BMD体重校正值得明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与假手术组比较无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 各组大鼠BMD体重校正值得比较($\text{mg}/\text{cm}^2 \cdot 100\text{g}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	BMD 体重校正值得
胆经组	9	$0.062 \pm 0.009^* \triangle$
非经穴组	10	$0.050 \pm 0.006^{\blacktriangle}$
模型组	10	$0.051 \pm 0.005^{\blacktriangle}$
假手术组	11	0.065 ± 0.007

注:与模型组比较, $*P < 0.05$;与非经穴组比较, $\triangle P < 0.05$;与假手术组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

3.3 各组大鼠骨代谢生化标志物比较

表2示,非经穴组DPD明显升高,较其余3组均有统计学差异($P < 0.05$);模型组亦显著高于胆经组、假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。NTX、OC各组间无统计学差异($P > 0.05$)。胆经组BAP明显高于假手术组、模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);假手术组、模型组及非经穴组3组之间无统计学差异($P > 0.05$)。胆经组PINP与其他3组比较均无统计学差异,但其值高于非经穴组和模型组;假

手术组较非经穴组和模型组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

4 讨论

1994年美国FDA推荐使用去卵巢(OVX)大鼠模型用于绝经期OP的前临床和临床设计^[7-8]。Wistar大鼠OVX造模后14天已见近端胫骨干骺端骨量减少,30~60天达50%;而股骨、颈骨量减少约在30天,180天达50%^[8]。本实验使用12月龄大鼠,摘除卵巢后等待3个月,才开始为期3个月的干预,共计180天,因此模型是可靠的。本研究结果中BMD体重校正值得分析显示,模型组和非经穴组较假手术组显著下降($P < 0.05$),胆经组与假手术组比较无统计学差异,却分别较模型组、非经穴组明显升高($P < 0.05$)。这说明:①造模成功;②电针胆经穴后克服了造模所导致的骨量加速丢失,使BMD回复到近似未摘除卵巢的水平;③非经穴组电针干预亦未能扭转造模后骨量严重丢失。

体重与BMD及骨的几何尺寸的相关性在 $0.85 \sim 0.97^{[9-10]}$,所以很多专家建议采用双能X线骨密度仪测定大鼠BMD时必须考虑体重因素^[11-12]。我们观察到大鼠造模后,模型组体重明显增加,而电针大鼠体重降低,尤其以胆经组为明显。有研究表明,OVX大鼠增重可部分抵消实际BMD值下降^[13];而一些药物(如雌激素)常能抑制OVX大鼠的增重效应,又可部分抵消实际BMD值增加^[14]。因而本实验采用BMD体重校正方法,其结果与形态学观察结果是吻合的。

骨吸收指标DPD、NTX是反映胶原降解和骨吸收的灵敏指标^[15-17]。本研究中,非经穴组的DPD升高较其余3组均有统计学意义;模型组亦显著高于胆经组、假手术组($P < 0.05$),提示非经穴组较其他3组破骨活动更加活跃;而模型组破骨活动又强于另两组。胆经组DPD与假手术组无差异,表明电针足少阳经穴后大鼠去卵巢的作用被扭转。

血清NTX以及骨形成指标OC在各组间均无统计学差异,不排除这两个指标受昼夜节律性变化

表2 各组大鼠骨代谢生化标志物比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	DPD(nmol/L)	NTX(nmol/L)	BAP(U/L)	PINP(ng/ml)	OC(ng/ml)
胆经组	9	$0.650 \pm 0.169^* \triangle$	1.548 ± 0.169	$27.100 \pm 8.774^* \blacktriangle$	20.888 ± 11.151	1.815 ± 0.137
非经穴组	10	$1.545 \pm 0.222^* \blacktriangle$	1.569 ± 0.074	20.850 ± 11.135	$14.500 \pm 10.102^{\blacktriangle}$	1.858 ± 0.079
模型组	10	$1.274 \pm 0.396^{\blacktriangle}$	1.548 ± 0.088	14.150 ± 9.681	$17.000 \pm 11.747^{\blacktriangle}$	1.817 ± 0.124
假手术组	11	0.679 ± 0.104	1.543 ± 0.079	15.000 ± 11.161	27.700 ± 9.381	1.777 ± 0.121

注:与模型组比较, $*P < 0.05$;与假手术组比较, $\blacktriangle P < 0.05$;与非经穴组比较, $\triangle P < 0.05$

的影响。据报道^[18]大鼠血清NTX、OC峰值都在09:00~13:00。而本实验取血在08:00~09:00,正值动物骨吸收活跃,NTX和OC(骨吸收时结合于骨基质的OC又被释放重新进入循环)值趋于最大时,故组间差异反不明显。DPD采集24h尿液,故未出现上述问题。

骨形成指标BAP水平与成骨细胞和前成骨细胞活性呈线性关系,是最精确的骨形成标志物。胆经组的血清BAP明显高于假手术组和模型组($P<0.05$);该组BAP亦高于非经穴组,虽无统计学差异,也反映出电针胆经经穴后大鼠的成骨活动较非经穴组更活跃的趋势。PINP反映了I型胶原的合成水平。胆经穴组PINP与假手术组无统计学差异,而非经穴组和模型组较假手术组降低($P<0.05$)。这仍提示电针胆经穴后成骨活动加强。OC组间无统计学差异,原因已如上文,仅反映各组骨代谢的实时信息。

参考文献

[1]王鸿度,张丰正,游慧,等. “少阳主骨”理论考辨[J]. 中国针灸, 2008,28(6):468-71.

[2]Parés A, Gualabens N. Osteoporosis in primary biliary cirrhosis: pathogenesis and treatment [J]. Clin Liver Dis, 2008,12(2):407-424.

[3]Guichelaar MM, Schmoll J, Malinchoc M, et al. Fractures and avascular necrosis before and after orthotopic liver transplantation: long-term follow-up and predictive factors[J]. Hepatology, 2007,46(4):1198-1207.

[4]Collier J. Bone disorders in chronic liver disease [J]. Hepatology, 2007,46(4):1271-1278.

[5]Guichelaar MM, Kendall R, Malinchoc M, et al. Bone mineral density before and after OLT: long-term follow-up and predictive factors [J]. Liver Transpl, 2006,12(9):1390-1402.

[6]李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2007:265.

[7]Jee WS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2001,1(3):193-207.

[8]Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, et al. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research [J]. Comp Med, 2008,58(5):424-430.

[9]杨定焯,张倩,杨惠,等. 用骨强度概念探索骨密度测量的诊断指标[J]. 中国骨质疏松杂志, 2002,8(1):10-12.

[10]邱贵兴,林守清. 骨质疏松误诊与漏诊原因分析[J]. 当代医学, 2000,6(10):44-49.

[11]郑高利,郑筱祥. 大鼠BMD、BMC与体重和月龄关系的二元回归分析[J]. 浙江省医学科学院学报, 2001,12(4):5-8.

[12]伍贤平,陆泽元. 双能X线吸收法测定大鼠骨量的评价及去卵巢骨丢失敏感区的选择[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2000,16(4):212-215.

[13]陆泽元,廖二元. DXA测量活体大鼠骨的精密性及骨丢失的检测[J]. 中国骨质疏松杂志, 2001,7(3):199-201,229.

[14]韦永中,陶松年. 依普拉芬和雌激素对实验性骨质疏松作用的初步观察[J]. 中国骨质疏松杂志, 2001,7(1):76-78.

[15]彭应梅,张雪竹,于建春,等. 骨转换生化指标的研究进展及选择依据[J]. 现代生物医学进展, 2008,8(3):593-596.

[16]周学瀛,夏维波. 骨转换生化标志物[J]. 基础医学与临床, 2007,27(10):1093-1100.

[17]McCormick RK. Osteoporosis: integrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility[J]. Altern Med Rev, 2007,12(2):113-145.

[18]Shao P, Ohtsuka-Isoya M, Shimoda H. Circadian rhythms in serum bone markers and their relation to the effect of etidronate in rats [J]. Chronobiol Int, 2003,20(2):325-336.

(收稿日期:2010-05-04;修回日期:2010-07-11)

[编辑:崔京艳]

欢迎邮购《〈中医杂志〉“专题笔谈”文萃》

《〈中医杂志〉“专题笔谈”文萃》收集了《中医杂志》“专题笔谈”栏目1995~2004年10年间关于单味中药单独应用或以单味中药为主配合其他药物治疗各类疾病的临床治疗经验共900余篇文献。

“专题笔谈”是《中医杂志》特色栏目之一,汇集了全国各地中医师丰富的临床实践经验,其中不乏对一些疑难病症的独特治法,也包括了一些常用中药的非常规用法,深受广大医务人员和读者的欢迎,对于临床医生临证用药具有较高的参考价值。全书共分为两辑,定价83元(免邮寄费)。按照著作权法有关规定,我们将向所收载文章的作者寄赠样书1册作为全部稿酬的变通支付方式。请1995~2004年期间在《中医杂志》专题笔谈栏目发表文章的作者及时与编辑部联系,并说明详细联系方式,我们将在收到来信后寄赠样书。

联系地址:北京市东直门南小街16号中医杂志北京医海林音像书店,邮编:100700,电话:(010)64014411 转 3053,64013162,联系

人:崔京艳、邓媛。购书者请在汇款单附言栏注明所购书名及联系电话。

欢迎邮购《中医杂志》

1997年2、4、6、8~12期,每册3.50元;1998年3~8、10~12期,每册4元;1999年4~12期,每册4元,合订本65元;2000年2~12期,每册5.80元,合订本85元;2001年2~12期,每册6.50元,合订本95元;2002年1~12期,每册6.80元,合订本105元;2003年1~12期,每册6.80元,合订本105元;2004年1、2、4~12期,每册6.80元,合订本115元;2005年1~7、9、11、12期,每册6.80元,合订本125元;2006年1~12期,每册7.30元,合订本135元;2007年2~12期,每册8.80元,合订本140元;2008年2~12期,每册9.80元,合订本140元;2009年每册9.80元,合订本140元。《中医杂志》2006~2009年增刊每册4元。以上免费邮寄,如需挂号每册另加3元。

欲购者请汇款至北京东直门内南小街16号中医杂志社读者服务部,邮编:100700,电话:(010)64014411 转 3036。