

## · 基础研究 ·

## 针刺疗法对去卵巢骨质疏松症模型大鼠生长素和雌二醇及骨密度的影响

欧阳钢 施洁 莫非 葛伟 侯立皓 姜青林

**【摘要】目的** 观察针刺对去卵巢骨质疏松症模型大鼠雌二醇、生长素和骨密度的影响。**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手术组和假手术组,手术组 40 只,假手术组 20 只。采用双侧卵巢切除法复制成骨质疏松大鼠模型,造模 3 个月后经双能 X 线法检测 BMD,手术组大鼠腰椎和股骨的骨密度较假手术组明显降低( $P < 0.01$ ),表明骨质疏松模型造模成功。造模成功后,从假手术组选取 10 只大鼠设为对照组,从手术组选取 30 只大鼠按随机数字表法分为模型组、针刺组和雌激素组,每组 10 只。其中,针刺组给予电针刺激,雌激素组皮下注射苯甲酸雌二醇,对照组和模型组不作任何处理。连续干预 3 个月后进行骨密度(BMD)检测,然后处死大鼠,摘除眼球取血,检测血清雌二醇、生长素等指标。**结果** 血清生长素:针刺组[(399 ± 163) pg/ml]和雌激素组[(276 ± 92) pg/ml]与模型组[(546 ± 98) pg/ml]比较,均有明显降低( $P < 0.01$ );血清雌二醇:针刺组[(128.02 ± 62.28) pg/ml]和雌激素组[(182.89 ± 42.01) pg/ml]与模型组[(72.10 ± 19.83) pg/ml]比较,均有明显提高( $P < 0.05$ );腰椎骨密度:针刺组[(0.212 ± 0.019) g/cm<sup>2</sup>]和雌激素组[(0.231 ± 0.021) g/cm<sup>2</sup>]与模型组[(0.191 ± 0.012) g/cm<sup>2</sup>]比较,均有明显提高( $P < 0.05$ ),但针刺组对生长素和腰椎骨密度的作用不及雌激素组( $P < 0.05$ )。**结论** 针刺疗法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,下调血清生长素的水平,但整体作用不及雌激素。

**【关键词】** 骨质疏松; 针刺疗法; 生长素; 雌二醇; 骨密度

**Effect of acupuncture intervention on ghrelin, estradiol and bone mineral density in postmenopausal osteoporosis rats** OUYANG Gang\*, SHI Jie, MO Fei, GE Wei, HOU Li-hao, LOU Qing-lin. \* Department of Rehabilitation Medicine, Jiangsu Province Officers' Hospital, Nanjing 210024, China

**【Abstract】Objective** To observe the effect of acupuncture on ghrelin, estradiol (E2) and bone mineral density (BMD) in postmenopausal osteoporosis rats. **Methods** According to the random number table method, 60 female Sprague-Dawley rats aged 3 months, were randomly divided into surgery group (40 rats) and sham group (20 rats). The osteoporosis model was established by bilateral ovariectomy. Three months after the operation, a significant decrease in BMD of lumbar vertebrae and femur of the model rats as measured by dual energy X-ray absorptiometry against the sham group indicated successful establishment of the osteoporosis model. Then surgery group was randomly divided into a model subgroup, a acupuncture subgroup and an estrogen subgroup, with 10 rats in each subgroup. The acupuncture subgroup was treated with electroacupuncture, estrogen subgroup with subcutaneous injection of estradiol benzoate, sham group and model subgroup without any treatment. After 3 months of intervention all the rats were sacrificed, BMD of the lumbar vertebrae and femur was measured, ghrelin and E2 were determined. **Results** Serum ghrelin in acupuncture subgroup (399 pg/ml) and estrogen subgroup (276 pg/ml) were significantly lower ( $P < 0.01$ ) than that in model subgroup (546 pg/ml); serum E2 in acupuncture subgroup (128.02 pg/ml) and estrogen subgroup (182.89 pg/ml) increased significantly ( $P < 0.05$ ) than that in model subgroup (72.10 pg/ml); lumbar vertebrae BMD in acupuncture subgroup (0.212 g/cm<sup>2</sup>) and estrogen subgroup (0.231 g/cm<sup>2</sup>) increased significantly ( $P < 0.05$ ) than that in model subgroup (0.191 g/cm<sup>2</sup>), but in acupuncture subgroup the effect on improving the level of E2, ghrelin and lumbar vertebrae BMD was less than that in estrogen subgroup ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Acupuncture intervention can improve lumbar vertebrae BMD and serum E2 level of postmenopausal osteoporosis rat model, down regulate serum ghrelin level, but the overall effect of acupuncture is less than estrogen.

**【Key words】** Osteoporosis; Acupuncture; Ghrelin; Estradiol; Bone mineral density

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.10.002

基金资助:国家自然科学基金资助项目(81072850)

作者单位:210024 南京,江苏省省级机关医院康复医学科(欧阳钢、莫非、葛伟、侯立皓、姜青林);南京中医药大学第二临床医学院(施洁)

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis) 是临床上的一种常见病和多发病,其确切的发病机制目前仍未明了,普遍认为主要与雌激素水平下降有关。多年来笔者采用针刺治疗骨质疏松症取得了良好的效果<sup>[1-2]</sup>,但针刺的治疗机制尚不清楚。近年来随着生长素研究的不断深入,人们发现生长素与骨质疏松症密切相关<sup>[3]</sup>。本研究通过观察针刺疗法对去卵巢骨质疏松症模型大鼠雌二醇、生长素和骨密度的影响,探讨针刺治疗绝经后骨质疏松症的可能作用机制,旨在为针刺疗法防治骨质疏松症提供科学的理论依据。

## 材料与方法

### 一、实验动物及仪器试剂

1. 实验动物:选取健康雌性 Sprague-Dawley (SD) 清洁级大鼠 60 只,3 月龄,未曾交配,体重 180 ~ 200 g。购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物使用许可证号为 SCXK(沪)2007-0005。采用标准饮料喂养,饲养室内保持恒温(20 ~ 25 °C)。

2. 实验设备:韩氏电针仪(南京济生医疗科技有限公司)、Discovery-A 骨密度仪(美国 Hologic 公司)、高速离心机(德国 Eppendorf 公司)、Model680 酶标仪(美国伯乐公司)、20 × 13 mm 佳健牌导电塑柄针(无锡佳健医疗器械有限公司)。

3. 药物试剂:苯甲酸雌二醇注射液(由上海通用药业股份有限公司生产),规格:1 mg/ml;雌二醇和生长素放射免疫分析盒购自郑州安图绿科生物工程有限公司。

### 二、动物模型制作及分组

动物适应饲养 1 周后,按随机数字表法分成假手术组(20 只)和手术组(40 只)。采用 3% 戊巴比妥钠(按 0.1 ml/100 g 体重)经大鼠腹腔注射麻醉后,于背部正中切口进入腹腔背侧。采用双侧卵巢切除法制作骨质疏松大鼠模型<sup>[4-6]</sup>,将手术组 40 只大鼠完整摘除双侧卵巢后,仔细止血,逐层缝合;假手术组 20 只大鼠则取腰椎旁背侧切口,进入腹腔,切除一段小肠系膜后,立即止血缝合。大鼠手术后给予 1.6 万 U/100 g 体重肌肉注射青霉素治疗 3 d,防止感染,自由摄食、饮水。造模 3 个月后进行骨密度 (bone mineral density, BMD) 检测,手术组大鼠腰椎和股骨的 BMD 较假手术组明显降低,且差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),提示骨质疏松模型造模成功,详见表 1。

表 1 2 组大鼠腰椎和股骨体的 BMD 变化 ( $\text{g}/\text{cm}^2, \bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 只数 | 腰椎体                 | 右侧股骨体               |
|------|----|---------------------|---------------------|
| 假手术组 | 20 | $0.223 \pm 0.013$   | $0.200 \pm 0.012$   |
| 手术组  | 40 | $0.198 \pm 0.014^a$ | $0.186 \pm 0.010^a$ |

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$

造模成功后,从假手术组选取 10 只大鼠设为对照组,从手术组选取 30 只大鼠按随机数字表法分为模型组、针刺组和雌激素组,每组 10 只。

### 三、治疗方法

针刺组:于造模成功后给予针刺治疗。选穴:①关元、三阴交(双);②肾俞、足三里(双)。每日选择其中一组穴位行针刺治疗,二组穴位交替进行。取穴方法按华兴邦等<sup>[7]</sup>的方法实施,用细美容针刺入穴位后,接韩氏电针仪进行电针刺激,其刺激参数为连续脉冲波、频率 3 ~ 4 Hz、强度 4 ~ 5 mA,以大鼠局部轻度抖动为度,每次 20 min,每日 1 次,连续治疗 3 个月。

雌激素组:于造模成功后皮下注射苯甲酸雌二醇,按人鼠剂量换算,每只大鼠每次剂量 0.1 mg/kg 体重,每周 1 次,连续治疗 3 个月。

对照组和模型组均不作任何处理。

### 四、检测指标

治疗 3 个月后,将对照组、模型组、针刺组和雌激素组大鼠分别进行 BMD 检测,然后处死大鼠,摘除眼球取血,分离血清,置于 -20 °C 冰箱保存集中待测。

1. 骨密度检测:大鼠处死前使用 Discovery-A BMD 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及股骨的 BMD 值。

2. 血清雌二醇和生长素检测:血清雌二醇和生长素均采用酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法<sup>[8]</sup>进行检测。

### 五、统计学处理

使用 SPSS 11.0 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。

## 结 果

### 一、各组大鼠腰椎和股骨体 BMD 的变化

经连续治疗 3 个月后,针刺组和雌激素组大鼠腰椎(腰<sub>1</sub> ~ 腰<sub>4</sub>)椎体的 BMD 均有明显提高 ( $P < 0.05$ ),与模型组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );针刺组和雌激素组右侧股骨体的 BMD 也较模型组有不同程度的提高,尤其以雌激素组提高明显 ( $P < 0.05$ ),但针刺组与模型组比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),详见表 2。

### 二、各组大鼠血清中雌二醇和生长素的变化

对照组大鼠血清生长素和雌二醇的水平分别为 ( $359.00 \pm 87.00$ ) pg/ml 和 ( $169.73 \pm 52.58$ ) pg/ml;模型组大鼠血清生长素水平明显高于对照组 ( $P < 0.01$ );模型组大鼠血清雌二醇水平明显低于对照组 ( $P < 0.01$ )。详见表 3。

**表 2** 各组大鼠干预后腰椎体和右侧股骨体 BMD 的变化  
( $\text{g}/\text{cm}^2, \bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 只数 | 腰椎椎体                   | 右侧股骨体               |
|------|----|------------------------|---------------------|
| 对照组  | 10 | $0.222 \pm 0.023$      | $0.208 \pm 0.012$   |
| 模型组  | 10 | $0.191 \pm 0.012$      | $0.187 \pm 0.013$   |
| 针刺组  | 10 | $0.212 \pm 0.019^a$    | $0.198 \pm 0.011$   |
| 雌激素组 | 10 | $0.231 \pm 0.021^{bc}$ | $0.205 \pm 0.012^a$ |

注:与模型组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与针刺组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 

经连续治疗 3 个月后,针刺组和雌激素组大鼠血清中生长素的水平较模型组有不同程度的降低( $P < 0.01$ ),而雌二醇水平则较模型组有不同程度的提高( $P < 0.05$ );针刺组生长素降低的幅度不及雌激素组显著,且针刺组与雌激素组组间比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );针刺组和雌激素组分别与对照组比较,组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见表 3。

**表 3** 各组大鼠血清生长素和雌二醇的变化( $\text{pg}/\text{ml}, \bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 只数 | 生长素                     | 雌二醇                  |
|------|----|-------------------------|----------------------|
| 对照组  | 10 | $359.00 \pm 87.00$      | $169.73 \pm 52.58$   |
| 模型组  | 10 | $546.00 \pm 98.00^a$    | $72.10 \pm 19.83^a$  |
| 针刺组  | 10 | $399.00 \pm 163.00^b$   | $128.02 \pm 62.28^c$ |
| 雌激素组 | 10 | $276.00 \pm 92.00^{bd}$ | $182.89 \pm 42.01^b$ |

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与针刺组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ 

## 讨 论

传统中医学中并没有绝经后骨质疏松症的病名,但从其临床表现属于中医“骨痿”之范畴,《素问·五脏生成篇》中指出“肾者主蛰,封藏之本,精之处也,其充在骨”,说明肾气充足与否与骨的生长发育有着密切的关系。《素问·痿论篇》则进一步指出,“肾气热,则腰脊不举,……水不胜火,骨枯而髓减,发为骨痿”,说明肾阴虚是“骨痿”发生的主要病因。绝经后骨质疏松症患者多为中老年人,除肾虚外,也有脾胃虚之表现。鉴于绝经后骨质疏松症患者多为脾肾俱虚的病理特点,笔者在临床上多选用具有补肾健脾作用的肾俞、关元俞、足三里、三阴交等为主的俞穴进行针刺治疗,在临床上收到较好效果。因此本实验选用关元、三阴交、肾俞、足三里四个腧穴,对通过去卵巢建立的骨质疏松症模型大鼠进行针刺治疗。结果显示,与模型组比较,雌激素组和针刺组均能明显提高模型组大鼠的腰椎 BMD( $P < 0.05$ ),表明针刺疗法具有良好的抗骨质疏松症作用。

生长素是近年来发现的含有 28 个氨基酸的生长激素释放肽,为生长激素促分泌素受体的天然配体,具

有促进生长激素分泌、调节细胞分化、增殖、凋亡等广泛的生理学功能<sup>[9]</sup>。生长素也是消化系统中一种重要的调节激素,能促进摄食,增加胃酸分泌和胃肠排空率,促进胃肠动力<sup>[10]</sup>。有研究表明,生长素与骨质疏松症有关<sup>[3,11]</sup>。生长素对消化系统的作用与针刺调节脾胃功能有相似之处。本研究显示,与假手术组比较,去卵巢骨质疏松症模型组大鼠的生长素水平明显升高,雌二醇水平明显降低,且差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),与潘妹霞等<sup>[12]</sup>的研究结果一致;经针刺和雌激素药物治疗后,其生长素明显降低,而雌激素水平则有明显的提高,提示针刺治疗可能通过调节生长素及雌二醇水平发挥作用。但是,有关针刺调节生长素和雌二醇的作用通路及其作用机制目前尚未阐明,仍有待进一步的深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] 欧阳钢,王玲玲,卓铁军,等. 不同的刺激方法对原发性骨质疏松症患者骨密度的影响. 中国针灸,2004;14:66-67.
- [2] 欧阳钢,王东岩,徐小梅. 针灸配合药物治疗男性骨质疏松症疗效观察. 中国针灸,2011,31:23-25.
- [3] Misra M, Miller KK, Stewart V, et al. Ghrelin and bone metabolism in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90:5082-5087.
- [4] Shiraishi A, Takeda S, Masaki T, et al. Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of osteoporosis; distinct actions from estrogen. J Bone Miner Res, 2000, 15:770-779.
- [5] Lelovas PP, Xanthos TT, Thorma SE, et al. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. Comp Med, 2008, 58:424-430.
- [6] 吴启跃,马雯,余正红,等. 骨质疏松两种造模方法的对照研究. 中国中医骨伤科杂志,2007,15:17-19.
- [7] 华兴邦,李辞蓉,周浩良,等. 大鼠穴位图谱的研制. 实验动物与动物实验,1991,1:1.
- [8] 刘辉. 临床免疫学和免疫检验实验指导. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2003:17-19.
- [9] Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, et al. Structure, regulation and function of ghrelin. J Biochem, 2012, 151:119-128.
- [10] Fukumoto K, Nakahara K, Katayama T, et al. Synergistic action of gastrin and ghrelin on gastric acid secretion in rats. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374:60-63.
- [11] Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, et al. Ghrelin directly regulates bone formation. J Bone Miner Res, 2005, 20:790-798.
- [12] 潘妹霞,张彩霞,肖本熙,等. 大豆异黄酮及雌激素对去势大鼠体重和 ghrelin 的影响. 中国公共卫生,2012,28:795-797.

(修回日期:2013-04-06)

(本文编辑:汪 玲)