

骨疏颗粒对去卵巢雌性大鼠骨质疏松的影响^{*}

李 冰, 杜义斌, 李黔云, 冯 妮, 李晓燕

(云南中医学院第一附属医院, 云南昆明 650021)

摘要: 目的 观察骨疏颗粒对去卵巢骨质疏松模型大鼠雌二醇(estradiol, E2)、睾酮(testosterone, T)、孕酮(P)、泌乳素(prolactin, PRL)、卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)的影响, 为骨疏颗粒治疗骨质疏松症提供实验依据。方法 40 只 SD 大鼠随机分为 4 组: 模型组、正常对照组、雌激素组、骨疏颗粒组。采用卵巢摘除法制作骨质疏松模型, 观察大鼠血清性激素相关 6 项检查 E2、T、P、PRL、FSH、LH 的变化、股骨骨质疏松病理及生化指标的变化。结果 与模型组比较, 骨疏颗粒可以改善去势雌性大鼠血清雌、雄激素水平, 缓解骨质疏松病理变化, 升高降钙素, 降低骨碱性磷酸酶、肿瘤坏死因子、抗酒石酸碱性磷酸酶、尿羟脯氨酸($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论 骨疏颗粒能治疗和延缓骨质疏松, 与雌激素比较差异无统计学意义。

关键词: 骨疏颗粒; 骨质疏松症; 雌激素

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2014)04-0009-04

骨质疏松症是一种全身性代谢骨骼疾病, 以骨量减少、骨的微结构退化为特征, 导致骨折性增加, 容易发生骨折, 好发于绝经后妇女、老人和多种慢性病患者, 是一种导致中老年妇女生活质量下降的重要原因。在我国约 80% 的 60 岁以上的老年人群患有不同程度的骨质疏松症, 女性患病人数是男性的 6 倍^[1]。

骨疏颗粒临床研究能明显改善围绝经妇女的骨质疏松症状, 缓解腰酸背痛, 疲乏无力等症状, 提高其生活质量^[2-3]。本研究进一步从动物实验入手, 来研究骨疏颗粒对去卵巢骨质疏松模型大鼠主要药效影响。实验采用双侧卵巢切除法进行造模, 以西药雌激素(戊酸雌二醇)、中药骨疏颗粒组分别用药治疗, 观察治疗后对大鼠血清性激素相关 6 项检查 E2、T、P、PRL、FSH、LH 的影响, 股骨骨质疏松病理及血生化指标的变化, 现将实验结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

6 月龄雌性未孕 Wistar 大鼠 40 只, 体质量 (180~220)g。由昆明医科大学动物实验中心提供。动物生产许可证号: SCXK(滇)2011-0004。饲养于

昆明医科大学动物实验中心实验室。实验室室温 18℃~22℃。随机分为 4 组, 分别为正常对照组、模型组、戊酸雌二醇组、骨疏颗粒组。

1.2 试剂、仪器与药品

1.2.1 试剂

E2、T、P、PRL、FSH、LH 放射免疫试剂盒, 由天津九鼎医学生物工程有限公司提供。生化指标试剂盒为武汉优尔生物科技股份有限公司生产: 骨钙素(批号 L130315408), 降钙素(批号 L130109322), 骨碱性磷酸酶(批号 L130314180), 肿瘤坏死因子(批号 L130228513), 抗酒石酸碱性磷酸酶(批号 L130124204), 尿羟脯氨酸(批号 L130225343)。使用 ELISA 法检测。

1.2.2 仪器

石蜡切片机(德国比 CIA 公司生产), 石蜡切片机刀片(德国 ELICA 公司产品), 组织贴片机(YT-6B 湖北孝感亚光医用电子技术研究所), 包埋机(SHAN-DON)电热恒温干燥箱(上海跃进医疗器械厂), 普通光镜(尼康 NIKONE200 日本)放大倍数($\times 40$)。

1.2.3 药品

骨疏颗粒由狗脊、骨碎补、淫羊藿、炙黄芪、白

* 基金项目: 云南省科技计划项目(应用基础研究)(2011FZ267)

收稿日期: 2014-04-15

作者简介: 李冰(1974-), 女, 云南华宁人, 主治医师, 主要从事老年病的中医药防治研究。

△通信作者: 杜义斌, E-mail: dybys@126.com

术、熟地、三七、杜仲、陈皮、独活等组成,生药由云南中医学院第一附属医院制剂中心提供,并由制剂中心制成颗粒剂。每袋重 15g(生药),使用时按 8.6g/kg 均配制成 2.5mL 药液灌胃。戊酸雌二醇(拜耳医药保健有限公司,1mg·21 片/盒,批号:095C)用蒸馏水配成 2.5mL 溶液,按 0.1mg/kg 大鼠体质量给药。

1.3 实验方法

1.3.1 造模方法

实验动物随机分为 4 个组,每组 12 只。除正常对照组外,其余 3 组均行双侧卵巢摘除术。具体过程如下:以乙醚吸入麻醉,无菌条件下背侧切口手术切除双侧卵巢,缝合切口。卵巢送病理切片确定切除完整。正常对照组即假手术大鼠步骤同前,切除卵巢旁部分脂肪,不切除卵巢。术后各组大鼠均肌注青霉素 5 万单位/只,连续 3d,分笼饲养,在(24±2)℃、通风良好、湿度 60%~70%的实验条件下标准鼠饲料喂养,自由饮水,喂养 4 周后灌药。(手术过程中 1 只大鼠因麻醉意外死亡,1 只大鼠因操作失误死亡,2 只大鼠因手术损伤当场死亡;术后 1 月内陆续因感染衰竭死亡 4 只。1 月后存活共 40 只。)

1.3.2 给药方法

在动物接受造模处理 4 周后,进行药物的治疗。正常组和模型组各自灌服等量的生理盐水。骨质疏松颗粒组及戊酸雌二醇组各自灌服相应药液 2.5mL,连续给药 8 周。

1.3.3 观察指标及检测方法

大鼠尿液生化指标的测定:于第 56 天用药结束后,用代谢笼收集大鼠尿液,测定尿羟脯氨酸。

性激素测定:于第 56 天用药结束后在空腹状态摘除眼球取血,离心,分离血清,-20℃保存,用放免法测定 E2、T、P、PRL、FSH、LH 含量,按各药盒说明书操作。测定血清骨钙素、降钙素、骨碱性磷酸酶、肿瘤坏死因子 α、血浆抗酒石酸酸性磷酸酶。

1.4 统计学方法

所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 *t* 检验。方差齐性检验,*P* 值大于 0.05,采用方差分析,*P* 值小于 0.05,不能用方差分析,采用 Kruskal-Wallis 检验。

2 结果

2.1 一般情况

造模的 48 只大鼠,除因故死亡的 8 只大鼠外,其它大鼠伤口均愈合良好,无出血、感染、溃疡等情况。造模后第 2 天,大鼠饮水、进食均较术前量少,便质较稀软,个别大鼠有脱水的情况;存活的大鼠未见明显异常,未见拒食、分泌物增多、呼吸困难、胀气、腹泻、眼球突出等情况。

模型组大鼠精神略显萎靡,体毛干枯不齐,其余各组表现不明显。

2.2 各组大鼠血清性激素 E2、T、P、PRL、FSH、LH 水平的比较(见表 1)

2.3 各组大鼠生化指标的比较(见表 2)

2.4 各组大鼠股骨病理改变的比较(见表 3)

表 1 各组大鼠血清性激素 E2、T、P、PRL、FSH、LH 水平的比较

	雌二醇 /(pg/mL)	睾酮 /(ng/mL)	孕酮 /(μg/L)	泌乳素 (ng/mL)	促黄体生成素 /(mIU/mL)	卵泡刺激素 /(mIU/mL)
正常对照	26.0780±3.8458 ^a	0.6900±0.1679 ^a	6.0450±0.8026 ^a	11.2730±1.0174	8.6510±0.9032	6.1680±0.7919 ^a
戊酸雌二醇组	20.5810±3.5961 ^b	0.1880±0.0537 ^b	5.0320±0.2293 ^{ab}	10.2990±2.7624	9.2720±0.6225	7.2690±0.8438 ^{ab}
骨质疏松颗粒组	17.8730±2.3004 ^b	0.1700±0.0440 ^b	4.1560±0.5583 ^{bc}	9.8950±2.0146	9.3250±0.3800	7.4260±0.6551 ^{ab}
模型组	7.9070±1.6047 ^c	0.0810±0.0363 ^c	3.9110±0.5623 ^{bc}	9.4310±1.5397	9.6790±1.3178	7.5990±1.3372 ^b

注:各组平均数间,凡有一个相同标记字母的即为差异不显著,凡具不同标记字母的即为差异显著。

表 2 各组大鼠生化指标的比较

	降钙素 /(pg/mL)	骨碱性磷酸酶 /(pg/mL)	肿瘤坏死因子 /(ng/mL)	抗酒石酸碱性磷酸酶 /(U/mL)	尿羟脯氨酸 /(mIU/mL)
正常对照	127.0260±9.0185 ^a	1.5900±0.1503 ^a	3.9130±0.3319 ^a	4.3560±0.4325 ^a	8.6140±1.0047 ^a
戊酸雌二醇组	115.7080±11.5778 ^a	1.5200±0.1054 ^a	4.8360±0.6768 ^{ab}	3.6760±0.7385 ^a	10.5960±1.4893 ^{ab}
骨质疏松颗粒组	108.5920±7.1684 ^a	1.6400±0.0887 ^a	5.0440±1.0530 ^{ab}	4.2610±0.6583 ^a	14.6700±1.6854 ^b
模型组	103.1370±18.5432 ^b	2.2100±0.1136 ^b	5.9680±0.8735 ^b	6.1120±0.7753 ^b	17.4010±2.4240 ^c

注:各组平均数间,凡有一个相同标记字母的即为差异不显著,凡具不同标记字母的即为差异显著。

表3 各组大鼠股骨病理改变的比较

	骨小梁面积百分数/%Tb·Ar	骨小梁数/Tb·N	骨小梁厚度/Tb·Th	骨小梁分离度/Tb·Sp
正常对照	55.3270±4.4364 ^a	8.40±0.5164 ^a	146.2680±21.1234 ^a	164.1790±39.8337 ^a
戊酸雌二醇组	48.2090±2.4115 ^b	6.90±0.7379 ^b	121.5600±15.5674 ^b	215.0210±10.1801 ^{ab}
骨疏颗粒组	46.4860±2.0193 ^b	7.50±1.2693 ^{ab}	122.7350±16.2768 ^b	187.9890±26.9116 ^a
模型组	37.8310±2.9517 ^c	4.20±1.0328 ^c	91.5410±14.5902 ^c	275.5840±50.1530 ^b

注:各组平均数间,凡有一个相同标记字母的即为差异不显著,凡具不同标记字母的即为差异显著。

2.5 各组大鼠股骨病理改变(见图1-8)

2.5.1 空白对照组

光镜下皮质骨正常,骨板层结构整齐;松质骨骨小梁密度正常,骨小梁数较多,可见较多嗜碱性蓝染新生骨小梁。骨小梁面积百分比高。股骨近段骺板软骨细胞呈柱状排列整齐,静止层、增殖层和肥大层软骨细胞分界清楚。

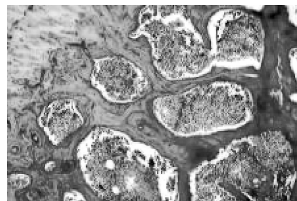


图1(×40)

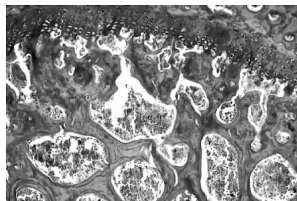


图2(×40)

2.5.2 戊酸雌二醇组

光镜下皮质骨变薄不明显,骨板层结构整齐;松质骨骨小梁密度稍降低,局部骨小梁变细,骨小梁数稀少不明显,可见较多嗜碱性蓝染新生骨小梁。骨小梁面积百分比略减少。股骨近段骺板软骨细胞排列稍紊乱。

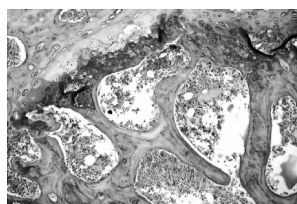


图3(×40)

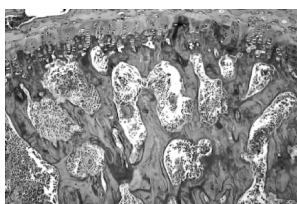


图4(×40)

2.5.3 骨疏颗粒组

光镜下皮质骨变薄不明显,骨板层结构整齐;松质骨骨小梁密度稍降低,局部骨小梁变细,骨小梁数稀少不明显,可见较多嗜碱性蓝染新生骨小梁。

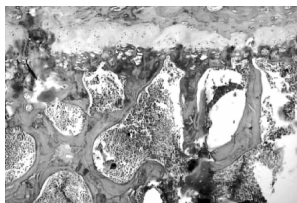


图5(×40)

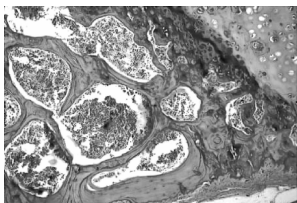


图6(×40)

梁。骨小梁面积百分比略减少。股骨近段骺板软骨细胞排列稍紊乱。

2.5.4 模型组

光镜下皮质骨变薄,骨髓腔扩大,骨板层结构不整齐;松质骨骨小梁密度降低,骨小梁数稀少,骨小梁变细,间距加宽,骨小梁面积百分比减少。股骨近段骺板软骨层变窄,软骨细胞数量显著减少,排列紊乱,柱状排列消失,初级骨小梁数量减少。

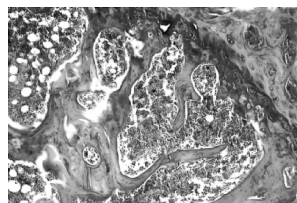


图7(×40)

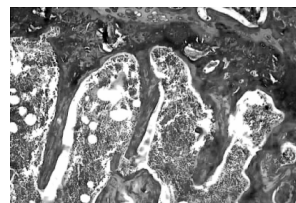


图8(×40)

3 讨论

骨质疏松症的病机主要为肾气虚衰,肾精不足,阴阳失调,脉络瘀阻。故而确立补肾益髓、健脾益气、活血化瘀的治则。骨疏颗粒主要由狗脊、骨碎补、淫羊藿、炙黄芪、白术、熟地、三七、杜仲、陈皮、独活等药物组成的验方。验方中狗脊、淫羊藿有益气力,强志,坚筋骨,元阳振作之功;骨碎补、杜仲、熟地补肝肾强筋骨,助狗脊、淫羊藿以增强补肾之功;黄芪、白术、陈皮益气健脾,以养后天并兼有祛痰除湿之功;当归、三七、独活养血生精活血,通络定痛。诸药合用不但有补肾健脾活血之功,还有可能促进丘脑-垂体-性腺轴功能,并且该药已在临床观察中取得良好的疗效。

去卵巢雌性大鼠骨质疏松模型骨代谢的特点和产生的结果与绝经后妇女骨质疏松症的变化类似。妇女绝经后性激素发生变化,血中雌、孕激素水平降低,使正常的下丘脑-垂体-卵巢轴之间平衡失调,主要表现为E2水平下降,黄体分泌不足,FSH和LH增加。在实验研究中,我们选择去势的造模方法,人为制造了一个雌激素突然降低的环境,切除卵巢送病理检查以确保切除完整。从实验结果中可

以看到,6 月龄大鼠在切除卵巢 12 周后,模型组出现性激素相关 6 项检查的改变为雌二醇、孕酮、睾酮明显降低,泌乳素的变化不显著,促黄体生成素轻度升高,但较其他组无显著差异,卵泡刺激素升高,较正常对照组有显著差异,与绝经期女性激素变化相似。戊酸雌二醇组与骨疏颗粒组升高雌二醇、睾酮作用无显著差异,但未达到正常水平。二者降低卵泡刺激素的水平与空白组无显著差异,接近正常。但是戊酸雌二醇同时还升高孕酮分泌,接近正常。骨疏颗粒组则对孕酮的影响与模型组无显著差异。泌乳素、促黄体生成素在各组变化差异不大。考虑卵巢切除 12 周可能还没有完全导致泌乳素、促黄体生成素的明显变化,骨疏颗粒对丘脑-垂体-性腺轴的影响有待下一步延长实验时间进行观察。

各组大鼠生化指标的比较可以看出,戊酸雌二醇组与骨疏颗粒组在升高降钙素,降低骨碱性磷酸酶、肿瘤坏死因子、抗酒石酸碱性磷酸酶、尿羟脯氨酸的作用上无显著差异,均可达到接近正常水平。也就是说戊酸雌二醇与骨疏颗粒均降低了骨吸收,并接近正常性激素分泌时骨吸收水平。

各组大鼠股骨病理改变的比较显示,戊酸雌二醇组与骨疏颗粒组在升高骨小梁面积百分数、骨小梁数、骨小梁厚度,降低骨小梁分离度无显著差异。但是骨疏颗粒在骨小梁分离度、骨小梁数方面可达到接近正常水平,优于戊酸雌二醇组。张昕^[4]总结了近年来中药影响骨髓间充质干细胞向成骨细胞的分化的研究,发现中药及其提取物可以正向影响骨髓间充质干细胞的成骨分化。

这个实验表明,骨疏颗粒有类似雌激素的作用,能使下丘脑垂体卵巢轴分泌功能趋于正常,从

而改善神经内分泌调节功能。袁新荣^[5]及吕慧^[6]的研究也表明,骨疏颗粒方中补肾中药淫羊藿和乙烯雌酚防治去卵巢大鼠骨质疏松症的作用相当,补肾中药可作为天然药物代替雌激素去卵巢后大鼠骨质疏松的发生。

综上所述,实验动物体内低下的雌激素水平提高,雌激素对于骨代谢的保护作用得以实现。这应该是骨疏颗粒对绝经期骨质疏松症具有治疗作用的一个重要原因,与雌激素替代治疗绝经期骨质疏松症的作用机制一致。通过本次实验,我们推测骨疏颗粒可能具有性激素样作用,其对骨质疏松症的治疗是通过其性激素样作用来实现的。并且骨疏颗粒在改善骨小梁分离度、骨小梁数方面可达到接近正常水平,优于戊酸雌二醇组。

参考文献:

- [1] 曾炳芳,李晓林,章振林. 骨质疏松症和骨质疏松性骨折的挑战[J]. 上海医学,2011,34(3):161-163.
- [2] 杜义斌,徐翔峰,彭江云. 骨疏颗粒治疗老年女性骨质疏松症 30 例疗效观察[J]. 云南中医中药杂志,2006,27(5):15.
- [3] 杜义斌,吴洋,段艳蕊,等. 骨疏颗粒治疗绝经后骨质疏松症临床观察[J]. 新中医,2013,45(8):18-21.
- [4] 张昕,李玛琳. 中药正性影响骨髓间充质干细胞成骨分化及机制的进展 [J]. 云南中医学院学报,2013,36 (3):91-98.
- [5] 袁新荣,李英勇,李红薇. 不同疗法对去卵巢大鼠骨质疏松预防作用的比较 [J]. 广东医学院学报,2007,25(4):387-390.
- [6] 吕慧,李秀芳,李玛琳. 中药促进骨质疏松性骨折愈合的作用及机制研究进展 [J]. 云南中医学院学报,2012,35 (3):66-70.

(编辑:杨阳)

Effects of Gushu Granules on Ovariectomized Osteoporotic Model Rats Serum

LI Bing, DU Yi-bin, LI Qian-yun, FENG Ni, LI Xiao-yan

(The First Affiliated Hospital of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effect of Gushu granules on Ovariectomized Osteoporotic Model Rats E₂、T、P、PRL、FSH、LH. In order to provide experimental basis for clinical application of Gushu granules and further study. **Methods** 40 SD rats were randomly divided into 4 groups:model group, blank control group, estrogen group and group of Gushu granules. The osteoporosis model was induced by ovariectomy. Serum levels of sex hormone E₂、T、P、PRL、FSH、LH change in rats were observed after the rats were treated with Gushu granules and western medicine(estradiol valerate), femoral osteoporosis pathology and biochemical indicators of change were catch, too. **Results** Gushu granules and estradiol valerate could increase the level of E₂ and T. Significant difference ($P < 0.005$) was compared with model group. They ease osteoporosis pathological changes, elevate calcitonin, reduce bone alkaline phosphatase、tumor necrosis factor、tartaric acid alkaline phosphatase and urine hydroxyproline ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** Gushu granules could treatment and delay osteoporosis improve. There was no significant difference with estrogen.

KEY WORDS: Gushu granules; osteoporosis; estrogen