

补肾化痰方对去卵巢大鼠骨组织 TNF- α 和 IL-6 的影响

胡娅^{1*}, 唐曦², 向楠³

(1. 长江大学医学院, 湖北 荆州 434023; 2. 华中科技大学同济医学院附属荆州中心医院, 湖北 荆州 434020; 3. 湖北中医药大学, 武汉 430061)

[摘要] **目的:** 观察补肾化痰方对去卵巢骨质疏松症大鼠骨组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)表达的影响, 探讨补肾化痰方对去卵巢大鼠骨代谢影响的可能机制。**方法:** SD 大鼠随机分为 5 组: 模型组(A)、假手术组(B)、利维爱组(C)、补肾化痰方低剂量组(D)、补肾化痰方高剂量组(E)。行双侧卵巢切除术后 3 月, C, D, E 组分别以利维爱 0.23 mg·kg⁻¹、补肾化痰方 9.4 g·kg⁻¹、补肾化痰方 18.8 g·kg⁻¹ 灌胃给药, A, B 组予以等体积的生理盐水。1 次/d, 给药时间为 8 周。术后 5 个月, 双能 X 线骨密度测定仪检测大鼠股骨骨密度, 免疫组化检测大鼠骨组织 TNF- α 和 IL-6 表达。**结果:** 补肾化痰方低、高剂量组均能显著提高去卵巢骨质疏松症大鼠的骨密度, 增加骨小梁数量和密度, 降低骨组织 TNF- α 和 IL-6 表达水平。**结论:** 补肾化痰方对去卵巢大鼠骨质疏松症有较好的治疗作用, 其作用机制与降低骨组织中细胞因子 TNF- α 和 IL-6 水平有关。

[关键词] 补肾化痰方; 骨质疏松症; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-6

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0173-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160173

Influence of Bushen Huatan Decoction on TNF- α and IL-6 in Ovariectomized Rats

HU Ya¹, TANG Xi², XIANG Nan³

(1. Medical School of Yangtze University, Jingzhou 434023, China;

2. Jingzhou Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Jingzhou 434020, China;

3. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the influence of Bushen Huatan decoction on tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in ovariectomized rats and to explore the therapeutic mechanism of the drugs. **Method:** Female SD rats were divided into five groups: model group (A), sham operation group (B), livial group (C), Bushen Huatan decoction low dose group (D) and high dose group (E). Except for group B, all rats were ovariectomized. Drug treatment began at three months after the operation. Group C was treated with livial at the dose 0.23 mg·kg⁻¹, group D and E were treated with the low dose 9.4 g·kg⁻¹ the large dose 18.8 g·kg⁻¹ and Bushen Huatan decoction respectively. A, B group received the same volume of physiological saline. After 8 weeks intragastric administration by once a day, the rat's bone mineral density was measured by dual energy X-ray absorptionmetry. Levels of TNF- α and IL-6 in bone tissue were determined by using immunohistochemistry techniques. **Result:** Bushen Huatan decoction can evidently increase bone density as well as the trabecular bone volume and density, and decrease the levels of TNF- α and IL-6 in bone. **Conclusion:** Bushen Huatan decoction can effectly prevent osteoporosis in female rats induced by ovariectomy, and the mechanism maybe lowering levels of TNF- α and IL-6 in bone tissue.

[Key words] Bushen Huatan decoction; osteoporosis; tumor necrosis factor- α ; interleukin-6

[收稿日期] 20140516(163)

[基金项目] 湖北省卫生厅资助项目(2012Z-Y31);湖北省教育厅资助项目(B2013280)

[通讯作者] * 胡娅, 博士, 讲师, 从事中药基础与临床药理工作, Tel:13508625973, E-mail:huy12@126.com

骨质疏松症是以骨量减少、骨组织显微结构退化,以致骨的脆性增高及骨折危险性增加的一种全身性骨病^[1]。骨质疏松症是绝经后妇女常见病和多发病。西药治疗长期服用不良反应较大,中药在该病治疗中的应用潜力巨大,具有较广泛的市场。传统中医学认为属中医绝经后骨质疏松属“骨痿”、“骨痹”等范畴,与肾虚等密切相关^[2]。补肾化痰方是根据临床经验总结的治疗绝经后骨质疏松症的有效方,早期在体外实验研究中已证实该方能促进骨髓间质干细胞(BMSCs)向成骨细胞分化,并抑制 BMSCs 向脂肪细胞分化。本实验通过观察补肾化痰方对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度(BMD)及骨组织 TNF- α 和 IL-6 的影响,初步探讨其对骨质疏松症的治疗作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药品 补肾化痰方由菟丝子 30 g,淫羊藿 10 g,补骨脂 15 g,瓜蒌 15 g,红曲 12 g,山楂 20 g 组成,生药由湖北中医药大学附属医院门诊部中药房提供,加水煎煮,过滤,并浓缩。利维爱(南京欧加农制药有限公司,2.5 mg/片,批号 LK-4305-10)。

1.1.2 试剂 两步法抗兔免疫组化试剂盒(香港 GENE TECH COMPANY LIMITED 公司),IL-6 抗体(北京博奥森公司,批号 bs0782R),TNF- α 抗体(北京博奥森公司,批号 bs0078R),大鼠抗石酒酸酸性磷酸酶(TRACP),酶联免疫分析试剂盒(美国 R&D 公司,批号 201007)。

1.1.3 实验动物 8 月龄雌性 SD 大鼠,清洁级,由华中科技大学同济医学院提供,许可证号 SCXK(鄂)2004-0007。

1.1.4 仪器 Lunar Prodigy 双能 X 线骨密度测定仪(美国 GE 公司),JT-12J 电脑生物组织脱水机(武汉俊杰电子有限公司),KD-BM 生物组织包埋机(浙江金华市科迪仪器设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 去卵巢大鼠模型的建立和分组 8 月龄雌性 SD 大鼠适应喂养 1 周后,随机分为模型组、假手术组、利维爱组、补肾化痰方低、高剂量组。各组大鼠麻醉后,无菌条件下行背部肋下双侧卵巢切除。假手术组术式相同,但不摘除卵巢,仅切除少量卵巢周围脂肪组织。术后 3 个月开始灌胃给药,补肾化痰方低剂量组和高剂量组分别以补肾化痰方 9.4, 18.8 g·kg⁻¹灌胃给药;利维爱组予以利维爱 0.23 mg·kg⁻¹,模型组、假手术组予以等体积的生理盐水,1 次/d,给药时间为 8 周。期间各组大鼠分笼常

规饲养,自由饮水摄食。

1.2.2 骨组织形态学观察及 TNF- α 和 IL-6 的测定 取大鼠的左侧胫骨骨组织,剔除周围附着的肌肉等软组织,置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,再于 10% 硝酸溶液中脱钙处理。常规石蜡包埋,切片,厚度 5 μ m,HE 染色。显微镜(光镜在 100 倍视野下)下观察骨组织形态结构,免疫组化检测骨组织 TNF- α 和 IL-6 水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析,所有数据均以均数 \pm 标准差 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

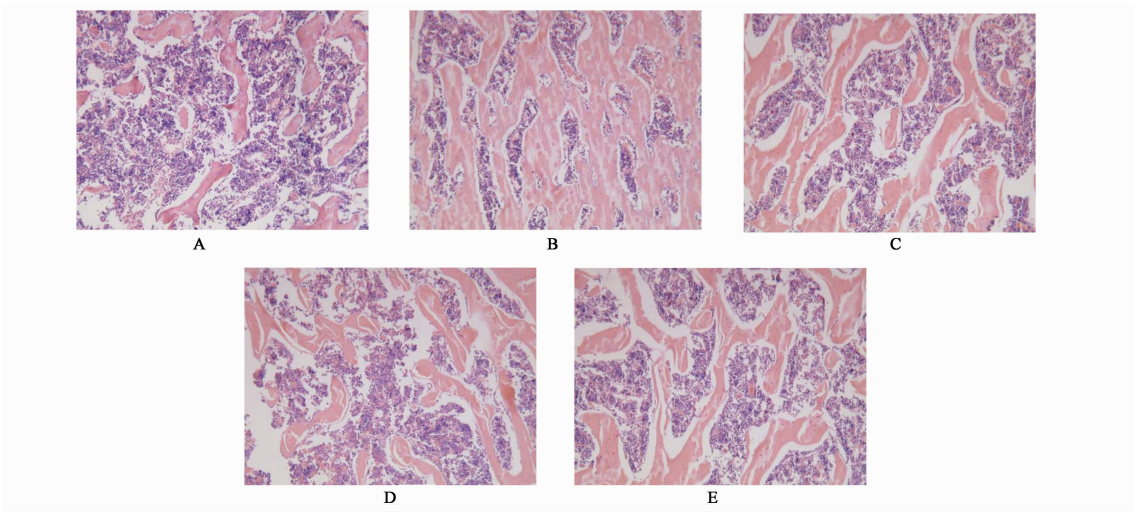
2.1 一般观察 大鼠在麻醉 3,4 h 后完全清醒,正常进食。24 h 后切口无红肿,可正常活动,72 h 后切口无感染征象。1 周后切口完全愈合,缝线脱落。

2.2 补肾化痰方对卵巢切除(OVX)大鼠骨组织形态学变化的影响 与假手术组相比,模型组骨小梁变细,小梁骨连接性丢失,见断裂现象,且占视野面积降低,数目明显减少,分布稀疏,骨小梁之间间隙增宽,排列不整齐,骨小梁密度明显减低。补肾化痰方组和利维爱组与模型组相比,骨小梁数量多,密度大,各骨小梁之间间隙较小,排列规则,连接性及完整性好,仅见少许断裂现象。见图 1。双能 X 线骨密度检测结果显示,与假手术组相比,模型组骨密度明显降低,补肾化痰方低、高剂量组均能有效增加骨密度($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表 1。

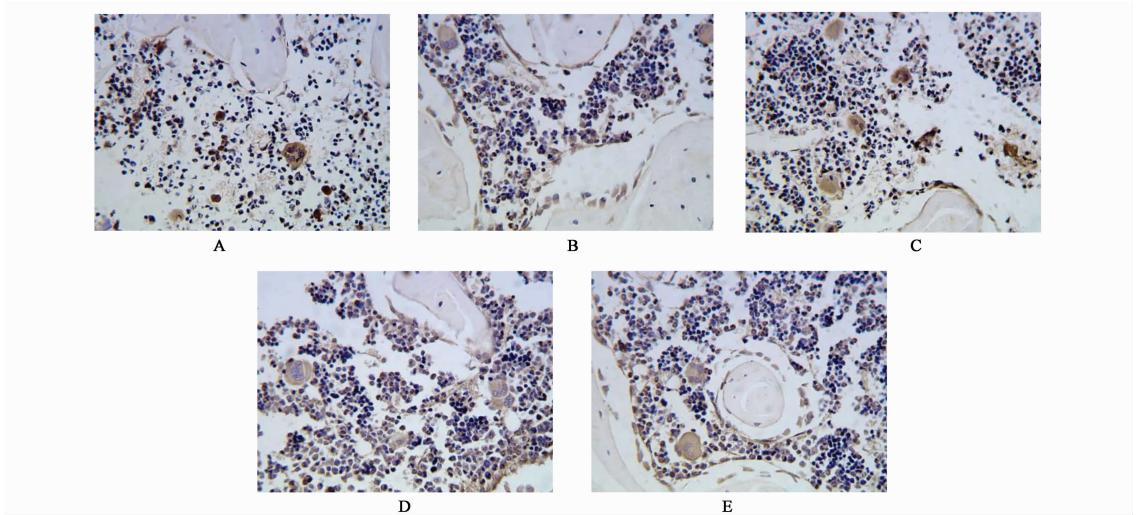
2.3 补肾化痰方对 OVX 大鼠骨组织 TNF- α 和 IL-6 的影响 免疫组织化学观察可见 TNF- α 和 IL-6 在骨组织中的分布基本相同,阳性表达主要位于骨小梁周边破骨细胞、成骨细胞和骨髓基质细胞胞浆中,与文献报道一致^[3]。光镜下观察阳性表达呈棕黄色颗粒。模型组大鼠骨小梁周边及骨髓腔中阳性破骨细胞数明显多于假手术组,补肾化痰方组和利维爱组阳性细胞数明显少于模型组。见图 2。累积光密度值分析结果显示,模型组大鼠骨组织中 TNF- α 和 IL-6 均有明显升高,利维爱和补肾化痰方均能明显降低两者水平($P < 0.01 \sim 0.05$),同时血清 TRACP5 b 水平亦明显降低,见表 1。

3 讨论

骨骼在人的一生中不断地进行着更新与改造,即在骨表面重复进行骨吸收和骨形成,这个过程主要由成骨细胞和破骨细胞共同完成。细胞因子是骨代谢调节中一种重要的途径。骨微环境的细胞因子异常是造成骨质疏松症骨形成障碍、骨吸收增强的



A. 模型组;B. 假手术组;C. 利多爱组 0.23 mg·kg⁻¹;
D. 补肾化痰方 9.4 g·kg⁻¹;E. 补肾化痰方 18.8 g·kg⁻¹
图 1 补肾化痰方对大鼠骨组织形态学的影响(HE, ×100)



A. 模型组;B. 假手术组;C. 补肾化痰方 9.4 g·kg⁻¹;D. 补肾化痰方 18.8 g·kg⁻¹;E. 利多爱组 0.23 mg·kg⁻¹(图 3 同)
图 2 补肾化痰方对大鼠 TNF- α 水平的影响(免疫组化, ×400)

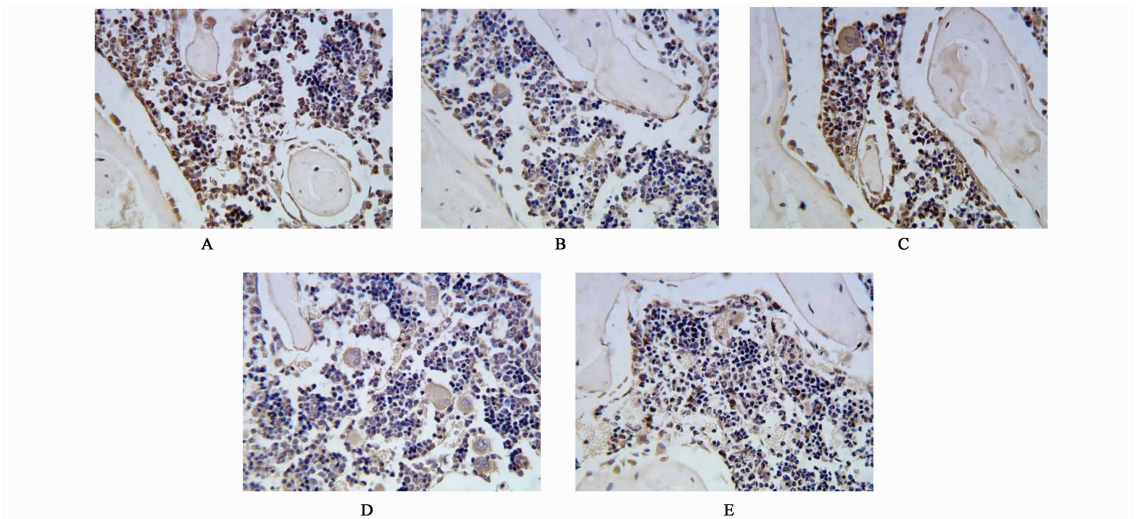


图 3 补肾化痰方对大鼠 IL-6 水平的影响(免疫组化, ×400)

表 1 补肾化痰方对大鼠 BMD 及 TNF- α , IL-6 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BMD/g·cm ²	TRACP5 b/ng·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-6/ μ g·L ⁻¹
模型	-	0.162 \pm 0.010	1 460 \pm 77	40 390 \pm 1 327	67 921 \pm 4 292
假手术	-	0.180 \pm 0.008 ²⁾	1 246 \pm 101 ²⁾	33 089 \pm 1 753 ²⁾	55 765 \pm 4 837 ²⁾
利维爱	0.23 \times 10 ⁻³	0.175 \pm 0.010 ²⁾	1 270 \pm 46 ²⁾	34 599 \pm 2 475 ²⁾	56 324 \pm 3 586 ²⁾
补肾化痰方	9.4	0.170 \pm 0.009 ¹⁾	1 285 \pm 64 ²⁾	38 501 \pm 2 110 ¹⁾	60 925 \pm 5 186 ²⁾
	18.8	0.177 \pm 0.008 ²⁾	1 266 \pm 98 ²⁾	33 237 \pm 2 334 ²⁾	57 190 \pm 4 682 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01。

重要因素。随着细胞生物学和分子生物学研究的不断深入,细胞因子在 OP 中的作用越来越受到人们的重视,尽管其具体的作用机制尚未完全明了,已有大量研究表明,在 OP 发病机制中,骨微环境的细胞因子网络异常起着重要作用。细胞因子是调节骨代谢的重要途径,许多细胞因子在 OP 患者都有明显的改变。随着年龄的增长,细胞因子水平也有改变,有观点认为,细胞因子的异常也是造成 OP 骨形成障碍、骨吸收增强的重要因素。调节细胞因子水平可能对 OP 的治疗有重要意义。TNF- α 和 IL-6 两种细胞因子与骨吸收过程密切相关,都能促进破骨细胞的增殖和分化,提高破骨细胞活性,加强骨吸收,在 OP 骨丢失过程中起重要作用。

TNF- α 与骨代谢关系密切,它是目前发现的强有力的骨吸收刺激因子^[4],在 OP 的相关研究中备受关注。临床研究结果亦显示 OP 患者血清 TNF- α 水平明显升高, TNF- α 与骨吸收率明显相关^[5]。鉴于 TNF- α 在绝经后骨质疏松症发病过程中的重要作用,将来可能以 TNF- α 等细胞因子作为靶因子治疗绝经后骨质疏松症^[6]。TNF- α 可作用于前体破骨细胞,使其分化为破骨细胞,促进破骨细胞生成。该作用表现为直接作用或间接作用。TNF- α 作为“上游”细胞因子,能刺激巨噬细胞集落刺激因子、IL-6、IL-1 等的分泌,这些细胞因子也能促进破骨细胞前体增殖。TNF- α 也可以作用于破骨细胞,主要是通过间接作用激活成熟的破骨细胞,使其形成骨吸收陷窝,骨吸收增强。TNF- α 还可通过前列腺素 E2 影响 OPG/RANKL/RANK 系统,诱导 RANKL 的表达,降低 OPG 的表达,促进前体破骨细胞的分化,激活成熟破骨细胞的活性。降低 TNF- α 含量,能保护骨质不被破坏,促进成骨细胞的生成。

IL-6 由骨组织中的成骨细胞、破骨细胞等多种

细胞合成分泌,是骨吸收中的重要环节。多种因素可以刺激 IL-6 的生成,如 TNF- α ,在刺激破骨细胞成熟和活性增强的同时诱导并促进 IL-6 的分泌。IL-6 是一个重要的促进破骨细胞分化增殖的因子。IL-6 通过多种作用途径的共同作用,增加破骨细胞形成,提高破骨细胞的活性,抑制其凋亡,延长破骨细胞的寿命,最终促进骨吸收。

在本研究中观察到,去卵巢大鼠骨组织中 TNF- α 和 IL-6 阳性表达明显增高。经药物治疗后, TNF- α , IL-6 水平均明显降低,同时血清 TRACP5b 水平降低,说明补肾化痰方能抑制骨组织中 TNF- α , IL-6 的表达,通过调节细胞因子网络平衡来抑制破骨细胞的骨吸收,减少骨丢失,发挥治疗 OP 作用。补肾化痰方降低 PMOP 大鼠骨组织中 TNF- α 和 IL-6 的水平,提示它可能通过调节细胞因子网络来抑制骨吸收,改善骨代谢。

[参考文献]

[1] 田刚,张治国,付小伟,等.骨碎补对卵巢切除所致大鼠骨质疏松症的治疗作用及其机理探讨[J].中国中医基础医学杂志,2013,19(1):47.

[2] 黄宏兴,柴生颢,黄红,等.骨质疏松症中医证型的聚类分析[J].广州中医药大学学报,2007,24(3):180.

[3] 范宏斌,王全平,蒋尔鹏,等.原发性骨质疏松症患者中轴骨 IL-6, bFGF 的免疫组化[J].中国矫形外科杂志,2001,8(4):363.

[4] 黄明炜,何小渡,刘雨银,等.补肾益骨方对去卵巢大鼠骨质疏松骨密度及 IL-6, TNF- α 的影响[J].中国老年保健医学杂志,2009,7(3):34.

[5] 张鑫,尹明贵.2 型糖尿病性骨质疏松患者血清 TNF- α 和 BAP 测定价值[J].河北医药,2013,35(19):2936.

[6] 杨丽,蔡宇,张荣华. TNF- α 与绝经后骨质疏松症研究进展[J].陕西医学杂志,2005,34(2):216.

[责任编辑 何希荣]