

左、右归丸对去卵巢骨质疏松症大鼠模型骨密度及骨代谢的影响

谭峰, 樊巧玲*, 卞玉群, 管华全
(南京中医药大学, 南京 210046)

[摘要] **目的:**观察左、右归丸对去卵巢骨质疏松模型大鼠骨密度及骨代谢的影响。**方法:**通过切除6月龄SPF级SD雌性大鼠双侧卵巢的方法建立绝经后骨质疏松症大鼠模型。造模10周后,将80只模型大鼠随机分为左归丸高、中、低剂量组($n=10$),右归丸高、中、低剂量组($n=10$),阳性药组($n=10$),模型组($n=10$),造模时只切除腹腔内部分脂肪组织而未切除卵巢的实验大鼠设为假手术组($n=10$),并分别*ig*给予相应药物或蒸馏水,各给药剂量分别为左、右归丸高剂量组 $20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$;左、右归丸中剂量组 $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$;左、右归丸低剂量组 $5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$;阳性药组为戊酸雌二醇片 $0.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$;假手术组和模型组*ig* $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 生理盐水。干预10周后,检测实验大鼠股骨骨密度(BMD)、骨组织形态学改变,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定大鼠血清骨碱性磷酸酶(BALP)、骨钙素(OC)、骨保护素(OPG)的含量。**结果:**与假手术组相比较,模型组大鼠BMD,OPG显著降低,而BALP,OC显著升高($P<0.05$),其病理改变与绝经后骨质疏松症患者改变一致;与模型组相比较,左、右归丸干预组大鼠BMD增加,骨组织形态改善,血清OPG含量升高、血清BALP,OC含量降低($P<0.05$)。**结论:**左、右归丸能够抑制骨吸收,纠正骨代谢失衡对绝经后骨质疏松症具有一定的治疗作用。

[关键词] 左归丸; 右归丸; 绝经后骨质疏松症; 去卵巢大鼠; 骨密度; 骨代谢

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0137-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015090137

Effects of Zuogui Wan and Yougui Wan on Bone Mineral Density and Bone Metabolism of Ovariectomized Rats with Osteoporosis TAN Feng, FAN Qiao-ling*, BIAN Yu-qun, GUAN Hua-quan (Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Zuogui Wan and Yougui Wan on bone mineral density and bone metabolism of ovariectomized rats with osteoporosis. **Method:** Post menopausal osteoporosis (PMOP) rats model was established by excision bilateral ovaries of 6 month old SD female rat. After successful modeling, 80 modeling rats were randomly divided into model group, estradiol valerate group, Zuogui Wan groups with different doses, and Yougui Wan groups with different doses. Rats with resection of abdominal adipose tissue were divided into sham group. The changes of bone mineral density (BMD), serum bone alkaline phosphatase (BALP), serum osteocalcin (OC) and serum osteoprotegerin (OPG) deoxy pyridinoline were detected respectively after 10 weeks. **Result:** Compared to sham operation group, BMD and serum OPG level of model group rats were decreased, but serum BALP, OC were increased. Compared with the model group, BMD, serum OPG of rats in Yougui Wan groups and Zuogui Wan groups were improved and serum BALP, OC content were decreased. **Conclusion:** Zuogui Wan and Yougui Wan can inhibit bone resorption, correct bone metabolism imbalance, which is beneficial to treatment of post menopausal osteoporosis

[Key words] Zuogui Wan; Yougui Wan; post menopausal osteoporosis; ovariectomized rats; bone mineral density; bone metabolism

[收稿日期] 20141027 (023)

[基金项目] 江苏省中医药局科技项目(LZ11192);江苏省方剂重点学科开放课题(2011FJ007);南京中医药大学国家自然科学基金(13XYYZ2,XY04)

[第一作者] 谭峰,博士,讲师,从事方剂学配伍理论及药效机制研究,Tel:025-85811929,E-mail:ver-1978@163.com

[通讯作者] *樊巧玲,博士,教授,博士生导师,从事中医治法与方剂配伍应用研究,Tel:025-85811929,E-mail:njfanql@163.com

绝经后骨质疏松症 (post menopausal osteoporosis, PMOP) 是一种与衰老有关的常见病, 主要由于绝经后妇女体内雌激素水平迅速降低, 导致骨量丢失显著增加, 全身骨密度 (BMD) 下降及骨组织结构变化, 使脆性增多易于骨折^[1]。中医传统理论认为本病病变在骨, 其本在肾, 认为其发病机制与肾精亏虚密切相关。而作为补肾代表方剂的左归丸、右归丸是中医临床治疗骨质疏松症的有效方剂^[2-3]。虽然已有研究表明左、右归丸两方均具有改善去卵巢大鼠骨组织形态结构和骨代谢的作用^[4-5], 但作为补肾阳 (右归丸) 与滋肾阴 (左归丸) 不同补肾治法的方剂, 其两方在干预去卵巢 PMOP 大鼠 BMD、骨代谢的药效作用以及作用机制上是否存在差异尚不明确, 尤其是左、右归丸对去卵巢 PMOP 大鼠 BMD 影响的比较缺乏研究支持, 而且量效关系不明确, 同时基于骨代谢的研究仅限于单一指标的观察。BMD 是目前公认的评价骨质丢失, 诊断骨质疏松症的重要指标, 是世界卫生组织 (WHO) 规定的诊断骨质疏松症的金标准。因此本课题组以去卵巢骨质疏松大鼠为模型, 观察左、右归丸对去卵巢骨质疏松大鼠 BMD 以及骨代谢生化指标的影响并探讨其作用机制差异。

1 材料

1.1 药物 左归丸组成: 熟地黄 40 g, 酒山萸肉 20 g, 山药 20 g, 枸杞子 20 g, 菟丝子 20 g, 鹿角胶 20 g, 龟胶 20 g, 川牛膝 15 g。右归丸组成: 炮附片 5 g, 肉桂 5 g, 熟地黄 40 g, 山药 20 g, 酒山萸肉 20 g, 菟丝子 20 g, 鹿角胶 20 g, 枸杞子 20 g, 当归 15 g, 盐杜仲 20 g。左、右归丸按照《景岳全书》原方水提制备。将处方量的药材 (其中鹿角胶和龟板胶除外), 混合粉碎至 40 目后加水煎煮 2 次, 第 1 次加入 10 倍量水回流提取 2 h, 第 2 次加入 8 倍量水提取 1.5 h, 合并 2 次提取液后加入鹿胶、龟胶烊化, 4 °C 保存备用。

1.2 试剂及仪器 Prodigy 型双能 X 射线骨密度测试仪 (GE 公司, 美国), Model680 型酶标仪 (Thermo 美国, Cat: 13073105)。大鼠骨碱性磷酸酶 (BALP) 酶联免疫检测试剂盒 (Abcam, 美国), 大鼠骨钙素 (OC) 酶联免疫检测试剂盒 (Abcam, 美国, lot: 13073102), 大鼠骨保护素 (OPG) 酶联免疫检测试剂盒 (Abcam, 美国, lot: 13073103), 戊酸雌二醇片 (拜耳医药保健有限公司广州分公司, 批号 226A, 使用前用生理盐水配制成质量浓度为 0.01 g·L⁻¹ 的溶液)。

1.3 动物 SPF 级健康 SD 大鼠 110 只, 雌性, 6 月

龄, 体重 (300 ± 20) g, 南京军区总院动物实验中心, 合格证号 SCXK (军) 2007-0012。

2 方法

2.1 动物造模 SD 大鼠 110 只, 随机分为造模组 ($n = 90$) 和假手术组 ($n = 20$)。全部实验动物用水合氯醛麻醉, 常规消毒, 然后于肋弓下脊柱旁开 1 cm 处切开皮肤及肌肉, 打开后腹膜, 结扎输卵管血管后切除双侧卵巢, 并逐层缝合。手术当天每只大鼠每侧手术部位肌注 1 mL 青霉素钠盐注射液 (6×10^7 U·L⁻¹), 术后每只大鼠每天给予肌注 1 mL 青霉素钠盐注射液, 连续 3 d。假手术组仅切除卵巢旁部分脂肪, 余处理同实验组。术后 10 周从两组分别随机选出 10 只大鼠处死后均取 L4 腰椎, 去除附着肌肉和结缔组织, 采用双能 X 射线骨密度仪进行检测 BMD, 以验证造模是否成功。

2.2 药物干预 造模成功后, 将 90 只造模大鼠随机分成 9 组 ($n = 10$), 左归丸高、中、低剂量组, 右归丸高、中、低剂量组、模型组、阳性药戊酸雌二醇组、假手术组。大鼠 *ig* 给药剂量按人与大鼠体表面积换算药物等效剂量, 设定人临床常用剂量为中剂量, 高、中、低剂量组之比为 4:2:1, 计算后各组给药剂量 (按生药量计) 为: 左、右归丸高、中、低剂量组 20, 10, 5 g·kg⁻¹·d⁻¹; 阳性药组为戊酸雌二醇片 0.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹; 假手术组和模型组 *ig* 等容积的生理盐水 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹, 连续给药 10 周。

2.3 取材及指标检测 全体动物提前禁食不禁水 24 h。颈动脉采血, 收集并分离大鼠的血清, 采用 ELISA 法测定血清 BALP, OC, OPG 的含量; 取大鼠双侧股骨, 剔除周围附着的软组织和肌肉, 左侧股骨置于双能 X 射线骨密度测定仪测定股骨的 BMD; 右侧股骨放入 10% 中性福尔马林溶液中固定 48 h, 脱钙 6 周后, 病理切片, 常规 HE 染色, 最后于显微镜下观察组织的结构变化。

2.4 数据处理 采用 SPSS 15.0 统计软件进行数据处理, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间均值比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠 BMD 的变化 与假手术组相比, 模型组大鼠的股骨上段及整体 BMD 显著下降 ($P < 0.05$), 提示造模后骨矿含量丢失严重; 左归丸高、中、低剂量组, 右归丸低剂量组大鼠的 BMD 升高较为明显, 与模型组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 各组大鼠血清骨代谢指标变化 模型组与假

手术组比较血清 BALP, OC 均明显升高, 而 OPG 含量下降 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 左、右归丸高、中、低剂量组大鼠血清 BALP, OC 含量下降 ($P <$

0.05)。而左归丸高、中、低剂量组以及右归丸中、低剂量组大鼠血清 OPG 含量升高 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 左归丸和右归丸对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度及骨代谢的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of Zuogui Wan and Yougui Wan on BMD, BALP, OC and OPG of rat with osteoporosis ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	BMD/ $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$	血清 BALP/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	血清 OC/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	血清 OPG/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
假手术	-	0.271 \pm 0.010 ¹⁾	77.7 \pm 15.9 ¹⁾	53.4 \pm 7.2 ¹⁾	19.4 \pm 3.3 ¹⁾
模型	-	0.251 \pm 0.017	97.2 \pm 19.1	62.5 \pm 6.5	11.5 \pm 2.4
左归丸	20	0.272 \pm 0.023 ¹⁾	53.1 \pm 12.5 ¹⁾	32.3 \pm 7.0 ¹⁾	27.0 \pm 5.1 ¹⁾
	10	0.270 \pm 0.025 ¹⁾	60.4 \pm 10.3 ¹⁾	32.5 \pm 4.1 ¹⁾	25.9 \pm 12.7 ¹⁾
	5	0.270 \pm 0.018 ¹⁾	56.0 \pm 12.2 ¹⁾	34.7 \pm 10.0 ¹⁾	24.6 \pm 4.9 ¹⁾
右归丸	20	0.260 \pm 0.013	64.0 \pm 13.0 ¹⁾	48.1 \pm 10.5 ¹⁾	18.9 \pm 4.2
	10	0.259 \pm 0.019	69.6 \pm 9.2 ¹⁾	42.6 \pm 10.0 ¹⁾	21.8 \pm 7.1 ¹⁾
	5	0.270 \pm 0.016 ¹⁾	73.8 \pm 14.5 ¹⁾	45.2 \pm 8.6 ¹⁾	23.5 \pm 12.3 ¹⁾
雌二醇	0.000 1	0.261 \pm 0.018 ¹⁾	90.4 \pm 11.5 ¹⁾	54.1 \pm 10.4 ¹⁾	19.8 \pm 8.3 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 各组大鼠骨形态学改变 光镜下观察病理切片显示:假手术组可见骨细胞排列整齐,骨小梁完整,排列规则,骨小梁中的骨细胞清晰可见,骨髓中造血细胞丰富,脂肪细胞大小一致,形态正常。模型组见股骨皮质骨中度变薄,骨髓腔扩大明显,骨纹理稀薄,松质骨骨小梁纤细,部分骨小梁断裂,造血细胞数量减少,呈现典型骨质疏松改变,提示造模成功。各干预组中左归丸高、中、低剂量组以及右归丸中、低剂量组、阳性药物组可见股骨皮质骨轻度变薄,骨髓腔轻度扩大,骨纹理稀薄,松质骨骨小梁纤细,造血数量减少,但较模型组有明显减轻。右归丸高剂量组与模型组骨组织病理形态无明显差异。见图 1。

4 讨论

女性进入围绝经期后,卵巢功能开始衰退,雌激素水平呈下降趋势,影响骨代谢,使破骨细胞和成骨细胞功能失偶联,导致骨吸收量大于骨形成量,出现低骨量和骨组织微结构退行性退变,因此绝经后骨质疏松症往往呈现骨代谢的“高转化”状态^[6]。目前在骨质疏松的诊断、鉴别诊断、预防和治疗上意义较大主要是 BMD 测定及骨代谢生化指标两大类指标。其中 BMD 测定快速直接是诊断骨质疏松的金指标。而骨代谢能反映整个骨骼系统的代谢水平,其变化与 BMD 相比更为敏感^[7]。OC 是由成骨细胞、成牙本质细胞和肥大软骨细胞合成的,其主要功能是维持骨的正常矿化速率,其能反映骨组织转化率和全身骨骼的代谢活动,是骨形成的特异生化

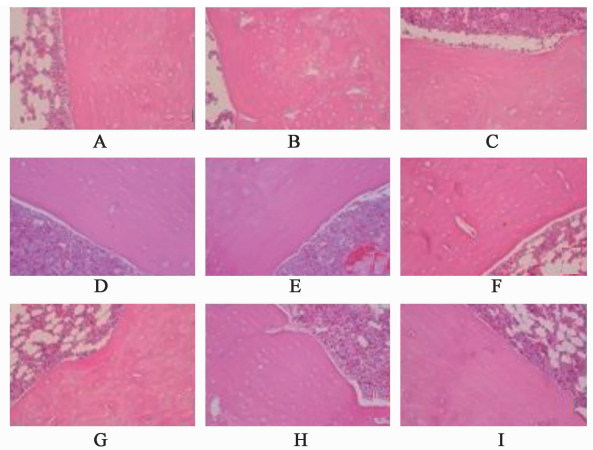


图 1 左归丸和右归丸对骨质疏松大鼠股骨形态的影响 (HE, $\times 40$)
A. 假手术组; B. 模型组; C. 戊酸雌二醇片 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组; D. 左归丸组 ($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); E. 左归丸 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组; F. 左归丸 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组; G. 右归丸 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组; H. 右归丸 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组; I. 右归丸 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组

Fig. 1 Effect of Zuogui Wan and Yougui Wan on rats bone morphology (HE, $\times 40$)

指标。BALP 是血清碱性磷酸酶 (ALP) 的同工酶之一,由成骨细胞合成分泌的具有催化活性的生物大分子,为成骨组织特有,可作为观察骨形成变化的敏感指标。以往研究显示在骨代谢生化指标中血清中 OC, BALP 是反映成骨细胞活性和骨形成总体状况的一项较好的指标^[8]。OPG 是一种分泌型糖蛋白,骨组织中 OPG 主要有 OB 谱系的各种细胞产生,它可以阻断破骨细胞谱系的 RANK 信号与成骨细胞、破骨细胞膜上的 RANKL 配体的结合,从而使得前

体破骨细胞的分化与活化得到抑制,破骨细胞凋亡加速,从而抑制骨吸收,而使骨量增加^[9]。既往研究也表明与PMOP患者血清OPG浓度的BMD成正比相关^[10]。绝经后患骨质疏松症的妇女OC,BALP水平明显高于骨量正常妇女,而OPG下降提示绝经后妇女的骨代谢正处于高转换水平,即骨代谢增强,骨吸收强于骨形成。本次实验结果显示卵巢切除后,模型组与假手术组相比大鼠股骨BMD明显下降,骨组织形态结构破坏,而血清OC,BALP含量升高,OPG含量下降,这显示模型大鼠的骨代谢处于高转换状态,与绝经后骨质疏松症病理状态相符。而左、右归丸干预后大鼠血清OC,BALP含量下降,OPG含量显著升高,大鼠BMD增加,骨组织形态结构改善,证实左、右归丸具有治疗绝经后骨质疏松症的药理作用,同时提示其作用机制可能与促进OPG合成分泌,抑制骨吸收,从而恢复骨吸收-形成偶联失衡有关,纠正绝经后骨代谢的高转换状态(骨吸收强于骨形成)有关。而左、右归丸两方相比较,左归丸不同剂量均表现出良好的药效作用,而右归丸只有低剂量组才显现一定的药效作用,说明左归丸对于模型大鼠骨代谢的干预作用明显优于右归丸,这可能与本次造模条件下大鼠病理状态(即中医所谓的“证”),以及左、右归丸组方配伍差异有关。

[参考文献]

[1] Puntus Thomas, Schneider Barbara, Meran Johannes, et al. Influence of age and gender on associations of body mass index with bone mineral density, bone turnover markers and circulating calcium-regulating and bone-

active sex hormones [J]. BONE, 2011, 49 (4): 824-829.

[2] 郑鲤榕,黄惠娟.左归丸治疗绝经后骨质疏松症研究概况[J].中国骨质疏松杂志,2012,18(6):576-578.

[3] 许正发,代玉金.右归丸治疗骨质疏松症96例[J].国医论坛,2002,17(2):50-50.

[4] 卢建华,王维佳,储小兵,等.补肾方对去卵巢大鼠I型胶原代谢的影响[J].中华中医药杂志,2010,25(7):1109-1111.

[5] 卢建华,王维佳,陈明涛,等.补肾方对去卵巢大鼠腰椎骨形态计量学的影响[J].中医正骨,2011,23(5):24-26.

[6] 易伟莲,廖德权,林柏云,等.绝经后骨质疏松症患者性激素、细胞因子及骨代谢指标的变化及关系[J].检验医学,2012,27(4):296-298.

[7] 王冰,曲凡,周坚红.骨代谢生化指标在绝经后骨质疏松症患者中的应用价值[J].现代妇产科进展,2014,23(2):136-138.

[8] J Tamaki, M Iki, E Kadowaki, et al. Biochemical markers for bone turnover predict risk of vertebral fractures in postmenopausal women over 10 years; the japanese population-based osteoporosis (JPOS) cohort study [J]. Osteoporos Int, 2013, 24 (3):887-897.

[9] Schoppet Michael, Preissner Klaus T, Hofbauer Lorenz C. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function [J]. Arterioscle, Thromb Vasc Biol,2002, 22 (4): 549-553.

[10] 崔双,薛昊罡.绝经后女性骨质疏松患者骨密度与血脂和护骨素的相关性[J].中国老年学杂志,2012,32(10):2051-2053.

[责任编辑 聂淑琴]