

杜仲丸不同配比对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响

段卫华, 牛彦兵, 崔茗婉, 赵振宇, 刘二伟, 高秀梅
(天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] **目的:**观察杜仲、续断不同配比组成的杜仲丸对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响。**方法:**通过切除3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4周后,将70只模型大鼠随机分为模型组,雌激素组(E_2 组),杜仲、续断不同比例杜仲丸组,杜仲与续断生药比分别为2:1,1:1,1:2,1:0,0:1。造模时仅切除部分卵巢周围脂肪组织的大鼠为假手术组,分别*ig*给予相应药物或蒸馏水。治疗干预12周后,检测各组大鼠骨密度(BMD),骨微结构参数,大鼠血清雌激素雌二醇(E_2),骨形成蛋白-2(BMP-2),大鼠I型胶原C端肽(CTX-I)含量。**结果:**与假手术组比较,模型组子宫系数,右股骨系数,BMD,骨体积分数(BV/TV)及血清 E_2 含量均显著下降,而血清BMP-2,CTX-I水平显著升高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与模型组比较, E_2 组和1:1组的子宫系数, E_2 组,2:1组,1:1组,1:2组,1:0组的右股骨系数,BMD, E_2 组,2:1组和1:1组BV/TV均显著升高;2:1组,1:1组,1:0组的血清BMP-2含量, E_2 组,2:1组,1:1组,1:2组,1:0组的血清CTX-I显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论:**杜仲、续断不同配比组成的杜仲丸对于绝经后骨质疏松症均具有治疗作用,但是治疗作用存在一定差异。

[关键词] 杜仲丸; 绝经后骨质疏松症; 骨密度; 骨微结构

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)07-0130-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016070130

Effect of Duzhong Wan with Different Proportions on Osteoporosis in Ovariectomized Rats

DUAN Wei-hua, NIU Yan-bing, CUI Ming-wan, ZHAO Zhen-yu, LIU Er-wei, GAO Xiu-mei
(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Duzhong Wan with different proportions on the osteoporosis in ovariectomized rats. **Method:** Post menopausal osteoporosis (PMOP) rat models were established by bilateral ovariectomy of 3-month-old SD female rats. 4 weeks after successful modeling, 70 model rats were randomly divided into the model group, estrogen group (E_2 group), Eucommiae Cortex and Dipsaci Radix (with different proportions) groups (2:1, 1:1, 1:2, 1:0, 0:1). The rats with only removal of part fat tissues around the ovary in modeling were used as sham operation group. Corresponding drugs and distilled water were given by *ig* administration to the rats. Bone mineral density (BMD), bone microstructure parameters, serum estradiol (E_2), bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and c-terminal peptide of collagen type I (CTX-I) levels were detected respectively after treatment 12 weeks. **Result:** Compared with sham operation group, uterine coefficient, right femur coefficient, BMD, bone volume fraction (BV/TV), and serum estrogen levels were significantly decreased in model group, but the level of BMP-2 and CTX-I in serum were significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the model group, uterine coefficient in E_2 group and 1:1 group, right femur coefficient and BMD in E_2 group, 2:1 group, 1:1 group, 1:2 group and 1:0 group, as well as BV/TV in E_2 group, 2:1 group, and 1:1 group were significantly increased; serum BMP-1 levels in 2:1 group, 1:1 group and 1:0 group, and serum

[收稿日期] 20150802(004)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09401004);天津市中医药管理局中医中西医结合科研项目(13109)

[第一作者] 段卫华,博士,讲师,从事中药药理研究,Tel:022-59596581,E-mail:whd2973@139.com

CTX-I levels in E₂ group, 2:1 group, 1:1 group, 1:2 group and 1:0 group were significantly decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion:** The results suggested that Duzhong Wan with different proportions of Eucommiae Cortex and Dipsaci Radix had treatment effect for post menopausal osteoporosis, while there may be a difference in intensity of the effect.

[Key words] Duzhong Wan; post menopausal osteoporosis; bone mineral density; bone microstructure

原发性骨质疏松症是一种多重病因引起的,具有复杂发病机制的全身性代谢性骨病,以骨量减少,骨的微结构破坏,从而导致骨强度下降而骨脆性增加,易发骨折为其发病特点,可分为绝经后骨质疏松症和老年性骨质疏松症。绝经后骨质疏松症属高转换型骨质疏松,因女性在绝经期雌激素急剧下降,造成了骨代谢的成骨和破骨过程的失衡,骨量丢失大于骨量形成而造成了骨质疏松。预计到 2050 年,我国骨质疏松患者(包括骨量减少)将占全国总人口的 13.2%^[1]。

中药治疗骨质疏松症具有多靶点、多途径的特点。由杜仲、续断等组成的杜仲丸始载于宋·陈自明的《校注妇人良方》,具有补肾功效。杜仲、续断是中医临床传统常用的补肾壮骨对药,入复方治疗骨质疏松、骨折等疾病。历代医家著作多有记载,但是对二药之间配伍关系、用量比例的记载不尽相同。如《古今医统》的用量是杜仲 4 两,续断 2 两,而不是等分组成。对于杜仲和续断单味药的现代研究逐渐深入,但是对于杜仲、续断配伍治疗骨质疏松症以及二药配伍关系、用量比例等研究鲜见报道,仅有少量研究针对配伍前后化学成分的变化^[2]。本文采用去卵巢手术的方法建立大鼠绝经后骨质疏松动物模型,以中医传统理论“肾主骨”、“补肾壮骨”为理论依据,观察杜仲、续断不同配比组成的杜仲丸对绝经后骨质疏松大鼠模型的影响,初步探讨杜仲、续断之间的配伍关系。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 80 只,雌性,3 月龄,体重(200 ± 20) g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号 SCXK(京)2014-0004。

1.2 药物及试剂 杜仲、续断均从安国市顺全隆中药材有限公司购买,经天津中医药大学中药学院中药鉴定教研室张丽娟教授鉴定,杜仲为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* 的干燥树皮,续断为川续断科植物川续断 *Dipsacus asper* 的干燥根。杜仲、续断生药分别用 70% 乙醇 10 倍量回流提取 2 次,每次 2 h,2 次提取液合并浓缩后,经真空干燥得到提取物,临用时按不同比例配置。大鼠血清雌激素雌二

醇(E₂)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号 C7360270181),骨形成蛋白 2(BMP-2)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号 K11011224),I 型胶原 C 端肽(CTX-I)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号 C1967270182)。

1.3 仪器 小动物 vivaCT 40 型显微计算机断层扫描(瑞士 Scanco Medical AG)。

2 方法

2.1 动物造模 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,按体重随机分为假手术组(SHAM)和去卵巢组(OVX)。OVX 组大鼠用水合氯醛 ip 麻醉后,腹位固定,常规消毒,下腹部正中切开皮肤进入腹腔,摘除双侧卵巢后逐层缝合。SHAM 组大鼠仅切除部分卵巢周围的脂肪组织,其他操作同 OVX 组。术后连续 3 d im 青霉素预防感染。

2.2 分组及给药 术后第 5 周开始 ig 给药,去卵巢模型大鼠按体重随机分成 7 组,每组 10 只,每日 1 次,共 12 周。SHAM 组灌服蒸馏水;模型组(OVX 组)灌服蒸馏水;雌激素组(E₂组)17β-雌二醇按照 0.15 mg·kg⁻¹ 给药;2:1 组杜仲、续断提取物按照生药 2:1 比例混合溶解,每日用药剂量为 3 g·kg⁻¹,即杜仲 2 g·kg⁻¹,续断 1 g·kg⁻¹;1:1 组杜仲、续断提取物按照生药 1:1 比例混合溶解,每日用药剂量为 3 g·kg⁻¹,即杜仲、续断各用 1.5 g·kg⁻¹;1:2 组杜仲、续断提取物按照生药 1:2 比例混合溶解,每日用药剂量为 3 g·kg⁻¹,即杜仲 1 g·kg⁻¹,续断 2 g·kg⁻¹;杜仲组杜仲、续断提取物按照生药 1:0 比例,ig 杜仲提取物,每日用药剂量为 3 g·kg⁻¹;续断组杜仲、续断提取物按照生药 0:1 比例,ig 续断提取物,每日用药剂量为 3 g·kg⁻¹。实验期间自由饮水摄食。每周称量 1 次体重,根据体重调整给药量。

2.3 取材及检测指标 至 ig 给药 12 周末,禁食不禁水 12 h,末次 ig 给药后,水合氯醛腹腔麻醉后,腹主动脉取血,分离血清,酶联免疫法检测 E₂, BMP-2, CTX-I 含量。分离大鼠子宫、右股骨,称质量,分别计算脏器系数。采用显微计算机断层扫描(Micro-CT)对右股骨远端干骺端进行扫描,图像分辨率为 10.5 μm,测量骨密度(BMD),测量和计算得出骨微结构参

数:骨体积分数(BV/TV),骨连接密度(Conn. D),骨小梁数目(Tb. N),骨小梁厚度(Tb. Th),骨小梁分离度(Tb. Sp),骨表面积体积比(BS/BV)。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析组间比较,方差齐采用 LSD 法,方差不齐则采用 Dunnett's T3 法比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对去卵巢大鼠脏器系数的影响 与 SHAM 组比较,OVX 组子宫系数和右股骨系数显著降低($P < 0.01$);与 OVX 组比较,E₂ 组和 1:1 组子宫系数,E₂ 组,2:1 组,1:1 组,1:2 组,杜仲组的右股骨系数显著升高($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同配比杜仲丸对去卵巢大鼠脏器系数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Duzhong Wan with different proportions on uterus and right femur coefficient of ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | n | 子宫/% | 右股骨/% |
|----------------|---------------------------|----|---------------------------|---------------------------|
| SHAM | - | 9 | 0.16 ± 0.04 ²⁾ | 0.36 ± 0.02 ²⁾ |
| OVX | - | 10 | 0.03 ± 0.03 | 0.29 ± 0.09 |
| E ₂ | 1.5 × 10 ⁻⁴ | 10 | 0.11 ± 0.05 ¹⁾ | 0.37 ± 0.07 ²⁾ |
| 2:1 | 3 | 10 | 0.07 ± 0.05 | 0.34 ± 0.03 ¹⁾ |
| 1:1 | 3 | 10 | 0.11 ± 0.05 ¹⁾ | 0.35 ± 0.03 ¹⁾ |
| 1:2 | 3 | 9 | 0.10 ± 0.07 | 0.35 ± 0.04 ¹⁾ |
| 杜仲 | 3 | 10 | 0.08 ± 0.07 | 0.36 ± 0.04 ²⁾ |
| 续断 | 3 | 9 | 0.06 ± 0.06 | 0.33 ± 0.03 |

注:与 OVX 组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

表 3 不同配比杜仲丸对去卵巢大鼠骨微结构的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Duzhong Wan with different proportions on bone microstructure of ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | n | BV/TV | Conn. D/mm ⁻³ | Tb. N/mm ⁻¹ | Tb. Th/mm | Tb. Sp/mm | BS/BV |
|----------------|------------------------|----|---------------------------|--------------------------|------------------------|-------------|-------------|--------------|
| SHAM | - | 9 | 0.54 ± 0.02 ²⁾ | 66.10 ± 11.85 | 5.32 ± 0.24 | 0.14 ± 0.01 | 0.20 ± 0.01 | 14.26 ± 0.85 |
| OVX | - | 10 | 0.49 ± 0.03 | 87.67 ± 37.83 | 4.85 ± 0.49 | 0.14 ± 0.02 | 0.23 ± 0.03 | 15.20 ± 1.87 |
| E ₂ | 1.5 × 10 ⁻⁴ | 10 | 0.51 ± 0.03 ¹⁾ | 78.63 ± 28.00 | 4.95 ± 0.34 | 0.14 ± 0.01 | 0.22 ± 0.01 | 14.30 ± 1.62 |
| 2:1 | 3 | 10 | 0.52 ± 0.02 ¹⁾ | 72.55 ± 12.62 | 5.08 ± 0.28 | 0.14 ± 0.01 | 0.22 ± 0.01 | 14.23 ± 1.07 |
| 1:1 | 3 | 10 | 0.52 ± 0.03 ¹⁾ | 70.01 ± 17.35 | 5.06 ± 0.25 | 0.14 ± 0.01 | 0.22 ± 0.01 | 13.03 ± 4.75 |
| 1:2 | 3 | 9 | 0.50 ± 0.03 | 85.21 ± 27.22 | 5.12 ± 0.36 | 0.13 ± 0.01 | 0.22 ± 0.01 | 15.18 ± 1.52 |
| 杜仲 | 3 | 10 | 0.50 ± 0.03 | 94.35 ± 25.89 | 5.21 ± 0.47 | 0.13 ± 0.01 | 0.22 ± 0.02 | 13.57 ± 4.79 |
| 续断 | 3 | 9 | 0.47 ± 0.04 | 108.08 ± 33.59 | 4.79 ± 0.59 | 0.13 ± 0.01 | 0.23 ± 0.03 | 16.16 ± 1.61 |

4 讨论

绝经后骨质疏松症是因为进入围绝经期的妇女,卵巢功能开始退化造成体内雌激素水平下降,导致骨代谢失衡。传统医学中并无“骨质疏松症”这一病名,根据骨质疏松症的临床表现特点,与中医典籍中记载的“骨痿”、“骨蚀”、“骨极”等病颇为相似。中医认为肾为先天之本,主生长发育,主骨生髓。肾气充盈则骨得滋养而强健有力。而女子从

3.2 对去卵巢大鼠 BMD 的影响 与 SHAM 组比较,OVX 组 BMD 显著降低($P < 0.01$);E₂ 组,2:1 组,1:1 组,1:2 组,杜仲组的右股骨 BMD 显著高于 OVX 组($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同配比杜仲丸对去卵巢大鼠骨密度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Duzhong Wan with different proportions on BMD of ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | n | BMD/mg·cm ⁻³ |
|----------------|------------------------|----|------------------------------|
| SHAM | - | 9 | 588.55 ± 22.03 ²⁾ |
| OVX | - | 10 | 541.74 ± 25.90 |
| E ₂ | 1.5 × 10 ⁻⁴ | 10 | 575.86 ± 22.80 ¹⁾ |
| 2:1 | 3 | 10 | 577.25 ± 19.03 ²⁾ |
| 1:1 | 3 | 10 | 577.45 ± 31.21 ²⁾ |
| 1:2 | 3 | 9 | 569.65 ± 20.74 ¹⁾ |
| 杜仲 | 3 | 10 | 573.93 ± 32.37 ¹⁾ |
| 续断 | 3 | 9 | 530.67 ± 48.10 |

3.3 对去卵巢大鼠骨微结构的影响 与 SHAM 组比较,OVX 组 BV/TV 显著降低($P < 0.01$)。E₂ 组,2:1 组,1:1 组 BV/TV 显著高于 OVX 组($P < 0.05$)。其他指标均无统计学差异。见表 3。

3.4 对去卵巢大鼠血清检测指标的影响 与 SHAM 组比较,OVX 组血清 E₂ 含量显著降低,BMP-2 和 CTX-I 含量显著增高($P < 0.01$)。E₂ 组血清 E₂ 含量显著高于 OVX 组($P < 0.01$)。2:1 组,1:1 组,杜仲组的血清 BMP-2 含量显著低于 OVX 组($P < 0.01, P < 0.05$)。E₂ 组,2:1 组,1:1 组,1:2 组,杜仲组的血清 CTX-I 显著低于 OVX 组($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 4。

“七七”开始天癸竭,随肾气亏虚而日渐衰老,骨失所养而致骨枯髓减而脆弱无力,发展为骨质疏松,甚至发生骨折。根据病因病机,中医临床常把骨质疏松辨证分为肾阴虚,肾阳虚,脾胃虚弱,气虚血瘀等型,多以补肾、健脾、活血等为治则组方治疗,又以补肾中药多用^[3]。

杜仲、续断作为中医临床常用的补肾壮骨药对应用广泛。《神农本草经》载杜仲“主腰脊痛,补中

表 4 不同配比杜仲丸对去卵巢大鼠血清 E₂,BMP-2,CTX-I 的影响 (x̄ ± s)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | n | E ₂ | BMP-2 | CTX-I |
|----------------|------------------------|----|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| SHAM | - | 9 | 51.28 ± 6.09 ²⁾ | 51.99 ± 17.77 ²⁾ | 134.82 ± 70.84 ²⁾ |
| OVX | - | 10 | 30.49 ± 6.39 | 122.48 ± 4.73 | 458.82 ± 21.76 |
| E ₂ | 1.5 × 10 ⁻⁴ | 10 | 42.69 ± 7.19 ²⁾ | 113.68 ± 10.73 | 332.89 ± 80.23 ¹⁾ |
| 2:1 | 3 | 10 | 34.05 ± 7.59 | 72.68 ± 11.35 ²⁾ | 216.79 ± 48.48 ²⁾ |
| 1:1 | 3 | 10 | 27.83 ± 3.27 | 82.53 ± 30.68 ¹⁾ | 200.93 ± 88.22 ²⁾ |
| 1:2 | 3 | 9 | 27.83 ± 5.00 | 113.65 ± 7.04 | 414.74 ± 27.66 ¹⁾ |
| 杜仲 | 3 | 10 | 25.57 ± 5.54 | 93.10 ± 9.84 ²⁾ | 296.90 ± 55.71 ²⁾ |
| 续断 | 3 | 9 | 26.95 ± 2.03 | 95.37 ± 36.57 | 475.54 ± 14.02 |

益精气,坚筋骨”,《名医别录》记载杜仲“主治脚中酸疼痛,不欲践地。”后世许多本草著作亦有相关记载,特别“主腰脊痛”、“益精气”、坚筋骨”等功效至今在临床上仍然广泛应用。续断始载于《神农本草经》,“主伤寒,补不足,……折跌,续筋骨……久服益气力。”后世本草书籍多有记载,如《本草经疏》载:“为治胎产、续绝伤、补不足、疗金疮、理腰肾之要药也。”现代药理研究表明,杜仲主要含有木脂素类、苯丙素类、环烯醚萜类等多种化学成分,续断主要含有三萜、苷类化合物、环烯醚萜类化合物等。杜仲、续断可以通过提高实验动物骨密度,促进骨形成,抑制吸收等途径抗骨质疏松^[4-6]。

从本实验结果可以看出,杜仲、续断配伍比例为 2:1 和 1:1 时,杜仲丸既可以提高 PMOP 模型大鼠骨密度,同时又能改善骨微结构。骨密度数值上的增高,理论上反映了骨小梁数目增加、骨小梁增粗或骨小梁密度增高 3 种可能性,而实际上常常这 3 种因素的综合体现^[7]。而骨微结构损伤早于骨质疏松病情的出现,且随着增龄加剧^[8]。由骨微结构破坏引起的骨强度下降程度要大于因骨量丢失导致的骨强度下降^[9]。因而 BV/TV 与骨密度相比,更能及时地反映出骨小梁骨量变化,特别是与骨小梁三维结构相关的骨量变化^[10]。因此,在观察药物疗效上,BV/TV 比 BMD 能更及时地反映早期骨小梁微结构的变化^[11]。同时杜仲、续断配伍比例为 2:1 和 1:1 时能够改善骨高转换状态。骨转换生化指标比骨密度更灵敏地反映骨转化速率,骨脆性和抗骨吸收治疗的效果^[12],其变化亦可独立预测骨质疏松导致的髌部骨折^[13]。此外,杜仲、续断配伍比例为 1:1 时,可以升高子宫系数。综上所述,杜仲丸各配伍组对于绝经后骨质疏松大鼠模型均有一定治疗作用,但是治疗作用存在差异,总体以杜仲-续断(2:1)和(1:1)的配伍比例更具优势。

【参考文献】

[1] 赵燕玲,潘子昂,王石麟,等. 中国原发性骨质疏松症

流行病学[J]. 中国骨质疏松杂志,1998,4(1):1-4,27.

[2] 侯愷,吕志强,赵才政,等. 盐炙与配伍对杜仲丸的 5 种药效部位含量的比较分析[J]. 中成药,2010,32(8):1442-1444.

[3] 李媚,袁婷婷,何勇静,等. 中药方剂防治骨质疏松症的研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(6):233-238.

[4] 邢燕,田雪峰,张倩楠,等. 中药治疗骨质疏松进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2013,19(3):302-306.

[5] 兰波,刘亭,谢玉敏,等. 两种杜仲黄酮类化合物对成骨细胞 OPG/RANKL 及成骨相关转录因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(22):180-183.

[6] Liu Z G,Zhang R,Li C, et al. The osteoprotective effect of Radix Dipsaci extract in ovariectomized rats [J]. J Ethnopharmacol,2009,123(1):74-81.

[7] 肖建德. 实用骨质疏松学[M]. 北京:科学出版社,2004:181.

[8] Green J O, Wang J, Diab T, et al. Age-related differences in the morphology of microdamage propagation in trabecular bone[J]. J Biomech,2011,13,44(15):2659-2666.

[9] Steiniche T, Christiansen P, Vesterby A, et al. Marked changes in iliac crest bone structure in postmenopausal osteoporotic patients without any signs of disturbed bone remodeling or balance[J]. Bone,1994,15(1):73-79.

[10] Nazarian A, Snyder B D, Zurakowski D, et al. Quantitative micro-computed tomography: a non-invasive method to assess equivalent bone mineral density[J]. Bone,2008,43(2):302-311.

[11] Diab T, Wang J, Reinwald S, et al. Effects of the combination treatment of raloxifene and alendronate on the biomechanical properties of vertebral bone [J]. J Bone Miner Res,2011,26(2):270-276.

[12] Szulc P, Delmas P D. Biochemical markers of bone turnover: potential use in the investigation and management of postmenopausal osteoporosis [J]. Osteoporos Int,2008,19(12):1683-1704.

[13] Szulc P. The role of bone turnover markers in monitoring treatment in postmenopausal osteoporosis [J]. Clin Biochem,2012,45(12):907-919.

【责任编辑 周冰冰】