

淫羊藿-女贞子对 GIOP 大鼠骨密度和激素水平的相关性分析

康学¹, 周琦², 李焱¹, 张伟华³, 刘仁慧^{1*}, 王秀娟^{1*}

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069;

2. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京 100010;

3. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437)

[摘要] **目的:**研究糖皮质激素性骨质疏松(GIOP)大鼠内源性激素水平与骨密度的相关性,探讨淫羊藿-女贞子配伍抗GIOP的作用机制。**方法:**SD大鼠60只,雌雄各半,随机分为正常对照组、模型对照组、女贞子组、淫羊藿组、淫羊藿-女贞子组、钙尔奇组。地塞米松 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, im, 2次/周,建立骨质疏松模型。造模同时各给药组灌服相应药物,女贞子组灌服女贞子水煎液 $9.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,淫羊藿组灌服淫羊藿水煎液 $9.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,淫羊藿-女贞子组灌服淫羊藿-女贞子(4:3)水煎液 $9.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,钙尔奇组灌服钙尔奇碳酸钙D3片 $0.2773\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。8周后处死取材,放射免疫法检测血清皮质醇(COR)、睾酮(T)、雌二醇(E_2)含量;双能X射线骨密度仪测量离体股骨骨密度(BMD);并对实验数据进行相关性分析。**结果:**模型对照组大鼠血清COR、T、 E_2 含量以及股骨不同部位BMD均显著降低($P < 0.05$ 或 0.01);与模型对照组比较,各给药组均可显著上调血清COR水平($P < 0.05$ 或 0.01),淫羊藿-女贞子组血清T含量显著升高($P < 0.05$),女贞子组、淫羊藿-女贞子组血清 E_2 含量显著升高($P < 0.05$ 或 0.01),且各用药组不同部位BMD均较模型对照组显著升高($P < 0.05$ 或 0.01);相关性分析结果显示BMD与血清COR、T、 E_2 水平呈显著正相关($P < 0.05$ 或 0.01)。**结论:**GIOP大鼠BMD与内源性激素水平密切相关,淫羊藿-女贞子配伍对激素水平的影响可能是其防治GIOP的机制之一。

[关键词] 骨质疏松;糖皮质激素;淫羊藿-女贞子;骨密度;内源性激素;相关性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0250-04

[doi] 10.11653/syfy2013230250

Analysis of Correlation of Combination of Epimedii Folium and Ligustri Lucidi Fructus on Bone Mineral Density and Hormone Levels in Glucocorticoid-induced Osteoporosis Rats

KANG Xue¹, ZHOU Qi², LI Zhan¹, ZHANG Wei-hua³, LIU Ren-hui^{1*}, WANG Xiu-juan^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Beijing Hospital of TCM Capital University of Medicine, Beijing 100010, China;

3. Yueyang Hospital of Integrative Chinese and Western Medicine Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200437, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the correlations between bone mineral density (BMD) and endogenous hormone levels, and then investigate the mechanism of anti-GIOP of combination of Epimedii Folium and Ligustri Lucidi Fructus. **Method:** Sixty SD rats were randomly divided into 6 groups: normal control group, model group, Epimedii Folium group, Ligustri Lucidi Fructus group, Epimedii Folium and Ligustri Lucidi Fructus mixture group

[收稿日期] 20130529(003)

[基金项目] 首都中医药及护理学专项课题(12ZYH07);北京市教育委员会科技计划面上项目(KM20131002501);北京中医药薪火传承“3+3”工程二室一站建设项目(2012-SZ-C-42)

[第一作者] 康学, 硕士, 从事中药药效与作用机制研究, Tel:010-83911624, E-mail: kangxue0907@126.com

[通讯作者] *刘仁慧, 博士, 从事中药药效与作用机制研究, Tel:010-83911639, E-mail: liurenhui995@163.com

*王秀娟, 教授, 博士生导师, 从事中药药效与作用机制研究及中药资源可持续利用研究, Tel:010-83911624, E-mail: wxj0517@sina.com

(compatibility group) and positive drug group. All rats received intramuscular injection of dexamethasone ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, twice a week) for 8 weeks to establish osteoporosis model except those in the control group, rats in treatment groups were treated with intragastric administration of traditional Chinese herbs or positive drug respectively, Ligustri Lucidi Fructus group was given Ligustrum lucidum with $9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, Epimedii Folium group was given Epimedium with $9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, the compatibility group were given Epimedii Folium-Ligustri Lucidi Fructus with $9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ the positive group was administered Caltrate calcium D3 tablets with $0.2773 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Eight weeks later, serum corticosteroid (COR), testosterone (T) and estradiol (E_2) were determined by radioimmunoassay, and BMD of femur was measured by dual-energy X-ray absorptiometry. **Result:** The content of serum COR, T, E_2 and BMD of model group were lower than normal control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with model group, serum levels of COR were upregulated significantly in each administration group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), serum T levels in compatibility group and E_2 levels in Ligustri Lucidi Fructus group and compatibility group were increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), BMD increased obviously in each treatment group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The correlation analysis showed that BMD was positively correlated with serum hormone levels ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** BMD was closely related to endogenous hormone levels in glucocorticoid-induced osteoporosis rats, which indicate that the effect of combination of Epimedii Folium and Ligustri Lucidi Fructus on hormone levels may be one of the mechanisms of its prevention and treatment of GIOP.

[**Key words**] osteoporosis; glucocorticoid; Epimedii Folium-Ligustri Lucidi Fructus; bone mineral density; endogenous hormone; correlation

糖皮质激素(GC)复杂的药理作用决定了其副作用的多样性和严重性,其中糖皮质激素性骨质疏松症(GIOP)已成为继绝经后骨质疏松和退行性骨质疏松之后最常见的药源性骨病,且GC剂量越大、疗程越长,自发性骨折的发生率就越高^[1]。GC引起骨质疏松的确切机制尚未完全明了,故目前尚无理想有效的治疗方法,临床用药缺乏针对性。可以认为,GC不是通过某一方面的单一因素诱发骨质疏松,而可能通过影响各种骨组织细胞功能及细胞因子活性、钙离子的代谢、内分泌系统等^[2]多方面的途径使骨形成减少和骨吸收增加,导致骨量丢失,诱发骨质疏松,此外还与患者的原发性疾病有关^[3]。前期研究结果已证实^[4],淫羊藿-女贞子配伍对大鼠哮喘模型激素干预治疗导致的下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)轴抑制和骨代谢异常有良好的保护作用,提示二者有防治GIOP的作用。本实验探讨淫羊藿-女贞子配伍对GIOP大鼠内源性激素的影响,并对激素水平和骨密度(BMD)进行相关性分析,旨在阐明二者配伍抗GIOP的作用机制,以利于开发出安全、高效、易于广大患者接受的抗GIOP的新药物。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康SD大鼠,雌雄各半,体重(200 ± 20)g,由北京维通利华实验动物技术股份有限公司提供,实验动物许可证号SCXK(京)

2007-0001。

1.2 试剂 地塞米松磷酸钠注射液(天津药业焦作有限公司,批号10081711),淫羊藿、女贞子中药材(均购自北京同仁堂药店),钙尔奇碳酸钙D3片(惠氏制药有限公司,批号1108317),皮质醇(COR)、睾酮(T)、雌二醇(E_2)放免试剂盒(北京北方生物技术研究所,批号均为20121220)。

1.3 仪器 XH6080放免仪(西安核仪厂),Heraeus Biofuge 15R型离心机(Heraeus Sepatech公司),XR-36型双能X射线骨密度仪(美国Norland公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 清洁级SD大鼠60只,雌雄各半,按随机数字表法分为6组:正常对照组(生理盐水)、模型对照组、女贞子组(女贞子水煎液 $9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、淫羊藿组(淫羊藿水煎液 $9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、淫羊藿-女贞子组[淫羊藿-女贞子(4:3)水煎液 $9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$]、钙尔奇组(阳性对照,钙尔奇碳酸钙D3片 $0.2773 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组10只,自由饮水、摄食。参考杨志刚等^[5]的造模方法,除正常对照组(生理盐水)外,其余各组大鼠分别给予两大腿内侧交替im地塞米松 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,2次/周,共8周,在造模同时,各组动物ig给予相应药物或生理盐水,1次/d,连续8周。

2.2 取材及检测 大鼠腹腔麻醉,腹主动脉取血,离心取血清,检测COR,T, E_2 ,按照试剂盒说明书,

均采用放射免疫法检测。完整分离大鼠股骨,剔除所有附着的肌肉和结缔组织,用生理盐水浸泡的湿纱布包裹, -20 ℃ 密封保存,用于 BMD 检测,应用 XR-36 型双能 X 射线骨密度仪及其所附带的“*The Small Subject Scout Scan*”软件,对全股骨、上 1/3 股骨及股骨头进行 BMD 扫描,BMD 采用单位面积内的骨矿物质含量($\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)表示。

2.3 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差齐性检验及单因素方差分析,根据方差齐性检验结果选择 *LSD* (方差齐)或 *Tamhane's T2* (方差不齐),相关性分析选用 Pearson 线性相关分析, $P < 0.05$ 为有统计意义。

3 结果

表 1 各组大鼠血清 COR, T, E₂ 水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	COR/ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$	T/ $\text{ng}\cdot\text{dL}^{-1}$	E ₂ / $\text{ng}\cdot\text{dL}^{-1}$
正常对照	-	23.48 ± 2.81 ²⁾	7.47 ± 2.33 ²⁾	8.90 ± 2.70 ²⁾
模型对照	-	7.25 ± 2.76	2.88 ± 0.82	4.97 ± 1.05
女贞子	9.5	17.74 ± 4.44 ²⁾	3.23 ± 0.83	7.84 ± 1.27 ²⁾
淫羊藿	9.5	17.23 ± 3.91 ²⁾	3.78 ± 0.56	6.19 ± 2.05
淫羊藿-女贞子	9.5	18.70 ± 3.99 ²⁾	4.19 ± 0.75 ¹⁾	7.50 ± 2.30 ¹⁾
钙尔奇	0.277	11.80 ± 4.86 ¹⁾	3.36 ± 0.60	5.73 ± 1.82

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 各组大鼠 BMD 的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$		
		全股骨	上 1/3 股骨	股骨头
正常对照	-	0.219 3 ± 0.038 3 ²⁾	0.196 1 ± 0.009 0 ²⁾	0.162 7 ± 0.011 0 ²⁾
模型对照	-	0.144 1 ± 0.024 0	0.148 7 ± 0.004 5	0.136 3 ± 0.004 4
女贞子	9.5	0.182 4 ± 0.038 2 ¹⁾	0.173 5 ± 0.010 2 ^{2,3)}	0.152 5 ± 0.010 2 ^{2,3)}
淫羊藿	9.5	0.189 1 ± 0.024 0 ²⁾	0.181 2 ± 0.008 6 ²⁾	0.162 1 ± 0.008 7 ²⁾
淫羊藿-女贞子	9.5	0.209 3 ± 0.028 6 ²⁾	0.181 9 ± 0.006 7 ²⁾	0.166 5 ± 0.006 8 ²⁾
钙尔奇	0.277	0.169 1 ± 0.036 0	0.171 9 ± 0.009 3 ²⁾	0.144 2 ± 0.009 2

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与淫羊藿-女贞子组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 大鼠 BMD 与激素水平的相关性分析 相关分析显示:全股骨、上 1/3 股骨及股骨头 BMD 均与 COR 水平呈显著正相关 ($r = 0.483, 0.771, 0.650$, 均 $P < 0.01$),与 T 含量呈显著正相关 ($r = 0.309, 0.611, 0.381$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);上 1/3 股骨、股骨头 BMD 与性激素 E₂ 含量呈正相关 ($r = 0.432, 0.395$, 均 $P < 0.01$) (表 3)。

4 讨论

GIOP 是一种长期或大剂量应用 GC 所致的,以骨强度下降、骨折风险率增加为特征的代谢性骨病。大约 90% 长期使用 GC 治疗的病人有明显的骨量丢失,骨质改变,骨折发生率明显增加。BMD 即骨骼

3.1 各组大鼠血清 COR, T, E₂ 含量的比较 与正常对照组比较,模型组大鼠血清 COR, T, E₂ 含量均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型对照组比较,淫羊藿、女贞子各给药组均可显著上调血清 COR 水平 (均 $P < 0.01$),淫羊藿-女贞子组血清 T 含量显著升高 ($P < 0.05$),女贞子组血清 E₂ 含量显著升高 ($P < 0.01$) (表 1)。

3.2 各组大鼠 BMD 的比较 模型对照组全股骨、上 1/3 股骨以及股骨头 BMD 均较正常对照组显著降低 (均 $P < 0.01$)。与模型对照组比较,淫羊藿-女贞子各给药组股骨 3 个部位的 BMD 均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中以淫羊藿-女贞子配伍升高 BMD 作用最为显著 (均 $P < 0.01$) (表 2)。

表 3 大鼠激素水平与股骨各部位 BMD 的相关性分析 ($n = 60$)

激素	骨密度			r 值
	全股骨	上 1/3 股骨	股骨头	
COR	0.483 ²⁾	0.771 ²⁾	0.650 ²⁾	
T	0.309 ¹⁾	0.611 ²⁾	0.381 ²⁾	
E ₂	0.230	0.432 ²⁾	0.395 ²⁾	

注:与激素水平相关¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

单位面积所含的骨矿物量,是目前骨矿代谢中量化骨量,反映骨强度,评价骨折危险度的重要指标^[6]。本研究结果显示:模型对照组大鼠全股骨、上 1/3 股

骨及股骨头 BMD 均较正常对照组显著降低,表明 GIOP 模型制备成功;淫羊藿-女贞子各给药组与模型对照组比较均表现出明显升高骨密度的作用,提示淫羊藿-女贞子能提高单位骨组织体积的骨量,有效对抗地塞米松所致的骨量降低,以淫羊藿-女贞子组作用最明显。

GC 诱导的骨质疏松作用途径复杂,既有对参与骨重塑基本单位细胞(成骨细胞和破骨细胞)的直接作用,又有对骨矿代谢、内分泌系统的间接作用。GC 对内分泌系统激素水平的抑制是 GIOP 产生的一个重要机制,主要表现为对性激素的抑制^[7]。雌激素在骨组织中具有调节成骨细胞活性和细胞凋亡的作用,雌激素抑制则严重影响骨吸收。雄激素可直接作用于骨内雄激素受体,或在芳香化酶的作用下转变为雌激素,作用于骨内雌激素受体进而影响骨代谢,雄激素的减少与骨丢失相关^[8]。GC 除了对性激素的影响外,还可抑制肾上腺皮质功能,影响内源性激素 COR 的分泌。超生理剂量的地塞米松可引起大鼠肾上腺皮质功能减退及形态上萎缩,抑制垂体促肾上腺皮质激素 ACTH 分泌^[9-10]。本实验结果显示:模型对照组血清 COR, T, E₂ 含量均显著降低,提示大剂量地塞米松引起肾上腺萎缩,肾上腺皮质功能抑制,性激素水平显著下降。而淫羊藿-女贞子可显著上调血清 COR 和性激素水平,淫羊藿-女贞子配伍可一定程度改善 GC 对内源性 COR 的抑制,提高 GC 诱导骨质疏松大鼠性激素水平,有效改善内分泌系统状态,纠正 GIOP 大鼠垂体-肾上腺轴和垂体-性腺轴功能紊乱。

以上研究成果提示,淫羊藿-女贞子配伍可提高单位骨组织体积骨量,有效缓解 GIOP 大鼠内源性 COR 的抑制,升高血清性激素水平。为了阐明二者配伍对 BMD 和激素水平的影响是否存在内在联系,进一步揭示淫羊藿-女贞子配伍抗 GIOP 的作用机制,本实验对 BMD 和内源性激素水平进行了相关性分析,结果显示:骨密度与血清 COR, T, E₂ 水平呈显著正相关。表明 GIOP 大鼠随着内源性激素水平的下降, BMD 相应降低,骨量减少,提示激素水平的下降与 GIOP 的发生密切相关。大量实验已证实淫羊藿抗骨质疏松作用与其所含的黄酮类物质有关,主

要发挥性激素样作用^[11],女贞子抗骨质疏松的主要成分以萜类、黄酮类为主^[12]。二者配伍可明显提高 GIOP 大鼠激素水平,骨密度随之显著升高,提示淫羊藿-女贞子配伍对内源性激素水平的影响可能是其抗 GIOP 的作用机制之一。

[参考文献]

- [1] 刘亚伟. 糖皮质激素性骨质疏松的发病机制及治疗进展[J]. 国外医学:泌尿系统分册, 2004, 24(5):711.
- [2] 杨召. 糖皮质激素性骨质疏松症的发病机制[J]. 中国骨与关节外科, 2009, 2(4):328.
- [3] Willenberg H S, Lehnert H. Basics and management of glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. Internist (Berl), 2008, 49(10):1186.
- [4] 刘仁慧, 杨婧, 王培, 等. 淫羊藿-女贞子对激素干预撤停阶段大鼠哮喘模型 HPA 轴及骨代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5):137.
- [5] 杨志刚, 沈宗根, 顾震纶, 等. WHE 抑制地塞米松致大鼠骨质疏松研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(29):12708.
- [6] 赵旭, 代平, 金钊, 等. 经方左归丸抗糖皮质激素性骨质疏松症的效应及机制研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9):2243.
- [7] 李洪涛, 于雪峰, 李登宇, 等. 糖皮质激素性骨质疏松症发病机理研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2009, 15(2):150.
- [8] 王化鹏. 雄激素与男性骨质疏松症[J]. 医学综述, 2007, 13(17):1329.
- [9] 杨波, 杜春晓, 李义凯. 硬膜外腔注射不同糖皮质激素对大鼠肾上腺皮质功能及形态学的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2012, 20(6):1.
- [10] 曾洋, 段晓红, 孙伟, 等. 补肾阳方拮抗外源性糖皮质激素 HPA 轴抑制及分解代谢效应研究[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(8):5.
- [11] 贾晓斌, 兰雪莲, 陈彦, 等. 淫羊藿黄酮类成分抗骨质疏松作用及其机制研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21(3):269.
- [12] 林雄浩, 吴锦忠. 中药复方二至丸的化学成分及抗骨质疏松研究进展[J]. 解放军药学报, 2009, 25(5):421.

[责任编辑 李玉洁]