

左归丸对糖皮质激素所致骨质疏松大鼠 血清中 BGP, IGF-I 含量的影响

刘梅洁, 潘静华, 李艳, 刘红, 滕静如, 王少君, 张颖, 杜中平, 于峥, 鞠大宏*
(中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:探讨左归丸对糖皮质激素性骨质疏松症的治疗作用及其机制。方法:将 42 只雌性 Wistar 大鼠随机分为 3 组:空白对照组 12 只、模型组 15 只、左归丸组 15 只。除空白组 im 生理盐水外,其余动物用地塞米松 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, im, 2 次/周, 连续 8 周造模。造模同时开始给药:左归丸组 ig 左归丸(生药) $9.52 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 1 次/d, 每周 6 d, 连续 8 周。造模给药 8 周后,采用骨组织形态计量学方法对不脱钙骨切片进行形态计量,采用 ELISA 法检测大鼠外周血清中骨钙素(BGP),胰岛素样生长因子-I(IGF-I)的含量。结果:与空白对照组比,模型组大鼠胫骨骨小梁体积百分比(TBV),骨小梁形成表面百分比(TFS)显著降低,骨小梁吸收表面百分比(TRS)显著增高;大鼠血清中 BGP, IGF-I 含量则显著降低;而左归丸组大鼠 TBV 显著高于模型组, TFS 亦显著增高, TRS 虽无差异,但有明显降低趋势;且血清中 BGP, IGF-I 的含量较模型组显著增高。结论:左归丸可使糖皮质激素所致骨质疏松大鼠血清中 BGP, IGF-I 水平上调,这可能是其治疗糖皮质激素所致大鼠骨质疏松症的机制之一。

[关键词] 左归丸;骨质疏松症;骨钙素;胰岛素样生长因子-I

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0133-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110622.1305.008 **[网络出版时间]** 2011-06-22 13:05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110622.1305.008.html>

Effects of Zuoguiwan on BGP and IGF-I in Serum of Glucocorticoid-induced Osteoporosis Rats

LIU Mei-jie, PAN Jing-hua, LI Yan, LIU Hong, TENG Jing-ru, WANG Shao-jun,
ZHANG Ying, DU Zhong-ping, YU Zheng, JU Da-hong*

(Institute of Basic Theories, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To reveal the mechanism of Zuoguiwan treatment for glucocorticoid induced osteoporosis. **Method:** Virgin Wistar rats were selected and randomly divided into three groups ($n = 12-15$ per group), including control group, model group and Zuoguiwan group. The rats were injected dexamethasone ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, twice a week) for eight weeks to make the model of osteoporosis, and the Zuoguiwan ($9.52 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 6 d per week) was administered intragastrically to the rats in Zuoguiwan group for eight weeks. We analyzed the effect of Zuoguiwan on tibia bone by measuring the relative parameters of the histomorphometric slides of the undecalcified tibia. And the content of bone r-carboxyalutamic-acid-containing proteins (BGP) and Insulin-like growth factors (IGF-I) in serum of rats were detected before and after the treatments. **Result:** TBV and TFS in model group were decreased significantly, while TRS was increased significantly. And the content of BGP and IGF-I were decreased significantly. After being treated by Zuoguiwan, TBV and TFS were increased significantly in Zuoguiwan group, no changes of TRS were observed, while it had the tendency to decrease. The content of BGP

[收稿日期] 2011-03-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873210)

[第一作者] 刘梅洁, 助理研究员, 博士, 从事中医药防治骨质疏松症的基础研究, Tel:010-64014411-2564, E-mail: liumeijie811@163.com

[通讯作者] * 鞠大宏, 研究员, 博士, 从事中医药防治骨质疏松症的基础研究, Tel:010-84024005, E-mail: judahong@sohu.com

and IGF-I were increased significantly in Zuoguiwan group. **Conclusion:** Zuoguiwan can treat glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. One of the mechanism is that Zuoguiwan can increase the content of BGP and IGF-I in serum.

[**Key words**] Zuoguiwan; osteoporosis; BGP; IGF-I

随着糖皮质激素广泛用于临床,糖皮质激素性骨质疏松(GIOP)发病率剧增,仅次于绝经后及老年性骨质疏松症而居第 3 位。美国一项调查显示,长期服用糖皮质激素是 20~44 岁年轻人发生骨质疏松的最常见原因^[1]。多年来,在“肾主骨”这一基本理论的指导下,中医以补肾法为主要治则,采用补肾方药治疗糖皮质激素性骨质疏松症,取得了较好的疗效^[2-3],充分显示了中医在治疗骨质疏松症中的独特优势。本研究建立大鼠糖皮质激素性骨质疏松模型,旨在探讨滋阴补肾法的代表方剂左归丸对糖皮质激素性骨质疏松症的治疗作用及机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠 42 只,雌性,体重 200~220 g,清洁级,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,许可证号 SCXK(军)2002-001。大鼠在中国中医科学院中医基础理论研究所清洁级实验动物室内饲养,实验动物室许可证号 SYK11-00-0039。

1.2 药物 左归丸由熟地黄 24 g,山药 12 g,枸杞子 12 g,山萸肉 12 g,牛膝 9 g,菟丝子 12 g,龟板胶 12 g,鹿角胶 12 g 组成,常规水煎制,含生药 0.952 mg·mL⁻¹;地塞米松磷酸钠注射液,天津金耀氨基酸有限公司(批号 0704031),使用时用生理盐水稀释至 1 g·L⁻¹,给药容积 1 mL·kg⁻¹;戊巴比妥钠,北京通县育才精细化工厂,批号 950427;盐酸四环素,欣惠泽奥科技有限公司,批号 US22105。

1.3 试剂 大鼠血清骨钙素(BGP)、胰岛素样生长因子-I(IGF-I)ELISA 试剂盒均购自美国 ADL 公司;乙二胺四乙酸二钠,北京北化精细化学品有限责任公司,批号 20060324;甲基丙烯酸甲酯,北京益利精细化学品有限公司,批号 20050317;甲基丙烯酸丁酯,北京益利精细化学品有限公司,批号 980716;聚乙二醇 400,北京化学试剂公司,批号 050425;苯甲酸甲酯,华北地区特种化学试剂开发中心(天津),批号 980923;过氧化苯甲酰,北京金龙化学试剂有限公司,批号 20000420;*N,N*-二甲基对甲苯胺(*N,N*-dimethyl-p-toluidine),Aldrich 公司,批号 04327MB-

235; I 液:100 mL 甲基丙烯酸甲酯 + 35 mL 甲基丙烯酸丁酯 + 5 mL 苯甲酸甲酯 + 1.2 mL 聚乙二醇 400; II 液: I 液 + 0.4 g 干燥过氧化苯甲酰; III 液: II 液 + 0.8 g 干燥过氧化苯甲酰。

1.4 仪器 冷冻切片(英国 TBS 公司),Reichert-Jung2040 切片(德国),CTR6000 显微镜(德国 Leica 公司),Leica-Qwin 图像分析仪系统(德国 Leica 公司),酶标仪(美国 Thermo 公司),洗板机(美国 Thermo 公司),恒温恒湿箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

2 方法

2.1 动物分组及处理 将 42 只雌性 Wistar 大鼠随机分为 3 组:空白对照组 12 只、模型组 15 只、左归丸组 15 只。造模大鼠 im 地塞米松 1 mg·kg⁻¹,每周 2 次,连续 8 周;空白对照组 im 等体积生理盐水;左归丸组除按以上方法 im 地塞米松外,ig 左归丸水煎剂含生药 9.52 g·kg⁻¹,1 次/d,每周 6 d,连续 8 周。

各组大鼠于处死前 16 d 和前 3 d 分别 ip 盐酸四环素 30 mg·kg⁻¹,以对骨进行荧光标记。给药结束后,采用大鼠麻醉后股动脉取血法,所取全血静置 1 h 后,经 2 000 r·min⁻¹离心 10 min,取血清,-20℃冰箱保存,用于 ELISA 检测。然后将大鼠迅速处死,取右侧胫骨制作不脱钙骨切片,用于骨组织形态计量学指标的检测。

2.2 骨组织形态计量学指标的测定

2.2.1 不脱钙骨切片的制作及染色 取大鼠右侧胫骨近端 1/3,4% 多聚甲醛溶液固定后,用乙醇逐级脱水:80%,95%,100% 乙醇各 2 d,二甲苯透明 2 d。标本依次在塑料聚合液 I 液、II 液、III 液中各浸泡 3 d。随后,将 400 μL *N,N*-二甲基对甲苯胺加入到 100 mL 预冷(4℃) III 液中,在青霉素小瓶中注入约 7 mL 的 III 液,将骨标本按同一方向放入瓶底,用塞盖紧,用注射器抽空包埋瓶中空气。然后置于 -20℃冰箱中聚合 1 周左右,变为无色透明的坚硬包埋块。修块后,每块切出 5 μm 厚的纵向不脱钙骨切片 2 张。其中一张甲苯胺蓝染色,另一张用于荧光观察。

2.2.2 骨组织形态计量方法 采用 Leica-Qwin 图像分析系统,对不脱钙骨切片进行形态计量。骨小梁体积百分比(TBV):骨小梁体积占被测骨髓腔总体积的百分比,是衡量骨量水平的主要标志;骨小梁吸收表面百分比(TRS)为不规则、凹凸不平的骨小梁表面占骨小梁表面的百分比,它可判断破骨细胞的活性;骨小梁形成表面百分比(TFS)为有成骨细胞被覆的类骨质表面占骨小梁表面的百分比,它可判断成骨细胞的活性。

2.3 血清 BGP, IGF-I 含量的检测 采用 ELISA 法检测血清 BGP 和 IGF-I 的含量。具体步骤严格按照试剂盒说明书进行操作。

表 1 左归丸对模型大鼠胫骨 TBV, TRS, TFS 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	TBV	TRS	TFS
空白	-	12	32.31 ± 4.75	3.63 ± 0.91	7.72 ± 2.10
模型	-	15	14.05 ± 3.52 ²⁾	7.05 ± 1.59 ²⁾	3.35 ± 1.01 ²⁾
左归丸	9.52	15	21.27 ± 4.11 ^{2,4)}	5.95 ± 1.52 ²⁾	6.03 ± 1.47 ^{2,4)}

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对骨质疏松大鼠血清中 BGP 含量的影响 模型组大鼠血清 BGP 的含量比空白组显著降低。左归丸组大鼠血清中 BGP 的含量与模型组相比明显增高,但仍明显低于空白组。见表 2。

表 2 左归丸对模型大鼠血清中 BGP, IGF-I 含量的影响($\bar{x} \pm s$)
 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	BGP	IGF-I
空白	-	12	5.47 ± 1.38	6.07 ± 1.08
模型	-	15	3.21 ± 1.14 ²⁾	3.91 ± 1.07 ²⁾
左归丸	9.52	15	4.27 ± 1.05 ^{1,3)}	5.21 ± 1.03 ^{1,4)}

3.3 对骨质疏松大鼠血清中 IGF-I 含量的影响 模型组大鼠血清中 IGF-I 的含量比空白对照组显著降低。与模型组比,左归丸组血清 IGF-I 的含量显著增高,但仍低于空白组。见表 2。

4 讨论

左归丸是滋阴补肾法的代表方剂,出自明代温补名家张景岳的《景岳全书·新方八阵》,是张景岳由六味地黄丸化裁而来,对以“肾精不足不能濡养于骨”为根本致病原因的骨质疏松症有一定的治疗作用。本实验观察了它对糖皮质激素所致的大鼠骨质疏松症的治疗作用。结果显示:大鼠经连续大量使用糖皮质激素后,作为骨量主要标志的胫骨 TBV 显著降低,代表骨吸收参数的 TRS 显著增高,而代表

2.4 统计学分析 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行数据处理,组间两两比较采用 *q* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对骨质疏松大鼠骨组织形态计量学指标的影响 模型组大鼠胫骨 TBV 显著低于空白组,而左归丸组的 TBV 则显著高于模型组,但与空白组相比仍有显著差异。与空白组比较,模型组大鼠胫骨 TRS 显著增高,而 TFS 显著降低,左归丸组的 TRS 比空白组显著增高,而 TFS 明显降低;与模型组比,左归丸组 TRS 有明显降低趋势,但无统计学差异, TFS 则显著增高。见表 1。

骨形成参数的 TFS 降低,表明使用糖皮质激素所造成的是一种骨形成降低,骨吸收增加而骨吸收大于骨形成的骨质疏松模型。给大鼠灌服左归丸后, TBV 显著增高, TRS 与模型组相比虽无差异,但有明显的降低趋势,且 TFS 明显增高。结果表明,左归丸能使糖皮质激素所致的骨吸收增高和骨形成降低的骨量丢失状态得到控制和逆转,从而导致骨量的增加。

IGF 是骨基质中含量最丰富的生长因子,能促进骨基质的合成,而治疗剂量的糖皮质激素(GC)能够抑制成骨细胞的 IGF 的表达。OB 同时产生几种胰岛样生长因子结合蛋白(IGFBP),调节 IGF 活性,其中 IGFBP3 及 IGFBP5 有增强 IGF 作用,而 IGFBP4 及 IGF-BP6 抑制 IGF 活性。有关实验证明,地塞米松能在 mRNA 及蛋白水平上抑制 IGFBP3 及 IGFBP5 的表达,对 IGFBP4 没有持续影响。在对胚胎鼠 OB 培养的研究中发现,可的松通过 RNA 聚合酶 II 抑制因子从转录水平刺激 IGFBP 6 在 OB 表达。GC 亦可减少 IGF II 受体转录,降低 IGFBP 活化。可见,IGF 系统调节紊乱是 GC 引起骨质疏松症的重要病理机制^[4]。实验结果显示:模型组大鼠血清中 IGF-I 的含量比空白对照组显著降低,这与以往的研究结果一致。而灌服左归丸后,大鼠血清中 IGF-I 的含量显著增高。这一结果说明,左归丸可以增强成

骨细胞的活性,从而使 IGF-I 的水平上调,最终使骨基质的形成增加,这可能是其治疗糖皮质激素性骨质疏松症的作用机制之一。

BGP 来源于骨组织,由成骨细胞合成并分泌到骨中,是骨组织中非胶原性蛋白的主要成分,约占骨蛋白的 3%。其作用是调节和维持骨钙。骨钙素 2/3 与羟磷灰石结晶结合,沉积于骨基质,1/3 进入血液循环。因此,血清中骨钙素浓度可特异性地反映它的“母体”成骨细胞的活性。由于在骨吸收过程中,基质中的骨钙素又可释放到血液,因此,骨钙素水平又可作为判断骨转移的指标。所以综合来讲,骨钙素是评价骨形成和骨转换率的特异性指标。本实验结果显示:模型组大鼠血清中 BGP 的含量比空白对照组显著降低。左归丸组大鼠血清中 BGP 的含量虽明显低于空白对照组,但与模型组相比明显增高。这一结果说明,糖皮质激素性骨质疏松症中,成骨细胞的活性显著降低,从而使骨形成受到抑制;而左归丸可以使成骨细胞的活性增强,从而使 BGP 的分泌增加,最终达到促进骨形成,治疗骨质疏松症的目的。

总之,左归丸可促进成骨细胞的活性,从而使血清中 BGP 和 IGF-I 的水平上调,这可能是其治疗糖皮质激素性骨质疏松的机制之一。当然,左归丸治疗糖皮质激素性骨质疏松症的机制是非常复杂的,本实验只是对其中的几个环节进行了探讨,还有待于进一步的深入研究。

[参考文献]

- [1] 曹立,吴红梅,张新军,等. 预防糖皮质激素所致骨质疏松的循证医学证据[J]. 循证医学,2006,26(2):142.
- [2] 陈秋霞,史建强,李常兴,等. 补肾胶囊治疗 SLE 患者骨质疏松症的作用机制[J]. 中国热带医学,2006,6(6):1021.
- [3] 李志英,刘保国,李显平. 仙灵骨松胶囊防治糖皮质激素诱发骨质疏松症的临床观察[J]. 中医杂志,2006,47(8):596.
- [4] Ohlsson C, Bengtsson B A, Isaksson O G, et al. Growth hormone and bone[J]. Endoer Rev, 1998, 19(1): 55.

[责任编辑 何伟]