

# 补肾方治疗去势雌鼠骨质疏松及其机制的研究

韦大文<sup>\*</sup>, 尚立芝, 李沛, 王建人  
(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 研究补肾方对去势后雌鼠骨质疏松的治疗及其机制。方法: 80 只雌性 SD 大鼠分为 5 组: 正常对照组、假手术组、骨质疏松模型组、雌激素组、补肾方高、低剂量组。手术 12 周后开始给药, 连续给药 12 周, 放射免疫法检测血清雌激素( $E_2$ )、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和胰岛素样生长因子-1(IGF-1)含量, 观察股骨组织的病理变化。结果: 模型组  $E_2$ , IGF-1 含量下降; 补肾方低剂量组和雌激素组  $E_2$ , IGF-1 含量显著增加, IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量显著下降。补肾方低剂量组与雌激素组比较差异无显著性。结论: 补肾中药有明显抗去势大鼠骨质疏松的作用, 其机制可能与增加  $E_2$  和 IGF-1、降低 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平有关, 为临床应用补肾中药治疗绝经后骨质疏松提供依据。

[关键词] 补肾方; 骨质疏松; 雌激素; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 胰岛素样生长因子-1

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0125-03

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是以骨量减少、骨组织微结构退化为特征, 致使骨的脆性增加以及易发生骨折的一种全身骨骼疾病<sup>[1]</sup>, 研究表明细胞因子在骨代谢中起着重要作用。中医理论认为 OP 的发病与“肾虚”有关<sup>[2]</sup>。临床实践亦证实, 运用补肾中药防治骨质疏松疗效显著, 但其机制尚有待深入研究。本试验拟观察补肾方对去势雌性大鼠骨质疏松的治疗作用及探讨其机制, 为补肾方防治骨质疏松提供依据。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

**1.1.1 动物与分组** 选用 6 月龄雌性健康 SD 大鼠 80 只, 清洁级, 体重(300 ± 20) g, 由郑州大学医学院实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXK(豫)2009-0001。大鼠随机分为正常组、假手术组和手术组, 分别为 20, 10, 50 只。去势术后 12 周, 从正常和手术组两组中各随机抽取 10 只大鼠, 行骨密度检测。确定造模成功后, 再将手术组余下的 40 只大鼠随机分为 4 组, 模型组、雌激素组、补肾方高、低剂量组, 每组 10 只。

**1.1.2 药物** 补肾方由淫羊藿、补骨脂、骨碎补、菟

丝子、墨旱莲、女贞子、牛膝等药物(各 10 g)组成, 由深圳市三九现代中药有限公司制备成颗粒冲剂, 配制成含生药 2 g·mL<sup>-1</sup> 药液, 精滤灭菌, 封闭备用。

**1.1.3 试剂** 血清雌激素( $E_2$ )、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)试剂盒均购自北方生物制品研究所。

**1.1.4 仪器** Lunar 双能 X 线骨密度仪, 美国 GE 公司; FA2004A 型电子天平, 上海精天电子仪器公司; SN-695 型智能放射免疫测量仪, 上海光辐射仪器有限公司; PRS-3 电子干燥箱, 湖北应山国营电子元件厂。722 分光光度计, 上海第三分析仪器厂; U-CMAD3 型 OLYMPUS 显微镜, 日本 OLYMPUS 公司。

### 1.2 去势雌鼠模型制备及给药方法

**1.2.1 模型制备** 参考文献方法<sup>[3]</sup>制备模型。手术前禁食 6 h, 3% 戊巴比妥钠 1 mL·kg<sup>-1</sup>, ip 麻醉后, 俯位固定, 背侧脊柱旁开 1 cm 处无菌操作切开皮肤, 分离皮下和肌肉组织, 找到并摘除双侧卵巢, 向腹腔内滴入青霉素注射液(10 万 U·mL<sup>-1</sup>) 数滴, 逐层缝合。术后分笼饲养, 自行摄食饮水。每只 im 青霉素 5 万 U·d<sup>-1</sup>, 共 3 d。假手术组于同样条件下, 在卵巢附近仅取出 1 块与卵巢大小相当的脂肪组织, 其余步骤同上。

**1.2.2 给药方法** 术后 12 周, 分别从正常组和手术组中随机各选取 10 只大鼠, 进行骨密度测定。确定骨质疏松模型成功后, 再开始对各组进行连续 12 周 ig 处理。正常组、假手术组、模型组均给予蒸馏

[收稿日期] 2009-08-13

[基金项目] 河南省科技厅自然科学基金项目(082300450290); 河南省教育厅自然科学基金项目(2008B360003)

[通讯作者] \* 韦大文, Tel: 0371-65962973, E-mail: wdw5962977@yahoo.com.cn

水 10 mL·kg<sup>-1</sup>, ig, 1 次/d; 补肾方高、低剂量组分别予补肾方 9.6, 4.8 g·kg<sup>-1</sup> (相当于临床剂量的 10 倍) ig 1 次/d; 雌激素组给予尼尔雌醇混悬液 0.9 mg·kg<sup>-1</sup>, ig, 1 次/周, 连续 12 周。

### 1.3 观察指标和测定方法

**1.3.1 血样品收集及血清指标测定** 所有动物处死前 8 h 禁食, 不禁水。摘单侧眼球取血, 离心分离血清, 取上清液置于 -20℃ 冰箱保存待测。放射免疫法检测 E<sub>2</sub>, IL-6, TNF- $\alpha$ , IGF-1 的含量, 按试剂盒说明书操作进行。

**1.3.2 大鼠股骨病理组织学观察** 处死大鼠后, 剥

离左侧股骨, 将附着的肌肉和筋膜剔除干净, 10% 福尔马林固定, 硝酸法脱钙, 石蜡包埋, 切片取关节软骨下松质骨区域, 片厚 5~7  $\mu$ m, HE 染色。

**1.4 统计学处理** 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验和方差分析。应用 SPSS11.5 软件进行统计分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 补肾方对血清 E<sub>2</sub>, IL-6, TNF- $\alpha$ , IGF-1 的影响**

除补肾方高剂量组的大鼠治疗成活率过低, 测定结果(原因有待分析)研究没有统计学意义, 其余各治疗组均具有统计学意义(表 1)。

表 1 补肾方对大鼠血清 E<sub>2</sub>, IL-6, TNF- $\alpha$ , IGF-1 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n=10)

ng·mL<sup>-1</sup>

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	E <sub>2</sub>	IL-6	TNF- $\alpha$	IGF-1
正常	-	0.25 ± 0.41	0.25 ± 0.55	255.13 ± 32.01	16.79 ± 8.96
假手术	-	0.24 ± 0.91 <sup>2)</sup>	0.31 ± 0.85 <sup>1)</sup>	275.73 ± 58.01 <sup>1)</sup>	18.90 ± 6.53 <sup>2)</sup>
模型	-	0.12 ± 0.85	0.53 ± 0.25	509.83 ± 71.42	12.52 ± 4.75
尼尔雌醇	9 × 10 <sup>-4</sup>	0.27 ± 0.72 <sup>2)</sup>	0.23 ± 0.07 <sup>2)</sup>	362.98 ± 87.92 <sup>1)</sup>	12.49 ± 5.35
补肾方	4.8	0.26 ± 0.35 <sup>2)</sup>	0.26 ± 0.18 <sup>2)</sup>	372.49 ± 62.13 <sup>1)</sup>	15.39 ± 8.59 <sup>1)</sup>

注: 与模型组比较<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01。

试验结果显示: 模型组与假手术组比较, 血清 E<sub>2</sub> 显著降低 (P < 0.01), IL-6, TNF- $\alpha$  显著升高 (P < 0.05), IGF-1 显著减少 (P < 0.01)。治疗 12 周后, 雌激素组与模型组比较, 血清 E<sub>2</sub> 显著升高 (P < 0.01), IL-6, TNF- $\alpha$  显著减少 (P < 0.01, P < 0.05)。补肾方组与模型组比较, 血清 E<sub>2</sub> 显著升高 (P < 0.01), IL-6, TNF- $\alpha$  显著减少 (P < 0.01, P < 0.05), IGF-1 显著增加 (P < 0.05)。两治疗组间无差异。应用非参数 Spearman 等级相关分析显示, 补肾方组 E<sub>2</sub> 与 IGF-1 呈正相关 (r = 0.38, P < 0.05); E<sub>2</sub> 与 IL-6 呈负相关 (r = -0.33, P < 0.05); E<sub>2</sub> 与 TNF- $\alpha$  呈负相关 (r = -0.55, P < 0.01)。

### 2.2 去势雌鼠股骨病理组织学改变

正常组与假手术组: 骨松质结构清楚, 骨小梁粗大饱满, 结构均匀, 整齐排列并连接成网, 形态结构完整; 骨髓腔相对较小, 腔内造血细胞数量较多, 有少量脂肪细胞, 无融合现象; 骨皮质致密, 边缘整齐。模型组: 骨小梁数目明显减少, 形态结构不完整, 变细、扭曲、稀疏、断裂、可见游离末端, 排列紊乱, 大部分不能连接成网状; 骨小梁间隙增大, 骨髓腔明显增宽, 腔内造血细胞数量减少, 脂肪空泡多, 有的融合呈泡状, 呈典型的骨质疏松改变。雌激素组: 骨小梁稍细, 稀疏, 数量增加, 排列尚整齐并连接成网, 部分

区域骨小梁间隙略增大, 骨髓腔内造血细胞数量较多。补肾方组: 骨皮质可见骨小梁较细, 稍稀疏, 有断裂, 排列尚整齐并连接成网。部分区域骨小梁间隙略增大, 骨髓腔内造血细胞数量较多, 见图 1。

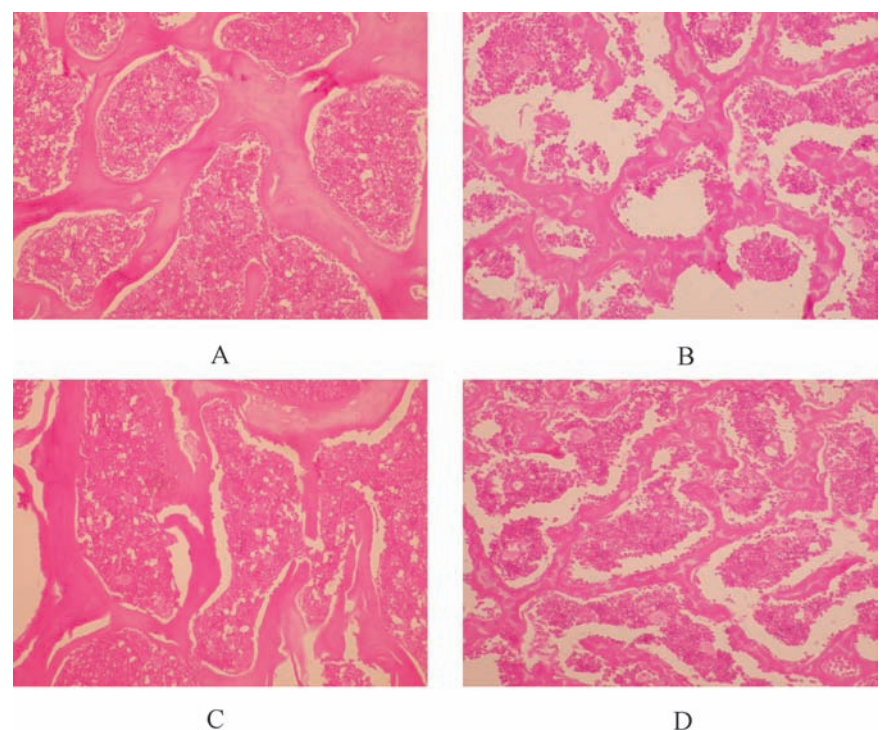


图 1 大鼠股骨病理切片 (HE, 10 × 10)

A. 假手术组; B. 模型组; C. 尼尔雌醇 0.9 mg·kg<sup>-1</sup> 组;  
D. 补肾方 4.8 g·kg<sup>-1</sup> 组

## 3 讨论

绝经后妇女骨质疏松的病因除老龄化引起骨量减少外, 主要是由于体内雌激素水平下降, 其形成

除与全身性调节激素有关外,还与细胞因子的影响密切相关。雌激素在骨代谢平衡中起着重要的调节作用,可直接抑制成骨细胞分泌 TNF- $\alpha$  和 IL-6。由于去势雌鼠分泌血清 E<sub>2</sub> 功能丧失,体内血清 E<sub>2</sub> 水平下降,解除或降低了 E<sub>2</sub> 对 IL-6, TNF- $\alpha$  的抑制作用,从而使 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平增加,本试验结果与文献报道结果一致<sup>[4]</sup>。经治疗后,与模型组比较,雌激素组、补肾方组血清 E<sub>2</sub> 均显著升高 ( $P < 0.01$ ), TNF- $\alpha$  和 IL-6 均显著减少 ( $P < 0.05$ )。相关性分析结果显示,补肾方组 E<sub>2</sub> 与 TNF- $\alpha$ , E<sub>2</sub> 与 IL-6 均呈负相关,提示补肾中药对去势雌鼠骨吸收有明显的拮抗作用,其机制可能与补肾中药升高血清 E<sub>2</sub>、减少 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达有关。

胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 是骨重建的重要调节因子<sup>[5]</sup>。本试验结果显示,去势雌鼠血清 IGF-1 显著减少 ( $P < 0.01$ ), 绝经后 E<sub>2</sub> 水平降低,加速骨吸收和骨转换,引起 IGF-1 亦下降。治疗后,补肾方组血清 IGF-1 显著增加,说明补肾方可上调去势大鼠血清 IGF-1 的水平。但雌激素组与模型组比较,血清 IGF-1 无显著性差异,与文献报道相近<sup>[6]</sup>,推测可能雌激素替代治疗使骨吸收与骨形成达到新的平衡。相关性分析显示,补肾中药组 E<sub>2</sub> 与 IGF-1 呈正相关, E<sub>2</sub> 可能影响 IGF-1 的合成和分泌。补肾方可能具有类雌激素样作用,通过一定程度上调 E<sub>2</sub> 水平,影响 IGF-1 的含量,从而发挥治疗绝经后骨质疏松症的作用。

去势雌鼠股骨形态学改变结果显示:补肾方治疗后,骨皮质可见骨小梁较细,排列较为一致。提示补肾方可改善大鼠骨质疏松骨组织结构。

中医认为肾虚是骨质疏松的主要病机,补肾中

药治疗骨质疏松机制的研究是目前的热点。补肾方由淫羊藿、补骨脂、骨碎补、菟丝子、墨旱莲、女贞子、牛膝等药物组成,该方能显著改善去势雌鼠骨组织结构,发挥其抗骨质疏松的作用。说明补肾中药具有雌激素样作用,该方与雌激素疗效接近,且无雌激素样副作用。其机制可能与补肾中药所含植物雌激素与骨细胞雌激素受体结合,下调 TNF- $\alpha$  和 IL-6,上调 IGF-1,抑制骨的破坏吸收,同时促进骨的形成,恢复其原有的动态平衡有关,其详细机制有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 杨如会,沈祥春,任光友,等. 骨质疏松症治疗药物研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2008,13(6):436.
- [2] 赵蓉,陈大蓉. 更年期妇女中医辨证分型与雌二醇、卵泡刺激素及黄体生成激素相关性研究[J]. 中华中医药杂志,2008,23(2):171.
- [3] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2006:1539.
- [4] Waki Y, Nomura M, Kasugai, et al. Walker 256/ S carcinosarcoma causes osteoporosis-like changes through ectopical secretion of luteinizing hormone-releasing hormone[J]. Cancer Res, 1999, 59(6):12191.
- [5] Agnusdei D, Gentilella R. GH and IGF-1 as therapeutic agents for osteoporosis[J]. J Endocrinol Invest, 2005, 28(8):32.
- [6] 黄遂柱,上官峰,赵永强. 补充雌激素对卵巢切除大鼠血清皮质醇和 IGF-1 的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2004,10(4):443.

[责任编辑 何伟]