

舒肝凉血方与阿那曲唑联用对去卵巢大鼠骨代谢的影响

刘素香, 任 艳, 庄桂宝, 李萍萍*

(北京大学临床肿瘤学院 北京肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所中西医结合科, 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室, 北京 100142)

[摘要] 目的: 观察中药舒肝凉血方与芳香化酶抑制剂阿那曲唑联合使用对去卵巢 SD 大鼠血清雌二醇和骨代谢生化指标的影响。方法: 采用去势法建立大鼠绝经后动物模型, 随机将大鼠分为 6 组, 即模型组、舒肝凉血方组(简称中药组)、阿那曲唑组、舒肝凉血方和阿那曲唑联合组(简称联合组)、阿仑磷酸钠组和假手术组。灌胃给药 16 周, 双能 X 线骨密度仪测定大鼠腰椎和股骨的骨密度, 放射免疫法检测血清雌二醇(E_2)、骨钙素(BGP)和前列腺素 E_2 (PGE_2)的水平, ELISA 法检测血清骨源性碱性磷酸酶(BAP)、I 型前胶原羧基端前肽(PICP)、吡啶诺林(PYD)、抗酒石酸盐酸性磷酸酶(TRAP)和 I 型胶原交联羧基末端肽(ICTP)的水平。结果: 中药组、阿那曲唑组和联合组的血清 E_2 水平均明显低于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 骨密度与模型组没有明显差异。与阿那曲唑组相比, 联合组能明显提高血清 BGP 的水平($P < 0.05$), 显著降低 PYD 的水平($P < 0.05$)和 PGE_2 的水平($P < 0.01$)。中药组和阿仑磷酸钠组均能明显降低 PYD 的水平, 与模型组相比有显著差异($P < 0.001$, $P < 0.001$)。结论: 实验提示舒肝凉血方联合阿那曲唑在降低血清雌二醇的同时, 对阿那曲唑导致的骨骼副作用有一定缓解作用。

[关键词] 舒肝凉血方; 阿那曲唑; 骨密度; 骨代谢

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)12-0057-05

Effects of Shugan-liangxue Prescription Combined with Anastrozole on Bone Metabolism of Ovariectomized Rats

LIU Su-xiang, REN Yan, ZHUANG Gui-bao, LI Ping-ping*

(Key laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Department of integration of Traditional Chinese Medicine with Western Medicine, Peking University School of Oncology, Beijing Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Shugan-liangxue prescription (SGLX) from traditional Chinese medicine combined with anastrozole (ANA) on the serum estradiol (E_2) level and bone metabolism in ovariectomized (OVX) Sprague-Dawley (SD) rats. **Methods:** The postmenopausal animal model was established after OVX and testified by vaginal smear method. Six-month SD rats were randomly divided into model, SGLX, ANA, ANA+ SGLX, alendronate sodium (AL) and sham groups. After 16 weeks intragastric administration, the bone mineral density (BMD) of lumbar vertebra and femur were measured by dual energy X-ray absorptiometry. The serum E_2 , bone gla protein (BGP) and prostaglandin E_2 (PGE_2) were detected by radioimmunoassay and bone alkaline phosphatase (BAP), carboxyterminal propeptide of type I procollagen (PICP), pyridinoline (PYD), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and cross-linked

[收稿日期] 2009-03-12

[基金项目] 北京市中医局科技项目(2004京中重IV15)

[通讯作者] * 李萍萍, Tel: (010) 88196273; E-mail: lppma123@yahoo.com.cn

carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) were determined by ELISA. **Results:** Serum E₂ level decreased in SGLX, ANA and ANA+ SGLX groups compared with the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), BMD had no significant difference compared with the model. In ANA+ SGLX group, serum BGP level increased, PYD and PGE₂ declined significantly compared with ANA group ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$). PYD decreased greatly in SGLX and AL groups compared with the model ($P < 0.001$, $P < 0.001$). **Conclusions:** This study showed that SGLX combined with ANA decreased the serum E₂ level, meanwhile had the effect to relieve the side reaction of bone induced by ANA.

[**Key words**] Shugar-liangxue prescription; anastrozole; bone mineral density; bone metabolism

芳香化酶抑制剂是临床用于绝经后乳腺癌疗效显著的内分泌治疗药物,主要通过抑制雌激素合成的关键酶芳香化酶,阻止睾酮、雄烯二酮向雌酮、雌二醇转化,降低外周循环血和乳腺癌组织中的雌激素水平,达到抑制乳腺癌生长的目的。第三代芳香化酶抑制剂(阿那曲唑、来曲唑和依西美坦)选择作用强,临床疗效的优势已得到证实,但是临床观察发现长期用药骨骼系统的副作用如骨质疏松、骨关节疼痛、关节炎等发生率较高^[1]。舒肝凉血方是北京肿瘤医院中西医结合科的协定处方,临床随机双盲试验证实对改善乳腺癌内分泌疗法引起的潮热有一定疗效^[2]。本实验应用大鼠去势造成绝经后动物模型,观察中药与阿那曲唑联合使用对血清雌二醇和骨代谢指标的影响,为临床用药提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物 6月龄雌性SD大鼠48只,体重(347.7±24.7)g,由北京维通利华实验动物公司提供,批号SCXK(京)2007-0001,饲养于北京肿瘤防治研究所动物实验室,动物级别:清洁级。

1.2 药物 舒肝凉血方(柴胡、郁金、紫草、牡丹皮、白芍、五味子等7味药共100g)购自北京白塔寺药店。加适量双蒸水浸泡2h,武火加热煮沸,之后文火煎煮30min,过滤,再用双蒸水重复煎煮一次,过滤,将2次煎煮的滤液混合后按所需浓度进行浓缩,置4℃冰箱保存备用。阿那曲唑由美国阿斯利康生物制药公司生产,阿仑磷酸钠由意大利默沙东制药有限公司生产,分别用双蒸水溶解为所需浓度,置4℃冰箱保存备用。

1.3 试剂 雌二醇(E₂)、骨钙素(BGP)和前列腺素E₂(PGE₂)的放免试剂盒,由北京华英生物技术研究所生产;骨源性碱性磷酸酶(BAP)、I型前胶原羧基端前肽(PICP)、吡啶诺林(PYD)、抗酒石酸盐酸性磷酸酶(TRAP)和I型胶原交联羧基末端肽(ICTP)的ELISA试剂盒,由美国Adlitteram Diagnostic

Laboratories 公司生产。

1.4 仪器 双能X线骨密度仪,由美国LUNAR公司生产,小动物全身骨密度测定软件由Lunar Prodigy提供,精确度为0.08%;r-911全自动放免计数仪,由中国科技大学实业总公司生产;STAT FAX 2100全自动酶标仪,由美国Awareness Technology公司生产;MA260S型电子分析天平,由上海第二天平仪器厂生产。

2 方法

2.1 绝经后动物模型的建立 去势大鼠ip10%水合氯醛(0.3 mL·100 g⁻¹)麻醉后,在无菌的条件下,开腹完整切除卵巢(双侧),彻底止血,逐层缝合切口并消毒。假手术组手术操作同上,仅摘除卵巢周围少许脂肪组织,不切除卵巢。切除的卵巢组织均经病理证实。术后1周各组大鼠进行阴道涂片,连续5d,涂片进行巴氏染色,观察去势组不再出现动情周期,表明已造成绝经后动物模型^[3],开始给药。

2.2 分组给药 去势大鼠按照体重随机分为模型组、中药组、阿那曲唑组、联合组、阿仑磷酸钠组5组,加上假手术组共6组,每组8只,给药剂量按人临床用量的6.2倍计算^[4]。模型组和假手术组给予蒸馏水,实验组按照中药组12.4 g生药·kg⁻¹,阿那曲唑组0.1 mg·kg⁻¹,联合组中药12.4g生药·kg⁻¹+阿那曲唑0.1 mg·kg⁻¹,阿仑磷酸钠组8.68 mg·kg⁻¹的剂量,每只大鼠每次ig 2 mL,除了阿仑磷酸钠组每周1次其余各组每天1次,每周6次,连续给药16周。每2周称重,按照体重调整给药浓度。

2.3 观察指标及检测方法

2.3.1 骨密度测定 实验结束后,对各组大鼠进行活体骨密度(BMD)测定。ip10%水合氯醛(0.3 mL·100 g⁻¹)麻醉后,将大鼠置于双能X线骨密度仪的扫描定位板上,采用小动物全身BMD测定软件进行全身BMD扫描,然后划区测算腰椎(L1-6)和左侧股骨、右侧股骨的BMD。动物处死后,完整取出腰椎

(L1-6) 和左侧股骨、右侧股骨, 仔细剥离软组织, 分别用生理盐水纱布包裹, 即刻保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 并尽快进行 BMD 测定。测定前取出上述标本, 室温下复温, 用双能 X 线骨密度仪测量离体骨 BMD。

2.3.2 血生化指标的测定 处死动物前 24 h 禁食, 内眦静脉取血, $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后分离血清保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中待检测。E₂, BGP 和 PGE₂ 用放射免疫法, BAP, PICP, PYD, TRAP 和 ICTP 用酶免法测定, 均按放免试剂盒与 ELISA 试剂盒说明书进行。

2.3.3 子宫湿重 动物取血后, 剖取子宫, 仔细剥离粘附的脂肪组织后称重。计算子宫重量指数(%) = 子宫湿重(g)/处死前体重(g) × 100%。

2.4 统计学分析 所有数据用 SPSS13.0 统计软件在 WindowsXP 环境下进行统计分析, 用单因素方差分析各组间差异, 结果以($\bar{x} \pm s$) 表示。

3 结果

3.1 各组大鼠的阴道涂片 假手术组: 出现动情周期的细胞变化规律^[5] (见图 1)。①动情前期阴道涂片的特点: 可见大量椭圆形或圆形的有核上皮细胞、少量不规则形的角化上皮细胞(图 1a); ②动情期的特点: 可见满视野为外形不规则的角化上皮细胞, 堆积或连接成片, 间有少量有核上皮细胞(图 1b); ③动情后期的特点: 不规则角化上皮细胞、有核上皮细胞和白细胞均可见, 且比例相当(图 1c); ④动情间期的特点: 大量白细胞及少量有核上皮细胞(图 1d)。去势组: 阴道涂片未出现动情周期的变化特点, 类似动情间期, 表明大鼠去势已成功造成绝经后动物模型。

3.2 各组大鼠血清雌二醇、子宫湿重和子宫重量指数的变化 模型组的血清 E₂、子宫湿重和子宫重量指数均明显低于假手术组($P < 0.05$); 中药组、阿那曲唑组和联合组与模型组相比 E₂ 水平明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 子宫湿重和子宫重量指数也明显低于模型组, 联合组的子宫重量指数与模型组差异不显著。两指标间进行相关分析, E₂ 与子宫湿重、E₂ 与子宫重量指数的变化均一致, 呈正相关(相关系数分别为 $r = 0.712$ 和 $r = 0.651$, $P < 0.01$), 说明子宫湿重和子宫重量指数均能间接反映雌二醇变化的水平。见表 1。

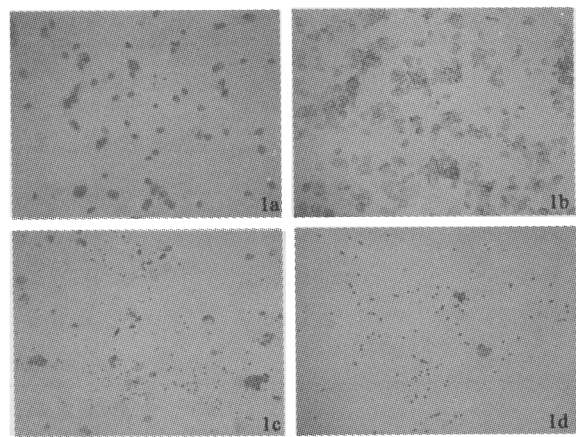


图 1 SD 大鼠动情周期中各阶段的阴道涂片观察
1a 动情前期; 1b 动情期; 1c 动情后期; 1d 动情间期

表 1 各组大鼠雌二醇、子宫湿重和子宫重量指数的比较($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量 ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	E ₂ ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	子宫湿重 (g)	子宫重量指数 (%)
模型组	—	19.76 ± 5.25	0.23 ± 0.03	0.051 ± 0.008
中药组	12.4	12.72 ± 6.30 ¹⁾	0.19 ± 0.04 ¹⁾	0.043 ± 0.008 ¹⁾
阿那曲唑组	1×10^{-4}	10.41 ± 6.07 ²⁾	0.17 ± 0.04 ¹⁾	0.040 ± 0.009 ¹⁾
联合组	$12.4 + 1 \times 10^{-4}$	8.55 ± 3.55 ³⁾	0.19 ± 0.04 ¹⁾	0.048 ± 0.013
阿仑磷酸钠组	8.63×10^{-3}	17.39 ± 1.45	0.25 ± 0.05	0.055 ± 0.011
假手术组	—	26.26 ± 5.87 ¹⁾	0.69 ± 0.13 ¹⁾	0.177 ± 0.034 ¹⁾

注: 与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ (下同)

3.3 各组大鼠骨密度的比较 活体骨密度: 实验结束后, 模型组腰椎与双股骨(左侧股骨和右侧股骨 BMD 的平均值)的 BMD 比假手术组降低明显($P < 0.05$), 与模型组相比, 中药组、阿那曲唑组、联合组腰椎与双股骨的 BMD 没有明显变化($P > 0.05$), 阿仑磷酸钠组能明显增加双股骨的 BMD($P < 0.05$)。离体骨密度: 结果与活体基本一致。各组大鼠处死前测量的活体 BMD 与其相应部位离体 BMD 呈正相关(腰椎 $r = 0.761$, 双股骨 $r = 0.829$, $P < 0.01$)。见表 2。

3.4 对大鼠血清骨代谢指标的影响 联合组的骨钙素(BGP)比模型组和阿那曲唑组增高明显($P < 0.05$), 其他组与模型组差异不明显。模型组的吡啶诺林(PYD)比假手术组增加明显($P < 0.05$); 中药组和阿仑磷酸钠组的 PYD 含量比模型组下降十分显著($P < 0.001$), 且两组之间没有差异; 阿那曲唑组和联合组的 PYD 含量比模型组明显增高($P < 0.001$, $P < 0.01$), 但联合组比阿那曲唑组的 PYD 有所下降($P < 0.05$)。骨源性碱性磷酸酶(BAP)、I 型

表 2 各组大鼠腰椎和股骨的骨密度($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	活体骨密度($g \cdot cm^{-2}$)		离体骨密度($g \cdot cm^{-2}$)	
		腰椎(L1-6)	双股骨	腰椎(L1-6)	双股骨
模型组	—	0.219 ± 0.018	0.247 ± 0.023	0.182 ± 0.013	0.169 ± 0.007
中药组	12.4	0.219 ± 0.019	0.244 ± 0.009	0.184 ± 0.012	0.166 ± 0.008
阿那曲唑组	1×10^{-4}	0.218 ± 0.024	0.247 ± 0.013	0.187 ± 0.011	0.168 ± 0.004
联合组	12.4+ 1×10^{-4}	0.194 ± 0.026	0.241 ± 0.021	0.185 ± 0.013	0.169 ± 0.010
阿仑磷酸钠组	8.68×10^{-3}	0.214 ± 0.025	0.270 ± 0.021 ¹⁾	0.196 ± 0.017	0.177 ± 0.007 ¹⁾
假手术组	—	0.250 ± 0.020 ¹⁾	0.274 ± 0.011 ¹⁾	0.202 ± 0.011 ¹⁾	0.179 ± 0.004 ¹⁾

表 3 各组大鼠血清骨代谢指标含量的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量($g \cdot kg^{-1}$)	BGP($\mu g \cdot L^{-1}$)	BAP($U \cdot L^{-1}$)	PICP($ng \cdot mL^{-1}$)	PYD($nmol \cdot L^{-1}$)	TRAP($IU \cdot L^{-1}$)	ICTP($ng \cdot mL^{-1}$)
模型组	—	4.26 ± 0.58	46.589 ± 8.201	8.7131 ± 1.322	31.984 ± 9.633	6.010 ± 0.819	13.699 ± 1.498
中药组	12.4	4.03 ± 0.66	59.426 ± 6.128	10.596 ± 2.825	13.409 ± 1.204 ³⁾	6.300 ± 1.741	15.818 ± 4.086
阿那曲唑组	1×10^{-4}	3.98 ± 0.48	51.160 ± 5.609	10.780 ± 3.036	72.098 ± 9.265 ³⁾	6.396 ± 1.812	18.430 ± 4.188
联合组	12.4+ 1×10^{-4}	4.91 ± 0.34 ^{1,4)}	58.340 ± 8.885	10.521 ± 2.797	45.299 ± 8.577 ^{2,4)}	6.258 ± 2.004	16.096 ± 5.803
阿仑磷酸钠组	8.68×10^{-3}	4.07 ± 0.55	46.754 ± 7.802	11.350 ± 2.543	15.762 ± 4.099 ³⁾	5.481 ± 0.142	15.429 ± 3.762
假手术组	—	4.15 ± 0.80	49.464 ± 14.152	10.047 ± 2.957	22.687 ± 3.800 ¹⁾	6.504 ± 1.040	15.890 ± 3.921

注:联合组与阿那曲唑组相比较,⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$ (下同)

前胶原羧基端前肽(PICP)、抗酒石酸盐酸性磷酸酶(TRAP)和I型胶原交联羧基末端肽(ICTP)组间差异没有统计学意义($P > 0.05$)。见表3。

3.5 对大鼠血清 PGE₂ 的影响 模型组的 PGE₂ 比假手术组增加明显($P < 0.01$),阿那曲唑组比模型组增加明显($P < 0.01$),联合组与阿那曲唑组相比能显著降低 PGE₂ 的水平($P < 0.01$)。见表4。

表 4 各组大鼠前列腺素 E₂ 含量的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量($g \cdot kg^{-1}$)	PGE ₂ ($ng \cdot L^{-1}$)
模型组	—	211.368 ± 14.269
中药组	12.4	209.210 ± 13.293
阿那曲唑组	1×10^{-4}	237.717 ± 18.686 ²⁾
联合组	12.4+ 1×10^{-4}	212.961 ± 20.325 ⁵⁾
阿仑磷酸钠组	8.68×10^{-3}	213.002 ± 16.023
假手术组	—	185.330 ± 16.843 ²⁾

4 讨论

去势法是建立绝经后动物模型的经典方法,且被FDA推荐为绝经后骨质疏松症及相关研究的动物实验造模方法⁶⁾。本实验采用去势手术和连续阴道涂片法初步证实造模成功,模型组腰椎和股骨的骨密度、血清雌二醇的水平 and 子宫重量指数比假手术组明显下降,均证明了本实验的造模是成功的。

中药在缓解肿瘤化疗毒副作用方面具有独特

的疗效,然而,对于乳腺癌的辅助治疗专家建议尽量不要应用具有雌激素活性的药物⁷⁾,否则可能会增加乳腺癌发展的风险。本实验发现阿那曲唑与舒肝凉血方联用能降低绝经后大鼠的雌二醇水平,且作用强于单用阿那曲唑,提示舒肝凉血方联合阿那曲唑有协同降低雌激素的作用。

观察芳香化酶抑制剂对骨密度和骨代谢影响的实验是乳腺癌研究的热点。本实验去势造模、给药16周后发现阿那曲唑组的腰椎和股骨的BMD与模型组比没有明显下降,可能与动物实验时间短有一定关系。国外多采用给药16周的方法,本实验结果与国外报道的结果基本一致⁸⁻¹⁰⁾。将阿那曲唑与舒肝凉血方联合使用,虽然观察到了血清E₂水平的显著降低,但并未发现BMD的明显下降。联合检测血液中骨形成和骨吸收的生化指标,能够敏感地反映成骨细胞、破骨细胞的功能和骨转换率,其中BGP, BAP, PICP和PYD, TRAP, ICTP是分别反映成骨和破骨的特异指标。本实验中舒肝凉血方联合阿那曲唑,明显增加了BGP的水平,并减少了阿那曲唑导致的PYD的升高。BGP主要由成骨细胞产生和分泌,其生理功能是维持骨的正常矿化速度,可直接反映骨形成的状况。PYD是胶原分子内和分子间的交联分子,随着胶原的成熟而合成、胶原的分解而释放,是I型胶原分解的标志物。本实验同时观察到

单用中药能明显降低 PYD, 与阿仑磷酸钠有类似作用。阿仑磷酸钠是最早经临床证明治疗骨质疏松症有效的双磷酸盐之一, 双磷酸盐是破骨细胞的有效抑制剂。这提示疏肝凉血方通过降低血清 PYD 的水平, 可能具有一定的抑制骨吸收作用。

雌激素水平的下降、前列腺素尤其是 PGE₂ 和缓激肽等炎性介质的增加在芳香化酶抑制剂导致的关节炎、关节痛发病过程中起重要作用^[11], 并且 PGE₂ 可以通过增加活化的破骨细胞导致血钙上升, 具有促进骨吸收的作用^[12]。本实验中阿那曲唑组 PGE₂ 水平增加明显, 联合组相对阿那曲唑组 PGE₂ 显著降低, 提示舒肝凉血方联合阿那曲唑通过降低 PGE₂ 的水平可能起到改善关节炎、肌肉骨关节疼痛的症状和抑制骨吸收的作用。

乳腺癌具有独特的生物学特点, 本实验提示了舒肝凉血方联合阿那曲唑在降低雌二醇的同时可缓解阿那曲唑的骨骼副作用, 为临床用药提供了依据, 两药联合在乳腺癌的治疗中具有广阔的应用前景。

[参考文献]

[1] Edith A. Perez. Safety of aromatase inhibitors in the adjuvant setting [J]. Breast Cancer Res Treat, 2007, 105: 75-89.

[2] P. P. Li. The assessment of randomized double blind clinical trial of Shugan liangxue prescription used for the treatment of hot flashes in breast cancer patients [J]. Journal of Clinical Oncology, 2006, 24(18S): 8584.

[3] 孙艳红. 女性更年期综合征动物模型制备的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(7): 657-659.

[4] Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for industry: estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult trials for therapeutics in adult healthy volunteers [J]. Pharmacology and toxicology. July 2005.

[5] 邹移海, 徐志伟, 苏钢强. 实验动物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 84.

[6] D. D. Thompson, H. A. Simmons, C. M. Pirie, et al. FDA guidelines and animal models for osteoporosis [J]. Bone, 1995, 17(4S): 123-133.

[7] Velentzis L S, Woodside Jayne V, Cantwell M M, et al. Do phytoestrogens reduce the risk of breast cancer and breast cancer recurrence? What clinicians need to know [J]. European Journal of Cancer. 2008. 44: 1799-1806.

[8] Kumru S, Yildiz AA, Yilmaz B, et al. Effects of aromatase inhibitors letrozole and anastrozole on bone metabolism and steroid hormone levels in intact female rats [J]. Gynecol Endocrinol, 2007, 23(10): 556-561.

[9] Goss PE, Qi S, Josse RG, et al. The steroidal aromatase inhibitor exemestane prevents bone loss in ovariectomized rats [J]. Bone, 2004, 34(3): 384-392.

[10] Goss PE, Qi S, Cheung AM, et al. Effects of the steroidal aromatase inhibitor exemestane and the nonsteroidal aromatase inhibitor letrozole on bone and lipid metabolism in ovariectomized rats [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(17): 5717-5723.

[11] C. Thorne. Management of arthralgias associated with aromatase inhibitor therapy [J]. Current oncology, 2007 (14S): 11-19.

[12] 刘忠厚. 骨质疏松学 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 129.