

实验研究

淫羊藿女贞子配伍对 GIOP 大鼠骨代谢生化指标的影响研究

刘仁慧¹ 康 学¹ 张伟华² 周 琦³ 王秀娟¹

(1 首都医科大学中医药学院, 北京, 100069; 2 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院中医科, 上海, 200437;

3 首都医科大学附属北京中医医院内科门诊, 北京, 100010)

摘要 目的:探讨淫羊藿、女贞子对糖皮质激素致骨质疏松(Glucocorticoid-induced Osteoporosis, GIOP)模型大鼠骨代谢生化指标的影响。方法:Sprague Dawley (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。每周两次肌肉注射地塞米松(1 mg/kg)建立骨质疏松模型。造模同时各给药组灌服相应药物,8 周后检测血清钙(Ca)、磷(P)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, StrACP)、骨钙素(Bone Gla-protein, BGP)及骨 Ca、P 含量。结果:模型对照组较正常对照组血清 AKP、StrACP 活性以及血 P 含量均显著升高,血清 BGP、血及骨 Ca 含量均显著下降;与模型对照组比较,各给药组均可显著下调血清 AKP、StrACP 水平,提高血清 BGP 含量;且可不同程度地纠正血及骨 Ca、P 代谢紊乱。结论:淫羊藿、女贞子配伍可明显改善骨代谢生化指标,有效纠正激素诱导骨质疏松模型大鼠骨代谢异常,从而发挥抗骨质疏松作用。

关键词 骨质疏松;糖皮质激素;淫羊藿;女贞子;骨代谢;生化指标

Study of Effects of Combination of Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi on Biochemical Indicators in Glucocorticoid-induced Osteoporosis Rats

Liu Renhui¹, Kang Xue¹, Zhang Weihua², Zhou Qi³, Wang Xiujuan¹

(1 School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2 Yueyang Hospital of Integrative Chinese and Western Medicine Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200437, China; 3 Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Shanghai University of TCM, Beijing 100010, China)

Abstract Objective: To explore the effects of combination of Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi on biochemical indicators in glucocorticoid-induced osteoporosis rats. **Methods:** A total of 60 SD rats were randomly divided into 6 groups: normal control group, model control group, Herba Epimedii group, Fructus Ligustri Lucidi group, Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi mixture group, and positive drug group. All rats received intramuscular injection of dexamethasone (1mg/kg, twice a week) for eight weeks to establish osteoporosis model (except those in the control group). Rats in treatment groups were treated with intragastric administration of traditional Chinese herbal decoction or positive drug respectively. Eight weeks later, serum biochemical indexes, including osteocalcin (BGP), calcium (Ca), phosphorus (P), alkaline phosphatase (AKP), tartrate-resistant acid phosphatase (StrACP), and the content of bone Ca and bone P were tested. **Results:** Serum AKP and StrACP activity and the concentration of serum P in model group were significantly higher than that of the normal control group, while the content of serum BGP, serum Ca and bone Ca were obviously lower. Compared with the model group, serum AKP and StrACP activity significantly decreased and serum BGP content increased significantly in each administration group, and serum and bone Ca and P metabolism disorders were corrected in varying degrees. **Conclusion:** Combination of Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi can significantly improve biochemical indicators and effectively correct abnormality of bone metabolism in glucocorticoid-induced osteoporosis rats, thus plays an important role in anti-osteoporosis.

Key Words Osteoporosis; Glucocorticoid; Herba Epimedii; Fructus Ligustri Lucidi; Bone metabolism; Biochemical indicator

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.12.023

糖皮质激素(glucocorticoid, GC)由于其重要而有 效的免疫抑制及抗炎效果而被广泛应用于临床多种疾

基金项目:北京中医药薪火传承“3+3”工程二室一站建设项目(编号:2012-SZ-C-42);首都中医药及护理学专项课题(编号:12ZYH07);北京市教育委员会科技计划面上项目(编号:KM201310025013)

通信作者:王秀娟(1957—),女,本科学历,教授,研究方向:中药及复方的药效学研究, Tel:010-83911624, E-mail:wxj0517@sina.com

病的治疗,但长期应用 GC 所诱发的骨质疏松症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]。从中医角度而言,GC 为外源性“纯阳”“邪热”之品,长期大量作用于人体后导致肾失封藏,肾之阴阳失衡,肾精亏虚无以充实骨骼,骨失濡养而形成骨质疏松^[2],治宜补肾填精壮骨之法。中药淫羊藿、女贞子配伍可平补阴阳、益精壮骨,故二者配伍较单味药应用更切合 GIOP 的中医发病机制。已有大量文献报道^[3]单味淫羊藿、女贞子及相关复方在防治骨质疏松方面取得显著效果,但尚未闻二者配伍防治 GIOP 的报道。课题组前期研究发现,淫羊藿、女贞子配伍后对哮喘大鼠应用糖皮质激素地塞米松治疗后导致的骨代谢异常起到明显的保护作用^[4]。本实验过观察淫羊藿女贞子对激素诱导骨质疏松模型大鼠骨代谢生化指标的影响,探讨二药配伍对骨代谢异常的改善作用,为防治 GIOP 的进一步研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 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,合格证号:SCXK(京)2007-0001。

1.1.2 试剂与药品 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(购于北京同仁堂药店);AKP、StrACP、Ca、P 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为:20110326、20110329、20110330、20110330);BGP 放免试剂盒(北京原子高科股份有限公司,批号:201112)。

1.1.3 仪器 XH6080 放免仪(西安核仪厂);721 分光光度计(日本岛津公司);紫外分光光度计(SHIMADZU,UV-1700);离心机(Heraeus Biofuge 15R)。

1.2 实验方法

1.2.1 分组 按随机数字表法分为 6 组: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(阳性对照组),每组 10 只,自由饮水、摄食。

1.2.2 造模及给药 参考文献^[5],除正常对照组外,其余各组大鼠分别给予两大腿内侧交替肌肉注射地塞米松 1 mg/kg 体重,2 次/周,共计 8 周,正常对照组大鼠给予等体积的生理盐水。在造模的同时,各组动物灌胃给予相应的药物或生理盐水,1 次/d,共计 8 周。1)淫羊藿组:淫羊藿水煎液 9.5 g/kg 体重灌胃;2)女贞子组:女贞子水煎液 9.5 g/kg 体重灌胃;3)淫羊藿女贞子组:淫羊藿女贞子(4:3)水煎液 9.5 g/kg 体重

灌胃;4)钙尔奇组:钙尔奇碳酸钙 D₃ 片 0.277 3 g/kg 体重灌胃,1 次/d;5)正常对照组、模型对照组:灌服与用药组等体积的生理盐水。

1.2.3 取材处理 大鼠腹腔麻醉,腹主动脉取血,离心取血清,用于血清生化指标的检测;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,用于骨 Ca、P 的测定。

1.2.4 观察指标及检测方法 1)大鼠一般情况观察:每周两次称重,观察大鼠体质量变化、精神状态、摄食饮水及活动情况、毛发光泽度、二便、存活率等。2)血清 AKP、StrACP、Ca、P 含量:按照试剂盒说明书,均采用比色法检测。3)血清 BGP 含量:按照试剂盒说明书,采用放免法检测。4)骨 Ca、P 含量:将剔净的大鼠股骨于 100℃烘箱干燥,取干燥的股骨段加入 10%三氯乙酸 5 mL,脱钙 24 h 后倾出脱钙液留存,再加入 10%三氯乙酸 5 mL 脱钙 24 h,合并两次脱钙液,按试剂盒说明书分别测定 Ca、P 含量。

1.2.5 统计学方法 数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)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),采用 SPSS 18.0 for Windows 软件包完成。

2 实验结果

2.1 大鼠一般情况 在激素造模过程中,模型对照组大鼠逐渐出现体质量增长缓慢,懒动少食,毛被稀疏无光泽,弓腰塌背,喜蜷缩聚堆,便软或有便溏等现象;各给药组情况较模型对照组均有所改善,以淫羊藿女贞子组改善作用最佳。实验前后大鼠体重结果显示:实验开始时各组体重均无差异;实验结束时,模型对照组大鼠体重较正常对照组显著下降($P < 0.01$),而各用药组体重均较模型对照组有所升高,以淫羊藿女贞子组升高最为显著,结果有统计学意义($P < 0.05$)。(表 1)

表 1 各组大鼠实验前后体质量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	体质量(g)	
		实验前	实验结束时
正常对照组	10	206.30 ± 4.08	425.40 ± 30.52
模型对照组	10	208.70 ± 6.00	298.10 ± 76.67**
女贞子组	10	207.70 ± 5.72	359.10 ± 15.55△△
淫羊藿组	10	206.30 ± 4.99	340.10 ± 33.35△△
淫羊藿女贞子组	10	207.20 ± 6.29	403.20 ± 6.61*
钙尔奇组	10	207.70 ± 5.93	339.50 ± 16.93△△

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,* $P < 0.05$;与淫羊藿女贞子组比较,△△ $P < 0.01$ 。

2.2 各组大鼠血清 AKP、StrACP、BGP 含量的比较
模型对照组血清 AKP、StrACP 活性较正常对照组显著升高,BGP 含量显著降低(均 $P < 0.01$)。与模型对照组比较,女贞子组、淫羊藿组、淫羊藿女贞子组及阳性药组均可明显下调血清 AKP、StrACP 水平($P < 0.05$ 或 0.01),且各给药组血清 BGP 含量显著升高(均 $P < 0.01$),其中以淫羊藿女贞子组作用最为显著。(表2)

表2 各组大鼠血清 AKP、TRAP、BGP 的比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	只数	AKP(金氏单位 /100 mL)	TRAP (U/L)	BGP (pg/mL)
正常对照组	10	26.00 $\pm$ 3.27	5.79 $\pm$ 2.28	6.84 $\pm$ 0.90
模型对照组	10	32.89 $\pm$ 6.32 **	10.51 $\pm$ 3.43 **	1.97 $\pm$ 0.64 **
女贞子组	10	25.88 $\pm$ 4.82 $\Delta\Delta\Delta\blacktriangle$	6.92 $\pm$ 1.90 $\Delta\Delta$	3.68 $\pm$ 1.07 $\Delta\Delta\Delta\blacktriangle$
淫羊藿组	10	27.17 $\pm$ 6.19 $\Delta\Delta\Delta\blacktriangle$	8.40 $\pm$ 1.49 Δ	5.80 $\pm$ 1.09 $\Delta\Delta\Delta\blacktriangle$
淫羊藿女贞子组	10	17.13 $\pm$ 4.82 $\Delta\Delta$	6.48 $\pm$ 1.02 $\Delta\Delta$	6.84 $\pm$ 0.61 $\Delta\Delta$
钙尔奇组	10	20.28 $\pm$ 6.82 $\Delta\Delta$	8.29 $\pm$ 2.47 Δ	4.23 $\pm$ 0.66 $\Delta\Delta\Delta\blacktriangle$

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与淫羊藿女贞子组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.3 各组大鼠血及骨 Ca、P 含量的比较
与正常对照组比较,模型对照组血及骨 Ca 含量显著降低(均 $P < 0.01$),血 P 含量显著升高($P < 0.01$)。与模型对照组比较,各用药组血及骨 Ca 含量均有升高趋势,血 P 含量有下降趋势,其中以淫羊藿女贞子组及阳性药组作用最为显著,结果有统计学意义(均 $P < 0.01$);各组间骨 P 含量差异无统计学意义。(表3)

表 3 各组大鼠血 Ca、P 含量的比较($\bar{x} \pm s$)					
组别	只数	血 Ca (mmol/L)	血 P (mmol/L)	骨 Ca (mmol/g prot)	骨 P (mmol/g prot)
正常对照组	10	2.74 ± 0.40	1.58 ± 0.23	6.61 ± 1.06	2.44 ± 0.13
模型对照组	10	1.93 ± 0.30 **	2.18 ± 0.35 **	4.50 ± 0.50 **	2.54 ± 0.16
女贞子组	10	2.26 ± 0.32 ▲▲	1.90 ± 0.24 △	5.22 ± 0.86 ▲	2.41 ± 0.19
淫羊藿组	10	2.44 ± 0.41 ▲	1.97 ± 0.20	5.33 ± 0.83 △	2.50 ± 0.18
淫羊藿女贞子组	10	3.08 ± 0.23 △△	1.86 ± 0.24 △△	6.01 ± 0.86 △△	2.41 ± 0.15
钙尔奇组	10	2.78 ± 0.15 △△	1.78 ± 0.25 △△	6.20 ± 1.03 △△	2.40 ± 0.18

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。与淫羊藿女贞子组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3 讨论

随着 GC 在肾脏疾病、器官移植、哮喘及炎症疾病等领域的广泛应用,由于其长期、超生理剂量使用而引发的 GIOP 已成为最常见的药源性骨病,其发病率仅次于绝经后及老年性骨质疏松症而位居第三位^[6],大约 90% 长期使用 GC 者,有明显骨量丢失,骨折发生率增加。因此,GIOP 已成为现代医学亟待解决的重要问题。纵观目前 GIOP 的治疗药物,西医多采用二磷酸盐类、降钙素、维生素 D 联合钙制剂以及激素替代疗法等^[7],虽有一定的疗效,但存在价格昂贵、不良反应大、单纯应用无效多需联合使用等缺点,对于 GIOP 这一复杂的病变而言,显然难奏长期之效。相对于西医治疗

的弊端,中医药治疗本病着重调动内因,辨证论治,具有多途径、多靶点的整体调节作用,最终达到纠正机体激素失衡和负钙平衡的功效;又以其不良反应小,治疗价格低,远期疗效佳等优势,在治疗本病方面具有广阔的应用前景。

中医学认为肾为先天之本,藏精主骨生髓,正如《素问·生气通天论》所言:“肾者,主蛰,封藏之本,精之处也,其充在骨。”即骨骼的生长、发育、枯荣与肾之精气盛衰密切相关,肾精充实则骨髓化生有源,骨得其养则坚固有力;若肾精亏虚则骨髓化生乏源,骨失其养就会出现骨骼脆弱,腰背疼痛,胫膝酸软等症状。中医学认为激素作为外源性“纯阳”“邪热”之品,能启动人体“藏精而起亟”功能,耗损阴精以激发元阳之气外出应变,对抗疾病。使用日久,阳气过度外出而不潜降,终致肾之封藏失司,肾精耗损,阴阳失衡^[8];肾精亏虚无以充实骨骼,骨失濡养而引发骨质疏松。本实验通过观察发现,模型对照组大鼠逐渐出现体质量增长缓慢,懒动少食,毛被稀疏无光泽,弓腰塌背,喜蜷缩聚堆,便软或便溏等一系列证候,提示激素的长期作用可造成大鼠肾之阴阳失衡,肾虚精亏。针对 GIOP 的发病机制,治宜补肾填精壮骨之法。中药淫羊藿温补肾阳、强筋骨,女贞子滋补肝肾、强腰膝,二药配伍可平补阴阳、益精壮骨。本实验生物学表征观察显示,淫羊藿、女贞子各给药组均可明显缓解激素致骨质疏松模型大鼠肾虚状况,使大鼠体质量增加,其中以淫羊藿女贞子组改善作用最为明显,提示二者配伍更切合 GIOP 的中医发病机制,作用效果较单味药更佳。

骨代谢生化指标具有敏感性高、特异性强等优点,可动态观察异常骨代谢过程和治疗效果,快速、灵敏地反映骨转换状态,对评价骨质量、监测药物疗效、预测骨密度和骨质疏松引起的骨折、鉴别诊断代谢性骨病等有着重要的意义^[9]。血清 BGP 浓度可特异性地反映母体成骨细胞的活性,可作为评价骨形成的重要指标^[10]。此外在骨吸收过程中,基质中的 BGP 又可释放到血液中,因此 BGP 水平又可作为判断骨转移,衡量骨转换率的特异性指标^[11]。成骨细胞是 GC 作用的主要位点,研究表明^[12],GC 主要是通过 GC 受体(GR)介导与成骨细胞靶基因的糖皮质激素受体反应元件(GREs)结合,抑制成骨细胞增殖分化,影响成骨细胞功能,促进成骨细胞凋亡,最终使骨形成减少,骨量降低,引发骨质疏松。本实验结果显示,模型对照组大鼠血清 BGP 含量较正常对照组显著降低($P < 0.01$),提示 GC 可明显抑制成骨细胞活性,使骨形成减少;而与模型对照组比较,各用药组血清 BGP 含量显著升高

(均 $P < 0.01$),其中以淫羊藿女贞子组升高最为显著,提示淫羊藿、女贞子可使 BGP 分泌增加,减弱激素对成骨细胞的抑制,使成骨细胞活性增强,促进骨形成,且二药配伍应用较单味使用效果更佳。

AKP 是反映骨代谢的灵敏指标,破骨或成骨占优势均升高,骨更新率增加的代谢性骨病血清 AKP 显著升高。实验结果显示,模型对照组大鼠血清 AKP 含量较正常对照组显著升高($P < 0.01$)。与模型对照组比较,女贞子组、淫羊藿组、淫羊藿女贞子组及阳性药组均可明显下调血清 AKP 水平($P < 0.05$ 或 0.01),其中以淫羊藿女贞子组作用最为显著。提示淫羊藿、女贞子对 GC 引起的 AKP 活性升高有拮抗作用,可有效纠正血清 AKP 水平的异常。

GC 除了对成骨细胞的抑制作用外,还可直接激活破骨细胞功能,或通过某些生长因子及细胞因子的间接作用影响破骨细胞的活性,使骨吸收增强^[13]。StrACP 参与骨基质中 Ca、P 矿化底物的降解及骨吸收窝陷的形成,由此被认为直接参与破骨细胞骨吸收过程^[14]。由破骨细胞产生的 StrACP 可进入血液循环,故检测血清中 StrACP 的水平可以反映体内破骨细胞活性和骨吸收状态。本实验中,模型对照组大鼠血清 StrACP 活性较正常对照组显著升高($P < 0.01$),提示 GC 可刺激破骨细胞,使其活性增强,骨吸收加快;与模型对照组比较,淫羊藿、女贞子各给药组均可显著下调血清 StrACP 水平($P < 0.05$ 或 0.01),其中淫羊藿女贞子组下调作用最为显著($P < 0.01$),提示淫羊藿、女贞子对激素引发的 StrACP 水平升高有拮抗作用,可降低破骨细胞活性,从而有效抑制骨吸收,且二药配伍应用作用更显著。

Ca 和 P 是骨骼的主要构成元素,骨代谢其实就是机体内 Ca、P 代谢,即骨组织不断地将储存的 Ca、P 释放入血,使血 Ca、P 含量升高,同时又将血中 Ca、P 回存于骨骼中,以保证骨矿代谢的稳态^[15]。Ca 与 P 的过度丢失和吸收不佳会致使骨代谢失调,引起骨质疏松。实验结果显示,模型对照组血及骨 Ca 含量显著降低(均 $P < 0.01$),血 P 含量显著升高($P < 0.01$),而与模型对照组比较,各用药组血及骨 Ca 含量均有升高趋势,血 P 含量有下降趋势,其中以淫羊藿女贞子组及阳性药组作用最为显著,提示淫羊藿、女贞子可明显升高血及骨 Ca 含量,血 Ca 水平的升高有助于新骨的形成和钙化,同时抑制骨 Ca 向血液转移,减少机体骨量的

丢失;同时下调血 P 水平,以保持各种无机元素的代谢平衡,从而有效地纠正了 GC 所导致的 Ca、P 代谢紊乱,达到治疗骨质疏松的目的。

综上所述,淫羊藿、女贞子可明显改善地塞米松致骨质疏松模型大鼠骨代谢生化指标,有效纠正骨代谢异常,对糖皮质激素性骨质疏松起到一定的防治作用,其中以二者配伍应用效果更佳。

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):711-715.
- [2]张军.糖皮质激素性骨质疏松症的中西病机及封髓潜阳微粉作用机制研究[D].成都中医药大学,2006.
- [3]康学,刘仁慧,王秀娟.淫羊藿、女贞子抗骨质疏松症的应用与机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2012;18(21):331-334.
- [4]刘仁慧,王秀娟,袁颖,等.淫羊藿、女贞子对激素干预哮喘大鼠骨代谢的影响[J].吉林中医药,2012,32(5):490-492.
- [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):12708-12710.
- [6]Mazziotti G, Giustina A, Canalis E, et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis clinical and therapeutic aspects [J]. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2007, 51(8):1404-1412.
- [7]廖二元.糖皮质激素所致骨质疏松症的预防和治疗[J].药品评价,2012,9(7):28-35.
- [8]王剑,郑洪新,刘瑞辉,等.糖皮质激素影响成骨细胞分化及补肾中药的调节机制[J].实用中医内科杂志,2012,26(1):4-7.
- [9]肖恩.骨质疏松骨代谢生化指标的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2008,14(3):212-216.
- [10]孟昭亨.骨钙素及其临床意义[J].中华内分泌代谢杂志,2006,8(1):41.
- [11]刘梅洁,潘静华,李艳,等.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[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(16):133-136.
- [12]Moutsatsou P, Kassi E, Papavassiliou AG. Glucocorticoid receptor signaling in bone cells[J]. Trends Mol Med, 2012, 18(6):348-359.
- [13]贺茂林.糖皮质激素性骨质疏松症的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2009,15(6):466-470.
- [14]高俊,张前德.“肾主骨”理论与破骨细胞骨吸收[J].中医杂志,2012,53(7):547-549.
- [15]岳南,只德广,赵益桂,等.骨康宁冲剂治疗骨质疏松的药效学研究[J].现代药物与临床,2009,24(4):227-231.

(2013-04-18 收稿)