

· 实验研究 ·

补肾壮骨胶囊对去卵巢大鼠骨质疏松症骨密度和相关细胞因子的影响

师晶丽¹ 赵永华¹ 梁健姿¹ 吴伟康²

(澳门特别行政区科学技术发展基金项目, 编号: 089/2005/A; 1 澳门科技大学中医药学院; 2 中山大学中西医结合研究所)

摘要 目的: 研究补肾壮骨胶囊对去卵巢大鼠骨质疏松症的骨密度和细胞因子等的影响, 探索该药对绝经后骨质疏松症的防治功效及作用机理。方法: 将大鼠随机分为 6 组: 假手术组、卵巢切除组、切除卵巢 + 牡蛎碳酸钙组、切除卵巢 + 补肾壮骨胶囊低剂量组、切除卵巢 + 补肾壮骨胶囊中剂量组、切除卵巢 + 补肾壮骨胶囊高剂量组, 观察骨密度、血清 E2 和 IL-6、子宫指数和股骨指数等指标, 了解其对去卵巢大鼠骨骼的影响。结果: 1) 骨密度的变化: 去卵巢 16 周后, 卵巢切除组大鼠右股骨骨密度和骨矿含量均明显低于假手术对照组, 差异有显著性 ($P < 0.01$), 表明造模成功。与卵巢切除组比较, 补肾壮骨胶囊中剂量组和高剂量组可明显提高模型大鼠股骨 BMC 含量 ($P < 0.05$), 高剂量组可明显提高模型大鼠股骨 BMD 的含量 ($P < 0.05$)。2) 血清 E2 和 IL-6 的变化: 去卵巢 16 周后, 卵巢切除组大鼠血清 E2 含量显著低于假手术对照组, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。中药中剂量组及高剂量组 E2 含量明显高于模型组, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。3) 子宫指数和股骨指数: 与假手术组比较, 卵巢切除组子宫指数和股骨指数明显降低, 具有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示造模成功。与卵巢切除组比较, 高剂量组子宫指数明显增加 ($P < 0.05$); 高、中、低三个剂量组股骨指数均明显增加 ($P < 0.05$)。结论: 补肾壮骨胶囊能增加去卵巢大鼠子宫湿重, 但对于干重无明显影响, 可以显著提高去卵巢大鼠离体骨骨密度及改善其生物力学性能, 提高去卵巢大鼠血清 E2 和 IL-6 含量, 具有类性激素样作用。

关键词 骨质疏松症/中医药疗法; @ 补肾壮骨胶囊

The Effect of Kidney-Tonifying Bone-Strengthening Capsule on Bone Mineral Density and Cytokine in Osteoporotic Ovariectomized Rat Models

Shi Jingli¹, Zhao Yonghua¹, Liang Jianzi¹, Wu Weikang²

(Project of Macau Fund for Scitech Development, No. 089/2005/A; 1 Faculty of Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, 2 Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Institute, Sun Yat Sen College of Medical Sciences)

Abstract Objective: To study the effect of Kidney-Tonifying Bone-Strengthening Capsule on bone mineral density and cytokine in osteoporotic ovariectomized (OVX) rat models, confirming this medicine has preventive and therapeutic effect on postmenopausal osteoporosis (PMOP). **Methods:** Sprague Dawley rats, female, were randomly divided into six groups: sham operation group, ovariectomized group, ovariectomized + oyster calcium carbonate group, ovariectomized + low dose capsule group, ovariectomized + middle dose capsule group, ovariectomized + high dose capsule group, to observe bone mineral density and serum biochemical markers, and study the effect of ovariectomy on bone. **Results:** 1. Change in bone density: 16 weeks after ovariectomy, the bone density and bone mineral content of the rat's right hind leg thighbones in ovariectomized group were obviously lower than those of the sham operation group ($P < 0.01$), indicating the model was successfully established. Compared with ovariectomized group, the middle- and the high-dose groups can significantly increase the level of BMC ($P < 0.05$) of the said organ, meanwhile the latter can obviously increase the BMD level ($P < 0.05$). 2. Change in serum E2 and IL-6: 16 weeks after ovariectomy, the serum E2 level in the ovariectomized group was significantly lower than that of the sham operation group ($P < 0.05$), indicating the model was successfully established. The levels in the middle- and high-dose groups were higher than that of the sham operation group ($P < 0.05$). 3. Change in uterus index and thighbones index: Compared with the sham operation group, the indices in ovariectomized group were obviously lowered ($P < 0.05$), indicating the model was successfully established. Compared with ovariectomized group, the uterus indexes in the high dose group was increased, the thighbones index in high-, middle- and low-dose groups were all significantly increased. **Conclusion:** the Capsule can increase the wet weight of ovariectomized rat's uterus while has no obvious effect to the dry weight. It also significantly increases the bone density level of ex vivo thighbones, the serum E2 as well as IL-6 level from the ovariectomized rats and improves the Vitodynamics, having gonadal hormone like effect.

Key Words Osteoporosis/ Chinese Medical Therapy; @ Kidney-Tonifying Bone-Strengthening Capsule

绝经后骨质疏松症是最常见的老年女性疾病之一,它严重地威胁着老年女性的身体健康,由此引起的骨折不但给患者造成极大痛苦,而且给社会及家庭带来了沉重的经济和生活负担^[1]。补肾壮骨胶囊是在多年用于临床治疗骨质疏松症的经验方的基础上,经工艺研究,提取、精制而成,在骨质疏松症的防治方面显示了较好的疗效。本研究旨在观察其对去卵巢大鼠骨骼的影响,并以西药牡蛎碳酸钙片做对照,以探讨其防治骨质疏松症的作用及机理。

1 材料与方法

1.1 材料:1) 药物及试剂:补肾壮骨胶囊(澳门科技大学中医药学院研制,批号:061012)由补骨脂、淫羊藿、丹参、熟地黄等组成,经提取精制而成,用药部位及炮制方法均有严格控制,并制订有相应的质量标准。阳性对照药:牡蛎碳酸钙片,广州白云山光华制药有限公司,批号:T26030;IL-6 检测试剂盒,解放军总医院科技开发中心放免所提供,批号:070330;E2 检测试剂盒,北京科美东雅生物技术有限公司提供,批号:070325。2) 动物:选用 32 周龄,清洁级,SD 雌性大鼠 72 只,体重(380±20)g,由中山医科大学实验动物中心提供。予普通饲料喂养,参照 AIN-93M 啮齿类动物饲料配方,用适当的物质替换饲料中来源于大豆的成分,以避免大豆异黄酮等植物激素对实验结果的干扰。自由摄水,照明昼夜明暗交替,时间为 12/12,适应性喂养 7 天。3) 仪器:日本 NORLAND 双能骨密度测量仪。上海日环一厂 SN-695B 型智慧放免 γ 测量仪。

1.2 方法:造模方法参照文献^[2]大鼠经腹腔注射 30mg/kgBW 的戊巴比妥钠溶液麻醉,腹位固定后,于腹中线距阴道口 3~4cm 去毛,分别用碘酒和酒精消毒,稍干后切开皮肤和腹肌约 2~3cm,切口视野可见白色脂肪,拨开脂肪层找到子宫后,轻轻将一侧子宫角拉出,在其末端可见被脂肪团包裹的卵巢。分离脂肪团,便可见到粉红的卵巢,以止血钳夹住卵巢,然后将卵巢下输卵管(包括脂肪)用丝线结扎,剪除卵巢(检查是否完全剪除),顺势将子宫角送回腹腔中,同法剪除另侧卵巢。腹肌和皮肤分层缝合后,再次消毒。最后经后肢肌肉注射 20000U 青霉素。假手术对照组(10 只)开腹剪除一小块脂肪后缝合。术后 5 天,动物恢复后开始分组给药。假手术对照组和卵巢切除组给予生理盐水 10ml/kg;切除卵巢+西药组(牡蛎碳酸钙)给予牡蛎碳酸钙 0.2g/kg;切除卵巢+低剂量补肾壮骨胶囊组给予补肾壮骨胶囊 0.125g/kg(相当于临床人用量的 5 倍);切除卵巢+中剂量补肾壮骨胶囊组给予补肾壮骨胶囊 0.25g/kg(相当于临床人用量的 10

倍);切除卵巢+高剂量补肾壮骨胶囊组给予补肾壮骨胶囊 0.5g/kg(相当于临床人用量的 20 倍)。每天灌胃给药 1 次,1 周给药 6 天,共给药 16 周。实验期间,继续按照普通饲料喂养及饮水。

1.3 观察指标:1) 血清生化指标的测定:造模 16 周后股动脉取血,血样本经处理后,分离血清,各组随机取 10 个样品进行放射免疫法测定血清雌二醇(E2)、白介素-6(IL-6)。2) 子宫及股骨指数测定:完整取出右侧股骨,剥离干净,称湿重。分离子宫,称重。计算每 100g 体重的子宫指数以及股骨指数。3) 骨密度:将取出的右侧股骨用日本 NORLAND 双能骨密度测量仪,扫描测量骨密度及骨矿含量。

2 结果

2.1 骨密度的变化:表 1 可见,去卵巢 18 周后,卵巢切除组大鼠右股骨骨密度 BMD 和骨矿含量 BMC 均明显低于假手术对照组,差异有显著性($P<0.01$),表明造模成功。与卵巢切除组比较,补肾壮骨胶囊中剂量组和大剂量组也可明显提高去卵巢大鼠股骨 BMC 含量($P<0.05$),大剂量组可明显提高去卵巢大鼠股骨 BMD 的含量($P<0.05$)。

表 1 补肾壮骨胶囊对雌性去卵巢大鼠股骨 BMD、BMC 的影响

组别	n	剂量 (g/kg)	右股骨	
			BMD(g/cm ²)	BMC(g)
假手术组	10	--	0.1407±0.0059**	0.4319±0.0303**
卵巢切除组	11	--	0.1303±0.0055	0.3795±0.0299
切除卵巢+牡蛎碳酸钙	12	0.2	0.1302±0.0058	0.3695±0.02516
切除卵巢+中药低剂量组	12	0.125	0.1296±0.0056	0.3891±0.0373
切除卵巢+中药中剂量组	11	0.25	0.1327±0.0085	0.4159±0.0388*
切除卵巢+中药大剂量组	11	0.5	0.1379±0.0089*	0.4325±0.0434**

注:与卵巢切除组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

2.2 血清 E2 和 IL-6 的变化:表 2 可见,去卵巢 16 周后,卵巢切除组大鼠血清 E2 含量显著低于假手术对照组,差异有显著性($P<0.05$),表明造模成功。中药中剂量组及高剂量组 E2 含量明显高于模型组,差异有显著性($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 2 补肾壮骨胶囊对雌性去卵巢大鼠 E2 和 IL-6 的影响

组别	n	IL-6(pg/ml)	E2(pmol/L)
假手术对照组	10	81.60±41.53	141.28±41.20*
卵巢切除组	10	61.70±35.22	50.58±14.09
切除卵巢+牡蛎碳酸钙	10	61.24±21.09	71.79±18.60
切除卵巢+中药低剂量组	10	67.70±14.21	71.66±56.51
切除卵巢+中药中剂量组	10	59.06±55.23	82.18±34.37*
切除卵巢+中药高剂量组	10	78.43±65.58	107.27±43.94**

与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

2.3 子宫指数和股骨指数:表 3 可见,与假手术组比较,卵巢切除组子宫指数以及股骨指数明显降低,具有

统计学意义($P < 0.05$),提示造模成功。与卵巢切除组比较,高剂量组子宫指数明显增加($P < 0.05$);高中低3个剂量组股骨指数均明显增加($P < 0.05$)。

表3 补肾壮骨胶囊对雌性去卵巢大鼠子宫指数和股骨指数的影响

组别	n	子宫指数(g/100g)	股骨指(g/100g)
假手术对照组	10	0.3323 ± 0.1576 *	0.335 ± 0.019 *
卵巢切除组	14	0.0357 ± 0.0099	0.284 ± 0.020
切除卵巢 + 牡蛎碳酸钙	10	0.0582 ± 0.0447	0.302 ± 0.020 *
切除卵巢 + 中药低剂量组	12	0.0520 ± 0.0578	0.306 ± 0.024 *
切除卵巢 + 中药中剂量组	13	0.0354 ± 0.0086	0.310 ± 0.036 *
切除卵巢 + 中药高剂量组	13	0.1007 ± 0.1108 *	0.317 ± 0.048 *

注:与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

补肾壮骨胶囊以“肾主骨”理论为指导,结合“脾肾相关”“血瘀”等理论,针对骨质疏松症“肾虚血瘀”的病机特点,筛选熟地黄、补骨脂、淫羊藿、丹参等中药组成。该方以熟地黄为君药,补肾益精、壮骨填髓;补骨脂、淫羊藿补肾助阳为臣药,此乃“善补阳者,必于阴中求阳”之意;丹参等药活血通络,为佐药。全方具有补肾益精、壮骨填髓、活血通络止痛之功效。

现代药理研究证明,熟地黄可抗氧化、延缓衰老,能增强免疫功能。地黄提取物能提高成骨细胞的增殖及成骨细胞中碱性磷酸酶的活性,改善骨质疏松症中的骨代谢^[3]。淫羊藿苷可提高卵巢切除大鼠的骨密度、最大载荷和抗弯刚度,降低血清抗酒石酸性磷酸酶

(TRACP)和骨碱性磷酸酶(BALP)的活性,从而增强去卵巢骨质疏松大鼠抗外力冲击的能力,可有效抑制卵巢切除大鼠的骨量丢失,防止骨质疏松的发生。^[4]补骨脂对分离破骨细胞有抑制作用^[5]。丹参还具有促进成骨细胞生长,改善骨环境内部和全身的血液循环,有助于骨的营养供应,还可增加血清中锌的含量而降低铜的含量,可进一步增加松质骨的形成而减少铜对骨形成的抑制作用^[6]。

本研究表明,补肾壮骨胶囊能增加去卵巢大鼠子宫湿重,但对干重无明显影响,可以显著提高去卵巢大鼠离体骨骨密度及改善其生物力学性能,提高去卵巢大鼠血清E2和IL-6含量,具有类性激素样作用。以往研究和小鼠急性毒性实验表明,补肾壮骨胶囊安全性较高,值得进一步研究开发。

参考文献

[1]陈阳生,等.骨质疏松与补钙.中国骨质疏松杂志,2001,7(2):188-189.
[2]肖炜,马云,邓虹珠,等.妇宁软胶囊对去卵巢大鼠雌激素受体及一氧化氮水平的影响.中国中药杂志,2005,10,30(20):598-1602.
[3]黄泰康主编.常用中药成分与药理手册.中国医药科技出版社,1994:1631.
[4]季辉,刘康,李绍平,等.淫羊藿总黄酮对维A酸诱导大鼠骨质疏松症的防治作用.中国药科大学学报,2000,31(3):222-225.
[5]张润荃,史凤琴,庞淑珍,等.补骨脂对分离破骨细胞作用的研究.现代口腔医学杂志,1995,9(3):136-138.
[6]刘国雄,肖柳斌,邹丽宜.复方丹参制剂抑制糖皮质激素性大鼠骨质丢失的研究.现代中西医结合杂志,2006,15(23):3190-3194.

(2007-12-10 收稿)

世界中联国际培训部举办2008年
中医药特色国际培训班时间表

(续前109页)

中医针灸提高班(WT-8-8):时间:6月;地点:北京

内容与目的:讲授中医针灸诊疗规范及常见病的治疗经验,介绍多种针法与针具的运用,提高在职针灸医务人员的临床诊疗水平。

讲师:赵吉平(北京中医药大学教授),程海英(首都医科大学附属北京市中医医院主任医师)

头痛等神经内科疾患的中医特色疗法高级培训班(WT-8-10):时间:9月26-29;地点:北京

内容与目的:通过各科专家对头痛、失眠、抑郁症、中风后遗症等神经内科疾病的介绍,使学员了解、学会应用不同的中医、中西医结合诊疗手段,进行临床诊断与治疗的知识与技能,提高学员在治疗同一种疾病的过程中,使用不同中医治疗方法的能力。

讲师:高颖(北京中医药大学教授),程海英(首都医科大

学附属北京市中医医院主任医师),付国兵(北京中医药大学东方医院主任医师)

风湿、类风湿中医药特色治疗培训班(WT-8-11):时间:10月4-7;地点:北京

内容与目的:通过对风湿性关节炎、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎等疾病中医治疗的讲解,使学员加深对中医痹症的认识,了解各种痹症的中西医诊断方法,及各种综合治疗手段,提高学员治疗相关疾病的技能和疗效。

讲师:姜泉(中国中医科学院广安门医院主任医师),王玉明(首都医科大学附属北京市中医医院主任医师),侯丽萍(太原市类风湿病医院院长)

老年病的中医认识与特色疗法高级研修班(WT-8-12):时间:10月23-26;地点:北京

内容与目的:通过讲解老年病发病特点及中西医结合用药规律,介绍老年心血管病的中医诊治进展等,让学员了解老年病,中医对老年病的认识,掌握常见老年病的中医诊治方法,提高学员临床诊疗能力。

讲师:徐贵成(中国中医科学院广安门医院主任医师),郝瑞福(北京中医药大学教授)