

荣骨颗粒对去卵巢大鼠骨质疏松症治疗作用的实验研究

戚团结 许昕 王莒生

【摘要】 目的 探索补肾中药“荣骨颗粒”治疗骨质疏松症的作用机理。方法 摘除大鼠双侧卵巢,正常喂养3个月后造成骨质疏松大鼠模型,按大、中、小剂量分组并灌服荣骨颗粒,对照组分别灌服己烯雌酚和中药骨疏康。3个月后处死所有大鼠,眼球取血,测定血清骨钙素(BGP)、碱性磷酸酶(ALP)、白介素1(IL-1)、白介素6(IL-6)、雌二醇(E_2)。结果 荣骨颗粒能使血清BGP、ALP、IL-1、IL-6含量降低,使血清 E_2 水平升高。结论 该药对骨质疏松症之骨吸收-骨形成偶联具有一定的调节作用;能够抑制IL-1、IL-6的分泌,具有促进雌激素分泌效应或类雌激素样作用。本实验从激素和细胞因子层面初步阐述了荣骨颗粒治疗骨质疏松症的作用机理。

【关键词】 荣骨颗粒; 骨质疏松; 卵巢切除

The experiment of Rong Gu Granules therapeutic mechanism to ovariectomy osteoporotic rats QI Tuan-jie, XU Xin, WANG Jusheng. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, 100010 China

【Abstract】 Objective To explore the therapeutic mechanism of the medicine Rong Gu Granules. **Methods** seventy nine Sprague-Dawley rats were randomly divided into seven groups; one normal control group, one model group, three Rong Gu Granules treated groups and two positive groups. Osteoporotic rat models were established by ovariectomy. After 3 months treatment, all animals were killed. And the level of serum BGP, IL-1, IL-6, ALP and E_2 were observed. **Results** The level of serum BGP, IL-1, IL-6 and ALP in Rong Gu Granules treated groups is lower than that in model group, on the other hand, the level of serum estradiol in all Rong Gu Granules is higher than that in model group. **Conclusions** Rong Gu Granules can inhibit the bone loss and protect the bone. The main therapeutic mechanism of Rong Gu Granules is related to its effect on the level of sex hormones.

【Key words】 Rong Gu Granules; Osteoporosis; Ovariectomy

材料和方法

1. 材料

(1) 实验动物

选用 Wistar 大鼠(由中国医学科学院实验动物研究所提供,许可证号:SCXK11-00-0008)79只,体重200~220g,雌性,清洁级。大鼠饲养和实验均在中国中医研究院基础理论研究所清洁级实验动物室内进行(实验动物室许可证号:SYXK 11-00-0039)。

(2) 药物与配制方法

药物:荣骨颗粒(由北京中医医院中心制剂室提供)、骨疏康冲剂(东港市康辰制药有限公司一厂,批

号:010303)、己烯雌酚(北京益民制药厂生产,批号:990404)。

配制方法:实验前,用蒸馏水将各组中西药物配制成以下浓度:荣骨颗粒分别为0.131g/ml、0.262g/ml、0.524g/ml;骨疏康冲剂0.131g/ml;己烯雌酚0.0016mg/ml。

(3) 主要试剂

血清雌二醇(E_2)放射免疫测定试剂盒,由天津九鼎医学生物工程有限公司提供,血清骨钙素(BGP)放射免疫测定试剂盒、白细胞介素1 β 放射免疫药盒及白细胞介素-6放射免疫药盒均由解放军总医院科技开发中心放免所提供。

(4) 主要仪器

美国伯乐公司 Biorad 550 酶标仪; FT-630G 多探头数免仪; 日本日立公司 7170A 生化分析仪。

基金项目:北京市科委科研资助(954021600)

作者单位:100010 首都医科大学附属北京中医医院

2. 方法

(1) 分组及处理

将79只大鼠随机分为7组:正常对照组11只,模型组11只,己烯雌酚组12只,骨疏康组10只,荣骨颗粒大剂量组(简称大剂量组)12只,荣骨颗粒中剂量组(简称中剂量组)11只,荣骨颗粒小剂量组(简称小剂量组)12只。

模型制作:以45 mg/kg的戊巴比妥钠进行大鼠腹腔注射麻醉,腹位固定;在其最末肋骨下、腋中线与距脊柱外侧约1 cm之交叉处备皮去毛;以70%的酒精和碘酊消毒后切开局部皮肤、肌肉和腹膜,轻轻将白色发亮脂肪团拉出并分离,暴露卵巢,结扎卵巢下端输卵管,摘除卵巢,缝合切口,外敷消炎粉。同法摘除对侧卵巢。

切除卵巢3个月后,按照大、中、小剂量分别给大鼠灌胃,荣骨颗粒药液浓度依次为0.524 g/ml、0.262 g/ml、0.131 g/ml,1 ml/100 g(体重),相当于人体5.24 g/kg、2.62 g/kg、1.31 g/kg(体重);己烯雌酚组灌胃,药液浓度为0.0016 mg/ml的己烯雌酚1 ml/100 g,相当于人体0.016 mg/kg;骨疏康组灌胃,药液浓度为0.131 g/ml的骨疏康1 ml/100 g,相当于人体1.31 g/kg。各组给药每天1次,连续6 d后,休息1 d;重复上法给药直至3个月为止。正常对照组、模型组分别给予等容积的蒸馏水同法、同期灌胃。给药3个月后,处死所有大鼠、取血,用放射免疫分析法分别测定血清骨钙素(BGP)、白介素1(IL-1)、白介素6(IL-6)及雌二醇(E₂)含量。用生化法测定血清碱性磷酸酶(ALP)含量。

3. 统计学处理

实验结果皆以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用student t检验。

结 果

1. 荣骨颗粒对去卵巢大鼠血清骨钙素(BGP)的影响

与正常组比较,模型组、己烯雌酚组、骨疏康组及荣骨颗粒大、中、小剂量组的大鼠血清BGP均显著升高;与模型组比较,己烯雌酚组、骨疏康组、荣骨颗粒大剂量组的血清BGP均显著降低;荣骨颗粒中、小剂量组的血清BGP,虽有降低趋势,但差异无显著性。荣骨颗粒各剂量组之间,及其与骨疏康组之间差异无显著性,见表1。

表1 各组大鼠血清BGP的变化

组别	大鼠数(只)	BGP(mg/L)
正常组	11	1.41 ± 0.366
模型组	11	2.43 ± 0.39**
己烯雌酚组	12	1.72 ± 0.28* ^{△△}
骨疏康组	10	2.04 ± 0.38** ^{△△}
荣骨颗粒大剂量组	12	2.02 ± 0.37** ^{△△}
荣骨颗粒中剂量组	11	2.10 ± 0.41**
荣骨颗粒小剂量组	12	2.25 ± 0.45**

注:与正常组比较*P<0.05,**P<0.01;与模型组比较[△]P<0.05,^{△△}P<0.01;与己烯雌酚组比较[#]P<0.05,^{##}P<0.01,下表同

2. 荣骨颗粒对去卵巢大鼠血清碱性磷酸酶(ALP)的影响

与正常组比较,模型组、己烯雌酚组、骨疏康组及荣骨颗粒大、中、小剂量组的大鼠血清ALP含量均显著升高;与模型组比较,己烯雌酚组、荣骨颗粒大剂量组的大鼠血清ALP含量显著降低;与己烯雌酚组比较,荣骨颗粒大、中、小剂量组、骨疏康组的大鼠血清ALP含量显著升高;荣骨颗粒大、中、小剂量组之间,及其与骨疏康组之间的ALP含量无显著性差异,见表2。

表2 各组大鼠血清ALP的变化

组别	大鼠数(只)	ALP(IU/L)
正常组	11	80.97 ± 12.91
模型组	11	144.41 ± 28.57**
己烯雌酚组	12	96.96 ± 19.58* ^{△△}
骨疏康组	10	130.98 ± 35.93**
荣骨颗粒大剂量组	12	116.39 ± 22.41** ^{△△}
荣骨颗粒中剂量组	11	126.95 ± 29.11**
荣骨颗粒小剂量组	12	130.67 ± 33.69**

3. 荣骨颗粒对去卵巢大鼠血清IL-1、IL-6含量的影响

与正常组比较,模型组、己烯雌酚组、骨疏康组及荣骨颗粒大、中、小剂量组的大鼠血清IL-1含量均显著增高;与模型组比较,己烯雌酚组、骨疏康组、荣骨颗粒大、中剂量组的血清IL-1含量均显著降低。荣骨颗粒大、中、小剂量组之间,及其与骨疏康组之间差异无显著性,见表3。

表3 各组大鼠血清IL-1的变化

组别	大鼠数(只)	IL-1
正常组	11	0.316 ± 0.040
模型组	11	0.468 ± 0.062**
己烯雌酚组	12	0.353 ± 0.0395* ^{△△}
骨疏康组	10	0.411 ± 0.049** ^{△△}
荣骨颗粒大剂量组	12	0.398 ± 0.0393** ^{△△}
荣骨颗粒中剂量组	11	0.409 ± 0.069** ^{△△}
荣骨颗粒小剂量组	12	0.421 ± 0.057**

与正常组比较,模型组、骨疏康组及荣骨颗粒

大、中、小剂量组的大鼠血清 IL-6 含量均明显增高;与模型组比较,己烯雌酚组、骨疏康组及荣骨颗粒大、中、小剂量组的血清 IL-6 含量均显著降低;与己烯雌酚组比较,骨疏康组、荣骨颗粒大、中、小剂量组血清 IL-6 含量均显著升高骨疏康组及荣骨颗粒大、中、小剂量组之间,血清 IL-6 含量差异无显著性,见表 4。

表 4 各组大鼠血清 IL-6 的变化

组别	大鼠数(只)	IL-6(pg/ml)
正常组	11	332.47 ± 21.57
模型组	11	448.19 ± 64.38**
己烯雌酚组	12	347.60 ± 26.99 ^{△△}
骨疏康组	10	384.33 ± 40.23** ^{△△} *
荣骨颗粒大剂量组	12	384.66 ± 53.38** ^{△△} *
荣骨颗粒中剂量组	11	397.42 ± 46.28** ^{△△} *
荣骨颗粒小剂量组	12	409.17 ± 42.15** ^{△△} *

4. 荣骨颗粒对去卵巢大鼠血清雌二醇(E₂)的影响

模型组、骨疏康组及荣骨颗粒大、中、小剂量组的大鼠血清 E₂ 较正常组均显著降低。与模型组比较,己烯雌酚组、荣骨颗粒大剂量组的 E₂ 均显著升高,其中己烯雌酚组与正常组比较,差异无显著性;荣骨颗粒中、小剂量组的 E₂ 含量与模型组比较,差异性次于前述两组,其与骨疏康组间无明显差异,见表 5。

表 5 各组大鼠血清雌二醇(E₂)的变化

组别	大鼠数(只)	E ₂ (pg/ml)
正常组	11	31.76 ± 8.39
模型组	11	9.28 ± 3.40**
己烯雌酚组	12	33.15 ± 3.97 ^{△△}
骨疏康组	10	12.30 ± 1.91** ^{△△} *
荣骨颗粒大剂量组	12	16.30 ± 2.72** ^{△△} *
荣骨颗粒中剂量组	11	14.89 ± 6.68** ^{△△} *
荣骨颗粒小剂量组	12	13.15 ± 3.37** ^{△△} *

讨 论

本研究结果显示,切除卵巢后模型组大鼠血清 BGP 及 ALP 含量均显著增高。BGP 为骨非胶原性蛋白的主要成分,是骨组织的特异性蛋白,由成骨细胞合成分泌。体外实验证明,在成骨细胞分化和骨基质矿化过程中 BGP 合成增加,ALP 分泌也随之增加。BGP 是反映骨转换的特异性指标。由于骨吸收和骨形成的偶联作用,修复和代偿性骨形成增多,故模型组血清 BGP、ALP 水平明显高于正常组 (P < 0.01),说明骨质疏松大鼠造模成功。

荣骨颗粒大剂量组血清 BGP 水平虽略高于正常组,但与模型组比较显著降低 (P < 0.05),这表明:虽然切除了大鼠卵巢,由于应用补肾中药荣骨颗粒,使骨吸收受到抑制,因而与之偶联的骨形成相对减少。但是,荣骨颗粒大剂量组大鼠毕竟因去除卵巢失去了雌激素的保护,故其与正常组比较仍可见到卵巢切除所致的高转换型骨质疏松症的血清激素水平改变,这与绝经后骨质疏松症的病理改变是一致的。荣骨颗粒能使 BGP 和 ALP 含量降低,说明该药对骨质疏松症的骨吸收-骨形成偶联,具有一定的调节作用,对骨质疏松症具有治疗作用。

已有研究表明,IL-1、IL-6 是骨吸收强有力的刺激因子,且抑制骨形成,是导致骨质疏松症发病的主要因素之一^[1,2]。本实验结果显示,模型组血清 IL-1、IL-6 水平均显著增高,而己烯雌酚组、骨疏康组及荣骨颗粒大、中剂量组的 IL-1、IL-6 含量均较模型组有所下降,说明荣骨颗粒能够抑制 IL-1、IL-6 的分泌,这可能是荣骨颗粒治疗骨质疏松症的机理之一。

雌激素缺乏是绝经后骨质疏松症发病的重要因素。雌激素对维持成骨细胞的功能和抑制破骨细胞的活性必不可少,对骨重建的动态平衡起重要调节作用。雌激素调节骨髓细胞、骨细胞产生细胞因子组成复杂的网络系统调控骨代谢。当雌激素缺乏时,骨微环境中多种细胞因子的相对平衡被破坏,引起骨代谢紊乱,导致骨质疏松这一病理过程出现。雌激素可抑制 IL-1、IL-6 的活性,并对骨吸收有直接的抑制作用^[3,4]。本实验结果显示,荣骨颗粒能使大鼠血清 E₂ 含量增高,说明荣骨颗粒具有促进雌激素分泌的效应或类雌激素样作用,可能为该药治疗骨质疏松症的另一机理。补肾中药荣骨颗粒虽然对上述激素、细胞因子有一定的影响,但其如何调节细胞因子,如何调节碱性磷酸酶的分泌,怎样影响雌激素水平,尚需更深入的实验研究加以证明。

参 考 文 献

- 1 Del mas PD. Biochemical makers of bone turnover: methodology and clinical use in osteoporosis. AM J Med, 1991, 91(Suppl 58): 59-63.
- 2 Gowen M, Wood DD, Ihtie EJ, et al. Anterleukin-like factor stimulate bone resorption *in vitro*. Nature, 1983, 306: 378-380.
- 3 Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. J Immunol, 1990, 144: 226-227.
- 4 Mark C, Horowitz. Cytokines and estrogen in bone: Antiosteoporotic Effect. Science, 1993, 260: 626-627.
- 5 Passeri G, Girasole G, Markus T, et al. 17-Estradiol regulates IL-6 production and osteolast development in murine calvaria cell cultures. J Bone Miner Res, 1991, 6: 263-265.

(收稿日期: 2004-04-12)