

益坤精胶囊对去卵巢大鼠骨密度和骨组织中 IL-6 含量的影响

段水竹 赵旭晔 张永洛 张剑宇

【摘要】 目的 观察补肾中药益坤精胶囊对去卵巢大鼠骨密度的影响,并通过其对骨组织微环境中 IL-6 含量的影响以探讨其作用机制。方法 通过切除大鼠双侧卵巢建立绝经后骨质疏松症模型。3 月龄 SD 雌性大鼠 50 只,随机分为 5 组:假手术组、去卵巢组、尼尔雌醇组、中药高、低剂量组。去卵巢术后 1 w,用灌胃法给服益坤精胶囊 10 w,以尼尔雌醇和生理盐水作为对照,观察各组大鼠骨密度及骨形态学的改变,并以 RIA 法检测各组大鼠骨组织培养液中 IL-6 的含量。结果 与假手术组比较,去卵巢组骨密度显著下降($P < 0.01$),骨小梁稀疏断裂,骨组织中 IL-6 含量明显增高($P < 0.01$)。与去卵巢组比较,治疗组骨密度明显增高($P < 0.01$),但仍低于假手术组($P < 0.05$)。骨组织中 IL-6 含量显著下降($P < 0.05$)。骨形态学亦显著改善。结论 益坤精胶囊能够抑制骨组织微环境中 IL-6 的产生,而起到抗骨质疏松的作用。

【关键词】 中药复方; 卵巢切除术; 骨密度; 白细胞介素-6

Effects of Yikunjing Capsules on bone mineral density and IL-6 levels in bone of ovariectomized rats DU-AN Shuizhu, ZHAO Xuye, ZHANG Yongluo, and ZHANG Jianyu. Shanxi Medical University Second Hospital, Taiyuan 030001, China

【Abstract】 Objective To observe the effects of Yikunjing capsules on bone mineral density(BMD) and study its mechanism based on the changes of IL-6 levels in bone of ovariectomized rats. **Methods** Adult ovariectomized rats were used in this study as the model of postmenopausal osteoporosis. 50 three-month-old female SD rats were randomly divided into 5 groups: sham operation group, ovariectomized(OVX) group, OVX with nilestriol group, OVX with Yikunjing groups in large and small dosages. Ten weeks after feeding with the medicines, the BMD and the IL-6 level in bone were detected, and histological changes of bone were observed. **Results** Compared with sham operation group, the general BMD in the OVX group decreased significantly ($P < 0.01$) while the IL-6 level in bone increased significantly ($P < 0.01$). The histology of bone revealed thin and irregular trabeculae. Compared with the OVX group, the general BMD in Yikunjing groups increased significantly ($P < 0.01$) while the IL-6 levels in bone decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusions** Yikunjing capsules effectively prevent osteoporosis induced by ovariectomy in female rats, presumably by decreasing the IL-6 level in bone and inhibiting bone absorption.

【Key words】 Postmenopausal osteoporosis; Ovariectomy; Bone density, Interleukin-6

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMO)是由雌激素减少所致的骨质疏松,发病机制目前尚未完全明了。有研究显示,与雌激素不足相关的骨量丢失主要是由于骨髓微环境中的一些溶骨性细胞因子所介的^[1]。IL-6 被认为是这些细胞因子网络中的关键成员,其在骨代谢中的调节作用不仅直

接刺激骨吸收,还能加强其他因子的作用,使骨吸收大大增强^[2,3]。近年来研究显示,一些补肾中药对 PMO 的治疗有效,但作用机制不清。本实验观察了补肾中药益坤精胶囊对去卵巢大鼠骨密度的影响,并通过其对骨组织微环境中的 IL-6 含量的影响以探讨其对 PMO 的作用机理。

材料和方法

作者单位:030001 太原,山西医科大学第二医院(段水竹、张永洛、张剑宇);山西省肿瘤医院(赵旭晔)

1. 动物分组与模型制备

3 月龄 SD 雌鼠 50 只(山西医科大学动物中心提供),随机分为 5 组,即假手术组、去卵巢组、尼尔雌醇组、中药高剂量组、中药低剂量组,每组 10 只。分组后,假手术组在无菌条件下,以 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,俯位固定,经腰椎旁切口进入大鼠腹腔背侧,将卵巢提出腹腔,再送回关腹。其余各组均在相同条件下切除双侧卵巢,然后止血缝合。术后 1 w 行阴道涂片,确定无动情周期变化者为造模成功。

2. 实验药物及试剂

益坤精胶囊(主要成分为鹿角胶、菟丝子、巴戟天、肉苁蓉、当归等)由山西医科大学第二医院制剂室提供,每粒剂量 0.3 g。尼尔雌醇由北京四环制药厂生产,每片 1 mg,批号 20010801。IL-6 放射免疫分析测定盒由解放军总医院科技开发中心放免所提供。Hank's 液、RPMI 1640 液、Schcidde 液均根据文献配制。

3. 动物给药及喂养

造模成功后,中药高剂量组以益坤精胶囊 $1.44\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重灌胃,中药低剂量组以益坤精胶囊 $0.72\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重灌胃,每日 1 次;尼尔雌醇组 $0.25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重灌胃,每两周 1 次,用药间歇期每天灌以等体积的生理盐水;假手术组、去卵巢组每天灌以等体积的生理盐水。给药时间为 10 w。各组大鼠于室温下分笼饲养,自由摄取标准饲料,自由饮用蒸馏水。

4. 检测项目

(1)称量体重及子宫重量:分别于实验前和大鼠处死前,用电子称逐一称量体重。处死后,解剖并完整分离子宫组织,剔净周围非子宫组织,于电子天平(精确到 0.001 g)上称子宫湿重,并记录。

(2)骨密度测定:将大鼠以戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,四肢展开平置于双能 X 线吸收测量仪(美国 Lunar 公司生产)平台上,测定大鼠全身的骨密度。

(3)组织形态学观察:取大鼠股骨干骺端,以 10% 的甲醛液常规固定,Sohcidde 液脱钙处理后石蜡制片,HE 染色,光镜下观察。

(4)骨组织培养及 IL-6 测定:无菌条件下取大鼠右侧股骨及胫骨,Hank's 液反复冲洗,用骨钳将其分离为 1 mm^3 碎块,称量 2 g,置于 3 ml 含 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,常规条件下(37°C 、5% CO_2 培养箱中)培养 48 h,吸取培养液,离心后取上清液,RIA 法检测其 IL-6 的含量。

5. 统计学处理

所有指标均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计

分析采用 SPSS10.0 软件进行多均值单因方差分析,用 LSD 法进行两两比较。

结 果

1. 大鼠体重比较

实验前,各组大鼠体重差异无显著性。处死前,与假手术组相比,去卵巢组体重显著增加($P < 0.01$),而子宫重量明显降低($P < 0.01$);中药高、低剂量组体重明显低于去卵巢组($P < 0.01$),而子宫重量则明显高于去卵巢组($P < 0.05$)。中药高、低剂量组之间及中药组和尼尔雌醇组之间差异无显著性($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠体重的变化和子宫重量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	体重(g)		子宫重量(g)
		实验前	实验后	
假手术组	10	212.38 ± 18.62	$298.89 \pm 23.75^*$	$0.66 \pm 0.12^*$
去卵巢组	10	211.35 ± 15.38	$371.25 \pm 22.93^{\Delta}$	$0.18 \pm 0.10^{\Delta}$
尼尔雌醇组	10	210.74 ± 16.51	$296.53 \pm 20.02^*$	$0.47 \pm 0.14^{* \Delta}$
中药高剂量组	10	213.48 ± 14.36	$315.87 \pm 13.57^*$	$0.40 \pm 0.16^{* \Delta}$
中药低剂量组	10	209.94 ± 17.32	$318.17 \pm 9.57^*$	$0.34 \pm 0.12^{* \Delta}$

注:各组与去卵巢组比较 * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$;各组与假手术组比较, $^{\Delta} P < 0.01$, $^{\Delta\Delta} P < 0.05$

2. 各组大鼠骨密度比较

实验完成后,与假手术组相比,去卵巢后各组大鼠骨密度均显著降低(分别为 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。而与去卵巢组相比,中药高、低剂量组骨密度均显著增高($P < 0.01$),但仍低于假手术组($P < 0.05$)。中药组之间以及中药和尼尔雌醇组之间相比则差异无显著性,见表 2。

表 2 各组大鼠骨密度及骨组织中 IL-6 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	骨密度	骨组织中 IL-6 含量
		(g/cm^2)	(pg/ml)
假手术组	10	$0.41 \pm 0.13^*$	$170.05 \pm 15.66^*$
去卵巢组	10	$0.27 \pm 0.08^{\Delta}$	$262.52 \pm 45.59^{\Delta}$
尼尔雌醇组	10	$0.34 \pm 0.18^{* \Delta}$	$200.92 \pm 31.79^*$
中药高剂量组	10	$0.36 \pm 0.11^{* \Delta\Delta}$	$210.05 \pm 48.68^*$
中药低剂量组	10	$0.34 \pm 0.09^{* \Delta}$	$226.05 \pm 43.37^{* \Delta\Delta}$

注:与去卵巢组比较 * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$;与假手术组比较 $^{\Delta} P < 0.01$, $^{\Delta\Delta} P < 0.05$

3. 各组大鼠骨组织中 IL-6 含量的变化

实验完成后,与假手术组相比,去卵巢组大鼠骨组织中 IL-6 含量显著增高($P < 0.01$)。与去卵巢组相比,用药后各组 IL-6 含量均显著降低($P < 0.05$)。

中药低剂量组虽显著高于假手术组 ($P < 0.05$), 但仍显著低于去卵巢组 ($P < 0.01$)。其中中药高、低剂量组之间及中药组与尼尔雌醇组之间相比则差异无显著性, 见表 2。

4. 骨组织形态学观察

去卵巢组股骨干骺端骨小梁明显变稀疏、断裂, 皮质骨变薄, 骨髓腔相对扩大, 部分区域骨小梁消失。对照组及治疗组股骨干骺端骨小梁丰富, 皮质骨致密, 小梁排列以纵向为主。在皮质骨形成表面, 治疗组均可见成对状排列、似上皮细胞样覆盖于新生骨表面的成骨细胞。

讨 论

去卵巢后大鼠体重明显增加, 原因可能与低雌激素状态下的脂代谢紊乱有关, 也可能是去卵巢后大鼠抗骨质疏松的一种保护性反应。体重增加可部分抑制去卵巢大鼠的骨量丢失^[4]。中药高、低剂量组均能抑制去势后大鼠的体重增加, 使其维持在正常水平。

骨质疏松的主要特征为骨量减少, 骨微结构改变。动物没有骨质疏松的诊断标准, 主要是比较骨量大小, 而骨密度则是量化骨量的重要指标。故通过比较骨密度的变化和骨形态学的改变可以比较准确地反映其骨质疏松的程度。本实验结束时, 与假手术组比较, 去卵巢组大鼠骨密度明显降低, 股骨干骺端骨小梁稀疏、断裂, 表明大鼠骨质疏松模型建立成功。用药 10 w 后, 中药高、低剂量组骨密度明显增加, 骨小梁较丰富, 显示补肾中药益坤精胶囊对去卵巢所致的骨质疏松具有良好的防治作用。

本实验结束时, 与假手术组相比, 去卵巢组大鼠骨组织中 IL-6 含量明显增高。IL-6 可由成骨细胞、破骨细胞、造血干细胞、基质细胞、单核细胞等分泌, 是骨吸收的诱导剂, 与绝经后骨转换失衡有密切关系。研究证实, IL-6 可增加破骨细胞形成, 刺激骨吸收。IL-6 主要作用于破骨细胞的早期阶段, 刺激早期的破骨细胞前体分裂增殖^[5]。IL-6 还刺激正常成熟的破骨细胞形成骨吸收陷窝^[6]。此外, IL-6 通过胶原酶的释放而加强骨基质降解。且 IL-6 能和其他

的细胞因子、激素产生协同作用, 共同调节破骨细胞的形成, 使骨吸收作用大大增强^[7]。IL-6 的产生受多种因素调节, 实验证明, E_2 、IL-1、 PGE_2 、TNF- α 、PTH、1,25(OH) $_2D_3$ 等均能作用于成骨细胞, 使之释放 IL-6, 刺激破骨细胞前体的形成和分化, 激发破骨细胞的活性, 促进骨吸收, 最后形成骨质疏松^[8]。而雌二醇、睾酮、孕酮则抑制这些因子刺激的 IL-6 分泌^[9], 但细胞因子刺激 IL-6 的产量较全身激素刺激要大的多。

本实验结果表明, 大鼠切除双侧卵巢后, 由于雌激素减少, 对 IL-6 抑制作用减弱, 使大量 IL-6 进入骨的微环境, 刺激更多的破骨细胞生成, 导致骨吸收活性增强, 骨小梁数目减少, 骨量下降。而用补肾中药治疗后, 抑制了 IL-6 的分泌, 减轻了由于骨吸收增加而引起的骨量和骨微结构的变化。本实验进一步证实了 IL-6 在去卵巢大鼠骨吸收中起着重要作用, 补肾中药抗骨质疏松的作用部分是通过抑制 IL-6 产生而介导的。

参 考 文 献

- 1 Munay GR, Boyce BF, Yoneda T, et al. Cytokines and bone remodeling. In: Marcus R, ed. Osteoporosis. Academic Press, 1996. 301-313.
- 2 Pacifici R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis-the second decade. Endocrinology, 1998, 139:2659-2661.
- 3 Ishimi Y, Miyaura CH, Jin CH, et al. IL-6 is produced by osteoblast and induce bone resorption. J Immunol, 1990, 145:3297-3303.
- 4 Wronski TJ, Schenck PA, Cintron M, et al. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int, 1987, 40:155-159.
- 5 Gowen M. Reply the bone loss activity of interleukin-6. J Bone Miner Res, 1991, 6:1145-1148.
- 6 Pivrotto LA, Cissel DS, Keeting PE. Sex hormones mediated interleukin-1 beta production by human osteoporosis HOBIT cells. Mol Cell Endocrinol, 1995, 111: 67-74.
- 7 Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. N Engl Med 1995, 332:305-311.
- 8 De LA Mata J, Uy HL, Guise TA, et al. Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone related protein *in vivo*. J Clin Invest, 1995, 95:2846-2852.
- 9 Horowitz MC. Cytokines and estrogen in bone: antiosteoporotic effect. Science, 1993, 260. 626-627.

(收稿日期: 2004-07-08)

(上接第 487 页)

- 4 张兴凯, 杨庆铭. 骨质疏松症成骨细胞生物学特征的体外研究. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10:50.
- 5 薛延, 主编. 骨质疏松症诊断与治疗指南. 北京: 科学出版社,

1999. 320-321.

- 6 Kumeda Y, Lnaba M, Nishizawa Y. Secondary osteoporosis and its treatment diabetes mellitus. Japan Clin Med, 1998, 56:1579-1586.

(收稿日期: 2004-05-18)