

三仙汤对去卵巢大鼠骨密度和钙磷代谢的影响

秦腊梅 姜良铎 肖永华 梁红 陶黎 牛福铃 吕沛莹 王硕仁 张丽平 阎艳芳

摘要: 目的 通过测定去卵巢大鼠骨质疏松症模型骨密度(BMD)、血清中钙、磷、碱性磷酸酶(ALP)及尿钙、尿磷,了解三仙汤是否能改善去卵巢大鼠骨质疏松症,并进一步探讨其起效的具体机制。方法 3 月龄雌性 SD 大鼠 59 只,随机分为 6 组:假手术组(Sham)、模型组(OVX)、尼尔雌醇组(Nil)、三仙汤小、中、大剂量组。Sham 组、OVX 组用生理盐水灌胃。Nil 组以 0.15 mg/100 g 大鼠体重给药,三仙汤小、中、大组给药量分别为 5.98 g/kg、11.96 g/kg 及 23.92 g/kg。除 Nil 组每周灌胃一次外,其他组均每周给药 6 次。持续 3 月后处死大鼠,测定其股骨 BMD 及血清中钙、磷、ALP 及尿钙、磷。结果 OVX 组大鼠 BMD 较 Sham 组显著降低($P < 0.01$),三仙汤各组及 Nil 组与 OVX 组比较均明显上升($P < 0.01$);OVX 组血钙、血磷浓度与 Sham 组比较有显著下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),三仙汤各剂量组、Nil 组与 OVX 比较则均显著上升($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);OVX 组血清 ALP 浓度较 Sham 升高($P > 0.05$),三仙汤各组 ALP 含量与 OVX 组比较明显上升($P < 0.05$),而 Nil 组反而明显降低($P < 0.05$)。OVX 的尿钙、尿磷均较 Sham 组明显升高($P < 0.05$),三仙汤各组尿钙与 OVX 组比较有下降趋势($P > 0.05$),尿磷则明显下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),与 Nil 组比较下降程度也有显著性($P < 0.01$)。结论 三仙汤能明显提高去卵巢大鼠的骨密度,提高去卵巢大鼠血钙、血磷、血清 ALP 水平,降低尿钙、尿磷浓度。

关键词: 骨质疏松;三仙汤;骨密度

Influences of Sanxian decoction on bone mineral density and metabolism of calcium and phosphorus in ovariectomized rats QIN Lamei, JIANG Liangduo, XIAO Yonghua, et al. The Key Laboratory of Traditional Chinese Internal Medicine, Dongzhimen Hospital, Beijing University of TCM, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To study the effects of Sanxian decoction on the bone mineral density (BMD), serum calcium, and phosphorus, urine calcium, and phosphorus, and serum alkaline phosphoric acid (ALP) in ovariectomized rats. **Methods** Fifty-nine 3-month-old female SD rats were randomized into six groups: sham-OVX group; ovariectomized group (OVX); nilestriol group; low dosage Sanxian decoction; moderate dosage Sanxian decoction; and high dosage Sanxian decoction. The experiment lasted for three months. At the end of experiment, BMD, serum calcium, and phosphorus, urine calcium, and phosphorus, and ALP in ovariectomized rats were determined. **Results** The BMD in OVX group was 0.372 g/cm², significantly lower than that of 0.416 g/cm² in Sham-OVX group ($P < 0.01$), and the BMD in all the three Sanxian groups and nilestriol group were significantly higher than that in OVX-group ($P < 0.01$). The serum calcium, and phosphorus in OVX-group were significantly lower than that in sham-OVX group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while those in the three Sanxian decoction groups and nilestriol group were significantly higher than that in OVX-group ($P < 0.05$ or or $P < 0.01$). The ALP content in OVX-group showed an increasing trend but did not so in sham-OVX group, and the ALP contents in the three Sanxian decoction groups were significantly higher than that of OVX-group, while that in the nilestriol group was significantly decreased ($P < 0.05$), the urine calcium, and phosphorus in OVX-group were significantly higher than those in Sham-OVX group ($P < 0.05$), and the urine calcium in Sanxian decoction groups showed an decreasing trend but did not so in OVX-group, while the urine phosphorus in Sanxian groups were significantly lower than that in OVX-group, even lower than that in nilestriol group ($P < 0.01$). **Conclusions** Sanxian decoction raises the BMD in

ovariectomized rats, maybe by increasing the calcium, phosphor, and ALP, and reducing the urine calcium, and phosphor in ovariectomized rats.

Key words: Sanxian decoction; Bone mineral density; Calcium; Phosphor; Ovariectomized rats

对三仙汤进行的一系列细胞学研究表明,三仙汤对体外培养成骨细胞有明显的促增殖作用。本实验通过去卵巢所致大鼠骨质疏松症模型,希望从动物整体实验的角度对该药再进行深入的研究。通过测定大鼠的骨密度(BMD),血清中钙、磷、碱性磷酸酶,尿钙、尿磷等指标,重点了解三仙汤是否能改善去卵巢所致大鼠骨质疏松型的骨质情况,并进一步探讨三仙汤起效的具体机制。

1 材料和方法

- 1.1 实验动物:雌性 SD 大鼠,3 月龄,59 只,平均体重 220 ~ 250 g(由中国医学科学院动物中心购进),动物级别 2 级(许可证编号为:SCXK 11-00-0006)。
- 1.2 动物饲养:各组大鼠分笼饲养,自由摄取标准鼠饲料,自由饮水,室温(20 ~ 22)℃。
- 1.3 试剂和仪器:尼尔雌醇片(Tabellae Nilestrioli),1 mg/片(北京四环制药二厂生产,批号 991020),全自动生化分析仪及配套提供的生化试剂盒(美国贝克曼公司),SD-1000 骨矿物测定仪(核工业北京地质研究院)。

2 方法

- 2.1 分组:59 只大鼠随机分为 6 组:假手术组(Sham)9 只,模型组(OVX)、尼尔雌醇组、三仙汤小剂量组、三仙汤中剂量组、三仙汤大剂量组均为 10 只。
- 2.2 造模:用 3.5% 水合氯醛 1 ml/100 g 大鼠体重腹腔麻醉,经背部行双侧卵巢切除术(OVX),尽量保持无菌操作,将输卵管结扎,仔细止血,分层缝合。
- 2.3 给药:造模完成后,阳性组、假手术组及模型组用生理盐水灌胃,每日一次,剂量为 1 ml/100g 大鼠体重。尼尔雌醇组用双蒸水配制成混悬液,以 0.15 mg/100 g 大鼠体重,每周灌胃一次。三仙汤小剂量组用 5.98 g/kg 剂量(相当于人临床等效剂量的 6.5 倍),三仙汤中剂量组用 11.96 g/kg 剂量(相当于人临床等效剂量的 13 倍),三仙汤大剂量组用 23.92 g/kg 剂量(相当于人临床等效剂量的 26 倍),每日灌胃一次。除尼尔雌醇组,其他组均每周给药 6 次,固定在周日停药。每周称量体重一次,计算新的给药量,共持续 3 个月。
- 2.4 取材:全部动物在最后一次喂药后 24 h 称重,收集尿液,由腹主动脉抽取全血,3000 rpm,离心 5

- min 分离血清,-35℃保存。取大鼠下肢左侧股骨,剔尽肌肉及筋膜,置 4℃保存。测定股骨的骨密度及血清中钙、磷、碱性磷酸酶及尿钙、磷等生化指标。
- 2.5 测定:①用全自动生化分析仪及其配套的试剂盒测定大鼠血清中钙、磷、碱性磷酸酶及尿钙、尿磷值;②用 SD-1000 骨矿物测定仪测定大鼠下肢左侧股骨的骨密度,以股骨下端同一位置为测量点,参数包括线骨矿含量(线密度 BMC, g/cm),骨横径(BW, cm)及面骨矿含量(面密度 BMC/BW, g/cm²)。
- 2.6 统计学处理:用 SPSS 统计软件进行统计学处理。结果以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异通过 F 检验和 Q 检验。

3 结果

3.1 大鼠股骨 BMD:表 1 表明,与假手术组比较,模型组大鼠骨密度(BMD)显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,三仙汤小剂量、中剂量、大剂量、阳性组均明显上升($P < 0.01$);三仙汤中剂量组骨密度(BMD)相对较高与阳性组最接近。

表 1 三仙汤对各组骨密度(BMD)的影响

组别	例数(n)	BMD(g/cm ²)
假手术组	8	0.4157 ± 0.0187
模型组	9	0.3721 ± 0.0209 ^{▲▲}
阳性组	8	0.4316 ± 0.0129 ^{▲***}
三仙汤小剂量组	8	0.4252 ± 0.0132 ^{***}
三仙汤中剂量组	8	0.4315 ± 0.0189 ^{***}
三仙汤大剂量组	8	0.4278 ± 0.0131 ^{***}

注:与假手术组比较[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较[★] $P < 0.05$,^{★★} $P < 0.01$

3.2 血钙:表 2 表明,与假手术组比较,模型组血钙浓度有显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,三仙汤小剂量、中剂量、大剂量、阳性组血钙浓度均有显著上升($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),其中以三仙汤小剂量组血钙浓度最高。

表 2 三仙汤对各组血钙浓度的影响

组别	例数(n)	Ca(mmol/L)
假手术组	6	2.4750 ± 0.0745
模型组	7	2.3543 ± 0.0428 [▲]
阳性组	9	2.5044 ± 0.0820 ^{★★}
三仙汤小剂量组	6	2.5083 ± 0.0697 ^{★★}
三仙汤中剂量组	6	2.4767 ± 0.0753 ^{★★}
三仙汤大剂量组	6	2.4517 ± 0.1364 [★]

注:与假手术组比较[▲] $P < 0.01$; 与模型组比较[★] $P < 0.05$,^{★★} $P < 0.01$

3.3 血磷:表 3 表明,与假手术组比较,模型组血磷浓度明显下降($P < 0.05$);与模型组比较,三仙汤小剂量组、中剂量组、大剂量组、阳性组血磷浓度均明显上升($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),其中以三仙汤大剂量组血磷浓度最高。

表 3 三仙汤对各组血磷浓度的影响

组别	例(n)	P(mmol/L)
假手术组	7	2.2843 ± 0.3158
模型组	8	2.0288 ± 0.1932 [▲]
阳性组	7	2.1871 ± 0.0995 [*]
三仙汤小剂量组	6	2.2783 ± 0.2131 [*]
三仙汤中剂量组	6	2.2667 ± 0.1680 ^{**}
三仙汤大剂量组	6	2.3000 ± 0.1577 ^{**}

注:与假手术组比较[▲] $P < 0.05$; 与模型组比较^{*} $P < 0.05$,
^{**} $P < 0.01$

3.4 血清碱性磷酸酶:表 4 说明,与假手术组比较,模型组血清碱性磷酸酶浓度升高($P > 0.05$);与模型组比较,三仙汤小剂量、中剂量、大剂量组均明显上升($P < 0.05$),其中小剂量组最高,而阳性组明显降低($P < 0.05$);与阳性组比较,三仙汤小剂量、中剂量、大剂量组均明显上升($P < 0.01$)。

表 4 三仙汤对各组血清碱性磷酸酶浓度的影响

组别	例(n)	ALP(IU/L)
假手术组	6	36.8333 ± 12.5764
模型组	8	42.6250 ± 9.5310
阳性组	8	30.6250 ± 9.6353 [*]
三仙汤小剂量组	6	69.1667 ± 27.7951 ^{▲*}
三仙汤中剂量组	6	61.0000 ± 17.1697 ^{▲▲*}
三仙汤大剂量组	6	58.3333 ± 15.6929 ^{▲*}

注:与假手术组比较[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较^{*} $P < 0.05$

3.5 尿钙:表 5 表明,与假手术组比较,模型组尿钙值明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,三仙汤小剂量组、中剂量组、大剂量组、阳性组均有所下降($P > 0.05$),其中以三仙汤小剂量组下降最明显。

表 5 三仙汤对各组尿钙浓度的影响

组别	例(n)	尿钙(mmol/L)
假手术组	8	0.4513 ± 0.3254
模型组	8	1.0389 ± 0.7299 [▲]
阳性组	7	0.6286 ± 0.5054
三仙汤小剂量组	9	0.5722 ± 0.0533
三仙汤中剂量组	8	0.9825 ± 0.7538
三仙汤大剂量组	9	0.6200 ± 0.4799

注:与假手术组比较[▲] $P < 0.05$

3.6 尿磷:表 6 表明,与假手术组比较,模型组尿磷有所增高($P > 0.05$);与模型组比较,三仙汤小剂量组、中剂量组、大剂量组均明显下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),其中以三仙汤小剂量组下降最明显。

表 6 三仙汤对各组尿磷浓度的影响

组别	例(n)	尿磷(mmol/L)
假手术组	9	0.6263 ± 0.4396
模型组	8	0.8700 ± 0.8105
阳性组	9	0.8200 ± 0.3960
三仙汤小剂量组	9	0.1289 ± 0.1570 ^{▲▲}
三仙汤中剂量组	8	0.2213 ± 0.1479 [▲]
三仙汤大剂量组	9	0.1822 ± 0.1929 [▲]

注:与模型组比较[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$

4 讨论

4.1 中医学认为,骨质疏松症的主要病因是肾虚,也与肝脾的病变有关。三仙汤以淫羊藿、仙鹤草、仙茅为主组成,全方具有补益肝肾、健脾补虚、活血强身等功效。临床实践和前期的实验研究均表明三仙汤能明显改善骨质疏松症患者症状^[1]。雌激素替代治疗能直接改善绝经后妇女骨代谢,降低骨质疏松症骨折的危险程度^[2],因此选用尼尔雌醇作为阳性对照药,对比三仙汤的作用疗效。

4.2 骨密度测量是诊断骨质疏松症的重要指标。本实验结果显示,大鼠去卵巢后骨密度显著下降,三仙汤和尼尔雌醇都能明显升高去卵巢大鼠的骨密度水平,促进骨质形成。三仙汤中剂量组骨密度(BMD)相对较高,较阳性组接近($P > 0.05$),说明三仙汤中剂量对去卵巢大鼠骨密度的影响与尼尔雌醇相近。

4.3 骨是人体中钙、磷的最大储库,通过成骨与溶骨作用不断与细胞外液进行钙磷交换,以维持血钙和血磷的平衡。本实验研究显示:在血钙方面,三仙汤能明显升高去卵巢大鼠的血钙浓度,并能使去卵巢大鼠的血钙浓度维持甚至高于正常水平,其中以三仙汤小剂量组作用最明显,甚至具有优于尼尔雌醇的作用;在血磷方面,三仙汤能明显升高去卵巢大鼠的血磷水平,并有优于尼尔雌醇的趋势,同时三仙汤大剂量组不但能升高去卵巢大鼠血磷浓度,而且使血磷浓度维持甚至高于正常水平;在尿钙方面,三仙汤能减少去卵巢大鼠钙的丢失,其中以三仙汤小剂量组作用最明显,有优于尼尔雌醇的趋势;在尿磷方面,三仙汤能明显减少去卵巢大鼠磷的丢失,且其作用明显优于尼尔雌醇,其中以三仙汤小剂量组减少磷的丢失最明显。综合分析表明:三仙汤能升高去卵巢大鼠血钙、血磷水平,降低尿钙、尿磷浓度,从而有利于钙磷的吸收和利用,促进骨形成,在骨代谢和骨转换中起到了积极的作用。其中三仙汤小剂

(下转第 121 页)

- [21] Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. Science, 2000, 289: 1508-1514.
- [22] Choy EHS, Panayi G. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. N Engl J Med, 2001, 344: 907-915.
- [23] Aarvak T, Chabaud M, Miossec P, et al. IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. J Immunol, 1999, 162: 1246.
- [24] Iubberts E, Van den Berselaar L. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-KappaB ligand/osteoprotegerin balance. J Immunol, 2003, 170: 2655-2662.
- [25] Kong YY, Feige U, Sarosi I, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. Nature, 1999, 402: 304-309.
- [26] Assuma R, Oates T, Cochran D, et al. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. J Immunol, 1998, 160: 43-49.
- [27] Hara Y, Ukai T, Yoshimura A, et al. Histological study of CD4 and CD8 positive T cells on bone resorption induced by Escherichia coli endotoxin. Calcif Tissue Int, 1998, 63: 63-66.
- [28] Teng TA, Nguyen H, Gao X, et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. J Clin Invest, 2000, 106: R59-R67.
- [29] Sharrock WJ. Bone and the hematopoietic and immune systems: a report of the proceedings of a scientific workshop. J Bone Miner Res, 1998, 13: 537-543.
- [30] Buchinsky FJ, Ma Y, Mann GN, et al. T lymphocytes play a critical role in the development of cyclosporinA-induced osteopenia. Endocrinology, 1996, 137: 2278-2285.
- [31] John V, Hock JM, Short LL, et al. A role for CD8 T lymphocytes in osteoclast differentiation *in vitro*. Endocrinology, 1996, 137: 2457-2463.
- [32] Greevick D, Lee SK, Marusic A, et al. Depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in mice *in vivo* enhances 1, 25-dihydroxyvitamin D3-stimulated osteoclast-like cell formation *in vitro* by a mechanism that is dependent on prostaglandin synthesis. J Immunol, 2000, 165: 4231-4238.
- [33] Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, et al. IL-12 alone and in synergy with IL-18 inhibits osteoclast formation *in vitro*. J Immunol, 2001, 166: 4915-4921.
- [34] Horwood NJ, Udagawa N, Elliott J, et al. Interleukin 18 inhibits osteoclast formation via T cell production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor. J Clin Invest, 1998, 101: 595-603.
- [35] Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, et al. T cell mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- γ . Nature, 2000, 408: 600-605.
- [36] Shinoda K, Sagiya E. Resting T cell negatively regulate osteoclast generation from peripheral blood monocytes. Bone, 2003, 33: 711-720.
- [37] Kobayashi Y, Hashimoto F. Force-induced osteoclast apoptosis *in vivo* is accompanied by elevation in transforming, growth factor and osteoprotegerin expression. J Bone Miner Res, 2000, 15: 1924-1934.
- [38] Marusic A, Greevick D, Katavic V. New bone induction by bone matrix and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the mouse. Croat Med J, 1996, 37: 237-244.
- [39] Dikic I, Marusic A, Vukieevic S, et al. New bone induction by demineralized bone matrix in immunosuppressed rats. Experientia, 1992, 48: 783-785.