

大黄素和小剂量雌激素合用对去卵巢大鼠骨质疏松的预防作用

刘钰瑜 崔燎 吴铁 姚卫民 许碧连 邹丽宜

摘要：目的 观察大黄素和小剂量雌激素联合应用对去卵巢大鼠骨质疏松的预防作用。方法 3 月龄大鼠双侧卵巢去除术后预防用药 90 d。用骨组织形态计量学方法，测定大鼠胫骨近端松质骨静态参数和动态参数，观察骨物理生长指标、血清生化指标和器官指数。结果 大黄素 $90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和己烯雌酚 $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 联合应用可抑制去卵巢大鼠的破骨细胞活性，完全对抗其骨转化率增高和骨量丢失的骨质疏松症状，与己烯雌酚 $30 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的作用相当，且降低己烯雌酚对子宫和肝脏的刺激作用。结论 大黄素和小剂量己烯雌酚联合应用可预防去卵巢大鼠骨质疏松。

关键词：大黄素；己烯雌酚；联合用药；去卵巢大鼠；骨质疏松；骨组织形态计量学

Combination of emodin with low dose estrogen showed synergetic effect on ovariectomy induced osteopenia in rats LIU Yuyu, CUI Liao, WU Tie, et al. Department of Pharmacology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China

Abstract : **Objective** To determine whether emodin in combination with low dose estrogen can completely prevent bone loss in ovariectomized rats. **Methods** Thirty-two Sprague-Dawley female rats at age of 3 months were sham-operated and treated orally with vehicle, or ovariectomized (OVX) and treated orally with either vehicle or diaethylstilbestrol or low dose diaethylstilbestrol combination with emodin for 90 days. Double in vivo fluorochrome labeling was administrated. The undecalcified longitudinal proximal tibial metaphyseal sections were used for the bone histomorphometric analysis. **Results** After 90 days post OVX the cancellous bone mass and showed high bone turnover indices. The low dose of estrogen combined with emodin treated group prevented bone loss equals to that the high dose of estrogen alone did. These two groups were shown to inhibit osteoclasts surface and decrease bone turnover rate. High dose of estrogen was found to inhibit growth and stimulate uterin and liver weight gain markedly while low dose of estrogen combined with emodin did not stimulate uterin and liver weight markedly. **Conclusions** Use of low dose of estrogen plus emodin showed effect on prevention of OVX-induced cancellous bone loss in rats.

Key words : Emodin ; Diaethylstilbestrol ; Drug combination ; Ovariectomized rat ; Osteoporosis ; Bone histomorphometry

绝经后骨质疏松症是因雌激素缺乏引起的以骨量减少、骨微结构蜕变和脆性增加为特征的代谢性疾病，其发病机制尚未明确。雌激素替代疗法疗效确切，但其使用存在争议^[1,2]。有文献报道，大黄素有雌激素样作用和抑制破骨细胞的作用^[3-5]，我们在实验中也发现其有促进成骨细胞分化的作用^[6]，那么其与小剂量雌激素合用，能否有高剂量雌激素同

样的防治作用？而且合用通过降低雌激素的用量，还可减少高剂量雌激素带来的毒副作用。本文观察二者联合用药对去卵巢大鼠骨质疏松的预防作用，为 大黄素防治骨质疏松提供初步实验依据。

1 材料和方法

1.1 药品及试剂

大黄素标准品(陕西省物资产业集团总公司)，己烯雌酚(广东彼迪药业有限公司，批号：20010601)，钙黄绿素、盐酸四环素、Goldner's 染色试剂(美国 Sigma 公司)，甲基丙烯酸甲酯(北京化工

作者单位：524023 湛江，广东医学院药理教研室(刘钰瑜、崔燎、吴铁、许碧连、邹丽宜) 广东医学院呼吸疾病研究所(姚卫民)

通讯作者：刘钰瑜，Email: liuyuyu22@yahoo.com

厂),邻苯二甲酸二丁酯(天津市化学试剂一厂),过氧化苯甲酰(广州化学试剂厂),氯胺 T(中国医药集团上海化学试剂公司),对二甲替氨基苯甲醛(广州化学试剂厂),高密度脂蛋白胆固醇测定试剂盒(宁波市慈城生化试剂厂),总胆固醇测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司),碱性磷酸酶测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司)。

1.2 仪器

低速锯(Buehler LTD. USA),硬组织切片机(德国 Leica 2155),碳化钨刚刀(德国 Leica 公司产品),自动化图像数字化分析仪包括光镜和荧光显微镜(Nikon ,日本),骨组织形态计量学测量软件(KSS Scientific Consultants ,UT USA),酶标仪(Bio-ELx-800 型 ,美国),电感耦合等离子体直读光谱仪(日本岛津公司),752 紫外光栅分光光度计(上海第三分析仪器厂),AE 240 电子天平(Mettler-Toledoinstr ,shanghai Ltd)。

1.3 动物及其分组

3 月龄未交配的雌性 SD 大鼠(中国科学院上海实验动物中心提供)32 只 ,普通级 ;分笼饲养 ,饲养于室温 23℃ ,相对湿度 80% 的清洁环境中 ,自由摄食和饮水 ,使用标准饲料 ,其中钙含量 1.33% ,磷含量 0.95% 。随机分成 4 组 ,1 组 :假手术组 ,2 组 :去卵巢组 ,3 组 :阳性对照组 ,4 组 :联合用药组 ;每组 8 只。1 组和 2 组灌胃 5.4% 的乙醇溶液 5 ml · kg⁻¹ · d⁻¹ (溶剂对照) ,3 组灌胃己烯雌酚 30 μg · kg⁻¹ · d⁻¹ ,4 组灌胃己烯雌酚 5 μg · kg⁻¹ · d⁻¹ 和大黄素 90 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 。所有动物给药时间为 90 d 。在动物处死前第 14、13 天和第 4、3 天分别皮下注射盐酸四环素 30 mg · kg⁻¹ 和钙黄绿素 5 mg · kg⁻¹ 进行荧光标记 ,以

观察骨形成的动态参数。

1.4 骨标本的制备和处理

所有动物用戊巴比妥钠麻醉后心脏抽血处死 ,分离血清 ,用电感耦合等离子体直读光谱仪测定钙、磷含量 ;分别采用连续监测法、磷钨酸 - 镁沉淀法、酶比色法(CHOD-PAP 法)测定血清中碱性磷酸酶、高密度脂蛋白胆固醇和总胆固醇的含量。分离肌肉 ,取下胫骨 ,用慢速锯在近端作矢状打开髓腔 ,进行固定、脱水、包埋 ,按文献 [4] 方法制成 4 和 8 μm 切片 ,4 μm 切片用 Goldner's trichrome 染色封片 ,进行破骨细胞测量。8 μm 切片不染色封片测量有关动静态参数 ,并按公式计算出相应的参数 ,取出内脏器官称重。左侧股骨 80℃ 恒温烘烤至恒重后用 AE 240 电子天平称重 ,以及测量骨物理生长指标。

1.5 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。SPSS 11.0 软件行方差分析并行 Bonferroni 组间比较 ,双侧 $P < 0.05$ 为统计检验显著性标准。

2 结果

2.1 对去卵巢大鼠内脏指数的影响

器官湿重除以体重得器官重量指数。去卵巢后脑和子宫重量指数明显下降 ,肾脏指数略有下降。己烯雌酚能使脑、子宫和肾重量指数回复 ($P < 0.01$) ,大黄素和低剂量己烯雌酚合用也能使脑和肾重量指数回复。

2.2 对去卵巢大鼠血清生化指标的影响

去卵巢后血清碱性磷酸酶(ALP)含量明显升高。己烯雌酚组和联合用药组均不能使碱性磷酸酶含量下降。己烯雌酚组与去卵巢组比较 ,高密度脂

表 1 大黄素和己烯雌酚对去卵巢大鼠内脏指数的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$ g/100 g)

组别	体重/g	肝脏指数	脾脏指数	肾脏指数	胸腺指数	脑指数	子宫指数
假手术组	267 ± 23	2.62 ± 0.20	0.23 ± 0.03	0.55 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.73 ± 0.05	0.38 ± 0.18
去卵巢组	312 ± 24 [#]	2.29 ± 0.31	0.26 ± 0.06	0.48 ± 0.06 [*]	0.08 ± 0.02	0.59 ± 0.05 [#]	0.04 ± 0.01 [#]
己烯雌酚组	250 ± 19 [△]	3.70 ± 0.61 ^{#△}	0.26 ± 0.09	0.61 ± 0.06 [△]	0.08 ± 0.02	0.74 ± 0.04 [△]	0.28 ± 0.05 [△]
联合用药组	265 ± 23 [△]	3.03 ± 0.18 ^{△☆}	0.24 ± 0.03	0.59 ± 0.02 [△]	0.08 ± 0.02	0.75 ± 0.10 [△]	0.17 ± 0.05 [#]

注 :与假手术组比较^{*} $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$;与去卵巢组比较[△] $P < 0.01$;与己烯雌酚组比较[☆] $P < 0.01$

表 2 大黄素和己烯雌酚对去卵巢大鼠血清生化指标的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	钙 (μg/ml)	磷(μg/ml)	高密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L)	总胆固醇 (mmol/L)	碱性磷酸酶 (U/L)
假手术组	115.2 ± 12.8	85.0 ± 16.1	1.25 ± 0.26	2.43 ± 0.36	23.20 ± 6.86
去卵巢组	114.3 ± 3.3	77.0 ± 8.7	1.10 ± 0.17	2.66 ± 0.16	36.16 ± 9.41 [*]
己烯雌酚组	125.0 ± 5.1	80.3 ± 5.2	0.64 ± 0.08 ^{#☆}	2.06 ± 0.23 [☆]	41.51 ± 13.11 [#]
联合用药组	114.3 ± 4.7	94.1 ± 4.6 [△]	1.05 ± 0.14 [★]	2.33 ± 0.30	26.65 ± 6.55 [▲]

注 :与假手术组比较^{*} $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$;与去卵巢组比较[△] $P < 0.05$,[☆] $P < 0.01$;与己烯雌酚组比较[▲] $P < 0.05$,[★] $P < 0.01$

蛋白胆固醇(HDL)和总胆固醇(CHO)的含量明显降低。

2.3 对去卵巢大鼠骨物理指标的影响

去卵巢后骨重指数明显下降 ,己烯雌酚组和联合用药组骨重指数恢复正常 ,与去卵巢组比较 ,差异有统计学意义($P < 0.01$)。去卵巢后股骨长度和股骨宽度无明显变化。

表 3 大黄酒和己烯雌酚对去卵巢大鼠骨物理指标的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	骨干重/体重(g/100 g)	股骨长度(mm)	股骨宽度(mm)
假手术组	0.21 ± 0.01	32.3 ± 0.7	4.1 ± 0.2
去卵巢组	0.18 ± 0.02 *	33.2 ± 1.0	4.3 ± 0.2
己烯雌酚组	0.22 ± 0.01 #	32.2 ± 1.1	4.2 ± 0.1
联合用药组	0.21 ± 0.02 #	32.2 ± 1.2	4.2 ± 0.3

注 :与假手术组比较 * $P < 0.01$;与去卵巢组比较 # $P < 0.01$

2.4 对去卵巢大鼠胫骨松质骨形态计量学静态参数的影响

表 4 大黄酒和己烯雌酚对去卵巢大鼠骨形态计量学静态参数的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	骨小梁面积(%)	骨小梁数目(mm ⁻¹)	骨小梁宽度(μ m)	骨小梁分离度(μ m)	破骨细胞数目(mm ⁻²)	破骨细胞周长(%)
假手术组	19.39 ± 5.26	3.45 ± 0.84	56.09 ± 4.58	257.32 ± 115.51	3.7 ± 1.4	0.53 ± 0.20
去卵巢组	4.04 ± 2.51 #	0.77 ± 0.51 #	52.55 ± 7.40	2307.72 ± 2347.16 *	15.4 ± 6.4 #	2.02 ± 0.87 #
己烯雌酚组	11.89 ± 2.99 # ☆	2.33 ± 0.63 # ☆	51.55 ± 2.72	414.08 ± 161.46 ^	3.4 ± 1.9 ☆	0.52 ± 0.24 ☆
联合用药组	9.84 ± 2.95 # ^	1.72 ± 0.28 # ^	57.46 ± 16.82	537.10 ± 89.90 ^	4.9 ± 2.8 ☆	0.71 ± 0.40 ☆

注 :与假手术组比较 * $P < 0.05$, # $P < 0.01$;与去卵巢组比较 ^ $P < 0.05$, ☆ $P < 0.01$

表 5 大黄酒和己烯雌酚对去卵巢大鼠松质骨形态计量学动态参数的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	标记周长分数(%)	百矿化沉积率(μ m/d)	骨表面骨形成率 BFR/BS(%/y)	转换率 BFR/BV(%/y)	骨组织形成率 BFR/TV(%/y)
假手术组	26.36 ± 4.98	0.67 ± 0.09	6.43 ± 1.46	191.61 ± 42.99	36.31 ± 10.18
去卵巢组	35.30 ± 7.85	0.98 ± 0.18 #	12.84 ± 4.38 #	405.87 ± 120.15 #	17.26 ± 11.69 #
己烯雌酚组	23.36 ± 7.93	0.64 ± 0.08 ☆	5.62 ± 2.37 ☆	179.30 ± 69.02 ☆	20.62 ± 7.19 *
联合用药组	22.41 ± 10.52 ^	0.62 ± 0.11 ☆	5.45 ± 3.01 ☆	192.76 ± 103.33 ☆	14.81 ± 8.90 #

注 :与假手术组比较 * $P < 0.05$, # $P < 0.01$;与去卵巢组比较 ^ $P < 0.05$, ☆ $P < 0.01$

3 讨论

3.1 去卵巢大鼠松质骨呈现高转换骨质疏松状态

骨形态计量学结果显示 ,3 月龄雌性大鼠去卵巢 90 d 后骨量明显减少 ,伴随骨吸收和骨形成同时增加 ,呈现高转换骨质疏松状态 ,显示典型的去卵巢骨质疏松模型的改变。大鼠去卵巢后骨骼的改变是由于体内雌激素迅速降低所致 ,该表现与绝经后妇女的改变有一定的相似。

去卵巢后大鼠体重明显增加是因为血中雌激素水平降低 ,肾上腺分泌雌酮在脂肪组织加速转化为雌激素 ,以弥补血中不足 ,从而导致体重增加。去卵巢大鼠血清碱性磷酸酶明显增加是由于去卵巢后雌

去卵巢大鼠与对照大鼠比较 ,90 d 后骨量(Tb.Ar)丢失 ,骨小梁数目(N·Tb)减少和骨小梁分离度(TbSp)增加 ,伴随明显的破骨细胞周长(%Oc.Pm)增加($P < 0.01$)。己烯雌酚组和联合用药组的骨量和骨小梁数目明显增加 ,破骨细胞数目和周长降低 ,与去卵巢组比较 ,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.5 对去卵巢大鼠胫骨松质骨形态计量学动态参数的影响

去卵巢大鼠与对照大鼠比较 ,90 d 后骨形成指标明显增加 ,矿化沉积率(MAR)、骨形成率(BFR/BS 和 BFR/BV)明显增加($P < 0.01$)。己烯雌酚以及大黄酒和低剂量己烯雌酚合用能抑制去卵巢后骨形成参数的增加(MAR、BFR/BS 和 BFR/BV 降低 , $P < 0.01$)。

激素的缺乏导致破骨细胞活性增强 ,因偶联作用成骨细胞活性提高 ,活跃的成骨细胞分泌大量骨型碱性磷酸酶 ,一部分参与骨的矿化 ,一部分释放到血液中 ,使血中碱性磷酸酶含量增加。

3.2 大黄酒和己烯雌酚联合应用对去卵巢大鼠骨质疏松有预防作用

本实验用疗效肯定的雌激素己烯雌酚作为阳性对照药。结果显示 ,己烯雌酚能对抗去卵巢所导致的骨丢失。能使骨重指数恢复 ,增加去卵巢后的骨量和骨小梁数目 ,减少破骨细胞周长 ,抑制去卵巢所引起的骨形成参数的增加。原因在于抑制了破骨细胞的活性 ,破骨细胞的活性降低从而抑制去卵巢后骨吸收增加所偶联的骨形成增加。雌激素预防去

卵巢引起的大鼠骨质疏松作用的特点正是同时明显抑制骨吸收和骨形成^[7],从而降低了去卵巢后破骨活性增加和降低骨高转换率,增加骨量。雌激素替代疗法应用广泛,确有疗效,但因其不良反应而使应用受限。实验中己烯雌酚以 $30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量应用时,明显抑制动物增长,过度刺激肝脏增重和明显刺激子宫增生。而当己烯雌酚以 $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量和大黄素联合应用时,对肝脏刺激作用较轻,不过度刺激子宫。而对抗去卵巢所导致的骨丢失的作用与高剂量己烯雌酚相当。实验所选择的大黄素的剂量是参考文献中大黄素用于抗炎、保护肝、肾损伤和抗肝纤维化的有效剂量^[8-11]而制定的。有文献报道,大黄素具有雌激素样作用,可使去势雌性大鼠迅速恢复性周期,临床试用,有卵泡激素样功效,口服对痛经、子宫内膜炎等病人,有类似雌激素的效用,并且与雌激素受体有高度的亲和力,激动受体产生生物效应^[3,4]。另外,大黄素有抗超氧负离子自由基的活性和延缓衰老的作用,其对脂代谢的影响和对脂肪细胞分化方面的调节作用可能也有利于骨质疏松的治疗^[12,13]。我们在体外实验也发现大黄素能促进大鼠成骨细胞分化,还可通过增加骨保护蛋白 OPG mRNA 的表达,从而抑制破骨细胞的分化、成熟^[6]。而且大黄素毒副作用少,药源丰富。本实验所用剂量的大黄素或其他剂量的大黄素单用能否也有预防去卵巢大鼠骨质疏松的药理作用值得做进一步的研究。

【参 考 文 献】

- [1] Doren M. Hormonal replacement regimens and bleeding. *Maturitas*, 2000, 34(Suppl 1) S17-S23.
- [2] Schneider HP. HRT and cancer risk :separating fact from fiction. *Maturitas*, 1999, 33(Suppl 1) S65-S72.
- [3] Matsuda H ,Shimoda H ,Morikawa T ,et al. Phytoestrogen from the roots of polygonum cuspidatum(Polygonaceae):Structure-requirement of hydroxyanthraquinones for estrogenic activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2001 ,11 :1839-1842.
- [4] Usui T ,Ikeda Y ,Tagami T ,et al. The phytochemical lindleyin , isolated from Rhei rhizoma , mediates hormonal effects through estrogen receptors. *J Endocrinol* 2002 ,175 :289-296.
- [5] 史凤芹,于世凤,张润荃,等. 大黄对破骨细胞性骨吸收作用的研究. *现代口腔医学杂志*, 1995, 9 :193-195.
- [6] 刘钰瑜,崔燎,吴铁,等. 大黄素对体外培养新生大鼠颅骨成骨细胞的影响. *中国药理学通报* 2005, 21 :235-240.
- [7] 崔燎,吴铁,刘晓青,等. 人参茎叶皂苷与小剂量雌激素联合用药防治去卵巢大鼠骨丢失. *药学报* 2002, 37 :501-505.
- [8] 祁红. 大黄素的抗炎作用. *中草药*, 1999, 30 :522-524.
- [9] 展玉涛,魏红山,王志荣,等. 大黄素对大鼠四氯化碳性肝损伤保护作用的实验研究. *中国中医药科技* 2000, 7 :30-31.
- [10] 王军,鲁盈,杨汝春,等. 大黄素防治糖尿病大鼠早期肾损伤的实验研究. *浙江医学* 2000, 22 :723-726.
- [11] 展玉涛,卫新革,陈颖伟,等. 大黄素对肝纤维化大鼠血清透明质酸的影响. *中西医结合肝病杂志*, 1999, 9 :27.
- [12] Huang SS ,Yeh SF ,CY Hong. Effect of anthraquinone derivatives on lipid peroxidation in rat heart mitochondria : structure-activity relationship. *J Nat Prod* 1995, 58 :1365-1371.
- [13] Zhang CB ,Teng L ,Shi Y ,et al. Effect of emodin on proliferation and differentiation of 3T3 L1 preadipocyte and FAS activity. *Chin Med J*, 2002, 115 :1035-1038.

(收稿日期 :2005-04-26)