

红景天预防高原去势大鼠骨质疏松症的实验研究

白孟海 葛宝丰 王琦 郑荣

摘要：目的 探讨红景天预防高原去势大鼠骨质疏松症的作用。方法 在海拔 3100 m 高原建立去势大鼠骨质疏松模型，分为 A 组正常组（假手术组）、B 组模型组（去除卵巢组）、C 组阳性组（去除卵巢 + 尼尔雌醇组）、D 组红景天组（去除卵巢 + 红景天混合饲料组）。术后 3 个月，测血清 IL-6、TNF- α 和尿 DPD 含量指标，观察骨组织切片变化，观察红景天对高原去势大鼠骨质疏松的预防作用。结果 A 组、C 组和 D 组 IL-6、TNF- α 和尿 DPD 含量均显著低于 B 组。A 组、C 组和 D 组被测 3 项内容之间比较，差异无显著性。骨组织切片显示：B 组骨小梁变细、变稀，并见断裂现象。C、D 组组织结构基本与正常组一样，骨小梁分布均匀，结构粗细一致。结论 红景天能有效降低高原去势大鼠血清 IL-6、TNF- α 含量和尿 DPD 排泄浓度，提高骨密度，具有抗高原组织缺氧抑制骨吸收和促进骨形成的作用。
关键词：高原；骨质疏松；绝经后；IL-6；TNF- α ；DPD

Experimental study of preventing ovariectomized rats from osteoporosis by CO-RADIOD(RACC) BAI Menghai ,GE Baofeng ,WANG Qi ,et al . The Institute of Lanzhou General Hospital ,Lanzhou 730050 ,China

Abstract : Objective To discuss the effect of CO-RADIOD(RACC) on the prevention of osteoporosis in ovariectomized rats in high altitude area. **Methods** The models of ovariectomized rats were made at high altitude , which were divided into group A(Sham operation group) ,group B(ovariectomized group) ,group C(ovariectomized + nilestriol) and group D(ovariectomized + mixed feed of RACC). The concentration of IL-6 ,TNF- α and urine DPD in the serum were measured and changes of bone tissue section were observed. **Results** The concentration of IL-6 , TNF- α and urine DPD in group A ,C and D were significantly lower than that in group B. **Conclusions** CO-RADIOD(RACC) could decrease the concentration of IL-6 ,TNF- α and urine DPD and improve the density of bone tissue ,and inhibit bone absorption and improve bone forming.

Key words : High altitude ; Osteoporosis ; Postmenopause ; IL-6(Interleukin-6) ; TNF- α (Tumor necrosis factor- α) ; DPD

高原高寒地区因缺氧，可导致机体生理功能的改变^[1]。有关高原缺氧环境下白细胞介素-6(IL-6) 和肿瘤坏死因子(TNF- α) 的变化已有报道^[2]。本实验在高原地区建立了去势大鼠骨质疏松模型，采用随机分组原则，观察红景天对高原去势大鼠 IL-6、TNF- α 含量的影响及骨组织结构病理变化。旨在探讨红景天抗高原组织缺氧和预防骨质疏松症的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

5 月龄健康雌性 Wistar 大白鼠 45 只，体重 220 ~ 240 g，由本院动物实验科提供。药物：阳性对照药物尼尔雌醇（北京四环制药有限公司生产，每片 1 mg，批号 20031002）使用前生理盐水配制浓度为 0.2 mg/ml 悬液。麻醉药：3% 戊巴比妥钠（上海化学试剂采购供应站分装厂）。治疗药物：红景天混合饲料参照黄增艳方法^[3]加工，红景天根茎洗净烘干，粉碎 100 目筛。制成干粉备用。将一定量的红景天干粉混入少量的普通饲料中制成颗粒状混凝合饲料。

1.2 实验分组及造模方法

将大鼠随机分为 4 组：A 组正常组（假手术组），B 组模型组（去除卵巢组），C 组阳性对照组（去除卵巢 + 尼尔雌醇组），D 组红景天组（去除卵巢 + 红景天混合饲料组）；每组 15 只。各组大鼠均用 3% 戊

巴比妥溶液按 0.1 ml/100 g 体重腹腔麻醉 ,从腹侧入路完整切除双侧卵巢 ,止血缝合 ,正常组行假手术 ,采用腹侧入路 ,切除皮下组织少许立即关闭。

1.3 饲养及给药途径

所有实验动物术后在青海海北州地区海拔 3100 m 同等条件下饲养。C 组术后 3 d 给予尼尔雌醇 0.6 ml/100 g 体重 ,每周灌胃 1 次。D 组术后 3 d 喂红景天干粉混合饲料 ,含红景天 3 g/220 g 体重 ,不足补给普通饲料 ,自由饮水。

1.4 血清 IL-6、TNF-α 和尿 DPD 测定

各组大鼠 3 个月后 ,采集尾巴静脉血 1.5 ml ,4℃离心分离血清 ,置负 30℃冰箱待测。血清 IL-6、TNF-α 含量测定采用放射免疫分析法 ,试剂盒均购于解放军总医院科技开发中心放免所 ,所用仪器为中科院上海原子核日环仪器厂生产的 SN-682 型放射免疫 γ 计数仪。尿脱氧吡啶酚 (DPD) 测定采用化学发光免疫法 ,用美国 METRA 公司生产的 ELISA 试剂盒检测。仪器为美国 CHIRON 公司生产的 ASC 180 全自动免疫分析仪。

1.5 股骨胫骨端组织学观察

术后 3 个月 ,处死实验大鼠 ,剥离右侧股骨 ,置 4% 多聚甲醛固定 48 h ,10% EDTA 脱钙 4 周 ,取胫骨端沿髁间窝纵切 1.5 cm 的骨组织 ,梯度脱水 ,浸透包埋切片 ,HE 染色 ,光镜观察。

1.6 统计学处理

IL-6、TNF-α 和 DPD 测定值均采用 SPSS 10.0 版本统计分析 ,结果用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。

2 结果

术后 3 个月 ,正常组 (A 组) 、阳性组 (C 组) 和红景天组 (D 组) 大鼠血清 IL-、TNF-α 含量和尿 DPD 排泄浓度显著低于模型组 ($P < 0.01$)。正常组、阴性组和红景天组之间比较 ,差异无显著性 ,见表 1。

表 1 红景天对高原去势大鼠血清 IL-6、TNF 和尿 DPD 含量影响比较 ($n = 15$)

组 别	IL-6	TNF-α	DPD
正常组	65.65 ± 6.68*	4.91 ± 0.86*	168.21 ± 2.40*
模型组	82.63 ± 8.40	7.52 ± 2.32	273.21 ± 2.40
阳性组	67.75 ± 5.32*	5.06 ± 1.09*	174.94 ± 1.76*
红景天组	68.52 ± 6.41*	5.62 ± 0.11*	175.75 ± 1.60*

注 :与模型组比较 * $P < 0.01$

股骨组织学观察 模型组见骨小梁变细 ,分布稀疏 ,并见断裂现象 (图 1)。

阳性组和红景天组组织学结构与正常组基本一样 ,骨小梁分布均匀 ,未见断裂现象 (图 2)。

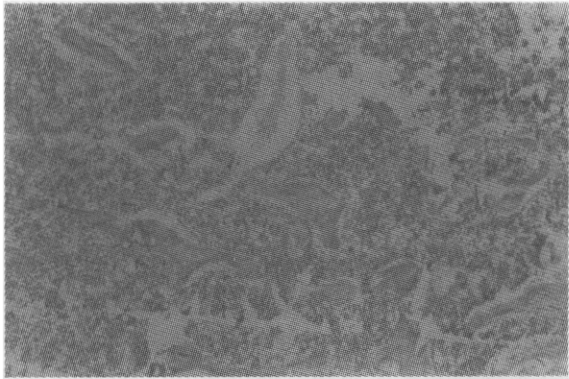


图 1 阳性组 ,股骨组织中骨小梁变细 ,分布稀疏 ,并见断裂现象 HE 染色 ($\times 40$)

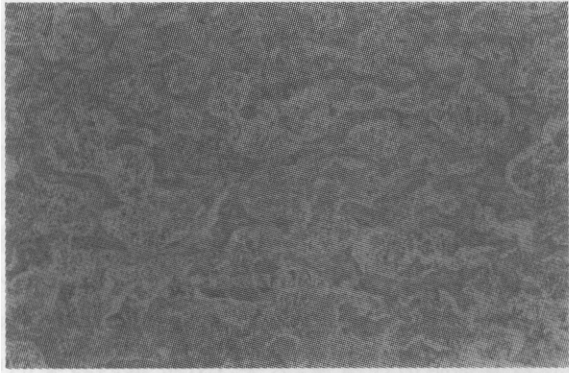


图 2 药物治疗组 ,股骨组织中见骨小梁分布均匀 ,骨小梁数目稠密 HE 染色 ($\times 40$)

3 讨论

高原高寒地区由于缺氧、寒冷和干燥等因素 ,机体器官发生一系列生理变化。其中高原缺氧可引起血清 IL-6 和 TNF-α 含量增加^[2]。而 IL-6 和 TNF-α 血液浓度又和骨代谢有着重要关系^[1,4,5]。

正常骨代谢周期 ,其骨吸收和骨形成维持在一种动态平衡状态。破骨细胞的骨吸收活动和成骨细胞的骨形成活动相互偶联 ,不断进行着骨重建。一旦偶联被打破 ,破骨细胞的活性增强骨吸收活动相对增强或成骨细胞活性降低骨形成活动相对减弱 ,骨吸收大于骨形成发生骨质丢失 ,导致骨质疏松症的发生。

众所周知 ,雌激素的缺乏是绝经后骨质疏松症发病中的重要因素。临床上应用雌激素替代疗法能减少骨质疏松症的发生 ,但雌激素防止骨质疏松的机理一直不很清楚。本实验在高原地区切除实验大

鼠卵巢,造成骨质疏松模型,3个月后测定实验鼠血清中 IL-6、TNF- α 和尿中 DPD 浓度,结果模型组被检测的 3 项内容均显著高于正常组、阳性组和治疗组。进一步证实了 IL-6 和 TNF- α 与骨质疏松有着密切关系。同时推测绝经后骨质疏松症的发生机理可能与 IL-6 和 TNF- α 浓度升高有关。

目前,已证实骨微环境中产生大量的免疫及造血因子,这些复杂的作用相互重叠的因子影响骨的形成和吸收^[6],其中主要包括 IL-6 和 TNF- α 因子,雌激素调节骨髓细胞,骨细胞产生细胞因子,细胞因子调控骨改建的过程。IL-6 是多功能细胞因子,机体许多细胞均产生 IL-6。现已发现人的成骨细胞、破骨细胞、T、B 淋巴细胞、骨髓基质细胞、巨噬细胞和骨肉瘤等均产生 IL-6。体内大量实验证实,IL-6 增加破骨细胞形成,刺激骨吸收。Yoneda 等^[7]发现若将产生 IL-6 的肿瘤移植到裸鼠体内可使裸鼠产生高钙血症,而用 IL-6 抗体治疗这些裸鼠,可使其血钙恢复到正常水平,再次证实了 IL-6 在骨吸收中起着重要作用。用 IL-6 基因缺失的小鼠进行实验,切除这些小鼠卵巢后未出现骨量丢失,而正常小鼠去势后很快出现骨量下降^[8]。这是因为正常小鼠去势后雌激素水平下降,使 IL-6 的表达增加,增强骨质吸收^[9]。TNF- α 是一种强有力的骨吸收诱导剂,可使破骨细胞活性增强,人类 TNF- α 基因转染的中国田鼠细胞可持续产生 TNF- α ,并使裸鼠破骨细胞的骨吸收作用增强,出现高钙血症。TNF- α 可刺激类破骨细胞的前体增殖并分化为破骨细胞。PCR 技术研究表明^[10],绝经后骨质疏松骨折妇女、正常绝经后妇女及绝经后采用雌激素替代疗法妇女 TNF- α mRNA 的表达分别为 63%、60% 和 10%。

DPD 是破骨细胞降解的胶原分解产物,释放入血后经尿排出。由于尿中的 DPD 是未经代谢的,且不受饮食影响,因此能较好的反映骨吸收状况^[11,12]。DPD 在血液和尿中以游离和肽结合形式存在,尿中游离形式占 40%,结合形式占 60%。本实验观察到,模型组 DPD 排泄浓度显著高于正常组、阳性组

和红景天组。而阳性组、正常组和红景天组之间差异无显著性。红景天具有激活能量代谢中的某些酶或辅酶,提高组织细胞能量作用的利用率,延长了供氧时限,同时红景天能降低血液黏度和血小板附聚性,有活血化瘀作用,能改善组织缺氧状态^[13]。实验观察到,红景天能显著降低高原去势大鼠血清 IL-6、TNF-含量和尿中 DPD 排泄浓度,具有较理想的抗高原组织缺氧作用和抑制骨吸收作用。从而可以预防骨质疏松症的发生。

【参 考 文 献】

- [1] 吕永达,主编.高原医学与生理学.第一版.天津科技翻译出版公司,1995.212-217.
- [2] 崔建华,张西洲,何富文,等.健康青年进驻高原血清 TNF- α 和 IL-6 的变化.西北国防医学杂志,1999,20:197-198.
- [3] 黄增艳,范书铎,张蟠,等.红景天对鼠抗疲劳作用实验研究.中国医科大学学报,1996,27:123-124.
- [4] 徐忠世,肖德明,庾智文,等.白细胞介素-6、钙素和骨碱性磷酸酶在大鼠骨质疏松模型中的表达.新乡医学院学报,2004,15:259-260.
- [5] 张娜,杨富生.肿瘤坏死因子受体相关因子 6 与破骨细胞、牙体、牙髓、牙周病学杂志,2004,14:701-704.
- [6] 周丕琪,浓霖,杜靖远,等.绝经后骨质疏松症与血清 IL-6、TNF- α 浓度关系的临床研究.中国骨质疏松杂志,2001,7:1-2.
- [7] Yoneda T, Nakai H, Moriyama K, et al. Neutralizing antibodies to human squamous carcinoma. Cancer Res, 1993, 53:737.
- [8] Suda T, Udagawa N, Nakamura I, et al. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. Bone, 1995, 17:875.
- [9] 蒋玲.细胞因子在调节骨吸收中的作用.国外医学老年医学分册,1995,16:198-201.
- [10] Niwa T, Shiobara K, Hamsde T, et al. Serum pyridinoline as specific makers of bone resorption in hemodialyzed patients. Clin Chem Acta, 1995, 235:33.
- [11] 马维平,马慧萍,辛继胜.尿 DPD 与小鼠实验性骨质疏松相关性研究.武警医学,2003,14:277-279.
- [12] 徐宝军,郑毅男,李向高,等.红景天属植物研究发展.中草药,2000,23:582-583.

(收稿日期:2005-11-28)