

依普拉芬与 17α -炔雌醇合用对去卵巢大鼠子宫和骨的影响

金勋杰 闫景龙 吴铁 李青南

摘要：目的 观察依普拉芬能否抑制 17α -炔雌醇刺激子宫副作用，及对炔雌醇抗骨质疏松作用的影响。方法 52 只 4 月龄 SD 雌性大鼠随机分为 6 组：①假手术组；②去卵巢组；③高炔雌醇组（ $30\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ）；④低炔雌醇组（ $6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ）；⑤依普拉芬（ $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ）；⑥联合用药组（炔雌醇 $6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ + 依普拉芬 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ）。实验 12 周，通过测量子宫内膜厚度及子宫湿重分析用药对子宫的刺激作用，测量骨小梁面积百分率（%Tb.Ar）、荧光周长百分数（%L.Pm）及破骨细胞数量（Oc.N 分别反映骨量、骨形成及骨吸收的变化）。结果 高、低炔雌醇组与去卵巢组比，%Tb.Ar 增加，%L.Pm、Oc.N 减少，子宫湿重及内膜厚度都显著增加。依普拉芬组与去卵巢组比，子宫湿重及内膜厚度、%Tb.Ar、%L.Pm 无显著性差异，Oc.N 减少。联合用药组与去卵巢组比，%Tb.Ar 增加；与低炔雌醇组比，子宫重量、内膜厚度显著降低，联合用药组与正常对照组的子宫内膜厚度无显著性差异。结论 依普拉芬可有效抑制炔雌醇对大鼠子宫刺激作用，与炔雌醇合用可有效防治骨质疏松。

关键词：依普拉芬； 17α -炔雌醇；子宫；骨质疏松；骨组织形态计量学

Effects of combined medication of ipriflavone and 17α -ethinylestradiol on uterus and bones in ovariectomized rats JIN Xunjie, YAN Jinglong, WU Tie, et al. Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524000, China

Abstract : **Objective** To observe the effect of combined medication of ipriflavone (IP) and ethinylestradiol (EE) on uterus and bones in ovariectomized (OVX) rats. **Methods** Fifty-two female SD rats were divided into 6 groups: ① Sham-OVX group; ② OVX group; ③ High EE group ($30\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$); ④ Low EE group ($6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$); ⑤ IP group ($200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$); ⑥ EE + IP group (combined medication of $6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ EE and $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ IP). After 12 weeks of experiment, the bone mass was measured with quantitative bone histomorphometry and the wet weight of the uterus and the endometrium epithelial thickness (EET) was obtained. **Results** The %Tb.Ar, uterine wet weight and EET of high and low EE groups was increased significantly in comparison with the OVX group, while no significant difference was found between the IP and OVX group. The IP + EE group showed increase in %Tb.Ar in comparison with the OVX group and decrease in uterine weight and EET in comparison with the low EE group without significant change when compared with the sham-OVX group. **Conclusions** IP could inhibit the stimulative effect of EE on uterus and prevent osteoporosis when given with EE.

Key words : Ipriflavone; Ethinylestradiol; Uterus; Osteoporosis; Bone histomorphometry

我们过去的研究证明我院研制的补骨胶囊^[1]及其有效成分淫羊藿总黄酮^[2]可有效抑制雌激素刺激子宫内膜增生副作用，且二者与雌激素合用都可有

效预防大鼠骨质疏松。淫羊藿总黄酮是黄酮类化合物，成分仍十分复杂，所以我们想寻找一种单体来代替它。依普拉芬是合成的异黄酮衍生物，文献报道其有一定抗骨质疏松作用^[3]。本实验研究了依普拉芬能否像淫羊藿总黄酮一样抑制雌激素刺激子宫副作用，并同时观察二者联合用药的抗骨质疏松效果。

1 材料和方法

1.1 材料

作者单位：524000 广东湛江，广东医学院附属医院骨外科[现攻读哈尔滨医科大学骨科博士（金勋杰）]，哈尔滨医科大学附属一院骨科（闫景龙），广东医学院药理教研室（吴铁），广东医学院骨生物学研究室（李青南）

通讯作者：吴铁，Email: wutie@gdmc.edu.cn

1.1.1 药品及试剂 依普拉芬由武汉滨湖制药厂生产。17 α -炔雌醇购自 Sigma 公司。钙黄绿素 (calcein) 盐酸四环素、Goldners 染料试剂均购自美国 Sigma 公司。甲基丙烯酸甲酯购自北京化工厂,邻苯二甲酸二丁酯购自天津市化学试剂一厂,过氧化苯甲酰购自广州化学试剂厂。

1.1.2 仪器 慢速锯(Buehler LTD. USA) ;碳化钨钢刀 ;LEICA 2155 硬组织切片机(德国制造) ;半自动图像数字化分析仪 ,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)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及分组 4 月龄未交配的 Sprague-Dawley(SD)雌性大鼠(广东省实验动物中心提供) 52 只 ,清洁级 ,体重(257 \pm 14)g。按随机排列表分为 6 组 ,除假手术组外 ,其余各组均行双侧卵巢切除术^[4]。分组情况 :①假手术组 ,8 只 ;②去卵巢组 ,8 只 ;以上两组给以生理盐水 5 ml \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ ,po ;③高炔雌醇组(高 EE 组) 8 只 ,给以炔雌醇 30 μ g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ ,po ;④低炔雌醇组 ,8 只 ,6 μ g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ ,⑤依普拉芬组 ,10 只 ,给以依普拉芬 200 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ ,po ;⑥联合用药组 ,10 只 ,给以炔雌醇 6 μ g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ 加依普拉芬 200 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ ,po。所有大鼠喂药均采用胃饲法。每周称体重 1 次 ,按体重调整药量 ,所有大鼠单笼饲养 ,在(23 ~ 25)℃ 相对湿度 50% ~ 70% 的清洁环境中自由摄食、摄水。使用标准饲料 ,钙含量 1.33% ,磷含量 0.95%。在饲养过程中 ,3 只死亡。

1.2.2 骨组织形态计量学分析 :大鼠实验 12 周 ,2% 戊巴比妥钠麻醉 ,心脏抽血处死 ,取左胫骨用慢速锯将其分为三段 ,取近心段暴露骨髓腔后 ,做不脱钙骨包埋、切片 ,用半自动图像数字化仪测量 ,计算以下参数^[2] :骨小梁面积百分数(%Tb.Ar ,反映骨量的多少) 荧光标记周长百分数(%L.Pm ,反映骨形成活跃程度) 破骨细胞数量(Oc.N ,反映骨吸收活跃程度)。

1.2.3 子宫的观察 雌激素刺激大鼠子宫副作用的强弱可以通过子宫重量、子宫内膜厚度来评价^[1]。取出子宫后 ,首先称重观察子宫大小。经石蜡包埋、切片、HE 染色后 ,于 200 倍镜下测量其平均子宫内膜厚度 ,观察药物对子宫内膜的影响。

1.2.4 统计学处理 :用 SPSS v7.5 软件进行数据分析 ,参数值用均数和标准差($\bar{x} \pm s$)表示 ,各组间比较采用单因素方差分析(LSD)。

2 结果

见表 1 表 2。

表 1 各组大鼠骨计量学参数结果($\bar{x} \pm s$)

组号	组别	n	%Tb.Ar (%)	%L.Pm (%)	Oc.N (# /mm ²)
1	假手术组	7	14.2 \pm 3.2	12.3 \pm 3.8	7.9 \pm 2.8
2	去卵巢组	8	4.1 \pm 2.0**	18.3 \pm 2.8**	21.9 \pm 8.3**
3	高炔雌醇组	7	12.0 \pm 4.3 [#]	7.0 \pm 2.5 [#]	8.4 \pm 4.9 [#]
4	低炔雌醇组	8	7.5 \pm 2.9 [#]	14.2 \pm 2.7	15.2 \pm 5.4 [#]
5	依普拉芬组	10	5.5 \pm 3.1**	15.7 \pm 3.6	15.6 \pm 4.1**
6	联合用药组	9	8.1 \pm 4.4 [#]	14.2 \pm 2.1 [#]	14.4 \pm 4.2 [#]

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 2 各组大鼠子宫重量和内膜厚度的测量结果($\bar{x} \pm s$)

组号	组别	n	子宫重量(mg)	内膜厚度(μ m)
1	假手术组	7	595 \pm 76	16.4 \pm 3.7
2	去卵巢组	8	100 \pm 14**	12.2 \pm 2.3**
3	高炔雌醇组	7	497 \pm 115 [#]	39.4 \pm 8.7 [#]
4	低炔雌醇组	8	419 \pm 145 [#]	28.6 \pm 12.2 [#]
5	依普拉芬组	10	137 \pm 30**	14.6 \pm 3.4
6	联合用药组	9	276 \pm 75 [#]	19.5 \pm 3.6 [#]

注 :与假手术组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与去卵巢组比较[#] $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$;与低炔雌醇组比较[▲] $P < 0.05$,[▲] $P < 0.01$

2.1 去卵巢对大鼠的影响

去卵巢组与假手术组比较 ,%Tb.Ar 降低 ,%L.Pm、Oc.N 增加 ,子宫重量及内膜厚度降低($P < 0.01$)。

2.2 单独使用雌激素对去卵巢大鼠的影响

高炔雌醇组与去卵巢组比 ,%Tb.Ar 增加 ,%L.Pm、Oc.N 降低 ,子宫重量及内膜厚度均明显增加($P < 0.01$) ;与假手术组比 ,%Tb.Ar、Oc.N 无差异 ,子宫内膜厚度显著增加($P < 0.01$)。低炔雌醇组与去卵巢组比 ,%Tb.Ar 增加($P < 0.01$) ,Oc.N 降低($P < 0.05$) ,子宫重量及内膜厚度均明显增加($P < 0.01$) ;与假手术组比 ,%Tb.Ar 降低($P < 0.01$) ,子宫内膜厚度显著增加($P < 0.01$)。

2.3 单独使用依普拉芬对去卵巢大鼠的影响

依普拉芬组与去卵巢组比 ,子宫湿重及内膜厚度、%Tb.Ar、%L.Pm 无显著性差异 ,Oc.N 减少($P < 0.05$)。

2.4 联合用药对去卵巢大鼠的影响

联合用药组与去卵巢组比 ,%Tb.Ar 增加($P < 0.01$) ,%L.Pm、Oc.N 降低($P < 0.05$) ,子宫重量及内膜厚度增加($P < 0.01$)。与假手术组比 ,%Tb.Ar 和子宫重量降低($P < 0.01$) ,子宫内膜厚度无显著性差异。联合用药组与低炔雌醇组比较 ,%Tb.Ar

无显著性差异,子宫重量和内膜厚度明显减少($P < 0.01$)其子宫内膜厚度与假手术组无显著性差异(见表 1)。

3 讨论

3.1 去卵巢、雌激素及联合用药对大鼠的影响

由结果可见,大鼠去卵巢后骨量(%Tb.Ar)显著降低,骨吸收和骨形成指标均显著增加,提示骨质疏松模型的复制是成功的。另外,大鼠去卵巢后子宫重量和内膜厚度均降低,这符合体内雌激素浓度降低后,生殖器官的变化规律。

本次实验中高、低剂量炔雌醇可显著降低骨吸收、增加去卵巢大鼠骨量、子宫重量和内膜厚度,说明炔雌醇在防治骨质疏松同时具有明显的刺激子宫的副作用。低剂量炔雌醇组作用较高剂量要弱,治疗后骨量与假手术组有显著性差异。这种现象已被大量实验所证实^[5]。

依普拉芬是一种合成的异黄酮衍生物,是一种非激素制剂。文献报道,它能加强雌激素作用,抑制破骨细胞前体细胞分化及成熟破骨细胞的活性,抑制骨吸收^[9]。张皎等^[10]报道,依普拉芬在 10^{-4} mol/L 可抑制成骨细胞增殖,而 10^{-8} mol/L 可刺激成骨细胞和分化。该药能降低绝经后骨质疏松患者的骨转换速度,增加腰椎骨密度^[3]。依普拉芬的副作用极少。

本次实验未观察到依普拉芬有预防去卵巢大鼠骨丢失的作用,其原因可能与用药量及本次实验大鼠在去卵巢后骨丢失太剧烈有关。另外,结果显示单用依普拉芬对去卵巢大鼠子宫无刺激作用。

依普拉芬与低剂量炔雌醇联合用药组显著降低骨吸收、增加去卵巢大鼠骨量。与单用炔雌醇比较,子宫内膜厚度显著降低,说明依普拉芬可以抑制炔雌醇对子宫的刺激作用。

3.2 联合用药的意义

雌激素防治绝经后骨质疏松症的疗效在临床实践和动物实验中都已得到证明^[6,7]。但是,雌激素可刺激子宫内膜增生,长期使用会增加子宫内膜癌的发生率,引起子宫、阴道出血,而且,停药后立即发生新的骨丢失。这限制了其临床使用^[8]。

本实验观察到依普拉芬可以抑制炔雌醇刺激子宫内膜增生副作用,这与补骨胶囊和淫羊藿总黄酮的作用相似^[1,2],提示可能还有其他黄酮类化合物具

有此种作用。此作用机制尚未明确,亦未见相关报道。雌激素是通过刺激雌激素受体而发挥作用,推测依普拉芬可能对此过程有影响。结果显示依普拉芬未干扰雌激素抗骨质疏松作用,说明依普拉芬对雌激素的抗骨质疏松作用和刺激子宫作用的影响是分开的。我们认为对此作用的分子水平机制,以及依普拉芬对雌激素其他副作用的影响、在人体是否有相同作用可以进一步研究。

综上所述,依普拉芬与炔雌醇合用后,一方面可以减弱炔雌醇刺激去卵巢大鼠子宫的副作用;另一方面可增加其骨量。

【参 考 文 献】

- [1] 金勋杰,吴铁,李青南,等. 补骨胶囊与 17- α 炔雌醇联合用药对大鼠骨质疏松的预防及对子宫刺激作用的研究. 中国骨伤 2003,5:272-274.
- [2] 金勋杰,许碧莲,吴铁,等. 复方淫羊藿总黄酮与己烯雌酚合用对去卵巢大鼠子宫和骨的影响. 中国骨伤,2005,18:477-479.
- [3] Ohta H, Komukai S, Makita K, et al. Effects of 1-year ipriflavone treatment on lumbar bone mineral density and bone metabolic markers in postmenopausal women with low bone mass. Horm Res, 1999, 51: 178-183.
- [4] 李朝阳,李青南,林柏云,等. 蛇床子素对去卵巢大鼠近侧胫骨代谢影像的定量研究. 药理学报,1996,3:327-332.
- [5] Ke HZ, Paralkar Vishwas M, Grasser William A, et al. Effects of CP-336,156, a new, nonsteroidal estrogen agonist/antagonist, on bone, serum cholesterol, uterus, and body composition in rat models. Endocrinology, 1998, 139:2068-2076.
- [6] Ravn P, Bidstrup M, Wasnich RD, et al. Alendronate and estrogen-progestin in the long-term prevention of bone loss: four-year results from the early postmenopausal intervention cohort study. A randomized, controlled trial. Ann Intern Med, 1999, 131:935-942.
- [7] Schlemmer CK, Coetzer H, Claassen N, et al. Oestrogen and essential fatty acid supplementation corrects bone loss due to ovariectomy in the female Sprague Dawley rat. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1999, 61:381-390.
- [8] Doren M. Hormonal replacement regimens and bleeding. Maturitas, 2000, 34(Suppl 1):S17-S23.
- [9] Bonucci E, Silvestrini G. Cytological and ultrastructural investigation in osteoblastic and preosteoclastic cells grown *in vitro* in the presence of ipriflavone: preliminary results. Bone and Mineral, 1992, 19(Suppl) S15-S25.
- [10] 张皎,侯加法. 依普拉芬对鸡胚成骨细胞的增殖和分化的影响. 中国骨质疏松杂志,2004,10:236-238.