

更年期安怡片对绝经后骨质疏松雌鼠防治作用的实验研究

冯 异 黎烈荣 张 英 刘又香

中图分类号: R285.5 R589.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)02-0085-05

摘要:目的 观察更年期安怡片对绝经后骨质疏松雌鼠预防和治疗效应及其作用机制。方法 雌性 SD 大鼠 60 只 随机分为正常组(INT)、假手术组(Sham)、模型组(Model)、雌激素组(E_2)、更年期安怡片组(GNAT)和更年期安怡片预防组(GNAT PR),每组 10 只。检测腰 1-6 和右侧股骨的骨矿含量(BMC)和骨密度(BMD),放射免疫法(RIA)和酶联免疫法(ELISA)分别检测血清雌二醇(E_2)、胰岛素样生长因子(IGF)及其结合蛋白(IGF-BP)含量。结果 模型组雌鼠 L_{1-6} 和股骨的 BMC、BMD 明显减少,血清 E_2 、IGF- I 和 IGF-BP1 含量下降,雌激素和更年期安怡片可不同程度地增加 E_2 、IGF- I 含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但 BMC 在用药前后无明显变化。更年期安怡片预防组对上述指标无明显改善。结论 更年期安怡片可以通过上调 E_2 、IGF- I 的含量,增加腰椎和股骨 BMD,改善因去除双侧卵巢引起的实验性绝经后骨质疏松症,为临床运用更年期安怡片治疗绝经后骨质疏松提供了实验依据。

关键词: 绝经后骨质疏松; 骨矿含量; 骨密度; 雌二醇; 胰岛素样生长因子; 胰岛素样生长因子结合蛋白

The experimental study of GNAT on treatment and prevention in postmenopausal osteoporosis female rats
FENG Yi, LI Lierong, ZHANG Ying, et al. Department of Neurobiology and Integrative Medicine, Shanghai Medical College of Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: **Objective** To study the role of GNAT on treatment and prevention in postmenopausal osteoporosis female rats. **Methods** 60 female SD rats were divided randomly into six groups: intact (INT), sham operation (Sham), model, estradiol (E_2), GNAT and GNAT prevention (GNAT PR) group. The bone mineral content (BMC) and the bone mineral density (BMD) of lumbar 1-6 and right thigh-bone were examined, as well as estradiol (E_2), insulin-like growth factor I (IGF- I) and insulin-like growth factor binding proteins (IGF-BPs) were tested by RIA or ELISA. **Results** The BMC and BMD of lumbar 1-6 and right thigh-bone in model group decreased obviously, meanwhile the serum E_2 , IGF- I and IGF-BP1 reduced too. E_2 or GNAT could increase the BMD as well as upgrade the contents of E_2 and IGF- I. However, changes were not showed in above indexes in GNAT PR group. **Conclusions** GNAT could improve postmenopausal osteoporosis of female rats by upgrading the serum E_2 and IGF- I to increase BMD of postmenopausal osteoporosis rats, which provided an experimental evidence of GNAT in clinic.

Key words: Postmenopausal osteoporosis; Bone mineral content; Bone mineral density; Estradiol; Insulin-like growth factor; Insulin-like growth factor binding proteins

绝经后骨质疏松症(Postmenopausal osteoporosis ,

PMOP)是指绝经后妇女由于卵巢功能衰退,雌激素水平下降,从而在骨代谢过程中,骨吸收大于骨形成,出现的以低骨量和骨组织的显微结构的退行性变为特征,临床表现为骨脆性和骨折易感性增加的一种代谢性疾病。它是目前为止最为普遍的骨代谢失调疾病^[1]。约 30% 的绝经后妇女患有骨质疏松症,而老年妇女的患病率更是同龄老年男子的

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2003ABA153)

作者单位: 200032 上海,复旦大学上海医学院中西医结合系(冯异);湖北中医学院(冯异、黎烈荣、张英、刘又香);江汉大学医学院(张英)

通讯作者: 冯异, Email: fengyi1717@hotmail.com

6 倍^[2]。

由于绝经后骨质疏松症主要是因为雌激素下降引起的高转换型骨量丢失,其骨重建受多种因素调控,包括激素和骨局部的因子。胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)系统被认为是多种激素和因子调节骨代谢的复杂网络的核心因素。目前绝经后骨质疏松症的治疗仍以激素替代疗法(hormone replacement therapy, HRT)和双膦制剂为主^[3]。由于 HRT 临床应用的副作用和致癌性,引起了不少争议。更年安怡片是应用于临床 20 年,主治女性围绝经期综合征和绝经后诸证的中成药,并对其作用机制进行了长期的实验研究^[4]。本实验以去除双侧卵巢 3 月后的雌性大鼠作为绝经后骨质疏松症模型,采用双能 X 线骨密度扫描、放射免疫法(RIA)和酶联免疫法(ELISA),观察各组大鼠骨矿含量(BMC)、骨密度(BMD)、血清雌二醇(E_2)和 IGF 因子及其结合蛋白的变化。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

雌性 Sprague-Dawley 大鼠 60 只, 200 ~ 250 g, 6 月龄, 购自华中科技大学实验动物中心。饲养于 12 h 光照/12 h 黑暗的环境中, 自由摄食和饮水。在实验环境中适应 1 w 后, 经阴道涂片观察阴道脱落细胞存在典型的 4 d 周期性变化者, 进行实验。动物的处理符合实验动物使用准则。

实验动物随机分为正常组(INT)、假手术组(Sham)、模型组(Model)、雌激素组(E_2)、更年安怡片组(GNAT)和更年安怡片预防组(GNAT PR), 每组 10 只。各组饲养方法与实验室环境等条件相同。

1.2 制备动物模型

1.2.1 参照文献方法^[5]进行, 将模型组、雌激素组、更年安怡片组和更年安怡片预防组大鼠用 10% 水合氯醛(4 mL/kg 体重)腹腔注射麻醉。大鼠俯卧位, 于腋中线末肋下 2 cm 处备皮, 络合碘消毒, 依次切开皮肤、筋膜、肌层和腹膜, 切除卵巢, 逐层缝合。一侧完成后切除另一侧。术后第 5 d 开始涂片观察阴道脱落细胞, 连续 5 d 无动情周期者, 用于后续实验。

1.2.2 将假手术组大鼠仅切除卵巢附近的一小块脂肪。术后观察阴道脱落细胞涂片, 仍有规律的动情周期存在者用于实验。其他步骤同切除双侧卵巢术。

1.3 给药方法

1.3.1 正常组、假手术组、模型组: 不给予任何处理。

1.3.2 雌激素组: 术后 90 d 开始, 将尼尔雌醇片(1 mg/片, 北京四环制药二厂, 京卫药准字 1996D153007, 生产批号 20021001)研碎, 用蒸馏水配成 0.01 mg/mL 的混悬液, 0.9 mg/100 g 体重灌胃, 每周 1 次, 连续 4 w。

1.3.3 更年安怡片组: 更年安怡片由熟地、山药、茯神、菟丝子、杜仲、肉苁蓉、泽泻等药物按一定比例配伍制成片剂, 3 g/片, 由湖北中医院制药厂提供。术后 90 d 开始, 将更年安怡片用蒸馏水配成 0.3 g/mL 的混悬液, 每只每天灌胃 1 mL/100 g 体重。每日 1 次, 6 d 为 1 疗程, 疗程间休息 1 d, 连续 4 个疗程。

1.3.4 更年安怡片预防组: 于术后 7 d 开始给予更年安怡片混悬液, 其余同上。

1.4 X 线骨密度扫描

各组动物于末次给药后, 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 俯卧位置于动态过滤双能 X 线骨密度诊断仪上(Norland XR-36, 美国, 能谱 38/70 keV, 高压稳定 $\pm 0.05\%$, 仪器精密度 1%), 用小动物测量软件在高分辨率模式下对大鼠第 1 ~ 6 腰椎和右侧股骨进行扫描。扫描参数为: 1.0 mm $\times$ 1.0 mm, 60 mm/s, 12.00 cm REV. 3.9.3/2.1.0。

1.5 血样品收集及测定

所有动物处死前 8 h 禁食, 不禁水。摘单侧眼球取血, 在消毒试管中室温静置 2 h 后, 离心 15 min (4000 r/min)。取上清液于 -20°C 保存待测。

血 E_2 的测定采用特异性的 RIA 试剂盒(天津九鼎医学生物工程公司), 所有操作按试剂盒说明书进行, 最小检出值为 2 pg/mL。测定 IGF-I、IGF-BP1 和 IGF-BP3 所用的酶联免疫试剂盒(ELISA)由美国 DSL(Diagnostic Systems Laboratories)公司生产, 天津天硕生物制品有限公司代理, 最小检出值分别是 30 ng/mL、0.25 ng/mL 和 0.04 ng/mL。全部程序严格按试剂盒说明书进行。采用 GC-1200 γ 放射免疫计数器(中国科学技术大学科技实业总公司中佳光电仪器分公司, 合肥)和 DG3023 型酶联免疫检测仪(中国国营华东电子管厂制造)检测。

1.6 统计学处理

各组数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 数据用 SPSS 11.5 软件处理。多组间数据统计采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行比较, 继以 Student-Newman-Keuls 检验。两组数据采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 定义为两者差别有显著性意义。

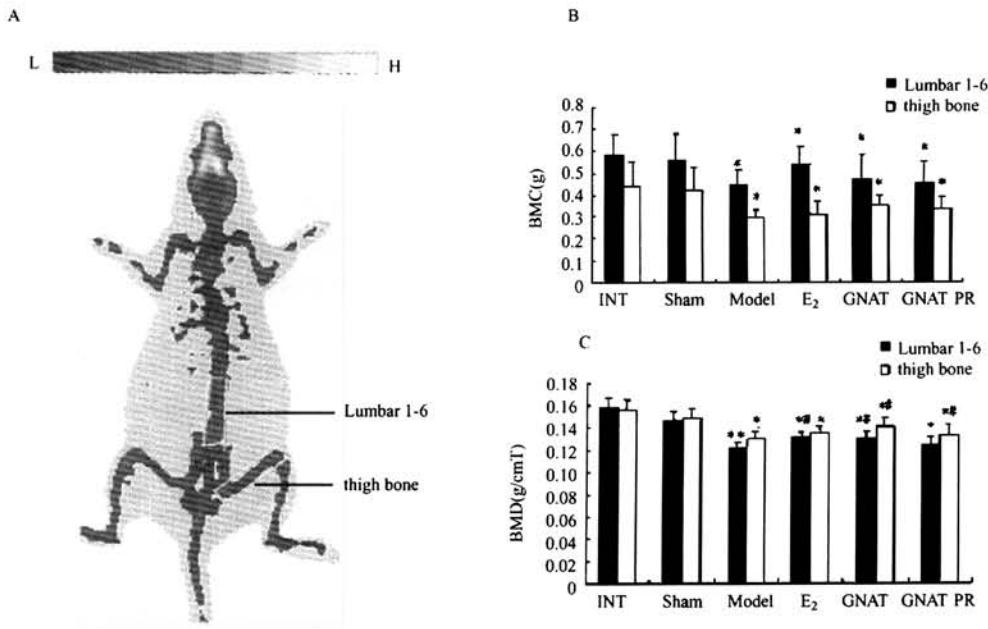


图1 大鼠 BMC 和 BMD 测量的扫描图及测量结果

A: 测量扫描图; B: 各组大鼠腰 1-6 和右侧股骨的 BMC 的测量结果; C: 各组大鼠腰 1-6 和右侧股骨的 BMD 的测量结果
注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

2 结果

2.1 各组大鼠 BMC 和 BMD 比较, 见图 1。

由图 1 可知, 模型组雌鼠腰椎和股骨的 BMC 和 BMD 与正常组相比明显下降, 差异有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 而假手术组和正常组比较无明显差异。雌激素和不同时间的更年安怡片给药对腰椎和股骨的骨矿含量无明显改善, 但经雌激素和更年安怡片处理后, 大鼠腰椎和股骨的 BMD 均有所提高, 与模型组比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠 E₂ 的结果比较, 见表 1。

表 1 各组大鼠血清雌二醇含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	E ₂ (pg/mL)
INT	10	106.67 ± 16.10
Sham	9	91.87 ± 21.75
Model	9	47.37 ± 10.81**
E ₂	8	97.93 ± 10.92* #
GNAT	8	75.77 ± 7.32* #
GNAT PR	7	41.23 ± 18.26**

注: ** $P < 0.01$ vs INT; * $P < 0.05$ vs INT; # $P < 0.01$ vs Model; # $P < 0.05$ vs Model

由表 1 可见, Model 组的血清 E₂ 水平较正常组和假手术组明显下降, 经统计学处理, 差异有显著性。雌激素可明显提高血清 E₂ 水平, 与模型组相比, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。而更年安怡片组可以提高血清 E₂ 水平, 但与正常组仍有明显差异 ($P < 0.05$)。但更年安怡片预防组与模型组相比, 血清 E₂ 含量无明显改变 ($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠 IGF- I 及 IGF-BP1、IGF-BP3 的结果比较, 见表 2。

表 2 各组大鼠血清 IGF- I 及 IGF-BP1、IGF-BP3 的含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	IGF- I (ng/mL)	IGF-BP1 (ng/mL)	IGF-BP3 (ng/mL)
INT	10	4259.68 ± 378.98	35.26 ± 8.97	19.43 ± 3.23
Sham	9	3766.90 ± 91.88	35.78 ± 5.95	19.80 ± 0.97
Model	9	2881.67 ± 520.56**	15.79 ± 5.66**	18.28 ± 2.82
E ₂	8	4078.60 ± 478.72* #	24.05 ± 9.23	13.90 ± 0.48
GNAT	8	4010.17 ± 413.21* #	22.75 ± 7.83	14.27 ± 0.81
GNAT PR	7	3033.50 ± 862.72	22.74 ± 12.49	13.75 ± 0.78

注: ** $P < 0.01$ vs INT; * $P < 0.05$ vs INT; # $P < 0.05$ vs Model

如表 2 所示, Model 组的血清 IGF- I 和 IGF-BP1 水平较正常组和假手术组明显下降, 经统计学处理,

差异有显著性($P < 0.01$)。雌二醇和 GNAT 可明显提高血清 IGF-Ⅰ水平,与模型组相比,有统计学意义($P < 0.01$)。但对 IGF-BP1 和 IGF-BP3 的影响不大。GNAT PR 对 IGF-Ⅰ、IGF-BP1 和 IGF-BP3 均无明显改变。

3 讨论

3.1 中医学认为,肾、脾、肝与骨的关系密切。肾为先天之本,主骨生髓,骨的生长、发育、强健、衰弱与肾精盛衰关系密切。如《素问·宣明五气》中“肾主骨”、《素问·阴阳应象大论》“肾主骨髓”及“在体为骨”等就是中医文献对这一理论的阐述。肾精充足则骨髓生化有源,骨骼得以滋养而强健有力;肾精亏虚则骨髓生化乏源,骨骼失养而痿软疼痛易折。尤其是妇女绝经后,肾气已亏,天癸已竭,肾精肾阳衰亏则髓海空虚,骨质不充。而脾为后天之本,主四肢,养百骸。脾气虚弱,运化乏力,先天之精无以填充,势必精亏髓空而百骸痿废。此外,肝不藏血,则精血不足,筋脉失养,痿软无力。正如《临证指南医案·痿》曰:“夫痿症之旨。不外乎肝肾脾胃四经之病。盖肝主筋。肝伤则四肢不为人用。而筋骨拘挛。肾藏精。精血相生。精虚则不能灌溉诸末。血虚则不能营养筋骨^[6]。说明该病是以肾虚、肝脾功能失调为主,精血亏损所致。

更年安怡片由熟地、山药、杜仲、菟丝子、肉苁蓉、泽泻等组成,应用于临床治疗围绝经期综合征及绝经后诸症 20 余年,取得了很好的疗效。临床观察和实验研究证实,更年安怡片可有效改善围绝经期和绝经后的胸闷心悸、潮热汗出、烦躁易怒等症状,还可调节脑内某些单胺类物质;一定程度地抑制黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH)分泌,提高血中 E_2 水平,增加血清白介素-2(IL-2)含量,多途径多环节多靶点地调节神经-内分泌-免疫网络^[7]。方中熟地,甘,微温,入肝肾两经,善益精填髓。山药,甘平,归脾、肺、肾三经,善益气健脾。二者补肾健脾合而为君。据《本草纲目》记载:补中益精气,坚筋骨。配伍杜仲、菟丝子补阳益阴,共为臣药。肉苁蓉补肾助阳,泽泻泻肾降浊,茯神健脾宁心安神,共为佐使。全方以补肾健脾为主,养肝益精为辅,阴阳互治,用于治疗绝经后骨质疏松,切合病机。

3.2 骨成熟后,骨组织不断经历破骨细胞对旧骨吸收和伴随其后成骨细胞形成新骨的动态平衡过程。如果内、外因素促进骨吸收超过骨形成,就会出现骨量丢失,发生骨质疏松。

胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factors, IGF)系统是一类具有促进细胞分化和增殖能力的多肽,包括配体 IGF-Ⅰ和 IGF-Ⅱ,特异性的结合蛋白(IGF-specific binding protein, IGFsBP)1-6,结合蛋白酶以及 IGF 受体(Ⅰ型和Ⅱ型)^[8,9]。其中,IGF-Ⅰ是依赖于生长激素(GH)的多肽蛋白,由 70 个氨基酸残基组成的一级多肽链,在骨细胞中高水平表达。它与骨骼中受体结合发生受体自身磷酸化后激活酪氨酸蛋白酶(TRK),促使胰岛素受体底物(IRS-1)的磷酸化,调节细胞的生长、增殖和代谢^[10]。IGF-Ⅰ对参与骨转换的所有细胞均具有刺激有丝分裂和/或启动分化的活性,尤其是增加成骨细胞数目和功能,加强胶原、非胶原蛋白的表达,分泌碱性磷酸酶(AKP)和 BGP^[11]。同时,IGF-Ⅰ抑制间质中胶原酶转录,减少骨胶原降解,维持骨量^[12]。表明 IGF-Ⅰ是骨重建的重要调节因子^[13]。IGF-BP 参与调控 IGF 的功能,即可增强,也可抑制。其中,IGF-BP1 和 IGF-BP3 可以调控 IGF-Ⅰ的大部分生物活性。IGF-BP3 可与循环系统中超过 90% 的 IGF-Ⅰ结合,延长 IGF-Ⅰ的半衰期,防止其穿过毛细血管壁;而 IGF-BP1 与 IGF-Ⅰ形成的复合体较小,可以帮助 IGF-Ⅰ穿过毛细血管壁,到达靶组织^[14]。

本实验采用酶联免疫法和放射免疫法的测定绝经后骨质疏松大鼠血清中 IGF-Ⅰ和 IGF-BP1、IGF-BP3。结果表明, E_2 和更年安怡片可以上调血清 IGF-Ⅰ的水平,但对结合蛋白的作用不明显,说明药物作用的关键靶点是 IGF-Ⅰ,而不是结合蛋白。

3.3 实验表明,Model 组大鼠血清 E_2 水平明显下降,而 IGF-Ⅰ也随 E_2 水平的下降而下降。而给予雌激素治疗后,去卵巢雌鼠血清 E_2 水平升高,IGF-Ⅰ含量也随之升高,提示:血清 IGF-Ⅰ与 E_2 可能具有正相关, E_2 可以影响 IGF-Ⅰ的合成和分泌。绝经后 E_2 水平降低,加速骨吸收和骨转换,引起 IGF-Ⅰ亦下降的效应。因此,绝经后妇女保持一定水平的雌激素含量有助于维持 IGF-Ⅰ水平,防止骨质疏松症的发生。GNAT 也可能具有类雌激素样作用,通过一定程度地上调 E_2 水平的作用影响 IGF-Ⅰ的含量,从而发挥治疗绝经后骨质疏松症的作用。

3.4 绝经后骨质疏松症的预防重于治疗的观念,使我们在实验中设立了 GNAT PR 组。但在本实验中,GNAT PR 的作用并不理想。我们考虑可能因为以下几点因素:①GNAT PR 于术后 7 d 开始给药,手术的创伤对雌鼠机体造成的应激反应可能影响了灌胃

药物的吸收。②术后 7 d 也是模型动物雌激素急剧下降的时段,与绝经后骨质疏松症雌激素缓慢减少的过程并不十分一致。此时更年安怡片的作用可能并不能对抗雌激素减少引起的效应。③GNAT PR 于术后 7 d 给药,连续 4 w,但却与其他组一起于术后 12 w 处死取血。药物的作用此时可能已经完全代谢,并没有体现其效应。在今后的实验中,可以考虑是否改为低剂量,持续给药,以期提高预防组的实验疗效。

【参 考 文 献】

- [1] 刘忠厚.主编.骨质疏松症.第 1 版.北京:化学工业出版社,1992,169.
- [2] Seeman E. Unresolved issues in osteoporosis in men. Rev Endocr Metab Disord, 2001, 2(1):45-64.
- [3] Zhang ZL, Liu ZH. The new progressing in osteoporosis. Chinese Journal of Osteoporosis, 2006, 12(2):107-112 in Chinese).
- [4] Li LR, Feng Y, Tan YL, et al. Effect on serum IGF- I and E_2 in postmenopausal rats by GNAT. J Hubei TCM, 2007, 29(3):5-6 in Chinese).
- [5] 徐淑云,卞如瀛,陈修.主编.药理学实验方法.第 3 版.北京:人民卫生出版社,2006,1539.

- [6] 叶天士著,徐灵胎评.临证指南医案.第 1 版.上海:上海人民出版社,1976,525.
- [7] Fan HX, Wan LS, Li LR. The clinical and experimental research of GNAT on postmenopausal syndrome. TCM research, 1999, 15(4):45-47 in Chinese).
- [8] 王少山.主编.骨病中西医结合诊疗学.第 1 版.北京:中国中医药出版社,2001.
- [9] Niu T, Rosen CJ. The insulin-like growth factor-I gene and osteoporosis: a critical appraisal. Gene, 2005, 361:38-56.
- [10] Kasukawa Y, Stabnov L, Miyakoshi N, et al. Insulin-like growth factor- I effect on the number of osteoblast progenitors is impaired in ovariectomized mice. J Bone Miner Res, 2002, 17(9):1579.
- [11] Cotteril AM. The therapeutic potential of recombinant human insulin-like growth factor-1. ClinEndocrinol, 1992, 37(1):11.
- [12] Farley JR, Stilt-Coffing B. Apoptosis may determine the release of skeletal alkaline phosphatase activity from human osteoblast-line cells. Calcif Tissue Int, 2001, 68:43-52.
- [13] Agnusdei D, Gentilella R. GH and IGF-I as therapeutic agents for osteoporosis. J Endocrinol Invest, 2005, 28(8 Suppl):32-36.
- [14] Disturbed synthesis of insulinlike growth factor I and its binding proteins may influence renal function changes in liver cirrhosis. Digestive Diseases and Science, 2001, 46(6):1313-1320.

(收稿日期:2007-07-09)