

# 杜仲叶对去势骨质疏松大鼠骨代谢的影响

戴鹏 邓鸣涛 张立超 朱美兰 林思俭 刘荣华 罗军

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)12-1127-04

**摘要:** **目的** 探讨通过建立去卵巢大鼠模型,研究杜仲叶调节骨代谢防治骨质疏松。**方法** 80 只 200g 雌性 SD 大鼠,随即分为模型对照组、假手术对照组、杜仲叶治疗组(10 g/kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、雌激素治疗组(50 μg/kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。造模 4 周后连续治疗 16 周。**结果** 模型组大鼠机械力学检查使用显微 CT (μCT)分析表明骨密度降低,骨关节面塌陷;组织学检查病理组织切片显示骨小梁减少;生化检查骨型碱性磷酸酶、尿钙尿磷反应骨代谢水平的下降,而采用杜仲叶醇提取物及雌激素治疗后,μCT 分析表明骨密度相对增多,骨关节面平整,病理组织切片示骨小梁数量正常,生化检查示骨型碱性磷酸酶、血钙血磷、尿钙尿磷均与正常对照组无明显差异。**结论** 杜仲叶可以维持骨代谢平衡防治去势大鼠骨质疏松症。相对模型组其主要能增高骨密度、增加骨小梁数量、以及改善骨代谢平衡。

**关键词:** 杜仲叶;骨代谢;骨质疏松;显微 CT;HE 染色

**Effect of eucommia ulmoides oliv leaves on bone metabolism in castrated osteoporotic rats** DAI Peng, DENG Mingtao, ZHANG Lichao, et al. The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Corresponding author:LUO Jun, Email: luojun1786@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the effect of eucommia ulmoides oliv leaves on the regulation of bone metabolism for the prevention and treatment of osteoporosis using established ovariectomized rat model. **Methods** Eighty 200g female SD rats were selected. They were randomly divided into 4 groups: model control group, sham-operation control group, eucommia ulmoides oliv leaves treatment group (10 g/kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), and estrogen therapy group (50 μg/kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>). After successful modeling for 4 weeks, the continuous therapy lasted for 16 weeks. **Results** In model control group, mechanical inspection using micro CT (μCT) analysis showed decreases in bone mineral density (BMD) and collapse of joint surface in rats. Histological examination showed a decrease in the bone trabecular. The biochemical test results such as bone type alkaline phosphatase, urinary calcium, and urinary phosphorus indicated that the level of bone metabolism declined. After the treatment of eucommia ulmoides oliv leaves ethanol extraction and estrogen, μCT analysis showed relative increases in BMD and smooth joint surface. Histopathology showed normal bone trabecular number. Biochemical tests showed that the levels of bone alkaline phosphatase, serum calcium, serum phosphorus, urinary calcium, and urinary phosphorus had no significant difference with those in normal control group. **Conclusion** Eucommia ulmoides oliv leaves can maintain bone metabolic balance, and prevent and treat osteoporosis in castrated rats. The effect is mainly on the increase of BMD, the increase of bone trabecular number, and the improvement of bone metabolic balance.

**Key words:** Eucommia ulmoides oliv leaves; Bone metabolism; Osteoporosis; Micro CT; HE staining

随着我国人口老龄化,骨质疏松症人数正在急剧增加。而绝经后低激素水平是引起绝经后骨质疏松症的重要原因,其导致骨代谢平衡的破坏。目前

激素替代疗法(hormone replacement therapy, HRT)预防和治疗绝经后骨质疏松症是一种常用方法,长期接受 HRT 具有生殖组织恶变的潜在危险。传统刺激骨生长药物(如生长激素、氟化钠和合成代谢类固醇类等)和抗骨吸收类药物(如:降钙素、双膦酸盐类等)也许能防止骨质疏松症骨质的进一步丢失,但成本太高,副作用多,不利于我国众多人群。

基金项目:江西省科学技术基金项目(JJ11359)  
作者单位:330006 南昌,南昌大学第二附属医院  
通讯作者:罗军,Email:luojun1786@163.com

因此,迫切需要寻找“天然”的药品或较少副作用的合成药物代替传统治疗药物。而中药具有纯天然、低副作用的优势,杜仲叶作为植物杜仲树的干燥树叶,具有补肝肾、强筋骨等作用,且是一年生长树叶,产量巨大。因此,本实验通过建立骨质疏松大鼠模型,使用杜仲叶治疗后,通过组织器官重量改变、 $\mu$ CT、免疫组化、生化指标等检测发现杜仲叶具有防止去势大鼠骨质疏松的作用。

## 1 资料与方法

### 1.1 动物

选用 8~12 周龄 SD 雌性大鼠 80 只,体重  $200 \pm 10$ g,购于江西中医学院动物中心(清洁级),动物合格证书编号:“SCXK(赣)2011-0001”,随即分成 4 组,每组 20 只,正常组对照组、模型对照组、杜仲叶治疗组、雌激素治疗组,置于  $24^\circ\text{C} \sim 16^\circ\text{C}$ 、12 小时光照动物房中,常规鼠粮颗粒饲料喂养,自由饮用三蒸水。

### 1.2 药品

**1.2.1 杜仲叶醇提取物浸膏:**江西中医学院药理实验室提供:新鲜干燥杜仲叶,切丝,于  $60^\circ\text{C}$  条件下干燥后,细磨成粉末,用 70% 乙醇提取 2 次。第 1 次用 10 倍量乙醇回流提取 1 小时,第 2 次用 8 倍量乙醇回流提取 1 小时,合并两次提取液,回收乙醇即得。每公斤烘干后杜仲叶粉末得 1 公斤浸膏。

**1.2.2 己烯雌酚:**化学名(E)-4,4'-(1,2)-二乙基-1,2-亚乙烯基)双苯酚。结构式:分子式: $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_2$ 分子量:268.36。合肥久联制药有限公司生产。

### 1.3 主要仪器

$\mu$ CT(瑞士 scanco 公司生产, $\mu$ CT80 型),全自动生化分析仪(日本 Olympus 公司生产,AU2700 型)、血液分析仪(日本 Sysmex 生产,XE-2100 型)、流式尿沉渣全自动分析仪(日本 Sysmex 生产,UF-100 型)、微量称(生化实验室提供)

### 1.4 模型制作及给药

模型对照组、杜仲叶治疗组、雌激素治疗组大鼠行双侧卵巢摘除术。均使用 3% 戊巴比妥钠麻醉(1 ml/kg,腹腔注射),腰背部剪毛后脱毛剂去除剩下绒毛,消毒后取双侧长约 1.5 cm 切口,行双侧卵巢摘除术。卵巢结节状、红色,周围脂肪包绕,与输卵管子官相连,卵巢下 0.5 cm 结扎,逐层缝合,术中及术后 48 小时给予青霉素抗炎。假手术对照组行假手术,只暴露卵巢,不切除,其余方法同前。杜仲叶治疗组给予杜仲叶醇提取物浸膏灌胃( $10 \text{ ml/kg} \cdot \text{d}^{-1}$ )。雌激素治疗组给予己烯雌酚灌胃( $50 \text{ } \mu\text{g/}$

$\text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$ )。模型组及正常对照组均给予等量生理盐水。所有大鼠手术后 4 周开始灌胃,持续 16 周,每周测量大鼠体重,并根据体重调整用量。杜仲叶和己烯雌酚用量是根据人鼠等效剂量转换原则<sup>[1,2]</sup>,本实验杜仲叶浸膏及己烯雌酚灌胃剂量相当于临床 60 kg 体重患者处方剂量。

### 1.5 标本采集、制作及测定方法

**1.5.1 体重、器官、血液、尿液及股骨收集:**所有大鼠每星期测量并记录一次体重。实验结束时,所有大鼠单独放置于鼠笼中,禁食水 24 小时。3% 戊巴比妥钠(1 ml/kg,腹腔注射)麻醉后行剖腹手术。膀胱取抽尿液约 2 ml,心脏抽取血液约 2 ml,置于离心机中离心(2000 转/分,20 分钟),离心完毕后存放于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱,以备生化检查。立即完整解剖取出大鼠双侧股骨、子宫、双肺、双肾、心脏、肝脏、脾脏、大脑剔除附着组织后进行称重并记录。双侧股骨置于 10% 甲醛液中固定,以备病理切片、骨密度扫描及  $\mu$ CT 扫描使用。本实验对待大鼠的原则和程序是依据美国国立卫生研究院出版的《1996 国家研究委员会:实验动物使用及看护指南》<sup>[3]</sup>。

**1.5.2 股骨近端 HE 染色切片制作过程:**取大鼠左侧股骨进行 HE 染色,制作过程:

(1)固定:股骨组织于 10% 甲醛中浸泡 2~3 天;(2)脱钙:脱钙剂(8%  $\text{HNO}_3$ )中浸泡 24 小时;(3)洗涤:将股骨组织切成 5 mm 左右片段过夜水洗;(4)包埋切片:脱水:80% 乙醇过夜,95% 乙醇 4 h,无水乙醇 20 min(两次);透明:二甲苯 30~40 min;浸蜡:58~60 $^\circ\text{C}$  2.5 小时;包埋:包埋后置于  $-20^\circ\text{C}$  过夜;切片;烤片:60 $^\circ\text{C}$  2 小时。(5)乙醇 II 3 min,95% 乙醇 5 min,80% 乙醇 5 min,水洗 2 min,苏木精 20 min,水洗 20 min,盐酸酒精分化 2~3 s,流水返蓝 20 min,伊红:2 min,水洗数秒烘干,中性树脂封片。

**1.5.3 生化检测:**血清、尿液生化测定 取存放于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱血清,血清钙(S-Ca)、磷(S-P)、碱性磷酸酶(ALP),使用南昌大学第二附属医院 AU2700 全自动生化分析仪(Olympus 公司,日本)测定,尿中钙(U-Ca)、磷(U-P)和肌酐(Cr)使用与血清相同的仪器及方法分析。

**1.5.4  $\mu$ CT 检测:**取股骨标本,去除周围软组织,采用 MicroCT 仪拍摄股骨标本远端断层影像,扫描厚度 20  $\mu\text{m}$ ,阈值设置为 200 mgHA/ $\text{cm}^3$ (毫克羟基磷灰石/立方厘米),并行三维骨结构重建,测定标本局部骨组织密度和体积等指标。

### 1.6 统计学分析

所测数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两个样本均数的比较采用 *t* 检验。所有数据均采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理, 各项参数间比较, *P* < 0.01 为有统计学差异。

2 结果

2.1 组织器官分析: 体重、股骨及各器官重量

2.1.1 体重: 四组大鼠均有相似的起始重量, 给予同样的饲料, 并在同种环境下喂养。模型组体重显著高于其他三组 (*P* < 0.01); 杜仲叶组与假手术组比较, 体重仍然增加; 雌激素组与杜仲叶组比较, 体重并无明显差异 (*P* > 0.05)。可见雌激素具有完全防止体重增加的效果, 杜仲叶治疗组并不能完全防止体重的增加, 但同样具有防止体重增加的效果 (图 1)。

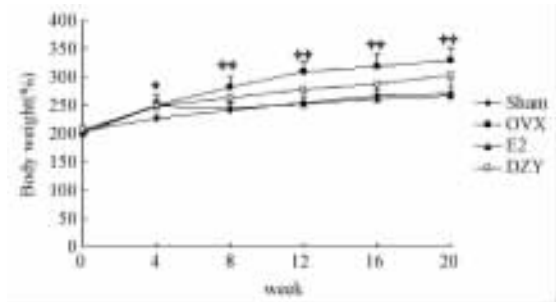


图 1 大鼠体重生长曲线

OVX: 模型组 sham: 假手术组

E2: 雌激素组 DZY: 杜仲叶提取物组

\*\* *P* < 0.01 ; \* *P* < 0.05

2.1.2 子宫: 与假手术组比较, 杜仲叶组、雌激素治疗, 模型组子宫重量显著减小 (*P* < 0.01); 与模型组比较, 雌激素组和杜仲叶子宫重量又显著增高 (*P* < 0.01); 而杜仲叶组及雌激素组未见显著差异。说明雌激素可显著影响子宫的重量, 并成功建立雌激素减少模型 (去势大鼠模型) (图 2)。

2.1.3 各器官重量: 实验结束时, 大鼠安乐死后取出的各组织器官并没有显著的统计学意义 (图 3)。

2.2 免疫组化分析: 股骨组织切片

假手术组大鼠骨小梁分布均匀, 排列密集, 互相连接成网状结构, 骨小梁较粗, 其间距较小。而模型组大鼠骨小梁明显稀少, 骨小梁明显变细, 间距增宽, 骨小梁粗细不均与, 常可见骨小梁断点。相对来说, 雌激素组及杜仲叶治疗组, 比假手术组骨小梁明显减少, 比模型组显著增加, 但两组之间未见明显异常。可见杜仲叶具有与雌激素相似的增加相对骨小梁数量的作用, 从而防治骨质疏松症 (图 4)。

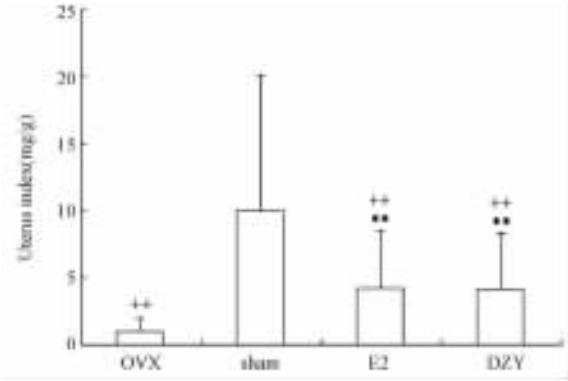


图 2 子宫是大鼠安乐死后所取出, 体重和子宫指数表示为子宫重量除以体重

OVX: 模型组 sham: 假手术组 E2: 雌激素组

DZY: 杜仲叶提取物组 \*\* *P* < 0.01 ; \* *P* < 0.01

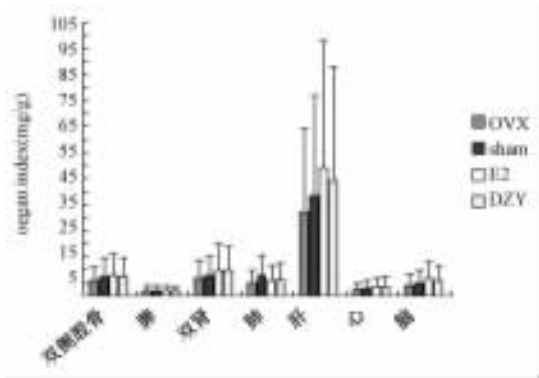


图 3 股骨、脾、肾、肺、肝脏、心脏、大脑是大鼠安乐死后所取出, 体重和器官指数

表示为器官重量除以体重

OVX: 模型组 sham: 假手术组

E2: 雌激素组 DZY: 杜仲叶提取物组

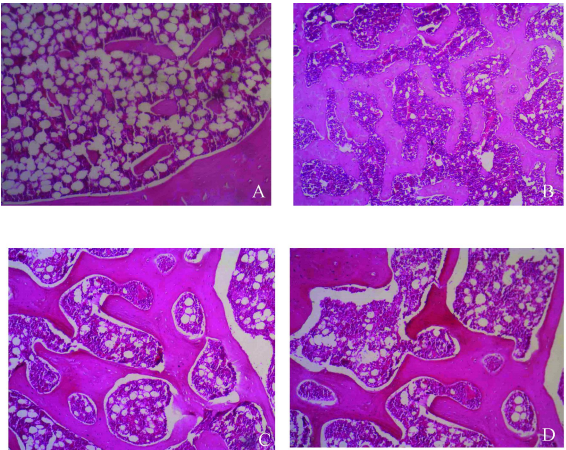


图 4 大鼠股骨横断面 HE 染色

A: OVX: 切除卵巢组 B: sham: 对照组

C: E2: 雌激素组 D: DZY: 杜仲叶提取物组

表 1 治疗 16 周后骨代谢各项指标(  $\bar{x} \pm s$  )

| 生化指标            | 假手术组          | 模型组              | 雌激素组             | 杜仲叶治疗组           |
|-----------------|---------------|------------------|------------------|------------------|
| 血钙( mmol/L )    | 2.63 ± 0.14   | 2.38 ± 0.11      | 2.75 ± 0.07      | 2.65 ± 0.08      |
| 血磷( mmol/L )    | 2.82 ± 0.24   | 2.48 ± 0.19      | 2.40 ± 0.24      | 2.07 ± 0.56      |
| 尿钙( mmol/mmol ) | 0.24 ± 0.06   | 0.62 ± 0.05 **   | 0.37 ± 0.04 **   | 0.38 ± 0.04 **   |
| 尿磷( mmol/mmol ) | 3.96 ± 0.46   | 4.68 ± 0.27 **   | 3.68 ± 0.21 **   | 3.76 ± 0.32 **   |
| 骨型碱性磷酸酶( U/L )  | 289.33 ± 16.4 | 100.13 ± 17.1 ** | 109.24 ± 34.2 ** | 129.49 ± 11.6 ** |

注: \*\*  $P < 0.01$

2.3 生化分析:血清和尿液生化指标

所测得血清钙及血清磷四组比较并没有明显统计学差别。而测得的模型组中尿钙、尿磷含量均显著高于其余三组(  $P < 0.01$  )。杜仲叶治疗组与雌激素治疗组相比并没有显著不同(  $P > 0.01$  )。骨型碱性磷酸酶( ALP )也是骨代谢活动中重要的生化指标<sup>[4]</sup>。模型组 ALP 显著高于其余三组(  $P < 0.01$  ),与模型组比较杜仲叶治疗组及雌激素治疗组均有降低 ALP 的作用。可见,杜仲叶和雌激素具有相似的降低骨代谢的作用(表 1)。

2.4 影像学分析:  $\mu$ CT

取大鼠股骨近端三维  $\mu$ CT 图像。模型组与其余组比较,可见关节面明显凹陷,骨密度严重降低,骨小梁明显稀疏,骨皮质变薄;而杜仲叶组和雌激素组与模型组比较,各方面均有扭转。

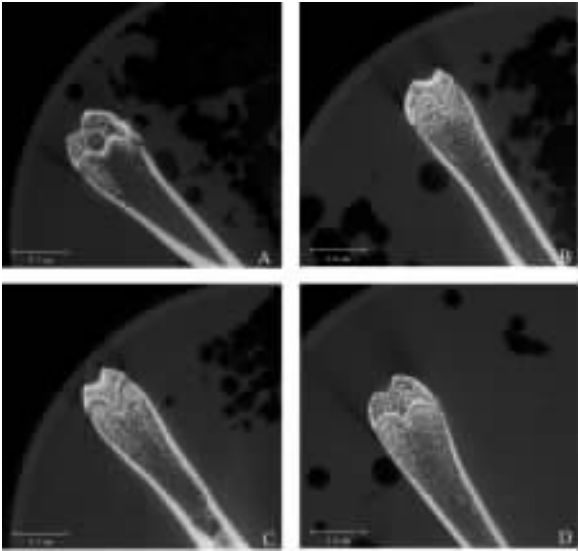


图 5 大鼠股骨近端  $\mu$ CT 图像

A:OVX:模型组 B:sham:假手术组

图 C:E2:雌激素组 D:DYZ:杜仲叶提取物组

3 讨论

绝经后骨质疏松( postmenopausal osteoporosis, PMO )是老年妇女常患的一种代谢性骨病,雌激素水平的明显下降是导致 PMO 的主要原因,因此 PMO 的防治多用雌激素替代疗法,但长期应用不良反应

大,疗效不肯定<sup>[5,6]</sup>。中药治疗骨质疏松在我国具有悠久的历史,选用不良反应小,疗效高的药物治疗骨质疏松是医学的重要研究课题之一。传统中医理论认为“肾藏精,精生髓,髓养骨”、“精足则髓足”髓在骨内,髓足则骨强,故若肾精亏损,则髓无以养,而致骨质疏松,所以骨质疏松症其本在骨,属骨痿,是由于肾虚所致,肾虚骨生髓,肾虚则骨空,日久发为骨痿,故补益肝肾为治疗骨痿的重要原则。而杜仲叶具有“补益肝肾,坚筋骨,轻身耐老”的功效。

骨代谢平衡失调会导致骨小梁稀少,骨小梁变细,间距增宽,骨小梁粗细不均,骨密度降低,尿钙降低和骨型碱性磷酸酶的升高等等。本实验结果显示,将 SD 雌性大鼠去卵巢后使其体内雌激素水平明显下降,治疗 16 周后。从子宫重量可见,杜仲叶组与雌激素组比较无明显差异,显示杜仲叶有类雌激素对子宫营养作用;从 HE 免疫组化染色可以看出,杜仲叶组与模型组比较,骨小梁明显增宽,间距减小,骨小梁粗细均匀;从  $\mu$ CT 图像与模型组比较,关节面较完整,骨密度明显提高,骨小梁数量显著增多。从生化指标看,杜仲叶与模型组比较,尿钙明显增加,骨型碱性磷酸酶明显降低,显示骨代谢活跃。

总之,杜仲叶醇提取物防治去势大鼠骨质疏松,为杜仲叶的药物开发与利用奠定了基础,并为骨质疏松的防治提高了新的思路和途径。

【 参 考 文 献 】

[ 1 ] FDA Guidance for industry and reviews 2002: estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers 12.

[ 2 ] Huang JH, Huang XH, Chen ZY, et al. Dose conversion among different animals and healthy volunteers in pharmacological study. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2004, 9:1069-72.

[ 3 ] National Research Council 1996: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

[ 4 ] Meyer-Sabellek W, Sinha P, Köttgen E. Alkaline phosphatase. Laboratory and clinical implications. J Chromatogr, 1988, 429: 419-44.

[ 5 ] Marsden J. Hormone replacement therapy and breast cancer. Maturitas,2000, 34( Suppl2 ):11-24.

[ 6 ] Task Force. Postmenopausal estrogen replacement and risk forvenous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis for the U. S. Preventive Services Ann Intern Med, 2002, 136( 9 ):42.

( 收稿日期: 2012-08-31 )

# 杜仲叶对去势骨质疏松大鼠骨代谢的影响

作者：[戴鹏](#)，[邓鸣涛](#)，[张立超](#)，[朱美兰](#)，[林思俭](#)，[刘荣华](#)，[罗军](#)  
作者单位：[南昌大学第二附属医院, 南昌, 330006](#)  
刊名：[中国骨质疏松杂志](#)   
英文刊名：[CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS](#)  
年，卷(期)：2012, 18(12)

## 参考文献(6条)

1. [FDA Guidance for industry and reviews 2002:estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers 12](#)
2. [Huang JH;Huang XH Chen ZYDose conversion among different animals and healthy volunteers in pharmacological study 2004](#)
3. [National Research Council 1996:Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#)
4. [Meyer-Sabellek W;Sinha P;Kttgen E Alkaline phosphatase Laboratory and clinical implications 1988](#)
5. [Marsden J Hormone replacement therapy and breast cancer 2000\(Suppl2\)](#)
6. [Task Force Postmenopausal estrogen replacement and risk forvenous thromboembolism:a systematic review and meta-analysis for the U.S.Preventive Services 2002\(09\)](#)

本文链接：[http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zggzsszz201212015.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201212015.aspx)