

二仙汤对去卵巢大鼠骨质疏松的影响

刘波^{1*} 陈明² 李姗姗¹ 刘志礼² 王力¹ 谢珍¹ 李苗¹

1. 江西中医药大学,南昌 330004
2. 南昌大学第一附属医院骨科,南昌 330004

中图分类号: R285.6 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014)02-0129-04

摘要: **目的** 探讨二仙汤防治去卵巢大鼠骨质疏松的作用及其初步机制。**方法** 实验SD大鼠分为假手术组、模型对照组、尼尔雌醇组和二仙汤高、中、低剂量组等6组,除假手术组施行假手术外,其余均行手术彻底摘除卵巢,术后连续10d以阴道涂片检测动情周期筛选动物,然后依照假手术组、模型对照组灌胃生理盐水,尼尔雌醇组灌胃尼尔雌醇(1.2 mg/(kg·w)),二仙汤高、中、低剂量组分别灌胃淫羊藿提取液(剂量依次为含生药12、8、4 g/kg),连续给药90 d,考察骨密度、骨生物力学,以及血清碱性磷酸酶(ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(ACP)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的变化。**结果** 与模型对照组相比,二仙汤能明显提高去卵巢大鼠骨密度($P < 0.01$)、股骨三点弯曲最大弯应力($P < 0.01$)和L₅腰椎压缩载荷力($P < 0.01$),提高血清ALP和SOD活性($P < 0.01$),降低血清ACP和MDA的含量($P < 0.01$)。**结论** 二仙汤能明显改善去卵巢大鼠骨质疏松症,促进成骨细胞增殖分化、抑制破骨细胞功能,抗氧化应激可能是其机制之一。

关键词: 二仙汤;骨质疏松症;活性氧;卵巢摘除

Effect of Er-xian decoction on osteoporosis in ovariectomized rats

LIU Bo¹, CHEN Ming², LI Shanshan¹, LIU Zhili², WANG Li¹, XIE Zhen¹, LI Miao¹

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China
2. The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330004, China

Corresponding author: LIU Bo, Email: bozhrlu@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect of Er-xian decoction on osteoporosis in ovariectomized rats and its preliminary mechanism. **Methods** The female SD rats were divided into 6 groups: sham operated group (Sham), ovariectomized group (Control), Nilestriol with ovariectomized group (Nilestriol), High concentration Er-xian decoction with ovariectomized group (HDDED), middle concentration Er-xian decoction with ovariectomized group (MDDED), and low concentration Er-xian decoction with ovariectomized group (LDED). Rats in Sham group received sham operation, while all the other rats were ovariectomized. The vaginal smear was observed to detect the estrous cycle of rats during consecutive 10 days after the operation, in order to screen rats. Then the screened rats in Sham group and the Control group were gavaged with normal saline. Rats in Nilestriol groups were gavaged with 1.2 mg/kg Nilestriol. The rats in HDDED group, MDDED group, and LDED group were gavaged with the extraction of herba epimedii, with the dosage of 12, 8, and 4 g/kg, respectively. All the treatment lasted for 90 days. The changes of bone mineral density (BMD), bone biomechanics characteristics, and the serum levels of ALP, ACP, SOD, and MDA were observed. **Results** Compared with that in the Control group, Er-xian decoction could significantly improve BMD, the maximum bending stress, and the loading force of the 5th lumbar vertebra ($P < 0.01$), increase serum ALP and SOD activity ($P < 0.01$), and lower the serum levels of ACP and MDA ($P < 0.01$). **Conclusion** Er-xian decoction can significantly relieve symptoms of osteoporosis in ovariectomized rats, promote the proliferation and differentiation of osteoblasts, inhibit the function of osteoclasts. Antioxidant stress may be one of the possible mechanisms.

Key words: Er-xian decoction; Osteoporosis; ROS; Ovariectomy

基金项目: 江西省自然科学基金项目(20114BAB205073);江西省卫生厅中医药科研项目(2011A142);江西中医学院重点学科培养计划资助项目(2012jzzdxk004)

* 通讯作者: 刘波, Email: bozhrlu@163.com

骨质疏松症(Osteoporosis)是以全身性骨量减少、骨微细结构退化为特征的一种慢性疾病,占全球常见病、多发病的第7位。据估计2020年美国骨量减少或骨质疏松症患者将达6100万,而2006年我

国 50 岁以上的骨质疏松症患者就达 6944 万,且发病率呈上升趋势^[1]。其发病机制仍不清楚,目前的激素代替疗法(HRT)、雌激素受体调节剂、双膦酸盐类等抑制骨吸收药物的治疗取得一定疗效,但副作用大,价格昂贵。骨质疏松症的症状主要是腰膝酸软、疼痛、或伴发畸形、骨折等,在祖国传统医学属“骨痿”、“骨痹”、“腰痛”等证的范畴,肾虚是发病的基本病机。所谓肾虚主要是肾虚髓亏,包含肾阴虚、肾阳虚、肾气虚、肾精不足等,与脾虚、肝血不足、血瘀等密切相关。中医理论认为,肾为先天之本,肾藏精,主骨生髓,如果肾精亏虚则骨髓化生无源,骨髓失充,骨失其养就会出现骨形成不足,骨骼脆弱,腰膝酸软等^[2]。从超微结构上看,肾虚元气不足,运化无力,不利于组织、细胞进行物质交换,骨营养不良,功能减退,逐渐出现骨小梁细且数目少,易产生微骨折现象。如《素问·痿论》“肾者水藏也,今水不胜火,则骨枯而髓虚,故足不任身,发为骨痿”,“肾主身之骨髓,肾气热则腰肌不举,肾枯则髓减,发为骨痿”。可见只有肾精充实,骨髓化生有源,骨得其养,坚固有力,才能防止骨质疏松症的产生。临床实践证明,中药在骨质疏松症治疗中发挥重要作用,二仙汤是上海中医药大学已故名医张伯讷教授针对围绝经期综合征研制的名方,整方由淫羊藿、仙茅、巴戟天、当归、知母、黄柏组成,以温而不燥,补肾壮阳的淫羊藿和仙茅为君药;温肾壮阳的巴戟天为臣药;佐以知母、黄柏性寒入肾经,泻相火,滋阴存阴;补血活血的当归为使药,全方温肾益精,滋阴泻火^[3]。本研究复制去卵巢致骨质疏松模型,产生肾虚现象,针对二仙汤的补肾填精功效,考察其对骨量、骨生物力学的变化,为临床应用二仙汤治疗骨质疏松症提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物:雌性 Sprague-Dawley 大鼠,6 月龄,体重 230~250 g,由江西中医学院实验动物中心提供,许可证号:SCXKC 赣 2009-0012。恒温,恒湿,实验期间动物自由饮食、水,连续灌胃给药 90 d,采血前 12 h 禁食。

1.1.2 药物与试剂:二仙汤组方中药淫羊藿(*Epimedii Folium*)、仙茅(*Curculiginis Rhizoma*)、巴戟天(*Morindae officinalis radix*)、当归(*Angelicae sinensis radix*)、知母(*Anemarrhenae rhizoma*)、黄柏(*Phellodendri chinensis cortex*)均购自南昌昌帮中药

行,由江西中医学院中药鉴定学科组付小梅副教授鉴定为朝鲜淫羊藿(*Epimedium koreanum Nakai.*),仙茅(*Curculigo orchoides Gaertn.*),巴戟天(*Morinda officinalis HOW*),当归(*Angelica sinensis (Oliv.) Diels*),知母(*Anemarrhena asphodeloides Bge.*),黄柏(*Phellodendron chinensis Schneid.*)。血清超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)检测试剂盒购于南京建成生物工程中心,尼尔雌醇购于北京四环制药有限公司,批号 20111201。血清碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(酶联免疫吸附试验法,批号: E91091Ra, L110818076),血清抗酒石酸酸性磷酸酶(ACP)检测试剂盒(酶联免疫吸附试验法,批号: E90902Ra, L110903047)均购于 Usca Life Science Inc.。

1.1.3 仪器:ELX800uv 酶标仪(美国 Bio-TEK 公司),双能 X 线吸收骨密度仪(DXA,美国 Lunar DPXIQ),微机控制电子万能试验机(WDW-200D,北京众晟华业科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 骨质疏松症模型的复制:2%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射 SD 大鼠致麻醉,从脊柱尽肋处切开肌肉和腹膜,揭开脂肪层,彻底切除两侧卵巢。假手术组则同样切开腹腔,揭开脂肪层,将卵巢移出后复位,并不切除卵巢而缝合切口。手术切除卵巢第 2 d 起进行阴道涂片检查,连续观察 10 d,根据是否有动情周期判断卵巢切除是否彻底,有动情周期的大鼠弃之不用。

1.2.2 二仙汤的制备:按比例原方 9:9:9:9:6:6,分别取淫羊藿、仙茅、巴戟天、当归、知母、黄柏等中药,统一煎煮标准为双蒸水漫过药液面 2 cm,先浸润 30 min,后文火煎煮 40 min,反复煎煮 3 次,最后将 3 次药液合并,浓缩至成为二仙汤高浓度提取液(12 g 生药/mL),同时又将其中部分二仙汤高浓度提取液稀释为二仙汤中浓度提取液(8 g 生药/mL)和二仙汤低浓度提取液(4 g 生药/mL)。

1.2.3 分组和给药:实验共分成 6 组,其中筛选后的 50 只卵巢彻底切除的雌性大鼠,随机分成 5 组,即模型对照组、尼尔雌醇组(1.2 mg/(kg·w))、二仙汤高、中、低剂量组按生药量分别计为 12, 8, 4 g/kg,每组 10 只,以仅作手术切开而未作卵巢切除的雌性大鼠(10 只)为假手术组。假手术组、模型对照组均灌服生理盐水,二仙汤高剂量组(HDED),二仙汤中剂量组(MDED)、二仙汤低剂量组(LDED)分别灌服二仙汤高、中、低剂量溶液,给药容积均为 10

mL/kg, 连续给药 90 d。

1.2.4 血清 ALP 和 ACP 检测:连续给药 90 d 后采用脱颈法处死动物, 处死前, 以心脏取血, 血清常温静置 2 h, 离心取血清。参照 ELISA 试剂盒方法, 分别检测 ALP 和 ACP。

1.2.5 血清 SOD、MDA 的检测:依据上述方法获得血清, 参照试剂盒方法进行 SOD、MDA 检测。

1.2.6 股骨骨密度检测:动物处死后, 分离大鼠的左下肢, 切开下肢皮肤, 轻轻剥离肌肉(不伤及骨膜), 再以生理盐水浸润的纱布包裹, 置 -20℃ 冰箱保存, 实验前先室温放置 6h 再采用双能 X 线吸收骨密度仪对股骨进行整体扫描, 检测股骨整体骨量(BMC)及单位面积骨密度(BMD)。

1.2.7 股骨三点弯曲试验和 L5 腰椎压缩试验:动物处死后, 同样分离大鼠右下肢和 L5 腰椎, 切开下肢皮肤, 轻轻剥离肌肉(不伤及骨膜), 以生理盐水浸润的纱布包裹, 置 -20℃ 冰箱保存, 实验前先室温放置 6 h 再采用微机控制电子万能试验机进行骨生物力学检测, 其中右股骨的三点弯曲试验, 设置跨长度为 12 mm, 最大量程为 1000 N, 加载速度为 1 mm/min 进行试验, 计算最大应力(Femur Stress, MPa)。L5 腰椎的压载实验设置加载速度为 1 mm/min 进行压载, 计算最大载荷(The 5th Lumbar Spine Compress, N)。

1.3 统计学处理

所有数据均采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 SPSS 11.5 统计分析软件 *t* 检验进行分析比较, $P < 0.05$ 有统计学意义, $P < 0.01$ 有极显著意义。

2 结果

2.1 二仙汤提高去卵巢大鼠的骨密度

骨量的多少反映骨质密度高低, 本研究结果显示, SD 大鼠去卵巢后骨密度无论是股骨总骨量还是单位面积的骨量均明显降低, 表明切除大鼠卵巢作为骨质疏松症模型符合实验要求, 尼尔雌醇作为性激素, 可以防止去卵巢后的骨量丢失。而二仙汤补肾填精, 高、中、低剂量均可显著提高去卵巢后骨量减少的情况, 且呈现剂量依赖性(见表 1)。

2.2 二仙汤提高骨抗压载能力和弯曲应力

骨生物力学作为骨质疏松症的检测指标是近年来发展起来, 主要反映骨质对压缩载荷、扭转、拉伸等力各位力的影响。我们研究结果显示, 去卵巢大鼠的股骨三点弯曲应力和 L5 腰椎压缩载荷明显下降。性激素尼尔雌醇不直接提高股骨的三点弯曲应

力, 但能提高 L5 腰椎的抗压缩载荷。而二仙汤高、中、低剂量均显著提高去卵巢大鼠的股骨三点弯曲应力和 L5 腰椎压缩载荷, 且呈浓度依赖性(见表 2)。

表 1 二仙汤对股骨骨密度的影响 $(\bar{x} \pm s, n = 10)$

Table 1 The effect of Er-xian decoction on the BMD of the femur $(\bar{x} \pm s, n = 10)$

Groups	Doses	BMC (g)	BMD (g/cm ²)
Sham	—	0.31 ± 0.04	0.24 ± 0.03
Control	—	0.22 ± 0.03	0.15 ± 0.04
Nilestriol	1.2 mg/kg, w	0.28 ± 0.042 ²⁾	0.21 ± 0.032 ²⁾
LDED	4 g/kg	0.26 ± 0.042 ²⁾	0.19 ± 0.071 ¹⁾
MDED	8 g/kg	0.28 ± 0.052 ²⁾	0.23 ± 0.042 ²⁾
HDED	12 g/kg	0.30 ± 0.052 ²⁾	0.24 ± 0.042 ²⁾

注: 与模型对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 后表均同

Notice: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, versus Control group, the same as below

表 2 二仙汤对骨生物力学的影响 $(\bar{x} \pm s, n = 10)$

Table 2 The effect of Er-xian decoction on bone biomechanical characteristics $(\bar{x} \pm s, n = 10)$

Groups	Doses	Femur Stress (MPa)	The 5th Lumbar Spine Compress (N)
Sham	—	20.76 ± 3.12	244.5 ± 16.8
Control	—	14.54 ± 2.26	167.4 ± 18.5
Nilestriol	1.2 mg/kg, w	15.24 ± 3.08	192.8 ± 20.61 ¹⁾
LDED	4 g/kg	16.86 ± 3.882 ²⁾	189.5 ± 28.61 ¹⁾
MDED	8 g/kg	18.85 ± 2.762 ²⁾	210.4 ± 21.82 ²⁾
HDED	12 g/kg	19.20 ± 2.342 ²⁾	228.6 ± 26.82 ²⁾

2.3 二仙汤促进骨生成并抑制骨吸收

骨形成和骨吸收是维持骨量平衡的主要因素, 骨形成和骨吸收通常分别成骨细胞和破骨细胞的功能, 成骨细胞的增殖、分化能提高 ALP 含量, 促进骨形成, 而破骨细胞主要与骨吸收相关, ACP 的含量反映破骨细胞的数量。本研究结果显示, 切除大鼠卵巢后 ALP 含量降低, ACP 含量显著升高, 但性激素尼尔雌醇不提高 ALP 含量, 却能显著降低 ACP 含量。二仙汤能呈浓度依赖关系地提高 ALP 水平和降低血清 ACP 水平(见表 3)。

2.4 二仙汤的抗氧化作用

结果显示, 切除卵巢可明显降低血清 SOD 活力, 从而清除自由基的能力下降, 脂质过氧化物明显增多。雌激素尼尔雌醇可提高 SOD 活力, 降低脂质过氧化物含量。二仙汤同样呈剂量依赖性的提高 SOD 活力, 降低脂质过氧化物含量(见表 4)。

表 3 二仙汤对血清碱性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 The effect of Er-xian decoction on serum ALP and ACP ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Groups	Doses	ALP (ng mL ⁻¹)	ACP (ng mL ⁻¹)
Sham	—	15.35 ± 3.55	28.43 ± 4.12
Control	—	12.23 ± 2.64	42.71 ± 5.35
Nilestriol	1.2 mg/kg. w	13.11 ± 2.13	24.24 ± 4.732 ²⁾
LDED	4 g/kg	15.24 ± 2.762 ²⁾	34.52 ± 7.162 ²⁾
MDED	8 g/kg	16.48 ± 2.022 ²⁾	27.9 ± 3.672 ²⁾
HDED	12 g/kg	16.94 ± 2.152 ²⁾	25.47 ± 3.442 ²⁾

表 4 二仙汤对血清 SOD 和 MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 The effect of Er-xian decoction on serum SOD and MDA ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Groups	Doses	SOD (U · L ⁻¹)	MDA (mmol · L ⁻¹)
Sham	—	68 ± 4.2	4.8 ± 0.7
Control	—	47 ± 6.1	6.2 ± 0.6
Nilestriol	1.2mg/kg. w	64 ± 6.42 ²⁾	5.2 ± 0.81 ¹⁾
LDED	4 g/kg	55 ± 8.41	5.2 ± 0.91 ¹⁾
MDED	8 g/kg	64 ± 6.52 ¹⁾	4.9 ± 0.62 ²⁾
HDED	12 g/kg	73 ± 8.62 ²⁾	4.3 ± 0.72 ²⁾

3 讨论

二仙汤是针对围绝经期综合征研制的名方,淫羊藿、仙茅、巴戟天、当归、知母、黄柏组成温而不燥,能泻相火,滋阴存阴,温肾益精。骨质疏松症是以骨量减少、骨微细结构退化为特征的一种慢性疾病,祖国医学多归属于肾虚。本研究采用雌性大鼠,以去卵巢模拟绝经,针对骨质疏松症采取二仙汤进行防治,为扩大中药二仙汤的临床应用范围和揭示中药防治骨质疏松症的机制提供依据。

骨密度、骨生物力学的变化直接反映骨量和骨质状态,是衡量骨质疏松症的关键指标,骨密度降低体现骨量减少,骨生物力学指标如骨弯曲应力和抗压载荷下降说明骨质脆弱。本研究成功复制了去卵巢大鼠骨质疏松症模型,并直接说明随着二仙汤剂量的增加,防治骨质疏松症的作用增强^[4]。

研究发现卵巢摘除能明显增加 ROS 的产生^[5],促进破骨细胞分化,加速骨吸收,并诱导成骨细胞凋亡,减少骨形成^[6]。在生命过程中,骨发育成熟后仍进行少量的骨重建,使骨在更新中保持强度和矿

化的稳态,涉及旧骨消除和新骨形成,由紧密配对的成骨细胞和破骨细胞共同组成的骨重建单位执行。成骨细胞是骨形成的功能细胞^[7],分泌 ALP,细胞寿命缩短,功能退化,使骨形成减少,不能完全填充骨吸收腔。ACP 是破骨细胞的特征,反映骨吸收,破骨细胞数量增多则骨吸收增强,骨吸收和形成偶联失调,则骨量负平衡,产生骨量下降和骨微细结构退化。本研究发现二仙汤不仅提高 SOD 水平,清除自由基,与文献报道相符^[8],还能促进 ALP 增加,明显降低 ACP 水平,说明二仙汤从促进骨形成,抑制骨吸收两个方面维持骨量,减少丢失,与去卵巢后雌激素减少,ROS 增加是骨质疏松症产生的重要因素的结论相对应^[9],抗氧化刺激可能是二仙汤防治骨质疏松症的机制之一。

【 参 考 文 献 】

- [1] Zhang Y, Liu Z, Zhang P. Epidemiological study on postmenopausal osteoporosis [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2010, 3(16) : 229-234.
- [2] Liu M, Li Y, Pan J, et al. Effects of zuogui pill on Wnt signal transduction in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. J Tradit Chin Med, 2011, 31(2) : 98-102.
- [3] Wang C, Zhang Z, Ma J. Effect of Er-Xian decoction on osteoporosis: clinical observation of 50 cases [J]. Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 1998, 19(5) : 205.
- [4] Nian H, Xu L, Ma M, et al. Protective effect of Er-xian decoction on ovariectomy-induced osteoporosis in rats [J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2007, 28(3) : 277-280.
- [5] Yu SJ, Liu HC, E LL, et al. Proliferation and differentiation of osteoblasts from the mandible of osteoporotic rats [J]. Experimental Biology and Medicine, 2012, 237(4) : 395-406.
- [6] Bai X, Lu D, Liu A, et al. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-κB ligand expression in osteoblast [J]. J Biol Chem, 2005, 280(17) : 17497-506.
- [7] Marie PJ, Kassem M. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets [J]. Eur J Endocrinol, 2011, 165(1) : 1-10.
- [8] Xue L, Wang Y, Liu L, et al. A HNMR-based metabonomics study of postmenopausal osteoporosis and intervention effects of Er-Xian decoction in ovariectomized rats [J]. Int J Mol Sci, 2011, 12(11) : 7635-7651.
- [9] Manolagas SC. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: A revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis [J]. Endocr Rev, 2010, 31(3) : 266-300.

(收稿日期: 2013-01-15; 修回日期: 2013-04-12)

二仙汤对去卵巢大鼠骨质疏松的影响

作者: 刘波, 陈明, 李姗姗, 刘志礼, 王力, 谢珍, 李苗, LIU Bo, CHEN Ming, LI Shanshan, LIU Zhili, WANG Li, XIE Zhen, LI Miao

作者单位: 刘波, 李姗姗, 王力, 谢珍, 李苗, LIU Bo, LI Shanshan, WANG Li, XIE Zhen, LI Miao(江西中医药大学, 南昌, 330004), 陈明, 刘志礼, CHEN Ming, LIU Zhili(南昌大学第一附属医院骨科, 南昌, 330004)

刊名: 中国骨质疏松杂志 

英文刊名: Chinese Journal of Osteoporosis

年, 卷(期): 2014(2)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201402004.aspx