

# 骨疏颗粒对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度及血清细胞因子的影响

毛海琴 杜义斌 徐莹 闵晓黎 李晓燕

**【摘要】 目的** 观察骨疏颗粒对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度及血清细胞因子的影响,探讨骨疏颗粒防治骨质疏松症的可能作用机制。**方法** 将3月龄SD雌性大鼠40只,按随机数字表法分为空白组、模型组、戊酸雌二醇组及骨疏颗粒组。空白组只行假手术,其余3组用去大鼠双侧卵巢复制绝经后骨质疏松症的模型。术后3天分别给戊酸雌二醇及骨疏颗粒灌胃,12周后检测血清白细胞介素(interleukin, IL)1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 及左股骨骨密度。**结果** (1)与空白组比较,模型组骨密度显著下降,血清 IL-1 $\beta$  及 IL-6 显著增加( $P<0.01$ ), TNF- $\alpha$  增加( $P<0.05$ );(2)与模型组比较,戊酸雌二醇组骨密度显著增加( $P<0.01$ ),血清 IL-1 $\beta$  显著降低( $P<0.01$ ), IL-6 及 TNF- $\alpha$  均降低( $P<0.05$ );骨疏颗粒组骨密度增加( $P<0.05$ ),血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  均降低( $P<0.05$ )。**结论** 骨疏颗粒对去卵巢骨质疏松大鼠有治疗作用,其作用机制可能是通过降低血清中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  细胞因子水平,从而抑制骨吸收。

**【关键词】** 骨疏颗粒; 骨质疏松; 骨密度; 白介素-1 $\beta$ ; 白介素-6; 肿瘤坏死因子- $\alpha$

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.09.012

**Effect of Gushu powder on bone mineral density and serum cytokines in rats with osteoporosis following ovariectomy** MAO Hai-qin, DU Yi-bin, XU Ying, et al. Geriatric Department of First Hospital affiliated to Yunnan University of TCM, Kunming 650021, China

Corresponding author: DU Yi-bin, E-mail: dybys@126.com

**【Abstract】 Objective** To observe Gushu powder treating rats with ovariectomy osteoporosis, and explore the mechanism of Gushu powder protecting and treating osteoporosis. **Methods** According to random number table, forty SD female rats of three months were randomly divided into four groups: sham group, model group, estradiol valerate group, and Gushu powder group. The sham group only got sham-operation and the other three groups were ovariectomized respectively. Three days later after ovariectomy, the rats were given estradiol valerate (0.5 mg/kg) and Gushu powder (10 mL/kg) by intragastric administration for twelve weeks. Bone mineral density (BMD) was detected with dual-energy X-ray absorptiometry. Serum interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) were detected. **Results** (1) Compared with the sham group, the BMD significantly decreased ( $P<0.01$ ), IL-1 $\beta$  and IL-6 significantly increased ( $P<0.01$ ), and TNF- $\alpha$  increased in model group ( $P<0.05$ ). (2) Compared with model group, BMD in Bujiale group dramatically increased ( $P<0.01$ ), IL-1 $\beta$  significantly decreased ( $P<0.01$ ), IL-6 and TNF- $\alpha$  decreased ( $P<0.05$ ). While in Gushu powder group, BMD in Bujiale group increased ( $P<0.05$ ); IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  decreased ( $P<0.05$ ).

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金(2011Y410, 2012C034); 云南白药、云南中医学院中医药教育创新基金(YB2011J06); 云南中医学院科研基金(XK201309); 云南省中医院院级科研(2011YJ034)

作者单位: 650021 昆明, 云南中医学院第一附属医院老年病科(杜义斌、毛海琴、李晓燕), 科教科(徐莹), 放射科(闵晓黎)

作者简介: 毛海琴(1978-), 女, 硕士, 讲师。研究方向: 中医药防治风湿病。E-mail: mao1978hq@163.com

通讯作者: 杜义斌(1968-), 本科, 主任医师, 硕士生导师。研究方向: 中医药防治老年病。E-mail: dybys@126.com

**Conclusions** *Gushu* powder may prevent and treat osteoporosis through reducing serum IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  which can depress bone absorption.

**【Key words】** *Gushu* powder; Osteoporosis; Bone mineral density; Interleukin-1 $\beta$ ; Interleukin-6; Tumor necrosis factor- $\alpha$

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种以骨量减少, 骨组织显微结构退化为特征, 导致脆性增加及骨折危险性增加的一种全身代谢性骨病<sup>[1]</sup>。随着人口老龄化和人类寿命延长, 骨质疏松症已成为全球健康问题<sup>[2]</sup>。根据 2003 至 2006 年的调查估算, 中国 2006 年 50 岁以上人群中约有 6944 万人患有骨质疏松症, 近 2.1 亿人为低骨量状态<sup>[3]</sup>, 因此防治骨质疏松症刻不容缓。研究表明, 细胞因子能够调节骨重建, 白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 及肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 等细胞因子能够增加破骨细胞活性, 促进骨吸收, 致使骨重建失衡<sup>[4-6]</sup>。骨疏颗粒是本院治疗骨质疏松症的协定处方, 临床应用多年, 疗效显著。相关的临床研究发现, 骨疏颗粒可以改善绝经后 OP 的主要症状, 降低骨吸收代谢指标, 提高绝经后 OP 患者腰椎骨密度<sup>[7-8]</sup>。为进一步明确骨疏颗粒治疗骨质疏松症的作用机制, 本研究以去卵巢骨质疏松大鼠为研究对象, 观察骨疏颗粒对骨密度及血清细胞因子的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级健康 SD 大鼠, 雌性, 40 只, 体质量 (200 $\pm$ 20) g, 3 月龄, 广州中医药大学动物实验中心提供。动物合格证书号: SCXK (粤) 2013-0020。

### 1.2 实验药品

骨疏颗粒由狗脊 30 g、骨碎补 15 g、淫羊藿 10 g、熟地 15 g、杜仲 20 g、知母 10 g、黄芪 20 g、白术 10 g、苍术 10 g、三七粉 3 g、羌活 10 g、独活 10 g, 共 12 味药组成, 为颗粒剂, 由广州中医药大学制剂中心制备; 戊酸雌二醇片 (商品名: 补佳乐, 拜耳医药保健有限公司广州分公司, 生产批号 069A2); 注射用青霉素 (华北制药股份有限公司, 生产批号 J3048403)。

### 1.3 主要试剂与仪器

大鼠 TNF- $\alpha$  试剂盒 (联科生物技术有限公司, 生产批号 238240523); 大鼠 IL-1 $\beta$  试剂盒 (联科生

物技术有限公司, 生产批号 2301B40534); 大鼠 IL-6 试剂盒 (联科生物技术有限公司, 生产批号 230640433); AL204-IC 电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); Multiscan Mk3-酶标仪 (美国 BIO-RAD550); 辽制 00000131-1 普通电子天平 (沈阳龙腾电子公司); 移液器 (EPPENDORF); XW-80A 旋涡混合器 (江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司); XK96-3 型微量振荡器 (姜堰市新康医疗器械有限公司); 双能 X 线吸收骨密度仪 (美国通用电气公司); F80 超低温冰箱 (SANYO 公司)。

### 1.4 动物分组及模型建立

将 SD 雌性大鼠按随机数字表法分为空白组及模型组、戊酸雌二醇组、骨疏颗粒组 4 组。每组 10 只。各组大鼠经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 0.3 mL/100 g 体重, 仰卧位固定。75% 酒精消毒, 沿下腹正中线切口 2~3 cm。先将模型组、戊酸雌二醇组、骨疏颗粒组“Y”型子宫角暴露, 然后结扎子宫角, 切除双侧卵巢, 空白组只切除卵巢周围少许脂肪组织, 逐层关闭, 缝合切口。术后连续肌注青霉素 3 天, 40000 u/只。模型组、戊酸雌二醇组、骨疏颗粒组连续阴道涂片 2 个性周期, 示阴道上皮无性周期变化, 提示卵巢切除成功。术后所有大鼠在室温 22.5~24℃ 及湿度 53%~54.5% 的 SPF 级饲养室饲养。实验过程中, 空白组及模型组各脱落 1 例; 戊酸雌二醇组脱落 2 例。空白组、模型组及戊酸雌二醇组各 1 只大鼠于术后出现肠胀气, 肠梗阻死亡; 戊酸雌二醇组 1 只误灌药入肺死亡。

### 1.5 给药方法

术后第 4 天开始给药, 灌胃的剂量按人与大鼠体表面积比折算成大鼠等效剂量。空白组灌服蒸馏水 1 mL/100 g。模型组按 1 mL/100 g 灌服蒸馏水, 戊酸雌二醇组按 0.05 mg/(mL $\cdot$ 100 g) 给药, 骨疏颗粒组按 0.3 g/(mL $\cdot$ 100 g) 给药。每日上午灌胃 1 次, 连续灌胃 12 周。

### 1.6 检测指标

实验大鼠在最后一次灌胃后, 禁食 12 小时, 自由饮水。经 10% 水合氯醛按 0.3 mL/100 g 体重腹腔麻醉, 卧位固定, 75% 酒精消毒腹部皮肤, 腹主动脉取血。4℃ 静置 30 分钟后, 以 3000 rpm 离心 15

分钟,分离血清,分装入 Eppendorf 管,标号,-20℃保存。检测时常温下解冻血清,酶联免疫吸附法检测 IL-1β、IL-6 及 TNF-α。分离左侧股骨,剥离肌肉、肌腱等组织,用 0.9% 生理盐水湿润纱布,包裹离体股骨,-80℃ 冰箱保存,用于骨密度测定。

1.7 统计学处理

实验数据采用 SPSS 15.0 统计软件进行处理,实验结果以均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,各组数据符合正态分布,方差齐,采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 进行分析,组间两两比较采用 LSD 分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对左股骨骨密度的影响

组间比较采用单因素方差分析,组间差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。与空白组比较,模型组骨密度显著降低 ( $P<0.01$ ),差异有统计学意义;与模型组比较,戊酸雌二醇组骨密度显著增加 ( $P<0.01$ ),骨质疏松颗粒组骨密度增加 ( $P<0.05$ ),差异均有统计学意义,具体见表 1。

表 1 各组大鼠左股骨骨密度比较 ( $\bar{x}\pm s$ )		
组别	<i>n</i>	骨密度 ( $\text{g}/\text{cm}^2$ )
空白组	9	0.219±0.010
模型组	9	0.177±0.011 <sup>a</sup>
戊酸雌二醇组	8	0.196±0.005 <sup>c</sup>
骨质疏松颗粒组	10	0.187±0.019 <sup>b</sup>

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ,<sup>c</sup> $P<0.01$

2.2 对血清细胞因子的影响

采用单因素方差分析对各组间 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 进行统计学分析,IL-1β 组间差异有统计学意义 ( $P<0.01$ ),IL-6 组间差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),TNF-α 组间差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。采用 LSD 分析进行组间两两比较,与空白组比较,模型组 IL-1β 及 IL-6 显著增加 ( $P<0.01$ ),TNF-α 增加 ( $P<0.05$ ),差异均有统计学意义;与模型组比较,戊酸雌二醇组 IL-1β 显著

降低 ( $P<0.01$ ),IL-6 及 TNF-α 均降低 ( $P<0.05$ ),差异均有统计学意义;与模型组比较,骨质疏松颗粒组 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 均降低 ( $P<0.05$ ),差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ),具体见表 2。

3 讨论

绝经后骨质疏松症(I型)是指因为雌激素急剧下降导致的以骨吸收增强、骨量减少、骨脆性增加、骨显微结构退化为特征,易于发生骨折的一种全身代谢性骨骼疾病<sup>[9]</sup>。目前,骨质疏松症大鼠模型的制作方法主要有维甲酸灌胃、切除卵巢和灌服糖皮质激素造模 3 种。采用雌性大鼠双侧卵巢切除方法进行造模,是研究绝经后骨质疏松症的经典模型<sup>[10]</sup>。本研究采用摘除大鼠双侧卵巢复制骨质疏松症模型,术后连续阴道涂片 2 个性周期。研究显示大鼠阴道上皮性周期变化消失,模型复制成功。骨密度检测亦显示模型组骨密度较空白组明显降低。

双能 X 线吸收测定法 (dual energy X-ray absorptiometry, DXA) 测量值是目前国际学术界公认的骨质疏松症诊断的金标准。骨质疏松能够提高去卵巢骨质疏松大鼠的骨密度,此组骨密度与去模型组大鼠比较有统计学意义。

骨质疏松的发病过程是骨重建偏向破骨细胞所致的骨吸收不平衡过程,细胞因子产生于骨的微环境中,骨重建过程受到 TNF-α、IL-1β、IL-6 等细胞因子的调节。TNF-α 由骨原细胞产生,也可以由其他因子诱导产生,具有促进破骨细胞生成,加速骨吸收的作用<sup>[11]</sup>。IL-1 是促破骨细胞的细胞因子之一,IL-1 可以刺激成骨细胞产生 IL-6 与 TNF-α 细胞,而且可以与这两种细胞因子相互协调,促进骨吸收<sup>[12]</sup>。本研究中,模型组 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 较空白组明显升高。用药 12 周后,戊酸雌二醇组及骨质疏松颗粒组血清 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 均降低,与模型组比较,差异均有统计学意义。骨质疏松防治骨质疏松症的机制可能是通过抑制 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 分泌,纠正骨吸收不平衡,进而减少骨吸收。

表 2 各组大鼠血清细胞因子的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )				
组别	<i>n</i>	IL-1β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
空白组	9	72.978±7.711	123.032±5.215	245.513±9.589
模型组	9	83.797±7.118 <sup>b</sup>	128.265±4.394 <sup>b</sup>	254.296±13.669 <sup>a</sup>
戊酸雌二醇组	8	72.390±4.574 <sup>d</sup>	124.463±5.893 <sup>c</sup>	246.581±9.480 <sup>c</sup>
骨质疏松颗粒组	10	77.563±9.111 <sup>c</sup>	124.374±3.435 <sup>c</sup>	246.194±7.021 <sup>c</sup>

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ,<sup>d</sup> $P<0.01$

本课题组临床观察发现,骨质疏松症主要病机为脾肾亏虚,瘀血阻络。骨疏颗粒由狗脊 30 g、骨碎补 15 g、淫羊藿 10 g、熟地黄 15 g、杜仲 20 g、知母 10 g、黄芪 20 g、白术 10 g、苍术 10 g、三七粉 3 g、羌活 10 g、独活 10 g 等组成。方中狗脊、骨碎补、淫羊藿、熟地黄、杜仲、知母补肾壮骨,黄芪、白术、苍术补益脾气,三七、羌活、独活活血通络止痛,共奏补肾健脾,活血通络止痛之功。现代药理学研究显示,淫羊藿总黄酮能有效防止灌服维甲酸造成的大鼠骨量丢失,改善骨组织的显微结构,调节骨形成与骨破坏的紊乱状态,进而有效地对抗骨质疏松的发生<sup>[13]</sup>。谢雁鸣等<sup>[14]</sup>研究发现,骨碎补总黄酮能显著提高大鼠股骨及腰椎的骨密度,调节细胞因子 IL-6、IL-4 及 TNF- $\alpha$  的水平。杜仲叶醇提取物具有类激素样作用,能增进大鼠骨髓生成和增加骨质强度<sup>[15]</sup>。黄芪水提液防止去卵巢大鼠骨丢失的效应与乙烯雌酚相近,但机制不同;其不仅能抑制去卵巢后的骨吸收,而且能增加体重<sup>[16]</sup>。由此可知,骨疏颗粒主要药物淫羊藿、骨碎补、杜仲、黄芪等均有抗骨质疏松作用。本课题组前期临床研究亦表明<sup>[7-8]</sup>,骨疏颗粒能改善 OP 的相关症状,抑制骨吸收,减缓骨量丢失,提高腰椎骨密度。本实验研究显示,骨疏颗粒可以增加去卵巢骨质疏松症大鼠骨密度,与模型组比较,差异有统计学意义。

综上,骨疏颗粒对去卵巢骨质疏松大鼠有治疗作用,其机制可能是通过降低血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  水平,抑制骨吸收,从而防治骨质疏松症。

### 参 考 文 献

- [1] Elaine D, Zoe C, Cyrus C. Diagnosis and epidemiology of osteoporosis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2005, (17): 456-461.
- [2] Cooper C, Melton LJ. Epidemiology of osteoporosis[J]. Trends Endocrinol Metab, 1992, (3): 224-229.
- [3] 朱汉民,方积乾,罗先正,等. 骨量流行病学:中国大陆的骨量变化和平均骨峰值[C]//2007 国际骨质疏松大会会刊, 2007, 4-7.
- [4] 李忠武,章明放,赵风云,等. 白细胞介素-1、-6 mRNA 在去势大鼠骨组织中的表达及其意义[J]. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11(4): 418-422.
- [5] Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, et al. IL-6 / IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions [J]. Clinical Science, 2012, 122(4): 143-159.
- [6] Kimble RB, Srivastava S, Ross PF, et al. Estrogen deficiency increases the ability of stromal cell to support urine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony stimulating factor production [J]. J Biol Chem, 1996, 271(46): 28890-28897.
- [7] 杜义斌,徐翔峰,彭江云. 骨疏颗粒治疗老年性骨质疏松症 30 例疗效观察[J]. 云南中医中药杂志, 2006, 27(5): 15.
- [8] 杜义斌,吴洋,段艳蕊,等. 骨疏颗粒治疗绝经后骨质疏松症临床观察[J]. 新中医, 2013, 45(8): 76-78.
- [9] 罗颂平,谈勇. 中医妇科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2012: 117-119.
- [10] 李青南,梁念慈,胡彬,等. 骨质疏松药物研究指南(美国 FDA)的方案简介附去卵巢模型及联合用药[J]. 中国骨质疏松杂志, 1997, 3(1): 75-78.
- [11] 李知玻,李子峰,章莹,等. TNF- $\alpha$  对成骨细胞凋亡作用的探讨[J]. 中国骨质疏松杂志, 2012, (10): 892-894.
- [12] Kwantan S, Padrine M, Thedeyre S, et al. IL-5, RANKL, TNF- $\alpha$ /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15(1): 49-52.
- [13] 回连强,曹春雨,刘婷,等. 黔岭淫羊藿总黄酮对抗维甲酸致大鼠骨质疏松作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(3): 170-174.
- [14] 谢雁鸣,许勇钢,赵晋宁,等. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨密度和细胞因子 IL-6、IL-4、TNF $\alpha$  水平的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(1): 34-37.
- [15] 李亚平. 杜仲叶提取物治疗骨质疏松浅见[J]. 四川中医, 1996, 14(9): 16.
- [16] 李朝阳,吴铁,黄连芳,等. 黄芪水提液与己烯雌酚对去卵巢大鼠骨代谢的影响[J]. 中草药, 1998, 29(1): 27-30.

(收稿日期: 2014-07-15)

(本文编辑: 董历华)

## · 启事 ·

### 本刊对来稿中图、表的有关要求

凡能用文字说明者,尽量不用图表。图表均应有简要的图题和表题。图、表序号一律用阿拉伯数字,分别按其在正文出现的先后次序连续编码,并在正文相应位置标示。

**图** 在 WORD 文档中出现的图,印刷效果可能不好,要求另附单独的电子图片。

**表** 一律采用“三线表”,其内容不可与文字和图重复。表内不设备注栏,如有需说明的事项(如 P 值等),以简炼文字写在表的下方,表内依次用<sup>a</sup>、<sup>b</sup>、<sup>c</sup>、<sup>d</sup>号标注在相应内容的右上角。表内参数的单位应尽量相同,放在表的右上方;如各栏参数的单位不同,则放在各栏的表头内,(均值 $\pm$ 标准差)用( $\bar{x}\pm s$ ),置于表的右上方。表内数据要求同一指标保留的小数位数相同,一般比可准确测量的精度多一位。统计学处理结果统一用<sup>a</sup>、<sup>b</sup>、<sup>c</sup>、<sup>d</sup>表示  $P<0.05$  或  $P<0.01$ 。