

补骨胶囊与 17-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

金勋杰¹ 吴铁¹ 李青南² 林柏云³ 刘双意³

(1. 广东医学院药理教研室,广东 湛江 524023;2. 骨生物学研究室;3. 附属医院骨外科)

【摘要】 目的 观察补骨胶囊与 17-炔雌醇联合用药对去卵巢大鼠骨质疏松的预防作用及对子宫的刺激作用。方法 47 只 4 月龄 SD 雌性大鼠随机分为 6 组: 假手术组; 去卵巢组; 高剂量及低剂量 17-炔雌醇预防组; 补骨胶囊预防组; 补骨胶囊与低剂量 17-炔雌醇联合用药组。实验 12 周,通过骨组织形态计量学方法分析大鼠骨量变化情况,通过测量子宫湿重及内膜厚度分析用药对子宫的刺激作用。结果 去卵巢组骨小梁面积百分率(Tb.Ar%)比假手术组显著下降,高剂量 17-炔雌醇组和联合用药组 Tb.Ar%比去卵巢组显著增加。高、低剂量 17-炔雌醇组与去卵巢组比,子宫湿重及内膜厚度都显著增加;联合用药组与两个 17-炔雌醇组比,子宫湿重及内膜厚度显著降低。结论 补骨胶囊与 17-炔雌醇联合用药可有效预防去卵巢大鼠骨质疏松,与单独使用 17-炔雌醇比,对子宫刺激作用显著降低。

【关键词】 补骨胶囊; 17-炔雌醇; 骨质疏松; 骨组织形态计量学; 大鼠

Effects of combined medication of BG and 17-ethinylestradiol(EE) on preventing osteoporosis and stimulating uterus in ovariectomized rats JIN Xunjie, WU Tie, LI Qingnan, et al. Department of Pharmacology, Bone Biology Lab, Guangdong Medical College(Guangdong Zhanjiang, 524023, China)

【Abstract】 Objective To observe the effects of combined medication of BG(a kind of traditional Chinese Medicine) and EE on preventing osteoporosis and stimulating uterus in ovariectomized(OVX) rats **Methods** 47 female SD rats were divided into 6 groups: sham-OVX group; OVX group; high-dose EE group; low-dose EE group; BG group; combined medication of EE and BG group. After experimental period of 12 weeks, the changes of bone mass were observed with quantitative bone histomorphometry, and the uterus side-effects were observed by measuring the wet weight of the uterus and the endometrium epithelial thickness(EET). **Results** Trabecular area percent (Tb. Ar %) of OVX group decreased in comparison with sham-OVX group. The Tb. Ar % of high-dose EE group and combined medication group increased significantly in comparison with OVX group. The uterine wet weight and EET of high-dose and low-dose EE group increased significantly in comparison with OVX group. Combined medication of BG and EE showed decreases in uterine weight and EET, in comparison with high-dose and low-dose EE group. **Conclusion** Combined medication of BG and EE could prevent osteoporosis, and in the meantime stimulating effect on uterus significantly decreased in comparison with using EE alone.

【Key words】 BG; 17-ethinylestradiol(EE); Osteoporosis; Bone histomorphometry; Rats

补骨胶囊是由淫羊藿、黄芪、白术中提取,经一定工艺加工而成的中药复方胶囊制剂。过去的研究证明该复方具有抗大鼠骨质疏松、促进骨形成^[1-3]的作用。我们希望通过联合应用补骨胶囊和雌激素,来增强其预防效果,降低雌激素剂量,减弱雌激素的副作用。因此,设计了下述实验。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂 17-炔雌醇由 SIGMA 公司生产;补骨胶囊由广东医学院医药科技开发中心生产,由淫羊藿、黄芪、白术中提取,生药由广东医学院天然药物实验室鉴定,每粒胶囊含 400 mg 粉末,相当于 1.4 g 生药。

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

图象数字化分析仪,包括光镜和荧光显微镜(Nikon,日本)、计算机(Macintosh IICx,美国苹果公司产品)、数字化板、电脑和形态学程序“Stereology”体视学(美国)。

1.3 实验动物及分组 4月龄未交配的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(广东省实验动物中心提供) 47只,体重(256 ± 19) g,按随机排列分为 6 组:假手术组;去卵巢组;以上两组给以生理盐水, 5 ml · kg⁻¹ · d⁻¹, po; 高剂量 17-炔雌醇预防组,给以 17-炔雌醇 30 μg · kg⁻¹ · d⁻¹, po; 低剂量 17-炔雌醇预防组,给以 17-炔雌醇 6 μg · kg⁻¹ · d⁻¹, po; 补骨胶囊预防组,给以 33 粒补骨胶囊; 100 ml 生理盐水的溶液, 5 ml · kg⁻¹ · d⁻¹, po; 补骨胶囊与低剂量 17-炔雌醇联合用药预防组:给以 33 粒补骨胶囊: 120 μg 17-炔雌醇: 100 ml 生理盐水的溶液, 5 ml · kg⁻¹ · d⁻¹, po, 相当于补骨胶囊与低剂量 17-炔雌醇合用。除假手术组做假手术外,其余各组均行去双侧卵巢手术,所有大鼠喂药均采用胃饲法。每周称体重一次,按体重调整药量,所有大鼠单笼饲养,自由摄食、摄水,在 24 ~ 28 ℃,通风良好,湿度 60 % ~ 80 % 的条件下饲养。

1.4 骨组织形态计量学分析 大鼠实验 120 d, 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,用半自动图象数字化仪测量,计算以下参数:骨小梁面积百分数(% Tb. Ar, 反映骨量的多少)、骨小梁宽度(Tb. Wi, 指骨小梁平均宽度)、骨小梁数量(Tb. N, 指单位面积内骨小梁数量)、骨小梁分离度(Tb. Sp, 指骨小梁之间的平均距离)。各参数具体测量和计算方法请参照表 1、2。

表 1 补骨胶囊与炔雌醇联合用药对去卵巢大鼠骨计量学参数的影响

组号	组别	n	%Tb. Ar (%)	Tb. Wi (μm)	Tb. N (mm ²)	Tb. Sp (μm)
1	假手术组	7	13.9 ± 3.0	59 ± 8	2.36 ± 0.44	377 ± 78
2	去卵巢组	8	4.0 ± 2.0	66 ± 15	0.61 ± 0.23	1707 ± 752
3	高炔雌醇组	7	10.8 ± 3.6	60 ± 8	1.80 ± 0.61	570 ± 281
4	低炔雌醇组	9	7.4 ± 3.0	56 ± 5	1.36 ± 0.61	830 ± 389
5	补骨胶囊组	7	4.1 ± 0.9	61 ± 9	0.67 ± 0.12	1485 ± 329
6	联合用药组	9	9.2 ± 3.2	64 ± 7	1.44 ± 0.49	697 ± 234
	F		14.1	1.3	15.4	12.9
	P		<0.000 1	0.293	<0.000 1	<0.000 1

注: ···· 表示与相应第 1 组,第 2 组,第 3 组,第 4 组,第 5 组比较有显著性差异, P < 0.05, (表 2 同)

表 2 补骨胶囊与炔雌醇联合用药对去卵巢大鼠子宫重量和内膜厚度的影响

组号	组别	n	子宫重量(mg)	内膜厚度(μm)
1	假手术组	8	595 ± 76	16.4 ± 3.7
2	去卵巢组	7	100 ± 14	12.2 ± 2.3
3	高炔雌醇组	7	497 ± 115	39.4 ± 8.7
4	低炔雌醇组	9	419 ± 145	28.6 ± 12.2
5	补骨胶囊组	7	94 ± 8	15.8 ± 2.9
6	联合用药组	9	228 ± 83	14.8 ± 2.1
	F		40.0	19.7
	P		<0.000 1	<0.000 1

1.5 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^[4,5], 所以我们选择并测量了这两个指标。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 10 × 20 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。

1.6 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),对于方差不齐参数的组间比较,采用 Dunnett's T3 方法。

2 结果

2.1 去卵巢对大鼠的影响 由表 1 可见,去卵巢组与假手术组比较,%Tb. Ar、Tb. N 降低,Tb. Sp 增加。由表 2 可见,去卵巢组与假手术组比,子宫重量降低。

2.2 单独使用雌激素对去卵巢大鼠的影响 高炔雌醇组的 %Tb. Ar 比去卵巢组增加;低炔雌醇组与去卵巢组比差异无显著性。高炔雌醇组与去卵巢组比,子宫重量及内膜厚度均增加。低炔雌醇组与去卵巢组比,子宫重量及内膜厚度均增加。

2.3 联合用药对去卵巢大鼠的影响 补骨胶囊组与去卵巢组比,%Tb. Ar 差异无显著性。联合用药组的 %Tb. Ar 比去卵巢组增加。联合用药组与低炔雌醇组比较,子宫重量下降,内膜厚度减少。与去卵巢组比较,子宫重量增加,内膜厚度差异无显著性;与假手术组比,子宫重量降低;内膜厚度差异无显著性。

3 讨论

3.1 去卵巢对大鼠的影响 由结果可见,大鼠去卵巢后骨量(%Tb. Ar)显著降低,形态结构上表现为骨小梁数量减少,分离度增加,提示大鼠去卵巢后骨量显著丢失,说明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降低。

3.2 单独使用雌激素对去卵巢大鼠的影响 本次实验中高剂量炔雌醇可显著增加去卵巢大鼠骨量,低剂量炔雌醇增加去卵巢大鼠骨量作用较弱。无论高、低剂量炔雌醇都可显著增加去卵巢大鼠子宫重量和子宫内膜厚度,说明炔雌醇在很低的浓度就可对子宫产生较强烈的刺激作用。

17-炔雌醇是一种以雌二醇为母体,人工合成的高效衍生物,其抗骨质疏松作用肯定,有些学者将 17-炔雌醇作为抗去卵巢大鼠骨质疏松的阳性药物,曾报道 30 或 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量可有效预防去卵巢大鼠骨质疏松^[6-8],本次实验结果也证明 30 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 17-炔雌醇可有效预防去卵巢大鼠骨丢失。另外,文献报道 30 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 17-炔雌醇用药 28 d,可使大鼠子宫重量增加,内膜厚度增厚^[9]。本实验高、低剂量炔雌醇都使去卵巢大鼠子宫重量显著增加,内膜厚度显著变厚,提示不但 30 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量,就连 6 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量也对子宫有明显刺激作用。

3.3 联合用药对去卵巢大鼠骨计量学参数的影响

本次实验未观察到补骨胶囊有预防去卵巢大鼠骨丢失的作用,这与以往的实验结果有所不同,其原因可能与用药量不足及本次实验大鼠在去卵巢后骨丢失太剧烈有关。另外,结果显示单用补骨胶囊对去卵巢大鼠子宫无刺激作用。

补骨胶囊与低剂量 17-炔雌醇联合用药组显著增加了去卵巢大鼠骨量,而单用低剂量炔雌醇组与去卵巢组比较骨量无显著性差异,提示补骨胶囊与低剂量炔雌醇联合用药预防骨质疏松效果优于单独用药,可有效预防去卵巢大鼠骨丢失。

补骨胶囊与低剂量炔雌醇合用组与单用低剂量炔雌醇的去卵巢大鼠比较,子宫重量和内膜厚度都显著降低,特别是内膜厚度减少到与假手术组和去卵巢组相近的水平。说明补骨胶囊可以抑制炔雌醇

对子宫的刺激作用。

综上所述,中药补骨胶囊与炔雌醇合用后,一方面可以减弱炔雌醇刺激子宫和抑制骨形成的副作用;另一方面可显著增加去卵巢大鼠骨量,取得较满意的预防效果,提示这是一种疗效确切、副作用小的抗骨质疏松用药方案。但中药中何种成分降低了雌激素刺激子宫副作用,是需要为基础研究中继续探讨的课题。另外,在人体中,此中药能否同样抑制雌激素刺激子宫作用,也是一个具有很高实用价值和理论意义的临床课题。

参考文献

- 1 吴铁,崔燎,李青南,等. 壮骨肾宝对抗泼尼松不良反应的实验研究. 中国中医药科技, 1996, 3(4): 16-19.
- 2 李青南,廖进民,吴铁,等. 淫羊藿预防羟基腺致大鼠骨质疏松的定量研究. 中国中医骨伤科, 1996, 4(3): 1-4.
- 3 李朝阳,吴铁,林柏云,等. 芪蓉肾宝与己烯雌酚对去卵巢大鼠骨代谢的影响. 中国骨质疏松杂志, 1997, 3(1): 67-69.
- 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响的定量研究. 药学报, 1996, 3(5): 327-332.
- 5 Ruenitz PC, Shen Y, Li M, et al. Specific bone-protective effects of metabolites/ derivatives of tamoxifen and clomiphene in ovariectomized rats. Bone, 1998, 23(6): 537-42.
- 6 Sato M, Turner CH, Wang T, et al. LY353381. HCl: a novel raloxifene analog with improved SERM potency and efficacy in vivo. J Pharmacol Exp Ther, 1998, 287(1): 1-7.
- 7 Sato M, Kim J, Short LL, et al. Longitudinal and cross-sectional analysis of raloxifene effects on tibiae from ovariectomized aged rats. J Pharmacol Exp Ther, 1995, 272(3): 1252-1259.
- 8 Ke HZ, Chen H, Jee W, et al. Effects of Droloxifene on prevention of cancellous bone loss and bone turnover in the axial skeleton of aged, ovariectomized rats. Bone, 1995, 17(5): 1-6.
- 9 Jimenez MA, Magee DE, Bryant HU, et al. Clomiphene prevents cancellous bone loss from tibia of ovariectomized rats. Endocrinology, 1997, 138(5): 1794-1800.
- 10 Ke HZ, paralkar Vishwas M, Grasser William A, et al. Effects of CP336, 156, a new, nonsteroidal estrogen agonist/ antagonist, on bone, serum cholesterol, uterus, and body composition in rat models. Endocrinology, 1998, 139(4): 2068-2076.

(收稿:2002-08-26 编辑:李为农)

第八届全国与第四届国际足踝外科学会议征文通知

中华骨科学会足踝外科学组定于 2003 年 8 月下旬在银川市召开第 8 届全国与第 4 届国际足踝外科学会议,现将征文事宜通知如下:

一、征文内容:小腿胫骨平台以远至足踝部各种骨折、脱位的临床研究与治疗体会;各种软组织缺损的显微外科修复;各种骨病、肿瘤及畸形矫正的治疗体会;足踝部各种疼痛性疾病的治疗及全身性疾病之足病如糖尿病病足的治疗体会、研究成果及新技术新方法等。

二、论文要求:论文在 3 000 字以内,附有 800 字摘要,字迹清晰,最好打印。单位医疗部门盖章后寄往银川市银夏医学院第二附属医院手足外科 马玉林收 邮编 750001 截稿日期:2003 年 6 月 30 日,稿件不退,请谅解。