

延髓骨宝与己烯雌酚对去卵巢大鼠骨代谢影响的定量研究*

李朝阳 吴铁 林柏云 黄连芳 李青南 莫艾
(广东医学院骨生物学研究室, 广东 湛江 524023)

【摘要】 目的 了解中药复方制剂延髓骨宝与己烯雌酚(DES)对去卵巢大鼠骨代谢的影响,并对两者疗效进行比较。方法 用 3 月龄雌性 SD 大鼠 31 只,随机分为基础对照组、年龄对照组、去卵巢 DES 治疗组 [灌胃 4.5mg/L 的己烯雌酚 5ml/(kg·d)]和去卵巢延髓骨宝治疗组 [灌胃含生药浓度为 330g/L 的延髓骨宝 5ml/(kg·d)],每周 6 次,12 周后处死,胫骨上段行不脱钙骨制片骨形态计量学分析。结果 己烯雌酚与延髓骨宝都有预防去卵巢大鼠骨质疏松的作用(骨小梁面积百分率分别增加了 122%和 83%),但两者作用机理不同,己烯雌酚主要是明显抑制去卵巢引起的骨高转换,而延髓骨宝则主要是抑制去卵巢大鼠的骨吸收,对骨形成无明显抑制作用。结论 延髓骨宝与己烯雌酚都有预防去卵巢大鼠骨丢失的作用,两者效应基本一致。

【关键词】 骨质疏松 己烯雌酚 中草药

Quantitative Analysis Study of the Effects of Chinese Herbal Medicine Yanhuogubao and Diethylstilbestrol on Bony Metabolism of Ovariectomized Rats LI Chaoyang, WU Tie, LIN Bai-yun, et al. Bone Biology Laboratory, Guangdong Medical College (Guangdong Zhanjiang, 524023)

【Abstract】 Objective To compare the effects of Chinese Herbal Medicine Yanhuogubao and diethylstilbestrol (DES) on bony metabolism of ovariectomized (OVX) rats. Methods 31 3-month-old SD female rats were randomly divided into five groups: the basal control, the age control, the OVX, OVX with DES (5 ml/(kg·d), DES: 4.5mg/L), and OVX with Chinese Herbal Medicine Yanhuogubao (5ml/(kg·d), crude drugs: 330g/L). All rats were killed at the 12th week. The proximal tibia of rats were processed its undecalcified section of 20μm thickness for bone histomorphometric analysis. Results DES inhibited the high bone turnover of OVX rats, but Chinese Herbal Medicine Yanhuogubao mainly inhibited bone resorption and had no obvious inhibition to bone formation. Conclusion Both DES and Yanhuogubao have effects on preventing bone loss in OVX rats.

【Key Words】 Osteoporoses Diethylstilbestrol Drugs, Chinese Herbal

中药淫羊藿、蛇床子以及由此两种中药为主组成的复方制剂对去卵巢、去睾丸大鼠骨质疏松有明显的预防作用^[1,2]。延胡索有活血、行气和止痛等功效。本实验以淫羊藿、蛇床子和延胡索组成复方制剂延髓骨宝,从标本兼治的角度组方,使该制剂在防治骨质疏松的同时,兼有止痛镇静作用,并与雌激素己烯雌酚作比较,为临床应用中药防治骨质疏松提供参考。

1 材料与方法

1.1 药物 延髓骨宝提取液:由本院医药科技开发

中心从箭叶淫羊藿(Epimedium Sagittatum Maxim)、蛇床子(Fructus Cnidii)和延胡索(Corydalis yanhusuo W. T. Wang)中提取,制备成 1L 相当于 330g 生药材的复方制剂。药材由广东湛江市药材公司提供。己烯雌酚(Diethylstilbestrol, DES):广东开平侨光联合制药厂生产,批号:911004。盐酸四环素:为荧光标记物,上海新亚制药厂生产,批号:89124-18。Calcein (USA):为荧光标记物。戊巴比妥钠(化学纯)、乙醇(分析纯)和丙酮(分析纯);甲基丙烯酸甲酯:北京化工厂生产,批号:940117。特殊骨染料(Osteochrome

* 本课题为国家自然科学基金资助项目之一(编号:39470367)

Villanueva Bone Stain, Polysciences, USA)。

1.2 仪器 低速锯(Buehler, USA), 半自动图象数字化分析仪包括光镜和荧光显微镜(Nikon, 日本), 数字化板, 电脑和形态学程序“Stereology”体视学(KSS Computer Engineers, Magna UT, USA)。

1.3 动物模型与分组 3 月龄雌性 SD 大白鼠(广东省实验动物中心) 31 只, 体重 189 ± 8g。随机分为: A 组(基础对照组, 6 只), 实验开始时, 将其杀死取材; B 组(年龄对照组, 7 只); C 组(去卵巢组, 6 只); D 组(去卵巢加 DES 治疗组, 6 只); E 组(去卵巢加延髓骨宝治疗组, 6 只)。B 组和 C 组灌胃生理盐水 5ml/(kg · d), D 组灌胃 4.5mg/L 的 DES 5ml/(kg · d), E 组灌胃 330g/L 的延髓骨宝 5ml/(kg · d), 均每周灌胃 6 次, 每周称体重 1 次, 并按体重变化调整给药量。B ~ E 组在实验 12 周后处死取材。所有动物在 24 ~ 28 天, 通风良好, 湿度 60% ~ 70% 的条件下饲养, 自由摄食(饲料来自本院动物实验中心)和饮水。全部大鼠在处死前第 10 天和第 2 天分别皮下注射盐酸四环素 25mg/kg 和钙黄绿素(Calcein) 5mg/kg。

1.4 骨片的制作和测量 实验 12 周后, 按文献^[1,2]方法制片和测量有关各动静态参数, 并按公式计算出相应的参数。

1.5 统计学处理 参数值用均数和标准差($\bar{x} \pm s$)表示。百分率(%)用“(\bar{x}_2/\bar{x}_1) × 100 - 100”公式计算。各组之间的差异性用组间 *t* 检验。

2 结果

2.1 体重 实验结束时, C 组(298 ± 21g)与 B 组(263 ± 13g)比较, 大鼠体重增加了 14% (*P* < 0.01); D 组(264 ± 27g)与 C 组比较, 体重减少了 12% (*P* < 0.05); D 组与 B 组比较无显著性差异; E 组(310 ± 35g)与 C 组比较, 无显著性差异; E 组分别与 B 组和 D 组比较, 体重都增加了 18% (*P* < 0.01 和 *P* < 0.05)。

2.2 骨组织形态结构光镜所见

年龄对照组: 骨小梁结构紧密, 小梁粗大, 骨连续性良好(见图 1)。

去卵巢组: 骨小梁呈现明显稀疏, 细小, 个别呈结节或钮扣状, 出现大片无骨小梁骨髓区(见图 2)。

去卵巢加 DES 治疗组: 相对年龄对照组骨小梁结构呈现稀疏, 但相对去卵巢组小梁数目较多, 结构紧密(见图 3)。

去卵巢加延髓骨宝治疗组: 骨小梁结构与 DES 治疗组相似, 但总体骨小梁稍稀疏(见图 4)。

2.3 骨形态计量学测量结果(见表 1)

表 1 延髓骨宝和己烯雌酚对去卵巢大鼠胫骨近端骨组织形态结构的影响($\bar{x} \pm s$)

参 数	年龄组		去卵巢组			去卵巢 + 己烯雌酚组			去卵巢 + 延髓骨宝组		
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	%	$\bar{x} \pm s$	%	% - 1	$\bar{x} \pm s$	%	% - 1	% - 2	
	(n=7)	(n=6)		(n=6)			(n=6)				
%Tb. Ar	21.1 ± 4.2	6.8 ± 2.2	- 68 **	15.2 ± 3.7	- 28 *	+ 122 **	12.5 ± 1.9	- 41 **	+ 83 **	- 18	
Tb. Th	57.8 ± 4.3	57.8 ± 5.1	0	56.8 ± 4.2	- 2	- 2	62.9 ± 3.6	+ 9 *	+ 9	+ 11 *	
Tb. N	3.6 ± 0.6	1.2 ± 0.4	- 67 **	2.7 ± 0.7	- 26 *	+ 126 **	2.0 ± 0.3	- 45 **	+ 68 **	- 26 *	
Tb. Sp	223.0 ± 45.0	846.8 ± 244.3	+ 280 **	335.7 ± 88.8	+ 51 *	- 60 **	448.6 ± 72.2	+ 101 **	- 47 **	+ 34 *	
%L. Pm	7.4 ± 1.5	13.7 ± 2.3	+ 84 **	6.1 ± 1.6	- 18	- 56 **	11.3 ± 2.3	+ 52 **	- 17	+ 87 **	
MAR	1.3 ± 0.2	1.7 ± 0.1	+ 32 **	1.4 ± 0.1	+ 4	- 21 **	1.8 ± 0.3	+ 38 **	+ 4	+ 32 **	
BFR/BV	104.3 ± 29.1	252.2 ± 45.8	+ 142 **	88.3 ± 18.5	- 15	- 65 **	205.3 ± 79.2	+ 97 **	- 19	+ 132 **	
BFR/BS	10.0 ± 3.2	24.0 ± 5.2	+ 141 **	8.3 ± 1.9	- 17	- 66 **	21.0 ± 7.4	+ 111 **	- 13	+ 154 **	
%O. Pm	5.8 ± 1.4	14.2 ± 2.7	+ 145 **	4.8 ± 2.2	- 17	- 66 **	14.7 ± 4.8	+ 153 **	+ 3	+ 203 **	
%Er. Pm	0.6 ± 0.1	1.4 ± 0.6	+ 158 **	0.6 ± 0.2	+ 16	- 55 **	0.6 ± 0.2	+ 13	- 56 **	- 2	

注: %: 与年龄组比较; % - 1: 与去卵巢组比较; % - 2: 与己烯雌酚治疗组比较。* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

去卵巢大鼠骨量显著减少, 表现为骨小梁面积百分率(Percent Trabecular Area, % Tb. Ar) 减少了 68%, 明显低于年龄组 (*P* < 0.01), 骨小梁数目(Trabecular Number, Tb. N) 减少, 骨小梁间隙(Trabecular Separation, Tb. Sp) 增大, 说明去卵巢大鼠骨小梁变得十分稀疏(如附图所示)。从动态参数看, 代表骨形成的参数值明显增加 (*P* < 0.01), 如荧光标记周长百分率(Percent Labeled Perimeter, %L. Pm)、矿化沉积率(MAR)、类骨质周长百分率(Percent Osteoid

Perimeter, %O. Pm)、单位骨小梁面积骨形成率[Bone Formation Rate (Area), BFR/BV]和单位骨小梁周长骨形成率[Bone Formation Rate (Surface), BFR/BS], 提示骨形成增加。同时骨吸收增加 (*P* < 0.01): 骨吸收周长百分率(Percent Eroded Perimeter, %Er. Pm) 增加了 158%。

DES 明显增加去卵巢大鼠骨量, % Tb. Ar 增加了 122% (*P* < 0.01), 骨小梁数目增多, 间隙缩小, 明显降低上述骨形成和骨吸收的参数值 (*P* < 0.01),

但 %Tb. Ar 仍比年龄组减少了 28%, 说明 DES 治疗组骨量未能达到年龄组水平。

延髓骨宝明显增加去卵巢大鼠骨量, %Tb. Ar 增加了 83% ($P < 0.01$), 骨小梁数目增多, 间隙缩小。明显降低去卵巢大鼠骨吸收, 但不抑制去卵巢诱导的“高”骨形成状态(其骨形成的参数值明显高于年龄组和 DES 治疗组, 与去卵巢组无显著性差异)。%Tb. Ar 仍比年龄组少 41%, 说明延髓骨宝治疗组的骨量未能达到年龄组水平。与 DES 治疗组比较, %Tb. Ar 无显著性差异, 骨小梁数目有所减少, 但骨小梁厚度增加。

3 讨论

去卵巢大鼠体重明显增加, 这与文献^[3]一致。DES 能抑制去卵巢大鼠体重的增加, 维持体重在年龄组水平。延髓骨宝治疗组体重明显高于年龄组和 DES 治疗组, 与去卵巢组无显著性差异。

DES 是合成雌激素, 能明显降低去卵巢诱导的骨高转换(同时降低去卵巢大鼠的骨形成和骨吸收), 并能改善骨小梁结构, 使治疗组的骨量明显高于去卵巢组。

延髓骨宝治疗组大鼠的骨量亦明显高于去卵巢组。其作用机理主要是通过明显抑制骨吸收, 并能维持去卵巢诱导的骨“高”形成状态。与 DES 比较, 延髓骨宝治疗组大鼠骨小梁厚度有增加, 数目虽有所减少, 但骨小梁面积百分率无明显差异, 说明两药对去卵巢大鼠的预防效果基本一致。DES 在抑制去卵巢大鼠骨吸收的同时, 又抑制其骨形成, 即主要通过阻止去卵巢后的骨高转换来发挥作用。而延髓骨宝主要是明显抑制去卵巢大鼠的骨吸收, 对其骨形成无明显的抑制作用。两个治疗组的骨量均未能达到年龄组水平, 可能与实验时间不够长或剂量偏低有关。

延髓骨宝是由淫羊藿、蛇床子和延胡索等中药

组成的复方制剂。淫羊藿和蛇床子温补肝肾、强筋骨、祛风湿、助阳益精, 在本方中为主药。延胡索活血、行气、止痛, 在本方中为辅药。业已证明淫羊藿的有效成分主要是黄酮类和多糖类。淫羊藿多糖促进 DNA 合成率, 影响核酸的代谢, 提高体外培养骨髓细胞的增殖率^[4]。本研究室已先后证实淫羊藿水提液对去睾丸大鼠骨质疏松有明显的预防作用^[5], 蛇床子总香豆素对糖皮质激素诱导的大鼠骨质疏松、蛇床子总香豆素和蛇床子素对去卵巢大鼠骨质疏松均有预防作用^[6~8]。延胡索对中枢神经系统的镇痛、镇静、催眠与安定作用, 确保了本方的标本兼治功效, 使本方在防治老年性骨质疏松的同时, 兼止痛镇静, 从而更有效地发挥本方的综合作用。

综上所述, DES 与延髓骨宝对去卵巢大鼠骨质疏松都有一定程度的预防作用, 前者的作用机理是显著抑制去卵巢诱导的骨高转换, 而后者主要是抑制去卵巢后的骨吸收。(本文图 1~4 见插页第 3 页)

参考文献

- [1] 李朝阳, 李青南, 吴铁, 等. 中药补肾 2 号对去势雌大鼠密质骨代谢影响的定量研究. 中成药, 1994, 16(10): 32-34.
- [2] 李青南, 廖进民, 吴铁, 等. 中药补肾 2 号对去势雌大鼠骨代谢影响的定量研究. 中国老年学杂志, 1995, 15(2): 113-115.
- [3] Wronski T J, Schenck PA, Citron M, et al. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int, 1987, 40(2): 155-159.
- [4] 刘福春, 丁光霞, 李菊仙. 淫羊藿多糖对羟基脲所致“阳虚”动物骨髓细胞 DNA 合成率的影响. 中国中药杂志, 1991, 16(10): 620-622.
- [5] 李青南, 黄连芳, 谢华, 等. 淫羊藿提取液对去睾丸大鼠骨代谢的影响. 中草药, 1993, 24(12): 637-638.
- [6] 李青南, 梁念慈, 吴铁, 等. 蛇床子总香豆素对去卵巢骨骼的影响. 中国药理学报, 1994, 15(6): 528-532.
- [7] 谢华, 李青南, 黄连芳, 等. 蛇床子总香豆素对类固醇性骨质疏松的作用. 中国药理学报, 1994, 15(4): 371-374.
- [8] 李朝阳, 吴铁, 李青南, 等. 蛇床子素对去卵巢大鼠近侧胫骨代谢影响的定量研究. 药理学报, 1996, 31(5): 327-332.

(收稿: 1998-10-21 修回: 1999-04-29 编辑: 房世源)

延髓骨宝与己烯雌酚对去卵巢大鼠骨代谢影响的定量研究

(正文见 77)

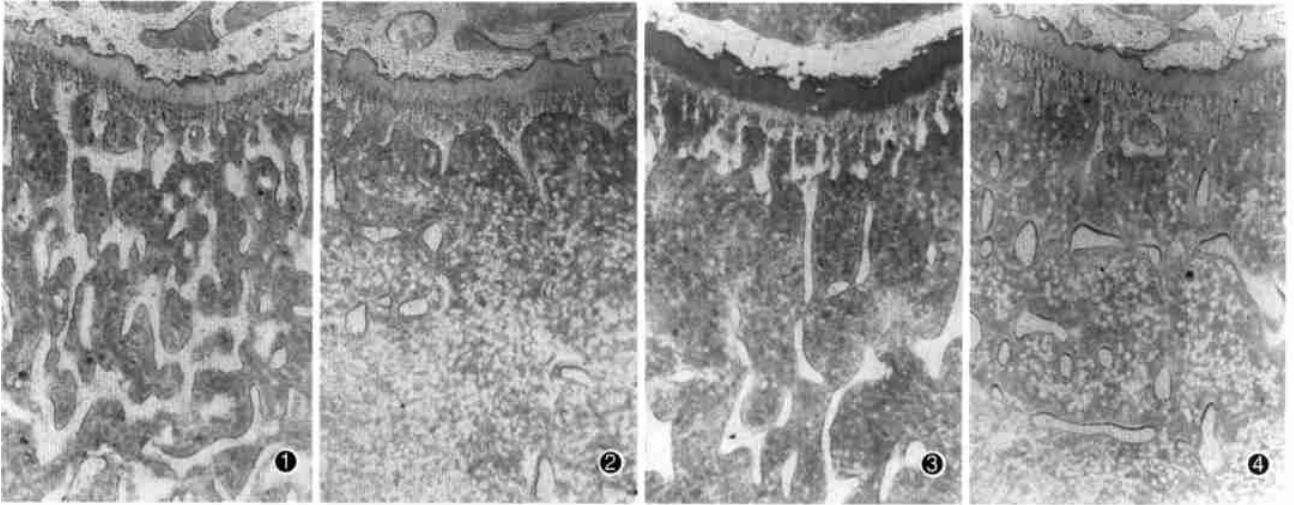


图 1~4 大鼠胫骨上段不脱钙骨 MMA 包埋骨磨片, Villanueva 染色, 10×400 图 1 为年龄对照组 图 2 为去卵巢组 图 3 为去卵巢加 DES 治疗组 图 4 为去卵巢加延髓骨宝治疗组

外敷中药对骨折愈合微血管重建的影响

(正文见 86)

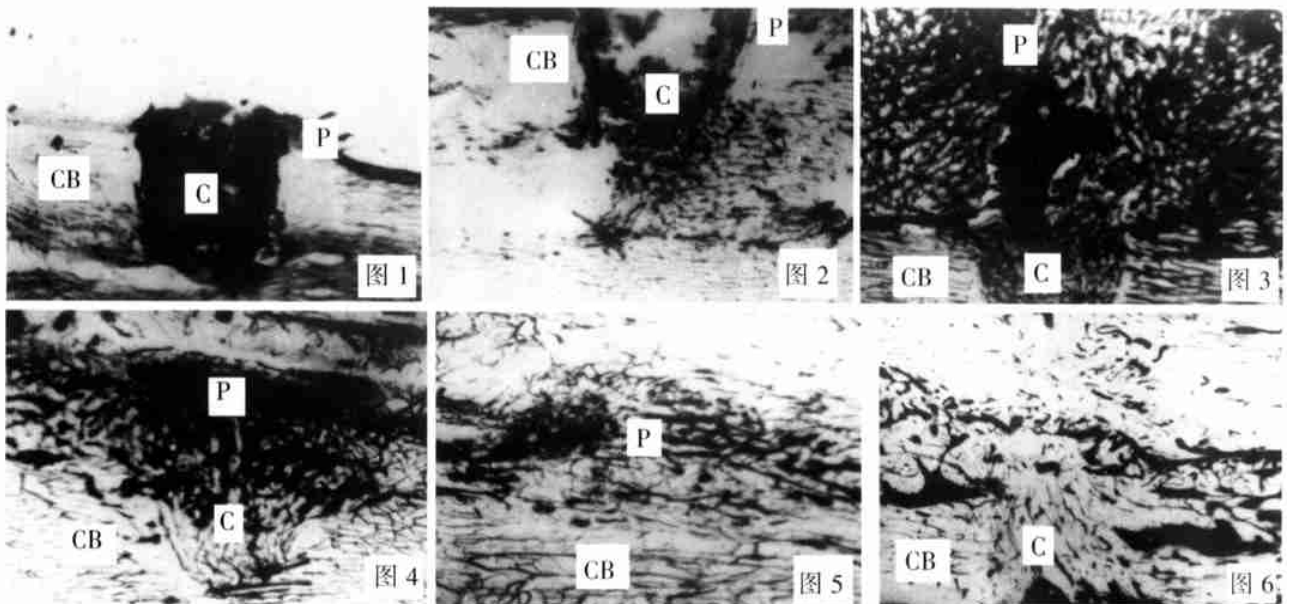


图 1 骨折第 10 天, 实验组骨愈合微血管。P: 骨膜, C: 骨痂, CB: 骨皮质。200 $\mu\text{m}\times 20$ 图 2 骨折第 10 天, 对照组骨愈合微血管。P: 骨膜, C: 骨痂, CB: 骨皮质。200 $\mu\text{m}\times 20$ 图 3 骨折第 20 天, 实验组骨愈合微血管。P: 骨膜, C: 骨痂, CB: 骨皮质。200 $\mu\text{m}\times 20$ 图 4 骨折第 20 天, 对照组骨愈合微血管。P: 骨膜, C: 骨痂, CB: 骨皮质。200 $\mu\text{m}\times 20$ 图 5 骨折第 30 天, 实验组骨愈合微血管。P: 骨膜, CB: 骨皮质。200 $\mu\text{m}\times 20$ 图 6 骨折第 30 天, 对照组骨愈合微血管。P: 骨膜, C: 骨痂, CB: 骨皮质。200 $\mu\text{m}\times 20$