

健骨颗粒对骨质疏松模鼠垂体-甲状腺轴的影响

林燕萍 李咏高 王和鸣 黄美雅
(福建中医学院骨伤系,福建 福州 350003)

【摘要】 目的 为进一步探讨健骨颗粒治疗原发性骨质疏松症的作用机理,拟从垂体-甲状腺轴角度进行研究。方法 建立 6 月龄 SD 雌性大鼠卵巢摘除骨质疏松模型,模型成立后随机分为 、 、 三组,分别喂服生理盐水、骨松宝和健骨颗粒。喂药 12 周后处死取材,取血清检测 TSH、FT₃、FT₄、CT 等浓度,取垂体、甲状腺作 TSH 细胞、C 细胞及 Tg 等免疫细胞化学染色,并形态计量。结果 喂服中药组的血清 TSH、FT₃、FT₄、CT 浓度均明显上升,与生理盐水组相比有显著统计学意义。 、 两组 TSH 细胞和 C 细胞的细胞数均高于 组。 组 Tg 阳性反应物也明显较 组多,颜色深。结论 健骨颗粒能有效扭转卵巢摘除后垂体-甲状腺轴功能减退的趋势,改善甲状腺的整体功能,从而增加骨形成抑制骨吸收,达到治疗骨质疏松症的目的。

【关键词】 中成药; 骨质疏松; 垂体; 甲状腺

Effect of Jiangu granula on the Pituitary-Thyroid axis of ovariectomized rats LIN Yan ping, LI Yong gao, WANG He ming, et al. Department of Orthopaedics & Traumatology of Fujian TCM (Fujian Fuzhou 350003)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Jiangu granula on the treatment of primary osteoporosis(OP) from the pituitary-thyroid axis **Methods** OP model animals by ovary excised were randomly divided into 3 group: normal saline group , Gusongbao treating group , Jiangu granula treating group . The animals were sacrificed after 12 weeks to collect experimental samples. The levels of TSH, FT₃, FT₄ & CT in serum were measured. TSH cell in pituitary, C-cell and immune globulin in thyroid gland were detected by immunocytochemistry and morphometric observations. **Results** The levels of TSH, FT₃, FT₄ and CT in treated groups were increasing comparing with normal saline group. The amount of TSH cell and C-cells in group and group groups were more than group . The Tg positive reaction in group were also more and the colour was deeper. **Conclusion** Jiangu granula can cure primary osteoporosis, by means of turning round the functional decrease of pituitary-thyroid axis after the ovary excised, and improve effectively the whole function of thyroid gland, and then raising the bone formation and reducing the bone resorption.

【Key words】 Chinese patent drugs; Osteoporosis; Pituitary gland; Thyroid gland

为进一步揭示健骨颗粒治疗原发性骨质疏松症(OP)的作用机理,本文运用动物实验,拟从垂体-甲状腺轴角度进行深入探讨,为临床新药开发提供客观理论依据。

1 材料和方法

1.1 健骨颗粒制备 原药材由福建省药材公司提供,福建中医药研究院中试车间负责加工制备,每克颗粒含原生药 2.9g。

1.2 动物造模、分组、取材 6 月龄 SD 雌性大鼠 50 只(由上海西普尔一必凯实验动物有限公司提供),体重 350 ~ 400g,

随机分成双侧卵巢摘除组(OVX)40 只,假手术组(Sham)10 只。动物均在 24 ~ 28 ℃,通风良好,湿度 60% ~ 80% 条件下分笼饲养,自由摄食、饮水。

实验大鼠用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(40mg · kg⁻¹),下腹部剪毛消毒后,剪开约 1.5cm 的正中切口,OVX 组行双侧卵巢结扎切除术,逐层缝合,术后肌注青霉素预防感染。Sham 组除未行卵巢结扎切除外,其余步骤同 OVX 组。术后 12 周两组各处死取材 10 只,先颈动脉取血,离心留取上清液,-20 ℃ 冻存待测;再用双能 X 线骨密度仪进行骨密度(BMD)检测,最后取胫骨上端 1 ~ 1.5cm 进行组织学检查以证明骨质疏松模型的成立。余 30 只模鼠随机分成 、 、 三组, 组喂服生理盐水 2ml · kg⁻¹ · d⁻¹, 组喂服骨松宝

基金项目:福建省自然科学基金重大项目(项目编号:C9830001)
教育部骨干教师资助计划项目(项目编号:1946)

1.5g·kg⁻¹·d⁻¹; 组喂服健骨颗粒 2g·kg⁻¹·d⁻¹。所用颗粒制剂均化水后灌服,统一于术后 13 周起灌胃,每天一次。喂药 12 周后取材,留取血清检测促甲状腺激素(TSH)、游离甲状腺素(FT₃、FT₄)及降钙素(CT)等浓度;摘取脑垂体、甲状腺作免疫细胞化学染色和 HE 染色,并进行形态定量。

1.3 标本处理和检测

1.3.1 骨密度测定 运用双能 X 线骨密度仪(Hologic QDR—2000 型)测定全身(头颅除外)及腰椎、股骨颈、股骨、胫骨上端等区域的骨密度。

1.3.2 骨形态学检测 胫骨上端标本酒精固定,塑料包埋剂包埋,SP1600 硬质切片机切片,甲苯胺蓝染色。

1.3.3 血清相关激素浓度测定 以放射免疫分析法检测血清 TSH、FT₃、FT₄、CT 浓度,放免分析试剂盒由北京中国原子能科学研究院提供,操作步骤根据使用说明书。

1.3.4 垂体、甲状腺免疫细胞化学染色、形态定量分析 垂体用 Bouin 固定,甲状腺用 10%福尔马林固定,常规石蜡包埋

切片。分别进行垂体 TSH 细胞、甲状腺滤泡旁细胞(C 细胞)及甲状腺球蛋白(Tg)等免疫细胞化学染色,均采用 S—P 法。相关抗体及 S—P 超敏试剂盒由福州迈新生物技术开发有限公司提供。免疫细胞化学染色结果运用 Leica Q550 彩色图像分析仪进行定量分析(在显微镜下随机选取脑垂体远侧部 8 个视野,每视野面积 400μm ×400μm,计算阳性细胞数)。同时作垂体和甲状腺 HE 染色进行对比观察。

1.4 统计处理 运用 SPSS 9.0 软件包进行数据分析,参数值用均数 ±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。测定结果分别作组间比较 t 检验,百分率(%)用(x_2/x_1) ×100 - 100 公式计算。

2 结果

2.1 动物模型的建立 术后 12 周 OVX 组 BMD 比 Sham 组明显下降,其中全身 BMD(颅骨除外)下降达 22.27%,有显著统计学意义(见表 1)。而且胫骨上端组织形态学也显示:OVX 组骨小梁明显稀疏,小梁面积减小,骨干骨皮质变薄(图 1、2),表明骨质疏松动物模型成立。

表 1 OVX 组和 Sham 组术后 12 周 BMD 检测结果($\bar{x} \pm s$) (单位:g/cm ×cm)

	全身	腰椎	股骨颈	股骨	胫骨上端
Sham 组	0.115 ±0.005	0.180 ±0.013	0.170 ±0.006	0.145 ±0.006	0.216 ±0.025
OVX 组	0.089 ±0.008 *	0.158 ±0.005 *	0.156 ±0.011 #	0.122 ±0.022 *	0.176 ±0.004 *
%	- 22.27	- 12.22	- 8.24	- 15.86	- 18.52

注:OVX 组与 Sham 组比较,* P<0.001,# 0.005 > P>0.001

2.2 血清 TSH、FT₃、FT₄、CT 含量变化 术后 12 周,OVX 组仅 TSH 浓度较 Sham 组升高,而 FT₃、FT₄、CT 均比 Sham 组显著降低。在用药 12 周后,组、组的血清 TSH、FT₃、

FT₄、CT 含量均明显上升,与组相比其差别有统计学意义(P<0.05 或 P<0.01)。但两用药组比较无显著区别。(见表 2)。

表 2 不同组别 TSH、FT₃、FT₄、CT 含量测定结果($\bar{x} \pm s$)

	TSH (mIU/L)	FT ₃ (pmol/L)	FT ₄ (pmol/L)	CT (pg/ml)
Sham 组	0.229 ±0.039	1.771 ±0.505	7.112 ±2.752	53.105 ±19.320
OVX 组	0.369 ±0.051 #	1.047 ±0.371 #	5.165 ±1.329 #	34.580 ±7.784 # #
组	0.237 ±0.028	0.453 ±0.389	2.807 ±0.792	28.271 ±1.426
组	0.353 ±0.062 *	1.471 ±0.296 *	5.852 ±1.279 *	43.417 ±18.667 **
组	0.395 ±0.067 *	1.556 ±0.249 *	5.592 ±1.612 *	42.133 ±9.966 **

注:OVX 组与 Sham 组比较,# P<0.01,## P<0.05;、组与组比较,* P<0.01,** P<0.05。

2.3 形态学变化

TSH 细胞、C 细胞免疫细胞化学形态定量测定结果,TSH 细胞数术后呈下降趋势,喂药后又略有回升,但各组间差别无统计学意义。而术后 12 周 OVX 组的 C 细胞数显著低于 Sham 组(P<0.01)。喂药 12 周后,、两组 C 细胞都高于组,有统计学意义。(见表 3,图 3~6)

从甲状腺 HE 染色结果看,组细胞明显增多,滤泡直径比组小;Tg 免疫细胞化学染色显示,组的阳性反应物明显较组多,颜色深。

3 讨论

绝经后由于雌激素的缺乏造成妇女骨质疏松已为大家所公认。在实验研究方面切除卵巢的大鼠骨质疏松模型,也是目前评价防治骨质疏松药物的药效学动物模型之一。因为去卵巢大鼠和绝经后骨质疏松所出现的骨丢失情况有许多共同

表 3 各组 TSH、C 细胞免疫细胞化学形态定量测定结果($\bar{x} \pm s$) (单位:个)

	TSH 细胞	C 细胞
Sham 组	536.25 ±206.25	675.13 ±231.71
OVX 组	374.43 ±129.09	369.89 ±161.33 *
组	421.40 ±64.24	369.14 ±206.79
组	462.38 ±138.00	451.86 ±86.59 #
组	456.38 ±62.50	515.00 ±97.57 #

注:OVX 组与 Sham 组比较,* P<0.01;组、组与组比较,# P<0.05。

之处。骨密度是评价骨质疏松的关键指标,从本实验结果看,术后 12 周,OVX 组的 BMD 均比 Sham 组明显降低,有显著统计学意义,而且形态学指标也显示,OVX 组出现骨质疏松,因此可以认为卵巢摘除后 12 周,骨质疏松模型成功建立,这与已有文献报道一致^[1,2]。

近年来有研究表明雌激素减少并非是引起绝经后 OP 的唯一因素^[3], 绝经后 OP 的发生与体内多种激素浓度变化密切相关。众所周知, 甲状腺激素对骨的生长发育、新陈代谢具有广泛的调节作用。任何原因引起的甲状腺功能异常, 都会影响骨骼的正常代谢, 进一步导致骨质疏松。因为成骨细胞膜上存在 T₃ 受体^[4,5], 而且甲状腺激素还能影响破骨细胞的活性和数量^[6]。CT 由甲状腺滤泡旁细胞 (亦称 C 细胞) 分泌, 主要抑制骨细胞与破骨细胞的活性与数量, 同时还能促进成骨细胞的活性, 直接抑制骨的吸收。血清 CT 浓度的下降是造成骨钙流失, 导致骨质疏松的重要原因之一^[7]。

本实验结果显示, 术后 12 周, 与 Sham 组比较, OVX 组的 FT₃、FT₄、CT 均显著降低, 而 TSH 却明显升高, 说明卵巢摘除, 雌激素水平急剧下降, 会引起甲状腺功能减退, 使相关激素分泌不足, 影响骨的生理代谢, 出现骨质疏松。垂体 TSH 浓度的升高可能是一种反馈性机制, 但同期 FT₃、FT₄ 却处于较低水平, 说明卵巢摘除降低了甲状腺对垂体 TSH 的敏感性。用药 12 周后, 组的上述四项指标都明显高于 组, 说明补肾健脾中药健骨颗粒能够增强垂体-甲状腺轴的调节能力, 提高甲状腺对垂体 TSH 的反应性, 改善甲状腺功能。FT₃、CT 浓度的上升, 能直接作用于成骨细胞和破骨细胞, 增加骨形成抑制骨吸收, 提高骨密度。

甲状腺免疫细胞化学及形态学观察显示: 组滤泡直径小, 滤泡上皮细胞高且排列致密; 而 组滤泡体积较大, 滤泡上皮细胞较稀疏。提示 组甲状腺滤泡上皮细胞激素合成功能明显旺盛。Tg 免疫细胞化学染色也显示 组滤泡腔内阳性物质染色较 组深, 说明 组的 Tg 含量较高。 组的 C 细胞数量增加显著, 这与血清中的 CT 浓度同步升高相一致, 提示健骨颗粒能增强 C 细胞的功能。两用药组检测指标无明显差异, 可能与用药周期偏短有关。

本实验结果表明, 健骨颗粒能有效逆转卵巢摘除 OP 模

鼠垂体-甲状腺轴功能减退的趋势, 改善甲状腺整体功能。健骨颗粒以中医“肾主骨”、“补先后天”理论为原则组方用药, 主要由煅狗骨、淫羊藿、山茱萸、党参等药味组成, 具有补肾健脾、强筋壮骨之功。前期研究表明, 煅狗骨能增强甲状腺功能, 促进垂体 TSH 细胞的分泌^[8]。此外, 现代药理研究也发现, 淫羊藿能抑制 M 受体—cGMP 系统, 改善甲状腺细胞能量代谢, 加强激素的合成^[9]。因此, 可以认为调整垂体-甲状腺轴功能, 是健骨颗粒有效提高骨密度, 治疗原发性骨质疏松症的机理之一。

(本文图 1~6 见插页 1)

参考文献

- 1 Gurkan L, Ekeland A, Gautvik KM, et al. Bone change after castration in rats: a model for osteoporosis. *Acta Orthop Scand*, 1986, 57(1): 67-70.
- 2 韩泽辉, 党耕町, 王志国, 等. 实验性绝经后骨质疏松症的性激素治疗. *中华外科杂志*, 1992, 30(8): 451-453.
- 3 李安荣, 周婴, 周晓琳, 等. 骨质疏松症. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998. 44-46.
- 4 Abu EO, Bord S, Horner A, et al. The expression of thyroid hormone receptors in human bone. *Bone*, 1997, 21(2): 137-142.
- 5 Allain TJ, Yen PM, Flanagan AM, et al. The isoform-specific expression of the tri-iodothyronine receptor in osteoblasts and osteoclasts. *Eur J Clin Invest*, 1996, 26(5): 418-425.
- 6 Allain TJ, Chambers TJ, Flanagan AM, et al. Tri-iodothyronine stimulates rat osteoclastic bone resorption by an indirect effect. *J Endocrinol*, 1992, 133(3): 327-331.
- 7 叶海, 万冬翠. 名医谈骨质疏松症. 宁波: 宁波出版社, 2000. 20-21.
- 8 林燕萍, 王和鸣, 周瑞祥. 煅狗骨对实验性骨折愈合作用的垂体 TSH、GH 细胞免疫细胞化学研究. *中国骨伤*, 1993, 6(6): 5-7.
- 9 卞以洁, 胡雅儿, 赵胜利, 等. 仙灵脾对 M 受体—cGMP 系统的调节作用. *中药药理与临床*, 1988, 4(3): 29-30.

(收稿: 2001-10-30 编辑: 房世源)

短篇报道

尾端系线法简化取钉过程

赵建勇 孙国明 王香梅

(沧州中西医结合医院骨科, 河北 沧州 061001)

临床中经常遇到肱骨髁上骨折, 胫骨平台骨折内固定术后取钉不易定位问题, 导致切口愈延愈大, 手术越作越没信心的情况。尤其是这些部位分别位于尺神经、腓总神经走行区域, 而且最终取钉都是借助于 X 线影像增强器来解决的。

我们通过实践认为, 如在克氏针尾或螺钉尾端系一 4 号黑色丝线, 沿原切口顺入皮下, 常能于取钉时顺利解决问题:

(1) 系线走行部位为切口入路, 该区域避开了神经及重要血

管, 顺该切口切开皮肤即可见系线线段, 沿线段走向钉尾, 方便快捷; (2) 该引导线色泽醒目, 质地柔软, 无排异反应, 无吸收可能, 不影响术后功能锻炼; (3) 如遇骨痂包埋钉尾, 可顺之果断凿通骨痂, 开窗取钉或克氏针, 作到有的放矢, 不致犹豫不决; (4) 如遇切口不在骨突部, 可于该骨突部作一安全小切口, 将丝线顺入皮下即可; (5) 可节约时间及费用。

(收稿: 2001-03-11 编辑: 李为农)

血管植入变性骨骼肌与自体神经瘤片段 联合移植修复周围神经陈旧性缺损

(正文见 152 页)

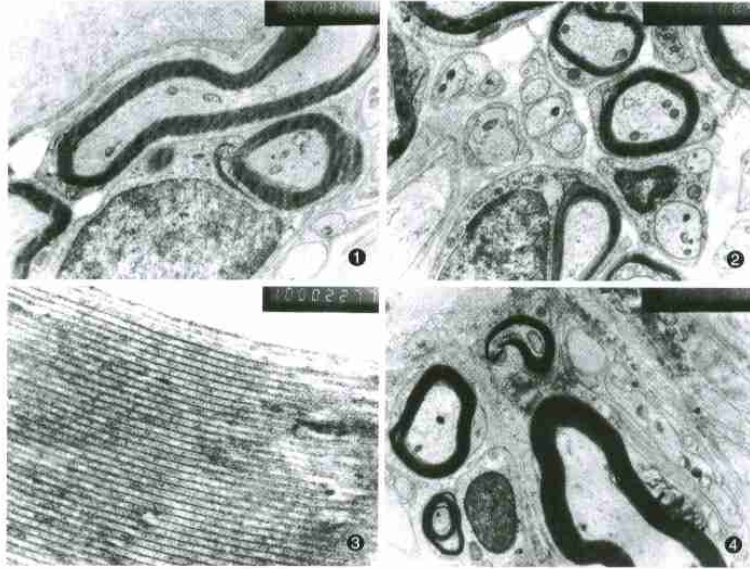


图1 联合移植组可见雪旺氏细胞发育良好并包绕再生神经纤维 5个月 透射电镜×8000
图2 自体神经移植组可见雪旺氏细胞并包绕再生神经纤维 5个月 透射电镜×8000
图3 联合移植组可见神经纤维髓鞘板层明暗板排列整齐 5个月 透射电镜×20000
图4 单纯变性骨骼肌加血管植入组可见雪旺氏细胞包绕的神经纤维部分崩解 5个月 透射电镜×8000

健骨颗粒对骨质疏松模鼠垂体—甲状腺轴的影响

(正文见 154 页)

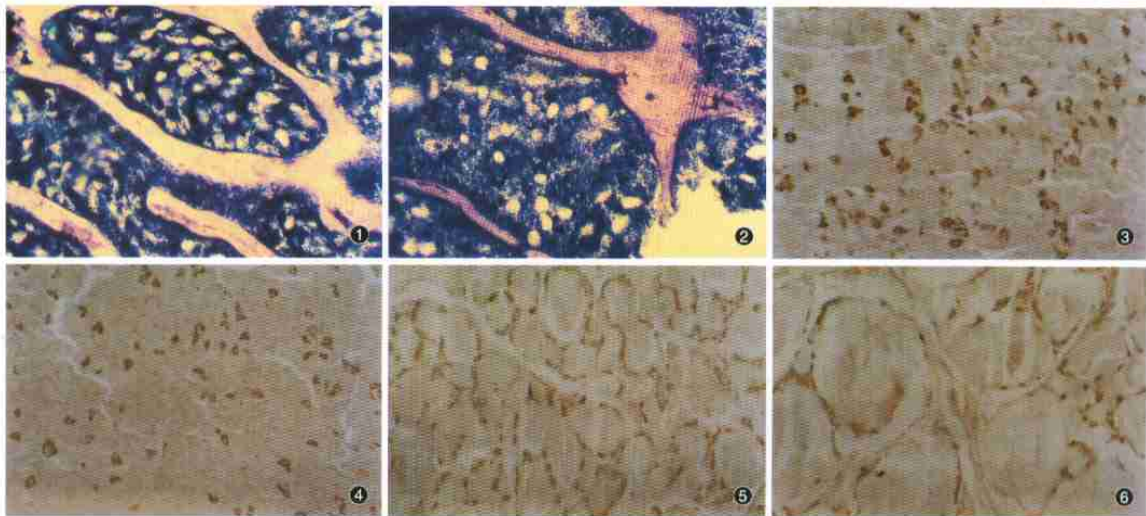


图1 术后12周Sham组骨小梁, 甲苯胺蓝染色, ×200 图2 术后12周OVX组骨小梁明显稀疏, 甲苯胺蓝染色, ×200 图3 用药12周健骨颗粒组(Ⅲ组)垂体TSH细胞免疫细胞化学染色, S-P法, DAB显色, ×100 图4 用药12周生理盐水对照组(Ⅰ组)垂体TSH细胞免疫细胞化学染色, S-P法, DAB显色, ×100 图5 用药12周生理盐水对照组(Ⅲ组)甲状腺C细胞免疫细胞化学染色, S-P法, DAB显色, ×100 图6 用药12周生理盐水对照组(Ⅰ组)甲状腺C细胞免疫细胞化学染色, S-P法, DAB显色, ×100