

• 基础研究 •

健骨颗粒对去卵巢骨质疏松模鼠血清 TNF- α 、TGF- β_1 的影响

林燕萍¹ 周瑞祥² 王和鸣¹ 冯尔宥¹

(1. 福建中医学院骨伤系, 福建 福州 350003; 2. 福建医科大学基础医学院, 福建 福州)

【摘要】 目的 探讨补肾健脾中药健骨颗粒对去卵巢骨质疏松模鼠血清 TNF α 与 TGF β_1 含量的变化。方法 切除卵巢建立大鼠骨质疏松模型, 随机分成三组, 分别喂服健骨颗粒、骨松宝、生理盐水, 用药 12 周后检测各组血清 TNF α 、TGF β_1 及 E₂ 含量。结果 大鼠去卵巢后 12 周, 随着 E₂ 水平下降, 血清 TNF α 含量明显升高, 而 TGF β_1 浓度却明显降低。当喂服健骨颗粒 12 周后, 血清 E₂ 水平和 TGF β_1 浓度回升明显, 而 TNF α 含量却出现下降, 与同期生理盐水组相比有明显统计学意义。血清 TGF β_1 、E₂ 含量与 TNF α 呈负相关, 而 TGF β_1 含量与 E₂ 水平高度正相关。结论 E₂ 对 TNF α 有一定的抑制作用, 而 TGF β_1 的分泌可能需要雌激素等的刺激。健骨颗粒通过综合调整作用以提高模鼠 E₂ 水平, 既制约了 TNF α 的合成、分泌及其活性, 又解除了对 TGF β_1 的抑制作用, 使破骨细胞的骨吸收活动减弱, 成骨细胞的骨形成作用增强, 改善骨代谢的负平衡。

【关键词】 骨质疏松, 绝经后; 骨代谢; 中医现代化; 卵巢切除术

Effect of Jiangu Granula on serum TNF α and TGF β_1 in osteoporosis models of ovariectomized rats LIN Yanping, ZHO U Rui-xiang, WANG He-ming, et al. Department of Orthopedics & Traumatology of Fujian TCM (Fujian Fuzhou, 350003)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Jiangu granula (JGG) on serum TNF α and TGF β_1 of osteoporosis (OP) models of rats. **Methods** OP model SD rats were produced by ovariectomy and were randomly divided into 3 group: normal saline group, Gusongbao treated group, JGG treated group. The serum levels of TNF α , TGF β_1 and E₂ were measured after 12 weeks of treatment by ELISA. **Results** The levels of serum TNF α increased at 12 weeks after operation, but serum TGF β_1 decreased. After treating with JGG 12 weeks the levels of serum TGF β_1 and E₂ increased, but serum TNF α decreased in comparison with the normal saline group. It was found that there were a negative correlation between TGF β_1 , E₂ and TNF α , TGF β_1 and E₂ appeared in highly positive correlation. **Conclusion** E₂ inhibited serum TNF α , but the secretion of serum TGF β_1 relied on the E₂ stimulation. JGG raise the E₂ levels of OP model rats by comprehensive modulation; it not only inhibites the secretion, synthesis and activity of TNF α , but also relieves the inhibition of TGF β_1 . Consequently JGG can inhibit the bone resorption of osteoclasts and accelerate the bone formation of osteoblasts, then improve the negative balance of bone metabolism.

【Key Words】 Osteoporosis, postmenopausal; Bone metabolism; Modernization of TCM; Ovariectomy

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 是妇女在绝经后因骨量丢失, 骨组织显微结构退变, 骨脆性增加, 而致骨折危险性增大为特征的老年性常见多发病。其发病机理目前尚不十分清楚。近年来有文献报道肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 等细胞因子与骨形成、骨吸收等骨代谢过程关系密切, 它们调控着骨代谢过程中成骨细胞和破骨细胞的分化、增殖与功能活性^[1,2]。但有关绝

经后骨质疏松症患者以及本症治疗过程中血清 TNF- α 、TGF- β_1 的含量变化情况报道较少。前期实验表明补肾健脾中药健骨颗粒能明显促进成骨细胞活性, 抑制破骨细胞功能, 改善雌激素水平下降后的骨代谢负平衡, 有效防治实验性 I 型骨质疏松症^[3,4]。为深入探讨健骨颗粒对骨代谢的具体调节机制, 本实验以切除卵巢大鼠为模型, 探讨用药后模鼠血清中 TNF- α 、TGF- β_1 含量的变化。

1 材料与方法

1.1 实验药物 健骨颗粒由煅狗骨、淫羊藿、党参等中药组成,

基金项目: 福建省自然科学基金重大项目 (C9830001)

教育部骨干教师资助项目 (No: 1946)

由本院中试车间加工制备,经浸泡煎煮、过滤浓缩、喷雾干燥、整粒分装制成颗粒冲剂,每克颗粒含原生药 2.9g。骨松宝由贵州富华药业有限责任公司制造(黔卫药准字第 100079 号)。

1.2 动物造模、分组、取材 选用 6 月龄 SD 雌性大鼠 50 只(由上海西普尔必凯实验动物有限公司提供),体重 350~400g,随机分成模型组 40 只(行腹部切口双侧卵巢切除术)和假手术组 10 只(腹部切口但不切除卵巢)。术后 3 个月模型组和假手术组各处死 10 只,经相关指标检测确定模型成立^[4],模型组余鼠 30 只再随机分成 3 组,每组 10 只,分别喂服生理盐水 $2\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,骨松宝 $1.5\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,健骨颗粒 $2\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,统一于术后第 13 周,即模型成立后给药,所用颗粒制剂均化水后灌服,每天一次。实验大鼠均在相同条件下自由摄食饮水,于用药 12 周后取材。颈动脉取血,离心留取血清, -20°C 冻存待测。

表 1 血清 TNF- α 、TGF- β_1 、E₂ 含量测定结果($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | TNF- α (pg/ml) | TGF- β_1 (ug/L) | E ₂ (pg/ml) |
|-------|----|------------------------------------|---------------------------------------|--|
| 模型组 | 10 | 53.88 \pm 16.35 \blacktriangle | 6.78 \pm 0.75 \triangle | 18.28 \pm 7.05 $\blacktriangle\triangle$ |
| 假手术组 | 10 | 36.97 \pm 6.87 \star | 15.25 \pm 5.20 \star | 92.22 \pm 27.10 \star |
| 生理盐水组 | 10 | 65.86 \pm 35.36 \triangle | 5.53 \pm 1.46 \triangle | 27.24 \pm 2.99 \triangle |
| 骨松宝组 | 10 | 38.08 \pm 16.17 \star | 7.89 \pm 1.16 \triangle | 63.27 \pm 13.47 $\blacktriangle\star$ |
| 健骨颗粒组 | 10 | 32.44 \pm 3.42 \star | 9.12 \pm 1.79 $\blacktriangle\star$ | 54.05 \pm 15.92 $\blacktriangle\star$ |

注:与模型组比,*示 $P < 0.05$,#示 $P < 0.01$;与假手术组比, \blacktriangle 示 $P < 0.05$, \triangle 示 $P < 0.01$;与生理盐水组比, \star 示 $P < 0.01$ 。

2.2 血清 TGF- β_1 含量变化 术后 12 周,去卵巢大鼠血清 TGF- β_1 含量出现下降,与假手术组比较有统计学意义($P < 0.01$),用药 12 周后,健骨颗粒组大鼠血清中的 TGF- β_1 含量上升,与同期生理盐水组相比,有统计学意义($P < 0.01$),但仍然低于假手术组($P < 0.01$)。两用药组之间无明显差异(见表 1)。

2.3 血清 E₂ 含量变化 卵巢摘除后 E₂ 水平急剧下降,与假手术组比较,统计学意义显著($P < 0.01$)。用药后健骨颗粒组和骨松宝组的血清 E₂ 浓度均明显回升,与同期生理盐水组比有明显统计学意义($P < 0.01$)。两用药组之间无明显差异(见表 1)。

2.4 血清各检测指标的相关性 将血清 TNF- α 、TGF- β_1 、E₂ 含量分别进行两两相关分析,结果发现:血清 TNF- α 与 E₂ 含量呈负相关($r = -0.324, P < 0.05$);血清 TGF- β_1 与 E₂ 含量呈高度正相关($r = 0.673, P < 0.01$);血清 TNF- α 与 TGF- β_1 亦呈负相关($r = -0.387, P < 0.02$)。

3 讨论

绝经或卵巢切除所致的雌激素缺乏,可使骨吸收和骨形成之间失耦联,加速骨量的丢失。虽然其具体机制尚不清楚,但近十几年来随着细胞生物学和分子生物学研究的不断深入,细胞因子的作用越来越受到人们的重视。细胞因子是一类由多种细胞产生并分泌到细胞外的糖蛋白分子,具有多种生物学功能。其中 TNF- α 、TGF- β_1 在骨质疏松症中发挥重要作用。近年来研究发现,随着妇女更年期雌激素水平的下降,骨吸收的细胞因子产生过多^[5],使骨吸收活动增强,TNF- α 是重要的骨吸收因子之一。TNF- α 作用表现为刺激破骨前体细胞的增殖和分化,也可抑制成骨细胞碱性磷酸酶的生成,抑

1.3 检测指标和方法 血清 TGF- β_1 、TNF- α 含量运用酶联免疫吸附法(ELISA)方法测定,mTGF- β_1 、mTNF- α ELISA 试剂盒均购自美国 Lifekey 公司。采用 Elx808 型酶标仪(美国 Bior Tek Instruments Inc.)测定 $\lambda = 450\text{nm}$ OD 值。血清雌二醇(E₂)运用放射免疫分析法(RIA)测定,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。

1.4 统计学处理 数据用 SPSS 软件包处理,组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 血清 TNF- α 含量变化 手术摘除卵巢 12 周后,模型组血清中的 TNF- α 浓度明显升高,与假手术组相比有统计学意义($P < 0.01$),用药 12 周后,健骨颗粒组和骨松宝组血清 TNF- α 浓度均显著降低,与生理盐水组比较统计学意义明显($P < 0.01$),两用药组之间无明显差异(见表 1)。

制骨形成和钙化^[6]。有学者认为,雌激素抗骨吸收效应即通过抑制 TNF- α 等骨吸收细胞因子的分泌^[7]。本实验结果显示,大鼠去卵巢后 12 周,血清中的 TNF- α 含量明显升高,与假手术组比有统计学意义($P < 0.05$),而同期的 E₂ 水平却显著降低,并伴有明显的骨组织形态结构的疏松改变^[4],提示 E₂ 可能对 TNF- α 有一定的抑制作用,当卵巢切除 E₂ 水平下降时,去除或减低了破骨细胞和骨髓基质细胞合成、分泌 TNF- α 的抑制作用,从而使 TNF- α 合成分泌增加,活性增强,促进骨吸收,抑制骨形成。

转化生长因子 β 是一种多功能生长因子,在哺乳类动物可分为 β_1 、 β_2 、 β_3 三型, β_1 是主要的功能因子。研究表明 TGF- β_1 对骨的修复和重建有重要作用,它可以通过刺激或抑制其它细胞因子的产生或调控其作用,来控制组织的修复过程^[8]。成骨细胞的数量及活性与骨髓成骨细胞祖细胞(OPC)的成骨潜力有关,而 TGF- β_1 是 OPC 分化、增殖中的重要内分泌生长因子,当 TGF- β_1 含量减少或加入 TGF- β_1 抗体后,OPC 克隆数量和增殖能力明显降低,致使成骨细胞数量减少和活性下降^[9]。所以 TGF- β_1 被认为是成骨细胞与破骨细胞之间相耦联的因子^[10]。本研究发现,雌性大鼠去势后 12 周,当 E₂ 水平下降,血清中 TNF- α 含量升高的同时,TGF- β_1 浓度却明显降低,这说明 TGF- β_1 的分泌可能需要雌激素等相关因素的刺激。

前期研究证明补肾健脾中药健骨颗粒能有效拮抗实验性骨质疏松^[3,4],本研究结果显示,当骨质疏松模鼠喂服健骨颗粒 12 周后,血清 E₂ 水平和 TGF- β_1 浓度都回升明显,而骨吸收的强力诱导剂 TNF- α 含量却明显低于模型组,与同期生理盐水组相比,均有显著统计学意义($P < 0.01$)。三种指标两

两相关分析显示:血清 TNF α 与 E₂、TGF β ₁ 含量呈负相关,而血清 TGF β ₁ 与 E₂ 含量呈高度正相关。提示:健骨颗粒可能通过综合调整相关内分泌功能,或通过植物药中的类雌激素样作用,使骨质疏松模鼠体内 E₂ 水平升高。随着 E₂ 水平的回升,制约了 TNF α 的合成和分泌,降低了 TNF α 的活性,解除了与之作用相拮抗的 TGF β ₁ 的抑制作用,使血清 TGF β ₁ 含量增加,结果使破骨细胞的骨吸收活动减弱,成骨细胞的骨形成作用增强,改变了骨吸收大于骨形成的骨代谢负平衡状态,增加了骨量,达到治疗目的。

参考文献

- 1 Weide R, Ehlenz K, Lorenz W, et al. Successful treatment of osteoporosis in systemic mastocytosis with interferon alpha 2b. *Ann Hematol*, 1996, 72(1): 41-43.
- 2 李安荣,周雯,周晓琳.骨质疏松症.合肥:安徽科学技术出版社,1998. 66-68.
- 3 林燕萍,周瑞祥,张爱平,等.健骨颗粒对去卵巢骨质疏松模鼠骨组织结构的影响. *解剖学杂志*, 2001, 24(6): 521-526.
- 4 林燕萍,李咏高,王和鸣,等.健骨颗粒对骨质疏松模鼠垂体-甲状腺轴的影响. *中国骨伤*, 2002, 15(3): 154-156.

- 5 Pacifici R. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 1996, 11(8): 1043-1051.
- 6 Kuwaki T, Shingu M, Koshihara Y, et al. Effects of cytokines on alkaline phosphatase and osteocalcin production, calcification and calcium release by human osteoblastic cells. *Br J Rheumatol*, 1994, 33(3): 224-230.
- 7 Girasole G, Jilka RL, Passeri G, et al. 17 beta estradiol inhibits interleukin 6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: A potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest*, 1992, 89(3): 883-891.
- 8 Yamada Y, Miyachi A, Goto J, et al. Association of a polymorphism of the transforming growth factor beta gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res*, 1998, 13(10): 1569-1576.
- 9 Gazit D, Zilberman Y, Ebner R, et al. Bone loss (osteopenia) in old male mice results from diminished activity and availability of TGF beta. *J Cell Biochem*, 1998, 70(4): 478-488.
- 10 Marie P. Growth factors and bone formation in osteoporosis: Role of IGF I and TGF beta. *Rev Rhum Engl Ed*, 1997, 64(1): 44-53.

(收稿: 2002-03-20 编辑: 李为农)

• 手法介绍 •

手法整复治疗肘关节侧方脱位 15 例

李超民 颜益祥

(涟源市中医院, 湖南 涟源 417100)

近 10 年来,作者采用手法整复、小夹板或石膏固定治疗肘关节侧方脱位 15 例,收到满意的效果,现总结报告如下。

1 临床资料

本组男 11 例,女 4 例;年龄最小 8 岁,最大 20 岁,均在伤后 1 小时~2 天内就诊。其中肘关节内侧方脱位 9 例,外侧方脱位 6 例。15 例病人中,只 1 例肘内侧方脱位合并内外上髁骨折有尺神经轻度损伤(4、5 指感觉麻木),无肱动脉损伤病例。15 例肘关节侧方脱位合并外髁骨折 2 例,肘关节内侧方脱位合并内髁骨折 4 例,肘关节外侧方脱位合并鹰嘴干骺端骨折 1 例,肘关节外侧方脱位合并内髁骨折 2 例,肘关节外侧方脱位合并肱骨内外上髁骨折 1 例,单纯内侧方脱位 3 例,单纯外侧方脱位 2 例。

2 治疗方法

一助手握住患者的上臂,一助手握腕关节,顺势适当牵引(牵引力不可过大),术者双手环抱脱位的桡尺骨近端,向肱骨远端捺正,在捺正的同时向后下方稍加牵引力,双指顶推肱骨远端,这样有利于鹰嘴滑过肱骨下端进入滑车,此时可听到一声低沉的入臼声,即复位成功。有合并神经、血管卡压或牵拉伤者,复位后,一般都会慢慢好转,如无明显改善迹象,则应立即手术探查,进行相应处理。复位成功后,术者双手固定肘关节,嘱助手将前臂旋后徐徐屈肘 90°,夹板(前、后、内、外四块)或石膏固定,悬吊胸前。3~4 周解除固定,如功能障碍者可

用中草药薰洗和加强功能锻炼。合并骨折者,脱位纠正后,骨折块一般亦随着对位,如仍有错位者,可行手法整复或手术切复固定。本组仅一例外侧脱位合并内外上髁骨折,脱位纠正后,内外上髁仍向下方移位,加用了向上推挤复位手法。

3 治疗结果

本组 15 例肘关节侧方脱位病例,均为一次整复成功,仅一例合并内外上髁骨折者,复位后内髁仍向下移位,作了相应手法整复。夹板和石膏固定时间最长 35 天,最短 21 天,功能恢复一般均在松除固定后 15~30 天,最长 60 天基本恢复。一例尺神经损伤者肘关节活动功能及尺神经支配区皮感也在 3 月内恢复。

4 讨论

复位治疗时应注意事项:①肘关节侧方脱位,关节周围软组织损伤严重,复位时要顺势牵引,远端助手不可左右摇摆手臂,否则可使侧方脱位又变成后脱位,加重软组织损伤。②复位成功后,维持对位,在未固定好时不能松手,因脱位对侧侧副韧带及关节囊均已破裂,而脱位侧相对完整,肘两侧稳定力量不平衡,复位后容易再次脱位。③由于肘关节损伤肿胀严重,固定时一定要扎带松紧适宜(上下可移动 1cm),石膏固定者更应密切观察伤肢血运、皮感情况,如有异常,及时处理。固定期间嘱患者加强腕指功能活动,以利血液循环。内服活血化瘀之中药,剂量可稍加重。

(收稿: 2002-01-21 编辑: 连智华)