

健骨颗粒对骨质疏松模型大鼠垂体- 肾上腺轴的影响

林燕萍¹, 周瑞祥², 马建华¹, 黄美雅¹

(11 福建中医学院骨伤系, 福建 福州 350003; 21 福建医科大学基础医学院)

摘要 目的: 从垂体- 肾上腺轴角度探讨健骨颗粒治疗 \tilde{N} 型原发性骨质疏松症的作用机制。**方法:** 通过切除 SD 大鼠双侧卵巢建立 \tilde{N} 型原发性骨质疏松模型, 随机分成 3 组, 分别喂服健骨颗粒、骨松宝和生理盐水。用药 12 周后处死取材, 检测血清皮质醇(COR)浓度, 取脑垂体行 ACTH 细胞免疫化学染色(S-P 法)并形态计量, 肾上腺行 HE 染色。**结果:** 切除卵巢 12 周后大鼠出现骨质疏松, 血清 COR 浓度以及垂体 ACTH 阳性细胞数和染色面积均明显高于假手术组(行腹部切口, 但不切除卵巢)。用药 12 周后健骨颗粒组血清 COR 水平、垂体 ACTH 阳性细胞数和染色面积均较生理盐水组降低或减少。**结论:** 补肾健脾中药健骨颗粒可有效调节去卵巢骨质疏松模型大鼠垂体- 肾上腺轴的病理变化和功能状态, 抑制雌激素水平降低后的异常骨吸收。

关键词 骨质疏松, 绝经后; 垂体; 肾上腺; 中草药

Effect of Jiangu granule on the pituitary-adrenal gland axis of ovariectomized rats LIN Yanping, ZHOU Ruixiang, MA Jianhua, HUANG Meiyu. Department of Orthopaedics & Traumatology of Fujian TCM (Fujian Fuzhou, 350003, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of Jiangu granule on the primary osteoporosis (POP) in the view of the pituitary-adrenal gland axis. **Methods:** POP animal model type I was made by ovariectomized in SD rats, which were randomly divided into Jiangu granule group, Gusongbao group and saline group. The animals were killed at 12 weeks after treatment. The levels of serum COR were measured. The ACTH cells in pituitary were stained with immunocytochemical method and observed with morphometry. The adrenal gland was stained with HE. **Results:** Osteoporosis occurred at 12 weeks after ovariectomy. The level of the serum COR and the number of the positive ACTH cells were higher than sham-operation group. After 12 weeks of treatment, the levels of the serum COR and the numbers of the positive ACTH cells in Jiangu granule groups were lower than the saline group. **Conclusion:** Jiangu granule can adjust the functional statement of the pituitary-adrenal gland axis of ovariectomized rats by means of invigorating the kidney and spleen and inhibit the abnormal bone resorption after ovariectomy.

Key words Osteoporosis, postmenopausal; Pituitary gland; Adrenal glands; Drugs, Chinese herbal

随着世界人口老龄化的提前到来, 骨质疏松症以及由它引发的骨折发生率迅速增加。虽然骨质疏松症发生与多种因素有关, 但内分泌功能紊乱是其重要的发病机制之一。垂体- 肾上腺轴是机体重要的内分泌调控通道, 皮质类固醇激素对骨形成和骨吸收起重要作用。纯中药制剂健骨颗粒以肾主骨理论为原则, 从补肾健脾入手组方用药。前期实验

研究表明: 该药能明显改善 \tilde{N} 型原发性骨质疏松模型大鼠的骨代谢状况, 有效防治实验性 \tilde{N} 型骨质疏松症^[1,2]。为进一步探讨健骨颗粒治疗骨质疏松的作用机制, 本实验将运用放射免疫学、免疫细胞化学染色和计算机图像分析等技术, 观察去卵巢模型大鼠中药治疗前后垂体、肾上腺形态结构变化, 并结合血清中相应激素浓度的改变, 阐明健骨颗粒对模鼠垂体- 肾上腺轴功能的影响, 既为临床新药开发提供理论依据, 也有助于人们对中医药治疗骨质疏松症机制的了解和认识。

基金项目: 福建省自然科学基金重大项目(C9830001)

教育部骨干教育资助项目(No: 1946)

通讯作者: 林燕萍 Tel: 0592 3570823 E-mail: YPLIN21@yahoo.

com.cn

1 材料和方法

111 实验药物 健骨颗粒由煅狗骨、淫羊藿、党参等中药组成,原药材从福建省医药公司统一购进,由本院中试车间加工制备,每克颗粒含原生药 219 g。骨松宝颗粒由贵州富华药业有限责任公司生产(黔卫药准字第 100079 号)。

112 实验动物处理 50 只 6 月龄 SD 雌性大鼠(由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供),体重 350~ 400 g。适应性喂养 1 周后,随机分成模型组 40 只(行腹部切口,切除双侧卵巢)和假手术组 10 只(行腹部切口,但不切除卵巢)。手术后 12 周模型组和假手术组各处死 10 只,经骨密度及形态学指标检测确定模型成立^[2]。剩余 30 只模鼠再随机分成健骨颗粒组、骨松宝组和生理盐水组,分别喂服健骨颗粒 2 g#kg⁻¹#d⁻¹、骨松宝 115 g#kg⁻¹#d⁻¹和生理盐水 2 ml#kg⁻¹#d⁻¹。统一于术后 13 周起灌胃(即模型成立后给药),每天 1 次,所有颗粒制剂均溶于水后灌服,实验大鼠均在相同条件下自由摄食饮水。于灌药 12 周后处死取材。颈动脉取血,离心留取上清液, - 20 e 冰箱内冻存待测。取大鼠脑垂体、肾上腺等标本,分别以 Bouin. s 液和 10% 甲醛固定。

113 检测指标和方法 血清皮质醇(COR)浓度运用放射免疫分析法(RIA)测定,操作步骤根据使用说明,试剂盒由中国原子能科学研究院同位素所提供;垂体 ACTH 细胞运用免疫细胞化学方法染色(S&P 法),试剂盒由福州迈新生物技术开发公司提供,运用 Leica Q550 型真彩色图像分析仪进行定量分析,在光学显微镜下(@100)随机选取脑垂体远侧部 8 个视野,每视野面积 200 Lm@200 Lm,计算阳性细胞数及阳性染色面积。肾上腺行常规石蜡切片 HE 染色,光镜观察。

114 统计学处理 运用 SPSS 软件包进行数据分析,参数值用均数? 标准差(x ? s)表示,测定结果分别作组间比较 t 检验。

2 结果

211 垂体 ACTH 细胞免疫化学染色及形态计量结果 光镜下可见: ACTH 细胞散在分布于整个垂体前叶,呈圆形、卵圆形、三角形、多角形星形或不规则形,核周细胞质中有阳性颗粒,且细胞内阳性颗粒密集地沿胞膜下分布。模型组 ACTH 细胞较密集,细胞体积较大,呈多角形或卵圆形,染色较深(图 1),而假手术组 ACTH 细胞分布较稀疏,散在分布,细胞体积较小,染色较浅(图 2)。形态计量显示模型组

ACTH 细胞阳性反应数及阳性染色面积均显著高于假手术组(P< 0101,见表 1)。健骨颗粒组 ACTH 细胞较生理盐水组稀疏,染色浅(图 3, 4),ACTH 细胞阳性染色面积低于生理盐水组,有统计学意义(P< 0105)(见表 1),而两用药组无明显差异。

表 1 ACTH 细胞免疫细胞化学形态定量及

血清 COR 含量测定结果(x ? s)

Tabl 1 Results of determinations of ACTH cell

with immunocytochemistry and morphometry and COR in serum

组别	阳性细胞数(个)	阳性染色面积(Lm ²)	COR(ng/ml)
模型组	1741 250? 241 182#	18921 371? 2971 917#	431 63? 91 86#
假手术组	831 125? 81 543	13891 648? 2581 461	251 32? 41 80
健骨颗粒组	1341 125? 171 521*	12861 184? 2531 692 v	331 24? 31 13*
骨松宝组	1191 375? 141 422*	13311 654? 2661 379	361 44? 51 53*
生理盐水组	1731 500? 211 125	15551 35? 1861 607	511 69? 31 21

注:模型组与假手术组比较,# P< 0101;健骨颗粒组、骨松宝组与生理盐水组比较,* P< 0101, v P< 0105。

212 血清 COR 含量检测结果 卵巢摘除后大鼠血清 COR 含量明显升高,与假手术组比较,统计学意义显著(P< 0101)。用药后健骨颗粒组和骨松宝组的血清 COR 浓度均明显下降,与同期生理盐水组比有明显差异(P< 0101)。从数字上看,健骨颗粒组血清 COR 浓度低于骨松宝组,但无统计学意义。

213 肾上腺常规形态学观察结果 大鼠肾上腺束状带模型组较假手术组明显增宽,细胞呈低柱状增生变大(见图 5, 6)。术后 24 周,健骨颗粒组与骨松宝组束状带均有所萎缩,肾上腺皮质变薄,而生理盐水组束状带仍增宽明显,类脂质颗粒及小脂滴增加,在切片上呈泡沫状。

3 讨论

中医理论认为绝经后骨质疏松症发生的病理基础是肾亏脾虚,健骨颗粒正是针对/肾亏脾虚0这一病机处方用药,意在补肾健脾,强筋壮骨。众所周知,中医/肾0的生理功能较为广泛,其中与内分泌系统关系密切。近年来,通过对/肾虚0实质的研究证实,/肾虚0与下丘脑-垂体-多个靶腺系统功能紊乱以及肾上腺、甲状腺、性腺等退行性改变有关^[3]。现代医学研究表明,绝经后骨质疏松症的发生主要是由于雌激素水平的下降或缺乏所致,但卵巢功能不足或丧失引起骨质疏松的详细病理机制却仍然不甚明了,而且近年来有研究表明雌激素减少并非是由于引起绝经后骨质疏松的唯一因素^[4],该病的发生与体内多种激素浓度变化密切相关。

血清皮质醇(COR)是人体肾上腺皮质束状带分泌的一种糖皮质激素,它是维持人体生命活动的重

要激素之一。血清皮质醇含量的测定是了解肾上腺皮质功能的一项重要参数,而皮质醇的分泌受垂体前叶促肾上腺皮质激素细胞(ACTH 细胞)的调控,ACTH 的释放能刺激肾上腺皮质增生,促进肾上腺皮质的功能活动。皮质类固醇激素可通过降低骨形成和促进骨吸收两个方面对骨代谢起作用。皮质类固醇可促进蛋白质分解,使骨基质的蛋白合成障碍,因此影响骨形成。Chen 等^[5]发现骨细胞内有皮质类固醇的受体存在,皮质类固醇可直接作用于骨细胞而发挥作用。Reid^[6]的多项研究表明,将灵长类的骨细胞置于皮质类固醇的培养液中,对细胞生长及 RNA 的合成等均有抑制作用,故认为皮质类固醇可影响成骨细胞功能、抑制其增殖及衍化为骨细胞。过多的皮质类固醇还能抑制肠道对钙的吸收,增加尿钙排泄,使血钙水平降低,继发甲状旁腺激素(PTH)的分泌和释放增加,从而使骨吸收加强^[7]。

本实验结果显示,卵巢摘除后 12 周,大鼠垂体 ACTH 细胞数、阳性染色面积均明显高于假手术组($P < 0.01$),模型组肾上腺束状带明显增宽,细胞增生、细胞体积大多数呈低柱状,大鼠血清 COR 含量亦明显高于假手术组,两组相比有明显统计学意义($P < 0.01$)。揭示去势后随着机体雌激素水平的下降,垂体 ACTH 细胞功能明显活跃,进而刺激肾上腺皮质细胞的增生,细胞功能也明显活跃,皮质类固醇激素分泌增加,抑制骨形成,增加骨吸收,出现骨质疏松。通过这一现象,我们推测机体的雌激素水平对垂体-肾上腺轴有一定的抑制作用,当切除卵巢雌激素水平下降时,垂体-肾上腺轴的抑制作用解除,因此出现明显的功能活跃状态。用药 12 周后,健骨颗粒组和骨松宝组垂体 ACTH 细胞数目和阳性染色面积均明显下降,血清 COR 浓度亦显著降低(与肾上腺 HE 染色结果相一致),与同期生理盐水组相比均有明显统计学意义($P < 0.01$)。两用药组相比,从数字上看,健骨颗粒组的 ACTH 细胞阳性染色

面积和血清 COR 浓度均较骨松宝组低,但无明显统计学差异。揭示健骨颗粒一方面通过补肾健脾的整体调节,有效控制骨质疏松模型大鼠因去势而出现的垂体-肾上腺轴功能亢奋的病理态势,另一方面可能由于健骨颗粒含有植物类雌激素样物质,以代偿因卵巢切除而引起的雌激素水平的降低,从而抑制垂体-肾上腺轴的亢奋状态,具体包括抑制垂体 ACTH 细胞的增生和活性,限制肾上腺皮质束状带细胞的增殖和功能,减少 COR 的合成和分泌,降低血清 COR 浓度,从而改善皮质类固醇激素对骨代谢的副作用,促进骨形成,减少骨吸收,达到治疗骨质疏松的目的。

综上所述,¹ 机体雌激素水平对垂体-肾上腺轴有一定的抑制作用;⁰ 垂体-肾上腺轴功能亢进,类固醇激素分泌增加,是卵巢切除大鼠产生骨质疏松复杂机制的一个不可忽视环节;[»] 健骨颗粒可通过/补肾健脾⁰有效调节去卵巢骨质疏松模型大鼠垂体-肾上腺轴的病理变化和功能状态,使 ACTH 细胞功能、血清 COR 水平趋于正常,这可能是该药有效治疗骨质疏松症的重要机制之一。

(本文图 1-6 见后插页 2)

参考文献

- 1 林燕萍,李咏高,马建华,等.健骨颗粒对去卵巢骨质疏松模型鼠骨代谢的影响.福建中医学院学报,2001,11(4):17219.
- 2 林燕萍,李咏高,王和鸣,等.健骨颗粒对骨质疏松模型鼠垂体-甲状腺轴的影响.中国骨伤,2002,15(3):1542156.
- 3 王致谱,蔡景峰.中国中医药 50 年.北京:人民卫生出版社,1998.1272162.
- 4 刘忠厚.骨质疏松学.北京:化学出版社,1992.1342135.
- 5 Chen TL, Feldman D. Glucocorticoid receptors and actions in subpopulations of cultured rat bone cells. Mechanism of dexamethasone potentiation of parathyroid hormone-stimulated cyclic AMP production. J Clin Invest, 1979, 63(4): 7502758.
- 6 Reid IR. Pathogenesis and treatment of steroid osteoporosis. Clin Endocrinol (Oxf), 1989, 30(1): 832103.
- 7 Burckhardt P. Corticosteroids and bone: A review. Horm Res, 1984, 20(1): 5264.

(收稿日期:2003-07-04 本文编辑:王宏)

北京天东医疗设备有限公司供货信息

北京天东医疗设备有限公司生产部是多年生产口腔正畸材料、骨科器械及小针刀系列产品的专业厂家。审批文件:京药管械经营许 20000629 号,京药管械生产许 20000333 号,京药管械(准)字 2001 年第 2140253 号,京医械广审(文)200303012 号。

现办理小针刀邮购业务,售价:Ñ 型(20 支装)每套 120 元;ò ~ ó 型(10 支装)每套 90 元。每套加收 10 元包装邮资,款到发货。地址:北京天东医疗设备有限公司,北京市丰台区三路居乙 12 号。邮编:100073 电话:010263266458 63488112

健骨颗粒对骨质疏松模型大鼠垂体-肾上腺轴的影响

(正文见 19 页)

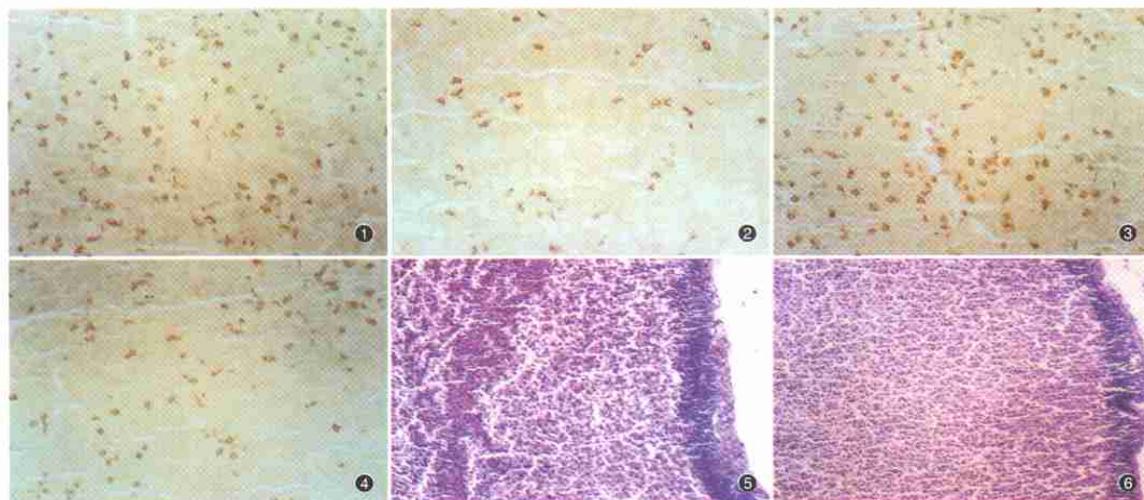


图1 术后12周,模型组垂体ACTH细胞密集,数量多,体积较大,呈多角形或卵圆形。免疫细胞化学染色(S-P法),DAB显色 $\times 200$ 图2 术后12周,假手术组垂体ACTH细胞明显稀疏,数量少,呈散在分布。免疫细胞化学染色(S-P法),DAB显色 $\times 200$ 图3 术后24周,生理盐水组垂体ACTH细胞与术后12周模型组情况相似。免疫细胞化学染色(S-P法),DAB显色 $\times 200$ 图4 术后24周,健骨颗粒组ACTH细胞明显比生理盐水组稀疏,数量少。免疫细胞化学染色(S-P法),DAB显色 $\times 200$ 图5 术后12周,假手术组肾上腺球状带、束状带、网状带结构清晰。HE染色 $\times 100$ 图6 术后12周,模型组肾上腺束状带明显增宽,细胞增生。HE染色 $\times 100$

Fig.1 12 weeks postoperatively, ACTH cells in pituitary were concentrated and enlarged with polygon and round in the model group. Immunocytochemical stain(S-P Technique), DAB stain $\times 200$ **Fig.2** 12 weeks postoperatively, ACTH cells in pituitary were obviously rarefied and few in sham-operation group, which show scatter distribution. Immunocytochemical stain(S-P Technique), DAB stain $\times 200$ **Fig.3** ACTH cell in pituitary had similarly appearance in the saline group in 24 weeks postoperatively with in model group in 12 weeks postoperatively. Immunocytochemical stain(S-P Technique), DAB stain $\times 200$ **Fig.4** ACTH cell were obviously rarefied and fewer in the Jiangu granula group than the saline group. Immunocytochemical stain(S-P Technique), DAB stain $\times 200$ **Fig.5** Structure was distinct in zona glomerulosa, zona fasciculata, zona reticularis of adrenal gland in the sham-operation group. HE stain $\times 100$ **Fig.6** 12 weeks postoperatively, width of zona fasciculata of adrenal gland was obviously increased in model group, and cell were proliferative. HE stain $\times 100$