

· 论 著 ·

补肾健脾活血方对去卵巢大鼠骨组织 TNF- α 表达的影响

胡冰¹ 张胜² 杨述华¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科, 湖北 武汉 430022; 2. 湖北大学)

【摘要】目的 观察复方中药补肾健脾活血方对绝经后骨质疏松症大鼠模型骨组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 表达的影响。**方法** 将 84 只大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、中药对照组、西药对照组、补肾健脾活血方大、小剂量组共 7 组, 采用卵巢切除的方法建造绝经后骨质疏松症动物模型, 灌药 90 d 后取腰椎骨用免疫组化的方法检测 TNF- α 的表达。**结果** 补肾健脾活血方能明显减少 TNF- α 表达的阳性细胞数, 其作用强于单纯补肾中药和西药治疗, 并且与剂量呈正相关。**结论** 补肾健脾活血方通过影响细胞因子 TNF- α 的表达来减少骨吸收。

【关键词】 补肾健脾活血方; 骨质疏松症, 绝经后; 肿瘤坏死因子

Effect of Bushen Jianpi Huoxue recipe on expression of TNF- α in bone tissue of ovariectomized rats HU Bing, ZHANG Sheng, YANG Shuhua. Union Hospital of Tongji medical College of Huazhong University of Science and Technology (Hubei Wuhan, 430022, China)

【Abstract】Objective To observe the effect of Bushen Jianpi Huoxue recipe on the expression of TNF- α in bone tissue of rat postmenopausal osteoporosis model. **Methods** 84 female rats were divided to 7 groups: normal group, sham operation group, model group, chinese herb control group, western medicine control group, large dose of Bushen Jianpi Huoxue recipe group and small dose of Bushen Jianpi Huoxue recipe group. The rat's postmenopausal osteoporosis model was made by ovariectomy 90 days after treatment, the expression of TNF- α in bone tissue were be detected. **Results** Bushen Jianpi Huoxue recipe can decrease the number of TNF- α positive expression cells. The effect of large dose group is superior to small dose Chinese herb control group and western medicine control group. **Conclusion** The effectiveness of treatment with Bushen Jianpi Huoxue recipe can decrease bone absorption by passing through effecting of the expression of TNF- α .

【Key words】 Bushen Jianpi Huoxue recipe; Osteoporosis postmenopausal; Tumor necrosis factor (TNF- α)

肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 是强有力的骨吸收刺激剂, 本实验采用免疫组织化学方法, 用 TNF- α 单克隆抗体对实验大鼠腰椎松质骨组织中 TNF- α 的表达水平进行检测, 观察补肾健脾活血方对大鼠腰椎松质骨组织中 TNF- α 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6 个月龄 SD 雌性大鼠 84 只, 体重 250~300 g, 购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。

1.2 药物及制备 (1) 补肾健脾活血方由人参、鹿角霜、骨碎补、补骨脂、淫羊藿、山药、白术、当归、丹参、山楂等组成, 由湖北中医学院附属医院制剂室水煎浓缩成 1:1 浓度, 即每毫升药液中生药含量为 1 g。

(2) 中成药仙灵骨葆胶囊 (黔卫药准字 10019), 贵州仙灵药业有限公司生产, 批号为 000619。(3) 西药尼尔雌醇片 (京卫药准字 93 第 034 号), 北京四环制药二厂生产, 批号为 000827。

1.3 模型的建立 对实验大鼠用 3% 戊巴比妥钠按每公斤体重 40 mg 作腹腔内注射麻醉, 俯卧位固定于大鼠夹板上, 常规消毒, 取脊柱两旁切口, 无菌操作下进入腹腔, 将双侧卵巢游离并切除, 止血缝合, 伤口用马应龙痔疮软膏外擦预防感染。术后大鼠均自由饮水, 标准饲料常规喂养 90 d, 造成实验性大鼠骨质疏松症模型。

1.4 分组及给药 84 只大鼠随机分成 7 组: 正常组、假手术组、模型组、中药对照组、西药对照组、补

肾健脾活血方大剂量组(简称大剂量组)和补肾健脾活血方小剂量组(简称小剂量组),每组 12 只。假手术组大鼠在与造模相同的麻醉和切口条件下,切除腹腔内左右各一块脂肪作假手术。正常组为空白对照组,相同条件下喂养,不作特殊处理。其余 5 组均按上述造模方法造成骨质疏松症动物模型。(注:实验过程中模型组、假手术组和西药对照组大鼠各死亡 1 只,不列入统计范畴。)

术后 91 d 开始灌胃给药,大剂量组按 4.0 g/300 g 将补肾健脾活血方浓缩液灌胃给药 1 次/d;小剂量组按 1.0 g/300 g 灌胃给药 1 次/d;中药对照组仙灵骨葆按人鼠体重换算等效剂量灌胃 1 次/d;西药组尼尔雌醇按人鼠体重换算剂量灌胃 1 次/周,每周其余 6 d 灌等量生理盐水;共 90 d。正常组、模型组和假手术组给予等容量生理盐水灌胃,次数和疗程相同。

1.5 标本制备 实验大鼠处死后,取下 L₃ 腰椎,按文献^[1]方法置 10% 中性福尔马林中在 4 ℃ 温度下浸泡 48 h,用骨刀切取 5 mm × 5 mm × 3 mm 小块,加入 10% 乙二氨四乙酸(EDTA, pH7.2)脱钙,温度保持 4 ℃,每周换脱钙液 1 次。待用手捏松质骨柔软有弹性时停止脱钙(约需 30~40 d),石蜡包埋,制备 4 μm 切片。

1.6 免疫组化方法 切片脱蜡后,分别经甲醇双氧水封闭内源性酶,正常羊血清封闭非特异性染色。最后按常规 ABC 法进行免疫组化处理,即切片经一抗处理过夜后依次经生物素化二抗、ABC 复合物处理 1 h, DAB 显色,用 PBS 缓冲液替代一抗作为阴性对照。(抗体和试剂均由武汉博士德生物工程有限公司提供)。每张切片计数 10 个高倍视野的阳性细胞数,取其均数。

1.7 统计学处理 组间数据比较采用 *F* 检验。

2 结果

表 1 各组间 TNF-α 阳性细胞数的比较(个/HP)

组别	动物数	TNF-α 阳性细胞数
正常组	12	28.4 ± 16.8
假手术组	11	28.3 ± 17.0
模型组	11	83.5 ± 30.1 ^{▲▲}
中药对照组	12	37.2 ± 20.2 ^{△△}
西药对照组	11	39.6 ± 21.2 ^{△△}
大剂量组	12	29.1 ± 16.5 ^{△△*○□}
小剂量组	12	38.5 ± 20.6 ^{△△}

注:与正常组相比^{▲▲}*P* < 0.01;与模型组相比^{△△}*P* < 0.01;与中药对照组相比^{*}*P* < 0.05;与西药对照组相比^{○□}*P* < 0.05;与小剂量组相比[□]*P* < 0.05

各组间 TNF-α 阳性细胞数的比较(见表 1)。假手术组和正常组相比, TNF-α 阳性细胞数无显著性差异(*P* > 0.05);模型组和正常组相比,阳性细胞数有非常显著性升高(*P* < 0.01);中药对照组、西药对照组、小剂量组和模型组相比, TNF-α 阳性细胞数有非常显著性降低(*P* < 0.01);大剂量组和模型组相比, TNF-α 阳性细胞数有非常显著性降低(*P* < 0.01);大剂量组和中药对照组、西药对照组、小剂量组相比, TNF-α 阳性细胞数也有显著性降低(*P* < 0.05),说明补肾健脾活血方对 TNF-α 阳性细胞数的降低作用强于单纯补肾中药治疗和西药雌激素治疗,且与剂量呈正相关。

免疫组织化学观察可见, TNF-α 阳性表达主要分布在骨小梁周边的成骨细胞和骨髓基质细胞,在胞浆中表达为强阳性,而骨基质中成熟骨细胞表达阴性;成骨细胞染色明显深于骨髓基质细胞。正常组和假手术组中骨小梁周边和骨髓腔中 TNF-α 阳性细胞数明显减少,染色较淡。

3 讨论

目前绝经后骨质疏松症的西药治疗中备受关注的方法是雌激素替代治疗。但雌激素替代治疗有导致乳房胀痛、阴道出血的副作用,且有增加乳腺癌和子宫内膜癌的危险性,同时雌激素治疗是否具有确切疗效以及其使用需维持多长时间也是有待解决的问题,所以对其临床应用尚存疑虑^[2]。因此研究绝经后骨质疏松症的中医药治疗十分必要。

补肾健脾活血方是我们多年临床经验的总结,其药物组成有:人参、鹿角霜、淫羊藿、骨碎补、补骨脂、山药、白术、当归、丹参、山楂等。方中以人参大补元气、健脾养胃,鹿角霜益肾助阳活血,两药合为君药;又以骨碎补、补骨脂和淫羊藿补肾壮骨,山药、白术健脾养胃,五味合为臣药;以当归、丹参、山楂活血通络,共为佐使之药。有关实验研究表明,补肾中药具有调节雌激素水平,增强雌激素受体活性的作用,从而可促进成骨细胞的骨形成,抑制破骨细胞的骨吸收,使骨质疏松症丢失骨量得到一定程度的恢复。如鹿角霜、骨碎补、补骨脂等中药可益精气、补腰膝,据报道其可抑制大鼠实验性骨质疏松症的发展,使钙化骨形成增加^[3]。现代临床与实验研究认为,中医学的“脾胃”不仅属于消化、吸收、营养代谢系统,同时也涉及植物神经系统、内分泌系统、血液系统等的功能,而且通过健脾养胃可调整这些系统的功能。健脾中药可以加强消化系统的功能,改善

肠道吸收,有利于营养物质的摄取和利用,而且很多健脾药本身就含有多种氨基酸及微量元素锌等^[4],因而有利于骨形成。某些健脾药如人参、山药、甘草等有雌激素样作用^[5]。补肾健脾活血方中的活血药物当归、丹参、山楂等在改善全身血液循环的同时,骨的血流状态也得到改善,从而使骨的营养增多,物质代谢增强,骨基质的合成及骨的矿化活动增强^[6]。这些活血药物既可针对血瘀症状如腰背疼痛治疗,又可兼顾补肾健脾药物补而不滞的作用,山楂既可活血,又可健脾养胃。

TNF- α 是一种 17Kda 的细胞因子,在骨质疏松症中发挥重要作用。TNF- α 作用于破骨细胞形成的所有阶段,可刺激破骨前体细胞的增殖和分化,增加破骨细胞形成,增强成熟破骨细胞活性,刺激成骨细胞分泌 GM-CSF、IL-6、IL-11、PGE₂ 等因子而间接刺激骨吸收,增加 MMP-1、MMP-2、MMP-9 等金属蛋白酶的生成^[7-12]。TNF- α 也可抑制成骨细胞碱性磷酸酶的生成,抑制骨形成和钙化。Ammann 等^[13]将转基因高水平表达可溶 TNF 受体 (STNFR₁-FcIgG₃) 的小鼠和对照组小鼠卵巢切除,发现高水平表达的 STNFR₁-FcIgG₃ 融合蛋白可中和 TNF 的生物学作用,防止卵巢切除后的骨丢失。研究表明, TNF- α 对破骨细胞形成的刺激作用可被雌激素 E₂ 或 IL-6 中和性抗体所抑制,由此证明 TNF- α 通过 IL-6 介导促进骨吸收,同时也表明 E₂ 有抑制 TNF- α 的作用^[14]。TNF- α 作用于成骨细胞,使其 IL-1mRNA 水平及 IL-1 分泌增加,因此 TNF- α 也可通过 IL-1 中介发挥破骨作用^[15]。

本实验结果表明, TNF- α 在去卵巢大鼠骨组织中表达明显增多,直接地证实了 TNF- α 参与骨质疏松症的发病过程。从免疫组化观察可知, TNF- α 主要分布在骨小梁周边的成骨细胞以及骨髓基质细胞。说明 TNF- α 可由成骨细胞产生,这与以往报道的成骨细胞是许多影响骨吸收局部及全身因素的初始作用细胞这一观点相同。实验结果还表明,骨髓基质细胞中 TNF- α 阳性细胞数增多,一般认为破骨细胞来源于骨髓的造血干细胞,成骨细胞来源于骨

髓的基质干细胞,骨髓微环境对成骨细胞和破骨细胞的生长和发育起极其重要作用。骨髓微环境中, TNF- α 增多可调节骨吸收与骨形成。本实验的大剂量组 TNF- α 阳性表达明显减少,说明补肾健脾活血方抑制了骨组织中 TNF- α 的表达,从而抑制了破骨细胞的骨吸收,发挥了治疗骨质疏松症作用。而且大剂量组的此种治疗作用优越于中药对照组、西药对照组和小剂量组。

参考文献

- 1 Bourque WT, Gross M, Hall BK, et al. A histological processing technique that preserves the integrity of calcified tissue (Bone, enamel), yolkly amphibian embryos, and growth factor antigens in skeletal tissue. *J Histochem Cytochem*, 1993, 41:1429-1434.
- 2 柯丽, 陈璐璐, 涂意辉, 等. 得合脉冲电磁场对去卵巢大鼠骨质疏松预防作用的研究. *中国骨质疏松症杂志*, 2001, 7(3):225.
- 3 李青南. 淫羊藿提取液对睾丸大鼠代谢的影响. *中草药*, 1993, 24(12):637.
- 4 危北海. 中医脾胃学说应用研究. 北京: 北京出版社, 1993. 140.
- 5 谢林. 健胃养胃法治疗骨质疏松症初探. *湖南中医学院学报*, 1996, 16(4):8.
- 6 宋献文, 石印玉, 沈培芝, 等. 补肾中药对骨质疏松大鼠骨骼的影响. *中国骨伤*, 1997, 10(5):13-15.
- 7 Eelson DT, Zhang Y, Hannan MT, et al. The effect of postmenopausal estrogen therapy on bone density in elderly women. *N Engl Med*, 1993, 329:11141-11146.
- 8 Gamble-CL. Osteoporosis: drug and nondrug therapies for the patient at risk. *Geriatrics*, 1995, 50(8):39-43.
- 9 Demers LM. New biochemical markers for bone disease: Is it a breakthrough? *Clin Chem*, 1992, 38:155-1.
- 10 Gerrits MI, Thijssen JHH, Rijn HJM. Determination of Pyridinoline and deoxypyridinoline in urine, with special attention to retaining their stability. *Clin Chem*, 1995, 41:571-574.
- 11 Uenelhart D, Gineyts E, Chapay M. Urinary excretion of pyridinium crosslinks: A new marker of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone Miner*, 1990, 8:87-96.
- 12 Panagakos FS, Kumar S. Modulation of protease and their inhibitors in immortal human osteoblast-like cells by tumor necrosis factor-alpha in vitro. *Inflammation*, 1994, 18:243-265.
- 13 Ammann P, Rizzoli R, Bonjour J, et al. Transgenic mice expressing soluble TNF receptor are protected against bone loss caused by estrogen deficiency. *J Clin Invest*, 1997, 99:1699-1703.
- 14 Horowitz MC. Cytokines and estrogen in Bone: antiosteoporotic effects. *Science*, 1993, 260:626-627.
- 15 Pivrotto LA, Cissel DS, Keeting PE. Sex hormones mediated interleukin-1 beta production by human osteoblastic HOBIT cells. *Mol Cell Endocrinol*, 1995, 111:67-74.

(收稿:2002-11-25 修回:2003-03-10 编辑:李为农)