

熟地对去卵巢大鼠骨代谢生化指标及骨密度的影响

盛莉 邢国胜 王毅 谈志龙 姜建石

摘要：目的 研究熟地水煎液对去卵巢大鼠骨代谢生化指标及骨密度的影响，探讨熟地对骨质疏松症大鼠的药理作用。方法 采用去卵巢大鼠模型，每天灌胃 1 g/kg、2 g/kg 及 4 g/kg 3 种剂量的熟地水煎液，3 个月后检测大鼠血清雌二醇、骨钙素、碱性磷酸酶、钙、磷、尿脱氧吡啶啉、钙、磷等生化指标及股骨骨密度的变化，并与模型组、正常对照组、己烯雌酚组比较。结果 与假手术组比较，熟地 3 个剂量组、己烯雌酚组 ALP 和 BGP 均明显升高 ($P < 0.05$)， E_2 含量均低于假手术组 ($P > 0.05$)。与模型组比较，各用药组 ALP、BGP、尿 DPD/Cr、Ca/Cr 含量均低于模型组 ($P < 0.05$)。各用药组大鼠股骨骨密度均较模型组有所升高 ($P < 0.05$)。结论 熟地可抑制骨吸收，延缓去卵巢大鼠骨量丢失，对骨质疏松症有一定的防治作用。

关键词：熟地；骨质疏松；骨密度；骨钙素；脱氧吡啶啉

Effects of *Radix Rehmanniae Preparata* on the biochemical markers of bone metabolism and the bone mineral density in ovariectomized rats SHENG Li, XING Guosheng, WANG Yi, et al. Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China

Abstract : Objective To investigate the effects of *Radix Rehmanniae Preparata* on the biochemical markers of bone metabolism and the bone mineral density and the pharmacology mechanism. **Methods** The model of ovariectomized rats were used. The bone mineral density and the biochemical markers of the model rats including E_2 , BGP, ALP, Ca and P in serum and Ca, P in urine, DPD were measured 3 months after the decoction of *Radix Rehmanniae Preparata* (RR) was given in 1 g/kg, 2 g/kg or 4 g/kg every day, respectively. The results were compared among the model group, sham-operated group and the diethylstilbestrol (DE) group. **Results** The concentration of ALP and BGP in RR and DE groups of each dosage were significantly higher than that of the sham-operated group ($P < 0.05$) and lower than that of the model group ($P < 0.05$), and the concentration of E_2 were lower ($P > 0.05$). The levels of Ca/Cr, DPD and PTH were lower than those of the model group ($P < 0.05$). The bone mineral density in femur was significantly higher in every medication group than that in the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** RR is effective in inhibiting bone resorption, delaying the bone loss in ovariectomized rats and has the preventive and therapeutic effect on osteoporosis.

Key words : *Radix Rehmanniae Preparata* ; Osteoporosis ; Bone Mineral Density ; Osteocalcin ; Deoxypyridinoline

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是严重威胁中老年人健康的一种常见的骨代谢疾病，我国医务工作者通过多年临床实践和实验研究发现许多中药复方都能有效地提高骨质疏松患者和骨质疏松模型动物的骨密度，改善其骨代谢，显示出较好的应用前景，并依此开发出了多种临床有效的纯中药方剂。随着中药现代化的逐步深入，目前越来越多的研究集中

在中药复方的精制与筛选上，因此加强单味中药的研究对简化和规范骨质疏松临床处方用药具有重要作用。本实验采用雌性大鼠去卵巢造成实验性骨质疏松模型，通过对骨密度、骨代谢生化指标、雌激素水平等方面的检测和观察，探讨目前临床防治骨质疏松症最常使用的补肾药熟地^[1]水煎液对去卵巢模型大鼠骨代谢的影响，为其广泛应用于临床提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 :Wistar 大鼠,清洁级,雌性,3 月龄,体重 256 ± 12 g (中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所动物实验中心,动物合格证号:军医动字第 B 98014),二级实验室喂养。

1.1.2 实验药品 :熟地(购于天津市中药饮片厂,产地:河南);己烯雌酚片(天津力生制药股份有限公司,批号:0309009,含量:每片 0.5 mg)。

1.1.3 试剂与仪器 :无机钙试剂盒(Ca,上海复星长征医学科学有限公司,批号:1L 040506);无机磷试剂盒(P,上海复星长征医学科学有限公司,批号:1L 040656);碱性磷酸酶试剂盒(alkaline phosphatase,ALP;Randox 有限公司,批号:32125);肌酐试剂盒(creatinine,Cr,Roche 公司,批号:653943-01);脱氧吡啶啉试剂盒(deoxypyridinoline,DPD;Metra Biosystem 公司,批号:900178);雌二醇放免试剂盒(E_2 ,北京华英生物技术研究所,批号:040812);骨钙素放免试剂盒(ostocalium,BGP;北京华英生物技术研究所,批号:041212)。双能 X 线骨密度仪(QDR-4500 w 型,美国 HOLOGIC 公司);全自动生化分析仪(TBA-30,日本 TOSHIBA 公司);智能放免测量仪(SN-695 型,上海核辐射电仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组 :选取适应性饲养 2 w 后的 3 月龄健康未孕雌性 Wistar 大鼠 30 只(体重 256 ± 12 g)按体重随机分为:假手术组(sham)、模型组、己烯雌酚组、熟地低剂量组、熟地中剂量组、熟地高剂量组 6 组,每组各 5 只。

1.2.2 骨质疏松症实验模型的制备 :大鼠均以 5% 氯胺酮 2.4 mL/kg (120 mg/kg)肌肉注射麻醉后,腹位固定,背部剪毛,碘伏消毒,各组大鼠背部脊柱两侧腹后壁切口约 2 cm,假手术组切除少量脂肪组织后立即关腹,其余各组大鼠均切除双侧卵巢,结扎输卵管,缝合伤口。术后连续 3 d 肌注硫酸庆大霉素注射液抗感染。分笼饲养,每笼 5 只。

1.2.3 实验用药的制备 :将熟地适量加 3 倍量水浸泡后常规煎煮法煎煮 2 次,合并煎煮液,分别浓缩为 250、500、1000 mg 生药/mL 的供试药液(相当于 60 kg 体重人用药量 5、10、20 倍), 4°C 保存备用。

1.2.4 给药方法 :熟地组大鼠每次每只分别灌胃 1 mL 供试药液,己烯雌酚组大鼠每只分别灌胃 1 mL 含有己烯雌酚的混悬液,假手术组和模型组每只鼠

分别灌胃 1 mL 蒸馏水,每日 1 次。各组大鼠自由摄食、饮水。

1.2.5 标本采集 :连续灌胃 12 周后,处死全部大鼠并取材。处死前分别称取各组大鼠体重,并收集清晨尿液。股动脉取血,离心分离血清,尿液和血清均保存在 -80°C 冰箱中备测。处死后分别取双侧股骨,去除软组织,置于 10% 福尔马林液中。分别测定血 Ca、P、ALP、BGP、 E_2 ,尿 Ca、P、Cr、DPD。用 DEXA 骨密度仪测量大鼠双侧股骨骨密度,每屏 5 只。

1.2.6 统计学处理 :用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理,实验结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, LSD 法进行两两组间比较。

2 结果

2.1 各组大鼠血清生化指标的比较

由表 1 可以看出,各组间血 Ca 和 P 的差异无显著性($P > 0.05$)。与假手术组比较,己烯雌酚组和熟地 3 个剂量组 ALP 和 BGP 均明显升高($P < 0.05$),而 E_2 含量均低于假手术组($P > 0.05$)。与模型组比较,各用药组 ALP、BGP 含量均有所降低($P > 0.05$)。熟地 3 个剂量组虽有增高但差异无显著性($P > 0.05$)。去势后大鼠血 E_2 水平明显低于假手术组($P < 0.05$),用药后各组 E_2 水平均高于模型组,己烯雌酚组与模型组比较差异有显著性($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠尿生化指标的比较

由表 2 可以看出,各组大鼠尿 P/Cr 差异无显著性。模型组大鼠尿 Ca/Cr、DPD/Cr 均高于假手术组大鼠($P < 0.05$)。而用药后各组大鼠尿 Ca/Cr 和 DPD/Cr 均低于模型组($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠骨密度的变化

由表 3 可以看出,与假手术组比较,模型组大鼠骨密度明显降低($P < 0.01$)。用药后,与模型组大鼠比较,各组股骨骨密度均有所升高($P < 0.05$)。

3 讨论

绝经后的 OP 病因复杂,目前多数学者认为绝经后雌激素缺乏,骨转换加快,骨吸收大于骨形成是其主要病因。鉴于西药临床应用的种种弊病,国内越来越多的研究者将注意力转移到中药治疗骨质疏松症,其中中药单味药的研究目前是一大热点,也取得了很大的成就,对指导临床用药,促进中药现代

表 1 各组大鼠血清生化指标比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	E ₂ (pg/mL)	BGP(ng/mL)	ALP(U/L)	Ca(mmol/L)	P(mmol/L)
假手术组	5	20.39 ± 5.29	1.48 ± 0.50	81 ± 28	2.58 ± 0.13	2.36 ± 0.47
模型组	5	13.02 ± 3.59 [#]	2.73 ± 0.58 ^{# #}	153 ± 20 ^{# #}	2.42 ± 0.40	2.89 ± 0.43
己烯雌酚组	5	20.06 ± 4.75 [*]	1.76 ± 0.35 ^{**}	110 ± 16 [#]	2.65 ± 0.32	2.29 ± 0.58
熟地高剂量组	5	15.34 ± 3.33	2.06 ± 0.87 ^{# #}	110 ± 26 [#]	2.50 ± 0.21	2.44 ± 0.30
熟地中剂量组	5	14.03 ± 4.12	2.36 ± 0.55 ^{# #}	126 ± 41 [#]	2.46 ± 0.12	2.56 ± 0.30
熟地低剂量组	5	13.97 ± 4.26	2.77 ± 0.72 ^{# #}	132 ± 31 [#]	2.50 ± 0.18	2.48 ± 0.22

注 :与模型组比较^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与假手术组比较[#] $P < 0.05$,^{# #} $P < 0.01$

表 2 各组大鼠尿生化指标比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	DPD/Cr ($\mu\text{mol/L/mmole/L}$)	Ca/Cr (mmol/L/mmole/L)	P/Cr (mmol/L/mmole/L)
假手术组	5	0.43 ± 0.12	0.15 ± 0.05	5.44 ± 1.97
模型组	5	0.64 ± 0.20 [#]	0.38 ± 0.12 ^{# #}	5.73 ± 1.61
己烯雌酚组	5	0.24 ± 0.08	0.13 ± 0.04 ^{**}	5.97 ± 1.95
熟地高剂量组	5	0.46 ± 0.10	0.20 ± 0.06 ^{**}	5.72 ± 1.68
熟地中剂量组	5	0.49 ± 0.20	0.22 ± 0.05 ^{**}	5.71 ± 1.76
熟地低剂量组	5	0.56 ± 0.14	0.27 ± 0.08 [*]	5.77 ± 1.74

注 :与模型组比较^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与假手术组比较[#] $P < 0.05$,^{# #} $P < 0.01$

表 3 各组大鼠股骨骨密度比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	BMD(g/cm^2)
假手术组	5	0.049 ± 0.007
模型组	5	0.032 ± 0.007 ^{# #}
己烯雌酚组	5	0.047 ± 0.007 [*]
熟地高剂量组	5	0.047 ± 0.003 ^{**}
熟地中剂量组	5	0.047 ± 0.011 ^{**}
熟地低剂量组	5	0.044 ± 0.007 [*]

注 :与模型组比较^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与假手术组比较^{# #} $P < 0.01$

化 ,进一步揭示中药治疗原发性骨质疏松的作用机理有重要意义。目前对临床治疗骨质疏松症应用最多的一味补肾药物熟地^[2]防治骨质疏松症作用机理的研究还相对较少 ;同时 ,鉴于临床上对骨质疏松症的诊断主要以骨密度值为依据 ,而反映骨转化状态还需以一些血或尿中有关骨代谢生化指标提供一些骨形成或骨吸收的信息 ,故本实验主要从骨密度与骨代谢生化指标两方面来探讨熟地水煎液对切除卵巢大鼠骨代谢的影响。反映骨形成的代谢指标中 ,血清总 ALP、骨碱性磷酸酶(BALP)和 BGP 是 3 个最常用的指标 ,而尿 Ca/Cr、DPD/Cr 是骨吸收的常用指标^[3]。有作者提出熟地能通过提高雌性小鼠血清雌二醇的浓度 ,对抗老化进程中成骨细胞孕激素受体含量的下降来防止骨质疏松的发生^[4] ,本实验观察了每天 1g/kg、2g/kg 及 4g/kg 3 个剂量的熟地水煎液 ,从子宫系数、子宫病理表现及血清 E₂ 水平来看熟地直接通过提高雌激素及雌激素受体水平来发挥效应的表现并不十分突出 ,反映出熟地对去卵巢大鼠骨代谢的作用可能有异于淫羊藿、葛根等补肾中

药的可以直接提高去势大鼠血清雌激素水平的作用^[5]。另外 ,雌性大鼠去势后 ,血清 ALP、BGP、尿 DPD/Cr、Ca/Cr 均明显升高 ,而服用熟地 3 个月干预后 ,与己烯雌酚干预效果一样可以抑制这种升高趋势 ,间接反映了熟地对骨吸收的抑制作用 ,其具体的机制正在进一步探讨。

本实验结果表明 ,熟地水煎液可有效地防治大鼠去势后骨量的丢失 ,通过骨代谢生化指标变化情况 ,显示熟地可通过抑制骨吸收来发挥防治骨质疏松症的作用。而熟地在诱发生殖系统组织增生方面的副作用远较雌激素为轻 ,其中有关的确切机制尚不明确 ,还有待于进一步的研究与探讨。另外 ,本实验 3 个剂量熟地水煎液对大鼠骨密度的影响没有显示出明显的量效关系 ,中剂量组大鼠的骨密度与高剂量组基本相同 ,而高剂量组用药量已经相当于 60kg 体重人的 20 倍 ,可能单味中药在体内对已经丢失骨量的改善仍具有一定的局限性。可以看出单味中药对骨代谢的调节作用可能仅仅作用于机体某些环节 ,与复方相比存在很大不同 ,不同功效的中药可以作用在不同的环节而预防和治疗骨质疏松 ,通过加强不同功效单味中药对骨代谢的研究 ,有效合理组方 ,将会为骨代谢疾病的药物治疗开辟新的选择空间。

【 参 考 文 献 】

[1] Tan Qingwu. Analysis for drugs-selecting on clinical empirical formula in the treatment of osteoporosis. TCM Res ,2004 ,17(3) :2-5(in Chinese).
[2] Zhao Yong. The study of Kidney-Nourishing and Spleen-Invigorating chinese medicine on bone biomechanics in the animal model of postmenopausal osteoporosis. Journal of Sichuan of Traditional Chinese Medicine 2003 21(6) :19-21(in Chinese).
[3] Yang Weiming ,Shao Bin. Biochemical markers of bone metabolism and osteoporosis. Chin J Osteoporos , 2004 ,10(1) :118-121(in Chinese).
[4] Gao Zhiping. ER、PR are up-regulated by rehmannia in aging female mice. Journal of Shanxi College of Traditional Chinese Medicine , 2000 ,1(4) :1-3(in Chinese).
[5] Huang Yanling , Shi Fengying. Effects of puerarin on the bone mineral density and biochemical markers of bone metabolism in ovariectomized rats. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation , 2004 ,8(12) :2307-2309(in Chinese).

(收稿日期 2005-12-22)