

滋补肾阴方与温补肾阳方对卵巢切除所致骨质疏松大鼠 IL-1 和 IL-6 活性的影响^{*}

鞠大宏 吕爱平 张春英 吴 皓 贾红伟 张丽坤

摘要 目的:对比观察滋补肾阴方与温补肾阳方对卵巢切除所致骨质疏松大鼠白细胞介素-1(IL-1)和白细胞介素-6(IL-6)活性的影响。方法:将 55 只雌性大鼠随机分为正常对照组、假手术组、卵巢切除组、滋阴组和补阳组。于卵巢切除 1 周后,给大鼠灌胃给药,连续给药 3 个月。采用骨组织形态计量学方法对大鼠胫骨进行形态计量,分别采用小鼠胸腺细胞检测法和 IL-6 依赖株细胞增殖反应检测法测定 IL-1 和 IL-6 的活性。结果:卵巢切除 3 个月后,大鼠胫骨骨小梁体积百分比(TBV%)明显降低,骨小梁吸收表面百分比(TRS%)和骨小梁形成表面百分比(TFS%)皆显著增高。同时,IL-1 和 IL-6 活性亦显著增高。给大鼠灌服滋补肾阴方和温补肾阳方后,均能使上述指标发生逆转,但程度有所不同,温补肾阳方的效果要明显优于滋补肾阴方。结论:温补肾阳方对 IL-1、IL-6 活性的抑制作用明显强于滋补肾阴方,这是其对卵巢切除所致大鼠骨质疏松的预防作用之所以优于滋补肾阴方的机理之一。

关键词 滋补肾阴方 温补肾阳方 白细胞介素-1 白细胞介素-6 骨质疏松

Effects of Nourishing Shen-Yin Recipe and Warming Recuperating Shen-Yang Recipe on Interleukin-1 and Interleukin-6 Activity in Ovariectomy Induced Osteoporosis Rats JU Da-hong, LU Ai-ping, ZHANG Chun-ying, et al *Institute of Basic Theory, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100700)*

Objective: To compare the effects of the recipes for nourishing Shen-yin (NSY) and for warming recuperating Shen-yang (WRSY) on the activity of interleukin-1 (IL-1) and interleukin-6 (IL-6) in ovariectomy-induced osteoporosis rats. **Methods:** Fifty-five female rats were randomly divided into five groups: the control, the sham operation, the ovariectomy, the ovariectomy plus NSY and the ovariectomy plus WRSY group. The medication was starting from one week after operation and lasted continuously for 3 months. The proximal tibia of rats were analyzed with bone histomorphometry, the activity of IL-1 was detected with mouse thymocyte assay and the activity of IL-6 was detected with IL-6 dependence cell proliferation assay. **Results:** Three months after ovariectomy, the percentage of trabeculae bone volume (TBV%) of tibia in rats was markedly reduced, but the percentage of trabeculae absorption surface (TRS%) and trabeculae formation surface (TFS%) significantly increased, and the activity of IL-1 and IL-6 increased obviously. These abnormal changes could be reversed to different degree by NSY or WRSY, but the effect of the latter was superior to that of the former. **Conclusion:** The inhibitory effect of WRSY on IL-1 and IL-6 activity was significantly better than that of NSY, which is one of the mechanisms of its superiority in preventing osteoporosis induced by ovariectomy in rats.

Key words nourishing Shen-yin recipe, warming recuperating Shen-yang, interleukin-1, interleukin-6, osteoporosis

大量的研究表明,白细胞介素-1(IL-1)和白细胞介素-6(IL-6)是强有力的骨吸收刺激因子^[1~3],在绝经后骨质疏松发生过程中起着非常重要的作用。我们以往的研究发现,滋补肾阴方和温补肾阳方对卵巢切除所

致的大鼠骨质疏松均有一定的治疗作用^[4,5]。那么,它们治疗作用之间是否存在差异?若有,产生这种差异的机理何在?为此,本实验在对比观察这两方对卵巢切除所致大鼠骨质疏松作用的基础上,着重对比观察它们对 IL-1 和 IL-6 活性的影响。

材料与方法

1 动物 选用雌性 Wistar 大鼠 55 只,体重 200~240g。由中国医学科学院动物研究所提供,本所

^{*} 国家博士后科学基金资助课题(No. 4556)

中国中医研究院基础理论研究所(北京 100700)

通讯作者:鞠大宏, Tel: 010 - 64014411 - 2564, Fax: 010 -

64013896, E-mail: judahong@Sohu.com

动物室饲养。适应性喂养 2 周后,用于实验。

2 分组及模型制作 将 55 只大鼠随机分为 5 组,即正常对照组(10 只)、假手术组(10 只)、卵巢切除组(OVX 组,11 只)、滋阴组(12 只)、补阳组(12 只)。除正常对照组及假手术组外,按文献^[4]的方法摘除大鼠双侧卵巢。滋阴组和补阳组在卵巢摘除 1 周后,开始给大鼠灌服给药。滋阴组给大鼠灌服按左归丸(滋补肾阴方)配方制成的水煎剂,生药含量为 1.05g/ml,每天灌服 0.7ml/100g 体重(相当于服生药 0.735g/100g 体重);补阳组给大鼠灌服自拟的温补肾阳方水煎剂,方药主要由鹿角胶、淫羊藿等组成,生药含量为 0.78g/ml,每天灌服 0.7ml/100g 体重(相当于服生药 0.546g/100g 体重),以上给药,1 天 1 次,连续 6 天,休息 1 天后,再连续灌服 6 天,如此至 3 个月止;假手术组手术同模型制作,只是切除小块脂肪组织,但不摘除卵巢。OVX 组、假手术组和正常对照组给大鼠灌服等容积的蒸馏水。在给药 3 个月后,将各组大鼠迅速断头处死,立即无菌取脾,用于 IL-1、IL-6 活性的测定。剥离胫骨,用 70% 乙醇固定,用于骨组织形态计量学指标的测定。

3 观察项目及检测方法

3.1 骨组织形态计量学指标的测定 取大鼠左侧胫骨近端 1/3,去除软组织,并磨去左右两侧部分皮质。按照刘绍泉方法^[6]进行塑料包埋。在 Reichert-Jung2040 切片机(德国产)上,用钨钢刀切出 5 μ m 的纵向不脱钙骨切片。将切片先置于甲基丙烯酸甲酯中 2h,二甲苯中两次各 1h,溶掉树脂,梯度乙醇脱水,进行甲苯胺蓝染色。按照章明放方法^[7]进行形态计量:骨小梁体积百分比(TBV%):骨小梁体积占被测骨髓腔总体积的百分比,是骨量水平的主要标志;骨小梁吸收表面百分比(TRS%):不规则、凹凸不平的骨小梁表面占骨小梁表面的百分比;骨小梁形成表面百分比(TFS%):有成骨细胞被覆的类骨质表面占骨小梁表面的百分比。

3.2 IL-1 和 IL-6 活性的测定 无菌取脾,用 200 目不锈钢网分离脾单个核细胞,溶解红细胞,离心去上清,用 RPMI 1640 液重复离心洗涤两次(1500r/min,10min,共 2 次)。用含 10% 胎牛血清、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、LPS 10 μ g/ml 的 RPMI 1640 培养液调细胞浓度为 2×10^6 /ml,加入 24 孔培养板,每孔 2ml。置 37℃ 5% CO₂ 培养箱(TOKIWA,日本)48h,收集上清, -20℃ 冻存待测。

3.2.1 IL-1 活性检测 采用小鼠胸腺细胞检测法^[8]。拉颈处死小鼠,取胸腺置含 RPMI 1640 全培养

基中。将胸腺剪碎,无菌纱布过滤,制成单个核细胞悬液,离心去上清。用 Hank's 液 1500r/min 20min 离心洗涤细胞 2 次,然后悬于 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 中,使细胞浓度为 1.5×10^6 /ml。将诱生上清 8 倍稀释后加入 96 孔培养板中,每孔 100 μ l,设 3 个复孔,并包括阴性对照、培养液对照及有丝分裂原对照。将 ConA 混入细胞悬液,分别加至 96 孔板中,每孔 100 μ l,ConA 终浓度为 1 μ g/ml。将培养板置 5% CO₂, 37℃ 孵育 68h;加入 MTT (5mg/ml,溶于 0.01mol/L, pH7.4 的 PBS) 20 μ l,继续培养至 72h。轻轻吸弃培养上清 150 μ l,每孔加入二甲基亚砷(DMSO) 100 μ l。微量混合器震荡 30min,静置 10min,酶标仪(SLT) 492nm 处测 OD 值,以表示 IL-1 活性。

3.2.2 IL-6 活性检测 采用 IL-6 依赖株细胞增殖反应测定法^[9]。取传代培养的 7TD₁ 细胞株,以大量 Hank's 液洗两遍(1750r/min,20min,共 2 次)。用含 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 调细胞浓度至 8×10^4 /ml,加入 96 孔平底培养板中,每孔 90 μ l。取 8 倍稀释的诱生上清 10 μ l(已做过预试,以 8 倍稀释的培养上清检测较为敏感)加入含 7TD₁ 细胞的培养板中,每个标本设 3 个复孔,并设阴性对照和阳性对照孔。5% CO₂ 37℃ 培养 68h,加入 MTT 20 μ l(5mg/ml),继续培养 4h,轻轻吸取上清 80 μ l,每孔加入 DMSO 100 μ l。微量混合器震荡 30min,静置 10min,酶标仪 492nm 处测 OD 值,以表示 IL-6 活性水平。

4 统计学方法 实验结果皆以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 q 检验。

结 果

1 滋补肾阴方与温补肾阳方对去卵巢大鼠胫骨 TBV%、TRS% 和 TFS% 的影响 见表 1。OVX 组与假手术组比较,作为胫骨小梁骨量标志的 TBV% 显著降低。与 OVX 组比较,滋阴组和补阳组的 TBV% 均明显增加,而与假手术组比较,滋阴组明显降低,补阳组差异无显著性。与滋阴组比较,补阳组的 TBV% 明显增高。OVX 组与假手术组比较,代表骨吸收参数的 TRS% 和代表骨形成参数的 TFS% 均显著增加。滋阴组和补阳组与 OVX 组比较,TRS%、TFS% 均显著降低,但与假手术组比较,滋阴组的均明显增高,而补阳组则无显著性变化。与滋阴组比较,补阳组的 TRS%、TFS% 皆明显降低。

2 滋补肾阴方与温补肾阳方对去卵巢大鼠 IL-1 和 IL-6 活性的影响 OVX 组与假手术组比较,IL-1、

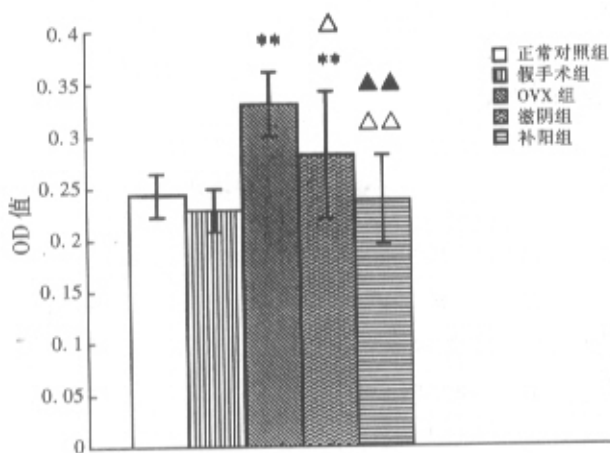
表 1 各组大鼠胫骨 TBV%、TRS% 和 TFS% 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TBV (%)	TRS (%)	TFS (%)
正常对照	10	31.77 ± 4.60	4.05 ± 1.72	8.37 ± 2.30
假手术	10	28.83 ± 5.97	4.22 ± 1.74	9.37 ± 2.39
OVX	11	15.85 ± 3.91 **	8.85 ± 2.10 **	18.19 ± 4.50 **
滋阴	12	22.54 ± 6.34 *△	6.68 ± 2.08 *△	13.03 ± 2.37 *△△
补阳	12	29.45 ± 7.20 △△▲	4.64 ± 1.89 △△▲	10.24 ± 3.01 △△▲

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 OVX 组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与滋阴组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$

IL-6 活性均显著增高。滋阴组和补阳组与 OVX 组比较,IL-1、IL-6 活性均显著降低,而与假手术组比较,滋阴组均明显增高,补阳组则无显著性变化。补阳组的 IL-1、IL-6 活性较滋阴组均明显降低。见图 1、2。

假手术组与正常对照组比较,以上各项指标均未发生显著性变化,从而排除了手术本身对实验的影响。



注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与 OVX 组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与滋阴组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 图 2 同

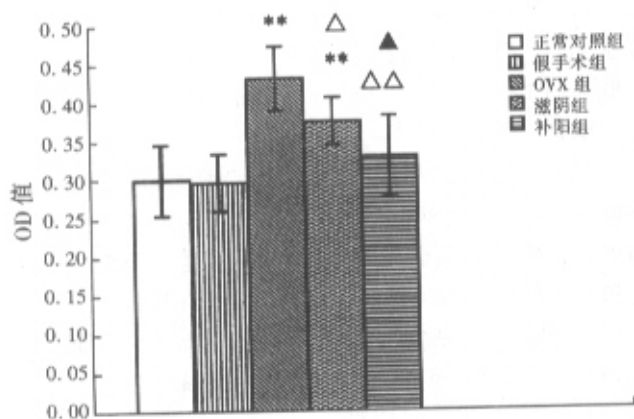


图 2 各组大鼠 IL-6 活性的变化

万方数据

讨 论

骨质疏松症是中老年人,尤其是绝经后妇女的一种常见病、多发病,属于中医学的“骨痹”或“骨痿”范畴。中医学理论认为,肾藏精生髓主骨,肾精充实,则骨髓化生有源,骨得其养,则坚固有力;若肾精亏虚,则骨髓化生乏源,骨失其养,就会出现骨脆易折、腰背疼痛等症,这也就是现代医学所说的骨质疏松症。由于肾精亏虚是骨质疏松症发生的根本,所以对其的防治就应以补肾为基本大法。已有大量的临床报道,用补肾法治疗骨质疏松症,不仅能明显地改善肾虚症状,而且还能使骨密度明显提高^[10,11]。补肾法包涵有温补肾阳和滋补肾阴两法。本实验结果显示,大鼠切除卵巢 3 个月后,大鼠胫骨 TBV% 显著降低,TRS% 和 TFS% 皆显著增高,表明卵巢切除所造成的是一种骨吸收大于骨形成的高转换型骨质疏松模型。这一结果与大量的国内外文献报道相一致^[12,13]。给大鼠灌服滋补肾阴方和温补肾阳方 3 个月后,均能使上述指标发生逆转。温补肾阳方与滋补肾阴方相比,前者的效果要明显优于后者。

本实验结果显示,大鼠切除卵巢后,IL-1 和 IL-6 活性均明显增高,提示雌激素对 IL-1 和 IL-6 的活性具有抑制作用。已有许多实验证实了这一点^[14,15]。Gliulio 等^[16]观察了卵巢切除妇女外周血单个核细胞 IL-1 和 IL-6 水平的变化,发现也都明显提高。此外,有人发现卵巢切除也能使骨髓基质细胞 IL-1 和 IL-6 分泌增加^[1,2]。这些因雌激素水平下降所致的 IL-1 和 IL-6 活性或含量的增高对于骨代谢有着极为重要的影响。因为 IL-1 和 IL-6 是强有力的骨吸收刺激因子,大量的体内外实验均证明了一点。Kimble 等^[1]发现在给 OVX 大鼠皮下注射 IL-1 受体拮抗剂 (IL-1ra) 能有效地防止因雌激素缺乏所致的骨量减少;Jilka 等^[2]也发现给小鼠注射 IL-6 单克隆抗体可有效地阻止因雌激素含量减少所致的破骨细胞的增多。Manolagas 等^[3]通过体外研究发现,IL-1 与 IL-6 可协同刺激破骨细胞聚集,并且使已被⁴⁵Ca 标记的胎鼠骨释放出⁴⁵Ca 和诱发骨质的吸收。IL-6 可促进骨吸收的主要机理是刺激破骨细胞前体细胞的生成和分化,并能使破骨细胞的活性增强,数量增多^[2]。有研究表明,在成骨细胞上有 IL-1 受体^[17],IL-1 与其受体结合而对其发生作用,使成骨细胞分泌 IL-6、集落刺激因子、前列腺素 E₂ (PGE₂) 等因子,以旁分泌的形式对破骨细胞产生作用。IL-6 和集落刺激因子可促进破骨细胞的前体细胞分化成熟,并提高已成熟的破骨细胞

的活性, PGE_2 可协同 IL-1 促进骨的吸收^[2,18,19]。在正常情况下, 雌激素除了本身对骨吸收有抑制作用外, 还对 IL-1、IL-6 等骨吸收刺激因子也有一定的抑制作用, 从而使骨吸收与骨形成维持在相对的平衡状态, 使骨进行着正常的代谢。雌激素缺乏就可使这些抑制遭到一定程度的解除, 使 IL-1、IL-6 等骨吸收刺激因子的活性异常增高, 由此造成骨的过度吸收, 骨量的大量丢失, 进而导致骨质疏松的发生。

本实验结果显示, 温补肾阳方和滋补肾阴方皆能使 OVX 大鼠 IL-1 和 IL-6 的活性显著降低, 但程度上有所不同。前者的效果要明显优于后者。这是温补肾阳方对卵巢切除所致大鼠骨质疏松症的预防作用之所以优于滋补肾阴方的机理之一。

参 考 文 献

- Kimble RB, Vannice JL, Bloedow DC, et al. Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 1994;93:1959—1964.
- Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, et al. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 1992;257:88—91.
- Manolagas SC, Jilka RL. Cytokines hematopoiesis osteoclastogenesis and estrogens. *Calcif Tissue Int* 1992;50:199—205.
- 鞠大宏, 张春英, 王安民, 等. 温补肾阳方对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗作用. *中国中医基础医学杂志* 2000;6(4):29—32.
- 鞠大宏, 张春英, 王安民, 等. 左归丸对去卵巢所致大鼠骨质疏松症的治疗作用. *中国中医基础医学杂志* 2001;7(3):17—19.
- 刘绍泉. 塑料包埋不脱钙骨组织玻璃刀切片技术. *中华病理学杂志* 1996;25(1):49.
- 章明放, 张乃鑫, 谭郁彬. 运动对雌性大鼠去势后骨质疏松

- 症的作用. *中华骨科杂志* 1994;14(6):365—369.
- 杨廷彬, 尹学含. 实用免疫学. 长春: 长春出版社, 1994:592.
 - 李求是, 代为民, 任福林, 等. 手术应激对血清 IL-6 的影响及消炎痛的治疗作用. *中国免疫学杂志* 1991;7(4):247—249.
 - 梁立, 江正玉, 刘中厚, 等. 补肾中药治疗骨质疏松症临床观察. *中医杂志* 1992;33(11):36—37.
 - 刘勇, 刘振义. 壮骨补肾法治疗骨质疏松症 54 例. *北京中医* 1993(1):28—29.
 - Wronski TJ. Histologic evidence for osteopenia increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 1986;7:119—123.
 - 李洪洋, 谭建三, 刘宏伟, 等. 去势雌鼠骨质疏松模型研究. *现代预防医学* 1991;19(1):5—7.
 - Mark C, Horowitz Z. Cytokines and estrogen in bone: Antioestrogenic effects. *Science* 1993;260:626—630.
 - Passeri G, Girasole G, Markus T, et al. 17-estradiol regulates IL-6 production and osteoclast development in murine calvaria cell cultures. *J Bone Miner Res* 1991;6:263—269.
 - Giulio P, Guiseppeina B, Mario P, et al. Spontaneous release of IL-1 and IL-6 by peripheral blood mononuclear cells after oophorectomy. *Clin Science* 1992;83:503—508.
 - Bird TA, Saklatvala J. Identification of a common class of high affinity receptors for both types of porcine interleukin-1 on connective tissue cells. *Nature* 1986;324:263—267.
 - Evans DB, Buning RA, Russell RGG. The effect of recombinant human interleukin-1 beta on cellular proliferation and the production of prostaglandin E2, plasminogen activator osteocalcin and alkaline phosphatase by osteoblast-like cells derived from human bone. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;166:208—214.
 - Carrett IR, Mundy GR. Relationship between interleukin-1 and prostaglandins in resorbing neonatal calvaria. *J Bone Miner Res* 1989;4:789—795.

(收稿 2002-07-05 修回 2002-11-07)

第七次全国中西医结合虚证与老年病学术会议征文通知

根据中国中西医结合学会 2003 年学术活动计划安排, 拟于 2003 年 8 月中旬在甘肃省敦煌市召开第七次全国中西医结合虚证与老年病学术会议, 现将征文事宜通知如下。

1 征文内容 (1) 虚证、老年病及内科的中医、西医、中西医结合基础研究、临床报道、药物研究、实验研究。(2) 虚证、老年病及内科的疑难病例研究和报告。(3) 虚证、老年病及内科的名老中医经验整理。(4) 虚证、老年病及内科的古今文献研究。(5) 虚证、老年病及内科的临床护理经验总结。

2 征文要求 (1) 来稿必须实事求是, 有科学性。论文请加盖单位公章。(2) 全文一般在 5 000 字以内, 摘要 800 字以内。“摘要”应以目的、方法、结果、结论顺序表达, 包括标题、署名、单位、邮政编码, 单独打印一页。请寄全文、摘要各 1 份和录入的 3.5 寸磁盘(用 word 录入)1 张。请自留底稿, 恕不退稿。(3) 截稿日期 2003 年 5 月 30 日(以邮戳为准)。(4) 论文请寄: 甘肃省兰州市七里河区安西路 358 号, 甘肃省中医院老年病科, 刘国安、李妍怡, 邮政编码: 730050, 联系电话: 0931—2335211—2231, 3325280。