

二仙汤对去卵巢大鼠骨质疏松的作用

年 华¹,徐玲玲¹,马明华²,张巧艳^{3*},秦路平³,郑汉臣³

(1.上海中医药大学岳阳中西医结合医院药剂科,上海 200437;2.上海新兴医药股份有限公司,上海 200135;3.第二军医大学药学院生药学教研室,上海 200433)

[摘要] **目的:**研究二仙汤对去卵巢大鼠骨质疏松症的作用。**方法:**去卵巢诱导大鼠骨质疏松症,12周后,取胫骨近端行不脱钙切片进行骨组织形态计量学分析;双能X射线骨密度仪测量股骨骨密度。**结果:**二仙汤能显著增加骨小梁面积百分比和骨小梁厚度($P<0.01$),减少骨小梁分离度($P<0.05$);增加骨形成参数:矿化沉积率(MAR)、骨形成率(BFR/BS、BFR/BV、BFR/TV)($P<0.05$, $P<0.01$);减少破骨细胞数($P<0.01$)且显著增加去卵巢大鼠股骨骨密度($P<0.05$)。**结论:**二仙汤对去卵巢大鼠骨质疏松有保护作用,主要是通过促进骨形成、抑制骨吸收、提高骨密度。

[关键词] 二仙汤;骨质疏松;卵巢切除术;骨密度;骨形态计量学

[中图分类号] R 681.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)03-0277-04

Protective effect of *Er-xian* decoction on ovariectomy-induced osteoporosis in rats

NIAN Hua¹, XU Ling-ling¹, MA Ming-hua², ZHANG Qiao-yan^{3*}, QIN Lu-ping³, ZHENG Han-chen³ (1. Department of Pharmacy, Yueyang Hospital of Chinese Integrative Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 2. Shanghai Xinxing Pharmaceutical Co. Ltd, Shanghai 200135; 3. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the protective effects of *Er-xian* decoction on ovariectomy-induced osteoporosis in rats. **Methods:** The osteoporosis model was induced by ovariectomy in rats. Twelve weeks later, the undecalcified longitudinal proximal tibial metaphysical sections were made and stained for the bone histomorphometric analysis. Bone density of femur metaphysis was determined by dual-energy X-ray absorptiometry. **Results:** *Er-xian* decoction significantly increased trabecular area and trabecular thickness ($P<0.01$) and decreased trabecular separation ($P<0.05$). The parameters of bone formation of rats, such as MAR, BFR/BS, BFR/BV, and BFR/TV, were increased significantly after *Er-xian* decoction treatment ($P<0.05$, $P<0.01$). Moreover, *Er-xian* decoction obviously reduced osteoclast number ($P<0.01$) and enhanced bone density of femur metaphysis in ovariectomized rats ($P<0.05$). **Conclusion:** *Er-xian* decoction has antiosteoporotic effects on ovariectomized rats by promoting bone formation, increasing bone density, and inhibiting bone resorption.

[KEY WORDS] *Er-xian* decoction; osteoporosis; ovariectomy; bone density; bone histomorphometry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(3): 277-280]

绝经后骨质疏松症是一种影响中老年妇女身心健康的代谢性骨疾病。其特征是骨量减少,骨组织的显微结构改变,骨折的危险性增大。补肾健脾是祖国医学防治此病的思路之一^[1-2]。近年来,在“肾主骨”中医理论指导下,许多学者应用补肾壮骨法研制出了疗效肯定、副作用小的中药制剂。二仙汤(EXD)是张伯讷教授20世纪50年代创制的著名方剂,全方由仙茅、淫羊藿、黄柏、巴戟天、当归和知母组成,主要用于治疗更年期综合征和延缓衰老^[3],在骨质疏松症的防治方面也显示了较好的效果,临床应用40余年,疗效确切,载入多部中医方剂学著作^[4-5]。本文通过去卵巢大鼠骨质疏松模型,用骨组织形态计量学的方法和骨密度等方法,研究了二仙汤对去卵巢大鼠骨质疏松的治疗作用,探讨其作用

机制,以期为临床更好的使用该药提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 药品及试剂 钙黄绿素、盐酸四环素、Goldners 染色试剂均购自Sigma(美国);甲基丙烯酸甲酯购自北京化工厂;邻苯二甲酸二丁酯购自天津市化学试剂一厂;过氧化苯甲酰购自广州化学试剂厂;氯胺T购自中国医药集团上海化学试剂公司;对二甲替氨基苯甲醛购自广州化学试剂厂;尼尔雌醇:上

[基金项目] 国家自然科学基金(90209043)。Supported by National Natural Science Foundation of China (90209043)。

[作者简介] 年 华,博士,药师。

E-mail:jackynian@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail:jackynian@sohu.com

海第十二制药厂。二仙汤为第二军医大学药学院生药学教研室自制(淫羊藿、仙茅、巴戟天、黄柏、知母、当归六味药材各 250 g,沸水煎煮、浓缩后制成,相当于 1 g 生药量/ml)。

1.2 仪器 低速锯(Buehler LTD USA);硬组织切片(德国 Leica 2155);碳化钨钢刀(德国 Leica 公司产品);自动化图像数字化分析仪包括光镜和荧光显微镜(Nikon,日本);骨组织形态计量学测量软件(KSS Scientific Consultants, UT USA);双能 X 射线骨密度仪(美国 Lunar 公司骨密度分析系统)

1.3 动物 3 个月龄雌性 SD 大鼠,体质量 200~220 g,由中国科学院上海实验动物中心提供(动物合格证号:SL050216)。

1.4 实验方法 将大鼠随机分为 5 组,每组 10 只,包括假手术组(Sham)、去卵巢组(OVX)、尼尔雌醇(nylestriol)组、二仙汤组(EXD,3 g/kg 和 6 g/kg)。各组大鼠在 2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉下,背部肋下切开皮肤、肌肉,暴露腹腔,找出双侧卵巢,Sham 组保留,其余各组切除。术后所有动物在 24~28℃,通风良好的条件下饲养,每周称体质量 1 次。治疗从术后第 3 天开始,Sham 组和 OVX 组灌胃生理盐水,5 ml/kg,每周 6 次;尼尔雌醇组灌胃 0.2 g/L 的尼尔雌醇,5 ml/kg(1 mg/kg),每周 1 次;二仙汤组灌胃汤剂,用量相当于 3、6 g(生药量)/kg,折算为成人剂量的 6 倍,每周 6 次,连续给药 12 周。所有大鼠在处死前第 14、13 天分别皮下注射盐酸四环素 25 mg/kg,作为第 1 次荧光标记;处死前第 4、3 天分别皮下注射 calcein 10 mg/kg,作为第 2 次荧光标记。给药 12 周后,将大鼠断头处死。分别剔除左侧股骨和右侧胫骨,剥离骨组织后分别保存。

1.5 骨密度及骨形态计量学检测

1.5.1 骨密度的检测 将分离肌肉组织后的大鼠左侧股骨,用缓冲液纱布包裹后保存于-80℃。检

测时采用小动物扫描模式于双能 X 射线骨密度仪检测大鼠股骨干骺端 10 mm 区域的骨密度(BMD)。

1.5.2 骨形态计量学参数的检测 按文献^[6-7]的方法,将大鼠右侧胫骨在切片机上用特制碳化钨钢刀切成 10 μm 和 5 μm 厚的切片。其中,10 μm 切片用于测量静态参数和反映骨形成的动态参数,5 μm 切片经 Goldners 染色后用于测量破骨细胞数量和破骨细胞周长百分数等反映骨吸收的参数。用半自动图像数字化分析仪,包括光镜和荧光显微镜、数字化板、电脑和形态学程序“Stereology”体视学软件(美国),测量大鼠胫骨距骺线下 1 mm 处至远端 4 mm 范围内的骨组织的各参数。其测算参数之含义和计算公式见文献^[8]。

1.6 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 对去卵巢大鼠胫骨干骺端静态骨形态计量学参数的影响 由表 1 可见,OVX 组与 Sham 组比较,骨量明显减少,如骨小梁面积百分数下降 77.8%($P < 0.01$),骨小梁厚度下降 37.8%($P < 0.05$),骨小梁数目下降 62%($P < 0.05$),骨小梁分离度增加 4.7 倍($P < 0.01$);6 g/kg EXD 与 OVX 组比较,骨量明显恢复,骨小梁面积百分数增加 292%($P < 0.01$),骨小梁厚度增加 306%($P < 0.01$),骨小梁分离度减少 48.9%($P < 0.05$),而骨小梁数目未见明显改变,表现出明显的促进骨小梁生长的作用,同 3 g/kg 组相比骨小梁面积百分数和骨小梁厚度都明显增加($P < 0.01$)。尼尔雌醇能提高去卵巢大鼠骨小梁面积百分数($P < 0.05$,表 1)和骨小梁数目($P < 0.05$),使骨小梁分离度减少($P < 0.01$),表现出一定的骨保护作用。

表 1 二仙汤对大鼠胫骨干骺端松质骨静态形态学参数的影响

Tab 1 Effects of *Er-xian* decoction on static parameters of proximal tibial cancellous bone histomorphometry in rats

(n=10, $\bar{x} \pm s$)

Group	Percent of trabecular area(%)	Trabecular thickness(d/μm)	Trabecular number(mm ⁻¹)	Trabecular separation(l/μm)
Sham	23.97±2.94**	70.11±9.84*	3.41±0.31*	222.31±22.83**
OVX	5.32±1.09	43.62±1.41	1.31±0.22	1 267.41±127.61
Nylestriol+OVX	13.57±2.27*	57.42±4.82	2.44±0.31*	372.52±52.14**
3 g/kg EXD+OVX	7.05±3.33	58.84±5.06	1.25±0.56	632.52±111.41*
6 g/kg EXD+OVX	20.86±2.03**△△	176.91±29.42**△△	1.32±0.22	647.63±201.72*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs OVX group; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs 3 g/kg EXD group; EXD: *Er-xian* decoction; OVX: Ovariectomized

2.2 对去卵巢大鼠胫骨干骺端动态骨形态计量学参数的影响 结果表明,同 Sham 比较 OVX 能使骨形成参数明显增加,表现出明显的骨高转换现象。如荧光标记周长百分率增加 47.6%($P<0.05$,表 2),骨矿化沉积率(MAR)增加 55%($P<0.05$),骨形成率/周长(BFR/BS)增加 138%($P<0.01$),骨形成率/小梁面积(BFR/BV)增加 184%($P<0.01$),骨形成率/组织参数(BFR/TV)无显著差异;同去卵

巢组相比 6 g/kg 二仙汤能显著促进去卵巢后骨形成参数的增加,MAR、BFR/BS、BFR/BV、BFR/TV 有显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$,表 2),有明显的促进骨形成的作用;同 3 g/kg 组相比骨形成作用更强($P<0.05$, $P<0.01$);3 g/kg 二仙汤的骨矿化沉积率和骨形成率较卵巢组低。尼尔雌醇则显著降低去卵巢后骨形成的动态指标(表 2)。

表 2 二仙汤对大鼠胫骨干骺端松质骨动态形态学参数的影响

Tab 2 Effects of *Er-xian* decoction on dynamic parameters of proximal tibial cancellous bone histomorphometry in rats

($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	Percent of label perimeter(%)	Mineral apposition rate($\mu\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$)	Bone formation rate/BS(%/year)	Bone formation rate/BV(%/year)	Bone formation rate/TV(%/ year)
Sham	22.91±2.10*	0.78±0.08*	15.71±4.11**	141.71±54.12**	32.91±8.59
OVX	33.82±2.91	1.21±0.08	37.42±2.52	402.61±44.93	24.71±6.81
Nylestriol+OVX	21.11±3.71*	0.76±0.03*	18.23±4.01**	194.22±48.91**	26.62±8.82
3g/kg EXD+OVX	28.42±2.45	0.77±0.02*	16.79±3.91**	320.11±67.41	21.31±4.01
6g/kg EXD+OVX	35.87±1.23	1.68±0.01**△	55.0±1.31**△△	517.53±33.91*△	48.35±7.23*△

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs OVX group; △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$ vs 3 g/kg EXD group; BS: Bone surface; BV: Bone volume; TV: Tissue area; OVX: Ovariectomized; EXD: *Er-xian* decoction

2.3 对去卵巢大鼠胫骨干骺端破骨细胞的影响 由表 3 可见,同 Sham 比较,去卵巢使骨吸收参数明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);二仙汤(6 g/kg)显著降低破骨细胞数,抑制去卵巢引起的破骨细胞增殖过程($P<0.01$),对单位骨小梁周长的破骨细胞数无明显改变。而 3 g/kg 对破骨细胞无显著影响。

可增加去卵巢大鼠的骨密度($P<0.05$);尼尔雌醇组与去卵巢组相比具有显著性差异($P<0.05$)。

表 3 二仙汤对大鼠胫骨干骺端松质骨破骨细胞参数的影响

Tab 3 Effects of *Er-xian* decoction on osteoclast parameters of proximal tibial cancellous bone histomorphometry in rats

($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	Osteoclast number (mm^{-2})	Osteoclast number/ trabecular perimeter
Sham	3.52±1.81**	14.25±6.44*
OVX	11.95±1.52	39.96±10.08
Nylestriol+OVX	10.21±2.71	34.93±8.59
3 g/kg EXD+OVX	9.32±1.32	33.65±7.56
6 g/kg EXD+OVX	4.51±1.81**△△	32.71±6.32

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs OVX group; △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$ vs 3 g/kg EXD group

2.4 对去卵巢大鼠股骨干骺端骨密度的影响 大鼠去卵巢后,与 Sham 组相比,股骨干骺端的平均骨密度显著降低($P<0.05$,图 1)。而不同剂量的二仙汤均

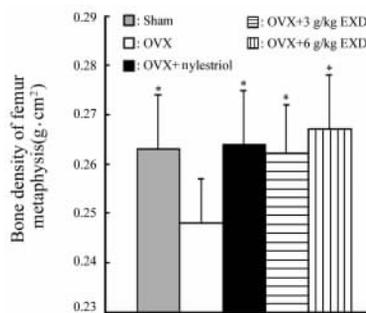


图 1 二仙汤对去卵巢大鼠股骨干骺端骨密度的影响

Fig 1 Effects of *Er-xian* decoction on bone density of femur metaphysis of ovariectomized rat

* $P<0.05$ vs OVX group; $n=10, \bar{x} \pm s$

3 讨论

用去卵巢大鼠建立骨质疏松模型来研究绝经后妇女骨质疏松,已被广泛公认和采纳。我们用 3 个月龄 SD 大鼠去卵巢 12 周均可成功地建立骨质疏松模型。本实验结果表明,去卵巢大鼠胫骨近端骨结构发生了明显的变化,这些改变说明,机体为了抵抗去卵巢后雌激素水平下降对骨骼的影响,刺激成

骨细胞使之活动增强、数目增多,表现为荧光标记周
长百分率明显增加。同时,又使破骨作用增强,骨吸
收增加,表现为骨小梁数日减少、厚度变薄、间隙增
大。综合上述成骨与破骨两方面的影响,去卵巢的
结果是既有骨形成的增加,又有骨吸收的增强,但骨
吸收大于骨形成,出现高转换型骨质疏松。

尼尔雌醇为雌激素类抗骨质疏松类药物,由实
验结果可知它起效的作用机制主要是通过抑制骨高
转换过程(包括骨形成和骨吸收),并以抑制骨吸收
为主,纠正了骨代谢的负平衡,明显增加骨量。从而
达到抗骨质疏松效果,这同文献^[9]报道的完全一致。

中医药治疗骨质疏松症多以补肾为主要治疗原
则,“肾主骨”,补肾即是强骨。二仙汤由淫羊藿、仙
茅、巴戟天等多味补肾中药组成。本实验中经骨组
织计量学研究发现,与 OVX 比较,二仙汤(6 g/kg)
组有显著促进骨的形成和骨量增加的作用,静态学
参数上表现为骨小梁厚度和骨小梁面积百分比明显
增加,骨小梁分离度减少;动态学参数表现为能促进
去卵巢后骨形成参数:MAR、BFR/BS、BFR/BV、
BFR/TV 等的增加;同时,二仙汤(6 g/kg)组降低去
卵巢后破骨细胞活性,使破骨细胞数明显减少,抑制
骨吸收过程。骨密度结果也显示,二仙汤(6 g/kg)
组可以阻止去卵巢引起的大鼠骨密度的降低过程,
提高骨密度、恢复骨骼结构。其抗骨质疏松的疗效
明显优于 3 g/kg 组。

我们首次从骨形成和骨吸收两方面报道了二仙
汤对去卵巢大鼠骨质疏松的治疗作用,本研究药物

的剂量就是参照临床用量而制定的,这也为寻找新
的治疗骨质疏松的药物和方法奠定了科学依据。

综上所述:大鼠去卵巢后由于雌激素不足,导致
骨吸收超过骨形成,出现高转换型骨质疏松。二仙
汤(6 g/kg)组可以促进骨形成,抑制骨吸收,维持骨
再建过程中骨代谢平衡,保持骨量的正常水平、提高
骨密度,从而起到抗骨质疏松的疗效和骨保护作用。

[参考文献]

[1] 史 晓,祁雨丽,杨文宏,等. 补肾健脾通络方治疗原发性骨质
疏松症的临床研究[J]. 上海中医药杂志,2006,40:45-46.
[2] 潘伟军,曾昭明,黄宏兴. 补肾益精法治疗更年期妇女骨质疏
松的临床观察[J]. 山西中医学院学报,2006,7:30-31.
[3] 王翠霞,王 昕. 二仙汤为主治疗更年期综合征 64 例[J]. 辽宁
中医杂志,2006,33:703-704.
[4] 周风梧. 实用方剂学[M]. 济南:山东科学技术出版社,1989:817.
[5] 缪正来. 实用方剂学辞典[M]. 南京:江苏科技出版社,1989:4.
[6] Nian H, Qin L P, Chen W S, et al. Protective effect of ster-
oidal saponins from rhizome of Anemarrhena asphodeloides on
ovariectomy-induced bone loss in rats [J]. Acta Pharmacol Sin,
2006, 27:728-734.
[7] 年 华,徐玲玲,马明华,等. 箭叶淫羊藿对去卵巢大鼠骨量丢
失的保护作用[J]. 中西医结合学报,2006,4:628-633.
[8] 曾昭洋,杨 光,谢兴文,等. 中药增骨丸对去卵巢大鼠骨质疏
松症模型骨组织形态计量学指标的影响[J]. 甘肃中医学院学
报,2005,22:15-19.
[9] 段水竹,赵旭晔,单联则. 利维爱 and 尼尔雌醇对去卵巢大鼠骨质
疏松症的实验研究[J]. 临床医药实践杂志,2006,15:96-98.

[收稿日期] 2006-10-20 [修回日期] 2007-02-02
[本文编辑] 尹 荼

· 书 讯 ·

《异病同治临证经验集萃——162 味中药的奇方妙用》已出版

本书由谢文英、李素领、车志英主编,收集了近十几年来医学杂志专题笔谈中记载的 160 多种纯天然药和千余种治法,辑
录了以当代名医为主的近 300 位名老中医、著名专家学者屡用屡验的奇效之药。

本书特点有二:其一,是所疗疾病范围广泛,包含内、外、妇、儿、五官、皮肤等临床各科,而尤其偏重于疑难杂证;其二,是用
药方法颇具特色,分析精当,广开思路,发人深省。

本书适合中医临床各科医师、中医药院校师生、研究生参考阅读。本书按中药概况介绍和异病同治临证中药运用两大部
分进行撰写,便于广大读者查阅使用。

本书定价:57.00 元,由第二军医大学出版社出版、发行。

订购电话:021-65493093,地 址:上海市翔殷路 800 号 第二军医大学出版社发行科,邮 编:200433