

补肾方防治地塞米松致雄性大鼠骨质疏松及其生化机制探讨*

沈培芝¹ 陈东煜² 张 戈¹ 史万忠¹ 徐 宇¹ 石印玉^{1△}

内容提要 目的:研究补肾方预防和治疗地塞米松致雄性大鼠骨质疏松的疗效,并探讨其生化机制。方法:采用 12 月龄 SD 雄性大鼠 46 只,随机分组给药,18 周后分别测定全身骨密度、股骨抗弯强度以及血清中骨钙素、甲状旁腺素、睾酮、雌二醇的水平。结果:全身骨密度、股骨抗弯强度预防组显著高于地塞米松组($P < 0.01$),与空白对照组比较未见明显差异;治疗组高于地塞米松组($P < 0.05$),但低于空白对照组($P < 0.05$);预防组、治疗组的血清睾酮水平高于地塞米松组($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),血清甲状旁腺素水平低于地塞米松组($P < 0.05$),血清雌二醇以及骨钙素的水平略高于地塞米松组,但无统计学意义。结论:应用补肾方可以有效地预防和治疗地塞米松诱导的雄性大鼠骨质疏松。

关键词 补肾方 骨质疏松 糖皮质激素

Study on Efficacy of Chinese Kidney-Tonifying Recipe in Male Rats with Osteoporosis Induced by Dexamethasone and Its Mechanism Shen Peizhi, Chen Dongyu, Zhang Ge, et al *Institute of Traumatology and Orthopedics, Shanghai Academy of TCM, Shanghai (200032)*

Objective: To study the efficacy of traditional Chinese Kidney-Tonifying Recipe (KTR) in male rats with osteoporosis induced by dexamethasone (DM) and its mechanism. **Methods:** Forty-six male Sprague-Dawley rats at 12 months of age were chosen; they were divided into four groups and KTR and DM were administered appropriately for 18 weeks. General bone mineral density, femur bending strength, serum-BGP, serum-PTH and serum- E_2 were measured. **Results:** General bone mineral density, femur bending strength in KTR prevention group were significantly higher than those in DM group ($P < 0.01$) and the same with those in normal control group ($P > 0.05$). General bone mineral density, femur bending strength in KTR treatment group were higher than those in DM group ($P < 0.05$), and lower than those in normal control group. Compared with DM group, level of serum-T in KTR prevention group and KTR treatment group increased ($P < 0.05$) and level of serum-PTH in those two groups decreased ($P < 0.05$). But in comparison with DM group, level of serum- E_2 and serum-BGP in the above-mentioned two groups was unchanged ($P > 0.05$). **Conclusions:** The data indicated that traditional Chinese Kidney-Tonifying Recipe could prevent and treat osteoporosis in male rats induced by DM.

Key words Kidney tonifying recipe, osteoporosis, gluco-corticoid

临床治疗某些免疫性疾病往往需要长期大剂量应用肾上腺糖皮质激素,结果虽然控制了原发性疾病,但易继发骨质疏松。如何预防和治疗由此导致的继发性骨质疏松已经成为临床急待解决的课题。本实验旨在研究在中医“肾主骨”理论的指导下组配的中药复方制剂补肾方,防治模型大鼠骨质疏松的疗效及其机制,为临床中医药防治肾上腺糖皮质激素性骨质疏松提供实

验依据。

材料与方法

1 动物 12 月龄 SD 雄性大鼠 46 只,体重 400 ± 20 g,由上海中医药大学实验动物中心提供(上海医学实验动物管理委员会实验动物合格证号 001750)。

2 药物和试剂 补肾方浸膏(主要成分为肉苁蓉、补骨脂、紫河车、鹿茸、石斛、菊花、牡蛎)由上海中医药大学附属曙光医院制剂室提供;地塞米松磷酸钠注射液由上海第一制药厂提供,批号 93-1208;盐酸

* 国家九五攻关资助项目(No.96-906-09-05)

1. 上海市中医药研究院骨伤科研究所(上海 200032);

2. 上海市宝治医院;△为课题负责人

氯氨酮注射液由上海第一制药厂提供,批号 92-1201。骨钙素试剂盒由北京长城免疫技术研究所提供;甲状旁腺素试剂盒、睾酮试剂盒、雌二醇试剂盒均由美国 DPC 公司提供。

3 仪器 DPX-L 型双能 X 线骨密度仪(美国);INSTRON-1122 型万能材料试验机(美国);游标卡尺(中国金华);80-1 型离心沉淀机(中国上海)。

4 动物分组及处理 将大鼠随机分为空白对照组(14 只)、地塞米松组(16 只)、预防组(8 只)、治疗组(8 只);空白对照组和地塞米松组分别臀肌注射生理盐水与地塞米松,6 周后停用,并在该两组中分别处死 6 只、8 只,测定全身的骨密度、骨抗弯强度,其余大鼠正常喂养,18 周后全部处死;预防组臀肌注射地塞米松,同时灌喂补肾方浸膏(简称中药)的悬浊液,6 周后停用激素,继续灌喂中药,18 周以后全部处死;治疗组臀肌注射地塞米松,6 周以后停用激素,开始灌喂中药悬浊液,18 周后全部死处。药物服用剂量分别为:每次地塞米松 0.25mg/100g 体重,等量生理盐水,每周 2 次;中药悬浊液(加蒸馏水配成)0.166g/100g 体重,每天 1 次。各组大鼠分笼饲养,自由摄取标准大鼠饲料(钙 1.01%,磷 0.78%),自由饮用蒸馏水;室温 $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

5 观察指标及方法

5.1 全身骨密度的测定 处死前,大鼠腹腔注射 5% 氯氨酮注射液 10mg/100g,当大鼠呈现稳定的昏睡状态持续 10min 以上时,置于 DPX-L 型双能 X 线骨密度仪的探头下,应用全身骨密度软件进行全身扫描,并且自动打印测定结果。

5.2 股骨抗弯强度的测定 大鼠处死后,取出完整的右侧股骨,首先用游标卡尺测定股骨中段的宽度并计算截面积,然后将股骨放在万能材料试验机的支架上(跨距 = 25mm),以 5mm/min 的速度下压股骨中段,记录最大的压力载荷,最后计算抗弯强度(单位截面积上最大的压力载荷)。

5.3 血清生化指标的测定 心脏采血处死动物,抽出的血液离心后取血清,应用放射免疫方法,分别选择相应的试剂盒测定血清中的骨钙素、甲状旁腺素、睾酮、雌二醇的水平,具体方法按药盒说明。

6 统计学处理 两组均数之间比较采用 t 检验,多组均数两两比较采用方差分析。

结 果

1 判定模型是否形成 判定糖皮质激素性骨质疏松模型是否复制成功,主要取决于动物经过地塞米

松诱导后骨量丢失是否具有统计学意义。实验发现地塞米松注射 6 周后,地塞米松组较空白对照组的全身骨密度明显减低($P < 0.05$),同时骨抗弯强度亦明显降低($P < 0.05$),见表 1。表明骨量减少的同时骨折的倾向亦显著增加,即糖皮质激素性骨质疏松模型复制成功。

表 1 6 周后两组大鼠全身骨密度、股骨抗弯强度的测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	动物数	全身骨密度 (g/cm^2)	股骨抗弯强度 (N/mm^2)
空白对照	6	0.403 ± 0.005	21.34 ± 3.52
地塞米松	8	$0.373 \pm 0.018^*$	$14.24 \pm 1.44^*$

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$

2 各组大鼠全身骨密度、股骨抗弯强度的测定结果 见表 2。18 周后,治疗组的全身骨密度以及骨抗弯强度明显高于地塞米松组($P < 0.05$),但仍然低于空白对照组($P < 0.05$),说明模型复制成功后进行治疗可以部分恢复已经减少的全身骨密度和已经降低的股骨抗弯强度;预防组的全身骨密度以及股骨抗弯强度亦显著高于地塞米松组($P < 0.01$),与空白对照组比较未见明显差异,提示造模的同时进行预防性给中药可使已经减少的全身骨密度和已经降低的骨抗弯强度恢复至正常水平。

表 2 18 周后各组大鼠全身骨密度、股骨抗弯强度的测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	动物数	全身骨密度 (g/cm^2)	股骨抗弯强度 (N/mm^2)
空白对照	8	$0.423 \pm 0.025^{**}$	$22.54 \pm 5.45^{**}$
地塞米松	8	0.382 ± 0.017	15.15 ± 2.25
预 防	8	$0.457 \pm 0.126^{**}$	$24.82 \pm 6.37^{**}$
治 疗	8	$0.413 \pm 0.014^{* \Delta}$	$21.19 \pm 3.05^{* \Delta}$

注:与地塞米松组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与空白对照组比较, $\Delta P < 0.05$

3 各组大鼠血清生化指标测定结果 见表 3。预防组、治疗组的血清睾酮水平高于地塞米松组($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$);血清甲状旁腺素水平低于地塞米松组($P < 0.05$);血清雌二醇以及骨钙素的水平略高于地塞米松组,但无统计学意义。

讨 论

1 模型动物年龄的选择 本研究选用 12 月龄雄性大鼠,因为 12 月龄雄性大鼠骨量变化最小,并且在未达 24 月龄前始终处于增值水平⁽¹⁾,因而可以确保模型动物骨量的减少是由于糖皮质激素诱导引起,并非空白对照组的生长所致。

表 3 18 周后各组大鼠血清生化指标的测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	动物数	骨钙素(g/L)	甲状旁腺素(mg/L)	睾酮(mg/L)	雌二醇(g/L)
空白对照	8	2.802 ± 0.386	92.03 ± 16.84 *	7.883 ± 3.604 **	6.9764 ± 2.6907
地塞米松	8	2.470 ± 0.450	182.14 ± 84.99	2.816 ± 1.447	5.3041 ± 1.7480
预 防	8	2.817 ± 0.467	101.90 ± 30.09 *	15.422 ± 3.384 ** △	7.6224 ± 2.2683
治 疗	8	3.125 ± 0.749	136.26 ± 29.63 *	6.614 ± 4.027 *	7.0796 ± 2.0292

注:与地塞米松组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与治疗组比较, △ $P < 0.05$

2 补肾方预防和治疗地塞米松诱导雄性大鼠骨质疏松机制如下。

2.1 降低血清甲状旁腺素水平 实验结果显示预防组、治疗组的血清甲状旁腺素水平明显低于地塞米松组,提示补肾方能够拮抗地塞米松导致的继发性甲状旁腺功能亢进,从而调节骨吸收处于抑制状态,其中的拮抗机制与补肾方纠正糖皮质激素诱发的肠钙吸收障碍有关⁽²⁾。已经证实以补肾为主的方药可以提高糖皮质激素性骨质疏松模型血清中的 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的水平,促进肠钙吸收⁽³⁾;最近又证实在“肾主骨”理论指导下配伍的方药可以增强地塞米松所致的骨质疏松模型鼠体内肠道 CaBP-D9k 基因的表达⁽⁴⁾。CaBP-D9k 是存在于十二指肠粘膜上决定肠钙吸收的载体,CaBP-D9k mRNA 的增加意味着 CaBP-D9k 合成的增加,肠钙吸收增强⁽⁵⁾。

2.2 升高血清睾酮水平 本项实验发现预防组、治疗组的血清睾酮水平都明显高于地塞米松组,深入比较发现预防组的血清睾酮水平亦明显高于治疗组。结合预防组的疗效优于治疗组的实验结果以及各组之间血清雌二醇水平无差异来分析,提示补肾方防治雄性大鼠以糖皮质激素性骨质疏松模型的部分机制似与血清睾酮水平升高有密切关系,并且睾酮水平与防治效果之间亦可能存在着某种正性量效关系。至于补肾方通过血清睾酮介导是以何种方式调节骨代谢,是抑制骨吸收,还是促进骨形成,或者两者皆有?以往的研究认为:雄激素在青春期前对于松质骨和皮质骨的骨量增加以及在青春期后对于皮质骨的骨量增加具有重要作用⁽⁶⁾。但是,从实验结果来分析,反映成骨细胞活性的血清骨钙素水平在预防组、治疗组与地塞米松组之间并未观察到显著差异。根据预防组、治疗组骨量与地塞米松组比较明显增加这一实验事实,考虑骨量增减最终取决于骨形成与骨吸收之间的相对关系,推测补肾方通过血清睾酮介导可能主要作用于骨吸收环节,即抑制骨吸收。Nordin 应用雄激素替代疗法治疗老年男性骨质疏松,结果也显示雄激素对于骨吸收有明显的抑制作用,对于骨形成没有明显的促进作用;同

时指出雄激素抑制骨吸收的机制似乎是通过提高血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的水平,促进肠钙吸收,从而减少了由于低血钙导致的甲状旁腺素的分泌⁽⁷⁾。然而,假设睾酮水平与甲状旁腺素水平之间存在负相关,那么预防组的血清甲状旁腺素水平应该明显低于治疗组,可是实际的结果却显示两组之间未见差异。如果排除实验误差,显然睾酮存在其他的调节骨代谢的途径。随着细胞因子在骨质疏松发病机制中的深入研究⁽⁸⁾,有些学者提出性激素的减少可能触发骨吸收刺激因子 IL-6 基因的表达失控^(9,10),因此,今后的工作应从分子生物学角度研究补肾方通过血清性激素的介导能否对 IL-6 基因的表达进行调控。

参 考 文 献

1. Dike N, Kalu RH, Hardin RC, et al. Aging and dietary modulation of rat skeleton and parathyroid hormone. *Endocrinology* 1984;115(4):1239—1247.
2. 朱光彝. 代谢性骨病学. 第 1 版. 天津:天津科学技术出版社,1989:307.
3. 刘和娣,李 恩,佟晓阳. 补肾方药对地塞米松诱发的骨质疏松大鼠体内雌激素和 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的影响. *中国中西医结合杂志* 1993;13(9):544—545.
4. 刘和娣,李 恩,刘 嵬. 补肾中药对骨质疏松大鼠 CaBP-D9k 基因及表达的影响. *中国骨质疏松杂志* 1996;2(3):62—64.
5. 刘和娣,李 恩. 钙结合蛋白研究进展. *国外医学生理病理科学与临床分册* 1995;(4):278.
6. 戴力扬,张 嘉. 男性骨质疏松. *中华骨科杂志* 1995;15(5):302—305.
7. Nordin BE, Need AG, Morris HA, et al. New approaches to the problems of osteoporosis. *Clin Orthop* 1985;200:181.
8. 王颜刚,王桂兰,王 伟. 白细胞介素 6 在老年男性原发性骨质疏松症发病中的作用. *中国骨质疏松杂志* 1996;2(1):73—77.
9. 郭华章,刘 健,胡蕴玉. 细胞因子在骨质疏松症发病机制的作用. *中国骨质疏松杂志* 1996;2(2):83—85.
10. Ersheler WB. Interleukin-6: a cytokine for gerontologists. *J Am Geriatr Soc* 1993;41:176—181.

(收稿:1997-05-12 修回:1998-02-08)