

复方更年康对骨质疏松雌鼠内分泌免疫功能调节的影响实验研究

吴素慧 孙静汾 郭述真

摘要 目的 观察中药复方更年康对老年雌鼠内分泌免疫功能的调节作用。方法 选择有骨质疏松的老年雌性大鼠作为研究对象,与正常青年雌性大鼠对比,分别用中药复方更年康和尼尔雌醇灌胃 3 个月,观察中药复方更年康对骨质疏松的治疗作用及对内分泌免疫功能的调节作用。采用双能 X 线吸收技术(DEXA)检测骨密度,放免(RIA)法检测血清雌二醇(E_2)、卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)水平,流式细胞术(flow cytometry)进行脾脏 T 细胞亚群(CD_4^+ 、 CD_8^+)及 T 细胞凋亡的检测。结果 老年骨质疏松大鼠骨密度减少,血清 E_2 水平下降,FSH、LH 水平上升,脾脏 CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 明显下降,T 细胞凋亡率显著上升,中药复方更年康能提高骨质疏松大鼠的骨密度,能使 FSH、LH 水平下降,而血清 E_2 水平升高不明显,T 细胞 CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 升高,接近正常水平,T 细胞凋亡减少。结论 中药复方更年康对老年雌性骨质疏松症大鼠有治疗作用,并能调节内分泌,提高机体免疫力。

关键词 复方更年康;骨质疏松;内分泌;免疫功能

Experimental Study on Regulatory Effect of Compound Gengniankang on Endocrine and Immune Functions in Aged Female Rats with Osteoporosis WU Su-hui, SUN Jing-fen, GUO Shu-zhen *Department of Obstetrics and Gynecology, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan (030001)*

Objective To observe the effect of Compound Gengniankang (GNK) in regulating the endocrine and immune functions in aged female rats. **Methods** Aged female rats with osteoporosis were selected as the object for observation and healthy young rats were taken for control. Animals were administered by GNK and nilestriol respectively, through gastric perfusion, for 3 months to observe the therapeutic effect of drug treatment on osteoporosis and the regulatory effect on endocrine and immune function. Bone mineral density (BMD) was measured by double energy X-ray absorption technique, serum levels of estradiol (E_2), follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) were determined by RIA, T-cell subsets and apoptosis in spleen were detected by flow cytometry. **Results** In aged rats with osteoporosis, the BMD decreased, serum level of E_2 lowered, FSH and LH levels raised, splenic CD_4^+ , CD_4^+/CD_8^+ significantly decreased and T-cell apoptosis rate significantly elevated. GNK could increase the BMD, lower the FSH and LH levels, but showed no significant effect on E_2 level. It could increase the CD_4^+ and CD_4^+/CD_8^+ ratio to nearby the normal range, and reduce the apoptosis of T-cells. **Conclusion** GNK has therapeutic effect on osteoporosis in aged rats, and is able to regulate the endocrine and enhance the immune function in organism.

Key words compound Gengniankang; osteoporosis; endocrine; immune function

绝经是卵巢功能衰竭的表现,不仅是生殖系统,全身各个系统均有改变,骨骼系统尤为明显,表现为绝经后骨质疏松症,对该病的研究成为医学界的热点。随着神经-内分泌-免疫网络理论的建立,为研究绝经

后骨质疏松症的病理改变、发病机制及进一步的治疗提供了思路。大量事实证明绝经后内分泌紊乱,激素水平较绝经前明显变化,基于神经-内分泌-免疫网络理论,从神经、内分泌、免疫不同层面对该病进行研究成为主导思想,本研究采用了双能 X 线吸收(DEXA)、放射免疫(RIA)、流式细胞术,从内分泌、免疫角度,观察中药复方更年康治疗老年骨质疏松雌鼠的疗效,探讨复方更年康对内分泌及免疫系统的调节作用,

基金项目 山西省科委资助攻关项目(No. 022074)

作者单位 山西医科大学第一医院妇产科(太原 030001)

通讯作者:吴素慧,博士, Tel: 0351-4130326, E-mail: shwu1215@

万方数据

为绝经后骨质疏松症的治疗开辟新途径。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物 雌性 SD 大鼠,由山西医科大学实验动物中心提供,按清洁级标准饲养。

1.2 药物 复方更年康:由生地、白芍、龟板、枸杞、菟丝子等组成,由山西医科大学第一医院中药制剂室制成汤剂,每毫升含生药 5g。尼尔雌醇:北京四环制药二厂生产,1mg/片。

2 方法

2.1 动物分组和给药 取 3 月龄雌性 SD 大鼠 6 只设为青年对照组。经 DEXA 检测与 3 月龄大鼠比较,将有骨质疏松发生的 15 月龄雌性大鼠 18 只,分为空白对照组、中药复方更年康组、尼尔雌醇组,每组 6 只,分笼饲养。中药复方更年康组每天灌中药复方更年康 4mL(相当于临床成人每公斤体重剂量的 35 倍),尼尔雌醇组 0.21g/kg,15 天 1 次;空白对照组灌生理盐水,给药时间为 3 个月。各组大鼠于 3 个月后处死,取血清、脾脏分别按实验要求保存,处死前再进行 DEXA 测骨密度。

2.2 激素测定 检测大鼠血清雌二醇(E_2)、卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)水平,采用 RIA 法,放免试剂盒为天津九鼎医学生物工程有限公司产品。

2.3 T 细胞亚群检测 取脾脏组织置于生理盐水中,机械法制细胞悬液 2ml,加淋巴细胞分离液 2ml,分离细胞,取单核粒细胞层,调整细胞浓度为 3×10^6 个/ml,取 100 μ l 悬液,加羊抗大鼠 CD₄-PE、CD₈-FITC(Pharmingen 公司生产)各 20 μ l,避光,室温孵育 20min,加 2ml PBS 离心,弃去上清,500 μ l PBS 液上流式细胞仪(美国 BD 公司生产的 FACS Calibur 型)检测,激发波 488nm 氩离子激光器,在 560nm 条件下,经 FL₁、FL₂ 通道以对数方式分别获取信号,信号的获取及分析在软件 Cellquest 支持下完成。

2.4 T 淋巴细胞凋亡的检测 取脾脏组织,迅速

用 70% 乙醇固定 24h 后用 pH 7.4 的 PBS 洗去乙醇,机械法制细胞悬液,离心滤液,弃去上清,调整细胞浓度为 3×10^6 个/ml,取 100 μ l 悬液加浓度为 10 μ g/ml 的 RNA 酶 500 μ l,消化 RNA 30min,再加 50 μ g/ml PI (Sigma 公司生产)500 μ l,避光,室温孵育 20min。流式细胞仪检测,方法同上。

3 统计学方法 SPSS 10.0 软件,进行 t 检验。

结 果

1 各组大鼠 E_2 、FSH、LH 水平比较 见表 1。空白对照组与青年对照组比较 E_2 水平显著下降,FSH、LH 水平上升($P < 0.05$);用复方更年康治疗后,与老年对照组比较, E_2 水平上升,差异无显著性($P > 0.05$),FSH、LH 水平显著下降($P < 0.05$);尼尔雌醇治疗后与空白对照组比较, E_2 水平上升,FSH、LH 水平下降差异有显著性($P < 0.05$),提示复方更年康和尼尔雌醇治疗在调节内分泌方面程度不同,复方更年康并不使 E_2 水平上升,但 FSH、LH 水平更接近青年对照组。

2 各组大鼠骨密度比较 见表 1。空白对照组与青年对照组比较骨密度显著降低($P < 0.05$),用复方更年康和尼尔雌醇治疗后骨密度明显升高($P < 0.05$),但与青年组比较差异有显著性($P < 0.05$);两治疗组比较,差异无显著性($P > 0.05$)。提示复方更年康可以取得与激素替代同样的治疗效果。

3 各组 CD₄⁺、CD₈⁺ 及 CD₄⁺/CD₈⁺ 比值比较 见表 2。空白对照组与青年对照组比较 CD₄⁺ 和 CD₄⁺/CD₈⁺ 显著下降,CD₈⁺ 显著增加($P < 0.05$),用复方更年康、尼尔雌醇治疗后 CD₄⁺ 和 CD₄⁺/CD₈⁺ 升高,CD₈⁺ 减少($P < 0.05$),CD₄⁺ 和 CD₄⁺/CD₈⁺ 两治疗组比较,差异有显著性($P < 0.05$),CD₈⁺ 差异无显著性($P > 0.05$),提示复方更年康和尼尔雌醇治疗均可增加脾脏 CD₄⁺,使 CD₄⁺/CD₈⁺ 升高调整已经异常的淋巴细胞亚群,延缓免疫功能衰老,以增强机体免疫功能。复方更年康比激素替代有更强的调节免疫功能的作用。

表 1 各组大鼠血清 E_2 、FSH、LH 水平及骨密度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	E_2 (ng/L)	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	骨密度 (g/cm ²)
青年对照	6	26.10 ± 0.71	2.29 ± 0.53	2.48 ± 0.26	0.31 ± 0.09
空白对照	6	15.89 ± 0.87 *	17.90 ± 6.80 *	3.73 ± 0.26 *	0.22 ± 0.01 *
复方更年康	6	16.11 ± 0.89 *	5.92 ± 1.04 * △	2.71 ± 0.50 * △	0.27 ± 0.02 * △
尼尔雌醇	6	21.29 ± 1.38 * △ ▲	9.60 ± 2.47 * △ ▲	2.97 ± 0.67 * △ ▲	0.28 ± 0.01 * △

注:与青年对照组比较,* $P < 0.05$;与老年对照组比较,△ $P < 0.05$;与复方更年康组比较,▲ $P < 0.05$

万方数据

表 2 各组大鼠脾脏 T 细胞亚群及细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	T 细胞凋亡率(%)
青年对照	6	65.96±2.20	18.15±3.60	3.69±0.81	12.77±1.09
空白对照	6	49.82±1.83 *	34.96±3.10 *	1.43±0.16 *	24.93±0.83 *
复方更年康	6	61.54±4.60 [△]	27.48±6.96 * [△]	2.39±0.76 [△]	18.66±1.12 * [△]
尼尔雌醇	6	54.05±4.16 * ^{△▲}	29.32±2.41 * [△]	1.86±0.20 * ^{△▲}	20.55±1.35 * ^{△▲}

注 :与青年对照组比较 , * P<0.05 ;与老年对照组比较 ,[△] P<0.05 ;与复方更年康组比较 ,[▲] P<0.05

4 各组大鼠脾脏 T 细胞凋亡率比较 见表 2。空白对照组与青年对照组比较 T 细胞凋亡率显著上升($P<0.05$),用复方更年康、尼尔雌醇治疗后 T 细胞凋亡率明显下降($P<0.05$),两治疗组比较 ,差异有显著性($P<0.05$),提示复方更年康和尼尔雌醇替代治疗均可降低脾脏 T 淋巴细胞的凋亡率 ,增强机体免疫功能 ,复方更年康比尼尔雌醇作用更显著。

讨 论

雌激素作为一个重要激素伴随并影响着女性的一生 ,进入老年 ,卵巢功能衰竭 ,雌激素水平低落 ,可诱发许多疾病 ,绝经后骨质疏松症尤其明显 ,由于该病研究的不断深入 ,为治疗提供了良好的依据。目前 ,国内外学者认为 ,绝经后骨质疏松症不仅与内分泌激素改变有关 ,而且免疫系统的变化也很显著。从免疫角度研究 ,探讨病机成为综合治疗该病必不可少的环节。Keller 等研究发现绝经后妇女多发生与绝经相关的免疫功能改变^[1-3] ,雌激素对免疫功能有影响 ,可以保护免疫功能 ,提高免疫力^[4,5] ,所以国内外在这方面的研究大多定位在雌激素替代治疗绝经后骨质疏松症对免疫功能的影响上。绝经后由 Th₁、Th₂ 细胞分泌的某些细胞因子升高 ,如 IL-2、IL-4 ,Th₁/Th₂ 比例失调 ,雌激素替代治疗可以阻止细胞因子的升高 ,使 CD8⁺ 细胞减少 ,CD4⁺/CD8⁺ 比值上升 ,协调 Th₁/Th₂ 比例 ,使 Th₁ 细胞介导的细胞免疫 ,Th₂ 细胞介导的体液免疫反应达到平衡^[6-9]。Kamada 等发现 ,雌激素替代治疗可以增加淋巴细胞比例提高机体免疫力^[10] ,还可通过增加 B-2 细胞产物 ,阻止免疫系统老化过程^[11]。大量事实证实雌激素替代治疗绝经后骨质疏松症是有效的 ,可以提高机体免疫力 ,但由于雌激素替代治疗的种种不良反应 ,如子宫内膜癌、乳腺癌、阴道出血等 ,限制了它的使用。为了降低雌激素替代疗法带来的不良反应 ,各国学者努力寻找其他治疗方法 ,目前有人选用选择性雌激素受体调节剂(SERMs)治疗该病 ,但对 SERMs 的研究尚处于初级阶段 ,对其有无不良反应 ,仍有争议 ,还有待于进一步深入研究^[12]。

中医学在治疗疾病的过程中有其独特的优势 ,中医立足于整体 ,辨证施治 ,认为绝经后骨质疏松症并非

骨骼系统、生殖系统的局部病变 ,而是全身多环节、多系统综合作用的结果。大量研究证明 ,绝经后骨质疏松症患者多个系统都有改变 ,所以依据中医整体理论治疗更符合疾病本身的特点 ,有望达到标本兼治的目的。中医认为肾虚与骨质关系十分密切 ,骨质疏松由肾虚引起 ,中医的“ 肾 ”是一个多功能的体系 ,它具有生殖、遗传、生长发育、神经系统、泌尿系统、免疫系统等方面的功能^[13] ,中药复方更年康就是基于这一理论 ,从整体出发进行调节 ,调动内因 ,调节各系统趋于平衡 ,作用于多靶点 ,调节神经内分泌免疫功能 ,全面改善症状 ,正如本实验显示 ,中药复方更年康在治疗骨质疏松方面可以达到雌激素替代治疗同样的疗效 ,在调节内分泌方面与雌激素替代不同 ,并不使血清雌激素水平升高 ,而可使 FSH、LH 水平降低 ,从而可减少雌激素对子宫及乳腺的刺激 ,降低子宫内膜癌和乳腺癌的发生率 ,并且中药复方更年康在调节免疫力方面优于激素替代 ,所以用中药复方更年康治疗该病不失为一种减少激素替代并发症 ,有效治疗绝经后骨质疏松症的好方法。复方更年康主要由生地、龟板、枸杞子、白芍、菟丝子等组成 ,诸药相伍共奏补肾壮骨、益气养阴、通血活络、调整阴阳之功。现代药理学研究显示 ,黄芪对处于抑制状态的免疫功能具有调节作用 ,并能增强网状内皮系统的吞噬和杀菌能力 ,菟丝子和龟板能使抗原刺激后抗体提前形成 ,并且使抗体存在时间延长 ,生地在淋转试验中有轻中度免疫激发作用。可见复方更年康治疗老年骨质疏松症在提高免疫力 ,调节内分泌方面有独特的优势 ,同时也避免了激素替代的严重副反应 ,为该病的治疗增加了一种新方法。

参 考 文 献

1 Keller ET , Zhang J , Yao Z , et al. The impact of chronic estrogen deprivation on immunologic parameters in the ovariectomized rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of menopause. *J Reprod Immunol* 2001 ;50(1):41—55.

2 Arnaud CD. An integrated view of the role of the endocrine system in the genesis of the osteoporosis associated with aging. *Osteoporos Int* 1993 ;3(Suppl 1):37—39.

3 Rachon D , Mysliwska J , Suchecka Rachon K , et al. Effects of oestrogen deprivation on interleukin-6 production by periph-

- eral blood mononuclear cells of postmenopausal women. *J Endocrinol* 2002 ; 172(2): 387—395.
- 4 Porter VR , Greendale GA , Schocken M , et al. Immune effects of hormone replacement therapy in post-menopausal women. *Exp Gerontol* 2001 ; 36(2): 311—326.
 - 5 Yang JH , Chen CD , Wu MY , et al. Hormone replacement therapy reverses the decrease in natural killer cytotoxicity but does not reverse the decreases in the T-cell subpopulation or interferon-gamma production in postmenopausal women. *Fertil Steril* 2000 ; 74(2): 261—267.
 - 6 Brooks Asplund EM , Tupper CE , Daun JM , et al. Hormonal modulation of interleukin-6 , tumor necrosis factor and associated receptor secretion in postmenopausal women. *Cytokine* 2002 ; 19(4): 193—200.
 - 7 Kamada M , Irahara M , Maegawa M , et al. Transient increase in the levels of T-helper 1 cytokines in postmenopausal women and the effects of hormone replacement therapy. *Gynecol Obstet Invest* 2001 ; 52(2): 82—88.
 - 8 Porter VR , Greendale GA , Schocken M , et al. Immune effects of hormone replacement therapy in post-menopausal women. *Exp Gerontol* 2001 ; 36(2): 311—326.
 - 9 Holl M , Donat H , Weise W. Peripheral blood lymphocyte subpopulations of postmenopausal women with hormone replacement therapy. *Zentralbl Gynakol* 2001 ; 123(9): 543—545.
 - 10 Kamada M , Irahara M , Maegawa M , et al. Effect of hormone replacement therapy on post-menopausal changes of lymphocytes and T cell subsets. *J Endocrinol Invest* 2000 ; 23(6): 376—382.
 - 11 Kamada M , Irahara M , Maegawa M , et al. B cell subsets in postmenopausal women and the effect of hormone replacement therapy. *Maturitas* 2001 ; 37(3): 173—179.
 - 12 Littleton Kearney MT , Ostrowski NL , Cox DA , et al. Selective estrogen receptor modulators : tissue actions and potential for CNS protection. *CNS Drug Rev* 2002 ; 8(3): 309—330.
 - 13 谢林 郭振球 姚共和. 绝经后骨质疏松症中医辨证分析. *中国医药学报* 1999 ; 14(3): 35—39.
Xie L , Guo ZQ , Yao GH , et al. Analysis in the differentiation of symptoms and signs of postmenopausal osteoporosis. *China J TCM Pharmacy* 1999 ; 14(3): 35—39.

(收稿 2003 - 11 - 11 修回 2004 - 02 - 27)

(上接第 544 页)

- 6 石山 田德真 李增. 中药附子对动物耐药缺氧和急性心肌缺血的保护作用. *中医杂志* 1980 ; 21(9): 67—69.
Shi S , Tian DZ , Li ZX. Protective effect of radix aconitin praeparata against anoxia and acute myocardial ischemia in animals. *J Tradit Chin Med* 1980 ; 21(9): 67—69.
- 7 石山 李增 吴秀英. 附子对麻醉犬急性心肌缺血左室功能和血流动力学的影响. *中医杂志* 1981 ; 22(12): 59—61.
Shi S , Li ZX , Wu XY. Effect of aconitin carmichaeli on acute myocardial ischemia , left ventricular performance and hemodynamics in anesthetized dogs. *J Tradit Chin Med* 1981 ; 22(12): 59—61.
- 8 徐叔云 卞如濂 陈修. 药理实验方法学. 第 2 版. 北京 : 人民卫生出版社 , 1991 : 921.
Xu SY , Bian RL , Chen X. Experimental method of pharmacology. 2ed. Beijing : People 's Medical Publishing House , 1991 : 921.
- 9 Flaherty JT , Zweier JL. Role of oxygen radicals in myocardial reperfusion injury : experimental and clinical evidence. *Klin Wochenschr* 1991 ; 69(21—23): 1061—1065.
- 10 侯明晓 敖定椿. 人参总皂甙抗心肌缺血再灌注损伤的作用机制. *中国胸心外科临床杂志* 2000 ; 7(4): 256—259.
Hou MX , Ao DC. Study on the mechanism of ginsenoside against ischemia-reperfusion injury of myocardium. *Chin J Clin Thorac Cardiovasc Surg* 2000 ; 7(4): 256—259.
- 11 张杰民 陈立波 赵洪序 等. 人参总皂甙对心肌缺血和再灌注损伤的保护作用及浓度效应关系的实验研究. *白求恩医科大学学报* 1998 ; 24(3): 254—256.
Zhang JM , Chen LB , Zhao HX , et al. Effects of ginsenosides on myocardial ischemia and reperfusion injury and concentration-effect relationship. *J N Bethune Med Sci* 1998 ; 24(3): 254—256.
- 12 张明发. 附子温里药理的研究. *陕西中医* 1994 ; 15(2): 88—91.
Zhang MF. Studies on the warming li effect of Fuzi. *Shaanxi Tradit Chin Med* 1994 ; 15(2): 88—91.

(收稿 2003 - 01 - 17 修回 2004 - 03 - 08)