

补肾宁心方对小鼠绝经后骨质疏松的影响

王玉东[△] 李大金 王文君 朱 影

摘要 目的 探讨补肾宁心方防治绝经后骨质疏松的作用。**方法** 建立 BALB/c 小鼠绝经后骨质疏松模型,灌服补肾宁心方浓缩液(简称补肾方组),并以 17 β -雌二醇为阳性对照(简称 E₂ 组),以生理盐水为阴性对照(简称模型组)。12 周后处死,取血测 Th₁/Th₂ 型细胞因子;取椎骨(L3-4)和左股骨测骨密度(BMD);取右股骨行骨组织形态计量分析;胫骨提取总 RNA,半定量 RT-PCR 分析护骨素(OPG)的 mRNA 表达。计算子宫对体重的比值,并行子宫组织切片观察。**结果** 补肾方组的 IFN- γ 水平较模型组明显升高($P < 0.01$),而 IL-4 水平低于模型组($P < 0.05$)。补肾方组与 E₂ 组小鼠的 BMD 均改善,骨小梁面积增加,OPG mRNA 表达增加;但补肾方组小鼠的子宫明显小于 E₂ 组($P < 0.05$),与模型组比较差异无显著性。**结论** 补肾方能够选择性地防治绝经后骨质疏松,对子宫无或仅有轻微的刺激作用。其机制可能与调节 Th₁/Th₂ 的偏移及提高 OPG 的表达,抑制破骨细胞的活性有关。

关键词 补肾宁心方;绝经后骨质疏松;护骨素;Th₁/Th₂;mRNA 表达

Predominant Effect of Bushen Ningxin Decoction on Postmenopausal Osteoporosis in Mice WANG Yu-dong, LI Da-jin, WANG Wen-jun, et al *Laboratory of Reproductive Immunology, Institute of Obstetrics and Gynecology, Fudan University, Shanghai (200011)*

Abstract Objective To investigate the preventive and therapeutic effect of Bushen Ningxin decoction (BSNX) on postmenopausal osteoporosis. **Methods** The BALB/c female mice postmenopausal osteoporosis model was established. The model mice were treated by BSNX, with 17 β -estradiol (E₂) and normal saline as positive and negative control, respectively. All mice were sacrificed after 12 weeks' treatment, the serum cytokines Th₁/Th₂, bone mineral density (BMD) of vertebrae (L3-4) and left femur were determined, and morphological quantitative analysis of bone tissue of right femurs was performed and osteoprotegerin (OPG) mRNA expression in tibia was detected by semi-quantitative RT-PCR. The ratio in weight of uterus to body was calculated, and uterine slice was gotten for histological observation. **Results** As compared with the negative control group, the level of interferon- γ (IFN- γ) was significantly increased ($P < 0.01$) and interleukin-4 (IL-4) decreased ($P < 0.05$) in the BSNX treated group. The BMD of mice were improved, area of bone trabecula and OPG mRNA expression were increased in the BSNX treated and E₂ treated group($P < 0.01$). But the uterus in the former was significantly smaller than that in the latter($P < 0.01$), while it was not significantly different to that in the negative control group. **Conclusion** BSNX can selectively prevent and cure the postmenopausal osteoporosis, it has no or slight stimulation on uterus. The mechanism may relate with its effects in regulating the deviation of Th₁/Th₂, enhancing the OPG expression and inhibiting the activity of osteoclasts.

Key words Bushen Ningxin decoction; postmenopausal osteoporosis; osteoprotegerin; Th₁/Th₂; mRNA expression

资助项目:国家自然科学基金项目(No. 30472259),上海市科技攻关项目(No. 004019061),上海市卫生局青年基金(No. 044Y06)

作者单位:复旦大学附属妇产科研究所生殖免疫室(上海 200011)

[△]现在上海交通大学附属第六人民医院妇产科(上海 200233)

通讯作者:李大金, Tel: 021-63457331, E-mail: djli@shmu.edu.cn

本研究通过观察补肾宁心方(简称补肾方)对绝经后骨质疏松(postmenopausal osteoporosis, PMOP)小鼠的骨和子宫的作用,及其对 Th₁/Th₂ 型细胞因子的调控和护骨素(osteoprotegerin, OPG)表达的影响,以探讨该方选择性防治绝经后骨质疏松的作用。

材料与方法

1 动物 8~9 月龄雌性 BALB/c 小鼠 40 只,体重 18~21 g(中国科学院动物中心提供,合格证号 003),按清洁级标准饲养。小鼠可以自由进食和饮水,光照 12h/天。各组小鼠的体重、妊娠和生育史等无差异。

2 药物与试剂 补肾宁心方由仙灵脾、当归、知母、补骨脂、菟丝子、枸杞子、生地、酸枣仁、知母、黄柏、甘草组成,制成浓缩液,每毫升含生药 2 g,上海顺天堂药店提供;17 β -雌二醇(17 β -estradiol 分子量 272.4):购于 Sigma 公司,配成浓度为 1×10^{-5} mol/L 的液体;IL-4、IFN- γ 的 ELISA 试剂盒为 BD 公司产品;TRIZOL 为 Invitrogen 产品;氯胺酮为华美公司产品。

3 方法

3.1 PMOP 小鼠模型的建立 小鼠用 1 mg/ml 氯胺酮(100 mg/kg)腹腔注射麻醉,从背部切除双侧卵巢(模型)或手术过程相同但不切除卵巢(假手术);8 周后,各组同时随机取两只小鼠的腰椎和股骨,以病理形态学确定 PMOP 模型的建立,排除手术的影响。

3.2 实验分组 40 只小鼠随机分 4 组,每组 10 只,即假手术组、模型组、E₂ 组和补肾方组;E₂ 组和补肾方组分别于手术后第 7 天每天给 17 β -雌二醇 0.5 ml,补肾方组同时灌服补肾宁心方浓缩液 0.5 ml,假手术组和模型组则给予同体积生理盐水。灌药 3 个月后,称量小鼠体重,颈椎脱臼法处死小鼠,心脏取血,分离血清,存于 -20℃ 待测;子宫称重,并确认卵巢完全切除。分别取腰椎、股骨和胫骨行以下测定。

3.3 BMD 测定 用美国 Lunar 公司 DPX-L 型号的双能 X 线骨密度检测仪,采用小动物骨密度测定软件,测定腰椎骨(L3-4)和左股骨的骨密度。

3.4 细胞因子(IFN- γ 和 IL-4)测定 采用 ELISA 法。一次性同时测定标准品和各组 450 nm 处的 OD 值,根据标准品 OD 值求出拟合曲线后计算各组 IFN- γ 、IL-4 的含量。

3.5 骨组织形态计量分析 取腰椎(L1-2)中间和右股骨近端骨组织标本,去净软组织。椎体标本取横切面,股骨标本取纵切面,常规 HE 染色。委托未参与实验的病理医师以双盲法进行图像分析(leica 软件),每个切片随机测 3 个视野,测量骨小梁面积。

3.6 OPG RT-PCR 半定量分析 将小鼠胫骨储于液氮中,取干骺端在液氮中匀浆,用 TRIZOL 提取总 RNA,用 Robust RT-PCR kit(FINNZYMES 公司

的 F-580)根据说明进行反应。cDNA 合成:42℃ 30 min,94℃ 2 min;PCR 反应:94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;延伸:72℃ 7 min,总体系 50 μ l。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察照相并扫描光密度(Alpha imager2200 软件)。PCR 引物由上海博亚公司合成,序列如下:

OPG sense 5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3'
Anti-sense 5'-TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC-3'
(55℃)^[1]
 β -actin sense 59-GGGCACAGTGTGGGTGAC-39
anti-sense 59-CTGGCACCACACCTTCTAC-39
(55℃)^[2]

3.7 检测小鼠子宫情况 完整取出子宫,分离净脂肪组织,称量子宫湿重并行子宫组织切片,计算子宫(mg)/体重(g)的值。

4 统计学方法 所有数据输入 SPSS 11.0 分析,组间比较用 *t* 检验,OPG mRNA 的比较用方差分析。

结 果

1 补肾方对股骨、椎骨 BMD 的影响 见表 1。与模型组比较,假手术组股骨、椎骨和椎骨加股骨的 BMD 平均值均显著上升($P < 0.01$),说明模型成功建立;E₂ 组上述 3 项显著改善($P < 0.05$, $P < 0.01$);补肾方组小鼠椎骨及椎骨加股骨的 BMD 平均值显著改善($P < 0.05$)。补肾方组与 E₂ 组比较差异无显著性。

表 1 各组小鼠 BMD 测定结果比较 (g/cm², $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	股骨	椎骨	椎骨加股骨平均值
假手术	8	0.264 $\pm$ 0.005 **	0.284 $\pm$ 0.007 **	0.274 $\pm$ 0.012 **
模型	8	0.228 $\pm$ 0.005	0.241 $\pm$ 0.011	0.234 $\pm$ 0.011
E ₂	8	0.240 $\pm$ 0.010 *	0.255 $\pm$ 0.007 *	0.247 $\pm$ 0.012 **
补肾方	8	0.236 $\pm$ 0.014	0.254 $\pm$ 0.007 *	0.245 $\pm$ 0.015 *

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$
2 补肾方对 PMOP 小鼠血清 IFN- γ 、IL-4 的影响 见表 2。与模型组比较,E₂ 组小鼠 IFN- γ 含量显著升高($P < 0.05$),补肾方组小鼠 IFN- γ 含量升高($P < 0.01$),IL-4 含量下降($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠血清 IFN- γ 、IL-4 测定结果比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IFN- γ	IL-4
模型	8	3486.52 $\pm$ 2654.57	12058.20 $\pm$ 10412.80
E ₂	8	6236.52 $\pm$ 3115.63 *	5105.40 $\pm$ 4376.70
补肾方	8	8171.30 $\pm$ 1637.03 **	5009.03 $\pm$ 1975.96 *

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$
3 补肾方对小鼠胫骨 OPG mRNA 表达、腰椎和股骨骨小梁面积的影响 见表 3。与模型组比较,补肾方组和 E₂ 组 OPG mRNA 表达水平提高($P < 0.05$, $P < 0.01$),腰椎、股骨的骨小梁面积均增加($P < 0.05$, $P <$

0.01),补肾方组与 E₂ 组比较差异无显著性。

表 3 各组小鼠胫骨 OPG mRNA 及椎骨、股骨骨小梁面积测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	胫骨 OPG/ β -actin ($n=3$)	骨小梁面积(μm^2)	
		椎骨($n=8$)	股骨($n=8$)
模型	0.478 $\pm$ 0.04	12629.1 $\pm$ 4983.0	12584.8 $\pm$ 3522.7
E ₂	0.710 $\pm$ 0.015**	20354.3 $\pm$ 3364.9**	23786.0 $\pm$ 3239.6**
补肾方	0.587 $\pm$ 0.051*	18622.5 $\pm$ 8300.2*	18602.1 $\pm$ 5953.3*

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

4 补肾方对子宫的作用 见表 4。与假手术组比较,模型组和补肾方组小鼠子宫重量下降($P<0.05$, $P<0.01$),E₂ 组小鼠子宫重量增加($P<0.01$);与模型组比较,E₂ 组小鼠子宫及子宫重量/体重的比值显著升高($P<0.05$);与 E₂ 组比较,补肾方组小鼠上述两项指标均显著下降($P<0.05$)。

表 4 各组小鼠子宫重及子宫重/体重比结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	子宫重(g)	子宫重/体重(比值)
假手术	8	0.205 $\pm$ 0.024	1.09 $\pm$ 0.10
模型	8	0.150 $\pm$ 0.019**	0.84 $\pm$ 0.09
E ₂	8	0.233 $\pm$ 0.021** Δ	1.24 $\pm$ 0.06* Δ
补肾方	8	0.167 $\pm$ 0.024* $\blacktriangle$	0.92 $\pm$ 0.09* $\blacktriangle$

注:与假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.01$;与 E₂ 组比较, $\blacktriangle P<0.05$

5 各组小鼠子宫组织学观察 见图 1。子宫切片 HE 染色后,低倍镜($\times 20$)下观察见:补肾方组与模型组可见柱状上皮萎缩变薄,腺体数量减少,柱状上皮、内膜间质和肌细胞中细胞核与胞质的比例下降,缺少有丝分裂。而 E₂ 组柱状上皮增厚;腺体数量增加;柱状上皮、内膜间质和肌细胞中细胞核与胞质的比例升高,增生活跃。

讨 论

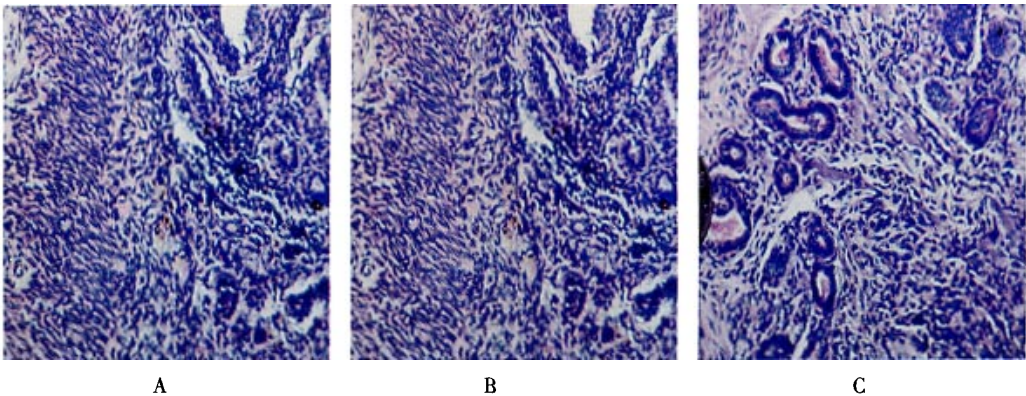
绝经后骨质疏松症属于中医学中“骨痹”、“骨痿”

范畴,主要病因病机是肾虚。补肾方以仙灵脾、菟丝子、枸杞子平补肾中精气为君药;当归、骨碎补活血补肾,生地、知母滋阴降火为臣药;酸枣仁宁心安神为佐;黄柏、甘草引诸药入肾经,共奏补肾壮骨之功。

衰老时 T 淋巴细胞免疫功能减退,表现为 CD₂₈⁺ T 细胞减少,Th₁(IFN- γ)下降,Th₂(IL-4、IL-10)升高,Th₁/Th₂ 比值降低^[3]。绝经后妇女激素替代治疗(HRT)可以逆转降低的 NK 细胞毒活性,但不能逆转 T 细胞亚群或降低的 IFN- γ ^[4]。我们研究发现,与模型组比较,补肾方能上调 IFN- γ 的分泌,而降低 IL-4 的水平,从而整体上调 Th₁/Th₂ 的偏移,起到增强 T 细胞免疫功能,延缓衰老的作用。

OPG 属于可溶性肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族成员,通过结合 RANKL(NF- κ B 受体激动子的配体,位于成骨细胞)阻断其与 RANK(NF- κ B 受体激动子,位于破骨细胞)的结合,从而有效地抑制 RANKL-RANK 介导的破骨细胞分化成熟,实现对破骨细胞功能的抑制,以及调控骨量的作用。许多调控破骨细胞分化的信号都是间接地控制成骨细胞 RANKL 或其 OPG 产物来实现的^[5]。我们已经证实了补肾方对小鼠成骨细胞的增殖和抗凋亡作用^[6]。同时,补肾方能够提高 OPG mRNA 的表达,从而抑制破骨细胞的活性^[7]。与模型组比较,补肾方组不但骨密度改善了,而且骨小梁变粗,面积增加。

目前美国已经将雌激素列为致癌药物。我们的结果也证实,雌激素虽能有效地预防绝经后骨密度的降低,但同时也明显地促进子宫内膜增生,在一定程度上提示了雌激素导致内膜癌的作用,这对于绝经后妇女是不适宜的。补肾方能防治绝经后骨质疏松而对子宫



注:A为模型组;B为补肾方组;C为 E₂ 组

图 1 各组小鼠子宫切片 HE 染色后光镜下($\times 20$)观察

无或仅有轻微的增生作用,其机制与促进成骨细胞增殖,提高 OPG 的表达及调节 Th_1/Th_2 的偏移有关。

参 考 文 献

- 1 Kim YH, Kim GS, Jeong-Hwa B. Inhibitory action of bisphosphonates on bone resorption does not involve the regulation of RANKL and OPG expression. *Exp Mol Med* 2002; 34(2): 145—151.
 - 2 Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 2001; 104(5): 719—730.
 - 3 王玉东, 李大金. 绝经后骨质疏松症发生的分子机制. *中华老年医学杂志* 2003; 22(3): 187—188.
- Wang YD, Li DJ. The molecular mechanism for the genesis of postmenopausal osteoporosis. *Chin J Geriatrics* 2003; 22(3): 187—188.

- 4 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 subpopulation or interferon-gamma production in postmenopausal women. *Fertil Steril* 2000; 74(2): 261—267.
 - 5 Alliston T, Derynck R. Medicine: interfering with bone remodeling. *Nature* 2002; 416(6882): 686—687.
 - 6 王玉东, 李大金, 朱 影. 补肾宁心方对小鼠成骨细胞的增殖和抗凋亡作用. *中国中西医结合杂志* 2004; 24(3): 230—233.
- Wang YD, Li DJ, Zhu Y. Effect of Bushen Ningxin Decoction on proliferation and apoptosis of murine Osteoblast. *Chin J Integr Tradit West Med* 2004; 24(3): 230—233.
- 7 王玉东, 李大金, 高建军. 脱氢表雄酮抑制骨吸收的作用机制. *中国药理学杂志* 2004; 39(6): 429—431.
- Wang YD, Li DJ, Gao JJ. Inhibition mechanism of bone resorption by dehydroepiandrosterone. *Chin Pharm J* 2004; 39(6): 429—431.

(收稿: 2004-12-13 修回: 2005-03-12)

益心安胃汤治疗功能性消化不良 55 例

李存德

2001 年 8 月—2003 年 8 月, 笔者用自拟益心安胃汤治疗功能性消化不良 55 例, 并与用吗丁啉治疗的 60 例作对照, 现报告如下。

临床资料 所有患者均符合文献诊断(潘国宇. 现代肠胃病学. 北京: 科学出版社, 1994: 935—936)。患者有上腹部痛或不适, 腹胀、早饱、嗝气、恶心呕吐等症状, 并持续 12 周以上。全部病例均经胃镜检查病理证实为正常。排除: 内镜下见糜烂、溃疡及肿瘤等器质性病变者及有肝、胆、胰、糖尿病、甲亢等器质性疾病者。115 例均为本院门诊患者, 按抽签法随机分为两组, 治疗组 55 例, 男 23 例, 女 32 例; 年龄 16~76 岁, 平均 (43.8 ± 18.4) 岁; 病程 5 个月~8 年, 平均 (2.20 ± 1.05) 年。对照组 60 例, 男 27 例, 女 33 例; 年龄 18~69 岁, 平均 (41.6 ± 15.4) 岁; 病程 4 个月~10 年, 平均 (2.10 ± 0.93) 年。两组资料比较差异无显著性, 具有可比性。

治疗方法 两组均用乳酸菌素片(每片 0.4 g, 远达药业集团哈尔滨一洲制药有限公司产品)3 片, 每天 3 次嚼服, 雷尼替丁(每粒 0.15 g, 杭州民生制药厂生产)1 粒, 每天 2 次口服; 幽门螺杆菌阳性者(快速尿素酶试验)加服阿莫西林胶囊(每粒 0.25 g, 华北制药集团制剂有限公司产品)2 粒, 每天 3 次口服(青霉素过敏者除外)作为基础治疗。治疗组加服益心安胃汤, 基本方: 熟地 15 g 当归 10 g 茯苓 10 g 远志 10 g 党参 15 g 白术 10 g 柴胡 10 g 川芎 10 g 郁金 10 g 枳壳 10 g 法半夏 8 g 黄连 10 g 干姜 3 g。随症加减: 脾胃虚寒加熟附子、肉桂; 返酸加煅瓦楞; 瘀结偏重加桃仁、红花; 胃阴不足加麦冬、沙参、玉竹; 每天 1 剂水煎分两次服。对照组加服吗丁啉(西安杨森产品)每次 10 mg, 每天 3 次饭前服。两组

均服 1 个月后评定疗效。测定指标: 治疗前后进行血、尿常规及肝功能检查, 治疗过程中每周记录症状变化及不良反应。统计学方法: 计数资料用 χ^2 检验, 计量资料用 t 检验。

结 果

1 疗效评定标准(自拟) 症状积分法: 根据患者治疗前后 1 周的主要症状表现, 分度评价 6 个主症(腹胀、餐后早饱、嗝气、恶心呕吐、上腹痛、反酸烧心), 每一症状按轻、中、重分别计分 1、3、5 分, 无症状计 0 分, 轻度为偶尔有症状, 中度为症状较常出现, 重度为每日均有症状。疗效指数 = (治疗前症状积分 - 治疗后症状积分) / 治疗前症状积分 $\times 100\%$ 。疗效指数 $> 75\%$ 为治愈, $30\% \sim 75\%$ 为有效, $< 30\%$ 为无效。

2 临床疗效 治疗组 55 例, 治愈 36 例(65.5%), 有效 17 例(30.9%), 无效 2 例(3.6%), 总有效率为 96.4%。对照组 60 例, 治愈 21 例(35.0%), 有效 24 例(40.0%), 无效 15 例(25.0%), 总有效率为 75.0%。治愈率及总有效率两组比较差异均有显著性($P < 0.05$)。

3 两组治疗前后症状积分情况 治疗组治疗前为 (22.5 ± 4.1) 分, 治疗后为 (5.4 ± 1.7) 分($P < 0.05$); 对照组分别为 (21.9 ± 4.0) 分、 (10.1 ± 2.6) 分($P < 0.05$)。治疗后积分治疗组明显低于对照组($P < 0.05$)。

4 不良反应 治疗组治疗过程中未发现任何不良反应。

讨 论 功能性消化不良属中医脾胃痛、痞证范畴, 为脾胃气阴不足、肝旺疏泄失常。益心安胃汤基于此病机而设, 方中熟地、当归、茯苓、远志、川芎补心安神; 党参、白术、茯苓健脾益气养胃; 柴胡、郁金、枳壳疏肝理气解郁; 半夏、干姜、黄连辛苦苦降, 使中焦气机得以升降, 能和胃降逆除痞, 全方共奏补心安神疏肝健脾和胃降逆之功效。

(收稿: 2005-01-08 修回: 2005-08-10)

作者单位: 河南省鹤壁市鹤煤集团总医院(河南 458000)