

寿胎丸对去势大鼠雌激素水平及骨形态计量学的影响

吴成林, 陈京萍, 程菊芬, 梁 朗, 朱淑惠(广州中医药大学门诊部, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察寿胎丸对去势大鼠血清雌激素水平和骨形态计量学参数的影响。**方法** 84 只雌性 SD 大鼠随机分为 6 组, 除假手术组外, 其余 5 组建立去势模型(均行双侧卵巢切除术), 寿胎丸高、中、低剂量组每天灌胃剂量分别为 26.8, 13.4, 6.7 g·kg⁻¹ 的药液, 阳性对照药戊酸雌二醇组灌胃剂量为 0.104 mg·kg⁻¹ 的药液, 假手术组与模型组予等量生理盐水灌胃。于术后 12 周处死动物, 取静脉血检测血清雌二醇(E₂)水平; 获取右侧胫骨标本测定骨形态计量学参数。**结果** 与假手术组比较, 模型组血清 E₂ 水平下降且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 寿胎丸高、中、低剂量组及戊酸雌二醇组血清 E₂ 水平均有明显升高 ($P < 0.05$); 寿胎丸高、中剂量组及戊酸雌二醇组血清 E₂ 水平与寿胎丸低剂量组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与假手术组及模型组比较, 各给药组在骨矿化沉积率无明显变化 ($P > 0.05$); 与模型组比较, 各给药组骨小梁面积百分数、骨小梁厚度、骨小梁密度、骨表面骨形成率、骨体积骨形成率升高, 骨小梁分离度及破骨细胞数则降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。血清 E₂ 水平与骨形态计量学中骨小梁面积百分数、骨小梁厚度、骨小梁密度、骨小梁分离度、骨表面骨形成率、骨体积骨形成率、破骨细胞数明显相关 ($P < 0.05$)。**结论** 雌激素水平与绝经后骨质疏松骨组织的微观结构改变密切相关。寿胎丸中、高剂量可提高血清 E₂ 水平, 改善骨组织微观结构、抑制骨结构退化、促进骨形成、抑制骨吸收。

关键词: 寿胎丸; 雌激素; 骨形态计量学; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)03-0295-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.014

Effects of Shoutai Pills on Estrogen Level and Bone Histomorphometry in Ovariectomized Rats

WU Chenglin, CHEN Jingping, CHENG Jufen, LIANG Lang, ZHU Shuhui(Out-patient Department of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of Shoutai pills (SP) on estrogen level and bone histomorphometry parameters in ovariectomized rats. **Methods** A total of 84 female healthy SD rats were randomly divided into 6 groups. A sham operation group was set up, and rats in the other groups were given bilateral oophorectomy. SP at the dosages of 26.8, 13.4, 6.7 g·kg⁻¹ and Progynova at the dosage of 0.104 mg·kg⁻¹ were administered to the rats separately by intragastric administration according to the experimental design. Sham operation group and ovariectomized model group were given intragastric administration of equal volume of saline. The rats were executed 12 weeks after the operation. The estradiol level in venous blood was detected, and the bone histomorphometry parameters of right tibia were also evaluated. **Results** There was significant difference of estrogen level ($P < 0.05$) between sham operation group and model group. Compared to the model group, estrogen level in all of the medicinal intervention groups were significantly increased ($P < 0.05$). Differences of estrogen level between high-, middle-dosage SP groups and Progynova group showed statistical significance ($P < 0.05$). Estrogen level in low-dosage SP group was significantly lower than that in the other three medication groups ($P < 0.05$). Bone mineralization deposition rate in sham operation group and model group did not differ from that in the four medication groups ($P > 0.05$). When compared with the model group, the medication groups had high trabecular bone area percentage(% TbAr), trabecular bone thickness(TbTh), trabecular bone number(TbN), bone formation rate of bone surface, and bone formation rate of bone volume, but had low

收稿日期: 2014-01-19

作者简介: 吴成林, 男, 主治医师, 研究方向: 骨质疏松的中医药研究。Email: 110953793@qq.com。通讯作者: 朱淑惠, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 生殖健康与生殖障碍的中医药研究。Email: zsh0763@126.com。

基金项目: 广东省中医药局科研课题(20132119); 教育部高等学校博士点基金(20114425120016)。

trabecular bone resolution and osteoclast number ($P < 0.05$). Serum estrogen level was closely correlated with most of bone histomorphometry parameters. **Conclusion** The estrogen level shows significant correlation with most of bone histomorphometry parameters. Application of middle- and high-dosage SP could improve estrogen level, enhance bone microstructure, inhibit bone structure degradation, promote bone formation and restrain bone resorption.

Keywords: Shoutai pills; Estrogen; Bone histomorphometry; Rats

绝经后骨质疏松症是绝经后妇女的高发病症, 为多因素性疾病, 雌激素的缺乏、遗传因素、营养状况、生活习惯、体格锻炼、月经周期紊乱、绝经早于 40 岁等因素均与发病相关^[1]。绝经后雌激素缺乏则是绝经后骨质疏松症发生的重要原因, 绝经后妇女在第 1 个 5~7 年中骨的丢失以每年 1%~5% 的速度递增, 结果导致骨小梁的减少, 容易出现骨质疏松性骨折。约 1/3 绝经后妇女患有骨质疏松症, 其与卵巢合成的激素水平降低有关^[2]。中医理论认为肾虚是骨质疏松的根本原因, 故中医药治疗以“肾主骨”为理, 以“补肾”为法。寿胎丸为补肾安胎之代表方, 出自清代张锡纯《医学衷中参西录》, 由菟丝子、桑寄生、续断、阿胶 4 味药组成, 临床用于治疗先兆流产、反复自然流产疗效确切、显著^[3-5]。本研究在天癸理论指导下, 以“肾-冲任-天癸”生殖轴与“肾主骨生髓”相结合, 建立 SD 大鼠双侧卵巢切除模型, 以寿胎丸进行干预, 观察大鼠雌激素水平及骨形态计量学指标, 研究其预防绝经后骨质疏松的可行性。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 SPF 级雌性 SD 大鼠, 10~12 周龄, 体质量 180~230 g, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 实验动物使用许可证号: 44005900000816。84 只大鼠随机分为 6 组(每组 14 只): 假手术组, 模型组, 寿胎丸高、中、低剂量组, 阳性对照药戊酸雌二醇组。

1.2 建立去势大鼠模型^[6] 模型组及各给药组大鼠, 采用浓度为 3% 的戊巴比妥钠溶液(佛山市化工实验厂, 批号: F860901)腹腔注射麻醉, 75% 酒精消毒, 取下腹部正中切口, 进入腹腔后探查并摘除双侧卵巢, 结扎残端; 术后 3 d 予青霉素 5 万单位肌肉注射预防感染。术后第 5 天起, 每天行阴道分泌物细胞学涂片检查, 连续 9 d, 涂片无周期性变化, 提示去势彻底。假手术组大鼠手术方法同上, 仅切除双侧卵巢旁边一小块脂肪。

1.3 药物 寿胎丸水煎剂制备: 每剂含饮片 200 g(购

于康美药业股份有限公司, 批号: 121002111、121000211), 按菟丝子: 桑寄生: 续断: 阿胶 = 2: 1: 1: 1 的比例, 菟丝子、桑寄生、续断 3 味药加水 750 mL, 水提 1 次, 煎至 150 mL, 阿胶烊化。4 味药水煎液水浴浓缩至 100 mL, 浓度为 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。戊酸雌二醇片(补佳乐, 拜耳医药保健有限公司广州分公司, 批号: 077A2), 溶于蒸馏水中, 定溶为 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药液备用。

1.4 给药方法 各组于术后 2 周开始灌胃给药, 以后每隔 24 h 给药 1 次。假手术组及模型组予生理盐水, 每天按 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃, 连续 10 周; 寿胎丸高、中、低剂量组按 26.8, 13.4, 6.7 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃, 连续 10 周。戊酸雌二醇组按 $0.104 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃, 连续 10 周。所有动物处死前 14、13 天腹腔注射四环素 2 次(美国 Sigma 公司, 批号: 2230417) $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 于处死前 4、3 天腹腔注射钙黄绿素 2 次(Adamas, 批号: 24495A) $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.5 指标检测

1.5.1 检测血清雌二醇(E_2)水平 卵巢切除术后 12 周麻醉后眼眶后静脉丛取血 5 mL, 分离血清, -20°C 保存, 以全自动电化学发光免疫分析仪(罗氏 Cobase 601, 瑞士)完成检测步骤。

1.5.2 骨形态计量学检测 大鼠处死后, 获取右侧胫骨完整标本, 4% 甲醛固定过夜, 乙醇脱水后聚甲基丙烯酸甲酯(佛山市化工实验厂, 批号: 8307282)包埋; 使用硬组织切片(ZEISS, 德国)机获取胫骨近端干骺部 $5 \mu\text{m}$ 及 $10 \mu\text{m}$ 骨切片。 $5 \mu\text{m}$ 骨切片于 Goldner 染色, $10 \mu\text{m}$ 骨切片采用透明封固。采用全自动图像数字化分析仪(leica, 德国)按照《骨质疏松实验动物研究》^[7]中的方法进行检测计算。采用 $5 \mu\text{m}$ 切片测量静态参数, 包括: 骨小梁面积百分数(% TbAr)、骨小梁厚度(TbTh)、骨小梁数量(TbN)、骨小梁分离度(TbSp)。采用 $10 \mu\text{m}$ 切片测量动态参数, 包括: 骨矿化沉积率(MAR)、骨表面骨形成率(BFR/S)、骨体积骨形成率(BFR/V)、破骨细胞数(OcN/ mm^2)。

1.6 统计学处理方法 采用 SPSS 17.0 软件, 计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间差异采用方差分析, 分析雌激素水平与骨形态计量学参数采用相关性分析, 检验水平为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 寿胎丸对去势大鼠雌激素水平的影响 见表 1。与假手术组比较, 模型组血清 E_2 水平明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 寿胎丸高、中、低剂量组及戊酸雌二醇组血清 E_2 水平均有明显升高 ($P < 0.05$), 提示药物干预可明显逆转卵巢切除导致的 E_2 水平降低。寿胎丸高、中剂量组及戊酸雌二醇组血清 E_2 水平与寿胎丸低剂量组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 寿胎丸对去势大鼠血清 E_2 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=14$)
Table 1 Effects of Shou Tai Wan on serum E_2 levels in ovariectomized rats

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	体质量 /g	E_2 /ng·L ⁻¹
假手术组	-	308.43 ± 15.77	60.96 ± 4.51
模型组	-	364.24 ± 12.47	32.09 ± 2.38 [△]
寿胎丸高剂量组	26.8	343.62 ± 15.08	59.37 ± 4.59 ^{*#}
寿胎丸中剂量组	13.4	339.68 ± 11.95	57.96 ± 4.87 ^{*#}
寿胎丸低剂量组	6.7	358.26 ± 13.17	42.94 ± 2.98 [*]
戊酸雌二醇组	10.4 × 10 ⁻⁴	341.83 ± 12.04	58.54 ± 4.43 ^{*#}

注: 与假手术组比较, [△] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与寿胎丸低剂量组比较, [#] $P < 0.05$ 。

2.2 寿胎丸对去势大鼠骨形态计量学参数的影响

2.2.1 静态参数 见表 2。与假手术组比较, 模型组骨小梁面积百分数、骨小梁厚度、骨小梁密度均明显下降, 骨小梁分离度则升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组骨小梁面积百分数、厚度及密度均明显升高, 骨小梁分离度则降低 ($P < 0.05$)。寿胎丸高、中剂量组及戊酸雌二醇组与寿胎丸低剂量组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2.2 动态参数 见表 3。各组骨矿化沉积率均无明显变化 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 各给药组骨表面骨形成率、骨体积骨形成率升高, 破骨细胞数降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。寿胎丸高、中剂量组及戊酸雌二醇组与寿胎丸低剂量组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 大鼠血清 E_2 水平与骨形态计量学参数的相关性分析 见表 4。大鼠血清 E_2 水平与骨小梁面积百分数、骨小梁厚度、骨小梁密度、骨小梁分离度、骨表面

表 2 寿胎丸对去势大鼠骨形态计量学静态参数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=14$)
Table 2 Effects of Showtai Pills on bone histomorphometry static parameters in ovariectomized rats

组别	骨小梁面积百分数 /%	骨小梁厚度 / μ m	骨小梁密度 (#/mm)	骨小梁分离度 (μ m)
假手术组	13.52 ± 2.37	71.84 ± 2.43	2.64 ± 0.18	499.86 ± 82.47
模型组	6.03 ± 1.16 [△]	50.73 ± 4.55 [△]	0.86 ± 0.14 [△]	1468.31 ± 110.75 [△]
寿胎丸高剂量组	14.29 ± 1.92 ^{*#}	71.31 ± 2.95 ^{*#}	2.64 ± 0.21 ^{*#}	555.96 ± 73.82 ^{*#}
寿胎丸中剂量组	13.31 ± 1.64 ^{*#}	69.75 ± 2.16 ^{*#}	2.53 ± 0.32 ^{*#}	489.09 ± 98.03 ^{*#}
寿胎丸低剂量组	8.80 ± 2.71 [*]	59.40 ± 4.29 [*]	1.39 ± 0.32 [*]	898.51 ± 84.35 [*]
戊酸雌二醇组	12.88 ± 2.07 ^{*#}	72.41 ± 2.70 ^{*#}	2.50 ± 0.17 ^{*#}	553.44 ± 124.37 ^{*#}

注: 与假手术组比较, [△] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与寿胎丸低剂量组比较, [#] $P < 0.05$ 。

表 3 寿胎丸对去势大鼠骨形态计量学动态参数的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 3 effects of Showtai Pills on bone histomorphometry dynamic parameters in ovariectomized rats

组别	骨矿化沉积率 /%	骨表面骨形成率 /%	骨体积骨形成率 /%	破骨细胞数 (OcN/mm ²)
假手术组	1.22 ± 0.28	22.33 ± 2.25	237.11 ± 27.07	11.81 ± 3.24
模型组	1.28 ± 0.20	8.46 ± 1.97 [△]	107.49 ± 21.56 [△]	22.19 ± 6.74 [△]
寿胎丸高剂量组	1.14 ± 0.17	21.26 ± 2.72 ^{*#}	226.25 ± 24.41 ^{*#}	11.74 ± 2.79 ^{*#}
寿胎丸中剂量组	1.18 ± 0.29	19.46 ± 2.08 ^{*#}	224.03 ± 13.65 ^{*#}	10.82 ± 1.38 ^{*#}
寿胎丸低剂量组	1.25 ± 0.31	13.99 ± 2.21	156.15 ± 17.23	18.09 ± 4.24
戊酸雌二醇组	1.36 ± 0.40	19.54 ± 1.91 ^{*#}	234.51 ± 18.98 ^{*#}	12.13 ± 1.84 ^{*#}

注: 与假手术组比较, [△] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与寿胎丸低剂量组比较, [#] $P < 0.05$ 。

骨形成率、骨体积骨形成率、破骨细胞数等骨形态计量学参数均呈明显相关性 ($P < 0.05$), 且与骨小梁面积百分数、骨小梁厚度、骨小梁密度、骨表面骨形成率、骨体积骨形成率呈正相关, 与骨小梁分离度、破骨细胞数呈负相关。大鼠血清 E_2 水平与骨矿化沉积率无明显相关性 ($P > 0.05$)。

表 4 大鼠血清 E_2 水平与骨形态计量学参数的相关性分析
Table 4 Correlation analysis of rats serum E_2 level and bone histomorphometry parameters

	ThAr/%	TbTh	TbN	TbSp	MAR	BFR/S	BFR/V	OCN _o
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.354	0.000	0.000	0.000
Pearson 相关系数	0.768	0.847	0.893	-0.888	-0.101	0.850	0.856	-0.729

3 讨论

雌激素水平的下降是绝经后骨质疏松发病的主要原因。绝经后骨质疏松的病理特点是骨矿含量和骨基质成分等比例地减少, 骨皮质变薄, 骨小梁减少变细, 骨吸收和骨形成均增强, 以骨吸收为主, 从而表现为高转换型骨质疏松^[8]。在细胞水平, 破骨

细胞通过刺激产生酸和酶,溶解骨矿物质和蛋白,从而促进骨吸收;成骨细胞通过产生基质蛋白构成主要的胶原,钙化后,形成矿物质沉积的骨组织,最终促进骨形成。如骨吸收和骨形成不平衡则出现骨丢失,导致骨量减少,骨折危险性增加^[9]。雌激素缺乏时,体内甲状旁腺素分泌减少,导致活性维生素D在肾脏内的转化减少,使肠道对钙的吸收减少,进而骨生成原料不足导致骨质疏松症^[10]。

对于绝经后骨质疏松症的治疗,一般以药物、运动及物理疗法为主。西药大致可分为两大类:一类为以抑制骨吸收为主的骨吸收抑制剂如雌激素、钙剂、降钙素、双磷酸盐及活性维生素D等;另一类为促进骨形成为主的骨形成促进剂如氟化物、生长激素、雄激素、合成蛋白同化激素、维生素K等。但实际治疗过程中仍存在疗效不理想,价格高、副作用大等缺点。中医古籍中虽无记载骨质疏松这一病名,但根据其临床症状,如全身或腰背疼痛、易发生骨折、驼背等将其归类为“骨痹”、“骨痿”。关于本病的病因病机多集中在脾肾亏虚,肾亏为主,脾虚为辅,血瘀为促进因素。“肾为先天之本”、“肾主骨生髓”,肾虚是骨质疏松的根本原因,肾精充足,则骨髓化生有源,骨骼得到充分滋养而坚固有力;反之,肾精亏少,骨失濡养,引发骨质疏松。寿胎丸为补肾经方,临床常用于安胎,方中菟丝子补肾益精,肾旺自能荫胎;桑寄生、续断补肝肾,固冲任,使胎气强壮;阿胶滋养阴血,使冲任血旺,则胎气自固。四药相配,共奏补肾安胎之功。在以往的研究中发现,寿胎丸可提高孕激素及雌激素水平,对“肾-冲任-天癸”的整体调节可能是其作用机制,但寿胎丸对骨的微观结构改变的作用尚未有研究报道。

在本研究中,通过大鼠双侧卵巢切除,建立了绝经后骨质疏松模型,与假手术组比较,模型组在血清E₂水平、骨小梁面积百分数、骨小梁厚度、骨小梁密度、骨小梁分离度、骨表面骨形成率、骨体积骨形成率、破骨细胞数方面与假手术组比较差异均有统计学意义,从而证实模型建立成功。通过给予寿胎丸干预,结果显示可明显提高血清E₂水平,逆转卵巢切除导致的雌激素水平下降,使其维持在正常水平;在骨形态计量学静态参数方面,寿胎丸可明显改善骨小梁面积百分数、骨小梁厚度、骨小

梁密度,降低骨小梁分离度,从而促进骨形成,抑制骨结构退化;在骨形态计量学动态参数方面,寿胎丸可通过增加骨表面骨形成率、骨体积骨形成率,减少破骨细胞数促进骨形成、抑制骨吸收,从而抑制绝经后骨质疏松的高转换状态。对血清E₂水平与骨形态计量学相关参数进行相关性分析,结果显示血清E₂水平与骨形态计量学绝大部分参数明显相关,证实了雌激素水平与骨的微观结构密切联系,提示寿胎丸治疗绝经后骨质疏松的作用机制。

综上所述,雌激素水平与绝经后骨质疏松骨组织的微观结构改变密切相关。寿胎丸中、高剂量均可通过提高血清E₂水平改善骨组织微观结构、抑制骨结构退化、促进骨形成、抑制骨吸收。但寿胎丸改善血清雌激素水平的具体作用机制需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Emre Okyay, Caglan Ertugrul, Berrin Acar, et al. Comparative evaluation of serum levels of main minerals and postmenopausal osteoporosis[J]. *Maturitas*, 2013, 76(4): 320-325.
- [2] Toshio Hayashi, Koichiro Ina, Morihiko Maeda, et al. The effects of selective estrogen receptor modulator treatment following hormone replacement therapy on elderly postmenopausal women with osteoporosis[J]. *Nitric Oxide*, 2011, 24(4): 199-203.
- [3] 周英,叶敦敏.寿胎丸合失笑散治疗肾虚血瘀型先兆流产的临床疗效观察[J]. *广州中医药大学学报*, 2006, 23(1): 25-29.
- [4] 丁琴音.寿胎丸加味治疗先兆流产、习惯性流产62例[J]. *江西中医药*, 1999, 30(2): 23.
- [5] 曾诚,岳明明.试论先兆流产的中医证型分布规律[J]. *中国中医药信息杂志*, 2002, 9(8): 5-8.
- [6] 朱淑惠,曹越,罗颂平.寿胎丸调控大鼠卵巢移植急性排斥期细胞凋亡的研究[J]. *吉林中医药*, 32(5): 493-495.
- [7] 李青南.骨质疏松实验动物研究-骨组织形态计量学[M].成都:四川大学出版社,2001:24-43.
- [8] Michaël Laurent, Evelien Gielen, Frank Claessens, et al. Osteoporosis in older men: Recent advances in pathophysiology and treatment[J]. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013, 27(4): 527-539.
- [9] Yoshinori Matsumoto, Fumio Otsuka, Mariko Takano-Narazaki, et al. Estrogen facilitates osteoblast differentiation by upregulating bone morphogenetic protein-4 signaling[J]. *Steroids*, 2013, 78(5): 513-520.
- [10] Stig Andersen, Peter Laurberg. Age discrimination in osteoporosis screening—Data from the Aalborg University Hospital Record for Osteoporosis Risk Assessment (AURORA)[J]. *Maturitas*, 2014, 77(4): 330-335.

(编辑:邓响潮)