

加味当归补血片对围绝经期综合征大鼠骨骼及雌性激素的影响

雷高¹, 陈志维^{2,3}, 潘亚伟¹, 罗德民¹, 詹丽玲²,
张丁城¹, 方国芳¹, 黎玉翠³, 孙朝跃³

1. 东莞康华医院, 广东 东莞 523080
2. 广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808
3. 广州中医药大学, 广东 广州 510006

[摘要] 目的: 观察加味当归补血片对围绝经期综合征大鼠骨骼及相关雌性激素的影响, 为临床防治围绝经期综合征提供理论依据。方法: 取雌性自然衰老 SD 大鼠 48 只, 随机分为 6 组, 分别为衰老模型组、西药阳性组、中药阳性组、中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组。各给药组分别灌胃相应浓度的药物, 衰老模型组灌胃等体积蒸馏水。连续给药 4 个月。测定骨密度、骨小梁面积、骨小梁面积率、骨小梁个数、血清雌二醇 (E_2)、卵泡刺激素 (FSH)、促黄体素 (LH) 等指标。结果: 与衰老模型组比较, 西药阳性组全身骨密度、左股骨颈骨密度、骨小梁面积、骨小梁面积率、骨小梁个数、 E_2 水平、子宫系数显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 中药阳性组全身骨密度、右股骨骨密度、骨小梁面积、骨小梁面积率、骨小梁个数升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 中药高剂量组骨小梁面积、骨小梁面积率、骨小梁个数、 E_2 水平、LH 水平升高, FSH 水平下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 中药中剂量组全身骨密度、右股骨骨密度、骨小梁面积、骨小梁面积率、骨小梁个数、 E_2 水平、LH 水平升高, FSH 水平下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 中药低剂量组 E_2 水平升高, FSH 水平下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 加味当归补血片能显著缓解围绝经期综合征大鼠骨骼和雌性激素的变化, 值得临床应用和推广。

[关键词] 加味当归补血片; 围绝经期综合征; 自然衰老 SD 大鼠; 骨密度; 骨小梁; 雌性激素; 动物实验

[中图分类号] R285

[文献标志码] A

[文章编号] 0256-7415 (2016) 11-0218-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.11.093

Effect of Modified Angelica Blood-enriching Tablets on Bones and Estrogen in Rats with Climacteric Syndrome

LEI Gao, CHEN Zhiwei, PAN Yawei, LUO Demin, ZHAN Liling,
ZHANG Dingcheng, FANG Guofang, LI Yucui, SUN Chaoyue

Abstract: Objective: To observe the effect of modified angelica blood-enriching tablets on bones and relevant estrogen in rats with climacteric syndrome, and provide theoretical and experimental basis for the clinical treatment of climacteric syndrome. Methods: Took out 48 female natural aging SD rats and divided them into six groups. They were aging model group, western positive medicine group, Chinese positive medicine group, Chinese medicine high dosage group, Chinese medicine middle dosage group, Chinese medicine low dosage group. Each group was given medicine of corresponding dosage respectively for 4 months orally, and aging model group received distilled water of equal volume for 4 months. Measured indexes such as the density of bone, the trabecular bone area, the rate of trabecular bone area, the volume of trabecular bone, serum estradiol (E_2), follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH). Results: The general bone mineral density, density of the left femoral bone and left cervical bone, trabecular bone area, rate of trabecular bone area, volume of trabecular bone, E_2 levels, uterus coefficient of western positive medicine group, comparing with those of aging model group, were increased obviously ($P < 0.05$). The general bone mineral density, density of the right femoral bone, trabecular bone area, rate of trabecular bone area, volume of trabecular bone of Chinese positive medicine group were raised

[收稿日期] 2016-05-26

[基金项目] 东莞市医疗卫生单位科技计划项目 (2012105102012)

[作者简介] 雷高 (1946-), 男, 主任医师, 研究方向: 骨科、显微外科、脊柱外科。

[通讯作者] 陈志维, E-mail: vitas_chan@126.com。

($P < 0.05$, $P < 0.01$). The trabecular bone area, rate of trabecular bone area, volume of trabecular bone, E_2 levels and LH levels of Chinese medicine high dosage group were increased, while FSH levels was declined, differences being significance ($P < 0.05$, $P < 0.01$). For Chinese medicine middle dosage group, the general bone mineral density, density of the right femoral bone, trabecular bone area, rate of trabecular bone area, volume of trabecular bone, E_2 levels and LH levels were raised, but FSH levels was decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Comparing with aging model group, there were significant differences Chinese medicine low dosage group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), in which the E_2 levels was increased, but FSH level was decreased. Conclusion: Modified angelica blood-enriching tablets can obviously relieve the variations in bones and relevant estrogen in rats with climacteric syndrome, and it is worth applying and popularizing clinically.

Keywords: Modified angelica blood-enriching tablets; Climacteric syndrome; Natural aging SD rats; Density of bone; Trabecular bone; Estrogen; Animal experiment

围绝经期综合征又称更年期综合征,指妇女绝经前后出现性激素波动或减少所致的一系列以自主神经系统功能紊乱为主,伴有神经心理症状的一组症候群,常见症状有潮热、失眠、烦躁、耳鸣及骨质疏松等^[1]。加味当归补血片是由当归、黄芪、淫羊藿3味中药精制而成,具有补气生血作用,可用于治疗肾气渐衰,冲任二脉虚惫,阴阳失调,气血两虚而引起的头昏耳鸣、心悸失眠、烦躁易怒、抑郁焦虑、潮热汗出等症状。本试验采用了11月龄大鼠作为自然衰老模型,在11月龄时,大鼠已出现排卵不规则和反复的假孕,提示其卵巢功能已开始下降,此时开始给药,以反映加味当归补血片对围绝经期综合征大鼠的预防及治疗作用。

1 实验材料与方法

1.1 实验药物与试剂 加味当归补血片(当归、淫羊藿各500g,黄芪100g三味中药精制而成,每片0.46g):广州中医药大学新药开发研究中心提供,批号20071201。西药阳性药倍美力(PREMARIN)片:0.625mg/片,爱尔兰惠氏药厂生产,批号071207。中药阳性药右归丸:河南省宛西制药股份有限公司生产,批号071004。 β -内啡肽:北京普尔伟业生物科技有限公司提供,批号:081024。卵泡刺激素(批号025382)、促黄体素(批号028520)、雌二醇(批号002871)ELISA试剂盒:北京科美雅生物技术有限公司提供。

1.2 实验仪器 骨密度测量仪(美国GE公司生产型号Lunar Prodigy), 放免 γ 测量仪(上海日环仪器厂生产,型号TSN-695B), 倒置荧光相差数码照相显微镜(Nikon公司生产,型号TE2000-S), 全自动石蜡切片机(德国徕卡公司生产,型号KM2255), 石蜡包埋机(德国徕卡公司生产,型号EG1140)。

1.3 实验动物分组及给药 自然衰老SD大鼠(11月龄),雌性,SPF级,由广东省医学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(粤)2003-0002,合格证号:0031821。取雌性自然衰老大鼠(11月龄)48只,适应性饲养15天(即至11.5月龄)时,随机分为衰老模型组、西药阳性组、中药阳性组、中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组,每组8只。所有大鼠灌胃给药,给药量按1mL/100g体重,每天1次。中药高、中、

低剂量组分别灌胃不同浓度的加味当归补血片(研磨后加蒸馏水配制),相当于0.22g、0.11g、0.055g生药/mL,西药阳性组灌胃倍美力(研磨后加蒸馏水配制),为10.42 μ g/mL,中药阳性组灌胃右归丸(加蒸馏水超声配制成混悬液),为0.45g/mL,衰老模型组给予等体积蒸馏水。连续给药4个月,末次给药后动物禁食12h。

1.4 统计学方法 所有数据用SPSS17.0统计软件包分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 检测指标

2.1 骨密度(BMD)测定 麻醉后采用DEXA法测定大鼠全身骨密度、腰椎骨密度、双侧股骨颈骨密度以及双侧股骨骨密度,因为一般情况下,随年龄增长,股骨颈区域的骨密度比股骨骨密度下降的更为迅速^[2]。

2.2 骨小梁面积、骨小梁面积率的测定及骨小梁计数 取2-4腰椎,10%甲醛固定,常规石蜡包埋切片,HE染色,用图像分析软件测定骨小梁面积及骨小梁面积率。每片随机观察椎体三个视野(放大10倍),计算视野内骨小梁个数,取平均值。

2.3 血清雌二醇(E_2)、卵泡刺激素(FSH)、促黄体素(LH)的测定 腹主动脉采血,离心取上清液,保存于-20℃冰箱,用放射免疫分析法(RIA法)测定血清中 E_2 、FSH、LH含量。具体操作按试剂盒说明书进行。

2.4 肾上腺、子宫、卵巢、阴道脏器系数测定 解剖取相应脏器,称重,按如下公式计算:脏器系数(%)=脏器湿重(g)/体重(g) \times 100%。

3 实验结果

3.1 各组大鼠骨密度(BMD)结果比较 见表1。与衰老模型组比较,西药阳性组全身、左股骨颈骨密度显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);中药阳性组和中药中剂量组全身、右股骨骨密度显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3.2 各组大鼠骨小梁面积、骨小梁个数、骨小梁面积率结果比较 见表2。与衰老模型组比较,西药阳性组、中药阳性组及中药高、中剂量组骨小梁面积、骨小梁面积率、骨小梁个数升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),中药低剂量

组无显著差异。

表1 各组大鼠骨密度(BMD)结果比较($\bar{x} \pm s$)g/cm²

组别	n	全身	腰椎	左股骨颈	右股骨颈	左股骨	右股骨
衰老模型组	8	0.173±0.014	0.202±0.026	0.222±0.013	0.226±0.019	0.205±0.017	0.202±0.014
西药阳性组	8	0.184±0.006	0.210±0.014	0.238±0.015	0.228±0.014	0.214±0.010	0.213±0.012
中药阳性组	8	0.187±0.007	0.212±0.019	0.227±0.013	0.222±0.015	0.217±0.015	0.216±0.011
中药高剂量组	8	0.183±0.011	0.216±0.026	0.228±0.012	0.228±0.016	0.209±0.015	0.213±0.017
中药中剂量组	8	0.186±0.010	0.214±0.016	0.228±0.021	0.227±0.020	0.211±0.020	0.219±0.033
中药低剂量组	8	0.181±0.007	0.221±0.017	0.222±0.022	0.222±0.019	0.207±0.010	0.210±0.009

与衰老模型组比较, ①P<0.05

表2 各组大鼠骨小梁面积、骨小梁个数、骨小梁面积率结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	骨小梁面积(μm ²)	骨小梁个数(个)	骨小梁面积率(%)
衰老模型组	8	130811.8±23206.2	17.0±4.2	0.302±0.054
中药阳性组	8	244459.6±19986.8	20.8±3.0	0.564±0.047
西药阳性组	8	229953.8±21516.3	21.1±4.0	0.531±0.048
中药高剂量组	8	238970.6±55800.4	22.3±6.4	0.551±0.128
中药中剂量组	8	186114.0±31058.0	20.9±4.1	0.429±0.071
中药低剂量组	8	164330.6±47739.3	18.6±3.5	0.379±0.110

与衰老模型组比较, ①P<0.05, ②P<0.01

3.3 各组大鼠血清 E₂、FSH、LH 含量结果比较 见表3。与衰老模型组比较, 西药阳性组 E₂ 水平升高, 差异有统计学意义(P<0.01); 中药高、中、低剂量组 E₂ 水平显著升高, FSH 水平降低, 差异有统计学意义(P<0.05, P<0.01), 中药高、中剂量组 LH 水平升高, 差异有统计学意义(P<0.05)。

表3 各组大鼠血清 E₂、FSH、LH 含量结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	E ₂ (pmoL/L)	FSH(IU/L)	LH(IU/L)
衰老模型组	8	34.45±13.38	6.57±0.58	8.04±2.03
西药阳性组	8	80.69±40.79	5.60±0.86	7.57±1.27
中药阳性组	8	44.13±17.94	5.71±1.66	8.45±2.25
中药高剂量组	8	63.23±19.91	4.62±0.46	9.70±1.43
中药中剂量组	8	50.69±13.99	3.82±1.05	9.81±1.40
中药低剂量组	8	59.33±33.53	3.80±1.04	8.19±1.86

与衰老模型组比较, ①P<0.05, ②P<0.01

3.4 各组大鼠肾上腺、卵巢、子宫、阴道系数结果比较 见表4。与衰老模型组比较, 西药阳性组子宫系数显著升高, 差异有统计学意义(P<0.01), 其余各给药组无显著性差异。

4 讨论

围绝经期综合征又称更年期综合征, 是妇科多发病, 发病率达到 87%, 严重威胁女性健康^[3-4]。现代医学多采用激素替代疗法, 虽有缓解围绝经期症状等作用, 但长期使用激素会产生明显的不良反应^[5]。中药复方在治疗围绝经期综合征上可以发挥很好的作用, 避免了激素的不良反应, 疗效确切, 显示了

表4 各组大鼠肾上腺、卵巢、子宫、阴道系数结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肾上腺	卵巢	子宫	阴道
衰老模型组	8	0.0158±0.0013	0.0327±0.0060	0.2028±0.0381	0.0804±0.0161
西药阳性组	8	0.0179±0.0031	0.0399±0.0110	0.2938±0.0541	0.0891±0.0164
中药阳性组	8	0.0178±0.0038	0.0379±0.0073	0.2161±0.0304	0.0953±0.0179
中药高剂量组	8	0.0165±0.0017	0.0338±0.0072	0.2178±0.0341	0.0900±0.0273
中药中剂量组	8	0.0160±0.0029	0.0387±0.0087	0.2192±0.0400	0.0915±0.0184
中药低剂量组	8	0.0164±0.0028	0.0384±0.0111	0.2087±0.0218	0.0852±0.0087

与衰老模型组比较, ①P<0.01

良好的应用前景^[6-7]。

围绝经期综合征病机与卵巢功能下降、性激素分泌相对减少、骨质结构变化等有关^[8]。从中医角度来说, 围绝经期综合征的病位主要以肝、肾为主, 病性以阴虚、气滞、血虚为主, E₂ 水平与血虚有关, LH 和 FSH 与肝气滞相关^[9]。研究证明, 在围绝经期综合征发生过程中, FSH 水平会出现升高, 而 E₂ 与 LH 水平则会下降^[10]。围绝经期妇女由于性激素水平下降, 同时失去了性激素对骨转换的直接抑制以及骨吸收相对增加, 导致骨丢失比较严重, 而性激素缺乏是引起骨质疏松最重要的危险因素^[11]。加味当归补血片是在当归补血汤的基础上, 依据中医药理论, 加淫羊藿而制成的现代方剂。本课题组前期研究发现, 加味当归补血片具有显著的类雌激素活性, 能发挥雌激素作用却不会促进乳腺细胞的增殖, 同时能增强碱性磷酸酶活性, 上调骨骼生长基因表达, 促进骨骼细胞分化和生长^[12]。

本实验结果显示, 加味当归补血片能够显著升高衰老大鼠的 E₂ 与 LH 水平, 同时降低 FSH 水平, 说明加味当归补血片可以调节衰老大鼠的雌性激素水平; 加味当归补血片可增加衰老大鼠的骨密度、骨小梁面积、数量, 从一定程度上减缓衰老大鼠骨质疏松, 缓解衰老大鼠骨小梁结构退化。综上所述, 加味当归补血片在治疗女性围绝经期综合征具有广阔的开发前景, 可以开发出疗效显著的治疗围绝经期综合征的药物, 但是, 其具体的作用机制尚不明确, 有待进一步实验研究。

[参考文献]

- [1] Li Qiong, Shu Yi-qiong, Lai Hui-hong, et al. Clinical Observation on Zhengnan Xifeng Decoction in Treating Peri-Menopausal Syndrome [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2003, 9(1): 63-66.
- [2] 张勤, 李力, 谭雯文, 等. 股骨颈上部区域与腰椎及双侧股骨上端骨密度的相关性研究[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(20): 3695-3697.
- [3] Qian LQ, Wang B, Niu JY, et al. Assessment of the Clinical Effect of Chinese Medicine Therapy Combined with Psychological Intervention for Treatment of Patients of Peri-menopausal Syndrome Complicated with Hyperlipidemia [J]. Chin J Integr Med, 2010, 16(2): 124-130.
- [4] He Jin-sen, Liao Jian-qin, An Xiao-ying, et al. Clinical Efficacy Analysis on Treatment of Peri-menopausal Syndrome with Electroacupuncture [J]. Journal of Acupuncture and Tuina Science, 2006, 4(2): 108-111.
- [5] 关素珍, 尹金鹏, 潘妍, 等. 归芍地黄汤合生脉散治疗围绝经期综合征临床研究[J]. 中药材, 2015, 38(1): 206-208.
- [6] 徐丹, 郑洁莉, 谢波, 等. 复方左归胶囊治疗围绝经期综合征 160 例疗效观察[J]. 中医临床研究, 2014, 6(19): 7-9.
- [7] 赵杰. 中药治疗围绝经期综合征的临床效果及缓解情况分析[J]. 中国医药指南, 2016, 14(5): 206.
- [8] 魏珍珍, 苗明三. 补肾阳中药治疗围绝经期综合征特点分析[J]. 中医学报, 2013, 28(11): 1688-1691.
- [9] 杨敏, 李灿东, 李红, 等. 围绝经期综合征中医证素与性激素水平的相关研究[J]. 中华中医药杂志, 2012, 2: 366-368.
- [10] 严炜. 女性围绝经期综合征中医证型与性激素关系的研究[J]. 福建中医学院学报, 2004, 14(3): 1-4.
- [11] 李亚珍, 杨欣. 性激素对骨细胞功能的调节[J]. 中国妇产科临床杂志, 2006, 7(4): 313-314.
- [12] Gao QT, Choi RC, Cheung AW, et al. Danggui Buxue Tang-A Chinese herbal decoction activates the phosphorylations of extracellular signal-regulated kinase and estrogen receptor alpha in cultured MCF-7 cells [J]. FEBS Lett, 2007, 581(2): 233-240.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)

葛根素对成骨细胞增殖、分化及 I 型胶原 mRNA 表达的影响

王晓晖, 罗向霞, 史晓伟, 张定华

甘肃省中医院内分泌科, 甘肃 兰州 730050

[摘要] 目的: 探讨葛根素 (Pue) 对高糖培养的成骨细胞增殖、分化及 I 型胶原 mRNA (Coll mRNA) 表达的影响, 为临床治疗糖尿病骨质疏松症提供实验依据。方法: 取出生 24 h 内的 SD 大鼠的颅骨, 体外分离培养成骨细胞, 待细胞形态稳定后, 取对数生长期的成骨细胞, 随机分为正常组、高糖组 (葡萄糖浓度 22 mmol/L)、葛根素各浓度组 (葛根素浓度分别为 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L)、高糖加葛根素各浓度组, 每组设 8 个复孔, 分别培养 48 h, 隔天换液并加药。测定成骨细胞的增殖能力、细胞内 ALP 活性以及 Coll mRNA 表达情况。结果: 与正常组比较, 葛根素各浓度组细胞增殖、细胞 ALP 活性、细胞 Coll mRNA 表达均显著增高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 高糖组、高糖+葛根素各浓度组明显低于正常组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与高糖组比较, 高糖+葛根素各浓度组细胞增殖、细胞 ALP 活性、细胞 Coll mRNA 表达均显著增高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 高糖情况下抑制成骨细胞的增殖、分化和 I 型胶原表达, 但加入葛根素后能提高成骨细胞的增殖、分化和 I 型胶原表达, 说明葛根素对糖尿病骨质疏松症有治疗作用。

[关键词] 葛根素; 成骨细胞; 增殖; 分化; I 型胶原; 新生 SD 大鼠; 细胞实验

[中图分类号] R285 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2016) 11-0221-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.11.094

[收稿日期] 2016-06-12

[基金项目] 甘肃省自然科学基金项目 (1308RJZA136)

[作者简介] 王晓晖 (1970-), 女, 副主任医师, 研究方向: 内分泌及代谢性疾病。