

虎潜丸对去卵巢大鼠骨质疏松模型骨密度及转化生长因子 $\beta 1$ 表达的影响

谢义松¹, 张紫铭², 吴官保³, 朱建华², 尤冬春²

(1. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410007; 3. 湖南省中医药研究院附属医院, 湖南 长沙 410006)

摘要 目的:探讨虎潜丸治疗骨质疏松症的作用机制。**方法:**雌性 SD 大鼠 40 只, 体质量 180 ~ 220 g, 中位数 200 g, 随机分为虎潜丸组、雌激素组、模型组、假手术组, 每组 10 只。虎潜丸组、雌激素组、模型组切除双侧卵巢造模。7 d 后, 虎潜丸组予以虎潜丸水煎液灌胃, 雌激素组予以尼尔雌醇混悬液灌胃, 模型组、假手术组予以蒸馏水灌胃; 每 100 g 体质量 0.875 mL, 每日灌胃 1 次, 连续干预 12 周。比较各组大鼠椎骨骨密度及椎骨、肾组织中转化生长因子 $\beta 1$ 的表达。**结果:**虎潜丸组和雌激素组各有 1 只大鼠死亡, 共纳入研究 38 只。干预 12 周后, 各组大鼠椎骨骨密度值比较, 差异有统计学意义 [$(0.210 \pm 0.028) \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$, $(0.205 \pm 0.030) \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$, $(0.171 \pm 0.036) \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$, $(0.205 \pm 0.034) \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$; $F = 7.561$, $P = 0.001$]; 虎潜丸组、雌激素组、假手术组均高于模型组 ($P = 0.002$, $P = 0.002$, $P = 0.013$); 虎潜丸组与雌激素组、假手术组相比, 差异均无统计学意义 ($P = 0.459$, $P = 0.224$); 雌激素组与假手术组相比, 差异无统计学意义 ($P = 0.231$)。各组大鼠椎骨转化生长因子 $\beta 1$ 灰度值比较, 差异无统计学意义 (169.060 ± 5.545 , 167.420 ± 6.238 , 162.400 ± 3.882 , 168.130 ± 7.899 ; $F = 2.176$, $P = 0.109$)。各组大鼠肾组织转化生长因子 $\beta 1$ 光密度值比较, 差异有统计学意义 (172.600 ± 5.019 , 158.200 ± 8.038 , 155.130 ± 4.542 , 157.570 ± 5.524 ; $F = 15.568$, $P = 0.000$); 虎潜丸组高于雌激素组、模型组和假手术组 ($P = 0.000$; $P = 0.000$; $P = 0.000$); 雌激素组与模型组、假手术组比较, 差异均无统计学意义 ($P = 0.478$, $P = 0.490$); 假手术组高于模型组 ($P = 0.038$)。**结论:**虎潜丸可增加大鼠腰椎椎骨骨密度, 上调肾组织中转化生长因子 $\beta 1$ 的表达, 可能是其治疗骨质疏松症的机制之一。

关键词 骨质疏松 骨密度 转化生长因子 $\beta 1$ 动物实验 大鼠 虎潜丸

Impact of HUQIAN PILL on bone density and transforming growth factor beta1 expression in the ovariectomized osteoporosis rat model Xie Yisong*, Zhang Ziming, Wu Guanbao, Zhu Jianhua, You Dongchun. *The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410005, Hunan, China

ABSTRACT Objective: To explore the mechanisms of action of HUQIAN PILL in the treatment of osteoporosis. **Methods:** Forty female SD rats, ranged in weight from 180 to 220 g (Median = 200 g), were randomly divided into HUQIAN PILL group, estrogen group, model group and sham-operation group, 10 rats in each group. The rats models of osteoporosis were created by ovariectomy in HUQIAN PILL group, estrogen group and model group. Seven days after operation, rats were intragastric administrated with HUQIAN PILL decoction, nilestriol suspension and distilled water (0.875 mL/100 g) respectively, one time daily for 12 consecutive weeks. The bone density of vertebrae and transforming growth factor beta1 (TGF $\beta 1$) expression in vertebra and nephridial tissue were detected and compared among the 4 groups.

Results: One rat died in HUQIAN PILL group and one rat died in estrogen group, so 38 rats were included in the study. After 12 weeks of drug intervention, there were statistical differences in the bone density values of rat vertebra among the 4 groups (0.210 ± 0.028 , 0.205 ± 0.030 , 0.171 ± 0.036 , $0.205 \pm 0.034 \text{ g/cm}^2$), $F = 7.561$, $P = 0.001$. The bone density values of HUQIAN PILL group, estrogen group and sham-operation group were all higher than that of model group ($P = 0.002$, $P = 0.002$, $P = 0.013$). The HUQIAN PILL group was similar to estrogen group and sham-operation group in the bone density values ($P = 0.459$, $P = 0.224$), and there were no statistical differences between estrogen group and sham-operation group ($P = 0.231$). There were no statistical differences in the gray values of TGF- $\beta 1$ in vertebra among the 4 groups (169.060 ± 5.545 , 167.420 ± 6.238 , 162.400 ± 3.882 , 168.130 ± 7.899 , $F = 2.176$, $P = 0.109$). There were statistical differences in the optical density (OD) values of TGF- $\beta 1$ in nephridial tissue among the 4 groups (172.600 ± 5.019 , 158.200 ± 8.038 , 155.130 ± 4.542 , 157.570 ± 5.524 , $F = 15.568$, $P = 0.000$). The OD value of TGF- $\beta 1$ of HUQIAN PILL group was higher than that of estrogen group, model group and sham-operation group respectively ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$). Estrogen group was similar to model group and sham-operation group ($P = 0.478$, $P = 0.490$) in the OD value of TGF- $\beta 1$, and

the sham-operation group surpassed the model group ($P=0.038$). **Conclusion:** The bone density of lumbar vertebra can be increased and the expression of TGF- $\beta 1$ in nephridial tissue can be up-regulated in rat model by using HUQIAN PILL, and it may be one of the mechanisms of action for HUQIAN PILL in the treatment of osteoporosis.

Key words Osteoporosis; Bone density; Transforming growth factor beta1; Animal experimentation; Rats; HUQIAN PILL

骨质疏松症是中老年人的常见病、多发病,临床主要表现为疼痛、脊柱后凸、身长缩短等,甚者可并发骨折^[1]。虎潜丸药方出自元代朱震亨的《丹溪心法》,是滋阴降火、强壮筋骨的经典方,主要用于治疗肝肾阴虚、精血不足所致筋骨软弱、行走无力等症状。虎潜丸临床用于治疗骨质疏松症取得了良好的疗效^[2]。本研究通过观察虎潜丸对去卵巢大鼠骨质疏松模型椎骨骨密度(bone mineral density, BMD)及椎骨、肾组织中转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor beta1, TGF- $\beta 1$) 表达的影响,探讨虎潜丸治疗骨质疏松症可能的作用机制,为该药的临床应用提供依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 SD 大鼠 40 只,雌性,3 月龄,体质量 180~220 g,中位数 200 g;购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物合格证号 SCXK(湘)2011-0003。

1.2 实验药物及主要试剂 虎潜丸水煎液,含生药 0.5 g·mL⁻¹,湖南中医药大学第二附属医院药剂科提供,药物组成:黄柏(酒炒)240 g、龟甲(酒炙)120 g、知母(酒炒)60 g、熟地黄 60 g、陈皮 60 g、白芍 60 g、锁阳 45 g、狗骨(酒炙)30 g、干姜 15 g。尼尔雌醇片,上海华联制药有限公司生产(国药准字 H31021646),蒸馏水制配成 0.5 mg·mL⁻¹ 的混悬液。TGF- $\beta 1$ 抗体,武汉博士德生物有限公司生产。

1.3 实验仪器 OSTEORECORE 型双能 X 线骨密度诊断仪(法国 MED LINK 公司),JY3002 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),LEICA DM LB2 型双目显微镜(德国 LEICA 公司),Shandon325 型石蜡切片机(英国 Shandon 公司),DNP-9162 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司),Motic B5 显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司),CMIAS 医学图像分析系统(北京航空航天大学)。

2 方法

2.1 分组和造模方法 SD 大鼠 40 只,随机分为虎潜丸组、雌激素组、模型组、假手术组,每组 10 只。2%戊巴比妥钠腹腔注射(4 mg·kg⁻¹)麻醉后,背部及肋弓下缘备皮,络合碘消毒,在脊柱旁开 0.5 cm 和肋弓下缘 0.5 cm 的交点处切开皮肤,进入腹腔^[3]。

假手术组切除腹膜后的少许脂肪组织,其余各组均切除双侧卵巢。术后青霉素生理盐水 1.5 mL(40 000 单位·mL⁻¹)腹腔注射,每日 1 次,共用 3 d。

2.2 药物干预方法 术后 7 d,各组大鼠开始给药。大鼠每日用药量为成人每日用药量的 6.3 倍,即每 100 g 体质量 0.875 mL^[4]。虎潜丸组予以虎潜丸水煎液灌胃,雌激素组予以尼尔雌醇混悬液灌胃,模型组、假手术组予以蒸馏水灌胃;每日灌胃 1 次,连续干预 12 周。各组大鼠均每周称体质量 1 次,并根据体质量变化调整给药量。

2.3 标本采集方法 最后 1 次灌胃后禁食 24 h,采用腹主动脉放血法处死全部大鼠,取出第 5 腰椎及双侧肾脏,剥离干净,置 4% 多聚甲醛溶液中固定 48~72 h。

2.4 观察指标测定方法

2.4.1 椎骨 BMD 检测方法 将第 5 腰椎椎骨标本沿长轴固定于双能 X 线 BMD 分析仪扫描测试台上,选择小动物扫描模式。扫描完成后,计算、记录 BMD 值。

2.4.2 椎骨及肾组织中 TGF- $\beta 1$ 检测方法 采用免疫组化法检测椎骨及肾组织中 TGF- $\beta 1$ 的表达。将在 4% 多聚甲醛溶液中固定 48~72 h 的椎骨及肾脏标本浸入 4% 乙二胺四乙酸溶液中,室温脱钙 4 周,每周换液 1 次。脱钙完成后,冰冻切片(切片厚度 10 μ m),并贴片于包被有多聚赖氨酸的载玻片上,室温放置 1 h, -20 $^{\circ}$ C 丙酮固定 10 min,磷酸缓冲液洗涤 3 次,3% H₂O₂ 封闭 10 min,磷酸缓冲液冲洗 2 次,加山羊工作血清封闭 10 min,滴加按 1:200 比例稀释的 TGF- $\beta 1$ 抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,磷酸缓冲液冲洗,按说明加入免疫组化试剂盒中的二抗工作液,室温放置 10 min,磷酸缓冲液冲洗,增敏二氨基联苯胺显色。分析图像,记录视野内阳性细胞的平均灰度值或平均光密度(optical density, OD)值。

2.5 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件处理数据,各组大鼠椎骨 BMD 值、TGF- $\beta 1$ 灰度值及肾组织 TGF- $\beta 1$ OD 值的组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 各组大鼠椎骨及肾组织 TGF- $\beta 1$ 免疫组化染

色结果 虎潜丸组和雌激素组各有 1 只大鼠死亡, 共纳入研究 38 只。药物干预 12 周后, 各组大鼠椎

骨及肾组织中 TGF- β 1 免疫组化染色结果见图 1、图 2。

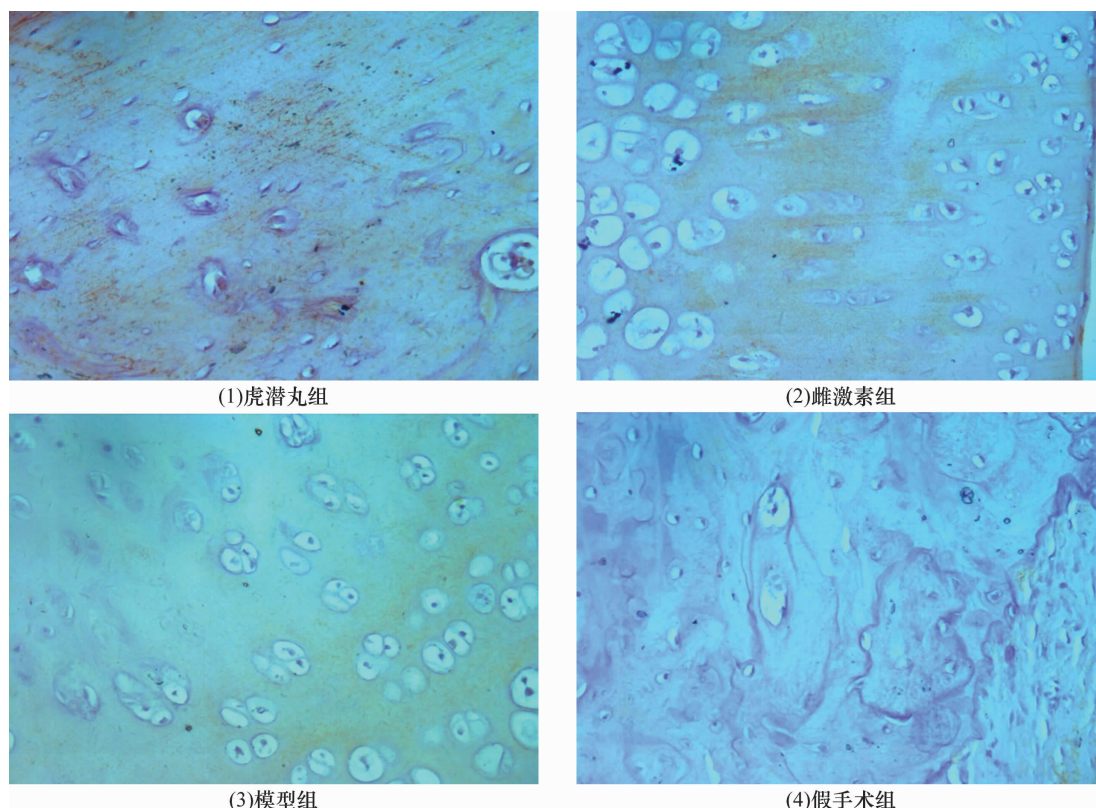


图 1 干预 12 周后各组大鼠椎骨 TGF- β 1 免疫组化染色结果 ($\times 40$)

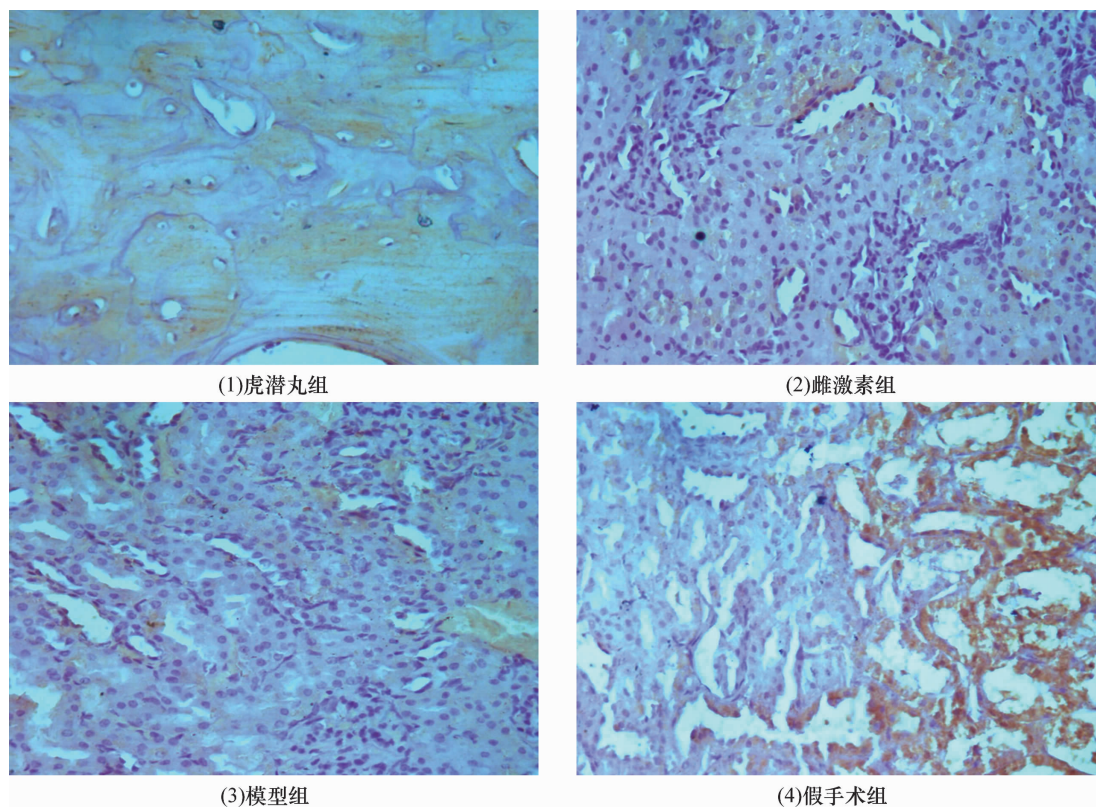


图 2 干预 12 周后各组大鼠肾组织 TGF- β 1 免疫组化染色结果 ($\times 40$)

3.2 各组大鼠椎骨 BMD 值及椎骨、肾组织中 TGF- β 1 表达的比较结果 干预 12 周后, 各组大鼠椎骨

BMD 值比较, 差异有统计学意义; 虎潜丸组、雌激素组、假手术组均高于模型组 ($P = 0.002$, $P = 0.002$,

$P=0.013$);虎潜丸组与雌激素组、假手术组相比,差异均无统计学意义($P=0.459, P=0.224$);雌激素组与假手术组相比,差异无统计学意义($P=0.231$)。各组大鼠椎骨 TGF- $\beta 1$ 灰度值比较,差异无统计学意义。各组大鼠肾组织 TGF- $\beta 1$ OD 值比较,差异有统计学意义;虎潜丸组高于雌激素组、模型组和假手术组($P=0.000; P=0.000; P=0.000$);雌激素组与模型组、假手术组比较,差异均无统计学意义($P=0.478, P=0.490$);假手术组高于模型组($P=0.038$)。见表 1。

表 1 各组大鼠椎骨 BMD 值、TGF- $\beta 1$ 灰度值及肾组织 TGF- $\beta 1$ OD 值的组间比较

组别	椎骨 BMD ($g \cdot cm^{-2}$)	椎骨 TGF- $\beta 1$ 灰度值	肾组织 TGF- $\beta 1$ OD 值
虎潜丸组	0.210 ± 0.028	169.060 ± 5.545	172.600 ± 5.019
雌激素组	0.205 ± 0.030	167.420 ± 6.238	158.200 ± 8.038
模型组	0.171 ± 0.036	162.400 ± 3.882	155.130 ± 4.542
假手术组	0.205 ± 0.034	168.130 ± 7.899	157.570 ± 5.524
F 值	7.561	2.176	15.568
P 值	0.001	0.109	0.000

4 讨 论

骨质疏松症属中医学“骨痿”“骨枯”“腰痛”等范畴。《素问·宣明五气篇》曰:“肾主骨”。《素问·痿论》曰:“肾气热,则腰脊不举,骨枯而髓减,发为骨痿”“肾者水藏也,今水不胜火,则骨枯而髓虚,故足不任身,发为骨痿”。虎潜丸方中重用黄柏,配以知母以泻火清热;熟地黄、龟甲、白芍滋阴养血;狗骨强壮筋骨;锁阳温阳益精;干姜、陈皮温中健脾、理气和胃。诸药合用,共奏滋阴降火、强壮筋骨之功。

虎潜丸治疗骨质疏松症的作用机制尚不明确。

刘静仪等^[2]认为补肾类中药具有类激素样作用,可通过调节下丘脑-垂体-性腺轴的功能而防治骨质疏松,虎潜丸加减可用于肾虚型骨质疏松症的治疗。李洪成等^[5]的研究表明虎潜丸增加肾虚证患者的 BMD,可能与其可调节皮质醇的分泌水平有关。任艳玲等^[6]的研究表明,补肾健脾类中药的药物血清可上调成骨细胞中 TGF- $\beta 1$ 的信号转导分子 Smad2mRNA 和蛋白的表达水平,促进成骨细胞的生长与分化。

本研究结果表明,虎潜丸可增加大鼠腰椎椎骨 BMD,上调肾组织中 TGF- $\beta 1$ 的表达,可能是其治疗骨质疏松症的机制之一,但具体作用机制尚不明确,有待进一步研究。

5 参考文献

- [1] 胡永红,李丽春,梁燕,等. 中医药治疗肾阳虚型骨质疏松症研究进展[J]. 河北中医药学报,2012,27(4):42-43.
- [2] 刘静仪,林如平. 虎潜丸加减治疗骨质疏松症 30 例疗效观察[J]. 成都医药,2004,30(3):134-135.
- [3] 田茂友,李洪祥. 去卵巢大鼠骨质疏松模型研究[J]. 现代预防医学,2007,34(12):2239-2241.
- [4] 邓洋洋,王思程,郑洪新,等. 补肾中药对去卵巢骨质疏松症模型大鼠骨密度、子宫指数影响的实验研究[J]. 辽宁中医杂志,2012,39(9):1867-1869.
- [5] 李洪成,郭素华,林如平,等. 补肾药虎潜丸对肾虚患者骨密度的影响[J]. 中国中西医结合杂志,1997,17(11):669-670.
- [6] 任艳玲,郑洪新,杜松. 补肾健脾药物血清对大鼠成骨细胞 Smad2mRNA 表达影响的研究[J]. 中医药学刊,2005,23(4):618.

(2013-08-23 收稿 2013-10-13 修回)

· 简 讯 ·

《中医正骨》广告业务范围

■ 医疗、科研、教学单位及药械生产营销企业介绍

■ 用于骨伤科医疗、科研、教学的器械设备介绍

■ 用于骨伤科医疗、科研、教学的中西药物及中间体介绍

■ 各种形式的骨伤科讯息,如书刊征订、招生启事、会议通知等

《中医正骨》2014 年度广告收费标准

刊登位置	印刷规格	版面	每期收费标准(元)	半年收费标准(元)	全年收费标准(元)
封二	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	9 000	54 000	75 600
封三	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	8 000	48 000	67 200
封底	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	10 000	60 000	84 000
前插页	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	7 000	42 000	58 800
后插页	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	6 000	36 000	50 400
内文图文	大 16 开黑白铜版纸印刷	全版	3 000	18 000	25 200
	大 16 开黑白铜版纸印刷	1/2 版	1 800	10 800	15 120
内文文字	大 16 开黑白铜版纸印刷	全版	3 000	18 000	25 200
	大 16 开黑白铜版纸印刷	1/2 版	1 800	10 800	15 120