

基于雌激素作用的淫羊藿女贞子配伍对绝经后骨质疏松症大鼠的影响研究

李晓曦¹ 陈宇恒¹ 唐秀凤¹ 高莹莹¹ 于萍¹ 马紫童¹ 刘仁慧^{1△}

[摘要] 目的:研究淫羊藿女贞子配伍对绝经后骨质疏松症(PMOP)大鼠雌激素作用的影响。方法:双侧卵巢切除术模拟 PMOP 大鼠模型,随机分为假手术组、模型组、淫羊藿女贞子配伍组(配伍组)、淫羊藿组、女贞子组、雷洛昔芬组(阳性药组),每组 8 只。术后 1 周开始给予相应的药物治疗 12 周,酶免疫法检测血清中雌二醇(E2)含量,自动生化法检测肝肾功能指标丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、肌酐(CR)和尿酸(UA)含量,免疫荧光、Western Blotting 和实时荧光定量 PCR 技术检测骨组织雌激素受体(ER)两种亚型的蛋白及 mRNA 表达,苏木精-伊红染色检测骨组织病理学改变。结果:与假手术组比较,PMOP 大鼠血清 E2 含量和骨组织 ER α 和 ER β mRNA 及蛋白表达均显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$);肝肾功能指标均显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$);同时出现典型的骨质疏松病理改变。与模型组比较,配伍组能显著升高血清 E2 含量,差异有统计学意义($P<0.01$);降低肝肾功能指标的水平,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);上调骨组织中 ER α 及 ER β 的蛋白及 mRNA 表达,差异有统计学意义($P<0.01$);显著改善骨质疏松的病理改变。结论:淫羊藿女贞子配伍防治 PMOP 的作用与显著上调雌激素及雌激素受体的表达有关。

[关键词] 骨质疏松症;淫羊藿/女贞子;雌激素;雌激素受体

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)09-0001-06

Effects of the Combination of Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi on Estrogen in Ovariectomy-Induced Osteoporosis Rats

LI Xiaoxi¹ CHEN Yuheng¹ TANG Xiufeng¹ GAO Yingying¹
YU Ping¹ MA Zitong¹ LIU Renhui^{1△}

¹ School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China.

Abstract Objective: To investigate the effects of the combination of herba epimedii and fructus ligustri lucidi on estrogen and estrogen receptor(ER)in ovariectomy(OVX)-induced osteoporosis of rats. **Methods:** PMOP rat model was duplicated by bilateral ovariectomy. Rats were randomly divided into 6 groups, including sham group, model group, Herba Epimedii group, fructus ligustri lucidi group, combination group and raloxifene group. Estradiol (E2), ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartic transaminase), CR (creatinine) and UA (uric acid) in blood, the mRNA and protein expression of estrogen receptor(ER)in bone, and bone histomorphometry analysis were detected. **Results:** Compared with the sham group, serum E2 level and the mRNA and protein expression of ER in bone were reduced ($P<0.01$), while serum ALT, AST, CR and UA were significantly increased ($P<0.01$); pathological changes of osteoporosis were detected in the model group. Compared with the model group, herba epimedii and fructus ligustri lucidi in combination could significantly increased the level of serum E2, reduced serum ALT, AST, CR and UA, up-regulated the expression of mRNA and protein of ER α and ER β in bone tissue, and improving the pathological changes of osteoporosis. **Conclusion:** Herba epimedii and fructus ligustri lucidi in combination has the anti-osteoporosis on PMOP through the up-regulation of estrogen and ER.

Keywords: osteoporosis; herba epimedii/fructus ligustri lucidi; estrogen; estrogen receptor

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81673993)

国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室
建设项目

¹ 首都医科大学中医学院(中医络病研究北京市重点实验室)
(北京, 100069)

[△]通信作者 E-mail: liurenhui995@163.com

随着社会人口老龄化进程的不断加剧,绝经后骨质疏松症(Postmenopausal Osteoporosis, PMOP)患病率正逐渐增加。淫羊藿女贞子配伍是国家级名老中医李世增教授基于 50 多年的临床经验而筛选用于骨质疏松症治疗的基本方。本课题组前期研究证实,以“阴阳双补,益精壮骨”立法的该配伍对维甲酸诱导的高转化性骨质疏松症^[1]及糖皮质激素诱导的低转化性骨质疏松症均有较好的防治作用^[2,3],但对 PMOP 的作用尚未研究。研究表明淫羊藿、女贞子均具上调雌激素水平的作用^[4,5],提示二药防治 PMOP 的作用与调节雌激素表达及作用有关。本研究采用双侧去卵巢手术诱导大鼠 PMOP 模型,观察淫羊藿、女贞子单用及配伍对血清中雌二醇(Estradiol, E2)水平和骨组织中雌激素受体(Estrogen Receptor, ER)的影响,探讨淫羊藿女贞子配伍对 PMOP 的防治作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 8 月龄健康雌性 SD 大鼠,体质量(390 ± 10)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2012-0001。

1.2 试剂与药品

淫羊藿、女贞子水提物购自西安康威生物有限公司;盐酸雷洛昔芬片(LILLY, SA, 批号 C614454),注射用青霉素钠(华北制药,批号 F6082102),E2 ELISA 试剂盒(Blue Gene Biotech Co., 批号 E02E0023),肝功能包括丙氨酸氨基转移酶(Alanine Aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(Aspartic Transaminase, AST)、肌酐(Creatinine, CR)和尿酸(Uric Acid, UA)试剂盒,均由英科新创(厦门)科技有限公司提供;ER α 一抗(Novus, 批号 NB300-560)。ER β (Novus, 批号 NB120-3577)、羊抗小鼠 IgG(批号 122107)、山羊抗兔 IgG(批号 ZB-2301)、小鼠抗 β -actin 抗体(批号 ZB-2305)均由北京中杉金桥提供;动物组织总 RNA 提取试剂盒(批号 Q5301)和 2 \times SYBR Premix ExTaqTM(批号 Q6220)由 TianGEN 提供;PCR 引物均由北京六合通公司提供。

1.3 主要仪器

电泳仪(BIO-RAD 公司, MINI PROTEAN Tetra Cell, 1658004),电转仪(BIO-RAD 公司, MINI Trans-Blot Cell MTB(CNA), 1703810),CFX-96 型 PCR 仪(BIO-RAD 公司),荧光显微镜(Nikon, ECLIPSE 80i),酶标仪(Molecular Devices 公司, SpectraMax Plus384 型),凝胶、化学发光成像分析系统(FUSION FX6 XT, 16200694),全自动生化仪(日本奥林巴斯株式会社, AU480)。

1.4 分组与模型制备

按照随机数字表法将动物分成 6 组,包括假手术组、模型组、淫羊藿女贞子配伍组(配伍组)、淫羊藿组、女贞子组、雷洛昔芬组(阳性药组)。参照文献^[6]造模

行双侧卵巢摘除术造模,假手术组用同样手术方法暴露卵巢,切除少量脂肪,不摘除卵巢。

1.5 给药及取材方法

术后第 7 天开始灌胃给药,淫羊藿、女贞子及配伍组(淫羊藿:女贞子=4:3)均给予相应的药物 0.7 g/kg,阳性药组给予盐酸雷洛昔芬片 6.25 mg/kg,1 次/d,共计 12 周。腹主动脉取血,离心取血清;分离左侧股骨,10%甲醛固定;分离胫骨,置于液氮内,-80℃冰箱保存。

1.6 检测指标

1.6.1 E2 含量 按照试剂盒说明书采用酶免疫法检测血清中 E2 含量。

1.6.2 肝肾功能指标 采用全自动生化仪检测血清 ALT, AST, CR 及 UA 含量。

1.6.3 免疫荧光法(IF)检测股骨中 ER α 及 ER β 蛋白表达 石蜡切片常规脱蜡、水化, PBS 冲洗; 0.01 mmol/L 柠檬酸缓冲液微波高温修复 20 min, 取出冷却至室温, PBS 冲洗; 滴加 10% 羊血清 37℃ 封闭 60 min, 倾去; 分别滴加 50 μ L ER α (4 μ g/mL)及 ER β (0.5 μ g/mL)抗体, 4℃ 孵育 36 h; 37℃ 复温 60 min, PBS 冲洗; 滴加相应荧光二抗 50 μ L(1:100), 37℃ 孵育 2 h, PBS 冲洗; 50 μ L DAPI(1:10 000 稀释), 室温孵育 5 min 染核, PBS 冲洗; 抗荧光淬灭封片剂封片, 4℃ 避光保存。光学显微镜下观察(100 倍), 每个骨组织切片随机选取 3 个视野, 并用 NIS-Elements BR 3.2 软件测定蛋白表达的阳性面积和积分光密度值(IOD), 进行统计学分析。

1.6.4 Western Blotting(WB)法检测胫骨组织中 ER α 及 ER β 蛋白表达 取胫骨组织按 1:10 比例加入 RIPA 裂解液后匀浆, 冰上孵育 40 min, 4℃ 12 000g 离心 15 min, 取上清液, 即为骨组织总蛋白, 采用 BCA 蛋白测定法计算蛋白浓度; 蛋白样本与上样缓冲液按 3:1 比例混合, 沸水中煮 7 min。取各蛋白样本 40 μ g 进行 10% SDS-PAGE 电泳; 根据目的条带的大小和电泳标记所指示的位置切下目的条带和内参条带, 制作转膜的三明治, 于 350 mA 恒流下转膜约 1 h, 整个转膜过程在冰浴中进行; 5% 脱脂奶粉摇床室温封闭 2 h; 分别加入目的蛋白 ER α (4 μ g/mL), ER β (2 μ g/mL)和内参蛋白 β -actin(1:2 000)一抗稀释液, 4℃ 孵育过夜后(16 h), TBST 洗膜; 加入辣根过氧化物酶标记的目的蛋白和内参蛋白二抗稀释液(抗兔 1:20 000, 抗小鼠 1:20 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜; 滴加 ECL 发光液, 于凝胶、化学发光成像分析系统中进行胶片曝光、显影和定影。通过 Image J 图像分析软件测定各蛋白条带的灰度值, 以目的蛋白条带的灰度值与内参 β -actin 条带灰度值的比值表示各蛋白的相对表达水平。

1.6.5 胫骨组织中 ER α 及 ER β 的 mRNA 表达 根据 Trizol 试剂说明提取大鼠骨组织总 RNA; 酶标仪测定 RNA 的浓度和纯度; 按照 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA; 根据

SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)荧光定量预混试剂说明书,进行实时荧光定量 PCR 检测,引物序列见表 1. 具体反应条件为:95 ℃预变性 15 min,95 ℃变

性 10 s,60 ℃退火 1 min,60 ℃延伸 10 s,共 40 个循环。以基因 β -actin 为内参对照,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法计算 ER α 和 ER β mRNA 相对表达量。

表 1 引物序列

引物	转递(5'→3')	反转(5'→3')	产物长度/bp
ER α	GCTTATTGACCAACCTGGCAGAC	AGGATCTCCAACCAGGCACAC	130
ER β	GTACCATAGACAAGAACCGGCGTAA	TCCGCACTATACGGTACCCACA	120
β -actin	CACTTTCTACAATGAGCTGCG	CTGGATGGCTACGTACATGG	129

1.6.6 股骨组织病理学检测 参照文献[7]进行左侧股骨标本病理学检测,并根据公式计算出骨小梁面积百分比(Tb. Ar,%)、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁数量(Tb. N)和骨小梁分离度(Tb. Sp)。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较根据方差齐性检验结果选择 LSD(方差齐)或 Tamhane's T2(方差不齐)检验。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 淫羊藿女贞子配伍对 PMOP 大鼠血清 E2 及肝肾功能的影响

与假手术组比较,去卵巢大鼠血清 E2 水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$);而 ALT,AST,CR 及 UA 水平均显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,淫羊藿、女贞子单用及配伍均能提高 PMOP 大鼠血清 E2 的水平,而降低 AST,ALT 及 UA 的水平,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),对 CR 的影响仅淫羊藿组及配伍组有差异,差异有统计学意义($P<0.05$)。具体数据见表 2。

表 2 各组大鼠血清 E2 及肝肾功能的结果比较($\bar{x}\pm s,n=7$)

组别	E2/(pg·mL ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	CR/(μ mol·L ⁻¹)	UA/(μ mol·L ⁻¹)
假手术组	95.83±8.52	60.57±9.93	176.57±10.59	40.00±2.08	81.00±7.25
模型组	59.77±8.30**	94.86±10.37**	240.00±9.18**	49.14±3.45**	125.86±13.47**
淫羊藿组	99.09±8.60##	61.28±6.68#	150.57±13.10##	42.14±1.53#	78.86±7.42##
女贞子组	88.48±9.53#	68.57±7.10#	170.57±18.94##	43.57±2.73	76.57±6.23##
配伍组	94.42±6.22##	59.28±7.59##	166.57±20.12##	42.00±2.22#	86.00±6.40##
阳性药组	91.27±6.00##	72.86±4.75	216.00±15.27	43.28±1.49	97.71±11.40#
F	3.253	2.852	5.074	1.736	4.187
P	<0.05	<0.05	<0.01	>0.05	<0.01

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

2.2 淫羊藿女贞子配伍对 PMOP 大鼠骨组织中 ER α 的影响

与假手术组比较,模型组 ER α 蛋白及 mRNA 表达均显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组相比,淫羊藿组及配伍组的 ER α 蛋白及 mRNA 表达均显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$),但

IF 法检测女贞子组 ER α 蛋白表达显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);配伍组较淫羊藿组 ER α 蛋白表达的面积及 IOD 值显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$),较女贞子组 ER α 蛋白及 mRNA 表达均显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。具体数据见表 3 及图 1-3。

表 3 各组大鼠骨组织中 ER α 的结果比较($\bar{x}\pm s,n=7$)

组别	ER α mRNA	ER α 蛋白		
		面积/ μ m ²	IOD	相对表达量
假手术组	0.851 1±0.030 9	31.63±0.23	115.48±0.93	0.695 6±0.023 9
模型组	0.398 9±0.012 7**	21.76±0.23**	79.26±1.19**	0.357 1±0.023 6**
淫羊藿组	0.656 8±0.027 2##	22.93±0.24##&&	84.61±0.82##&&	0.646 9±0.034 1##
女贞子组	0.444 9±0.018 6&&	20.79±0.19##&&	76.18±0.84&&	0.366 6±0.042 0&&
配伍组	0.673 4±0.040 7##	27.73±0.23##	104.35±0.67##	0.717 0±0.026 3##
阳性药组	0.704 3±0.019 2##	21.16±0.24	77.50±0.67	0.474 9±0.032 3#
F	40.990	370.555	356.098	27.935
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与配伍组比较,&& $P<0.01$ 。

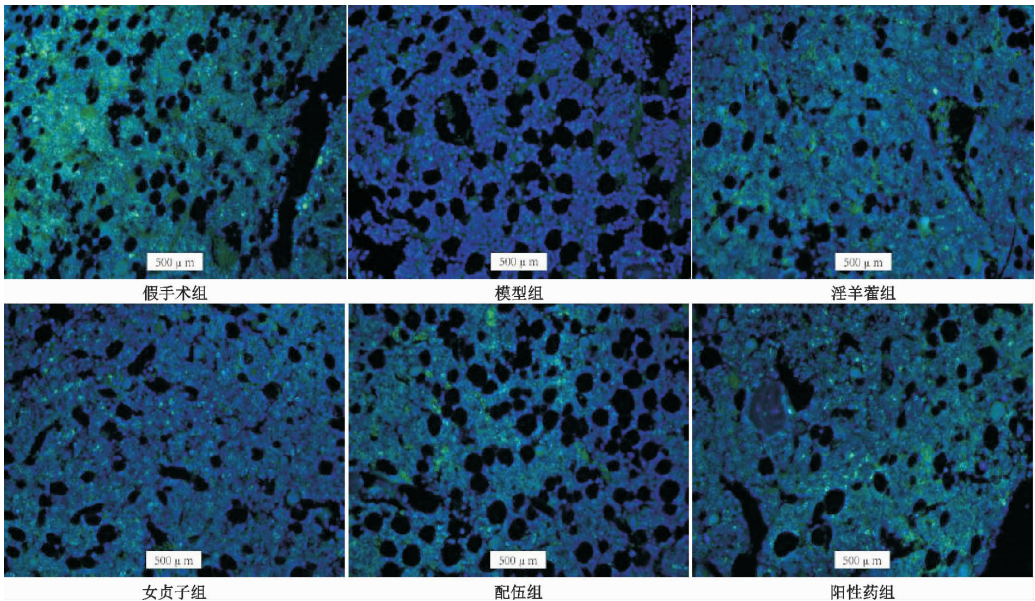


图 1 各组大鼠骨组织 ER α 免疫荧光图片(100 \times)

2.3 淫羊藿女贞子配伍对 PMOP 大鼠 ER β 蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠骨组织 ER β 蛋白及 mRNA 表达显著下调,差异有统计学意义($P<0.01$)。给药后,各给药组 ER β 蛋白(IF 法)及 mRNA 表达均显著上

调,差异有统计学意义($P<0.01$);配伍组及阳性药组 WB 法检测 ER β 蛋白也显著上调,差异有统计学意义($P<0.01$)。淫羊藿女贞子配伍较淫羊藿或女贞子单用 ER β 蛋白及 mRNA 表达均显著上调,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。具体见表 4 及图 2-3。

表 4 各组大鼠骨组织 ER β 蛋白的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	ER β mRNA	ER β		
		面积/ μm^2	IOD	相对表达量
假手术组	0.600 3 \pm 0.023 4	30.79 \pm 0.20	117.09 \pm 0.95	0.638 0 \pm 0.043 4
模型组	0.217 9 \pm 0.019 4 ^{**}	17.57 \pm 0.39 ^{**}	65.65 \pm 1.52 ^{**}	0.321 0 \pm 0.036 1 ^{**}
淫羊藿组	0.401 2 \pm 0.020 1 ^{#&&}	23.09 \pm 0.34 ^{#&&}	86.10 \pm 1.63 ^{#&&}	0.356 1 \pm 0.039 0 ^{&&}
女贞子组	0.441 7 \pm 0.025 9 ^{#&&}	25.15 \pm 0.30 ^{#&&}	94.19 \pm 0.97 ^{#&&}	0.400 4 \pm 0.025 3 ^{&&}
配伍组	0.513 8 \pm 0.020 8 [#]	26.85 \pm 0.40 [#]	101.16 \pm 1.53 [#]	0.548 6 \pm 0.035 2 [#]
阳性药组	0.548 5 \pm 0.011 3 [#]	27.05 \pm 0.32 [#]	102.07 \pm 1.54 [#]	0.612 1 \pm 0.056 1 [#]
F	43.379	181.379	158.014	11.597
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与假手术组比较,^{**} $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与配伍组比较,[&] $P<0.05$,^{&&} $P<0.01$ 。

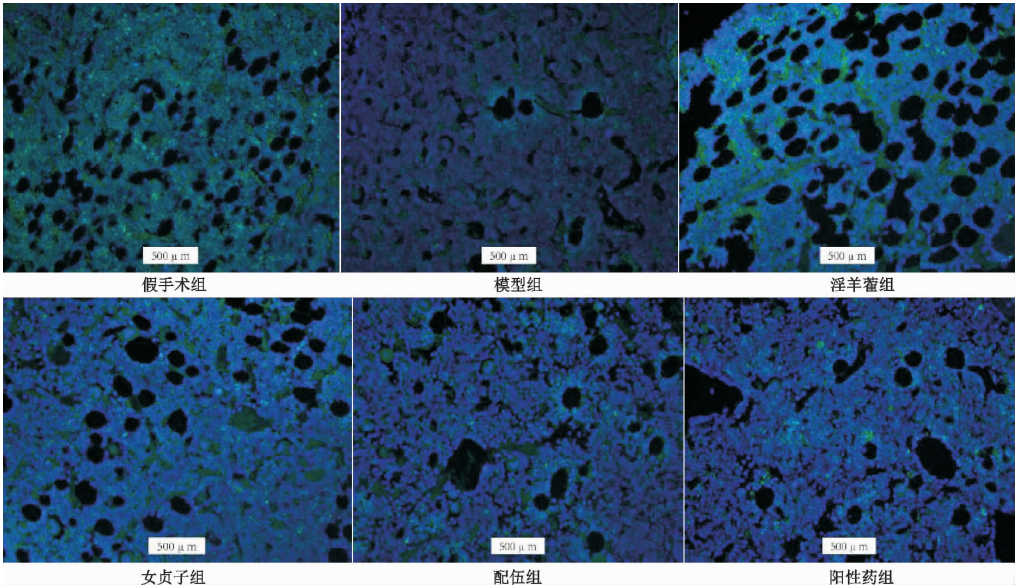


图 2 各组大鼠骨组织 ER β 免疫荧光图片(100 \times)

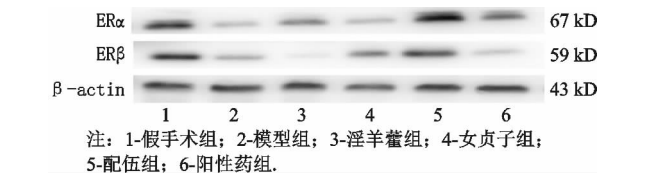


图 3 各组大鼠骨组织 WB 图片

2.4 淫羊藿女贞子配伍对 PMOP 大鼠骨组织病理学的影响

表 5 各组大鼠骨组织病理学指标的结果比较(̄±s,n=6)

组别	骨小梁面积比/%	骨小梁周长/μm	骨小梁厚度/μm	骨小梁数量	骨小梁分离度/μm
假手术组	28.37±1.66	27 903.13±1 079.20	127.49±6.42	2.65±0.11	306.55±112.26
模型组	11.02±0.23**	13 285.90±487.83**	91.80±2.96**	1.06±0.05**	768.64±270.31**
淫羊藿组	23.44±1.87 [#]	20 000.13±1 692.27 [#]	128.29±5.57 [#]	2.01±0.15 [#]	431.16±291.51 [#]
女贞子组	22.21±1.85 [#]	20 323.04±1 382.58 [#]	119.83±6.01 [#]	2.07±0.12 [#]	462.85±436.54 [#]
配伍组	24.39±1.33 [#]	23 767.09±1 518.07 [#]	127.37±10.75 [#]	2.09±0.13 [#]	384.24±327.72 [#]
阳性药组	27.41±1.94 [#]	24 208.94±1 985.10 [#]	119.06±5.16 [#]	2.13±0.17 [#]	324.14±368.46 [#]
F	15.267	12.030	3.796	15.890	15.697
P	<0.001	<0.001	<0.01	<0.001	<0.001

注:与假手术组比较,**P<0.01;与模型组比较,[#]P<0.01.

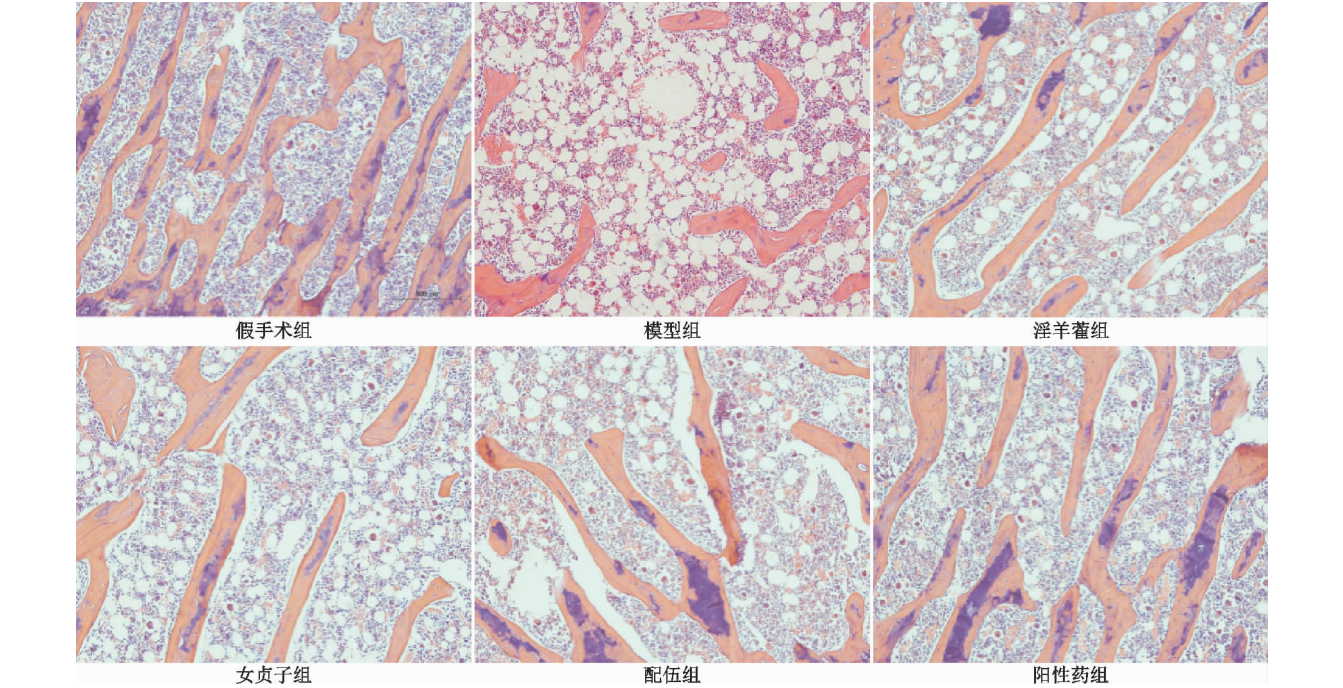


图 4 各组大鼠骨组织病理学检测结果(苏木精-伊红染色,100×)

3 讨论

临床和实验研究均证实雌激素在 PMOP 的发病中起着重要的作用^[8,9],基于雌激素在骨代谢中的重要作用,雌激素替代疗法是防治 PMOP 的重要手段,但长期应用雌激素会导致乳腺癌、冠心病、血栓栓塞及阴道出血等不良反应^[10]。目前植物雌激素类中药对 PMOP 的疗效确切且无雌激素类副作用而受到较多的关注。淫羊藿是临床上治疗骨质疏松相关疾病的常用补肾阳中药^[11]。有研究认为淫羊藿苷能促进去卵巢致 PMOP 大鼠体内脂肪组织、皮肤等处的雌激素合成,提高体内雌激素水平,故具有拟雌激素样作用。但蒾慧荣等^[12]研究认为淫羊藿苷仅具有类似的活性但

与假手术组比较,模型组病理学计量参数差异有统计学意义(P<0.01),提示 OVA 术后骨组织出现骨小梁改变为主的骨质疏松的病理改变。与模型组比较,各给药组骨小梁面积比、骨小梁周长、厚度及数量均显著升高,差异有统计学意义(P<0.01);骨小梁分离度降低,差异有统计学意义(P<0.01)。具体见表 5 及图 4。

并不是真正的植物雌激素。补肾阴中药女贞子也具有雌激素样活性^[13],临床研究证实以女贞子为主药的资癸女贞胶囊可提高更年期患者体内 E2 水平^[14]。本实验研究结果发现,淫羊藿、女贞子单用及配伍均能提高去卵巢大鼠血清 E2 的表达,证实淫羊藿、女贞子具有升高 PMOP 大鼠血清 E2 的作用。淫羊藿女贞子配伍后对 E2 的改善与淫羊藿或女贞子单用相比无显著区别,提示两药各减少剂量后合用对雌激素水平的上调产生协同增效的作用。中医理论认为“肝主疏泄”“肾藏精”与天癸密切相关,而现代医学也证实雌激素的合成及代谢与肝肾功能有关。本研究检测了肝肾功能相关指标,发现去卵巢大鼠 ALT,AST,CR 及 UA 均表

现出异常增高,提示出现了肝肾功能的异常;给予淫羊藿、女贞子单用及配伍能改善 PMOP 大鼠的肝肾功能,可能在一定程度上有助于恢复雌激素的合成及代谢过程。

骨代谢是受 $ER\alpha$ 和 $ER\beta$ 两种雌激素受体调节的,若雌激素水平降低,则细胞内 ER 水平也随之降低^[15]。 ER 主要有 $ER\alpha$ 和 $ER\beta$ 两个亚型^[16],两种亚型含量相当,但它们存在的位置不同,发挥的效应也有所区别。一般而言,雌激素对成骨的作用是由 $ER\beta$ 介导的,对破骨细胞的抑制则是 $ER\alpha$ 介导的; $ER\alpha$ 对骨代谢起着至关重要的作用,而 $ER\beta$ 则是通过影响 $ER\alpha$ 活性进而影响骨代谢^[17,18]。当 $ER\alpha$ 存在时 $ER\beta$ 可以削弱前者激活转录功能,但当 $ER\alpha$ 丧失时 $ER\beta$ 又可以部分替代其功能。李红明等^[19]在体外培养骨膜细胞时发现淫羊藿苷对 $ER\beta$ 亲和力较 $ER\alpha$ 高,并且淫羊藿苷和膜受体结合起效时间短。有研究发现女贞子可以选择性上调去卵巢大鼠骨组织中 $ER\alpha$ 的表达,而对 $ER\beta$ 无明显影响^[20]。为进一步评价淫羊藿女贞子配伍使用对 ER 的作用,笔者对骨组织中 ER 两种亚型的 mRNA 及蛋白表达进行了研究,发现去卵巢大鼠骨组织中 ER 两种亚型的蛋白及 mRNA 表达均显著下调,淫羊藿单用及与女贞子配伍后可以显著上调 $ER\alpha$ 和 $ER\beta$ mRNA 及蛋白的表达。女贞子单用对 $ER\alpha$ mRNA 的表达虽无明显改善,但能提高 $ER\alpha$ 蛋白表达(IF 法),且明显提高 $ER\beta$ mRNA 和蛋白的表达。二者减少剂量后合用,对 ER 两种亚型的 mRNA 及蛋白表达较单用改善作用更显著,提示淫羊藿女贞子配伍可使雌激素的骨保护作用更好地发挥。本实验中采用 IF 和 WB 两种方法检测骨组织中 ER 受体的蛋白表达,IF 和 WB 两种方法的部分结果不一致,如用 IF 法检测淫羊藿、女贞子对 $ER\beta$ 蛋白表达有显著上调作用,而 WB 结果却无明显差异。原因可能是因为 IF 实验部位是主要含 $ER\beta$ 较多的松质骨,而 WB 实验部位包括含 $ER\alpha$ 的皮质骨及 $ER\beta$ 较多的松质骨。

中医认为肾之精气是骨骼生长发育的根本,肾虚与骨质疏松症的关系非常密切^[21]。淫羊藿温肾壮阳、女贞子滋补肝肾之阴,是中医药防治 PMOP 的常用药物。二者合用,有平补阴阳、益肾健骨的功效,是首都国医名师李世增教授常用于防治骨质疏松的基本方。本实验证实了淫羊藿女贞子对 PMOP 大鼠的骨组织病理学指标有明显的改善作用,提示抗骨质疏松的作用。本研究证实了二药单用及配伍均能增加血清雌二醇的水平,与文献报道二药的雌激素样作用一致。但对骨组织中 ER 亚型的表达二药有所区别,淫羊藿对去卵巢大鼠骨组织 $ER\alpha$ mRNA 和蛋白的表达更为明显;但女贞子对 $ER\beta$ 的 mRNA 和蛋白表达作用更突出。二者配伍后能显著上调 ER 两种亚型的蛋白及 mRNA 的表达,提示配伍应用后的协同增效作用。

综上所述,以去卵巢导致的 PMOP 大鼠模型进行研

究,发现淫羊藿女贞子配伍对血清中 E_2 的降低以及骨组织中 ER 两种亚型的下调均有改善作用,提示调节雌激素对骨组织的保护作用为淫羊藿女贞子防治 PMOP 的作用机制。 $ER\alpha$ 和 $ER\beta$ 在骨代谢中有着不同的作用,它们对骨骼的确切作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 李梅,康学,年宏蕾,等.淫羊藿-女贞子抗维甲酸致大鼠骨质疏松症的作用机制探讨[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(12):81-85.
- [2] 康学,刘仁慧,年宏蕾,等.基于 I 型胶原代谢水平探讨淫羊藿和女贞子对骨质疏松模型的影响[J].中药新药与临床药理,2014,25(5):559-564.
- [3] YANG Y, NIAN H L, XIANG X F, et al. Effects of the combined herba epimedii and fructus ligustri lucidi on bone turnover and TGF- β 1/smads pathway in GIOP rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 21: 91-99.
- [4] 张明发,沈雅琴.女贞子及其活性成分促生长增体质作用的研究进展[J].药物评价研究,2016,39(3):474-480.
- [5] 刘启明,罗统富,董黎强,等.植物雌激素类中药延缓关节软骨细胞退变的研究进展[J].中医正骨,2017,29(5):27-30.
- [6] 李晓曦,陈宇恒,唐秀凤,等.淫羊藿、女贞子单用及配伍对绝经后骨质疏松症大鼠骨量及内分泌器官的影响[J].中国医药导报,2018,15(35):12-16.
- [7] LIU R H, KANG X, XU L P, et al. Effect of the combined extracts of herba epimedii and fructus ligustri lucidi on sex hormone functional levels in osteoporosis rats [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015:184802.
- [8] 郑莎,弓慧杰.围绝经期妇女雌激素水平与骨质疏松的关系研究[J].中国妇幼保健,2018,33(8):1806-1808.
- [9] 张巧慧,胡玲,李婷.雌二醇片/雌二醇地屈孕酮片复合包装联合阿仑膦酸钠片治疗卵巢早衰合并骨量减少及骨质疏松症患者临床疗效分析[J].中国药物与临床,2018,18(6):987-989.
- [10] PARDINI D. Hormone replacement therapy in menopause [J]. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Etabologia, 2014, 58(2):172-179.
- [11] 汪小飞,李晶晶.淫羊藿总黄酮对老年骨质疏松大鼠 Notch 和 Smads 通路蛋白表达的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2019,27(2):1-5.
- [12] 惠慧荣,马慧萍,高玉海,等.淫羊藿苷是一种植物雌激素吗? [J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2016,9(4):421-427.
- [13] 俞益火,田治标,谢嫚花.滋阴补肾对绝经后膝骨关节炎雌激素和 C-反应蛋白表达的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2014,22(3):34-35.
- [14] 李嘉音,李扬璐,阮祥燕,等.资癸女贞胶囊治疗复发性流产的疗效观察[J].首都医科大学学报,2016,37(5):688-692.
- [15] 唐飞,徐娟,邵明君.不同生理阶段小鼠雌激素受体水平及 IL-13、TNF- α 含量的变化[J].生殖医学杂志,2018,27(5):422-425.