

基于下丘脑-垂体-卵巢轴探讨藏药二十五味鬼臼丸对绝经后骨质疏松症大鼠的干预作用

李淑桢¹, 王琦¹, 李沁园¹, 申继强¹, 李长兴¹, 吴佩锋¹, 张立雪², 代冬芳^{1*}

1. 青海大学医学院 基础医学研究中心, 青海 西宁 810006

2. 西北民族大学 医学部, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 基于下丘脑-垂体-卵巢轴 (hypothalamus-pituitary-ovary axis, HPOA) 探讨藏药二十五味鬼臼丸对去卵巢大鼠骨质疏松的影响。方法 将 40 只 SD 雌性未孕大鼠随机分为假手术组、模型组、雌二醇组、二十五味鬼臼丸组, 每组 10 只。除假手术组仅摘取卵巢旁同样大小的脂肪块, 其余 3 组大鼠均摘除双侧卵巢建立绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 大鼠模型。手术 1 周后开始给药处理, 雌二醇组 ig 0.1 mg/kg 戊酸雌二醇, 二十五味鬼臼丸组 ig 441 mg/kg 二十五味鬼臼丸, 假手术组和模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 12 周后, ELISA 法检测血清雌二醇、黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)、卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH)、促性腺激素释放激素 (gonadotropin releasing hormone, GnRH) 水平; RT-PCR 检测下丘脑、垂体、左侧股骨远端雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)、雌激素受体 β (estrogen receptor β , ER β) mRNA 表达; 免疫荧光染色法检测下丘脑、垂体和右侧股骨远端 ER α 、ER β 蛋白表达; HE 染色法观察大鼠右侧股骨远端组织形态变化; Micro-CT 检测右侧股骨远端微结构的改变。结果 藏药二十五味鬼臼丸能显著降低大鼠体内血清 LH、FSH、GnRH 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 并在 HPOA 轴中显著性上调下丘脑及垂体 ER α mRNA 及蛋白表达 ($P < 0.01$), 同时显著性上调股骨 ER β mRNA 及蛋白表达 ($P < 0.01$), 并能显著回调大鼠股骨密度及骨微结构参数 ($P < 0.01$)。结论 藏药二十五味鬼臼丸可有效防治 PMOP, 其机制可能与药物直接作用骨组织雌激素受体或作用 HPOA 轴靶器官相关雌激素受体后, 通过改变体内性激素的水平间接调控骨代谢有关。

关键词: 藏药; 二十五味鬼臼丸; 植物雌激素; 骨质疏松; 雌激素受体; 下丘脑-垂体-卵巢轴

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)20-6282-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.20.019

Study on intervention effect of Tibetan medicine Ershiwuwei Guijiu Pill on PMOP rats based on HPOA

LI Shu-zhen¹, WANG Qi¹, LI Qin-yuan¹, SHEN Ji-qiang¹, LI Chang-xing¹, WU Pei-feng¹, ZHANG Li-xue², DAI Dong-fang¹

1. Basic Medical Research Center, Medical College of Qinghai University, Xining 810006, China

2. Medical College of Northwest Minzu University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective Based on the hypothalamus-pituitary-ovary axis (HPOA) to explore the effect of Tibetan medicine Ershiwuwei Guijiu Pill (二十五味鬼臼丸) on osteoporosis in ovariectomized rats. **Methods** Forty non-pregnant SD female rats were randomly divided into sham operation group, model group, estradiol group, and Ershiwuwei Guijiu Pill group, with 10 rats in each group. Except for the sham operation group, only the fat masses of the same size beside the ovaries were removed, and the rats in the other three groups were removed bilateral ovaries to establish a rat model of postmenopausal osteoporosis (PMOP). One week after the operation, the administration was started. The estradiol group was given 0.1 mg/kg estradiol valerate, the Ershiwuwei Guijiu Pill group was given 441 mg/kg Ershiwuwei Guijiu Pill. The same volume of distilled water were given to the sham operation group and the model group and gavage daily for 12 consecutive weeks. The levels of serum estradiol, luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), and gonadotropin releasing hormone (GnRH) were detected by ELISA; RT-PCR was used to detect estrogen receptor alpha

收稿日期: 2021-06-11

基金项目: 青海省科技厅基础研究项目 (2018-ZJ-730, 2019-SF-134); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (31920180028)

作者简介: 李淑桢 (1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中藏药药理机制。E-mail: 373754365@qq.com

*通信作者: 代冬芳, 硕士生导师, 主要从事中藏药药理机制研究。E-mail: ddf1535@163.com

(*ERα*) and estrogen receptor beta (*ERβ*) mRNA expression in the hypothalamus, pituitary, and the distal femur of the left side; Immunofluorescence staining method was used to detect the expression of *ERα* and *ERβ* protein in the hypothalamus, pituitary and distal right femur; HE staining method was used to observe the morphological changes of the distal femur of rats; Micro-CT was used to detect the microstructure changes of the distal femur of the right. **Results** The Tibetan medicine Ershiwuwei Guijiu Pill can significantly decrease serum LH, FSH, GnRH levels in rats ($P < 0.05, 0.01$), and significantly up-regulate *ERα* mRNA and protein expression of hypothalamus and pituitary in the HPOA axis ($P < 0.01$), and significantly up-regulate femoral *ERβ* mRNA and protein expression ($P < 0.01$). And it can significantly recall the femur bone density and bone microstructure parameters of rats ($P < 0.01$). **Conclusion** The Tibetan medicine Ershiwuwei Guijiu Pill can effectively prevent and treat PMOP, and its mechanism may be related to the direct action of the drug on the estrogen receptor in bone or the indirect regulation of bone by changing the level of sex hormones in the body after acting on the estrogen receptor subtypes on the target organs of the HPOA.

Key words: Tibetan medicine; Ershiwuwei Guijiu Pill; phytoestrogens; osteoporosis; estrogen receptor; hypothalamus-pituitary-ovary axis

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 是女性进入围绝经期后常见症状之一。随着人口老龄化加剧, 女性绝经后骨质疏松症患者人数已高达 2 亿^[1]。研究发现, 雌激素减少是 PMOP 发生的主要原因, 对因治疗是临床主要手段, 但长期内源性雌激素治疗具有一定风险性, 患者可能会并发乳腺癌、静脉血管栓塞、心血管疾病、子宫内膜癌等严重疾病^[2]。为减少并发症, 研究人员提出使用植物雌激素治疗方法。目前已有大量临床研究证实, 植物雌激素具有防治 PMOP 的作用^[3-5]。

藏药二十五味鬼臼丸作为青藏地区特色性药物, 是当地用于治疗女性围绝经期综合征的首选药物之一, 其主要组成为鬼臼, 鬼臼中的木脂素属于植物雌激素^[6]。已有临床试验证明, 该药能够改善围绝经期女性出现的诸多症状^[7-8]。然而二十五味鬼臼丸临床疗效机制的研究仍停留在临床经验的积累上, 对其实验药效学和作用机制研究的报道极少, 这远不能满足现代临床和市场的需要, 因此, 本实验通过建立 PMOP 动物模型观察二十五味鬼臼丸在下丘脑-垂体-卵巢轴 (hypothalamus-pituitary-ovary axis, HPOA) 上对 PMOP 的影响, 为临床用药提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雌性未孕 SD 大鼠 40 只, 4 月龄, 体质量 (220±20)g, 由西安交通大学医学部实验动物中心所提供, 动物许可证号: SCXK (陕) 2018-001。饲养环境室温 (22±1)℃, 自由摄食、饮水, 12h 昼夜自然规律。实验过程遵循青海大学医学院实验动物伦理委员会相关规定 (批准文号 QHDX2021000541)。

1.2 药物与试剂

戊酸雌二醇片 (拜耳医药保健有限公司, 国药准

字 J20171038, 批号 547A); 藏药二十五味鬼臼丸 (青海省藏医院, 国药准字 Z20140539, 规格 0.35 g×49 丸/瓶, 批号 626189); TRIzol Reagent (美国 Ambion 公司, 批号 229001); PCR 引物由日本 TaKaRa 公司合成; RNA 提取试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司, 批号 AT311); 荧光定量 PCR 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司, 批号 AQ141); EDTA 脱钙液 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 E1171); HE 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 G1120); 大鼠血清雌二醇、黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)、卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH)、促性腺激素释放激素 (gonadotropin releasing hormone, GnRH) ELISA 试剂盒 (江苏酶标生物科技有限公司, 批号分别为 MB-2116A、MB-6623A、MB-2107A、MB-2062A)。大鼠 *ERα* 和 *ERβ* 多克隆抗体、 β -actin (英国 Abcam 公司, 批号 ab3575、ab3576、ab8227); DAPI 染色液 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 C1006); Cy3 标记羊抗兔 IgG (北京博奥森生物工程有限公司, 批号 A0516)。

1.3 主要仪器

Centrifuge 5418R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); Nanodrop 2000 (美国 Thermo 公司); Light Cycler96 实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司); HistoCore Pearl 全封闭组织脱水机 (德国 Leica 公司); HistoCoreArcdia 石蜡包埋机 (德国 Leica 公司); SkyScan 1176 小动物 Micro-CT 扫描仪 (德国 Bruker 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

适应性喂养 1 周后, 将 40 只 SD 未孕雌性大鼠中随机分为假手术组、模型组、雌二醇组、二十五味鬼臼丸组。除假手术组仅摘除卵巢旁同等大小的

脂肪组织,其余3组建立PMOP动物模型。术前禁食12h不禁水,将大鼠固定在手术台后,每只大鼠ip 10%水合氯醛(3 mL/kg),深度麻醉后备皮,碘伏消毒,沿腹直肌中线做腹正中切口2~3 cm,暴露腹腔后将腹内容物推向一侧可见呈V字型的子宫,沿子宫角向上可见桑葚状卵巢。除假手术组外,其他各组大鼠均摘取双侧卵巢,建立PMOP动物模型。术后im青霉素(20万U/只)连续3d预防感染。术后3d对各组大鼠逐只进行阴道涂片,1次/d,连续5d,若动物不出现动情期反应则表示造模成功。手术1周后开始ig给药处理,按照临床等效剂量计算,雌二醇组大鼠用药剂量为0.1 mg/kg,二十五味鬼臼丸组大鼠用药量为441 mg/kg,其余2组ig等体积蒸馏水,每日给药,持续12周。

2.2 标本制备

最后1次给药后,禁食12h,大鼠深度麻醉,腹主动脉取血,分离出双侧股骨,冰上操作,剔除

周围附着的肌肉和韧带等软组织后,用生理盐水反复冲洗,将左侧股骨置于冻存管中-80℃保存备用,右侧股骨置于4%多聚甲醛固定备用;大鼠断头处死后,冰上摘取下丘脑和垂体,生理盐水反复冲洗后,分别置于冻存管,-80℃保存备用。

2.3 ELISA检测各组大鼠血清性激素水平变化

EDTA抗凝管腹主动脉取血后,上下颠倒混匀,静置20 min左右,4℃,3000 r/min,离心20 min后收集上清液,按试剂盒要求检测雌二醇、LH、FSH、GnRH水平。

2.4 RT-PCR检测下丘脑、垂体和股骨的雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)、ER β mRNA表达

各组分别取100 mg下丘脑、垂体和左侧股骨远端,加入Trizol提取组织总RNA,按试剂盒进行反转录和荧光定量。每组设3个平行复孔,以 β -actin为内参基因,记录各组C_t值。运用2^{- $\Delta\Delta$ C_t}相对定量法计算各组目的基因相对表达量。引物序列见表1。

表1 引物序列及扩增产物长度

Table 1 Primer sequences and amplification products length

基因名称	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')	长度/bp
ER α	CACTCGATCATTTCGAGCACATTC	AAGGGTCATGGTCATGGTCAG	191
ER β	GCTGCTGGATGGAGGTGCTAA	TCGCCAGGAGCATGTCAAAG	150
β -actin	CCTAAGCCAACCGTGAAAA-3	CAGAGGCATACAGGGACAACAC	103

2.5 免疫荧光双标检测下丘脑、垂体和股骨ER α 及ER β 蛋白表达

将大鼠下丘脑、垂体、右侧股骨脱水包埋后,切成5 μ m厚度的切片后,依次进行烤片、脱蜡、水化、抗原修复、封闭、一抗孵育(1:200)、标记、染色、脱水、透明等步骤,封片后在荧光显微镜下观察并拍照,图像用Image J 6.0软件分析,测定平均荧光强度。

2.6 HE染色观察股骨形态变化

右侧股骨远端置于4%多聚甲醛固定48 h后,PBS缓冲液冲洗3次,20 min/次,放入EDTA脱钙液中,置于37℃恒温箱中脱钙4周,直至大头针能刺穿股骨后停止脱钙。随后进行脱水、透明、包埋、切片等步骤,按HE染色步骤染色后,显微镜下观察骨形态变化。

2.7 Micro-CT检测股骨微结构变化

应用Micro-CT CT50成像系统(Micro-CT CT50, Senco Medical)评价大鼠右侧股骨远端的微观结构,分辨率为18 μ m,并采用系统分析软件选定目的区域骨组织分析骨体积(bone volume, BV)、

相对骨体积[BV/组织体积(tissue volume, TV)]、骨小梁数量(trabecular number, Tb.N)、骨小梁分离度(trabecular separation/spacing, Tb.Sp),所有标本的分析范围保持一致。

2.8 统计学分析

研究数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 19.0软件进行分析,组间比较进行单因素方差齐性分析,若方差齐,组间比较采用LSD *t*检验;若方差不齐,组间比较采用Dunnett's *t*检验,*P*<0.05表示有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠血清性激素水平的变化

与假手术组比较,模型组大鼠血清雌二醇水平显著下降(*P*<0.01),LH、FSH、GnRH水平显著升高(*P*<0.01);与模型组比较,雌二醇组大鼠血清雌二醇水平显著升高(*P*<0.01),LH、FSH、GnRH水平显著下降(*P*<0.01);与模型组比较,二十五味鬼臼丸组大鼠血清雌二醇水平变化无统计学意义,但LH、FSH、GnRH水平显著下降(*P*<0.05、0.01)。结果见表2。

表2 各组大鼠血清性激素水平的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 2 Changes of serum sex hormone levels in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	雌二醇/(pmol·L ⁻¹)	LH/(mIU·mL ⁻¹)	FSH/(IU·L ⁻¹)	GnRH/(mIU·mL ⁻¹)
假手术	71.59 ± 1.66	10.72 ± 0.36	10.79 ± 0.40	75.60 ± 4.15
模型	59.31 ± 0.68**	13.42 ± 0.44**	14.10 ± 0.17**	90.05 ± 1.55**
雌二醇	67.73 ± 0.62##	11.32 ± 0.22##	11.86 ± 0.15##	81.85 ± 1.08##
二十五味鬼臼丸	60.67 ± 0.48	11.78 ± 0.26##	12.52 ± 0.24##	85.05 ± 1.78#

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

** $P < 0.01$ vs Sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below

3.2 各组大鼠下丘脑、垂体和股骨 ER α 、ER β mRNA 水平变化

与假手术组比较, 模型组大鼠下丘脑 ER α 、ER β mRNA 显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 雌二醇组和二十五味鬼臼丸组下丘脑 ER α mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$), 但 ER β mRNA 表达水平差异无统计学意义。见图 1。

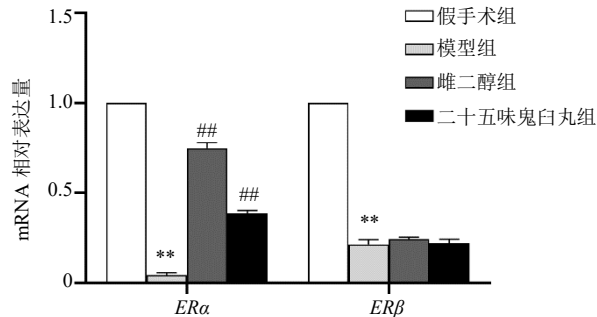


图1 各组大鼠下丘脑 ER α 、ER β mRNA 水平的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 1 Changes of ER α and ER β mRNA levels in hypothalamus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

与假手术组比较, 模型组大鼠垂体 ER α 、ER β mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 雌二醇组和二十五味鬼臼丸组垂体 ER α mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 雌二醇组垂体 ER β mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$), 二十五味鬼臼丸组垂体 ER β mRNA 表达水平差异无统计学意义。结果见图 2。

与假手术组比较, 模型组大鼠股骨 ER α 、ER β mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 雌二醇组股骨 ER α 、ER β mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$), 二十五味鬼臼丸组股骨 ER β mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$), 但 ER α mRNA 表达水平差异无统计学意义。结果见图 3。

3.3 各组大鼠下丘脑、垂体和股骨 ER α 、ER β 蛋白水平变化

下丘脑免疫荧光染色显示 (图 4), ER α 蛋白表

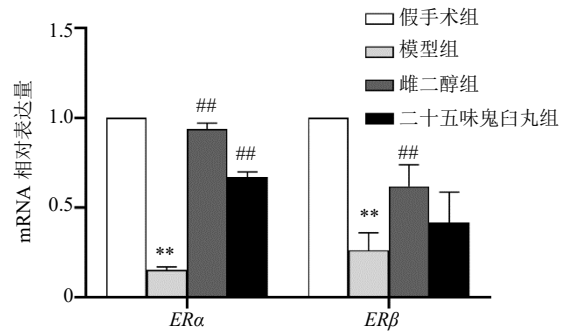


图2 各组大鼠垂体 ER α 、ER β mRNA 水平的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 2 Changes of ER α and ER β mRNA levels in pituitary of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

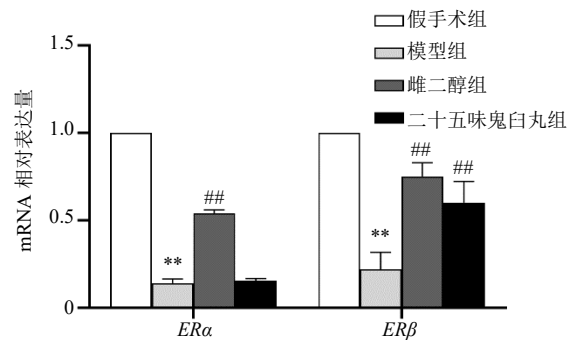
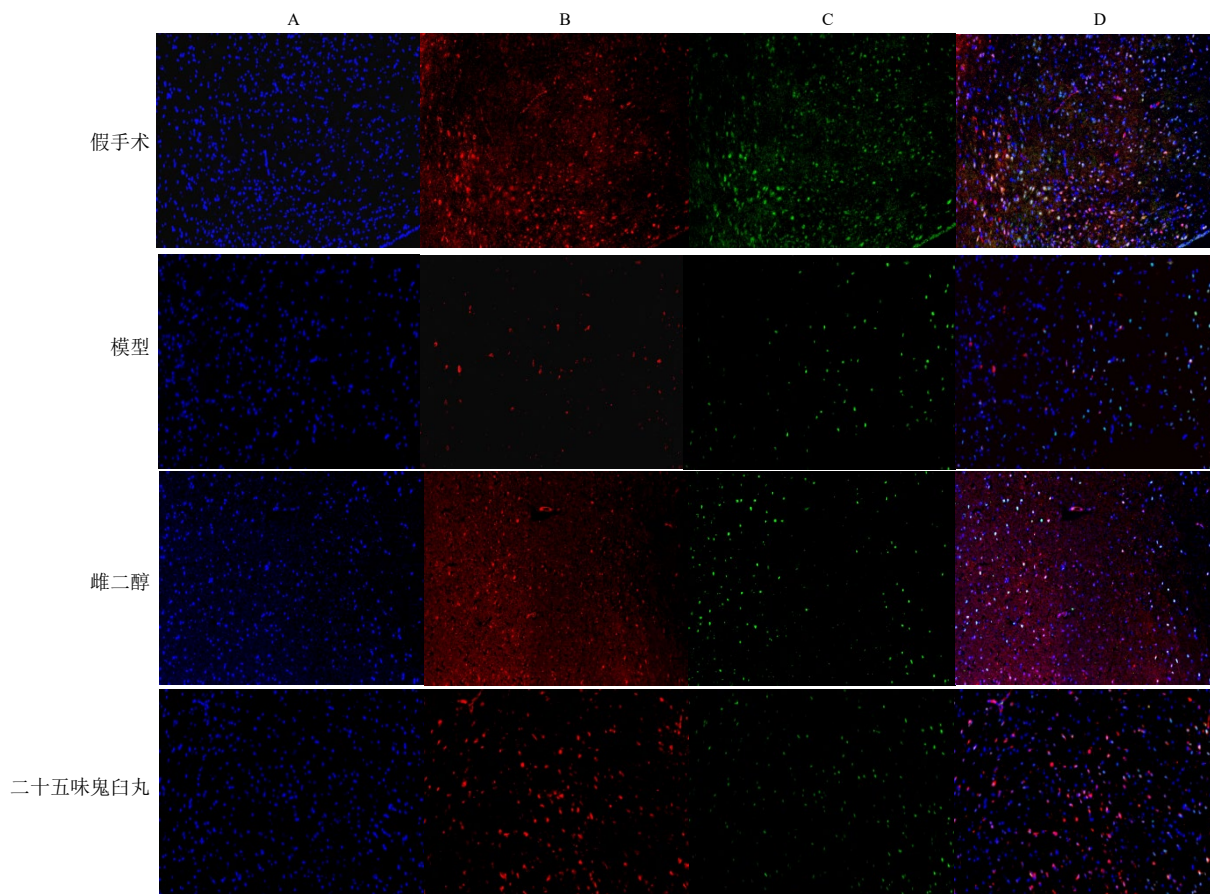


图3 各组大鼠股骨 ER α 、ER β mRNA 水平的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 3 Changes of ER α and ER β mRNA levels in femur of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

达阳性为红色, ER β 蛋白表达阳性为绿色。免疫荧光结果 (图 5) 显示, 与假手术组比较, 模型组 ER α 、ER β 蛋白平均荧光强度显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 雌二醇组和二十五味鬼臼丸组 ER α 蛋白平均荧光强度显著增强 ($P < 0.01$), 而 ER β 蛋白平均荧光强度差异无统计学意义。

垂体免疫荧光染色显示 (图 6), ER α 蛋白表达阳性为红色, ER β 蛋白表达阳性为绿色。免疫荧光



A-细胞核 B-ERα 蛋白的阳性表达 C-ERβ 蛋白的阳性表达 D-ERα 和 ERβ 共表达, 图 6、8 同

A-cell nucleus B-positive expression of ERα protein C-positive expression of ERβ protein D-co-expressed of ERα and ERβ protein, same as below fig. 6 and 8

图 4 下丘脑 ERα、ERβ 荧光染色 (×100)

Fig. 4 Fluorescence staining of ERα and ERβ in pituitary in hypothalamus (× 100)

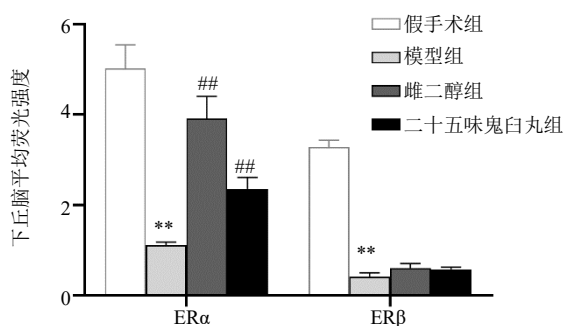


图 5 下丘脑 ERα、ERβ 蛋白半定量分析结果 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)
Fig. 5 Results of semi-quantitative analysis of ERα and ERβ proteins in hypothalamus ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

结果 (图 7) 显示, 与假手术组比较, 模型组 ERα、ERβ 蛋白平均荧光强度显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 雌二醇组 ERα、ERβ 蛋白平均荧光强度显著增强 ($P < 0.01$); 二十五味鬼臼丸组 ERα 蛋白

平均荧光强度显著增强 ($P < 0.01$), ERβ 蛋白平均荧光强度差异无统计学意义。

股骨免疫荧光染色显示 (图 8), ERα 蛋白表达阳性为红色, ERβ 蛋白表达阳性为绿色。免疫荧光结果 (图 9) 显示, 与假手术组比较, 模型组 ERα、ERβ 蛋白平均荧光强度显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 雌二醇组 ERα、ERβ 蛋白平均荧光强度显著增强 ($P < 0.01$); 二十五味鬼臼丸组 ERβ 平均荧光强度显著增强 ($P < 0.01$), ERα 蛋白平均荧光强度差异无统计学意义。

3.4 股骨形态变化

假手术组骨小梁排列有序, 结构致密完整; 模型组大鼠骨小梁稀疏, 排列紊乱甚至中断, 腔隙变大, 网状结构损坏; 与模型组比较, 雌二醇组骨小梁明显增多, 排列尚规则, 网状结构明显修复; 二十五味鬼臼丸组骨小梁明显增多, 但排列仍有中断,

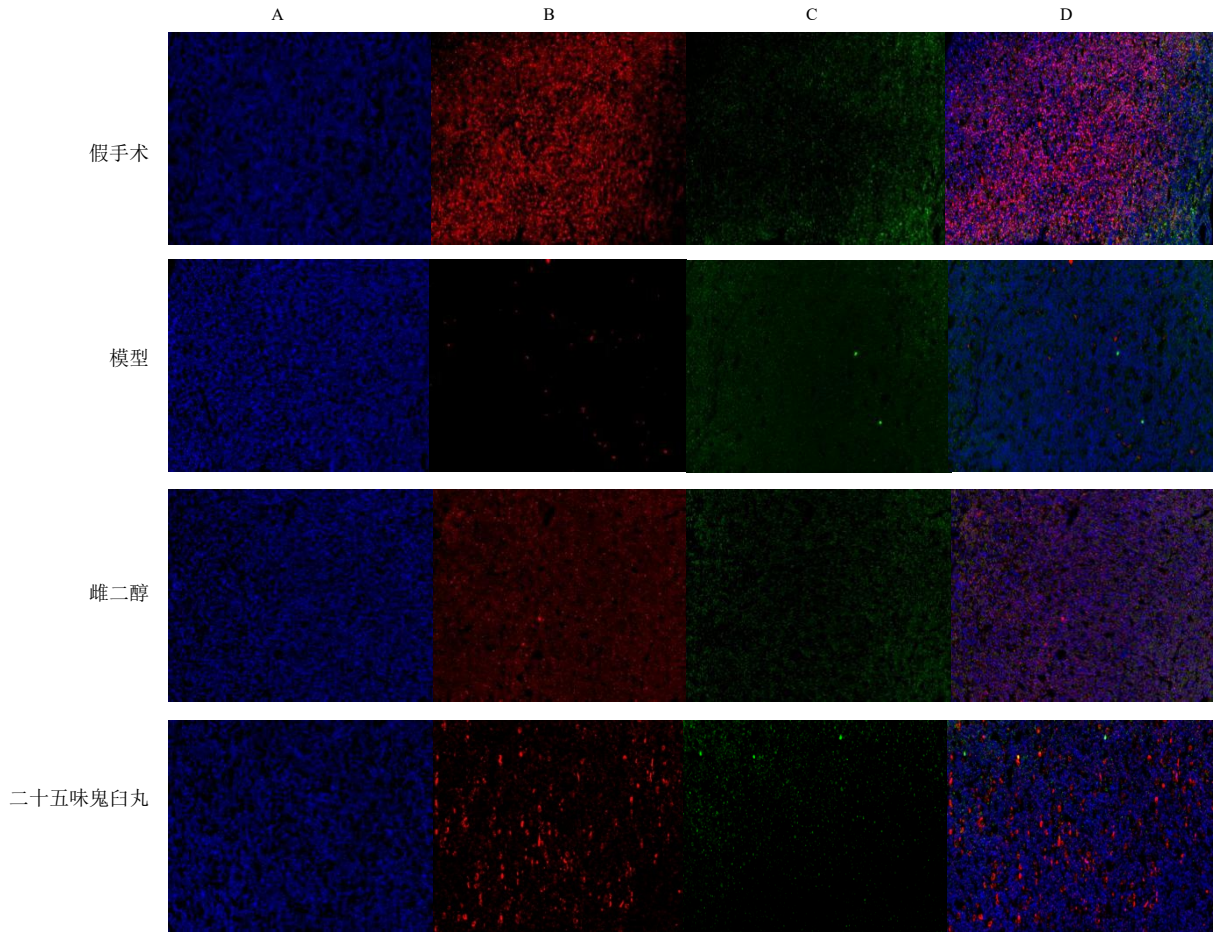


图6 垂体 ERα、ERβ 荧光染色 (×100)

Fig. 6 Fluorescence staining of ERα and ERβ in pituitary (× 100)

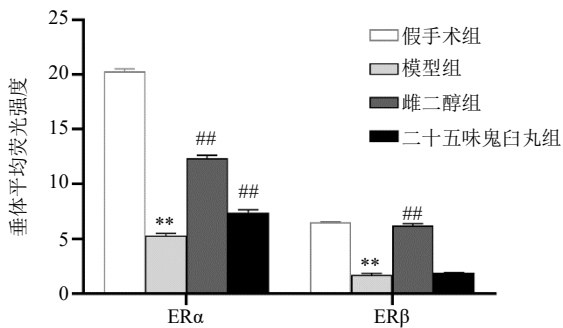


图7 垂体 ERα、ERβ 蛋白半定量分析结果 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 7 Results of semi-quantitative analysis of ERα and ERβ proteins in pituitary ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

可见腔隙间仍有少量脂肪细胞填充。见图 10。

3.5 各组大鼠股骨 Micro-CT 扫描及微结构参数的变化

与假手术比较,模型组大鼠 BV、BV/TV、Tb.N 显著下降 ($P < 0.01$), Tb.Sp 显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,雌二醇组和二十五味鬼臼丸组 BV、

BV/TV、Tb.N 显著升高 ($P < 0.01$), Tb.Sp 显著下降 ($P < 0.01$)。见图 11 和表 3。

4 讨论

HPOA 作为经典调节轴,是调节女性体内性激素水平稳定的主要神经内分泌轴。在女性进入围绝经期之前,HPOA 轴能够维持激素水平稳定,而女性进入围绝经期之后,由于卵巢功能衰退,体内雌激素水平显著下降,HPOA 轴已不能发挥其正常功能,导致下丘脑、垂体释放大量 GnRH、LH、FSH。体内性激素水平紊乱导致女性出现一系列临床症状,如燥热、失眠、情绪波动、骨量减少等。围绝经期是女性骨量丢失最多、最迅速的时期,在此期间,体内雌激素水平仍在正常范围,而促性腺激素处于高水平阶段;到疾病中后期,雌激素缺乏才是骨量丢失的主要原因^[9]。因此,近年来有大量研究证明,在围绝经期促性腺激素与骨量之间存在一定的相关性^[10-11]。Liu 等^[12]在研究 FSH 多克隆抗体对去卵巢小鼠脂肪组织的影响时发现,FSH 抗体与受体

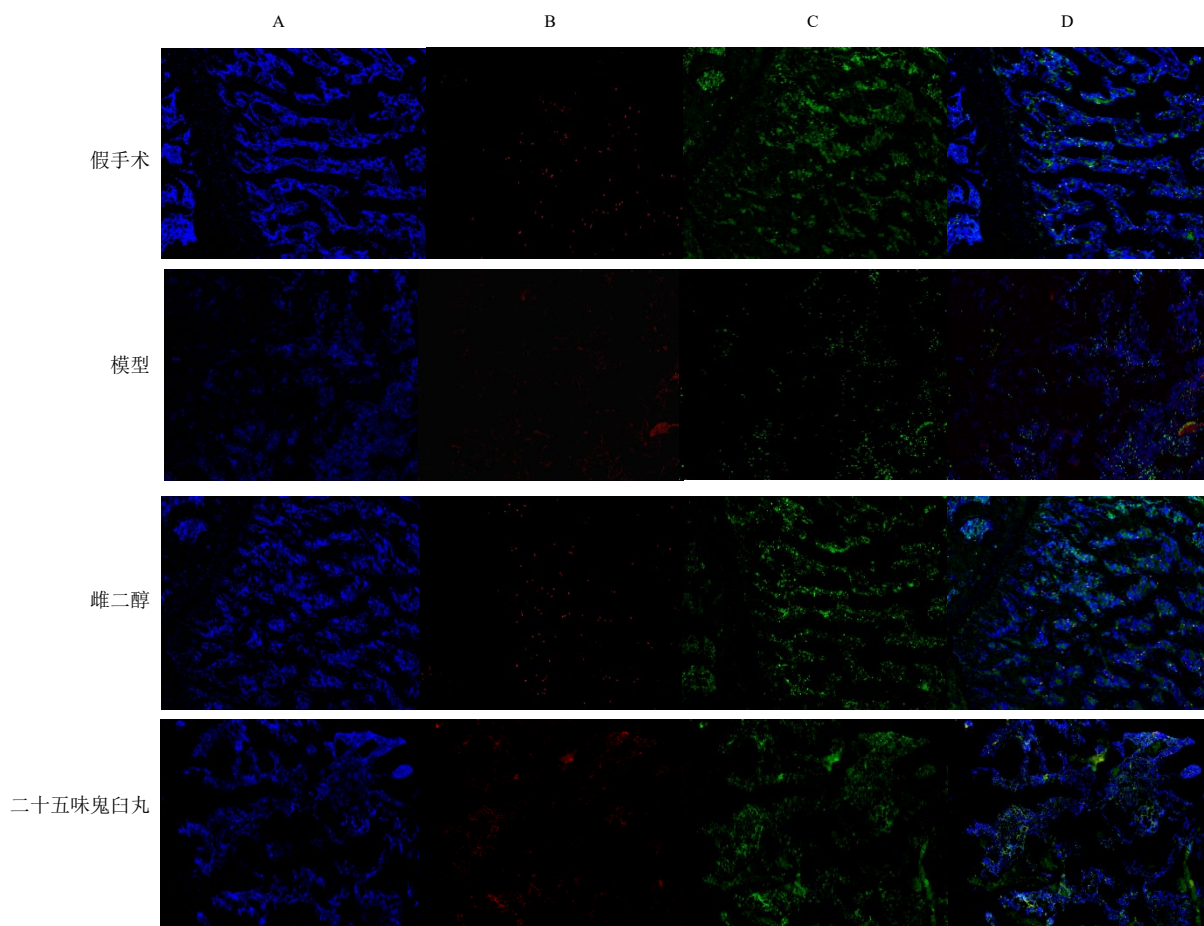


图 8 股骨 ERα、ERβ 荧光染色 (×50)

Fig. 8 Fluorescence staining of ERα and ERβ in femur (× 50)

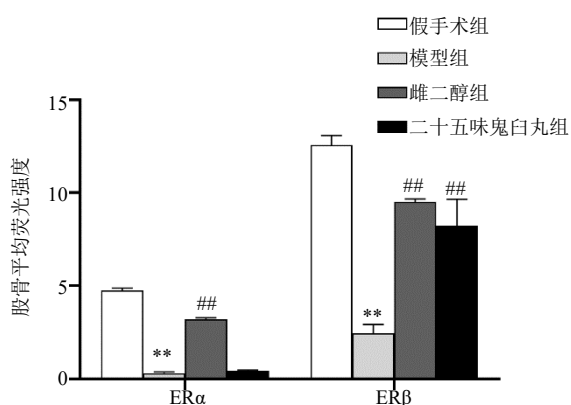


图 9 股骨 ERα、ERβ 蛋白半定量分析结果 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 9 Results of semi-quantitative analysis of ERα and ERβ proteins in femur ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

结合后还会增加小鼠骨量, 推测 FSH 受体可能是治疗绝经后肥胖及骨质疏松的潜在靶标, 该研究与 Ji 等^[13]的实验结果一致。Wang 等^[14]在观察围绝经期妇女 FSH 与破骨细胞活性标志物 I 型胶原肽羧基端

交联肽 (C-terminal cross-linked telopeptides of type I collagen, CTX) 的关系时发现, 围绝经期间女性 FSH 与 CTX 都显著升高, 提示高水平的 FSH 能促进破骨细胞活性, 导致骨量丢失。LH 是雌激素水平降低后负反馈刺激 HPOA 轴分泌的另一种激素, Blair 等^[15]实验证明, 降低血清 LH 水平后会引起来去卵巢大鼠骨密度增加。大量实验研究都已验证 HPOA 轴中的促性腺激素对骨质疏松有直接调控作用, 可能这也是临床中补充雌激素后导致体内促性腺激素水平降低, 对破骨细胞促进作用减弱, 从而防治骨质疏松的机制之一。本研究表明, 二十五味鬼臼丸显著降低血清 LH、FSH、GnRH 水平, 增加远端股骨密度, 该结果与 Zhou 等^[16]和 Wong 等^[17]的结果一致, 提示 HPOA 轴可能参与骨代谢。同时二十五味鬼臼丸选择性上调下丘脑、垂体 ERα 表达, 推测二十五味鬼臼丸可能通过与 ERα 结合降低血清 LH、FSH、GnRH 水平, 从而间接调控骨密度。

骨组织同样能够表达 ER, 雌激素可直接作用

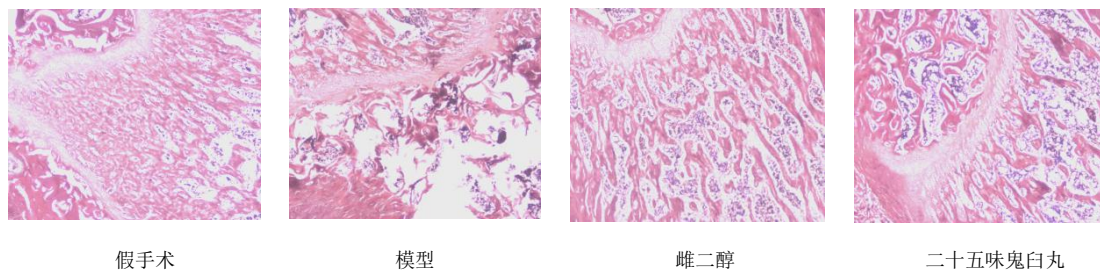


图 10 各组大鼠股骨形态变化 (HE, ×400)

Fig. 10 Morphological changes of femur in each group (HE, × 400)

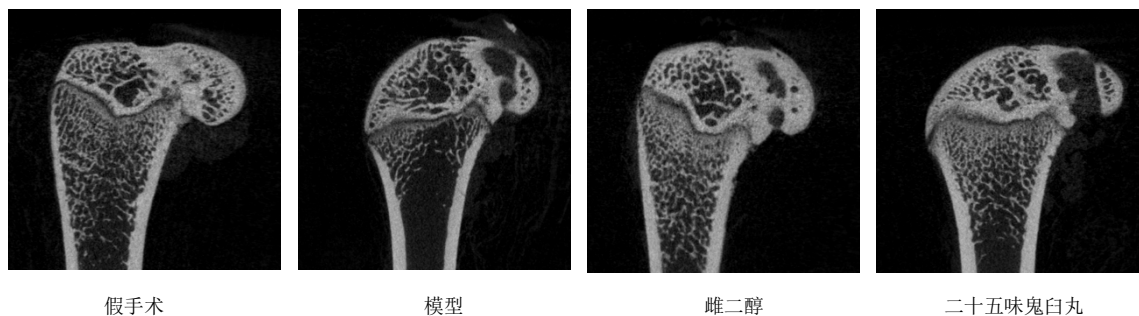


图 11 各组大鼠股骨远端 Micro-CT 扫描结果

Fig. 11 Micro-CT scan results of rat distal femurs in each group

表 3 各组大鼠股骨计量学结果 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 3 Femur histometric results in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	BV/mm ³	(BV/TV)%	Tb.N/(μm ⁻¹)	Tb.Sp/μm
假手术	3.52 ± 0.23	63.56 ± 3.02	0.004 5 ± 0.000 2	107.15 ± 14.54
模型	0.60 ± 0.26**	11.34 ± 3.03**	0.001 1 ± 0.000 5**	412.20 ± 72.08**
雌二醇	2.73 ± 0.29##	50.41 ± 7.18##	0.004 2 ± 0.000 1##	135.19 ± 23.56##
二十五味鬼臼丸	1.58 ± 0.26##	31.44 ± 5.18##	0.003 2 ± 0.000 4##	214.97 ± 23.02##

于骨组织 ER 调控骨细胞（破骨细胞和成骨细胞）活性，进而控制骨量变化。针对这一机制，选择性雌激素受体调节剂成为临床研究热点，巴多昔芬是该类药物代表之一，已有大量实验长期研究其安全性及有效性，实验证明巴多昔芬通过结合雌激素受体能有效增加骨密度，降低骨折发生率，并减少不良反应的发生^[18-20]。植物雌激素由于与雌激素有共同的酚环结构，因此能够与 ER 结合发挥相同效应，并具有双重调节作用，被认为具有选择性 ER 调节作用。近年来由于临床常规治疗方法的远期并发症较多，植物雌激素成了研究对象，其治疗 PMOP 的有效性在各实验中早已得到了验证^[21-22]。ERβ 在骨组织中分布广泛，有研究表明 ERβ 多态性与高骨密度相关^[23]。Lee 等^[24]研究雷公藤的多糖提取物对去卵巢小鼠更年期症状的影响时发现，雷公藤多糖提取物是通过调节 ERβ 而不是 ERα 相关的蛋白激酶

B (protein kinase, Akt) 信号通路减轻 PMOP。本研究结果显示，与模型组比较，二十五味鬼臼丸组显著上调大鼠股骨 ERβ 的表达，结果提示二十五味鬼臼丸可能通过 ERβ 直接调控骨密度。

综上所述，藏药二十五味鬼臼丸对防治 PMOP 有一定作用，能有效改善绝经后骨密度下降及骨微结构紊乱，其机制可能与药物作用骨组织 ER 后直接调控骨密度，或作用 HPOA 轴靶器官相关 ER 后通过改变体内性激素的水平间接调控骨代谢有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Svedbom A, Hernlund E, Ivergård M, et al. Osteoporosis in the European Union: A compendium of country-specific reports [J]. Arch Osteoporos, 2013, 8: 137.
 [2] 袁春燕, 任慕兰. 绝经后骨质疏松的性激素治疗 [J]. 实用妇产科杂志, 2020, 36(7): 494-497.

- [3] Abdi F, Alimoradi Z, Haqi P, *et al.* Effects of phytoestrogens on bone mineral density during the menopause transition: A systematic review of randomized, controlled trials [J]. *Climacteric*, 2016, 19(6): 535-545.
- [4] 陆思成. 青娥丸治疗绝经后肾阳虚型骨质疏松症的临床疗效观察 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2020.
- [5] 刘蔚楠, 戴燕铃, 林翔, 等. 益肾健骨膏治疗绝经后骨质疏松症的效果及对骨代谢的影响 [J]. *中外医学研究*, 2020, 18(34): 12-14.
- [6] 达娃卓玛, 尼玛潘多, 次旦多吉. HPLC 法测定藏药二十五味鬼臼丸中鬼臼毒素的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(8): 1482-1486.
- [7] 李亚芳. 藏药二十五味鬼臼丸治疗慢性盆腔炎的临床观察 [J]. *中国民族医药杂志*, 2020, 26(6): 19-21.
- [8] 宽太吉. 藏药二十五味鬼臼丸治疗妇科疾病的疗效 [J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2020, 8(14): 171.
- [9] Wang J, Zhang W W, Yu C X, *et al.* Follicle-stimulating hormone increases the risk of postmenopausal osteoporosis by stimulating osteoclast differentiation [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134986.
- [10] Taneja C, Gera S, Kim S M, *et al.* FSH-metabolic circuitry and menopause [J]. *J Mol Endocrinol*, 2019, 63(3): R73-R80.
- [11] Zhu D X, Li X S, MacRae V E, *et al.* Extragonadal effects of follicle-stimulating hormone on osteoporosis and cardiovascular disease in women during menopausal transition [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2018, 29(8): 571-580.
- [12] Liu P, Ji Y T, Yuen T, *et al.* Blocking FSH induces thermogenic adipose tissue and reduces body fat [J]. *Nature*, 2017, 546(7656): 107-112.
- [13] Ji Y, Liu P, Yuen T, *et al.* Epitope-specific monoclonal antibodies to FSH β increase bone mass [J]. *PNAS*, 2018, 115(9): 2192-2197.
- [14] Wang B, Song Y, Chen Y, *et al.* Correlation analysis for follicle-stimulating hormone and C-terminal cross-linked telopeptides of type I collagen in menopausal transition women with osteoporosis [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(2): 2417-2422.
- [15] Blair J A, Palm R, Chang J, *et al.* Luteinizing hormone downregulation but not estrogen replacement improves ovariectomy-associated cognition and spine density loss independently of treatment onset timing [J]. *Horm Behav*, 2016, 78: 60-66.
- [16] Zhou L P, Wong K Y, Yeung H T, *et al.* Bone protective effects of Dangguibuxue Tang alone and in combination with tamoxifen or raloxifene *in vivo* and *in vitro* [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 779.
- [17] Wong K Y, Zhou L P, Yu W X, *et al.* Water extract of Er-Xian decoction selectively exerts estrogenic activities and interacts with SERMs in estrogen-sensitive tissues [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114096.
- [18] Duggan S T, McKeage K. Bazedoxifene: A review of its use in the treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. *Drugs*, 2011, 71(16): 2193-2212.
- [19] Peng L H, Luo Q, Lu H. Efficacy and safety of bazedoxifene in postmenopausal women with osteoporosis: A systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(49): e8659.
- [20] Yavropoulou M P, Makras P, Anastasilakis A D. Bazedoxifene for the treatment of osteoporosis [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2019, 20(10): 1201-1210.
- [21] 贾强强, 陈贝贝, 朱如愿, 等. 女贞子对去卵巢大鼠抗骨质疏松作用及其对 GH/IGF-1 信号通路的影响 [J]. *中草药*, 2019, 50(16): 3852-3858.
- [22] 赵冰洁, 宋捷, 章丽, 等. 淫羊藿醇提物对去卵巢大鼠骨质疏松治疗作用及机制研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(11): 1919-1925.
- [23] Honma N, Mori S, Zhou H Y, *et al.* Association between estrogen receptor- β dinucleotide repeat polymorphism and incidence of femoral fracture [J]. *J Bone Miner Metab*, 2013, 31(1): 96-101.
- [24] Lee E, Jang M, Lim T G, *et al.* Selective activation of the estrogen receptor- β by the polysaccharide from *Cynanchum wilfordii* alleviates menopausal syndrome in ovariectomized mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 165(Pt A): 1029-1037.

[责任编辑 潘明佳]