

第五章 歸脾湯對去卵巢大鼠誘發骨質疏鬆的影響

前言

停經後婦人容易產生骨質疏鬆，缺乏雌激素是主要因素之一(Tremollieres et al. 1992)。雌激素已被廣泛的使用在停經後婦女(Kalu et al.,1991)。雌激素能刺激骨質的形成、抑制骨質的分解(Bain et al,1993) ，大鼠去卵巢後由於缺乏雌激素會誘發骨質疏鬆症，是目前廣泛運用的骨質疏鬆的動物模式(Patlas et al.,2000 ; Kalu et al.,1991) 。在第三章實驗中，我們以抗氧化的觀點，探討歸脾湯對大鼠去卵巢後產生氧化應力傷害的影響。臨床上，歸脾湯應用於更年期症候群，因此本章實驗利用在第三章實驗所保留的大鼠的骨標本，進行骨質疏鬆的相關研究。

材料與方法

一、動物

本章實驗是利用第三章實驗動物犧牲後所保留的骨檢品來進行。收集動物犧牲前 24 小時尿液供尿鈣測定，動物犧牲時取相關臟器重量稱重，採得的血清使用生化自動分析儀 (Ciba-corning 550, USA)，測定鹼性磷酸 \square (alkaline phosphatase)、酸性磷酸 \square (acid phosphatase) 的活性、及血鈣濃度。使用 Roche 試劑。

二、骨密度之測定

骨體積和密度之測量依據 Archimedes 原理 (Kalu et al. 1991)，先將第四腰椎之軟組織清除乾淨。骨放於盛去離子水之燒杯，燒杯放置在真空乾燥器中，抽真空 90 分鐘。取出骨將水分吸乾，即刻稱重，得骨之重量。緊接著，將骨懸浮在裝有去離子水的燒杯中，稱其重量，得骨體積。由骨重量及骨體積求出骨密度(g/cm^3)。

三、骨灰分及骨含鈣量之測定

骨在 100 $^{\circ}\text{C}$ 經 12 小時烘乾得骨乾重。再於 1000 $^{\circ}\text{C}$ 高溫燒燬 12 小時，等冷卻後稱其重量，得骨灰分重。將燒燬後的骨研磨均勻，取骨灰 10 mg，加入 1ml HCl (6N)、9.5 ml HNO₃ (0.1N)，混合均勻，取 0.5ml 混合液，稀釋 20 倍，加入 20% LaCl₃ 溶液 0.1ml，充分混合。使用原子吸光儀(Z-8200

Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer)測定鈣含量。以多重校正曲線計算濃度，骨中鈣濃度以 mg / g ash 表示之。

四、試藥

LaCl₃ 購自 sigma chemical CO.P.O。HNO₃ 購自 Ferak laborat gmbh berlin(west)。HCl 購自 Wako Pure Chemical Industries.Ltd。Ca 購自 Kanto chemical CO.Inc。

五、統計方法

以單尾變異數分析(one-way analysis of variance)方法分析，並進行 Dunnet 測試，以 P 值小於 0.05 認為有顯著差異。

結 果

一、攝食量及體重變化

詳第三章結果一。

二、子宮、腦下垂體的重量變化

Table 5-1. Effect of GPT on the weight of uterus and pituitary in OVX rats.

	Pituitary(mg)	Uterus(g)
Sham	18.5 ± 1.0	0.896 ± 0.149
Control	14.7 ± 0.6 ^{###}	0.087 ± 0.002 ^{###}
E2	18.5 ± 1.0 ^{**}	0.421 ± 0.017 ^{**}
1%GPT	14.6 ± 0.6	0.097 ± 0.003
3%GPT	14.6 ± 0.5	0.109 ± 0.004
5%GPT	15.1 ± 0.4	0.099 ± 0.004

Data were means ± S.E. (n = 9). ^{###} P<0.001 compared with sham operated group, ^{**} P<0.01 compared with ovx control group,

如表 5-1 所示，去卵巢大鼠腦下垂體和子宮的重量，與偽手術組比較明顯減輕。E2 明顯增加去卵巢大鼠腦下垂體和子宮的重量。歸脾湯處理的去卵巢大鼠腦下垂體和子宮的重量與控制組比較無影響。

三、鹼性磷酸□與酸性磷酸□活性

如表 5-2 所示，去卵巢大鼠手術後 12 週的血清鹼性磷酸□ (alkaline phosphatase)、酸性磷酸□(acid phosphatase)活性較偽手術組高。E2 或歸脾湯 (5 %)的處理可以降低此兩種酵素的活性。

Table 5-2. Effect of GPT on the activities of serum alkaline phosphatase and acid phosphatase in OVX rats.

	ALP(U/L)	ACPP(U/L)
Sham	29.5 ± 1.5	11.9 ± 0.9
Control	54.7 ± 3.6 ^{###}	18.8 ± 1.6 ^{##}
E2	33.9 ± 1.3 ^{***}	9.9 ± 0.8 ^{***}
1%GPT	41.3 ± 3.3 ^{**}	16.5 ± 1.6
3%GPT	51.4 ± 2.5	19.5 ± 2.1
5%GPT	42.3 ± 1.3 ^{**}	13.2 ± 1.1 [*]

Data were means ± S.E. (n = 9). ^{##} P<0.01 , ^{###} P<0.001 compared with sham operated group, ^{*} P<0.05 , ^{**} P<0.01 ^{***}P<0.001 compared with ovx control group.

四、血鈣濃度及尿鈣量

Table 5-3. Effect of GPT on serum and urinary calcium concentrations in OVX rats.

	Serum-Ca(mEq/dl)	Urinary-Ca(mg/24hrs)
Sham	10.5 ± 0.1	201.4 ± 30.7
Control	9.9 ± 0.1 ^{##}	93.3 ± 19.3 ^{##}
E2	10.8 ± 0.1 ^{***}	139.0 ± 12.6
1%GPT	10.1 ± 0.1	106.6 ± 19.1
3%GPT	10.1 ± 0.03	132.2 ± 28.0
5%GPT	10.0 ± 0.1	134.7 ± 10.4

Data were means ± S.E. (n = 9). ^{##} P<0.01 compared with sham operated group, ^{***}P<0.001 compared with ovx control group.

如表 5-3 所示，去卵巢大鼠血鈣濃度及尿鈣濃度與偽手術組比較，有下降現象。E2 對去卵巢大鼠血鈣有提昇作用，對尿鈣濃度沒有影響。去卵巢

大鼠餵食歸脾湯飼料 12 週對血鈣濃度無顯著影響，歸脾湯(3%)對尿鈣濃度有提昇作用。

五、骨密度、骨灰含鈣量

如圖 5-1 所示，去卵巢大鼠第四腰椎的骨密度、骨灰含鈣量較偽手術組明顯下降，E2 的處去卵巢大鼠第四腰椎的骨密度、骨灰含鈣量皆有意義的提昇。歸脾湯(1~5 %) 的處理可以增加去卵巢大鼠的骨密度，歸脾湯 (3 % , 5 %) 對骨灰含鈣量亦有提昇的作用。

討 論

大鼠去卵巢後體重增加，腦下垂體和子宮重量明顯減輕，這些變化皆可因 E2 的處理而獲得改善，但歸脾湯的處理對這些沒有影響，顯然的歸脾湯不具雌激素樣作用。

骨再建過程包括骨吸收(bone resorption)、骨形成(bone formation)和靜止階段。骨形成時，成骨細胞(osteoblast)先形成新骨。骨吸收時，破骨細胞(osteoclast)清除舊骨的礦物質(Kalu, 1991)。血清中鹼性磷酸 \square 是骨形成的指標 (Kalu et al., 1991a; Marie et al., 1993)，血清中酸性磷酸 \square 是骨吸收指標 (Peris et al., 1999)。

在本實驗大鼠去卵巢 12 週後，第四腰椎骨密度及骨灰含鈣量明顯較偽手術組低，去卵巢大鼠血清鹼性磷酸 \square 和酸性磷酸 \square 活性上升。E2 的處理可以改善骨密度及骨灰含鈣量，對血清鹼性磷酸 \square 和酸性磷酸 \square 活性也有降低作用。這些顯示雌激素對骨吸收及骨形成都有影響，與其他文獻的觀點一致 (Lindsay, 1987)。

歸脾湯的處理可以改善骨密度及骨灰含鈣量，對血清鹼性磷酸 \square 和酸性磷酸 \square 活性也有降低作用。歸脾湯對骨質流失的改善作用會影響骨吸收及骨形成。

在本實驗與其他實驗同 (Kalu, 1984 ; Turner et al., 1987 ; Burnett and Reddi, 1983)，去卵巢大鼠血鈣及尿鈣濃度均較偽手術組低，E2 的處理可以改

善血鈣、尿鈣濃度，可能是雌激素具有促進腸對鈣的吸收而使血鈣增加，因此尿鈣也增加 (Wornski et al.,1988 ; Liu and Kalu, 1990)。歸脾湯的處理對血鈣、尿鈣濃度沒有影響，由此推測歸脾湯對腸道鈣吸收沒有影響。

歸脾湯可以改善骨質流失，其作用機轉與雌激素不同，尚待進一步探討。