

## · 基础研究 ·

## 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨超微结构及脯氨酸羟化程度的影响

伍海昭, 陈海啸, 朱敏

(台州医院骨科, 浙江 临海 317000)

**【摘要】目的:**研究应用骨碎补总黄酮后骨超微结构及脯氨酸羟化程度的变化,从骨胶原的超微结构来研究骨碎补总黄酮对骨强度的影响。**方法:**40 只 10 月龄 SD 雌性大鼠(体重 350~380 g),随机分成假切除组(空白组)、模型组、药物组、对照组,每组 10 只。假切除组只切除腹部的少许脂肪,其余各组采用双侧卵巢切除的方法进行动物造模。药物组每天灌服中药骨碎补总黄酮浓缩剂 2 ml(相当于骨碎补总黄酮 0.02 g),共 6 个月;对照组每天灌服培美力悬剂 2 ml(相当于培美力 0.017 mg),共 6 个月。灌胃 6 个月后取 L<sub>2</sub> 进行扫描电镜观察,并以碱水解法测单位重量脯氨酸羟化程度。**结果:**骨碎补总黄酮能明显改善骨胶原的排列,减少断裂的骨胶原。药物组脯氨酸羟化程度为(58.77±0.56)%,对照组为(60.90±0.53)%,模型组为(47.34±0.52)%,药物组和对照组比较差异无统计学意义,但较模型组脯氨酸羟化程度提高(P<0.05)。**结论:**骨碎补总黄酮能改善骨质疏松的超微结构及脯氨酸羟化程度,从而为药物防治骨质疏松的研究提供思路。

**【关键词】** 骨碎补总黄酮; 脯氨酸; 骨质疏松,绝经后; 动物实验; 卵巢切除术

DOI:10.3969/j.issn.1003-0034.2011.01.014

### Effects of drynaria fortunei on bone ultramicrostructure and proline hydroxylation level of ovariectomized rats

WU Hai-zhao, CHEN Hai-xiao, ZHU Min. Taizhou Hospital, Linhai 317000, Zhejiang, China

**ABSTRACT Objective:** To observe the change of bone ultramicrostructure and proline hydroxylation level after application of drynaria fortunei and explore the effects of drynaria fortunei to bone strength from aspect of ultramicrostructure of bone collagen. **Methods:** Forty SD female rats with 10-month-old (Each weight was 350-380 g) were randomly divided into sham-ovariectomized group, model group, Chinese herb group and control group (each group had 10 rats). Only a little abdominal fat were cut in sham-ovariectomized group; in other groups, the hibateral ovaries of rats were cut to make ostenopausal osteoporosis model. Chinese herb medicine group rats were treated with drynaria fortunei of 2 ml (equivalent to 0.02 g) through intragastric administration everyday, and control group were fed with Premarin of 2 ml (equivalent to 0.017 mg). At the 6 months after treatment, bone ultramicrostructure of L<sub>2</sub> were observed with electronmicroscope, and proline hydroxylation level were measured by method of alkali hydrolysis. **Results:** Drynaria fortunei can obviously improve arrangement of bone collagen and decrease break of bone collagen. Proline hydroxylation level of Chinese herb medicine group, control group, model group were respectively (58.77±0.56)%, (60.90±0.53)%, (47.34±0.52)%, there was no significant difference between Chinese herb medicine group and control group, but this two groups were higher than that of model group (P<0.05). **Conclusion:** The experimental results showed that drynaria fortunei can improve cancellated bone ultramicrostructure and proline hydroxylation level, thereby to provide a new idea for prevention and treatment of osteoporosis.

**KEYWORDS** Drynaria fortunei; Proline; Osteoporosis, postmenopausal; Animal experimentation; Ovariectomy

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(1):48-50 www.zggszz.com

骨质疏松症是严重影响老年人生活质量的常见病之一,它以骨量减少、骨组织显微结构退化、骨折危险度增加为特征,治疗非常棘手<sup>[1]</sup>。植物药在治疗该病方面有明显优势。近年来,骨质疏松症研究中越来越强调骨质量,认为骨质量才能更好地反映骨骼

的生物特性<sup>[2]</sup>。本文从骨胶原的超微结构来研究骨碎补总黄酮对骨强度的影响,同时从氨基酸的水平研究其机制。

#### 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 茛三酮、磺基水杨酸为 SIGMA 公司产品,羟脯氨酸测定试剂盒购自南京建成生物公司,磷酸、戊二醛和冰醋酸为上海试剂总厂产品。清洁级 SD 大鼠购自浙江中医药大学实验动物中心。

**1.2 实验动物的选择、分组与造模** 40 只 10 月龄

基金项目:浙江省卫生厅基金项目(编号:2005c098)

Fund programs: Programs of Health Department of Zhejiang Province (No: 2005c098)

通讯作者:陈海啸 E-mail: wuhaizhao@21cn.com

SD 大鼠,随机抽取 10 只麻醉后,仅切除腹部少许脂肪(假手术组),其余 30 只麻醉后从背部入路切除双侧卵巢(随机分成药物组、模型组和阳性对照组)。

假切除组和模型组,用标准饲料常规饲养。药物组在继续用标准饲料喂养的同时每天灌服中药骨碎补总黄酮浓缩剂 2 ml(相当于骨碎补总黄酮 0.02 g,按人鼠体表面积换算,药物由北京岐黄制药有限公司提供,在浙江省台州医院药剂科制成浓缩液),共 6 个月。对照组在标准饲料常规喂养 6 个月的同时每天灌服培美力悬剂 2 ml(相当于培美力 0.017 mg,按人鼠体表面积换算,药物由爱尔兰惠氏药厂生产,制成混悬液,在浙江省台州医院药剂科完成),用药时间也为 6 个月。

### 1.3 观察指标与方法

**1.3.1 大鼠腰椎松质骨扫描电镜标本的制备** 经腹主动脉采血处死动物后,立即取 L<sub>2</sub>,剔除骨组织表面附着的肌肉等软组织,沿正中中线做矢状剖开,暴露骨髓腔。用生理盐水冲洗后,于 2.5%戊二醛中固定 24 h,再放入 10%次氯酸钠溶液浸泡 8 h,超声冲洗 15 min,乙醇逐级脱水,醋酸异戊酯脱脂,常温空气干燥,临界点干燥,定向黏附在金属载物上。真空喷金镀膜,在扫描电子显微镜下观察大鼠腰椎松质骨骨小梁超微结构的形态改变。

**1.3.2 测单位重量脯氨酸羟化程度** ①骨组织匀浆制备。称取新鲜骨组织 200 mg,液氮速冻,研磨成粉,加预冷 PBS,充分混匀,制备组织匀浆,定容至 2 ml。②羟脯氨酸测定。取 0.5 ml 骨组织匀浆测定羟脯氨酸含量(碱水解法),所有实验步骤严格按照试剂盒操作说明书(南京建成生物公司)进行,根据计

算公式换算羟脯氨酸含量(ug/g 骨组织)。③脯氨酸测定。取上述组织匀浆 0.5 ml,然后向各管分别加入 3 ml 3%的磺基水杨酸溶液,沸水浴 10 min,冷却后过滤,滤液即为脯氨酸提取液。取 2 ml 提取液于 10 ml 试管中,加入 2 ml 冰醋酸及 2 ml 酸性茚三酮试剂,在沸水浴中加热 30 min,溶液即呈红色。冷却后每试管加入 4 ml 甲苯,摇荡 30 s,静置片刻,取上层液至 10 ml 离心管中,在 3 000 r/min 下离心 5 min。用吸管轻轻吸取上层脯氨酸红色甲苯溶液于比色杯中,以甲苯为空白对照,在分光光度计上 520 nm 波长处比色,测得吸光度值。同时设立脯氨酸标准品对照,制

备脯氨酸标准品溶液,浓度分别为 1、2、3、4、5、6 μg/ml,做上述相同处理,测吸光度值,绘制标准曲线。根据标准曲线回归方程,计算组织匀浆液中脯氨酸的含量,再计算每克骨组织脯氨酸含量(ug/g 骨组织)。脯氨酸羟化程度以 [羟化脯氨酸/(羟化脯氨酸+脯氨酸)]×100%表示。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,模型组与空白组比较采用成组设计定量资料的 *t* 检验,模型组、药物组、对照组比较采用方差分析。

## 2 结果

**2.1 大鼠腰椎松质骨超微结构** 放大 3 500 倍的扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)照片可见:空白组大鼠腰椎松质骨骨小梁上的胶原纤维走向清晰,排列紧密整齐,呈规则的束状结构,纤维束间有更细的斜向纤维相连(图 1);模型组大鼠腰椎松质骨的胶原纤维排列杂乱无序,胶原纤维结构模糊不清,呈板结硬化样改变(图 2);药物组大鼠

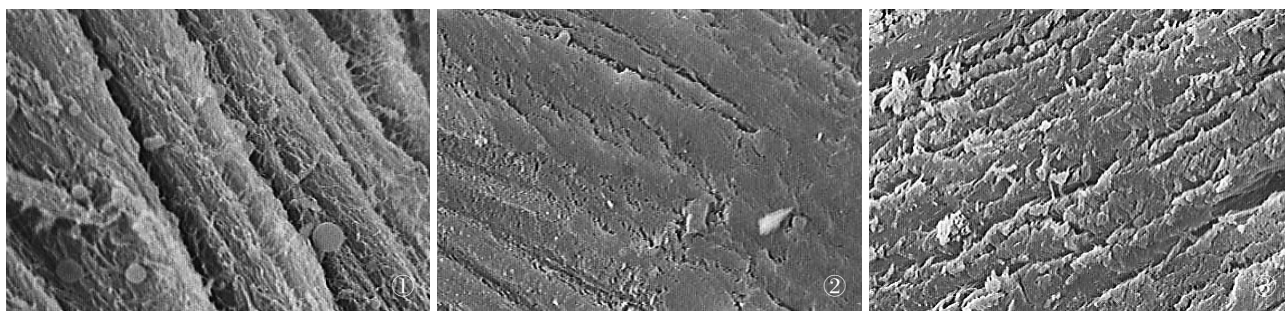


图 1 空白组的胶原纤维走向清晰,排列紧密整齐,呈规则的束状结构,束间有更细的斜向纤维相连(SME×3 500) 图 2 模型组的胶原纤维排列杂乱无序,胶原纤维结构模糊不清,呈板结硬化样改变(SME×3 500) 图 3 药物组的胶原纤维结构模糊不清,呈板结硬化样改变,但好于模型组(SME×3 500) 图 4 对照组胶原纤维的正常形态仍可见,纤维束间的斜向纤维很少可见(SME×3 500)

**Fig.1** Arrange of collagen fibers in sham-ovariectomized group were clearly and tightly, showed regularly bunchy structure, slimy oblique fibers linked between bunchy structure (SME×3 500) **Fig.2** Arrange of collagen fibers in model group were disorderly and structure were unclearly, showed change of harden (SME×3 500) **Fig.3** Arrange of collagen fibers in Chinese herb group were unclearly showed change of harden, but it was better than model group(SME×3 500) **Fig.4** In control group,

normal form of collagen fibers can still visible, few oblique fiber can be seen between fiber bundles(SME×3 500)

腰椎松质骨骨小梁上的胶原纤维结构模糊不清,呈板结硬化样改变,但好于模型组(图 3);对照组大鼠骨胶原纤维的正常形态仍可见,纤维束间的斜向纤维很少见(图 4)。

**2.2 脯氨酸羟化程度分析** 造模 6 个月后各组大鼠椎体脯氨酸、羟脯氨酸和羟化程度差异有统计学意义,药物组与对照组比较差异无统计学意义,但药物组与模型组比较、对照组与模型组比较,药物组、对照组的羟化程度均提高(见表 1)。

表 1 造模 6 个月后各组大鼠椎体脯氨酸羟化程度比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Comparison of proline hydroxylation level at the 6 months after operation among 4 groups( $\bar{x} \pm s$ )

组别	脯氨酸( $\mu\text{g/g}$ )	羟脯氨酸( $\mu\text{g/g}$ )	羟化程度(%)
空白组	118.86 $\pm$ 7.83	251.33 $\pm$ 13.15	68.02 $\pm$ 0.52
模型组	198.45 $\pm$ 12.48 <sup>a1b1c1</sup>	178.08 $\pm$ 8.53 <sup>a2b2c2</sup>	47.34 $\pm$ 0.52 <sup>a3b3c3</sup>
药物组	148.18 $\pm$ 11.23 <sup>d1</sup>	211.01 $\pm$ 12.25 <sup>d2</sup>	58.77 $\pm$ 0.56 <sup>d3</sup>
对照组	142.96 $\pm$ 10.22	223.56 $\pm$ 12.62	60.90 $\pm$ 0.53

注:与空白组比较,<sup>a1</sup>t=3.68, P<0.01; <sup>a2</sup>t=3.19, P<0.05; <sup>a3</sup>t=2.72, P<0.05。与药物组比较,<sup>b1</sup>q=4.01, P<0.05; <sup>b2</sup>q=4.14, P<0.05; <sup>b3</sup>q=3.96, P<0.05。与对照组比较,<sup>c1</sup>q=4.07, P<0.05; <sup>c2</sup>q=4.23, P<0.05; <sup>c3</sup>q=3.98, P<0.05。与对照组比较,<sup>d1</sup>q=0.62, P>0.05; <sup>d2</sup>q=0.59, P>0.05; <sup>d3</sup>q=0.53, P>0.05

Note: Compared with sham-ovariectomized group, <sup>a1</sup>t=3.68, P<0.01; <sup>a2</sup>t=3.19, P<0.05; <sup>a3</sup>t=2.72, P<0.05. Compared with Chinese herb group, <sup>b1</sup>q=4.01, P<0.05; <sup>b2</sup>q=4.14, P<0.05; <sup>b3</sup>q=3.96, P<0.05. Compared with control group, <sup>c1</sup>q=4.07, P<0.05; <sup>c2</sup>q=4.23, P<0.05; <sup>c3</sup>q=3.98, P<0.05. Compared with control group, <sup>d1</sup>q=0.62, P>0.05; <sup>d2</sup>q=0.59, P>0.05; <sup>d3</sup>q=0.53, P>0.05

### 3 讨论

骨质疏松症是一种系统性疾病,不仅有骨量的减少,更重要的是骨组织显微结构的退化。骨质疏松症研究中越来越强调骨质量,认为骨质量才能更好地反映骨骼的生物特性。骨质量取决于骨的材料特性和结构特性。作为骨的支架,骨小梁的微结构能明显影响骨骼生物特性<sup>[3-6]</sup>。

本研究系统观察了骨碎补总黄酮喂养的去卵巢大鼠腰椎椎体松质骨骨小梁的超微结构改变,发现去卵巢大鼠腰椎椎体松质骨胶原纤维由排列杂乱无序到结构模糊不清,出现板结硬化样改变。而药物组和对照组能明显改善这种状况,但药物组差于对照组。

骨小梁是由胶原纤维构成的,胶原蛋白由 3 条

$\alpha$  肽链绞合而成,胶原蛋白中肽链的螺旋结构与脯氨酸、羟脯氨酸有关。羟脯氨酸能产生氢键及氧桥,使结构相对牢固<sup>[7-8]</sup>。本研究中各组羟脯氨酸的差异表明去卵巢大鼠腰椎椎体松质骨中胶原的羟脯氨酸明显降低,而药物组有明显的提高,说明骨碎补总黄酮能使骨胶原中脯氨酸的羟化程度提高,从而使骨胶原的结构更牢固。

### 参考文献

- [1] 薛延. 骨质疏松症防治指南[M]. 北京:人民卫生出版社,2008: 3-13. Xue Y. Prevention and Treatment of Osteoporosis[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 3-13. Chinese.
- [2] 郭世绛. 骨质量与骨质疏松症[J]. 国外医学:内分泌学分册, 2005, 25(5): 295-297. Guo SF. Bone quality and osteoporosis[J]. Guo Wai Yi Xue: Nei Fen Mi Xue Fen Ce, 2005, 25(5): 295-297. Chinese.
- [3] 曹立, 雍宜明, 沈惠良. 骨质量在骨质疏松诊断中的意义[J]. 中国骨质疏松杂志, 2000, 6(3): 84-86. Cao L, Yong YM, Shen HL. Significance of bone quality in diagnosis of osteoporosis[J]. Zhongguo Gu Zhi Shu Song Za Zhi, 2000, 6(3): 84-86. Chinese.
- [4] 张剑锋, 陈允震, 刘海春, 等. 骨胶原在骨质疏松大鼠中的变化及其与骨生物力学相关性试验研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2006, 14(23): 1807-1809. Zhang JF, Chen YZ, Liu HC, et al. Experimental observation of the changes and correlation of bone collagen and biomechanical property in osteoporosis rats[J]. Zhongguo Jiao Xing Wai Ke Za Zhi, 2006, 14(23): 1807-1809. Chinese.
- [5] Vignat-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength[J]. Osteoporos Int, 2006, 17(3): 319-336.
- [6] 谢斌, 陈允震, 刘海青. 骨胶原在骨质疏松中的作用[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(8): 2057-2059. Xie B, Chen YZ, Liu HQ. Effect of bone collagen in osteoporosis[J]. Zhongguo Lao Nian Xue Za Zhi, 2009, 29(8): 2057-2059. Chinese.
- [7] 李梅, 孟迅吾, 周学瀛, 等. I 型胶原蛋白与骨质疏松症研究进展[J]. 国外医学:内分泌学分册, 2000, 20(1): 14-16. Li M, Meng XW, Zhou XY, et al. Progress of collagen type I and osteoporosis[J]. Guo Wai Yi Xue: Nei Fen Mi Xue Fen Ce, 2000, 20(1): 14-16. Chinese.
- [8] 查锡良. 生物化学[M]. 第 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2008: 311-313. Zha XL. Biochemistry[M]. 7th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 311-313. Chinese.

(收稿日期:2010-07-14 本文编辑:连智华)