

· 基础研究 ·

蛇床子素与金雀异黄酮对大鼠峰值骨量影响的比较研究

成魁¹, 葛宝丰¹, 甄平¹, 陈克明¹, 马小妮¹, 周建¹, 宋鹏¹, 马慧萍²

(1, 兰州军区兰州总医院骨科研究所, 甘肃 兰州 730050; 2, 兰州军区兰州总医院药材科, 甘肃 兰州 730050)

【摘要】 目的:研究蛇床子素(Osthole, OST)与金雀异黄酮(Genistein, GEN)对大鼠峰值骨密度与骨质量的影响。**方法:**采用随机分组法将 36 只 1 月龄 SD 雌性大鼠(125±3) g 分为 3 组:对照组(CON, 等体积蒸馏水, n=12), 蛇床子素组(OST, 9 mg·kg⁻¹·d⁻¹ i.g., n=12), 金雀异黄酮组(GEN, 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ i.g.; n=12)。每周监测体重, 每月用双能 X 射线骨密度仪(DEXA)检测全身骨密度。3 个月后处死所有动物, 采用酶联免疫法测定血清骨钙素(Osteocalcin, OC)和抗酒石酸性磷酸酶 5b(Tartaric acid phosphatase 5b, TRACP 5b)含量, 用 DEXA 测定股骨骨密度, 用 μCT 分析股骨组织微结构, 树脂包埋不脱钙骨组织切片技术做胫骨骨形态分析, 用万能材料试验机测定股骨生物力学, 称量心、肝、胃、肾、肾上腺和子宫湿重, 计算器官指数, 并做常规病理学检测。**结果:**大鼠的体重、器官指数差异无统计学意义(P>0.05); 病理学观察未见异常发生; 第 1、2 个月全身骨密度无明显差异(P>0.05), 第 3 个月后 OST 组全身骨密度显著高于 CON 组、GEN 组, 上述 3 组中股骨骨密度与全身骨密度的变化呈相同趋势(P<0.05)。与对照组相比, OST 组、GEN 组血清 OC 水平升高, 而与 CON 组、GEN 组相比, OST 组的 TRACP 5b 含量下降(P<0.05); OST 组的骨体积百分率、骨小梁厚度和骨小梁数量均高于 CON 组, 但骨小梁分离度和模型系数均显著低于 CON 组(P<0.05), OST 组与 GEN 组的上述指标虽未出现统计学差异(P>0.05), 但平均值 OST 组高于 GEN 组; OST 组骨小梁厚度和骨小梁数量均高于 CON 组、GEN 组, 但骨小梁分离度低于 CON 组、GEN 组; OST 组股骨最大载荷、弹性模量和屈服强度均明显高于 CON 组(P<0.05), OST 组与 GEN 组虽未出现统计学差异(P>0.05), 但平均值 OST 组高于 GEN 组。**结论:**口服蛇床子素能有效提高大鼠峰值骨量, 从而为防治骨质疏松的发生提供新思路。

【关键词】 蛇床子素; 金雀异黄酮; 骨密度; 骨和骨组织; 大鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2014.07.013

Comparative study on effect of osthole and genistein on peak bone mass in rats CHENG Kui, GE Bao-feng, ZHEN Ping, CHEN Ke-ming*, MA Xiao-ni, ZHOU Jian, SONG Peng, and MA Hui-ping. *Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Area, Lanzhou 730050, Gansu, China

ABSTRACT Objective: To compare the ability of osthole (OST) and genistein (GEN) in enhancing bone peak bone mass of rats to prevent osteoporosis. **Methods:** Thirty-six female one-month-old SD rats of (125±3) g body weight were randomly divided into three groups, 12 rats in each group, one group was orally administered osthole at 9 mg·kg⁻¹·d⁻¹, one group was given genistein at 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ and another was given equal quantity of distilled water as the control. The body weight was monitored weekly and the bone mineral density (BMD) of total body was measured every month. All rats were sacrificed after three months, the femoral bone mineral density, the serum levels of osteocalcin (OC) and anti-tartaric acid phosphatase 5b (TRACP 5b) were measured by Elisa. The bone microarchitectures were analyzed with micro-CT and the bone biomechanics properties were tested with universal material machine. **Results:** No significant differences were observed between O-treated or GEN group and the control for the food-intake and body weight during three months. However, the rats treated with OST had significant higher BMD for both total body and femur than the control and GEN group. The O-treated rats also had higher level of serum OC and lower level of TRACP 5b. Besides, they owned bigger bone volume/tissue volume, trabecular thickness, trabecular number but smaller trabecular spacing. In the three point bending tests of femurs, they were found to have larger maximum load, the young's modulus and structural model index (SMI). **Conclusion:** Orally administered osthole could efficiently increase the peak bone mass of rats, which provide new ideas for preventing osteoporosis.

KEYWORDS Osthole; Genistein; Bone density; Bone and bones; Rats

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2014, 27(7):587-591 www.zggszz.com

基金项目:国家自然科学基金(编号:81270963);甘肃省科技重大专项(092NKDA025)

Fund program: Natural Science Foundation of China (No. 81270963)

通讯作者:陈克明 E-mail:chkeming@aliyun.com

Corresponding author: CHEN Ke-ming E-mail:chkeming@aliyun.com

峰值骨量与青春期的发育迟缓有紧密联系,更早的月经初潮使得机体接受雌激素的时间相对更早从而可以获得更高的峰值骨量^[1]。高峰值骨量可以延缓骨质疏松的发生,所以提高峰值骨量是预防骨质疏松发生的一条途径。长期服用雌激素会导致乳腺癌变和子宫瘤等病症,植物雌激素和具有植物雌激素样作用的天然产物是理想的替代品^[2]。金雀异黄酮作为植物雌激素是常用的抗骨质疏松药物^[3]。蛇床子素是伞形科植物蛇床的果实,中医认为其具有温肾助阳和祛风燥湿之功效。本实验通过口服蛇床子素与金雀异黄酮研究对大鼠峰值骨密度和骨质量的影响,以期对蛇床子素预防骨质疏松活性作出初步判断。

1 材料和方法

1.1 实验动物与材料 1月龄SD雌性大鼠36只,SPF级,体重(125±3)g,由甘肃医学院实验动物中心提供(合格证号:SCXK(甘)2004-0006-152);蛇床子素(陕西宝鸡辰光生物科技有限公司,纯度≥98%);抗石碳酸酸性磷酸酶试剂盒和骨钙素试剂盒(IDS公司,英国);Technovit@9100试剂盒(Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG公司);双能X射线骨密度仪(GE公司,美国)、μCT(MILabs公司,荷兰)和AG-IS万能材料试验机(岛津公司,日本)均为本实验室仪器。

1.2 分组和给药 实验大鼠随机分3组,每组12只,一组每日灌服蛇床子素为服药组,一组每日灌服金雀异黄酮为阳性对照组,另一组只给予等体积蒸馏水作为对照组。蛇床子素用蒸馏水配成0.9 mg/ml的混悬液,按每日每只大鼠9 mg·kg⁻¹体重给药;金雀异黄酮用蒸馏水配成1 mg/ml的混悬液,按每日每只大鼠10 mg·kg⁻¹体重给药。大鼠饲养于SPF级实验室,自由饮水和进食,记录每日进食量和进水量,每周称1次体重。

1.3 观察指标与方法

1.3.1 脏器病理学观察 动物处死后即剥离出心脏、肝脏、胃、肾、肾上腺和子宫,称重,计算器官指数,并将所有器官固定于10%甲醛中,石蜡包埋,常规切片,HE染色,由高年资深病理医师进行病理学观察与评价。

1.3.2 骨密度的测定 每月在麻醉状态下测1次全身骨密度,第3个月测完后即处死所有动物,剥离出四肢长骨,左侧股骨用于检测骨密度。麻醉采用10%水合氯醛,剂量为3 ml·kg⁻¹,腹腔注射(ip)。

1.3.3 血清生化指标的测定 心脏取血,4 000 r/min,10 min离心,取上层血清,-80℃保存;按试剂盒说明书制作OC和TRACP5b标准曲线,OC于450 nm、

TRACP 5b于405 nm处测定OD值,通过标准曲线计算出含量。

1.3.4 μCT影像分析 将右侧股骨用70%乙醇固定。感兴趣区域选择在距生长板1 mm位置。分析参数包括相对骨体积率(bone volume/tissue volume, BV/TV),骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th),骨小梁数量(trabecular number, Tb.N),骨小梁分离度(trabecular spacing, Tb/Sp)和模型系数(structural model index, SMI),并采集成像图片。

1.3.5 骨形态计量分析 将右侧胫骨固定于70%乙醇中。严格按照Technovit@9100试剂盒说明书操作,依次进行脱水、脱塑、浸渍、渗透和包埋,聚合2 d后切片,磨片,用VG法染色,观察骨髓线下1~4 mm距离区域。

1.3.6 生物力学分析 将左侧股骨用浸透0.9%生理盐水的纱布包裹后保存于-20℃。在实验24 h前取出,于室温下自然解冻。三点弯曲试验的跨距为17 mm,速度为10 mm/min。记录载荷变形曲线,得到包括最大载荷、屈服强度和弹性模量等指标。

1.4 统计学分析 采用SPSS 16.0 (SPSS公司,美国)软件完成,所有检测数据表示均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不同组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较用LSD检验法。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脏器病理学观察 3组大鼠的每天进食量和进水量无明显差异,体重虽然随时间增长而增加,但也未出现显著性差异(表1),表明灌服蛇床子素对饮食和体重均无影响。各器官指数无显著差异(P>0.05),病理学观察也未见异常改变。

2.2 对大鼠骨密度的影响 3组大鼠的全身骨密度在实验开始时(TBMD-M0)、服药1个月后(TBMD-M1)和服药2个月后(TBMD-M2)比较均无明显差异(表2),但3个月后(TBMD-M3)出现显著性差异(P<0.01)。动物处死后离体检测股骨骨密度的结果也出现相同趋势,表明连续口服蛇床子素3个月后骨密度较对照组有明显提高,并且蛇床子素组高于金雀异黄酮组。

2.3 对大鼠血清OC和TRACP 5b含量的影响 OC由成骨细胞分泌,是骨形成特异性指标,TRACP 5b由破骨细胞分泌,是骨吸收特异性指标。如表3所示,OST组大鼠的血清OC水平极显著高于对照组(P<0.01),而血清TRACP 5b水平显著低于CON组与GEN组(P<0.05),说明口服蛇床子素3个月后,大鼠体内骨形成水平提高,同时骨吸收活动减弱,抑制骨吸收的能力强于金雀异黄酮。

表 1 不同时间点大鼠体重的变化结果($\bar{x} \pm s, g$)Fig.1 Results of body weight (g) of rats at different time points ($\bar{x} \pm s, g$)

表 2 不同时间点大鼠全身骨密度和股骨骨密度检测结果 ($\bar{x} \pm s, g \cdot cm^{-3}$)Tab.2 Results of total and femur bone mineral density of rats at different time points ($\bar{x} \pm s, g \cdot cm^{-3}$)

表 3 大鼠血清 OC 和 TRACP 5b 的含量($\bar{x} \pm s, g$)Tab.3 Results of serum OC and TRACP 5b of rats ($\bar{x} \pm s, g$)

2.4 μ CT 影像分析结果 如表 4 所示, OST 组骨体积百分率(BV/TV)、骨小梁数(Tb.N)和骨小梁厚度(Tb.TH)明显高于 CON 组($P < 0.05$), 但骨小梁分离度(Tb.Sp)和模型系数(SMI)明显低于对照组($P < 0.05$), OST 组和 GEN 组差异无统计学意义, 但平均值优于 GEN 组, 说明口服蛇床子素 3 个月对骨组织微结构改建比金雀异黄酮更明显(图 1)。

2.5 骨形态计量分析 如图 2 所示, 骨组织呈红色, 骨骺线下红色网状结构为骨小梁, 对照组红色结构较药物组稀疏。OST 组骨小梁的数量明显多于 GEN 组和 CON 组, 骨小梁分离度低于 GEN 组和 CON 组。表明 OST 组的骨微结构比 GEN 组与 CON

组更加致密, 证明蛇床子素对骨微结构的改建能力强于金雀异黄酮。

2.6 对大鼠骨生物力学的影响 如表 5 所示, 股骨三点弯曲实验发现, OST 组和 GEN 组的最大载荷和屈服强度极显著高于 CON 组($P < 0.01$), 弹性模量显著高于 CON 组 ($P < 0.05$), OST 组和 GEN 组差异无统计学意义($P > 0.05$), 但 OST 组的平均值整体高于 GEN 组, 表明口服蛇床子素 3 个月提高了骨强度, 且优于金雀异黄酮。

3 讨论

骨的重建周期为 3~6 个月, 体内成骨与破骨是一种偶联形式^[7], 包括激活期、骨吸收期、逆转期和

表 4 大鼠 μ CT 影像分析结果 ($\bar{x} \pm s, g$)

Tab.4 Results of μ CT on femur of rats ($\bar{x} \pm s, g$)

表 5 对大鼠生物力学的影响 ($\bar{x} \pm s, g$)

Tab.5 Results of biomechanics on femur of rats ($\bar{x} \pm s, g$)

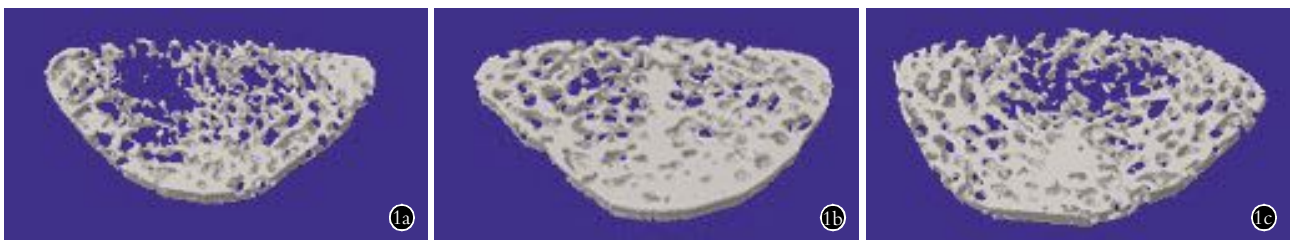


图 1 大鼠股骨 μ CT 影像 1a. CON 组, 骨小梁网状结构稀疏, 分离度大 1b. OST 组, 骨小梁网状结构致密, 分离度小 1c. GEN 组, 骨小梁网状结构较致密, 分离度较小

Fig.1 Three-dimensional reconstruction of the femur micro-CT 1a. Trabecular net structure was few and scattered, trabecular spacing was faraway in control group 1b. Trabecular net structure was dense, trabecular spacing was close in Osthole group 1c. Trabecular net structure was relatively dense, trabecular spacing was relatively faraway in Genistein group

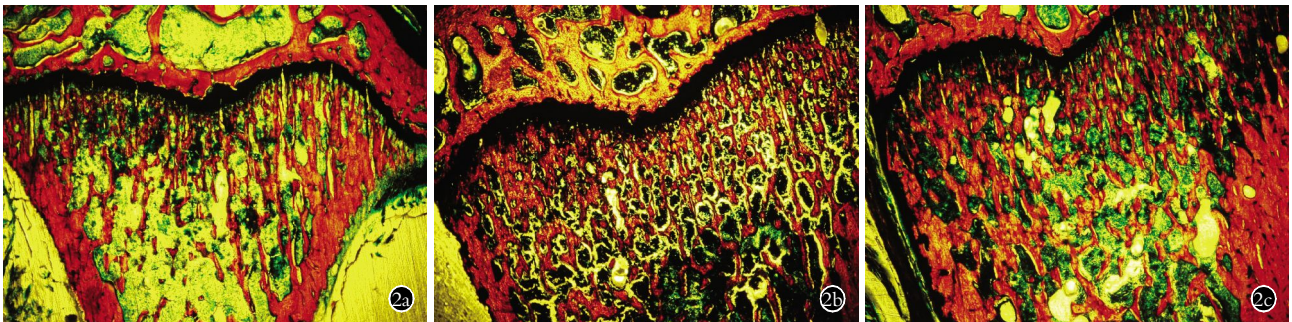


图 2 大鼠股骨骨形态图片 (VG \times 40) 2a. CON 组, 骨小梁稀疏 2b. OST 组, 骨小梁致密 2c. GEN 组, 骨小梁较致密

Fig.2 Bone Histomorphometry picture (VG \times 40) 2a. Trabecular net structure was few and scattered in control group 2b. Trabecular net structure was dense in Osthole group 2c. Trabecular net structure was relatively dense in Genistein group

静止期^[8];峰值骨量的高低与分泌雌激素的迟早有关,少女初潮早比晚者峰值骨量更高^[9-11]。所以笔者给 1 月龄断乳雌性大鼠灌服蛇床子素 3 个月以期观察峰值骨量的变化。

金雀异黄酮是大豆异黄酮中最丰富的一种天然植物雌激素,能保护细胞恶变,抑制肿瘤细胞增殖和抗细胞凋亡,雌激素缺乏的绝经期能补充并发挥雌激素作用,并具有缺氧保护作用^[12-13]。蛇床子素具有保护机体的作用,能抗菌、杀虫和抗炎,并对心脏、血液和血脂有作用,除对骨、肿瘤起作用外,还对生殖系统有作用^[14]。本实验参考选择该药物最佳浓度 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{BW}$ ^[15],并换算成同样摩尔浓度的蛇床子素,即 $9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量,在给药的分子量一致的前提下,对比研究蛇床子素与金雀异黄酮的药效。结果显示:①蛇床子素与金雀异黄酮对实验大鼠的饮食、体重、各器官指数及关键脏器的病理学观察均无影响。②与金雀异黄酮相比,蛇床子素明显地提高了实验大鼠的全身骨密度和股骨骨密度,这很可能与成骨活性的增强有关。③蛇床子素显著地提高了 OC,OC 是由成骨细胞分泌的特异性的骨形成指标;同时蛇床子素显著地降低了 TRACP5b,TRACP5b 是由破骨细胞分泌,的特异性的骨吸收指标。由此可以说明蛇床子素主要通过提高骨形成,抑制骨吸收来发挥抗骨质疏松的药理活性。④蛇床子素明显地提高了实验动物骨体积百分率(BV/TV)、骨小梁数(Tb.N)和骨小梁厚度(Tb.TH);降低了实验动物骨小梁分离度(Tb.Sp)和模型系数(SMI)。OST 组和 GEN 组在上述指标上差异无统计学意义,但 OST 组平均值优于 GEN 组,说明口服蛇床子素 3 个月后对骨组织微结构改建比金雀异黄酮明显。⑤骨形态计量分析结果表明蛇床子素能明显地增加实验大鼠骨小梁数量,同时又能增强实验大鼠的最大载荷、弹性模量、屈服强度和位移,缩减实验大鼠骨小梁分离度与模型系数。上述结果均表明蛇床子素能显著提高实验大鼠峰值骨量及骨密度,从而为防治骨质疏松的发生提供新思路。

鉴于骨质疏松症的难逆转性,防治兼备或许会起到更佳的效果,从提高峰值骨量的角度出发,将是一条理想的预防骨质疏松的思路。通过本实验研究,

发现蛇床子素具备提高峰值骨量的能力,并且优于公认的抗骨质疏松药物:金雀异黄酮。证明蛇床子素能预防骨质疏松的发生,为防治骨质疏松提供积极的帮助。

参考文献

- [1] Rossouw J, Anderson G, Prentice R, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial[J]. JAMA, 2002, 288(3): 321-333.
- [2] Lacey JJ, Mink PJ, Lubin JH, et al. Menopausal hormone replacement therapy and the risk of ovarian cancer[J]. JAMA, 2002, 288(3): 334-341.
- [3] Setchell KD, Lydeking-Olsen E. Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies[J]. Am J Clin Nutr, 2003, 78(3 suppl): 593S-609S.
- [4] Koinuma D, Imamura T. Bone formation and inflammation[J]. Nihon Rinsho, 2005, 63(9): 1523-1528.
- [5] 黄公怡. 骨重建与骨质量[J]. 中华骨科杂志, 2006, 26(11): 787-789.
Hung GY. Bone reconstruction and bone quality[J]. Zhonghua Gu Ke Za Zhi, 2006, 26(11): 787-789. Chinese.
- [6] Rosenthal DI, Mayo-Smith W, Hayes CW, et al. Age and bone mass in premenopausal women[J]. J Bone Miner Res, 1989, 4(4): 533-538.
- [7] Ito M, Yamada M, Hayashi K, et al. Relation of early menarche to high bone mineral density[J]. Calcif Tissue Int, 1995, 57(1): 11-14.
- [8] Fujita Y, Katsumata K, Unno A, et al. Factors affecting peak bone density in Japanese women[J]. Calcif Tissue Int, 1999, 64(2): 107-111.
- [9] Tang DZ, Hou W, Zhou Q, et al. Osteole stimulates osteoblast differentiation and bone formation by activation of beta-catenin-BMP signaling[J]. J Bone Miner Res, 2010, 25(6): 1234-1245.
- [10] Tarkowski M, Kokocinska M, Latocha M, et al. Genistein in chemoprevention and treatment[J]. Pol Merkuri Lekarski, 2013, 34(199): 54-57.
- [11] 闫俊, 宣伟东, 卞俊. 蛇床子素的研究进展[J]. 中国药业, 2012, 21(11): 110-112.
Yan J, Xuan WD, Bian J. Osthole reseach progress[J]. Zhongguo Yao Ye, 2012, 21(11): 110-112. Chinese.
- [12] Elmarakby AA, Ibrahim AS, Faulkner J, et al. Tyrosine kinase inhibitor, genistein, reduces renal inflammation and injury in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Vascul Pharmacol, 2011, 55(5-6): 149-156.

(收稿日期: 2013-05-29 本文编辑: 李宜)