

鹿瓜多肽对去卵巢大鼠骨密度、股骨生物力学及松质骨中 BMP₂ 表达的影响

李强 刘建 段永宏

摘要：目的 鹿瓜多肽(松梅乐)注射液肌注对去卵巢大鼠骨密度、股骨生物力学及松质骨中 BMP₂ 表达的影响。方法 将 8 月龄未产雌性二级 SD 大鼠 30 只 ,随机分为假手术组(SHAM)组、去势组(OVX)、去势 + 鹿瓜多肽(OVX + CCP)组。OVX + CCP 组大鼠术后第 1 天开始给药 ,术后 20 周处死各组大鼠 ,应用双能 X 线吸收仪(DEXA)测量各组大鼠股骨粗隆、股骨干中点及第 3 ~ 5 腰椎中点的骨密度(BMD) ;应用 INSTRON 1195 电子拉伸试验机检测股骨生物力学性能 ;利用免疫组织化学染色及图像分析方法对各组大鼠松质骨切片图像进行灰度分析 ,观察鹿瓜多肽注射液对 OVX 大鼠松质骨中 BMP₂ 表达的影响。结果 (1)OVX 与 SHAM 组比较 ,灰度值降低明显($P < 0.01$) ,而 OVX + CCP 组灰度值较去势组降低($P < 0.01$) ,表明 OVX 大鼠松质骨中骨小梁周围及髓腔中 BMP₂ 表达阳性细胞数明显多于 SHAM 组 ,而 OVX + CCP 组骨小梁周围及髓腔内 BMP₂ 表达阳性细胞数多于去势组 ,且染色加深。(2)与 SHAM 组相比 ,OVX 组股骨近端、股骨干、腰椎 BMD 明显降低($P < 0.01$) ,OVX + CCP 各部位 BMD 高于去势组($P < 0.01$) ,但未达到 SHAM 组水平($P < 0.01$)。(3)与 SHAM 比较 ,去势组大鼠股骨最大载荷、挠度、最大应力、弹性模量均明显下降($P < 0.01$) ,治疗组上述指标高于去势组($P < 0.01$) ,接近对照组水平($P > 0.05$)。结论 鹿瓜多肽注射液可以抑制和延缓骨质疏松的形成 ,对雌激素缺乏引起的骨质疏松具有预防作用。

关键词：卵巢切除术；骨质疏松；鹿瓜多肽；骨矿密度；免疫组织化学；生物力学；骨形成蛋白；鹿瓜多肽

Influence of cervus and cucumis polypeptide injection on expression of BMP₂ in cancellous bone , and its bone mineral density and biomechanical properties in ovariectomized rats Li Qiang , Liu Jian , DUAN Yonghong . Institute of Orthopedics of Chinese PLA , Xijing Hospital , the Fourth Military Medical University , Xi'an 710032 , China

Abstract : Objective To study the influence of cervus and cucumis polypeptide(CCP , Lugua polypeptide) on the expression of BMP₂ in cancellous bone , its bone mineral density (BMD) and biomechanical properties in ovariectomized(OVX) rats. **Methods** Thirty 8-month-old female SD rats were randomized into three groups($n = 10$ in each) , including SHAM , OVX and OVX + CCP group. CCP therapeutic group was treated with CCP Injection 1 day after the operation. Twenty weeks later , all rats were sacrificed. BMD of L₃ - L₅ vertebrae , proximal femoral segment , femoral shaft were measured by dual energy-x-ray absorptiometry (DXA). The biomechanical properties of femur shaft were tested with INSTRON 1195. SABC immunohistochemistry and Image Analysis was used to detect the expression of BMP₂ in L₂ vertebrae of each group. **Results** (1) The grayscale of cancellous bone in OVX group was significantly lower than that of the sham group($P < 0.01$) , and higher than that of the OVX + CCP group($P < 0.01$). (2) Twenty weeks after OVX , the BMD of L₃ ~ L₅ vertebrae , proximal femur , and femoral shaft decreased significantly($P < 0.01$) and the trabecular became thinner and irregular compared with the sham group. After CCP medication , the above parameters restored($P < 0.01$) , but did not reach the level of sham group($P < 0.01$). (3) The biomechanical properties of femur such as maximum load , maximum stress , elastic deformation and modulus , and bone histomorphometric parameters of L₂ Vertebrae in the OVX group

were significantly lower than those of the sham group ($P < 0.01$). The above parameters of the OVX + CCP group were higher than those of the OVX groups ($P < 0.01$). **Conclusions** CCP is able to increase the expression of BMP₂ in cancellatous bone in the OVX rats and prevent OVX-induced osteoporosis in rat model.

Key words: Ovariectomy; Osteoporosis; Cervus and cucumis polypeptide; Bone mineral density

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMO) 是一种严重危害人类健康的代谢性生理问题。其特点是骨转换加快, 破骨多于成骨, 致骨量减少和骨组织纤维结构受损, 继而引起骨质疏松和骨折危险性增加。骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 是在动物骨基质中存在的一种骨诱导活性蛋白, 能诱导未分化的间充质细胞不可逆地转化为软骨和骨, 从而导致新骨形成, 使成骨和骨修复过程中不可缺少的骨诱导蛋白。本实验中利用鹿瓜多肽注射液的成骨特性探讨其对去卵巢大鼠骨质疏松形成过程中骨密度、骨生物力学性能以及松质骨中 BMP₂ 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

Sprague-Dawley 雌性大鼠 (第四军医大学实验动物中心提供); 鹿瓜多肽注射液 (哈尔滨誉衡制药有限公司提供, 批号产品: 050611); 兔抗大鼠 BMP₂ 多克隆抗体、SABC 免疫组化试剂盒及 DAB 显色剂 (武汉博士德生物工程有限公司); DPX-IQ 型双能 X 线吸收仪 (DEXA) 及中小动物软件系统 (Lunar 公司, 美国); INSTRON 1195 (控制系统经 5500 升级) 电子拉伸试验机 (英特朗公司, 英国); LEICADMLA 显微镜及 Leica Q-Win Stander V2.3 全自动图像分析系统 (Leica 公司, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 分组和处理 8 月龄未经产雌性二级 SD 大鼠 30 只, 体重 320 ± 25 g, 随机分为 3 组: SHAM 组、OVX 组、OVX + CCP 组, 每组 10 只, 组间大鼠体重无统计学差异。所有大鼠均以 3% 戊巴比妥 (40 mg/kg) 腹腔内注射麻醉, 在无菌条件下手术, 取背部切口。分离、结扎、摘除 OVX 组、OVX + CCP 组大鼠双侧卵巢; 分离、提出 SHAM 组大鼠双侧卵巢后, 放回腹腔, 分层缝合关闭切口。术后第 1 天开始, 依据人应用剂量按体重相应比例换算出, 每只 0.6 ml/kg/d 给予 OVX + CCP 组大鼠鹿瓜多肽注射液肌注。SHAM 组、OVX 组大鼠给予等量生理盐水注射。术后 3 组大鼠均在二级环境下分笼饲养, 给予标准饲料, 自由摄水。饲养期间 3 组大鼠正常成活, 体重

(370 ± 35) g, 均于术后 20 周后处死。

1.2.2 标本采集制备方法 取各组大鼠股骨、腰椎用于测量骨密度。取 L₂ 椎体, 置于 4% 的多聚甲醛溶液 4℃ 环境下固定 48 h, 再放入 15% EDTA 溶液中脱钙 2 周, 每 3 天更换 1 次脱钙液, 脱钙完成后, 标本经梯度酒精逐级脱水后, 石蜡包埋、切片, 部分切片进行 HE 染色, 部分进行免疫组化染色。

1.2.3 免疫组织化学染色 椎体松质骨免疫组织化学染色过程 (1) 切片浸入二甲苯、梯度酒精脱蜡、脱水, 在室温 20℃ 下置于 3 ml/L H₂O₂ 溶液中灭活内源性过氧化物酶, 蒸馏水清洗 3 次; (2) 切片浸入 0.01M 枸橼酸盐缓冲液, 用电炉加热至沸腾后熄火, 间隔 6 min 后再反复加热 2 次, 冷却后 PBS 清洗 2 次, 滴加 5 ml/L BSA 封闭液, 室温下孵育 20 min, 甩去多余的液体; (3) 滴加 1:200 兔抗大鼠 BMP₂ 多克隆抗体 (I 抗), 在室温下孵育 2 h 后用 0.01 mmol/L PBS 清洗 3 min × 3 次; (4) 滴加 1:200 生物素化山羊抗兔 IgG (II 抗), 在室温下孵育 20 min, 0.01 mmol/L PBS 溶液冲洗 2 min × 3 次; (5) 滴加 SABC 试剂, 室温下 20 min, 0.01 mmol/L PBS 清洗 5 min × 3 次; (6) DAB 显色, 显微镜下观察有棕黄色物质出现时停止; (7) 蒸馏水冲洗, 苏木素复染细胞核, 常规梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

1.2.4 骨密度测量 使用 DPX-IQ 型 7040 双能 X 线吸收测量平台 (Lunar 公司, 美国), 通过计算机中小动物软件系统测量股骨粗隆部、股骨干中点及第 3~5 腰椎中点的 BMD 值。

1.2.5 股骨生物力学检测 在 INSTRON 1195 (控制系统经 5500 升级) 力学试验机上进行股骨三点弯曲实验, 至其发生骨折。加载速度为 3 mm/min, 支点跨距为 20 mm, 用函数记录仪描记载荷-变形曲线, 股骨中点所在截面近似的认为是椭圆形, 用游标卡尺测量截面外径, 收集已经破坏了的试件, 测量出试件断面处皮质的厚度, 算出内径值, 根据载荷-变形曲线和皮质骨内、外径分析骨的生物力学性能参数。本实验检测完整股骨结构力学性能参数为: 最大抗弯强度, 以屈服点载荷计算; 结构刚度, 以弹性范围内载荷-变形曲线斜率表示, 即载荷与变形量之比。皮质骨材料力学性能参数为: 强度极限, 由最大应力表

示 刚度 ,有弹性模量表示 ,最大载荷 ,挠度直接从载荷-变形曲线上获得。近似认为截面呈椭圆 ,测量其外径、内径 ,求出股骨强度极限。

1.2.6 图像分析 骨组织形态学及骨免疫组织化学观察采用 LEICA DM LA 显微镜及 Leica Q-Win Stander V2.3 全自动图像分析系统(Leica 公司 ,德国)。每次均在开机 20 min 后 ,在 40 倍物镜下采集图像。每次采集都将采图的各项设置包括光源、光圈大小、白平衡、曝光强度、对比度等改为手动设置且固定 ,以保证每次取图的设置值一样 ,使各组的图片采集的灰度值具有可比性。以细胞内呈棕黄色颗粒者为阳性。对各组切片细胞中 BMP₂ 表达的灰度值进行分析。判定方法 :灰度值越小 ,阳性染色越

强 ,表明免疫反应性越高。结果进行统计学处理。
1.2.7 统计学处理 采取 SPSS 11.5 软件进行统计分析 ,所有参数均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采用方差分析 ,LSD-t 检验。

2 结果

2.1 显微镜下观察

锥体松质骨中 BMP₂ 主要分布在骨小梁周围成骨细胞、破骨细胞及骨髓中未分化的间充质细胞中 ;OVX 组大鼠松质骨中 BMP₂ 阳性反应较 SHAM 组明显增强 ,CCP 治疗组 BMP₂ 阳性表达高于 OVX 组 ,且染色加深。图 1~3 分别为对照组、去势组、治疗组腰椎松质骨 BMP₂ 免疫组织化学染色(×400)。

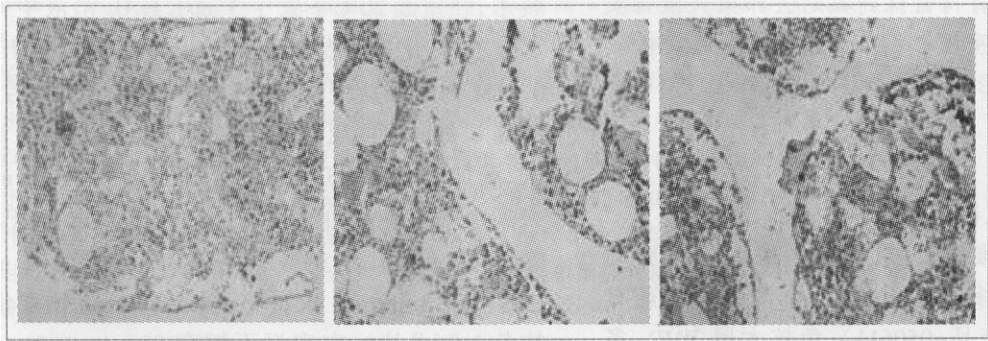


图 1

图 2

图 3

2.2 图像分析

去势组与 SHAM 组相比较 ,BMP₂ 阳性细胞灰度值降低 ($P < 0.01$);而 OVX + CCP 组 BMP₂ 阳性细胞灰度值低于 OVX 组 ($P < 0.01$),见表 1。

表 1 各组松质骨中 BMP₂ 阳性细胞灰度值对比 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SHAM	OVX	OVX + CCP
灰度值	175.46 ± 9.32	146.76 ± 6.07 [*]	140.24 ± 4.77 ^{*△}

注 :与 SHAM 组比较 ,^{*} $P < 0.01$;与 OVX 组比较 ,[△] $P < 0.01$

2.3 骨组织形态学观察

腰椎 HE 切片光镜下观察见 :OVX 组骨小梁明显稀疏 ,皮质骨变薄 ,小梁及间隙增大 ,部分区域骨小梁消失 ;OVX + CCP 与 OVX 组对比 ,骨小梁相对丰富 ,骨皮质较厚 ,骨小梁间隔较小 ,但与 SHAM 组差别不明显。图 4~6 分别为 SHAM 组、OVX 组、OVX + CCP 组腰椎骨小梁结构的组织学对比(箭头所指为骨小梁)。

2.4 骨密度测量 术后 20 周 OVX 组与 SHAM 组比较 ,皮质骨及松质骨 BMD 均明显降低。股骨近端、股骨干、第 3~5 腰椎 BMD 值均明显下降($P <$

0.01) ;OVX + CCP 组与 OVX 组比较 ,股骨颈基底部、股骨干 BMD 均明显高于 OVX 组 ($P < 0.01$) ;OVX + CCP 组与 SHAM 组比较 ,股骨近端、股骨干 BMD 均明显低于 SHAM 组 ($P < 0.01$),见表 2。

表 2 各组 BMD 测定值比较 ($\bar{x} \pm s$, g/cm²)

部位	SHAM	OVX	OVX + CCP
股骨近端	0.189 ± 0.020	0.159 ± 0.026 [*]	0.188 ± 0.014 [△]
股骨干	0.169 ± 0.022	0.149 ± 0.024 [*]	0.168 ± 0.017 [△]
L ₃	0.198 ± 0.030	0.161 ± 0.023 [*]	0.193 ± 0.018 [△]
L ₄	0.215 ± 0.039	0.160 ± 0.023 [*]	0.200 ± 0.022 [△]
L ₅	0.230 ± 0.041	0.189 ± 0.016 [*]	0.224 ± 0.028 [△]

注 :与 SHAM 组、OVX + CCP 比较 ,^{*} $P < 0.01$;与 SHAM 组比较 ,[△] $P < 0.01$

2.5 生物力学检测结果

OVX 组与 SHAM 组比较生物力学性能明显降低 ($P < 0.01$) ;OVX + CCP 组在股骨的最大载荷、挠度、抗弯强度弹性模量等参数与去势组相比改善显著 ($P < 0.01$),与 SHAM 组无明显性差异 ($P > 0.05$),见表 3。

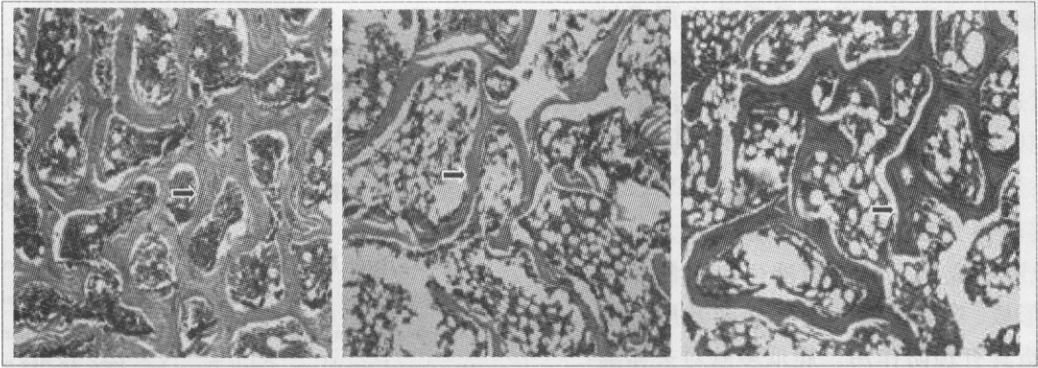


图 4

图 5

图 6

表 3 各组股骨生物力学对比($\bar{x} \pm s$)

指标	SHAM	OVX	OVX + CCP
屈服点载荷(N)	135.21 ± 2.60	112.06 ± 10.80 ^{**△}	125.32 ± 13.4 [*]
最大挠度(mm)	0.67 ± 0.20	0.56 ± 0.21 ^{**△}	0.62 ± 0.15 [*]
最大应力(MPa)	116.55 ± 2.18	102.66 ± 1.23 ^{**△}	113.88 ± 2.32 [*]
弹性模量(GPa)	10.83 ± 2.56	8.70 ± 1.31 ^{**△}	10.01 ± 1.32 [*]

注 :与 OVX + CCP 组比较 ,^{**} $P < 0.01$,与 SHAM 组比较 ,[△] $P < 0.01$;与 SHAM 组比较 ,^{*} $P > 0.05$

3 讨论

临床观察发现 ,鹿瓜多肽注射液具有改善局部血运、促进成骨、软组织修复、抑制炎症反应以及镇痛等作用^[1] ,其促进骨折愈合和骨痂形成的作用也得到临床验证^[2] 。其主要作用机理为 :促进细胞有丝分裂、分化作用、趋化作用和溶骨活性^[3] 。本实验通过观察鹿瓜多肽肌注对去卵巢大鼠骨质疏松形成过程中骨密度、股骨生物力学性能和松质骨中 BMP₂ 表达的影响 ,进一步探讨鹿瓜多肽注射液对于骨质疏松形成的影响。

BMP 属于转化生长因子超家族(transforming growth factor-bate superfamily ,TGF- β s)成员 ,能诱导未分化的间充质细胞经过趋化期、分化期、骨质形成及重塑期四个环节不可逆分化为软骨细胞和成骨细胞 ,诱导新骨形成^[4] 。同时 ,BMP 也是具有潜在活性的蛋白质 ,当骨组织形态结构完整时它处于一种稳定的低表达状态 ,当骨组织损伤时 ,BMP 迅速出现量的增加及活性的增强^[5,6] ,其基因转录水平与骨形成有着直接的关系 ;正常情况下 ,活性 BMP 水平降低会导致严重的骨质疏松 ,因此上调 BMP 的表达数量和活性是促进成骨的一种有效手段。BMP₂ 是 BMP 家族中最具代表性的成员之一 ,具有促进成骨细胞分化和诱导体外成骨的能力^[7] ,能够促使肢芽的生长、诱导软骨细胞和成骨细胞前体的形成 ,并协同其他调节因子参与骨形成^[8] 。

本实验发现 ,去卵巢 20W 后大鼠松质骨 BMP₂ 表达阳性灰度值较假手术组明显降低($P < 0.01$) ,表明去势组大鼠松质骨中骨小梁周围及髓腔内 BMP₂ 表达阳性细胞数增多 ,提示去势后大鼠成骨作用增强有其分子生物学基础 ,这与上述因雌激素水平降低引起骨骼系统高转换最终导致骨质疏松的机制一致 ;经鹿瓜多肽注射液肌注 20 W 后的去势大鼠 ,各部位骨密度无明显减少 ,松质骨、皮质骨 BMD 大于单纯去势组($P < 0.01$) ;治疗组与 OVX 腰椎骨组织学对比 ,治疗组腰椎骨小梁相对丰富 ,骨皮质较厚 ,小梁间隔较少 ,但与假手术组接近。本研究显示 ,去势大鼠经鹿瓜多肽注射液肌注治疗 20 W 后 ,腰椎、股骨干、股骨近端 BMD 得到较好维持 ,而未经鹿瓜多肽注射液肌注治疗的去势组大鼠 BMD 却呈降低趋势 ,说明鹿瓜多肽注射液对低雌激素水平下的骨密度及骨形态结构有较好的维持作用。去势 20 周后的大鼠股骨屈服点载荷、载荷/变形、最大应力、弹性模量明显降低($P < 0.01$) ,CCP 治疗组上述指标均明显大于单纯去势大鼠骨矿含量、骨细微结构 ,说明鹿瓜多肽注射液能够有效抑制雌激素下降后骨力学性能的下降 ,降低骨质疏松性骨折的发生机率。

鹿瓜多肽注射液(松梅乐注射液) ,系采用现代生物工程技术 ,利用鹿科动物梅花鹿的骨骼和葫芦科植物甜瓜的干燥成熟种子 ,经分别提取后制成的灭菌水溶液。以往有学者对梅花鹿角骨提取成分-鹿茸多肽的药理作用进行了较广泛的基础性研究和临床研究 ,相关文献也论证了其促进成骨和对骨质疏松的治疗作用^[9,10] 。梅花鹿四肢骨与角骨具有同源性 ,但是对于梅花鹿骨骼提取物与甜瓜干燥成熟的种子提取物制成复方制剂即鹿瓜多肽后是否仍有作用 ,却报道不多。目前有关鹿瓜多肽的基础性研

究处于起步阶段,有关鹿瓜多肽对骨质疏松形成过程是否有影响,怎么影响的文献报道不多。本次实验,我们就针对这种现状采用鹿瓜多肽注射液肌注的方法来观察其对去卵巢大鼠骨质疏松形成过程中骨密度、股骨生物力学性能和松质骨中 BMP₂ 表达的影响,通过实验中免疫组化、BMD 及生物力学性能检测结果,说明了鹿瓜多肽注射液可以抑制和延缓骨质疏松的形成,对雌激素缺乏引起的骨质疏松及骨质疏松骨折具有预防作用。鹿瓜多肽对去卵巢大鼠预防作用是否存在剂量依赖效应以及对骨质疏松模型是否具有治疗作用还有待进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] 刘国辉,张玉,杨述华.鹿瓜多肽临床应用的疗效观察及分析.中国医院药学杂志,2004,24(2):490-491.
- [2] 赵广跃,朱庆生,吕宏生.鹿瓜多肽注射液治疗四肢骨干骨折的临床观察.中国骨与关节损伤杂志,2005,20(8):537-538.
- [3] 李海丽,松梅乐.中国新药杂志,2003,19(9):770-771.
- [4] 马文辉,时述山,李亚非.骨修复中骨形态发生蛋白(BMP)成骨机理的研究及其应用现状.中国矫形外科杂志,2001,8(2):

167-170.

- [5] Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, et al. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. J Bone Miner Res, 1994, 9(5):651-659.
- [6] 韩利华,王全平,刘建.卵巢切除大鼠松质骨中骨形态发生蛋白免疫组织化学观察.第四军医大学学报,1997,18(5):481-482.
- [7] Chen D, Harris MA, Rossini G, et al. BMP-2 enhances BMP-3, BMP-4 and bone cell differentiation marker genes expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. Calcif Tissue Int, 1996, 60:283-290.
- [8] Harris SE, Feng JQ, Harris MA, et al. Recombinant BMP-2 accelerates bone cell differentiation and stimulates BMP-2 mRNA expression and BMP-2 promoter activity in primary fetal rat calvarial osteoblast culture. Mol Cell Differ, 1995, 3:137-139.
- [9] Zhou QL, Guo YJ, Wang LJ, et al. Velvet antler polypeptides promoted proliferation of chondrocytes and osteoblast precursors and fracture healing. Acta Pharmacol Sin, 1999, 20(3):279-282.
- [10] 赵文海,黄丹奇,郝东明,等.注射用鹿茸生长素对肾阳虚型骨质疏松症的临床研究.中国中医骨伤科杂志,2003,11(2):20-22.

(收稿日期:2006-04-28)