

葛密牌钙片阻止 OPG 基因敲除小鼠的骨量丢失作用

刘盟 魏丽 李白艳 刘玲 张鹏 高晓黎

中图分类号: R956 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)02-0138-04

摘要: 目的 研究葛密牌钙片及鹿角肽对骨保护素 (Osteoprotegerin, OPG) 基因敲除纯合子小鼠 (homozygous OPG knockout mice, OPG^{-/-} mice) 骨质疏松的影响。方法 以 OPG^{-/-} 小鼠为研究对象, 钙尔奇 D、葛密牌钙片及鹿角肽分别给各组 OPG^{-/-} 小鼠连续灌胃 30 d, 酶联免疫法测定血清中抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (tartrate-resistant acid phosphatase form 5b, TRACP5b) 的含量, 竞争放射免疫法测定血清中骨钙素 (Bone-γ-carboxyglutamic acid, BGP) 的含量; 双能 X 线骨密度仪 (Dual Energy X-ray Absorptiometry, DEXA) 测定股骨和总体的骨密度 (Bone mineral density, BMD)。结果 葛密牌钙片及鹿角肽能增加 OPG^{-/-} 小鼠的股骨和总体的 BMD 值, 降低 TRACP5b 的含量, 增加 BGP 的含量。结论 葛密牌钙片对 OPG^{-/-} 小鼠的骨质疏松症有预防作用, 其机制与抑制骨量高转换有关。

关键词: 葛密牌钙片; OPG^{-/-} 小鼠; 骨代谢生化指标; 骨密度

Effects of the GUMIPAI calcium table reverses bone loss in OPG knockout mice LIU Meng, WEI Li, LI Baiyan, et al. Xinjiang Medical University Pharmaceutical College, Urumqi 830011, China

Abstract: **Objective** To research pharmacodynamic action which GUMIPAI calcium table and the Colla Cornus peptide effect on the homozygous (OPG^{-/-}) OPG knockout mice. **Methods** The OPG^{-/-} mice is objection, the Caltrate D, the GUMIPAI calcium table, the Colla Cornus peptide were used continuously to intragastric administration for 30 days to the OPG^{-/-} mice. The concentration of tartrate-resistant acid phosphatase form 5b (TRACP5b) in serum was measured by enzyme-linked immunosorbent assay; the concentration of Bone-γ-carboxyglutamic acid (BGP) in serum was measured by competitive radio immunologic. Bone mineral density (BMD) of the OPG^{-/-} mice was determined by Dual Energy X-ray Absorptiometry (DEXA). **Results** GUMIPAI calcium table and the Colla Cornus peptide can enhance OPG^{-/-} mice thighbone and whole body BMD; the level of TRACP5b was decreased; the concentration of BGP was increased. **Conclusions** GUMIPAI calcium table had antiosteoporotic effects on the OPG^{-/-} mice by inhibiting the bone turnover.

Key words: GUMIPAI calcium table; The OPG^{-/-} mice; Biochemical markers of bone metabolism; BMD

葛密牌钙片主要含有天山马鹿角、钙、维生素 D₃, 处方中的鹿角胶是由新疆天山马鹿角经酸化处理而成的更利于人体吸收的鹿角肽。中医理论认为, 肾藏精, 精生髓, 髓养骨。鹿角胶品味甘咸性温, 入肝、肾两经, 具有补肾填精、益气活血、强筋壮骨的作用。研究发现鹿角胶具有促进实验性骨质疏松性骨折愈合、改善 BMD、预防和治疗骨质疏松症的作用^[1]。上海南方模式动物中心利用胚胎干细胞基因敲出技术成功建立了 OPG^{-/-} 小鼠品系。该型小鼠在

出生后早期即出现明显的骨量丢失, 表现骨质疏松, 随着月龄的增加其骨量继续丢失, 出现更严重的骨质疏松, 这些都符合高转换型骨质疏松症的表现^[2,3]。笔者主要研究了葛密牌钙片及鹿角胶对 OPG^{-/-} 小鼠的骨代谢生化指标、BMD 的影响, 探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级 OPG^{-/-} 小鼠, 18~22 g, 6 w 龄, 60 只, 雌雄各半。(上海南方模式动物中心提供)。OPG^{-/-} 小鼠在实验前进行了 PCR 鉴定 (图 1)。

1.2 仪器

Lexos 型双能 X 射线骨密度测量仪 (DMS, 法

基金项目: 乌鲁木齐市科学技术计划项目 (C06212003)

作者单位: 830011 乌鲁木齐, 新疆医科大学药学院药剂教研室 (刘盟、高晓黎); 新疆医科大学第一附属医院 (魏丽、李白艳、刘玲、张鹏)

通讯作者: 高晓黎, Email: gxli@tefeng.com

国);超低温冰箱(MDF-382E,日本);LDZ5-2 MODEL 550 酶标仪(BIO-RAD,美国);低温离心机(SIGMA,日本);GC-2016 γ 放射免疫计数器(科大创新股份有限公司);凝胶图像处理系统(BIO-RAD,美国),PCR 仪(BIO-RAD,美国)。

1.3 药材及试剂

苜蓿牌钙片(批号:20080406,新疆特丰药业股份有限公司);鹿角肽(批号:20080324,新疆特丰药业股份有限公司);钙尔奇 D(批号:0707019, Wyeth 惠氏制药有限公司)。

硫酸阿托品(批号:0707101,天津药业集团新郑股份有限公司),地西洋注射液(批号:0706042,天津药业集团新郑股份有限公司),盐酸氯胺酮注射液(批号:070808,福建古田药业有限公司)。Premix Ex Taq™ (TAKARA,日本),DNA 提取试剂盒(BIOTEKE,中国),BGP 试剂盒(批号 20080507,中国原子能科学研究院);TRACP5b 试剂盒(批号 060203,英国 IDS 公司)。

1.4 方法

1.4.1 遗传性状鉴定:子鼠 1 月龄时,随机抽提雌、雄子代及亲代小鼠各 1 只尾巴的 DNA。DNA 抽提按试剂盒说明操作,然后进行两步法 PCR 扩增。引物序列为:OPGJD5:5'-ATGCCCATTCAGCAGTAGCCT-ATG-3';OPGJD₃:5'-GTGGGGGTGGGGTGGGATTAG-ATA-3';反应体系为 20 μ L,扩增仪中 94℃ 5 min,再扩增(94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 复性 30 s) 35 个循环,最后在 72℃ 下延伸 5 min。用琼脂糖凝胶电泳,图像处理系统扫描,拍照。

1.4.2 分组及给药:OPG^{-/-}小鼠适应环境 1 w 后,随机分为 6 组,每组 10 只,雌雄各半。各组分别按照以下剂量^[4]见表 1,连续灌胃 30 d,每天 1 次。

表 1 各组 OPG^{-/-}小鼠灌胃剂量和主要成分

组别	剂量	主要成分
模型组	0.2 mL/10 g	生理盐水
钙尔奇 D	270.3 mg/kg	90.10 mg 钙
苜蓿牌钙片高剂量	450 mg/kg	90.10 mg 钙 60 mg 鹿角胶
苜蓿牌钙片中剂量	225 mg/kg	45.05 mg 钙 30 mg 鹿角胶
苜蓿牌钙片低剂量	112.5 mg/kg	22.525 mg 钙 15 mg 鹿角胶
鹿角胶	30 mg/kg	30 mg 鹿角胶

1.4.3 骨密度测定:试验前、灌胃 30 d 后称量各组 OPG^{-/-}小鼠,腹腔注射复合麻醉剂(阿托品:地西洋:盐酸氯胺酮 = 1:1:1),麻醉剂量 0.1 mL/10 g,麻醉显效后依次将各实验组小鼠放入 DEXA 骨密度测定

仪,进行全身 BMD 扫描测定小鼠股骨和总体 BMD 值。

1.4.4 骨代谢生化指标测定:试验前、灌胃 30 d 后眼眶静脉丛取血,每只每次 OPG^{-/-}小鼠采血约 300 μ L,3000 r/min 离心 10 min 分离血清。酶联免疫法测定血清中 TRACP5b 的含量。竞争放射免疫法测定血清中 BGP 的含量。

1.5 统计学处理

计量数据采用 SPSS 11.0 软件处理,用 ONE-Way ANOVA 进行分析。数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$), $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 遗传性状鉴定结果

子代小鼠同亲代小鼠一样,表现为 OPG 基因缺失,出现同样的 620bp 条带。

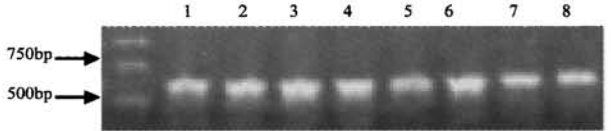


图 1 子代小鼠遗传性状 PCR 鉴定结果

1,2-亲代雄鼠;3,4-子代雄鼠;5,6-亲代雌鼠;7,8-子代雌鼠

2.2 实验前、灌胃 30 d 后各组 OPG^{-/-}小鼠总体 BMD 的变化(见表 2)

实验前各组 OPG^{-/-}小鼠的全身 BMD 差异均无统计学意义($P > 0.05$),灌胃 30 d 后,试验干预组与模型组相比总体 BMD 均有升高($P < 0.05$);实验干预组试验前后的总体 BMD 差值与模型组相比,钙尔奇 D、苜蓿牌钙片高剂量、鹿角肽组的增加值比模型组大($P < 0.05$)。

表 2 实验前、灌胃 30 d 后各组 OPG^{-/-}小鼠总体 BMD 的变化($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量	试验前(g/cm^2)	试验后(g/cm^2)	差值(g/cm^2)
模型组	0.2 mL/10 g	0.072 $\pm$ 0.005	0.069 $\pm$ 0.001	0.005 $\pm$ 0.001
钙尔奇 D	270.3 mg/kg	0.074 $\pm$ 0.005	0.092 $\pm$ 0.008 *	0.018 $\pm$ 0.004 *
苜蓿牌钙片高剂量	450 mg/kg	0.069 $\pm$ 0.004	0.090 $\pm$ 0.005 *	0.020 $\pm$ 0.003 *
苜蓿牌钙片中剂量	225 mg/kg	0.071 $\pm$ 0.003	0.083 $\pm$ 0.007 *	0.012 $\pm$ 0.009
苜蓿牌钙片低剂量	112.5 mg/kg	0.073 $\pm$ 0.004	0.084 $\pm$ 0.013 *	0.015 $\pm$ 0.006
鹿角胶	30 mg/kg	0.069 $\pm$ 0.006	0.094 $\pm$ 0.003 *	0.025 $\pm$ 0.007 *

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与阳性组比较, Δ $P < 0.05$

2.3 实验前、灌胃 30 d 后各组 OPG^{-/-}小鼠股骨 BMD 值的变化(见表 3)

实验前各组 OPG^{-/-}小鼠的股骨 BMD 差异均无统计学意义($P > 0.05$),灌胃 30 d 后,除苜蓿牌钙片低剂量组外其余各组与模型组相比股骨 BMD 值均有

升高($P < 0.05$);实验干预组试验前后股骨 BMD 的差值与模型组相比,钙尔奇 D、苜蓿牌钙片高剂量、鹿角肽组的增加值比模型组大($P < 0.05$)。

表 3 实验前、灌胃 30 d 后各组 OPG^{-/-}小鼠股骨 BMD 的变化($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量	试验前(g/cm^2)	试验后(g/cm^2)	差值(g/cm^2)
模型组	0.2 mL/10 g	0.083 ± 0.001	0.080 ± 0.001	0.002 ± 0.001
钙尔奇 D	270.3 mg/kg	0.084 ± 0.001	$0.098 \pm 0.008^*$	$0.014 \pm 0.006^*$
苜蓿牌钙片高剂量	450 mg/kg	0.085 ± 0.005	$0.096 \pm 0.004^*$	$0.013 \pm 0.002^*$
苜蓿牌钙片中剂量	225 mg/kg	0.083 ± 0.004	$0.093 \pm 0.003^*$	0.009 ± 0.001
苜蓿牌钙片低剂量	112.5 mg/kg	0.083 ± 0.002	0.091 ± 0.006	0.006 ± 0.001
鹿角肽	30 mg/kg	0.083 ± 0.002	$0.100 \pm 0.002^*$	$0.013 \pm 0.004^*$

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与阳性组比较, $^\Delta P < 0.05$

2.4 实验前、灌胃 30 d 后各组 OPG^{-/-}小鼠的血清 BGP 的变化(见表 4)

实验前各组 OPG^{-/-}小鼠的血清 BGP 含量差异均无统计学意义($P > 0.05$);灌胃 30 d 后,实验干预组的血清 BGP 含量均高于模型组($P < 0.05$);苜蓿牌钙片高剂量组和鹿角肽组的血清 BGP 含量高于阳性对照组钙尔奇 D 组($P < 0.05$);实验干预组试验前后的血清 BGP 含量的差值与各组相比,苜蓿牌钙片高剂量组的增加值大于阳性对照组钙尔奇 D 组($P < 0.05$)。

表 4 实验前、灌胃 30 d 后各组 OPG^{-/-}小鼠的 BGP 的变化($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量	试验前(ng/mL)	试验后(ng/mL)	差值(ng/mL)
模型组	0.2 mL/10 g	9.780 ± 0.156	8.530 ± 0.164	1.250 ± 0.140
钙尔奇 D	270.3 mg/kg	10.090 ± 0.064	$10.340 \pm 0.071^*$	0.250 ± 0.011
苜蓿牌钙片高剂量	450 mg/kg	9.627 ± 0.749	$11.227 \pm 0.177^{**\Delta}$	$1.500 \pm 0.120^\Delta$
苜蓿牌钙片中剂量	225 mg/kg	9.365 ± 0.020	$10.615 \pm 0.014^*$	1.250 ± 0.026
苜蓿牌钙片低剂量	112.5 mg/kg	9.255 ± 1.010	$10.005 \pm 0.092^*$	0.750 ± 0.055
鹿角肽	30 mg/kg	10.155 ± 0.040	$11.125 \pm 0.026^{**\Delta}$	1.000 ± 0.023

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与阳性组比较, $^\Delta P < 0.05$

2.5 实验前、灌胃 30 d 后各组 OPG^{-/-}小鼠的血清 TRACP5b 的变化(见表 5)

表 5 实验前、灌胃 30 d 后各组 OPG^{-/-}小鼠的 TRACP5b 的变化($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量	试验前(u/L)	试验后(u/L)	差值(u/L)
模型组	0.2 mL/10 g	9.065 ± 0.136	9.665 ± 0.353	0.600 ± 0.060
钙尔奇 D	270.3 mg/kg	8.987 ± 0.519	$7.582 \pm 0.252^*$	1.605 ± 0.185
苜蓿牌钙片高剂量	450 mg/kg	9.003 ± 0.486	$5.572 \pm 0.263^{**\Delta}$	$3.431 \pm 0.129^{**\Delta}$
苜蓿牌钙片中剂量	225 mg/kg	8.976 ± 0.358	$6.464 \pm 0.273^*$	$2.512 \pm 0.150^{**}$
苜蓿牌钙片低剂量	112.5 mg/kg	8.883 ± 0.383	$7.385 \pm 0.573^*$	1.497 ± 0.139
鹿角肽	30 mg/kg	8.988 ± 0.476	$7.655 \pm 0.206^*$	1.333 ± 0.077

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与阳性组比较, $^\Delta P < 0.05$

实验前各组 OPG^{-/-}小鼠的血清 TRACP5b 含量差异均无统计学意义($P > 0.05$);灌胃 30 d 后,各实验干预组的血清 TRACP5b 的含量均低于模型组($P <$

0.05);苜蓿牌钙片高剂量组的血清 TRACP5b 含量低于阳性对照组钙尔奇 D 组($P < 0.05$);实验干预组试验前后的血清 TRACP5b 含量的差值与模型组相比,苜蓿牌钙片高剂量、苜蓿牌钙片中剂量组的降低值比模型组大($P < 0.05$);苜蓿牌钙片高剂量组的降低值比阳性对照组钙尔奇 D 组大($P < 0.05$)。

3 讨论

上海南方模式动物中心的 OPG^{-/-}小鼠是一种新型的原发型高转换型骨质疏松症模型,与目前的最常用的雌性大鼠去势模型相比,具有能排除外界环境对试验的干扰及所选动物的基本差异,能缩短试验时间的优势;OPG^{-/-}小鼠未行手术干预,不会造成模型动物的负氮平衡,对体内性激素相关内环境影响不大^[5]。因此,研究选取 OPG^{-/-}小鼠来探讨苜蓿牌钙片对骨质疏松症的影响。

实验中,由于腰椎部位的棘突等微细结构用自动分析软件难于准确确定骨边界,故用股骨的结构反应骨量变化^[6,7]。连续灌胃 30 d 后,苜蓿牌钙片组和鹿角肽组的总体 BMD 值均高于模型组($P < 0.05$),说明苜蓿牌钙片及鹿角肽有增加总体骨量的作用。与模型组比苜蓿牌钙片高剂量组、鹿角肽组实验前、后骨密度的增加值有升高($P < 0.05$),说明苜蓿牌钙片及鹿角肽对 OPG^{-/-}小鼠的总体骨量有增加作用。对股骨进行局部 BMD 测量时,苜蓿牌钙片组和鹿角肽组的 BMD 升高($P < 0.05$),说明了苜蓿牌钙片及鹿角肽有增加局部骨量的作用;与模型组比苜蓿牌钙片高剂量组和鹿角肽组实验前、后骨密度的增加值有升高($P < 0.05$),说明苜蓿牌钙片及鹿角肽具有促进 OPG^{-/-}小鼠增加骨量的作用与钙尔奇 D 相似。鹿角肽组与苜蓿牌钙片高、中浓度组的 BMD 值比无差异($P > 0.05$),说明鹿角肽与苜蓿牌钙片的作用相似。

BGP 是由成骨细胞分泌的一种小分子非胶原蛋白,是反映骨形成的一项特异性生化指标,血清 BGP 水平与骨骼 BGP 水平呈正相关关系^[8]。连续灌胃 30 d 后,苜蓿牌钙片高剂量组、鹿角肽组的 BGP 含量高于钙尔奇 D 阳性对照组($P < 0.05$);说明苜蓿牌钙片高剂量、鹿角肽有促进 OPG^{-/-}小鼠骨形成的作用比钙尔奇 D 大。苜蓿牌钙片高剂量组试验前、后 BGP 含量的增加值比钙尔奇 D 阳性对照组高($P < 0.05$),说明苜蓿牌钙片促进 OPG^{-/-}小鼠骨形成的作用比钙尔奇 D 大,可能是因为苜蓿牌钙片、鹿角肽对 OPG^{-/-}小鼠体内成骨细胞骨矿化速率较钙尔奇

D 阳性对照组明显增快,最终导致菴密牌钙片、鹿角肽组 OPG^{-/-} 小鼠整体 BMD 值的升高。

血清 TRAP 是一个骨吸收速率的有用标志物。MouseTRAPTM 分析方法是一个特异性检测小鼠破骨细胞分泌到循环中的 TRACP 5b^[9,10]。笔者研究发现,连续灌胃 30 d 后,菴密牌钙片高、中、低剂量组和鹿角肽组的 TRACP5b 含量降低 ($P < 0.05$);菴密牌钙片高剂量组比钙尔奇 D 阳性对照组降低更明显 ($P < 0.05$),提示菴密牌钙片是通过抑制破骨细胞活性来发挥作用,其作用效果比钙尔奇 D 大,可能因为其处方中的鹿角肽也有抑制骨吸收的作用。菴密牌钙片高剂量组实验前后的降低值比钙尔奇 D 阳性对照组大 ($P < 0.05$),进一步说明了菴密牌钙片能抑制 OPG^{-/-} 小鼠的破骨细胞活性,降低骨质流失,作用较钙尔奇 D 明显。

鹿角胶为鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 或马鹿 *C. elaphus* L. 的角煎熬而成的胶块,在《本草逢原》中称鹿胶,现称鹿角胶,味甘咸性温,入肝、肾两经,具有补肾阳、益精血的作用,并可止血^[11]。忠义讲“骨之余为角”,角,一般是排列组合最好的骨,其硬度、弹性、韧性比一般的骨都要好。而角中,鹿角则为上品。天山马鹿角的组织结构是以膜内成骨形式形成的完全骨化的实角,具有再生功能,新疆的气候和地域特点对天山马鹿角实角的形成也有密不可分的影响。菴密牌钙片中的马鹿角是选用新疆天山马鹿角,品质好,资源丰富。

实验证明了菴密牌钙片对 OPG^{-/-} 小鼠有促进骨量增加的作用,在骨代谢指标方面菴密牌钙片的药效作用优于钙尔奇 D 可能因为其处方中除了含有钙、维生素 D₃ 外还有鹿角肽,经试验证实鹿角肽不但对成骨活性有增值作用,同时存在抑制破骨活性的能力,而且从骨代谢的数据中可得出菴密牌钙片与处方中的鹿角肽可能存在叠加或协同效应,所以菴密牌钙片比单纯钙类产品预防骨质疏松症作用更好。试验中骨密度增加变化慢,若持续使用菴密牌钙片的周期延长,观察时间增加,可能会对 OPG^{-/-} 小

鼠 BMD 的增加作用优于钙尔奇 D。菴密牌钙片及鹿角肽对成骨细胞的作用机制有待进一步的深入研究。

致谢 新疆医科大学第一附属医院动物实验中心张春、江涛致以感谢。

【参 考 文 献】

- [1] Li XJ, Wen H, Liu ZH, et al. Studies on effects of LING LU JIE GU capsule on promoting fracture healing in experimental osteoporotic models produced in rats. *Chinese J Trad Med Traum&Orthop*, 2004, 12 (4):8-11(in Chinese).
- [2] XU Y, Yang H. High-bone-turnover Osteoporosis and Aortic Calcification in Opg Knockout Mice. *J Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2007, 34(3): 260-266.
- [3] Atsuko M, Norio A. Severe Osteoporosis in Mice Lacking Osteoclastogenesis Inhibitory Factor/Osteoprotegerin. *J Biochemical and biophysical research communications*, 1998, 247:610-615.
- [4] 徐叔云, 卞如, 陈修, 主编. 药理试验方法学. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [5] Chen ZX, Sheng ZJ. Preliminary baseline observation of osteoporosis on osteoprotegerin-deficient mice. *Fudan Univ J Med Sci*, 2007, 34 (3):373-377(in Chinese).
- [6] Cheng SD, Wang YJ. Study on osteoporosis in offspring of OPG knockout mice. *Chin J Osteoporos*, 2008, 14 (11): 16-19 (in Chinese).
- [7] Wang XX, Zhang YL. The effects of puerariae radix on bone mass and bone microarchitecture in ovariectomy mice. *Chin J Osteoporos*, 2008, 14 (5):349-353(in Chinese).
- [8] Xiao E, Meng P. The roles of bone metabolic biochemical markers in patients with osteoporosis: An update. *Chin J Osteoporos*, 2008, 14 (3):212-216(in Chinese).
- [9] Sari LA, Jussi MH. Rapid Screening Method for Osteoclast Differentiation *in vitro* That Measures Tartrate-resistant Acid Phosphatase 5b Activity Secreted into the Culture Medium. *J Clinical Chemistry*, 2000, 46(11):1751-1754.
- [10] Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, et al. Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5b: A Novel Serum Marker of Bone Resorption. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(7):1337-1345.
- [11] 江苏新医学院, 主编. 中药大辞典. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1978.

(收稿日期: 2008-11-05)