

依普拉芬对去卵巢大鼠骨质疏松骨保护效果及 NO 调控机制研究

葛保健 王业华 郭含军 袁峰 高绪仁 龚维成

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)11-0810-07

摘要:目的 研究人工合成的植物雌激素-依普拉芬对去卵巢大鼠骨密度及生物力学的影响,同时与雌激素对照,探讨其骨保护效果及 NO 调控作用机制。方法 60 只 6 月龄 SD 雌性大鼠,随机分成 6 组:假手术组和手术切除大鼠双侧卵巢组,后者分为阴性对照组、依普拉芬低、中、高剂量组和雌激素对照组,分别给予基础饲料和不同剂量受试物,12 周后进行骨密度、血清 NO 及 NOS 浓度测定,免疫组化方法检测股骨 NOS 表达。结果 与假手术组相比,去卵巢大鼠阴性对照组股骨密度、生物力学指标和血清 NO、eNOS 浓度以及股骨 eNOS 表达明显降低,血清 iNOS 浓度以及股骨 iNOS 表达增加,依普拉芬组骨密度、生物力学指标血清 NO、eNOS 浓度以及股骨 eNOS 表达均高于阴性对照组,与假手术组差异无显著意义。同时低于雌激素组。血清 iNOS 浓度以及股骨 iNOS 表达均低于阴性对照组,与假手术组以及雌激素组差异无显著意义。结论 一定浓度的依普拉芬可以通过提高去卵巢大鼠 eNOS 的表达来提高 NO 的浓度,促进成骨,增加骨密度,达到防治骨质疏松症的作用。

关键词:依普拉芬;骨质疏松;一氧化氮;内皮型一氧化氮合酶;诱导型一氧化氮合酶;免疫组化;骨密度;生物力学

DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.11.005

Effects of ipriflavone on protection on bone quality in ovariectomized (OVX) rats and its possible mechanisms through NO pathway GE Baojian, WANG Yehua, GUO Hanjun, et al. Department of Orthopaedics, The Affiliated Hospital of Xu Zhou Medical College, Xu Zhou 221002, China

Abstract: **Objective** To evaluate the effect of Ipriflavone (7-isopropoxyisoflavone, IP) on bone mineral density (BMD) and biomechanics and synthesis of nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) in ovariectomized (OVX) rats. **Methods** 60 six-month-old Sprague-Dawley female rats were randomly assigned to six groups: sham, OVX, ovx + ipriflavone (50 mg/kg/d), ovx + ipriflavone (100 mg/kg/d) ovx + ipriflavone (200 mg/kg/d) and ovx + 17 β -estradiol (E2) (10 μ g/kg/d). Diet and different doses of the test compounds were given. After 12 weeks, bone mineral density (BMD), indexes of biomechanics and the level of serum NO and NOS were detected in grouped rats. The expression of NOS in femur was detected by immunohistochemistry and in situ hybridization.

Results In comparison with sham group, BMD and the level of serum NO, eNOS, expression of eNOS in femur of ovariectomized (OVX) rats decreased significantly ($P < 0.01$). The level of serum iNOS and expression of iNOS in femur increased significantly ($P < 0.01$). Some indexes of biomechanical decreased significantly ($P < 0.01$). Ipriflavone could significantly increase BMD, the level of serum NO, eNOS, expression of eNOS in femur and some indexes of biomechanical comparison with OVX ($P < 0.01$). There was no statistical significance of the difference between Ipriflavone and sham group. Estrogen group obtained higher level of NO and eNOS than other groups. The level of serum iNOS and expression of iNOS in femur were less than OVX group ($P < 0.01$). There was no statistical significance of the difference between Ipriflavone, 17 β -estradiol and sham group. **Conclusions** Ipriflavone could increase significantly the synthesis of NO by promoting expression of eNOS in ovariectomized (OVX) rats and consequently increase BMD of OVX rats and benefit postmenopausal osteoporosis (PMOP).

作者单位: 221002 徐州, 徐州医学院附属医院骨科

通讯作者: 葛保健, Email: gbjly81@sina.com

Key words: Ipriflavone; Osteoporosis; Nitric oxide; Endothelial nitric oxide synthase; Inducible nitric oxide synthase; Immunohistochemistry Bone mineral density; Biomechanics

骨质疏松症是中老年妇女的多发病,它包括骨量减少、骨微结构退变、骨生物力学强度下降 3 个方面。对于中老年妇女来说,雌激素缺乏是绝经后骨质疏松(postmenopausal osteoporosis, PMOP)的首要病因,其含量的变化决定女性 PMOP 的发生发展。因此,雌激素替代疗法(ERT or HRT)被认为是 PMOP 防治的首选治疗方案。雌激素虽可有效治疗预防 PMOP,但是越来越多的研究证实,长期使用雌激素会增加乳腺癌、脑卒中、心肌梗死、胆囊炎以及血栓形成等的发病风险^[1]。这促使人们希望寻找一种具有雌激素样的对骨骼系统的有益作用而无副作用的药物。植物雌激素大豆异黄酮的分子结构与雌二醇相似,在雌激素缺乏时表现为雌激素样作用,可减少雌激素缺乏所致骨丢失^[2],人工合成的异黄酮——依普拉芬(7-异丙氧基黄酮, 7-isopropoxyisoflavone, IP)是骨吸收的抑制剂和骨形成的增强剂。许多动物试验和临床实验证实依普拉芬可以用于预防由于雌激素缺乏引起的绝经期妇女以及去卵巢大鼠的骨量丢失^[3]。但是关于其作用的具体机制目前还不十分清楚。OP 的病理基础上,无论是绝经后 OP 还是老年性 OP,都表现为破骨细胞(osteoclast)骨吸收能力大于成骨细胞(osteoblast)骨生成能力。近年来发现一氧化氮(nitric oxide, NO)及其一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)与骨代谢有关,在参与和促进骨质疏松症(osteoporosis, OP)病理生理过程中也占有举足轻重的作用,研究发现,低浓度一氧化氮能促进骨吸收,而高浓度的一氧化氮则抑制骨吸收功能^[4]。无论在体内还是体外,NO 在调节骨再生和骨丢失之间的平衡中均起着重要作用。雌激素的多种生理作用与 NO 系统关系密切,已有研究表明,雌激素可调节 NO 的释放,并通过升高 NO 水平发挥其作用。笔者在去卵巢大鼠的基础上,探讨人工合成的植物雌激素——依普拉芬对其股骨骨密度以及血清 NO 及 NOS 合成的影响,明确其防治骨质疏松的作用及其 NO 机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物 依普拉芬片剂,100 mg/片,由华中科技大学同济医学院药学院石朝周教授惠赠。17 β 雌二醇片剂(诺坤复),1 mg/片,丹麦诺和诺德公司产品。

1.1.2 实验动物 6 月龄雌性 SD 大鼠 70 只,体重 240 ~ 260 g,二级动物,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供(许可证编号:沪动合证字 152 号)。首先将大鼠随机分为假手术组(10 只)和去卵巢组(50 只),取复制骨质疏松模型成功的去卵巢组大鼠 50 只进行实验。

1.1.3 主要试剂和仪器 NO 测定试剂盒, NOS 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。大鼠 iNOS 多克隆抗体,大鼠 eNOS 多克隆抗体,兔抗大鼠 IgG 抗体, SABC 染色试剂盒, DAB 染色试剂盒,均购自武汉博士德公司。多聚 L 赖氨酸:Sigma 公司。NIKON-TS100 倒置显微镜,高速低温离心机 3K-18。骨生物力学测定仪 INSTRON5566,固体密度测量仪(SARTORIUS AG LA 120S,)硬组织切片仪 YD-1508R。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的建立及取材方法

1.2.1.1 动物模型的建立 大鼠适应性喂养 1 周后,用 2% 戊巴比妥钠 40 mg/kg BW 腹腔注射麻醉。将麻醉后的动物仰卧固定,腹部消毒剪毛,下腹正中切口,完整切除去卵巢组大鼠双侧卵巢,止血后缝合。假手术组则切除卵巢周围的 1 块脂肪组织,大小与卵巢相同,其余步骤与去卵巢组相同。手术后 2 d 对各组(假手术组除外)进行阴道涂片检查,连续 5 d 无发情周期变化(连续 5 d 出现阴道上皮角化细胞)为模型成功,否则弃去不用。

1.2.1.2 动物模型分组 从模型成功大鼠中随机抽取 50 只,并随机分为 5 组,每组 10 只。分别为阴性对照组(OVX);依普拉芬低、中、高剂量组以及与雌激素对照组。10 只假手术组大鼠编为假手术组(sham)。

1.2.1.3 给药剂量和途径 将依普拉芬片剂和 17 β 雌二醇片剂(诺坤复)充分研细,50ml 0.2% 吐温-80 溶解,备用。手术 1 周后,阴性对照组及假手术组进食合成基础饲料,依普拉芬低、中、高剂量组分别进食基础饲料+依普拉芬 50 mg/kg/d 饲料、依普拉芬 100 mg/kg/d 饲料、依普拉芬 200 mg/kg/d 饲料,雌激素对照组进食基础饲料+17 β 雌二醇 10 ug/kg/d 饲料。各组大鼠均单笼喂养,自由进食,饮用去离子水。

1.2.1.4 取材方法 试验持续 12 周后,断头处死动

物,取子宫称重;收集的血液室温静置凝固,3000 rpm,15 min 离心分离血清,及时检验或置于 -20℃ 冰箱保存;取左、右股骨及胫骨,剔去肌肉组织,将左侧股骨置于 10% 甲醛溶液固定,右侧股骨置于生理盐水中,作测量骨长、骨密度和骨钙用,左侧胫骨干燥保存用于测量羟脯氨酸,右侧胫骨置于生理盐水浸湿的纱布中,4℃ 保存,3 日内测骨生物力学指标。

1.3 指标测定及方法

1.3.1 体重测量 试验进行的前 4 周,每周称体重,统计进食量,求出食物利用率。后 8 周,每周称体重 1 次。

1.3.2 股骨长度、重量及骨密度的测定 取右侧股骨样品,用游标卡尺测量长度;烘干后用固体密度测量仪(SARTORIUS AG LA 120S,Germany)测量重量和密度。烘干的股骨样品放入固体密度测量仪(SARTORIUS AG LA 120S,Germany)仪器上部的测量杯里进行测定,得出股骨在空气中的重量,再将股骨样品放入下部盛水的测量杯中,平衡后得到股骨在水中的重量,据下式求出股骨密度: $\rho(g/cm^3) = (W_{(a)} \times \rho_{(n)}) / (W_{(a)} - W_{(n)})$ 。式中: ρ 为股骨的密度; $W_{(a)}$ 为股骨在空气中的重量; $W_{(n)}$ 为股骨在水中的重量; $\rho_{(n)}$ 为水的密度。

1.3.3 骨生物力学的测定 取右侧胫骨,使用美国 INSTRON 骨力学测定仪进行三点弯曲试验。加载速度为 5 mm/min,跨距 8 mm,传感器量称 0~5 kg。记录载荷-变形曲线及最大载荷、最大应力、弹性模量、屈服点和能量。

1.3.4 血清 NO 浓度的测定 NO 化学性质活泼,在体内代谢很快转为 NO₂⁻ 和 NO₃⁻。而 NO₂⁻ 又进一步转化为 NO₃⁻,利用硝酸还原酶特异性将 NO₃⁻ 还原为 NO₂⁻,通过显色深浅测定其浓度的高低。具体步骤按 NO 测定试剂盒说明进行操作。

1.3.5 血清 NOS 浓度的测定 NOS 催化 L-Arg 和分子氧反应生成 NO,NO 与亲核性物质生成有色化合物,在 530 nm 波长下测定吸光度,根据吸光度的大小计算出 NOS 活力。NOS 主要有两种类型:内皮型(eNOS)和诱导型(iNOS)。eNOS 依赖钙;iNOS 不依赖钙,根据此原理可以分型。具体按 NOS 测定试剂盒说明进行操作。

1.3.6 股骨切片 eNOS,iNOS 的免疫组化 将留取的左股骨远端 1/3,置于 10% 甲醛溶液固定后逐级脱水,浸入 3:7 甲基丙烯酸丁酯:甲基丙烯酸甲酯 24 h (真空负压 8.67 kPa),以半聚合的甲基丙烯酸丁酯包埋,将每个标本用 YD-1508R 硬组织切片机连续

切若干张 7 μm 厚的不脱钙切片,行免疫组织化学染色;封片以后采用 Meta Morph 图像分析软件 3.51 版本对阳性染色的细胞进行定量分析,经图像冻结、光密度标定、图像分割、编辑,测定其平均灰度值及平均积分光密度(ODI)作统计指标。

1.3.7 统计学处理 试验数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有试验数据均通过 SPSS 11.5 软件统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 药物对大鼠体重的影响(图 1)

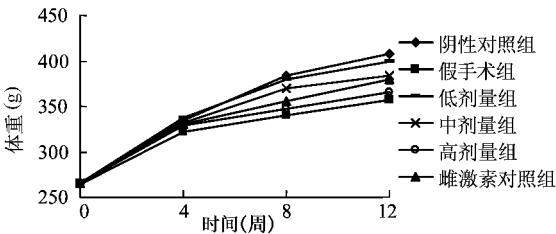


图 1 大鼠喂养时间与体重变化

各组大鼠体重均随时间的增加而增加。虽然各组间体重差异均无统计学意义($P > 0.05$),但从第 4 周开始,各剂量组体重的增加有随剂量的增加而降低的趋势,并都低于阴性对照组,但均高于假手术组。

2.2 药物对大鼠体重和子宫重量的影响(表 1)

表 1 药物对大鼠体重和子宫重量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	体重(g)	子宫重量(g)	大鼠子宫/体(g/kg)
OVX	407.3 ± 31.8	0.063 ± 0.006 [#]	0.158 ± 0.018 [#]
Sham	356.7 ± 24.7	0.462 ± 0.072 [*]	1.295 ± 0.197 [*]
低剂量 IP 组	403.6 ± 39.4	0.083 ± 0.012 [#]	0.210 ± 0.031 [#]
中剂量 IP 组	379.8 ± 32.6	0.097 ± 0.036 [#]	0.259 ± 0.086 [#]
高剂量 IP 组	365.3 ± 31.7	0.083 ± 0.025 [#]	0.236 ± 0.082 [#]
雌激素对照组	379.5 ± 46.2	0.085 ± 0.033 [#]	0.223 ± 0.085 [#]

注:与阴性对照组比较^{*} $P < 0.01$;与假手术组比较[#] $P < 0.01$

由表 1 可见,与假手术组比较,阴性对照组及各剂量组大鼠子宫重量及子宫/体重均极显著降低($P < 0.01$);各剂量组与阴性对照组相比,子宫重量及子宫/体重无显著差异($P > 0.05$)。

2.3 药物对大鼠股骨长度、重量、骨钙总量、骨钙含量及骨密度的影响(表 2)

表 2 药物对大鼠股骨长度、重量、骨钙含量、骨钙含量及骨密度的影响($\bar{x} \pm s$)					
组别	股骨长度(cm)	股骨重量(g)	股骨钙总量(mg)	股骨钙含量(mg/g)	股骨骨密度(g/cm ³)
OVX	3.63 ± 0.05	0.559 ± 0.045	104.8 ± 9.2	187.6 ± 3.5	1.209 ± 0.032 [☆]
Sham	3.63 ± 0.02	0.563 ± 0.028	113.9 ± 8.9	202.3 ± 9.1 [#]	1.294 ± 0.037 [#]
低剂量 IP 组	3.64 ± 0.06	0.574 ± 0.058	114.2 ± 10.1	199.5 ± 6.3 [#]	1.240 ± 0.016 ^{*☆}
中剂量 IP 组	3.64 ± 0.04	0.623 ± 0.043 ^{*△}	122.3 ± 9.5 [#]	196.4 ± 3.8 [*]	1.254 ± 0.033 ^{#☆}
高剂量 IP 组	3.68 ± 0.03	0.619 ± 0.038 ^{*△}	124.9 ± 5.4 [#]	202.1 ± 8.6 [#]	1.254 ± 0.027 ^{#☆}
雌激素对照组	3.67 ± 0.06	0.591 ± 0.038	116.4 ± 8.5 [*]	196.8 ± 6.3 [*]	1.245 ± 0.036 ^{*☆}

注 与阴性对照组比较^{*} $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$ 与假手术组比较[△] $P < 0.05$,[☆] $P < 0.05$

由表 2 可见,试验各组的股骨长度差异无显著性($P > 0.05$)。与阴性对照组相比,中、高剂量组股骨重量、股骨钙总量显著升高($P < 0.05$) 雌激素对照组的股骨钙总量也显著升高($P < 0.05$) ;各剂量组、雌激素对照组以及假手术组的股骨钙含量明显升高($P < 0.05$) ;各剂量组及雌激素对照组的股骨

骨密度也明显高于阴性对照组($P < 0.05$),但明显低于假手术组($P < 0.01$)。高剂量组大鼠的股骨重量、股骨钙总量、股骨钙含量以及股骨骨密度与雌激素对照组相比有所增加,但差异无显著性($P > 0.05$)。

2.4 药物对胫骨生物力学的影响(表 3)

表 3 药物对大鼠胫骨生物力学指标的影响($\bar{x} \pm s$)					
组别	最大载荷(N)	最大应力(N/mm ²)	弹性模量(N/mm ²)	屈服点(N)	能量(J)
OVX	58.3 ± 6.3	116.5 ± 12.4	309.1 ± 65.9	7.89 ± 1.02	0.044 ± 0.012
Sham	70.7 ± 5.9 [*]	143.3 ± 19.9 [*]	382.4 ± 161.2	9.85 ± 0.71 [*]	0.057 ± 0.014
低剂量 IP 组	61.7 ± 6.3	123.4 ± 12.5	334.1 ± 56.3	10.10 ± 1.76 [#]	0.059 ± 0.010
中剂量 IP 组	73.3 ± 12.2 [*]	146.5 ± 24.4 [*]	427.5 ± 240.4	9.94 ± 1.13 [*]	0.060 ± 0.017
高剂量 IP 组	67.9 ± 8.7	135.9 ± 17.4	412.6 ± 190.4	8.8 ± 1.60	0.051 ± 0.011
雌激素对照组	62.6 ± 5.5	125.2 ± 11.1	325.4 ± 73.6	7.75 ± 1.89	0.052 ± 0.011

注 与阴性对照组比较^{*} $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

由表 3 可见,假手术组、依普拉芬中、高剂量组、雌激素对照组在最大载荷、最大应力以及屈服点 3 个指标及低剂量组在屈服点 1 个指标均明显高于阴性对照组($P < 0.05$),依普拉芬各剂量组 3 个指标均低于雌激素对照组($P < 0.05$),其余差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

假手术组以及雌激素对照组($P < 0.01$)。

2.5 药物对大鼠血清 NO 及 NOS 浓度的影响(表 4)

表 4 药物对大鼠血清 NO 及 NOS 浓度的影响($\bar{x} \pm s$)			
组别	NO(μmol/L)	eNOS(μmol/L)	iNOS(μmol/L)
OVX	112.82 ± 11.61 [#]	10.91 ± 1.62 [#]	34.92 ± 3.17 [#]
Sham	150.28 ± 14.93 [*]	27.42 ± 2.71 [*]	23.61 ± 1.87 [*]
低剂量 IP 组	143.58 ± 12.72 ^{*#}	15.84 ± 1.71 ^{*#}	24.94 ± 2.32 ^{*#}
中剂量 IP 组	147.82 ± 12.34 ^{*#}	23.51 ± 2.46 ^{*#}	25.82 ± 2.36 ^{*#}
高剂量 IP 组	139.32 ± 10.55 ^{*#}	19.67 ± 1.95 ^{*#}	23.56 ± 1.81 [*]
雌激素对照组	146.54 ± 13.17 ^{*#}	22.39 ± 2.32 ^{*#}	22.26 ± 1.48 ^{*#}

注 与阴性对照组比较^{*} $P < 0.01$ 与假手术组比较[#] $P < 0.01$

统计学分析表明 与假手术组相比,去卵巢大鼠阴性对照组血清 NO 以及 eNOS 浓度显著下降($P < 0.01$), iNOS 浓度明显增加($P < 0.01$) 给予受试物后,去卵巢大鼠血清 NO 以及 eNOS 浓度明显高于阴性对照组($P < 0.01$),其中,中剂量组还高于雌激素对照组($P < 0.01$) 与阴性对照组相比,受试物可明显降低大鼠血清 iNOS 浓度($P < 0.01$),其中,高剂量组和假手术组相当($P > 0.05$),其余各组均高于

2.6 药物对去卵巢大鼠股骨 eNOS 表达的影响(图 2,表 5)

免疫组织化学观察可见 eNOS 表达在骨小梁和骨髓腔中分布类似,主要分布在骨小梁周边的成骨细胞、骨髓基质细胞。阴性对照组 eNOS 阳性细胞数明显少于假手术组,染色浅淡。受试物各剂量组以及雌激素对照组 eNOS 阳性细胞数明显多于阴性对照组,其中,高剂量组呈强阳性。

统计学分析表明 与假手术组相比,去卵巢大鼠股骨 eNOS 表达的灰度以及积分光密度值显著下降($P < 0.01$),给予受试物后,去卵巢大鼠股骨 eNOS 表达明显高于阴性对照组($P < 0.01$),其中,高剂量组还高于雌激素对照组以及假手术组($P < 0.01$);其余各组均低于假手术组以及雌激素对照组($P <$

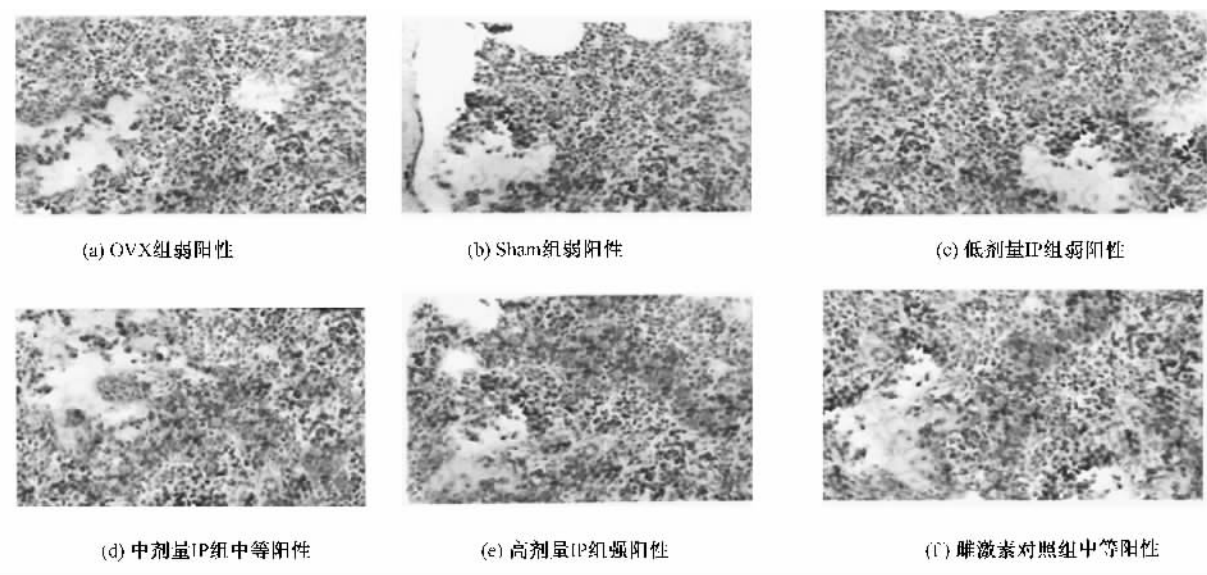


图 2 eNOS 染色 ABC × 400

0.01)。
2.7 药物对去卵巢大鼠股骨 iNOS 表达的影响 (图 3,表 6)

表 6 去卵巢大鼠股骨 iNOS 免疫组化结果($\bar{x} \pm s$)		
组别	灰度值	积分光密度值
OVX	$182.65 \pm 14.36^{\#}$	$0.512 \pm 0.061^{\#}$
Sham	$164.71 \pm 13.62^*$	$0.403 \pm 0.039^*$
低剂量 IP 组	$176.78 \pm 13.72^{*\#}$	$0.475 \pm 0.057^{*\#}$
中剂量 IP 组	$172.82 \pm 12.43^{*\#}$	$0.427 \pm 0.046^{*\#}$
高剂量 IP 组	$167.62 \pm 11.85^{*\#}$	$0.418 \pm 0.038^{*\#}$
雌激素对照组	$167.54 \pm 12.17^{*\#}$	$0.416 \pm 0.041^{*\#}$

注 :与阴性对照组比较 * $P < 0.01$;与假手术组比较 $^{\#} P < 0.01$
免疫组织化学观察可见 :去卵巢大鼠阴性对照组 iNOS 阳性表达主要分布在骨小梁周边的成骨细

胞和骨髓基质细胞,在胞浆中表达为强阳性,而骨基质中成熟骨细胞表达阴性,成骨细胞染色明显深于骨髓基质细胞(图 3b)。假手术组中骨小梁周边和骨髓腔中 iNOS 阳性细胞数明显减少,染色浅淡。受试物各剂量组以及雌激素对照组中骨小梁周边和骨髓腔中 iNOS 阳性细胞数明显少于阴性对照组,而多于假手术组。

统计学分析表明 :与假手术组相比,去卵巢大鼠股骨 iNOS 表达的灰度以及积分光密度值明显增加 ($P < 0.01$) ;给予受试物后,各组 iNOS 表达均显著低于阴性对照组 ($P < 0.01$) ,其中,高剂量组与雌激素对照组差异无统计学意义 ($P > 0.01$) ;与阴性对

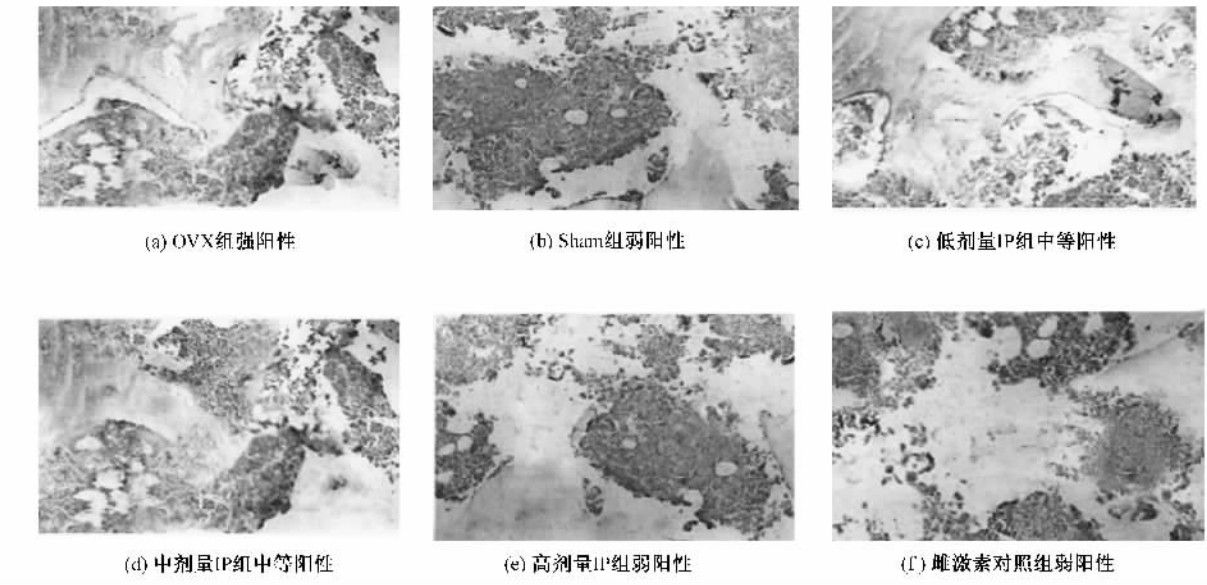


图 3 iNOS 染色 ABC × 400

对照组相比,受试物可明显降低大鼠血清 iNOS 浓度 ($P < 0.01$),其中,高剂量组和假手术组相当 ($P > 0.05$),其余各组均高于假手术组以及雌激素对照组 ($P < 0.01$)。

3 讨论

大鼠去卵巢后引起的食欲过盛^[2]或/和雌激素缺乏致使机体的脂肪代谢紊乱,可导致大鼠体重增加^[5]。随给予依普拉芬剂量的增加,体重逐渐恢复至正常水平,提示依普拉芬可能发挥类雌激素的作用而调节体重。各组子宫体重比明显低于假手术组,说明本次试验模型成功,同时也说明依普拉芬没有雌激素替代疗法的副作用。本试验结果显示:依普拉芬可改善去卵巢大鼠骨质疏松症的骨质性能,提高抗骨折能力,为 PMOP 的防治提供了新的方案,这种效果可能是通过 NO-NOS 系统进行调控的。

依普拉芬是由类黄酮中的异黄酮合成而来的,属植物雌激素类药物,作为合成前体的类黄酮是一大类苯- γ -吡喃酮的衍生物,广泛存在于各类植物当中。起初黄酮类药物是用于心血管病的防治,后来在切除卵巢的小鼠的实验中发现,染料木黄酮具有雌激素样维持骨质的作用,因而认为异黄酮可用于防治骨量丢失和绝经后骨质疏松。60 年代后期,匈牙利首次合成了依普拉芬(7-异丙氧基异黄酮),分子量为 280.31。在人体无雌激素样作用。到 70 年代初,在各种骨质疏松实验模型中发现依普拉芬不仅能减少骨量丢失,而且能使骨的总钙量增加,因而首次提出用这类药物治疗骨质疏松。

一氧化氮(nitric oxide, NO)是细胞间、细胞内的信使分子,其扩散速度、穿透细胞膜的能力、内在不稳定性等特征极为显著。由于其合成易于调节,作为高级生物体调节的有效信号在循环、呼吸、消化及内分泌代谢等系统中发挥着重要影响。一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)是生成内源性 NO 的主要限速物质,通过 RT-PCR,目前已证实骨组织中存在 NOS 全部 3 个亚型:神经元型(nNOS, NOS-1)、诱生型(iNOS, NOS-2)、内皮型(eNOS, NOS-3)。破骨细胞(osteoclast, OC)及破骨细胞前体(osteoclast progenitor)、成骨细胞(osteoblast, OB)和骨细胞(osteocyte)均既能表达 eNOS,又能表达 iNOS。骨细胞维持其正常功能需一定浓度 eNOS 存在,eNOS 以静止态存在于骨细胞谱系中,激活后酶活性持续时间很短,其活性依赖于 Ca^{2+} 和钙调蛋白(calmodulin, CaM),如 OC 胞质 Ca^{2+} 浓度的波动,可调节其 eNOS

的活性。在骨组织中,eNOS 水平相对恒定,而 iNOS 诱导生成 NO 的能力远高于 eNOS 的诱导作用,细胞因子刺激 NO 的生成主要是通过激活 iNOS 的合成。

近年来发现 NO 及其 NOS 在参与和促进骨质疏松症(osteoporosis, OP)病理生理过程中也占有举足轻重的作用,Bakker 等^[6]研究认为: NO 是由骨细胞产生,是一种机械负荷应答而促进骨的合成代谢的辅助因子。然而,与前列腺素不同,NO 可能通过增加骨保护素(osteoprotegerin, OPG)产生而抑制骨吸收^[7],Jamal 等^[8]研究发现:服用长效异乐定和其他 NO 通路活性剂患者骨密度增加可能是由于 NO 的这种效应。

NO 导致细胞因子诱导性骨吸收增强与绝经后雌激素缺乏妇女 OP 密切相关^[9]。妇女绝经后,雌激素水平的下降引起 NO 水平降低,大量实验也证实 OVX 大鼠血清 NO 水平降低。实验表明,雌激素减少使骨组织 eNOS 含量显著降低,骨组织内由 eNOS 生成的 NO 大大减少。推测此时骨组织中 NOS 是由大量减少的 eNOS 和 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 等细胞因子刺激生成的少量 iNOS 组成,催化产生的低浓度 NO 导致 OC 性骨吸收增强。低水平 NO 促进破骨细胞性骨吸收,导致骨量丢失,骨密度下降可能是绝经后骨质疏松发生的重要机制之一^[10]。因此调控 NO 的药品可能成为预防治疗 OP 产品研发的一个重要方向。本研究发现,大鼠去卵巢后,股骨重量、股骨钙含量、股骨钙总量及骨密度明显下降,与假手术组相比,其股骨的生物力学分析指标有较大变化,弯曲强度和弯曲弹性模量明显降低,结合骨密度降低的事实,说明去卵巢大鼠骨骼抵抗外力的能力明显减弱,骨折危险度增加。而药物组则在最大载荷、最大应力和屈服点 3 个指标明显强于阴性对照组,并与假手术组相当,表明药物可明显增加去卵巢大鼠骨的韧性和抗骨折能力,且未发现 HRT 的副作用。

同时本研究结果发现:大鼠去卵巢后,血清 NO 以及 eNOS 浓度显著下降,iNOS 诱生性的增加,增强了 OC 骨吸收活性,从而成为 OP 病理过程中重要环节,促使骨质疏松的发生发展。给予药物后,可以显著提高血清 NO 以及 eNOS 浓度,同时抑制 iNOS 浓度的增加,促进骨组织的 eNOS 合成,有适度促进作用,抑制 iNOS 的异常表达,减轻功能亢进的 OC 性骨吸收,从而有利于骨组织的重建及骨量的恢复,重建骨形成-吸收新平衡耦联。目前对 NO 的递质作用与生物效应已有了较多认识,但 NO 在 OP 研究中

却是非常“年轻的分子”，目前对 NO 及 NOS 的骨吸收调控机制及在 OP 发生过程中作用的认识仍主要是观察性或推理性的，同发现雌激素缺乏在 OP 发病过程中的重要作用后所造成的对 OP 患者治疗、预防、药物研制、治疗观念改变等的巨大社会影响相比较，现在对 NO、NOS 与 OP 的认识还是初步的，有待进一步探索、开拓、研究其整个作用过程和机制。

【参 考 文 献】

- [1] Staren ED, Omer S. Hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Am J Surg*, 2004, 188(2): 136-149.
- [2] Picherit C, Chanteranne B, Bennetau-Pelissero C, et al. Dose-dependent bone-sparing effects of dietary isoflavones in the ovariectomized rat. *Br J Nutr*, 2001, 85: 307-316.
- [3] Arjmandi BH, Birnbaum RS, Juma S, et al. The synthetic phytoestrogen, ipriflavone, and estrogen prevent bone loss by different mechanisms. *Calcif Tissue Int*, 2000, 66(1): 61-65.
- [4] van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology*, 2001, 103(3): 255-261.
- [5] Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, et al. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr*, 1996, 126(1): 161-167.
- [6] Bakker AD, Klein Nulend J, Tanck E, et al. Additive effects of estrogen and mechanical stress on nitric oxide and prostaglandin E₂ production by bone cells from osteoporotic donors. *Osteoporos Int*, 2005, 16: 983-989.
- [7] Wang FS, Wang CJ, Chen YJ, et al. Nitric oxide donor increases osteoprotegerin production and osteoclastogenesis inhibitory activity in bone marrow stromal cells from ovariectomized rats. *Endocrinology*, 2004, 145: 2148-2156.
- [8] Jamal SA, Cummings SR, Hawker GA. Isosorbide mononitrate increases bone formation and decreases bone resorption in postmenopausal women: a randomized trial. *J Bone Miner Res*, 2004, 19: 1512-1517.
- [9] 李昂, 卿茂盛, 薛延. 骨质疏松发生一氧化氮机制及雌激素调控作用研究. *中国骨质疏松杂志*, 2003, 9(1): 19-22.
- [10] 韩学哲, 许鹏, 姚建锋, 等. 大鼠骨质疏松模型血清中一氧化氮和 IL-6 水平及意义. *中国矫形外科杂志*, 2001, 8(4): 369-371.

(收稿日期: 2009-06-16)