

· 论著 ·

牛膝提取物对去卵巢大鼠骨密度、骨转换及 I 型胶原蛋白表达的影响

杨国夫 宋国胜 张涛 徐洪伟 董锋

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)02-0109-04

摘要: 目的 观察牛膝醇提取物对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度(BMD)、骨转换和骨组织 I 型胶原蛋白表达的影响。方法 背侧切口切除大鼠双侧卵巢,分为去卵巢组,牛膝提取物高、中、低剂量组和雌激素对照组,另设一假手术组,分别给予基础饲料和不同剂量治疗药物,12w 后使用双能 X 线骨密度仪测量股骨、胫骨和腰椎的骨密度;采用酶联免疫吸附法对骨转换指标血清骨碱性磷酸酶(BAP)、血清骨钙素(BGP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)、尿 I 型胶原氨基末端肽(NTx)/肌酐比值(NTx/Cr)进行测定,并利用 Western 免疫印迹法检测骨组织 I 型胶原蛋白表达的变化。结果 大鼠去势后骨密度和 I 型胶原蛋白的表达显著下降($P < 0.01$),骨转换指标有较大变化。牛膝醇提取物高、中剂量组可使去势大鼠骨密度和 I 型胶原蛋白的表达显著提高,改善骨转换指标的变化,且存在一定的剂量-效应关系。结论 牛膝醇提取物能提高去势大鼠的骨密度和 I 型胶原蛋白的表达。

关键词: 牛膝; 骨质疏松; 骨密度; 胶原

The effect of Achyranthes bidentata BI. extracts on bone mineral density, bone turnover rate and type I collagen expression in ovariectomized rats YANG Guofu, SONG Guosheng, ZHANG Tao, et al.
Department of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Corresponding author: YANG Guofu, Email: nemoygf@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the effects of achyranthes bidentata BI extracts on bone mineral density (BMD), bone turnover rate and the expression of type I collagen in bone of ovariectomized (OVX) rats. **Methods** Rats with bilateral removal of ovaries were divided into OVX control group, low-, middle-, and high-dose of achyranthes bidentata BI extracts group, estrogen control group, and sham operation group. Basic feed and different dose of curative materials were given. After 12 weeks, BMDs of the femur, the tibia, and the lumbar vertebra were measured using DXA. Serum bone alkaline phosphates (BAP), bone gla-protein (BGP), tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) activity, and urine deoxypyridinoline/creatinine (UDpd/Cr) were measured with enzyme-linked immuosorbent assay. The amount of type I collagen protein in bone tissue were detected with Western blot. **Results** BMD and the expression of type I collagen in the bone significantly decreased and bone turnover rate changed obviously in OVX group. High- and middle-dose of achyranthes bidentata BI extracts increased BMD and type I collagen in OVX rats significantly, and improved the bone turnover rate, in a dose-dependent manner. **Conclusion** Achyranthes bidentata BI extracts was able to elevate BMD and improved the expression of type I collagen protein in OVX rats.

Key words: Achyranthes bidentata BI.; Osteoporosis; Bone mineral density; Collagen

作者单位: 150001 哈尔滨, 哈尔滨医科大学附属第一医院骨科(杨国夫、张涛、徐洪伟、董锋); 大兴安岭地区人民医院骨科(宋国胜)

通讯作者: 杨国夫, Email: nemoygf@yahoo.com.cn

万方数据

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是以骨结构解聚与骨矿物质减少为特征的骨代谢性疾病,与骨细胞的代谢异常有关^[1]。随着我国人口老龄化的进程,骨质疏松症的发病率正逐年增加,而骨质疏松性骨折和再骨折的危害性更大,严重影响老年人群的

生活质量。因此,迫切需要研究和开发更为安全有效的防治骨质疏松的药物。

牛膝(怀牛膝)为苋科牛膝属植物 *Achyranthes bidentata* Bl. 之干燥根,为中医常用药,具有补肝肾,强筋骨之功效,自古以来用于腰膝酸痛,筋骨无力^[2]。但就牛膝单味药对骨代谢影响的研究报道还很少见,本研究以 75% 乙醇萃取牛膝的干燥根,观察提取物对去卵巢(OVX)大鼠骨密度、骨转化指标(BAP、BGP、NTX、TRAP)及骨组织 I 型胶原(Collagen type I, COL I)蛋白表达的影响,为开发新的、高效的抗骨质疏松新药提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6 月龄清洁级雌性 SD 大鼠 60 只,体重 280 ~ 320 g,使用许可证号:SYSK(黑 2006-033),购自哈医大二院实验动物中心。

1.2 药物及试剂

怀牛膝购自哈尔滨市药材公司,经黑龙江中医药大学大学生药教研室鉴定为牛膝(*Achyranthes bidentata* Bl.)的干燥根;17- β 雌二醇片剂(丹麦诺和诺德公司,商品名:诺坤复)、戊巴比妥钠(中国医药上海化学试剂公司)、兔抗鼠 I 型胶原多克隆一抗(北京中山生物公司)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(北京中山生物公司)、TLC 用硅胶 GF₂₅₄(青岛海洋化工厂)、HPD100 型大孔吸附树脂(沧州宝恩化工有限公司)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)测试盒(南京建成生物工程研究所)、血清碱性磷酸酶(A4)检测试剂(北京中山生物公司)、NTx ELISA 试剂盒购自美国 Ostex 公司,其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器设备

LUNAR-Prodigy 双能 X 线骨密度仪测定仪(美国 GE 公司);ChemImager 5500 凝胶电泳成像分析系统(美国,Alpha Innotech);Bio-rad 电泳系统(美国伯乐);ELx-800 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

1.4 方法

1.4.1 牛膝醇提物的制备:取怀牛膝干燥的根 2 kg,用体积分数 75% 的乙醇回流提取 3 次,每次 3 h;提取液减压回收乙醇,浓缩液经大孔树脂脱糖后,用体积分数 95% 的乙醇洗脱,洗脱液回收溶剂、浓缩得水溶液,石油醚萃取^[3],重结晶后样品用水溶解,制成 1 g/L 的溶液存 4℃ 冰箱备用。

1.4.2 骨质疏松大鼠模型的制备和分组:Wistar 大鼠适应喂养 1w 后,随机分为模型组和假手术组

(SHAM),模型组大鼠采用背侧切口,3% 戊巴比妥钠按 40 mg/kg 腹腔注射麻醉后,无菌条件下切开皮肤、皮下组织,摘除双侧卵巢,止血缝合。术后,给予青霉素 5 万单位/只,肌肉注射 3 d。大鼠摄食为标准饲料和自来水,温度、湿度以普通级条件饲养。术后 10 d 开始给药,共 12 w。假手术组(SHAM)同等条件下取大小相当的脂肪各一块。模型组分为卵巢切除组(OVX)做空白对照、牛膝高剂量组(ABH)、牛膝中剂量组(ABM)、牛膝低剂量组(ABL),并以 17- β 雌二醇组(E₂)阳性药物对照组,每组 10 只。

1.4.3 给药方法:牛膝(AB)高、中、低剂量组 AB 用量分别为 320、160 和 80 mg/kg,雌二醇组(E₂)给予 17- β 雌二醇片剂(诺坤复),研磨成细粉,0.2% 吐温-80 50 mL 溶解,用量为 10 μ g/kg,均每天灌胃 1 次。假手术组(SHAM)和卵巢切除组(OVX)灌以同体积的水。

1.4.4 尿 I 型胶原氨基末端交联肽(Cross-linked N-telopeptide of type I collagen, NTx)测定:12 w 末,将大鼠分别置于代谢笼中收集 24 h 尿液,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定 NTx 含量,同时测定尿肌酐(Cr)浓度,计算出 NTx/Cr 比值。

1.4.5 血清指标检测:实验结束时,大鼠空腹 12 h 后,股动脉取血分离血清,用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测血清骨特异性碱性磷酸酶(Bone-specific alkaline phosphates, BAP)、骨钙素(Bone gla-protein, BGP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(Tartrate-resistant acid phosphatase, TRACP),均按其具体试剂盒操作说明进行检测。

1.4.6 骨密度(BMD)检测:12 w 后,各组大鼠用 3% 戊巴比妥钠按 40 mg/kg 腹腔注射麻醉后,四肢展开平置于美国 Lunar 公司生产的双能 X 线吸收测量仪平台上,通过计算机系统中小动物软件测定全身 BMD,组内 CV 在 0.8% ~ 1.2%。

1.4.7 骨组织 COL I 蛋白的 Western 印迹检测:取仔细剥除附着的肌肉、结缔组织后存放在液氮中的大鼠右后肢股骨头,放入研钵不断加入液氮,研磨成粉末,加入 RIPA 裂解液(1 mL/100 mg, PMSF 10 μ M/100 mg),匀浆,低温高速离心后取上清,BCA 法测蛋白含量。加入 2 $\times$ 上样缓冲液(1:1)后干式恒温器 100℃ 变性 5 min,8% SDS-PAGE 后电转移至硝酸纤维素膜,脱脂奶粉溶液封闭 2 h,兔抗鼠 I 型胶原多克隆抗体(1:5000)和 Actin 抗体分别杂交硝酸纤维素膜 1 h 后,加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(1:4000)杂交 1 h, ECL 发光剂染膜后,显

影、定影,用 ChemiImager 5500 型凝胶电泳成像分析仪对杂交带进行密度扫描分析,比较各组大鼠 COL I 蛋白表达相对水平。

1.5 统计学处理

所有资料用 SPSS 12.0 统计软件进行分析,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异极有显著性。

2 结果

2.1 实验动物基本情况

AB 低剂量组于术后第 2 周死亡 2 只,AB 高剂量组于术后第 3 周死亡 1 只, E_2 组于术后第 3 周死亡 1 只,原因均为灌胃时药物不慎进入气管窒息所致,余均存活。

表 1 各组大鼠骨转换指标和骨组织 I 型胶原蛋白测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别 (Group)	数量 (n)	BAP (U/L)	BGP ($\mu\text{g/L}$)	TRACP (U/L)	NTx/Cr (nmol BCE/mmol Cr)	I 型胶原灰度比值 (Ratio of total grey)
卵巢切除组 (OVX)	10	14.3 $\pm$ 1.9 *	1.91 $\pm$ 0.1 *	13.7 $\pm$ 1.2 **	0.51 $\pm$ 0.23 *	0.05 $\pm$ 0.03 **
假手术组 (SHAM)	10	23.8 $\pm$ 2.7	4.7 $\pm$ 0.4	4.5 $\pm$ 0.9	0.26 $\pm$ 0.17	0.24 $\pm$ 0.06
雌二醇组 (E_2)	9	20.9 $\pm$ 2.3 *	4.2 $\pm$ 0.3 *	4.7 $\pm$ 1.1 **	0.27 $\pm$ 0.12 **	0.29 $\pm$ 0.09 **
牛膝高剂量组 (ABH)	9	21.3 $\pm$ 2.2 *	4.1 $\pm$ 0.4 *	4.4 $\pm$ 0.8 **	0.23 $\pm$ 0.15 **	0.37 $\pm$ 0.07 **
牛膝中剂量组 (ABM)	10	19.6 $\pm$ 1.8 *	3.8 $\pm$ 0.3 *	6.7 $\pm$ 1.0 **	0.30 $\pm$ 0.18 *	0.28 $\pm$ 0.07 *
牛膝低剂量组 (ABL)	8	17.3 $\pm$ 2.1 **	3.3 $\pm$ 0.2 *	9.4 $\pm$ 1.3 **	0.41 $\pm$ 0.15 *	0.19 $\pm$ 0.04 *

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. SHAM group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. OVX group

2.3 全身 BMD

12w 后,OVX 组大鼠全身 BMD 与假手术组相比明显降低 ($P < 0.01$)。雌二醇和高、中剂量的牛膝醇提取物均可增加 OVX 大鼠的 BMD ($P < 0.05$

2.2 骨转换指标的变化

2.2.1 尿 NTx/Cr 比值: OVX 组显著升高,为假手术组的 1.96 倍 ($P < 0.05$), E_2 组显著低于 OVX 组 ($P < 0.05$),与假手术组差异无统计学意义。AB 低剂量组与假手术组相比亦显著升高,但仍较 OVX 组低 ($P < 0.05$)。AB 高、中剂量组均显著低于 OVX 组 ($P < 0.05$),而与假手术组、 E_2 组水平相当,见表 1。

2.2.2 血清骨转换指标 BAP、BGP 和 TRACP 的测定:与 OVX 组比较,假手术组、牛膝醇提取物各剂量组血清骨碱性磷酸酶 (BAP) 和骨钙素 (BGP) 均有增高的趋势 ($P < 0.05$);假手术组、雌二醇组、牛膝醇提取物高、中剂量组的 TRACP 与 OVX 组比较均显著降低 ($P < 0.01$),有统计学差异,见表 1。

或 $P < 0.01$),尤以雌二醇和高剂量牛膝醇提取物升高 BMD 的作用明显 (均 $P < 0.01$),且两者作用相当,见表 2。

表 2 各组大鼠骨密度的测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别 (Group)	数量 (n)	股骨近端 (g/cm^2)	股骨远端 (g/cm^2)	胫骨近端 (g/cm^2)	胫骨远端 (g/cm^2)	腰椎 (g/cm^2)
卵巢切除组 (OVX)	10	0.162 $\pm$ 0.012 **	0.151 $\pm$ 0.023 **	0.159 $\pm$ 0.018 **	0.168 $\pm$ 0.023 **	0.132 $\pm$ 0.011 **
假手术组 (SHAM)	10	0.316 $\pm$ 0.021	0.349 $\pm$ 0.024	0.317 $\pm$ 0.019	0.328 $\pm$ 0.022	0.268 $\pm$ 0.015
雌二醇组 (E_2)	9	0.271 $\pm$ 0.027 **	0.302 $\pm$ 0.028 **	0.288 $\pm$ 0.023 **	0.312 $\pm$ 0.026 **	0.258 $\pm$ 0.018 **
牛膝高剂量组 (ABH)	9	0.254 $\pm$ 0.024 **	0.289 $\pm$ 0.023 **	0.291 $\pm$ 0.029 **	0.307 $\pm$ 0.025 **	0.231 $\pm$ 0.017 **
牛膝中剂量组 (ABM)	10	0.222 $\pm$ 0.016 **	0.231 $\pm$ 0.022 **	0.246 $\pm$ 0.017 **	0.257 $\pm$ 0.027 **	0.192 $\pm$ 0.016 **
牛膝低剂量组 (ABL)	8	0.200 $\pm$ 0.017	0.198 $\pm$ 0.019	0.189 $\pm$ 0.016	0.193 $\pm$ 0.019	0.167 $\pm$ 0.012

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. SHAM group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. OVX group

2.4 骨组织 COL I 蛋白表达的检测

OVX 组较假手术组明显降低 ($P < 0.01$),牛膝醇提取物各组及雌二醇组均较 OVX 组显著升高,且均有统计学意义 (AB 中、低剂量组 $P < 0.05$,其余均 $P < 0.01$,表 1、图 1)。

3 讨论

骨组织由 1/3 有机基质和 2/3 无机基质构成,其中 I 型胶原蛋白占骨有机基质的 80% ~ 90%。它不仅是骨的弹性和韧性的主要构成者,也是骨盐

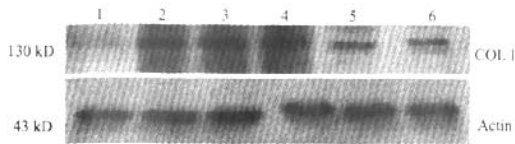


图1 各组大鼠骨组织 I 型胶原蛋白表达结果

注:1. OVX; 2. SHAM; 3. E₂; 4. ABH; 5. ABM; 6. ABL

栖息的场所,骨组织 I 型胶原的代谢状况与骨的代谢密切相关^[4]。骨胶原的过度降解或合成减少均可引起骨弹性和韧性降低,骨盐失去依附,溶解增多,极易导致骨质疏松。骨 I 型胶原相关研究揭示骨质疏松症发病机理及药物干预机制的重要手段。

血清骨碱性磷酸酶(BAP)和骨钙素(BGP)是反映骨形成的敏感指标;而抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)和尿 NTx/Cr 的比值是反映骨吸收的比较敏感性、特异性较强的指标,在预测骨量丢失趋势及疗效监测方面具有重要的价值。本研究发现,牛膝醇提取物能增加血清 BAP 和 BGP 的水平,显著降低血清 TRACP 和尿中 NTx/Cr 的比值,且随着剂量的增大,作用有增强趋势。其中,AB 高剂量组的作用与 E₂ 组相当。提示 AB 具有较强的促进骨形成,降低骨基质的降解、抑制骨吸收的作用。且经牛膝处提取物治疗 12w 后,可显著增高 OVX 大鼠的全身 BMD,并随着剂量的增加而呈现上升的趋势,其中 320 mg/kg 的 AB 增加全身 BMD 的作用与 10 μg/kg 的 E₂ 相当。

本研究结果还显示:OVX 组 I 型胶原蛋白的表达低于假手术组($P < 0.01$),牛膝醇提取物高、中剂量组 I 型胶原蛋白的表达高于 OVX 组($P < 0.01$),接近假手术组。提示牛膝醇提取物可以通过增加成骨细胞的 I 型胶原蛋白的表达水平,促进骨组织 I 型胶原的合成,从而促进骨形成。崔洪英和王冬春等用含有牛膝的补肾中药对去势大鼠进行骨形态的研究,发现补肾复方中药能使大鼠骨小梁的宽度、面积、总体积以及密质骨面积增大,而骨髓腔面积减小^[5,6]。综合以上的研究结果,牛膝醇提取物具有提高去势大鼠骨密度和抗骨组织 I 型胶原蛋白丢失的作用。

【参 考 文 献】

- [1] 孙益,童培建,肖鲁伟. 绝经后骨质疏松症与中医体质的相关性. 中医杂志, 2009, 50(8): 696-699.
- [2] 林肖慧,刘鹏,徐为人,等. 牛膝不同炮制品中多糖的测定. 中草药, 2008, 39(8): 1180-1182.
- [3] 孟大利,吉双,张予川,等. 牛膝中萜类及糖类成分的分离与鉴定. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(5): 348-352.
- [4] Stavros C, Manolagas SC, Ika RL. Bone marrow, cytokines and bone remodeling. N Eng J Med, 1995, 332(5): 305-311.
- [5] 崔洪英,张柏丽,安秀玲. 补肾中药对骨质疏松大鼠骨形态的影响. 天津中药, 1997, 14(5): 226-227.
- [6] 王冬春,檀爱民,马世平,等. 仙灵强骨口服液对去势老龄大鼠骨质疏松症的影响. 中国中药杂志, 2007, 32(10): 965-968.

(收稿日期:2010-07-20)

(上接第 108 页)

- [6] Marie PJ. Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption. Osteoporos Int, 2005, 16 (Suppl 1): S7-S10.
- [7] Reginster JY, Deroisy R, Neuprez A, et al. Strontium ranelate: new data on fracture prevention and mechanisms of action. Curr Osteoporos Rep, 2009, 7(3): 96-102.
- [8] Chattopadhyay N, Quinn SJ, Kifor O, et al. The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. Biochem Pharmacol, 2007, 74(3): 438-447.

- [9] Caverzasio J. Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms. Bone, 2008, 42: 1131-1136.
- [10] Canalis E, Hott M, Deloffre P, et al. The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. Bone, 1996, 18(6): 517-523.
- [11] Barbara A, Delannoy P, Denis BG, et al. Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells. Metabolism, 2004, 53(4): 532-537.

(收稿日期:2010-08-09)

牛膝提取物对去卵巢大鼠骨密度、骨转换及 I 型胶原蛋白表达的影响

作者：杨国夫，宋国胜，张涛，徐洪伟，董锋

作者单位：杨国夫, 张涛, 徐洪伟, 董锋 (哈尔滨医科大学附属第一医院骨科, 哈尔滨, 150001)，宋国胜 (大兴安岭地区人民医院骨科)

刊名：中国骨质疏松杂志 

英文刊名：CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS

年，卷(期)：2011, 17 (2)

参考文献(6条)

1. 王冬春;檀爱民;马世平 仙灵强骨口服液对去势老龄大鼠骨质疏松症的影响[期刊论文]-中国中药杂志 2007 (10)

2. 崔洪英;张柏丽;安秀玲 补肾中药对骨质疏松大鼠骨形态的影响 1997 (05)

3. Stavros C;Manolagas SC;Ika RL Bone marrow, cytokines and bone remodeling 1995 (05)

4. 孟大利;吉双;张予川 牛膝中萜类及糖类成分的分离与鉴定[期刊论文]-沈阳药科大学学报 2009 (05)

5. 林肖慧;刘鹏;徐为人 牛膝不同炮制品中多糖的测定[期刊论文]-中草药 2008 (08)

6. 孙益;童培建;肖鲁伟 绝经后骨质疏松症与中医体质的相关性[期刊论文]-中医杂志 2009 (08)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201102005.aspx