

咖啡酸苯乙酯对雌性骨质疏松小鼠的实验研究

秦迎泽 向川 段王平 李琦 卫小春

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013)03-0264-04

摘要: 目的 采用骨生物力学、骨密度测定方法综合评价咖啡酸苯乙酯(Caffeic acid phenethyl ester CAPE)对去势小鼠骨质疏松影响的实验研究。方法 取 96 只 12 周龄 C57BL/6J 雌性小鼠随机分 16 组, (每组 6 只)。分别研究 CAPE 预防骨质疏松部分: 1 周假手术组(sham PBS 组)、去势组(ovx PBS 组); 4 周、7 周的 sham PBS 组、ovx PBS 组、ovx CAPE(0.5 mg/kg)组、ovx CAPE(1 mg/kg)组。CAPE 治疗骨质疏松部分: 7 周 sham 空白组和 ovx 空白组; 造模 7 周后腹腔注射药物 4 周, 包括 11 周 sham PBS 组、ovx PBS 组、ovx CAPE(0.5 mg/kg)组、ovx CAPE(1 mg/kg)组。96 只小鼠均用 0.5% 的戊巴比妥 0.3 ml 腹腔注射麻醉, 5 分钟后心脏采血, 采用 ELISA 方法检测血清中雌激素水平。并对小鼠的双侧肱骨、脊柱进行取材, 取双侧肱骨进行三点弯曲实验, 采用美国 HOLOGIC 骨密度仪分析小鼠脊柱骨密度变化。结果 (1) 血清中雌激素水平检测发现, 所有 ovx 组雌激素较 sham 组显著降低($P < 0.05$)。 (2) 骨密度: 预防部分 4 周 ovx 组的脊柱骨密度值较 sham 组、ovx 0.5mg 组及 ovx 1mg 组明显降低($P < 0.05$)。 (3) 生物力学: 预防部分 1 周、4 周与治疗部分 7 周、11 周 ovx 组较 sham 组、ovx 0.5mg 组、ovx 1mg 组的最大破坏应力指标显著降低($P < 0.05$)。结论 咖啡酸苯乙酯能明显改善去势骨质疏松小鼠骨的力学性能, 增加去势骨质疏松小鼠的骨密度, 抑制骨吸收, 从而达到预防和治疗骨质疏松的作用。

关键词: 骨质疏松; 咖啡酸苯乙酯; 生物力学; 骨密度;

Experimental study of the effect of coffee acid ethyl benzene on female osteoporotic mice QIN Yingze, XIANG Chuan, DUAN Wangping, et al. The Second Clinical Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: XIANG Chuan, Email: xcml7275@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To evaluate the effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on ovariectomized mice with osteoporosis comprehensively by measuring bone biomechanics and bone mineral density (BMD). **Methods** A total of 96 12-week C57BL/6J mice were randomly divided into 16 groups ($n = 6$ in each group). Prevention of osteoporosis using CAPE: 1-week sham group (sham PBS group), ovariectomized group (OVX PBS group); 4-week and 7-week sham PBS group, OVX PBS group, OVX CAPE (0.5 mg/kg) group, and OVX CAPE (1 mg/kg) group. Treatment of osteoporosis using CAPE: 7-week sham blank group and OVX blank group, and after 4-week intraperitoneal injection, 11-week sham PBS group, OVX PBS group, OVX CAPE (0.5 mg/kg) group, and OVX CAPE (1 mg/kg) group. All the 96 mice were anesthetized with 0.3 ml 0.5% pentobarbital intraperitoneal injection. Blood samples were taken from the heart 5 minutes later. Serum estrogen level was detected using ELISA method. Bilateral humerus and the spine were collected. Three-point bending experiment was performed on the bilateral humerus. BMD of the spine was tested using dual-energy X-ray absorptiometry (HOLOGIC, USA). **Results** Serum estrogen level in all OVX groups was significantly lower than that in sham group ($P < 0.05$). In prevention part, BMD in 4-week OVX group was significantly lower than that in sham group, OVX 0.5 mg group, and OVX 1mg group ($P < 0.05$). On biomechanics part, the maximum stress failure index in 1-week and 4-week OVX

基金项目: 山西省自然科学基金资助项目(2010011050-2)

作者单位: 030001 太原, 山西医科大学第二临床医学院

通讯作者: 向川, Email: xcml7275@yahoo.com.cn

group in prevention part and 7-week and 11-week OVX group in treatment part was significantly lower than that in sham group, OVX 0.5 mg group, and OVX 1mg group ($P < 0.05$). **Conclusion** CAPE can obviously improve the mechanical properties of the bone in ovariectomized osteoporotic mice, increase the BMD of ovariectomized osteoporotic mice, and inhibit bone resorption, leading to the prevention and treatment of osteoporosis.

Key words: Osteoporosis; CAPE; Biomechanics; Bone mineral density

骨质疏松 (Osteoporosis, OP) 以骨量减少、微结构退变, 骨强度下降, 脆性增加从而使骨折风险增高的全身代谢性骨病。全球约两亿人患病, 其中我国约占 42%^[1]。原发性骨质疏松症以绝经后妇女最多见, 因此女性的发病率明显高于男性。绝经后妇女骨质疏松及其引发的骨折严重影响中老年人生活质量。咖啡酸苯乙酯 (Caffeic Acid Phenethyl Ester, CAPE) 为蜂胶的主要活性成份, 是一种天然的 NF- κ B 抑制剂, 还具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等作用, 一些研究表明 CAPE 可能通过阻止 RANKL 信号通路 NF- κ B 和 NFAT 的活动, 从而抑制破骨细胞的形成与激活^[2]。为进一步研究 CAPE 对骨质疏松的作用, 本实验采用切除小鼠卵巢建立骨质疏松模型, 观察 CAPE 对小鼠骨密度、骨生物力学的影响。

1 材料与方法

1.1 建立骨质疏松模型

所有 ovx 组小鼠用 0.5% 的戊巴比妥 0.3 ml 腹腔注射麻醉后, 用眼科小剪刀将小鼠背部中后三分之一的毛剪掉。取俯卧位, 用碘伏消毒手术区皮肤, 在背部两侧分别做纵行切口约 0.5 cm 左右, 剥离卵巢周围的白色脂肪组织, 用小镊将卵巢提出, 结扎输卵管并将卵巢摘除, 生理盐水冲洗后逐层缝合。假手术组仅切开卵巢周围脂肪组织, 冲洗后逐层缝合。术后伤口给予碘伏消毒, 术后所有动物无一例感染。

1.2 仪器及实验药物

Instron 4455 材料性能测试仪 (太原理工大学应用力学研究所), 美国 Hologic 双能 X 线骨密度仪 (山西医科大学第二临床医学院)。咖啡酸苯乙酯 (caffeic acid phenethyl ester, CAPE), 美国 Sigma 公司。0.5% 戊巴比妥钠溶液 (北京医药公司)。

1.3 实验动物及分组

96 只 C57BL/6J 近交系雌性小鼠 (购自中科院动物研究所), 将 96 只 12 周龄小鼠随机分 16 组, (每组 6 只)。分别研究 CAPE 预防骨质疏松部分: 1 周假手术组 (sham PBS 组)、去势组 (ovx PBS 组); 4

周、7 周的 sham PBS 组、ovx PBS 组、ovx CAPE (0.5 mg/kg) 组、ovx CAPE (1 mg/kg) 组。CAPE 治疗骨质疏松部分: 7 周 sham 空白组和 ovx 空白组; 造模 7 周后腹腔注射药物 4 周, 包括 11 周 sham PBS 组、ovx PBS 组、ovx CAPE (0.5 mg/kg) 组、ovx CAPE (1 mg/kg) 组。

1.4 给药方法

咖啡酸苯乙酯先溶于二甲基亚砜中, 之后再溶于 PBS 中制成。术后 3 天给予腹腔注射药物 (2 次/周)。PBS 组腹腔注射 PBS 溶液 0.5 ml/kg; ovx 组腹腔注射 CAPE 0.5 ml/kg、ovx 腹腔注射 CAPE 1 ml/kg; 分别于 1、4、7、11 周取标本。

1.5 观察指标

1.5.1 一般情况: 观察所有小鼠切口、精神状态和体重的变化, 所有小鼠用电子天平测量体重 (1 次/周, 连续测量 11 周)。

1.5.2 雌激素检测: 小鼠腹腔注射 0.5% 的戊巴比妥 0.5 ml, 5 分钟成功麻醉后, 心脏采血约 0.4 - 0.7 ml, 采用 ELISA 法检测小鼠血清中雌激素水平。

1.5.3 BMD 检测: 小鼠脊柱取材后用生理盐水浸湿的纱布 -20℃ 冰箱保存, 标本自然解冻 24 小时后采用美国 HOLOGIC Discovery Wi 骨密度仪扫描小鼠脊柱, 由设备配套的小动物软件分析并得出骨密度值。

1.5.4 生物力学: 取小鼠双侧肱骨自然解冻置于 Instron 4455 材料性能测试仪上 (太原理工大学应用力学研究所), 保持其湿度, 测试温度为 23℃。以肱骨中点为加力点, 支座跨距 8 mm, 加载速度 2 mm/min, 计算机采集挠度及载荷信号并对载荷 - 挠度曲线自动处理。载荷逐渐增加直到骨破坏, 试验结束后计算机自动输出实验数据。

1.6 统计学方法

全部实验数据均采用 SPSS 13.0 分析软件对数据进行统计分析, 计量资料数据均采用以 $\bar{x} \pm s$ 标准差表示, 两样本定量资料采用 t 检验, 多组定量资料采用单因素方差分析, 组间比较用 LSD 和 Bonferroni 法, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 一般情况与体重变化

术后 3 天内小鼠精神状况较差,1 周左右逐渐恢复正常。连续测量 11 周小鼠体重发现所有 ovx 组小鼠的体重明显增加,而 sham 组的小鼠体重未出现明显改变(见图 1~4)。

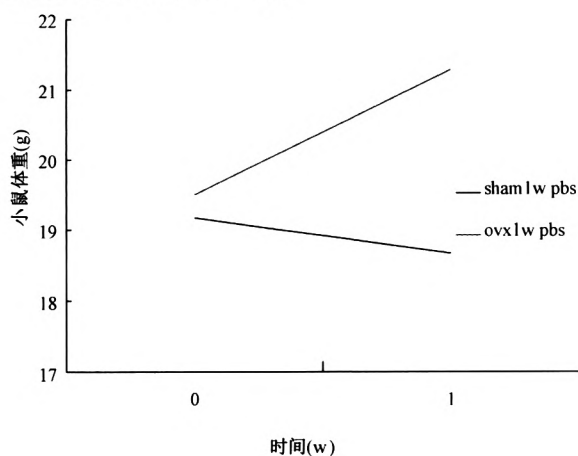


图 1 预防部分 1 周体重变化折线图
Fig. 1 Prevention of some 1 weeks weight change The line chart

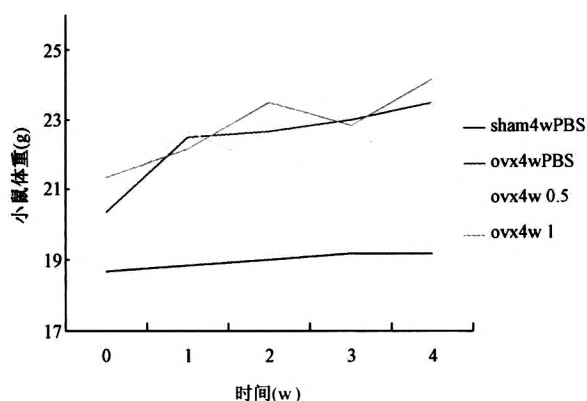


图 2 预防部分 4 周体重变化折线图
Fig. 2 Prevention of some 4 weeks weight change The line chart

2.2 雌激素检测

通过对血清中雌激素水平的检测发现,在 1 周、4 周、7 周、11 周时,ovx 组小鼠雌激素较 sham 组显著降低($P < 0.05$)(见图 5)。

2.3 BMD 检测

预防部分 1 周、7 周与治疗部分 7 周、11 周 ovx 组的脊柱骨密度值较 sham 组、ovx0.5mg 组及 ovx1mg 组统计学无差异($P > 0.05$)。其中预防部分

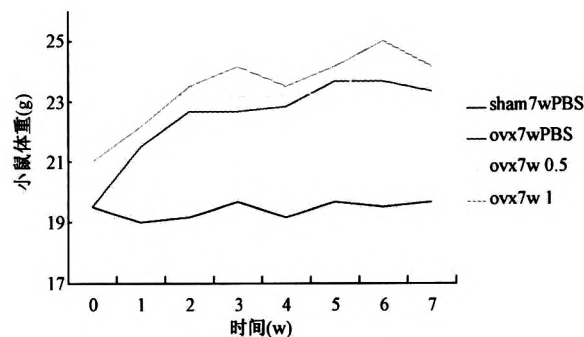


图 3 预防部分 7 周体重变化折线图
Fig. 3 Prevention of 7 weeks weight change The line chart

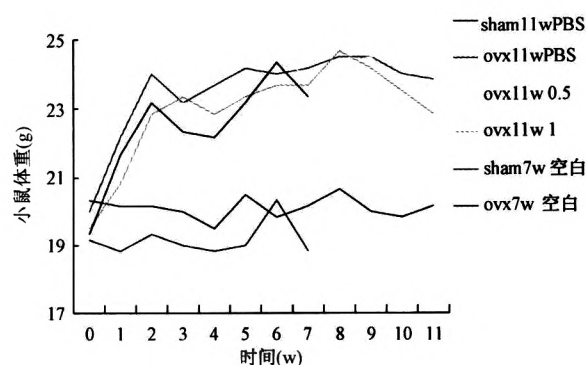


图 4 治疗部分 7、11 周体重变化折线图
Fig. 4 Treatment of 7, 11 weeks weight change The line chart

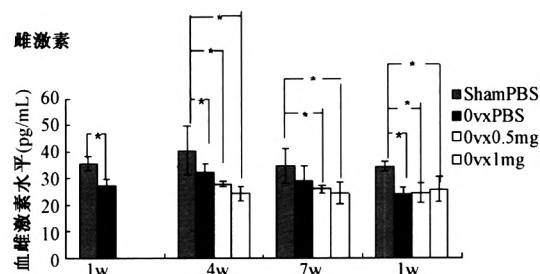


图 5 1、4、7、11 周雌激素变化柱状图
注: * 表示 $P < 0.05$

Fig. 5 1, 4, 7, 11 weeks, estrogen change histogram

Note * express $P < 0.05$

4 周组的差异较显著($P < 0.05$)(见表 1)。

2.4 生物力学

预防部分 1、4 周与治疗部分 7 周 ovx 组较 sham 组、ovx0.5mg 组、ovx1mg 组的弹性模量、最大破坏应变百分比差异无统计学意义($P > 0.05$),而骨的最大破坏应力指标变化较显著($P < 0.05$)(见表 2)。

表 1 小鼠脊柱骨密度(BMD)测试结果

Table 1 Mouse spinal bone density (BMD) test results

组别	例数	骨密度 (g/cm ²)
Sham 1w PBS	6	0.084 ± 0.007
ovx 1w PBS	6	0.079 ± 0.01
Sham 4w PBS	6	0.088 ± 0.005 *
Ovx 4w PBS	6	0.081 ± 0.005 *
Ovx 4w 0.5 mg	6	0.093 ± 0.005 *
Ovx 4w 1 mg	6	0.091 ± 0.002 *
Sham 7 w PBS	6	0.084 ± 0.005
ovx 7 w PBS	6	0.079 ± 0.007
ovx 7 w 0.5 mg	6	0.083 ± 0.007
ovx 7 w 1 mg	6	0.085 ± 0.007
Sham 7 w 空白	6	0.088 ± 0.007
ovx 7 w 空白	6	0.084 ± 0.005
Sham 11 w PBS	6	0.086 ± 0.001
ovx 11 w PBS	6	0.082 ± 0.01
ovx 11 w 0.5 mg	6	0.085 ± 0.008
ovx 11 w 1 mg	6	0.078 ± 0.008

注: * 表示 $P < 0.05$, Note: * express $P < 0.05$ 表 2 双侧肱骨三点弯曲试验结果 $n = 12$ Table 2 Double side humerus three point bending test results $n = 12$

组别	弹性模量 (MPa)	最大破坏 应变 (%)	最大破坏 应力 (MPa)
Sham 1 w PBS	3.42 ± 1.12	11.16 ± 3.42	35.15 ± 4.17 **
ovx 1 w PBS	3.07 ± 0.74	9.36 ± 3.49	26.83 ± 6.29 **
Sham 4 w PBS	3.68 ± 1.28	9.17 ± 4.61	29.26 ± 7.03 *
ovx 4 w PBS	3.28 ± 0.66	8.04 ± 2.22 *	24.97 ± 3.16 *
Ovx 4 w 0.5 mg	2.95 ± 1.03	8.82 ± 2.71	25.13 ± 8.97 *
Ovx 4 w 1 mg	3.02 ± 0.59	11.24 ± 3.44 *	32.59 ± 7.09 *
Sham 7 w PBS	2.55 ± 0.93	13.03 ± 7.72	26.36 ± 4.94
ovx 7 w PBS	2.57 ± 1.11	10.77 ± 4.55	25.15 ± 7.85
Ovx 7 w 0.5 mg	2.55 ± 0.8	10.01 ± 4.82	23.17 ± 6.05
Ovx 7 w 1 mg	2.43 ± 0.53	10.48 ± 3.0	24.21 ± 4.87
Sham 7 w 空白	3.07 ± 0.89	11.91 ± 6.82	32.62 ± 12.44 *
ovx 7 w 空白	2.52 ± 0.45	9.41 ± 1.99	23.44 ± 5.89 *
Sham 11 w PBS	3.26 ± 1.06	10.15 ± 3.32	33.94 ± 16.21 *
ovx 11 w PBS	3.12 ± 0.98	11.26 ± 4.27	29.95 ± 5.82 *
Ovx 11 w 0.5 mg	3.48 ± 1.39 *	10.03 ± 4.95	28.76 ± 7.52 *
Ovx 11 w 1 mg	2.6 ± 0.54 *	9.59 ± 2.47	24.19 ± 6.0 *

注: * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$ Note: * express $P < 0.05$, ** express $P < 0.01$

3 讨论

随着人口的老龄化,OP 的发病率逐年上升如何预防和治疗骨质疏松已成为国内外学者研究的热点。雌性小鼠切除双侧卵巢动物模型的建立已成为标准化,为学术界公认的模拟妇女绝经后由于雌激素缺乏而引起的原发性骨质疏松症^[3]。本实验切除小鼠双侧卵巢后引起小鼠体重增加,检测血清中雌激素含量下降,可以确定本实验骨质疏松模型成功建立^[4]。

咖啡酸苯乙酯是蜂胶中一种单体活性物质,许

多学者通过动物实验及临床实验已证实 CAPE 具有清除体内自由基,抑制体内 5-脂加氧酶催化的花生四烯酸与亚油酸的氧化反应阻断人嗜中性粒细胞氧化产物的形成;对多种瘤细胞有较显著的细胞毒作用;还有抗炎、调节免疫功能等广泛的生物学作用。但是关于 CAPE 对骨质疏松方面的研究甚少,本研究通过生物力学、骨密度测定方法科学的评价 CAPE 对骨质疏松的作用。研究结果显示:(1)骨密度:双能 X 线骨密度测量仪是以 X 线球管发射的 X 线作为放射源,检查 BMD 通常以脊柱及股骨颈、股骨粗隆等部位的测定结果为诊断依据,是目前测定人体 BMD 最有效的方法^[5]。本研究中预防部分 4 周 ovx 组的骨密度值较 sham 组、ovx0.5 mg 组及 ovx1 mg 组降低 ($P < 0.05$)。说明小鼠在切除卵巢后骨质含量丢失加速,使用咖啡酸苯乙酯后可以提高小鼠脊椎骨质含量,即这种药物可预防和治疗切除卵巢引起的骨质含量丢失。(2)生物力学:对于骨质疏松来说我们最关心的是骨骼的强度,骨生物力学检测是将经典力学与骨科学相结合,直接反映防治骨质疏松药物对骨组织结构的力学效应,是研制和开发防治骨质疏松新药的一个重要检验手段^[6]。本实验结果显示,预防部分 1、4 周与治疗部分 7 周 ovx 组较 sham 组、ovx0.5 mg 组、ovx1 mg 组骨的最大破坏应力指标变化较显著 ($P < 0.05$)。综上所述,本实验中咖啡酸苯乙酯能促进去卵巢小鼠骨结构再建,使骨密度增加外,还能增强骨的力学性能。因此,在预防和治疗骨质疏松的角度看,早期使用咖啡酸苯乙酯可预防和治疗骨质疏松症,而当骨的力学性能发生改变时可能为时已晚。

【参考文献】

- [1] 王澍寰,荣国威,田伟.实用骨科学.北京:人民卫生出版社,2008:226-227.
- [2] Ang ES, Pavlos NJ, Chai LY, et al. Caffeic acid phenethyl ester, an active component of honeybee propolis attenuates osteoclastogenesis and bone resorption via the suppression of RANKL-induced NF- κ B and NFAT activity. J Cell Physiol, 2009, 221(3):642-649.
- [3] 张月峰,韩景献.骨质疏松动物模型研究进展.动物医学进展,2005,26(3):8-11.
- [4] 谢肇,李起鸿,孟萍,等.去卵巢大鼠骨质疏松模型的特点.中国临床康复,2006,10(28):79-81.
- [5] 赵光,杨艳萍,沈霖.替勃龙对绝经后骨质疏松症患者骨密度及骨代谢指标的影响.中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2012,5(1):20-24.
- [6] 秦岭,梁国穗.骨生物力学在防治骨质疏松药物开发中的应用基础(二).中国骨质疏松杂志,2000,6(2):73-78.

(收稿日期:2012-12-10)

咖啡酸苯乙酯对雌性骨质疏松小鼠的实验研究

作者: [秦迎泽](#), [向川](#), [段王平](#), [李琦](#), [卫小春](#)
作者单位: [山西医科大学第二临床医学院, 太原, 030001](#)
刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)
年, 卷(期): 2013, 19(3)

参考文献(6条)

1. [王澍寰;荣国威;田伟](#) [实用骨科学](#) 2008
2. [Ang ES;Pavlos N J;Chai LY](#) [Caffeic acid phenethyl ester,an active component of honeybee propolis attenuates osteoclastogenesis and bone resorption via the suppression of RANKL-induced NF-kappaB and NFAT activity](#) 2009(03)
3. [张月峰;韩景献](#) [骨质疏松动物模型研究进展](#) 2005(03)
4. [谢肇;李起鸿;孟萍](#) [去卵巢大鼠骨质疏松模型的特点](#) 2006(28)
5. [赵光;杨艳萍;沈霖](#) [替勃龙对绝经后骨质疏松症患者骨密度及骨代谢指标的影响](#) 2012(01)
6. [秦岭;梁国穗](#) [骨生物力学在防治骨质疏松药物开发中的应用基础\(二\)](#) 2000(02)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201303015.aspx