

· 论 著 ·

茜草对大鼠股骨显微结构的影响

吴晨晨 杨小雯 王文龙 王姗姗 曹丹丹 马烽 王建国 路浩 赵宝玉*

西北农林科技大学动物医学院, 中国陕西省杨陵示范区 712100

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 06-0658-04

摘要: **目的** 茜草对骨骼具有红染的效果, 探索茜草如何影响骨骼的显微结构, 是否饲喂茜草对大鼠的内脏器官具有显著的毒害作用。 **方法** 本试验选取 80 只 1 月龄大鼠, 随机分为 4 组(分别添加茜草量为 0%、5%、10% 和 15% 入日粮中), 饲喂后 0.5、1、3 和 6 个月, 采取双侧股骨、内脏和血液。 **结果** 饲喂茜草 6 个月后, 10% 和 15% 组大鼠股骨骨干的平均厚度、骨干内径、骨干外径、骨髓腔面积、皮质骨面积、骨干总面积和股骨骨干的骨矿物质密度显著高于 0% 组大鼠; 股骨远端骨小梁体积百分比, 骨小梁厚度, 连接密度, 骨小梁数量和股骨远端的骨矿物质密度的水平均显著高于 0% 组大鼠, 而股骨远端的骨小梁分离度和结构模型指数显著低于 0% 组大鼠。但是饲喂茜草 6 个月后, 15% 组的大鼠血液中尿素氮和肌酐的含量与 0% 组大鼠之间差异显著。 **结论** 饲喂 10% 茜草对大鼠无毒性影响, 并能促进大鼠的骨骼长度和骨的显微结构, 为以后茜草的合理应用提供了实验基础。

关键词: 茜草; 大鼠; 骨显微结构; 股骨

Effect of madder on bone micro-structure in rats

WU Chenchen, YANG Xiaowen, WANG Wenlong, WANG Shanshan, CAO Dandan, MA Feng, WANG Jianguo, LU Hao, ZHAO Baoyu

College of Veterinary Medicine, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China

Corresponding author: ZHAO Baoyu, Email: zhaobaoyu12005@163.com

Abstract: **Objective** Bone could be stained with red color by madder. However, whether feeding with the madder has significantly toxicity in animals was still unknown. This study was designed to explore this question. **Methods** Eighty 1-month rats were selected in this study, and then randomly divided into 6 groups (0%, 5%, 10%, or 15% madder added in diet). After 0.5-, 1-, 3-, and 6-month feeding, all the rats were executed. And the bilateral femur, the internal organs, and the blood were collected. **Results** The results showed that the mean thickness, the inner diameter, the external diameter, the marrow cavity area, the cortical bone area, the total area, and the bone mineral density of the femur diaphysis in 10% group and 15% group increased significantly compared with those in 0% group. The trabecular bone volume, the trabecular thickness, the connectivity density, the trabecular number, and the bone mineral density of the distal femur in 10% group were higher than those in 0% group. The trabecular separation and the structure model index of the distal femur in 10% group were lower than those in 0% group. However, after 6-month feeding, the blood levels of urea nitrogen and creatinine in 15% group were significantly different with that in 0% group. **Conclusion** There is no toxicity of 10% madder in the diet for rats. Madder can improve the length of the femur and the bone micro-structure, which provides the experimental basis for the reasonable application of madder.

Key words: Madder; Rat; Bone micro-structure; Femur

茜草是野生植物, 动物饲喂茜草后, 生长的骨骼被染成特殊的颜色^[1]。茜草根中含有的蒽醌类物质具有许多不同的生物学活性, 例如: 抗氧化剂、抗微生物、抗真菌、细胞毒性、杀灭寄生虫幼虫和抗病

毒性^[2]。茜草也作为中草药, 可以用来治疗黄疸、坐骨神经痛和瘫痪^[3]。茜草素红可以在体外抑制 HIV-1 蛋白酶, 并且在体内也表现出很多优点^[4]。其实, 茜草最重要的作用就是作为天然的植物染料。茜草主要含有茜草素、红紫素和伪羟基茜草素, 这些染料可以有效的结合骨中的钙离子^[5]。然而, 采食茜草对骨的生长的影响众说纷纭。有的

基金项目: 国家自然科学基金 - 青年项目 (31302153); 校博士启动金 (Z111021305)

* 通讯作者: 赵宝玉 (zhaobaoyu12005@163.com)

认为茜草可能延迟鼠牙齿和骨的生长^[6],或者是短暂停止骨的生长。狗饲喂茜草素的剂量超过 40 mg/kg,抑制骨的形成,饲喂同等剂量的茜草素红 S 也有类似的作用^[7]。高剂量的茜草,可使血压快速降低,心率增加并发呼吸困难^[8]。为进一步验证茜草对骨显微结构的影响,因此本实验在大鼠日粮中添加不同剂量的茜草,并在饲喂茜草后第 0.5、1、3 和 6 个月观测大鼠的股骨显微结构。通过研究这一系列的变化,旨在为临床进一步研究茜草对骨骼生长发育的影响奠定试验基础,为以后茜草的合理应用提供了实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物和样品的采集

1 月龄 80 只大鼠购自西安交通大学实验动物中心。分成 4 组,每组 20 只大鼠,日粮中分别添加 0%、5%、10% 和 15% 茜草根部分末,制成颗粒日粮,其营养成分符合大鼠日粮标准。饲喂茜草后 0.5、1、3 和 6 个月,每个时间点每组屠宰 5 只大鼠。应用乙醚麻醉,采取大鼠的双侧股骨和血液。

1.2 骨显微结构计算机 X 射线断层扫描

所获得的股骨样品均经过台式显微-CT 系统进行扫描 (eXplore Locus SP, GE Healthcare, USA)。Micro-CT 扫描参数包括股骨远端骨小梁的体积比值 (BV/TV)、平均骨小梁厚度 (Tb. Th)、骨小梁分

离度 (Tb. Sp)、(Tb. N)、结构模型指数 (SMI)、骨小梁的结构模型指数 (Conn. D) 和股骨远端矿物质密度 (DF-BMD);股骨骨干的平均厚度、骨干内径、外径、骨髓腔面积、皮质骨面积、骨干总面积和股骨骨干矿物质密度 (FD-BMD)。

1.3 大鼠血液生化指标的检测

肝素钠抗凝血液,经离心后获得血浆用来检测生化指标。所检测指标包括:肌酸激酶 (CK),肌酸激酶 MB 同工酶 (CK-MB),天冬氨酸转移酶 (AST),丙氨酸氨基转移酶 (ALT),血尿素氮 (BUN),肌酸酐 (CRE),胰淀粉酶 (AMY) 和葡萄糖 (GLU) 用全自动生化分析仪检测。

1.4 统计学处理

结果用 SPSS13.0 软件进行统计分析,组间差异显著性用 Indepent-sample test 统计分析。所有数据的标注均为平均值 (Mean values) ± 标准差 (Standard deviation (SD)),差异显著设为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 血液生化指标的检测

表 1 显示,饲喂茜草后 6 个月,0%、5% 和 10% 组大鼠血液中 CK,CK-MB,AST,ALT, BUN, CRE,AMY 和 GLU 水平差异不显著 ($P > 0.05$)。然而,饲喂茜草后 6 个月,15% 组大鼠血液中的 BUN 和 CRE 的水平显著高于 0% 组大鼠。

表 1 各组大鼠饲喂茜草后血液生化指标的检测结果

Table 1 Detection results of the serum levels of biochemical indexes in different groups								
组别	CK (U/L)	CK-MB (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	BUN (mmol/L)	CRE (umol/L)	AMY (IU/L)	GLU (mmol/L)
5% group	228.23 ± 26.57	227.28 ± 19.37	82.29 ± 5.17	31.56 ± 2.47	10.71 ± 1.33	21.34 ± 1.33	189.66 ± 20.78	9.21 ± 0.53
10% group	236.56 ± 29.37	236.77 ± 16.57	82.40 ± 5.47	31.24 ± 3.17	11.52 ± 1.44	22.38 ± 1.44	191.13 ± 21.55	9.32 ± 0.44
15% group	241.33 ± 21.82	243.55 ± 20.83	83.19 ± 5.67	32.17 ± 3.45	16.26 ± 1.17*	26.66 ± 1.17*	198.64 ± 20.46	9.66 ± 0.47
0% group	234.23 ± 21.57	245.69 ± 12.34	83.24 ± 5.99	31.45 ± 2.66	10.79 ± 1.24	21.02 ± 1.54	196.88 ± 21.33	9.51 ± 0.54

注:数据表示成平均数 ± 标准差;与 0% 相比较,* $P < 0.05$ 表示差异显著
Data are expressed as the means ± SD; * $P < 0.05$ versus the 0% group

2.2 大鼠股骨远端和股骨骨干的三维重建及其参数

表 2 显示,饲喂茜草 0.5、1 和 3 个月后,10% 组大鼠的股骨骨干的平均厚度、骨干内径、骨干外径、骨髓腔面积、皮质骨面积、骨干总面积和 FD-BMD 与 0% 组大鼠之间没有显著的差异 ($P > 0.05$);饲喂茜草 6 个月后,10% 组大鼠的股骨骨干的平均厚度、骨干内径、骨干外径、骨髓腔面积、皮质骨面积、骨干总面积和 FD-BMD 显著高于 0% 组大

鼠 ($P < 0.05$)。
表 3 显示,饲喂茜草 0.5 和 1 个月后,10% 组大鼠的股骨远端 BV/TV, Tb. Th, Conn. D, Tb. N, Tb. Sp, SMI 和 DF-BMD 的水平与 0% 组大鼠之间没有显著的差异 ($P > 0.05$);饲喂茜草 3 和 6 个月后,10% 组大鼠的股骨远端 BV/TV, Tb. Th, Conn. D, Tb. N 和 DF-BMD 的水平均显著高于 0% 组大鼠,而股骨远端的 Tb. Sp 和 SMI 显著低于 0% 组大鼠 ($P < 0.05$)。

表 2 大鼠饲喂茜草后各阶段股骨干显微结构的变化

Table 2 The changes of the bone micro-structure of the femoral diaphyseal in rats after feeding with madder

饲喂时间	组别	Mean Thickness (mm)	Inner Perimeter (mm)	Outer Perimeter (mm)	Marrow Area (mm ²)	Cortical Area (mm ²)	Total Area (mm ²)	FD BMD (mg/cm ³)
0.5 month	0% group	0.131 ± 0.01	5.34 ± 0.98	6.12 ± 1.12	1.21 ± 0.55	0.87 ± 0.22	3.13 ± 0.31	735.8 ± 41.1
	10% group	0.133 ± 0.01	5.31 ± 0.96	6.11 ± 1.08	1.23 ± 0.54	0.89 ± 0.23	3.20 ± 0.34	741.1 ± 42.0
1 month	0% group	0.251 ± 0.01	6.65 ± 1.0	8.34 ± 1.54	3.43 ± 0.67	1.90 ± 0.36	5.34 ± 0.64	825.7 ± 81.1
	10% group	0.259 ± 0.01	6.73 ± 0.88	8.41 ± 1.33	3.47 ± 0.65	1.95 ± 0.34	5.36 ± 0.55	824.6 ± 79.3
3 month	0% group	0.344 ± 0.03	6.83 ± 1.22	10.22 ± 1.34	3.84 ± 0.93	3.26 ± 1.00	7.05 ± 1.3	1098.1 ± 88.2
	10% group	0.371 ± 0.02	7.52 ± 1.12	10.32 ± 1.56	4.23 ± 0.91	3.39 ± 0.94	7.08 ± 1.4	1126.3 ± 87.5
6 month	0% group	0.385 ± 0.01	7.51 ± 1.22	10.87 ± 1.71	4.04 ± 0.94	3.77 ± 0.97	7.12 ± 1.31	1158 ± 99.5
	10% group	0.444 ± 0.02 *	8.49 ± 1.34 *	13.95 ± 1.87 *	4.68 ± 0.97 *	4.54 ± 0.92 *	7.91 ± 1.13 *	1268.6 ± 101 *

注:数据表示成平均数 ± 标准差;与 0% 相比较, * *P* < 0.05 表示差异显著
Data are expressed as the means ± SD; * *P* < 0.05 versus the 0% group

表 3 大鼠饲喂茜草后各阶段股骨远端显微结构的变化

Table 3 The changes of the bone micro-structure of the distal femur in rats after feeding with madder

饲喂时间	组别	BV/TV (%)	Tb. Th (mm)	Conn. D (/mm ³)	Tb. N (/mm)	Tb. Sp (mm)	SMI	DF BMD (mg/cc)
0.5 month	0% group	0.771 ± 0.11	0.033 ± 0.002	12.1 ± 1.21	1.99 ± 0.65	0.44 ± 0.013	3.03 ± 0.87	143.1 ± 21.6
	10% group	0.761 ± 0.12	0.032 ± 0.003	12.8 ± 1.33	1.94 ± 0.61	0.45 ± 0.014	3.05 ± 0.90	144.7 ± 22.8
1 month	0% group	0.891 ± 0.14	0.059 ± 0.005	17.47 ± 1.33	2.56 ± 0.71	0.361 ± 0.023	2.21 ± 0.93	160.1 ± 33.8
	10% group	0.86 ± 0.15	0.057 ± 0.004	17.9 ± 1.28	2.66 ± 0.78	0.347 ± 0.03	2.264 ± 0.89	159.87 ± 34.2
3 month	0% group	2.88 ± 0.3	0.097 ± 0.007	31.55 ± 6.5	3.07 ± 0.89	0.287 ± 0.01	1.83 ± 0.74	246.7 ± 57.4
	10% group	4.37 ± 1.5 *	0.128 ± 0.01 *	30.297 ± 6.4 *	3.85 ± 0.86 *	0.200 ± 0.011 *	1.42 ± 0.76 *	262.85 ± 56.8 *
6 month	0% group	6.29 ± 1.5	0.13 ± 0.01	34.97 ± 6.7	3.72 ± 0.94	0.186 ± 0.005	1.12 ± 0.08	255.95 ± 66.2
	10% group	16.76 ± 4.3 *	0.20 ± 0.02 *	43.60 ± 8.5 *	4.19 ± 0.94 *	0.127 ± 0.005 *	0.988 ± 0.07 *	322.51 ± 65.2 *

注:数据表示成平均数 ± 标准差;与 0% 相比较, * *P* < 0.05 表示差异显著
Data are expressed as the means ± SD; * *P* < 0.05 versus the 0% group

3 讨论

多年前就已经知道,动物采食茜草的根部,动物的骨骼变为红色,这主要是因为茜草中含有很多染料^[9]。正常范围内饲喂茜草,对其动物是安全的,无毒害作用,并且在一定剂量中,是不会抑制动物的生长。然而,长时间饲喂高剂量的茜草会导致一些毒副作用。先前研究指出注射茜素红 S 会停止或延缓骨骼的生长的报道^[10]。因此,目前有关茜草对骨骼的生长和体重的影响模糊不清。本实验饲喂茜草 6 个月后,除 15% 组大鼠血浆尿素氮和肌酐浓度增加外,其他各组大鼠眼观和病理组织学未见异常。表明长期食用含有适量(≤10%)茜草的日粮可促进骨骼的生长,对大鼠的健康没有伤害;而长期饲喂大剂量的茜草(≥15%)则有可能造成大鼠肾脏的损伤,因此,在本次试验中我们主要选取了 10% 组大鼠为研究对象与 0% 组大鼠进行骨骼显微结构的比较。

骨骼显微 CT 扫描的数据中,我们发现饲喂茜草 0.5、1、3 和 6 个月后,0%,和 10% 组大鼠的股骨

远端的骨小梁的类似“棒状”和“杆状”的结构和数量逐渐增多,并且股骨骨干的内径,外径和厚度也随着月龄的增加而增加。饲喂茜草 3 个月后,10% 组大鼠的股骨远端的显微结构开始好于 0% 组大鼠;饲喂茜草 6 月后,10% 组大鼠的股骨骨干的显微结构好于 0% 组大鼠。由此得出,随着饲喂茜草的时间延长,大鼠的股骨远端和骨干的显微结构均要好于对照组。

在骨组织中皮质骨占了骨量的 80%,松质骨的骨量丢失 50% 时,测得值才显示 10%,单纯测量骨量并不能很好地反映骨量丢失^[11]。骨组织结构主要包括皮质骨厚度及其内孔隙的密度,松质骨的形状、厚度、连接性及各向异性程度即骨微结构,其中以骨微结构最为重要,它是骨脆性的决定因素,独立于骨密度而起作用^[12]。骨小梁厚度是指骨小梁的平均厚度,发生骨质疏松时,骨小梁厚度减少;骨小梁分离度是指骨小梁之间的髓腔平均宽度,如骨小梁分离度增加,提示骨吸收增加,可能发生骨质疏松;结构模型指数是通过计算骨骼表面的曲率来描述骨小梁板状和杆状的程度,发生骨质疏松时,骨小

梁从板状向杆状转变,结构模型指数增加。在本试验中,饲喂茜草 3 和 6 个月后,10% 组大鼠的 股骨远端骨小梁体积百分比,骨小梁厚度,连接密度,骨小梁数量和股骨远端的骨矿物质密度的水平均显著高于 0% 组大鼠,而股骨远端的骨小梁分离度和结构模型指数显著低于 0% 组大鼠。

据此可知,饲喂≤10% 的茜草,能增加大鼠的体重,6 个月内不会对大鼠健康造成损害;饲喂≥15% 茜草则有可能损伤大鼠的肾脏。饲喂 10% 的茜草,增加大鼠股骨的长度,增强股骨远端和股骨骨干的显微结构。

【 参 考 文 献 】

[1] Hammond RH, Prof E Storey. Experiments and observations on the growth of bones [J]. Experiments and observations on the growth of bones, 1969, 4(1):291-304.

[2] Nakanishi F, Nagasawa Y, Kabaya Y, et al. Characterization of lucidin formation in Rubia tinctorum L [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, 43(10): 921-928.

[3] Dioscoride, Gunther RWT, Goodyer J. The Greek Herbal of Dioscorides: Illustrated by a Byzantine, AD 512 [M]. Hafner Publishing Company, 1968.

[4] Brinkworth RI, Fairlie DP. Hydroxyquinones are competitive non-peptide inhibitors of HIV-1 proteinase [J]. Biochimica et

Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1995, 1253(1): 5-8.

[5] Paff GH, Eksterowicz FC. The selective stoppage of bone growth in tissue culture [J]. The Anatomical Record, 1950, 108(1): 45-55.

[6] Schour I. Measurements of Bone Growth by Alizarine Injections [J]. Experimental Biology and Medicine, 1936, 34(2): 140.

[7] William HH, Dorothy FT, Ulf F, et al. The in vivo inhibition of bone formation by alizarin red S [J]. The Journal of Bone and Joint Surgery (American), 1964, 46(3): 493-508.

[8] Richter D. Vital staining of bones with madder [J]. Biochemical Journal, 1937, 31(4): 591.

[9] Schour I, Hoffman MM, Sarnat BG, et al. Vital Staining of Growing Bones and Teeth With Alizarine Red S [J]. Journal of Dental Research, 1941, 20(5): 411-418.

[10] Inoue K, Yoshida M, Takahashi M, et al. Carcinogenic potential of alizarin and rubiadin, components of madder color, in a rat medium-term multi-organ bioassay [J]. Cancer Science, 2009, 100(12): 2261-2267.

[11] Hernandez CJ, Keaveny TM. A biomechanical perspective on bone quality [J]. Bone, 2006, 39:1173-1181.

[12] Dalle Carbonare L, Giannini S. Bone microarchitecture as an important dererminant of bone strength [J]. J Endocrinol Invest, 2004, 27: 99-105.

(收稿日期: 2013-08-29,修回日期:2013-10-17)

(上接第 617 页)

[2] Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, et al. Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone micro architecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study. J Bone Miner Res,2001, 16(10):1846-1853.

[3] Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, et al. Growth of factor regulation of fracture repair. J Bone Miner Res,1999,14(11):1805-1815.

[4] Simmons DJ. Fracture healing perspectives. Clin Orthop Relat of Res, 1985,200:100-113.

[5] Ming N, Cheng JT, Rui YF, et al. Dose-dependent enhancement of spinal fusion in rats with teriparatide (PTH[1-34]). Spine, 2012,37(15):1275-1282.

[6] Van der Horst G, Farih-Sips H, Löwik CW, et al. Multiple mechanisms are involved in inhibition of osteoblast differentiation by PTHrP and PTH in KS483 Cells. J Bone Miner Res, 2005, 20(12): 2233-2244.

[7] Robling AG, Kedlaya R, Ellis SN, et al. Anabolic and catabolic regimens of human parathyroid hormone 1-34 elicit bone- and envelope-specific attenuation of skeletal effects in Sost-deficient mice. Endocrinology,2011,152(8): 2963-2975.

[8] Kim SW, Pajevic PD, Selig M, et al. Intermittent parathyroid hormone administration converts quiescent lining cells to active osteoblasts. J Bone Miner Res, 2012, 27(10):2075-2084.

[9] Gafni RI, Brahim JS, Andreopoulou P, et al. Daily parathyroid hormone 1-34 replacement therapy for hypoparathyroidism induces marked changes in bone turnover and structure. J Bone Miner Res, 2012, 27(8): 1811-1120.

[10] Aspenberg P, Genant HK, Johansson T, et al. Teriparatide for acceleration of fracture repair in humans: a prospective, randomized, double-blind study of 102 postmenopausal women with distal radial fractures. J Bone Miner Res, 2010, 25(2): 404-414.

[11] Nakazawa T, Nakajima A, Shiomi K, et al. Effects of low-dose, intermittent treatment with recombinant human parathyroid hormone (1-34) on chondrogenesis in a model of experimental fracture healing. Bone, 2005, 37(5):711-719.

[12] Kakar S, Einhorn TA, Vora S, et al. Enhanced chondrogenesis and Wnt signaling in PTH-treated fractures. J Bone Miner Res, 2007, 22(12):1903-1912.

(收稿日期: 2013-07-09,修回日期:2013-09-23)

茜草对大鼠股骨显微结构的影响

作者：

[吴晨晨](#)，[杨小雯](#)，[王文龙](#)，[王姗姗](#)，[曹丹丹](#)，[马烽](#)，[王建国](#)，[路浩](#)，[赵宝玉](#)，[WU Chencheng](#)，[YANG Xiaowen](#)，[WANG Wenlong](#)，[WANG Shanshan](#)，[CAO Dandan](#)，[MA Feng](#)，[WANG Jianguo](#)，[LU Hao](#)，[ZHAO Baoyu](#)

作者单位：

[西北农林科技大学动物医学院, 中国陕西省杨陵示范区, 712100](#)

刊名：

[中国骨质疏松杂志](#) 

英文刊名：

[Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年，卷(期)：

2014(6)

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201406016.aspx