

• 药物研究 •

银杏叶提取物不同给药方式对骨质疏松大鼠成骨的影响

张慧彦¹ 秦娇娇¹ 齐晓爽¹ 姜雪¹ 张叶² 陈一文¹ 吴哲^{1,3*}

1. 吉林大学口腔医院, 长春 130021

2. 吉林大学护理学院, 长春 130021

3. 广州医科大学口腔医院, 广州 51050

中图分类号: R336 R977 R285 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 09-1154-05

摘要: 目的 探讨银杏叶提取物(Ginkgo Biloba Extract, GBE)不同体内给药方式对骨质疏松(Osteoporosis, OP)大鼠成骨的影响。方法 构建去势大鼠骨质疏松模型(osteoporosis in ovariectomized rats, OVX) 64只和糖皮质激素性骨质疏松大鼠模型(Glucocorticoid-induced osteoporosis in rats, GIOP) 64只。并将两组骨质疏松大鼠用随机数字表法分为3组不同浓度灌胃给药(100 mg/(kg·d)、200 mg/(kg·d)、400 mg/(kg·d)和3组注射给药(3.5 mg/(kg·d)、4.0 mg/(kg·d)、4.5 mg/(kg·d)),设立模型对照组2组、空白对照组1组(每组8只)。采用ELISA染色法检测血清骨钙素(OC)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP),观察股骨横切HE染色病理改变。结果 与对照组相比,两组大鼠构建2个月后,OC、TRAP水平检测,大鼠股骨远端横断观察,符合骨质疏松改变。两组骨质疏松模型通过不同方式和浓度的给药后,与不给药对照组相比,OC水平上升($P < 0.01$),TRAP水平下降($P < 0.05$)。组织学观察可见,两组大鼠给药后均有不同程度新生骨小梁形成,骨小梁排列整齐,有不同程度的变粗,数量增多。结论 GBE灌胃给药与腹腔注射给药对骨质疏松大鼠的成骨均有促进作用,促进成骨细胞分泌OC,抑制破骨细胞的分泌TRAP,可以促进骨小梁的形成,增强骨的致密度,作用效果与给药方式和剂量有直接关系。

关键词: 银杏叶提取物;成骨作用;骨质疏松

Effect of ginkgo biloba extract on osteogenesis by different administration routes in osteoporosis ratsZHANG Huiyan¹, QIN Jiaojiao¹, QI Xiaoshuang¹, JIANG Xue¹, ZHANG Ye², CHEN Yiwen¹, WU Zhe^{1,3}

1. School of Stomatology

2. School of Nursing, Jilin University, Jilin 130021, Changchun

3. Stomatology Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 51050, Guangdong, China

Corresponding author: WU Zhe, Email: 1378725107@qq.com

Abstract: **Objective** To explore the effect of ginkgo biloba extract (GBE) on osteogenesis in osteoporosis (OP) rats by different administration routes. **Methods** Two groups of osteoporosis models were developed by ovariectomy (OVX) and glucocorticoid-induced (GIOP) method (64 rats in each group). The rats were divided by random number table into 3 concentration groups (100 mg/kg/d, 200 mg/kg/d, and 400 mg/kg/d) by intragastric administration, and 3 concentration groups by injection (3.5 mg/kg/d, 4.0 mg/kg/d, and 4.5 mg/kg/d). Two model control groups and a blank control group (8 rats in each group) were established. Serum levels of OC and TRAP were detected using ELISA method. Bone slices were HE-stained and observed. **Results** Compared with the control groups, the osteoporosis rat model was constructed in 2 months, according to the results of OC and TRAP levels and cross-sectional observation of the distal femur in rats. After administration in different ways and concentrations, OC level increased ($P < 0.01$) but TRAP level decreased ($P < 0.05$) in two osteoporotic model groups comparing with those in model groups. Histological observation showed that new trabecular bone formed, neatly arranged, thickened, and the

基金项目: 大学生创新创业训练计划(2014A78337); 吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目基金(吉教科合字[2015]第530号)

* 通讯作者: 吴哲, Email: 1378725107@qq.com

张慧彦、张叶为共同第一作者

number increased in 2 groups after drug administration. **Conclusion** GBE promotes bone formation in osteoporotic rats in both intragastric administration and intraperitoneal injection. It promotes OC secretion by osteoblasts and inhibits TRAP secretion by osteoclasts. It promotes the formation of trabecular bone and increases bone mineral density. The effect is directly related to the route of administration and dosage.

Key words: Ginkgo biloba extract; Osteogenesis; Osteoporosis

骨质疏松是以骨量减少、骨的微观结构退化为特征,致使骨的脆性增加,导致骨折发生的一种全身骨骼疾病^[1]。目前骨质疏松的发病率正在逐年增高,其中妇女绝经后骨质疏松和临床用药导致的糖皮质激素性骨质疏松^[2-3]占据了大部分症候群。骨质疏松症的一个重要病因是成骨细胞和破骨细胞之间的动态平衡被打破,成骨细胞分化减少,破骨细胞分化增加,骨吸收超过骨形成所导致的^[4]。本课题前期实验证明了银杏叶提取物可以促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,抑制骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化^[5-6],但有关银杏叶提取物体内给药对于骨质疏松成骨影响的研究未见报导。本课题旨在探讨灌胃和腹腔给药两种方式对骨质疏松大鼠成骨的影响,为临床提供理论支持。

1 材料与方法:

1.1 动物、主要试剂和仪器:健康 3 个月龄 SD 大鼠 152 只,雌性,平均体质量(280 ± 20) g,由大连医科大学动物实验中心提供,实验动物许可证号:SZXK(辽)2013-0003。国际通用银杏叶标准品(恒凯银杏制品有限公司,中国)。地塞米松磷酸钠(天津药业集团新郑股份有限公司),大鼠骨钙素(OC) ELISA 检测试剂盒[卡迈舒(上海)生物科技有限公司],大鼠抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP) ELISA 检测试剂盒[卡迈舒(上海)生物科技有限公司]。酶标仪(Bio-TEK,美国),低温高速离心机(Eppendorf,德国)。

1.2 构建骨质疏松大鼠模型

1.2.1 OVX 的建立:3 个月龄雌性 SD 大鼠^[7] 64 只,10%水合氯醛麻醉,双侧摘除卵巢。采用腹部正中切口,逐层切开组织,结扎双侧卵巢后切除。假手术组大鼠 8 只,同样方式切除卵巢附近相同大小脂肪组织,缝合并用青霉素 8 万单位/(只·d)消炎 3 d,对照组 8 只不做处理。给予正常饮食 8 周。心脏取血,处死去势组、假手术组和对照组各 8 只大鼠,检测血清 TRAP 和 OC 水平的变化,取股骨固定、脱钙、包埋、石蜡切片、HE 染色,观察其病理形态学改变,以确定模型的成功建立。

1.2.2 GIOP 的建立:3 个月龄雌性 SD 大鼠 64 只,每周两次肌肉注射地塞米松磷酸钠($1\text{ mg/kg}\cdot\text{次}$)持续 8 周。模型对照组大鼠 8 只,每周两次肌肉注射等剂量生理盐水。心脏取血,处死模型组和模型对照组各 8 只大鼠,检测血清 TRAP 和 OC 水平的变化,取股骨固定、脱钙、包埋、石蜡切片、HE 染色,观察其病理形态学改变,以确定模型的成功建立。

1.3 对 OVX 进行不同方式体内给药

将 OVX 用随机数字表法分为给药组 6 组(每组 8 只)和对照组 1 组(8 只)。将银杏叶提取物溶解于生理盐水中(50 g/l),取 3 组用灌胃针分别进行 GBE 给药 $100\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, $200\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, $400\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,连续给药 30 d,给药剂量参考于 Lian Wang 的相关研究^[8];将银杏叶提取物溶解于生理盐水中(2 g/l),取 3 组分别进行不同浓度 $3.5\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, $4.0\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, $4.5\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 腹腔注射给药 42 d(隔天注射),对照组不给药。心脏取血,处死全部大鼠,检测血清 TRAP 和 OC 水平的变化,取股骨固定、脱钙、包埋、石蜡切片、HE 染色,观察其病理形态学改变。

1.4 对 GIOP 进行不同方式体内给药

将 GIOP 用随机数字表法分为给药组 6 组(每组 8 只)和对照组 1 组(8 只)。将银杏叶提取物溶解于生理盐水中(50 g/l),取 3 组用灌胃针分别进行 GBE 给药 $100\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, $200\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, $400\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,连续给药 30 d;将银杏叶提取物溶解于生理盐水中(2 g/l),取 3 组分别进行不同浓度 $3.5\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, $4.0\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, $4.5\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 腹腔注射给药 42 d,对照组不给药。心脏取血,处死全部大鼠,检测血清 TRAP 和 OC 水平的变化,取股骨固定、脱钙、包埋、石蜡切片、HE 染色,观察其病理形态学改变。

1.5 统计学处理

采用 SPSS19.0 进行数据处理。结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用独立样本 T 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 OP 的建立

2.1.1 去势 8 周后大鼠骨代谢指标的改变: 去势 8 周后, 去势组 OC 水平明显低于对照组 ($P < 0.01$), TRAP 水平明显高于对照组 ($P < 0.01$)。对照组和假手术组两种指标均无明显差异, 见表 1。

表 1 各组大鼠骨代谢指标的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The changes of bone metabolism indexes of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	骨钙素 (pg/ml)	抗酒石酸酸性磷酸酶 (mIU/ml)
空白对照组	8	391.61 ± 17.79	0.981 ± 0.083
去势模型组	8	211.50 ± 8.35*	1.857 ± 0.143*
去势对照组	8	382.85 ± 8.35	1.082 ± 0.128
糖皮质激素模型组	8	271.36 ± 10.23*	1.652 ± 0.085*
糖皮质激素对照组	8	398.23 ± 18.04	1.000 ± 0.092

注: 与空白组相比, * $P < 0.01$

2.1.2 去势 8 周后大鼠股骨病理形态的改变: 去势 8 周后, 去势组大鼠股骨远端横断骨小梁排列散乱, 骨小梁数量较少、变细、断裂、骨小梁距离增宽, 成骨细胞明显减少, 符合骨质疏松病理改变。而空白对照组和假手术组没有这些改变。见图 1。

2.1.3 给予地塞米松 8 周后大鼠骨代谢指标的改变: 地塞米松肌注 8 周后, 去势组 OC 水平明显低于对照组 ($P < 0.01$), TRAP 水平明显高于对照组 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.1.4 地塞米松处理 8 周后大鼠股骨病理形态的改变: 给予地塞米松 8 周后, 大鼠股骨远端横断骨小梁排列散乱, 骨小梁数量较少、变细、断裂、骨小梁距离增宽, 符合骨质疏松病理改变。模型对照组没有这些改变。见图 1。

2.2 银杏叶提取物灌胃和腹腔注射给药对骨质疏松大鼠成骨的影响

2.2.1.1 银杏叶提取物不同给药方式对 OVX 骨代谢指标的影响: 灌胃给药与腹腔注射给药对于 OVX 都有治疗效果, 且效果与给药浓度有关。在两种方

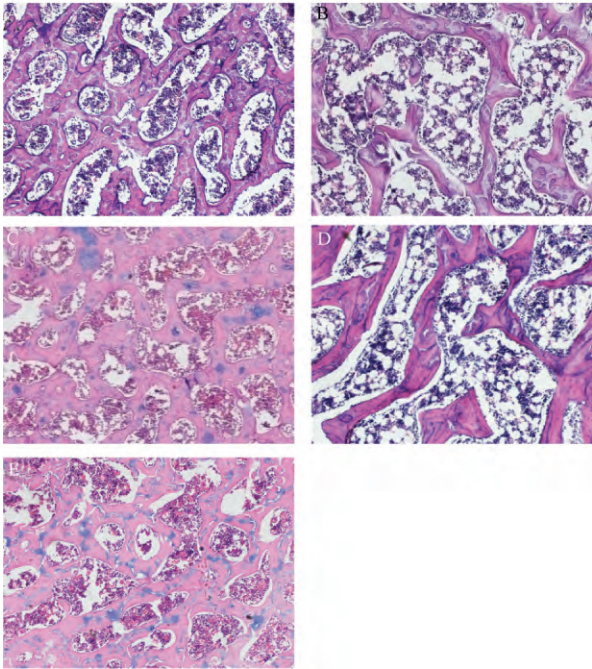


图 1 各组大鼠股骨病理改变 (HE 染色, $\times 40$)。A: 空白对照组; B: 去势组; C: 假手术组; D: 糖皮质激素组; E: 糖皮质激素对照组

Fig.1 Pathological changes of the femur of rats in each group (HE staining, $\times 40$). A: Blank control; B: OVX group; C: SHAM group; D: GIOP group; E: Glucocorticoid control group.

式不同浓度给药, 大鼠血清骨钙素 (OC) 水平均有升高 ($P < 0.01$), 抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 水平均有降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.2.1.2 银杏叶提取物不同给药方式对 OVX 骨组织病理形态的影响: 不同浓度灌胃给药和腹腔注射给药对于 OVX 的成骨均有促进作用, 均有不同程度的新生骨小梁形成, 骨小梁增多, 变宽。灌胃给药 200 mg/kg/d 时促进效果最强, 高倍镜下可见成骨细胞明显增多。见图 2。

表 2 不同组别给药治疗后去势大鼠骨代谢指标的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The changes of bone metabolism indexes of OVX rats after the treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	给药量 (mg/kg)	例数	OT	TRAP
对照组	0	8	211.50 ± 8.35	1.86 ± 0.14
灌胃给药组 a	100	8	424.13 ± 11.42*	0.95 ± 0.06**
灌胃给药组 b	200	8	408.81 ± 6.45*	1.00 ± 0.08*
灌胃给药组 c	400	8	406.26 ± 12.82**	1.24 ± 0.14**
注射给药组 a	3.5	8	384.94 ± 13.16*	1.44 ± 0.11**
注射给药组 b	4	8	376.63 ± 6.72*	1.00 ± 0.07*
注射给药组 c	4.5	8	342.63 ± 8.71**	1.14 ± 0.11**

注: 与对照组相比, * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$

2.2.2.1 银杏叶提取物不同给药方式对 GIOP 骨代谢指标的影响: 灌胃给药与腹腔注射给药对于 GIOP 都有治疗效果,且效果与给药浓度有关。在两

种方式不同浓度给药,OC 水平均有升高($P < 0.01$),TRAP 水平均有降低($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 不同组别给药治疗后糖皮质激素性骨质疏松大鼠骨代谢指标的变化($\bar{x} \pm s$)
Table 3 The changes of bone metabolism indexes in GIOP rats after the treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	给药量(mg/kg)	例数	OT	TRAP
对照组	0	8	271.37 $\pm$ 10.23	1.65 $\pm$ 0.09
灌胃给药组 a	100	8	380.74 $\pm$ 13.28*	1.00 $\pm$ 0.03**
灌胃给药组 b	200	8	399.40 $\pm$ 10.94*	1.06 $\pm$ 0.10*
灌胃给药组 c	400	8	404.81 $\pm$ 14.76*	1.23 $\pm$ 0.13**
注射给药组 a	3.5	8	374.64 $\pm$ 10.58*	1.38 $\pm$ 0.04**
注射给药组 b	4	8	396.55 $\pm$ 6.52*	1.09 $\pm$ 0.01**
注射给药组 c	4.5	8	386.49 $\pm$ 9.20*	1.14 $\pm$ 0.05**

注: 与对照组相比, * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$

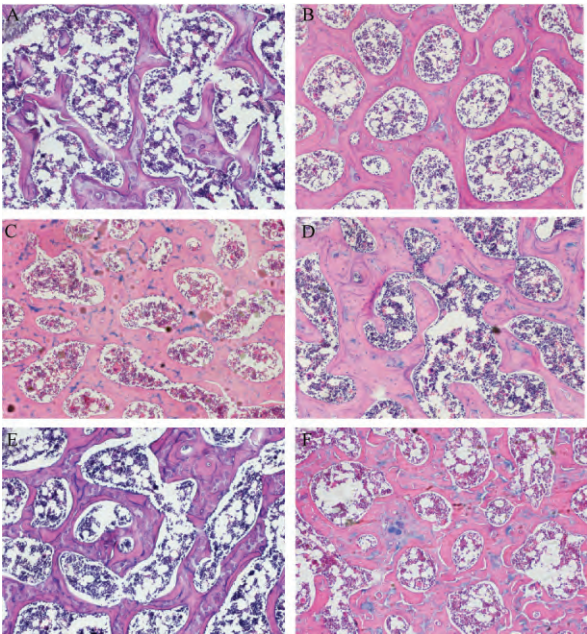


图 2 银杏叶提取物对 OVX 给药后股骨病理改变(HE 染色, $\times 40$)。A: 不给药组; B: 灌胃组 100 mg/(kg·d); C: 灌胃组 200 mg/(kg·d); D: 灌胃组 400 mg/(kg·d); E: 注射组 3.5 mg/(kg·d); F: 注射组 4.0 mg/(kg·d); G: 注射组 4.5 mg/(kg·d); H($\times 100$): 灌胃组 200 mg/(kg·d)。

Fig. 2 Effect of GBE on pathological changes of the femur after drug administration in OVX rats (HE staining , $\times 40$) . A: No drug administration; B: Ig group (100 mg/kg/d); C: Ig group (200 mg/kg/d); D: Ig group (400mg/kg/d); E: Injection group (3.5 mg/kg/d); F: Injection group (4.0 mg/kg/d); G: Injection group (4.5 mg/kg/d); H ($\times 100$): Ig group (200 mg/kg/d) .

2.2.2.2 银杏叶提取物不同给药方式对 GIOP 骨病理形态的影响: 不同浓度灌胃给药和腹腔注射给

药对于 GIOP 的成骨均有促进作用,均有不同程度的新生骨小梁形成,骨小梁增多,变宽。灌胃给药 200 mg/(kg·d) 时促进效果最强,高倍镜下可见成骨细胞明显增多。见图 3。

3 讨论

研究^[4]证实,骨质疏松症是因为成骨细胞和破骨细胞之间的动态平衡被打破,骨吸收超过骨形成所导致的。Cairolì^[9]和 Rachner^[10]分别从成骨细胞和破骨细胞阐述了骨质疏松的形成原因。细胞的动态改变导致的骨小梁数量较少、变细、断裂、骨小梁距离增宽,在机体表现为疼痛、骨折等临床症状。本实验证实了 GBE 可以促进成骨细胞的表达,抑制破骨细胞的表达;镜下观察成骨细胞明显增多,断裂增宽的骨小梁排列整齐致密,骨转换向着成骨的方向进行,对成骨有着促进作用。

骨转换过程可以通过间接的测定骨生化标志物,反映成骨细胞和破骨细胞的活性^[11]。本实验检测血清中骨钙素(OC) 水平^[12-13]和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP) 水平^[14],同时观察股骨用药前后的组织学改变^[15]。血清中 OC 水平可作为评估骨转换率及骨形成的特异性标志物,OC 参与成骨细胞分化及基质的矿化过程。本实验证实了骨质疏松大鼠 GBE 灌胃和腹腔注射两种方式给药后,与对照组相比,血清中 OC 水平增高,表明 GBE 对成骨均有促进作用。TRAP 是一种酸性磷酸酶的同功酶,血清中 TRAP 水平可以反映体内破骨细胞活性和骨吸收状态。从结果中我们可以看到,灌胃和腹腔注射两种方式给药后,两种类型的骨质疏松大鼠血清中 TRAP 水平和对照组相比明显降低,表明银杏叶提取物能够降低破骨细胞的活性,抑制骨吸收。组织

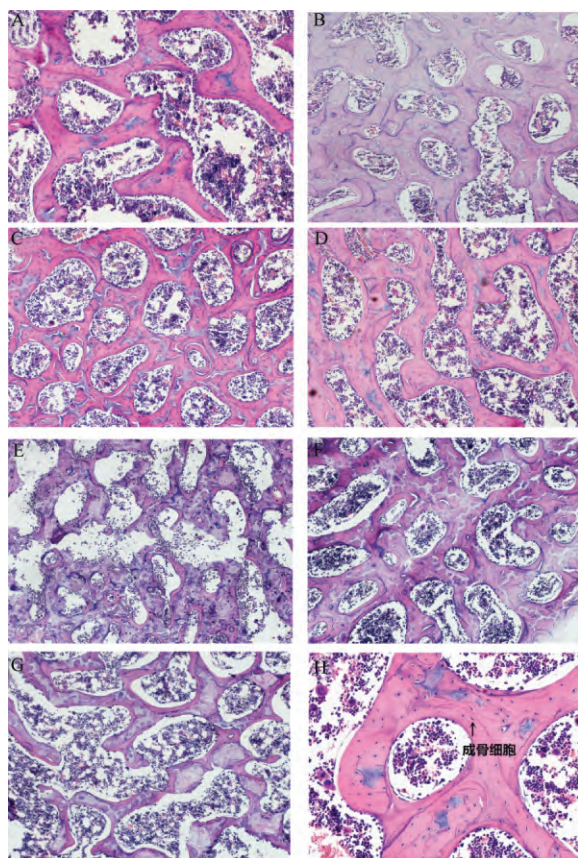


图3 银杏叶提取物对 GIOP 给药后股骨病理改变 (HE 染色, $\times 40$)。A: 不给药组; B: 灌胃组 100 mg/(kg $\cdot$ d); C: 灌胃组 200 mg/(kg $\cdot$ d); D: 灌胃组 400 mg/(kg $\cdot$ d); E: 注射组 3.5 mg/(kg $\cdot$ d); F: 注射组 4.0 mg/(kg $\cdot$ d); G: 注射组 4.5 mg/(kg $\cdot$ d); H ($\times 100$): 灌胃组 200 mg/(kg $\cdot$ d)

Fig. 3 Effect of GBE on pathological changes of the femur after drug administration in GIOP rats (HE staining, $\times 40$). A: No drug administration; B: Ig group (100 mg/kg/d); C: Ig group (200 mg/kg/d); D: Ig group (400 mg/kg/d); E: Injection group (3.5 mg/kg/d); F: Injection group (4.0 mg/kg/d); G: Injection group (4.5 mg/kg/d); H ($\times 100$): Ig group (200 mg/kg/d).

学观察结果显示两种方式给药后,股骨骨小梁变粗,增宽。中药胃肠药动学理论下^[16],口服中药经胃肠道作用才可以使其发挥最好药效,本试验结果证明,GBE 灌胃给药作用效果优于腹腔注射给药,与此理论相符;并筛选出最佳给药方式以及浓度为灌胃给药 200mg/(kg $\cdot$ d)。结合本课题前期实验可知:GBE 体内给药与体外给药对于成骨都有促进作用,体内给药同时可以抑制破骨细胞活性,从而促进成骨。对于银杏叶提取物促进成骨的具体作用机制还有待

进一步的研究。

【参考文献】

- [1] Sandhu SK, Hampson G. The pathogenesis, diagnose, investigation and management of osteoporosis [J]. J Clin Exp Pathol 2011 64(12): 1042.
- [2] Kurt-Sirin O, Yilmaz-Aydogan H, Uyar M, et al. Combined effects of collagen type I alpha1 (COL1A1) Sp1 polymorphism and osteoporosis risk factors on bone mineral density in Turkish postmenopausal women [J]. Gene 2014 540(2): 226-231.
- [3] Den Uyl D, Bultink IE, Lems WF. Advances in glucocorticoid-induced osteoporosis. Curr Rheumatol Rep 2011 13(3): 233-240.
- [4] Guo Liang. Osteoblast, Osteoclast and OPG/RANKL/RANK system about osteogenesis. [J]. Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology, 2010, 22(7): 41-44. in Chinese.
- [5] Zhang Jiadi. Effects of GBE on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of BMSCs. [J]. Journal of Oral Science Research, 2015 06: 575-579. in Chinese.
- [6] Gu Xu. Effect of Ginkgo biloba extract on adipogenic differentiation ability of bone marrow mesenchymal stem cells in rat. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2015, 02: 343-346 + 442.
- [7] Qi Shanshan, Wang Yongji. An animal model establishment of SD rat with women's postmenopausal osteoporosis [J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2016 01: 49-52. in Chinese.
- [8] Lian Wang. Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms in the mice by treatment with Ginkgo biloba extract (GEB761). [J] 2013 1(150): 308-315.
- [9] Cairoli E, Zhukouskaya VV, Eller-Vainicher C, et al. Perspectives on osteoporosis therapies. [J] Endocrinol Invest, 2015 38(3): 303-311.
- [10] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future [J]. Lancet 2011 377(9773): 1276-1287.
- [11] Zhang XJ, Li Rong. The research progress of bone metabolism markers. [J]. Shandong Medical Journal, 2014 54(16): 93-95. in Chinese.
- [12] Turunen MJ, Saarakkala S, Rieppo L, et al. Comparison between infrared and Raman spectroscopic analysis of maturing rabbit cortical bone. Appl Spectroscopy 2011 65(6): 595-603.
- [13] Simona Jurkovic Mlakara, Janez Prezelj, Janja Marica. Testing GSTP1 genotypes and haplotypes interactions in Slovenian post-/pre-menopausal women: novel involvement of glutathione S-transferases in bone remodeling process. Maturitas 2012 71(2): 180-187.
- [14] Shidara K, Inaba M. Bone metabolic marker for osteoporosis. Nihon Rinsho Japanese Journal of Clinical Medicine, 2009 67(5): 927-931.
- [15] Pan JH, Zhang HX, Li FF, et al. The dynamic effects of Astragalus on bone tissue of ovariectomized rats. [J]. Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine, 2010 16(3): 251-253. in Chinese.
- [16] Sun LJ, Wang XS, Lv HY. Progress of research on gastro intestinal transit pharmacokinetics in Chinese herbal compound preparations. [J]. Journal of Dalian Medical University, 2008, 06: 573-576. in Chinese.

(收稿日期: 2016-04-23; 修回日期: 2016-06-28)