

· 药物研究 ·

含辅酶 Q₁₀ 和洛伐他汀的红曲提取物对大鼠胫骨形态的骨计量学观察

吕思敏¹ 于琼² 司徒永立³ 孙金影² 崔燎^{2,4} 吴铁^{1,2*}

1. 广东医科大学·广东润和生物科技有限公司辅酶 Q₁₀ 联合研究中心, 东莞 523808

2. 广东医科大学药学院, 东莞 523808

3. 广东医科大学病原生物学与免疫学研究所, 湛江 524023

4. 广东天然药物研究与开发重点实验室, 湛江 524023

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 11-1469-08

摘要: 目的 采用大鼠去卵巢合并 D-半乳糖诱导老年性骨质疏松的动物模型来评价从红曲提取含辅酶 Q₁₀ 和洛伐他汀的提取物对胫骨形态的骨计量学作用, 并与雌激素己烯雌酚比较。方法 3 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠, 随机分为假手术对照组 (CON), 去卵巢组 (OVX), 模型组 (MOD), 己烯雌酚组 (DES) 和红曲胶囊组 (RYR), 连续给药 60 天。实验结束前第 13、14 天和第 3、4 天皮下注射钙黄绿素 7 mg·kg⁻¹ 进行骨荧光标记。实验结束时, 取右侧胫骨上段制成不脱钙骨切片, 胫骨中段制成不脱钙骨磨片用于骨组织形态计量学研究。结果 去卵巢合并皮下注射 D-半乳糖可导致大鼠体重增加, 胫骨松质骨骨量丢失严重, 骨显微结构严重退化, 胫骨皮质骨的面积减少; 含辅酶 Q₁₀ 和洛伐他汀的红曲提取物可使去卵巢合并 D-半乳糖大鼠的体重明显减轻, 胫骨松质骨以及胫骨皮质骨的骨丢失明显减轻, 骨量、骨微观结构得到明显改善。结论 去卵巢合并 D-半乳糖可导致大鼠出现老年性骨质疏松, 补充含辅酶 Q₁₀ 和洛伐他汀的红曲提取物可改善去卵巢合并 D-半乳糖大鼠的胫骨骨丢失, 提示该提取物具有减肥及防治骨质疏松的良好的应用前景。

关键词: 辅酶 Q₁₀; 红曲提取物; 去卵巢; D-半乳糖; 骨质疏松; 己烯雌酚; 大鼠

Effect of red yeast rice extract components containing coenzyme Q₁₀ and lovastatin on histomorphometry of the tibia in rats

LV Simin¹, YU Qiong², SITU Yongli³, SUN Jinying², CUI Liao^{2,4}, WU Tie^{1,2*}

1. Guangdong Medical University & Guangdong Runhe Biological Technology Co., Ltd. Coenzyme Q₁₀ Research Institute, Dongguan 523808

2. School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523808

3. Institute of Immunology and Microbiology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023

4. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China

Corresponding author: WU Tie, Email: wutie2@163.com

Abstract: Objective To establish the model of osteoporosis induced by OVX and D-galactose in rats, to investigate the effect of red yeast rice extract components containing coenzyme Q₁₀ and lovastatin on the tibia, and to compare the effect with that of diethylstilbestrol. **Methods** Three-month-old female Sprague-Dawley rats were randomly into sham group (CON), ovariectomized group (OVX), model group (MOD), diethylstilbestrol group (DES), and red yeast rice capsule group (RYR). All rats were weighed weekly and received subcutaneous injection of calcein (7 mg·kg⁻¹) on day 14, day 13, day 4, and day 3 before sacrificed. After 60 days, static and dynamic histomorphometric analysis on the cancellous bone of the proximal tibia metaphysis (PTM) and tibia shaft (Tx) was measured in undecalcified sections. **Results** After OVX and D-galactose injection, the body weight and the bone loss of cancellous bone in the tibia increased in rats, and the cortical bone in tibia reduced

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No 81273518)

* 通讯作者: 吴铁, Email: wutie2@163.com

significantly. In addition, serious degradation of the bone microstructure was observed in the rats. Red yeast rice extract components containing coenzyme Q_{10} and lovastatin effectively prevented body weight gain and the bone loss of cancellous bone and the cortical bone in the tibia in rats. The bone mass and bone microstructure also improved. **Conclusion** OVX and D-galactose injection lead to osteoporosis in rats. Red yeast rice extract components containing coenzyme Q_{10} and lovastatin prevent the tibia bone loss in rats treated with OVX and D-galactose, suggesting a good prospect of the components in weight loss and anti-osteoporosis application.

Key words: Coenzyme Q_{10} ; Red yeast rice extract components; Ovariectomy; D-galactose; Osteoporosis; Diethylstilbestrol; Rat

红曲,既是中药,又是食品,红曲含有洛伐他汀,产生的次级代谢产物有很好的降血脂功能活性^[1]。红曲中有效成分他汀类可阻断胆固醇合成的通路,具有治疗与预防心脑血管疾病作用。我们发现红曲发酵后可分离到辅酶 Q_{10} ,辅酶 Q_{10} 是细胞代谢及细胞呼吸的激活剂,可改善线粒体呼吸功能,促进氧化磷酸化反应。洛伐他汀降血脂同时可增加骨密度,修复骨的显微结构^[2],但其同时抑制体内辅酶 Q_{10} 的合成,可导致转氨酶升高等肝损伤作用^[3],临床研究已经证明,补充辅酶 Q_{10} 可避免他汀类引起的转氨酶增高,并能增强他汀类的降脂作用^[4]。而且,辅酶 Q_{10} 具有潜在的抗骨质疏松作用,可以调节成骨细胞和破骨细胞的分化^[5]。因此,我们分别从红曲菌丝体中提取辅酶 Q_{10} 和洛伐他汀,组合成含有纯天然的辅酶 Q_{10} 和洛伐他汀的红曲提取物胶囊,并采用大鼠去卵巢合并应用 D-半乳糖诱导老年性骨质疏松的动物模型,评价该红曲提取物胶囊的骨药理学作用,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物

45 只 SPF 级 3 月龄 SD 大鼠,雌性,体质量 (231.11 ± 18.96) g。由广东省中山大学实验动物中心提供,实验动物质量合格证号码为:SCXK(粤)2011-0029。

1.2 药物

己烯雌酚注射液购于上海通用制药股份有限公司,批号 100204;D-半乳糖购于天津市光复精细化工研究所,批号 20120928。钙黄绿素、甲苯胺蓝购于美国 Sigma 公司。红曲提取物胶囊由广东医科大学湛江广医药科技开发有限公司(博士后科研工作站)提供,每粒胶囊含洛伐他汀为 1.31 mg,辅酶 Q_{10} 为 6.28 μ g。

1.3 仪器与试剂

荧光显微镜及显微照相机(日本 Nikon 公司);光学显微镜(日本 NIKON 公司);Osteomeasure 测量与分析系统(Osteo Metrics, Inc. USA);碳化钨钢刀

(德国 LEICA 公司);硬组织切片机;慢速锯;石膏打磨机;电热恒温鼓风干燥箱;赛多利斯 BT 25S 电子天平;恒温磁力搅拌器。

1.4 实验方法

45 只 SD 大鼠适应性养一周,后根据体重随机分配为 5 组,每组 9 只。①假手术组(CON):灌胃蒸馏水 $5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。②去卵巢组(OVX):双侧去卵巢,灌胃蒸馏水 $5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。③模型组(MOD):双侧去卵巢后,皮下注射 D-半乳糖 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。④己烯雌酚组(DES):按模型组造模后,灌胃己烯雌酚 $30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。⑤红曲胶囊组(RYR):按模型组造模后,灌胃红曲提取物胶囊 0.5 颗 $\cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。各组大鼠自由饮水和摄食,并连续灌胃给药 60 天。所有大鼠在处死前第 13、14 天和第 3、4 天皮下注射钙黄绿素($7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)各一次,进行体内荧光标记。动物每周称体重一次,并按照体重的变化来调整给药的剂量。实验结束时,用戊巴比妥钠($1.5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$)来进行腹腔注射,大鼠麻醉后,右心室彻底抽血以处死大鼠。取右侧胫骨上段制成不脱钙骨切片,胫骨中段制成不脱钙骨磨片用于骨组织形态计量学研究。

1.5 观察指标及测定方法

1.5.1 大鼠体重的观察:每周称大鼠体重一次,实验第八周在实验结束前停止供应饲料喂养 12 小时,称重,作为实验结束的最后体重。

1.5.2 大鼠胫骨骨组织形态计量学检测方法^[6]:大鼠处死后,迅速取出右侧胫骨,置于 4% 多聚甲醛中。24 h 后右侧胫骨用慢速锯沿额状面锯开干骺端,暴露骨髓腔,于胫骨上端 1/3 处横行锯断胫骨,为胫骨上段。将余下的胫骨于胫骨和腓骨结合处横向锯开,作中段骨检测。右侧胫骨上段按照文献进行脱水、透明、渗透,包埋,切片,染色,封片,制成不脱钙骨切片,以生长板下 1 mm 到 4 mm 为观察范围,测量松质骨骨组织形态计量学参数。胫骨中段按照文献进行脱水、透明、渗透,包埋,磨片,封片,制成不脱钙骨磨片,测量皮质骨骨组织形态计量学参数。用半自动的图象数字化仪直接测量出的参数

后,根据国际通用公式进行计算分析,包括松质骨计算参数骨小梁面积百分数(% Tb. Ar)、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁数量(Tb. N)、骨小梁分离度(Tb. Sp),荧光周长百分数(% L. Pm)、骨矿化沉积率(MAR)、骨形成率(BFR/BS、BFR/BV、BFR/TV);皮质骨计算参数皮质面积(Ct. Ar)、皮质面积百分率(% Ct. Ar)、骨髓面积百分率(% Ma. Ar),骨外膜标记周长百分率(% P-L. Pm)、骨外膜骨矿化沉积率(P-MAR)和骨外膜骨形成率(P-BFR/BS)。

1.6 统计学分析方法

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件进行 ANOVA 单因素方差分析,若 Levene 检验方差齐性,则组间采用 LSD 检验;若方差不齐则采用 welch 校正后做方差分析,组间采用 Dunnett's T3 多

重检验。以 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 各实验组大鼠体重的变化

如表 1 所示,开始用药前,大鼠体重各组间无统计学意义,各组大鼠体重随着时间的推移而逐渐增加。实验结束时,与 CON 组相比,OVX、MOD 组的大鼠体重均显著增加,分别增加 10.83%、9.45% ($P < 0.01$)。与 MOD 组相比,OVX、DES 组体重差别无统计学意义,但 RYR 组的大鼠体重降低了 14.29% ($P < 0.01$)。RYR 组的大鼠体重与 DES 组相比,差异具有统计学意义,RYR 组降低了 10.45% ($P < 0.01$)。

表 1 各实验组大鼠体重的变化($n=9$)
Table 1 The body weight change in rats of each group ($n=9$)

Group	0 week (g)	2 week (g)	4 week (g)	6 week (g)	8 week (g)
CON	231 ± 16.3	247 ± 15.6	260 ± 13.8	264 ± 16.1	257 ± 15.2
OVX	232 ± 23.3	253 ± 28.2	265 ± 27.4	281 ± 23.6	285 ± 23.3 **
MOD	231 ± 19.8	256 ± 18.4	268 ± 19.3	277 ± 19.7	281 ± 21.7 **
DES	233 ± 18.1	243 ± 13.1	252 ± 15.8	263 ± 17.3	269 ± 19.1
RYR	229 ± 20.9	215 ± 15.6 * ** $\Delta \Delta$	225 ± 15.8 * ** $\Delta \Delta$	237 ± 14.4 * ** $\Delta \Delta$	241 ± 13.1 ** $\Delta \Delta$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. CON; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. MOD; $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$ vs. DES

2.2 各实验组大鼠胫骨上段骨形态计量学的变化

2.2.1 各实验组大鼠胫骨上段骨形态学的变化:从图 1 可见,A 为 CON 组,该组的动物骨小梁结构紧密、连续性好、粗细较均匀;B 为 OVX 组,该组动物骨小梁结构明显细小、稀疏,出现了大片无骨小梁的骨髓区;C 为 MOD 模型组,该组动物骨小梁结构明显细小、稀疏,骨小梁数量明显减少,骨小梁结构很

稀疏、并且断裂,个别呈结节状或纽扣状,亦出现了大片无骨小梁的骨髓区;D 为 DES 组,该组动物的骨小梁较 MOD 组的明显增粗,增多,连续性有一定的恢复;E 为 RYR 组,该组动物的骨小梁分布较均匀,排列有序,连续性比较好,在小梁骨的数量、厚度、以及分布上均都有明显的改善。

2.2.2 各实验组大鼠胫骨上段形态计量学静态参

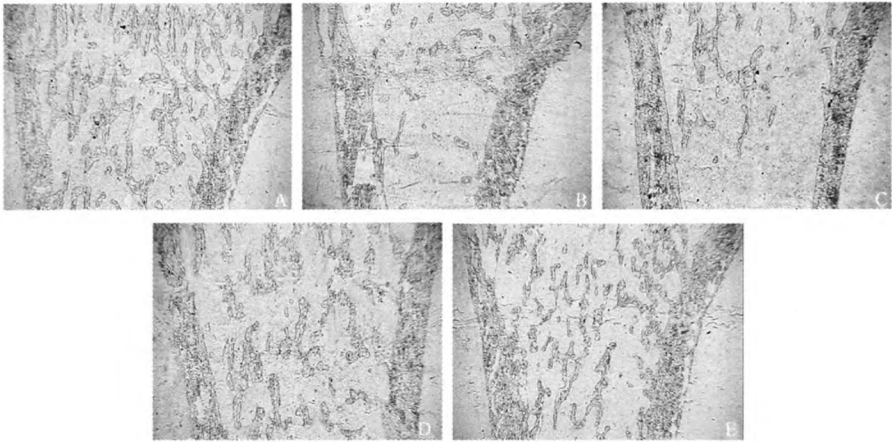


图 1 各实验组大鼠胫骨上段组织形态的表现(未染色,2X)

Fig. 1 Bone histomorphometry of PTM in rat of each group (unstained, 2X).
A. CON; B. OVX; C. MOD; D. DES; E. RYR

数的变化:由表 2 可知:与 CON 组相比,MOD 组的 %Tb. Ar、Tb. Th 和 Tb. N 分别降低了 69.68% ($P < 0.01$)、14.51% ($P < 0.05$)、65.81% ($P < 0.01$), Tb. Sp 增加了 393.03% ($P < 0.05$),提示去卵巢合并 D-半乳糖可以使大鼠胫骨松质骨的骨小梁数目显著减少,微观结构显著退化。与 MOD 组相比,DES 组和 RYR 组的骨小梁数目明显增多、增粗,并且分布均匀,连续性良好;DES 组 %Tb. Ar、Tb. Th

和 Tb. N 均显著增加,分别增加了 154.58%、18.50% 和 119.16% ($P < 0.01$),Tb. Sp 则下降,但差别无统计学意义;RYR 组 %Tb. Ar 和 Tb. N 均显著增加,分别增加了 165.86% 和 158.88% ($P < 0.01$),而 Tb. Sp 则明显下降,降低了 74.04% ($P < 0.05$),提示己烯雌酚和红曲提取物胶囊均可有效地预防去卵巢合并 D-半乳糖对大鼠胫骨松质骨显微结构的破坏。

表 2 各实验组大鼠胫骨上段形态计量学静态参数的变化($n=9$)

Table 2 The static histomorphometry parameters of the cancellous bone in rats of each group ($n=9$)

Group	% Tb. Ar (%)	Tb. Th (μm)	Tb. N (mm^{-1})	Tb. Sp (μm)
CON	31.30 $\pm$ 4.00	50.09 $\pm$ 6.46	6.26 $\pm$ 0.47	110.40 $\pm$ 12.00
OVX	12.85 $\pm$ 4.24 **	42.57 $\pm$ 3.48 *	3.03 $\pm$ 0.97 **	357.87 $\pm$ 266.21
MOD	9.49 $\pm$ 5.49 **	42.82 $\pm$ 5.95 *	2.14 $\pm$ 1.05 **	544.31 $\pm$ 295.63 *
DES	24.16 $\pm$ 8.56 **	50.74 $\pm$ 8.09 **	4.69 $\pm$ 1.43 ***	201.40 $\pm$ 155.39
RYR	25.23 $\pm$ 6.58 **	45.25 $\pm$ 4.39	5.54 $\pm$ 1.15 **	141.30 $\pm$ 35.49 #

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. CON; # $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs. MOD

2.2.3 各实验组大鼠胫骨上段荧光标记的动态变化:由图 2 可见,图中 A 为 CON 组,该组的动物胫骨上段骨片单荧光较多。B 为 OVX 组,该组的动物胫骨上段骨片单荧光和双荧光均较多。C 为 MOD 组,该组动物的单荧光丰富,绿色的钙黄绿素荧光清晰可见,而且双荧光亦清晰明亮。D 为 DES 组,E 为 RYR 组,该两组骨厚片的荧光均较 C 组的减少,单荧光零星点点,暗哑,并且稀疏,而且 RYR 组的荧光更加稀少。

2.2.4 各实验组大鼠胫骨上段形态计量学动态参数的变化:由表 3 可知,与 CON 组相比,MOD 组除了 BFR/TV 外,其他的动态参数指标均有所增加,其

中 %L. Pm、BFR/BV 分别增加了 79.40% ($P < 0.01$)、158.09% ($P < 0.05$);提示去卵巢合并 D-半乳糖能明显促进大鼠的骨形成和骨矿化作用,以增强骨转换率,但破骨作用远远大于成骨作用,使骨重建处于负平衡,从而导致骨丢失。与 MOD 组相比,DES 组的动态参数指标 %L. Pm、MAR、BFR/BV 分别降低了 33.24% ($P < 0.01$)、28.20% ($P < 0.05$)、59.04% ($P < 0.05$),而 RYR 组的 %L. Pm、MAR、BFR/BS、BFR/BV 分别降低了 54.53% ($P < 0.01$)、29.91% ($P < 0.05$)、66.21% ($P < 0.05$)、67.42% ($P < 0.05$);提示补充己烯雌酚和红曲提取物胶囊对胫骨松质骨表面骨形成的活跃程度有明显的抑制

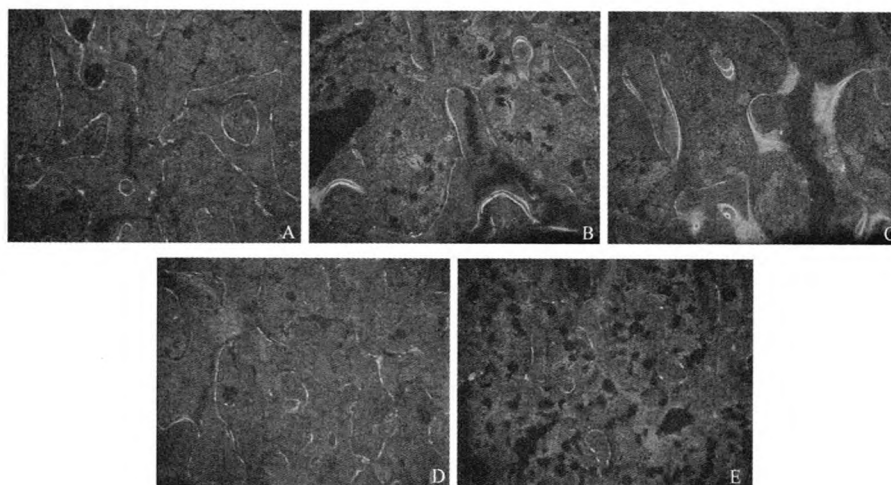


图 2 各实验组大鼠胫骨上段切片荧光图(未染色,10X)

Fig. 2 Trabecular slices of PTM with fluorescence in rats of each group (unstained, 10X).

A. CON; B. OVX; C. MOD; D. DES; E. RYR

作用,与正常对照组没有显著性差异。

表 3 各实验组大鼠胫骨上段形态计量学动态参数的变化(n=9)

Table 3 The dynamic histomorphometry parameters of the cancellous bone in rats of each group (n=9)

Group	% L. Pm(%)	MAR(μm/d)	BFR/BS(μm/d * 100)	BFR/BV(%/year)	BFR/TV(%/year)
CON	5.97 ± 2.58	0.92 ± 0.32	5.71 ± 3.30	71.59 ± 43.31	21.77 ± 12.53
OVX	9.63 ± 1.96 **	1.24 ± 0.25 *	12.14 ± 4.38 *	176.10 ± 70.52 *	22.42 ± 9.58
MOD	10.71 ± 4.02 **	1.17 ± 0.31	13.20 ± 6.81	184.77 ± 87.42 *	16.75 ± 11.56
DES	7.15 ± 1.72 **	0.84 ± 0.18 #	6.22 ± 2.64	75.69 ± 32.01 #	18.13 ± 10.87
RZR	4.87 ± 2.37 **	0.82 ± 0.29 #	4.46 ± 3.72 #	60.19 ± 48.12 #	14.54 ± 10.76

* P<0.05, ** P<0.01 vs. CON; #P<0.05, ##P<0.01 vs. MOD

2.3 各实验组大鼠胫骨中段骨形态计量学的变化

2.3.1 各实验组大鼠胫骨中段骨形态学的变化:图中 A 为 CON 组,该组中段骨的管壁宽而厚、骨髓腔面积较小;B 为 OVX 组,该组中段骨的骨髓腔面积

变大,管壁变薄;C 为 MOD 组,该组中段骨的骨髓腔面积明显增大,管壁变薄,而且皮质骨面积明显减少;D 为 DES 组,E 为 RZR 组,两组皮质骨的面积均较 C 组的明显增加。

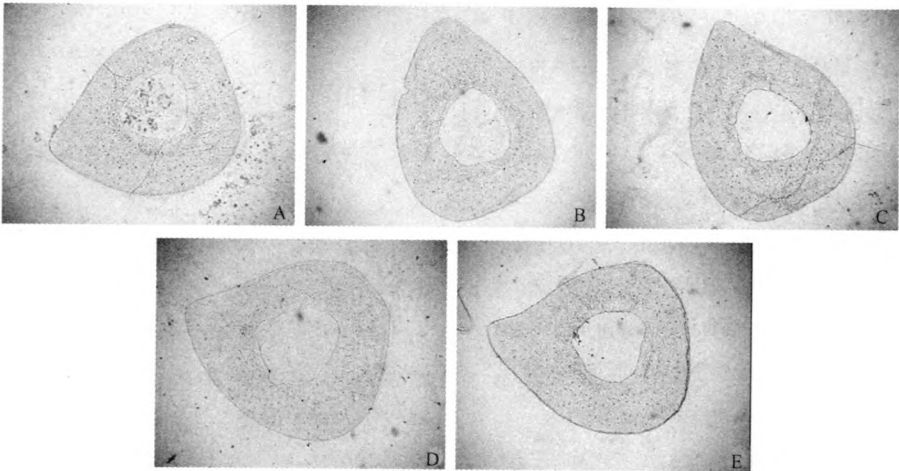


图 3 各实验组大鼠胫骨中段组织形态的表现(未染色,2X)

Fig. 3 Bone histomorphometry of the middle shaft of the tibia in rats of each group (unstained, 2X).
A. CON; B. OVX; C. MOD; D. DES; E. RZR

2.3.2 各实验组大鼠胫骨中段形态计量学静态参数的变化:由表 4 可知,与 CON 组比较,MOD 组静态指标 Ct. Ar、% Ct. Ar 明显降低,分别降低了 10.90% (P<0.05)、3.50% (P<0.01),% Ma. Ar 则显著增加了 20.09% (P<0.01);提示去卵巢合并 D-半乳糖使大鼠胫骨中段皮质骨的骨面积减少,骨髓腔变大,骨量明显丢失。与 MOD 组比较,DES 组的静态指标 Ct. Ar 和 % Ct. Ar 均显著增加,分别增加了 10.37% 和 3.44% (P<0.01),% Ma. Ar 则下降了 15.89% (P<0.01);RZR 组 Ct. Ar 和 % Ct. Ar 均显著增加,分别增加了 7.71% 和 2.26% (P<0.01),% Ma. Ar 则下降了 10.44% (P<0.01),提示己烯雌酚与红曲提取物胶囊均可有效预防去卵巢合并 D-半乳糖所引起的大鼠皮质骨骨量的丢失以及

骨髓腔扩大。

表 4 各实验组大鼠胫骨中段形态计量学静态参数的变化(n=9)

Table 4 The static histomorphometry parameters in the middle shaft of the tibia in rats of each group (n=9)

Group	Ct. Ar(mm ²)	% Ct. Ar(%)	% Ma. Ar(%)
CON	4.22 ± 0.34	85.17 ± 1.14	14.83 ± 1.14
OVX	3.81 ± 0.16	82.52 ± 0.97 **	17.48 ± 0.97 **
MOD	3.76 ± 0.14 *	82.19 ± 1.40 **	17.81 ± 1.40 **
DES	4.15 ± 0.14 **	85.02 ± 1.28 **	14.98 ± 1.28 **
RZR	4.05 ± 0.14 **	84.05 ± 1.55 **	15.95 ± 1.55 **

*P<0.05, ** P<0.01 vs. CON; #P<0.05, ##P<0.01 vs. MOD

2.3.3 各实验组大鼠胫骨中段荧光标记的动态变化:图 4 为胫骨中段骨表面的荧光标记,为钙黄绿素的绿色荧光。其中 A 为对照组,该组动物皮质骨外

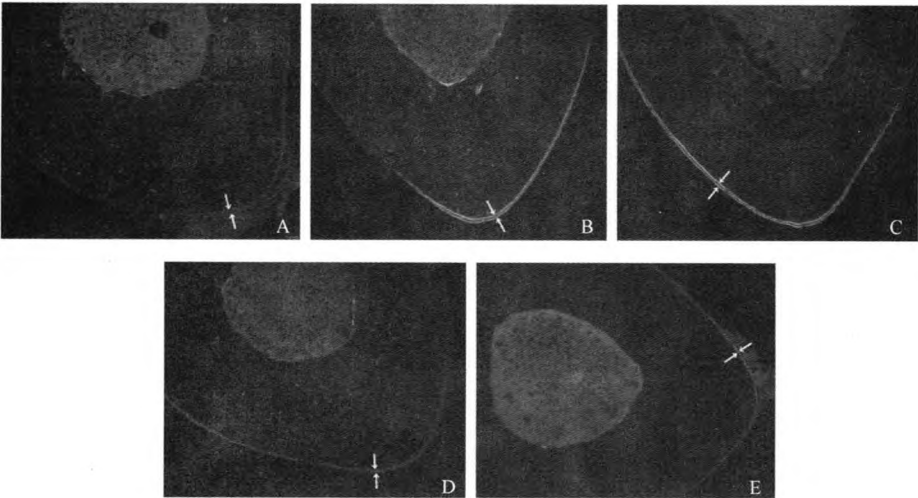


图 4 各实验组大鼠胫骨中段骨磨片荧光图(4X)

Fig. 4 Trabecular slices of Tx with fluorescence in rats of each group (4X).

A. CON; B. OVX; C. MOD; D. DES; E. RYR

膜的荧光较少。C 为 MOD 组,大鼠皮质骨外膜的双荧光间距宽阔;D 为己烯雌酚组,E 为红曲胶囊组,这两组的荧光均较模型组少,且暗淡。

2.3.4 各实验组大鼠胫骨中段形态计量学动态参数的变化:由表 5 可知,与 CON 组相比,MOD 组动态参数% P-L、Pm、P-MAR 和 P-BFR/BS 均显著增加,分别增加了 595.99%、255.56% 和 1408.90% ($P < 0.01$),提示去卵巢合并 D-半乳糖能明显增强大鼠皮质骨外膜的骨形成作用和矿骨化作用。与 MOD 组比较,两个药物组的荧光减少,荧光模糊;DES 组的% P-L、Pm、P-BFR/BS 均显著降低,分别降低了 56.03%、66.36% ($P < 0.01$);RYR 组的% P-L、Pm、P-MAR、P-BFR/BS 亦均显著降低,分别降低了 51.60%、42.97%、70.01% ($P < 0.01$);提示己烯雌酚与红曲提取物胶囊均对去卵巢合并 D-半乳糖大鼠皮质骨外膜的骨形成有明显的抑制作用,但与假手术对照组相比,其对大鼠皮质骨外膜的骨形成还是不能回复到正常水平。

表 5 各实验组大鼠胫骨中段骨外膜形态计量学动态参数的变化 ($n = 9$)

Table 5 The dynamic histomorphometry parameters in the middle shaft of the tibia in rats of each group ($n = 9$)			
Group	% P-L、Pm (%)	P-MAR ($\mu\text{m}/\text{d}$)	P-BFR/BS ($\mu\text{m}/\text{d} \times 100$)
CON	3.99 $\pm$ 4.77	0.36 $\pm$ 0.47	2.36 $\pm$ 3.49
OVX	29.27 $\pm$ 3.61 **	1.25 $\pm$ 0.19 **	36.67 $\pm$ 8.08 **
MOD	27.77 $\pm$ 4.01 **	1.28 $\pm$ 0.21 **	35.61 $\pm$ 8.26 **
DES	12.21 $\pm$ 7.50 * **	0.81 $\pm$ 0.40	11.98 $\pm$ 10.69 * **
RYR	13.44 $\pm$ 4.95 * **	0.73 $\pm$ 0.29 **	10.68 $\pm$ 5.65 * **

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. CON; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. MOD

3 讨论

3.1 去卵巢合并 D-半乳糖大鼠胫骨骨质疏松的特点

3 月龄的 SD 大鼠双侧去卵巢后,每天皮下注射 D-半乳糖 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,60 天后,大鼠体重比假手术组的显著增加,说明去卵巢合并 D-半乳糖可使大鼠体重增加,出现肥胖症状。这可能是由于雌激素水平的降低,引起脂质代谢紊乱^[7],导致体内脂肪堆积所致。

骨组织形态计量学静态参数% Tb. Ar 是反映骨量变化,Tb. N、Tb. Th 和 Tb. Sp 反映骨小梁显微结构变化。本课题组司徒永立等^[8]对三种小鼠骨质疏松模型骨组织形态计量学观察与评价研究发现,去卵巢合并 D-半乳糖能明显地减低小鼠胫骨上段骨量,可以作为一种新的骨质疏松动物模型。去卵巢合并 D-半乳糖致大鼠骨质疏松模型目前未见研究报道,本课题为模拟正常妇女绝经期与衰老同时发生的生理过程来更好地模拟骨质疏松的发生过程,利用 D-半乳糖所致衰老与去卵巢模拟绝经期雌激素缺乏的基本原理来联合制模。由表 2 可知,与 CON 组相比,MOD 组的% Tb. Ar、Tb. Th 和 Tb. N 均明显降低,Tb. Sp 明显增加。另外,图 1 可看出,去卵巢合并 D-半乳糖组骨小梁结构明显细小、稀疏,个别呈结节状或钮扣状,出现了大片无骨小梁的骨髓区。以上结果说明去卵巢合并 D-半乳糖大鼠的骨量丢失严重,骨小梁面积百分数、骨小梁厚度以及骨小梁数量均降低,骨小梁分离度增加,骨微结构破

坏,出现明显的骨质疏松症状。与司徒永立等研究报道相一致^[8]。检测骨组织的动态参数可以动态了解骨的变化,解释静态参数变化的原因,从而了解骨转化速率和探讨药物作用机制。从大鼠胫骨上段荧光标记的变化图可观察到,去卵巢合并 D-半乳糖组动物的荧光丰富,绿色的钙黄绿素荧光清晰可见,且双荧光清晰明亮。与 CON 组相比,MOD 组除了 BFR/TV 外,其他的动态参数指标均有所增加,其中 % L. Pm、BFR/BV 明显增加;说明去卵巢合并 D-半乳糖大鼠的单标记周长增大,成骨细胞数量多,骨形成与骨转化活跃,有促进骨形成的作用,但破骨作用远远大于成骨作用,使骨重建处于负平衡,从而导致骨丢失。

从大鼠胫骨中段皮质骨的组织形态的表现可见,模型组中段皮质骨的骨髓腔面积明显增大,管壁变薄,而且皮质骨面积明显减少;与 CON 组比较,MOD 组静态指标 Ct. Ar、% Ct. Ar 明显降低,% Ma. Ar 则显著增加;提示去卵巢合并 D-半乳糖大鼠胫骨中段皮质骨的骨量丢失严重,皮质骨的面积减少,骨髓腔变大。从大鼠皮质骨荧光标记的变化图可观察到,MOD 组大鼠皮质骨外膜的双荧光间距宽阔。与 CON 组相比,MOD 组动态参数 % P-L. Pm、P-MAR 和 P-BFR/BS 均显著增加,说明去卵巢合并 D-半乳糖大鼠可促进皮质骨外膜的骨形成作用。胫骨的骨皮质,要经历成熟期前的骨建造期和成熟期后的骨重建期这两个时期。处于骨建造期的皮质骨,骨外膜面表现为骨形成比较强,骨内膜面表现为骨吸收比较弱^[9]。处于建造期的皮质骨横截面的几何结构,呈现骨的外径不断增粗,骨髓腔直径渐渐扩大,骨皮质厚度和骨皮质面积不断增加,骨质内的钙盐的比例也在增加^[9]。一旦进入老年期(即骨重建期),皮质骨骨外膜面的骨形成减弱,骨内膜面的骨吸收相应减弱或异常增高,骨皮质面积净增长停止或减少,骨质的骨矿含量会缓慢的丢失。而去卵巢合并 D-半乳糖使大鼠皮质骨处于骨重建期,导致股骨外径变小,骨皮质面积减少。

3.2 含辅酶 Q₁₀和洛伐他汀的红曲提取物对去卵巢合并 D-半乳糖大鼠胫骨骨质疏松的影响

3 月龄的 SD 大鼠双侧去卵巢后,每天皮下注射 D-半乳糖 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹,给予 0.5 颗·kg⁻¹·d⁻¹ 的含辅酶 Q₁₀和洛伐他汀的红曲提取物胶囊,60 天后,与 MOD 组相比,RYR 组的大鼠体重显著降低,说明红曲提取物胶囊可减轻去卵巢合并 D-半乳糖大鼠的体重,效果比己烯雌酚好。其原因是因

为红曲提取物胶囊含有洛伐他汀和辅酶 Q₁₀,洛伐他汀可阻断胆固醇的合成,而辅酶 Q₁₀可避免他汀类引起的转氨酶增高,并能增强他汀的降脂作用^[4]。

从大鼠胫骨上段组织形态的表现图可见,RYR 组骨小梁分布较均匀,排列有序,连续性比较好,在小梁骨的数量、厚度、以及分布上均都有明显的改善。与 MOD 组相比,RYR 组静态参数 % Tb. Ar 和 Tb. N 均显著增加,而 Tb. Sp 则明显下降,说明红曲提取物胶囊可增加骨量,骨小梁百分数、骨小梁数量增加,骨小梁分离度降低,可有效地预防去卵巢合并 D-半乳糖对大鼠胫骨松质骨显微结构的破坏。大鼠胫骨上段荧光标记的变化图可见,RYR 组骨厚片的荧光均较 MOD 组的减少,荧光零星点点,暗哑,并且稀疏。并且,与 MOD 组相比,RYR 组动态参数 % L. Pm、MAR、BFR/BS、BFR/BV 均明显降低,说明红曲提取物胶囊成骨细胞数量和活性降低,对胫骨松质骨表面骨形成的活跃程度影响不大。

大鼠胫骨中段皮质骨的组织形态图可见,RYR 组皮质骨的面积均较 MOD 组的明显增加。与 MOD 组比较,RYR 组静态参数 Ct. Ar 和 % Ct. Ar 均显著增加,% Ma. Ar 则显著下降,说明红曲提取物胶囊可使皮质骨的面积增大,骨髓腔面积减小,可有效预防去卵巢合并 D-半乳糖所引起的大鼠皮质骨骨量的丢失以及骨髓腔的扩大。大鼠皮质骨荧光标记的变化图可见,RYR 组荧光均较模型组少,荧光模糊且暗淡。与 MOD 组比较,RYR 组的动态参数 % P-L. Pm、P-MAR、P-BFR/BS 均显著减少,提示红曲提取物胶囊可使皮质骨外膜荧光减弱,对去卵巢合并 D-半乳糖大鼠皮质骨外膜骨形成影响不大。

D-半乳糖可导致体内抗氧化酶活性降低,从而体内的自由基增多,启动脂质过氧化,形成脂质过氧化产物,损伤体细胞。辅酶 Q₁₀本身又是细胞自身产生的天然抗氧化剂,能抑制线粒体的过氧化,有保护生物膜结构完整性的功能,一定程度上保护细胞完整性。研究发现,辅酶 Q₁₀可以调节破骨细胞和成骨细胞的分化,起到抗骨质疏松作用,而他汀类可以增加 BMP-2 表达和分泌,还可增加骨质中雌激素受体 α 的数量,还可抑制骨髓基质干细胞的成脂分化,从而促进成骨和增加骨质的形成^[10-12]。临床长期应用他汀类药物可出现较多的副作用,原因是因体内的辅酶 Q₁₀减少。他汀类抑制胆固醇合成,同时抑制了辅酶 Q₁₀的合成,使体内辅酶 Q₁₀的合成减少,导致辅酶 Q₁₀在肝、肾、心肌等脏器组织能量供

给不足,产生不良反应。因此外源性补充辅酶 Q₁₀ 可避免他汀类引起的不良反应,并能增强他汀的抗骨丢失作用。因此,补充含辅酶 Q₁₀ 和洛伐他汀的红曲提取物可降低大鼠胆固醇的水平,具有减轻体重作用,由于其直接抵抗破骨作用,对成骨作用影响不大,因此在一定程度上可抗骨丢失,但长期应用对骨代谢的影响还有待下一步探究。

3 月龄的 SD 大鼠双侧去卵巢后,每天皮下注射 D-半乳糖 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹,60 天后,大鼠体重增加,胫骨松质骨骨量丢失严重,骨显微结构严重退化,胫骨皮质骨的面积减少,可造成老年性骨质疏松。给予 0.5 颗·kg⁻¹·d⁻¹ 含辅酶 Q₁₀ 和洛伐他汀的红曲提取物胶囊后,大鼠体重明显减轻,胫骨松质骨以及胫骨皮质骨的骨丢失明显减轻,提示该天然提取物具有减肥及防治骨质疏松的良好应用前景。

【参 考 文 献】

- [1] Jia shi chen, Meng jin ming, Mu hong xia, et al. Advances of new functional ingredients and efficacy on monascus fermented products. *China Food Additives*, 2015(4):179-184.
- [2] Lu jianhua, Wu chengliang, Wang weijia, et al. The experimental study of hongqu on serum hormone levels and bone mineral density and biodynamics of ovariectomized rats. *Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopedics*, 2004,12(4):20-23.
- [3] Stechow D, Fish S, Yahalom D, et al. Does simvastatin stimulate bone formation in vivo. *BMC Musculoskelet Disord*, 2003,4:8.
- [4] Xie xiaoli, Guo wenyi, Li hu, et al. Effect of Coenzyme Q₁₀ Combined with Atorvastatin on Liver Enzyme Activity and Blood Lipids in Patients with Coronary Heart Disease Complicated by Hyperlipoidemia. *Journal of Clinical Research*, 2009,26(9):1589-1592.
- [5] Ho-Jin Moon, Wan-Kyu Ko, Min-Seo Jung, et al. Coenzyme Q₁₀ Regulates Osteoclast and Osteoblast Differentiation. *Journal of Food Science*, 2013,7(5):785-791.
- [6] Cui liao, Wu tie. *Pharmacological studies of anti-osteoporosis and the atlas*. Beijing: www.sciencep.com, 2011:43-44.
- [7] Pantaleao TU, Mousovich F, Rosenthal D, et al. Effect of estradiol and leptin levels on thyroid function, food intake and body weight gain in female Wistar rats. *Steroids*, 2010,75(10):638-642.
- [8] Si-tu yong li, Ke xing, Liu yi, et al. The observation and evaluation of bone histomorphometry in three osteoporosis models of mice. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2014,31(9):421-424.
- [9] Zhu tai yong, Shi yin yu, Zhang ge, et al. Research for the action and active mechanism of "TCM complex prescription of kidney-tonifying" ameliorated biomechanics property of the consisten bone in ovariectomized rat. *Chinese Journal of Gerontology*, 2002,11(22):490-493.
- [10] Mundy C, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*, 1999,286(5446):1946-1949.
- [11] Wang JW, Xu SW, Yang DS, et al. Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat. *Osteoporos Int*, 2007,18(12):1641-1650.
- [12] Ji rui feng, Han shu feng. Modeling and treatment of osteoporosis. *China Foreign Medical Treatment*, 2013,32(35):197-198.
- (收稿日期:2016-04-19;修回日期:2016-07-02)

(上接第 1458 页)

- [38] Von Hurst PR, Stonehouse W, Coad J. Vitamin D supplementation reduces insulin resistain South Asian women living in New Zealand who are insulin resistant and vitamin D deficie- nta randomized, placebo- controlled trial. *Brit J Nutr*, 2010;103(4):549-55.
- [29] Yang Y, Gao L, Li Q Y, et al. Content of 25(OH)D, IL-6, IGF-1 in patient with type 2 diabetes mellitus complicating osteoporsis. *Chongqing Medicine*, 2015,21(7):2898-2900.
- [30] Lu D H, Zhang F, Dai Y L, et al. Changes of bone mineral density in patients with type 2 diabetes mellitus at different ages. *Chinese Journal of Gerontology*, 2008,28(22):2251-2252.
- [31] Li X F, Shi B Y, Pang y l, et al. Relative risk factor analysis of type 2 diabetes complicated with osteoporosis. *Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences)*, 2010,31(2):197-199.
- [32] Wang Q J, Wang L, Ma Y Z, Bai y, et al. Study of serum 25-OH vitamin D level in senile male patients with osteoporosis and type 2 diabetes. *Chin J Osteoporos*, 2014,9:1093-1095.
- [33] Chagas CE, Borges MC, Martini LA, et al. Focus on vitamin D, inflammation and type 2 diabetes. *Nutrients*, 2012,4:52-67.
- [34] Zhang W Z, Zhang D Y. Treatment of postmenopausal osteoporosis with kidney nourishing and promoting blood circulation. *Journal Of Traditional Chinese Medicine and Chinese Materia Medica of JiLin*, 2004,24(10):3-4.
- [35] Dong W T, Lv Z B, Song M, et al. Scientific meaning of the treatment of primary osteoporosis from the spleen and kidney theory by the divergence of "Disharmony between bone and muscle". *Chin J Osteoporos*, 2014,20(6):714-717.
- [36] Ge L, Dai F F, Ge Z. Clinical observation on the treatment of 20 cases of primary osteoporosis with "Jian Gu pill". *Jiangsu Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2005,26(3):24-25.
- (收稿日期:2016-04-10;修回日期:2016-05-31)