

异补骨脂素对去卵巢大鼠骨代谢的影响研究

刘锐 杨小杰 李鑫 张超 高秋明*

兰州军区总医院创伤骨科,甘肃 兰州 730050

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 06-0807-05

摘要: **目的** 研究异补骨脂素对去卵巢大鼠骨代谢的影响。**方法** 取3月龄雌性SD大鼠40只,随机分为4组,假手术对照组,模型组,雌二醇组(苯甲酸雌二醇0.2 mg/kg,皮下注射,每周1次),异补骨脂素组。手术6w后,异补骨脂素组用25 mg/kg(此浓度经过前期浓度筛选得到)异补骨脂素灌胃,每天1次,1周停止1次,模型组灌胃与用药组等体积生理盐水,假手术组正常饲养。12w后双能X骨密度仪检测全身骨密度后处死,分离骨组织,于AG-X系列台式电子万能试验机检测左侧股骨和椎骨生物力学指标,血清中骨钙素(osteocalcin, OC)和抗酒石酸性磷酸酶5b(tartrate resistant acid phosphatase 5b, TRACP 5b)检测,右侧股骨护骨素(osteoprotegerin, OPG),RANKL免疫组织化学染色,剥离心、肝、脾、肺、肾、肾上腺和子宫称重,计算器官指数,并做常规病理学检测。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠体质量、全身骨密度、股骨骨密度、腰椎骨密度及血清OC、TRACP 5b,胫骨微组织结构和股骨生物力学性能差异极显著,有统计学意义($P < 0.01$),说明骨质疏松造模良好;与模型组比较,异补骨脂素组大鼠体质量、全身骨密度、股骨骨密度、腰椎骨密度及血清OC、TRACP 5b,胫骨微组织结构和股骨生物力学性能显著差异有统计学意义($0.01 < P < 0.05$)。与模型组比较,阳性对照组大鼠全身与股骨骨密度、血清OC、TRACP 5b和股骨生物力学性能极显著差异有统计学意义($P < 0.01$)。药物处理组与阳性对照相比无统计差异。**结论** 25 mg/kg的异补骨脂素能增加SD大鼠骨密度,改善骨组织微结构,有效提升骨生物力学性能,促进骨形成,降低骨质疏松骨折发生的风险。**关键词:** 异补骨脂素; 中医中药; 大鼠; 去卵巢; 骨形成; 骨质疏松模型

Effects of isopsoralen on bone metabolism in ovariectomized rats

LIU Rui, YANG Xiaojie, LI Xin, ZHANG Chao, GAO Qiuming*

Department of Traumatology, General Hospital of Lanzhou PLA, Lanzhou, Gansu 730050, China

Corresponding author: GAO Qiuming, Email: gaoqm@sohu.com

Abstract: Objective To study the effects of isopsoralen on bone formation in ovariectomized rats. **Methods** Forty female SD rats were randomly divided into four groups: sham-operation control group, model group, estradiol group (estradiol benzoate 0.2 mg/kg, subcutaneously once a week), and isopsoralen group. After 6 weeks of operation, the rats in the isopsoralen group were treated with 25 mg/kg (this concentration after pre-concentration of screening) isopsoralen once a day, and rest once in a week. The rats in the model group were given the same volume of normal saline. Rats in the sham operation group was fed normally. After 12 weeks, bone mineral density was measured using dual-energy X-ray absorptiometry. The bone biomechanical parameters of the left femur and vertebrae were measured with AG-X series. The serum osteocalcin (OC) and tartrate resistant acid phosphatase 5b (TRACP) were measured. Osteoprotegerin (OPG) and RANKL were immunohistochemically stained on the right femur. The liver, spleen, lung, kidney, adrenal gland, and uterus were weighed for the calculation of organ index, and the routine pathological examination was performed. **Results** Comparing to those in the sham group, the body weight, whole body bone mineral density, femoral bone mineral density, lumbar vertebra bone mineral density, serum OC and TRACP-5b, tibial microstructure and biomechanical properties in the model group were significantly different ($P < 0.01$), indicating that osteoporosis model was well established. Comparing to those in the model group, the body mass, whole body bone mineral density, bone mineral density of the femurs and lumbar vertebra, serum OC and TRACP-5b, tibial microstructure, and femoral biomechanical properties were significantly different ($0.01 < P < 0.05$). There were significant differences in the bone mineral density, serum OC and TRACP-5b, and femoral biomechanical properties between the positive control group and the model group ($P < 0.01$). There was no statistical difference between the drug-treated group and the positive control group. **Conclusion** 25 mg/kg of isopsoralen can

*通讯作者: 高秋明, Email: gaoqm@sohu.com

increase the bone mineral density in SD rats, improve the bone microstructure, improve bone biomechanical properties, promote bone formation, and reduce the risk of osteoporotic fracture.

Key words: Isopsoralen; Chinese traditional medicine; Rats; Ovariectomy; Bone formation; Osteoporosis model

补骨脂为豆科补骨脂属植物补骨脂 (*Psoralea corylifolia* L.) 的干燥成熟果实, 为《中国药典》记载的传统中药。中药补骨脂, 别名和兰菟、胡韭子, 其性温、味辛, 具有补肾助阳, 温中止泻, 纳气平喘之功。其中主要活性成分补骨脂素 (psoralen) 和异补骨脂素 (isopsoralen) 等香豆素类成分, 具有较强的光敏化作用和镇静、解痉、止血等作用, 是治疗白癜风、斑秃、牛皮癣以及瘤样皮肤病的有效药物^[1]。近来研究表明, 异补骨脂素具有与雌激素类似的促进骨代谢效果, 可控制机体的骨量流失状态从而达到治疗因骨量流失引起的骨质疏松症。因此, 研究异补骨脂素对骨质疏松的治疗作用具有重要意义。本文旨在研究异补骨脂素对去卵巢大鼠骨代谢的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

3月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 40 只, 购自中国人民解放军第四军医大学实验动物中心, 动物合格证号: SCXK 军 2010-007。

1.2 实验试剂和仪器

主要试剂: 异补骨脂素 (中国药品生物制品检定所, 含量测定用, 批号为 110738-201509)。水合氯醛 (天津大茂化学试剂公司), 钙黄绿素 (美国 Sigma 公司), 四环素 (美国 Sigma 公司), 苯甲酸雌二醇 (中国美仑生物, 质量分数 $\geq 98\%$), 甲基丙烯酸甲酯 (天津市凯信化学工业有限公司, 中国), 邻苯二甲酸二丁酯 (烟台市双双化工有限公司, 中国), 过氧化苯甲酰 (上海山浦化工有限公司, 中国), 无水乙醇 (天津市富宇精细化工有限公司, 中国), 二甲苯 (天津市巴斯夫化工有限公司, 中国), 辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京中杉金桥公司。

主要实验仪器有: 主要仪器双能 X 线骨密度仪 (GE 公司, 美国), 正置相差显微镜 (奥林巴斯公司, 日本), SP1600 硬组织切片仪 (LEICA 公司, 德国), SB-5200DT 超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司, 中国), 便携式真空泵, Image-ProPlus 6.0 (IPP6.0) Media Cybernetics, 公司图片分析软件。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及处理: 3 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 40 只, 由中国人民解放军第四军医大学实验动物

中心提供, 许可证号: SCXK 军 2010-007。将大鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别为假手术组, 模型组, 异补骨脂素组和雌激素处理组 (苯甲酸雌二醇 0.2 mg/kg, 皮下注射, 每周 1 次)^[2]。去卵巢大鼠模型的建立及药物处理: 3 月龄雌性 SD 大鼠 40 只, 体重 210 ~ 230 g, 10 只作为假手术对照组, 30 只经腹手术双侧去卵巢后随机分为 3 组, 分别为模型组, 异补骨脂素组和雌二醇阳性对照组。除阳性对照组外, 各组分别于去卵巢后 6w 后进行实验处理, 异补骨脂素组每天用 25 mg/kg 灌胃 1 次, 1 周停 1 天; 模型组, 与药物组等体积生理盐水灌胃处理; 假手术组不作处理。去卵巢雌二醇阳性对照组, 手术当天按 0.2 mg/kg 体重皮下注射苯甲酸雌二醇 1 次, 此后每周 1 次。饲养温度 (22 ± 2) °C, 湿度 60% ~ 70%, 饮用自来水, 标准类饲料, 不限制饮水和食量, 所有大鼠随机分组后安置在塑料筐内。

1.3.2 骨密度及生物力学检测: 药物灌胃处理第 12 周时, 采用 100 g/L 的水合氯醛, 在实验大鼠腹腔注射 3 mL/kg 进行麻醉。将麻醉后的大鼠置于双能 X 线骨密度仪下检测其全身骨密度, 后处死大鼠, 分离股骨和椎体骨组织, 分别置于双能 X 线骨密度仪下检测离体骨密度, 生物力学检测。

1.3.3 骨形态分析: 第 12 周处死动物, 于处死前第 14、13 天及第 4、3 天分别皮下注射 25 mg/kg 四环素 (美国 Sigma 公司) 和 5 mg/kg 钙黄绿素 (美国 Sigma 公司) 作双荧光标记。大鼠处死后: 取左胫骨用低速锯 (Buehler LTD, USA) 将其分为 3 段, 其上段行额状面去掉胫骨粗隆后置 70% 酒精中固定 24 h, 经酒精脱水后, 用甲基丙烯酸甲酯进行不脱钙骨包埋, 并切成 5 μ m 薄片及 10 μ m 厚片, 厚片观察骨小梁骨量及组织结构, 薄片脱钙后, 行 HE 染色观察骨组织细胞^[3]。骨形态计量学指标: ① 静态指标: 骨小梁面积百分率, 骨小梁宽度, 骨小梁数量, 骨小梁分离度。② 反映破骨的动力学指标: 破骨细胞数, 骨小梁周长破骨细胞数。

1.3.4 血清 ELISA 检测: 大鼠心脏取血, 5000 r/min, 离心 15 min, 留血清, -80 °C 保存; ELISA 试剂盒对血清中 γ 钙素 (osteocalcin, OC) 和抗酒石酸性磷酸酶 5b (tartrate resistant acid phosphatase 5b, TRACP 5b) 检测, 标准曲线制备及样品测定方法按

照说明书操作;于酶标仪上 405 nm 和 450 nm 处测定 OD 值,并通过标准曲线计算每孔中的 TRACP 5b 和 OC 的量。并用 Image-ProPlus6.0 (IPP6.0) 图片分析软件进行骨形态计量学分析。

1.3.5 离体骨免疫组织切片及组织化学染色:组织切片:方法见参考文献^[4],取 1.5 cm × 1 cm × 0.5 cm 大小的骨组织,放入 4% 中性缓冲甲醛液 4℃ 固定 24 h,然后入中性 EDTA 脱钙液(4℃ 冰箱内)脱钙,每 3 天换 1 次脱钙液,约 2w 后用大头针刺探脱钙骨标本,若能穿入骨密质即可流水冲洗,然后经 70% 乙醇 1.5 h,80% 乙醇 1.5 h,95% 乙醇 1 h,无水乙醇 I 30 min,无水乙醇 II 30 min;二甲苯 I 20 min,二甲苯 II 20 min;浸蜡(58 ~ 60℃)1 h,石蜡包埋,制成蜡块,切成 4 μm 厚的石蜡切片,60℃ 温箱烤片 1 h 后再行染色。免疫组化染色:方法见参考文献^[5],石蜡切片脱蜡至蒸馏水,3% H₂O₂,甲醇液室温作用 20 min 后水洗;切片入 1% 胃蛋白酶 37

℃ 孵育 10 min;滴加 50 μL BSA,室温封闭 20 min 后甩干;滴加鼠抗 BMP-2 多克隆抗体 4℃ 湿盒孵育过夜;PBS 洗,滴加 Biotin 标记的羊抗鼠 IgG 37℃ 湿盒孵育 40min;PBS 洗,滴加 HRP 标记的链霉亲和素分子 37℃ 湿盒孵育 30min;PBS 洗,DAB/H₂O₂ 显色;自来水充分洗涤,蒸馏水洗;苏木精 1min,水洗,1% 盐酸酒精分化后返蓝;蒸馏水洗后,梯度酒精彻底脱水,二甲苯透明,中性树脂封固。

1.4 统计学处理

统计学处理统计分析均采用 SPSS16.0 软件完成所有检测,数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各組间差异显著性检验用方差分析。

2 结果

2.1 骨密度测量及生物力学检测

骨密度测量及生物力学检测结果见表 1、2。

表 1 大鼠全身骨密度、股骨骨密度、椎骨骨密度测量结果 (g/cm², $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Results of whole body bone mineral density, femoral bone mineral density, and vertebral bone mineral density (g/cm², $\bar{x} \pm s$)

组别	全身骨密度	股骨骨密度	椎骨骨密度
模型对照	0.1611 ± 0.00373 **	0.1322 ± 0.00361 **	0.1480 ± 0.00283 **
异补骨脂素组	0.1654 ± 0.00375 #	0.1357 ± 0.00271 #	0.1516 ± 0.00425 #
阳性对照组	0.1679 ± 0.00502 **	0.1484 ± 0.00320 * **	0.1659 ± 0.00375 * **
假手术组	0.1851 ± 0.00428	0.1552 ± 0.00175	0.1775 ± 0.00430

注:与假手术组比较, ** P < 0.01;与模型组比较, # P < 0.05, ** P < 0.01

表 2 大鼠弹性模量、最大载荷、屈服强度测量结果

Table 2 Results of elastic modulus, maximum load, and yield strength in rats

组别	弹性模量 (mPa)	最大载荷 (N)	屈服强度 (N)
模型对照	1039 ± 11.972 **	85.1 ± 2.183 **	35.4 ± 0.699 **
异补骨脂素组	1642 ± 488.326 #	89.9 ± 3.843 #	37.0 ± 1.155 #
阳性对照组	2415 ± 325.107 **	122.9 ± 1.524 **	72.2 ± 1.033 **
假手术组	2537 ± 16.364	124.7 ± 1.767	76.2 ± 1.932

注:与假手术组比较, ** P < 0.01;与模型组比较, # P < 0.05, ** P < 0.01

2.2 血清 ELISA 检测

血清 ELISA 检测见图 1、2。

2.3 免疫组织化学染色图片

免疫组化切片具有阳性结果,呈颗粒状或条块状的棕黄色(见图 3、4),定位准确,对比明显,背景浅,骨小梁结构完整、清晰,染色结果稳定可靠,敏感性高、特异性强,适合显微照相等。因此,该方法可作为骨组织的制片与免疫组化的标准化实验方法应用。

大鼠去卵巢后骨组织 OPG 表达迅速下降,而

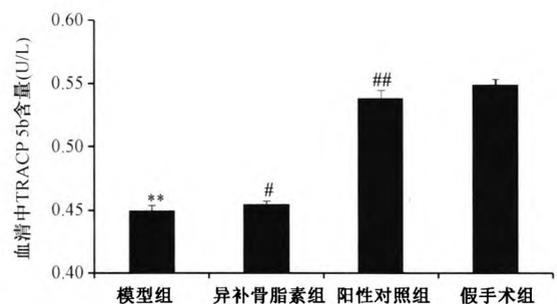


图 1 血清中 TRACP 5b 的 ELISA 检测结果

注:与假手术组比较, ** P < 0.01;与模型组比较, # P < 0.05, ** P < 0.01

Fig. 1 The test results of serum TRACP 5b

RANKL 表达明显升高,由图 3 所示:与假手术组比较,模型对照组大鼠骨组织 OPG 表达显著升高;与模型组比较,异补骨脂素组大鼠骨组织 OPG 表达极显著升高,差异有统计学意义 (P < 0.01)。异补骨脂素组与阳性对照相比无统计差异。由图 4 所示:

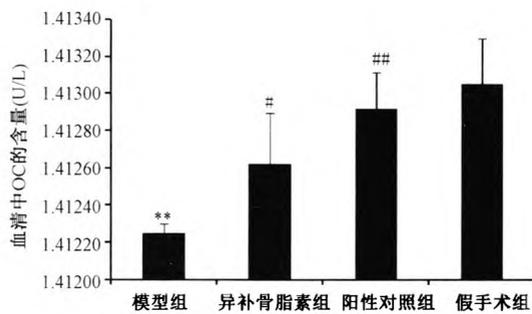


图2 血清中OC的ELISA检测结果

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

Fig. 2 The test results of serum OC

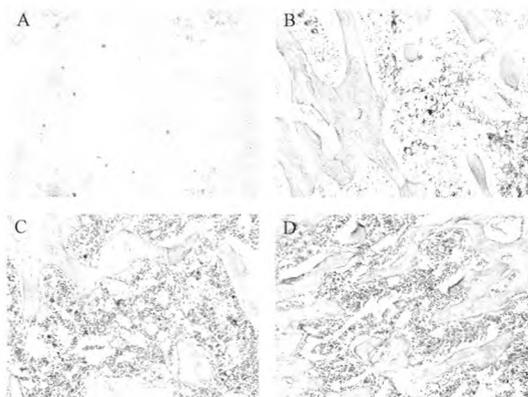


图3 OPG免疫组织化学染色

A为模型对照组,B为药物处理组,C为阳性对照组,D为假手术组

Fig. 3 Immunohistochemical staining for OPG

A. model control group; B. drug treatment group; C. positive control group; D. sham operation group

假手术组比较,模型对照组大鼠骨组织RANKL表达较高;与模型组比较,异补骨脂素组大鼠骨组织RANKL表达显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。异补骨脂素组与阳性对照相比无统计差异。

3 讨论

众所周知,绝经后妇女雌激素缺乏导致骨质疏松,雌激素替代疗法是当前常用抗骨质疏松药物,考虑到其副作用,如何寻找安全的抗骨质疏松药物就变成当务之急^[6]。异补骨脂素作为补阳壮骨的天然化合物在骨研究领域得到众多的关注,苯甲酸雌二醇,是公认的抗骨质疏松药物。大鼠双侧卵巢切除是常用的绝经后骨量丢失模型。

本试验中,假手术组全身、股骨和腰椎骨密度均

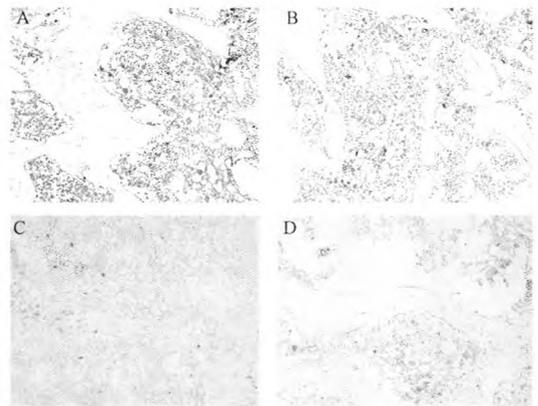


图4 RANKL免疫组织化学染色

A为模型对照组,B为药物处理组,C为阳性对照组,D为假手术组

Fig. 4 Immunohistochemical staining for RANKL

A. model control group; B. drug treatment group; C. positive control group; D. sham operation group

极显著高于模型组,说明去卵巢大鼠是研究骨质疏松症发病机制的良好模型。异补骨脂素与苯甲酸雌二醇体质量均高于模型组,对脏器湿质量无显著性影响。TRACP 5b是破骨细胞分泌的特异性酶,OC是成骨细胞分泌的特异性酶,异补骨脂素显著影响血清TRACP 5b和OC的水平,表明能促进骨形成,抑制骨吸收。OPG、RANKL均可由成骨细胞和基质细胞表达,几乎所有重要的骨代谢相关激素和细胞因子均可以通过调节OPG和RANKL的表达发挥调节骨重建的作用。雌激素缺乏导致的多种细胞因子分泌异常是导致绝经后骨质疏松症的重要原因^[7]。试验中,我们观察到大鼠去卵巢后股骨成骨细胞OPG表达迅速下降,而RANKL表达明显升高,OPG/RANKL比值前期明显低于对照组,其结果和曾天舒等^[8]报道的大鼠去卵巢后骨髓源性破骨细胞形成在后期达到高峰相一致。去卵巢后立即给予雌激素可以使上述基因表达的异常恢复到接近正常水平^[9]。口服异补骨脂素,注射苯甲酸雌二醇后,骨小梁数量有所增多,交联度致密,同时异补骨脂素组股骨生物力学、腰椎弹性模量、强度增加与骨组织微结构的改善有关。异补骨脂素组骨密度、生化指标、骨形态和生物力学平均值略低于阳性对照组,异补骨脂素组增高的骨密度可能与其较高的骨钙素表达、较强消退炎症反应能力有关,意味着较强的骨形成、抑制骨吸收能力使得其骨密度和骨微结构强势。异补骨脂素作用机制可能与扭转骨转换、消退炎症反应、活跃血管再生途径有关。王建华和翟远坤等^[10,11]研究了异补骨脂素对体外大鼠成骨细胞增

殖与分化的影响,然而异补骨脂素是如何作用于机体,如何被吸收,如何发挥其药理作用,如何参与细胞信号通路?未见报道,所以,如何进一步了解异补骨脂素作用的分子机理有待更深层次的研究。

【参 考 文 献】

- [1] 白鸽,曹学丽,谭莉,等. 补骨脂素和异补骨脂素的分离纯化研究. 食品科学技术学报, 2009, 27(5):1-4.
Bai G, Cao XL, Tan L, et al. Isolation and purification of psoralen and isopsoralen. Food Science and Technology, 2009, 27 (5): 1-4. (in Chinese)
- [2] 郭峰,李正南,刘晋平,等. 六月龄大鼠去卵巢后建立骨质疏松症模型的可行性. 中国组织工程研究, 2012, 16(24): 4459-4462.
Guo F, Li ZN, Liu JP, et al. Feasibility of establishment of osteoporosis model after ovariectomy in 6-month-old rats Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2012, 16 (24): 4459-4462. (in Chinese)
- [3] 何文英,姚晓军,胡之德,等. 补骨脂素和异补骨脂素键合人血清白蛋白的比较. 物理化学学报, 2010, 26(1):221-229.
Hu WY, Yao XJ, Hu ZD, et al. Comparison of psoralen and isopsoralen binding human serum albumin. Acta Physico-Chimica Sinica, 2010, 26(1):221-229. (in Chinese)
- [4] Bao ZQ, Zhang CC, Xiao YZ, et al. Over-expression of Sox4 and β -catenin Is Associated with a Less Favorable Prognosis of Osteosarcoma. Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences], 2016, 29(2):44-50.
- [5] 俞焱阳,杨毛周. 不同脱钙方法对骨组织切片细胞内 mRNA 原位杂交表达效果的影响. 重庆医学, 2004, 33(5):666-667.
Yu CY, Yang MZ. Al. Effects of different decalcification methods on intracellular mRNA in situ hybridization of bone tissue sections. Chongqing Medical Journal, 2004, 33 (5): 666-667. (in Chinese)
- [6] 成魁,陈克明,葛宝丰,等. 淫羊藿苷与金雀异黄酮通过血管再生和抗炎反应途径抑制卵巢切除大鼠骨丢失的比较研究. 中药材, 2014, 37(4):627-631.
Cheng K, Chen KM, Ge BF, et al. A comparative study of icariin and genistein on bone loss in ovariectomized rats by vascular regeneration and anti-inflammatory response pathway. Chinese Traditional And Chinese Materia Medica, 2014, 37 (4): 627-631. (in Chinese)
- [7] 徐琳,向光大. 护骨素与血管钙化. 心血管康复医学杂志, 2006, 15(4):412-414.
Xu L, Xiang GD. Osteoprotegerin and vascular calcification. Chinese Journal of Cardiovascular Rehabilitation Medicine, 2006, 15 (4): 412-414. (in Chinese)
- [8] 曾天舒,潘世秀,陈璐璐,等. 雌激素调节大鼠去卵巢后骨髓细胞 OPG、RANKL、RANK 基因表达. 中国骨质疏松杂志, 2006, 12(2):138-141.
Zeng TS, Pan SX, Chen LL, et al. OPG, RANKL and RANK gene expression in bone marrow cells of ovariectomized rats by estrogen regulation. Chin J Osteoporos, 2006, 12 (2): 138-141. (in Chinese)
- [9] 张波,韦冰丹,甘坤宁,等. 富血小板血浆联合骨髓间充质干细胞对兔股骨头坏死 BMP-2/Smads 通路的影响. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(2):131-134.
Zhang B, Wei BD, Gan KN, et al. Effects of platelet-rich plasma combined with bone marrow mesenchymal stem cells on BMP-2 / Smads pathway in femoral head necrosis in rabbits. Chin J Osteoporos, 2016, 22 (2): 131 -134. (in Chinese)
- [10] 张萌,辛欣,王伟,等. 补骨脂素加锌对大鼠成骨细胞增殖与分化影响的实验研究. 天然产物研究与开发, 2011, 23(2): 361-364.
Zhang M, Xin X, Wang W, et al. Effects of psoralen and zinc on the proliferation and differentiation of osteoblasts in rats. Natural Product Research and Development, 2011, 23 (2): 361-364. (in Chinese)
- [11] 翟远坤,潘亚磊,牛银波,等. 补骨脂素与异补骨脂素对乳鼠颅骨成骨细胞分化成熟影响的比较研究. 中国药理学通报, 2012, 28(3):355-361.
Chai YK, Pan YL, Niu YB, et al. Effects of psoralen and isopsoralen on differentiation and maturation of cranial osteoblasts in neonatal rats. Chinese Pharmacological Bulletin, 2012, 28 (3): 355-361 (in Chinese)

(收稿日期:2016-11-13;修回日期:2016-12-10)