

· 论 著 ·

雷公藤内酯对睾丸切除雄性大鼠骨丢失的保护作用实验研究

江亚¹ 詹俊锋² 王林³ 刘群¹ 刘锴¹ 陈燕¹ 卞育俊¹ 吴刚¹ 杨祖华^{1*}

1. 合肥市第三人民医院骨 2 科, 安徽 合肥 230022
2. 安徽医科大学第二附属医院骨 2 科, 安徽 合肥 230000
3. 皖南医学院弋矶山医院创伤骨科, 安徽 芜湖 241000

中图分类号: R-332;R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 11-1433-05

摘要: **目的** 探索雷公藤内酯对睾丸切除雄性大鼠的骨丢失保护作用。**方法** 30 只 3 月龄的雄性大鼠随机分为 3 组: 对照组 (Sham 组)、睾丸切除组 (CON 组) 和雷公藤内酯治疗组 (LGT 组), 每组 10 大鼠。行双侧睾丸切除手术或假手术, LGT 组术后给予雷公藤内酯治疗 12 周, 并在实验结束时安乐死大鼠, 获取血清和大鼠胫骨。这些治疗的效果通过生物力学测试、Micro-CT 扫描和血清生化分析进行评估。**结果** 与 CON 组大鼠相比, 雷公藤内酯的全身给药显著降低骨代谢指标 [I 型前胶原氨基末端前肽 (type 1 procollagen amino terminal propeptide, PINP) 和 I 型胶原羧基端肽 (type I collagen carboxy terminal peptide, CTX-1)], 增加大鼠胫骨骨密度, 改善骨小梁参数 (骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数目和骨小梁分离度), 增强胫骨极限载荷、能量和刚度, 且比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 雷公藤内酯能有效保护双侧切除睾丸大鼠诱导的骨丢失。

关键词: 骨质疏松; 雷公藤内酯; 去睾丸; 骨密度; 骨强度; 动物实验; 大鼠

Experimental study on the protective effect of triptolide on bone loss in male rats with testicular excision

JIANG Ya¹, ZHAN Junfeng², WANG Lin³, LIU Qun¹, LIU Kai¹, CHEN Yan¹, BIAN Yujun¹, WU Gang¹, YANG Zuhua^{1*}

1. Department of Bone 2nd Division, Hefei City Third People's Hospital, Hefei 230022
2. Department of Bone 2nd Division, The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230000
3. Department of Orthopaedic Traumatology, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241000, China

* Corresponding author: YANG Zuhua, Email: 3104634263@qq.com

Abstract: Objective To explore the protective effect of triptolide on bone loss in male rats with testicular excision. **Methods** Thirty 12-month-old male rats were randomly divided into 3 groups: control group (Sham group), testis resection group (CON group) and triptolide treatment group (LGT group), with 10 rats in each group. After bilateral orchiectomy or sham surgery, LGT group was treated with triptolide for 12 weeks and euthanized at the end of the experiment to obtain serum and rat tibia. The effects of treatments were evaluated by biomechanical tests, Micro-CT scans and serum biochemical analysis. **Results** Compared with untreated CON group rats, the systemic administration of triptolide significantly reduced the levels of bone metabolic markers [type 1 procollagen amino terminal propeptide (PINP) and type I collagen carboxy terminal peptide (CTX-1)], increased bone mineral density (BMD), improved trabecular bone parameters in rats [bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), and trabecular separation Degree (Tb.Sp)], and increased limit load of tibia, energy and stiffness, all reached statistically significance ($P < 0.05$). **Conclusion** Triptolide could effectively protect bone loss induced by bilateral resection of testes in rats.

Key words: osteoporosis; triptolide; debridement; bone mineral density; bone strength; animal experimentation; rats

基金项目: 安徽省自然科学基金 (1708085QH209)

* 通信作者: 杨祖华, Email: 3104634263@qq.com

流行病学研究表明, 随着年龄的增加, 男性股骨颈、髋部和前臂远端的骨密度降低, 尤其是 50 岁以后^[1]。骨质疏松症被定义为退行性骨骼疾病, 其特

征在于骨量减少和微结构退化,导致骨折风险增加^[2]。虽然男性脆性骨折不太常见,但与女性相比,其发病率和死亡率更高^[3]。雷公藤多甙已被广泛用于治疗类风湿性关节炎、肾病综合征、系统性红斑狼疮和强直性脊柱炎等各种疾病^[4-6]。雷公藤内酯醇是雷公藤多甙的主要成分,以其抗炎和免疫抑制活性而闻名^[7]。最近,雷公藤内酯的心血管保护和抗肿瘤特性引起了研究人员的注意,此外,雷公藤也因其对其他病理状况的潜在有益作用而引起研究人员的注意^[8]。最近的研究表明,雷公藤内酯醇能够通过抑制破骨细胞发育所需的 RANKL 诱导的 NF- κ B 活化来抑制破骨细胞形成,进一步研究表明雷公藤内酯醇可以预防大鼠模型中钛颗粒引起的局部骨质疏松症的作用^[8]。

基于上述所述,雷公藤内酯显示出对骨丢失疾病的潜在影响。然而,雷公藤内酯对治疗男性骨质疏松症的潜在治疗作用尚未被研究。因此,笔者进行了这项体内研究观察雷公藤内酯对睾丸切除雄性大鼠骨丢失的保护作用。

1 材料和方法

1.1 动物和治疗

3 月龄体重 230 ~ 260 g 雄性 Sprague-Dawley 大鼠,购自上海动物史莱克公司。大鼠适应饲养 1 周后,将 30 只大鼠随机分为 3 组即对照组(Sham 组)、睾丸切除组(CON 组)和雷公藤内酯治疗组(LGT 组),每组 10 大鼠。睾丸切除组和雷公藤内酯治疗组双侧睾丸均被切除,而对照组阴囊被打开但睾丸被保留。雷公藤内酯治疗组术后大鼠腹腔注射上海纯优生物提供的雷公藤内酯醇 15 μ g/(kg $\cdot$ d),对照组和睾丸切除组每日皮下注射等量生理盐水(0.9%氯化钠的双蒸水),治疗共 12 周。所有实验期间大鼠均饲养在 23 $^{\circ}$ C 恒温条件下 12 h 光暗循环的房间中,且所有大鼠都可以自由饮水和标准的啮齿动物饮食。治疗结束后,处死所有大鼠。当大鼠处于麻醉状态时通过心脏穿刺收集血液,并收集左侧胫骨进行分析。

1.2 Micro-CT 扫描

通过 Micro-CT (SkyScan 1176, Bruker-MicroCT, Kontich, 比利时)将每组 5 只大鼠用于测量胫骨近端中的小梁骨结构。在相同条件(分辨率:18 μ m,源电压:65 kV,源电流:385 μ A,旋转步骤:0.7 $^{\circ}$)下扫描所有骨骼。对整个胫骨进行扫描,并且对每个 Micro-CT 平扫图像绘制骨小梁区域。扫描后,将

Micro-CT 图像数据传输到工作站,并通过 Micro-CT 系统中的软件进行分析。评估骨小梁微结构的以下参数,如骨密度(bone mineral density, BMD),骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数日和骨小梁分离度,具体操作步骤参考文献[9]。

1.3 骨转换指标检测

收集的血液以 3000 rpm 离心 10 min 以提取血清。它被存储在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中直到分析。根据制造商的说明,使用酶联免疫吸附通过中国武汉精细生物技术有限公司提供的试剂盒检测血清 1 型前胶原氨基末端前肽(type 1 procollagen amino terminal propeptide, P1NP)和 I 型胶原羧基端肽(type I collagen carboxy terminal peptide, CTX-I)浓度的水平。

1.4 骨生物力学检测

将包裹在氯化钠中的右侧胫骨进行生物力学测试。将样品放置在 37 $^{\circ}$ C $\pm$ 0.9% 氯化钠中 12 h,然后进行测试。对每个样品在 8874 型号力学机进行三点弯曲测试(美国马萨诸塞州诺伍德的 Instron 公司),主载荷跨度为 14.5 mm。以 0.1 mm/s 的位移速率将骨载荷至出现骨折,并测量载荷和位移。测试后,计算机记录载荷-位移曲线,从载荷-变形曲线计算极限载荷(N),能量(J)和刚度(N/mm)。

1.5 统计学分析

研究数据使用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;使用单因素方差分析(ANOVA)来检验组间差异。方差分析和 Tukey 检验用于判断比较的统计学差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠骨密度的改变

手术及治疗 12 周,3 组大鼠胫骨的骨密度见图 1,切除睾丸后 12 周,CON 组较 Sham 组大鼠的骨密度显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);术后使用雷公藤治疗的 LGT 组其骨密度较 CON 组显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);这表明雷公藤对去睾丸雄性大鼠的骨密度有一定的保护作用。

2.2 Micro-CT 检测结果

手术 12 周时大鼠的胫骨 Micro-CT 扫描结果见图 2,微观参数见图 3。与 Sham 组相比,CON 组的胫骨骨量和小梁厚度显著降低($P < 0.05$);CON 组的小梁间距增加($P < 0.05$),而 LGT 的上述指标明显优于 CON 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。骨组织形态计量学参数显示,LGT 对去卵巢大鼠胫骨

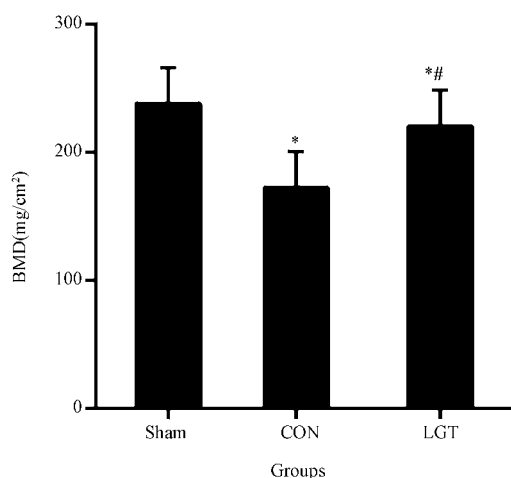


图1 各组大鼠手术12周时胫骨骨密度

注:和 Sham 组比较, * $P < 0.05$; 和 CON 组比较, # $P < 0.05$ 。

Fig. 1 Tibia bone density at 12 weeks after surgery in all groups

骨量有保护作用。

2.3 生物力学性能

生物力学测试获得的数据见图4, Sham 组具有

最高的极限载荷、能量和刚度;与 CON 组比较, LGT 组极限载荷、能量和刚度明显增加, 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

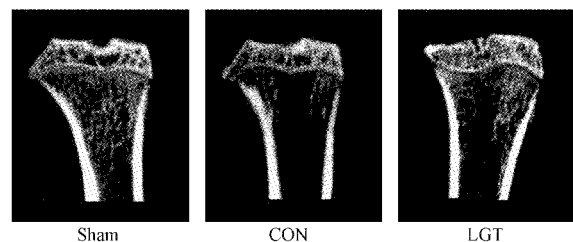


图2 治疗12周后大鼠胫骨 Micro-CT 扫描结果

Fig. 2 Micro-CT scans of tibia in rats after 12 weeks of treatment

2.4 治疗后大鼠血清 CTX-1 和 P1NP 的影响

治疗后大鼠血清 CTX-1 和 P1NP 的变化见图5。与 Sham 组比较, CON 和 LGT 组的 CTX-1 和 P1NP 显著增加 ($P < 0.05$)。LGT 组的 CTX-1 和 P1NP 较 CON 组明显降低, 比较差异有统计学 ($P < 0.05$)。

3 讨论

在目前的研究中, 本研究结果表明腹腔注射雷

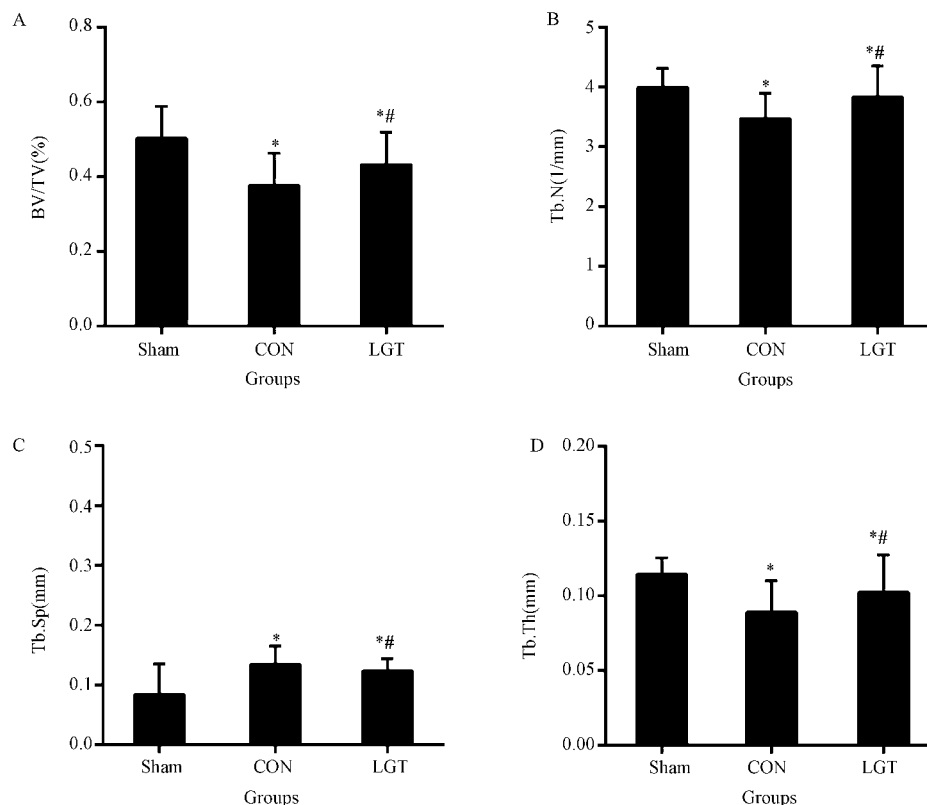


图3 治疗12周后大鼠胫骨微观参数比较

注:和 Sham 组比较, * $P < 0.05$; 和 CON 组比较, # $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Microscopic parameters of tibia in rats after 12 weeks of treatment

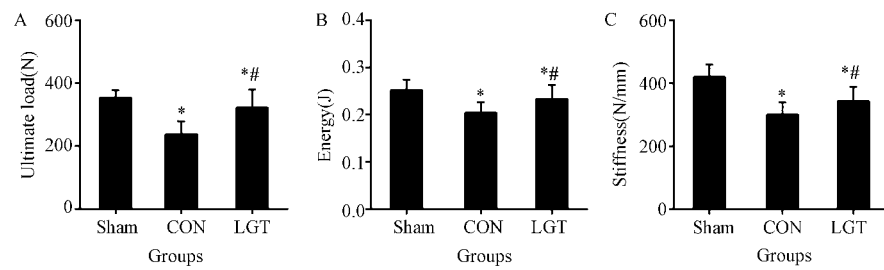


图 4 治疗对大鼠股骨生物力学的影响

注:和 Sham 组比较,* $P < 0.05$;和 CON 组比较,# $P < 0.05$ 。

Fig.4 Effects of treatment on femur biomechanics

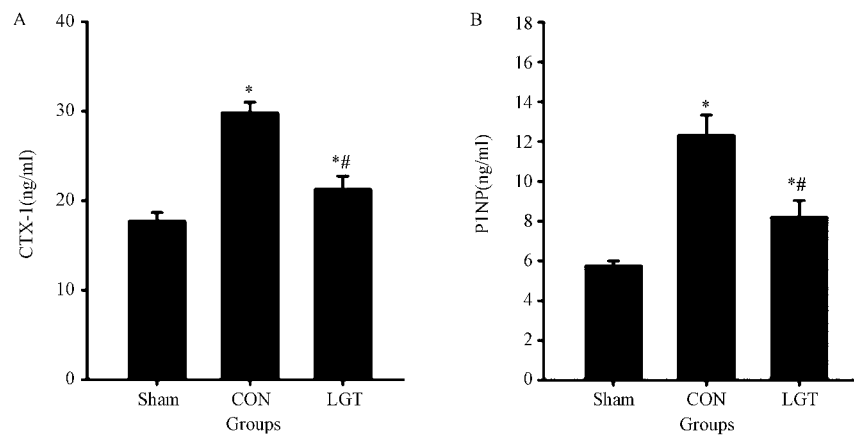


图 5 治疗对大鼠血清 CTX-1 和 P1NP 的影响

注:和 Sham 组比较,* $P < 0.05$;和 CON 组比较,# $P < 0.05$ 。

Fig.5 Effects of treatment on serum CTX-1 and P1NP.

公藤内酯能够抑制破骨细胞,从而防止老年大鼠胫骨骨质流失和改善小梁微结构。老年性骨质疏松症正在成为一个公共卫生问题,因为它导致脆性骨折增加,并伴随高昂的医疗和社会经济成本,亟需有效的策略来对抗这种疾病。然而,与年龄相关的骨丢失和微结构退化的潜在分子机制仍然知之甚少。许多年龄相关的变化与炎症状态的升高相关,炎症状态的升高表明炎症细胞因子水平升高,如 TNF- α 和 IL-6。此外,以前的研究表明,炎症在年龄相关性骨丢失的病理学中也发挥重要作用^[10]。更高的循环 C-反应蛋白被认为是全身炎症的敏感标志物,与老年女性的骨密度降低相关^[11]。此外,许多促炎细胞因子如 IL-1 和 IL-6 被证明具有促进破骨细胞分化、活化和骨吸收的能力^[12]。此外,流行病学研究显示,在各种炎症条件下发生骨质疏松症的风险增加。上述结果支持炎症显著促成老年性骨质疏松症发病机理的理论。因此,抗炎可能是治疗老年骨质疏松症的潜在治疗靶点。雷公藤内酯是一种炎症抑制剂,其抗炎活性已有文献报道。由于这种抗炎性质,

雷公藤内酯被广泛用于治疗各种疾病,如类风湿性关节炎、肾病综合征和癌症。巧合的是,这些疾病与骨质流失有关,导致患者出现额外的并发症。因此,研究雷公藤甲素对骨骼的影响是有意义的。

一些体外研究显示,雷公藤内酯具有抑制破骨细胞分化和功能的作用^[8]。此外,以前的研究还表明,雷公藤内酯醇能够通过抑制胶原诱导的小鼠中的破骨细胞分化和形成来预防骨质破坏和骨吸收^[8]。另外,雷公藤内酯被证明具有减弱钛颗粒诱导的骨溶解的能力^[8]。以上结果表明雷公藤甲素可能对预防骨质流失有潜在的作用。然而,就笔者所知,本研究首先揭示了雷公藤内酯在预防雄性大鼠去除睾丸复制的骨丢失和改善骨结构的有益作用。为了确定骨重塑中的变化是否可以解释雷公藤内酯对去除睾丸所致骨丢失的保护作用,笔者对胫骨进行了 Micro-CT 分析。在本研究中,雷公藤甲素对骨小梁有显著的影响。本研究确定雷公藤对去除睾丸所致雄性骨质疏松症大鼠骨丢失确切的保护作用。

同时,用雷公藤内酯醇治疗后,破骨细胞活性显著降低,从骨代谢指标 CTX-1 和 P1NP 水平降低可以反映。这些结果与有些学者的研究结果一致,表明雷公藤内酯能够抑制钛颗粒介导的骨溶解大鼠模型中的破骨细胞活性。一般认为骨质疏松症由于破骨细胞和成骨细胞的活性之间的失衡而发生骨丢失。因此,本研究表明雷公藤内酯促进胫骨骨密度,增加骨强度,并可能通过抑制破骨细胞活性改善大鼠骨组织。本研究显示,雷公藤甲素具有抑制破骨细胞活性的能力。尽管雷公藤内酯被证明对许多疾病具有许多药理学作用,但其相关的不良反应使其不能在临床实践中广泛使用。然而,越来越多的研究表明雷公藤内酯诱导的毒性取决于剂量和给药时间。研究报道,体内雷公藤内酯的最小毒性剂量为 28 d 为 $50 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 或 49 d 为 $40 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ^[13]。本研究中使用的雷公藤内酯剂量为 $15 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, 84 d, 低于最小毒性剂量。因此本研究中使用的雷公藤甲素剂量为 $15 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, 84 d 可能被认为是中等和安全的。

总之,在大鼠模型中,雷公藤内酯醇以 $15 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的剂量持续 84 d 似乎对于治疗性腺功能下降相关的骨丢失是安全和有效的。此外,雷公藤内酯的骨保护作用似乎部分通过降低骨转换来介导的。基于目前的研究,雷公藤内酯可能具有治疗老年男性骨质疏松症的潜力。

【参 考 文 献】

- [1] Liu M, Zhang Y, Cheng X, et al. The effect of age on the changes in bone mineral density and osteoporosis detection rates in Han Chinese men over the age of 50[J]. Aging Male, 2014, 17(3): 166-173.
- [2] Liu GM, Xu CJ, Kong N, et al. Age-related differences in microstructure, density and biomechanics of vertebral cancellous bone of Chinese males [J]. Aging Male, 2012, 15 (4): 233-239.
- [3] Sterling RS. Gender and race/ethnicity differences in hip fracture incidence, morbidity, mortality, and function[J]. Clin Orthop Relat Res, 2011, 469(7): 1913-1918.
- [4] Tao X, Younger J, Fan FZ, et al. Benefit of an extract of tripterygium wilfordii hook F in patients with rheumatoid arthritis: A double-blind, placebo-controlled study [J]. Arthritis & Rheumatology, 2002, 46(7): 1735.
- [5] Tao X, Lipsky PE. The Chinese anti-inflammatory and immunosuppressive herbal remedy Tripterygium wilfordii Hook F [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2000, 26(1): 29-50.
- [6] 陈荣国, 孙强, 曾怿, 等. 雷公藤红素对 IL-1 β 致软骨终板退变的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23 (12): 1629-1632.
- [7] Zhou ZL, Yang YX, Ding J, et al. Triptolide: structural modifications, structure-activity relationships, bioactivities, clinical development and mechanisms [J]. Natural Product Reports, 2012, 29(4): 457-475.
- [8] Luo D, Ren H, Zhang H, et al. The protective effects of triptolide on age-related bone loss in old male rats[J]. Retour Au Numéro, 2018, 98(1): 280-285.
- [9] Tao ZS, Zhou WS, Wu XJ, et al. Prevention of ovariectomy-induced osteoporosis in rats: Comparative study of zoledronic acid, parathyroid hormone (1-34) and strontium ranelate [J]. Zeitschrift Für Gerontologie Und Geriatrie, 2018(5): 1-8.
- [10] Martinis MD, Benedetto MCD, Mengoli LP, et al. Senile osteoporosis: Is it an immune-mediated disease? [J]. Inflammation Research, 2006, 55(10): 399-404.
- [11] De PP, Cooper MS, Buckley CD. Association between bone mineral density and C-reactive protein in a large population-based sample[J]. Arthritis & Rheumatism, 2012, 64(8): 2624.
- [12] Wei S, Kitaura H, Zhou P, et al. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis[J]. Journal of Clinical Investigation, 2005, 115(2): 282-290.
- [13] Li XJ, Jiang ZZ, Zhang LY. Triptolide: progress on research in pharmacodynamics and toxicology [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 155(1): 67-79.

(收稿日期: 2018-03-22; 修回日期: 2018-04-23)

(上接第 1414 页)

【参 考 文 献】

- [1] 刘佳滢, 薛愉, 万伟国, 等. 脊柱关节炎患者骨质疏松的诊断现状[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(2): 277-280.
- [2] 张智海, 刘忠厚, 石少辉, 等. 中国大陆地区以 -2.5SD 为诊断的骨质疏松症发病率文献回顾性研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(1): 1-7, 24.
- [3] 贺丽英, 孙蕴, 要文娟, 等. 2010-2016 年中国老年人骨质疏松症患病率 Meta 分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(12): 1590-1596.
- [4] 王煜, 邓诺, 吴建国, 等. 中国部分高校 2008—2012 年公共卫生与预防医学 SCI 论文分析[J]. 中国公共卫生, 2016, 32(5): 716-720.
- [5] 王煜, 邓诺, 吴建国, 等. 中国部分高校 2008—2012 年公共卫生与预防医学学科国内科技论文分析[J]. 中国公共卫生, 2016, 32(11): 1594-1598.
- [6] 毕娜, 丁红, 苏天娇, 等. 社区骨质疏松患者饮食行为及健康管理策略[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(4): 452-455, 472.
- [7] 马海珍, 葛继荣. 中药治疗骨质疏松不良反应的现状初探[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(4): 548-554.
- [8] 罗文东, 赵刚, 舒钧, 等. 云南壮族中老年人骨骨质疏松症患病率及影响因素的调查研究[J]. 中国全科医学, 2017, 20(8): 912-917.

(收稿日期: 2018-02-07; 修回日期: 2018-04-04)