

· 论 著 ·

白藜芦醇对酒精诱导雄性大鼠骨量减少和骨强度降低的保护作用

吴兴净¹ 陶周善¹ 吴信举¹ 张俊宇¹ 徐祝军¹ 徐宏光² 王坤正^{3*}

1. 皖南医学院弋矶山医院创伤骨科, 安徽 芜湖 241000

2. 皖南医学院弋矶山医院脊柱骨科, 安徽 芜湖 241000

3. 西安交通大学第二附属医院骨一科, 陕西 西安 710004

中图分类号: R-332; R965.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 02-0174-05

摘要: **目的** 探索白藜芦醇对酒精诱导雄性大鼠骨量减少和骨强度降低的影响。**方法** 30 只 12 周雄性大鼠随机分为对照组、模型组和治疗组 3 组, 每组 10 只。模型组和治疗组大鼠给予 0.4 mL/100 g 的 20% 乙醇溶液, 每周 3 次。治疗组接受白藜芦醇 40 mg/kg 治疗, 每日一次, 治疗为期 12 周。治疗结束时收集血清和股骨对治疗结果进行评价。**结果** 治疗 12 周后, 治疗组的股骨骨密度较模型组显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Micro-CT 显示治疗组大鼠股骨干骺端较模型组具有更多骨小梁以及更佳的骨微观参数, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 生物力学结果显示治疗组股骨的极限载荷和峰值负荷较模型组显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而血清检测结果表明治疗组的碱性磷酸酶和骨钙素较模型组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 白藜芦醇对酒精诱导雄性大鼠骨量减少和骨强度降低有一定的保护作用。

关键词: 白藜芦醇; 酒精; 骨密度; Micro-CT; 骨强度; 大鼠; 动物实验

Resveratrol protects male rats from alcohol-induced loss of bone mass and bone strength

WU Xingjing¹, TAO Zhoushan¹, WU Xinju¹, ZHANG Junyu¹, XU Zhujun¹, XU Hongguang², WANG Kunzheng^{3*}

1. Department of Orthopedics, Wanjiashan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241000

2. Department of Orthopedics, Shaojishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241000

3. Department of Bone, First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

* Corresponding author: Wang KZ, Email: zhmm5866@126.com

Abstract: Objective To explore the effect of resveratrol on alcohol-induced loss of bone mass and bone strength in male rats.

Methods Thirty 12-week-old male rats were randomly divided into 3 groups: control group, model group and treatment group, with 10 rats in each group. The model group and treatment group rats were given 0.4 mL/100 g of 20% ethanol solution three times per week. The treatment group received resveratrol 40 mg/kg once a day for 12 weeks. Serum and femur were collected at the end of the treatment to evaluate the effect of the treatment. **Results** After 12 weeks of treatment, femur bone density in the treatment group was significantly higher than that in the model group ($P < 0.05$). Micro-CT showed that the femoral metaphysis of the treatment group had greater number of trabeculae and better microscopic bone parameters than the model group, with statistically significant differences ($P < 0.05$). The biomechanical result showed that the limit load and peak load of the femur of the treatment group were significantly higher than that of the model group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The result of serum test showed that the levels ALP and OC in the treatment group were significantly lower than that in the model group, and there was a significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** Resveratrol has a protective effect on alcohol-induced reduction in bone mass and bone strength in male rats

Key words: resveratrol; alcohol; bone mineral density; Micro-CT; bone strength; rat; animal experiment

基金项目: 安徽省教育厅高校自然科学研究重点项目 (KJ2017A266); 2015 年度弋矶山医院引进人才科研基金项目 (YR201513); 2016 年度皖南医学院重点科研项目培育基金 (WK2016ZF07)

* 通信作者: 王坤正, Email: zhmm5866@126.com

饮酒是一个全球性问题。根据世界卫生组织的一份报告, 在世界范围内 15 岁或 15 岁以上的饮酒者约有 16.0% 酗酒^[1]。酒精摄入与多种有害作用有关, 如肝损伤、认知障碍和胚胎发育受损^[2]。骨

骨质疏松症是一种非常常见的骨骼代谢紊乱,与多种危险因素有关。其中之一是低骨量与慢性酒精滥用之间的密切关联^[3]。酒精滥用也是骨折愈合受损的一个危险因素,其会导致骨折延长修复,患有骨折的酗酒者与住院时间延长和发病率增加有关^[4]。在酒精引起的骨质疏松症中发挥中心作用的一个因素是自由基的过度生成,这又引起氧化应激反应形成^[5]。酒精引起的炎症状态也会导致细胞因子产生增加,这可能会在许多器官(包括骨骼)中诱发损伤^[6]。已知从红葡萄、花生和其他植物提取的天然多酚组分白藜芦醇(RES)发挥许多有益的药理作用,例如抗肿瘤、清除自由基、抗炎症、心脏保护和血管保护作用^[7]。临床和实验研究表明,RES通过减轻氧化应激引起的损伤来防止骨质流失。RES可诱导产生主要的细胞抗氧化酶,如GSH-PX、血红素加氧酶和SOD,导致氧化应激明显减弱^[8-9]。RES的骨保护作用主要归因于其抗氧化活性。更重要的是,RES没有毒性作用,因此RES可以安全地用于治疗/或预防骨质疏松症,即使长时间使用^[10]。骨质疏松症的发生会使人虚弱并影响生活质量。寻找替代疗法来预防酒精引起的骨质疏松症,同时考虑到RES抗氧化特性。笔者假设RES对酒精引起的骨质疏松症具有保护作用,为了证明这一假设,本研究旨在确定RES对酒精引起的骨质疏松大鼠骨量和骨强度的影响。

1 材料和方法

1.1 动物治疗和标本检测

30只3月龄的SD雄性大鼠(购自上海实验动物中心),体重220~250 g。动物喂食商品实验室食物;所有大鼠在测试期间保持在恒定温度(25℃)和湿度(50±20)%下,自由接近蒸馏水。将大鼠分成3组:对照组、模型组和治疗组,每组10只。研究中使用100%无水乙醇(Sigma, USA),然后将其制备成20%(体积/体积)乙醇/盐水溶液。模型组和治疗组大鼠按体重每100 g腹腔内给予0.4 mL配置好的20%乙醇溶液,每周3次。这种暴露模型模仿人类暴饮暴食,所使用的剂量已被证明对骨骼产生影响^[11]。本研究使用的酒精剂量产生的血液酒精浓度接近300 mg/dL,这相当于慢性酒精饮酒者常见的血液浓度^[11]。治疗组接受RES溶液(Sigma-Aldrich)按体重40 mg/kg治疗,每日一次。治疗为期12周,在治疗期结束时,来自每个治疗组的大鼠用乙醚麻醉并通过颈椎脱臼处死。通过心脏穿刺收

集血液,并在4℃下以3 000 r/min的速度离心20 min,根据制造商的说明书(Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Wuhan, China),通过450 nm的比色分析测量碱性磷酸酶(alkaline phosphates, ALP)(E-EL-R0113c)和骨钙素(osteocalcin, OC)(E-EL-R0243c)的血清水平,并收集左侧股骨进行分析。

1.2 股骨 Micro-CT 检测

将左侧股骨固定在10%中性福尔马林中48 h,然后将它们浸入70%乙醇中。采用Micro-CT(VivaCT 40; Scanco, Brüttisellen, Switzerland)以15 μm分辨率,管电压70 kV和管电流114 μA扫描股骨中远端骨微结构。重建和3D定量分析使用Micro-CT系统(VivaCT 40; Scanco)提供的软件进行。在股骨中,皮质骨体积(Ct.Vo)和皮质厚度(Ct.Th)在中间骨干参考点的帮助下分析,其中感兴趣区域(region of interest, ROI)为1.0 mm。小梁骨区域参考点在生长板接合处,偏移2.0 mm为ROI。在定义的ROI中分析以下3D参数,包括相对于总体积的骨量(BV/TV, %)、小梁数量(Tb.N)、小梁厚度(Tb.Th)、小梁间距(Tb.Sp)、连接密度(Conn.D)、结构模型指数(structural model index, SMI)和骨密度(bone mineral density, BMD)。

1.3 骨力学性能测试

根据先前的方法通过三点弯曲测试评估所有骨样品的股骨强度。将每只大鼠的股骨在-80℃从存储器中取出,并使用卡尺测量长度。使用小数点后4位数字标尺确定骨的水合重量。标本被放置在两个支撑(12 mm),并弯曲直到通过降低位于中间轴处的十字头而断裂。从载荷放置曲线获得峰值载荷(N)和极限刚度(N/mm)。

1.4 统计学分析

研究数据使用均数±标准差表示($\bar{x} \pm s$);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

治疗12个月,3组大鼠股骨的骨密度如表1所示。给予酒精干预12周,模型组较对照组大鼠的骨密度显著降低,比较差异有统计学意义($P < 0.05$);使用RES治疗的治疗组其骨密度较对照组显著升高,比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。这表明RES

对酒精干预的雄性大鼠的骨密度有一定的保护作用。

表 1 不同组别股骨的小梁微结构和皮质参数比较

Table 1 Comparison of trabecular microstructure and cortical parameters of femur in different groups

组别	总体积的骨量/%	骨小梁数量/(1/mm)	小梁厚度/ μm	小梁分离/mm	连接密度/(1/mm ³)	结构模型指标	骨密度/(mg HA/ccm)	皮质骨量/mm ³	皮质厚度/mm
对照组	45.54±6.23	4.93±0.54	82.23±17.56	0.11±0.23	158.23±21.43	0.46±0.45	730.24±14.37	4.84±0.78	2.86±0.87
模型组	23.34±7.17*	2.89±0.85*	53.45±13.87*	0.22±0.14*	103.74±19.79*	1.76±0.29*	691.23±13.34*	5.32±0.63*	2.65±0.43*
治疗组	35.15±6.92**	4.47±0.46**	76.48±15.34**	0.14±0.13**	132.34±24.55**	1.13±0.23**	722.23±7.81**	5.11±0.73**	2.78±1.07**

注:结果以均数±标准差表示。与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,** $P<0.05$ ($n=5$ /组)。

2.2 Micro-CT 检测结果

治疗 12 周时大鼠的股骨远端的 Micro-CT 扫描结果如图 1 所示,微观参数如表 1 所示。与对照组相比,模型组的股骨骨量和小梁厚度显著降低($P<$

0.05),且小梁间距增加($P<0.05$);而治疗组上述指标明显优于模型组,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。骨组织形态计量学参数显示,RES 对去卵巢大鼠股骨骨量有保护作用。

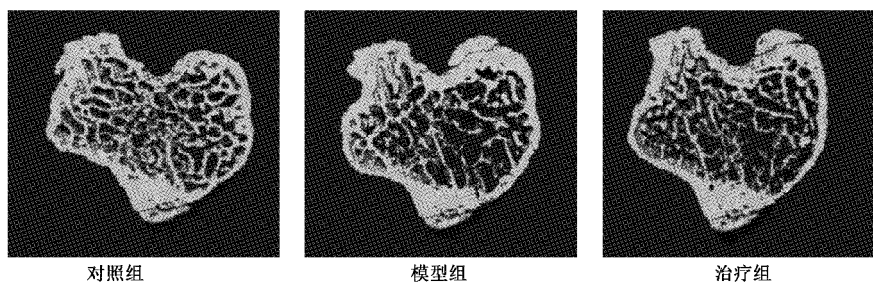


图 1 三组大鼠股骨干骺端三维重建结果

Fig.1 Three-dimensional reconstruction of femoral metaphysis in the three groups of rats

2.3 生物力学性能

生物力学测试获得的数据见图 2,对照组具有最高的极限载荷和峰值负荷;与模型组比较,治疗组极限载荷和峰值负荷明显增加,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 治疗后大鼠血清 ALP 和 OC 的影响

治疗后大鼠血清 ALP 和 OC 如图 3 所示。与对照组比较,模型组和治疗组的 ALP 和 OC 显著增加($P<0.05$)。治疗组的 ALP 和 OC 较模型组明显降低,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

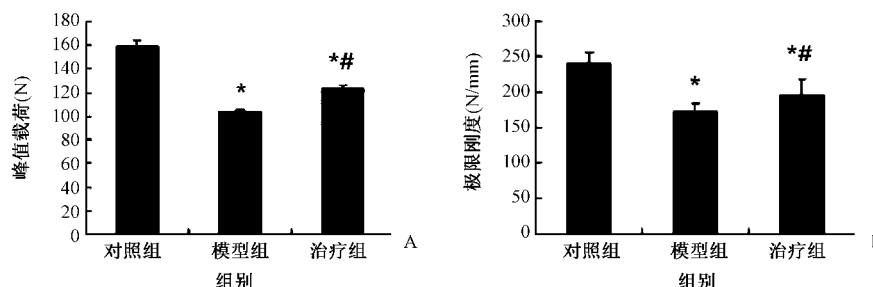


图 2 治疗对大鼠股骨生物力学的影响(与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,** $P<0.05$)。A:峰值负荷;B:极限硬度

Fig.2 Effects of treatment on femur biomechanics (Compared with the control group, * $P<0.05$; compared with the model group, ** $P<0.05$). A: Peak load; B: Ultimate hardness

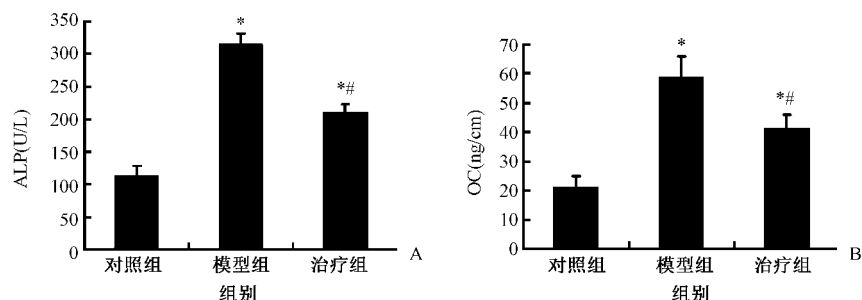


图 3 治疗对大鼠血清 ALP 和 OC 的影响 (与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$)

Fig.3 Effects of treatment on serum ALP and OC (Compared with the control group, * $P < 0.05$; compared with the model group, # $P < 0.05$)

3 讨论

作为老年人中主要存在的疾病之一,由于老年人口的增加,越来越多的人患有骨质疏松症和骨质疏松性骨折^[12]。骨质疏松症已经成为人口老龄化中的医疗保健问题,然而它尚未吸引足够的研究注意力。由于社会文明和经济的快速发展,生活水平的提高以及生活方式和习惯的改变,特别是随着城市和地区老龄化程度的加剧,骨质疏松症的发病率迅速上升,并成为老年人常见的疾病人口。近年的研究表明,酒精会导致成年人的骨质破坏,进一步明确酒精可以显著降低胫骨的骨强度^[13]。在健康的年轻女性中,饮酒与总股骨和股骨颈骨密度降低有关,男性骨密度也受到酒精干预的影响^[14]。本研究中使用酒精诱导雄性大鼠骨损伤,12 周的诱导结果显示酒精可以显著降低大鼠股骨骨强度、降低股骨骨密度和远端骨小梁的量。在本研究中,证实用中剂量白藜芦醇治疗显著增加酒精诱导骨质疏松大鼠的 BMD。本研究表明白藜芦醇可以一定程度上保护酒精对骨骼的损害。

已经注意到酒精导致的骨损伤与炎症过程之间的关系,酒精会增加的细胞因子和活性氧的产生。产生氧的自由基是有氧代谢的副产物。这一过程主要发生在线粒体中,因为电子逃逸通过电子传递链,并产生高反应性和短寿命的超氧化物。作为 ROS 最丰富的形式, H_2O_2 通过线粒体膜自由扩散到细胞质中。氧化应激是 ROS 升高的结果,ROS 损害蛋白质、脂质和 DNA,最终引发细胞死亡。在本研究中,使用酒精来诱导大鼠体内的氧化应激。已知天然多酚组分 RES 是发挥许多有益的药理作用,包括抗肿瘤、清除自由基和抗炎活性。临床和实验研究表明 RES 通过减轻氧化应激的损伤来防止骨质流失。

此外,有研究表明在 RES 处理的去卵巢大鼠中 OPG 产生增加,而 RANKL 合成降低,因此阻止了破骨细胞的形成和分化^[15]。更重要的是,RES 没有毒性作用,因此即使用于长期治疗和/或预防骨质疏松症也是安全的^[15]。本研究结果表明,通过改善氧化应激状态,RES 可以抑制了破骨细胞活性 (ALP 和 OC 水平降低),因此最终减弱了骨吸收并防止了体内的骨质流失,并且引起保护免受氧化损伤并且抑制骨质疏松症中的破骨细胞生成。

骨基质包括有机物质和无机物质。有机质主要包含胶原纤维 (主要是 I 型和 II 型胶原纤维) 和少量非晶基质。无机物是指骨矿物质,包括结晶羟基磷灰石和无定形胶体钙磷。胶原纤维是构成骨骼结构并维持骨骼机械强度的基质蛋白质。因此,骨形成等同于骨矿化,指的是无定形磷酸钙及其骨矿物质定期沉积在骨有机质间隙中的过程^[16]。研究表明,雌激素促进 I 型成骨细胞胶原蛋白、碱性磷酸酶和转化生长因子的分泌,从而促进骨形成^[17]。目前的研究发现,酒精诱导的骨质疏松症大鼠的血清 ALP 和 OC 水平明显升高。同样,已经有研究表明白藜芦醇通过抑制年轻大鼠中 ALP 水平的介导促进骨生长^[17]。本研究中 RES 治疗后大鼠的血清 ALP 和 OC 水平明显降低,这和去卵巢诱导大鼠骨质疏松结果相似^[17]。

这项研究采用了酒精诱导雄性大鼠骨质疏松模型,显示酒精对骨骼有不良影响。酒精可以显著降低骨骼生物力学性能。RES 可以显著保护酒精诱导雄性大鼠骨强度和骨密度以及骨量。但是本研究也有其不足之处,首先大鼠的年龄较轻且大鼠数量很少,研究时间较短,后期加大研究时间和样本量以及进一步的机制研究显得有必要。

(下转第 181 页)

- [10] Strollo R, Rizzo P, Spoletini M, et al. HLA-dependent autoantibodies against post-translationally modified collagen type II in type 1 diabetes mellitus [J]. *Diabetologia*, 2013, 6 (3): 563-572.
- [11] Ma XY, Chen FQ, Hong H, et al. The relationship between serum osteocalcin concentration and glucose and lipid metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus-the role of osteocalcin in energy metabolism [J]. *Ann Nutr Metab*, 2015, 66 (2-3): 110-116.
- [12] Kostoglou-Athanassiou I, Athanassiou P, Gkoutouvas A, et al. Vitamin D and glycemic control in diabetes mellitus type 2 [J]. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2013(4):122-128.
- [13] Munasinghe LL, Mastroeni MF, Mastroeni SSBS, et al. The Association of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and elevated glycated hemoglobin values: a longitudinal study of non-diabetic participants of a preventive health program [J]. *Nutrients*, 2017,9(7):640.
- [14] Yoshikawa Y, Kode A, Xu L, et al. Genetic Evidence Points to an Osteocalcin-independent Influence of Osteoblasts on Energy Metabolism [J]. *J Bone Miner Res*, 2011,26(9):2012-2025.

(收稿日期: 2018-10-15;修回日期: 2018-12-18)

(上接第 177 页)

【参 考 文 献】

- [1] Organization WH. Global status report on alcohol and health 2014 [J]. *Global Status Report on Alcohol*, 2014,18(7): 1-57.
- [2] Yun JW, Son MJ, Abdelmegeed MA, et al. Binge alcohol promotes hypoxic liver injury through a CYP2E1-HIF-1 α -dependent apoptosis pathway in mice and humans [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2014,77: 183-194.
- [3] Turner RT. Skeletal Response to Alcohol [J]. *Alcoholism Clinical & Experimental Research*, 2010,24(11): 1693-1701.
- [4] Chakkalakal DA. Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair [J]. *Alcoholism Clinical & Experimental Research*, 2005, 29(12): 2077-2090.
- [5] Albano E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage [J]. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2006,65(3): 278-290.
- [6] Gonzálezreimers E, Santolariafernández F, Martínezgonzález MC, et al. Alcoholism: A systemic proinflammatory condition [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014,20(40): 14660-14671.
- [7] Bhattarai G, Poudel SB, Kook SH, et al. Resveratrol prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis [J]. *Acta Biomaterialia*, 2015,29: 398-408.
- [8] Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, et al. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007,292(5): H2417.
- [9] Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, et al. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010,299(1): H18.
- [10] Cottart CH, Nivetantoine V, Laguilliermorizot C, et al. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010,54(1): 7-16.
- [11] Syuhada Z, Sitizulaikha MH, Yinghwey K, et al. Vitamin E improved bone strength and bone minerals in male rats given alcohol [J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2017,20 (12): 1360-1367.
- [12] 陶周善, 周皖舒, 江云云, 等. 骨形成蛋白联合雷奈酸锆对成骨细胞增殖和分化的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(2):165-169.
- [13] Sharlina M, Nazrun SA, Afian MS, et al. Tocotrienol supplementation improves late-phase fracture healing compared to alpha-tocopherol in a rat model of postmenopausal osteoporosis: a biomechanical evaluation [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012,2012(2039): 372878.
- [14] Paccou J, Edwards MH, Ward K, et al. Relationships between bone geometry, volumetric bone mineral density and bone microarchitecture of the distal radius and tibia with alcohol consumption [J]. *Bone*, 2015,78: 122-129.
- [15] Feng YL, Jiang XT, Ma FF, et al. Resveratrol prevents osteoporosis by upregulating FoxO1 transcriptional activity [J]. *Int J Mol Med*, 2018,41(1): 202.
- [16] Levaot N, Simoncic PD, Dimitriou ID, et al. 3BP2-deficient mice are osteoporotic with impaired osteoblast and osteoclast functions [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121 (8): 3244.
- [17] Wang X, Chen L, Peng W. Protective effects of resveratrol on osteoporosis via activation of the SIRT1-NF- κ B signaling pathway in rats [J]. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 2017, 14 (5): 5032.

(收稿日期: 2018-04-14;修回日期: 2018-07-07)