论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201504072

锁阳多糖对去卵巢大鼠骨质疏松的改善作用

史 平,朱 薇,李晓鸣 (730030 兰州,兰州大学第二医院病理科)

[摘要] **目的** 观察锁阳多糖对去卵巢大鼠骨质疏松的作用并探讨其机制。**方法** 雌性SD大鼠分为假手术组、造模组。术后2个月造模组分为模型组、阳性对照组、锁阳多糖治疗组,每组10只。治疗组灌胃给予锁阳多糖(20、40、80 mg/kg),阳性药组灌胃给予尼尔雌醇(1.5 mg/kg),每日1次,连续给药12周。ELISA法检测血清雌二醇(E_2)、骨钙素(BGP)、降钙素(CT)及尿液脱氧吡啶啉(DPD)的含量,双能X线骨密度检测仪检测腰椎及股骨的骨矿物密度(BMD),三点弯曲法测定胫骨生物力学,Western blot检测大鼠股骨组织中骨保护素(OPG)及核因子-κB受体活化因子配体(RANKL)蛋白的表达。**结果** 摘除卵巢后模型组大鼠血清中E_2、CT显著下降($P<0.05$,$P<0.01$),血清BGP及尿液DPD含量则显著升高($P<0.01$),中、高剂量锁阳多糖及尼尔雌醇能够显著升高血清E_2、CT含量($P<0.05$),降低血清BGP及尿液DPD含量($P<0.01$);锁阳多糖及尼尔雌醇能够逆转去卵巢大鼠腰椎和股骨BMD的降低($P<0.01$),改善胫骨生物学特性中的最大载荷及最大应力降低的趋势($P<0.05$,$P<0.01$),并能增强OPG蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$),降低RANKL蛋白表达($P<0.01$),升高OPG/RANKL比值($P<0.01$)。**结论** 锁阳多糖有明显抗去卵巢大鼠骨质疏松的作用,其机制可能与其调节E_2,CT、BGP和DPD水平,激活OPG/RANK/RANKL信号系统有关。

[关键词] 锁阳多糖;骨质疏松;去卵巢大鼠;BGP;BMD;OPG/RANKL
[中图法分类号] R285.5; R681.01; R711.51 [文献标志码] A

Cynomorium Songaricum polysaccharide improves osteoporosis in ovariectomized rats

Shi Ping, Zhu Wei, Li Xiaoming (Department of Pathology, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730030, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of *Cynomorium Songaricum* polysaccharide (CSP) on the osteoporotic (OVX) rats by ovariectomization. **Methods** Female SD rats were randomly given sham operation or ovariectomization, and then the model group were further divided into model group, positive control groups, and CSP treatment groups. The rats from the CSP treatment group were fed intragastrically with CSP at a dose of 20, 40 and 80 mg/kg, respectively, and those of the positive control group were with nilestriol (1.5 mg/kg) respectively, with 10 rats in each dose group, once per day for 12 consecutive weeks. The serum contents of estradiol (E_2), boneglaprotein (BGP), calcitonin (CT) and urinary deoxypyridinoline (DPD) were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The bone mineral density (BMD) in the lumbar spine and femur was analyzed by dual energy X-ray absorptiometry (DEXA), and bone biomechanical properties of tibia were measured by the three-point bending test. The expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) in the femur was analyzed by Western blotting. **Results** Compared with the sham operation group, the serum levels of E_2 and CT were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), while the contents of BGP and DPD were significantly

[基金项目] 甘肃省科技支撑项目(1304FKCA122)
[通信作者] 李晓鸣,E-mail:lzulxm@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151016.1043.001.html(2015-10-16)

increased ($P<0.01$) in the OVX rats. While, the medium and high doses of CSP and nylestriol significantly elevated E_2 and CT ($P<0.05$), and decreased BGP and DPD ($P<0.01$). The CSP and nylestriol reversed the reduction of BMD in the lumbar spine and femur ($P<0.01$), effectively improved the tibial maximum load and maximum stress ($P<0.05$, $P<0.01$), enhanced the expression of OPG ($P<0.05$, $P<0.01$), lowered the level of RANKL protein ($P<0.01$). and elevated OPG/RANKL ratio ($P<0.01$). **Conclusion** CSP exerts potential antiosteoporotic effects on OVX induced postmenopausal osteoporosis. The mechanism may be related to the regulation of E_2, CT, BGP and DPD, and activation of OPG/RANK/RANKL signaling system.

[**Key words**] *Cynomorium Songaricum* polysaccharide; osteoporosis; ovariectomized rats; boneglaprotein; bone mineral density; osteoprotegerin/receptor activator of NF-κB ligand

Supported by the Supporting Project of Science and Technology of Gansu Province (1304FKCA122). Corresponding author: Li Xiaoming, E-mail: lzulxm@163.com

对绝经后骨质疏松(postmenopausal,PMO)的治疗方法主要是雌激素和孕激素为主的激素替代疗法(HRT),但长期使用有一定副作用[1]。锁阳科植物锁阳(cynomoriumsongaricumrupr.)主要分布于我国西北地区,具有补肾阳、益精血之效。研究表明,锁阳水煎液对PMO具有一定的防治作用,但尚缺乏其具体作用物质基础的研究[2]。锁阳多糖(cynomoriumsongaricum polysaccharide,CSP)为锁阳的主要药理活性成分之一,目前已在老年保健领域广泛应用[3]。本研究拟探讨锁阳多糖防治去卵巢大鼠骨质疏作用及机制。

1 材料

1.1 实验动物

3月龄雌性SD系大鼠,购自协和医学院医学实验动物中心,合格证号:SKXK2013-000141。

1.2 药品及试剂

锁阳多糖购自陕西澳源生物技术有限公司,多糖含量≥97%。大鼠骨钙素(BGP)及降钙素(CT)ELISA试剂盒购自上海研谨生物科技有限公司,尼尔雌醇、雌二醇(E_2)及脱氧吡啶啉(DPD)ELISA检测试剂盒购自上海广锐生物科技有限公司,兔抗大鼠骨保护素(OPG)及核因子-κB受体活化因子配体(RANKL)抗体、β-actin抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 实验设备

MultiskanMk3酶标仪(Thermo美国),双能X线骨密度检测仪(Lunar美国),微机控制电子式万能实验机(CMT4000系列)(深圳市新三思材料检测有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 分组及处理 选取60只3月龄雌性SD大鼠,适应环境3 d后分假手术组和造模组。绝经后大鼠骨质疏松动物模型根据文献[1]摘除大鼠双侧卵巢复制,假手术组不摘除卵巢。术后2个月,造模组动物分为模型组、阳性对照组、锁阳多糖治疗组。治疗组分别灌胃给予20、40、80 mg/kg锁阳多糖,阳性对照组灌胃给予尼尔雌醇1.5 mg/kg,假手术组及模型组给予同体积的蒸馏水,每日1次,连续给药12周。药物浓度设置参考文献[4]。

1.4.2 血液及尿液生化指标检测 末次给药后大鼠禁食不禁水过夜,收集大鼠24 h总尿液量,4 ℃,1 500 r/min离心10 min,留取上清,分装,-20 ℃保存备用。麻醉动物取股动脉血,静置于37 ℃温水中20 min后,离心(1 500 r/min,15 min,4 ℃)分离取上清液,分装,-20 ℃保存备用。外周E_2、BGP、CT及尿液中DPD含量采用ELISA免疫学方法进行测定,检测时根据试剂盒说明书进行。

1.4.3 骨密度BMD和骨生物力学的测定 动物处死后取右股骨、第四腰椎骨、胫骨,剔尽软组织,以盐水纱布包裹于-4 ℃冰箱保存备用。测定时骨组织自然恢复至室温,使用双能X线骨密度仪进行骨密度测定;采用三点弯曲法测定胫骨骨生物力学,测定时跨度20 mm,以10 mm/min加载速率下压胫骨中段,直至胫骨发生断裂,测出胫骨的最大载荷、最大应力。

1.4.4 Western blot检测OPG/RANKL蛋白表达 动物处死后取左股骨,剔尽软组织,分组密封于液氮中冷冻数小时后,粉碎,加液氮充分研磨,根据骨组织蛋白提取试剂盒说明书提取总蛋白,BCA法测定蛋白质的含量。实验时,规定上样量为50 μg,电泳结束后PVDF膜于5% 脱脂奶粉的TBST缓冲液中封闭2 h,置于含一抗(1∶1 000,兔抗鼠OPG,RANKL抗体)的TBST缓冲液中4 ℃过夜,加入二抗(1∶1 000;辣根过氧化物酶标记)于室温下孵育2 h,增强化学发光法(ECL)进行显色反应,应用Image Pro Plus 6.0软件分析条带的积分光密度(integrated optical density IOD)。

1.5 统计学分析

实验结果以$\bar{x}\pm s$表示,利用SPSS 15.0统计软件

分析。各组间进行单因素方差分析,各组间两两比较采用 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 大鼠血清 E_2、BGP、CT 及尿液 DPD 含量

如表1所示,与假手术组相比,模型组大鼠血清 E_2、CT 含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),BGP、DPD 含量明显升高($P<0.01$);给予中、高剂量的锁阳多糖及尼尔雌醇治疗后 E_2、CT 含量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),BGP、DPD 含量明显降低($P<0.01$)。小剂量锁阳多糖能够升高 E_2的含量,差异具有统计学意义($P<0.05$),但对 BGP、CT、DPD 的变化没有影响($P>0.05$)。

2.2 大鼠骨密度 BMD 和骨生物力学测定

如表2所示,与假手术组相比,模型组大鼠腰椎、右股骨的 BMD 值均有降低($P<0.01$),给予中、高剂量的锁阳多糖及尼尔雌醇治疗后 BMD 值逐渐升高,差异具有统计学意义($P<0.01$),各剂量锁阳多糖与尼尔雌醇之间没有差异($P>0.05$)。

如表3所示,与假手术组相比,模型组大鼠胫骨的最大载荷及最大应力均显著下降($P<0.05$),给予中、高剂量的锁阳多糖及尼尔雌醇治疗后最大载荷及最大应力有增高趋势,差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。

表1 锁阳多糖对骨质疏松大鼠血清 E_2、BGP、CT 及尿液 DPD 含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量	E_2(ng/mL)	BGP(ng/mL)	CT(ng/mL)	DPD(nmol/L)
假手术组	-	2.49±0.61	7.09±0.74	8.03±0.67	21.56±1.45
模型组	-	1.14±0.09[a]	11.98±0.86[b]	5.61±0.39[b]	39.64±2.29[b]
尼尔雌醇组	1.5 mg/kg	2.33±0.49[d]	7.20±0.56[d]	7.86±0.49[d]	22.36±1.94[d]
CSP 低剂量组	20 mg/kg	1.86±0.12[c]	11.05±0.93	5.78±0.57	35.12±2.36
CSP 中剂量组	40 mg/kg	2.05±0.42[c]	8.21±0.74[d]	6.24±0.20[c]	29.65±1.36[d]
CSP 高剂量组	80 mg/kg	2.54±0.23[d]	7.39±0.82[d]	6.86±0.37[d]	23.87±2.16[d]

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$, 与假手术组比较; c:$P<0.05$, d:$P<0.01$, 与模型组比较

表2 锁阳多糖对骨质疏松大鼠骨密度 BMD 的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量	BMD	
		腰椎	股骨
假手术组	-	1.08±0.08	0.91±0.19
模型组	-	0.57±0.12[a]	0.48±0.12[a]
尼尔雌醇组	1.5 mg/kg	0.60±0.08[b]	0.55±0.10[b]
CSP 低剂量组	20 mg/kg	0.78±0.11	0.74±0.15
CSP 中剂量组	40 mg/kg	0.88±0.10[b]	0.80±0.10[b]
CSP 高剂量组	80 mg/kg	1.07±0.18[b]	0.87±0.16[b]

a:$P<0.01$, 与假手术组比较; b:$P<0.01$, 与模型组比较

表3 锁阳多糖对骨质疏松大鼠胫骨生物力学的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

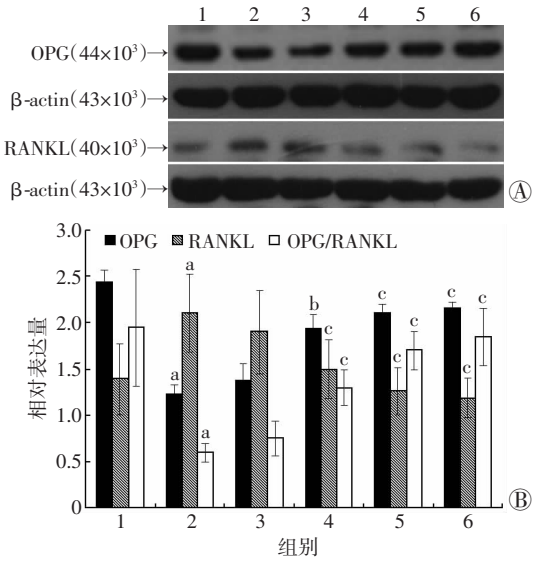
组别	剂量	最大载荷(N)	最大应力(MPa)
假手术组	-	155.01±12.92	189.21±12.36
模型组	-	102.37±10.45[a]	90.26±9.32[b]
尼尔雌醇组	1.5 mg/kg	130.99±12.47[d]	175.24±10.23
CSP 低剂量组	20 mg/kg	112.78±10.36	115.67±13.69
CSP 中剂量组	40 mg/kg	124.39±11.29[d]	169.72±15.34[c]
CSP 高剂量组	80 mg/kg	135.30±10.56[d]	185.97±14.75[d]

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$, 与假手术组比较; c:$P<0.05$, d:$P<0.01$, 与模型组比较

2.3 大鼠股骨组织中 OPG/RANKL 蛋白的表达

如图1所示,与假手术组相比,模型组大鼠左股骨组织中的 OPG 蛋白含量明显下降,RANKL 蛋白含量则明显升高($P<0.05$);与模型组相比较,连续给药锁阳多糖中剂量、高剂量及尼尔雌醇12周均能明显升高 OPG 蛋白的表达水平,同时显著降低 RANKL 蛋白的表达($P<0.05$, $P<0.01$)。

如图1所示,与假手术组相比,模型组大鼠左股骨组织中 OPG/RANKL 蛋白表达比值下降,连续给药锁阳多糖中、高剂量及尼尔雌醇12周能明显升高 OPG/RANKL 蛋白表达比值($P<0.01$)。



1:假手术组;2:模型组;3:CSP 20 mg/kg 组;4:CSP 40 mg/kg 组;5:CSP 80 mg/kg 组;6:尼尔雌醇组

a:$P<0.01$, 与假手术组比较; b:$P<0.05$, c:$P<0.01$, 与模型组比较

A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果

图1 锁阳多糖对骨质疏松大鼠股骨组织中 OPG 及 RANKL 蛋白表达及 OPG/RANKL 比值的影响

3 讨论

BGP 是由成骨细胞(osteoblast, OB)分化时分泌

的一种非胶原蛋白质,能够促进骨组织矿物质沉积的正常钙化过程,被认为是反映成骨细胞活性、骨转换和骨形成的特异指标[5-6]。骨更新率越快,BGP值越高,反之降低。DPD是骨的Ⅰ型胶原的分解产物,骨吸收过程中,DPD释放到血液中,直接以原形经肾脏排泄到尿中,不受食物成分或药物的影响,其含量受破骨细胞(osteoclast,OC)活力影响 ,是检测骨吸收的指标之一[7]。本研究发现,与假手术组比较,去除卵巢之的大鼠血清中BGP及尿液中DPD排泄量升高,说明模型组大鼠的骨形成与骨吸收都明显增强,与临床上绝经之后妇女所表现出的高骨转换状态一致[8-9]。给予锁阳多糖治疗后,中高剂量锁阳多糖组血清BGP及尿液DPD含量出现逆转趋势,并且锁阳多糖的逆转趋势与尼尔雌醇类似。上述结果说明锁阳多糖具有类似与雌激素的作用,通过降低去卵巢后骨质疏松大鼠破骨细胞活性的升高,抑制高骨转换率来减少骨量的丢失起到防治骨质疏松的作用。

CT由甲状腺C细胞产生,直接作用于破骨细胞前体,具有抑制骨吸收,降低血钙、减少骨钙丢失的生理作用。雌激素也是调节钙平衡的重要激素之一[10]。本研究发现摘除卵巢的大鼠血清E_2及CT水平显著下降,用锁阳多糖及外源性的雌激素尼尔雌醇治疗之后,E_2及CT水平回升,提示锁阳多糖能够通过增加E_2、CT水平,刺激成骨细胞的形成,调节成骨细胞的活性,从而抑制骨吸收,促进骨生成。

本研究中,模型组大鼠的骨密度降低,骨的最大载荷和最大应力降低,表明摘除卵巢后雌激素水平下降,骨转换率增高,但是由于骨形成低于骨吸收导致使骨量减少,构成骨的材料质量恶化,导致了生物力学性能的下降。再给予锁阳多糖治疗后,能够有效地能提高骨密度,改善骨质疏松症雌鼠的生物力学性能。研究发现治疗组及尼尔雌醇组大鼠胫骨外在强度特性,即最大载荷的值仍低于假手术组,而胫骨内在特性,即最大应力的值不低于假手术组。说明锁阳多糖提高骨外在强度特性(即降低骨脆性)的作用弱于提高骨内在强度特性(即增加骨强度)的作用。类似现象在其他药物研究中也有发现[11]。

OPG主要由OB细胞产生,作为RANKL的饵受体[8],通过竞争性地与RANKL结合,阻止破骨细胞的成熟分化。OPG/RANK/RANKL系统调控破骨细胞分化、成熟、凋亡,在骨代谢中具有重要作用[12]。在本研究中,锁阳多糖通过增加OPG蛋白的表达,抑制RANKL蛋白的表达,从而增加OPG/RANKL比值起到防治骨质疏松的作用。

本研究结果提示,锁阳多糖有明显抗去卵巢大鼠骨质疏松的作用,其机制可能是增加雌激素的分泌,刺激成骨细胞的分化,增加OPG/RANKL比值抑制破骨细胞活性,调节骨钙素水平以降低骨转换率,恢复骨形成与骨吸收之间平衡,减少骨量丢失,同时增加骨密度及提高胫骨生物力学性能,降低骨脆性及骨折风险。

参考文献:

[1] Chlebowski R T, Anderson G L, Gass M, *et al*. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women[J]. JAMA, 2010, 304(15): 1684-1692.
[2] 于舒雁, 刘会丽, 苗明三. 锁阳的现代研究及展望[J]. 中医学报, 2012, 27(1): 79-81.
[3] 王晓梅, 张倩, 热娜, 等. 锁阳全草化学成分的研究[J]. 中草药, 2011, 42(3): 458-460.
[4] 马丽杰. 锁阳多糖延缓衰老的作用及端粒酶调控机制研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2009.
[5] Terauchi M. Role of the immune system in the pathophysiology of postmenopausal osteoporosis[J]. Nihon Rinsho, 2011, 69(7): 1215-1219.
[6] Rachner T D, Khosla S, Hofbauer L C. Osteoporosis: now and the future[J]. Lancet, 2011, 377(9773): 1276-1287.
[7] Rossini M, Di-Munno O, Gatti D, *et al*. Optimising bisphosphonate treatment outcomes in postmenopausal osteoporosis: review and Italian experience[J]. Clin Exp Rheumatol, 2011, 29(4): 728-735.
[8] Liang H D, Yu F, Tong Z H, *et al*. Cistanches Herba aqueous extract affecting serum BGP and TRAP and bone marrow Smad1 mRNA, Smad5 mRNA, TGF-β1 mRNA and TIEG1 mRNA expression levels in osteoporosis disease[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(2): 757-763.
[9] Xu H, Xiao W, Luo D, *et al*. Association analysis of genetic polymorphisms and potential interaction of the osteocalcin (BGP) and ER-alpha genes with body mass index (BMI) in premenopausal Chinese women[J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(4): 455-460.
[10] Stovall D W, Pinkerton J V. Estrogen agonists/antagonists in combination with estrogen for prevention and treatment of menopause-associated signs and symptoms[J]. Womens Health (Lond Engl), 2008, 4(3): 257-268.
[11] Cheng Z, Yao W, Zimmermann E A, *et al*. Prolonged treatments with antiresorptive agents and PTH have different effects on bone strength and the degree of mineralization in old estrogen-deficient osteoporotic rats[J]. J Bone Miner Res, 2009, 24(2): 209-220.
[12] Wasilewska A, Rybi-Szuminska A A, Zoch-Zwierz W. Serum osteoprotegrin (OPG) and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANKL) in healthy children and adolescents[J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2009, 22(12): 1099-1104.

(**收稿**:2015-04-14;**修回**:2015-04-30)
(编辑 王小寒)