DOI:10.16016/j.2097-0927.202107081

松脂醇二葡萄糖苷对生长期大鼠骨质量的影响

谢高倩[1,2],高玉海[2],柏 鑫[2],何玥颖[2],陈克明[1,2] 730070 兰州,甘肃农业大学生命科学技术学院[1];730050 兰州,中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院基础医学实验室[2]

[**摘要**] **目的** 研究松脂醇二葡萄糖苷(pinoresinol diglucoside,PDG)对生长期大鼠骨质量的影响,评价其应用于抗骨质疏松药物的潜力。**方法** 将30只1月龄雌性SD大鼠按随机数字表法分为3组:对照组(Control)、25 mg/(kg·d)的PDG处理组(PDG-25)和50 mg/(kg·d)的PDG处理组(PDG-50),体质量(107±7)g,每组10只。Control组每天灌服等体积蒸馏水,PDG-25组和PDG-50组分别每天灌服25 mg/kg和50 mg/kg的PDG。第2、4、6周后检测大鼠全身骨密度。之后处死所有大鼠,计算重要器官的器官系数,进行micro CT扫描、骨生物力学实验以及血清骨代谢生化指标检测等。**结果** 各组大鼠体质量和主要器官系数差异无统计学意义;6周时PDG-25组和PDG-50组的全身骨密度均显著高于Control组($P<0.05$);PDG-50组的相对骨体积、骨小梁数和体积骨密度显著高于Control组($P<0.05$),骨小梁分离度显著低于Control组($P<0.05$),PDG-25组和PDG-50组的骨微结构均明显优于Control组;PDG-50组的股骨弹性模量和椎骨最大载荷显著高于Control组($P<0.05$);PDG-50组血清骨钙素含量显著高于Control组($P<0.01$),但血清抗酒石酸酸性磷酸酶5b含量显著低于Control组($P<0.01$),PDG-25组血清骨钙素含量显著高于Control组($P<0.05$)。**结论** PDG能有效提高生长期大鼠的骨密度、优化骨微结构、增强骨强度、促进骨形成的同时抑制骨吸收,提高骨质量。

[**关键词**] 松脂醇二葡萄糖苷;骨密度;骨代谢;生长和发育
[**中图法分类号**] R285.5; R322.71; R681.01 [**文献标志码**] A

Effect of pinoresinol diglucoside on bone quality in growing rats

XIE Gaoqian[1,2], GAO Yuhai[2], BAI Xin[2], HE Yueying[2], CHEN Keming[1,2] [1]College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu Province, 730070; [2]Basic Medical Laboratory, No. 940 Hospital of Joint Logistics Support force of Chinese PLA, Lanzhou, Gansu Province, 730050, China

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of pinoresinol diglucoside (PDG) on bone quality in growing rats and evaluate its potential as an anti-osteoporosis drug. **Methods** A total of 30 1-month-old female SD rats (body weight 107±7 g) were randomly divided into 3 groups: control group (Control), 25 mg/(kg·d) PDG treatment group (PDG-25) and 50 mg/(kg·d) PDG treatment group (PDG-50), with 10 rats in each group. The rats in the PDG-25 group and PDG-50 group were given corresponding doses of PDG intragastrically every day, and those of the control group was given equal volume distilled water. Their body mineral density (BMD) of the whole body was measured in 2, 4 and 6 weeks after treatment. In the end of 6 weeks, all rats were sacrificed, and organ coefficients of important organs were calculated. Micro-CT scanning, bone biomechanical test and serum biochemical tests of bone metabolism were performed. **Results** There were no significant differences in body weight and main organ coefficients among the groups. At 6 weeks, the BMD value was significantly higher in the PDG-25 group and PDG-50 group than the Control

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81770879);军队后勤科研计划(CLB18J028);联勤保障部队第九四〇医院青年培育项目(2021yxky053)
[**通信作者**] 陈克明,E-mail:chenkm@lut.cn

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

group ($P<0.05$). The PDG-50 group had significantly higher relative bone volume, trabecular number and volumetric bone mineral density ($P<0.05$), lower trabecular separation ($P<0.05$) than the Control group, and the bone microstructure of PDG-25 group and PDG-50 group was significantly better than that of Control group. The PDG-50 group had elevated elastic modulus of femur ($P<0.05$), larger maximum load of vertebrae ($P<0.05$). The PDG-50 group had increased content of serum osteocalcin ($P<0.01$), but obviously lower content of serum tartrate resistant acid phosphatase 5b ($P<0.01$), when compared with the Control group. The content of serum osteocalcin in the PDG-25 group was significantly higher than that in the Control group ($P<0.05$). **Conclusion** PDG can effectively improve bone mineral density, optimize bone microstructure, enhance bone strength, promote bone formation, inhibit bone resorption and improve bone quality.

[**Key words**] pinoresinol diglucoside; bone density; bone metabolism; growth and development

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81770879), the Military Logistic Scientific Research Plan (CLB18J028), and the Youth Cultivation Project of No. 940 Hospital of Joint Logistics Support Force (2021yxky053). Corresponding author: CHEN Keming, E-mail: chenkm@lut.cn

骨质疏松症(osteoporosis,OP)是一种以低骨量和骨结构破坏,导致骨强度下降和骨折风险增加为特征的慢性疾病。OP 也被认为是一种隐匿性疾病,在第一次骨折发生之前通常没有症状[1]。鉴于人口结构的变化,OP 正成为全球卫生保健的一个日益沉重的问题[2]。目前已有一系列治疗骨质疏松的方法,临床上常用的药物如雌激素、双膦酸盐类以及降钙素等,这些药物的长期使用会产生众多不良反应[3]。已有研究表明,以大豆异黄酮等为代表的植物雌激素能安全有效地防治 OP[4]。松脂醇二葡萄糖苷(pinoresinol diglucoside,PDG)是中药杜仲的主要活性成分之一,属于木脂素类化合物,大部分的植物木脂素具有雌激素活性[5],且本课题组前期实验已证明 PDG 能促进体外培养成骨细胞(osteoblast,OB)的成骨性分化,增加钙化结节的生成面积并提高成骨相关基因蛋白的表达水平[6]。本研究在前期细胞水平研究的基础上,从动物水平探究灌服 PDG 对生长期大鼠全身骨密度和其他骨代谢指标的影响,进一步探讨其在防治骨质疏松中的潜在应用价值。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

松脂醇二葡萄糖苷(成都仪睿生物科技有限公司,产品批号:YRS003-210301);骨钙素(OCN)定量检测试剂盒(泉州睿信生物科技有限公司,产品批号:20210514-30405B);抗酒石酸酸性磷酸酶 5b(TRACP-5b)定量检测试剂盒(泉州睿信生物科技有限公司,产品批号:20210518-35628B);双能 X 线骨密度仪(美国,GE 公司);AG-IS 万能台式力学试验机(日本,岛津公司);microCT(德国,Bruker 公司,型号:SkyScan 1276)。

1.2 实验动物与分组处理

1 月龄 SPF 级 SD 雌性大鼠 30 只,体质量(107±7)g,购于斯贝福(北京)生物有限公司,合格证号:SCXK(京)2019-0010。饲养于联勤保障部队第九四〇医院 SPF 级动物实验中心,许可证编号:SYXK(军)2017-0047。30 只大鼠按随机数字表法分为 Control 组、PDG-25 组和 PDG-50 组。PDG-25 组、PDG-50 组分别每天灌服 25、50 mg/kg PDG,Control 组灌服等体积蒸馏水。灌胃时间为每周一至周六上午 9:00-11:00。实验期间不限制饮水与进食,每周测 1 次大鼠体质量,每 2 周测 1 次全身骨密度,待第 6 周给药组全身骨密度显著高于对照组后,处死所有大鼠并取材。

1.3 骨密度检测

将 10%水合氯醛以 3 mL/kg 的剂量腹腔注射于实验大鼠体内,待麻醉成功后用双能 X 线骨密度仪检测全身骨密度。

1.4 microCT 分析

将新鲜剥离的右侧胫骨采用 4%多聚甲醛固定后放于 4 ℃冰箱。扫描分析时的参数为:射线管电流 200 μA,电压 85 kV,扫描分辨率 10 μm,曝光时间 384 ms,扫描角度 180°。扫描得到原始图像后,使用三维重建软件 NRecon(软件版本 V1.7.4.2,德国,Bruker 公司)对原始图像进行选择区域的重建。得到横截面图、最大剖面图以及骨形态参数包括相对骨体积、骨小梁数、骨小梁分离度和体积骨密度。

1.5 生物力学检测

新鲜剥离的右侧股骨和椎骨用浸润生理盐水的纱布包裹,冻存于-20 ℃,检测时置于常温下自然解冻。将右侧股骨横放于 AG-IS 万能台式力学试验机进行三点弯曲实验,跨距设为 15 mm,加载速度为 2 mm/min,

测得最大载荷和弹性模量。剪取第 3 腰椎,除去多余的软组织,磨平上下两端并修剪成似圆柱体,立于 AG-IS 万能台式力学试验机上进行压缩试验,加载速度为 2 mm/min,测得最大载荷和弹性模量。

1.6 血清生化指标检测

自大鼠腹主动脉采集血样,4 000 r/min 离心 15 min 后取上清,保存于-80 ℃的冰箱中。自然解冻后,用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 450 nm 处的光密度值,按说明书绘制标准曲线并计算出骨钙素(osteocalcin,OCN)和抗酒石酸酸性磷酸酶 5b(tartrate resistant acid phosphatase-5b,TRACP-5b)的含量,结果表示为 ng/mL。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 23.0 统计软件进行单因素方差分析和方差齐性检验,所得数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,选取 LSD 法分析多组间差异。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PDG 对大鼠体质量无明显影响

第 1~3 周,3 组大鼠体质量都呈快速增长,从第 3 周直至实验结束,所有大鼠体质量增长速率变缓,各组间差异无统计学意义(图 1)。提示灌服 PDG 对大鼠体质量无明显影响。

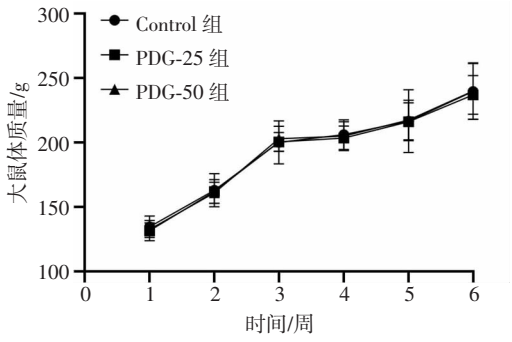


图 1 各组大鼠体质量变化情况 ($n=10$)

2.2 PDG 对大鼠脏器无明显影响

肉眼观察新鲜剥离的心、肝、脾、肺、双肾以及子宫,未见明显病理学改变。称量并计算脏器系数,各组间差异无统计学意义,见图 2。表明 PDG 对大鼠主要器官脏器系数无明显影响。

2.3 PDG 能有效提高大鼠全身骨密度

如图 3 所示,第 2 周和第 4 周时,3 组大鼠全身骨密度的差异无统计学意义。第 6 周时,PDG-25 组、PDG-50 组大鼠全身骨密度显著高于 Control 组($P<0.05$,$P<0.01$)。PDG-50 组虽高于 PDG-25 组,但两组间差异无统计学意义。以上结果说明 PDG 能有效提高大鼠全身骨密度。

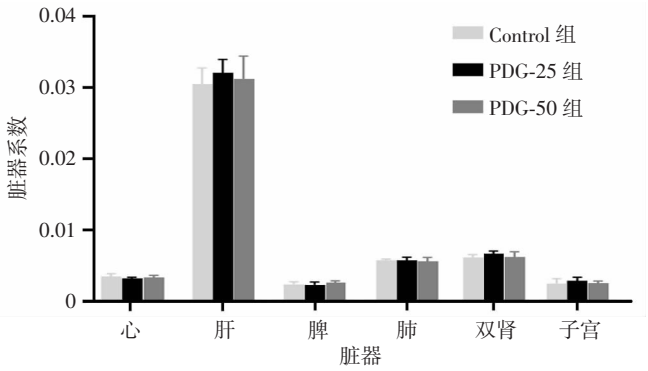
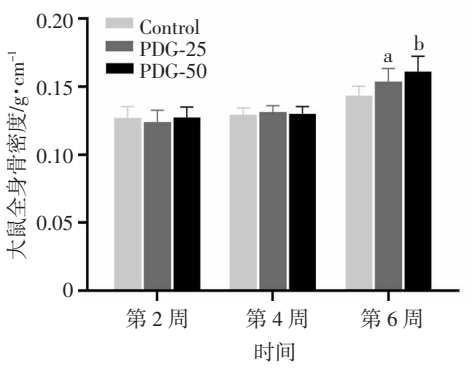


图 2 灌胃 6 周各组大鼠主要脏器系数变化 ($n=10$)



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 Control 组比较

图 3 PDG 对各组大鼠全身骨密度的影响 ($n=10$)

2.4 microCT 扫描及分析

PDG-50 组大鼠胫骨相对骨体积、骨小梁数和体积骨密度均显著高于 Control 组($P<0.05$),其骨小梁分离度显著低于 Control 组($P<0.05$),PDG-25 组骨小梁分离度低于 Control 组,但差异无统计学意义(表 1)。如图 4 所示,PDG-25 组和 PDG-50 组相比于 Control 组,骨小梁数目明显增多、骨小梁结构更加紧密、骨小梁之间的连续性更好,且骨小梁间的间隙变小变少;与 PDG-50 组相比较,PDG-50 组的骨小梁质量更优于 PDG-25 组。说明 PDG 能有效优化大鼠骨微结构及其骨质量。

表 1 大鼠胫骨 microCT 量化指标比较 ($\bar{x}\pm s$,$n=8$)

组别	相对骨体积(%)	骨小梁数/mm^{-1}	骨小梁分离度/mm	体积骨密度/$g\cdot cm^{-3}$
Control 组	19.55±2.15	2.04±0.28	0.31±0.05	0.20±0.01
PDG-25 组	20.15±2.85	2.01±0.18	0.27±0.01	0.21±0.02
PDG-50 组	26.88±2.54[a]	2.60±0.21[a]	0.22±0.01[a]	0.25±0.01[a]

a:$P<0.05$,与 Control 组比较

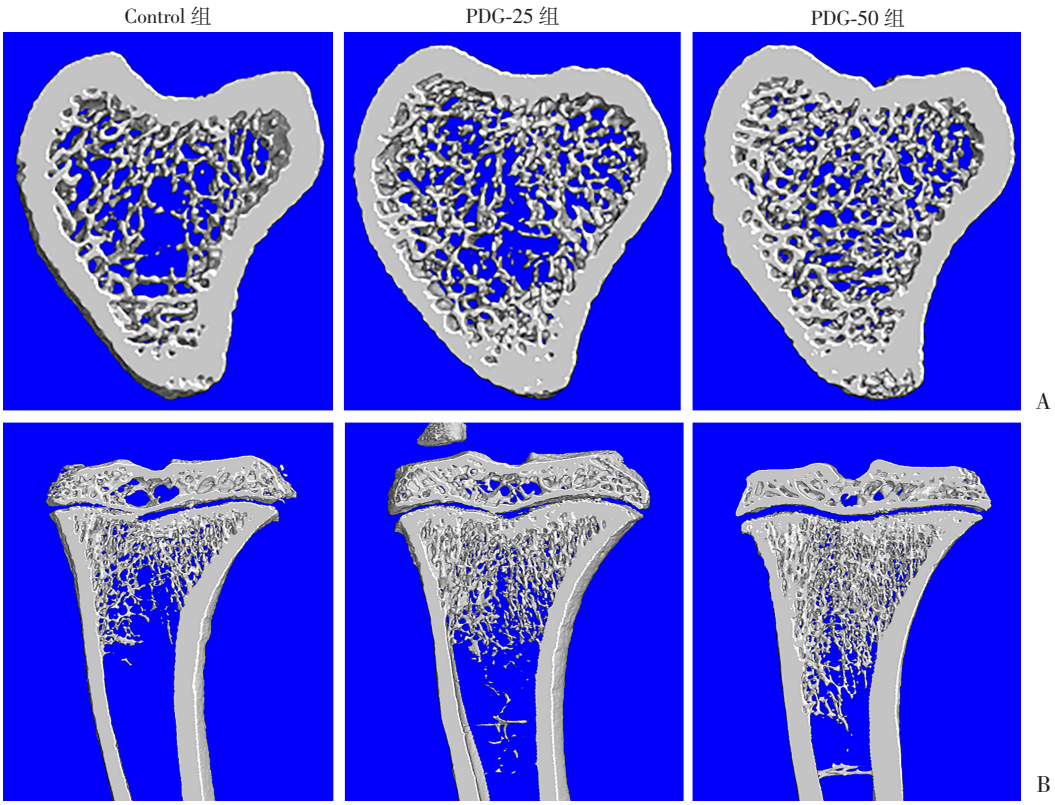


图 4 大鼠胫骨 micro CT 成像分析横截面图(A)和最大剖面图(B)

2.5 PDG 对大鼠生物力学指标的影响

股骨三点弯曲实验显示,PDG-50 组的弹性模量显著高于 Control 组($P<0.05$),PDG-25 组和 PDG-50 组的最大载荷均高于 Control 组,但无统计学差异。PDG-25 组和 PDG-50 组的屈服强度与 Control 组相比差异均无统计学意义(表 2)。第三椎体(L3)压缩实验显示,PDG-25 组和 PDG-50 组的弹性模量与 Control 组相比差异无统计学意义,但 PDG-50 组的最大载荷显著高于 Control 组($P<0.05$,表 3)。结果提示,PDG 能提高大鼠股骨韧性和椎骨抗骨折能力。

表 2 各组大鼠股骨三点弯曲实验结果($\bar{x}\pm s$,$n=8$)

组别	弹性模量/mPa	最大载荷/N	屈服强度/N
Control 组	2 542.91±386.74	109.98±3.98	93.76±11.49
PDG-25 组	2 665.54±280.98	110.35±6.38	91.77±12.02
PDG-50 组	3 267.34±675.29[a]	121.30±13.16	94.60±12.08

a:$P<0.05$,与 Control 组比较

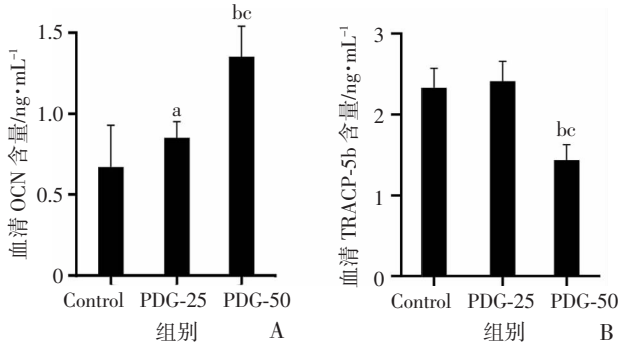
表 3 各组大鼠 L3 压缩实验结果($\bar{x}\pm s$,$n=8$)

组别	弹性模量/mPa	最大载荷/N
Control 组	312.70±110.63	277.86±78.78
PDG-25 组	350.51±160.67	338.00±66.22
PDG-50 组	300.42±128.58	338.72±50.94[a]

a:$P<0.05$,与 Control 组比较

2.6 PDG 对大鼠血清骨代谢生化指标的影响

如图 5 所示,PDG-25 组 OCN 含量显著高于 Control 组($P<0.05$),PDG-50 组 OCN 含量显著高于 Control 组和 PDG-25 组($P<0.01$);PDG-25 组血清 TRACP-5b 含量与 Control 组相比差异无统计学意义,PDG-50 组 TRACP-5b 含量显著低于 Control 组和 PDG-25 组($P<0.01$)。说明 PDG 具有剂量依赖性促进骨形成和抑制骨吸收的双重活性。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 Control 组比较;c:$P<0.01$,与 PDG-25 组比较

图 5 各组大鼠 OCN(A)、TRACP-5b(B)含量 ($n=10$)

3 讨论

骨质疏松症是一种以骨量减少、骨微结构恶化和脆骨性骨折为特征的慢性疾病,在大大降低生活质量的同时,也提高了骨质疏松性骨质的发病率,而脊柱、骨盆或髋部骨折则增加了患者的病死率[7]。在人群水平上,峰值骨量(peak bone mass,PBM)每增加10%,晚年骨折的风险就降低50%。低PBM可能是由发生在青春期和青年期的各种原因所引起的骨丢失,如种族、性别、家族史、钙和维生素D摄入量、吸烟和饮酒、体育活动等[8]。因此,在青少年期增加骨强度、提高PBM从而降低晚年骨质疏松的发生风险,是预防骨质疏松的可靠途径之一。

杜仲被认为是防治骨质疏松的经典用药,《本草纲目》中记载其具有"治腰膝痛,补中益精气,坚筋骨,强志"的功效[9]。研究表明不同剂量的杜仲皮提取物均能预防雌激素缺乏所导致的OP[10],杜仲皮中的总木脂素在体内和体外都具有防止骨丢失的作用[11]。杜仲的化学成分类型共15类,其中以PDG为代表物质的木脂素类含量最多[12],基于木脂素具有雌激素活性,推测PDG可能是杜仲防治OP的主要活性成分。本研究在前期细胞实验的基础上,在动物实验水平上探究了PDG对生长期大鼠的影响。发现PDG有提高生长期大鼠骨质量和骨强度的作用,与细胞实验结果一致。

骨密度是由每单位面积测得骨骼中矿物质和盐含量的数据处理得到的骨骼矿物质密度,也是生物实验中确定骨量损失或增加最常用的参数[13],被认为是诊断骨质疏松的基本依据。本研究结果显示,25、50 mg/kg PDG都能提高生长期大鼠全身骨密度,且50 mg/kg PDG的作用效果更好。microCT结果显示,50 mg/kg的PDG能显著优化大鼠胫骨microCT量化指标,具体为相对骨体积、骨小梁数、骨小梁分离度和体积骨密度。25、50 mg/kg PDG都能使大鼠胫骨骨量变多、骨小梁的网状结构更紧密,从而优化骨组织的微结构,且高剂量的PDG作用效果更好。这些结果表明PDG可以剂量依赖性增加生长期大鼠的骨密度。

骨生物力学性能是决定骨强度的关键因素之一[14]。股骨三点弯曲实验和椎骨压缩实验结果表明,25 mg/kg PDG对大鼠生物力学性能无明显影响,50 mg/kg PDG可显著提高大鼠股骨的韧性和椎骨的抗骨折能力,提示50 mg/kg PDG对大鼠骨强度的提高作用。

血清生化指标可直接反映骨代谢的本质,也是评价骨转换率的客观标准[15]。血清骨钙素(OCN)含量代表成骨细胞的骨形成水平,血清抗酒石酸酸性磷酸酶5b(TRACP-5b)含量代表破骨细胞的骨吸收活动[14]。本研究血清检测结果表明,25 mg/kg PDG可显著抑制骨吸收但无促进骨形成作用,50 mg/kg PDG则既能促进骨形成又能抑制骨吸收,这与本课题组前期报道淫羊藿苷具有促进骨形成和抑制骨吸收的双重活性是一致的。

综上所述,PDG在剂量依赖性提高生长期大鼠全身骨密度、优化骨微结构、增强骨强度、促进骨吸收的同时抑制骨吸收。表明有可能通过服用PDG或其衍生物来提高生长期大鼠的骨质量,从而达到降低晚年骨质疏松的发生率。本研究结果为采用提高峰值骨密度法防治骨质疏松症提供了一种新的选择,但其提高效率与其他已报道的药物或化合物相比有何优势,其提高骨密度的作用机制如何,长期服用有无副作用等,尚需在下一步的研究中予以阐明。

参考文献:

[1] JOHNSTON C B, DAGAR M. Osteoporosis in older adults[J]. Med Clin North Am, 2020, 104(5): 873-884. DOI: 10.1016/j.mcna.2020.06.004.

[2] ASPRAY T J, HILL T R. Osteoporosis and the ageing skeleton[J]. Subcell Biochem, 2019, 91: 453-476. DOI: 10.1007/978-981-13-3681-2_16.

[3] LIU Y X, LIU J P, XIA Y. Chinese herbal medicines for treating osteoporosis[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2014(3): CD005467. DOI: 10.1002/14651858.CD005467.pub2.

[4] 隋雨婷, 李乐乐, 刘俊业, 等. 大豆异黄酮药理作用研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2019, 40(4): 293-296. DOI: 10.13845/j.cnki.issn1673-2995.2019.04.021.
SUI Y T, LI L L, LIU J Y, *et al*. Research progress of soy isoflavone's extract and pharmacological effects[J]. J Jilin Med Univ, 2019, 40(4): 293-296. DOI: 10.13845/j.cnki.issn1673-2995.2019.04.021.

[5] 施洋, 候宝林, 吴胜利, 等. 植物雌激素的研究进展[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(11): 172-176.
SHI Y, HOU B L, WU S L, *et al*. Research advancement of phytoestrogen[J]. Asia-Pac Tradit Med, 2019, 15(11): 172-176.

[6] 吴思敏,孙薇,高玉海,等.松脂醇二葡萄糖苷促进体外培养成骨细胞骨形成的作用研究[J]. 解放军医药杂志, 2021, 33(5): 9-12.
WU S M, SUN W, GAO Y H, *et al*. Effect of pinoresinol

diglucoside on bone formation of osteoblasts *in vitro*[J]. Med Pharm J Chin PLA, 2021, 33(5): 9-12.

[7] LANGDAHL B L. Overview of treatment approaches toosteoporosis[J]. Br J Pharmacol, 2021, 178(9): 1891-1906. DOI: 10.1111/bph.15024.

[8] ZHU X, ZHENG H. Factors influencing peak bone massgain [J]. Front Med, 2021, 15(1): 53-69. DOI: 10.1007/s11684-020-0748-y.

[9] 王桂云, 刘湘琳, 陈沙, 等. 中医药治疗骨质疏松症的研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(6): 162-165. DOI: 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2020.06.064.
WANG G Y, LIU X L, CHEN S, *et al*. Research progress of traditional Chinese medicine in the treatment of osteoporosis [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2020, 36(6): 162-165. DOI: 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2020.06.064.

[10] ZHANG R, LIU Z G, LI C, *et al*. Du-Zhong (Eucommia ulmoides Oliv.) cortex extract prevent OVX-induced osteoporosis in rats[J]. Bone, 2009, 45(3): 553-559. DOI: 10.1016/j.bone.2008.08.127.

[11] ZHANG R, PAN Y L, HU S J, *et al*. Effects of total lignans from Eucommia ulmoides barks prevent bone loss *in vivo* and *in vitro*[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155(1): 104-112. DOI: 10.1016/j.jep.2014.04.031.

[12] 刘锟, 潘颖宜, 王健英, 等. 杜仲化学成分的主要影响因素概况[J]. 中国医药导报, 2020, 17(12): 41-44.
LIU K, PAN Y Y, WANG J Y, *et al*. Research on the main factors affecting the chemical composition of eucommia ulmoides Oliv[J]. China Med Her, 2020, 17(12): 41-44.

[13] HERNANDEZ-BECERRA E, LONDOÑO-RESTREPO S M, HERNÁNDEZ-URBIOLA M I, *et al*. Determination of basal bone mineral density in the femur bones of male and female Wistar rats[J]. Lab Animals, 2021, 55(1): 30-42. DOI: 10.1177/0023677220922566.

[14] JEPSEN K J, SCHLECHT S H. Biomechanical mechanisms: resolving the apparent conundrum of why individuals with type Ⅱ diabetes show increased fracture incidence despite having normal BMD[J]. J Bone Miner Res, 2014, 29(4): 784-786. DOI: 10.1002/jbmr.2189.

[15] CHEN J, CHEN P, QI H, *et al*. Puerarin affects bone biomarkers in the serum of rats with intrauterine growth restriction[J]. J Tradit Chin Med, 2016, 36(2): 211-216. DOI: 10.1016/s0254-6272(16)30029-2.

(**收稿**:2021-07-12;**修回**:2021-10-09)

(编辑 吴培红)