

# 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨组织 I 型胶原表达及骨代谢的影响

伍海昭<sup>1</sup>, 朱敏<sup>1</sup>, 詹红生<sup>2</sup>, 陈海啸<sup>1</sup>

(1. 浙江省台州医院, 浙江 临海 317000; 2. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203)

**摘 要** **目的:**观察骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨组织 I 型胶原表达及骨代谢的影响。**方法:**雌性 SD 大鼠 40 只, 月龄 10 个月, 随机分为实验组、空白对照组、模型组和阳性对照组, 每组 10 只。除空白对照组外, 其余各组均切除双侧卵巢制作骨质疏松模型。造模后第 8 天开始药物干预, 实验组予以骨碎补总黄酮浓缩液 2 mL 灌胃, 阳性对照组予以倍美力混悬剂 2 mL 灌胃; 空白对照组和模型组予以生理盐水 2 mL 灌胃; 均每日 1 次。药物干预 6 个月后, 比较各组大鼠骨密度、尿脱氧吡啶啉/尿肌酐比值、I 型胶原氨基末端肽/尿肌酐比值及血清 I 型前胶原氨基末端前肽含量; 并检测各组大鼠骨组织中 I 型胶原 mRNA 的表达。**结果:**药物干预 6 个月后, 各组大鼠骨密度值比较, 差异有统计学意义[ $(0.287 \pm 0.017) \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $(0.362 \pm 0.031) \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $(0.207 \pm 0.008) \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $(0.291 \pm 0.015) \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $F = 104.317, P = 0.000$ ]; 实验组低于空白对照组( $P = 0.000$ ), 高于模型组( $P = 0.000$ ), 但与阳性对照组比较, 差异无统计学意义( $P = 0.584$ ); 空白对照组高于模型组和阳性对照组( $P = 0.000, P = 0.000$ ); 模型组低于阳性对照组( $P = 0.000$ )。各组间尿脱氧吡啶啉/尿肌酐比值( $3.381 \pm 0.202, 2.462 \pm 0.310, 4.526 \pm 0.243, 3.232 \pm 0.191$ )、I 型胶原氨基末端肽/尿肌酐比值( $10.901 \pm 1.265, 8.638 \pm 1.036, 13.392 \pm 1.959, 10.516 \pm 1.362$ )及血清 I 型前胶原氨基末端前肽含量[ $(232.081 \pm 28.452) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}, (184.443 \pm 19.250) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}, (283.262 \pm 33.628) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}, (238.861 \pm 26.685) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ]比较, 差异均有统计学意义( $F = 124.841, P = 0.000; F = 18.277, P = 0.000; F = 21.648, P = 0.000$ ); 实验组高于空白对照组, 差异均有统计学意义( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ); 实验组低于模型组, 差异有统计学意义( $P = 0.000, P = 0.003, P = 0.002$ ); 实验组与阳性对照组比较, 差异均无统计学意义( $P = 0.107, P = 0.521, P = 0.589$ ); 空白对照组低于模型组和阳性对照组, 差异有统计学意义( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.003, P = 0.000$ ); 模型组高于阳性对照组, 差异均有统计学意义( $P = 0.000, P = 0.001, P = 0.004$ )。空白对照组大鼠骨组织 I 型胶原 mRNA 表达最强; 模型组大鼠骨组织 I 型胶原 mRNA 表达呈阴性或低表达; 实验组大鼠骨组织 I 型胶原 mRNA 表达水平与阳性对照组接近, 较模型组强。**结论:**骨碎补总黄酮能增强去卵巢大鼠骨组织 I 型胶原的表达, 降低骨转换率, 增加骨密度; 这可能是骨碎补总黄酮防治骨质疏松症的机制之一。

**关键词** 骨碎补 骨质疏松, 绝经后 胶原 I 型 骨密度 大鼠 动物实验

**Effect of drynaria fortunei total flavonoids on collagen type I expression in bone tissue and bone metabolism in the ovariectomized rats** Wu Haizhao<sup>\*</sup>, Zhu Min, Zhan Hongsheng, Chen Haixiao. <sup>\*</sup> The Taizhou hospital of Zhejiang province, Linhai 317000, Zhejiang, China

**ABSTRACT** **Objective:** To observe the effect of drynaria fortunei total flavonoids on collagen type I (COL - I) expression in bone tissue and bone metabolism in the ovariectomized rats. **Methods:** Forty ten - month - old female SD rats were randomly divided into experimental group, blank control group, model group and positive control group, 10 rats in each group. The osteoporosis rat models were built by bilateral ovariectomy in experimental group, model group and positive control group. The drug intervention were carried out from the 8th day after modeling. The rats in the experimental group were intragastric administrated with concentrated solution of drynaria fortunei total flavonoids (2 mL qd), the rats in the positive control group were intragastric administrated with Premarin suspensions (2 mL qd), while the others in the blank control group and model group were intragastric administrated with normal saline (2 mL qd). After 6 months of drug intervention, bone density, urine content ratio of deoxy pyridinoline (DPD) to creatinine (Cre), urine content ratio of N - telopeptide of type I collagen (NTx) to creatinine (Cre) and serum content of amino - terminal propeptide of type I procollagen (PINP) were detected and compared between the 4 groups. Meanwhile, the COL - I mRNA expression in bone tissues were detected. **Results:** After drug intervening for 6 months, there were statistical differences in the bone density between the 4 groups ( $0.287 \pm 0.017, 0.362 \pm 0.031, 0.207 \pm 0.008, 0.291 \pm 0.015 \text{ g/cm}^2$ );  $F = 104.317, P = 0.000$ ). Further comparison indicated that the bone density value of experimental

group was lower than that of the blank control group ( $P=0.000$ ) and higher than that of model group ( $P=0.000$ ), while there was no statistical difference in the bone density value between the experimental group and positive control group ( $P=0.584$ ). The bone density value of the blank control group was higher than that of model group and positive control group ( $P=0.000, P=0.000$ ), while the bone density value of the model group was lower than that of positive control group ( $P=0.000$ ). There were statistical differences in the urine content ratio of DPD to Cre ( $3.381 \pm 0.202, 2.462 \pm 0.310, 4.526 \pm 0.243, 3.232 \pm 0.191$ ), the urine content ratio of NTx to Cre ( $10.901 \pm 1.265, 8.638 \pm 1.036, 13.392 \pm 1.959, 10.516 \pm 1.362$ ) and the serum content of PINP ( $232.081 \pm 28.452, 184.443 \pm 19.250, 283.262 \pm 33.628, 238.861 \pm 26.685 \mu\text{g/mL}$ ) between the 4 groups ( $F=124.841, P=0.000; F=18.277, P=0.000; F=21.648, P=0.000$ ). The values of these bone metabolism indexes were higher in the experimental group compared with the blank control group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ) and were lower in the experimental group compared with the model group ( $P=0.000, P=0.003, P=0.002$ ). There were no statistical differences in the values between the experimental group and the positive control group ( $P=0.107, P=0.521, P=0.589$ ). The values of the blank control group were lower than those of the model group and the positive control group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.003, P=0.000$ ). The values of the model group were higher than those of the positive control group ( $P=0.000, P=0.001, P=0.004$ ). Strong + positive expression of COL - I mRNA in bone tissues was found in the blank control group, while negative or low expression of COL - I mRNA was found in the model group. The experimental group was similar to the positive control group and surpassed the model group in the expression of COL - I mRNA in bone tissues. **Conclusion:** The *Drynaria fortunei* total flavonoids can enhance the COL - I expression in bone tissues of ovariectomized rats and reduce the bone turnover rate and increase the bone density, which may be one of the mechanisms for *Drynaria fortunei* total flavonoids in the prevention of osteoporosis.

**Key words** *Drynaria fortunei*; Osteoporosis, postmenopausal; Collagen type I; Bone density; Rats; Animal experimentation

骨质疏松症以骨强度下降、骨折风险增加为特征,是一种严重危害中老年人健康的全身骨代谢疾病<sup>[1]</sup>。I 型胶原(collagen type I, COL - I)是骨组织中主要的有机成份,可直接影响骨的生物力学特性<sup>[2]</sup>。骨碎补总黄酮具有增加去卵巢大鼠骨密度、改善骨组织形态、抑制破骨细胞形成和骨吸收的作用<sup>[3-4]</sup>,且骨碎补总黄酮能提高骨胶原中脯氨酸的羟化程度,从而使骨胶原的结构更牢固<sup>[5]</sup>。本研究观察骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨组织 COL - I 表达及骨代谢的影响,进一步探讨骨碎补总黄酮防治骨质疏松症的作用机制,为临床应用提供依据,现总结报告如下。

## 1 材 料

**1.1 实验动物** 清洁级 SD 大鼠 40 只,均为雌性,月龄 10 个月,体质量( $180 \pm 10$ )g;由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号 SCXK(沪)2003 - 0003。实验在浙江中医药大学实验动物中心进行,标准饲料常规饲养。

**1.2 实验药物及试剂** 骨碎补总黄酮,购自北京岐黄制药有限公司,由浙江省台州医院药剂科制备成  $0.01 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的浓缩液;结合雌激素片(培美力),爱尔兰惠氏制药有限公司生产,批号 0706012,由浙江省台州医院药剂科制备成  $0.017 \text{ mg} \cdot 2 \text{ mL}^{-1}$  的混悬液。Trizol 裂解液(美国 Invitrogen 公司),焦炭酸二乙酯

(美国 Amresco 公司),M - Mulv 逆转录酶(立陶宛 MBI Ferments 公司),TaqDNA 聚合酶(上海捷瑞生物工程有限公司),引物(上海基康生物技术有限公司),脱氧吡啶啉(deoxy pyridinoline, DPD)、I 型胶原氨基末端肽(N - telopeptide of type I collagen, NTx)、I 型前胶原氨基端前肽(amino - terminal propeptide of type I procollagen, PINP)及 ELISA 试剂盒(美国 ADL 公司)。

## 2 方 法

**2.1 分组与造模方法** SD 大鼠 40 只,随机分为实验组、空白对照组、模型组和阳性对照组,每组 10 只。2% 戊巴比妥钠注射液腹腔注射麻醉后,采用背部入路,空白对照组切除腹部少许脂肪,其余 3 组均切除双侧卵巢造模。

**2.2 药物干预方法** 造模后第 8 天,各组大鼠开始给药,大鼠每日用药量采用人与动物体表面积计算法计算(单位体质量大鼠用药量约为成人剂量的 25 倍)。实验组,骨碎补总黄酮浓缩液 2 mL 灌胃;阳性对照组,倍美力混悬液 2 mL 灌胃;空白对照组和模型组,生理盐水 2 mL 灌胃;每日 1 次。

**2.3 骨密度及骨代谢指标检测方法** 药物干预 6 个月,应用 Norland - XR36 双能 X 线骨密度仪检测各组大鼠左侧股骨骨密度(bone mineral density, BMD)。各组大鼠在最后 1 次干预后留存 24 h 总尿液量;每只

大鼠抽取外周血 2 mL,离心(转速 2 000 r · min<sup>-1</sup>,离心半径 15.65 cm)10 min,分离血清。按照 ELISA 试剂盒说明书检测尿 DPD、NTx 和血清 PINP,全自动生化仪检测尿肌酐(creatinine,Cre);以 DPD、NTx 检测值与 Cre 检测值的比值,校正尿液浓缩或稀释对 DPD、NTx 检测结果的影响。

**2.4 大鼠骨组织总 RNA 提取方法** 处死各组大鼠,收集新鲜胫骨,液氮速冻后,研磨成粉。每只大鼠取 100 mg 骨粉分别加入试管后,加入 Trizol 裂解液 1 mL,充分裂解,室温静置 5 min;每管加入 200 μL 氯仿,静置 3 min;4 ℃ 离心(12 000 r · min<sup>-1</sup>,离心半径 9.8 cm)15 min;吸出上清液,转移至新的离心管。加入等量异丙醇,轻轻颠倒混匀;4 ℃ 离心(12 000 r · min<sup>-1</sup>,离心半径 9.8 cm)15 min,弃上清液,扣于纸上控干后,加入 70% 乙醇溶液 1 mL,-20 ℃ 冰箱过夜。取出试管轻轻颠倒混匀,4 ℃ 离心(12 000 r · min<sup>-1</sup>,离心半径 9.8 cm)15 min,弃上清液,风干后,加入焦炭酸二乙酯处理水 20 μL。经核酸分析仪定量后,选取 A260/A280 比值位于 1.8~2.0 之间的总 RNA,作为反转录扩增模板。

**2.5 COL-Ⅰ mRNA 表达的检测方法** 取抽提的总 RNA 2 μg,加入随机引物及 M-MuLV 逆转录酶合成 cDNA 链。取 cDNA 0.1 μg,加入 Buffer 缓冲液 2.5 μL,25 mM · L<sup>-1</sup> 的氯化镁溶液 1 μL,10 mM · L<sup>-1</sup> 的脱氧核糖核苷三磷酸溶液 0.5 μL,20 pmol · μL<sup>-1</sup> 的上下游引物各 0.5 μL,5 单位 · μL<sup>-1</sup> 的 TaqDNA 聚合酶 0.5 μL,灭菌双蒸水补充至 25 μL。PCR 仪进行扩增,β-actin 作为内参。PCR 扩增条件:预变性 95 ℃ 2 min,变性 94 ℃ 45 s,退火 52.0 ℃ 45 s,延伸 72 ℃ 1 min,最后延伸 10 min。循环 28 次,最后 72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。大鼠 COL-Ⅰ 基因上游引物为 5'

-TACAGCACGCTTGTGGATG-3';下游引物为 5'-TTGAGTTTGGGTTGTTGGTC-3',扩增产物为 259 bp;大鼠 β-actin 上游引物为 5'-AACCTTAAGGC-CAACCGTGAAAAG-3',下游引物为 5'-TCATGAG-GTAGTCTGTCAGGT-3',扩增产物为 241 bp。1.8% 琼脂糖凝胶电泳 45 min,电压 5 V · cm<sup>-1</sup>。

**2.6 统计学方法** 采用 SPSS17.0 统计软件处理数据;各组大鼠骨密度、尿 DPD 和 NTx 及血清 PINP 含量的组间比较采用单因素方差分析;组间两两比较采用 *q* 检验;检验水准 α=0.05。

3 结果

**3.1 各组大鼠骨密度和骨代谢指标的比较** 药物干预 6 个月后,各组大鼠间 BMD 值比较,差异有统计学意义(*F* = 104.317,*P* = 0.000);实验组低于空白对照组(*P* = 0.000),高于模型组(*P* = 0.000),但与阳性对照组比较,差异无统计学意义(*P* = 0.584);空白对照组高于模型组和阳性对照组(*P* = 0.000,*P* = 0.000);模型组低于阳性对照组(*P* = 0.000)。各组间尿 DPD/Cre 比值、NTx/Cre 比值及血清 PINP 含量比较,差异均有统计学意义(*F* = 124.841,*P* = 0.000;*F* = 18.277,*P* = 0.000;*F* = 21.648,*P* = 0.000);实验组高于空白对照组,差异均有统计学意义(*P* = 0.000,*P* = 0.000,*P* = 0.000);实验组低于模型组,差异均有统计学意义(*P* = 0.000,*P* = 0.003,*P* = 0.002);实验组与阳性对照组比较,差异均无统计学意义(*P* = 0.107,*P* = 0.521,*P* = 0.589);空白对照组低于模型组和阳性对照组,差异均有统计学意义(*P* = 0.000,*P* = 0.000,*P* = 0.000;*P* = 0.000,*P* = 0.003,*P* = 0.000);模型组高于阳性对照组,差异均有统计学意义(*P* = 0.000,*P* = 0.001,*P* = 0.004)。见表 1。

表 1 药物干预 6 个月后各组大鼠骨密度和骨代谢指标的比较

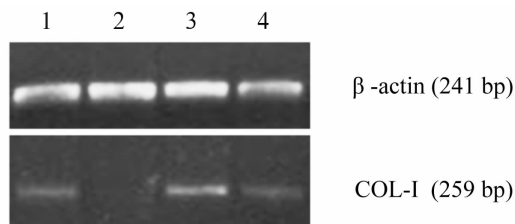
组别	BMD(g · cm <sup>-2</sup> )	DPD/Cre(nmol/mmol)	NTx/Cre(nmol/mmol)	PINP(μg · mL <sup>-1</sup> )
实验组	0.287 ± 0.017	3.381 ± 0.202	10.901 ± 1.265	232.081 ± 28.452
空白对照组	0.362 ± 0.031	2.462 ± 0.310	8.638 ± 1.036	184.443 ± 19.250
模型组	0.207 ± 0.008	4.526 ± 0.243	13.392 ± 1.959	283.262 ± 33.628
阳性对照组	0.291 ± 0.015	3.232 ± 0.191	10.516 ± 1.362	238.861 ± 26.685

**3.2 各组大鼠 COL-Ⅰ 表达强度的比较** PCR 扩增结果显示,空白对照组大鼠骨组织 COL-Ⅰ mRNA 表达最强;模型组大鼠骨组织 COL-Ⅰ mRNA 表达呈阴性或低表达;实验组大鼠骨组织 COL-Ⅰ mRNA 表达

水平与阳性对照组接近,较模型组强(图 1)。

**4 讨论**

COL-Ⅰ 和骨矿化之间有着密切联系,机体吸收的钙离子和焦磷酸裂解的磷离子合成羟磷灰石转运



1实验组, 2模型组, 3空白对照组, 4阳性对照组

图1 各组大鼠骨组织 COL - I mRNA PCR 扩增电泳图

到骨胶原,按一定的电荷极性排列、沉积,从而完成骨质的正常矿化。研究<sup>[6-8]</sup>发现 COL - I 通过其  $\alpha 1$  链上的特定位点和细胞表面的整合素受体结合,可促进细胞的分化,对成骨细胞的生长、分化起着重要的作用。因此, COL - I 已成为骨质疏松症防治研究的热点之一<sup>[9-11]</sup>。骨重建包括骨吸收、骨形成及静止期 3 个阶段,骨吸收和骨形成的速率称为骨转换率, I 型骨质疏松症患者骨转换异常加快,骨小梁变细、断裂,造成骨量丢失和骨强度降低。COL - I 的代谢产物 PINP 及骨代谢指标 DPD 和 NTx 是反映 COL - I 合成和骨吸收的敏感指标<sup>[12-13]</sup>。中药骨碎补是临床常用的治疗骨质疏松症的药物,骨碎补总黄酮是骨碎补有效成分的提取物,用于雌激素水平较低者,可产生弱雌激素样作用,与成骨细胞内的雌激素受体蛋白结合,增强成骨细胞的活性,抑制破骨细胞的生长,预防骨质疏松症的发生<sup>[14]</sup>。本研究中,去卵巢大鼠骨质疏松症模型经骨碎补总黄酮干预后骨代谢指标明显降低,说明骨碎补总黄酮能明显降低异常升高的骨转换率,抑制骨吸收,这可能是骨碎补总黄酮可增加骨质疏松大鼠骨密度的主要原因。

本研究结果表明,骨碎补总黄酮能增强去卵巢大鼠骨组织 COL - I 的表达,降低骨转换率,增加骨密度;这可能是骨碎补总黄酮防治骨质疏松症的机制之一。

## 5 参考文献

[1] 薛延. 骨质疏松症防治指南[M]. 北京:人民卫生出版

社,2008:3-13.

- [2] 黄淑纾,林华,朱秀芬,等. 骨质量与骨质疏松性骨折[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2012,5(4):285-291.
- [3] 谢雁鸣,鞠大宏,赵晋宁. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨密度和骨组织形态计量学影响[J]. 中国中药杂志,2004,29(4):343-345.
- [4] 谢雁鸣,许勇钢,赵晋宁,等. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨密度和细胞因子 IL - 6、IL - 4、TNF $\alpha$  水平的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2004,10(1):34-37.
- [5] 伍海昭,陈海啸,朱敏. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨超微结构及脯氨酸羟化程度的影响[J]. 中国骨伤,2011,24(1):48-50.
- [6] 梁文娜,叶蕙芝,廖凌虹,等. I型胶原蛋白对骨矿化机制的影响[J]. 中国老年学杂志,2012,32(17):3840-3842.
- [7] Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens - structure, function, and biosynthesis [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55(12):1531-1546.
- [8] 张荣华,彭勇,杨丽,等. 益骨胶囊对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织 I 型胶原 mRNA 表达的影响[J]. 时珍国医国药,2005,16(10):941-943.
- [9] 杨国夫,宋国胜,张涛,等. 牛膝提取物对去卵巢大鼠骨密度、骨转换及 I 型胶原蛋白表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2011,17(2):109-112.
- [10] 钱济先,王相如,马保安,等. 吡啶昔芬对大鼠成骨细胞增殖和 I 型胶原合成的影响[J]. 中华骨科杂志,2004,24(11):674-677.
- [11] 肖恩,孟萍. 骨质疏松骨代谢生化指标的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2008,14(3):212-216.
- [12] 王桂华,赵建宁. 骨质量的影响因素及其检测方法[J]. 医学研究生学报,2011,24(10):1095-1098.
- [13] 王洪复. 骨质疏松症的诊断[J]. 国际内分泌代谢杂志,2006,26(4):285-288.
- [14] 段斌斌,万全增,李春雯,等. 骨碎补对 OPG/RANKL 表达影响的研究进展[J]. 中医正骨,2011,23(6):40-42.

(2013-12-23 收稿 2014-02-24 修回)

## · 通 知 ·

### 关于启用《科技期刊学术不端文献检测系统(AMLC)》的通知

为了保证学术论文的真实性和原创性,杜绝学术论文抄袭、剽窃、伪造、篡改、不当署名、一稿多投等现象的发生,本着对本刊论文作者和读者负责的态度,《中医正骨》编辑部于 2010 年 4 月开始启用《科技期刊学术不端文献检测系统(AMLC)》。该系统以《中国学术文献网络出版总库》为全文比对数据库,本刊编辑使用该系统对所有来稿的文字复制情况进行检测,检测结果包括与已发表论文比对后的文字复制比率,所涉及论文的题目、作者、发表期刊和发表时间。按规定文字复制比超过 20% 的来稿即视为存在学术不端行为的可能,经人工比对后才能进入下一个审稿程序,特此提醒广大作者,注意所投稿件的原创性与真实性。特此通知。