

侧被盖区和蓝斑等。这些研究均证实雌激素水平的变化与围绝经期睡眠障碍有着密切的联系。本实验研究结果显示, 70 %醇洗脱有效部位($48 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)可以增加去卵巢合并电刺激小鼠的子宫系数, 提示柴胡加龙骨牡蛎汤可能是通过调节去卵巢合并电刺激小鼠的雌激素水平而发挥其改善睡眠作用。

本实验选取中医临床疗效确切的中药复方柴胡加龙骨牡蛎汤, 筛选并确定了柴胡加龙骨牡蛎汤改善围绝经期睡眠的最佳有效部位和最佳给药剂量, 并通过本方对去卵巢合并电刺激小鼠生殖器系数影响的比较, 从一方面确定了其改善围绝经期综合征睡眠的可能机制, 这为深层次研究柴胡加龙骨牡蛎汤改善围绝经期综合征失眠的作用及生物机制, 奠定了基础, 也为临床应用柴胡加龙骨牡蛎汤治疗围绝经期综合征提供科学依据。

参考文献:

- [1] 黄莉莉, 于爽, 李廷利. 柴胡加龙骨牡蛎汤对围绝经期大鼠睡眠时相的影响[J]. 上海中医药杂志, 2013, 47(2): 76-78.
- [2] 黄莉莉, 于爽, 李秋红, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对去卵巢大鼠睡眠时相的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(1): 38-39.
- [3] 马堃, 李连达. 中医药治疗更年期综合征药效学试验的基本要求[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(3): 214-216.
- [4] Liu KJ, Wang WJ, Li DJ, et al. Effect of Gengnianchun Recipe on bone mineral density, bone biomechanical parameters and serum lipid level in ovariectomized rats[J]. Chin J Integr Med, 2010, 12(2): 132-136.
- [5] 李晔, 周明芳, 王君伟. 坤宝丸治疗围绝经期综合征的临床研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(8): 1957-1958.
- [6] 堵吉, 谈勇. 中医药治疗围绝经期综合征的 meta 分析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(5): 564-565.
- [7] 王利芬. 围绝经期综合征中西医临床研究进展[J]. 环球中医药, 2013, 6(2): 151-155.
- [8] 韩翠芹. 围绝经期综合征诊治进展[J]. 医学理论与实践, 2014, 27(1): 33-36.
- [9] McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system[J]. Endocr Rev, 1999, 20(3): 297-307.
- [10] 王宪. 补肾至仙汤治疗围绝经期综合征及对神经-内分泌-免疫网络影响的临床研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2011.
- [11] Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, et al. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha[J]. Endocrinology, 2003, 144(5): 2055-2067.

(编辑: 修春)

基于 I 型胶原代谢水平探讨淫羊藿和女贞子对骨质疏松模型的影响

康 学¹, 刘仁慧¹, 年宏蕾¹, 张伟华², 李 蔚¹, 王秀娟¹(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437)

摘要: **目的** 基于 I 型胶原合成降解率探讨淫羊藿和女贞子配伍对大鼠骨质疏松模型的影响及可能机制。**方法** 取 Wistar 雄性大鼠 60 只, 随机分为 6 组, 即正常对照组、模型对照组、淫羊藿组 ($9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、女贞子组 ($9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、淫羊藿女贞子配伍组(淫羊藿:女贞子=4:3, $9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、雷洛昔芬阳性对照组($6.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 10 只, 自由饮水、摄食。除正常对照组外, 其余各组大鼠均用 0.5 % 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配成的维甲酸混悬液按 $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃, 正常对照组大鼠以 0.5 % CMC-Na 灌胃, 连续造模 2 周。在模型复制的同时, 各组动物灌胃给予相应的药物, 正常对照组和模型对照组给予等量的生理盐水灌胃, 每日 1 次, 共 3 周。检测骨密度、生物力学、血清骨钙素(BGP)及 I 型前胶原氨基端前肽(PINP)、I 型前胶原羧基端前肽(PICP)、I 型胶原交联羧基末端肽(ICTP)水平, 并对实验数据进行相关性分析。**结果** 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠骨密度和生物力学性能显著下降 ($P < 0.01$), BGP 含量及 PINP、PICP、ICTP 水平显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型对照组比较, 淫羊藿女贞子配伍可显著升高骨密度 ($P < 0.01$), 增强骨生物力学性能 ($P < 0.01$),

收稿日期: 2014-03-24

作者简介: 康学, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药及复方的药效学研究。Email: kangxue0907@126.com。通讯作者: 刘仁慧, 博士, 副教授, 研究方向: 中药及复方的药效学研究。Email: liurenhui995@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81373814); 北京市教育委员会科技计划面上项目(KM201310025012); 北京中医药薪火传承“3+3”工程二室一站建设项目(2012-SZ-C-42)。

下调血清 BGP 及 PINP、PICP、ICTP 水平($P < 0.05$);相关性分析结果显示骨密度、生物力学性能与反映 I 型胶原合成降解率的各指标间存在显著负相关($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 I 型胶原合成降解率的加快与骨质疏松的发生密切相关,淫羊藿女贞子配伍对 I 型胶原代谢水平的调节作用可能是其防治骨质疏松症的机制之一。

关键词: 骨质疏松症; I 型胶原; 骨密度; 生物力学; 骨钙素

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)05-0559-06

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.010

Study on Effect of Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi on Osteoporosis Model Based on Type I Collagen Metabolism

KANG Xue¹, LIU Renhui¹, NIAN Honglei¹, ZHANG Weihua², LI Zhan¹, WANG Xiujuan¹(1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2. Yueyang Hospital of Integrative Chinese and Western Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China)

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect and its possible mechanisms of Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi for osteoporosis based on type I collagen metabolism. **Methods** Sixty male Wistar rats were randomly divided into six different groups according to the body mass: normal control group, model group, Herba Epimedii group ($9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), Fructus Ligustri Lucidi group ($9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), combination group of (Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi at the combination proportion of 4 : 3, $9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and positive drug group (raloxifene at the dose of $6.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). All rats tool drinking water and food intake freely. Rats except those in the normal control group received intramuscular injection of $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of retinoic acid for two weeks to establish osteoporosis model, and the medication groups were treated with intragastric administration of corresponding medicine once a day for three weeks during the modeling. Outcomes of bone density, biomechanical indicators, bone gla protein (BGP), carboxyterminal crosslinked propeptide of type I procollagen (PICP), aminoterminal propeptide of type I procollagen (PINP), and crosslinked carboxy-terminal peptide of type I collagen (ICTP) were detected. **Results** Bone density and biomechanical properties were significantly lower ($P < 0.01$), while the serum contents of BGP, PINP, PICP and ICTP were significantly higher in the model group than those in the normal control group($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the combination of Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi could significantly increase bone density and biomechanical properties($P < 0.01$), while down-regulate serum BGP, PINP, PICP and ICTP levels significantly ($P < 0.05$). The results of correlation analysis showed that bone density and biomechanical properties were negatively correlated with each indicator that reflected the synthesis and degradation rate of type I collagen($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Acceleration of synthesis and degradation of type I collagen is closely related with the development of osteoporosis. The regulation of the combination of Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi on type I collagen metabolism may be one of its preventive and therapeutic mechanisms for osteoporosis.

Keywords: Osteoporosis; Collagen Type I ; Bone density; Biomechanics; Osteocalcin

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是以骨量减少和骨组织纤维结构退化,继而引起骨骼脆性和骨折危险性增加为特征的系统性骨骼疾病^[1]。中医学认为肾虚精亏是 OP 的病机关键,补肾填精壮骨之法是治疗 OP 的基本大法。课题组前期研究显示,平补肾中阴阳之药对淫羊藿和女贞子,对维甲酸致大鼠骨质疏松模型的骨代谢异常和骨组织病理状态均具有良好的改善作用^[2],但其防治 OP 的作用途径尚未深入探

究。有报道显示^[3],绝经后妇女由于雌激素水平下降可引起骨转换率升高,促使 I 型胶原合成和溶解速率加快,骨基质不断减少,骨密度降低,最终造成骨质疏松。本实验通过观察 I 型胶原合成降解率与骨密度、骨生物力学在骨质疏松模型中的变化及其相关性,旨在探讨淫羊藿和女贞子配伍对骨质疏松症的防治作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物 Wistar 大鼠 60 只, 雄性, 3 月龄, 清洁级, 体质量(250 ± 20) g, 北京维通利华实验动物技术股份有限公司, 动物许可证号: SCXK(京)2012-0001。

1.2 药物及试剂 炙淫羊藿(批号: 23820701)、酒女贞子(批号: 1205042), 均购于北京同仁堂药店; 维甲酸, 北京贝丽莱斯生物化学有限公司, 批号: 120701; 羧甲基纤维素钠(CMC-Na), 国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20111021; 盐酸雷洛昔芬片(易维特), 礼来苏州制药有限公司, 批号: L02576; 血清骨钙素(BGP)放免测定盒, 北京华英生物技术研究, 批号: 20130501B; I 型前胶原氨基端前肽(PINP)酶联试剂盒(批号: E02P0578), I 型前胶原羧基端前肽(PICP)酶联试剂盒(批号: E02P0015), I 型胶原交联羧基末端肽(ICTP)酶联试剂盒(批号: E02I0754), 均为美国 BG 公司产品。

1.3 仪器 Lexxos-2000 型双能 X 线骨密度检测仪, 法国 MEDILINK 公司; WD-1 型电子万能试验机, 长春非金属试验机厂; r-911 全自动放免计数仪, 中国科技大学实业总公司; MULTISKAN MK3 全自动多功能酶标仪, 美国 Thermo 公司; DH4000A 型电热恒温培养箱, 天津泰斯特仪器有限公司; MH-1 漩涡振荡器, 其林贝尔仪器制造有限公司。

1.4 分组、模型复制及给药 取 Wistar 大鼠 60 只, 按随机数字表法分为 6 组, 即正常对照组、模型对照组、淫羊藿组($9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、女贞子组($9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、淫羊藿女贞子配伍组(简称配伍组, 淫羊藿: 女贞子 = 4 : 3, $9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、雷洛昔芬阳性对照组($6.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 10 只, 自由饮水、摄食。除正常对照组外, 其余各组大鼠用 0.5 % CMC-Na 配成的维甲酸混悬液按 $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃, 正常对照组大鼠以 0.5 % CMC-Na 灌胃, 连续造模 2 周。在模型复制的同时, 各组动物灌胃给予相应的药物, 正常对照组和模型对照组给予等量的生理盐水灌胃, 每天 1 次, 共计 3 周。

1.5 取材及检测 大鼠禁食 16 h 后麻醉, 腹主动脉取血, 离心取血清。放免法检测血清 BGP 含量, 酶免法检测血清 PINP、PICP、ICTP 水平, 均按试剂盒说明书步骤操作。完整分离大鼠的右侧股骨, 剔除所有附着的肌肉和结缔组织, 用生理盐水浸泡的湿纱布包裹, 用于骨密度扫描和骨生物力学测试。

1.6 统计学处理方法 采用 SPSS 18.0 统计软件, 计量资料结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用方差齐性检验及单因素方差分析, 根据方差齐性检验结果选择 LSD(方差齐)或 Tamhane's T2(方差

不齐); 相关性分析选用 Pearson 线性相关分析。

2 结果

2.1 对各组大鼠骨密度的影响 模型对照组全股骨、上三分之一股骨以及股骨头骨密度均较正常对照组显著降低($P < 0.01$); 与模型对照组比较, 淫羊藿组、配伍组和雷洛昔芬组全股骨及上三分之一股骨密度均显著升高, 差异具有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$), 各给药组股骨头骨密度均显著升高, 具有显著性差异($P < 0.05$ 或 0.01); 与配伍组相比较, 淫羊藿组和女贞子组全股骨及股骨头骨密度上升幅度小于配伍组($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 1。

表 1 对各组大鼠骨密度的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 1 Effects on bone density in rats($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	全股骨 / $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$	上三分之一股骨 / $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$	股骨头 / $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$
正常对照组		$0.2185 \pm 0.0106^{**}$	$0.2330 \pm 0.0159^{**}$	$0.2662 \pm 0.0101^{**}$
模型对照组		0.1829 ± 0.0129	0.1997 ± 0.0121	0.2172 ± 0.0109
淫羊藿组	9.5	$0.1935 \pm 0.0112^{*\Delta}$	$0.2103 \pm 0.0079^*$	$0.2320 \pm 0.0121^{**\Delta}$
女贞子组	9.5	$0.1909 \pm 0.0137^{\Delta\Delta}$	0.2090 ± 0.0113	$0.2284 \pm 0.0138^{*\Delta\Delta}$
配伍组	9.5	$0.2058 \pm 0.0090^{**}$	$0.2168 \pm 0.0085^{**}$	$0.2425 \pm 0.0136^{**}$
雷洛昔芬组	0.00625	$0.2026 \pm 0.0114^{**}$	$0.2240 \pm 0.0056^{**}$	$0.2462 \pm 0.0089^{**}$

注: 与模型对照组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与配伍组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

2.2 对各组大鼠骨生物力学的影响 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠股骨最大载荷和最大挠度均显著降低($P < 0.01$); 与模型对照组比较, 配伍组、雷洛昔芬组最大载荷显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 女贞子组、配伍组、雷洛昔芬组最大挠度显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中, 以配伍组升高程度最为显著($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 各组大鼠骨生物力学的比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Effects on bone biomechanical indicators in rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	最大载荷 /kg	最大挠度 /mm
正常对照组	10		$8.226 \pm 1.000^{**}$	$0.7415 \pm 0.1588^{**}$
模型对照组	8		3.215 ± 0.719	0.5081 ± 0.1778
淫羊藿组	8	9.5	4.079 ± 1.298	0.6328 ± 0.1529
女贞子组	8	9.5	$3.327 \pm 1.794^{\Delta\Delta}$	$0.6699 \pm 0.1882^*$
配伍组	8	9.5	$5.313 \pm 1.992^{**}$	$0.7339 \pm 0.1228^{**}$
雷洛昔芬组	8	6.25×10^{-3}	$4.940 \pm 0.962^*$	$0.6865 \pm 0.1067^*$

注: 与模型对照组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与配伍组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

2.3 对各组大鼠血清 BGP 含量的影响 模型对照组血清 BGP 含量较正常对照组显著升高($P < 0.01$); 与模型对照组比较, 配伍组、雷洛昔芬组均可显著下

调血清 BGP 水平($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 对各组大鼠血清 BGP 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Contents of BGP in rats		
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	BGP/ng·mL ⁻¹
正常对照组		4.076 ± 0.472**
模型对照组		4.645 ± 0.206
淫羊藿组	9.5	4.394 ± 0.319
女贞子组	9.5	4.485 ± 0.297
配伍组	9.5	4.325 ± 0.362*
雷洛昔芬组	0.00625	4.266 ± 0.383*

注: 与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.4 对各组大鼠血清 PINP、PICP、ICTP 含量的影响 与正常对照组比较, 模型对照组血清 PINP、PICP、ICTP 含量均显著升高($P < 0.05$); 与模型对照组比较, 配伍组和雷洛昔芬组可显著下调血清 PINP、PICP、ICTP 水平($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 4。

表 4 对各组大鼠血清 PINP、PICP、ICTP 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 4 Contents of PINP, PICP and ICTP in rats				
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	PINP/pg·mL ⁻¹	PICP/pg·mL ⁻¹	ICTP/ng·mL ⁻¹
正常对照组		226.04 ± 75.38*	649.13 ± 163.70*	0.458 ± 0.249*
模型对照组		343.28 ± 141.80	849.32 ± 187.40	0.779 ± 0.383
淫羊藿组	9.5	277.26 ± 97.01	739.07 ± 204.38	0.554 ± 0.364
女贞子组	9.5	266.03 ± 72.14	734.40 ± 134.83	0.501 ± 0.322
配伍组	9.5	239.59 ± 78.70*	650.14 ± 85.31*	0.428 ± 0.137*
雷洛昔芬组	0.00625	240.67 ± 74.05*	648.74 ± 128.58*	0.376 ± 0.147**

注: 与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.5 I 型胶原代谢与骨密度的相关性分析 相关分析显示, 全股骨、上 1/3 股骨及股骨头骨密度均与 PINP 含量呈显著负相关($r=-0.393$ 、 -0.335 、 -0.373 , $P < 0.01$); 股骨头骨密度与 PICP 含量呈显著负相关($r=-0.291$, $P < 0.05$); 全股骨、上 1/3 股骨骨密度与 ICTP 含量呈显著负相关($r=-0.344$, -0.296 , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见表 5。

2.6 I 型胶原代谢与生物力学的相关性分析 相关分析显示, 股骨最大载荷、最大挠度与 PINP 水平呈显著负相关($r=-0.316$ 、 -0.271 , $P < 0.05$), 见表 6。

3 讨论

随着社会老龄化的进程, OP 的发病率逐年增加, 目前已跃居为世界常见病发病率的第 7 位, 其严重性已受到密切的关注。OP 依据其病理特点可分为高转换型和低转换型, 高转换型是骨吸收和骨形成均增加, 骨转换率增高的一种病理状态, 主要见于妇

表 5 I 型胶原水平与骨密度的相关性分析结果(r 值, $n=48$)
Table 5 Correlation analysis between the levels of collagen type I and bone mineral density

I 型胶原	骨密度		
	全股骨	上 1/3 股骨	股骨头
PINP	-0.393**	-0.335**	-0.373**
PICP	-0.241	-0.176	-0.291*
ICTP	-0.344**	-0.296*	-0.223

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 6 I 型胶原水平与生物力学的相关性分析结果(r 值, $n=48$)
Table 6 Correlation analysis between the levels of collagen type I and bone biomechanical indicators

I 型胶原	生物力学	
	最大载荷	最大挠度
PINP	-0.316*	-0.271*
PICP	-0.210	-0.200
ICTP	-0.172	-0.230

注: * $P < 0.05$ 。

女绝经后 OP; 低转换型虽然骨吸收增加或减少, 但骨形成率降低, 因而表现为低转化率的一种病理状态, 主要见于老年性 OP^[4]。药物维甲酸(Retinoic Acid, RA)所诱导的属于高转换型 OP, 该模型采用维甲酸 70 mg·kg⁻¹ 连续灌服 2 周, 即可出现大鼠体质量减轻, 弓腰塌背, 跛足以及骨代谢紊乱, 骨小梁稀疏断裂, 骨密度和骨生物力学性能降低等病理表现^[5], 这与本实验结果相一致, 说明 OP 模型制备成功。

骨质疏松症是骨量减少和骨强度降低共同作用的结果。骨密度是指单位骨组织体积所含的骨矿物量, 骨矿物含量减少即骨密度下降是骨质疏松的主要病理表现, 因此, 骨密度是目前骨矿代谢中量化骨量, 反映骨强度, 评价骨折危险性的金指标^[6]。骨生物力学是以工程力学理论为基础, 研究骨组织在外界作用下的力学特性和骨在受力后的生物学效应, 是对骨质量进行评定的一种可靠方法^[7]。在三点弯曲实验中, 最大载荷和最大挠度反映的是在骨骼断裂前发生的最大变性和承受的最大压力, 二者均是反映骨结构力学特性的重要指标。研究证实, 骨密度和骨生物力学性能成正相关^[8]。本实验骨密度扫描结果显示, 模型对照组大鼠全股骨、上 1/3 股骨及股骨头处骨密度均较正常对照组显著降低($P < 0.01$); 各给药组与模型对照组比较, 均表现出不同程度的升高骨密度的作用, 其中, 配伍组骨密度较单用组升高显著($P < 0.05$, $P < 0.01$), 提示淫羊藿和女贞子均

能提高单位骨组织体积的骨量,有效对抗维甲酸所致骨质疏松模型的骨量减少,以配伍组作用更显著。生物力学测试结果显示,造模后,模型对照组大鼠股骨最大载荷和最大挠度均显著降低($P < 0.01$)。配伍组、雷洛昔芬组最大载荷显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);女贞子组、配伍组、雷洛昔芬组最大挠度显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示药物可有效改善大鼠股骨生物力学性能,增加骨组织的承受力,提高骨骼抵抗外力的冲击能力,降低骨折风险,淫羊藿与女贞子配伍应用效果更明显。

骨转换率可准确反映骨代谢状态,若骨转换活跃,破骨细胞的骨吸收速度超过成骨细胞的骨形成速度,骨基质不断被溶解,骨量丢失,最终引发 OP。BGP 是由成熟的成骨细胞合成和分泌的一种含 γ 羧基谷氨酸的非胶原蛋白,具有骨代谢调节激素的功能,是反映骨更新情况的一项特异性生化指标。BGP 水平增高,常见于高转换型骨质疏松症^[9-10]。结果显示,模型对照组血清 BGP 含量显著升高($P < 0.01$);配伍组、雷洛昔芬组均可显著下调血清 BGP 水平($P < 0.05$),提示药物可有效逆转维甲酸诱导骨质疏松模型的高转换型骨代谢状态,从而使骨吸收和骨形成之间的偶联趋于平衡,淫羊藿与女贞子配伍较单用作用显著。

骨基质由大量胶原纤维和少量无定形基质组成。胶原纤维绝大多数是 I 型胶原,占骨有机质的 90%。胶原合成减少、分解代谢增强、形态改变、稳定性下降,导致骨矿物质不能有效地沉积在胶原纤维之间,所提供机械支持功能降低是形成骨质疏松发病的重要原因^[11]。I 型胶原合成时,所形成的 PINP、PICP 的比例为 1:1。测定血清 PICP、PINP 含量可以很好地反映 I 型胶原合成速率和骨转换情况^[12]。I 型胶原交联羧基末端肽(ICTP)是 I 型胶原蛋白降解过程中的释放的唯一免疫球蛋白,与 I 型胶原蛋白以 1:1 比例释放入血,血清 ICTP 水平与骨溶解增加相关,是反映破骨细胞性胶原降解和骨吸收的高度敏感性指标^[13-14]。所以,联合检测血清 PINP、PICP 以及 ICTP 的水平可较为直观地反映骨 I 型胶原合成和降解状态^[15]。结果显示,模型对照组血清 PINP、PICP、ICTP 含量均较正常对照组显著升高($P < 0.05$),提示维甲酸建模后, I 型胶原合成和降解速率加快,骨转换活跃, BGP 的检测结果也验证了这一点。配伍组和雷洛昔芬组可显著下调血清 PINP、PICP、ICTP 水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),表明淫羊藿与女贞子

配伍可有效降低骨质疏松大鼠骨胶原的代谢水平,抑制其骨代谢的高转换状态,从而对骨代谢起调节作用。

研究表明,淫羊藿女贞子配伍可提高单位骨组织体积骨量,增强骨组织生物力学性能,有效逆转维甲酸致骨质疏松大鼠骨代谢的高转换状态,调节骨胶原的代谢水平。为了探讨药物对骨密度、生物力学和胶原代谢的影响是否存在内在联系,进一步揭示淫羊藿女贞子配伍抗 OP 的可能机制,本实验对 I 型胶原代谢水平与骨密度、生物力学指标进行了相关性分析,结果显示,骨密度、生物力学性能与反映 I 型胶原合成和降解率的各指标间存在显著负相关。表明随着 I 型胶原合成降解速率的加快,胶原代谢活跃;在这种高转换型的骨代谢状态下,骨基质不断消耗,故骨密度随之不断减少,生物力学性能相应下降,提示 I 型胶原合成降解率的加快与 OP 的发生密切相关。淫羊藿与女贞子配伍可有效降低骨质疏松大鼠骨胶原的代谢水平,抑制骨代谢的高转换状态,骨密度和生物力学性能随之显著升高,提示淫羊藿与女贞子配伍对 I 型胶原代谢水平的调节作用可能是其防治 OP 的机制之一。

参考文献:

- [1] 朱夫璋. 健康体检人群骨质疏松症患病情况及影响因素分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 27(7): 790-791.
- [2] 康学, 李崧, 张伟华, 等. 淫羊藿女贞子配伍对维甲酸致大鼠骨质疏松模型的影响研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(23): 15-19.
- [3] 邓咏梅, 张金山, 林炎斌. 绝经早期妇女血清 PINP、ICTP 和 OC 水平与骨密度的关系[J]. 放射免疫学杂志, 2012, 25(6): 604-606.
- [4] 文天林, 孙天胜, 王玲. 骨质疏松症的流行病学、病因和分类[J]. 人民军医, 2010, 53(9): 662-663.
- [5] 贾婷婷, 张云涛, 刘顺振. 维甲酸诱导大鼠骨质疏松模型的制作[J]. 口腔医学研究, 2012, 28(5): 420-421.
- [6] 赵旭, 代平, 金钊, 等. 经方左归丸抗糖皮质激素性骨质疏松症的效应及机制研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2243-2244.
- [7] 许碧莲, 陈广斌, 陈文双. 仙振骨宝干预泼尼松诱发大鼠的骨丢失[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(28): 5136-5140.
- [8] 褚亚明, 姜保国, 张殿英, 等. 骨量、微结构及受力方向对去卵巢大鼠骨生物力学的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2007, 13(9): 651-654.
- [9] 冼华, 曹文富. 补肾防疏煎剂对骨质疏松症大鼠血清骨钙素的影响[J]. 中国药房, 2011, 22(19): 1751-1753.
- [10] Raff H, Raff JL, Duthie EH, et al. Elevated salivary cortisol in the evening in healthy elderly men and women: correlation with bone mineral density[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 1999, 54(9): 479-483.
- [11] 谢斌, 陈允震, 刘海春. 骨胶原在骨质疏松中的作用[J]. 中国老

- 年学杂志, 2009, 29(16): 2057-2059.
- [12] 陈树清, 周厚明, 孙保国, 等. 补肾方对去卵巢大鼠血清中 PICP、PINP 的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2009, 17(3): 13-14.
- [13] Garnero P, Ferreras M, Karsdal MA, et al. The type I collagen fragments ICTP and CTX reveal distinct enzymatic pathways of bone collagen degradation[J]. J Bone Miner Res, 2003, 18: 859-867.
- [14] 马进峰, 王一农, 金锐. 枸杞多糖对骨质疏松大鼠血清 PICP、ICTP 及钙、磷、镁和碱性磷酸酶水平的影响[J]. 郑州大学学报, 2012, 47(2): 247-249.
- [15] Sigrist IM, Gerhardt C, Alini M, et al. The long-term effects of ovariectomy on bone metabolism in sheep[J]. J Bone Miner Metab, 2007, 25(1): 28-35.

(编辑: 宋威)

齐墩果酸对血管紧张素 II 诱导的大鼠心肌成纤维细胞增殖的影响及其作用机制

冯 健¹, 左玉梅², 徐 亮³, 钟 毅¹, 查克岚¹, 李家富¹, 范忠才¹ (1. 泸州医学院附属医院心内科, 四川 泸州 646000; 2. 解放军 77156 部队医院内科, 四川 乐山 614000; 3. 河南科技大学第四附属医院, 河南 安阳 455000)

摘要: **目的** 研究齐墩果酸(OA)对血管紧张素 II(Ang II)诱导的大鼠心肌成纤维细胞(CFs)增殖的影响, 并探讨其可能的作用机制。**方法** 采用胰酶消化法及差速贴壁法培养大鼠 CFs, 实验分为空白对照组、Ang II(10^{-6} mol·L⁻¹)组、Ang II(10^{-6} mol·L⁻¹)+OA(60, 80, 100 μ mol·L⁻¹) 组。细胞长至融合状态时, 先加入 OA(60, 80, 100 μ mol·L⁻¹)预处理 1 h, 然后加入 Ang II(10^{-6} mol·L⁻¹)作用 24 h。应用二甲基四唑氮蓝(MTT)法测定细胞增殖活性, 酶联免疫吸附法(ELISA)测定细胞上清中 I 型胶原含量, 蛋白质印迹法(Western blotting)和激光扫描共聚焦显微镜分别检测各组 CFs 中结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)蛋白表达和活性氧(ROS)变化。**结果** Ang II 能诱导 CFs 增殖, 并能增加细胞上清中 I 型胶原的含量, 同时 CTGF 的蛋白表达及 CFs 中 ROS 水平也显著增加。OA 在 60~100 μ mol·L⁻¹ 浓度范围内呈浓度依赖性抑制 Ang II 诱导的 CFs 增殖, 并且 OA 能减弱 Ang II 诱导的 CTGF 和 ROS 表达。**结论** OA 可通过 ROS-CTGF 途径抑制 Ang II 诱导的 CFs 增殖和胶原生成。

关键词: 齐墩果酸; 血管紧张素 II; 心肌成纤维细胞; 活性氧; 结缔组织生长因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)05-0564-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.011

Study of Oleanolic Acid in Inhibiting Rat Cardiac Fibroblasts Proliferation Induced by Angiotensin II Through ROS-CTGF Pathway

FENG Jian¹, ZUO Yumei², XU Liang³, ZHONG Yi¹, ZHA Kelan¹, LI Jiafu¹, FAN Zhongcai¹ (1. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000 Sichuan, China; 2. Department of Internal Medicine, No.77156 Military Hospital, Leshan 614000 Sichuan, China; 3. The Fourth Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Anyang 455000 Henan, China)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitive effect of oleanolic acid (OA) on cardiac fibroblasts (CFs) proliferation induced by angiotensin II (Ang II) and to explore the related mechanism. **Methods** Rat CFs were isolated by the methods of digestive enzyme and differential adhesion. When the rat CFs became cell fusion, OA ($60, 80, 100 \mu$ mol·L⁻¹) was added into the medium. One hour later, Ang II(10^{-6} mol·L⁻¹) was added into the medium for co-culture for 24 hours. Cell proliferation was measured by MTT assay. The content of type I collagen in the culture medium was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blotting method was used to detect the protein level of connective tissue growth factor(CTGF), and cellular reactive oxygen species(ROS) levels were detected by confocal laser scanning microscope. **Results** Ang II significantly induced CFs proliferation, increased

收稿日期: 2013-11-14

作者简介: 冯健, 男, 主治医师, 研究方向: 冠心病及相关疾病的发病机制与防治。Email: 415623fj@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金(31300946); 泸州医学院附属医院人才基金(12290); 泸州市科技计划项目(12330)。