

素,从而加重了脑再灌注性损害,脑缺血后,ATP 减少,AMP 增多,后者分解产生次黄嘌呤,脑组织中正常存在的次黄嘌呤脱氢酶,在钙的参与下转变为黄嘌呤氧化酶,该酶在次黄嘌呤和黄嘌呤存在下,使再灌注期进入脑组织的 O_2 转变为超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$)。这是缺血时产生自由基的主要途径之一^[3]。

$O_2^{\cdot-}$ 进一步启动 Haber-Weiss 反应生成毒性更强的羟自由基。这些自由基可以攻击细胞膜,并可以造成许多大分子如核酸、蛋白质损伤,最终导致神经细胞的损伤。本实验利用黄嘌呤氧化酶-黄嘌呤(X/XO)反应系统产生 $O_2^{\cdot-}$ 。利用 $O_2^{\cdot-}$ 及 H_2O_2 作为外源性自由基损伤因素,研究自由基对培养神经细胞的损伤,并用于筛选有效的抗自由基损伤的药物。本实验结果表明,神经细胞经 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 损伤后,神经细胞存活率及活性均明显下降,说明外源性自由基的确造成了神经细胞的损伤。

本研究发现外源性 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 作用于神经细胞,使 MDA 生成量显著增加,说明生成了大量的脂质过氧化物,间接地反映出细胞受到自由基的严重损伤。同时 SOD 活力则明显下降,说明清除自由基的能力下降,原位 DNA 缺口末端标记法检测到阳

性细胞,说明自由基造成的神经细胞死亡包括坏死和凋亡。

脑舒宁胶囊能提高自由基损伤的神经细胞的存活率及细胞活性,减少凋亡细胞数量,并能降低 MDA 的生成量,提高 SOD 活力,有效地减轻了 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 对神经细胞的损伤作用。脑舒宁胶囊保护神经细胞免受自由基损伤的可能机制:(1)直接清除自由基,起到天然抗氧化剂的作用;(2)提高机体内抗氧化酶的活性,启动内源性抗自由基系统来清除过量产生的自由基;(3)增强细胞膜等易受自由基攻击的目标的耐受性;(4)抑制自由基引起的神经细胞凋亡。但其具体机制仍有待进一步研究。

References:

- [1] Li T W, Kong L K, Xiong W. Protection of ginsenosides against $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 damage to cultured rat cortical neuronal cells [J]. *J Norman Bethune Univ Med Sci* (白求恩医科大学学报), 1998, 24(2): 130-133.
- [2] Zhang J J, Cai Z, Liu X M. The change of LPO and SOD on acute ischemic stroke patients and effect of antioxidants [J]. *J Apoplexy Nerv Dis* (中风与神经疾病杂志), 1992, 9(4): 213-216.
- [3] Wang S M, He C M. Anti-lipid peroxidation and oxygen free radical scavenging activity of Pericarpium Citri Reticulatae extract [J]. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1998, 29(6): 462-465.

蛇床子素抑制大鼠骨质疏松的实验研究

汤群芳¹,孔令军²,顾振纶¹,谢梅林^{1*}

(1. 苏州大学医学院 药理研究室,江苏 苏州 215123; 2. 苏州大学医学院 儿科系,江苏 苏州 215123)

蛇床子素 (osthole) 为从伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cusson 果实中提取得到的香豆素类化合物。具有抗炎、抗心律失常、抗诱变、抗肿瘤、抗变态反应以及抑制伴刀豆球蛋白 A 所致小鼠肝炎等作用^[1,2]。近年来有报道蛇床子素能够防治去卵巢致大鼠高转换型骨质疏松,促进成骨细胞的增殖和成骨作用^[3]。本实验以地塞米松诱导大鼠实验性骨质疏松症为模型,进一步观察蛇床子素对激素引发骨质疏松大鼠的骨代谢血清学指标、骨矿化密度 (bone mineral density, BMD) 及骨小梁结构的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物:选用 3 月龄健康 SD 雌性大鼠,体重

(160±20) g,清洁级。实验动物生产许可证:XCZYK (苏) 2002-0008,实验动物使用许可证号:SYXK (苏) 2002-0037,苏州大学实验动物中心供应。

1.2 药品与试剂:地塞米松磷酸钠注射液,江苏第六制药厂生产,批号 020802;维生素 D₃ (Vit D₃),上海罗氏制药有限公司惠赠;蛇床子素,质量分数为 95%,西安绿泉生物技术有限公司提供,批号 030516;血清碱性磷酸酶 (ALP)、磷 (P³⁺) 及钙 (Ca²⁺) 测定试剂盒均购于南京建成生物技术公司,批号均为 20050104;甲状旁腺激素 (PTH) 和雌二醇 (E₂) 放免测定试剂盒购于北京中国原子能科学研究院,批号均为 200501;白细胞介素-1 (IL-1)、骨钙素 (BGP) 和降钙素 (CT) 放免测定试剂盒购于

收稿日期:2006-03-08

作者简介:汤群芳(1975—),女,江苏苏州人,在读硕士,研究方向为中药药理。Tel: (0512) 65471556

* 通讯作者 谢梅林 Tel: (0512) 65880320 E-mail: Xiemeilin@suda.edu.cn

北京中国原子能科学研究院,批号均为 200503。

1.3 动物造模及分组:取大鼠 48 只,适应性喂养 1 周后,随机分成 6 组,即溶媒对照组、模型组、阳性药组及蛇床子素 5、10、20 mg/kg 组,每组 8 只,分笼喂养。骨质疏松模型的复制:分组后,除溶媒对照组外,其余各组大鼠分别 im 地塞米松磷酸钠 1 mg/kg,每周 2 次,溶媒对照组大鼠 im 等量生理盐水。所有大鼠喂食正常饲料,自由饮水,共 8 周。

1.4 给药方法:在模型复制的同时,每天上午溶媒对照组和模型组大鼠 ig 10 mL/kg 溶媒溶液(0.2% 聚山梨酯);阳性药组大鼠 ig Vit D₃ 0.2 μg/kg (0.02 μg/mL),蛇床子素组大鼠分别 ig 5、10 和 20 mg/kg 蛇床子素。每天 1 次,共 8 周。

1.5 检测指标

1.5.1 血清学指标的测定:实验 8 周后,给大鼠 ip 10% 水合氯醛 0.4 mL/kg 麻醉,然后腹主动脉取血,离心后,分别测定血清 Ca²⁺、P³⁺、ALP、BGP、PTH、E₂、CT、IL-1 的水平,具体方法按药盒说明书进行。

1.5.2 BMD 测定:动物处死后,迅速剥离右侧股骨,剔除周围软组织,用 LUNAR DPXIQ 双能 X 线骨密度仪(美国 GE 公司)测定,应用动物分析软件进行大鼠股骨扫描,测定 BMD 值。

1.5.3 光镜观察:处死大鼠后,剥离左侧股骨,用 10% 福尔马林溶液固定,EDTA 脱钙,乙醇逐渐脱水透明,石蜡包埋,切 5~7 μm 厚度切片,HE 染色,Olympus 光镜观察,并摄像。

1.6 统计学处理:实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Excel 统计软件处理,进行样本均数的 *t* 检验。

2 结果

2.1 一般情况:在实验期间,模型组大鼠逐渐出现毛色无光泽、懒动、少食等症状,而溶媒对照组和各治疗组大鼠皮毛光泽较好,活动如常。

2.2 对血清 Ca²⁺、P³⁺、ALP 的影响:实验结果显

示,造模后模型组血清 Ca²⁺ 下降,而 ALP 明显增高,与溶媒对照组比较有统计学差异 (*P* < 0.05、0.01)。在造模同时 ig 蛇床子素,血清 Ca²⁺ 有不同程度的增加,与模型组比较有统计学差异 (*P* < 0.05、0.01),而血清 P³⁺、ALP 明显下降 (*P* < 0.05、0.01)。这些结果表明蛇床子素能抑制地塞米松引起的血清 Ca²⁺ 下降、血清 P³⁺ 升高以及血清 ALP 活性的增强。结果见表 1。

表 1 蛇床子素对地塞米松诱发骨质疏松性大鼠血清 Ca²⁺、P³⁺ 和 ALP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effects of osthole on serum Ca²⁺, P³⁺, and ALP in dexamethasone-induced osteoporosis rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	Ca ²⁺ / (mmol · L ⁻¹)	P ³⁺ / (mmol · L ⁻¹)	ALP/ (U · L ⁻¹)
对照	—	2.21 ± 0.16	2.08 ± 0.43	236.3 ± 76.8
模型	—	2.01 ± 0.22 [△]	2.51 ± 0.46	486.4 ± 93.6 ^{△△}
蛇床子素	5	2.11 ± 0.20	2.03 ± 0.24*	282.8 ± 75.6*
	10	2.41 ± 0.21**	2.07 ± 0.36*	264.5 ± 89.8*
	20	2.24 ± 0.19*	2.07 ± 0.28*	229.9 ± 77.1**
Vit D ₃	2 × 10 ⁻⁴	2.31 ± 0.09**	2.03 ± 0.39*	353.8 ± 85.7

与对照组比较: [△]*P* < 0.05 ^{△△}*P* < 0.01

与模型组比较: **P* < 0.05 ***P* < 0.01

[△]*P* < 0.05 ^{△△}*P* < 0.01 vs control group

P* < 0.05 *P* < 0.01 vs model group

2.3 对血清 E₂、PTH、BGP、CT、IL-1 的影响:实验结果显示,模型组的血清 E₂ 和 IL-1 明显升高,与溶媒对照组比较有统计学差异 (*P* < 0.05、0.01)。而蛇床子素(10 mg/kg)组的血清 E₂ 和 IL-1 与模型组比较显著下降 (*P* < 0.05)。蛇床子素组的血清 PTH 水平随着剂量的增加逐渐降低,20 mg/kg 组血清 PTH 明显低于模型组 (*P* < 0.05)。与模型组比较,蛇床子素可使血清 BGP 升高,尤其 10 和 20 mg/kg 组升得更为明显 (*P* < 0.05、0.01)。蛇床子素虽有降低血清 CT 的趋势,但与模型组比较未见统计学意义。结果见表 2。

表 2 蛇床子素对地塞米松诱发骨质疏松性大鼠血清 E₂、PTH、BGP、CT 及 IL-1 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effects of osthole on serum E₂, PTH, BGP, CT, and IL-1 levels in Dexamethasone-induced osteoporosis rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	E ₂ /(pg · mL ⁻¹)	PTH/(ng · L ⁻¹)	BGP/(ng · mL ⁻¹)	CT/(ng · L ⁻¹)	IL-1/(ng · mL ⁻¹)
对照	—	83.80 ± 31.98	71.1 ± 32.8	4.37 ± 0.59	32.76 ± 15.57	0.07 ± 0.02
模型	—	131.07 ± 38.33 [△]	80.9 ± 46.6	3.44 ± 0.56 ^{△△}	41.10 ± 26.65	0.12 ± 0.03 ^{△△}
蛇床子素	5	112.54 ± 24.57	79.0 ± 60.2	3.90 ± 0.78	34.40 ± 11.98	0.11 ± 0.06
	10	81.38 ± 39.70*	75.6 ± 25.7	4.03 ± 0.31*	33.69 ± 17.10	0.08 ± 0.03*
	20	89.84 ± 21.88*	35.9 ± 26.9*	4.18 ± 0.18**	32.41 ± 11.99	0.10 ± 0.02
Vit D ₃	2 × 10 ⁻⁴	82.02 ± 28.42*	64.3 ± 31.3	4.35 ± 0.33**	33.15 ± 12.38	0.10 ± 0.02

与对照组比较: [△]*P* < 0.05 ^{△△}*P* < 0.01; 与模型组比较: **P* < 0.05 ***P* < 0.01

[△]*P* < 0.05 ^{△△}*P* < 0.01 vs control group; **P* < 0.05 ***P* < 0.01 vs model group

2.4 BMD 的变化:模型组 BMD 明显低于溶媒对照组大鼠 BMD ($P < 0.01$),而蛇床子素组大鼠的 BMD 与模型组比较明显增加 ($P < 0.01$)。结果见表 3。

表 3 蛇床子素对地塞米松诱发骨质疏松性大鼠骨矿化密度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effects of osthole on BMD of femur metaphyses in Dexamethasone-induced osteoporosis rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	股骨近端骨密度/ (g · cm ⁻²)	股骨远端骨密度/ (g · cm ⁻²)
对照	—	0.082 2 ± 0.015 2	0.136 5 ± 0.019 0
模型	—	0.019 7 ± 0.018 1 ^{△△}	0.050 1 ± 0.013 3 ^{△△}
蛇床子素	5	0.027 5 ± 0.011 9	0.130 4 ± 0.036 4 ^{**}
	10	0.083 9 ± 0.023 1 ^{**}	0.123 4 ± 0.027 7 ^{**}
	20	0.196 8 ± 0.015 6 ^{**}	0.165 3 ± 0.023 6 ^{**}
Vit D ₃	2 × 10 ⁻⁴	0.045 3 ± 0.017 3 [*]	0.090 8 ± 0.016 8 ^{**}

与对照组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

与模型组比较: $* P < 0.05$ $** P < 0.01$

$\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs control group

$* P < 0.05$ $** P < 0.01$ vs model group

2.5 骨形态组织学观察:股骨切片显示,与溶媒对照组比较,模型组骨小梁数目明显减少,稀疏断裂,大部分不能连接成网状,骨髓腔明显增大,骨小梁结构出现较大的空白区域,且可见大量脂肪细胞。而蛇床子素组股骨骨小梁明显宽厚,数目也显著增加,骨小梁断裂与脂肪细胞少见,接近溶媒对照组。

3 讨论

糖皮质激素广泛应用于临床,长期大量的应用常引发一系列的不良反应,引发骨盐丢失是其中之一。资料表明:地塞米松有抗维生素 D₃、减少肠钙吸收、增加尿钙排泄、抑制成骨、促进破骨、使骨盐丢失等作用,并通过影响 PTH、1,25-二羟基维生素 D₃ [1,25-(OH)₂-D₃]、性激素而间接作用于骨代谢,继发甲状腺亢进而导致骨质疏松^[4-7]。

本实验采用大鼠 im 地塞米松 8 周后,骨密度降低,骨组织显微结构发生了典型的骨质疏松改变,血清生化检查提示骨代谢呈现一种低骨形成和高骨吸收的状态,说明糖皮质激素性骨质疏松大鼠模型已复制成功。研究表明 1,25-(OH)₂-D₃ 是诱导 BGP 产生的唯一一刺激物,本实验中蛇床子素能明显提高血清 BGP 水平,表明蛇床子素有类 1,25-(OH)₂-D₃ 作用或直接提高 1,25-(OH)₂-D₃ 水平,从而促进成骨细胞合成和分泌 BGP,促进成骨。BGP 含有 A-羧

基羧氨酸残基,可作为阳离子的螯合剂,维持骨的正常钙化,是成骨细胞分泌的主要非胶原蛋白,也是成骨细胞分化的特征指标之一。大剂量组的 PTH 水平明显低于模型组,提示蛇床子素尚能拮抗地塞米松导致的继发性甲状旁腺功能亢进,从而调节骨吸收抑制状态,其中的拮抗机制可能与蛇床子素纠正糖皮质激素诱发的肠钙吸收障碍有关。

中医学认为“肾主骨生髓”,骨质疏松症属于中医“骨痿”范畴。蛇床子素能够刺激成骨细胞³H-胸腺嘧啶和³H-脯氨酸掺入量^[3]。本实验中蛇床子素明显增加大鼠股骨骨密度。通过化学结构分析发现,蛇床子素具有与 Vit D₃ 相同的活性环,故推测蛇床子素抗糖皮质激素引起的动物骨质疏松作用一方面可能通过促进钙的吸收,影响肾的钙磷代谢来增加成骨活性;另一方面通过降低糖皮质激素引起的炎症介质 IL-1 分泌增多,来对抗 IL-1 所致的骨吸收而改善骨代谢,促进骨形成,抑制骨吸收;恢复机体激素总失衡或减少负平衡,提高 BGP 的水平,降低 PTH 的水平,从而影响钙磷代谢和钙盐的沉积,达到防治骨质疏松的目的。

本实验对蛇床子素预防地塞米松诱导雌性大鼠骨质疏松的作用进行研究,显示了较好的结果,提示蛇床子素在预防糖皮质激素继发骨质疏松方面有较好的应用前景。

References:

- [1] Qu A N, Gong H Y. Pharmacological action and advances in studies on osthole [J]. *Med J Chin PAPF* (武警医学), 2004, 15(5): 383-384.
- [2] Okamoto T, Yoshida S, Kobayashi T, et al. Inhibition of concanavalin A-induced mice hepatitis by coumarin derivatives [J]. *Pharmacology*, 2001, 85(1): 95-97.
- [3] Zhang Q Y, Qin L P, Tian Y P. Effects of osthole on osteoblasts in neonatal calvarial cultures [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2003, 19(4): 384-387.
- [4] Liu H D, Li X H, Tong X X, et al. Comparison of osteoporosis model of rats induced by dexamethasone and retinoic acid [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2004, 20(4): 697-699.
- [5] Canalis E, Pereira R C, Delany A M. Effects of glucocorticoids on the skeleton [J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2002, 15(suppl5): 1341-1345.
- [6] Manelli F, Giustina A. Glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2000, 11(3): 79-85.
- [7] Xie H, Li Q N, Huang L F, et al. Effect of total coumarins from dried fruits of *Cnidium monnieri* on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1994, 15(4): 371-374.