

## 女贞子水提液对去卵巢大鼠骨结构和骨代谢的影响研究

郭鱼波<sup>1</sup>, 王丽丽<sup>1</sup>, 马如风<sup>1</sup>, 王亮<sup>2</sup>, 杨美娟<sup>1</sup>, 唐雨晴<sup>1</sup>, 柳辰玥<sup>3</sup>, 朱如愿<sup>1</sup>, 刘海霞<sup>1</sup>, 赵丹丹<sup>4</sup>, 莫芳芳<sup>4</sup>, 牛建昭<sup>2</sup>, 高思华<sup>4</sup>, 李或<sup>2</sup>, 张东伟<sup>4\*</sup>

1. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029
2. 解放军第309医院, 北京 100091
3. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029
4. 北京中医药大学糖尿病研究中心, 北京 100029

**摘要:** **目的** 探讨女贞子水提液对骨质疏松大鼠骨保护作用和骨代谢调节作用。**方法** 用去卵巢方法复制大鼠骨质疏松模型, 其中假手术组大鼠仅切除卵巢周围与卵巢体积大小相同的脂肪。实验分为4组: 假手术组、模型组、阿伦膦酸钠(0.12 g/kg)组、女贞子水提液(3.5 g/kg)组, 每组9只。各组均ig给药, 连续12周。实验结束时, 用生化法测定血清钙(S-Ca)、血清磷(S-P)、尿钙(U-Ca/Cr)、尿磷(U-P/Cr)及血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、总胆固醇(TC)和三酰甘油(TG)的量; 用ELISA法测血清I型胶原氨基端前肽(PINP)、I型胶原羧基端肽(CTX-I)、骨钙素(OCN)和尿脱氧吡啶林(DPD)的量; 用放免法测定血清碱性磷酸酶(ALP)的活性; 分别用骨密度仪、VivaCT和万能试验机评价骨组织结构变化。**结果** 女贞子水提液可以明显抑制去卵巢引起的大鼠体质量上升, 升高去卵巢大鼠S-Ca、S-P、HDL-C和PINP量, 降低U-Ca/Cr和U-P/Cr水平, 降低血清中LDL-C、TC、TG、ALP、OCN和CTX-I水平以及尿中DPD的量( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。女贞子水提液可以升高去卵巢大鼠的股骨和椎骨骨密度(BMD), 改善股骨的微结构, 增加骨强度。**结论** 女贞子水提液能升高去卵巢大鼠的BMD, 提高骨强度, 其作用机制与调节钙、磷代谢, 胶原蛋白和非胶原蛋白代谢有关。

**关键词:** 女贞子; 骨质疏松; 钙、磷代谢; 胶原代谢; 骨结构

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)07-1155-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.07.016

## Effects of water extract from *Ligustri Lucidi Fructus* on bone structure and metabolism in ovariectomized rats

GUO Yu-bo<sup>1</sup>, WANG Li-li<sup>1</sup>, MA Ru-feng<sup>1</sup>, WANG Liang<sup>2</sup>, YANG Mei-juan<sup>1</sup>, TANG Yu-qing<sup>1</sup>, LIU Chen-yue<sup>3</sup>, ZHU Ru-yuan<sup>1</sup>, LIU Hai-xia<sup>1</sup>, ZHAO Dan-dan<sup>4</sup>, MO Fang-fang<sup>4</sup>, NIU Jian-zhao<sup>2</sup>, GAO Si-hua<sup>4</sup>, LI Yu<sup>2</sup>, ZHANG Dong-wei<sup>4</sup>

1. Preclinical Medicine School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
2. Center of Orthopedics, The 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China
3. Chinese Materia Medica School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
4. Diabetes Research Center, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

**Abstract: Objective** To investigate the protecting and regulatory effects of water extract from *Fructus Ligustri Lucidi* (FLL) on bone structure and bone metabolism in osteoporosis rats. **Methods** SD female rats were bilaterally ovariectomized to establish osteoporosis model, and Sham operated rats only cut the fat around the ovary. Experimental rats were divided into four groups: Sham operation (SHAM) group, model (OVX) group, alendronic acid sodium (ALN) group, and *Fructus Ligustri Lucidi* (FLL) group, with nine rats in each group. The rats in FLL group were given FLL water extract (3.5 g/kg) and rats in ALL group were given ALN suspension (0.12

收稿日期: 2015-12-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81273995, NSFC81274140); 北京中医药大学自主选题项目(2015-JYB-XSO48); 教育部和国家外专局高等学校学科创新引智计划资助项目(B07007)

作者简介: 郭鱼波(1989—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药抗骨质疏松作用机制研究。

Tel: (010)64286772 Fax: (010)64286772 E-mail: guoyubo1101@163.com

\*通信作者 张东伟, 博士, 副研究员, 研究方向为中药活性成分的筛选和作用机制研究。E-mail: zhdw1006@163.com

g/kg) by ig administration for 12 weeks. At the end of the experiments, the contents of serum and urine calcium (S-Ca) and phosphorus (S-P), urine creatinine (U-Ca/Cr and U-P/Cr), serum high density lipoprotein (HDL-C) cholesterol, low density lipoprotein (LDL-C) cholesterol, total cholesterol (TC), and triglyceride (TG) were measured by biochemical methods. The levels of collagen I amino terminal peptide (PINP), collagen I carboxyl terminal peptide (CTX-I), osteocalcin (OCN), and urine deoxypyridinoline (DPD) were measured with ELISA. The determination of alkaline phosphatase (ALP) was by radioimmunoassay method. To evaluate the change of bone tissue structure, the bone density instrument, VivaCT, and a universal testing machine were used. **Results** FLL could inhibit the increased body weight of ovariectomy (OVX) rats, increase S-Ca, S-P, serum HDL and PINP contents, reduce urinary U-Ca/Cr and U-P/Cr ratios, reduce serum LDL-C, TC, TG, ALP, OCN, CTX, and reduce urinary DPD content ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ) in OVX rats. Meanwhile, FLL can elevate the femur head and vertebral bone mineral density, bone micro-structure and bone strength in OVX rats. **Conclusion** FLL can improve the bone density and bone strength in OVX rats by regulating Ca and P metabolism, collagen and non-collagen metabolism.

**Key words:** *Fructus Ligustri Lucidi*; osteoporosis; calcium and phosphorus metabolism; collagen metabolism; bone structure

绝经后骨质疏松多是因雌激素缺乏引起的骨代谢紊乱性疾病,表现为骨转换率升高、骨密度和骨质量降低、骨脆性增加,容易引发骨折。骨质疏松属于中医的“骨痿”“骨痹”“腰痛”等范畴,病因病机以肝、脾、肾亏虚为本,外邪、血瘀为标。女贞子 *Fructus Ligustri Lucidi* 为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实,性凉,味甘、苦,归肝、肾经,可补肝肾阴、乌须明目、清虚热,是治疗骨质疏松的常用中药之一。临床研究发现,女贞子及含有女贞子的复方可以明显改善骨质疏松患者的临床症状,升高骨密度,且耐受性强,副作用小<sup>[1-4]</sup>。但是,女贞子对去卵巢所致骨质疏松的作用机制尚不清楚。本实验拟以去卵巢诱发的骨质疏松模型大鼠为对象,研究女贞子水提液对骨质疏松大鼠骨密度、骨微结构和骨生物力学的影响,并进一步研究这种作用与钙、磷代谢和胶原蛋白及非胶原蛋白代谢的关系。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

HOLOGIC Discovery Wi 双能 X 线骨密度仪,美国 Hologic 公司; RM2255 徕卡轮转式切片仪,德国 Leica 公司; Olympus BX53 倒置荧光显微镜,日本奥林巴斯有限公司; WF-4005 微机控制电子万能试验机,深圳市瑞格尔仪器有限公司; VivaCT40 小动物活体断层扫描仪,瑞士 Scanco medical AG。

### 1.2 药品与试剂

阿伦磷酸钠片(批号 007140601),石药集团欧意药业有限公司。乙二胺四乙酸(EDTA),北京市化学试剂公司。女贞子,购于北京同仁堂药店,经北

京中医药大学中药博物馆马泽新教授鉴定为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实。

### 1.3 动物

SPF 级雌性 SD 大鼠,体质量 220~240 g,购自斯贝福(北京)实验动物科技有限公司,许可证号 SCXK(京)2011-0004,饲养于北京中医药大学科研实验中心清洁级动物实验室[合格证号 SCXK(京)2011-0024,室温 22 ℃,相对湿度 55%,光暗周期 12 h/12 h]。大鼠给予普通饲料饲养,自由饮水,适应性喂养 1 周后进行造模。

## 2 方法

### 2.1 女贞子水提液的制备

将女贞子生药 100 g 加入 1 000 mL 双蒸水,置于混悬仪上加入磁转子低温搅拌 48 h,室温 4 000 r/min 离心 20 min,取上清液。将上清液在旋蒸仪上低温旋蒸浓缩至含生药 0.35 g/mL 的溶液,得到女贞子水提液(经 HPLC-MS 分析,女贞子水提液中含有红景天苷 0.718 mg/g)。

### 2.2 去卵巢骨质疏松大鼠模型制备

SD 大鼠适应性喂养 1 周后,ip 1%戊巴比妥钠(4 mL/kg)腹腔麻醉后,在脊柱旁一横指、肋骨下缘一横指处用尖头剪刀依次剪开皮肤层、筋膜层、肌肉层,分离组织,沿一侧子宫向上于子宫角末端可见脂肪团,将脂肪团拉出腹腔,可见粉红色菜花样卵巢,用止血钳将卵巢与子宫之间夹闭并结扎,然后切除,松开止血钳,然后将组织放回腹腔还原,依次缝合肌肉层、筋膜层、皮肤层。生理盐水擦拭伤口,除去血迹。用阿莫西林对伤口消炎,并注意保持 25 ℃恒温。按同样的方法切除另一侧卵巢。假手术组大鼠仅切除卵巢

旁边相同大小的脂肪组织。

### 2.3 分组与给药

造模 1 周后, 取造模成功大鼠 27 只, 按体质量随机分为 3 组, 每组 9 只, 分别为模型组、阳性对照阿伦磷酸钠 (用双蒸水配成混悬液, 0.12 g/kg 相当于临床人用剂量的等效剂量) 组、女贞子水提液 (生药 3.5 g/kg, 相当于临床人常用剂量) 组。另取假手术组大鼠 9 只作为对照。假手术组和模型组大鼠 ig 给予等剂量的蒸馏水, 其余各组大鼠 ig 给予相应药物, 每日 1 次, 连续 12 周。

### 2.4 取材及组织样品处理

每周测定各组大鼠体质量 1 次, 给药 12 周后取生物样品。各组大鼠禁食 12 h 后取尿液, 待测。然后用 1% 戊巴比妥钠 (4 mL/kg) ip 麻醉大鼠, 分别腹主动脉取血 (3 500 r/min, 4 °C 离心 10 min, 取上清, 置于 -80 °C 备用)、椎骨 (L)、两侧股骨。将大鼠股骨和椎骨剔除肌肉组织后, 一侧股骨和整个椎骨用生理盐水湿润的湿纱布包裹, 放于 -80 °C 备用。另一侧股骨先置于 10% 中性福尔马林中固定 72 h, 后用 15% EDTA (pH 7.4) 脱钙液脱钙, 脱钙液每 2 周换 1 次, 连续脱钙 3 个月, 备用。

### 2.5 血清和尿液生化指标的测定

利用直接法-过氧化氢酶清除法, 测定血清中高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平; 利用胆固醇氧化酶-过氧化物酶法和甘油磷酸氧化酶-过氧化物酶法, 分别测定血清中总胆固醇 (TC) 和三酰甘油 (TG) 水平, 以上操作均按试剂盒 (Biosino BIO-Technology and Science Inc.) 说明书进行。血清钙 (S-Ca) 和血清磷 (S-P)、尿钙 (U-Ca/Cr) 和尿磷 (U-P/Cr) 水平均按试剂盒 (南京建成生物公司) 说明书操作测定, 其中 U-P/Cr 和 U-Ca/Cr 表示排泄 1 g 肌酐 (Cr) 时所排出的蛋白质数量, 可以作为评估骨质疏松症患者骨吸收状态的生化指标。利用 ELISA 法, 测定血清中 I 型胶原氨基端前肽 (PINP)、I 型胶原羧基端肽 (CTX-I)、骨钙素 (OCN) 和尿液脱氧吡啶啉 (DPD) 水平; 放免法测定血清碱性磷酸酶 (ALP) 活性, 以上操作均按试剂盒 (Cusabio BIO-Technology Co., Ltd.) 说明书进行。

### 2.6 骨密度 (BMD) 的测定

使用 Discovery Wi 双能 X 线骨密度仪对大鼠的股骨和第 2、4、5 腰椎骨 (L2、L4、L5) 进行扫描, 然后统一划定股骨近头端和 L2、L4、L5 特定的兴

趣区域, 进行图像分析, 得到股骨头 BMD 和 L2、L4、L5 的 BMD。

### 2.7 骨微结构的测定

用 VivaCT40 小动物活体断层扫描仪扫描股骨 (扫描股骨头下 0.5 cm), 分析骨体积平均密度 (BD)、骨组织体积平均密度 (TD)、骨表面积与体积分数比 (BS/BV)、骨小梁体积分数比 (BV/TV)、骨小梁厚度 (Tb.Th)、骨小梁分离度 (Tb.Sp)、骨小梁数量 (Tb.N)、结构模型指数 (SMI)、异性程度 (DA) 和连接密度 (Conn.D) 的变化。

### 2.8 骨生物力学的测定

骨生物力学测定采用微机控制电子万能试验机。实验时将股骨生理弯曲面向上放置, 进行 3 点弯曲测试, 参数设置如下: 跨距 20 mm, 直径 3 mm, 下降速度 1 mm/min, 至股骨断裂后停止, 得到载荷位移曲线, 计算股骨的最大载荷、最大应力和弹性模量。

### 2.9 HE 染色

将脱钙后的股骨石蜡包埋、切片 (5 μm), 进行常规 HE 染色, 中性树胶封片, Olympus BX53 倒置显微镜下观察病理变化并拍照。

### 2.10 茜素红染色

茜素红 (Alizarin Red S, Sigma-Aldrich) 染色步骤如下: 将股骨石蜡切片, 60 °C 烤 2 h 后, 常规脱蜡至水; 茜素红染色 2 min, 甩干多余染料后镜检; 丙酮和丙酮-二甲苯分别反复蘸 20 s, 二甲苯透明, 中性树胶封片; 显微镜 (物镜×10) 下观察, 拍照并进行图像分析。

### 2.11 统计学分析

实验数据采用 SPSS20.0 软件系统进行统计分析, 结果用  $\bar{x} \pm s$  描述。满足正态分布时, 方差齐时, 组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA); 方差不齐时, 使用 Dunnett's T3 检验。不满足正态分布时, 则使用非参数检验。

## 3 结果

### 3.1 对去卵巢大鼠体质量的影响

实验过程中每周测定 1 次体质量, 分别统计各组给药 0、4、8、12 周大鼠体质量, 结果见表 1。给药前 (0 周), 各组大鼠的体质量无明显差异。从第 4 周开始, 模型组大鼠的体质量较假手术组明显增加 ( $P < 0.05$ 、0.01), 这种趋势一直持续到第 12 周实验结束。与模型组相比, 阿伦磷酸钠给药 12 周和女贞子水提液给药 4、8、12 周后, 大鼠体质量均有一定程度的降低。

表 1 女贞子水提液对去卵巢大鼠体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Table 1 Effect of water extract from FLL on body weight of ovariectomized rats ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	体质量/g			
		0 周	4 周	8 周	12 周
假手术	—	257.7±15.6	296.0±24.0	328.1±31.5	349.3±31.0
模型	—	259.7±19.1	356.9±46.4 <sup>##</sup>	396.0±68.1 <sup>#</sup>	432.2±69.4 <sup>##</sup>
阿伦膦酸钠	0.12	253.1±19.0	339.0±38.4 <sup>#</sup>	379.9±56.8	401.9±61.0
女贞子水提液	3.5	262.5±9.7	331.0±25.3	371.1±35.3	394.4±41.7

与假手术组比较: <sup>#</sup>*P*<0.05 <sup>##</sup>*P*<0.01; 与模型组比较: <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01; 下同  
<sup>#</sup>*P*<0.05 <sup>##</sup>*P*<0.01 vs Sham group; <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 vs model group; same as below

3.2 对去卵巢大鼠血清及尿液中钙和磷水平的影响

钙、磷代谢在骨组织钙化中发挥重要的作用<sup>[5]</sup>。各组大鼠血清和尿液中钙、磷检测结果见表 2。与假手术组相比,模型组大鼠 S-Ca 和 S-P 均显著降低, U-Ca/Cr 和 U-P/Cr 的量明显升高 (*P*<0.01)。与模型组相比,去卵巢大鼠经女贞子水提液或阿伦膦酸钠连续治疗 12 周后,大鼠 S-Ca 和 S-P 的量明显升高, U-Ca/Cr 和 U-P/Cr 的量明显降低 (*P*<0.05、0.01)。

3.3 对去卵巢大鼠血清中 TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平的影响

血清脂代谢与骨代谢有密切的关系<sup>[6]</sup>。各组大鼠血清脂代谢相关指标的变化如表 3 所示。与假手术组相比,模型组大鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平显著升高, HDL-C 水平显著降低 (*P*<0.05、0.01)。与模型组相比,大鼠给予女贞子水提液治疗 12 周后,其血清中 TC、TG 和 LDL-C 水平显著降低 (*P*<0.05、0.01), HDL-C 水平显著升高 (*P*<0.05), 女贞子水提液对血脂的调节作用与阿伦膦酸钠作用基本接

近, 但给药组血清 HDL-C 水平仍显著低于假手术组 (*P*<0.01)。

3.4 对去卵巢大鼠血清 PINP、ALP、CTX-I、OCN 及尿液中 DPD 的影响

血清 ALP、PINP 和 OCN 是反映骨形成的生化指标, 血清 CTX-I 和尿液中 DPD 是反映骨吸收的生化指标<sup>[7-8]</sup>。各组大鼠骨血清转换标志物水平比较见表 4。与假手术组相比,模型组大鼠血清中 PINP 水平显著降低, 血清 ALP、CTX-I 和 OCN 水平显著升高, 尿液中 DPD 水平显著升高 (*P*<0.05、0.01)。与模型组相比,去卵巢大鼠经女贞子水提液治疗 12 周后,其血清中的 PINP 水平显著升高, 血清 ALP、CTX-I、OCN 水平显著降低, 尿液中 DPD 水平显著降低 (*P*<0.05、0.01)。

3.5 对去卵巢大鼠股骨和腰椎骨 BMD 的影响

BMD 是诊断骨质疏松的金指标<sup>[7,9]</sup>, 各组大鼠股骨头和 L2、L4、L5 的 BMD 测定结果见图 1。与假手术组相比,模型组大鼠股骨头和 L2、L4、L5 的 BMD 均显著降低 (*P*<0.01)。与模型组相比,

表 2 女贞子水提液对去卵巢大鼠血清和尿液中钙和磷水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Table 2 Effect of water extract from FLL on Ca and P in serum and urine of ovariectomized rats ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	S-Ca/(mmol·L <sup>-1</sup> )	S-P/(mmol·L <sup>-1</sup> )	U-Ca/Cr	U-P/Cr
假手术	—	4.325 4±0.481 5	2.911 0±0.408 4	0.124 0±0.027 5	1.500 0±0.419 2
模型	—	3.358 5±0.315 0 <sup>##</sup>	1.533 5±0.334 0 <sup>##</sup>	0.296 8±0.079 7 <sup>##</sup>	2.941 9±0.744 6 <sup>##</sup>
阿伦膦酸钠	0.12	3.957 7±0.355 0 <sup>**</sup>	2.063 3±0.224 8 <sup>##*</sup>	0.150 8±0.039 6 <sup>**</sup>	1.253 9±0.551 4 <sup>**</sup>
女贞子水提液	3.5	3.929 5±0.417 8 <sup>*</sup>	2.652 1±0.618 8 <sup>**</sup>	0.139 4±0.058 2 <sup>**</sup>	1.540 0±0.638 9 <sup>**</sup>

表 3 女贞子水提液对去卵巢大鼠血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Table 3 Effect of water extract from FLL on levels of TC, TG, HDL, and LDL in serum of ovariectomized rats ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	TC/(mmol·L <sup>-1</sup> )	TG/(mmol·L <sup>-1</sup> )	HDL-C/(mmol·L <sup>-1</sup> )	LDL-C/(mmol·L <sup>-1</sup> )
假手术	—	2.162 0±0.787 1	1.058 8±0.119 1	2.134 9±0.564 7	3.769 7±1.076 1
模型	—	3.177 7±0.425 6 <sup>##</sup>	1.656 8±0.576 7 <sup>##</sup>	0.536 2±0.305 1 <sup>##</sup>	5.151 0±0.614 0 <sup>#</sup>
阿伦膦酸钠	0.12	2.347 6±0.629 3 <sup>*</sup>	0.852 1±0.213 3 <sup>**</sup>	1.301 0±0.319 9 <sup>##**</sup>	3.227 5±1.351 0 <sup>**</sup>
女贞子水提液	3.5	2.319 3±0.652 2 <sup>*</sup>	1.225 6±0.326 3 <sup>*</sup>	1.168 9±0.523 7 <sup>##*</sup>	3.394 3±0.922 7 <sup>**</sup>

表 4 女贞子水提液对去卵巢大鼠血清和尿液中骨转换标志物的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Table 4 Effect of water extract from FLL on turnover markers content of serum in ovariectomized rats ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	ALP/(U·L <sup>-1</sup> )	PINP/(μg·L <sup>-1</sup> )	CTX-I/(ng·mL <sup>-1</sup> )	OCN/(ng·mL <sup>-1</sup> )	DPD/(pmol·L <sup>-1</sup> )
假手术	—	47.9±12.9	16.467 3±1.923 4	342.121 2±35.598 0	7.66±0.91	18.1±2.5
模型	—	69.0±14.5 <sup>##</sup>	13.737 4±0.976 7 <sup>#</sup>	403.295 5±27.475 6 <sup>##</sup>	10.47±0.64 <sup>##</sup>	24.4±2.9 <sup>#</sup>
阿伦膦酸钠	0.12	51.8± 5.7 <sup>*</sup>	17.241 2±1.777 3 <sup>**</sup>	347.613 6±41.894 8 <sup>*</sup>	9.02±1.16 <sup>**</sup>	18.5±4.4 <sup>*</sup>
女贞子水提液	3.5	50.0±12.7 <sup>*</sup>	16.144 1±2.239 9 <sup>*</sup>	349.245 5±43.049 8 <sup>*</sup>	8.83±0.89 <sup>**</sup>	15.9±5.3 <sup>**</sup>

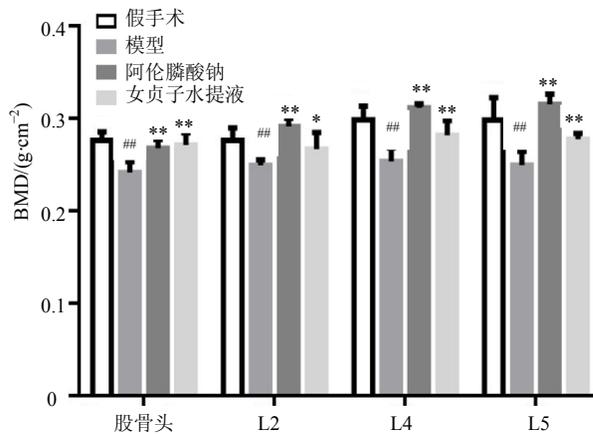


图 1 女贞子水提液对去卵巢大鼠股骨和腰椎骨 BMD 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Fig. 1 Effect of water extract from FLL on changes of BMD in femur and lumbar of ovariectomized rats ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

去卵巢大鼠经女贞子水提液治疗 12 周后, 股骨头和 L2、L4、L5 的 BMD 显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )。

### 3.6 对去卵巢大鼠股骨组织微结构的影响

骨微结构的改变决定骨强度<sup>[7-8]</sup>, 各组大鼠股骨微结构观察结果见图 2, 相关指标测定结果见表 5。与假手术组相比, 模型组大鼠的骨微结构遭到严重破坏, 其 BD、Tb.Sp、SMI、DA 明显升高, TD、BV/TV、BS/BV、Tb.Th、Tb.N、Conn.D 明显降低

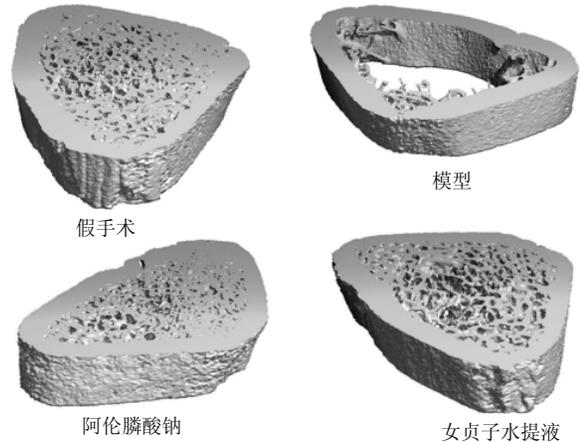


图 2 各组大鼠股骨微结构扫描图

Fig. 2 Scanning of micro structure of femur of rats in each group

( $P < 0.01$ )。去卵巢大鼠经女贞子水提液或阿伦膦酸钠治疗 12 周后, 与模型组相比, 骨微结构明显得到改善, BD、Tb.Sp、SMI、DA 明显降低, TD、BV/TV、BS/BV、Tb.Th、Tb.N、Conn.D 明显升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )。

### 3.7 对去卵巢大鼠股骨生物力学的影响

去卵巢大鼠股骨生物力学检测结果见图 3。与假手术组相比, 模型组大鼠股骨的最大载荷、最大应力、弹性模量均明显降低 ( $P < 0.01$ )。去卵巢大鼠经女贞子水提液或阿伦膦酸钠治疗 12 周后, 与

表 5 女贞子水提液对去卵巢大鼠骨微结构指标的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 5 Effect of water extract from FLL on changes of micro structure in ovariectomized rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	BD/(mgHA·ccm <sup>-1</sup> )	Tb.Sp/mm	SMI	DA	TD/(mgHA·ccm <sup>-1</sup> )
假手术	—	947.02±20.31	0.14±0.03	2.19±1.41	1.48±0.10	589.09±65.04
模型	—	974.07±18.00 <sup>##</sup>	0.37±0.08 <sup>##</sup>	5.32±0.69 <sup>#</sup>	1.96±0.28 <sup>##</sup>	478.98±16.90 <sup>##</sup>
阿伦膦酸钠	0.12	956.94±23.91	0.21±0.06 <sup>**</sup>	2.82±2.10	1.47±0.07 <sup>**</sup>	583.03±74.15 <sup>**</sup>
女贞子水提液	3.5	984.86±27.95 <sup>#</sup>	0.23±0.07 <sup>**</sup>	2.60±2.31 <sup>*</sup>	1.62±0.21 <sup>*</sup>	567.54±35.71 <sup>*</sup>
组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	BV/TV	(BS/BV)/mm <sup>-1</sup>	Tb.Th/mm	Tb.N/mm <sup>-1</sup>	Conn.D/mm <sup>-3</sup>
假手术	—	0.58±0.09	11.76±2.06	0.39±0.09	5.09±1.19	129.38±22.05
模型	—	0.45±0.02 <sup>##</sup>	4.28±1.47 <sup>##</sup>	0.26±0.03 <sup>##</sup>	2.87±0.20 <sup>##</sup>	12.14± 8.49 <sup>##</sup>
阿伦膦酸钠	0.12	0.56±0.09 <sup>*</sup>	10.89±1.28 <sup>**</sup>	0.32±0.04 <sup>##</sup>	4.51±0.53 <sup>**</sup>	110.23±38.41 <sup>**</sup>
女贞子水提液	3.5	0.57±0.04 <sup>*</sup>	10.72±2.46 <sup>**</sup>	0.37±0.06 <sup>**</sup>	4.21±1.12 <sup>*</sup>	98.47±17.84 <sup>**</sup>

模型组相比，大鼠股骨最大载荷、最大应力、弹性模量均明显升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )。

### 3.8 对去卵巢大鼠股骨病理形态学的影响

股骨组织切片 HE 染色结果见图 4，光镜 ( $\times 4$ ) 下观察发现，与假手术组相比，模型组大鼠股骨头部位，脂滴明显增多，骨小梁结构紊乱、变细、断裂。与模型组相比，女贞子水提液组和阿伦膦酸钠组大鼠的骨小梁排列相对整齐，骨微结构形态得到改善，脂滴明显减少，骨小梁增粗、排列整齐，但与假手术组相比，女贞子水提液组大鼠骨组织结构

仍然未恢复到正常状态。

### 3.9 对去卵巢大鼠股骨组织钙化的影响

在成骨细胞分化过程中，钙离子与茜素红反应后，沉积形成钙结节。钙结节数量反映了成骨细胞的活化程度和骨形成速度。如图 5 所示，茜素红染色后光镜下观察发现，与假手术组相比，模型组大鼠股骨成骨细胞钙化结节数量明显减少。与模型组比较，阿伦膦酸钠组或女贞子水提液组股骨的钙结节数量明显增加 ( $P < 0.01$ )，分布也相对比较均匀。

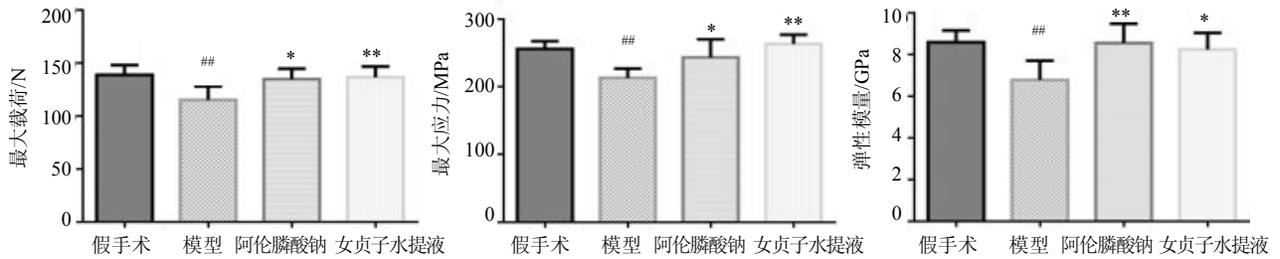


图 3 女贞子水提液对去卵巢大鼠股骨生物力学改变的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Effect of water extract from FLL on changes of femur bone biomechanics in ovariectomized rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

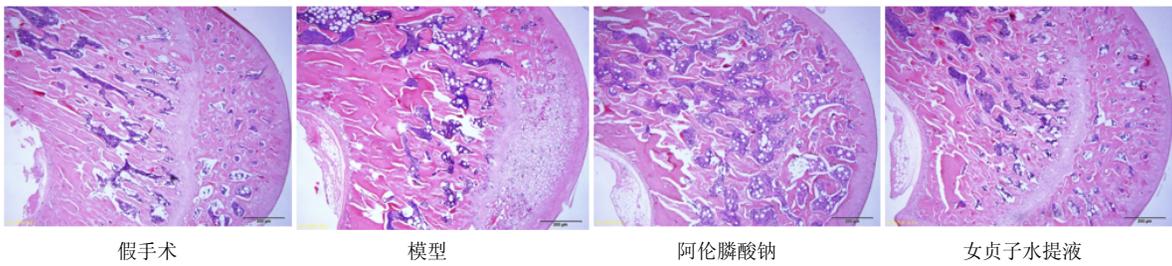


图 4 大鼠股骨 HE 染色

Fig. 4 HE staining of femur in rats

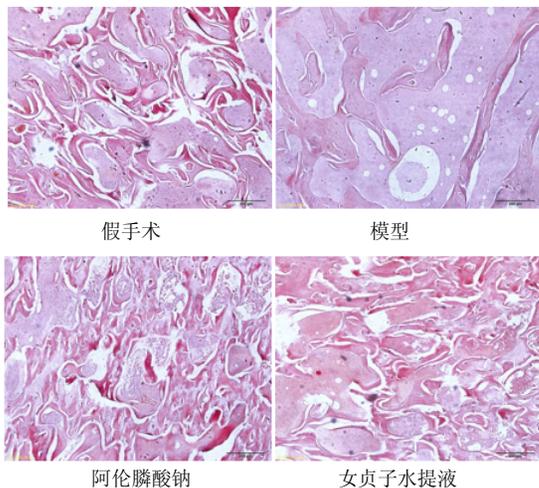
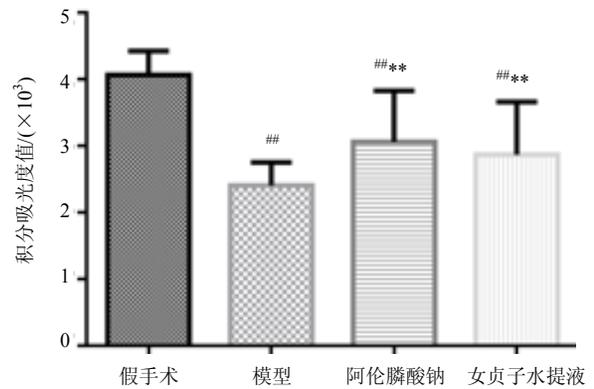


图 5 大鼠股骨茜素红染色 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Fig. 5 Alizarin red S staining of femur in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )



#### 4 讨论

绝经后妇女骨质疏松属于高转化型骨质疏松, 由于卵巢功能减退, 雌激素缺乏, 导致骨强度受损, BMD 与骨质量下降, 骨脆性增加, 易于骨折, 严重地影响中老年女性的身体健康和生活质量, 甚至缩短寿命。去卵巢建立的骨质疏松模型是研究绝经后骨质疏松的经典方法。本实验结果显示模型组去卵巢后, 大鼠体质量增加, BMD 降低, 骨微结构破坏, 骨结构力学性能下降, 骨质量和骨强度下降, 表明造模成功<sup>[10]</sup>。

女贞子具有补益肝肾、清虚热、明目的功效, 自古以来就被用于治疗“骨痿”“骨痹”之症, 有强筋健骨的功效。《本草纲目》记载:“女贞子可补中, 安五脏, 养精神, 除百病。久服使人肥健, 轻身不老, 强阴, 健腰膝, 明目。”有研究报道, 脂肪细胞和炎症因子能间接或直接抑制成骨细胞的生成, 增加破骨细胞的生成, 并促进破骨细胞发挥其功能, 从而造成骨丢失<sup>[11-12]</sup>。现代药理研究表明, 女贞子有降血糖、调血脂、抗炎等作用, 也是治疗骨质疏松的常用有效药物<sup>[13-14]</sup>。本实验结果表明, 女贞子水提液连续治疗 12 周, 可以缓解大鼠因卵巢切除后雌激素减少而引起的体质量增加; 升高股骨头和 L2、L4、L5 的 BMD, 抑制去卵巢诱发的骨质量降低; 升高 TD、BV/TV、BS/BV、Tb.Th、Tb.N、Conn.D, 降低 BD、Tb.Sp、SMI、DA, 改善骨微结构, 增强骨强度; 升高最大载荷、最大应力、弹性模量, 增强骨生物力学性能; 升高 HDL-C, 降低 TC、TG、LDL-C, 调节脂质代谢, 以上结果同研究报道相一致。

血液和尿液的生化指标可以反映骨代谢水平, 去卵巢后会引发钙、磷代谢紊乱, 血钙和骨钙减少, 肾脏排出的尿钙增多, 引起钙缺乏; 血磷和尿磷的增多也使骨形成和骨钙化能力降低, 导致矿物质沉积减少, 骨骼物质基础缺乏, BMD 和骨量降低, 骨骼脆性增加, 引发骨质疏松甚至骨折<sup>[15-17]</sup>。此外, 去卵巢还可引起骨转换率升高, 骨吸收大于骨形成, 使骨量增加受阻。本实验发现用女贞子水提液干预 12 周后, 去卵巢大鼠血钙和血磷水平升高, 尿钙和尿磷水平降低, 钙、磷代谢改善, 骨组织钙化加强。同时, 茜素红染色也发现, 女贞子水提液可以明显提高去卵巢大鼠骨组织的钙盐沉积, 促进成骨细胞的成熟和矿化, 加速骨形成。

骨钙素和胶原蛋白是构成骨组织的主要蛋白,

血清 PINP 和 OCN 是作为骨形成的生化指标; CTX-I 和尿 DPD 是作为骨吸收的生化指标。研究发现, 去卵巢大鼠的骨转换率升高, 骨形成和骨吸收均增强, PINP 的量明显降低; OCN、CTX-I、ALP 和 DPD 的量明显升高<sup>[18-19]</sup>。本实验研究也发现, 女贞子水提液可以升高去卵巢大鼠血中 PINP 量, 降低 ALP、CTX-I、OCN 和 DPD 量, 从而调节骨胶原蛋白和非胶原蛋白的代谢, 降低去卵巢诱发的高骨转换率, 促进骨形成, 抑制骨吸收。

综上所述, 本实验研究发现, 女贞子水提液能改善去卵巢诱发的骨质疏松模型大鼠的骨密度、提高其骨强度, 可能是通过调节钙、磷代谢, 骨组织胶原蛋白和非胶原蛋白代谢而发挥预防和治疗骨质疏松的作用。

#### 参考文献

- [1] 李虎臣, 赵素云, 侯逢春, 等. 补肾壮骨胶囊预防治疗骨质疏松症的临床研究 [J]. 河北中医, 1997, 19(1): 10-11.
- [2] 王亮亮. 骨松灵汤治疗骨质疏松症疗效观察 [J]. 陕西中医, 2015, 36(3): 312-313.
- [3] 李剑松. 补肾壮髓汤治疗原发性骨质疏松症临床观察 [A] // 全国第七届中西医结合风湿病学术会议论文汇编 [C]. 北京: 中国中西医结合学会, 2008.
- [4] 张明发, 沈雅琴. 女贞子及其活性成分抗骨质疏松症的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(6): 566-571.
- [5] Zhang Y, Lai W P, Leung P C, et al. Effects of *Fructus Ligustri Lucidi* extract on bone turnover and calcium balance in ovariectomized rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(2): 291-296.
- [6] 苏甜, 罗湘杭. 血脂紊乱与骨代谢 [J]. 药品评价, 2015, 12(15): 27-33.
- [7] Cheng M, Wang Q W, Fan Y K, et al. A traditional Chinese herbal preparation, Er-Zhi-Wan, prevent ovariectomy-induced osteoporosis in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138(2): 279-285.
- [8] Liu R H, Kang X, Xu L P, et al. Effects of the combined extracts of *Herba Epimedii* and *Fructus Ligustri Lucidi* on bone mineral content and bone turnover in osteoporotic rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15(1): 112.
- [9] Liu R H, Kang X, Xu L P, et al. Effect of the combined extracts of *Herba Epimedii* and *Fructus Ligustri Lucidi* on sex hormone functional levels in osteoporosis rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 1-13.
- [10] 张伟, 李晶, 宋敏, 等. 淫羊藿总黄酮对去势大鼠钙、磷代谢的影响 [J]. 西部中医药, 2012, 25(8): 30-32.

- [11] 邢联平, 张倩, 姚振强. 破骨细胞介导炎症性骨丢失的研究进展 [J]. 中华创伤骨科杂志, 2006, 8(7): 671-674.
- [12] 朱恒, 刘元林, 陈继德, 等. 向成骨细胞和成脂肪细胞分化的小鼠骨间充质干细胞调节单核细胞来源的破骨细胞发育 [J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(5): 1187-1190.
- [13] 刘亭亭, 王萌. 女贞子化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14): 228-234.
- [14] 郭鱼波, 马如风, 王丽丽, 等. 女贞子治疗骨质疏松作用及其机制的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 851-856.
- [15] 秦腊梅, 姜良铎, 肖永华, 等. 三仙汤对去卵巢大鼠骨密度和钙磷代谢的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11(1): 91-93.
- [16] 汤淑媛. 骨康对去势大鼠钙磷代谢影响的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2001.
- [17] 张林, 范颖, 陈文娜, 等. 补肾、健脾和补肾健脾方对尾部悬吊大鼠钙、磷代谢的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 193-196.
- [18] Huh J E, Kim S J, Kang J W, *et al.* The standardized BHH10 extract, a combination of *Astragalus membranaceus*, *Cinnamomum cassia*, and *Phellodendron amurense*, reverses bone mass and metabolism in a rat model of postmenopausal osteoporosis [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(1): 30-39.
- [19] Choi J S, Kim J W, Kim K Y, *et al.* Antiosteoporotic effects of Polycan in combination with calcium lactate-gluconate in ovariectomized rats [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(3): 957-967.