

不同炮制方法的巴戟天寡糖对骨质疏松模型雄性小鼠氧化应激和股骨组织形态的影响

庄文德¹, 钟 诚¹, 陈浩谚², 王东平¹, 郭浩华¹, 丁 平³, 晋大祥⁴, 谢炜星^{4*}

1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510006
2. 华南理工大学材料科学与工程学院, 广东 广州 511400
3. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006
4. 广州中医药大学第一附属医院 脊柱骨科, 广东 广州 510405

摘要: 目的 探讨巴戟天寡糖对环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)诱导骨质疏松雄性小鼠氧化应激指标和股骨组织形态的影响, 并探析炮制工艺对巴戟天寡糖成分及效用的影响。方法 对巴戟天寡糖及酒巴戟天寡糖中成分进行提取分离并验证。将雄性昆明小鼠随机分为对照组、模型组、维生素 D₃ (5 µg/kg) 组及巴戟天寡糖低、高剂量 (50、200 mg/kg) 组和酒巴戟天寡糖低、高剂量 (50、200 mg/kg) 组。除对照组外, 其余小鼠连续 15 d ig CTX (4.5 mg/kg) 制备骨质疏松模型, 造模结束后, 给予相应药物干预 4 周, 测定各组小鼠血清中谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平; 采用 Micro-CT 对股骨远端骨微结构进行分析; 采用三点弯曲法测定骨生物力学参数; 切片测量骨组织形态计量学参数。结果 巴戟天寡糖及酒巴戟天寡糖的 6 种寡糖成分的含量不同, 巴戟天寡糖中 D-果糖、蔗糖、1-蔗糖三糖、耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖的含量较酒巴戟天寡糖更多, 而酒巴戟天寡糖中 D(+)-无水葡萄糖的含量更多。与模型组相比, 巴戟天寡糖低剂量组小鼠股骨的骨密度显著增加 ($P < 0.01$); 骨生物力学参数改善 ($P < 0.05$ 、 0.01); 血清 MDA 水平降低 ($P < 0.05$); 松质骨的骨小梁面积比 (percentage of trabecular bone area, Tb.Ar)、荧光标记周长比 (percentage of fluorescent label perimeter, L.Pm)、骨矿化沉积率 (mineral apposition rate, MAR) 及骨形成率 (bone formation rate to bone volume, BFR/BV) 显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 骨小梁分离度 (trabecular separation, Tb.Sp) 和破骨细胞数目 (number of osteoclast, OC.N) 显著降低 ($P < 0.01$); 皮质骨的 MAR 显著降低 ($P < 0.05$), BFR/BV 显著升高 ($P < 0.01$)。巴戟天寡糖高剂量组小鼠骨密度显著增加 ($P < 0.01$); 血清中 CAT 活性显著升高 ($P < 0.01$); 松质骨组织中 Tb.Ar 显著升高 ($P < 0.05$), Tb.Sp 显著降低 ($P < 0.05$)。酒巴戟天寡糖低剂量组小鼠骨密度显著增加 ($P < 0.01$); 骨生物力学参数改善 ($P < 0.05$); 血清 GSH-Px 活性升高 ($P < 0.01$); 松质骨的 Tb.Ar、L.Pm、MAR 及 BFR/BV 显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), Tb.Sp 和 OC.N 显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 皮质骨的 MAR 显著降低 ($P < 0.05$), BFR/BV 显著升高 ($P < 0.05$)。酒巴戟天寡糖高剂量组小鼠血清中 CAT 活性显著升高 ($P < 0.01$), 对于骨结构改变则无明显影响作用。结论 不同炮制工艺会影响巴戟天寡糖的成分含量。巴戟天寡糖及酒巴戟天寡糖均能不同程度地改善氧化应激指标, 但低剂量的巴戟天寡糖及酒巴戟天寡糖对于改善 CTX 引起的骨质疏松的作用更为显著。

关键词: 巴戟天寡糖; 酒炙; D-果糖; 蔗糖; 1-蔗糖三糖; 耐斯糖; 1F-果呋喃糖基耐斯糖; D(+)-无水葡萄糖; 氧化应激; 骨质疏松

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)17-5409-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.17.017

Effect of *Morinda officinalis* oligosaccharides concocted by different methods on oxidative stress and femoral tissue morphology in osteoporotic male mice

ZHUANG Wen-de¹, ZHONG Cheng¹, CHEN Hao-yan², WANG Dong-ping¹, GUO Hao-hua¹, DING Ping³, JIN Da-xiang⁴, XIE Wei-xing⁴

1. The First Clinical School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China
2. School of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 511400, China

收稿日期: 2022-04-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074007)

作者简介: 庄文德, 硕士研究生, 研究方向为中医药防治骨质疏松。Tel: 15768884884 E-mail: 20201120142@stu.gzucm.edu.cn

*通信作者: 谢炜星, 副主任医师, 研究方向为脊柱外科及骨质疏松防治。Tel: 13560079199 E-mail: xwx841211@163.com

3. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

4. Department of Spinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

Abstract: Objective To investigate the effects of *Morinda officinalis* oligosaccharides (MO) on oxidative stress indexes and femoral tissue morphology in male mice with cyclophosphamide (CTX)-induced osteoporosis, and explore the effects of processing technology on the composition and efficacy of MO. **Methods** The components in MO and wine *M. officinalis* oligosaccharides (WMO) were extracted, separated and verified. Male Kunming mice were randomly divided into control group, model group, vitamin D₃ (5 µg/kg) group, MO low-and high-dose (50, 200 mg/kg) groups, WMO low-and high-dose (50, 200 mg/kg) groups. Except for control group, the other mice were continuously ig CTX (4.5 mg/kg) for 15 d to establish osteoporosis models. After the modeling, mice were given corresponding drug for 4-week intervention, glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) activities and malondialdehyde (MDA) level in serum of mice in each group was measured; Micro-CT was used to analyze distal femur bone microstructure; Three-point bending method was used to determine bone biomechanical parameters; Slices were used to measure bone histomorphometric parameters. **Results** MO and WMO had different contents of six kinds of oligosaccharides. Contents of *D*-fructose, sucrose, 1-fructose, nystose and 1F-fructofuranosylnystose in MO was higher than that of WMO, while content of *D*(+)-anhydroglucose was higher in WMO. Compared with model group, bone mineral density of femur of mice in WO low-dose group was significantly increased ($P < 0.01$), bone biomechanical parameters were improved ($P < 0.05, 0.01$), MDA level in serum was decreased ($P < 0.05$); Percentage of trabecular bone area (Tb.Ar), percentage of fluorescent label perimeter (L.Pm), mineral apposition rate (MAR) and bone formation rate to bone volume (BFR/BV) in cancellous bone were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), trabecular separation (Tb.Sp) and number of osteoclasts (OC.N) were significantly decreased ($P < 0.01$); MAR in cortical bone was significantly decreased ($P < 0.05$), and BFR/BV was significantly increased ($P < 0.01$). Bone mineral density of mice in MO high-dose group was significantly increased ($P < 0.01$), CAT activity in serum was significantly increased ($P < 0.01$), Tb.Ar in cancellous bone tissue was significantly increased ($P < 0.05$), Tb.Sp was decreased ($P < 0.05$). Bone mineral density in WMO low-dose group was significantly increased ($P < 0.01$), bone biomechanical parameters were improved ($P < 0.05$), GSH-Px activity in serum was increased ($P < 0.01$); Tb.Ar, L.Pm, MAR and BFR/BV in cancellous bone were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), Tb.Sp and OC.N were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$); MAR in cortical bone was significantly decreased ($P < 0.05$), BFR/BV was significantly increased ($P < 0.05$). CAT activity in serum of mice in WMO high-dose group was significantly increased ($P < 0.01$), but had no significant effect on the changes of bone structure. **Conclusion** Different processing techniques can affect the content of MO. MO and WMO can improve oxidative stress indicators to varying degrees, but effect of low dose MO and WMO on improving CTX-induced osteoporosis are more significant.

Key words: *Morinda officinalis* oligosaccharides; wine process; *D*-fructose; sucrose; 1-fructose; nystose; 1F-fructofuranosylnystose; *D*(+)-anhydroglucose; oxidative stress; osteoporosis

随着老年化社会的来临, 男性骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 的发病率也逐年升高。据报道, 50 岁以上的群体中男性 OP 患病率为 6.0%, 需要进行防治的低骨量男性群体患病率高达 46.9%^[1], 而且伴随年龄的增加, 男性 OP 患者意外骨折后死亡率更高^[2], 具有高危害性。现代研究表明人体衰老的发生发展与机体氧化应激水平紧密联系^[3], 而氧化应激是导致 OP 发病一大原因^[4]。目前批准用于治疗男性 OP 药物主要是双膦酸盐类、活性维生素 D 制剂以及降钙素类药物, 长期使用会出现不良反应, 治疗手段较局限^[5-6]。根据《黄帝内经·素问》理论, 人体的衰老、OP 的发病均与肾阳虚衰有密切联系。巴戟天 *Morinda officinalis* How 具有补肾阳、壮筋骨、祛风湿的功效。现代药理学研究发现, 巴戟

天具有抗骨质疏松、抗炎、镇痛、抗衰老、抗氧化等多种生物活性, 而且酒炙炮制后, 其效应会发生改变。此外, 巴戟天寡糖作为巴戟天主要的药效成分, 其质量分数可占药材干质量的 10%以上^[7-12]。基于此, 本研究通过以巴戟天寡糖及酒制巴戟天寡糖干预环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 致 OP 雄性小鼠, 考察其氧化应激指标及股骨骨密度、骨微结构变化, 探究巴戟天寡糖抗 OP 作用及炮制工艺对巴戟天寡糖效应的影响, 以期为研究男性 OP 的治疗及巴戟天寡糖的进一步开发及临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性昆明小鼠, 体质量 (20±2) g, 4 周

龄, 购自广州中医药大学实验动物中心, 生产许可证号 SYXK (粤) 2018-0085。动物饲养于室温 20~25 °C、湿度 40%~60% 的环境中, 室内照明以自然采光为主, 通风良好, 环境较安静。动物实验符合广州中医药大学实验动物伦理委员会规定, 均符合 3R 原则。

1.2 药品与试剂

注射用 CTX (批号 9F312A) 购自 Baxter Oncology GmbH 公司; 维生素 D₃ 滴剂 (批号 20180401-1) 购自杭州海王生物工程有限公司; 巴戟天寡糖及酒巴戟天寡糖由广州中医药大学中药学院丁平教授提供; 谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 试剂盒 (批号 20191209)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 20191218)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 可见光试剂盒 (批号 20191214) 均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器

Primaide 高效液相色谱仪 (日本日立高新技术公司); UM5800 型蒸发光散射检测器 (上海通微分析技术有限公司); XR 205SM-DR 型电子分析天平 (瑞士 Precisa 公司); DFT-200 型高速万能粉碎机 (温岭市林大机械有限公司); CQ-200 型超声波清洗器 (上海音波声电科技公司); Eclipse TE2000-5 型倒置荧光显微镜 (日本尼康公司); BC-2800Vet 型全自动动物血液细胞分析仪 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); 1510 型全波长酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); CT14RD 型低速冷冻离心机 (天美科学仪器有限公司); 移液枪 (德国 Eppendorf 公司); SkyScan 1276 Micro-CT 扫描仪 (美国 Bruker 公司)。

2 方法

2.1 巴戟天寡糖及酒巴戟天寡糖中成分的验证

2.1.1 样品制备 分别取巴戟天寡糖、酒巴戟天寡糖各 0.1 g, 加入 60% 乙腈溶解并定容至 10 mL, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.1.2 色谱条件 Waters XBridgeTM Amide 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 3.5 μm), 流动相为 0.2% 三乙胺乙腈 (A)-0.2% 三乙胺水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 75%~70% A; 10~20 min, 70% A; 20~45 min, 70%~60% A; 45~60 min, 60% A; 60~63 min, 60%~75% A; 63~75 min, 75% A。体积流量为 0.8 mL/min; 进样量为 20 μL; 蒸发光散射检测器 (ELSD) 漂移管温度为 75 °C; 氮气体积流

量为 2.0 L/min; 柱温为 35 °C。

2.2 动物分组、造模及给药

动物适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组、模型组、维生素 D₃ (5 μg/kg) 组及巴戟天寡糖低、高剂量 (50、200 mg/kg) 组和酒巴戟天寡糖低、高剂量 (50、200 mg/kg) 组, 每组 13 只。除对照组外, 其余各组小鼠 ig CTX (4.5 mg/kg) 制备 OP 模型^[13], 对照组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续 15 d。造模结束后, 各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积生理盐水, 1 次/d, 连续 4 周。观察各组小鼠的运动状态、精神状态、毛发外观等变化。

2.3 各组小鼠血清中 GSH-Px、CAT 活性及 MDA 水平的检测

给药 4 周后, 小鼠 ip 戊巴比妥钠 (1 mL/kg) 后进行腹主动脉采血, 全血于室温放置, 分层后 3500 r/min 离心 10 min, 取上层血清, 按试剂盒说明书测定血清中 GSH-Px、CAT 活性及 MDA 水平。

2.4 各组小鼠股骨 Micro-CT 检测

给药结束后, 小鼠 ip 戊巴比妥钠 (1 mL/kg) 安乐死, 逐层分离骨组织肌肉, 取右侧股骨行 Micro-CT 连续扫描, 扫描参数: 电流 100 μA; 电压 80 kV; 扫描厚度 15 μm; 滤片 0.5 mm; 扫描方向沿股骨长轴扫描股骨远端, 最终获取连续平面 Micro-CT 图像。扫描完成后在主机上选出股骨远端 1.5 mm 的区域为感兴趣区域 (range of interests, ROI), 在配套软件上分析骨密度。

2.5 各组小鼠股骨生物力学性能的测定

用游标卡尺测量小鼠股骨的长度、短轴宽度和长轴宽度, 用万能材料试验机进行三点弯曲试验, 测定骨骼的最大载荷、最大挠度、最大应力、最大应变和能量吸收值。

2.6 各组小鼠松质骨及皮质骨形态计量学分析

取各组小鼠松质骨及皮质骨, 制备不脱钙骨组织塑料切片, 并对组织切片进行测量, 进行骨组织形态计量学分析。分别测量并计算骨小梁面积比 (percentage of trabecular bone area, Tb.Ar)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁数量 (trabecular number, Tb.N)、骨小梁分离度 (trabecular separation, Tb.Sp)、皮质骨面积比 (percentage of cortical bone area, Ct.Ar)、骨髓腔面积比 (percentage of marrow-cavity area, Ma.Ar)、荧光标记周长比 (percentage of fluorescent label perimeter, L.Pm)、骨矿化沉积率 (mineral apposition rate, MAR)、骨形

成率 (bone formation rate to bone volume, BFR/BV) 和破骨细胞数目 (number of osteoclast, OC.N) 等参数。

2.7 统计学分析

结果采用 SPSS 22.0 软件进行方差分析及检验, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间样本均数比较采用单因素方差分析进行处理。

3 结果

3.1 巴戟天寡糖和酒巴戟天寡糖的成分分析

如图 1 和表 1 所示, 巴戟天寡糖及酒巴戟天寡糖中 6 种寡糖的含量不同, 巴戟天寡糖中 *D*-果糖、蔗糖、1-蔗果三糖、耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖的含量较酒巴戟天寡糖更多, 而酒巴戟天寡糖中 *D*(+)-无水葡萄糖的含量更多。

3.2 动物行为学观察

与对照组比较, 模型组小鼠毛发稀疏干枯, 懒动思卧, 精神状态欠佳。与模型组比较, 各给药组

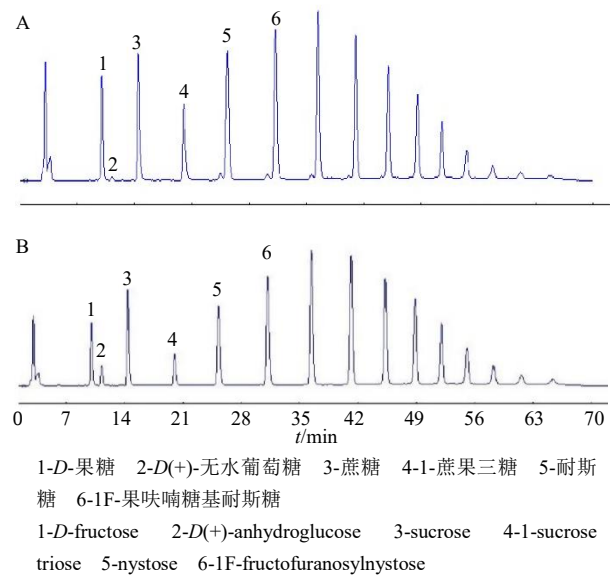


图 1 巴戟天寡糖 (A) 及酒巴戟天寡糖 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of *M. officinalis* oligosaccharides (A) and wine *M. officinalis* oligosaccharides (B)

表 1 巴戟天寡糖及酒巴戟天寡糖中 6 种寡糖成分

Table 1 Six oligosaccharides in *M. officinalis* oligosaccharides and wine *M. officinalis* oligosaccharides

组别	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	<i>D</i> -果糖	<i>D</i> (+)-无水葡萄糖	蔗糖	1-蔗果三糖	耐斯糖	1F-果呋喃糖基耐斯糖
巴戟天寡糖	62.020	6.395	73.930	64.869	100.854	148.458
酒巴戟天寡糖	56.229	25.097	67.922	39.450	88.319	141.863

小鼠精神状态好转, 毛发较光亮。对照组小鼠无死亡, 模型组死亡 2 只, 维生素 D₃ 组死亡 1 只, 巴戟天寡糖低剂量组死亡 2 只, 巴戟天寡糖高剂量组无死亡, 酒巴戟天寡糖低剂量组无死亡, 酒巴戟天寡糖高剂量组死亡 3 只。

3.3 巴戟天寡糖和酒巴戟天寡糖对 OP 小鼠血清中 GSH-Px、CAT 活性及 MDA 水平的影响

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 GSH-Px 和 CAT 活性均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$),

MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 维生素 D₃ 组小鼠血清中 GSH-Px 和 CAT 活性均显著升高 ($P < 0.05$), MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$); 巴戟天寡糖低剂量组小鼠血清中 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$); 巴戟天寡糖高剂量组小鼠血清中 CAT 活性显著升高 ($P < 0.01$); 酒巴戟天寡糖低剂量组小鼠血清中 GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.01$); 酒巴戟天寡糖高剂量组小鼠血清中 CAT 活性显著升高 ($P < 0.01$)。

表 2 巴戟天寡糖和酒巴戟天寡糖对 OP 小鼠血清中 GSH-Px、CAT 活性及 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of *M. officinalis* oligosaccharides and wine *M. officinalis* oligosaccharides on GSH-Px, CAT activities and MDA level in serum of OP mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	GSH-Px/(μmol·L ⁻¹)	CAT/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
对照	—	13	629.05 ± 92.99	7.89 ± 1.95	4.31 ± 2.32
模型	—	11	553.54 ± 68.21 [#]	3.38 ± 0.64 ^{##}	7.84 ± 4.79 [#]
维生素 D ₃	—	12	658.01 ± 50.99 [*]	7.38 ± 0.75 [*]	4.03 ± 2.56 [*]
巴戟天寡糖	50	11	610.29 ± 72.19	5.49 ± 2.25	5.69 ± 2.26 [*]
	200	13	604.98 ± 58.33	7.37 ± 2.44 ^{**}	6.16 ± 2.88
酒巴戟天寡糖	50	13	707.23 ± 97.83 ^{**}	6.31 ± 2.75	7.28 ± 1.87
	200	10	563.70 ± 126.20	8.57 ± 1.88 ^{**}	6.80 ± 2.18

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下表同

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below tables

3.4 巴戟天寡糖和酒巴戟天寡糖对 OP 小鼠股骨微结构的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠皮质骨变薄,骨髓腔增大,骨小梁网状结构退化,呈现出明显的骨微结构破坏。与模型组比较,各给药组

小鼠皮质骨面积增加,骨髓腔缩小,骨小梁数量、宽度、长度、形态部分恢复,密度和网状结构联结性增加。其中,巴戟天寡糖低剂量组和酒巴戟天寡糖低剂量组基本达到对照组水平,与维生素 D₃ 组基本一致。

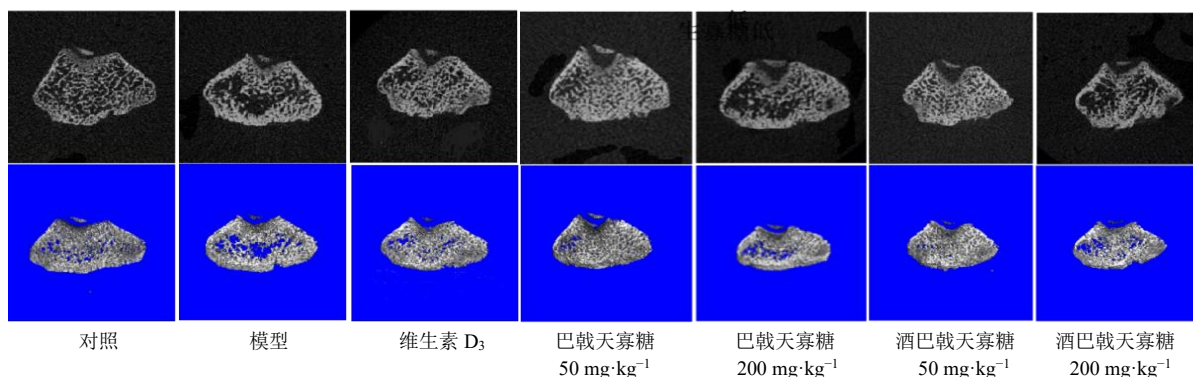


图 2 各组小鼠股骨远端 Micro-CT X-Y 三维剖面图

Fig. 2 Micro-CT X-Y three-dimensional cross-sectional view of distal femur of mice in each group

3.5 巴戟天寡糖和酒巴戟天寡糖对 OP 小鼠股骨骨密度的影响

如表 3 所示,与对照组比较,模型组小鼠股骨骨密度显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,除酒巴戟天寡糖高剂量组外,其余各给药组小鼠股骨骨密度均显著升高 ($P < 0.01$)。

表 3 巴戟天寡糖和酒巴戟天寡糖对 OP 小鼠股骨骨密度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of *M. officinalis* oligosaccharides and wine *M. officinalis* oligosaccharides on femoral bone density of OP mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	骨密度/(g·cm ⁻²)
对照	—	13	0.098 ± 0.009
模型	—	11	0.054 ± 0.005 ^{##}
维生素 D ₃	—	12	0.076 ± 0.005 ^{**}
巴戟天寡糖	50	11	0.097 ± 0.013 ^{**}
	200	13	0.081 ± 0.010 ^{**}
酒巴戟天寡糖	50	13	0.093 ± 0.018 ^{**}
	200	10	0.056 ± 0.018

3.6 巴戟天寡糖和酒巴戟天寡糖对 OP 小鼠股骨生物力学性能的影响

如表 4 所示,与对照组比较,模型组小鼠股骨的最大载荷、最大应力及最大应变均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01);与模型组相比,维生素 D₃ 组、巴戟天寡糖低剂量组和酒巴戟天寡糖低剂量组小鼠股骨的最大应力及最大应变均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01);巴戟天寡糖低剂量组小鼠股骨的最大载荷显著升高 ($P < 0.05$)。

3.7 巴戟天寡糖和酒巴戟天寡糖对 OP 小鼠股骨形态计量学参数的影响

如表 5 所示,与对照组比较,模型组小鼠松质骨组织中 Tb.Th 无显著变化,但 Tb.Ar、Tb.N、L.Pm、MAR 和 BFR/BV 均显著降低 ($P < 0.01$), Tb.Sp 和 OC.N 显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,维生素 D₃ 组、巴戟天寡糖低剂量组和酒巴戟天寡糖低剂量组小鼠松质骨组织中 Tb.Ar、L.Pm、MAR、BFR/BV

表 4 巴戟天寡糖和酒巴戟天寡糖对 OP 小鼠股骨生物力学性能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of *M. officinalis* oligosaccharides and wine *M. officinalis* oligosaccharides on biomechanical properties of femurs in OP mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	最大载荷/N	最大挠度/mm	最大应力/MPa	最大应变/%	能量吸收值/J
对照	—	13	135.5 ± 20.2	1.05 ± 0.46	103.5 ± 26.1	4.52 ± 0.65	0.075 ± 0.018
模型	—	11	99.5 ± 15.3 [#]	0.93 ± 0.12	83.0 ± 18.5 [#]	2.23 ± 0.23 ^{##}	0.058 ± 0.012
维生素 D ₃	—	12	113.2 ± 17.5	1.03 ± 0.38	102.5 ± 16.7 [*]	4.32 ± 0.31 ^{**}	0.065 ± 0.015
巴戟天寡糖	50	11	123.9 ± 19.3 [*]	1.04 ± 0.44	101.8 ± 14.9 [*]	4.21 ± 0.32 ^{**}	0.064 ± 0.017
	200	13	110.3 ± 14.8	0.94 ± 0.16	94.6 ± 0.0	2.51 ± 0.26	0.059 ± 0.016
酒巴戟天寡糖	50	13	116.8 ± 16.7	1.00 ± 0.33	102.8 ± 14.9 [*]	3.94 ± 0.37 [*]	0.064 ± 0.011
	200	10	101.6 ± 13.6	0.82 ± 0.15	86.7 ± 20.1	2.66 ± 0.94	0.060 ± 0.012

表 5 各组小鼠松质骨静态和动态参数的变化 ($\bar{x} \pm s$)Table 5 Changes of static and dynamic parameters in cancellous bone of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	Tb.Ar/%	Tb.Th/ μ m	Tb.N/mm ⁻¹	Tb.Sp/ μ m	L.Pm/%	MAR/(μ m·d ⁻¹)	BFR/BV/%	OC.N/mm ²
对照	—	13	20.5±7.3	52.5±12.3	3.1±0.9	286.4±28.5	18.0±5.4	8.5±0.2	276.2±35.6	4.0±1.5
模型	—	11	5.5±1.2 ^{##}	49.6±15.6	0.9±0.1 ^{##}	470.9±63.6 ^{##}	9.5±3.6 ^{##}	4.5±0.1 ^{##}	123.1±20.5 ^{##}	19.5±3.6 ^{##}
维生素 D ₃	—	12	8.6±1.3 [*]	50.6±11.3	1.0±0.3	305.8±31.4 ^{**}	15.2±3.7 [*]	6.5±0.3 [*]	256.8±10.3 ^{**}	10.2±2.0 ^{**}
巴戟天寡糖	50	11	10.5±2.3 ^{**}	52.5±18.2	1.0±0.4	310.3±32.1 ^{**}	16.3±5.5 [*]	6.3±0.2 [*]	256.5±20.6 ^{**}	10.0±1.9 ^{**}
	200	13	9.5±1.6 [*]	48.5±14.6	0.9±0.1	350.1±37.6 [*]	10.1±4.8	4.7±0.1	166.5±20.4	18.3±1.3
酒巴戟天寡糖	50	13	11.5±2.4 ^{**}	53.6±16.4	1.0±0.3	365.7±26.1 [*]	16.2±5.5 [*]	6.4±0.2 [*]	242.9±31.3 ^{**}	11.7±2.6 ^{**}
	200	10	5.9±1.4	49.7±12.4	0.8±0.1	471.0±94.5	10.7±2.5	4.6±0.2	155.9±29.2	17.0±2.3

显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)，Tb.Sp 和 OC.N 显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)；巴戟天寡糖高剂量组小鼠松质骨组织中 Tb.Ar 显著升高 ($P<0.05$)，Tb.Sp 显著降低 ($P<0.05$)。

如表 6 所示，与对照组比较，模型组小鼠皮质骨中 Ct.Ar、L.Pm、MAR 及 BFR/BV 均显著降低

($P<0.05$ 、 0.01)，Ma.Ar 显著增加 ($P<0.01$)，提示 CTX 诱导雄性小鼠皮质骨变薄，骨量丢失，生成速度减慢。与模型组比较，维生素 D₃ 组、巴戟天寡糖低剂量组和酒巴戟天寡糖低剂量组小鼠皮质骨组织中 Ma.Ar 显著降低 ($P<0.05$)，BFR/BV 显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。

表 6 各组小鼠皮质骨静态和动态参数的变化 ($\bar{x} \pm s$)Table 6 Changes of static and dynamic parameters in cortical bone of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	Ct.Ar/%	Ma.Ar/%	L.Pm/%	MAR/(μ m·d ⁻¹)	BFR/BV/%
对照	—	13	70.5±7.3	20.6±4.3	33.5±3.6	4.4±0.5	73.1±10.5
模型	—	11	55.5±11.4 [#]	29.6±5.6 ^{##}	25.2±5.4 [#]	2.8±0.1 [#]	56.4±5.6 ^{##}
维生素 D ₃	—	12	56.8±8.3	23.6±5.3 [*]	26.0±3.0	3.1±0.3	64.8±5.3 [*]
巴戟天寡糖	50	11	56.5±9.3	23.5±4.2 [*]	26.3±5.2	3.1±0.2	69.5±4.2 ^{**}
	200	13	59.5±8.6	28.5±4.6	25.1±4.7	2.9±0.1	56.5±6.2
酒巴戟天寡糖	50	13	57.5±10.4	24.6±6.4 [*]	27.3±3.3	3.0±0.2	62.9±4.6 [*]
	200	10	58.4±8.4	29.7±2.4	26.7±2.6	2.4±0.2	54.9±6.3

4 讨论

《素问·上古天真论》曾言“丈夫……六八阳气衰竭于上，面焦，发鬓颁白。七八肝气衰，筋不能动。八八天癸竭，精少，肾脏衰，形体皆极，则齿发去”。男性在生长发育以及衰老过程中需要耗损大量阳气，其中又以肾阳耗损最重^[14]。《素问·阴阳别论篇》中云：“阳气虚，则为偏枯。阳虚而不能养筋，则为痿”。肾阳虚衰，无以温煦濡养筋脉骨骼，甚则骨枯髓减，进展为“骨痿”。由此可见，运用补肾阳法干预男性 OP 的发病及进展具有中医理论上的依据。

现代研究表明，机体进入衰老状态后，骨微环境中增多的促炎性分泌蛋白会导致 OP 的发生^[15]，而衰老是细胞内成分累积性氧化损伤的结果，因此机体抗氧化系统对于延缓衰老及防治 OP 至关重要^[16]。既往研究发现 CTX 具有生殖毒性、骨质疏松等不良反应，不少研究者利用 CTX 构建与衰老、骨质疏松、组织高氧化应激状态等相关小鼠模

型^[12,17]。因此，本研究利用 CTX 干预雄性昆明小鼠构建 OP 模型，发现模型小鼠具有骨密度下降、骨量严重丢失、骨微结构破坏、氧化应激指标升高等特点，可用于模拟男性 OP 机体状态。

有学者发现临床上运用补肾阳法治疗男性 OP 患者，能够有效改善骨密度及骨代谢指标^[18]，但其具体机制尚不明确。目前，大量研究表明肉苁蓉、淫羊藿、杜仲等补肾阳中药能够提高雄性实验鼠体内组织中 GSH-Px 活性，降低 MDA 水平，延缓或逆转其组织的氧化损伤，还能够提高骨骼质量、骨密度，改善骨小梁结构等^[19-24]，更进一步地揭示了男性 OP 的发病与氧化应激具有一定联系，但目前从氧化应激角度探讨男性 OP 的发病及治疗的研究仍相对较少。因此，本研究使用巴戟天寡糖干预 CTX 致 OP 的雄性小鼠，发现其可以有效改善实验小鼠的骨密度、持续骨丢失及骨微结构破坏的现象，同时调节血清中 GSH-Px、CAT 活性及 MDA 水平。本研究还发现与维生素 D₃ 相比，巴戟天寡糖在改善

骨密度上效果更明显,在改善其余 OP 及氧化应激指标上则作用相近,表明巴戟天寡糖具有较好的抗 OP 及改善氧化应激作用,而且可能通过调节雄性实验鼠体内氧化应激发挥抗 OP 作用,但这仍需进一步实验证实。

研究发现,炮制后的巴戟天化学成分与作用效果发生改变,巴戟天酒炙后在机体能量代谢上具有与盐炙相似的炮制增效作用,且作用较盐炙更优;巴戟天酒炙后寡糖对生精障碍雄性小鼠生殖氧化应激作用明显优于生巴戟天寡糖^[12,25-26]。本研究发现巴戟天寡糖与酒巴戟天寡糖在 6 种寡糖成分的含量上均有不同,巴戟天寡糖中 D-果糖、蔗糖、1-蔗果三糖、耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖的含量较酒巴戟天寡糖更多,而酒巴戟天寡糖中 D(+)-无水葡萄糖的含量更多。

本研究结果显示,巴戟天寡糖及酒巴戟天寡糖均有较好的抗 OP 及改善氧化应激作用,但巴戟天寡糖改善血清 MDA 水平更显著,酒巴戟天寡糖在改善 GSH-Px 指标上更为明显。低剂量的巴戟天寡糖和酒巴戟天寡糖能够升高 CTX 致 OP 小鼠松质骨的 Tb.Ar、L.Pm、MAR 和 BFR/BV,显著降低 Tb.Sp 和 OC.N,一定程度上恢复变薄的皮质骨,减少皮质骨量丢失,增加皮质骨生成速度,与维生素 D₃ 作用相近,具有较好的抗 OP 作用。这可能是巴戟天寡糖调控骨保护素/核因子 κ B 受体活化因子配体/核因子 κ B 受体活化因子 (osteoprotegerin/ receptor activator of nuclear factor- κ B/receptor activator of nuclear factor κ B ligand, OPG/RANK/ RANKL) 通路从而发挥抗 OP 的作用^[27],但炮制后巴戟天寡糖的寡糖成分含量发生改变和剂量的不同,也影响其效用发挥,目前相关研究较少,其潜在机制尚不明确,这也提示可以进一步探讨巴戟天寡糖中不同寡糖成分的作用及效应机制,以明确巴戟天抗骨质疏松的有效成分及具体机制。

目前,临床上尚无针对男性 OP 的专门用药,且许多含有补肾阳药的抗 OP 药物服用周期往往较长,一般为 3~6 个月,患者容易出现口干、便秘、面红等不良反应,无法长期服用^[28]。同时,中药饮片质量良莠不齐,便携性差,也影响了其推广与使用^[29]。巴戟天寡糖具有低热、稳定、安全无毒等良好理化性质,并且已有中成药制剂应用于临床^[30],在抗 OP 方面具有较好的应用前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(4): 317-318.
- [2] Fuggle N R, Curtis B, Clynes M, *et al.* The treatment gap: The missed opportunities for osteoporosis therapy [J]. *Bone*, 2021, 144: 115833.
- [3] 丁宇, 王彦丰, 左夏林, 等. 细胞自噬与人体衰老调控的关联性研究进展 [J]. 国际老年医学杂志, 2022, 43(2): 223-227.
- [4] 何红梅, 覃冬云. 辅酶 Q10 治疗骨质疏松的研究进展 [J]. 中国处方药, 2022, 20(2): 176-178.
- [5] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 男性骨质疏松症诊疗指南 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2020, 13(5): 381-395.
- [6] 于龙, 王亮. 老年骨质疏松症现状及进展 [J]. 中国临床保健杂志, 2022, 25(1): 6-11.
- [7] Zhu J Y, Peng Q W, Xu Y, *et al.* *Morinda officinalis* oligosaccharides ameliorate depressive-like behaviors in poststroke rats through upregulating GLUT3 to improve synaptic activity [J]. *FASEB J*, 2020, 34(10): 13376-13395.
- [8] Xia T S, Dong X, Lin L Y, *et al.* Metabolomics profiling provides valuable insights into the underlying mechanisms of *Morinda officinalis* on protecting glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 166: 336-346.
- [9] Zhang Q, Zhang J H, He Y Q, *et al.* Iridoid glycosides from *Morinda officinalis* How. exert anti-inflammatory and anti-arthritic effects through inactivating MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 172.
- [10] Yang X, Chen D L, Chen T L, *et al.* Oligosaccharides from *Morinda officinalis* slow the progress of aging mice by regulating the key microbiota-metabolite pairs [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 9306834
- [11] Shi Y, Liu X Y, Jiang Y P, *et al.* Monotropein attenuates oxidative stress via Akt/mTOR-mediated autophagy in osteoblast cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109566.
- [12] 刘梦云, 秦祎蓓, 刘秋怡, 等. 基于正交试验设计-熵权逼近理想解排序法 (TOPSIS) 优选巴戟天酒炙工艺及炮制前后药效对比研究 [J]. 中草药, 2021, 52(20): 6208-6215.
- [13] 吴铁, 刘钰瑜, 崔燎, 等. 不同剂量的环磷酸胺对大鼠骨药理作用探讨 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17(3): 329-333.
- [14] 王琦. 王琦男科学 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社,

- 1997: 89.
- [15] 倪乙洪, 王正博, 刘权, 等. 细胞衰老在老年骨质疏松症防治中的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(8): 1207-1211.
- [16] 何毓婕, 曲涛, 王桐, 等. 松花粉对环磷酰胺致卵巢早衰大鼠的卵巢保护作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(6): 1005-1013.
- [17] 刘俐, 何清湖, 唐宇, 等. 龟甲胶对肾阴虚大鼠抗氧化活性和 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(5): 1406-1414.
- [18] 邵鹏, 丁旭锋, 顾建林, 等. 中西医结合治疗中老年男性骨质疏松症临床研究 [J]. 中国医药科学, 2020, 10(19): 52-54.
- [19] 郭俏俪, 武志博, 周玉碧, 等. 兰州肉苁蓉多糖的组成分析及抗氧化活性 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(15): 96-103.
- [20] 李金涛, 李时军, 宋章兴, 等. 富硒当归淫羊藿方对大鼠睾丸 SOD、MDA 及血清性激素的影响 [J]. 中国医药导报, 2021, 18(4): 9-13.
- [21] 王胜超, 李本科, 阚玉璇, 等. 杜仲补天素胶囊剂对腺嘌呤诱导的雄性大鼠生殖功能损伤的影响 [J]. 中华男科学杂志, 2020, 26(1): 63-73.
- [22] 徐双华, 吴清. 肉苁蓉复方颗粒对大鼠骨质疏松症的治疗作用 [J]. 中南药学, 2021, 19(9): 1854-1858.
- [23] 张永胜, 熊福生, 何浓, 等. 淫羊藿治疗骨质疏松的研究进展 [J]. 河南外科学杂志, 2021, 27(6): 164-167.
- [24] 李敏启, 杜娟, 杨盼盼, 等. 氧化应激调控骨质疏松症的研究进展 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2021, 59(6): 16-24.
- [25] 吴文辉, 管莉, 魏玉玲, 等. 基于能量代谢的巴戟天盐、酒炙炮制增效作用对比研究 [J]. 中医药临床杂志, 2021, 33(9): 1750-1753.
- [26] 史娟兰. 炮制对巴戟天化学成分影响的研究进展 [J]. 东南园艺, 2019, 7(6): 66-70.
- [27] 陈浩谚. 巴戟天寡糖对去卵巢骨质疏松大鼠骨微结构和骨组织 OPG、RANKL 表达影响的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2021.
- [28] 魏戎, 谢雁鸣, 张春和, 等. 中药治疗男性骨质疏松症的临床文献研究 [J]. 世界中医药, 2018, 13(2): 492-495.
- [29] 吴迪, 林逸轩, 李金菊, 等. 中医药治疗骨质疏松症近 10 年临床研究进展 [J]. 中医药临床杂志, 2019, 31(11): 2038-2041.
- [30] 曹重阳, 韩露, 王克, 等. 巴戟天寡糖联合帕罗西汀治疗抑郁症临床评价 [J]. 中国药业, 2020, 29(6): 148-150.

[责任编辑 李亚楠]