

·骨质疏松·

葛根素对绝经后骨质疏松大鼠不同部位骨骼的抗骨质疏松作用差异的研究

覃成禹¹ 周昊楠^{2,3} 陈远明¹

【摘要】目的 本文拟通过动物实验研究葛根素对大鼠骨密度的影响,探讨葛根素对不同部位骨骼抗骨质疏松作用的差异。**方法** 对24只雌性SD大鼠行双侧卵巢切除术,构建大鼠绝经后骨质疏松模型。采用葛根素处理大鼠后,分别于第2、4、8、12周采用双能X射线吸收法(DXA)检测其各部位骨骼骨密度随时间发生的变化,并对比不同部位骨骼骨密度、骨矿含量的差异,同时通过组织切片观察葛根素对骨组织微结构的影响。**结果** 葛根素应用后的第8周疗效最为显著,经葛根素处理后股骨远端、腰椎等松质骨的骨密度、骨矿含量显著提高,且骨小梁更粗、数量更多,而股骨中段等皮质骨的骨密度、骨矿含量变化则不大。**结论** 葛根素对绝经后骨质疏松大鼠松质骨的抗骨质疏松作用优于皮质骨。

【关键词】 葛根素; 绝经后骨质疏松症; 骨密度

The difference of anti-osteoporosis effect of Puerarin on different parts of bone in postmenopausal osteoporosis rats Qin Chengyu¹, Zhou Haonan^{2,3}, Chen Yuanming¹. ¹Department of Orthopedics, The Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530007, China; ²Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Medicine, Nanning 530011, China; ³Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China

Corresponding author: Chen Yuanming, Email: rkyygk@163.com

【Abstract】 Objective This study aims to investigate the effect of Puerarin on bone mineral density in rats through animal experiments, and explore the diversity of anti-osteoporosis effect of puerarin in different parts of bones. **Methods** Bilateral ovariectomy was performed on 24 female SD rats to establish the postmenopausal osteoporosis model. After the rats were treated with puerarin, the changes of bone mineral density (BMD) were detected by dual energy X-ray absorption (DXA) in the 2nd, 4th, 8th and 12th weeks. The differences of BMD and bone mineral content (BMC) in different parts were compared. The effect of Puerarin on the microstructure of bone tissue was evaluated by observing tissue sections. **Results** The effect of Puerarin was the most significant in the 8th week since it was applied. After Puerarin Treatment, the BMD and BMC of cancellous bone such as distal femur and lumbar spine increased significantly, and bone trabeculae of treatment group were thicker and more in quantity, while there was little change in cortical bone such as middle femur. **Conclusion** Puerarin has a stronger anti-osteoporosis effect on cancellous bone than cortical bone in postmenopausal osteoporosis rats.

【Key words】 Puerarin; Postmenopausal osteoporosis; Bone mineral density

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMO)是由雌激素水平降低导致骨组织微结构破坏和骨量减少的一种骨骼疾病。骨折是PMO的主要并发症,常见发生部位有椎体、髌部、骨盆等,是老年患者致残、致死的主要原因之一^[1]。雌激素治

疗是预防PMO的有效手段,但长期应用雌激素可引起乳腺癌、心血管意外的风险增加^[2]。葛根素作为一种植物类雌激素,已被发现可与雌激素受体 β 结合调节成骨细胞和破骨细胞活性,具有一定的抗骨质疏松作用,且相比于双膦酸盐、雌激素、特立帕肽

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2096-0263.2023.01.005

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81560777), 广西自然科学基金资助项目(2018JJA140280), 广西医科大学第二附属医院院内课题(EFYKY170007)

作者单位: 530007 南宁, 广西医科大学第二附属医院骨科¹; 530011 南宁, 广西中医药大学²; 463000 驻马店市中心医院³

通信作者: 陈远明, Email: rkyygk@163.com

等抗骨质疏松药物具有较高的安全性和较低的成本等优势^[3]。有研究发现,葛根素治疗可使骨质疏松大鼠骨密度增加,且治疗效果与雌激素治疗无异^[4],但关于葛根素对不同部位骨骼的抗骨质疏松作用有何差异目前尚未见相关报道。本文将通过对比葛根素治疗后小鼠各部位骨密度、骨矿含量及骨组织微结构变化,探索葛根素抗骨质疏松作用的组织特异性,为拓展葛根素在抗骨质疏松方面的临床应用提供新思路。

材料与方法

一、实验动物、仪器及材料

24只3月龄普通级实验用健康雌性SD大鼠[(重量 250 ± 50)g],由广西医科大学实验动物中心供给,许可证号:SCXK桂2014-0002。实验过程中所有大鼠均饲养于广西医科大学实验动物中心。实验手术器械由广西医科大学实验动物中心提供高温高压蒸汽灭菌。青霉素注射液(400万单位/瓶)购自华北制药股份有限公司,戊巴比妥钠(5g/瓶)购自北京博奥拓达科技有限公司,葛根素注射液(2ml:0.1g/支)购自华润双鹤利民药业有限公司,生理盐水购自中国大冢制药有限公司,苏木素伊红染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

二、绝经后骨质疏松雌性模型大鼠

将24只三个月大的雌性SD大鼠随机分为对照组和处理组。根据体重予以戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(30mg/kg)后,从背侧入路进行双侧卵巢切除术,在最后一根肋骨与腋窝中线相交处,距脊柱2cm处,逐层切开皮肤和肌肉0.5~1.0cm,露出乳白色脂肪团,钝性解剖,发现粉红色或黄红色的卵巢。输卵管的根部用丝线结扎,用小电刀切除卵巢后,在未观察到活动性出血后将输卵管轻轻放回原位,逐层缝合肌肉和皮肤,并用碘伏消毒。术后复苏期间以取暖器加热保暖,待大鼠苏醒且可自由取食、运动后放回笼子。术后三个月,通过扫描测定骨密度,验证骨质疏松模型的建立。

三、DXA测定骨密度及骨矿含量

绝经后骨质疏松雌性大鼠模型构建完成后,分别对处理组和对照组腹腔注射葛根素及等体积生理盐水,根据人与动物的剂量换算,葛根素注射到大鼠体内的剂量约为2mg/d。两组大鼠分别在葛根素注射的第2、4、8、12周行水合氯醛腹腔注射麻醉(0.3ml/100g),送至广西医科大学第一附属医院放

射科采用双能X射线吸收法(dual energy X-ray absorptiometry, DXA)检测各部位骨骼(腰椎、双侧股骨远端及中段)的骨密度及骨矿含量。

四、HE染色

分别于葛根素注射后的第2、4、8、12周骨密度扫描完成后,每组随机选取3只大鼠采用空气栓塞法处死,分离下肢,剔除胫骨,剥除肌肉,获取大鼠股骨远端标本,依次进行固定、脱钙、石蜡包埋、切片、脱蜡的操作,最后采用苏木素伊红(hematoxylin and eosin staining kit, HE)染色,获得大鼠远端骨组织切片,采用Cytation 5成像仪(BioTek, 美国)采集股骨远端骨组织镜下图像。

五、统计分析

采用SPSS 26.0(IBM, 美国)进行统计学分析,计量资料采用Kolmogorov-Smirnov检验是否符合正态分布,符合正态分布的数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两样本的比较采用完全随机设计 t 检验,多个独立样本对比则采用完全随机设计的单因素方差(One-way ANOVA)分析,采用LSD法进行多重比较,检验水准 α 取双侧0.05, $P<0.05$ 认为具有统计学意义。

结 果

一、葛根素的抗骨质疏松作用具有时间依赖性

分别在第2周、第4周、第8周和第12周处死大鼠前进行骨密度扫描(图1),对处理组大鼠在不同时间节点的骨密度进行单因素方差分析以及两两比较,结果提示,葛根素处理后的大鼠在第8周时各部位骨密度明显高于第2周(图2~6),差异具有统计学意义($P<0.05$),取该时间点的数据进行后续分析。

二、葛根素抗骨质疏松作用在不同部位的差异

于疗效最显著的第8周取两组大鼠各部位骨密度及骨矿含量数据进行对比,对大鼠各部位骨骼的相关参数在两组间的差异进行完全随机设计 t 检验,结果提示,在腰椎、双侧股骨远端中,处理组骨密度和骨矿含量均明显高于对照组(图7~8),差异具有统计学意义($P<0.05$),而在双侧股骨中段,两组骨密度和骨矿含量的差异并不具有统计学意义。

三、葛根素可改善松质骨中卵巢切除术后导致的骨小梁丢失

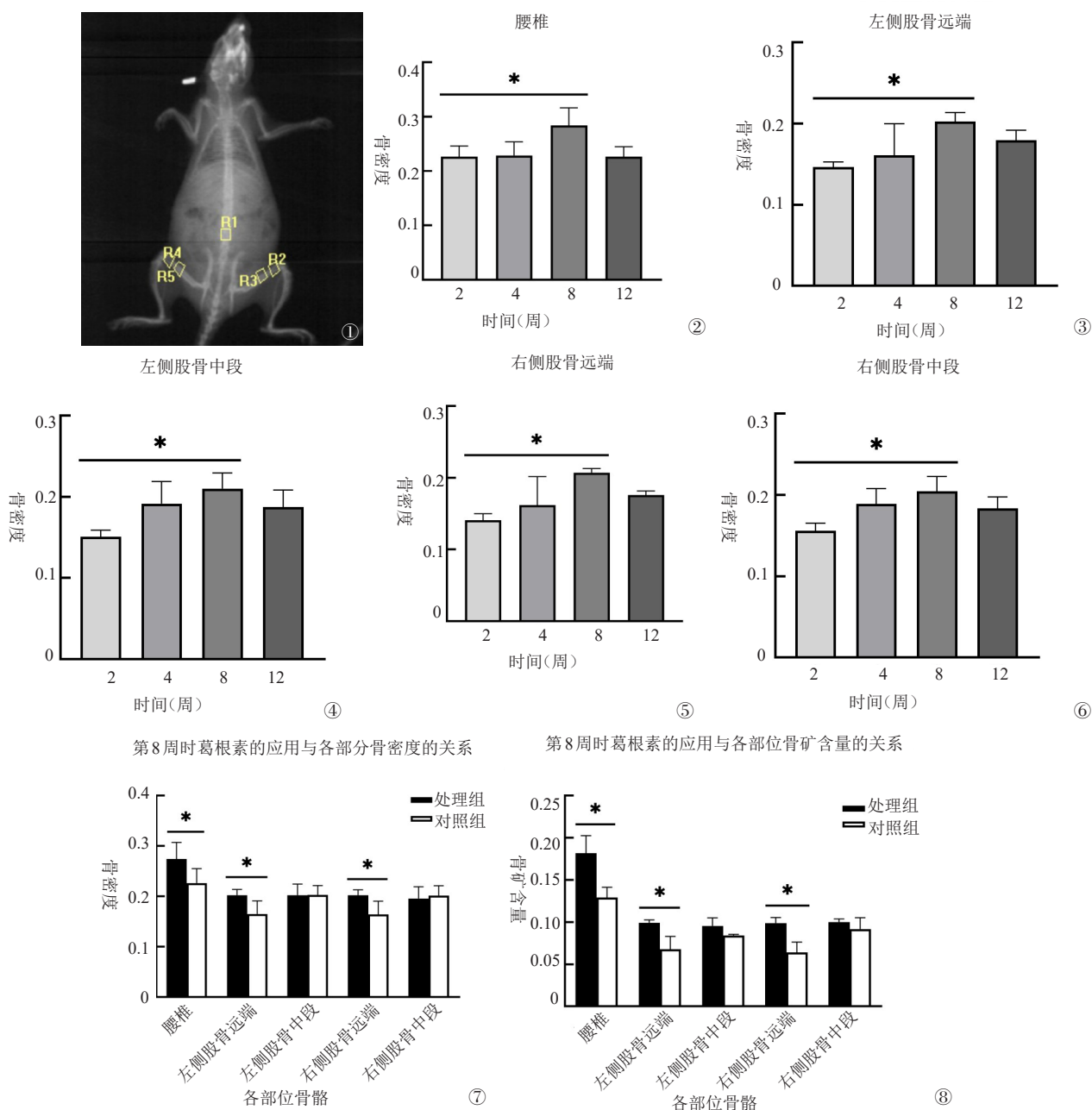
取骨密度扫描后处死的两组大鼠股骨远端制作组织切片,经HE染色,观察发现经葛根素处理的大鼠,其股骨远端骨组织相较于对照组,骨小梁更粗、

数量更多,骨小梁间隙更小,第8周时的骨组织微结构变化最为显著(图9)。

讨 论

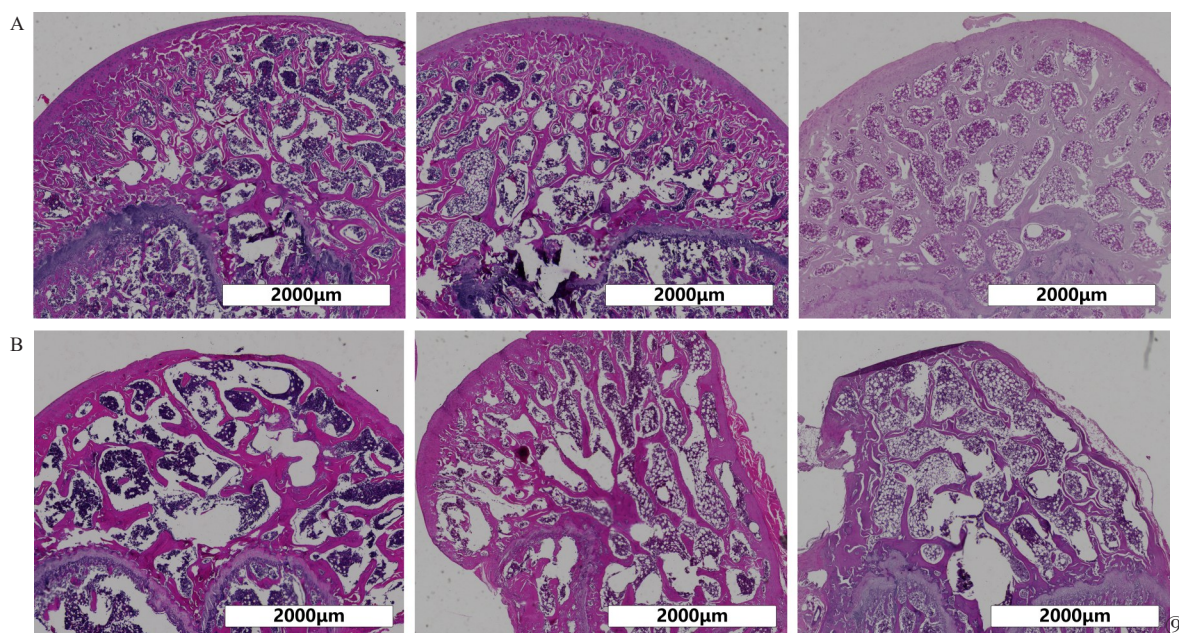
一、葛根素的雌激素样作用治疗PMO的潜在机制
原发性骨质疏松症可分为绝经后骨质疏松症

(Ⅰ型)、老年性骨质疏松症(Ⅱ型)和特发性骨质疏松症(包括青少年型),其中,因雌激素缺乏导致的PMO是老年女性发生骨折的一个重要原因^[5]。流行病学数据显示,在50岁以后女性骨折的发病率开始超过男性,且其发生骨质疏松性骨折的风险两倍于男性。雌激素应用于PMO可减少其所需钙的摄入量,从机制上来说,这是因为雌激素可减少骨组织中



注: “*”表示 $P < 0.05$

图 1 骨密度扫描部位示意图。各选定区域对应部位: R1 为腰椎, R2 为左侧股骨远端, R3 为左侧股骨中段, R4 为右侧股骨远端, R5 为右侧股骨中段。图 2~6 在大鼠各部位骨骼中, 葛根素应用时间与骨密度的关系。随着葛根素应用时间的延长, 处理组大鼠腰椎、双侧股骨远端及中段的骨密度发生上述变化。图 7~8 葛根素对不同部位骨骼抗骨质疏松作用存在差异。图 7 第 8 周时葛根素的应用与各部位骨骼骨密度的关系; 图 8 第 8 周时葛根素的应用与各部位骨骼骨矿含量的关系。



注：A.处理组；B. 对照组

图9 第8周时两组大鼠股骨远端骨组织微结构对比(HE染色)。对照两组切片,可见处理组骨小梁较粗、数量较多

破骨细胞的募集和形成,骨吸收的减少可促进 $1,25-(OH)_2-D_3$ 在肾脏的合成,改善肠道的钙吸收和肾脏钙的重吸收,以维持钙平衡^[6]。因此,当雌激素缺乏时,机体钙流失增加,需要通过骨溶解来维持钙平衡,从而导致骨质疏松。

成人骨骼分为皮质骨和松质骨,其中皮质骨结构强度最高,占机体骨骼重量的80%,松质骨仅占20%,但其中成骨细胞及破骨细胞的却最为活跃。约80%的骨重塑活动发生在松质骨中^[7]。因此当雌激素水平降低导致成骨分化抑制、破骨细胞分化增加时,松质骨的骨丢失最为明显,其典型的组织学表现为骨小梁变薄、骨小梁丧失、骨皮质变薄,富含松质骨的骨骼部位也更容易发生骨质疏松性骨折^[7-8]。本研究发现通过对比葛根素治疗后骨质疏松大鼠的骨密度和骨矿含量,发现葛根素在腰椎、股骨远端等骨松质中的抗骨质疏松作用明显,远优于股骨中段的骨皮质部分,而椎体压缩性骨折在骨质疏松症患者中较为常见^[9]。因此相较于预防肢体的脆性骨折,葛根素预防椎体压缩性骨折的作用可能更显著,我们推测这可能与松质骨和皮质骨自身成骨能力的差异有关。松质骨中含有丰富的成骨细胞、间充质干细胞、骨形态发生蛋白和生长因子,具有良好的成骨能力,临床中常用于创伤后的骨移植^[10]。葛根素可通过发挥雌激素样作用诱导骨组织中的间充质干细胞分化为成骨细胞,同时,抑制破骨细胞分化成熟,从而发挥抗骨质疏松作用^[11-13]。

我们以往的研究发现了葛根素可诱导脂肪干细胞向成骨分化,其他的一些研究也发现了葛根素可促进成骨细胞表达碱性磷酸酶,这体现了其促成骨的方面发挥的作用^[14,15]。在抑制破骨方面,目前的研究发现葛根素可促进成骨细胞中骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)的表达,并减少核因子 κB 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κB ligand, RANKL)的产生,OPG可竞争性结合RANKL,从而阻断其对破骨前体细胞的激活作用^[3,15-16]。RANKL促进破骨前体细胞分化成熟为破骨细胞的作用,依赖于MAPK和NF- κB 信号通路的激活,葛根素还可通过TRAF/ROS途径阻断MAPK和NF- κB 信号通路,从而发挥抑制破骨分化的作用^[17]。

二、葛根素在抗PMO治疗中扮演的角色

此外,在实验过程中我们发现葛根素治疗在第8周时抗骨质疏松效果最好,随后疗效出现了下降。类似的结果也在一项关于葛根提取物的动物实验中得到体现,当葛根提取物应用8周后部分骨组织的骨密度才表现出与对照组的差异,且此后骨密度下降速度减缓甚至出现回升,但仍有部分骨组织骨密度的下降趋势并未得到逆转。造成这一现象的原因可能是葛根素具有类雌激素作用,而成骨细胞与破骨细胞均可表达雌激素受体,因此葛根素同时促进骨形成和骨吸收,其体内药效则与靶细胞中雌激素受体表达量相关^[3,18]。这提示了葛根素单独应用于PMO治疗可能还存在不足,但其作为抗骨质疏

松的辅助治疗药物仍存在一定的价值。目前常见的针对PMO的治疗药物有双膦酸盐、地诺单抗、绝经激素补充治疗等。其中绝经激素补充治疗可预防因雌激素水平下降引起的骨质疏松症,但也增加了乳腺癌和宫颈癌等生殖系统肿瘤发生的风险;地诺单抗属于RANKL抑制剂,可减少破骨细胞的激活,但其一旦停药可导致病情反弹,引起多发性椎体骨折,须加用双膦酸盐以预防,但这也增加了下颌骨坏死、肾脏毒性等不良反应的风险,且治疗成本较高^[1,19]。葛根素作为一种潜在的抗骨质疏松辅助治疗手段,可能减少其他药物使用剂量以避免毒副作用,且由于其成本较低,在临床中具有广阔的应用前景,但其具体作用机制以及最佳用药方案仍需进一步研究加以阐明。尽管葛根素被用于治疗肝损伤、中毒、炎症等,被认为是安全性较高的药物,本研究采用的药物剂量也低于同类研究,但未能进一步检测葛根素在治疗PMO的药理浓度下各脏器的安全性指标,以更深入地评估其潜在副作用,这是本研究的不足之处之一^[20-21]。

本研究发现应用葛根素治疗后,大鼠在第8周时表现出骨密度及骨矿含量增加,以股骨远端、腰椎等富含间充质干细胞的松质骨最为明显。结合我们以往关于葛根素促脂肪干细胞成骨分化的研究,初步探讨了葛根素的促成骨分化能力在其抗骨质疏松治疗中发挥的作用。但葛根素对于人体是否也表现出同样的作用,以及该作用是否能有效降低骨质疏松并发症的发生风险,仍需进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 夏维波,章振林,林华,等.原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(03):281-309.
- 2 Rozenberg S, Al-Daghri N, Aubertin-Leheudre M, et al. Is there a role for menopausal hormone therapy in the management of postmenopausal osteoporosis? [J]. Osteoporosis International, 2020, 31(12): 2271-2286.
- 3 Wang S, Zhang S, Wang S, et al. A comprehensive review on Pueraria: Insights on its chemistry and medicinal value [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110734.
- 4 Yang X, Zheng H, Liu Y, et al. Puerarin for OVX-Induced postmenopausal osteoporosis in murine model: systematic review and Meta-Analysis [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2020, 15(1): 37-42.
- 5 吕遐,扶琼.原发性骨质疏松症的研究进展与最新指南解读[J].临床内科杂志,2020,37(05):319-322.
- 6 Marcus R. Post-menopausal osteoporosis [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2002, 16(3): 309-327.
- 7 Langdahl B, Ferrari S, Dempster DW. Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis [J]. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2016, 8(6): 225-235.
- 8 Yang H, Bullock WA, Myhal A, et al. Cancellous bone May have a greater adaptive strain threshold than cortical bone [J]. JBMR Plus, 2021, 5(5): e10489.
- 9 Clynes MA, Harvey NC, Curtis EM, et al. The epidemiology of osteoporosis [J]. Br Med Bull, 2020, 133(1): 105-117.
- 10 Hamada T, Matsubara H, Hikichi T, et al. Rat model of an autologous cancellous bone graft [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 18001.
- 11 Yin X, Wang X, Hu X, et al. ER β induces the differentiation of cultured osteoblasts by both Wnt/ β -catenin signaling pathway and estrogen signaling pathways [J]. Exp Cell Res, 2015, 335(1): 107-114.
- 12 Liu G, Lu Y, Mai Z, et al. Suppressing MicroRNA-30b by Estrogen Promotes Osteogenesis in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells [J]. Stem cells international, 2019, 2019: 7547506.
- 13 Li J, PENG Y. Effect of puerarin on osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells [J]. The Journal of international medical research, 2020, 48(4): 300060519851641.
- 14 刘永红,陈远明,周昊楠,等.葛根素诱导脂肪干细胞成骨分化的实验研究[J].中国骨质疏松杂志,2020,26(05):631-635.
- 15 Tiyasatkulkovit W, Charoenphandhu N, Wongdee K, et al. Upregulation of osteoblastic differentiation marker mRNA expression in osteoblast-like UMR106 cells by puerarin and phytoestrogens from Pueraria mirifica [J]. Phytomedicine, 2012, 19(13): 1147-1155.
- 16 Yasuda H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system [J]. J Bone Miner Metab, 2021, 39(1): 2-11.
- 17 Xiao L, Zhong M, Huang Y, et al. Puerarin alleviates osteoporosis in the ovariectomy-induced mice by suppressing osteoclastogenesis via inhibition of TRAF6/ROS-dependent MAPK/NF- κ B signaling pathways [J]. Aging, 2020, 12(21): 21706-21729.
- 18 Suthon S, Jaroenporn S, Charoenphandhu N, et al. Anti-osteoporotic effects of Pueraria candollei var. mirifica on bone mineral density and histomorphometry in estrogen-deficient rats [J]. J Nat Med, 2016, 70(2): 225-233.
- 19 Lamy O, Stoll D, Aubry-Rozier B, et al. Stopping denosumab [J]. Curr Osteoporos Rep, 2019, 17(1): 8-15.
- 20 Zhou YX, Zhang H, Peng C. Puerarin: a review of pharmacological effects [J]. Phytotherapy research : PTR, 2014, 28(7): 961-975.
- 21 Li B, Wang Y, Gong S, et al. Puerarin improves OVX-induced osteoporosis by regulating phospholipid metabolism and biosynthesis of unsaturated fatty acids based on serum metabolomics [J]. Phytomedicine, 2022, 102: 154198.

(收稿日期:2022-06-22)

(本文编辑:吕红芝)

覃成禹,周昊楠,陈远明.葛根素对绝经后骨质疏松大鼠不同部位骨骼的抗骨质疏松作用差异的研究[J/CD].中华老年骨科与康复电子杂志,2023,9(1):23-27.