

丹参素对去势大鼠骨质量的影响

屈涛,甄平,杨成伟,蓝旭,张涛,刘华,王世勇

兰州军区兰州总医院全军骨科中心脊柱外科,甘肃兰州 730050

[摘要] 研究口服丹参素能否促进去势大鼠骨形成或减少骨丢失,从而提高骨质量。**方法:**30只雌性SD大鼠随机分为三组,即空白对照组、模型对照组和丹参素组,每组10只。模型对照组和丹参素组行双侧卵巢切除术,其中,丹参素组采用丹参素灌胃($12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。90 d后处死所有大鼠,采用双能X线骨密度仪检测大鼠全身骨密度、股骨和腰椎骨骨密度,AG-IS型电子万能试验机检测股骨生物力学性能,ELISA法检测血清骨钙素和骨碱性磷酸酶(BALP)水平,HE染色后统计股骨近心干骺端成骨细胞数量。**结果:**与空白对照组比较,模型对照组骨密度、股骨生物力学指标、血清骨钙素和BALP水平均降低,骨组织中成骨细胞数量减少;而丹参素组全身骨密度、股骨和腰椎骨骨密度、股骨三点弯曲试验弹性模量、最大载荷、屈服强度、断裂点载荷、血清骨钙素和BALP水平及成骨细胞数量均高于模型对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:**丹参素可提高大鼠骨密度,增强大鼠生物力学性能,促进血清骨形成相关因子的表达以及增加成骨细胞数量,从而提高骨质量。



[关键词] 丹参素/治疗应用;骨质疏松/药物治疗;骨密度;生物力学;碱性磷酸酶;骨钙素;大鼠,Sprague-Dawley;模型,动物;随机对照试验

[中图分类号] R285.5; R68 **[文献标志码]** A

Effects of Danshensu on bone formation in ovariectomized rats

QU Tao, ZHENG Ping, YANG Chengwei, LAN Xu, ZHANG Tao, LIU Hua, WANG Shiyong (*Spine Surgery of Orthopaedics Center, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China*)

Corresponding author: WANG Shiyong, E-mail: wsyonggansu@126.com, <http://orcid.org/0000-0001-7665-5933>

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Danshensu on bone formation in ovariectomized rats. **Methods:** Thirty female SD rats were randomly divided into three groups with 10 rats in each: blank control group, model control group and Danshensu group. The osteoporosis model was induced by bilateral ovariectomy and rats in Danshensu group were fed with Danshensu $12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ by gavage after

收稿日期:2016-10-10 接受日期:2016-11-21

基金项目:国家自然科学基金(81601905)

第一作者:屈涛(1980—),男,学士,主治医师,主要从事脊柱外科工作;E-mail: QuTao1980@126.com; <http://orcid.org/0000-0001-7665-5933>

通讯作者:王世勇(1967—),男,硕士,副主任医师,主要从事脊柱外科工作;E-mail: wsyonggansu@126.com; <http://orcid.org/0000-0001-7665-5933>

ostoporosis model induced. All animals were sacrificed after 90 days. The bone mineral density (BMD) of the whole body, femur and lumbar vertebra was measured by dual energy X-ray absorptiometry. The biomechanical properties of femur were measured by AG-IS mechanical universal testing machine. Serum osteocalcin and bone alkaline phosphates (BALP) levels were measured by ELISA. The number of osteoblasts of proximal femoral metaphysis was counted with light microscopy after HE staining.

Results: Compared with blank control group, BMD, biomechanical properties of femur, serum osteocalcin and BALP levels and the number of osteoblasts were decreased in model control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). While compared with model control group, BMDs of the whole body, femur and lumbar vertebra, the elastic modulus, maximum load, yield strength, breaking point load of femur, the serum levels of osteocalcin and BALP, and the number of osteoblasts were significantly improved in Danshensu group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Danshensu can improve bone quality by increasing bone density, improving biomechanical properties, promoting the expression of osteogenesis-related factors, and increasing the number of osteoblasts.

[**Key words**] Danshensu/therapeutic use; Osteoporosis/drug therapy; Bone density; Biomechanics; Alkaline phosphatase; Osteocalcin; Rats, Sprague-Dawley; Models, animal; Randomized controlled trial

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2016,45(6):587-591.]

丹参素是唇形科植物丹参和甘西鼠尾草的根及根茎中分离出来的一种活性物质,始载于《神农本草经》,中医用于活血化瘀、理气止痛,增加机体代谢和免疫力。近年研究报道,丹参素具有保护脑损伤、抑制血小板聚集及抗凝、抗菌消炎、增强机体免疫力、降低血脂及抗动脉硬化的作用^[1-4]。此外,崔燎等^[5]研究发现,丹参素可促进成骨细胞活性,防治泼尼松所致大鼠骨质疏松。周陆怡等^[6]对丹参素在大鼠体内骨组织中的药代动力学研究,为丹参素治疗骨质疏松的药效物质基础提供了科学依据。本研究通过丹参素灌胃去势大鼠,探讨其对大鼠骨密度、生物力学及血清中骨形成相关因子的影响,以研究其治疗骨质疏松的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、仪器和试剂

5月龄雌性SPF级SD大鼠30只,体质量为(300±20)g,由第四军医大学实验动物中心提供,动物检验合格证编号:SCXK(军)2012-0007。饲养温度控制在(23±5)℃,湿度为(50±10)%,饮用水为自来水,标准大鼠饲料喂养,适度控制卵

巢切除术(OVX)模型大鼠的饮食和饮水。

丹参素(上海麦克林生化科技有限公司);戊巴比妥钠(北京通县育才精细化工厂);双能X线骨密度仪(美国GE公司);AG-IS型电子万能试验机(日本岛津公司);酶标仪(美国BioTek公司);骨钙素试剂盒、骨碱性磷酸酶(bone alkaline phosphates, BALP)试剂盒(英国IDS公司)。

1.2 实验分组及给药

将30只大鼠按随机区组法^[6]随机分为三组:空白对照组、模型对照组、丹参素组,每组10只。编号后称取体质量,微调使得各组体质量均值相当。空白对照组大鼠切除卵巢周围少量脂肪,并进行缝合;模型对照组和丹参素组大鼠行双侧卵巢切除术。三组大鼠均在术后两周进行实验。丹参素组采用丹参素灌胃(12.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹);模型对照组采用蒸馏水灌胃,调整灌胃体积与丹参素组等量;空白对照组正常饲养。每周一称取大鼠体质量,并根据每周称取的体质量调整灌药浓度,灌胃时间为上午10:00至10:30。

1.3 骨密度测量仪检测骨密度

分别在灌胃30、60、90 d后,以40 mg/kg戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠后置于双能X线骨

密度仪测量大鼠全身骨密度;90 d后处死大鼠,分离左侧股骨和全部腰椎骨测定离体骨密度。

1.4 三点弯曲试验检测骨组织生物力学指标

分离右侧股骨,置于万能力学试验机进行三点弯曲试验,跨距设置为 14 mm,加载速度为 2 mm/min,测定最大载荷(N)、弹性模量(N/mm²)、屈服强度(N)和断裂点载荷(N)。

1.5 ELISA 法检测血清生物化学指标

用 10 mL 注射器抽取大鼠心脏血,3350 × g 离心 10 min,取上清液于 -80 ℃ 保存;ELISA 试剂盒测定血清骨钙素和 BALP,按说明书绘制标准曲线,分别于酶标仪 405 nm 处测定吸光度值,按标准曲线计算骨钙素和 BALP 质量浓度。

1.6 HE 染色观察成骨细胞组织病理学变化

大鼠处死后,分离右侧股骨于 4% 的多聚甲醛固定一周后,用 10% 的乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙后石蜡包埋切片,行 HE 染色。用 IPP 6.0 软件统计骨骺线下端 1 mm 处往下 2 mm 区域(称为感兴趣区)内所有成骨细胞的数量,并计算成骨细胞密度,即成骨细胞密度(g/cm²) = 成骨细胞数量 ÷ 感兴趣区表面积。

1.7 统计学方法

统计分析均采用 SPSS 20.0 软件完成,所有

检测数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不同组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较用 LSD 检验法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹参素对大鼠骨密度的影响

如表 1 所示,模型对照组和丹参素组灌胃 30、60、90 d 大鼠全身骨密度、股骨骨密度、腰椎骨骨密度均明显低于空白对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);同时,丹参素组灌胃 60、90 d 大鼠全身骨密度、股骨骨密度和腰椎骨骨密度均高于模型对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。提示丹参素可以改善去势大鼠的骨密度。

2.2 丹参素对大鼠股骨生物力学指标的影响

如表 2 所示,模型对照组股骨三点弯曲试验弹性模量、最大载荷、屈服强度及断裂点载荷均低于空白对照组(均 $P < 0.01$);丹参素组股骨最大载荷和断裂点载荷也低于空白对照组(均 $P < 0.05$),但其弹性模量、最大载荷、屈服强度及断裂点载荷均高于模型对照组(均 $P < 0.01$)。提示丹参素可以改善去势大鼠的骨生物力学性能。

表 1 各组骨密度比较

Table 1 The effects of Danshensu on whole body, femur and lumbar vertebra BMDs

组别	n	全身骨密度			股骨骨密度	腰椎骨骨密度
		灌胃 30 d	灌胃 60 d	灌胃 90 d		
空白对照组	10	0.171 ± 0.004	0.169 ± 0.003	0.170 ± 0.003	0.146 ± 0.004	0.150 ± 0.006
模型对照组	10	0.150 ± 0.003 **	0.147 ± 0.004 **	0.145 ± 0.004 **	0.123 ± 0.004 **	0.130 ± 0.004 **
丹参素组	10	0.151 ± 0.004 **	0.153 ± 0.004 ***	0.153 ± 0.003 ***	0.133 ± 0.003 ***	0.141 ± 0.003 ***

与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

表 2 各组股骨生物力学指标比较

Table 2 Effects of Danshensu on the biomechanical properties of femur in rats

组别	n	($\bar{x} \pm s$)			
		弹性模量(N/mm ²)	最大载荷(N)	屈服强度(N)	断裂点载荷(N)
空白对照组	10	518 ± 56	141 ± 20	72 ± 10	143 ± 6
模型对照组	10	336 ± 35 **	81 ± 9 **	52 ± 7 **	60 ± 7 **
丹参素组	10	451 ± 49 ##	129 ± 23 ***	70 ± 7 ##	111 ± 8 ***

与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,## $P < 0.01$ 。

2.3 丹参素对大鼠血清骨钙素和 BALP 水平的影响

如表 3 所示,模型对照组、丹参素组血清骨钙素和 BALP 水平均低于空白对照组(均 $P < 0.01$);丹参素组血清骨钙素和 BALP 水平均高于模型对照组(均 $P < 0.01$)。提示丹参素可以提高去势大鼠的血清骨钙素和 BALP 水平。

2.4 丹参素对大鼠股骨近心干骺端成骨细胞数量的影响

如图 1 所示,模型对照组大鼠股骨近心干骺端

表3 各组血清骨钙素和骨碱性磷酸酶水平比较

Table 3 Effects of Danshensu on serum osteocalcin and BALP levels in rats

组别	n	$(\bar{x} \pm s, \text{ng/mL})$	
		骨钙素	骨碱性磷酸酶
空白对照组	10	1361 ± 58	546 ± 17
模型对照组	10	828 ± 29**	407 ± 9**
丹参素组	10	1210 ± 116***#	474 ± 10***#

与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ## $P < 0.01$.

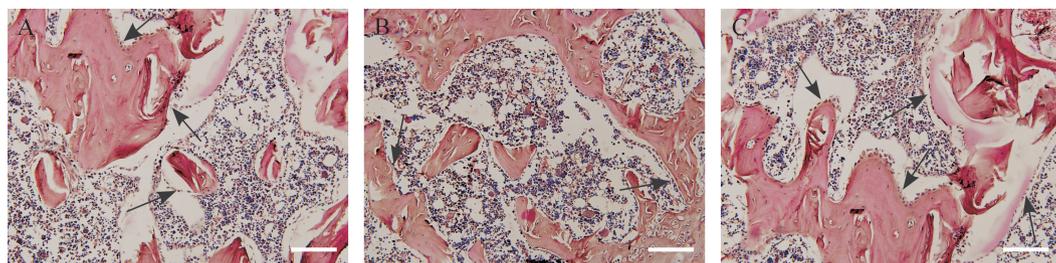


图1 HE染色示各组骨组织形态学表现
A:空白对照组骨组织中成骨细胞数量和形态正常;B:模型对照组成骨细胞数量减少,细胞质干瘪;C:丹参素组成骨细胞增多,细胞质丰富且饱满。粉色为骨小梁,蓝色为骨髓腔细胞,箭头指示的骨小梁表面单层整齐排列扁平细胞即为成骨细胞。标尺=50 μm 。

Figure 1 HE staining of bone tissue

3 讨论

丹参素是酚性芳香酸类化合物,为棕黄色粉末或黄色粉末,多用于活血化瘀、理气止痛、胸闷、心绞痛等^[7]。目前关于丹参素的研究主要集中在心血管疾病上,而在治疗骨质疏松方面的研究较少。有文献报道,丹参素对大鼠的 TNF- α 有明显的抑制作用,可通过降低 TNF- α 的生成来抑制炎症反应,防止破骨细胞生成,从而减少骨丢失^[8]。崔燎等^[5]的研究报道,丹参水提取物可以有效预防糖皮质激素所造成的骨质疏松,其机制与促进成骨细胞活性和骨基质形成、抑制骨吸收有关。这些研究均表明,丹参素可通过减少骨丢失、促进骨细胞生成、抑制骨吸收,从而防治骨质疏松症的发生,这些效果可能是由于丹参素有增加成骨细胞活性、减少骨丢失从而提高骨质量的作用。

目前,双侧卵巢切除模型已成为骨质疏松的经典模型,它极好地模拟了绝经后妇女雌激素表达降低从而易发生骨质疏松症的病理状况^[9]。本实验结果显示,切除双侧卵巢后的大鼠骨流失较快,具体表现为骨密度和骨生物力学性能降低,血清中骨形成相关因子骨钙素和 BALP 的表达量

皮质骨和骨小梁周围成骨细胞分布少于空白对照组和丹参素组。其中,空白对照组、模型对照组、丹参素组大鼠股骨近心干骺端成骨细胞数量分别为 $(0.079 \pm 0.004) \text{g/mm}^2$ 、 $(0.036 \pm 0.004) \text{g/mm}^2$ 和 $(0.071 \pm 0.003) \text{g/mm}^2$, 差异有统计学意义(均 $P < 0.01$);丹参素组大鼠股骨近心干骺端成骨细胞数量多于模型对照组($P < 0.01$)。提示丹参素可增加去势大鼠股骨近心干骺端成骨细胞的数量。

降低,以及成骨细胞数量减少。

骨密度是骨质疏松检测的黄金指标,通过骨密度检测可以了解骨质量和骨强度的变化^[10]。本研究结果显示,丹参素灌胃 60 d 后,丹参素组大鼠的全身骨密度较模型对照组有显著提高,灌胃 90 d 后,丹参素组大鼠的股骨和腰椎骨的骨密度也比模型对照组提高,说明丹参素灌胃能够防止因雌激素缺失所导致的骨丢失。

生物力学实验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的方法^[11]。骨生物力学反映骨本身的强度和韧性,与骨骼矿物质含量和骨密度相关,且不受形状大小的影响。本实验中,股骨三点弯曲试验结果表明,丹参素灌胃可提高股骨最大载荷、弹性模量、屈服强度及断裂点载荷等力学性能,可显著增强骨强度。提示丹参素可提高大鼠材料力学和结构力学的性能,从而增加骨质量。

生物化学指标反映体内骨代谢的状态,能够客观地评价骨形成和骨吸收的作用。骨钙素和 BALP 都是骨形成的相关因子,它们含量的增加表明了骨形成的增加。本研究结果显示,丹参素

灌胃后的大鼠血清骨钙素和 BALP 水平与模型对照组比较都有显著提高,提示灌胃丹参素能够通过增加骨形成相关因子的表达,促进骨形成,从而提高骨质量。

HE 染色是经典的组织学染色的方法,可以清楚地观察到成骨细胞形态并对其计数。本实验 HE 染色后发现,丹参素灌胃后大鼠股骨干骺端皮质骨和骨小梁周围成骨细胞数量明显多于模型对照组。成骨细胞数量增多,表明其骨形成较为活跃,再次证实丹参素有促进骨形成的作用。

综上所述,丹参素能通过提高大鼠全身和离体骨密度,增强股骨生物力学性能、促进血清中骨形成相关因子的表达、调节成骨细胞数量等多个方面促进骨形成,有望成为治疗骨质疏松的新药物。

参考文献

- [1] 艾进超,周惠芬,舒明春,等. 丹参素在局灶性脑缺血大鼠体内药动学—药效学相关性研究[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(14):2751-2755.
AI Jinchao, ZHOU Hui fen, SHU Mingchun, et al. Study on pharmacokinetics-pharmacodynamics correlation of Danshensu in rats with focal cerebral ischemia [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, 39(14):2751-2755. (in Chinese)
- [2] 汪旻晖,单娇娇,李浣钧,等. 丹参素对异丙肾上腺素损伤大鼠内皮血管活性的保护作用及机制研究[J]. *中草药*, 2013, 44(1):59-64.
WANG Minhui, SHAN Jiaojiao, LI Huanjun, et al. Protection of Danshensu on endothelial vascular functions in rats damaged by isoproterenol and its mechanism [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2013, 44(1):59-64. (in Chinese)
- [3] 潘坚扬,赵筱萍,邵青. 丹参素大鼠体内药代动力学及生物利用度研究[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(2):146-149.
PAN Jianyang, ZHAO Xiaoping, SHAO Qing. Pharmacokinetics and bioavailability study of danshensu in rat [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2008, 33(2):146-149. (in Chinese)
- [4] 王天. 高血糖致认知功能障碍信号通路及阿司匹林、丹参素干预作用的研究[D]. 济南:山东大学, 2012.
WANG Tian. The signaling pathway of cognitive decline induced by hyperglycemia and the effects of aspirin and danshensu on the cognitive decline [D]. *Jinan: Shandong University*, 2012. (in Chinese)
- [5] 崔燎,邹丽宜,刘钰瑜,等. 丹参水提物和丹参素促进成骨细胞活性和防治泼尼松所致大鼠骨质疏松[J]. *中国药理学通报*, 2004, 20(3):286-291.
CUI Liao, ZOU Liyi, LIU Yuyu, et al. Preventing cancellous bone loss in steroid-treated rats and stimulating bone formation by water extract of salvia miltiorrhiza and danshensu [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2004, 20(3):286-291. (in Chinese)
- [6] 周陆怡,鲁澄宇. 丹参素在大鼠骨组织中分布动力学研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2010, 16(7):483-486.
ZHOU Luyi, LU Chengyu. Study of distribution kinetics of Danshensu in rat bone tissues [J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2010, 16(7):483-486. (in Chinese)
- [7] 李骅,王四旺,张邦乐,等. 丹参素的药理活性与药物动力学研究进展[J]. *西北药学杂志*, 2011, 26(4):310-312.
LI Hua, WANG Siwang, ZHANG Bangle, et al. Pharmacological action and pharmacokinetics of danshensu [J]. *Northwest Pharmaceutical Journal*, 2011, 26(4):310-312. (in Chinese)
- [8] WANG T, FU F, HAN B, et al. Danshensu ameliorates the cognitive decline in streptozotocin-induced diabetic mice by attenuating advanced glycation end product-mediated neuroinflammation [J]. *J Neuroimmunol*, 2012, 245(1-2):79-86.
- [9] 刘颖. 绝经后不同时期长期激素替代治疗对OVX大鼠认知功能的影响[D]. 北京:中国协和医科大学, 2006.
LIU Ying. The effects of long-term hormone therapy initiated at different stage of menopause on cognitive function in ovariectomized middle-aged rats [D]. *Beijing: Peking Union Medical College*, 2006. (in Chinese)
- [10] CUMMINGS S R, BATES D W, BLACK D M. Clinical use of bone densitometry [J]. *JAMA*, 2002, 288(15):1889-1897.
- [11] 高玉海,陈克明,葛宝丰,等. 不同强度正弦交变电磁场对大鼠骨生物力学性能的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014(10):1170-1174.
GAO Yuhai, CHEN Keming, GE Baofeng, et al. Effect on different intensity of sinusoidal electromagnetic fields on the biomechanical properties in rats [J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2014(10):1170-1174. (in Chinese)